

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

جامعة عين تموشنت بلحاج بوشعيب

Université –Ain Témouchent- Belhadj Bouchaib

Faculté des Sciences et de Technologie

Département de Génie mécanique



Projet de Fin de Cycle

Pour l'obtention du diplôme de Master en : Génie des procédés des matériaux

Domaine : Science et technologie

Filière : Génie des procédés

Spécialité : Génie des procédés des matériaux

Thème

Extraction et valorisation des biodéchets en matières premières de valeur

Présenté par :

Melle : BELBACHIR Intissar

Melle : MANKOURI Houria

Soutenu le : 27/06/2023

Devant le jury composé de :

Dr MERABTENE Meriem	M.C.B	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Président
Dr AZZI Hadjer	M.C.A	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Examinatrice
Dr BELKHADEM Fatima	M.C.B	UAT.B.B (Ain Témouchent)	Encadrante

Année universitaire 2023/2024



Remerciment

Nous remercions en premier lieu Allah, de nous avoir donné la force, la santé, la patience et la volonté.

Remercier l'Université de Belhadj Bouchaïb Ain Témouchent en général et à laboratoire des sciences en particulier qui nous ont offert l'opportunité d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Nous tenons particulièrement à remercier notre encadrante Dr BELKHADEM Fatima pour sa gentillesse, son aide, sa disponibilité et sa patience. Nous lui sommes profondément reconnaissantes pour le soutien qu'elle nous a apporté au cours de ces mois, pour son dévouement exemplaire et pour ses compétences.

Nos remerciements vont également au Président et membres du jury Dr MERABTENE Meriem et Dr AZZI Hadjer pour avoir bien voulu examiner et juger cet humble travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mme AMRAOUI Bahria et BEKADA Wahiba du laboratoire de génie des procédés pour son temps consacré et ses précieux conseils.

Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

Enfin, Nous ne pourrions oublier de remercier du fond du cœur nos parents, nos frères, nos sœurs, nos familles et nos amis pour nous avoir toujours permis de suivre le chemin des études.

Merci pour leurs soutiens, leurs encouragements et surtout leur amour qui a toujours été une source motivante.

Dédicaces

Louange à Dieu seul,

Je dédie ce projet à :

Mes très chers parents Mohammed & Aicha pour leurs sacrifices, leur patience et leur encouragement tout le long de mes études.

« À vous, mes parents, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous. »

Mes chères sœurs Fatima et Soumaya, et mon cher frère Abderrahmane, je souhaite une vie pleine de bonheur, de joie et de réussite.

Ma grande mère, qui je souhaite une bonne santé.

Mon marie Djemai Mohammed Mnaouar.

Sans oublier ma binôme INTISSAR pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

À ma famille

À mes amis, mes enseignants et pour ceux qui m'ont donné de l'aide un jour, que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits.



Houria

Dédicaces

Alhamdulillah pour l'achèvement de ce travail :

Ce modeste travail est dédié spécialement

A mes très chers parents

Au premier mot prononcé par mes lèvres, au symbole de l'amour et de la tendresse, ma chère mère.

À la lumière qui éclaire mon chemin dans la vie, à la chose la plus précieuse de l'existence, mon cher père.

Mes parents, à qui je ne peux rendre justice quoi que je dise ou fasse, je leur dédie le fruit de cet humble travail et les remercie vivement pour leur aide et leur encouragement tout au long de mon parcours académique, que Dieu vous garde comme une couronne sur ma tête.

Aux piliers de notre maison, mes frères Abu Saïf et Fathi.

A ma mère, ma sœur et mon amie Latifa, merci pour votre soutien et votre amour inestimables.

À mon beau-frère Wahid pour vos soutiens et leurs conseils

À mes petits poussins, Basmalah, Tasneem, Ossaïd et Najwa.

A ma grande père

À ma binôme HOURIA pour sa entente, sa sympathie, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

À ma famille

À mes amis, mes enseignants et pour ceux qui

m'ont donné de l'aide un jour,

que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits



INTISSAR

ملخص :

تعتبر الكتلة الحيوية للصوف من الماشية نفايات حيوية مهمة لإنتاج الكيراتين وذلك في مجال الاستخدامات الطبية الحيوية، الصيدلانية ومستحضرات التجميل. يتضمن العمل المطلوب في استخلاص الكيراتين من الصوف عن طريق التحلل المائي باستخدام محلول قلوي في ظل ظروف محسنة وتفاعلها مع الأملاح المعدنية للحصول على مركبات معقدة حيوية الجديدة، يليها استخدامها كمضادات للأوكسدة. يتم تحديد بنية هذه المعقدات عن طريق الاختبارات الكيميائية الحيوية (النينهيدرين و البيوريت) و تمييزها بالبيانات الطيفية للأشعة فوق البنفسجية المرئية و الأشعة تحت الحمراء.

الكلمات الرئيسية: النفايات الحيوية، الصوف، الاستخلاص، معقدات المواد الحيوية، النشاط المضاد الأوكسدة.

Résumé :

La biomasse de laine des bovins est considérée comme un biodéchet important pour la production de kératine pour l'usage biomédical, pharmaceutique et cosmétique. Le travail réalisé est dans le cadre de l'extraction de la kératine issus de la laine par hydrolyse en utilisant du la solution alcaline dans des conditions optimisées et la synthèse organométallique de nouveaux complexes biomatériaux kératiniques, ensuite faire l'application antioxydante.

Les structures de kératine extraite de la laine et ces complexes sont identifiés par des tests biochimiques (biuret, ninhydrine) et caractérisées par des données spectrales UV-Visible et IR.

Mots clés : Biodéchet, Laine, Extraction, Complexes biomatériaux, Activité antioxydante.

Abstract :

The wool biomass from cattle is considered an important biowaste for the production of keratin for biomedical, pharmaceutical, and cosmetic use. The present work is keratin extraction from wool through hydrolysis using an alkaline solution under optimized conditions, than the organometallic synthesis of new keratin-based biomaterial complexes, evaluated by antioxidant application.

The structures of tkeratin extracted and their complexes are identified through biochemical tests (biuret, ninhydrin) and characterized using UV-visible and IR spectral data.

Keyword : Biowaste, Wool, Extraction, Biomaterial complexes, Antioxidant activity.

Sommaire

Liste des figures, schémas et tableaux	page : I
Liste des abréviations	page : IV
Introduction Générale	page : 01
<i>Références</i>	<i>page : 03</i>

A.I : Présentation générales de la kératine

A.I.1 Introduction	page : 04
A.I.2 Valorisation des déchets.....	page : 04
A.I.3 Les sources des déchets kératiniques	page : 05
A.I.4 Définition d'un biopolymère	page : 06
A.I.5 La morphologie de la laine	page : 06
A.I.5.1 Définition de la kératine	page : 06
A.I.5.2 Acide aminé	page : 07
A.I.5.3 Les principales caractéristiques de la kératine	page : 07
A.I.5.4 Les structures de la kératine	page : 08
A.I.6 Classification des acides aminés suivant la nature des chaînes latérales	page : 08
A.I.6.1 Différentes structures protéique	page : 10
A.I.7 Conclusion	page : 13
<i>Références</i>	<i>page : 14</i>

A.II : Extraction de kératine et son domaine d'application

A.II.1 Introduction	page : 16
A.II.2 Méthodes d'extraction de la kératine	page : 16
1. Méthode chimique	page : 17
2. Explosion d'eau supercritique et de vapeur.....	page : 19
3. Extraction assistée par micro-onde	page : 20
4. Méthodes microbiennes et enzymatiques	page : 20
A.II.3 les domaines d'application de la kératine	page : 21
1. Cosmétique et soins capillaires	page : 21
2. Biotechnologie et ingénierie tissulaire	page : 21
3. Industrie textile et cuir	page : 22

4. Alimentation et compléments alimentaires	page : 22
5. Applications médicales et pharmaceutiques	page : 23
A.II.4 La synthèse organométallique	page : 23
A.I.4.1 Définition d'un ligand	page : 24
A.II.4.2 Les métaux de transitions	page : 25
A.II.5 Domaines d'application de complexes organométalliques kératiniques	page : 25
A.II.6 Conclusion	page : 26
<i>Références</i>	<i>page : 27</i>

A.III : Généralités sur le pouvoir antioxydant

A.III.1 Introduction	page : 30
A.III.2.1 Qu'est-ce qu'un radical libre ?	page : 30
A.III.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène	page : 31
A.III.2.3 Le stress oxydant	page : 31
A.III.3.1 Les maladies liées au stress oxydant	page : 31
A.III.3 Antioxydants	page : 32
a. Les antioxydants endogènes	page : 32
b. Les antioxydants exogènes	page : 32
A.III.4 Domaine d'utilisation les antioxydants synthétiques	page : 33
A.III.5 Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydant	page : 33
A.III.6 Applications antioxydants de quelques exemples des biomatériaux kératinique	page : 34
A.III.7 Conclusion	page : 35
<i>Références</i>	<i>page : 36</i>

B.I Extraction de kératine de la laine synthèses des biomatériaux

B.I.1 Introduction	page : 38
B.I.2 Généralités et objectifs	page : 38
B.I.3 Matériels de synthèse	page : 38
B.I.4 Appareillage et Méthode de caractérisation	page : 40
B.I.4.1 Spectrophotométrie UV-Visible	page : 40
B.I.4.2 Spectroscopie infrarouge	page : 40
B.I.5 Chromatographie sur couche mince (CCM)	page : 40

B.I.6 Extraction de kératine de la laine	page : 41
B.6.1 Mode opératoire	page : 41
B.I.7 Identification biochimique de kératine de la laine de mouton extraite	page : 42
B.I.7.1 Identification de kératine extraite par Chromatographie sur couche mince CCM	
page : 42	
B.I.7.2 Identification de kératine extraite par le test de biuret	page : 44
B.I.7.3 Identification de kératine extraite par le test Ninhydrine	page : 45
B.I.8 Synthèse de complexes organométalliques correspondants (KM1-KM3)	page : 47
<i>Références</i>	<i>page : 49</i>

B. II. Expérimental de pouvoir antioxydant des produits testés

B.II.1 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante	page : 50
B.II.2 Principe de la méthode : piégeage du radical libre DPPH	page : 50
B.II.3 Expérimental de pouvoir antioxydant de kératine et leurs complexes	page : 51
B.II.3.1 Activité antioxydante de kératine et leurs complexes organométalliques ...	page : 51
B.II.3.2 Protocole de l'activité antioxydante de kératine et leurs analogues	page : 51
<i>Références</i>	<i>page : 53</i>

C.I L'extraction de kératine et synthèses de ces dérivées.

C.I.1 Introduction	page : 54
C.I.2 L'extraction de kératine par voie chimique (Hydrolyse alcalin)	page : 54
C.I.2.1 Résultats et discussion de l'extraction de la laine par hydrolyse	page : 55
1. Identification structurale de kératine extraite de la laine	page : 58
2. Identification qualitative de kératine de mouton extraite	page : 60
3. Identification des acides aminés par le test Ninhydrine	page : 61
4. Identification des acides aminés par test de Biuret	page : 62
5. Identification structurale de biomatériaux Synthétisés	page : 63
C.I.3 Conclusion	page : 65
<i>Références</i>	<i>page : 66</i>

C.II Résultats et discussion du pouvoir antioxydant

C.II.1 Introduction	page : 67
C.II.2 Activité antioxydante	page : 67

C.II.2.1 Effet piégeage des radicaux libre DPPH page : 67

C.II.3 Conclusion page : 68

Conclusion Générale page : 69

Liste des figures

Figure A.I.1 : Processus de valorisation des déchets	page : 04
Figure A.I.2 : les sources naturelles de kératine	page : 05
Figure A.I.3 : La laine	page : 06
Figure A.I.4 : Structure d'un acide aminé	page : 07
Figure A.I.5 : Squelette polypeptique.....	page : 07
Figure A.I.6 : Différent type d'interaction au sein des fibres Kératiniques et formation de la liaison peptidique avec les extrémités N-terminale et C-terminale.....	page : 08
Figure A.I.7 : Structure des acides aminés hydrophobes	page : 09
Figure A.I.8 : Structure des acides aminés polaires et non chargés	page : 09
Figure A.I.9 : Structure des acides aminés chargés.....	page : 09
Figure A.I.10 : Différentes structures de la kératine	page : 10
Figure A.I.11 : Structure primaire de la protéine	page : 11
Figure A.I.12 : Structure de l'hélice α	page : 11
Figure A.I.13 : structure en feuillet β	page : 12
Figure A.I.14 : Structure tertiaire de protéine	page : 12
Figure A.I.15 : Structure quaternaire de protéine.....	page : 13
Figure A.II.1: classification des méthodes d'extraction de la kératine.....	page : 16
Figure A.II.2: Méthode hydrolyse enzymatique (a) et hydrolyse par voie chimique (b)	page : 17
Figure A.II.3 : Oxydation de kératine résultante par la transformation de désulfite en sulfonâts.....	page : 18
Figure A.II.4 : Réaction de sulfitoxydation qui détruit les liaisons disulfures de la fibre Kératinique	page : 18
Figure A.II.5 : Liquide ionique méthode.....	page : 19
Figure A.II.6 : Extraction de kératine par la méthode de l'explosion d'eau supercritique et de vapeur	page : 19
Figure A.II.7 : Extraction de kératine par micro-onde	page : 20
Figure A.II.8 : Extraction enzymatique de kératine	page : 20
Figure A.II.9 : Gamme complète kératine.....	page : 21
Figure A.II.10 : Fibres textiles kératiniques	page : 22
Figure A.II.11 : Complément alimentaire à partir de kératine	page : 22
Figure A.II.12 : Fils de suture en kératine	page : 23
Figure A.II.13 : Formation d'un complexe de coordination.....	page : 24
Figure A.II.14 : Des exemples des ligands.....	page : 24
Figure A.II.15 : Nouveaux nanocomplexes à base de kératine	page : 26
Figure A.III.1 : Causes et conséquences d'un excès de radicaux libres	page : 30

Figure A.III.2 : Les espèces réactives	page : 31
Figure A.III.3 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées	page : 32
Figure A.III.4 : L'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants.....	page : 32
Figure A.III.5 : Les principales structures des antioxydants naturels.	page : 33
Figure A.III.6 : Synthèse de FK-GlyM (M=ZnII, CuII, NiII)	page : 34
Figure B.I.1 : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible	page : 40
Figure B.I.2. Spectroscopie infrarouge.....	page : 40
Figure B.I.3 : Montage de la Chromatographies sur Couche Mince	page : 44
Figure B.I.4: Test de biuret	page : 45
Figure B.I.5 : Teste de Ninhydrine.....	page : 46
Figure B.I.6 : Synthèse de complexes kératiniques K-Cu, K-Zn et K- Co	page : 47
Figure B.II.1: Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl)	page : 50
Figure B.II.2. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	page : 50
Figure B.II.3 : teste de DPPH.....	page : 52
Figure C.I.1: La laine très courte.....	page : 54
Figure C.I.2 : Préparation des échantillons	page : 55
Figure C.I.3 : Etape de filtration des solution	page : 55
Figure C.I.4 : Résultat de l'essai N°01 et N°03	page : 56
Figure C.I.5 : Résultat de l'essai N°02	page : 56
Figure C.I.6 : Résultat de l'essai N°04 et N°05.....	page : 57
Figure C.I.7: La kératine après centrifugation.....	page : 57
Figure C.I.8 : Spectre IR de la kératine	page : 58
Figure C.I.9 : Spectre UV-Vis de la kératine de la laine	page : 59
Figure C.I.10: Résultat de CCM.....	page : 60
Figure C.I.11 : Préparation des échantillons de kératine pour le test Ninhydrine	page : 61
Figure C.I.12 : Résultat du test Ninhydrine.....	page : 62
Figure C.I.13: Test de biuret.....	page : 62
Figure C.I.14: Spectre IR de kératine, le complexe (K-Cu) et CuSO ₄	page : 64
Figure C.I.15 : Spectre IR de kératine, le complexe (K-Co) et CoSO ₄	page : 64
Figure C.I.16 : Spectre IR de kératine, le complexe (K-Zn) et ZnSO ₄	page : 65
Figure C.II.1 : Piégeage des radicaux libre DPPH par la kératine de la laine	page : 67
Figure C.II.2 : Histogramme représentant le pouvoir antioxydant de kératine de la laine et la vitamine C.....	page : 68

Liste des schémas

Schéma B.II.1 : Extraction de kératine de la laine de mouton	page : 38
Schéma B.I.2 : Les principaux étapes de l'extraction de kératine de la laine de mouton	page : 41

Liste des tableaux

Tableau I.1: comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines de la laine, les cheveux humains et les plumes.....	page : 10
Tableau B.I.1 : Caractéristiques des produits chimiques et les solvants utilisés.....	page : 39
Tableau B.I.2 : Rendements de kératine.....	page : 48
Tableau B.I.3 : Rendements des complexes.....	page : 48
Tableau C.I.1: Les différents essais effectués pour extraire la kératine de la laine.....	page : 55
Tableau C.I.2 : Les fréquences de vibration de quelques liaisons de kératine et ces complexes.....	page : 63

Liste des abréviations

DMSO: Sulfoxyde de diméthyle

THF : Tétrahydrofurane

Da : Dalton

PH : Potentiel hydrogène

SFE: L'explosion flash à la vapeur

Cu: Cuivre

Fe: Fer

Ni: Nickel

Pd: Palladium

Pt: Platine

Mg: Magnésium

Ca: Calcium

Zn: Zinc

Mn : Manganèse

Co: Cobalt

Mo: Molybdène

K : Potassium

MnO₂ : Dioxyde de manganèse

CuSO₄ : Sulfate de cuivre

CoSO₄ : Sulfate de cobalt

ZnSO₄ : Sulfate de zinc

H₂O : L'eau

NaOH : Hydroxyde de sodium

Gd₂O₃ : Oxyde de gadolinium (III)

DOX: Doxorubicine

ERO: Espèces réactives de l'oxygène

SOD: Superoxyde dismutase

GPx : Glutathion peroxydase

TRAP : Paramètre du piégeage du radical total

PCL : Photochimie-luminescence

ORAC : Capacité d'absorbance du radical oxygène

ABTS : 2,2-azinobis-(3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate)

TEAC : Capacité anti-oxydant équivalente de Trolox.

DMPD : Balayage du radical cation N, N-diméthyle-phénylènediamine

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

FRAP : Capacités réductrices ferriques d'antioxydants

TOSC : Capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux

CCM: Chromatographie sur couche mince

Alip : Aliphatique

ar : Aromatique

R_f: Rapport frontal ou Rétention frontale

d substance : Distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache).

d solvant : Distance parcourue par front du solvant.

IR : Infrarouge.

UV-vis : Ultraviolet-visible.

R : Rendement

° C : Degrés Celsius

min : Minute

g : Gramme

h : Heures

M : Masse Molaire

T_f : Point de fusion

mL : Millilitre

µg/mL : Microgramme/millilitre

m : Masse d'échantillon

INTRODUCTION GENERALE

Introduction Générale

La nature offre une richesse incroyable en créant des matériaux avec des propriétés intéressantes à savoir les propriétés thermiques, diélectriques et biologiques qui restent souvent sous-exploitées dans toutes leurs potentialités.

Pour limiter le problème d'écologie environnemental, les chercheurs s'intéressent à valoriser les biodéchets de source animal et humaine (bovine, volaille et cheveux), On peut le remplacer par le terme coproduit.

Aujourd'hui, l'exploitation des coproduits à savoir la laine de mouton en vue d'une valorisation de kératine par des méthodes enzymatiques, microbiologique et chimiques ^{1,2}... etc.

La kératine est une protéine structurelle majeure à haute teneur en soufres constituée environ 20 types d'acide aminés ³. En raison de sa diversité de structures et de leurs propriétés ^{4,5}, la kératine est caractérisée par sa multitude d'application industrielle telle que dans l'industrie de papèterie, pharmaceutique ^{6,7} et dans le domaine catalytique, biomédical ⁷ (tissus antibactériens), biotechnologique ⁸ (couche mince), ainsi que dans le développement de nouveaux biocomposites et cosmétique ⁹.

Dans ce travail, nous nous sommes basés sur la laine comme source kératinique. Ce choix est justifié par le fait que c'est la matière la plus utilisée par de nombreux chercheurs pour caractériser la kératine et de plus, elle se trouve en abondance sur le marché.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'extraction de ligand appelé la kératine issue de la laine par hydrolyse alcaline ainsi que ces complexes organométallique biomatériaux kératiniques correspondants en utilisant les sels de métaux ensuite faire l'application comme des agents antioxydants.

Le manuscrit outre l'introduction se divise en trois parties principales : La partie **A**, **B** et **C**

- La partie **A** possède trois chapitres. Le premier chapitre contenant un rappel bibliographique donnant un aperçu sur la présentation générale de kératine, Les principales caractéristiques et son domaine d'application en industrie. Le second chapitre détaillant d'un point de vue théorique les différentes méthodes de l'extraction

INTRODUCTION GENERALE

de kératine et citer quelques exemples des biomatériaux synthétisés à bases de kératine. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à un rappel théorique sur l'activité antioxydante et l'application de kératine comme agent antioxydant.

- La partie **B** inclut les appareillages et les techniques, on décrira tous les modes opératoires utilisés pour extraire la kératine de la laine, les tests biochimiques et synthèse caractériser les biomatériaux synthétisés à base de kératine et la partie antioxydante.
- La partie **C** comporte toutes les interprétations et les discussions des résultats concernant : exploitions leur interprétation par : l'analyse par IR, UV-vis, le contrôle par CCM et l'identification biochimique telles test biuret et ninhydrine ainsi que l'étude de l'activité antioxydante.
- Pour la fin, une conclusion générale résumant l'essentiel des résultats et les perspectives.

Références :

1. Blackburn S., Lee G. R. The reaction of wool keratin with alkali. *Biochim. Biophys. Acta*, 19 : 505-512, 1956.
2. Sanchez S., Demain A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org. Process Res. Dev.* 15, 224-230, 2011.
3. Tesfay B. Sithol, D. Ramjugernath, V. Chunilall. Valorisation of chicken feathers : Characterisation of chemical properties. *Waste Management.* 68 : 626-635. 2017.
4. Wang B., Yang W., Mckittrick J., Meyers M.A. Keratin : structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science.* 76 : 229-318. 2016.
5. Nolin L. Outils d'aide à l'étude des protéines : modélisation surfacique et visualisation sémantique des feuilletts β . *Thèse de Doctorat*, Université de Reims Champagne Ardenne. 2010.
6. Hamouche H. Caractérisation des fibres kératiniques en vue de leur utilisation comme capteur d'humidité. *Mémoire de Magister*, Electronique, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 2012.
7. Messaoud A., Bounatiro S., Louddani S.N. Production de la kératine et ses dérivés par le recyclage d'agrodéchets via des traitements microbiens. *Mémoire de Master*, Génie de l'Environnement Université Saad Dahleb, Blida. 2023.,
8. Djebbar S., Yousfi B. Contribution à la valorisation de plumes de volaille comme élément de milieu de fermentation fongique. *Mémoire de Master*, Microbiologie, Université Constantine 1, Constantine. 2014.
9. Secchi G. Role of protein in cosmetics. *Clinics in dermatology*, 26 (4) : 321-325. 2008.

PARTIE THEORIQUE

Chapitre A.I : Présentation générales de la kératine

A.I.1 Introduction :

La valorisation des déchets est devenue une priorité mondiale en raison de la nécessité de gérer de manière durable les ressources et de réduire l'empreinte écologique.

Les biodéchets, également appelés déchets organiques, sont des déchets d'origine végétale ou animale qui peuvent être décomposés naturellement par des organismes vivants. La laine est un exemple de biodéchet d'origine animale, provenant de la tonte des moutons, qui peut être recyclé pour réduire notre impact sur l'environnement et préserver les ressources naturelles.

La laine est une fibre naturelle qui est largement utilisée dans l'industrie textile pour la confection de vêtements, de couvertures et d'autres produits. Elle est aussi utilisée comme isolant thermique dans la construction, grâce à ses propriétés de régulation de la chaleur et de l'humidité. En raison de sa composition organique, la laine est entièrement biodégradable.

Ce chapitre présente une vue d'ensemble de la kératine, ses sources, ses caractéristiques et ses diverses structures, ainsi que les acides aminés qui la composent ^{1,2}.

A.I.2 Valorisation des déchets :

Par valorisation, on entend toute transformation de résidus ou de co-produits industriels alimentaires en vue de les réintroduire sur le marché à titre de nouveaux ingrédients ou comme nouveaux produits ³ (figure A.I.1).

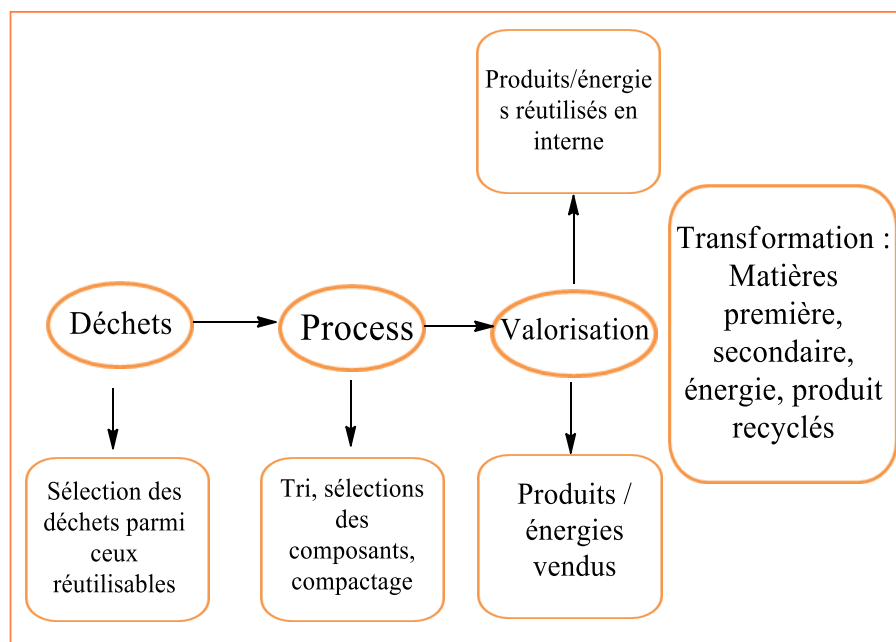


Figure A.I.1 : Processus de valorisation des déchets

La figure précédente résume l'évolution et le devenir des déchets depuis sa génération jusqu'à sa valorisation. Cette dernière peut mener à un produit qui sera inclus dans la chaîne de fabrication ou vendu comme matière première pour une production possible comme par exemple la kératine extraite de la laine de mouton.

A.I.3 Les sources des déchets kératiniques :

Les matières d'origine kératinique comprennent, les cornes, les sabots d'animaux, les poils de lapin, les plumes et la laine sont les principaux déchets kératiniques proviennent de l'industrie de la viande, en particulier de l'abattage. D'autres déchets sont issus des industries utilisant ces biopolymères kératiniques comme matière première. Par exemple, on trouve les déchets de bourre et de poussière de laine, provenant de l'amont de l'industrie lainière, ainsi que les déchets d'abattoirs, tels que les plumes de volailles (poulets, dindes... etc) et des palmipèdes gras (canards, oies) ainsi que les cheveux humains provenant des salons de coiffure ^{4,5}.

Les explications qui viennent montrent que les propriétés morphologiques et physico-chimiques sont presque identiques (figure A.I.2)



Figure A.I.2 : Les sources naturelles de kératine

A.I.4 Définition d'un biopolymère :

Les polymères sont des biomatériaux d'origine naturels composés de très longues chaînes (macromolécules), elles-mêmes formées de molécules élémentaires (unité monomères) assemblées entre elles par des liaisons chimiques covalentes. Leur « Squelette » est constitué d'atomes de carbone ⁶.

A.I.5 La morphologie de la laine :

La laine est l'une des sources de protéines les plus abondantes et sous-exploitées. C'est une fibre naturelle provenant de la toison des moutons et d'autres mammifères, caractérisée par une structure complexe et des propriétés uniques et elle fait partie de la famille des fibres protéiques. Elle est composée d'environ 97% de kératine, les 3% restants étant des lipides (2%) et des sels minéraux (1%). Elle est donc considérée comme une protéine fibreuse ⁷.



Figure A.I.3 : La laine

A.I.5.1 Définition de la kératine :

La kératine est une protéine fibreuse et insoluble dans l'huile, le benzène, le toluène et soluble dans certains solvants organiques tels que l'acétone, l'éthanol, le méthanol, sulfoxyde de diméthyle (DMSO) et tétrahydrofurane (THF) qui constitue la principale composante des productions épidermiques comme les cheveux, les poils, les ongles, les cornes, les plumes, les écailles chez les vertébrés et la laine ⁸.

A.I.5.2 Acide aminé :

Un acide aminé est un acide carboxylique qui possède également un groupe amine.

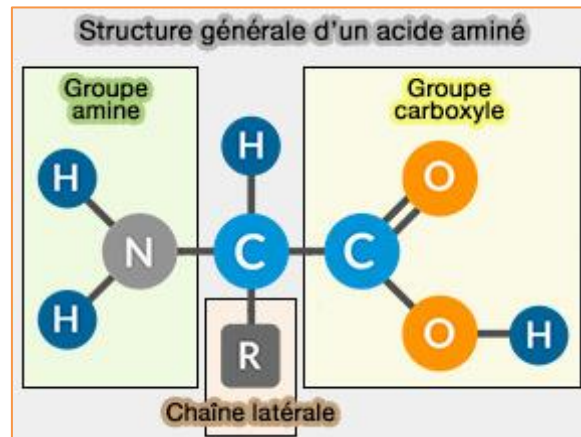


Figure A.I.4 : Structure d'un acide aminé

A.I.5.3 Les principales caractéristiques de la kératine :

- C'est une protéine riche en acides aminés sulfurés, notamment la cystéine.
- Elle forme le cytosquelette des kératinocytes, les cellules qui produisent.
- Chez les mammifères, elle existe sous deux formes principales : l'alpha-kératine et la bêta-kératine, cette dernière étant plus courte en acides aminés.
- Les kératines sont résistantes à la digestion par les protéases comme la trypsine et la pepsine.
- Elles jouent un rôle de protection et de structure dans les tissus épidermiques^{9,10,11}.

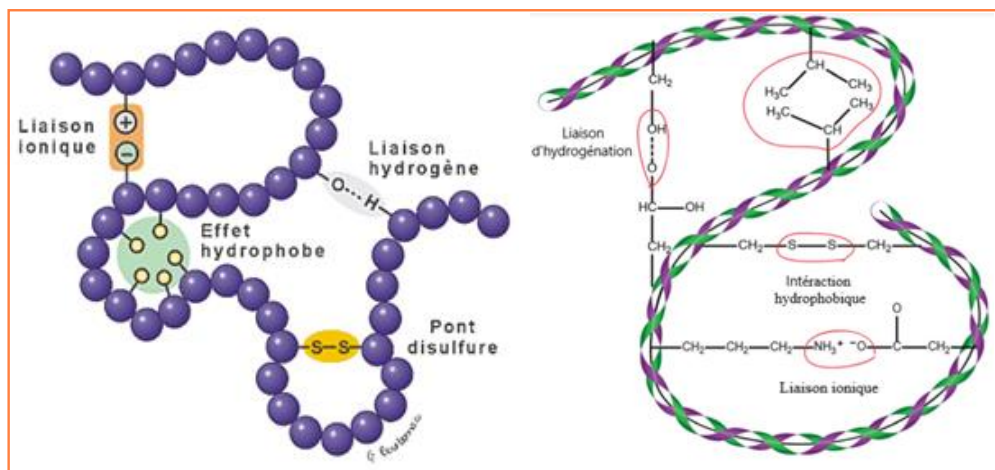


Figure A.I.5 : Squelette polypeptidique

A.I.5.4 Les structures de la kératine :

La kératine est un biopolymère protéinique d'un poids moléculaire varie de 10^4 à 10^5 Da constituées de 20 acides aminés naturels différents. Ces derniers sont essentiellement des acides α -aminés. Ces chaînes sont riches en cystéine. La structure de la base comprend une fonction acide carboxylique (COOH), une fonction aminée (NH₂), l'atome d'hydrogène est couplé à un atome de carbone asymétrique (C α) sous sa forme R, la chaîne latérale distingue l'acide aminé.

Un acide aminé contenant un groupe sulfhydryle qui permet la formation de liaisons disulfures entre les chaînes, renforçant ainsi la structure de la kératine. La condensation entre deux acides aminés d'une fonction amine et d'une fonction acide carboxylique forme un groupe amide, qui constitue la liaison peptidique ^{12,13} (figure A.I.6).

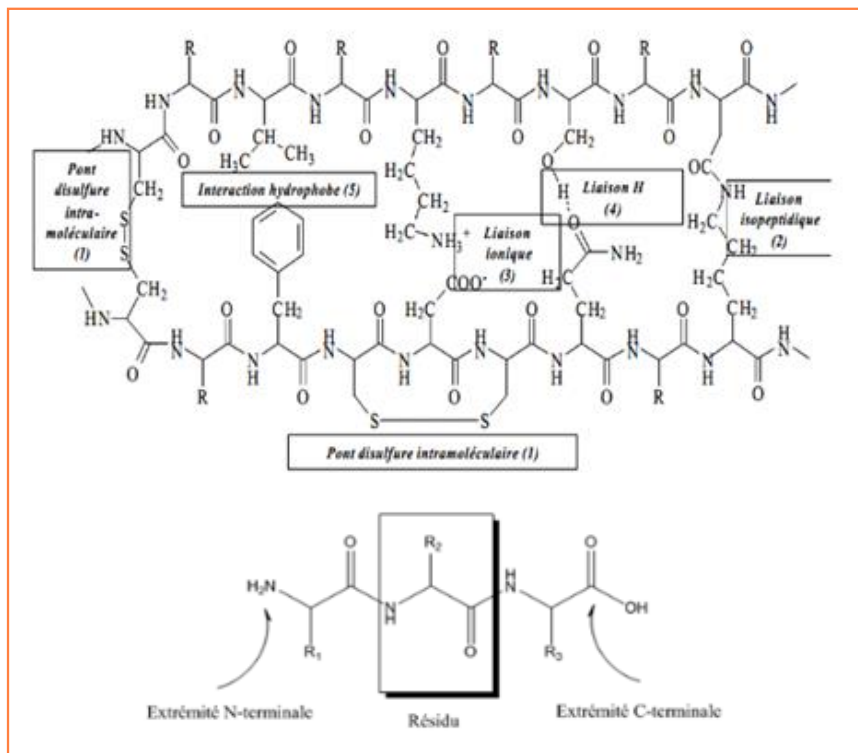


Figure A.I.6 : Différent type d'interaction au sein des fibres Kératiniques et formation de la liaison peptidique avec les extrémités N-terminale et C-terminale

A.I.6 Classification des acides aminés suivant la nature des chaînes latérales :

Il existe 20 acides aminés naturels qui composent les protéines. On peut les répertorier en trois groupes selon leur réactivité chimique : polaires, chargés, hydrophobes ^{14,15}.

- **Les acides aminés hydrophobes** : ont des chaînes latérales non chargées et non polaires. Ce sont la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane et la méthionine ^{14,15}.

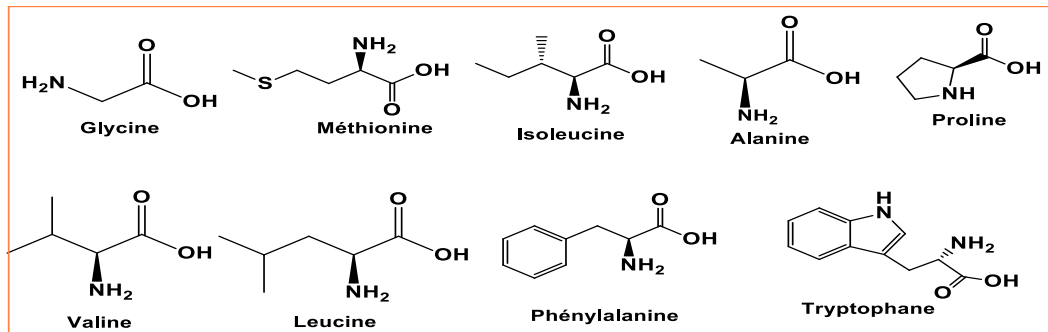


Figure A.I.7 : Structure des acides aminés hydrophobes

- **Les acides aminés polaires et non chargés** : sont la sérine, la thréonine, la cystéine, la tyrosine, l'asparagine et la glutamine. Ils sont caractérisés par une chaîne latérale qui contient des groupements polaires, mais qui ne porte pas de charge nette à PH physiologique ^{14,15}.

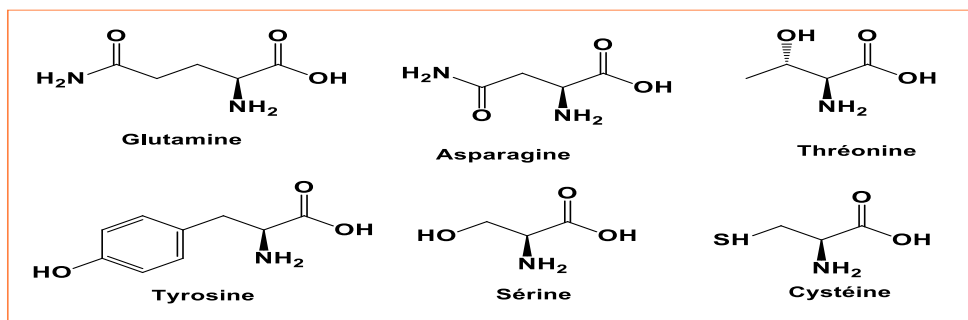


Figure A.I.8 : Structure des acides aminés polaires et non chargés

- **Les acides aminés chargés** : sont ceux qui possèdent une chaîne latérale portant une charge électrique à PH physiologique : l'acide aspartique et l'acide glutamique sont chargé négativement alors que la lysine, l'arginine et l'histidine sont chargé positivement ^{14,15}.

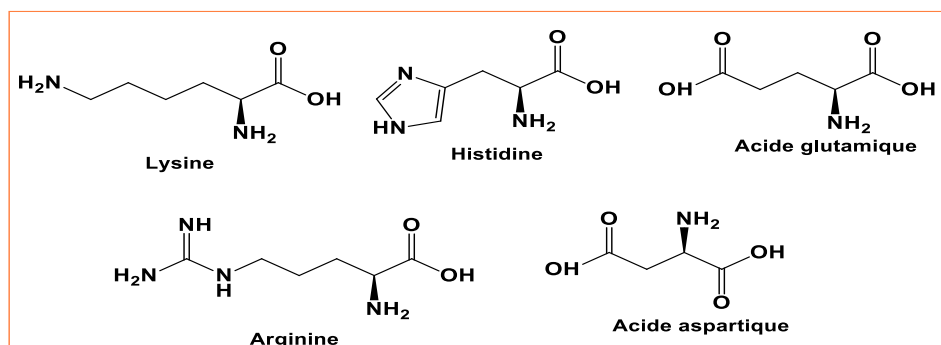


Figure A.I.9 : Structure des acides aminés chargés

Tableau I.1: comparaison de la composition en acides aminés entre les kératines de la laine, les cheveux humains et les plumes ⁴.

Les acides aminés	La laine	Les cheveux humains	Les plumes
Acide aspartique	6.4-7.0	7.09-9.3	5.42-6.7
Acide glutamique	11.3-13.4	11.56-16.6	6.9-9.3
Lysine	2.85-3.4	2.62-3.5	0.6-1.8
Arginine	3.3-7.1	3.19-7.2	1.7-4.96
Histidine	0.8-0.9	0.7-1.1	0.2-0.5
Serine	9.50-10.9	9-11.66	7.2-14.1
Thréonine	5.8-6.4	5.5-19.64	0.8-4.1
Tyrosine	1.96-4.1	1.2-2.5	4.6-4.15
Cystéine	5.7-11.4	7.6-12.92	5.07-7.8
Glutamine	5.9-13	6.0-10.0	4.62-10
Asparagine	2.0-6.2	3.0-5.0	2.0-4.0
Méthionine	0.4-0.59	0.4-2.49	0.1-0.41
Leucine	6.8-8.1	1.2-8.01	6.16-8.3
Valine	5.80-6.4	6.18-6.86	2.0-7.8
Phénylalanine	2.1-2.9	1.91-2.22	3.1-4.3
Glycine	8.0-9.4	5.2-6.56	7.16-16.2
Alanine	5.2-5.81	4.70-6.9	3.13-8.7
Proline	6.0-7.1	3.8-9.55	9.8-18.8
Isoleucine	3.0-3.5	3.12-3.7	3.2-4.3
Tryptophane	0.43-1.0	0.5-1.0	0.5-0.9

A.I.6.1 Différentes structures protéique :

On distingue quatre niveaux de structure en fonction de différentes interactions entre les acides aminés composant la kératine :

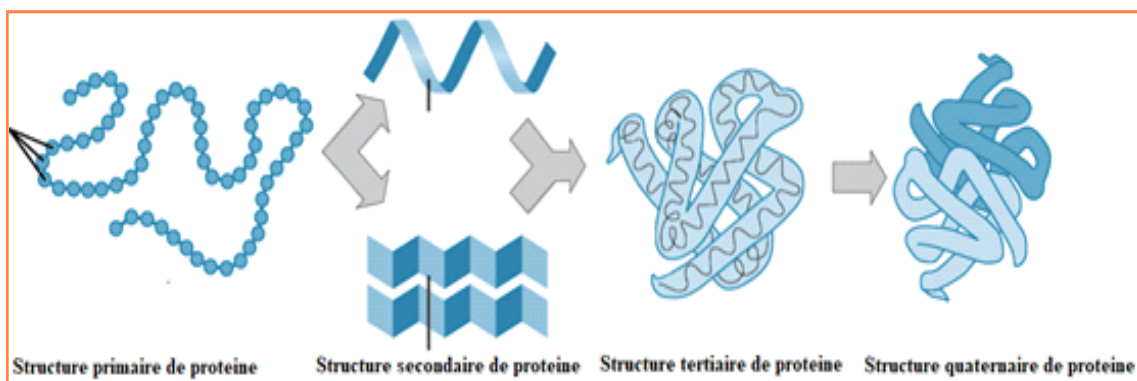


Figure A.I.10 : Différentes structures de la kératine

▪ La structure primaire :

La structure primaire est l'ordre d'enchaînement des acides aminés de la chaîne protéique (figure A.I.11)

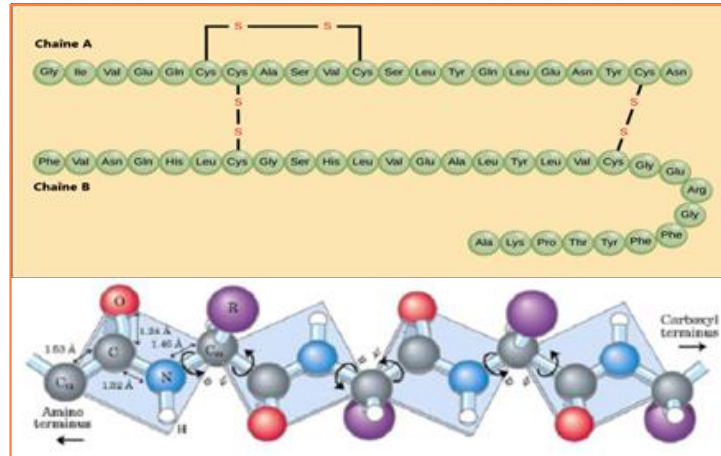


Figure I.11 : Structure primaire de la protéine

▪ La structure secondaire :

Cette structure comporte deux types plus importants, l'hélice α et le feuillet β , les liaisons d'hydrogène sont formées entre les groupements C=O et H-N. dans le cas des protéines, elle consiste à définir les repliements réguliers et répétitifs : hélices, feuillets, coudes ^{14,15,16}.

1. L'hélice α :

L'hélice α est une structure en bâtonnet dans laquelle la chaîne polypeptidique s'enroule autour d'un axe fixe (hypothétique), les chaînes latérales étant reflétées à l'extérieur (figure A.I.12). L'hélice α est quasiment toujours une hélice droite son sens d'enroulement des aiguilles d'une montre quand on regarde dans l'axe de la chaîne principale ^{14,15,16,17}.

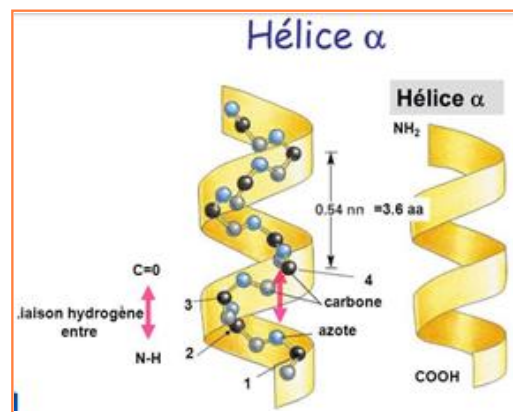


Figure A.I.12 : Structure de l'hélice α

2. Le feuillet β :

Le feuillet plissé β diffère notablement de l'hélice α par le fait qu'il soit une structure presque totalement étirée en feuillet (structure en zig-zig) est non pas un bâtonnet (structure hélicoïdale)¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶. Dans les feuillets β , les chaînes latérales se retrouvent alternativement au-dessus et en dessous du plan¹⁸ (figure A.I.13).

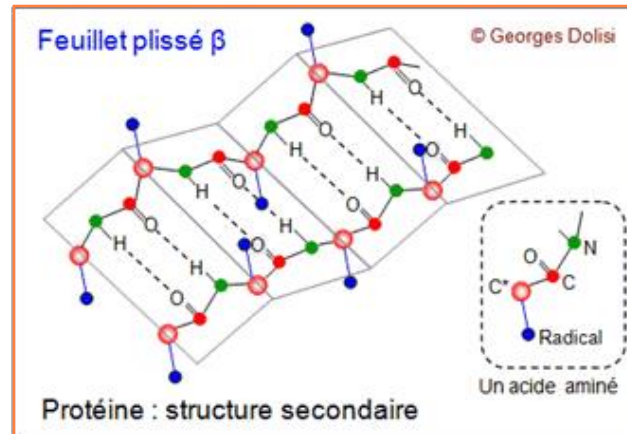


Figure A.I.13 : structure en feuillet β

▪ La structure tertiaire :

La structure tertiaire d'une protéine est sa disposition tridimensionnelle : c'est la donnée de l'agencement des structures secondaires et de l'organisation spatiale des chaînes latérales¹⁹ (figure A.I.14).

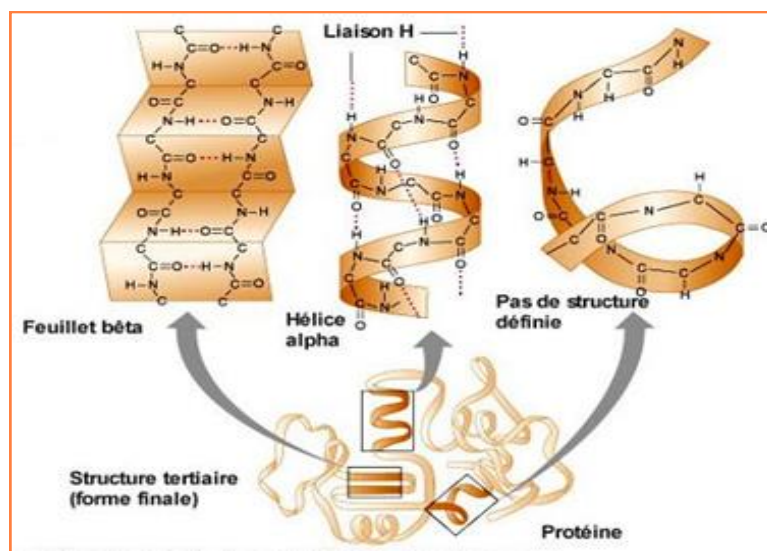


Figure A.I.14 : Structure tertiaire de protéine

▪ **La structure quaternaire :**

La structure quaternaire est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines et représente l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques possédant chacune sa propre structure tertiaire. Chaque monomère est appelé sous-unité et l'agencement tridimensionnel des sous-unités est stabilisé le plus souvent par le biais d'interactions non covalentes ¹⁹.

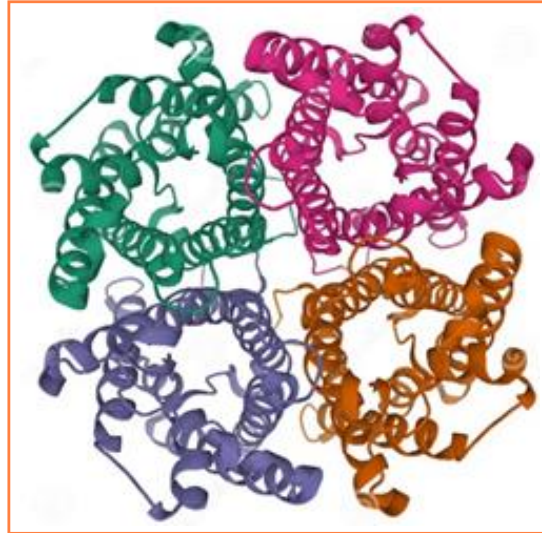


Figure I.15 : Structure quaternaire de protéine

A.I.7 Conclusion :

En conclusion, la kératine issue des déchets tels que la laine de mouton représente une ressource précieuse pour la valorisation des biodéchets. Les propriétés uniques de la kératine, telles que sa résistance et sa richesse en acides aminés soufrés, la rendent idéale pour diverses applications industrielles et biomédicales. La classification des acides aminés selon la nature de leurs chaînes latérales joue un rôle crucial dans la compréhension de la structure et de la fonction de la kératine. La valorisation des déchets kératiniques non seulement contribue à la réduction des déchets, mais ouvre également de nouvelles avenues pour l'innovation et le développement durable.

Référence :

1. Hamouche H. Caractérisation des fibres kératiniques en vue de leur utilisation comme capteur d'humidité. Mémoire de Magister, Electronique, *Université Mouloud Mammeri*, Tizi-Ouzou. 2012.
2. Messaoud A., Ounatiro S.B., Louddani N. S. Production de la kératine et ses dérivés par le recyclage d'agrodéchets via des traitements microbiens. *Mémoire de Master*, Génie de l'Environnement, Université Saad Dahleb, Blida. 2023.
3. Boucherba N. Valorisation des résidus agro-industriels. *Thèse de Doctorat*, Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaïa. 2014.
4. Kumawat, T K. Sharma, Sharma, V.A., Chandra S. Keratin waste : the biodegradable polymers. In Keratin. *Intech Open*. 2018. doi : 10.5772/intechopen.79502.
5. Jacques C. Etude de la valorisation des déchets d'origines kératiniques par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filament continu : cas spécifique de la laine. *Thèse de doctorat*, Université de Toulouse. 2003.
6. Seyni A. Propriétés physico-chimiques et d'usage de matériaux composites à charge dégradables produits par co-broyage. *Thèse de Doctorat*, l'université de Toulouse. 2008.
7. Jacques C. Etude de la valorisation des déchets d'origines kératiniques par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filament continu : cas spécifique de la laine. *Thèse de Doctorat*, Université de Toulouse. 2003.
8. Shavandi A., Silva T.H., Bekhit A.A, Bekhit A.E.-D.A. Keratin : dissolution, extraction and biomedical application. *Biomater. Sci.*, 5 :1699-1735, 2017, doi.org/10.1039/C7BM00411G.
9. Fraser R., Macrae T., Rogers G. Keratins, their composition, structure and biosynthesis. Charles C. Thomas, Springfield. 1972.
10. Tesfay B. Sithol, D. Ramjugernath, V. Chunilall. Valorisation of chicken feathers : Characterisation of chemical properties. *Waste Management*. 68 : 626-635. 2017.
11. Wang B., Yang W., Mckittrick J., Meyers M.A. Keratin : structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*. 76 : 229-318. 2016.
12. Hermann H., Braguulla. D., Homberger G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy*. 214 (4) : 516-559. 2009

13. Sharma S., Gupta A., Kumar Ashok N. Keratin as a protein Biopolymer : Extraction from Waste Biomass and Applications. S. Sharma, A. Kumar, (Eds) Springer.1-18. 2019. doi :10.1007/978-3-030-02901-2_1.
14. Nolin L. Outils d'aide à l'étude des protéines : modélisation surfacique et visualisation sémantique des feuilletts β . *Thèse de Doctorat*, Université de Reims Champagne Ardenne. 2010.
15. Berrada S. Les Proteines : Structure, Propriétés Et Applications Technologiques, *Biochimie Appliquée dans les Filières SBSSA*. 2009.
16. Boudesocque L. Nouvelles Méthodologies de Purification de Peptides par Chromatographie de Partage Centrifuge : Application à L'isolement et à La Purification de Peptides Bioactifs. *Thèse de Doctorat*, Université de Reims Champagne Ardenne. 2010.
17. Jacques C. Etude de la valorisation des déchets d'origine kératinique par voie thermomécano-chimique en vue de l'obtention de filaments continus : cas spécifique de la laine. *Thèse de Doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse. 2003.
18. Daubenfeld T. Etude de complexes protéiques non covalents par spectrométrie de masse FT-ICR. *Thèse de Doctorat*, Ecole Polytechnique. 2006.
19. Chevalier C. Biochimie Structurale, Les Protides, *Cours biochimie Protides IFTAB*. 2006.

Chapitre A.II : Extraction de kératine et son domaine d'application

A.II.1 Introduction :

La kératine est une protéine fibreuse connue pour sa résistance et sa capacité à protéger et renforcer les tissus.

L'extraction de la kératine peut se faire à partir de différentes sources, notamment la laine des moutons, les plumes de volaille, les poils d'animaux, les cornes de bovins, les griffes de félins, les écailles de poisson, etc. le processus d'extraction varie en fonction de la source et peut impliquer des traitements chimiques ou mécaniques pour isoler la kératine pure.

Une fois extraite, la kératine est utilisée dans de nombreuses applications, notamment dans l'industrie cosmétique pour la fabrication de produits capillaires et de soins de la peau. Elle est également utilisée dans l'industrie textile pour renforcer les fibres des tissus et dans l'industrie médicale pour la fabrication de sutures chirurgicales et de pansements.

En résumé, la kératine est une protéine essentielle aux propriétés uniques, largement utilisée dans divers domaines pour ses qualités de résistance et de protection. Son extraction et ses applications sont donc des sujets d'intérêt pour de nombreux secteurs industriels.

A.II.2 Méthodes d'extraction de la kératine :

La kératine peut être obtenue par différentes méthodes d'extraction ¹:

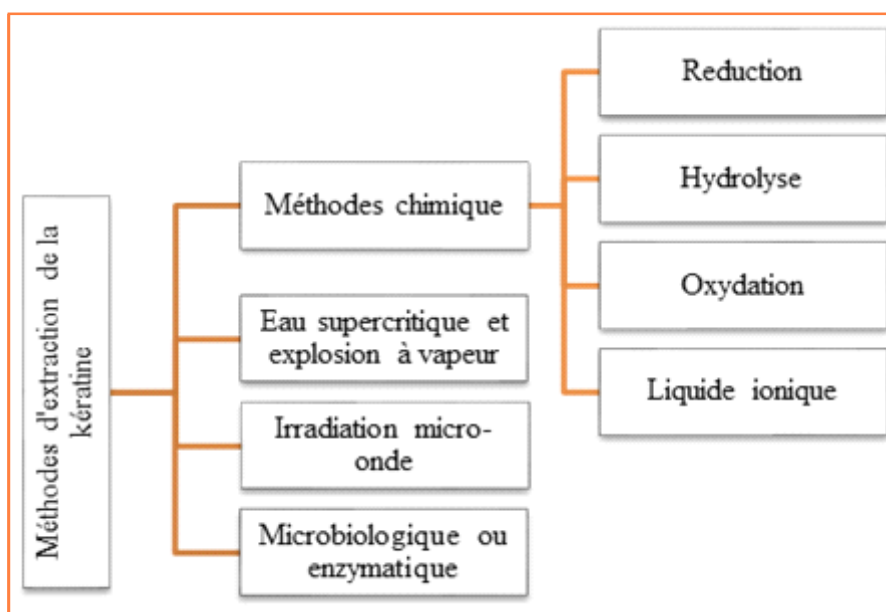


Figure A.II.1: classification des méthodes d'extraction de la kératine

A.II.2.1 Méthode chimique :

L'extraction chimique de la kératine est un processus par lequel la kératine présente dans les tissus durs tels que les cheveux, les plumes, les ongles et les cornes, est séparée des autres composants de ces tissus. Les méthodes d'extraction chimique de la kératine impliquent généralement l'utilisation de produits chimiques tels que des agents réducteurs, des acides, des bases ou des oxydants pour rompre les liaisons intermoléculaires de la kératine et la libérer des tissus environnants ².

▪ Réduction méthode :

Les premières études sur la solubilisation de la laine par la méthode de réduction par des agents réducteurs depuis l'année 1930, tels que les thiols (thioglycolate de sodium, acide and thioglycolique) qui sont utilisés pour réduire les fibres de laine remonte aux années 1930-1940 ^{3,4}.

▪ Alcaline méthode :

Cette méthode est connue depuis de nombreuses années pour sa capacité à solubiliser la laine lors de son traitement avec une solution alcaline, le noyau de soufre de cystine commence à se détruire ainsi qu'au niveau des chaînes peptidiques ⁵.

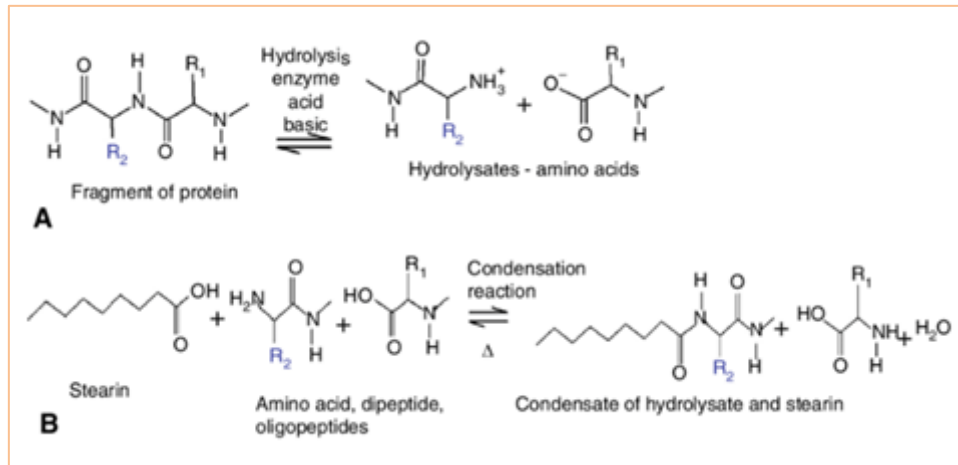


Figure A.II.2: Méthode hydrolyse enzymatique (a) et hydrolyse par voie chimique (b)

▪ **Méthode de l'oxydation :**

Le matériau kératinique est traité avec un agent oxydant pour solubiliser les protéines de kératine ⁶.

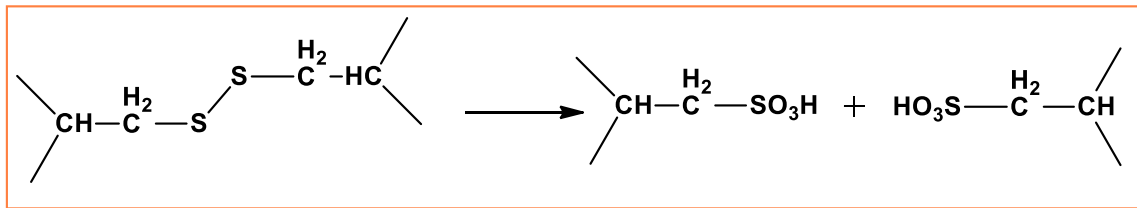


Figure A.II.3 : Oxydation de kératine résultante par la transformation de désulfite en sulfonâ

▪ **Méthode de sulfitolyse :**

La méthode de sulfitolyse est un processus par lequel les fibres de kératine sont soumises à un traitement avec du sulfitol pour décomposer la kératine ⁶.

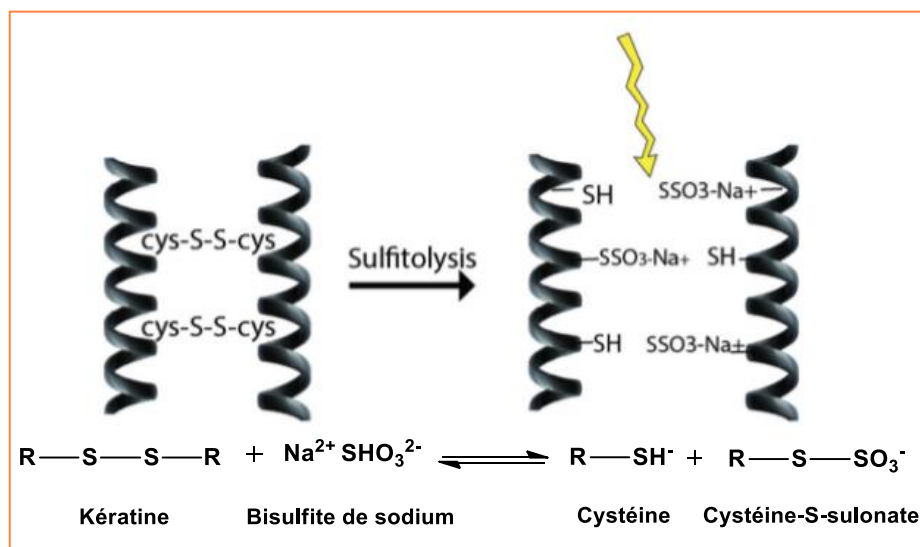


Figure A.II.4 : Réaction de sulfitolyse qui détruit les liaisons disulfures de la fibre kératinique.

▪ **Méthode de liquide ionique :**

L'extraction de la kératine à l'aide de liquides ioniques (LI) est une méthode innovante et respectueuse de l'environnement. Les liquides ioniques sont des sels liquides à température ambiante ou proche de celle-ci, qui possèdent des propriétés uniques telles qu'une faible pression de vapeur, une stabilité chimique élevée et une solubilité sélective pour de nombreux composés organiques et inorganiques ⁷.

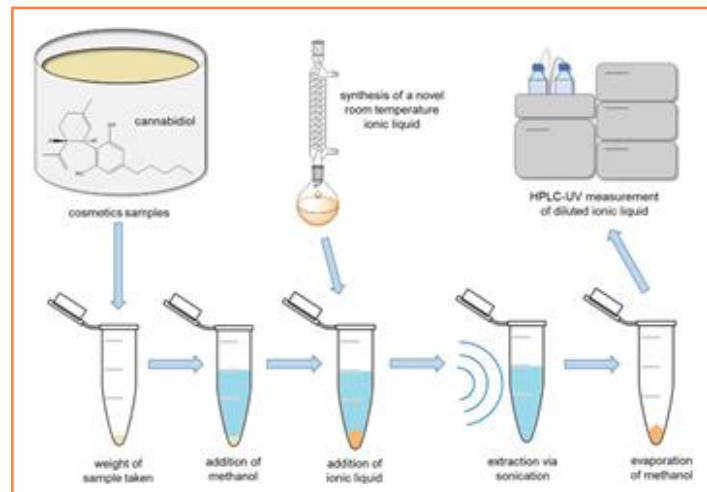


Figure A.II.5 : Liquide ionique méthode

A.II.2.2 Explosion d'eau supercritique et de vapeur (Supercritical water ans steam explosion) :

L'explosion flash à la vapeur (SFE) est une hydrolyse verte processus qui a été utilisé pour la production de produits biosourcés matériaux. Dans ce processus, le matériau est exposé pendant une courte période à de la vapeur à haute température, qui pénètre dans les tissus et les cellules du matériau, puis subit une décompression rapide et l'explosion se produit en une milliseconde de réaction ⁸.

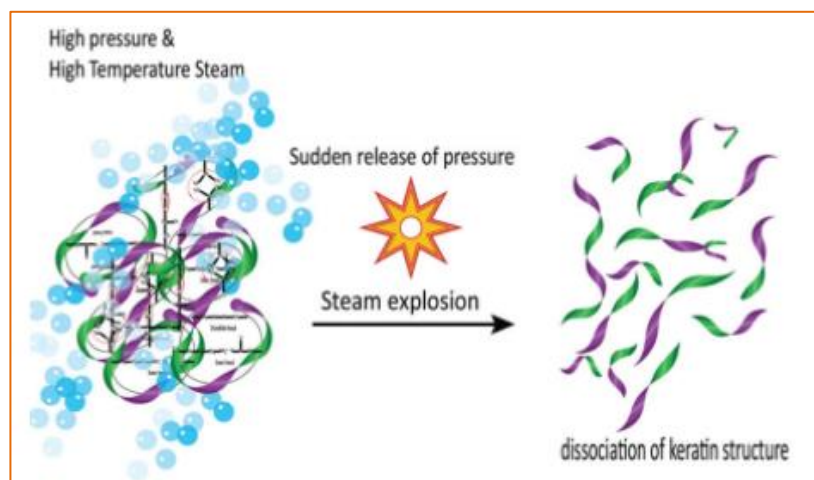


Figure A.II.6 : Extraction de kératine par la méthode de l'explosion d'eau supercritique et de vapeur

A.II.2.3 Extraction assistée par micro-onde :

L'extraction de kératine se fait à partir de l'irradiation de micro-onde. Le rendement obtenu de cette méthode est environ de 60% ⁹.

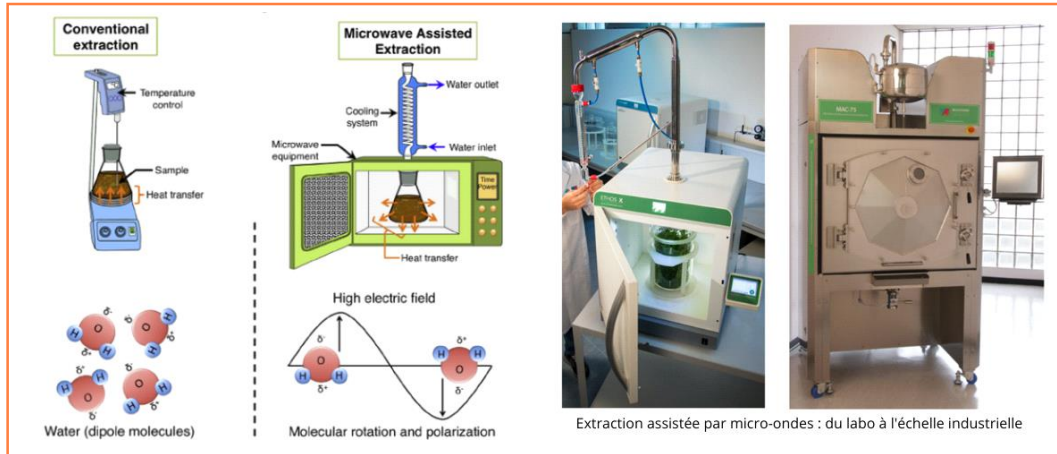


Figure A.II.7 : Extraction de kératine par micro-onde

A.II.2.4 Méthodes microbiennes et enzymatiques :

La kératine hydrolysée est extraite à partir de la conversion de matières riches en kératine en présence des enzymes ou des souches microbiennes utilisées au tant que catalyseurs, ce qui offre divers avantages par rapport aux produits chimiques. Cette méthode est douce en plus respectueuse de l'environnement et durable. Elle est largement utilisée dans de nombreux processus industriels et biotechnologiques ¹⁰.

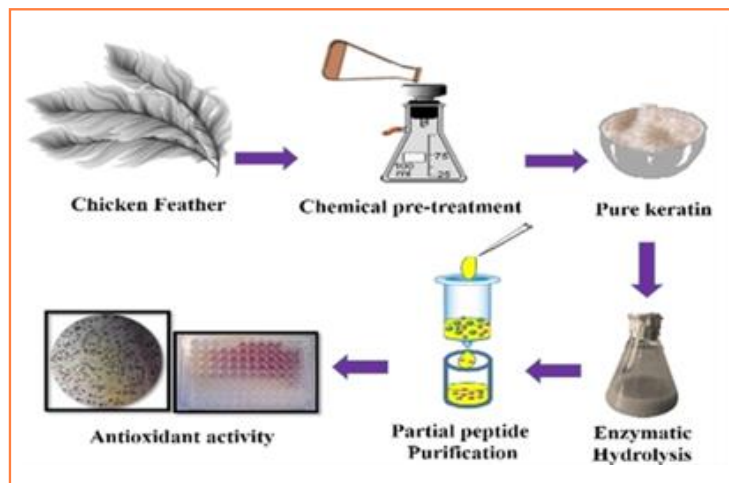


Figure A.II.8: Extraction enzymatique de kératine

A.II.3 Les domaines d'application de la kératine :

La kératine extraite par la laine est un matériau polyvalent avec des applications qui s'étendent du secteur cosmétique à l'ingénierie biomédicale, en passant par les industries textiles et alimentaires. Sa capacité à améliorer les propriétés des produits et sa compatibilité avec les systèmes biologiques en font un composant précieux dans de nombreux domaines ⁶.

1. Cosmétique et soins capillaires :

- **Produits capillaires :** la kératine est couramment utilisée dans les shampooings, après-shampooings et traitements pour les cheveux. Elle aide à renforcer, réparer les cheveux endommagés pour améliorer leur élasticité et réduire les frisottis ¹¹.
- **Soins de la peau :** dans les produits de soin de la peau, la kératine peut améliorer l'hydratation, l'élasticité et la protection contre les agressions extérieures. Elle est souvent incorporée dans les crèmes et les sérums pour ses propriétés revitalisantes ¹³.



Figure A.II.9 : Gamme complète kératine

2. Biotechnologie et ingénierie tissulaire :

- **Matrices de culture cellulaire :** la kératine est utilisée pour créer des échafaudages (scaffolds) dans la culture de cellules, favorisant la croissance et la différenciation cellulaire et surtout pour la recherche en régénération tissulaire ¹¹.
- **Ingénierie de la peau :** utilisée dans la fabrication de peaux artificielles pour les greffes de peau ou les tests dermatologiques, la kératine aide à recréer les structures naturelles de la peau ¹³.

3. Industrie textile et cuir :

- **Fils et tissus :** la kératine est utilisée pour produire des fibres textiles, elle améliore la durabilité et la résistance des tissus. Les textiles kératiniques peuvent également offrir des propriétés hypoallergéniques et antimicrobiennes ¹¹.
- **Traitement du cuir :** dans le traitement du cuir, la kératine est utilisée pour renforcer les fibres du cuir en améliorant leur résistance et leur flexibilité ⁶⁻¹².



Figure A.II.10 : Fibres textiles kératiniques

4. Alimentation et compléments alimentaires :

- **Suppléments diététiques :** La kératine hydrolysée est utilisée dans les compléments alimentaires pour ses bienfaits sur la santé des cheveux, des ongles et de la peau. Elle peut améliorer la force et la croissance des cheveux et des ongles ¹¹⁻¹³.
- **Enrichissement des aliments :** Dans certaines applications, la kératine est ajoutée aux aliments pour enrichir leur contenu en protéines ¹².



Figure A.II.11 : Complément alimentaire à partir de kératine

5. Applications médicales et pharmaceutiques :

- **Matériaux de suture :** Les sutures en kératine sont biocompatibles et résorbables, idéales pour la cicatrisation des plaies sans nécessiter de retrait ¹¹.
- **Système de délivrance de médicaments :** La kératine est utilisée pour fabriquer des systèmes de délivrance contrôlée de médicaments, permettant une libération prolongée et ciblée des agents thérapeutiques ¹².
- **Dispositifs médicaux :** La kératine est utilisée dans divers dispositifs médicaux pour ses propriétés biocompatibles, elle est adaptée à une variété d'applications cliniques, notamment les implants et les pansements ^{6,11}.

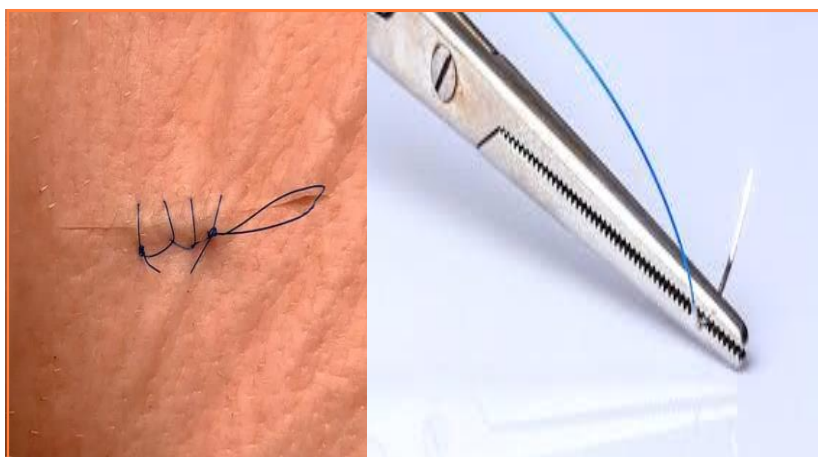


Figure A.II.12 : Fils de suture en kératine

A.II.4 La synthèse organométallique :

La chimie de coordination est une discipline qui associe le plus souvent la chimie inorganique et la chimie organique : les molécules organiques (comme ligands) et un ion inorganique comme élément central. Elle a connu un développement important, non seulement dans le domaine de la chimie structurale, des applications industrielles, de matériaux, de produits agrochimiques et catalytiques, mais également dans le domaine pharmacologique en raison des propriétés biologiques ou thérapeutiques d'un certain nombre de complexes ^{14,15,16}.

La notion du complexe a été introduite pour la première fois par le père de la chimie de coordination « Alfred Werner » à la fin du XIX siècle pour lequel il a obtenu le Prix Nobel de chimie en 1913 ¹⁷.

Un composé organométallique peut être défini comme un composé dans lequel il existe une liaison métal-carbone et il est constitué d'un ou de plusieurs cations (M) (d'habitude métallique) entouré d'un ou de plusieurs ligands(L) ¹⁸.

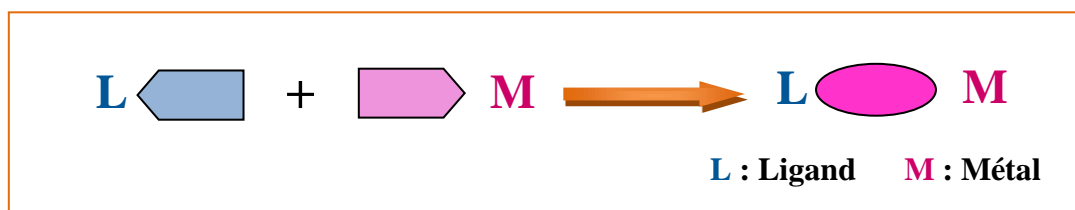


Figure A.II.13 : Formation d'un complexe de coordination.

A.II.4.1 Définition d'un ligand :

Le mot ligand vient du mot grec ligare (avoir l'intention de se lier). Ils sont des atomes ou des molécules qui, au moins formellement, peuvent être considérés comme des donneurs d'électrons envers un atome accepteur d'électron. Ces molécules comme les bases de Schiff ou atomes qui entourent l'atome central sont appelées des ligands (aussi appelés coordinats). Ces derniers connectés au centre métallique par une ou plusieurs liaisons chimiques ¹⁸.

On appelle coordination unidentée, un coordinat fixé à un seul point à l'ion métallique. Dans le cas de deux, trois, quatre liaisons ou plus, elles sont bidentées, quadridentées et plus généralement multidentées ^{19,20}.

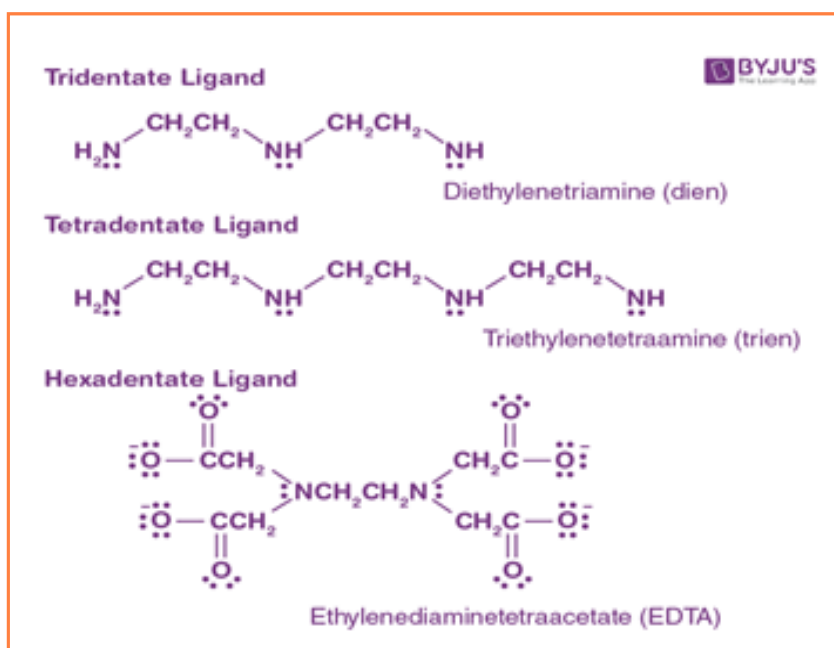


Figure A.II.14 : Des exemples des ligands

A.II.4.2 Les métaux de transitions :

Un élément de transition est un élément qui possède une sous-couche *d* ou *f* incomplète ;

Les métaux de transitions, comme le fer (Fe), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le palladium (Pd) et le platine (Pt), sont couramment utilisés en chimie organométallique en raison de leurs propriétés catalytiques et leur capacité à former des complexes avec divers ligands ¹⁶.

➤ Caractères généraux des éléments *d* :

- Ce sont des métaux ;
- Ils peuvent présenter de nombreux états d'oxydation dont certains négatifs ;
- Ils forment de nombreux complexes ;
- Ces complexes sont souvent colorés et paramagnétiques ²¹.

A.II.5 Domaines d'application de complexes organométalliques kératiniques :

Les complexes organométalliques contenant des protéines et des peptides telle que la kératine qui sont liées avec les métaux à savoir Na, K, Mg, Ca, Fe, Mn, Co, Cu, Zn et Mo et vu la diversité de leurs structures et de leurs propriétés, elles conviennent parfaitement à un large éventail d'utilisations et offrent des applications polyvalentes dans différents domaines tels que les biocatalyseurs, les hydrogels injectables, radiopharmaceutiques, le traitement des tumeurs et la livraison de médicaments ²².

En 2019, Shankar et *coll.* ont basé sur la synthèse des complexes à base de kératine de plume issues de Ag, Cu et Zn. Ces complexes ont montré une activité antibactérienne puissante *via* les souches bactériennes à Gram négative plus les souches à Gram positive ²³.

D'autre part, l'équipe de Yan Li a déduit que les complexes kératiniques issues de MnO₂ (MnNPs@Kératine) and Gd₂O₃ (GdNPs@Kératine) sont considérés comme des véhicules ou transporteurs médicamenteux ²⁴.

Nouveaux nanocomplexes à base de kératine extraite de la laine par sulfitolysis ont synthétisés par le groupe de Aluigi par gélation ionique, obtenant un système stable pouvant être chargé avec de la doxorubicine (DOX) afin de réduire la cardiotoxicité du médicament comme représenté dans la figure suivante ²⁵⁻²⁶ :

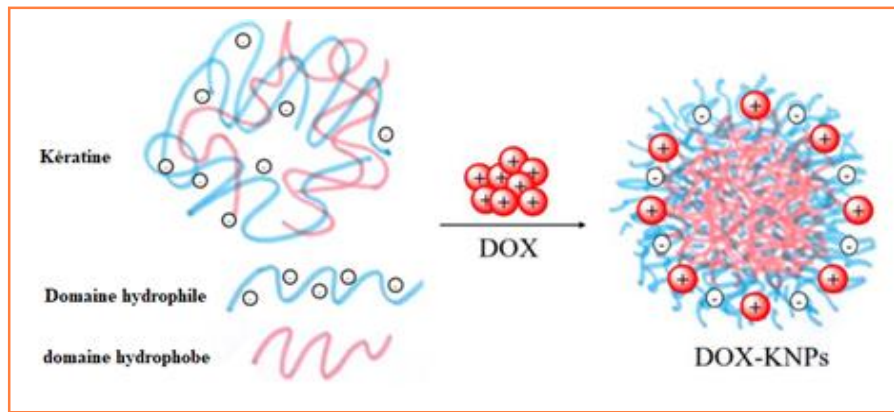


Figure A.II.15 : Nouveaux nanocomplexes à base de kératine

A.II.6 Conclusion :

La kératine joue un rôle essentiel dans de nombreux aspects de notre vie quotidienne, de la beauté à la santé en passant par l'industrie. Ses méthodes d'extraction et ses applications continuent d'évoluer pour répondre aux besoins croissants des consommateurs et des industries. Il est important de continuer à étudier et à explorer les différentes sources et utilisations de la kératine pour maximiser ses avantages et son potentiel. Enfin la kératine demeure une protéine précieuse et polyvalente qui mérite toute notre attention et notre exploration continue.

Références :

10. Shavandi A., Tiago H. Silva, Adnan, A. Bekhit ,C. Alaa El-Din A. Bekhi. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. *Biomater. Sci.* 5 : 1699-1735, 2017.
11. Blackburn S., Lee G. R. The reaction of wool keratin with alkali. *Biochim. Biophys. Acta*, 19 : 505-512, 1956.
12. Goddard D. R., Michaelis L. Derivatives of keratin. *J. Biol. Chem.* 112 : 361-371, 1935.
13. Patterson W. I., Geiger W. B., Mizell L. R. H. Milton. Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application. *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 27 : 89-103, 1951.
14. Shah A., Tyagi S., Bharagava R. N., Belhaj D., Kumar A., Saxena G., Saratal G.D., Mulla S. I. Keratin production and its applications : current and future perspective. In Keratin as a Protein Biopolymer : Extraction from Waste Biomass and Applications. In book : Keratin as a Protein Biopolymer (pp.19-34). Edition : I. Chapter : 2, *Springer Nature*. Switzerland AG, 2019. http://doi:10.1007/978-3-030-02901-2_2
15. Hamouche, H. Caractérisation des fibres kératiniques en vue de leur utilisation comme capteur d'humidité. *Mémoire de Magister*, Electronique, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 2012.
16. Azabi M. Extraction et caractérisation chimique et biochimique de la kératine de plumes de volailles. Mémoire de Master, Chimie des Produits Naturels, *Université Saad Dahleb*, Blida. 2020.
17. Zhao W., Yang R., Zhang Y., Wu L. Sustainable and practical utilization of feather keratin by an innovative physicochemical pretreatment: high density steam flash-explosion. *Green Chemistry*. 14 : 3352-3360, 2012.
18. Zocol, M., Aluigi, A., Patrucco A., Vineis C., Forlini F., Locatelli P., Sacchi M. C., Tonin C. Valorization of livestock keratin waste: application in agricultural fields. *Int J Environ Res Public Health*. 19 (11) : 6681, 2022.
19. Sanchez S. Demain, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Org. Process Res. Dev.* 15, 224-230, 2011.
20. Messaoud A., Bounatiro S., Louddani S.N. Production de la kératine et ses dérivés par le recyclage d'agro-déchets via des traitements microbiens. *Mémoire de Master*, Génie de l'Environnement Université Saad Dahleb, Blida. 2023.,

21. Djebbar S., Yousfi B. Contribution à la valorisation de plumes de volaille comme élément de milieu de fermentation fongique. *Mémoire de Master*, Microbiologie, Université Constantine 1, Constantine. 2014.
22. Secchi G. Role of protein in cosmetics. *Clinics in dermatology*, 26 (4) : 321-325. 2008.
23. Quintin, F. Synthèse de complexes organométalliques par mécano-chimie. Catalyse, photochimie et activités biologiques. Thèse de Doctorat, Biomoléculaire, *Université de Montpellier*, France. 2020.
24. Boulaaras B. Etude structurale des composés organométalliques à ligand N₂. *Mémoire de Master*, Chimie organique et matériaux organiques, Université Larbi Tébessi, Tébessa. 2017.
25. Boukerzaza, GH. Bouabellou, M. Synthèse, analyse structurale et criblage biologique de nouveaux complexes organométalliques. *Mémoire de Master*, Biochimie Appliquée, *Université des Frères Mentouri*, Constantine. 2019.
26. Fox T., Berke H. The Color of Complexes and UV-vis Spectroscopy as an Analytical Tool of Alfred Werner's Group at the University of Zurich. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 68(5): 307-11, 2014.
27. Attab, K. Zouaghi, H. Bouchene, R. Structure cristalline et analyse de la surface hirschfeld des complexes de coordination à base d'un ligand N/O chélateur. *Mémoire de Master*, Chimie, Université Larbi Ben M'hidi, Om El Bouaghi. 2020.
28. Guibedj, D. Les complexes métalliques du méthoxyphényl N-sulfamoyloxazolidinone avec Cu(II) et Co(II): Mise en évidence, études par DFT/B3LYP (B2PLYP) et docking moléculaire. *Thèse de Doctorat*, Chimie Physique Moléculaire et Organométallique, Université 8 Mai 1945, Guelma. 2020.
29. Boukelkoul, M. Propriétés magnéto-optiques des couches ultraminces et des slabs à base de métaux de transition. *Thèse de Doctorat*, Physique du Solide, Université Ferhat Abbas, Sétif. 2013.
30. Tohme, A. Synthèse et étude de nouvelles phosphines organométalliques électrocommutables pour la catalyse. *Thèse de Doctorat*, Chimie, Ecole doctorale Sciences de la Matière, France. 2014.
31. Marinova P., Tamahkyarova K. Synthesis and Biological Activities of Some Metal Complexes of Peptides : A Review, *BioTech*. 13 : 9, 2024, <https://doi.org/10.3390/biotech13020009>.

32. Shiv SH., Jong-Whan R. Eco-friendly antimicrobial nanoparticles of keratin-metal ion complex, *Materials Science & Engineering : C*, 105 : 110068. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110068>.
33. Yan L., Song K., Cao Y., Peng C., Yang G. Keratin-templated synthesis of metallic oxide nanoparticles as MRI contrast agents and drug carriers, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018. [https://doi : 10\(31\).1021/acsami.8b08555](https://doi.org/10.1021/acsami.8b08555).
34. Aluigi A., Ballestri M., Guerrini A., Sotgiu G., Ferroni C., Corticelli F., Gariboldi M.B., Monti E., Varchi G. Organic solventfree preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumour activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 1 (90) : 476-484. 2018.
35. Giannelli M., Guerrini A., Ballestri M., Aluigi A., Zamboni R., Sotgiu G., Posati T. Bioactive keratin and fibroin nanoparticles: an overview of their preparation strategies. *Nanomaterials*, 12(9) : 1406. 2022. <https://doi.org/10.3390/nano12091406>.

Chapitre A.III : Généralités sur le pouvoir antioxydant

A.III.1 Introduction :

Les cellules et tissus humains sont constamment exposés à diverses agressions, quelques soient physiques, chimiques ou métaboliques. Ces agressions peuvent entraîner une augmentation du stress oxydatif, un phénomène où la production de radicaux libres dépasse les capacités de l'organisme à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Les radicaux libres, notamment les espèces réactives de l'oxygène (ERO), jouent un rôle central dans ce processus. Ce sont des molécules très réactives en raison de la présence d'un électron non apparié, ce qui les rend capables de déclencher des réactions en chaîne qui endommagent les structures cellulaires telles que les lipides, les protéines et l'ADN ¹.

A.III.2.1 Qu'est-ce qu'un radical libre ?

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules transformées deviennent à leurs tours d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne ².

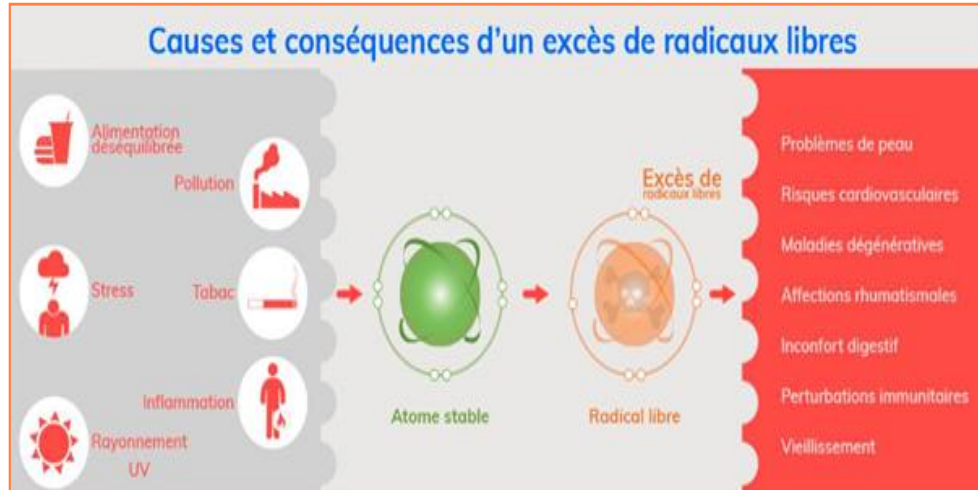


Figure A.III.1 : Causes et conséquences d'une excès de radicaux libres

A.III.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène :

Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se retrouvent dans les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et qui sont des radicaux libres dérivés de la molécule d'oxygène par addition d'un électron ³.

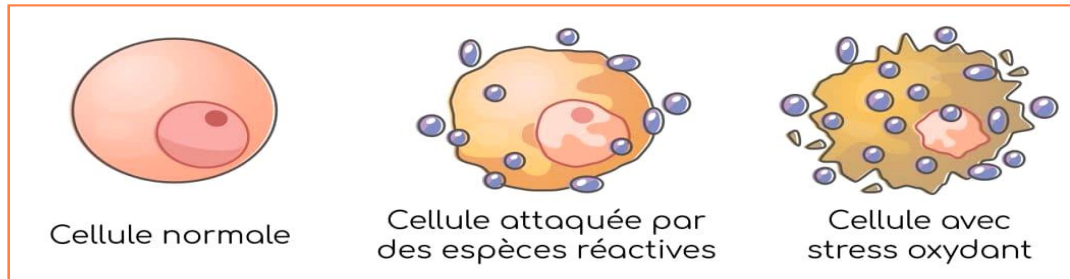


Figure A.III.2 : Les espèces réactives

A.III.2.3 Le stress oxydant :

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs ⁴.

A.III.3.1 Les maladies liées au stress oxydant :

Certaines maladies liées au stress oxydant comme le vieillissement, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer mais aussi le syndrome d'apnées du sommeil sont des modèles de stress oxydatif.

Le stress oxydant est responsable de nombreuses d'autres maladies chroniques évolutives comme les maladies rhumatismales inflammatoires, les maladies chroniques inflammatoires de l'appareil digestif, les maladies broncho-pulmonaires, les affections de la peau, le diabète, les maladies cardiovasculaires et les affections virales chroniques.

Et il y a d'autres causes classiques qui déclenche le stress oxydatif, comme le tabagisme, l'alcool, le soleil, la pollution ⁵ (Figure A.III.3).



Figure A.III.3 : Les pathologies associées aux espèces réactives oxygénées ⁶

A.III.3 Antioxydants :

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production et de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène.

Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable ⁷.

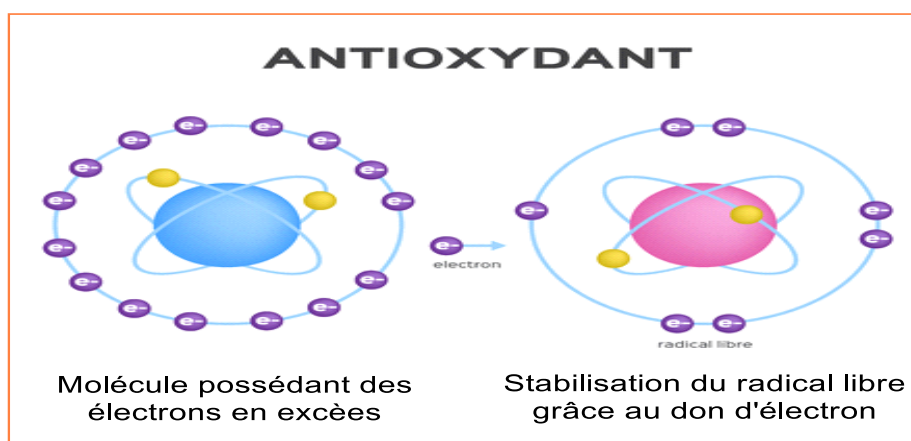


Figure A.III.4 : L'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants.

a. Les antioxydants endogènes :

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) ⁸.

b. Les antioxydants exogènes :

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines (vitamine A, E et C), nutriments, composés naturels... etc. Elles sont considérées comme des antioxydants. Notons à titre d'exemples, les plus courants : Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de

vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine.

Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxyés $\text{ROO}\cdot$ ⁹.

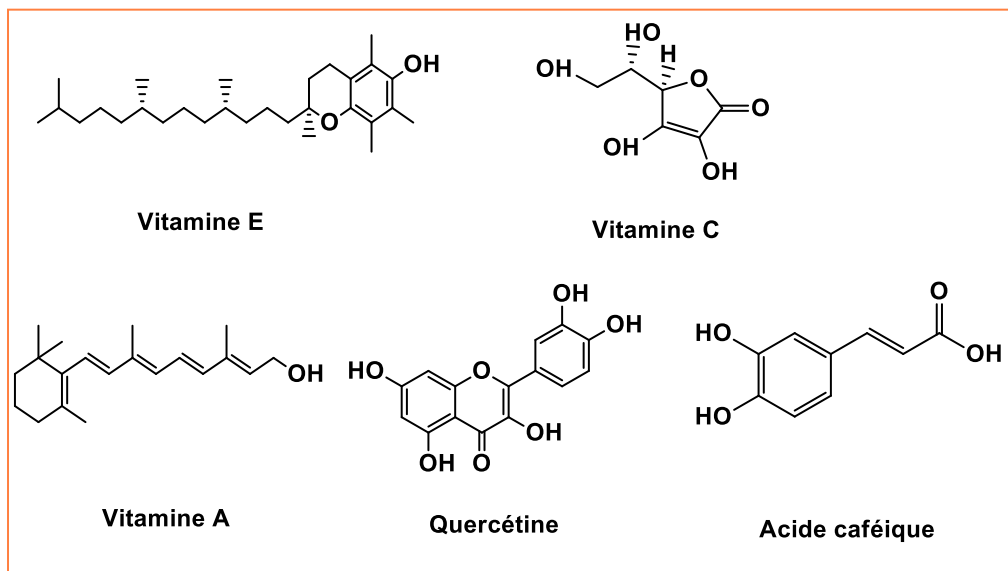


Figure A.III.5 : Les principales structures des antioxydants naturels.

A.III.4 Domaine d'utilisation des antioxydants synthétiques :

- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie et pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture¹⁰.
- Dans l'industrie de médicaments : pour le ralentissement du vieillissement des cellules humaines, contre les maladies : l'Alzheimer, le parkinson et le cancer...etc¹¹.

A.III.5 Les méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante :

Pour mesurer l'activité antioxydante d'une substance, plusieurs méthodes sont disponibles^{12,13}. Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron¹⁴.

Parmi ces techniques, nous citerons :

- ❖ La méthode TRAP (Paramètre du piégeage du radical total)¹⁵.
- ❖ La méthode PCL (photochimie-luminescence)¹⁶.
- ❖ La méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical oxygène)¹⁷.

- ❖ La méthode d'ABTS (2,2-azinobis-(3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (capacité anti-oxydant équivalente de Trolox) ¹⁸.
- ❖ La méthode DMPD (Balayage du radical cation N, N-diméthyle-phénylènediamine) ¹⁹.
- ❖ La méthode du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) ²⁰.
- ❖ La méthode FRAP (capacités réductrices ferriques d'antioxydants) ²¹.
- ❖ La méthode TOSC (capacité du piégeage des oxy-radicaux totaux) ²².

A.III.6 Applications antioxydante de quelques exemples des biomatériaux kératinique :

La chimie des métaux de transition a connu un essor important grâce à la diversité des propriétés physico-chimiques de ces métaux, ce qui a ouvert de nombreuses possibilités d'applications.

Les propriétés des complexes métalliques varient en fonction du métal et du ligand de kératine de la laine peuvent être modifiés pour obtenir les caractéristiques souhaitées.

Ces dernières années, les complexes organométalliques biopolymères ont gagné en importance dans des domaines tels que la synthèse organique, la biologie et la catalyse.

Par exemple, en 2018, l'équipe de Wang ²³ a synthétisé un nouveau biopolymère par la réaction de kératine de plume et la glycine en premier ensuite avec les sels de métaux pour donner de nouveaux biomatériaux métalliques de kératine-glycine (FK-GlyM, M=Zn, Cu, Mn, Ni). La plus excellente antioxydante parmi tous les biopolymères c'est le complexe FK-GlyCu, dont l'EC₅₀ est jusqu'à $4,5 \times 10^{-3} \pm 0,0012 \mu\text{mol}$ (Figure A.III.6).

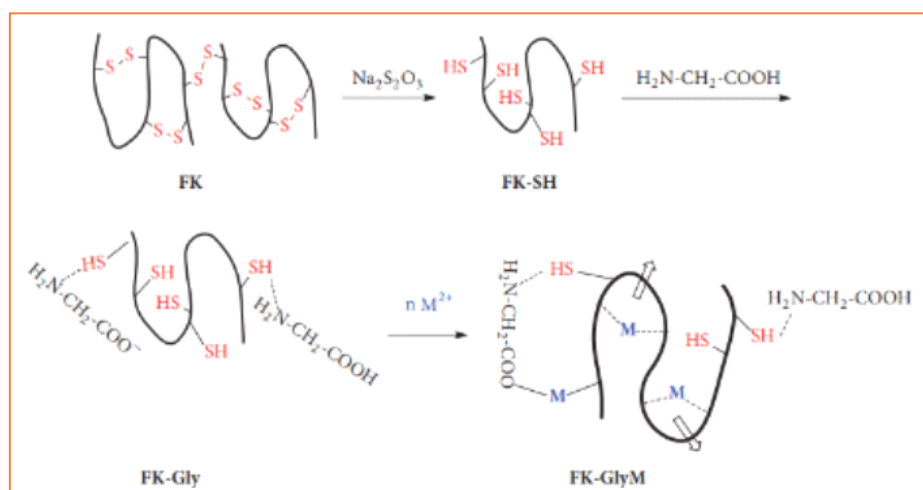


Figure A.III.6 : Synthèse de FK-GlyM (M=ZnII, CuII, NiII)

A.III.7 Conclusion :

Les recherches récentes mettent en lumière l'importance de kératine extraite de la laine du fait de leurs multitudes d'applications dans les domaines notamment le pouvoir antioxydant et on conclut que les complexes organométalliques biopolymères renforcent cette activité en piégeant les radicaux libres et diminuer les dommages oxydatifs.

En perspectives, l'utilisation prometteuse des biomatériaux kératiniques dans des domaines variés, allant de la synthèse organique à la biologie et la catalyse.

Références :

1. Boyd B, Ford C, Koepke MC, Gary K, Horn E, Mc Analley S, Mc Analley B. Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4(6): 7,2003
2. Brack M. Le stress oxydatif, *Institut de Recherche sur le Stress (IRS)*. 2010.
3. Lee S-J, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thym leaves (*Thymus vulgaris*) and their antioxidant properties. *Food Chem*. 91: 131-137,2005.
4. Walker J. E. M., Saraste M. J., Runswick N. J. Distantly related sequences in the alpha and bêta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*. 1.8: 945-951, 1982.
5. DacostaE. Les phytonutriments bioactifs. *Yves Dacosta*. Paris. 2003.
6. Borg J. Reeber A. Biochimie métabolique Ed ellipses. *Ellipses*, Paris. p: 217-219. 2004.
7. Boyd B. Ford, C. Koepke, M.C. Gary, K. Horn, E. Mc Analley, S. Mc Analley B. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience et Nutrition*. 4 (6) : 7. 2003.
8. Brack M. Le stress oxydatif, *Institut de Recherche sur le Stress (IRS)*. 2010.
9. Lee S J, Umamo K, Shibamoto T, Lee K G. "Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food chemistry*. 91(1) : 131-137. 2005.
10. Favier A. Le stress oxydant. *L'actualité chimique*. 108.10: 863-832. 2003.
11. Valko M. Rhodes, Moncol C. J., Izakovic J., M. Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160.1 : 1-40. 2006.
12. Gardès-Albert, M. Dominique Bonnefont-Rousselot. Zohreh Abedinzadeh, Z, Daniel Jore, D. Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*. 91. 2003.
13. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free radical research communications*. 9(1) : 1-32. 1990.
14. Marcel C. Stress oxydatif, radicaux libres, *Association Française de Médecine Esthétique et anti-âge (afme)*. 2016.
15. Sharif S., A. Kasoju, N. Luthra A., Singh, A., Sharanabasava H. Sahu, A. Bora U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food research international*. 41(1) : 1-15. 2008.

16. Scherer R., Godoy H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*. 112 (3) : 654-658. 2009.
17. Hung D., Boxin O., Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assay. *J. Agric. Food Chem.*53(6) : 1841-1856. 2005.
18. Wayner D.D, Burton G.W., Ingold K.U., Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins. *FEBS lett.* 187 (1) : 33-37. 1985.
19. Popov I.N., Lewin G. Baehr R. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. I. Assay of superoxide dismutase. *Biomed Biochim Acta* .46(11) : 775-9. 1987.
20. Cao G., Alessio H.M., Cutler R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine* 14 (3) : 303-311. 1993.
21. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci (Lond)*. 84 (4) : 407-12. 1993.
22. Li C., Oldham C.D., May S.W. NN-Dimethyl-1, 4-phenylenediamine as an alternative reductant for peptidylglycine α -amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem J* .300 (1) : 31-6. 1994.
23. Jianfeng W., Xiaoxiao L., Yufeng H. Pengfei S., Rong-Min W. Preparation of keratin-glycine metal complexes and their scavenging activity for superoxide anion radicals. *International Journal of Polymer Science*. 7 :1-8. 2018.

PARTIE EXPERIMENTALE

B.I Extraction de kératine de la laine synthèses des biomatériaux

B.I.1 Introduction :

Dans ce chapitre nous présenterons les produits, les dispositifs de synthèse et les méthodes de caractérisation utilisée qui nous ont permis de caractériser au mieux nos échantillons. Ainsi que le matériel, les techniques utilisées pour l'étude biologique et pour l'étude les inhibiteurs de corrosion.

B.I.2 Généralités et objectifs :

Vu que la laine est constituée jusqu'à 95% en poids de kératine alors on a choisi la laine comme matière première. Nos objectifs sont comme suit :

1. L'extraction de kératine de la laine de mouton par méthode chimique.
2. Identification chromatographie sur couche mince (CCM) de kératine de la laine de mouton extraite.
3. Identification biochimique de kératine de la laine de mouton extraite.
4. Synthèse de nouveaux matériaux organométallique par la réaction de kératine de la laine avec les sels de métaux d'après le schéma (B.I.1).
5. Activité antioxydant de kératine de la laine extraite.

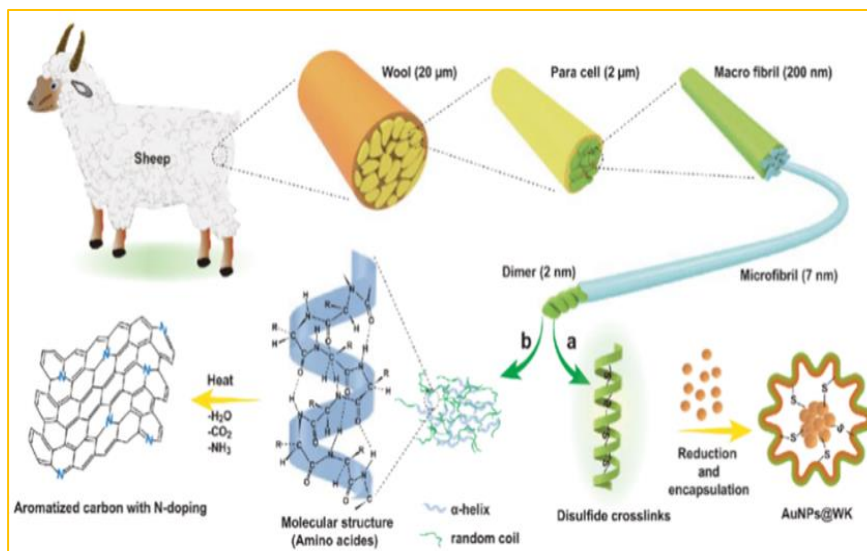


Schéma B.II.1 : Extraction de kératine de la laine de mouton.

B.I.3 Matériels de synthèse :

Les éléments essentiels utilisés pour le montage expérimental sont :

- ❖ Une plaque d'Aluminium pour CCM
- ❖ Cuve à chromatographie
- ❖ Pipette pasteur
- ❖ Pipette (10 ml)
- ❖ L'étuve
- ❖ Eprouvette
- ❖ Papier filtre
- ❖ Masques
- ❖ Gants
- ❖ Bécher
- ❖ Balance
- ❖ Spatule
- ❖ Boite de pétri
- ❖ Verre à montre
- ❖ Barreaux magnétiques
- ❖ Plaque chauffante d'agitateur magnétique

- **Réactifs et solvants utilisés :**

Un certain nombre de produit chimique (réactifs et solvants) a été utilisé pour réaliser ce travail.

Tableau B.I.1 : Caractéristiques des produits chimiques et les solvants utilisés.

Réactifs et solvants	Structure	M.(g/mol)	T _f (°C)	P _{eb} (°C)	Densité
Méthanol	CH ₄ O	32.04	/	0.7910	0.7910
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46.06	/	0.789	0.789
Acétone	C ₃ H ₆ O	58.08	/	0.784	0.784
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	60.05	/	1.0492	1.0492
Eau déminéralisé	H ₂ O	18	/	100	1
Eau distillée	H ₂ O	18	/	100	1
Nitrate d'argent	AgNO ₃	169.87	212	212	4.35
Nitrate de fer (III)	Fe (NO ₃) ₃ ⁻	404	47.2/125	125	1.68
Sulfate de cobalt	CoSO ₄	281.10	100	100	1.948
Dimethylsulfoxyde	C ₂ H ₆ OS	78.13	18.5	189	1.1
2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle(DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394.32	135	/	1,4
Hydroxyde de sodium	NaOH	39.997	318	1390	2.13
Acide ascorbique	C ₆ H ₈ O ₆	176.12	190 /192	/	1.65
2-aminoisobutyric	C ₄ H ₉ NO ₂	103.12	328	/	1.0 à 1.5
L-cystine	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	240.3	260.5	247 à 249	1,68
Cystéine	C ₃ H ₇ NO ₂ S	121.16	240	/	1.3
n-Butanol	C ₄ H ₁₀ O	74.12	-89.8	117.7	0.81

B.I.4 Appareillage et Méthode de caractérisation :

B.I.4.1 Spectrophotométrie UV-Visible :

Les spectres électroniques d'absorption des différents ligands de bases de Schiff et leurs complexes correspondants ont été enregistrés en solution dans le méthanol ou l'eau distillée entre 200 et 800 nm en utilisant un spectrophotomètre JASCO V-650 avec des cuves en quartz de trajet optique $l= 1\text{cm}^{-1}$.



Figure B.I.1 : Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible.

B.I.4.2 Spectroscopie infrarouge :

Les composés solides sont analysés dans une pastille KBr pour avoir des spectres IR à partir d'un spectromètre de type Jasco V-530 entre 400 et 4000 cm^{-1} (laboratoire d'organique, département de chimie, Université Es- Sénia, Oran) ².

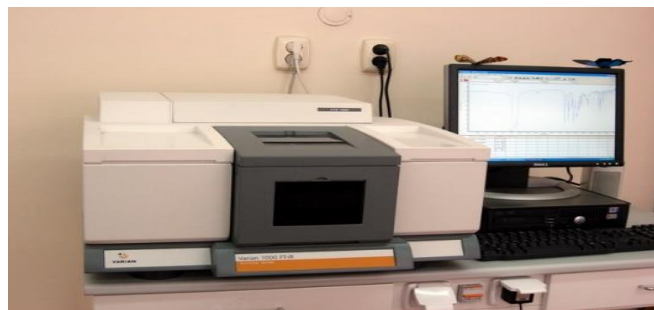


Figure B.I.2 : Spectroscopie infrarouge.

B.I.5 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Cette technique est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants, elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile ¹.

La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange qu'est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium)

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f)².

$$R_f = \frac{d \text{ substance}}{d \text{ solvant}}$$

d substance : distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache).

d solvant : distance parcourue par front du solvant³.

B.I.6 Extraction de kératine de la laine :

B.6.1 Mode opératoire :

La matière kératinique est obtenue après le nettoyage et le découpage de la laine de mouton en courte fibres. La laine est lavée, séchée puis faire réagir par l'hydrolyse alcaline avec différentes concentrations sous agitation magnétique en variant la température pendant quelques heures jusqu'à l'apparition de la kératine puis lavé avec l'eau distillée. Ensuite le gel obtenu est rincé abondamment à l'eau distillée pour éliminer les cellules de la cuticule qui ont été détruites dans la solution alcaline (voir le schéma B.I.2).

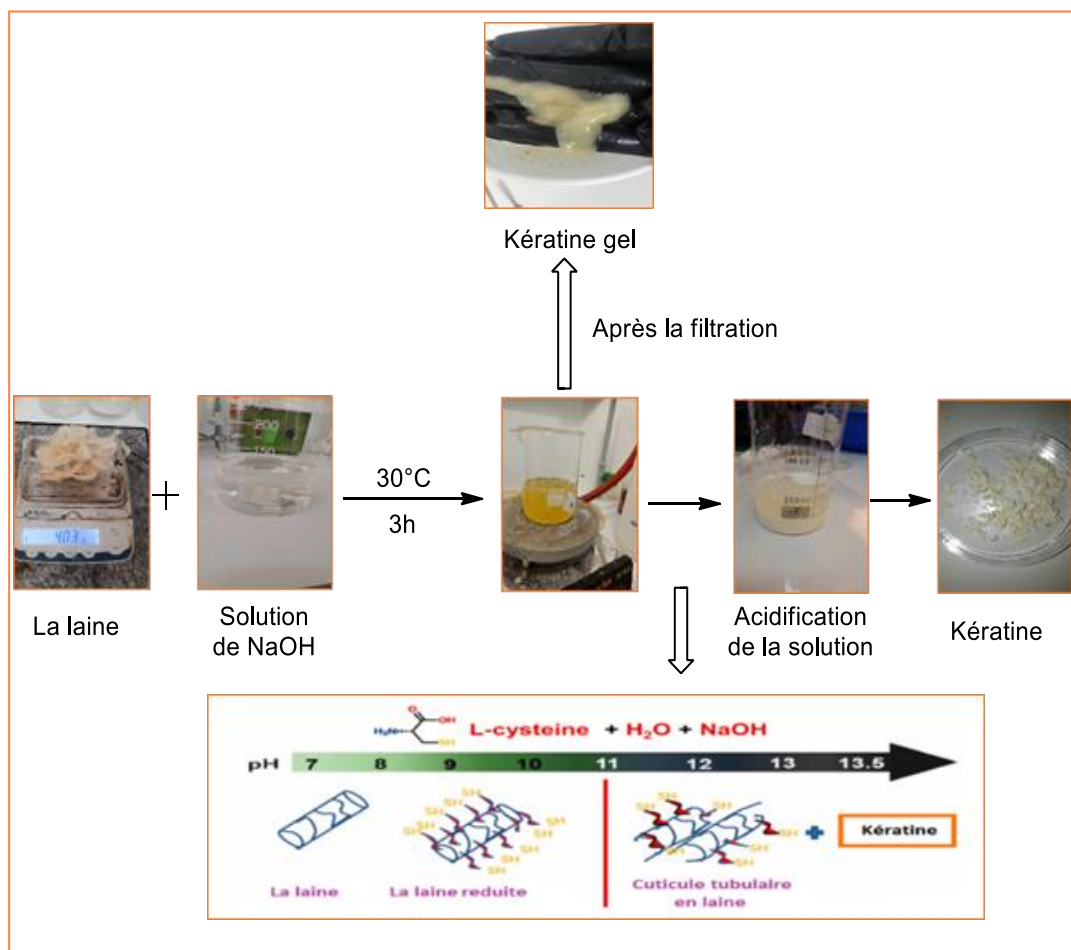


Schéma B.I.2 : Les principales étapes de l'extraction de kératine de la laine de mouton.

B.I.7 Identification biochimique de kératine de la laine de mouton extraite :

La kératine est une protéine constituée environ 20 types d'acide aminés, c'est cela on a identifié notre kératine par chromatographie sur couche mince (CCM) et deux tests biochimiques.

- Identification de protéine par le test de biuret.
- Identification de acides aminées par le test Ninhydrine ⁴.

B.I.7.1 Identification de kératine extraite par Chromatographie sur couche mince CCM :

La CCM est une méthode efficace pour séparer et identifier la kératine extraite de diverses sources biologiques. En utilisant une phase mobile et une phase stationnaire appropriées, ainsi que des réactifs de détection, il est possible de visualiser et d'identifier la kératine parmi d'autres protéines et peptides présents dans l'échantillon. Cette technique est particulièrement utile pour les analyses qualitatives et semi-quantitatives dans divers domaines de recherche en biochimie et biologie moléculaire.

La CCM repose sur la séparation des composants d'un mélange en fonction de leur affinité relative pour une phase stationnaire (la plaque de silice ou d'alumine) et une phase mobile (le solvant ou l'éluant). Les différents composants migrent à des vitesses différentes et se séparent sur la plaque ^{5,3}.

B.I.7.1.1 Matériel nécessaire :

- Plaque de CCM d'Alumine (Al_2O_3).
- Solution des acides aminés (L-Cystine, 2-Aminoisobutyric, Cystéine).
- Echantillon de kératine extraite.
- Tube à essai.
- Pipette pasteur à pointe coupée.
- Chambre de développement.
- Réactifs de détection : ninhydrine.
- Solvants pour la phase mobile.
- Lampe UV (optionnelle) : pour visualiser les taches car elles sont fluorescentes.

B.I.7.1.2 Mode opératoire :

La kératine est une protéine constituée de différentes acides aminés. On l'identifie par chromatographie sur couche mince. Cette analyse est effectuée sur des plaques prêtes à l'emploi à support en aluminium en phase normale Kiesel gel 60 F254 Merck (figure B.I.3).

• Préparation de l'échantillon :

- Extraire la kératine de la laine des moutons à l'aide de méthode d'extraction chimique.
- Dissoudre l'extrait de kératine dans un solvant approprié (DMSO).

• Préparation de la plaque CCM :

- Découper la plaque CCM à la taille souhaitée.
- Dessiner une ligne de base et d'haut de la plaque au crayon.

• Application de l'échantillon :

- À l'aide d'une micropipette, déposer de petites quantités de l'échantillon de kératine et des acides aminés (L-Cystine, 2-Aminoisobutyric, Cystéine) le long de la ligne de base.
- Laisser sécher les spots à l'air libre.

• Développement de la plaque :

- Placer la plaque dans une chambre de développement contenant la phase mobile : l'éluant (un volume de l'eau, un volume de l'acide acétique, 3 volumes butanol-1).
- Fermer la chambre et laisser les solvants migrer jusqu'à une certaine hauteur.

• Séchage et visualisation :

- Retirer la plaque de la chambre et laisser les solvants s'évaporer.
- Visualiser les taches de kératine sous une lampe UV (si elles sont fluorescentes) après en utilisant un réactif de détection : la ninhydrine.

• Révélation et identification :

- L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm) ou par pulvérisation de la plaque avec la solution de ninhydrine et chauffer doucement pour révéler les taches correspondant aux acides aminés et peptides.

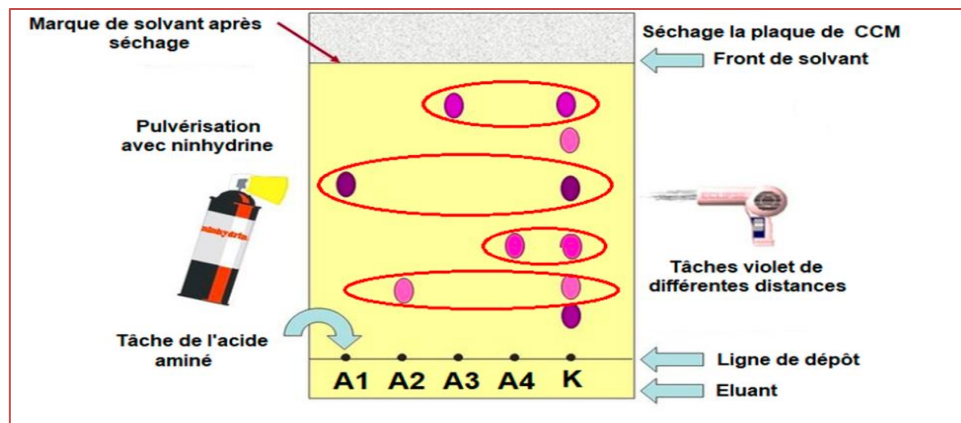


Figure B.I.3 : Montage de la Chromatographies sur Couche Mince.

B.I.7.2 Identification de kératine extraite par le test de biuret :

Cette réaction caractérise une liaison peptidique. Il convient à l'analyse qualitative et quantitative des protéines et des peptides, à condition que ces derniers contiennent au moins 4 acides aminés.

Le principe est qu'une solution de sulfate de cuivre fortement alcaline est ajoutée à une solution protéique, provoquant la formation d'un complexe entre les ions cuivre et liaisons peptidiques, qui apparaît violet proportionnellement au nombre d'acides aminés dans le milieu ⁶.

B.I.7.2.1 Matériel nécessaire :

- Kératine extraite
- Tubes à essai
- Pipette pasteur
- Pipette graduée
- Solution de sulfate de cuivre
- Solution de NaOH

B.I.7.2.2 Mode opératoire :

Dans un tube d'essai versé 2 ml de kératine ajouter 2ml de solution de NaOH 4% puis ajouter quelques gouttes de CuSO_4 , mélanger le contenu du tube et observer le changement de couleur.

- **Préparation de l'échantillon** : Placer environ 2 ml de kératine à tester dans un tube à essai.
- **Ajout de NaOH** : Ajouter 2 ml de solution de NaOH à 4% à l'échantillon.
- **Ajout de CuSO_4** : Ajouter quelques de solution de sulfate de cuivre.

- **Observation de la couleur** : Mélanger doucement le contenu du tube et observer le changement de couleur (violette).

Couleur violette : indique la présence de protéines. La couleur est due à la formation d'un complexe entre les ions Cu^{2+} et les liaisons peptidiques dans la protéine. (figure B.I.4)



Figure B.I.4: Test de biuret

B.I.7.3 Identification de kératine extraite par le test Ninhydrine :

Le test à la ninhydrine est un outil précieux pour l'identification et la quantification des acides aminés grâce à sa sensibilité élevée et à la spécificité relative des groupes amine libres.

Son principe consiste à ajouter une solution fortement alcaline de sulfate de cuivre à une solution de protéines entraînant la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et les liaisons peptidiques avec apparition d'une coloration violette proportionnelle à la quantité d'acides aminés présente dans le milieu qui absorbe à 540 nm ⁷.

B.I.7.3.1 Matériel nécessaire :

- Kératine extraite
- Tube à essai
- Pipette pasteur à pointe coupée
- Pipette graduée
- Bain marie
- Ninhydrine
- Ethanol
- L'eau distillée

B.I.7.3.2 Préparation de ninhydrine :

Pour obtenir une solution, la ninhydrine est dissoute dans un solvant approprié, généralement un mélange d'éthanol et d'eau.

B.I.7.3.3 Mode opératoire :

Mettre de 1 ml de kératine dans un tube à essai et ajouter 0.5 ml de solution de ninhydrine, Porter au bain marie pendant quelques minutes à 60°C. La couleur de la solution vire au violet foncé après chauffage. (Figure B.I.5)

- **Préparation de l'échantillon :** Placer une petite quantité de la kératine à tester dans un tube à essai.
- **Ajout de ninhydrine :** Ajouter une quantité égale de solution de ninhydrine à l'échantillon.
- **Chauffage :** Chauffer le mélange au bain-marie pendant quelques minutes.
- **Observation de la couleur :** Retirer le tube du bain-marie et observer la couleur développée (violette).

Coloration violette : Indique la présence d'acides aminés. La couleur est due à la formation du complexe de Ruhemann.

Coloration jaune : Peut indiquer la présence de certaines amines secondaires ou autres substances réactives avec la ninhydrine.

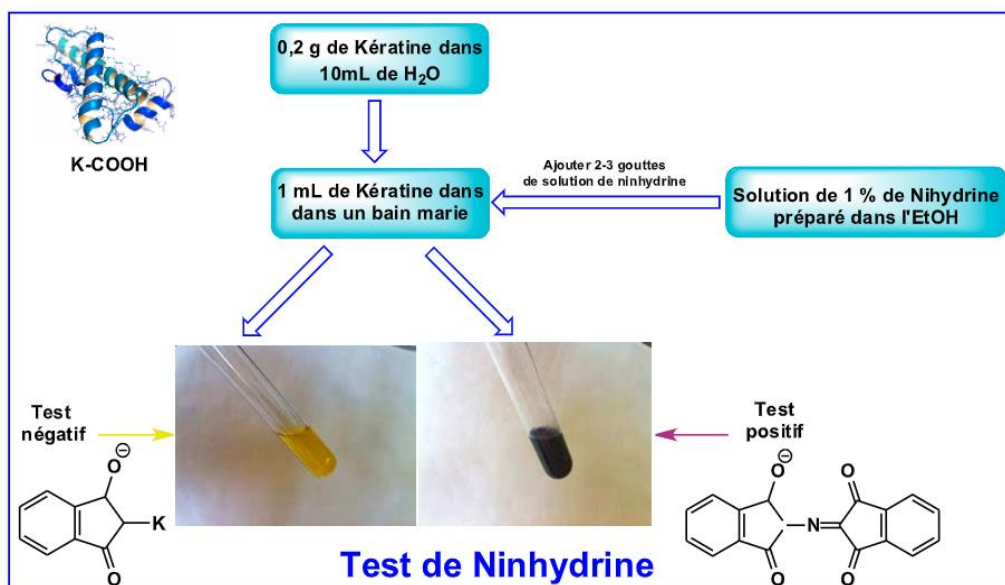


Figure B.I.5 : Teste de Ninhydrine

B.I.8 Synthèse de complexes organométalliques correspondants (KM1-KM3) :

Les complexes organométalliques à base de kératine de la laine [K-Métal] sont obtenus d'après la procédure décrite dans littérature. Ils sont formés dans un milieu alcalin. En mélangeant des solutions de sels métalliques avec la quantité requise d'un ligand (kératine de la laine)⁸.

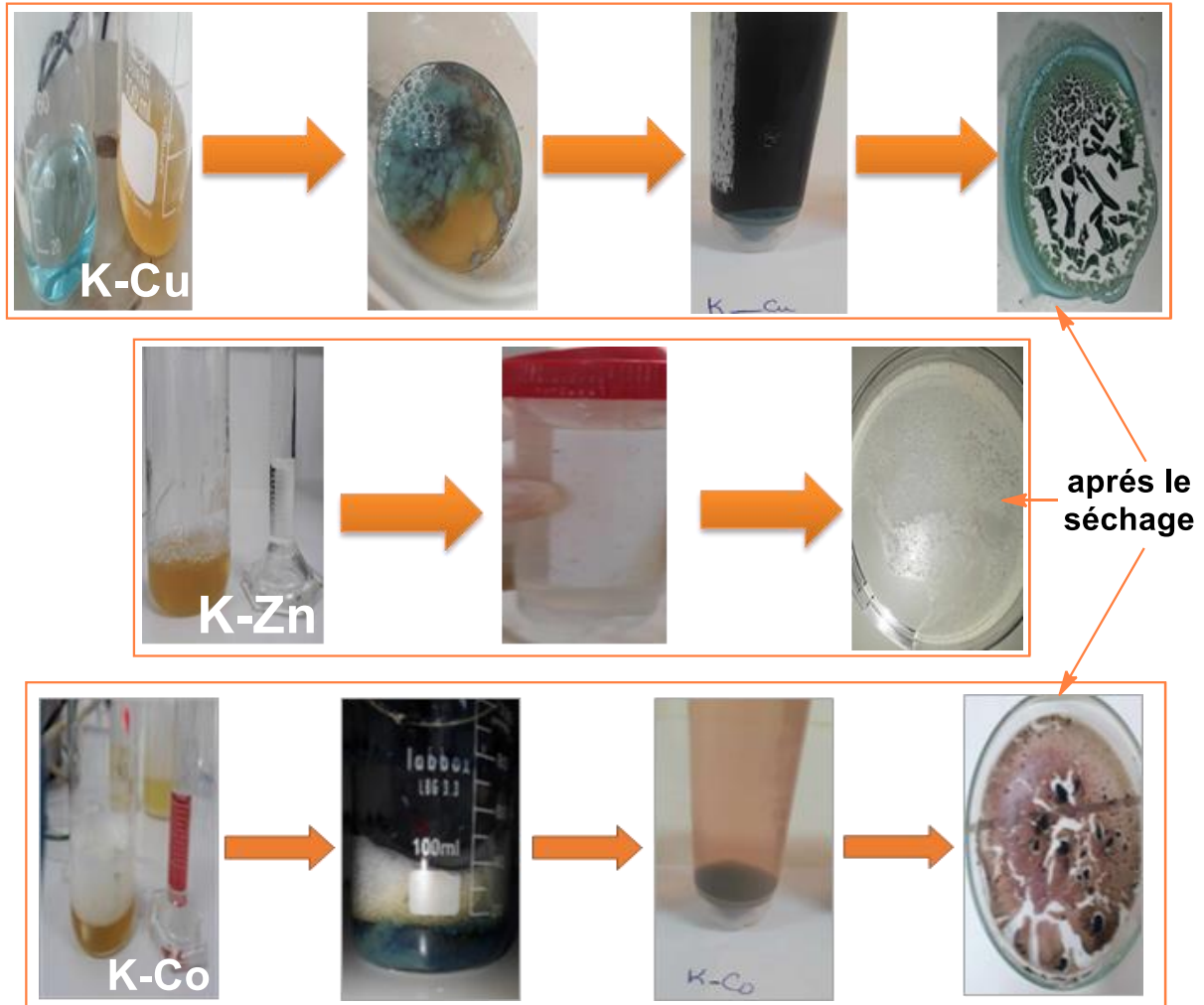


Figure B.I.6 : Synthèse de complexes kératiniques K-Cu, K-Zn et K- Co

La solution métallique est préalablement préparée dans l'eau déminéralisée et additionnée à la solution de ligand. Le mélange réactionnel est porté sous agitation magnétique. Au bout de quelques heures, un précipité abondant est formé. Ce dernier est séparé, filtré et lavé l'eau déminéralisée.

Les rendements des produits obtenus pour chaque ligand sont calculés et mesurés. Les résultats ainsi obtenus sont regroupés dans les tableaux B.I.2 et B.I.3.

Tableau B.I.2 : Rendements de kératine.

Kératine	2%	4%	10%
Rendement	45.5	43.25	20.13

Tableau B.I.3 : Rendements des complexes.

Complexes	K-Cu	K-Zn	K-Co
Rendement	30	45	45

Références :

1. Patterson W. I., Geiger W. B., Mizell L. R. H. Milton. Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application. *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, 27 : 89-103, 1951.
2. Shah A., Tyagi S., Bharagava R. N., Belhaj D., Kumar A., Saxena G., Saratal G.D., Mulla S. I. Keratin production and its applications : current and future perspective. In *Keratin as a Protein Biopolymer : Extraction from Waste Biomass and Applications*. In book : *Keratin as a Protein Biopolymer* (pp.19-34). Edition : I. Chapter : 2, *Springer Nature*. Switzerland AG, 2019. http://doi:10.1007/978-3-030-02901-2_2.
3. Attab, K. Zouaghi, H. Bouchene, R. Structure cristalline et analyse de la surface hirshfield des complexes de coordination a base d'un ligend N/O chelateur. *Mémoire de Master*, Chimie, Université Larbi Ben M'hidi, Om El Bouaghi. 2020.
4. Messaoud A., Bounatiro S., Louddani S.N. Production de la kératine et ses dérivés par le recyclage d'agrodéchets via des traitements microbiens. *Mémoire de Master*, Génie de l'Environnement Université Saad Dahleb, Blida. 2023.,
5. Aluigi A., Ballestri M., Guerrini A., Sotgiu G., Ferroni C., Corticelli F., Gariboldi M.B., Monti E., Varchi G. Organic solventfree preparation of keratin nanoparticles as doxorubicin carriers for antitumour activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 1 (90) : 476-484. 2018.
6. Azabi M. Extraction et caractérisation chimique et biochimique de la kératine de plumes de volailles. *Mémoire de Master*, Chimie des Produits Naturels, *Université Saad Dahleb*, Blida. 2020.
7. Cousin A. Quantification des acides aminés à chaîne ramifiée sur tache de sang séché par spectrométrie de masse tandem couplée à une chromatographie liquide haute performance Intérêt dans le suivi de la leucinose. *Thèse de Doctorat*, Pharmacie. Université Bordeaux– Victor Segalen, France. 2014.

B. II. Expérimental de pouvoir antioxydant des produits testés

B.II.1 Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Les composés représentés dans les différentes séries, ont été soumis à une évaluation de leur activité antioxydante en utilisant le test DPPH.

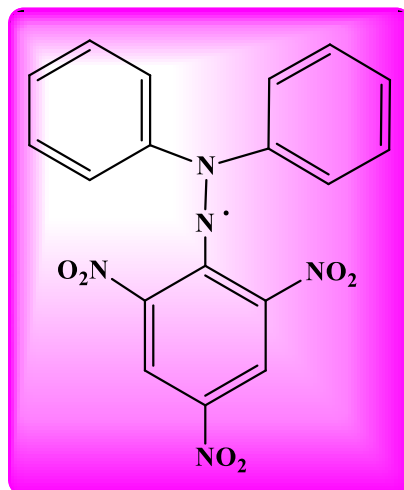


Figure B.II.1: Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl).

B.II.2 Principe de la méthode : piégeage du radical libre DPPH :

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH \cdot) est un radical organique stable, coloré et centré sur l'azote. Le maximum de son absorption se situe vers 517 nm dans le méthanol et l'éthanol¹. Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH \cdot , ce qui conduit par la formation de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH-H) et au radical R \cdot . Le DPPH \cdot a une couleur violette ou rouge pourpre mais cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux et apparition d'une couleur jaune (figure B.III.2)^{2,3}.

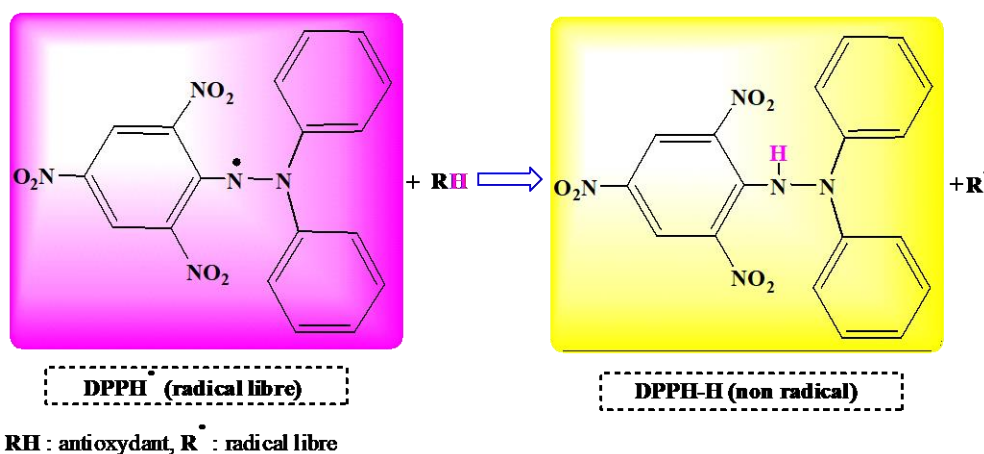


Figure B.II.2. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

B.II.3 Expérimental de pouvoir antioxydant de kératine et leurs complexes :

B.II.3.1 Activité antioxydante de kératine et leurs complexes organométalliques :

Les complexes organométalliques de kératine peuvent présenter des activités antioxydantes améliorées grâce aux propriétés synergiques des peptides kératiniques et des ions métalliques.

Ces complexes peuvent :

- Chélation des ions métalliques libres, empêchant ainsi les réactions pro-oxydantes.
- Fournir des électrons ou des hydrogènes pour neutraliser les radicaux libres.
- Moduler l'activité des enzymes antioxydantes endogènes.

B.II.3.2 Protocole de l'activité antioxydante de kératine et leurs analogues :

B.II.3.2.1 Activité antioxydante de l'hydrolysat protéique :

Pour évaluer l'activité antioxydante de l'hydrolysat de kératine, un certain nombre de méthodes expérimentales peuvent être utilisées. Voici un protocole type :

Matériaux et réactifs

- Hydrolysat de kératine
- DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)
- Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible.

Préparation de l'hydrolysat de kératine

Évaluation de l'activité antioxydante

1. Test DPPH

- Préparer une solution de DPPH dans du méthanol.
- Ajouter des volumes variés d'hydrolysat à des tubes contenant une solution de DPPH.
- Incuber les tubes à l'obscurité pendant 1h.
- Mesurer l'absorbance à 517 nm avec un spectrophotomètre ⁴.

B.II.3.2.2 Capacité de piégeage du 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) radicaux)

La capacité de kératine et leurs analogues à éliminer des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl_1-picrylhydrazyle) a été déterminée selon la méthode de Bersuderet al. (1998)

avec une légère modification en présence des radicaux libres le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl hydrazine de couleur jaune (figure B.II.3).

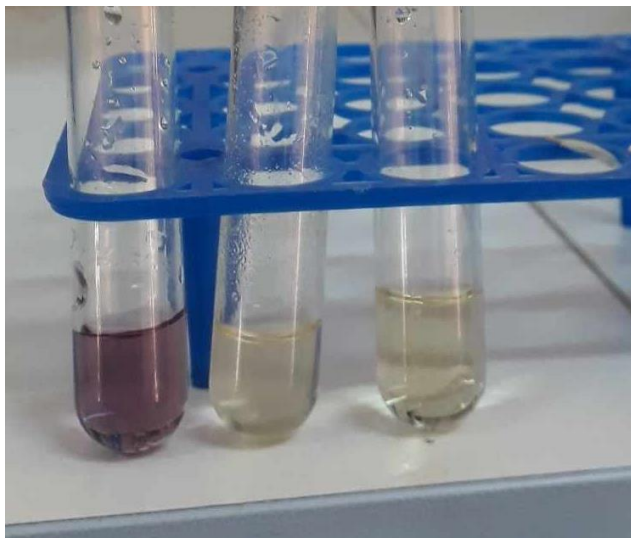


Figure B.II.3 : teste de DPPH

On introduit dans chaque tube Eppendorf : un volume de 500 μ L de chaque biopolymère synthétisés de la kératine (10mg/mL) et ajouté à 375 μ L d'éthanol absolu et 2,6 mL de DPPH méthanoïque (0,06 M). Le mélange a été laissé reposer à température ambiante et dans l'obscurité pendant 1h. L'absorbance (A) a été mesurée à 517nm par un spectrophotomètre OPTIZEN (MECASYS) contre un blanc de contrôle qui contient 500 μ L méthanol à la place de 500 μ L d'échantillon, puis il est incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon. L'acide ascorbique a été utilisé comme un témoin positif.

La capacité de piégeages des radicaux DPPH a été calculée comme suite ⁵ :

a. Détermination du pourcentage d'inhibition :

L'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante ⁶.

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai).

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Références :

1. Boyd B, Ford C, Koepke MC, Gary K, Horn E, Mc Analley S, Mc Analley B (2003) Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4(6): 7.
2. Lee S-J, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG (2005) Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilium* L.) and thym leaves (*Thymus vulgaris* and their antioxidant properties. *Food Chem*. 91: 131-137.
3. Brack M . Le stress oxydatif, Institut de Recherche sur le Stress (IRS).2010.
4. Boyd B, Ford C, Koepke MC, Gary K, Horn E, Mc Analley S, Mc Analley B. Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience & Nutrition*. 4(6): 7,2003
5. Walker J. E. M., Saraste M. J., Runswick N. J. Distantly related sequences in the alpha and bêta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*. 1.8: 945-951, 1982.
6. Marcel C. Stress oxydatif, radicaux libres, *Association Française de Médecine Esthétique et anti-âge (afme)*. 2016.

**RESULTATS
ET
DISCUSSIONS**

C.I L'extraction de kératine et synthèses de ces dérivées.

C.I.1 Introduction :

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'extraction de kératine de la laine et la synthèse d'une nouvelle série de biomatériaux kératinique à partir des synthèses organométalliques en utilisant les sels de métaux de transitions (Cu, Co et Zn) ensuite effectuer l'évaluation antioxydant de ces biomatériaux. La stratégie de l'extraction de ligand appelée la kératine et la synthèse détaillée des produits pivots à savoir les complexes organométalliques correspondants et discuterons des résultats par identification qualitative (CCM, test de ninhydrine et test de biuret) ainsi que les analyses spectrométriques : UV, IR, ensuite nous présenterons les résultats discutés et commentés du travail réalisé dans le laboratoire.

C.I.2 L'extraction de kératine par voie chimique (Hydrolyse alcalin) :

La laine est chargée d'impuretés comme de la poussière et la matière grasse. Pour cette raison, nous l'avons immergée dans l'eau froide toute une nuit, nous l'avons ensuite nettoyée avec du détergeant et rincée abondamment avec de l'eau distillée puis séchée à l'air libre.

Pour faciliter sa manipulation, nous avons coupé la laine en fibres très courtes, en utilisant une paire de ciseaux comme la montre la figure ci-dessous.



Figure C.I.1: La laine très courte.

Dans un bécher, on prépare une solution alcaline de NaOH avec des concentrations différentes (2%, 4%, 10%). Plusieurs essais ont été réalisés afin d'avoir le meilleur rendement de kératine extraite. La concentration, la température et la durée des expériences sont les paramètres sur lesquels on doit jouer pour réussir cette extraction. Pour toutes ces expériences, nous avons utilisé 4g de laine. Cinq solutions sont préparées, la composition de chacune est illustrée dans la figure et le tableau ci-dessous.

Tableau C.I.1: Les différents essais effectués pour extraire la kératine de la laine.

Essai	Composition	Température (°C)	Durée(h)	Rendement (Gel/Solide)
1	La laine+ 2% de NaOH	Ambiante	48h	34.5% / 45.5%
2	La laine+ 2% de NaOH	80	20 min	15.75% / 22.25%
3	La laine+ 4% de NaOH	30	3h	36.75% / 43.25%
4	La laine+ 4% de NaOH	Ambiante	48h	0 / 29.5%
5	La laine+ 10% de NaOH	30	3h	0 / 20.13%



Figure C.I.2 : Préparation des échantillons.

C.I.2.1 Résultats et discussion de l'extraction de la laine par hydrolyse :

Tout d'abord, nous avons constaté l'apparition d'une couleur jaune dans chaque solution indiquant l'attaque de NaOH sur les fibres de la laine et cette couleur provient des acides aminés existants à la surface de la cuticule. Ensuite lors de la filtration des solutions, effectuée en utilisant un entonnoir (Figure C.I.3).

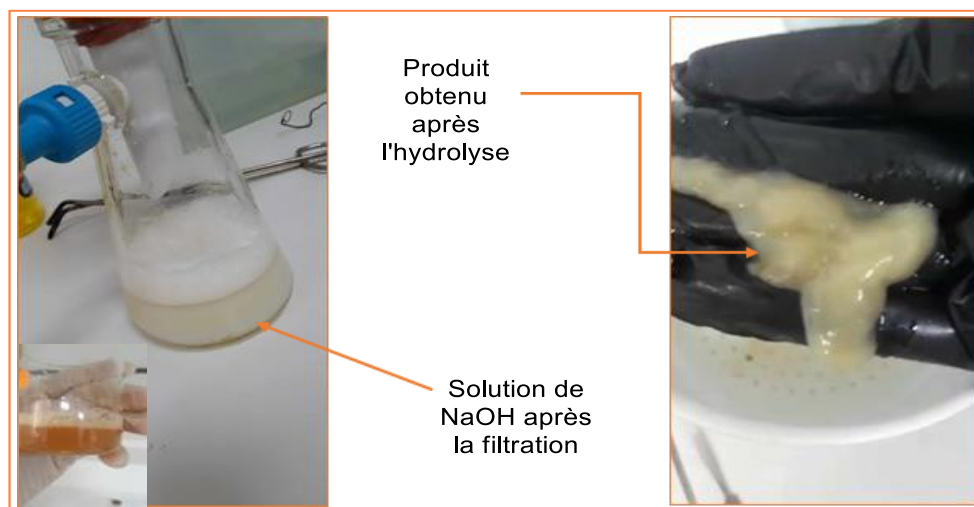


Figure C.I.3 : Etape de filtration des solutions.

Ci-dessous, nous décrivons les résultats obtenus après filtrage.

- ❖ Résultat de l'essai N°01 et N°03 : Dans ces deux essais, les pattes obtenues se présentent sous forme gélativeuse avec l'existence de quelques fibres gonflées (Figure C. 4)

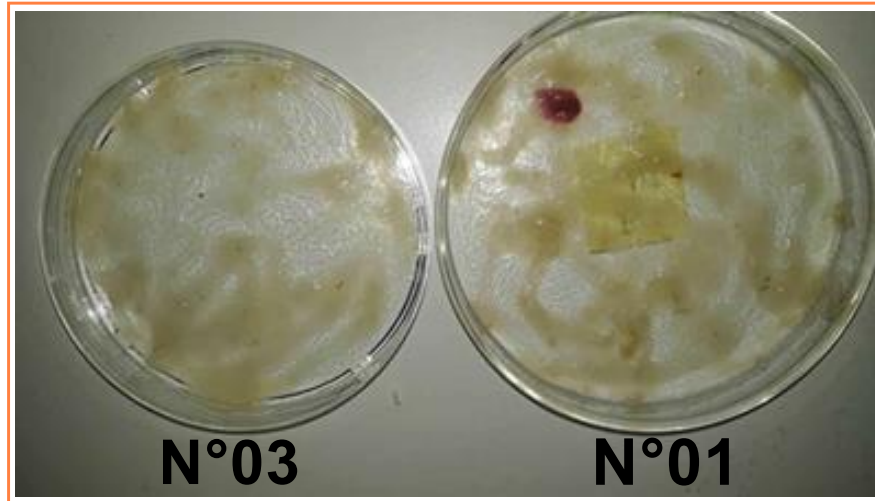


Figure C.I.4 : Résultat de l'essai N°01 et N°03

- ❖ Résultat de l'essai N°02 : Après filtration, le produit obtenu est un gel et la quantité obtenue est faible par rapport au premier essai.



Figure C.I.5 : Résultat de l'essai N°02

- ❖ Résultat de l'essai N°04 et N°05 : Nous remarquons que l'élévation de la température et la concentration de NaOH indique la dégradation totale de la laine avec l'obtention d'une solution jaunâtre d'une petite quantité de produit obtenu après filtration comparativement avec les premiers essais Cela provient de l'élévation de la température qui fait dégrader la laine progressivement.

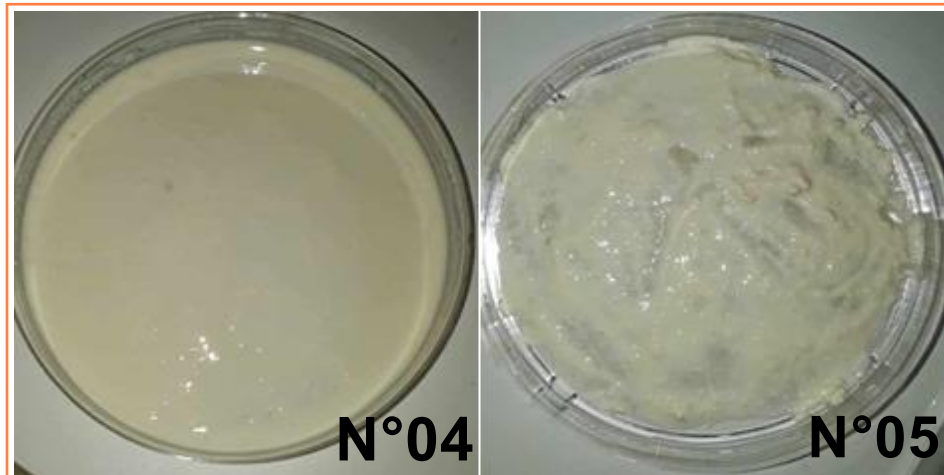


Figure C.I.6 : Résultat de l'essai N°04 et N°05

Après filtration de chaque essai, le filtrat est acidifié pour obtenir la kératine sous forme un solide beige ensuite on doit faire plusieurs lavages avec l'eau distillée après la centrifugation (FigureC.I.7).

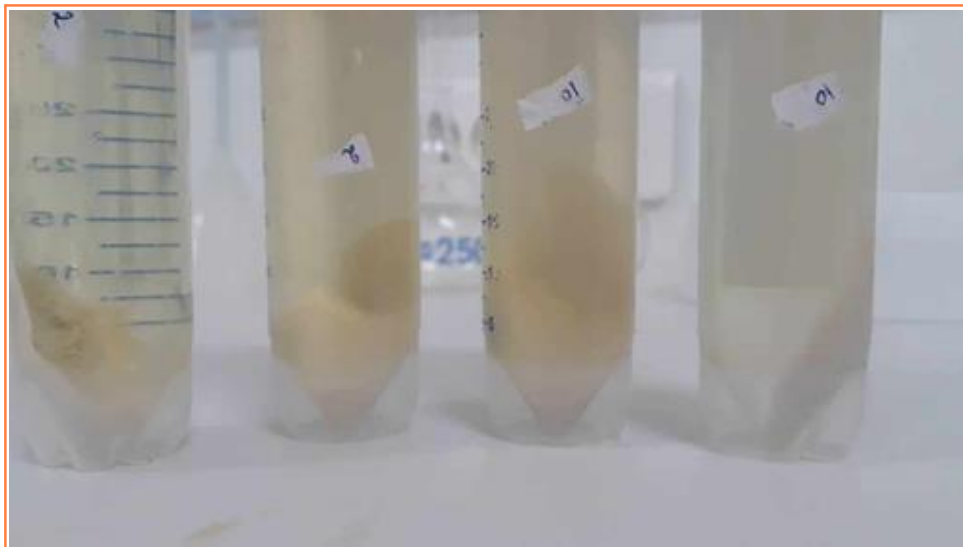


Figure C.I.7: La kératine après centrifugation.

Le meilleur rendement obtenu est dans l'essai N°01 avec une valeur de 34.5% (G)/45.5% (S) (voir tableau C.I.1)

1. Identification structurale de kératine extraite de la laine :

La structure de la kératine est mise en évidence par la spectroscopie IR

Spectroscopie IR :

La figure C.I.8 présente le spectre de la kératine en mode absorbance. L'attribution des bandes spectrales est résumée ci-dessous.

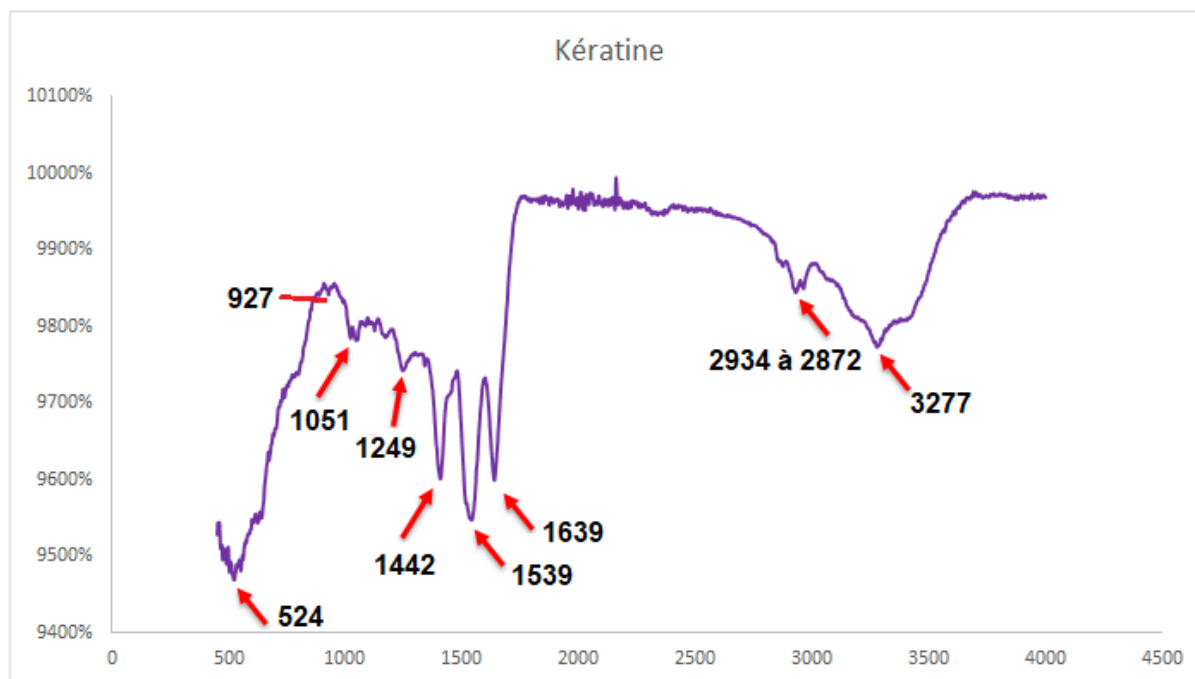


Figure C.I.8 : Spectre IR de la kératine.

Les changements conformationnels dans les chaînes polypeptidiques de kératine extraite de la laine sont analysés à partir du spectre IR.

- On observe, une bande d'absorption est apparait environ de 3277 cm^{-1} correspondant à la vibration N-H confirme la présence de l'**amide A**. Les deux faibles pics s'étendent entre $2934\text{ à }2872\text{ cm}^{-1}$ sont liés à la vibration de groupement alkyl CH_3 ¹⁻².
- Concernant l'**amide I**, La bande se présente autour de [1600 cm^{-1} - 1700 cm^{-1}]. Un pic intense d'absorption attribuée à la fonction carbonyle C=O couplée très légèrement avec les vibrations des groupes N-H et C-N située à 1639 cm^{-1} ³⁻⁴.
- Pour l'**amide II**, La bande spectrale se présente autour de [1410 cm^{-1} - 1600 cm^{-1}].

La présence d'une bande autour de $1539\text{ à }1516\text{ cm}^{-1}$ est assigné la fonction amine N-H et élongation de liaison C-H, cette bande caractérise l'hélice α ².

Une bande à 1442 cm^{-1} apparait avec la même intensité dans les deux courbes caractéristiques de $\text{H}_2\text{C-CH}$ indique que le squelette carboné su polypeptide n'est pas dégradé lors de l'extraction de kératine.

- **Amide III**, La bande spectrale se présente autour de $[1249 \text{ cm}^{-1} - 1338 \text{ cm}^{-1}]$ est de très faible intensité. Elle est attribuée principalement au groupement C-N et N-H⁵⁻⁶ ainsi que des signaux provenant de la déformation de C=O et de la vibration de l'élongation C-C⁷⁻⁸.

La présence d'une faible intensité à 1051 cm^{-1} est liée à la vibration (S-O) de l'acide cystique. Ainsi que l'apparition d'un pic autour de 1084 cm^{-1} correspond au sel de Bunte (Cy-S-SO₃Na).

Le pic à 927 et 524 cm^{-1} est associé aux liaisons C-S et S-S⁵.

Les bandes des amides I-III confirment l'existence de la structure du squelette protéique⁹.

Spectre UV-Vis :

La kératine qui est une protéine complexe a des propriétés optiques étudiées par beaucoup de chercheur.

Le spectre d'absorption de la solution de kératine extraite de la laine a montré un pic large dans l'intervalle de 203 à 288 nm (figure C.I.9). La mesure d'absorption UV-Vis de la solution de kératine extraite de la laine a montré un pic initial à 220 nm lié aux acides aminés et aux groupements d'acides carboxyliques formant des liaisons peptidiques, et une bande maximale à 288 nm indique l'apparition de noyau aromatique des groupements acides aminés⁷⁻⁸. Les principaux chromophores absorbant dans la région UV sont des composés aromatiques d'acides aminés tels que le tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine qui sont présents dans la série de la kératine.

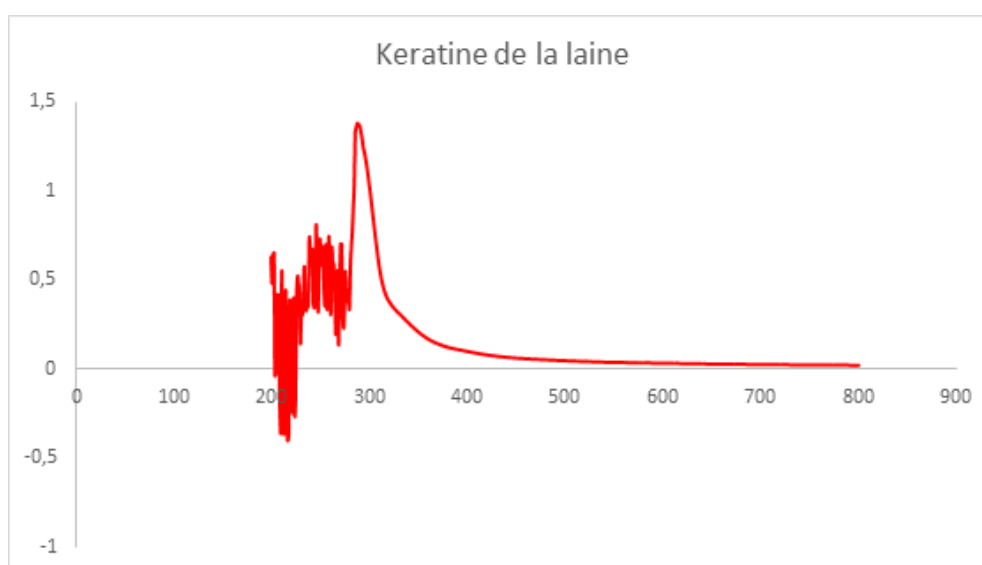


Figure C.I.9 : Spectre UV-Vis de la kératine de la laine

2. Identification qualitative de kératine de mouton extraite :

- **Ajout de la ninhydrine :**

Ajouter quelques gouttes de la solution de ninhydrine sur l'échantillon. Si la chromatographie sur couche mince est utilisée, vaporiser la solution de ninhydrine sur la plaque.

- **Chauffage :**

Chauffer l'échantillon traité à environ 100-110°C pendant 5 à 10 minutes. Cela peut être fait dans un four ou sur une plaque chauffante.

- **Observation :**

Après chauffage, observer la couleur développée. Les acides aminés réagiront avec la ninhydrine pour donner une coloration bleue à violette. Certains acides aminés peuvent donner des couleurs différentes (par exemple, la proline donne une couleur jaune).

- **Interprétation des résultats :**

- **Couleur bleue / violette :** Indique la présence de la plupart des acides aminés, car ils possèdent des groupes amine libres qui réagissent avec la ninhydrine.
- **Couleur jaune :** Typiquement observée avec la proline et l'hydroxyproline, en raison de leur structure cyclique.
- **Absence de couleur :** Indique l'absence des acides aminés ou la présence des substances ne possédant pas de groupes aminés libres.

Dans notre cas d'étude le test a donné une couleur violette ce qui prouve la présence de la plupart des acides aminés.



Figure C.I.10: Résultat de CCM

3. Identification des acides aminés par le test Ninhydrine :

L'identification des acides aminés par le test ninhydrine est une méthode classique en biochimie pour détecter la présence d'acides aminés. La ninhydrine réagit avec les groupements amine libres des acides aminés pour produire un composé coloré, généralement bleu ou violet, ce qui permet leur identification.

Les étapes typiques pour réaliser ce test sur un échantillon contenant la kératine sont :

- **Préparation de la solution de ninhydrine :**

Dissoudre la ninhydrine dans un solvant approprié, généralement l'éthanol pour obtenir une solution de 0,5%.

- **Préparation de la solution de kératine :**

Dissoudre la kératine dans l'eau déminéralisée jusqu'à la dissolution complète de kératine.

Verser une petite quantité de solution de kératine (solide et gel) dans des tubes à essai et ajouter quelques gouttes de ninhydrine sur l'échantillon.



Figure C.I.11 : Préparation des échantillons de kératine pour le test Ninhydrine

- **Chauffage :**

L'échantillon traité est chauffé pendant 10 à 15 minutes dans un bain marie.

- **Observation :**

Dans notre cas d'étude, le test a révélé une couleur violette. Cette observation indique la présence des acides aminés composant la kératine. La couleur violette est un signe distinctif de la réaction positive avec ces acides aminés.



Figure C.I.12 : Résultat du test Ninhydrine

4. Identification des acides aminés par test de Biuret :

Cette réaction caractérise la liaison peptidique et utilisée pour identifier les protéines et des peptides. Le principe de ce test consiste à mélanger la solution de kératine avec une solution de sulfate de cuivre fortement alcaline ce qui entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et les liaisons peptidiques avec l'apparition d'une coloration violette, comme la montre la figure suivante :



Figure C.I.13: Test de biuret

5. Identification structurale de biomatériaux Synthétisés :

La structure de kératine est mise en évidence par la spectroscopie IR.

Spectroscopie IR :

Les trois figures (C.I.9, C.I.10, C.I.11) montrent les spectres FTIR de kératine avec ces complexes kératiniques correspondantes et l'ion métallique. Le spectre de kératine extraite de la laine a montré une vibration des groupements O-H et N-H envers 3406 et 3283 cm^{-1} et une vibration d'élongation de C-H aliphatique à 2974 cm^{-1} ¹⁰. L'apparition des bandes à 1638, 1543 et 1247 cm^{-1} ont été respectivement attribuées à l'amide I (élongation de C=O), à l'amide II (N-H secondaire) et à l'amide III (élongation de C-N)¹¹. La position de ces bandes montre la structure représentative de la protéine. L'amide I est principalement associée au groupement carbonyle C=O dans la région de 1700 à 1600 cm^{-1} tandis que l'amide II est associé à la fonction N-H et à la vibration d'étirement C-H dans la région de 1543 à 1514 cm^{-1} . En revanche, l'Amide III est présent dans l'intervalle d'absorption de 1409 à 1244 cm^{-1} , en raison de la combinaison de la fonction C=O et de la vibration d'élongation de C-N¹⁰. Lorsque la kératine réagit avec les ions métalliques pour avoir des complexes kératiniques, la position du pic et l'intensité varient en fonction du type d'ion métallique (Cu, Co, Zn), ce qui indique que l'interaction entre la kératine de la laine et chaque ion métallique est différente.

Les ions métalliques interagissent différemment avec la kératine en raison de sa poids moléculaire ainsi que l'affinité électronique des ions métalliques qui peuvent réagir avec les groupements fonctionnels (NH, NH₂, C=O, -S-) de kératine et peuvent montrer des pics à des positions et intensités différentes (voir tableau C.I.2).

Tableau C.I.2 : Les fréquences de vibration de quelques liaisons de kératine et ces complexes

Biomaté riau × kératini que	IR (cm^{-1})								
	OH/NH- NH ₂	C-H _{ar}	-CH _{all}	C=O	N-H/ C-H _{élong}	C-CH	C- N _{élong}	C-S	S-S
Kératine	3406- 3283	3098	2966- 2878	1638	1535	1409	1243	927	524
K-Cu	3276	3078	2960	1643	1537	1394	1245	-	616
K-Co	3307	-	2917	1647	1537	1370	1243	982	570
K-Zn	3297	-	2964	1684	1504	1386	-	942	530

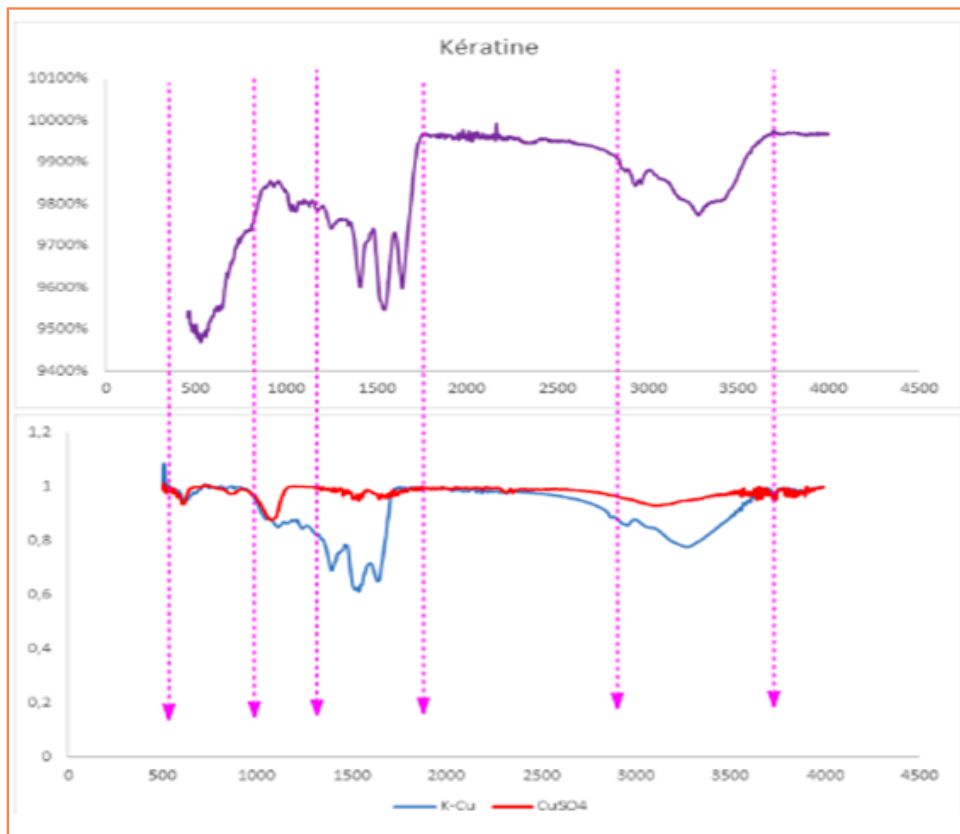


Figure C.I.14 : Spectre IR de kératine, le complexe (K-Cu) et CuSO_4



Figure C.I.15 : Spectre IR de kératine, le complexe (K-Co) et CoSO_4

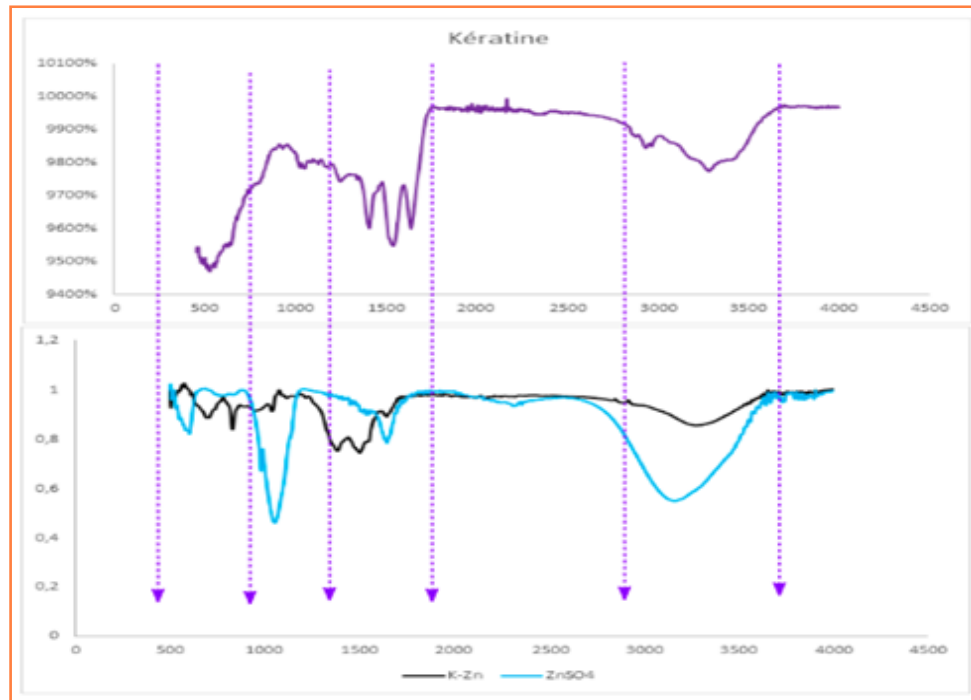


Figure C.I.16 : Spectre IR de kératine, le complexe (K-Zn) et ZnSO_4

C.I.3 Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons exploré l'extraction de kératine à partir de laine et sa synthèse organométallique avec des ions métalliques à savoir Cu, Co et Zn pour obtenir de nouveaux biomatériaux kératiniques qui sont caractérisés par FTIR et UV-vis. On peut observer que toutes ces bandes dans les complexes kératiniques subissent un décalage des fréquences.

Avec l'ensemble des remarques, on peut conclure que les protéines peuvent se lier aux ions métalliques à travers des groupes aminés et/ou des résidus de cystéine. L'évaluation antioxydante de ces biomatériaux a également été réalisée.

De plus, nous avons identifié biochimiquement les produits obtenus à travers la chromatographie sur couche mince (CCM), du test de ninhydrine et du test de biuret.

Les résultats ont montré que la possède des propriétés antioxydantes considérables.

La discussion des résultats a permis de mieux comprendre les mécanismes de réaction et les propriétés des nouveaux biomatériaux kératiniques.

Références :

1. Edwards, H. Hunt, D. Sibley, M. FT-Raman spectroscopic study of keratotic materials: horn, hoof and tortoiseshell. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 54.5: 745-757.1998.
2. Eslahi, N. Dadashian, F. Nejad, N.H. An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 43.7: 624-648. 2013.
3. Aluigi, A. Vineis, C. Varesano, A Mazzuchetti, G. Ferrero, F Tonin, C. Structure and properties of keratin/PEO blend nanofibres. *European Polymer Journal* 44.8: 2465-2475. 2008
4. Mohanty, A.K. Misra, M. Drzal, L.T. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites. CRC press, 2005.
5. Vasconcelos, A. Freddi, G. Cavaco-Paulo, A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin. *Biomacromolecules*, 9.4 :1299-1305.2018.
6. Wojciechowska, E. Włochowicz, A. Weselucha-Birczyńska, A. Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy to study degradation of the wool fiber keratin. *Journal of Molecular Structure*, 511 :307-318.1999.
7. Idris, A. Vijayaraghavan, R. Rana, U.A. Fredericks, D. Patti, A. MacFarlane, D. Dissolution of feather keratin in ionic liquids. *Green chemistry*, 15.2: 525-534. 2013.
8. Zhang, J. Yi, L. Jiashen, L. Zheng, Z. Xuan, L. Zhi, L. Yanxia, H. Junyan, H. Ai-Zheng, Ch. Isolation and characterization of biofunctional keratin particles extracted from wool wastes. *Powder technology*, 246: 356-362.2013.
9. Bomou, M. Qiao, X. Hou, X. Yang, Y. Pure keratin membrane and fibers from chicken feather. *International journal of biological macromolecules*, 89: 614-621.2016.
10. J. Wang, S. Hao, T. Luo, Q. Yang, B. Wang, Development of feather keratin nanoparticles and investigation of their hemostatic efficacy, *Mater. Sci. Eng. C*. 68 (2016) 768–773.
11. N. Eslahi, F. Dadashian, N.H. Nejad, An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43 (2013) 624–648.

C.II Résultats et discussion du pouvoir antioxydant

C.II.1 Introduction :

L'activité antioxydante des composés est un sujet de grande importance dans la recherche scientifique en raison de leur rôle crucial dans la prévention des dommages oxydatifs causés par les radicaux libres. Ces radicaux libres sont des molécules instables qui peuvent provoquer des dommages cellulaires, conduisant à diverses maladies chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les troubles neurodégénératifs. Dans cette étude, nous avons examiné l'activité antioxydante de la kératine extraite de la laine, en utilisant le test de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle). Le DPPH est un radical stable violet qui, en présence d'un antioxydant, subit une réduction, entraînant un changement de couleur de violet à jaune. Ce changement est mesuré par une diminution de l'absorption à 517 nm. Notre objectif était de comparer l'efficacité antioxydante de la kératine de laine à celle d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique, afin de déterminer son potentiel en tant qu'agent antioxydant naturel.

C.II.2 Activité antioxydante :

C.II.2.1 Effet piégeage des radicaux libre DPPH :

Pour détecter l'activité antiradicalaire de kératine extraite, nous avons utilisé le 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué se base sur le changement de couleur en jaune lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire (figure C.II.1).

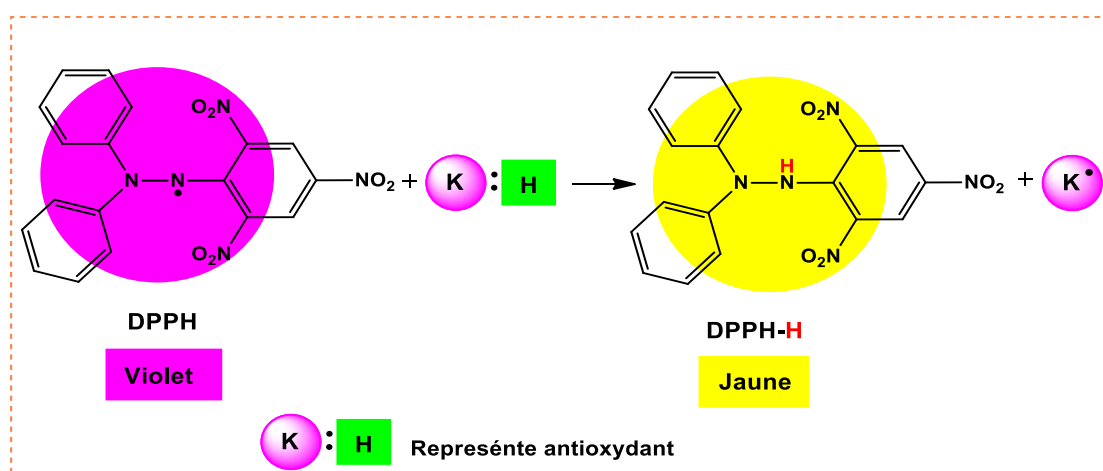


Figure C.II.1 : Piégeage des radicaux libre DPPH par la kératine de la laine

D'après les résultats l'histogramme ci-dessous représente l'inhibition du piégeage des radicaux libre DPPH en fonction de concentration de kératine extraite et l'acide ascorbique (figure C.II.2)

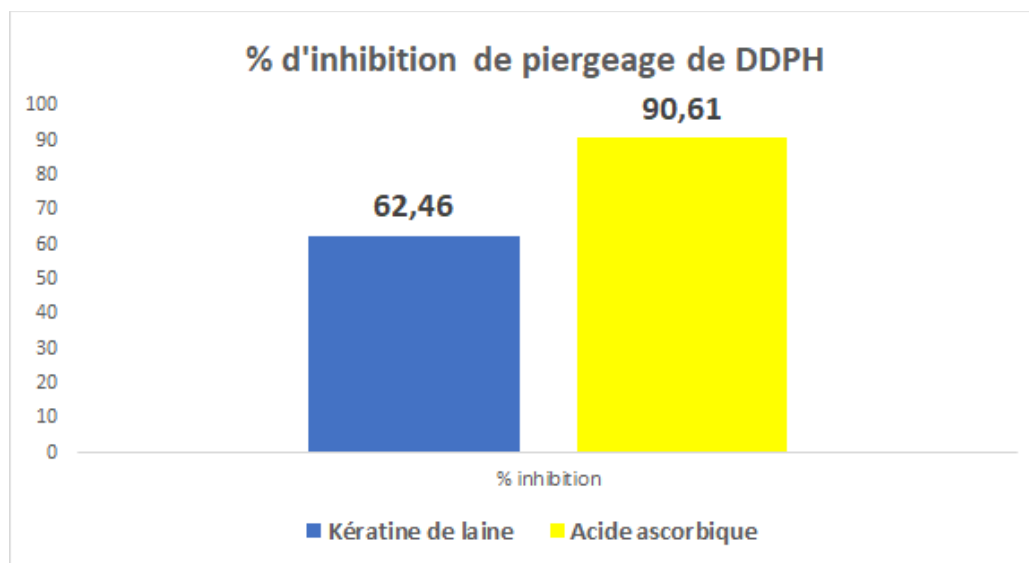


Figure C.II.2 : Histogramme représentant le pouvoir antioxydant de kératine de la laine et la vitamine C

D'après les résultats obtenus, les produits testés dans l'histogramme précédant, on constate clairement que la kératine extraite de la laine par l'hydrolyse présente un pouvoir antioxydant considérable de l'ordre de 62,46% en comparaison avec l'antioxydants standard acide ascorbique et sa valeur de l'inhibition égale à 90,61%. Cet effet due au piégeage des radicaux libre DPPH par la kératine de la laine.

C.II.3 Conclusion :

En conclusion, les résultats obtenus de cette étude montrent que la kératine extraite de la laine présente une activité antioxydante significative. Les tests ont révélé que la kératine a un pouvoir antioxydant de l'ordre de 62,46 %, comparé à l'acide ascorbique qui a une inhibition de 97,71 %. Cette activité est attribuée à la présence de divers acides aminés et de leurs structures contenant des groupements fonctionnels tels que OH, NH₂, et SH. Ces groupements fonctionnels renforcent le pouvoir antioxydant en réagissant avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables, mettant ainsi fin à la réaction en chaîne radicalaire. Ces résultats indiquent que la kératine de laine pourrait être utilisée comme une source potentielle d'antioxydants naturels, ouvrant la voie à son application dans divers domaines tels que la cosmétique, les compléments alimentaires et les produits pharmaceutiques.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La synthèse de complexes organométalliques kératiniques constituent un sujet de recherche actuel et continue d'attirer de nombreux groupes de recherche à travers le monde, tant au niveau universitaire ou industriel.

L'objet de notre travail est basé sur l'extraction de la kératine à partir de la laine et la synthèse de nouveaux complexes organométalliques avec les métaux de transitions (Cu, Co et Zn) en utilisant la kératine comme étant un ligand principal. Ensuite ces biomatériaux kératiniques sont évalués comme étant des agents antioxydant.

Pour réussir à extraire la kératine de la laine par des méthodes chimiques (hydrolyse), plusieurs paramètres ont été modifiés. L'essai N°01 conduit à un meilleur rendement de 45.5%

Les complexes synthétisés ont été élucidés par quelques techniques usuelles, telles que le l'UV-vis et le spectroscopie infrarouge (IR). L'analyse par FTIR montre l'existence de trois bandes (amide I, amide II, amide III) indiquant la présence de protéine qui est la kératine. Correspondantes aux biomatériaux préparés sans oublier l'identification de la kératine par chromatographie sur couche mince (CCM) et les tests biochimiques à savoir ninhydrine et biuret qui indiquent la présence de protéine qui est constituées de différentes acides aminés, Cela confirme l'existence de la kératine extraite de la laine.

L'évaluation de l'activité antioxydante montre que la kératine extraite de la laine possède une activité antiradicalaire considérable de l'ordre de 62,46% par rapport à la vitamine C avec une 90,61% qui est utilisée comme produit de référence.

Les perspectives de ce travail, elles peuvent clarification autour des points suivants :

- Faire d'autres analyses pour identifier les biomatériaux à savoir spectroscopie des solides, chromatographie sur couche mince (CCM), la Diffraction des Rayons X (DRX) et microscopie électronique à balayage (MEB), ...etc.
- Etudier de façon plus approfondie d'autres propriétés biologiques de ces biomatériaux telles que : les propriétés anti-inflammatoires et antivirales.
- L'utilisation de nos différents complexes, comme catalyseurs dans d'autres réactions de chimie organique.

- Conception de nouvelles formes pharmaceutiques destinées à usage thérapeutique comme le traitement du cancer et des affections cardiaques, pour l'élaboration de tissus artificiels et dans beaucoup d'autres applications.