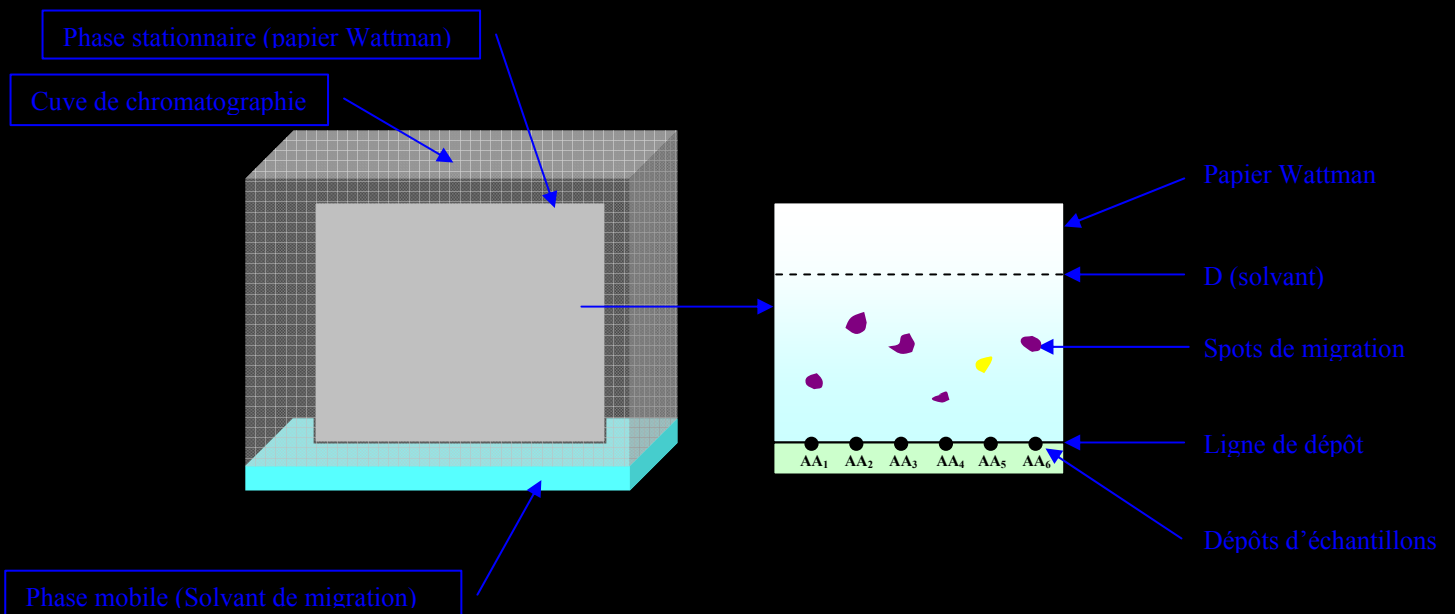


# Dr Amel Boumendjel

*Enseignante à l'Université Badji-Mokhtar Annaba  
Faculté des Sciences  
Département de Biochimie*

Support de cours du module

## Biochimie appliquée



Année universitaire 2006-2007

## Introduction

Cet ouvrage est avant tout destiné aux étudiants de la faculté des sciences désireux de parfaire leurs connaissances en matière de biochimie dans ses divers vecteurs : végétal, animal et microbien.

Ainsi, les multiples substances biologiques peuvent avoir des origines multiples. Qu'elles soient végétales, animales ou microbiennes, elles constituent, toutes, la matière première à partir de laquelle il est possible d'arriver à un certain nombre de produits susceptibles de trouver une application dans des domaines variés, notamment dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques ...etc. A cet effet, l'auteur a tenté de rassembler les nombreuses connaissances en biochimie appliquée, répondant ainsi à juste titre à leur dispersion à travers la littérature.

Dans un premier chapitre, l'auteur de l'ouvrage, traite de la nature des substances d'origine végétale, de leur extraction et de leur intérêt. Dans le chapitre suivant, il expose les principaux constituants d'origine animale et précise leur composition et leur structure ainsi que leur isolement et leur valorisation. Enfin, dans un troisième chapitre consacré aux diverses substances d'origine microbienne, il illustre ses informations par différents exemples d'application, dont principalement les enzymes qui sont spécialement développées dans le dernier chapitre d'enzymologie appliquée.

Destinée à aider principalement les étudiants de fin de cycle, la formule, qui y est proposée, enrichie de figures et de tableaux, se prête bien à l'utilisation pédagogique. De cette façon, l'auteur pense contribuer à la formation de ces étudiants en précisant les concepts et les données scientifiques et techniques qui sont à la base des innovations dans le domaine de la recherche appliquée en biochimie.

En outre, l'auteur signale qu'une annexe de l'ouvrage, donnée sous la forme d'une méthodologie originale pouvant servir de canevas-modèle, est consacrée aux critères de rédaction d'un mémoire de D.E.S.

## **PROGRAMME OFFICIEL DU MODULE DE** **BIOCHIMIE APPLIQUEE**

### Chapitre 1: **Biochimie des substances d'origine végétale:**

- 1 – Les macromolécules de la paroi végétale (protéines, cellulose, hémicellulose, pectines, lignines et autres substances)
- 2 – Les substances foliaires (protéines foliaires, obtention d'isolats et de concentrats)
- 3 – Métabolites secondaires (les alcaloïdes, terpènes, polyphénols)

### Chapitre 2 : **Biochimie des substances d'origine animale:**

- 1 – Constituants des liquides biologiques
  - 1 - 1 - sang
  - 1 - 2 - sérum du lait
- 2 – Culture de cellules animales (eucaryotes)
  - 2 - 1 - le cycle cellulaire
  - 2 - 2 - Les différents types de culture
  - 2 - 3 - L'hybridation cellulaire – application à la production d'anticorps monoclonaux.

### Chapitre 3 : **Biochimie des substances d'origine microbienne:**

- 1 – Les enzymes
- 2 – Les vitamines
- 3 – Les antibiotiques
- 4 – Culture de biomasse et production d'organismes unicellulaires

### Chapitre 4 : **Enzymologie appliquée:**

- 1 – Les enzymes immobilisés et leur intérêt
  - 1 - 1 - méthodes d'immobilisation des enzymes
  - 1 - 2 - Propriétés des enzymes immobilisées
  - 1 - 3 - Applications
  - 1 - 4 - Réacteurs enzymatiques.
- 2 – Les enzymes artificielles: cas des cyclodextrines

## **Chapitre 1 : BIOCHIMIE DES SUBSTANCES D'ORIGINE VEGETALE:**

Assimilant azote et carbone, les végétaux devraient potentiellement être des fournisseurs de 1<sup>er</sup> choix en protéines pour l'Homme. Mais il n'en est rien: le titre en **protéines** est faible et beaucoup d'acides aminés essentiels manquent, sans compter la présence de facteurs antinutritionnels telles les lectines et les inhibiteurs de protéases.

Par contre, les plantes synthétisent des quantités **d'hydrates de carbone** excédant de beaucoup leur besoin. Leur paroi étant composée principalement de cellulose, d'hémicellulose, de pectine et de lignines.

Enfin, on observe la présence de substances particulières chez de nombreux végétaux, ce sont des **métabolites** dits **secondaires** qui sont témoins de la complexité du métabolisme végétal (tels: les terpènes, les polyphénols, les alcaloïdes etc.).

## **1 - 1 – LES MACROMOLECULES DE LA PAROI VEGETALE:**

### **1 - 1 - 1 – Rappel sur la composition de la paroi végétale:**

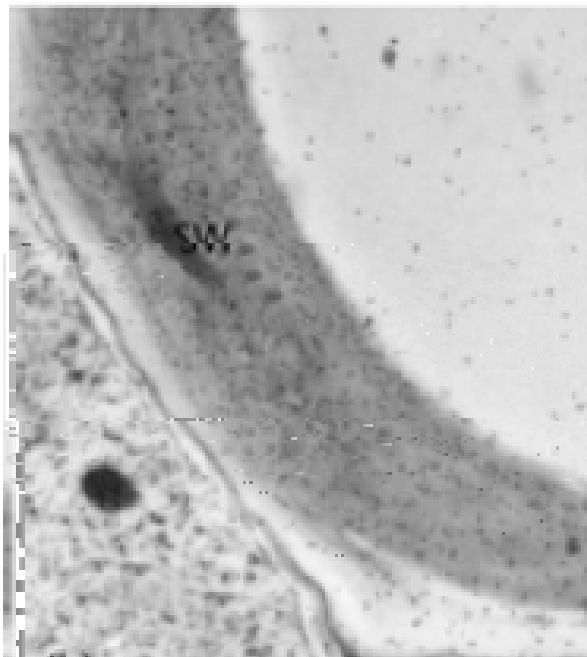
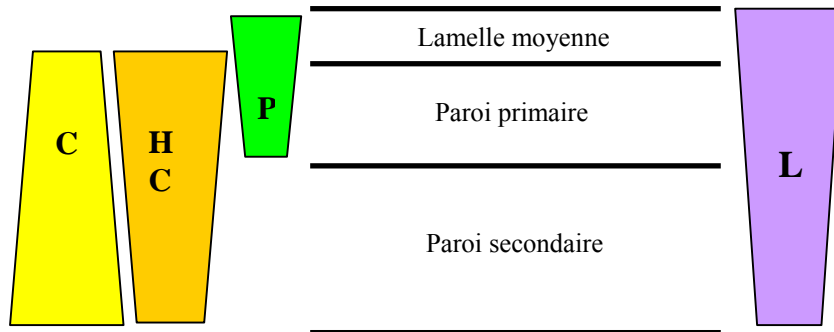
Malgré la diversité des types végétaux et de la grande variété des types cellulaires dans une même plante, on distingue de façon générale trois niveaux d'organisation de la paroi végétale :

- La lamelle moyenne: C'est la formation la plus périphérique, riche en protéines, constituée de pectines et de lignine. Par ses propriétés physico-chimiques la lamelle moyenne conditionne la cohésion intercellulaire.

- La paroi primaire: Très hydratée (90%), cette enveloppe fine et riche en hémicellulose constitue une matrice dans laquelle baignent des microfibrilles de cellulose (en faible pourcentage); on y rencontre aussi des substances pectiques. Au sein de ce réseau de polyholosides s'insèrent des chaînes peptidiques riches en hydroxyproline et serine (telle la glucoprotéine extensine).

- La paroi secondaire: Elle apparaît plus tard dans la croissance et elle est peu hydratée (20 % et moins); la cellulose (principal constituant) y est hautement cristalline.

La paroi végétale est donc constituée principalement de cellulose (**C**), pectine (**P**), hémicellulose (**HC**) et lignine (**L**). A ces polymères sont associés des produits azotés (protéines pariétales), lipides (cutine) et minéraux (silice  $\text{SiO}_2$ ).



**Table 1** Polysaccharides and structural proteins of primary cell walls

Polymer	Amount (%) <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	Principal building blocks	Notes
<b>Polysaccharides</b>				
<i>Microfibrillar</i>				
Cellulose	30	0	βGlc	Linear (1→4)-Glc <sub>n</sub> . Hydrogen-bonded within a microfibril
<i>Matrix</i>				
<b>Pectins</b>				
Homogalacturonan	16	-	αGalA	Linear (1→4)-GalA <sub>n</sub> . Some of GalA residues methyl-esterified, some O-acetylated. Nonesterified homogalacturonan is hydrolysed by EPG
Rhamnogalacturonan-I	10	-	αGalA, αRha, βGal, αAraf, ...	Backbone [-GalA-(1→4)-Rha-(1→2)-] <sub>n</sub> . ~Half the Rha residues carry Gal/Araf-rich oligomer side-chains. GalA residues O-acetylated. Not hydrolysed by EPG
Rhamnogalacturonan-II	4	-	α&βGalA, α&βRha, αGal, αFuc, αArap, βAraf, βAraf, βGlcA, KDO, βAcetA, αXyl, βDHA...	Extraordinarily complex polymer. α-(1→4)-GalA-rich core. Other residues as oligosaccharide side-chains attached via Api and KDO residues. Some Fuc and all Xyl residues as 2-O-methyl ethers. Some Araf residues esterified with borate. Not hydrolysed by EPG
Apogalacturonan	±	-	αGalA, Araf, ...	Only in certain aquatic angiosperms e.g. <i>Lemma</i>
<b>Hemicelluloses</b>				
<i>Xyloglucans</i>				
Xyloglucans	20	0	βGlc, αXyl, βGal, αFuc (±αAraf, βXyl)	Backbone (1→4)-Glc <sub>n</sub> . Frequent repeat units include XXXG and XXXF where X = αXyl-(1→6)-βGlc*, G = βGlc*, F = αFuc-(1→2)-βGal-(1→2)-αXyl-(1→6)-βGlc*; asterisked residues = part of backbone. Some Gal residues O-acetylated
Xylans	8	-	βXyl, αAraf, α-GlcA, β-D-Gal (± L-Gal, ...)	Backbone (1→4)-Xyl <sub>n</sub> . Side-chains, linked to C-2 or C-3 of backbone, include Araf, GlcA, Xyl-(1→2)-Araf and longer oligosaccharides. Some Xyl O-acetylated. Some Araf residues have ferulate esterified to C-5
Mannans	±	0	βMan, βGlc, αGal	Little studied in primary cell walls. Well known in secondary walls of xylem and in some seeds
Mixed-linkage glucans (MLGs)	±~	0	βGlc	Only in graminaceous monocots. Linear polymer with ~70% (1→4), 30% (1→3)-linkages
Callose	±	0	βGlc	Linear, (1→3)-Glc <sub>n</sub>
Glucuronomannans	±	-	βGlcA, αMan, Araf, Xyl, Gal	Backbone (-Man-(1→4)-GlcA-(1→2)-) <sub>n</sub> . Araf, Xyl and Gal residues as side-chains
<b>Proteins</b>				
<i>Extensins</i>				
Extensins	±	+	Hyp, Ser, Lys, Tyr, Val, His; 50–60% sugar [β&αAraf, αGal]	Basic polypeptide backbone. Tetrasaccharide (αAraf(1→3)-βAraf(1→2)-βAraf(1→2)-βAraf) O-linked to most Hyp residues. Single Gal attached to some Ser residues. Some Tyr coupled to form isodityrosine
<i>Arabinogalactan proteins (AGPs)</i>				
Arabinogalactan proteins (AGPs)	±	-	Hyp, Ser, Asp, Thr, Gly; 90–98% sugar [βGal, αAraf, GlcA, ...]	Slimes, e.g. gum arabic. Short, acidic polypeptide backbone. Polysaccharide groups (rich in (1→3) & (1→6)-linked Gal) O-linked to Hyp. Some AGPs tissue-specific. Some covalently attached to lipids
<i>Proline-rich proteins (PRPs)</i>				
Proline-rich proteins (PRPs)	±	+	Pro, Hyp, Val, Tyr, Lys	Hyp:Pro ratio ~1:1. May become covalently crosslinked, possibly via Tyr residues. Little or no sugar. Sometimes associated with lignin
<i>Glycine-rich proteins (GRPs)</i>				
Glycine-rich proteins (GRPs)	±		Gly; also Ser, Ala, ...	Often 60–70% Gly. Not glycosylated. Often associated with lignin

<sup>a</sup>Rough guide to amount of polymer present, as % of dry weight of a typical dicot primary cell wall from a rapidly growing cell culture. ±, not always present; -, amount varies greatly.

<sup>b</sup>Charge on polymer molecule (at physiological pH): -, negative; +, positive; 0, uncharged.

AceA, L-acetate; Ala, L-alanine; Api, D-apiose; Ara, L-arabinose; Asp, L-aspartate; D, optical isomer; DHA, 3-deoxy-2-D-heptulosate; DP, degree of polymerization; EPG, endopolygalacturonase; F, furanose ring form; Fuc, L-fucose; Gal, galactose (unless otherwise stated); GalB, D-galacturonic acid; Glc, D-glucose; GlcA, D-glucuronate; Glu, L-glutamate; GluB, L-glutamine; His, L-histidine; Hyp, L-hydroxyproline; KDO, D-ketodeoxyoctulate; L, optical isomer; Lys, L-lysine; Man, D-mannose; O, via oxygen atom; Pro, L-proline; Rha, L-rhamnose; Ser, L-serine; Thr, L-threonine; Tyr, L-tyrosine; Val, L-valine; Xyl, D-xylose. All sugar residues are in the pyranose (p) ring-form unless indicated.



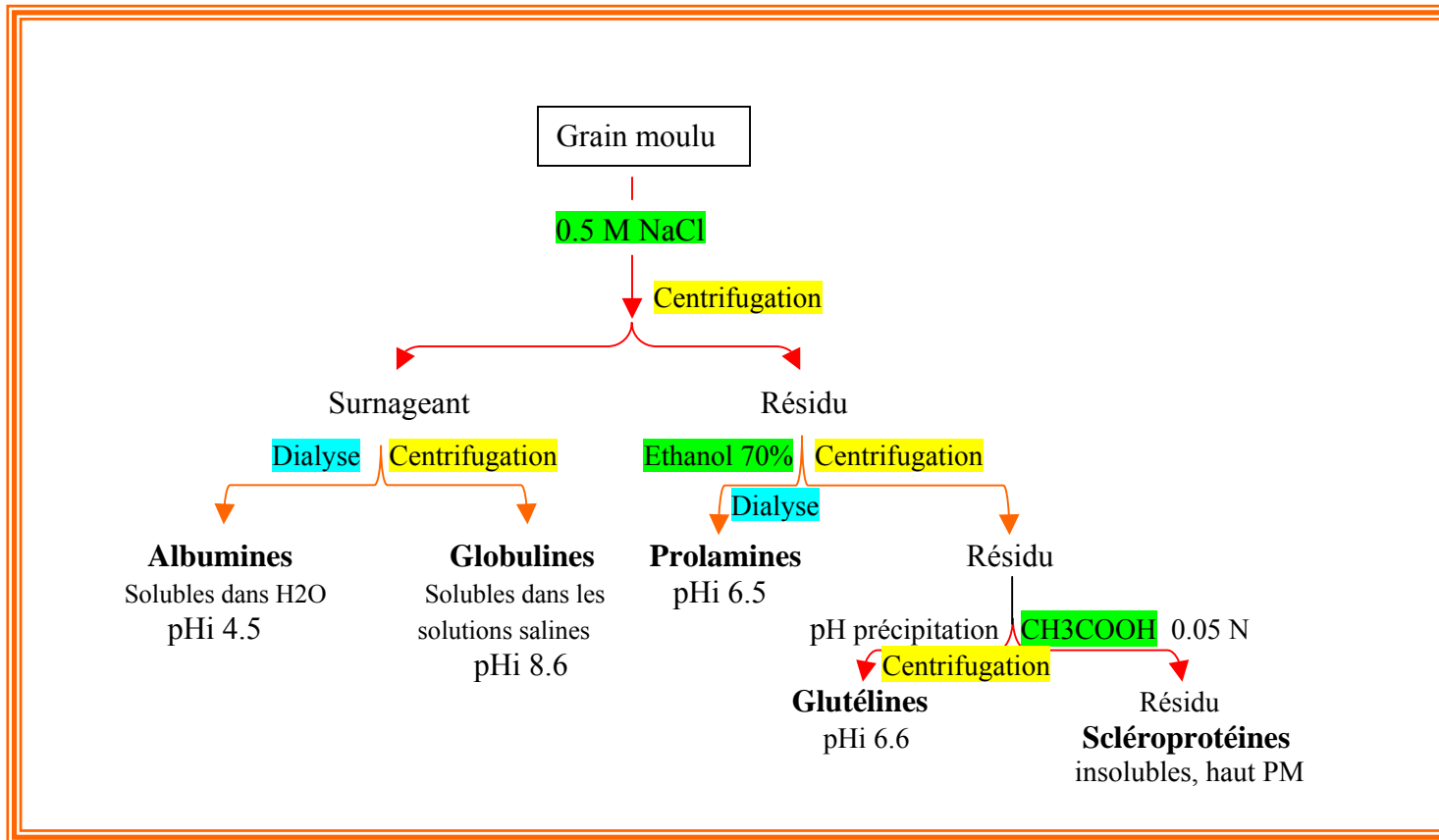


80%) est représentée par des globulines. Elles sont composées de deux classes: les globulines 7S et les globulines 11S appelées, respectivement conglycinine b et glycinine chez le soja, viciline et légumine chez le pois, dont les caractéristiques sont montrées dans le tableau 1.

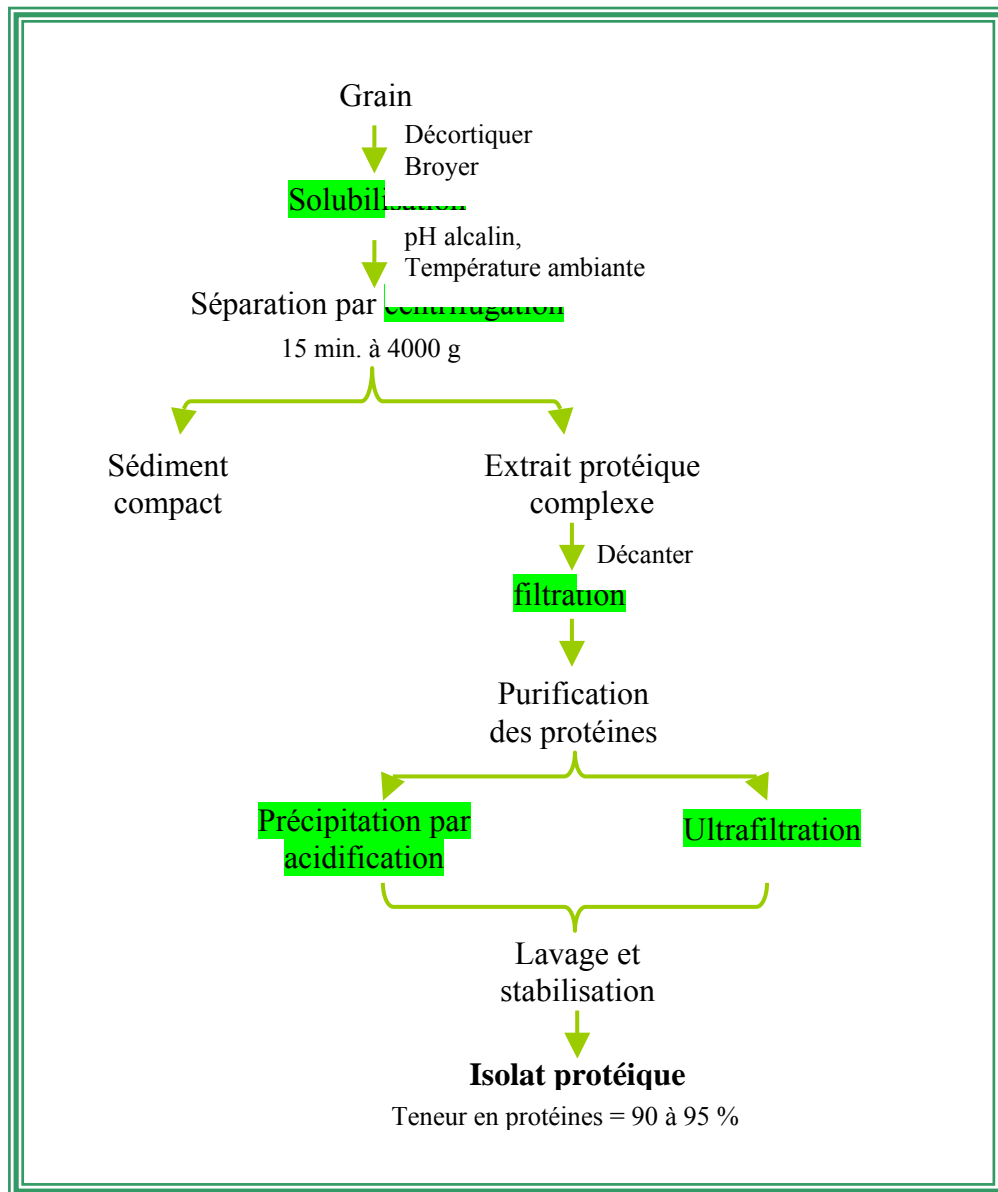
- **Extraction:** La figure 1 montre le schéma général d'extraction sélective de ces différentes protéines à partir d'un grain. Par contre dans la figure 2, la procédure de préparation d'isolat protéique total à partir des grains y est principalement développée. L'intérêt de ces isolats réside dans leurs bonnes propriétés de viscosité, gélifiantes et liantes.

**Tab. 1: Caractéristiques des fractions globuliniques des graines de légumineuses**

Fraction	PM (g)	pHi	Coagulation thermique	Coefficient de sédimentation
<b>Légumine</b>	5544 . 10 <sup>-18</sup>	4.8	Négative à 100°C	11 - 12 S
<b>Viciline</b>	3108 . 10 <sup>-20</sup>	5.5	Positive à 95°C	7 S



**Fig. 1: Schéma d'extraction sélective  
des protéines de graines**



**Fig. 2: Préparation d'isolat protéique à partir des grains.**

**Exemples des protéines de graines et leurs utilisations:**

- Les graminées sont particulièrement riches en prolamines (dont le PM est d'environ 30000 et dont la teneur en acide glutamique est de 15 à 25%): gliadine du blé, hordéine de l'orge, zéine du maïs, oryzine du riz, cafirine du sorgho, avenine de l'avoine, panicine du millet (voir tableau 2). L'hétérogénéité des gliadines est utilisée commercialement pour l'identification des cultivars, ce sont des marqueurs biochimiques de la qualité boulangère des farines. On observe une trentaine de gliadines différentes dans une même variété de blé. Les gliadines ainsi que les gluténines du blé constituent la majeure partie du gluten (l'autre constituant étant de nature lipidique).

**Tab. 2: Composition en fractions protéiques dans 100 g de protéine totale**

Culture	<i>Albumines</i>	<i>Globulines</i>	<i>Prolamines</i>	<i>Glutélines</i>
Avoine	10.2	18.2	14.3	<b>42.8</b>
Blé	8.2	10.8	45.1	25.2
Maïs	6.3	13.2	44.5	22.5
Millet	8 à 9.5	7.2 à 8.5	52.2 à 53.1	14.6 à 16.7
Orge	12.1	13.8	39.2	22.7
Pois	21	<b>66</b>	-	12
Féverole	20	<b>60</b>	-	15
Soja	10	<b>90</b>	-	-
Colza	44-52	20-25	3-4	6-9

La proportion et la nature des protéines de réserve joueraient un rôle prépondérant au niveau de l'influence sur la saveur du riz. Des recherches ont ainsi montré que les glutélines et les globulines auraient plus d'influence gustatives que les prolamines. Aussi, de nouvelles variétés de riz mieux adaptées pourraient être créées en étudiant les gènes codant pour ces trois groupes de protéines.

- Les dicotylédones sont surtout constituées de globulines (dont le PM est de 200000 à 300000 et dont la teneur riche en arginine est de 15 à 30%): édestine du chanvre, légumine du pois, arachine de l'arachide, ricine du ricin... cette dernière est une lectine ou phytohémagglutinine (PHA) [glucoprotéine toxique se comportant comme des anticorps vis à vis des globules rouges des vertébrés]; or certaines lectines induisent l'imperméabilisation des ovules à la pénétration des spermatozoïdes et pourraient être éventuellement utilisées comme anticonceptionnel.

### **B/ Les protéines des bulbes :**

Ces protéines ainsi que celles des tubercules, des rhizomes et des fruits se rencontrent essentiellement sous forme d'amides (asparagine et glutamine principalement) et d'acides aminés : ils représentent 72 % de l'azote total du tubercule de Dahlia, 54 % de celui de la racine charnue de Carotte, 67 % dans le cas du bulbe Ail...

### **1 - 1 - 3 - Les substances pectiques :**

**Origine** : Le fruit est l'une des matières végétales les plus riches en substances pectiques (voir tableau 3). Celles-ci se trouvent sous des formes diverses selon le degré de maturité des fruits:

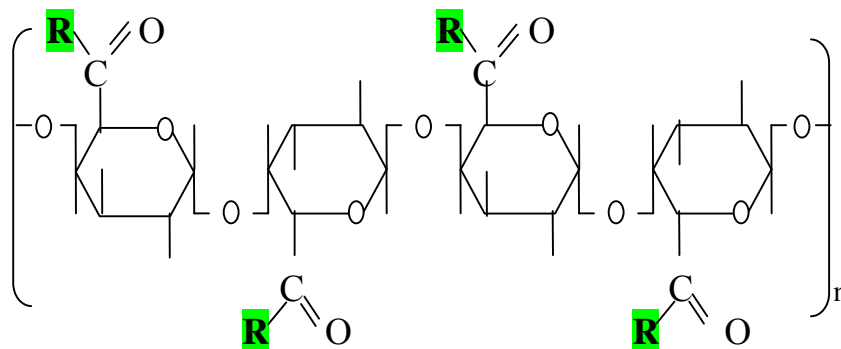
- Protopectine insoluble, car liée aux composants celluloses de la paroi cellulaire.
- Acides pectiniques estérifiés ou pectines.
- Acides pectiniques faiblement estérifiés, souvent pontés par du calcium (pectates).
- Acides pectiques totalement dé-estérifiés et insolubles (cette fraction homogalacturonique se trouve surtout au niveau des capitules de tournesol, et dans l'écorce de sapin...).

Au cours de la maturation du fruit, la transformation progressive de la protopectine en pectines solubles se fait selon des mécanismes enzymatiques (enzymes pectolytiques) qui aboutissent à la destruction de la rigidité de la structure cellulaire.

**Structure et classification** : La molécule de pectine peut être schématisée sous la forme d'une macromolécule d'acide polyanhydrogalacturonique partiellement méthoxylé (voir figure 3).

**Tab. 3: Teneur en substances pectiques de quelques végétaux**

Origine	Teneur en pectine (% de la matière sèche)
Pomme de terre	2.5
Carotte	10
Tomate	3
Pomme	4-7
Capitule de tournesol	25
Marc de betterave	15-20
Albedo des agrumes	30-35



**Fig. 3: Schéma d'une chaîne pectique**

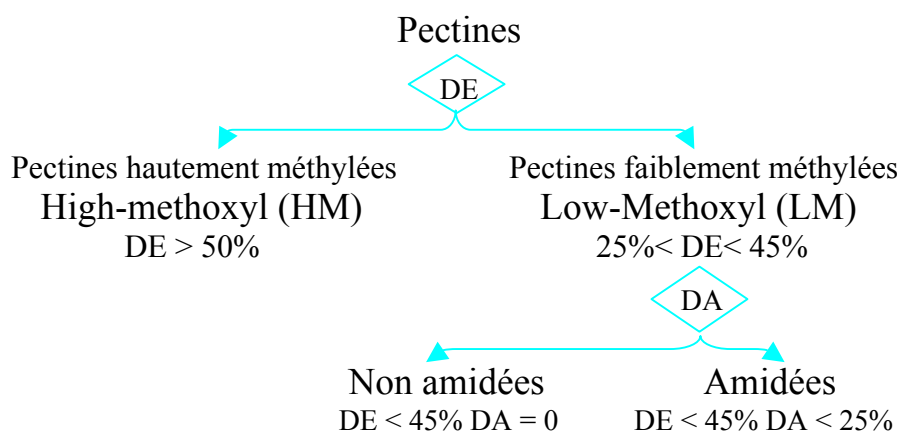
$R$  = OH acides pectiques

$R$  = OH , OCH<sub>3</sub> pectines (acides pectiniques)

$R$  = OH , OCH<sub>3</sub> , NH<sub>2</sub> pectines amidées

Sous forme d'hélice , ces chaînons formés d'unités d'acides  $\alpha$ ,D galacturonique liées en (1-4) sont interrompus par des liaisons avec le  $\beta$ ,L rhamnose qui provoque une déviation de l'hélice ( $90^\circ$ ) appelée "coude pectique" .

Ce sont essentiellement les propriétés gélifiantes des pectines qui sont à la base de leur classification en deux familles selon leur degré d'estérification, comme suit:

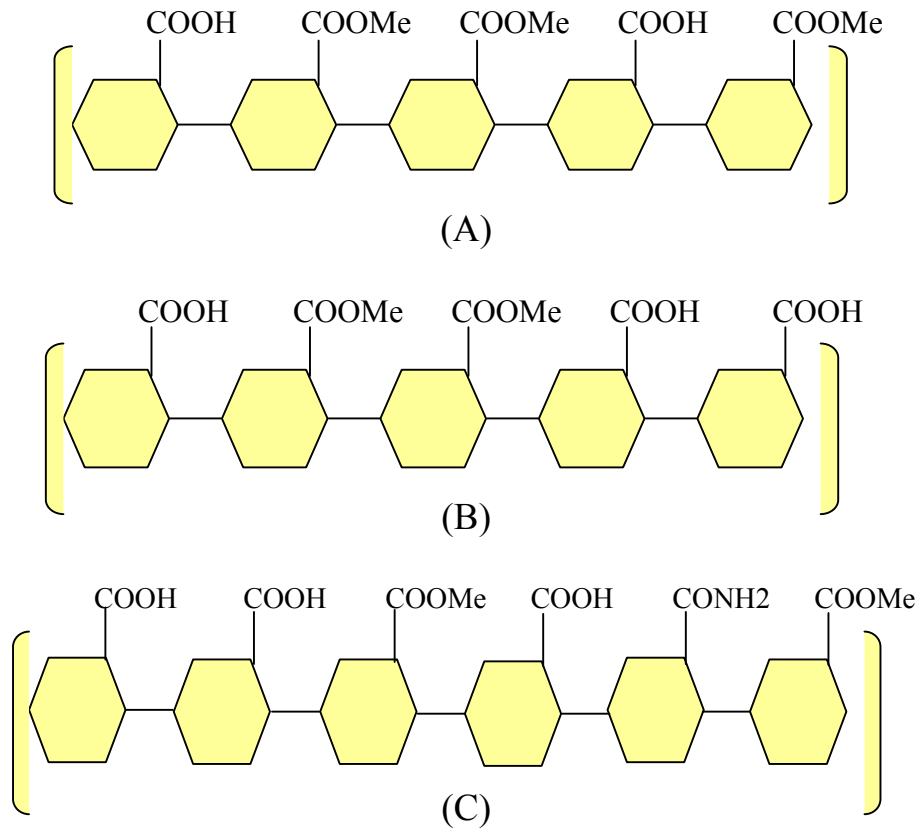


$$DE = \text{degré d'estérification} = \frac{100 \times \text{Nombre de groupes esters}}{100 \text{ motifs acide galacturonique}}$$

$$DA = \text{degré d'amidation} = \frac{100 \times \text{Nombre de groupes amides}}{100 \text{ motifs acide galacturonique}}$$



Ainsi, on distingue les pectines hautement méthylées et les pectines faiblement méthylées, dont des exemples sont donnés dans la figure 4.



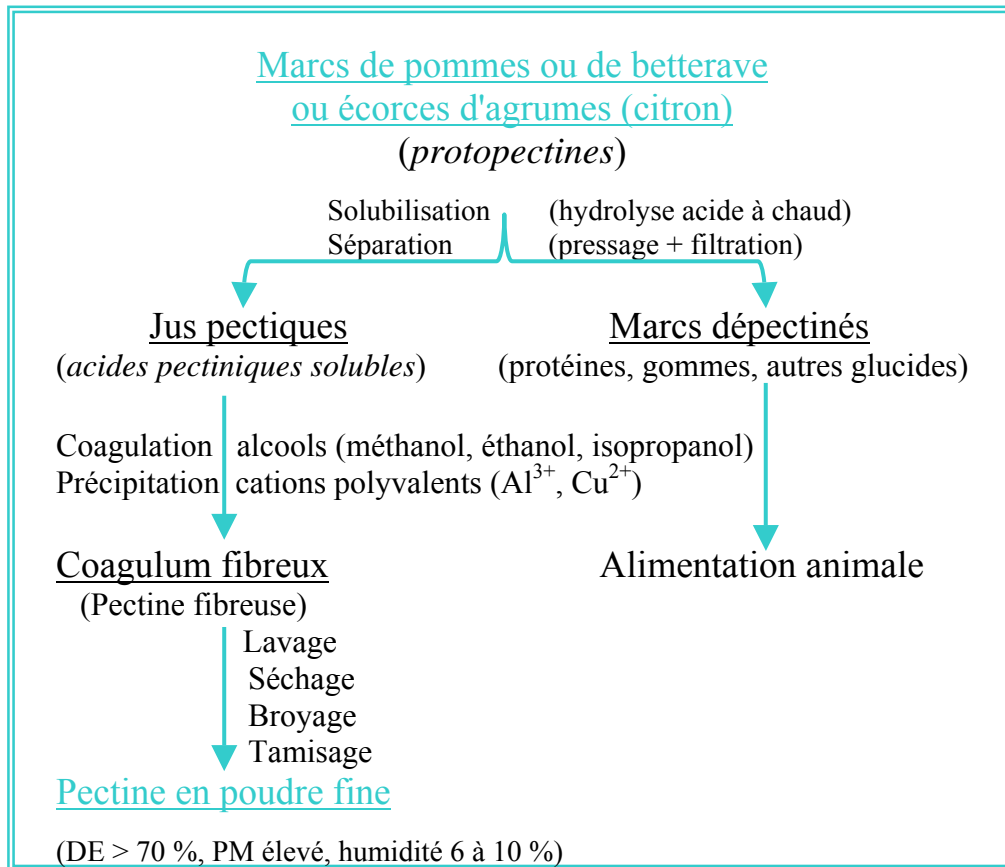
**Fig. 4: Exemples de pectines hautement et faiblement méthylées**

- (A): Exemple d'une pectine HM à DE = 60 %  
(B): Exemple d'une pectine LM non amidée à DE = 40 %  
(C): Exemple d'une pectine LM amidée à DE = 17 %

**Propriétés des pectines** : Il s'agit d'**hydrocolloïdes** donnant des solutions aqueuses qui présentent des propriétés épaississantes, stabilisantes et surtout gélifiantes. Elles sont insolubles dans les alcools et les solvants organiques courants, et partiellement solubles dans les sirops riches en sucres.

**Extraction et utilisations des substances pectiques** : L'extraction industrielle des pectines se fait à partir des sous-produits de l'industrie des jus de fruits: marcs de pomme et écorces (albedo) d'agrumes principalement (voir figure 5). Quant aux marcs de betterave, ils ne sont pas utilisés, car on y trouve des pectines dont les fonctions alcools secondaires sont estérifiées par de l'acide acétique empêchant la gélification de ces substances.

Les pectines sont principalement des gélifiants et l'industrie alimentaire utilise cette propriété, soit pour restituer à certains aliments une texture dégradée par les traitements de conservation, soit pour permettre leur présentation sous une forme appropriée à leur bonne conservation et à leur bon usage: confitures, confiseries, produits de fourrage et de nappage, desserts variés au fruits et/ou au lait, produits diététiques, crèmes glacées, ... etc.

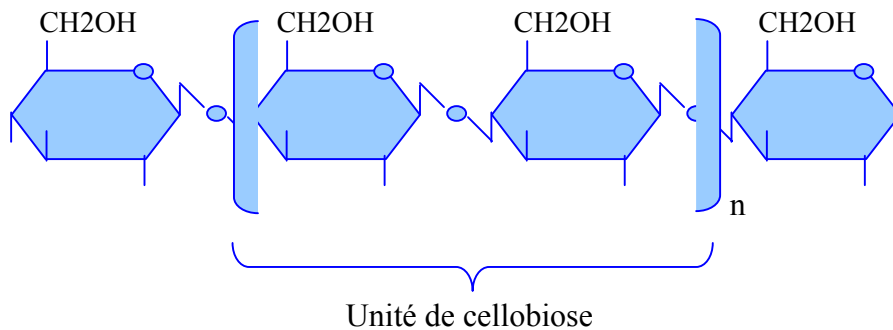


**Fig. 5: Procédé d'extraction industrielle de la pectine HM**

Grâce à son pouvoir filmogène (en tant que "fibre" alimentaire) au niveau des muqueuses gastriques et intestinales, la pectine peut accroître la durée d'absorption donc l'efficacité de certains principes thérapeutiques à absorption lente. Les pectines sont également utilisées comme pansements gastriques pour leur effets anti-diarrhéique ou détoxifiant et pour leur action régulatrice du système gastro-intestinal.

#### **1 - 1 - 4 - La cellulose :**

**Structure** : la cellulose, dont la masse moléculaire varie de 8000 à 15000, résulte de la condensation exclusivement linéaire d'unités  $\beta$ -D glucose, unies entre elles (1 - 4); l'unité élémentaire étant le cellobiose (formé de deux restes successifs de glucose) (voir figure 6).

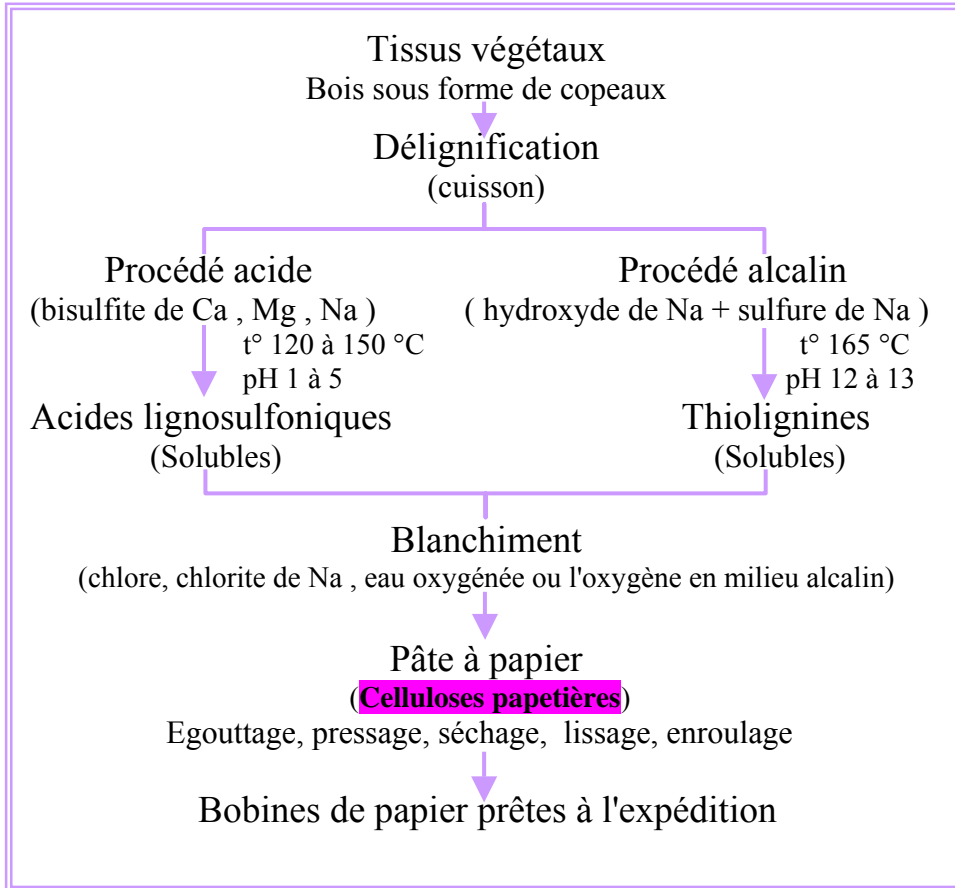


**Fig. 6: Structure de la cellulose**

La longueur des chaînes, constituées en moyenne par 20 unités de cellobiose, varie selon l'origine de la cellulose. Les plus longues se rencontrent dans les fibres employées comme textiles (lin, coton, chanvre...).

**Propriétés** : La cellulose gonfle dans l'eau et y est pratiquement insoluble, comme dans les autres solvants usuels. Elle résiste aux acides dilués, mais elle est hydrolysée par l'acide sulfurique concentré à ébullition. Elle est soluble mais partiellement hydrolysé dans une solution concentrée de chlorure de zinc (l'hydrocellulose formée se colore en bleu avec l'iode).

**Utilisations** : Ne possédant pas de cellulase (cylase), l'homme n'utilise pas la cellulose pour son alimentation contrairement aux micro-organismes (les fibres alimentaires, dont la cellulose, peuvent être dégradées partiellement par les enzymes bactériennes dans le côlon). Isolée à partir des tissus végétaux, elle a pourtant toujours joué un rôle important sous forme de textiles (rayonnes-viscose) ou de papiers (voir Figure 7) ou même en tant qu'explosifs et matières plastiques (nitrocellulose). Le tableau 4 montre l'utilisation de certains dérivés de la cellulose dans le domaine industriel (alimentaire essentiellement et autre).



**Fig. 7: Fabrication industrielle de la pâte à papier**

**Tab. 4: Les dérivés de la cellulose et leurs utilisations industrielles**

**CMC** : carboxyl méthyl cellulose de sodium ; **HPC** : hydroxyl propyl cellulose ; **MHPC** : méthyl-hydroxy propyl cellulose ;  
**MC** : méthyl cellulose ; **AC** : acétate de cellulose.

Dérivés	Caractéristiques	Utilisations
<b>CMC</b>	Bonne solubilité dans l'eau	Agent de dispersion dans les jus de fruits, améliorateur de structure des crèmes glacées, conservation des farines, lutte contre la dyspepsie au lait (trouble de la digestion).
<b>HPC</b>	Précipite lorsque l'eau atteint 40 - 50 °C	Dans les produits de boulangerie (ajuster la consistance des pâtes, améliorer la rétention d'eau, prolonger la durée de consommation de certains gâteaux en diminuant la vitesse de rassissement); pour leur effet gélifiant à chaud (confection des beignets, produits panés, produits reconstitués)
<b>MHPC</b> <b>MC</b>	Solubles dans l'eau chaude et gélifient à une température de l'eau d'environ 50 à 90 °C	
<b>AC</b>	-	Films, bandes magnétiques, membranes de dialyse

## **1 - 1 - 5 - Les hémicelluloses :**

**Structure:** les hémicelluloses sont un hétéropolysaccharide, dont le nom est dérivé du nom de l'ose constitutif, la désinence "-ose" étant remplacée par "-ane" (voir tableau 5).

**Propriétés:** l'hémicellulose est un polyside insoluble dans l'eau, mais, contrairement à la cellulose, elle est soluble dans les solutions alcalines (KOH à 15 % par exemple). Elle est facilement dégradée par les enzymes cellulaires et peuvent ainsi constituer des formes de réserve des végétaux (25 à 30 % du bois).

**Extraction et utilisation:** En tant que fibre alimentaire (absorbant l'eau et accroissant le poids des selles, ce qui favorise le transit intestinal), certaines hémicelluloses extraites à partir du bois (voir figure 8) ont des propriétés laxatives (médication purgative légère provoquant l'évacuation du contenu intestinal).

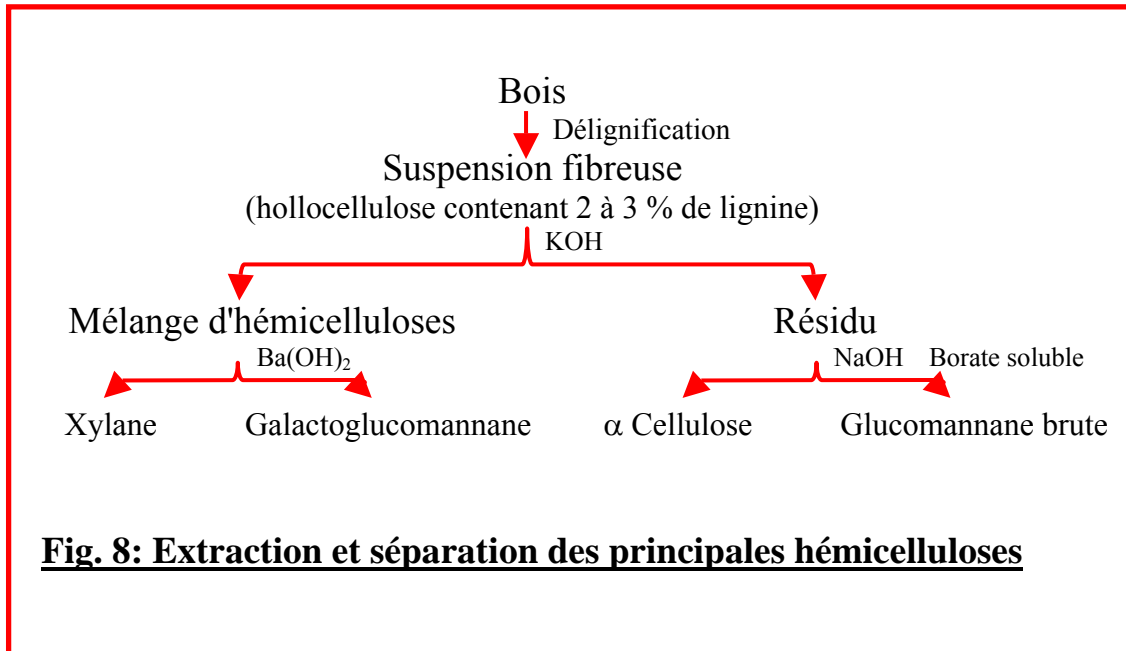
### **Remarque:**

On extrait également à partir des grains de céréales et des tubercules (maïs, blé, pommes de terre, riz, manioc...) une matière noble qui est l'amidon. Il constitue une source de glucides (glucose, dextrines...) capable de donner toute une gamme de produits alimentaires.



**Tab. 5: Désignation et Structure des différentes hémicelluloses**

Désignation	<b>Xylanes</b>	<b>Mannosanes:</b> mannanes, glucomannanes	<b>Galactosanes:</b> galactanes, arabogalactanes, rhamnogalactanes
Type de structure	Linéaire ou faiblement ramifiée	Essentiellement linéaire	très ramifiée
Composition	Xylopyrannose unies $\beta$ 1-4 avec au niveau des chaînes latérales l'arabinose, l'acide glucuronique et l'acide glucuronique méthylé	Glucopyrannose $\beta$ 1-4 et mannopyrannose $\beta$ 1-4	Galactopyrannose $\beta$ 1-4 branché $\beta$ 1-6 avec au niveau des chaînes latérales l'arabinose et le rhamnose

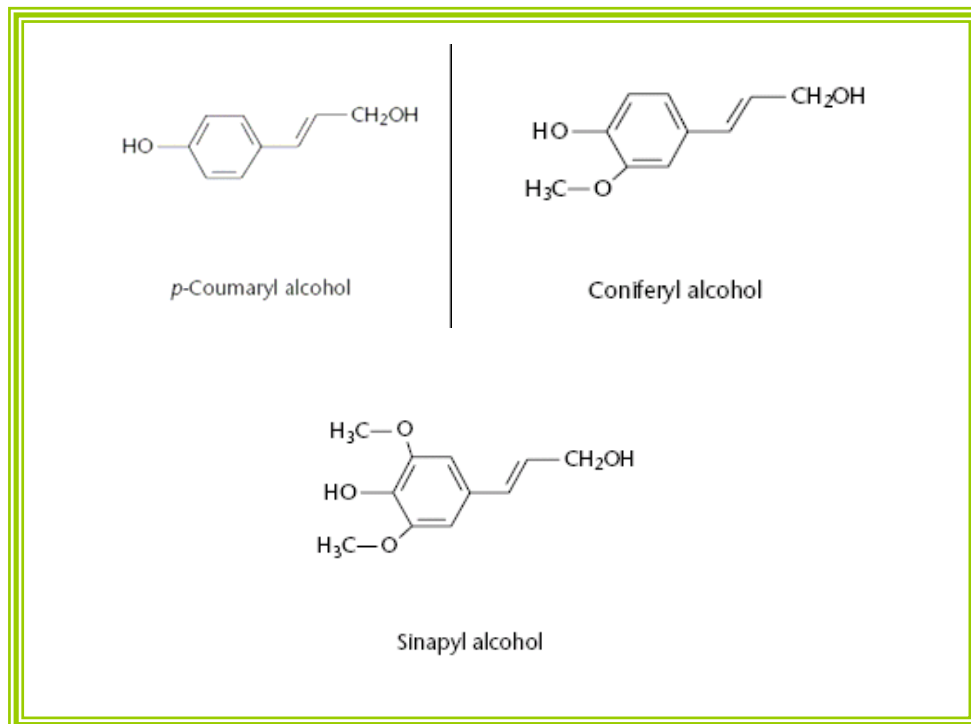


**Fig. 8: Extraction et séparation des principales hémicelluloses**

### 1 - 1 - 6 - La lignine :

**Structure** : La lignine est une macromolécule de haut Poids Moléculaire, étroitement associée aux polysides pariétaux. Elle est formée par la copolymérisation (polymérisation oxydative) d'un ou de trois phényl-propanoïdes qui proviennent eux mêmes des acides aminés aromatiques: phénylalanine et tyrosine. Les trois cycles aromatiques le plus souvent rencontrés sont les monolignols suivants: alcools coniférylique, coumarylique et sinapirylique (ou sinapylique).

La lignification des tissus renforce la solidité de la paroi des végétaux et représente à cet effet une forme de résistance contre les agressions (enzymatiques) par les insectes et les nématodes.

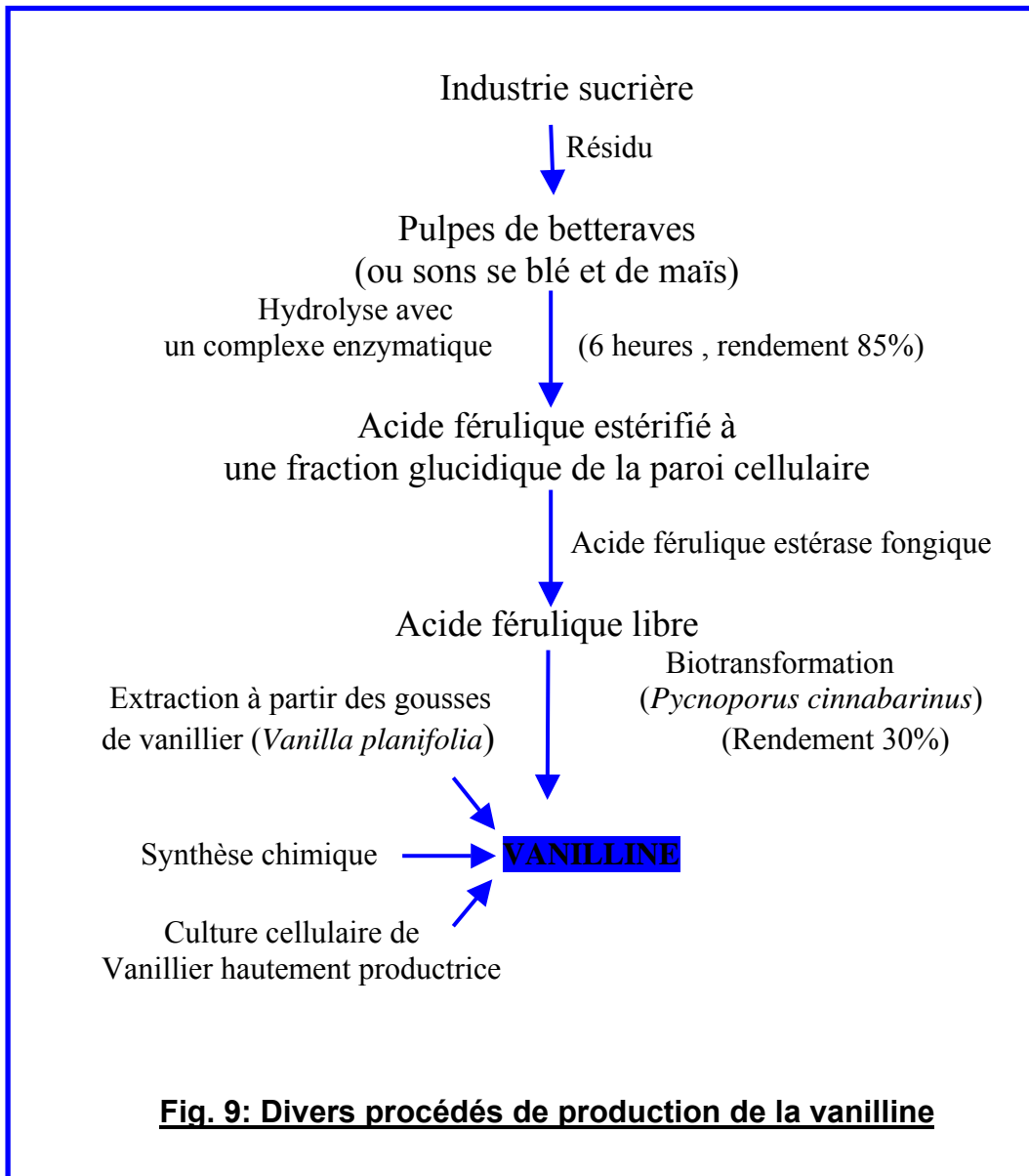


**Propriétés et utilisations** : La lignine est insoluble dans le réactif amoniaco-cuivrique, même après action des acides. Elle résiste pendant longtemps à l'acide sulfurique concentré. Elle est rapidement attaquée par le chlore, par les hypochlorites et par les oxydants tels que l'acide azotique, l'acide chromique et le permanganate de potasse.

Sa dégradation peut être envisagée par de nombreuses méthodes chimiques (l'oxydation par le nitrobenzène, l'acidolyse dans le dioxane ...etc.) et enzymatiques (peroxydase de *Phanerochaeta chrysosporium*, laccase à cuivre de *Phlebia radiata* ...etc.). C'est ainsi que la lignine peut servir de substrat pour la croissance des micro-organismes (*Chrysonilia sitophila* se développe très bien sur le matériel ligno-cellulosique de *Pinus radiata*).

Exemple appliqué : La vanilline (lignine dont l'élément de base est un alcool coniférylique doté d'un aldéhyde en C<sub>7</sub>) est l'arôme (additif alimentaire) le plus utilisé en agro-alimentaire. Elle est obtenue soit par extraction des gousses de *Vanilla planifolia* (Vanillier), soit par synthèse chimique. Des chercheurs ont développé un procédé nouveau de production de vanilline à partir de l'acide férulique (acide phénolique lié à la paroi cellulaire) contenu dans les pulpes de betteraves, un résidu de l'industrie sucrière. Par ailleurs, des recherches récentes ont montré que *Pycnoporus cinnabarinus* (champignon filamenteux du sol) est capable de transformer l'acide férulique en vanilline (rendement 30%), (voir figure 9).

**Remarque:** La vanilline extraite de la gousse de vanille revient à plus de 20 fois plus que le prix de ce même produit préparé artificiellement.



**Fig. 9: Divers procédés de production de la vanilline**

### **1 - 1 - 7 - Les gommés et les mucilages :**

**Origine et structure :** Il s'agit de substances provenant de la lamelle moyenne et qui ont pour origine les substances pectiques. Par gonflement, elles exsudent du tronc naturellement ou par suite d'un traumatisme. Le dessèchement à l'air de ces mucilages donne les gommés. Elles sont le plus souvent formées de chaînes d'acides polyuroniques combinés à des oses. Par exemple, la gomme arabique, provenant de certaines espèces du genre *Acacia*, contient du: L-arabinofurannose, D-galactopyrannose, L-rhamnose (6 désoxy L-mannose) et de l'acide D-glucuronique. Certaines gommés sont toutefois composées uniquement d'oses, par exemple la gomme Guar formée de chaîne linéaire de mannopyrannose relié en  $\beta$  (1-4) avec, latéralement, un pourcentage variable de reste de galactose fixé en 6.

**Propriétés, extraction et utilisations :** Les gommés ou résines ont la propriété de gonfler fortement au contact de l'eau et de former des masses gélatineuses ou des solutions colloïdales à viscosité élevée. Elles sont insoluble dans l'alcool, les solvants organiques et les graisses. C'est à partir des graines de guar et de caroube, que l'on peut obtenir :

- Soit des farines: après décorticage, on sépare les germes par broyage pour isoler les "splits" (albumen) à l'origine de la farine;
- Soit des extraits: la graine est solubilisée dans l'eau chaude, les matières insolubles étant éliminées par filtration; le glycanne

est ensuite précipité par l'alcool isopropylique puis lavé, pressé et séché sous vide.

Les gommés sont très utilisées en agroalimentaire, dans l'industrie des colles et des vernis mais surtout en pharmacie (voir tableau 6).

**Tab. 6: Principales gommés et leur utilisations pharmaceutiques et alimentaires**

Gomme	Source végétale		Utilisations	
	Genre et espèce	Famille	Pharmaceutiques	Alimentaires
<b>Adragante</b>	<i>Astragalus gummifer</i>	Légumineuse	Adoucissante (crème Gomina)	Épaississant et émulsifiant pour
<b>Arabique</b>	<i>Acacia arabica</i>	Légumineuse	Pâte pectorale	lier les sauces, fixateurs d'arômes
<b>De Caroube</b>	<i>Ceratonia siliqua</i>	Légumineuse	Anti-vomitif pour le nourrisson	Stabilisants et liants des crèmes glacées et des aliments cuits au four (tartes)
<b>Guar</b>	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	Légumineuse	Active le péristaltisme intestinal / utilisée en industrie papetière	
<b>De Karaya</b>	<i>Sterculia urens</i>	Sterculacée	Régulateur du transit intestinal, pansement intestinal	—

**Remarque:**

- les algues marines sont également pourvues de mucilages épaississants et gélifiants : alginates, laminaranes, fucoïdanes, carraghénanes, furcellaranes, agar-agar. Ce dernier, appelé aussi gélose, est extrait des algues rouges (Rhodophyceae) et est utilisé en bactériologie comme milieu de culture et en pharmacie comme laxatif.

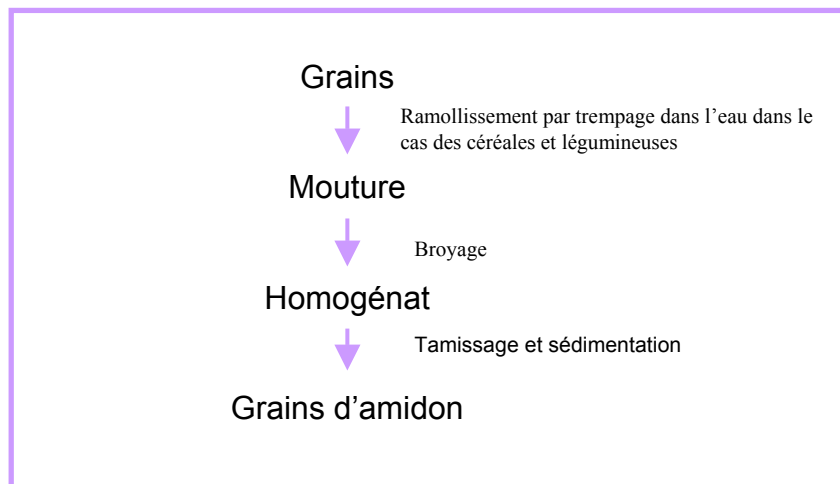
### 1 - 1 - 8 – L'amidon :

#### *Origine et structure :*

Il constitue la principale substance glucidique, après la cellulose, synthétisée sous forme de réserve, par les végétaux supérieurs. L'amidon est un polyholoside homogène constitué par la condensation d'unités D-glucose reliées entre elles principalement par les liaisons  $\alpha$  (1-4) et  $\alpha$  (1-6). Il est en fait formé d'un mélange de deux principaux constituants : l'amylose (macromolécule linéaire) et l'amylopectine (macromolécule ramifiée). Pour la plupart des amidons, la teneur en amylose varie entre 15 et 25% d'une façon générale. Cependant, cette teneur peut atteindre 80% (certaines variétés de maïs, pois ridé..) ou être en dessous de 1% (orge, riz ...).

#### *Séparation et extraction :*

Les méthodes d'extraction dépendent de l'état d'hydratation du matériel végétal utilisé :

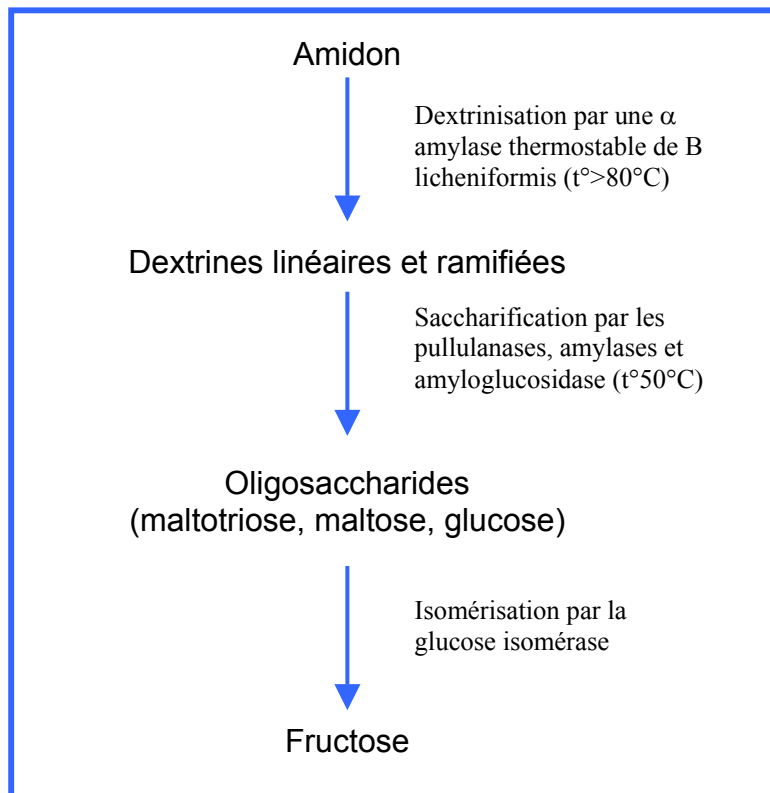




*Usages et transformation de l'amidon :*

Il constitue une source énergétique indispensable à l'alimentation de l'homme en particulier. La source potentielle d'amidon la plus importante est représentée par les grains de céréales (40 à 90% de leur poids sec), les graines de légumineuses (30 à 70% de leur poids sec) et les tubercules (65 à 85% de leur poids sec).

L'hydrolyse industrielle de l'amidon et l'utilisation des enzymes amylolytiques se fait en 3 étapes : dextrinisation (production de maltodextrines), saccharification (apparition d'une saveur sucrée) et l'isomérisation (production du fructose), voir la figure suivante.



**En glucoserie :** Parmi les différents produits sucrant d'hydrolyse de l'amidon employés en glucoserie :

- Glucose
- Fructose (obtenu par isomérisation du glucose)
- Sorbitol (obtenu par hydrogénation du glucose)
- Maltose
- Maltitol (obtenu par hydrogénation des sirops de maltose)
- Mannitol (obtenu par hydrogénation des sirops de fructose)

**Autres utilisations :**

- production de métabolites en utilisant le glucose issu de l'amidon dans les milieux de culture et de fermentation
- production d'alcool industriel (tel que l'éthanol)
- parmi les procédés de modification, la réticulation qui a pour but d'augmenter la résistance des amidons au chauffage (on introduit par divers réactifs, comme l'épichlorhydrine du glycérol, les ponts transversaux entre les chaînes). Ces amidons sont utilisés en agroalimentaire comme épaississant dans la fabrication de certaines sauces.
- En industrie : papeterie, textile, colle, adhésif ... etc.

## 1 - 2 – LES SUBSTANCES FOLIAIRES:

### 1 - 2 - 1 - Les protéines foliaires :

Les protéines foliaires sont localisées dans le cytoplasme, le stroma et les thylacoïdes du chloroplaste. La teneur en protéines foliaires des végétaux est très variable (voir le tableau 7). La méthode la plus appropriée, pour le dosage de ces protéines est celle de Kjeldahl. Elle se réalise en 3 étapes: la minéralisation qui transforme l'azote organique en azote ammoniacal, le dosage (colorimétrique ou autre) des ions  $\text{NH}_4^+$  formés dans le minéralisat et enfin la conversion du taux d'azote en taux de protéine en appliquant un facteur de conversion F, comme suit :

$$\text{Protéines brutes (\%)} = \text{N (\%)} \times 6.25$$

**Tab. 7: la teneur en protéines foliaires de certains végétaux**

Type de végétal	Protéine brute en % par rapport à la matière sèche foliaire
Coriandre	60.8
Ricin	36.9 - 41.3
Patate douce	26.7
Épinards	20 – 25
Chou	21.2
Bananier	19.3 - 20.9
Luzerne	15 – 20
Plantes aquatiques	5

**NB** : A côté de l'azote protéique, il y a toutes les formes de l'azote non protéique (amides, amines, nitrites, nitrates, acides nucléiques, lipides complexes, alcaloïdes, vitamines... etc.)

*Les protéines foliaires majeures*: Dans l'extrait protéique foliaire, il y a deux protéines majeures qui forment ensemble près de la moitié des protéines totales:

- La RuBP carboxylase (Ribulose - 1,5-Bisphosphate carboxylase): enzyme du stroma responsable de l'assimilation du CO<sub>2</sub>, il s'agit d'une protéine de réserve qui représente 40 à 80 % des protéines foliaires totales du soja, de la luzerne et de la plupart des céréales.

- La LHCP (Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein): protéine lamellaire.

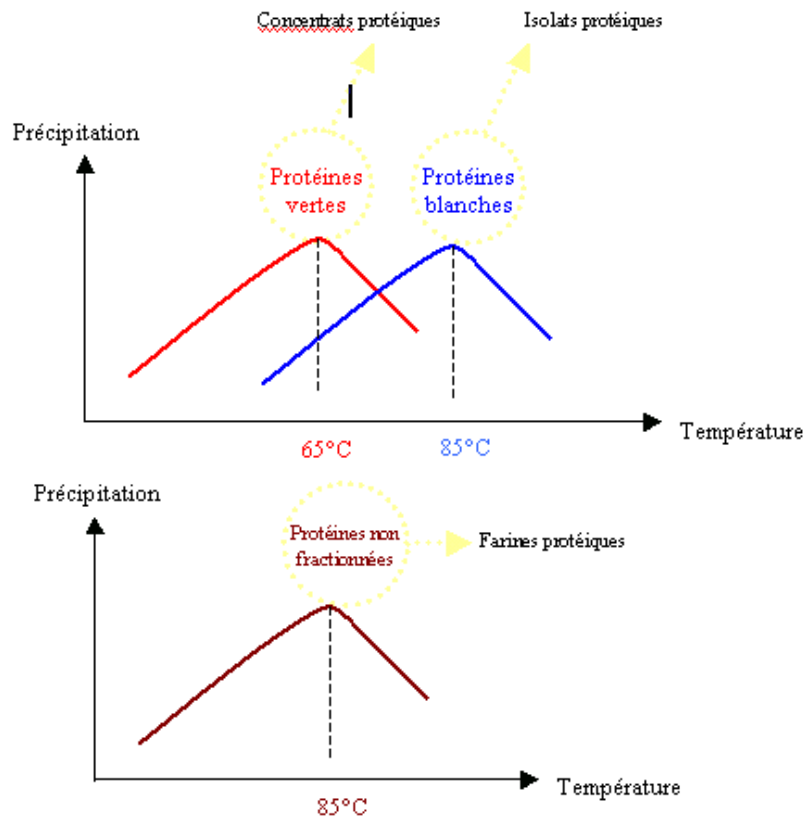
#### **Séparation et utilisations des protéines foliaires:**

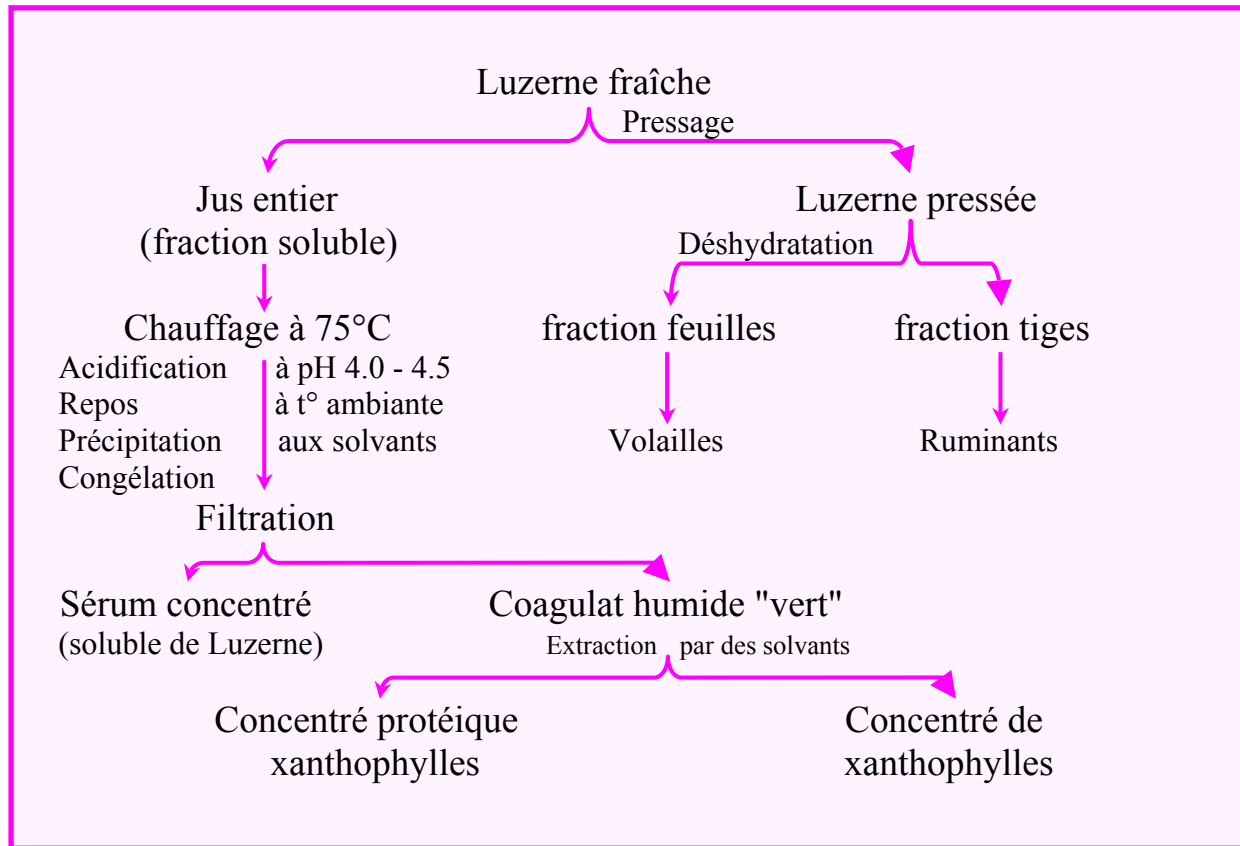
Selon leurs propriétés d'ionisation et de solubilité, on en distingue 2 groupes:

- Les protéines membranaires, insolubles dans l'eau, chargées en lipides et en pigments chlorophylliens et caroténoïdes, elles contiennent la LHCP. Lors du fractionnement, elles constituent la protéine "verte".
- Les protéines hydrosolubles forment une solution vraie généralement dépourvue de pigments lipophiles; elles renferment la RuBP carboxylase ainsi que l'ensemble des protéines cytoplasmiques, elles constituent la protéine "blanche".

Ces deux types de protéines représentent deux fractions distinctes pouvant être coagulées ensemble par la chaleur ou obtenues séparément par des opérations de chauffage en deux temps (55 à 65°C pour les protéines chloroplastiques "vertes" et 80°C pour les protéines chloroplastiques "blanches").

Les divers procédés utilisés définissent le produit final selon le taux obtenu en protéines : on parle de farines lorsqu'il est de 40 à 50 %, de concentrats lorsqu'il est de 65 à 70 % (voir figure 10), et on parle d'isolats lorsque cette teneur atteint ou dépasse 90 %.





**Fig. 10: Procédé de préparation de concentrats protéiques de feuilles.**

En raison de leur grande richesse en protéines (90 % sur matière sèche) les isolats protéiques "blancs" sont très utilisés pour la nourriture du bétail mais aussi en alimentation humaine dans les régions où les protéines animales font défaut. Quant aux concentrats protéiques "verts" comportant le carotène (provitamine A) à un taux d'environ 800 ppm, ils peuvent être utilisés en tant que supplément protéique vitaminé.

La luzerne représente, avec les tourteaux oléagineux et les graines de légumineuses, la source végétale la plus utilisée pour l'obtention industrielle de protéines. L'exploitation des protéines foliaires présente plusieurs avantages, comme elle présente certains inconvénients (voir tableau 8).

### **1 - 2 - 2 - Les saponines ou saponosides:**

Contrairement aux divers glycosides, les saponines sont de beaucoup les plus fréquentes dans le règne végétal (des plantes cultivées comme la luzerne, les betteraves et le pois, ainsi que des plantes tropicales de la famille des *Sapindaceae* en sont riches). Elles se subdivisent en deux principales familles classées parmi les stéroïdes et les terpénoïdes. Elles existent non seulement dans les graines, les tiges, mais surtout les feuilles.

**Tab. 8: Avantages et inconvénients des protéines foliaires et leur exploitation**

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
❖ Leur composition intéressante en acides aminés indispensables (Ile, Phe, Trp, Val)	❖ Le risque de toxicité (phénols, stéroïdes, alcaloïdes dont certains sont toxiques)
❖ L'existence de produits latéraux exploitables (lipidiques, quinoniques, pigments, ... etc.)	❖ Le risque de ramasser beaucoup d'éléments (polluants, flore bactérienne, fongique ... etc.)
❖ L'importance des cofacteurs métalliques puisque la plupart de ces protéines sont fonctionnelles par opposition aux protéines de réserve.	❖ Le problème de la déshydratation puisque la feuille est un organe très riche en eau dont elle doit être débarrassée.
❖ La facilité à récolter les feuilles (organes aériens) par opposition aux racines, tubercules ..etc.	

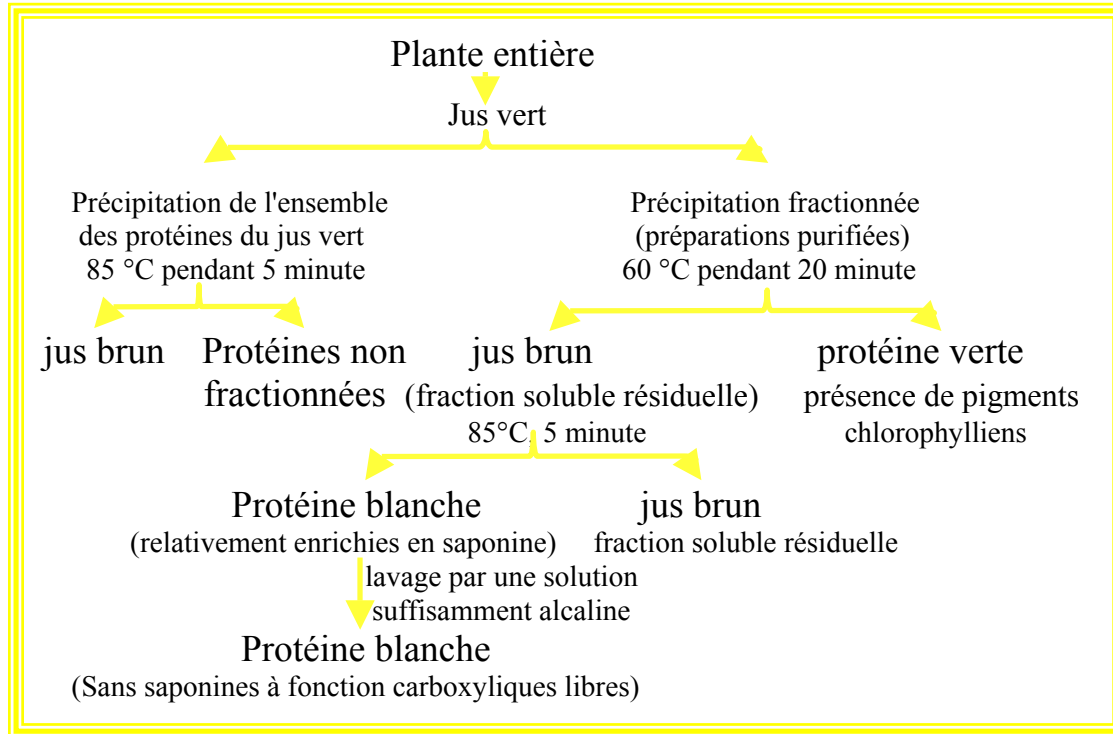


### **Structure et propriétés des saponines :**

Les saponosides sont constitués d'une partie hydrophobe (la sapogénine ou la génine) et d'une partie hydrophile, glucidique (constituée d'un ou de plusieurs sucres tels que: arabinose, xylose, rhamnose, glucose et acide glucuronique.). Ces hétérosides sont classés en deux groupes selon la structure de la génine: stéroïdique (27 atomes de carbone) ou triterpénique (30 atomes de carbone). Elles sont solubles dans les solvants apolaires ou peu polaires (benzène, acétone ...); Leur structure est voisine de celle des hétérosides cardiotoniques.

**Effets et utilisations des saponines :** Avec leur partie hydrosoluble et la partie liposoluble, elles sont douées de propriétés tensioactives, telles celles d'engendrer une mousse persistante par agitation dans l'eau (pouvoir aphrogène). Aussi, elles sont à l'origine du météorisme (ballonnement du ventre dû à des gaz).

Elles peuvent également inhiber de nombreuses activités enzymatiques (cholinestérase, trypsine, ...); Elles ont un effet sur le goût des aliments et la réduction de la croissance par réduction de prise volontaire des aliments. De ce fait, elles présentent un risque potentiel important d'effet antinutritionnel et doivent être supprimées des protéines foliaires (voir figure 11).



**Fig. 11: Extraction et obtention de préparations purifiées de protéines foliaires sans saponines**

A côté de leur utilisation traditionnelle dans les lessives et shampooings, certaines, telles la diosgénine et l'hécogénine ont acquis une importance commerciale considérable, car elles sont transformables par héli-synthèse en hormones stéroïdes. (*sapo = savon en latin*)

Ces composés sont également connus pour leur pouvoir hémolytique: ce qui justifie l'utilisation des saponosides du Gypsophile (*Gypsophila paniculata*) dans les laboratoires d'analyse hématologique comme réactif cytolytique pour les examens de numération (formule sanguine).

Parmi les nombreuses activités des saponosides, celles suscitant un intérêt en thérapeutique concernent les activités cytotoxique, antitumorale (saponaire, lierre terrestre), antifongique et immunomodulatrice. Depuis peu, les saponines de *Quillaja saponaria* (Rosaceae) sont utilisées comme adjuvants dans les vaccins à usage vétérinaire et comme constituants des complexes immunostimulants.

Par ailleurs, en raison de leur ichtyotoxicité (toxicité vis-à-vis des animaux à sang froid), les saponines sont depuis quelques années, utilisées pour leur effet molluscicide dans la schistosomiase par traitement de l'eau infestée dans certains pays d'Afrique.

Les saponosides purs ont été isolés en utilisant les techniques classiques d'extraction et de purification chromatographique.

La méthodologie mise en application, pour résoudre l'identification des composantes (génines, sucres, acides organiques éventuellement liés) et leur séquençage, fait appel à l'hydrolyse classique (acide et alcaline) et la spectrométrie de masse.

### **1 – 2 – 3 – Les lipides foliaires:**

Il s'agit principalement d'huiles essentielles (aromatiques), contrairement aux huiles fixes qui sont utilisées principalement dans les domaines agroalimentaire et industriel et sont extraites des grains et des fruits par des procédés utilisant la pression mécanique et les solvants issus de l'industrie pétrolière (cyclohexane, hexane, butane, ...). Les huiles essentielles végétales sont donc principalement isolées par entraînement à la vapeur, elles sont par la suite stockées dans un endroit sombre, frais et hermétique, puis utilisées surtout dans les domaines pharmaceutique et cosmétique. Parmi les plantes utilisées, on peut citer à titre d'exemple:

- *Ocimum basilicum* (Basilique, famille des lamiacées): linalol,  $\beta$  myrcène, le trans  $\alpha$  bergamotène.
- *Thymus vulgaris* (Thym, famille des lamiacées): thymol et carvacrol.
- *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus, famille des myrtacées): eucalyptol.
- *Pelargonium sp* (Géranium, famille des géraniacées): géraniol.

D'une façon générale, les *lipides* foliaires représentent 1 à 2 % du poids des feuilles fraîches (les principaux acides gras foliaires sont donnés dans le tableau 9). Ces substances co-précipitent avec les concentrats protéiques foliaires, constituant 10 à 30 % de leur poids, et ayant ainsi, des répercussions positives et négatives (voir tableau 10).

**Tab. 9 : Principaux acides gras foliaires :**

Acides gras	Structure
Acide laurique	C 12: 0
Acide myristique	C 14: 0
Acide palmitique	C 16: 0
Acide palmitoléique	C 16: 1
Acide palmitoléique	C 16: 3
Acide stéarique	C 18: 0
Acide oléique	C 18: 1
Acide linoléique	C 18: 2
Acide linoléique	C 18: 3

**Tab. 10 : Répercussions des lipides foliaires sur les concentrats protéiques:**

Répercussions positives	Répercussions négatives
- En raison de leur richesse en AG et en vitamines liposolubles, ces lipides peuvent être utilisés en tant que compléments nutritionnel ou vitaminique.	- plus de la moitié des AG ont 2 ou 3 doubles liaisons (polyinsaturés) pouvant s'oxyder pendant la préparation ou le stockage des concentrats. Les lipides oxydés diminuent ainsi la valeur nutritive et organoleptique des protéines affectant le goût et l'odeur en faisant apparaître des arômes désagréables.

## **1 - 3 – LES METABOLITES SECONDAIRES:**

### **1 - 3 - 1 - Les alcaloïdes :**

**Structure et propriétés:** Les végétaux ne pouvant se déplacer et fuir les herbivores, ils synthétisent une énorme diversité de métabolites nocifs, parmi lesquels des composés organiques azotés et basiques dits alcaloïdes. Ces derniers constituent un groupe très hétérogène et portent tous la terminaison "ine".

Les alcaloïdes ne constituent pas une catégorie définie de composés chimiques en raison de la variété de leurs structures moléculaires. Toutefois, d'une façon constante, ils possèdent un squelette hétérocyclique azoté, si l'on excepte quelques substances où l'azote est extracyclique (colchicine, éphédrine).

Les deux groupes de loin les plus importants sont représentés par les alcaloïdes isoquinoléiques (plus de 1 500) et indoliques (plus de 700). Dans quelques cas, il s'agit simplement de l'incorporation d'une molécule d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) ou d'une amine simple ( $\text{HO} - (\text{CH}_2)_2 - \text{N} (\text{CH}_3)_2$ ) dans une architecture stéroïde ou terpénique. Parfois, il s'agit de composés apparentés aux bases puriques des acides nucléiques (exemple: caféine, théophylline).

Mais dans la plupart des cas, il s'agit de produits de condensation des amines provenant de la décarboxylation des acides aminés naturels (exemple: cocaïne, atropine, nicotine, papavérine, colchicine). Quelques fois ces amines sont

condensées avec un fragment terpénique (exemple: réserpine, ajmaline, quinine).

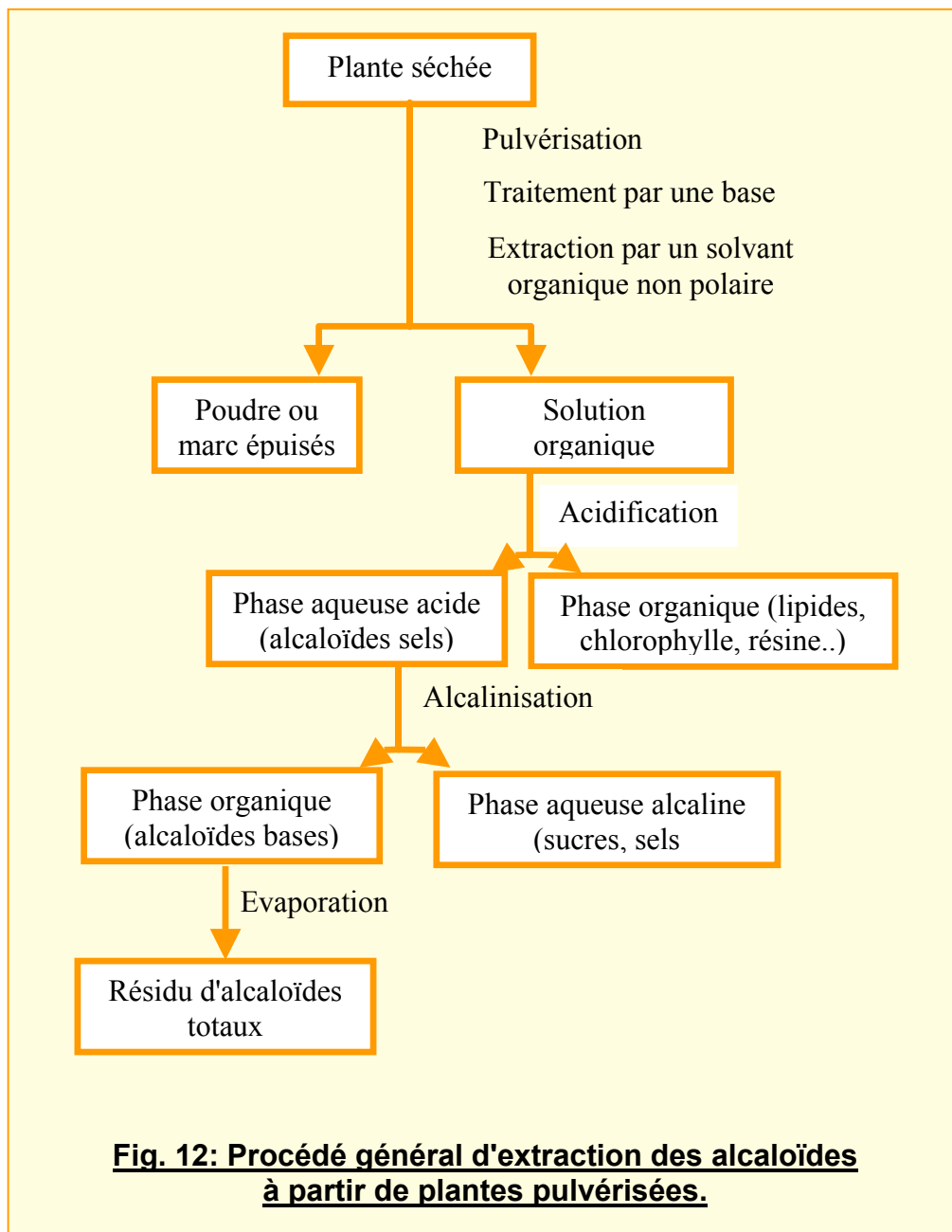
Teneur: entre 0.1% à 3 %, parfois 10 % du poids sec du végétal;

Solubilité : leur solubilité dans les différents solvants varie en fonction du pH : sous forme de bases, ils sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques non polaires (benzène, chloroforme...) et polaires (alcools). Quant aux sels d'alcaloïdes, ils sont solubles dans l'eau et les solvants organiques polaires mais insolubles dans les solvants organiques apolaires.

Précipitation : ils précipitent en milieu aqueux légèrement acide dans les réactifs suivants : solution neutre de mercuriiodure de potassium (précipité blanc jaunâtre), solution acide d'iodobismuthite de potassium (précipité rouge orangé), solution d'iodure de potassium iodé (précipité brun). Les alcaloïdes précipitent également avec les tanins, avec certains acides (acide picrique) et avec les sels de métaux lourds ( platine, tungstène...).

#### **Extraction et purification:**

Les propriétés basiques des alcaloïdes et les solubilités différentielles qu'ils présentent avec leurs sels sont mises à profit lors de leur extraction (voir figure 12).



**Fig. 12: Procédé général d'extraction des alcaloïdes à partir de plantes pulvérisées.**



Deux cas principaux se présentent:

– Alcaloïdes volatils entraînés par la vapeur d'eau: ils sont déplacés de leurs combinaisons naturelles par une base fixe (chaux, soude, magnésie), directement à partir de la plante, puis entraînés par la vapeur d'eau. Après condensation, ils se séparent de la partie aqueuse du distillat à laquelle ils ne sont pas miscibles. Sont obtenues de la sorte la nicotine du tabac ou la spartéine du genêt.

– Alcaloïdes fixes: la plante est traitée par de l'eau ou un alcool (éthanol à 70 p. 100, méthanol) en présence d'acide qui entraîne les alcaloïdes sous forme de sels solubles. La solution extractive est séparée, éventuellement concentrée, et alcalinisée par de la soude ou de l'ammoniaque qui libère les alcaloïdes. Ceux-ci sont alors repris par un solvant organique non miscible à l'eau.

Les produits obtenus lors des extractions sont des mélanges qu'il importe de fractionner pour obtenir les alcaloïdes à l'état pur. On opère par cristallisation progressive dans des solvants adéquats, par extractions successives en milieu acide à l'aide de solutions de pH décroissant, en pratiquant une séparation par contre-courant d'un solvant non miscible, et surtout par chromatographie.

Les méthodes chromatographiques consistent à séparer les divers constituants d'un mélange en fonction de leur affinité pour un adsorbant au sein d'un solvant choisi. On fait appel ici à la chromatographie d'adsorption sur colonne (silice, alumine) avec sa variante, la chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P.), aux diverses modalités de chromatographie en couche mince (C.C.M.), à la chromatographie d'échange d'ions. Les méthodes chromatographiques sont surtout du domaine du laboratoire et, en raison de leur coût, assez peu utilisées dans l'industrie, qui préfère la cristallisation fractionnée.

**Emploi et intérêt thérapeutique:**

Ils sont doués à la fois de propriétés toxiques (peuvent posséder, même à très faibles doses une forte toxicité, 1 mg) et médicamenteuses. En effet, La pharmacopée actuelle compte un bon nombre d'alcaloïdes parmi les médicaments les plus actifs (voir tableau 11) qui sont soit encore extraits à partir de sources végétales, soit synthétisés ou hémisynthétisés lorsque l'approvisionnement naturel est insuffisant.

**Tab. 11: Quelques exemples d'alcaloïdes et de leurs utilisations**

Alcaloïdes	Source	localisation	Propriétés et emploi
Ajmaline	Rouwolfia Apocynacées	Racine	Traitement des troubles cardiaques
Atropine	Belladone Solanacées	Feuille	Médicament mydriatique (provoque une dilatation pupillaire et une paralysie de l'accommodation)
Caféine	Caféier Rubiacées	Fruit	Tonique
Cocaïne	Cocaier Linacées	Feuille	Anesthésique local et excitant du système nerveux, dont l'usage prolongé aboutit à une toxicomanie grave
Colchicine	Colchique Liliacées	Graine	Traitement de la goutte et en cytologie comme inhibiteur des mitoses cellulaires
Nicotine	Tabac Solanacées	Feuille	Violent excitant du système neurovégétatif, employé comme insecticide
Papavérine	Pavot Papavéracées	Fruit	Antispasmodique
Quinine	Quinquina Rubiacées	Ecorce	Fébrifuge, employé pour son action sur l'hématozoaire du paludisme
Résérpine	Rouwolfia Apocynacées	Racine	Hypotensif
Théo-Phylline	Théier Ternstroëmiacées	Feuille	Action diurétique; vasodilatateur des artères et des bronches (asthme)

Les méthodes biotechnologiques sont applicables aux alcaloïdes par le moyen des cultures de cellules végétales *in vitro* (*Coptis japonica*, *Catharanthus roseus*, *Papaver somniferum* ...), mais les essais semblent jusqu'ici confinés au stade du laboratoire pour diverses raisons (prix de revient, irrégularité des rendements liée à l'hétérogénéité des populations cellulaires, instabilité génétique, difficulté de récupération des alcaloïdes). Les transformations chimiques par des micro-organismes ou des enzymes (bioconversions) ont été utilisées dans le cas des alcaloïdes, mais sans applications industrielles.

Exemple: La *vincamine*, alcaloïde indolique extrait de la petite pervenche, est largement utilisée en thérapeutique pour les troubles de la circulation cérébrale liés à la sénescence. L'insuffisance de l'approvisionnement à partir des sources naturelles a conduit à la mise au point d'une synthèse partielle biomimétique à partir d'un autre alcaloïde plus abondant, la tabersonine. La tabersonine et la vincamine appartiennent au même type biogénétique, la tabersonine étant un intermédiaire en amont de la vincamine dans la suite de la biosynthèse.

L'avantage de cette hémisynthèse, à haut rendement, est de faire appel à une matière première naturelle de même configuration absolue, ce qui élimine le problème de la séparation des isomères optiques, nécessaire dans la synthèse classique.

### **1 - 3 - 2 - Les terpènes :**

#### **Structure et propriétés:**

Parmi les métabolites secondaires végétaux, on distingue les terpénoïdes (terpènes et substances apparentées). Ces dérivés sont des constituants membranaires améliorant les propriétés mécaniques de ces membranes. Certains terpénoïdes, parfois très complexes, ont cependant des rôles physiologiques bien précis, comme les gibberellines qui sont des hormones végétales. L'ensemble des terpènes et des terpénoïdes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène  $(C_5H_8)_n$ . Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue: les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes ... jusqu'aux polyterpènes dont certains exemples sont cités dans le tableau 12.

La synthèse de ces molécules n'est pas exclusivement végétale: le squalène, par exemple, est un terpène abondant chez le requin, le cholestérol est un terpénoïde caractéristique des animaux et qui est retrouvé chez certaines algues.

**Tab. 12: Quelques exemples de terpènes et leurs importances**

<b>N</b>	<b>Terpène</b>	<b>Exemple</b>	<b>Rôle biologique et/ou emploi</b>
2	Monoterpène	Loganoside (noix vomique)	Joue un rôle capital dans la biosynthèse des alcaloïdes (attire/repousse les insectes lors de la pollinisation)
3	Sesquiterpène	Acide abscissique	Hormone végétale responsable de la chute des feuilles et des fruits
4	Diterpène	Phytol (persil)	Joue un rôle fondamental dans la constitution de la chlorophylle , de la vitamine E et K1
6	Triterpène (comprenant les stéroïdes)	Acide oléanolique (olivier)	Revêtements protecteurs des cellules végétales
8	Tetraterpène (caroténoïdes)	Lycopène (tomate)	Pigment rouge des fruits, doté d'excellent pouvoir antioxydant , diminue le risque de certaines maladies cardiaques et le cancer
500 à 5000	Polyterpène	Caoutchouc (Hevéa)	Industrie des pneumatiques, la chaussure, le textile, le jouet, l'industrie électrique
		Gutta-percha (palaguium)	Utilisé en industrie, et en prothèse dentaire (obturation des cavités)

### **Usages des terpènes:**

Les terpénoïdes constituent l'une des bases des industries des parfums, des arômes, des colorants alimentaires. En outre, ils possèdent parfois des propriétés physiologiques puissantes et spécifiques: vitamines, hormones ou phéromones d'invertébrés, substances de croissance de végétaux, alcaloïdes, antimitotiques.

De nombreux terpénoïdes ont une action pharmacologique sur les organismes qui les ingèrent (laxatifs, antimitotiques, substances allergisantes), sans parler de leurs effets organoleptiques (substances odorantes, amères, colorées).

### **1 - 3 - 3 - Les polyphénols :**

Ce sont des substances potentiellement toxiques les plus fréquentes dans les végétaux (avec les saponines et les lectines). Il s'agit des polyphénols solubles synthétisés à partir de la phénylalanine:

- Acides phénoliques
- Flavonoïdes (flavones, isoflavones, coumestanes)
- Flavanoïdes (anthocyanes, proanthocyanes, catéchines)
- Tanins (condensés ou hydrolysables)

Certains sont considérés comme des facteurs antinutritionnels; c'est le cas des lignines (polyphénols insolubles) qui réduisent la digestibilité des polysides pariétaux; les coumestanes et les isoflavones peuvent perturber

le métabolisme des œstrogènes et les cycles de reproduction des femelles des mammifères; les catéchines et les tanins condensés réduisent la mobilité des muscles lisses.

Enfin, les effets sur le goût, la couleur et l'odeur des produits végétaux peuvent résulter soit de l'action directe des polyphénols soit de celle de leurs produits de dégradation. Ainsi, les polyphénols de type coumarine ( $C_9H_6O_2$ ) et dicoumestrol confèrent aux végétaux qui les contiennent (Aspérule odorante) une odeur agréable, on les emploie, à cet effet, dans l'industrie des parfums.

Pour son effet antivitaminique K (dans le foie, inhibition de la synthèse de quatre protéines indispensables à la coagulation du sang), on utilise la coumarine en thérapeutique dans le traitement des thrombo-embolies.

La formation des anthocyanes est favorisée par la lumière et par les basses températures (ceci explique la pigmentation souvent éclatante des plantes de montagne). Les anthocyanes jouent, chez les plantes à fleurs, un rôle évident d'attraction dans les mécanismes de pollinisation par les insectes.

Ces substances, par suite de leur ionisation, présentent des couleurs différentes pour les divers pH : du rouge-orange en milieu acide au bleu-mauve en milieu alcalin. Ils sont utilisés en agro-alimentaire en tant que colorants.



## **Chapitre 2 – BIOCHIMIE DES SUBSTANCES D'ORIGINE ANIMALE:**

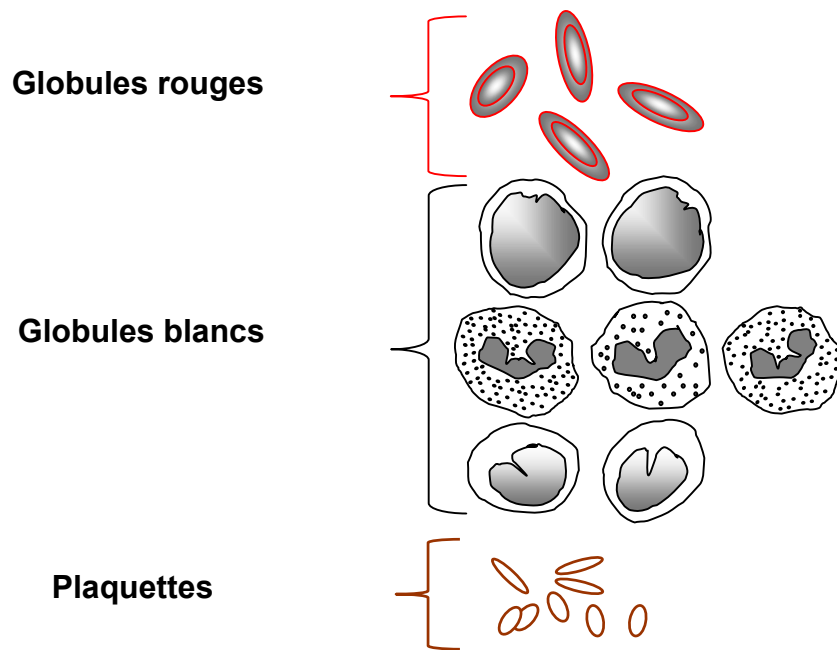
### **2 – 1 – LE SANG:**

#### **2 – 1 – 1 – Composition et rôle:**

Le sang est le liquide rouge qui circule dans les veines, les artères, le cœur et les capillaires et qui irrigue tous les tissus de l'organisme, auxquels il apporte éléments nutritifs et oxygène et dont il recueille les déchets vers les organes qui les éliminent (rein, poumons, peau). La masse sanguine totale est de 4.7 litres chez l'homme et 3.7 litres chez la femme.

La centrifugation permet de distinguer:

- Les cellules (45% du volume du sang total chez l'homme). Il s'agit des globules rouges (érythrocytes), globules blancs (leucocytes) et plaquettes (thrombocytes). Le nombre de chaque catégorie est apprécié par numération globulaire, et ce par examen du frottis sanguin sous microscopie optique.



- Une partie liquide "le plasma", qui renferme de l'eau, des sels minéraux, des vitamines, des enzymes, des hormones, des glucides, des lipides et des protides (Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogène constitue le sérum). Plusieurs méthodes colorimétriques, enzymatiques et électrophorétiques permettent d'apprécier le taux plasmatique de ces différents constituants (voir tableau 13).

**Tab. 13: Les principaux constituants de Plasma sanguin**

		Valeurs normales / l	Diminution	Augmentation
<b>Protides et autres constituants azotés</b>	Protides totaux	65 à 75 g	Dénutrition, néphropathies	Myélomes multiples, maladies infectieuses
	Albumine	33 à 49 g	Cirrhoses	Hémoconcentration
	Globulines	20 à 24 g	-	Myélomes multiples
	A1-globulines	3 à 4 g	-	Processus nécrotiques et inflammatoires
	A2-globulines	5.5 à 6 g	-	Rhumatisme articulaire aigu
	B-globulines	5.5 à 9 g	-	Myélomes multiples (maladie de Kahler)
	Γ-globulines	7 à 8 g	Épisodes infectieux à répétition	Myélomes multiples des os et toutes maladies infectieuses
	Fibrinogène	3 à 5 g	Insuffisance hépatique grave	États inflammatoires
	Urée	0.15 à 0.50 g	Idem	Insuffisance rénale
	Acide urique	20 à 70 mg	-	Néphrites et goutte
	Bilirubine (directe et indirecte)	0.6 à 2.5 mg 3 à 10 mg	-	Ictère par hémolyse
Créatinine	5 à 18 mg	Myopathies	Insuffisance rénale	
<b>Glucides et lipides</b>	Glucose	0.8 à 1.1 g	Insuffisance hépatique	Diabète
	Lipides totaux	5 à 8 g	Tuberculose	Affections rénales et ictère
	Triglycérides	0.50 à 1.80 g	-	Hyper lipidémies, diabète
	Cholestérol (total et estérifié)	1.5 à 2.6 g 1.3 à 2 g	Grande insuffisance hépatique et thyphoïde	Obstruction biliaire
	Corps cétoniques	Traces (0.1g)	-	Diabète grave

## **2 – 1 – 2 – Le prélèvement et la transfusion:**

Le don du sang est volontaire, anonyme et bénévole. Le sujet doit être âgé de dix-huit ans à soixante-cinq ans et doit avoir une tension artérielle normale, et surtout il doit être indemne de toute affection chronique, telle que syphilis, paludisme, cancer, tuberculose, SIDA et ne présentant pas d'allergie majeure. Les tests sérologiques pratiqués ainsi que l'interrogatoire des bénévoles ont été considérablement renforcé (un questionnaire vise à éliminer les donneurs appartenant à un «groupe à risque»: homosexuels à partenaires multiples, toxicomanes).

On recueille le sang (de 300 à 450 ml) dans des sacs en matière plastique, contenant une solution anticoagulante: presque toujours 75 millilitres d'une solution Citrate-Phosphate-Dextrose (CPD). Le prélèvement se fait de préférence à jeun ou après un repas léger ne comprenant ni lait ni beurre. Le donneur étant en position semi-couchée, on ponctionne une veine du pli du coude après désinfection de la peau. Le sac est agité mécaniquement afin d'éviter la coagulation.

Le prélèvement terminé, on recueille quelques millilitres de sang dans un flacon «pilote» afin de procéder à des tests de compatibilité, à des contrôles sérologiques, pour détecter des porteurs de virus ou de parasites, et de déterminer le groupe sanguin.

Le sang est ensuite conservé à 4°C dans un réfrigérateur ou en chambre froide, pendant quinze à vingt et un jours au maximum. On peut augmenter au-delà de vingt et un jours la durée de conservation en ajoutant des dérivés de l'adénosine (CPD-adénine).

Les éléments cellulaires et plasmatiques contenus dans le sang sont aujourd'hui disponibles à l'état séparé. La logique de la transfusion sélective est de proposer chaque constituant sanguin sous la forme la plus adaptée en pureté et en concentration. Le malade ne recevra ainsi que le dérivé correspondant à un besoin spécifique, en quantité suffisante, avec une qualité qui limitera au maximum l'injection de cellules ou de protéines contaminantes dont l'effet thérapeutique n'est pas recherché. Ceci diminue aussi les risques immunologiques et infectieux de la transfusion. En effet, le risque transfusionnel, peut être résumé en trois points essentiels:

- Le risque de transmission de maladie infectieuse (réduit par l'examen des donneurs et les contrôles biologiques obligatoires pratiqués sur les dons, mais aussi par la transfusion sélective, qui par certains traitements appliqués au cours de la préparation permet la destruction des particules virales éventuelles).
- Le risque immunologique (ce risque dû au polymorphisme génétique n'existe pas pour les produits sanguins stables pour lesquels les antigènes de membranes cellulaires sont

éliminés et els anticorps plasmatiques en trop faible quantité pour présenter un risque).

- Le risque de surcharge (évidemment nul avec la transfusion sélective qui évite une surcharge volémique ou même ferrique).

### **2 – 1 – 3 – Fractionnement industriel du plasma:**

Le fractionnement du plasma est une méthode physico-chimique permettant de séparer les différentes protéines du plasma. Il est en général réalisé sur des volumes importants de plasma préparés par le regroupement, poolage, de nombreuses unités individuelles (à partir de dons de sang total ou par plasmaphérèse, qui consiste à prélever du sang à un donneur, à séparer le plasma, puis à restituer au sujet ses propres globules rouges par autotransfusion). La taille des pools du plasma pour le fractionnement varie de quelques dizaines de litres à plusieurs milliers de litres.

La séparation des protéines par le fractionnement repose sur le fait que les protéines ont une solubilité variable en fonction des paramètres tels que la température, la concentration d'alcool ou d'agent précipitant, la force ionique, le pH du milieu de la réaction. La taille des protéines, leur poids moléculaire ou leur affinité permettent également de les séparer ou de les purifier.

Aussi, nous décrivons les quatre catégories de techniques les plus utilisées:

*A – Méthode de précipitation différentielle à l'éthanol:*

Le fractionnement du plasma pour la préparation des produits thérapeutiques est apparu en 1949 suivant la description d'E.J. Cohn. La méthode consiste en précipitations successives d'un mélange plasma-alcool en faisant varier la concentration d'éthanol, la force ionique, la température, le pH et la concentration en protéines.

En augmentant la concentration d'éthanol de 8 à 40 %, en abaissant la température à -3 puis -5 °C et en acidifiant le pH de 7.3 à 4.8 on obtient successivement le fibrinogène, les immunoglobulines et l'albumine.

De nombreuses variantes et améliorations de cette méthode ont été décrites, mais le schéma de base reste aujourd'hui la technique la plus utilisée par les centres de fractionnement.

La solubilité par l'acide caprylique de la fraction III permet la préparation d'immunoglobulines enrichies en IgA et en IgM ou en sous-classes particulières et aboutit à des produits ayant des activités différentes.

*B – Cryoprécipitation du plasma:*

La cryoprécipitation du plasma, bien que située avant le fractionnement de Cohn dans le schéma général du fractionnement, a été décrite de nombreuses années après. En effet, c'est en 1964 que J. Pool utilise le fait que la décongélation à une température inférieure à 4 °C du plasma aboutit à la formation d'un cryoprécipité qui contient, entre autres protéines, le facteur antihémophilique A ou facteur VIII. C'est cette méthode qui reste encore la base de la purification des différents facteurs VIII utilisables en thérapeutique.

*C – L'ultrafiltration:*

L'ultrafiltration est une technique qui permet la concentration de solutions de protéines et leur purification en continu en évitant la lyophilisation. Procédé connu depuis de nombreuses années, il a été adapté au début des années 1980 à la concentration de l'albumine et permet, outre un gain de temps, d'éliminer l'éthanol résiduel et les sels. Ensuite, l'ultrafiltration et la dialyse ont été appliquées à d'autres protéines.



*D – La chromatographie:*

Les techniques chromatographiques ont été adaptées au fractionnement industriel du plasma à partir des années 1980 et sont maintenant très habituellement utilisées pour la purification de certains produits, voire même pour le fractionnement complet à partir du plasma. Toutes les méthodes de chromatographie sont employées (gel filtration, échange d'ions, chromatographie d'affinité).

La chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Trisacryl M donne également de bons résultats, voir tableau 14.

**Tab. 14: Composition des différentes fractions  
Obtenues par chromatographie du plasma  
cryoprécipité sur DEAE-Trisacryl**

<b>Fraction</b>	<b>Composition</b>	<b>Pureté</b>
<b>I</b>	IgG	99.5 %
<b>II</b>	Transferrine Immunoglobulines Béta globulines albumine	~ 70 % traces ~ 20 % traces
<b>III</b>	Albumine Alpha globulines Béta globulines	~ 78 % ~ 15 % traces
<b>IV</b>	Céruleoplasmine Facteur VIII Facteur IX Facteur X	Non déterminé

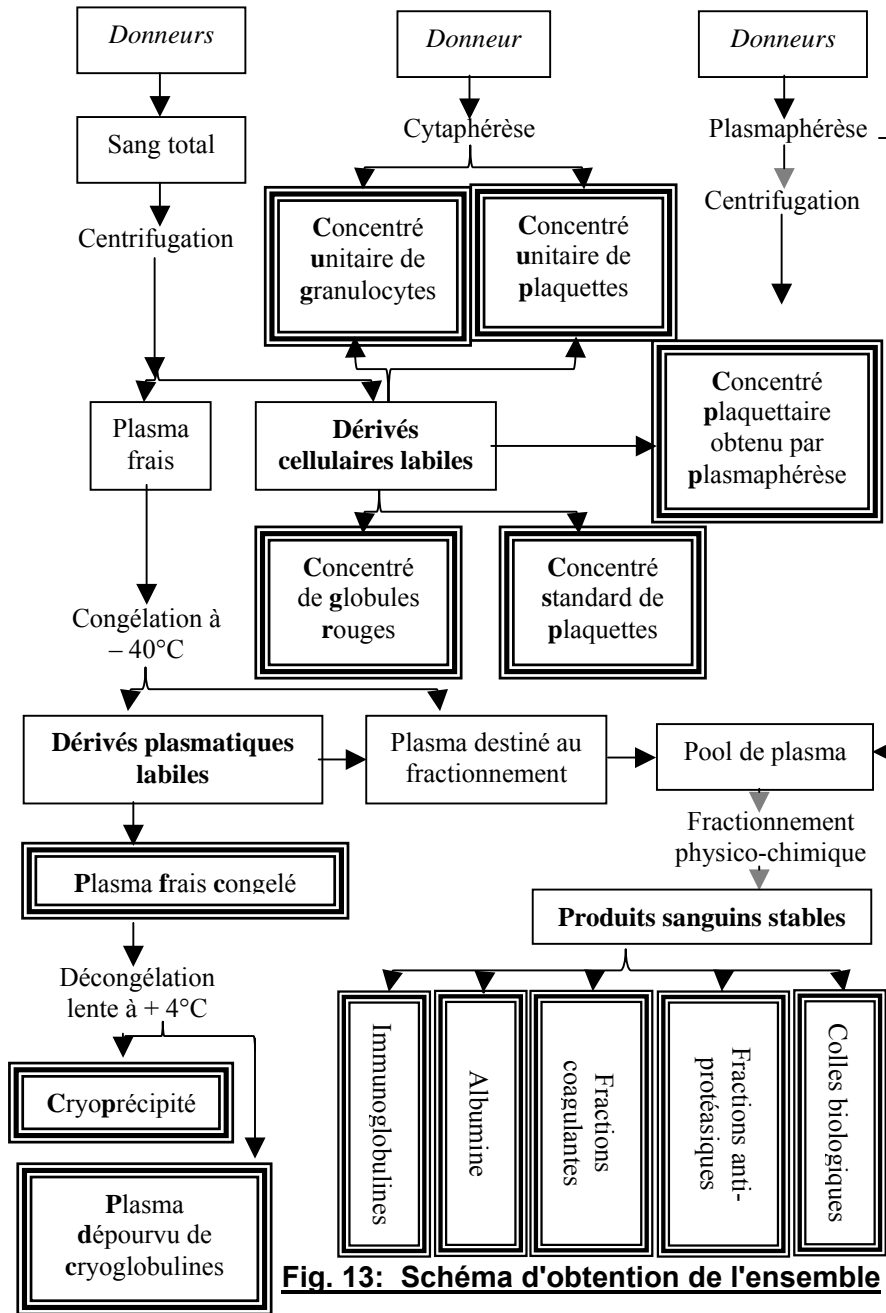
## **2 – 1 – 4 – Utilisations des divers dérivés sanguins:**

L'utilisation du sang total dans le traitement des hémorragies date du début du XX<sup>ème</sup> siècle. Cependant, le sang total contient des éléments qui n'ont de communauté ni dans leurs exigences de conservation, ni dans leurs indications, voir tableau ci-dessous.

Dérivé sanguin	Conservation	
	Température	Durée
Globules rouges	+ 4°C	35 jours
Globules blancs	Ambiante	Quelques heures
Plaquettes	+ 22°C	5 jours
Plasma	- 30°C	1 à 2 ans

Aussi, on comprend aisément pourquoi le sang total est devenu un produit dépassé dont la prescription est illogique. L'application des techniques physico-chimiques d'isolement et de purification permet de préparer des dérivés sanguins spécifiques adaptés à chaque situation.

Le sang prélevé chez les donneurs est conservé jusqu'à sa centrifugation dans la solution anticoagulante CPD. Il est rapidement acheminé vers les centres de transfusion où les dérivés sanguins labiles et/ou stables sont préparés (voir la figure 13, ainsi que les tableaux 15 et 16).



**Fig. 13: Schéma d'obtention de l'ensemble des dérivés sanguins stables et labiles.**

**Tab. 15: Les dérivés sanguins labiles et leur diverses indications Thérapeutiques**

Désignation		Préparation et obtention	Indications	
Dérivés cellulaires	Concentrés de granulocytes	Leucaphérèse (cytaphérèse de leucocytes) à partir d'un seul donneur	Infections sévères chez des patients neutropéniques pour lesquelles l'antibiothérapie s'est révélée inefficace (les granulocytes n'étant efficaces que sur les germes à localisation extra cellulaire)	
	Concentrés de globules rouges	Centrifugation de sang total, soustraction du plasma, addition d'une solution de préservation (adénine glucose mannitol)	Anémies chroniques ou aiguës par hémorragie	
	Concentrés plaquettaire	CSP	Centrifugation d'une unité de sang total frais	Traitement ou prévenir les hémorragies consécutives à une thrombopénie ou thrombopathie
		CPP	Plasmaphérèse + centrifugation	
CUP		Cytaphérèse		
Dérivés plasmatiques	Plasma frais congelé	Centrifugation lente de sang total + centrifugation + congélation 6h à -40°C + décongélation rapide et conservation à +22°C pendant les 2 h qui précède l'utilisation	Corriger les déficits conjoints de la volémie et des facteurs de l'hémostase (chirurgie)	
	Cryo-précipité Produit abandonné	Décongélation lente d'un plasma frais congelé	Traitement de l'hémophilie A, de la maladie de Wilbrand et des déficits en fibrinogène	
	Plasma dépourvu de cryoglobulines Retiré de la liste officiel des produits sanguins		Ne contenant plus les cryoprécipitables (II, V, VIII) de la coagulation ce dérivé n'est indiqué que dans les déficits volémiques	

**Tab. 16: Les dérivés sanguins stables et leur diverses indications thérapeutiques**

Désignation		Préparation et obtention	Indications
Fractions coagulantes	Anti hémophili – ques	A B	Cryoprécipitation + précipitation par les solvants + chromatographie et immuno-purification
	Autres	Fibrinogène	Précipitation à l'alcool + traitement par les solvants
Antiprotéases	Antithrombine III	Cryoprécipitation + Chromatographie (affinité)	Déficits héréditaires et acquis (cirrhose du foie, septicémie néonatale...)
	A1 antitrypsine (AAT)	Cryoprécipitation + précipitations alcooliques + chromatographies	Traitement substitutif d'un déficit constitutionnel en AAT
Immunoglobulines (Ig)	Ig polyvalentes	Fractionnement de Cohn d'un pool de plasma (1000 donneurs)	Prévention de certaines maladies infectieuses en absence d'Ig spécifiques (rougeole, oreillons), traitement des infections graves résistant aux antibiotiques (septicémies graves)
	Ig spécifiques	Fractionnement de Cohn d'un pool de plasma riches en Ac recherchés	ex.: Prévention de l'allo-immunisation fœtomaternelle ou post-transfusionnelle (Ig anti D), Ig anticytomégalovirus (voir fig.)
	Ig G A et M	Fractionnement de Cohn (fraction III: acide caprylique)	ex.: Ig antiallergiques (rhinites saisonnières, l'asthme aux acariens)
Albumine plasmatique		Fractionnement de Cohn (fraction IV) ou par chromatographie	Déficits volémiques, hémorragies et états de choc, brûlures et insuffisances hépatiques

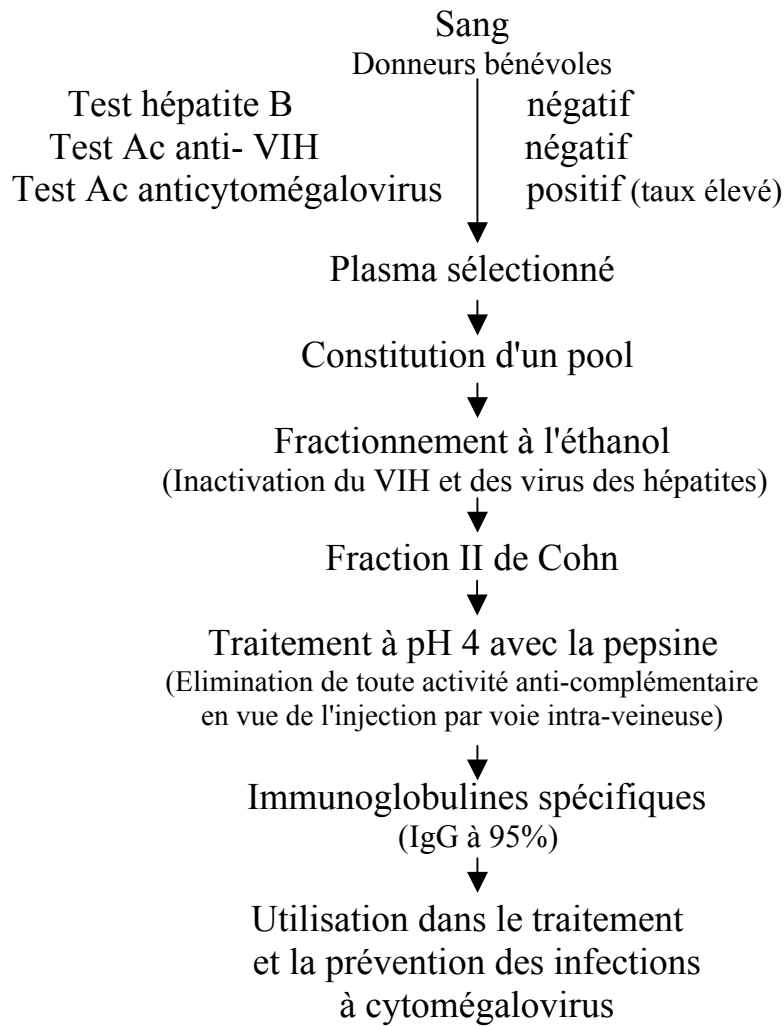
**Remarques:**

- La colle biologique constitue également un dérivé sanguin stable, obtenue par concentration des facteurs de l'hémostase coagulable par la thrombine. Son usage est réservé à des applications locales en chirurgie (plastique, dentaire, osseuse...

- Du fait de sa richesse en protéines, certains pays considère le sang comme une viande liquide qu'ils valorisent conditionné dans des boudins noirs qui sont vendus cuits (cruor). Le sang recueilli au moment de l'abattage des animaux représente de 3 à 5 % de leur poids et est utilisé entre autres dans l'alimentation animale (pour le sang bovin, le sang des volailles et celui des bovins étant souvent rejeté à l'égout).

- L'albumine sérique bovine (ou SAB), est très employée dans le domaine de la recherche en tant que témoin ou calibre dont le PM et /ou la concentration sont connue.

- Les immunoglobulines permettent de lutter contre certaines maladies infectieuses, bactériennes ou virales, soit à titre préventif (coqueluche, oreillons, tétanos, hépatite virale, rubéole), soit à titre curatif pour une infection déjà déclarée (voir figure 14). Certaines immunoglobulines sont capables de



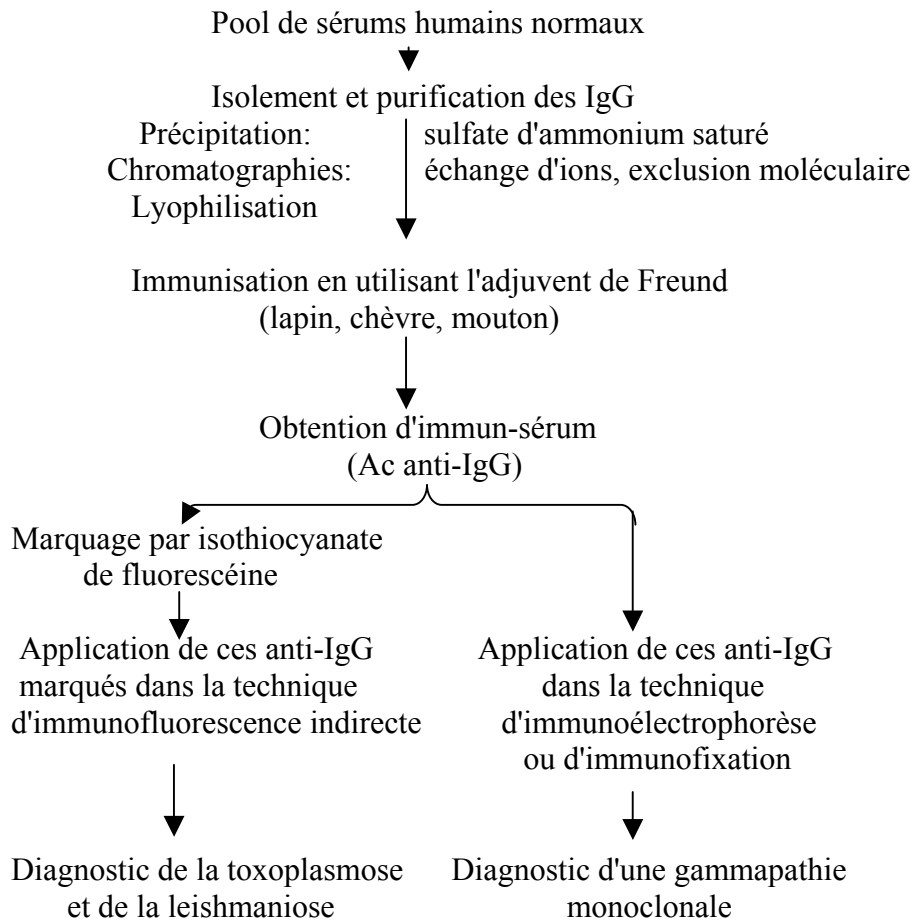
**Fig. 14: Schéma représentant la procédure d'obtention des Immunoglobulines anti cytomégalovirus**

prévenir des accidents de nature non pas infectieuse mais immunologique (chez les femmes «Rhésus négatif» dont le mari est «Rhésus positif» des gammaglobulines anti-Rhésus (anti-D) permettent de prévenir la maladie hémolytique du nouveau-né, à condition de les injecter immédiatement après le premier accouchement et à chaque accouchement ou avortement ultérieur).

Les immunoglobulines (polygamma) *injectables par voie intraveineuse* sont utilisées dans les rares agammaglobulinémies congénitales et surtout dans le traitement des affections auto-immunes (telles les thrombopénies idiopathiques).

Les immunoglobulines sont également utilisées pour la fabrication d'antisérums polyvalents sous forme de réactifs de laboratoire (kits ou trousse en bactériologie, virologie, parasitologie, immunologie comprenant des anticorps anti-Ig marqués ou non) (voir figure 15).





**Fig. 15: Schéma représentant la procédure d'obtention des anti-IgG (marquées ou non marquées)**

## **2 – 2 – LE LACTOSERUM:**

### **2 – 2 – 1 – Composition et propriétés:**

C'est un liquide jaune pâle verdâtre (dont l'eau représente environ 90 %), contenant les éléments solubles du lait. Le lactosérum est un sous-produit provenant de la fabrication de certains produits du laits: fromages, caséines et leurs dérivés. Chaque fois qu'un litre de lait est mis en œuvre pour fabriquer un fromage, il y a production de 0.6 à 0.9 litre de lactosérum. L'acidité (pH) du lactosérum varie selon son origine (pâte pressée cuite = 6.7, pâte fraîche et caséine acide = 4.5, camembert = 6.1 ...etc.).

**a) Les protéines** : elles représentent 17 % du total des matières azotées du lait, et représentent 0.6 à 0.7 % de la matière sèche du lactosérum. Elles ont une meilleure valeur nutritionnelle, surtout liée à leur teneur en acides aminés essentiels, soufrés et en lysine (voir tableau 17).

**Tab. 17: Teneurs en AA de la poudre du lactosérum**

Nature des AA	Teneurs en % d'AA total
Met	0.15
Cys	0.22
Lys	0.87
Thr	0.67
Arg	0.25
Val	0.55
Pro	0.61
Leu	0.98
Ile	0.59
Asp	1.08
Glu	1.74
Ala	0.48
Gly	0.24

La proportion des différentes protéines solubles dans le lactosérum est la suivante:

- La  $\beta$ -lactoglobuline (50%), de masse moléculaire 18362 Da, de nature holoprotéique (bien qu'un dérivé glycosylé ait été découvert en faible proportion), son pHi varie selon les variants génétiques de 5.23 à 5.30 (due à la substitution de l'Asp par la Lys);
- L'  $\alpha$ -lactoglobuline dite aussi  $\alpha$  -lactalbumine (22 %), de masse moléculaire voisine de 14174 Da, elle représente le facteur de régulation du système enzymatique de la lactose-synthétase, son pHi est de 4.8; cette protéine est riche en tryptophane.

- Les *immunoglobulines* (12 %) (en majorité des IgG de masse moléculaire 160 kDa chez les ruminants et des IgA chez les monogastriques de masse moléculaire 320 kDa, ainsi que des IgM);
- La *sérumalbumine* (5 %);
- Les *protéoses peptones* (10 %) : on en distingue 2 classes principales: composants issus de la protéolyse enzymatique de la caséine  $\beta$  ( $\beta$ -CN-5P de 14300Da et  $\beta$ -CN-1P de 9900 Da et  $\beta$ -CN-4P de 4000 Da), ainsi que le composant PP3 ou lactophorine qui est une glycoprotéine phosphorylée de 28000 Da;
- *Autres protéines mineures* possédant une activité biologique: la lactoferrine et la lactoperoxydase, qui possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique sur certaines espèces pathogènes.

Remarque: Les deux premières sont synthétisées par la glande mammaire, quant aux deux suivantes, elles sont d'origine sanguine.

La détermination de la teneur en protéines totales du lait repose sur le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl sachant que la teneur moyenne en azote des protéines est de 15,65 % (facteur de conversion azote/ Protéine = 6.38). L'inconvénient de cette méthode provient du fait que l'on dose également l'azote non protéique.

Par ailleurs, le dosage des trois fractions azotées du lait (caséines, protéines solubles et azote non protéique) est

réalisable après précipitation des caséines à pH 4.6 et précipitation des protéines totales dans l'acide trichloracétique à 12 %, l'azote étant dosé dans les surnageants et dans le lait. Cette technique n'est malheureusement pas fiable pour les albumines et les protéoses-peptones; elle ne peut s'appliquer aux laits ayant subi des traitements thermiques même modérés puisqu'une bonne partie des protéines solubles coprécipite avec les caséines.

Les méthodes électrophorétiques et chromatographiques s'appliquent parfaitement au fractionnement des protéines du lactosérum. La filtration sur gel de Séphadex G50 donne de bons résultats. L'électrophorèse de zone en gel d'amidon ou de polyacrylamide (en absence d'urée et de mercaptoéthanol) permet facilement l'identification des protéines du lactosérum.

La  $\beta$ -lactoglobuline et l'  $\alpha$ -lactalbumine peuvent être séparées par précipitation fractionnée au sulfate de sodium ou d'ammonium. Les deux protéines ainsi isolées peuvent être cristallisées après redissolution puis dialyse.

b) **Le lactose** : il s'agit du  $\beta$ - D - galactopyranosyl (1-4) D - glucopyranose  $\alpha$  ou  $\beta$ . En solution, la mutarotation amène le mélange  $\beta/\alpha$  à 1.63 (15-20 °C). Le lactose représente 70 à 80% de matière sèche du lactosérum; il peut subir des réactions de cristallisation, de dégradation physico-chimique et de fermentation lactique bactérienne.

c) **Les minéraux** : Ils représentent 7 à 12 % de matière sèche du lactosérum. Il s'agit essentiellement du calcium et du

phosphore, ainsi que le potassium, le sodium, le magnésium, le chlore, le fer, ...etc.

d) **Les vitamines** : Les vitamines sont en majorité hydrosolubles, car les vitamines liposolubles sont entraînées par la matière grasse du caillé égoutté. Ce sont donc essentiellement les vitamines du groupe B: la riboflavine (B<sub>2</sub>) qui lui donne sa couleur verdâtre, l'acide panthoténique, la thiamine (B<sub>1</sub>), la pyridoxine (B<sub>6</sub>), ainsi que la vitamine C.

e) **Les matières grasses**: Elles ne représentent que 0.7 % de la matière sèche du lactosérum, puisque la quasi totalité de la matière grasse du lait est retenue dans le caillé.

### **2 - 2 - 2 - Différents types de lactosérum:**

Il existe donc plusieurs types de lactosérum, selon le mode de transformation du lait:

- *Lactosérum doux*: provient en général de la fabrication des fromages à pâtes pressées cuites ou non cuites et de la caséine obtenue par action de la présure (coagulation des laits non acides).
- *Lactosérum acide*: provient des caséineries ou les fromageries fabriquant des pâtes fraîches ou pâtes molles, ou des caséineries (fabrication de la caséine acide).
- *Lactosérum mixte*: acide / doux.

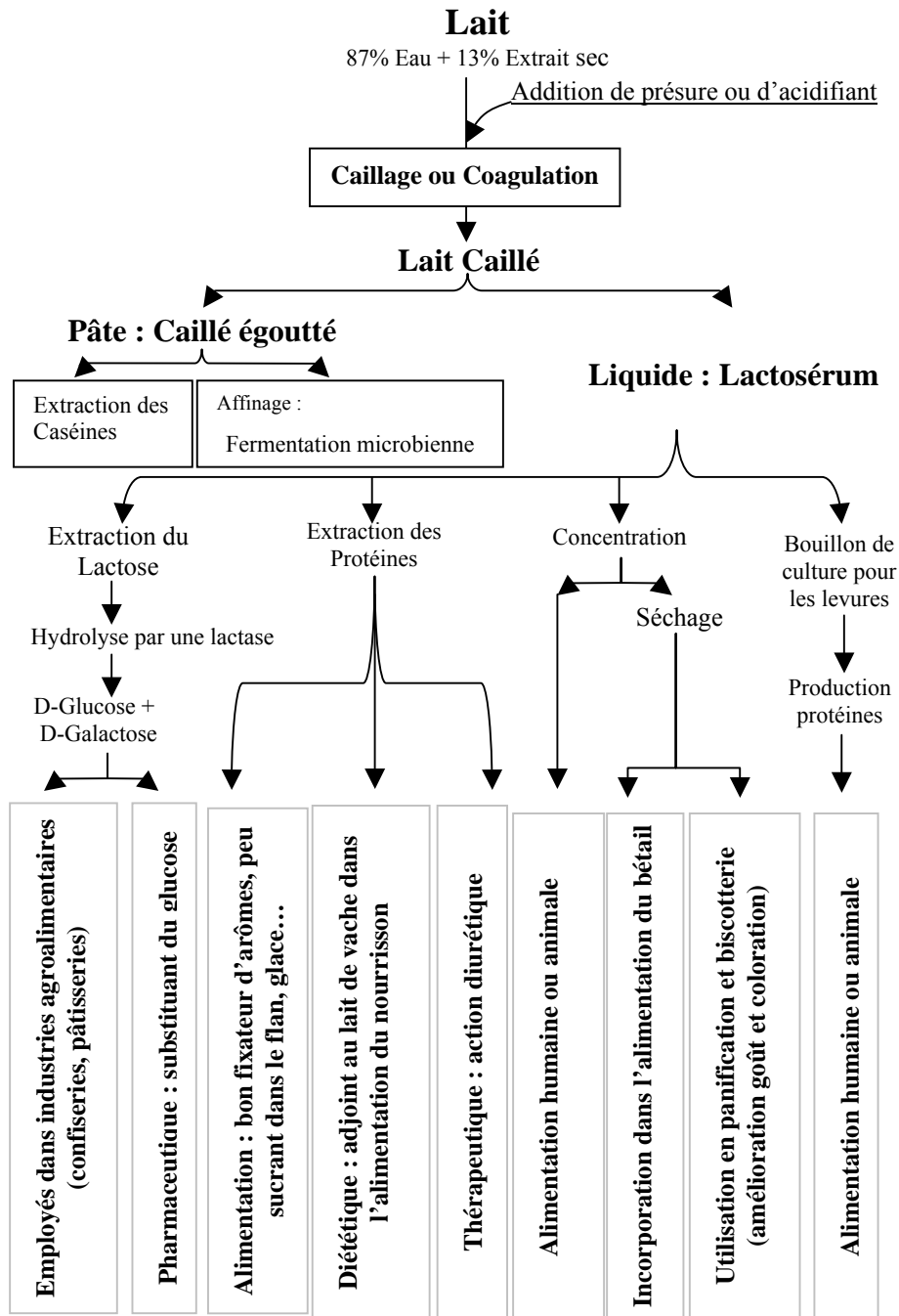
### **2 – 2 – 3 – Extraction et utilisations du lactosérum et de ses dérivés:**

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère, lorsqu'il est déversé dans une rivière (voir tableau 18), il engendre des effets polluants: les bactéries et autres micro-organismes vivants dans l'eau, attaquent certains constituants du lactosérum (lactose principalement) en consommant l'oxygène de l'eau. Ce dernier manquera aux poissons et aux plantes aquatiques qui mourront d'asphyxie.

**Tab. 18: Volumes de lactosérum rejetés / jour par quelques unités fromagères Algériennes.**

<b>Unités</b>	<b>Volumes rejetés (l/j)</b>	<b>Types de fromage fabriqué</b>
Blida	10000	Pâte fraîche
Relizane	15000	Pâte molle
Sidi-bel Abbes	16000	Pâte fraîche / Pâte molle

Ces torts causés à l'environnement pourraient être évités d'autant que le lactosérum est une matière *noble* dont il y a encore beaucoup à tirer. En effet, on en extrait donc du lactose (les méthodes d'extraction sont voisines de celles qui sont utilisées en sucrerie de cannes ou de betterave), mais aussi de l'acide lactique et de la riboflavine (vit B2). Le lactosérum entre dans la composition de divers produits alimentaires et pharmaceutiques voir figure 16, notamment les produits



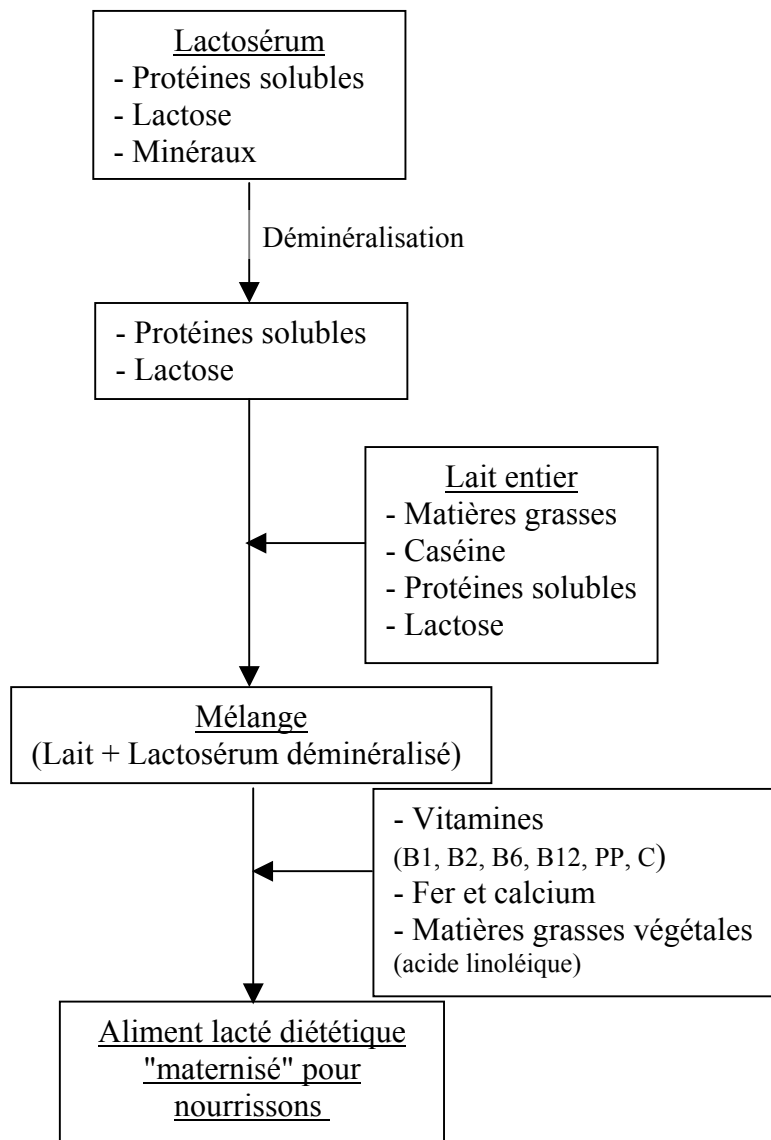
**Fig. 16: Utilisations du lactosérum et de ses dérivés**



diététiques (dans l'aliment lacté diététique maternisé pour nourrissons, voir figure 17) ou de régime.

De façon générale, le lactosérum est utilisé, pour l'alimentation animale: où utilisé sous sa forme liquide, il peut remplacer la totalité de l'eau de boisson et utilisé en poudre, il représente un facteur d'appétence chez le jeune veau. Cependant, l'incorporation exagérée de lactosérum dans l'alimentation des animaux domestiques présente un déséquilibre nutritionnel ainsi que certains troubles digestifs: diarrhées, acidose, cétose, météorisation...etc.

Le lactosérum est le liquide résiduel représentant plus de 80 % du lait utilisé en fromagerie. Il est intéressant par ses protéines et le lactose qu'il contient, mais pour l'industriel, il comporte certains inconvénients: extrait sec faible (6.5), salinité forte (10% de l'extrait sec), rapport protéine/glucose bas (1/6), avec en plus une grande fragilité, car c'est un bon milieu de culture (à 4°C, le stockage du lactosérum pendant deux semaines ne montre aucune variation notable de la composition chimique).



**Fig. 17:Utilisation du lactosérum dans l'aliment lacté diététique "maternisé" pour nourrissons.**

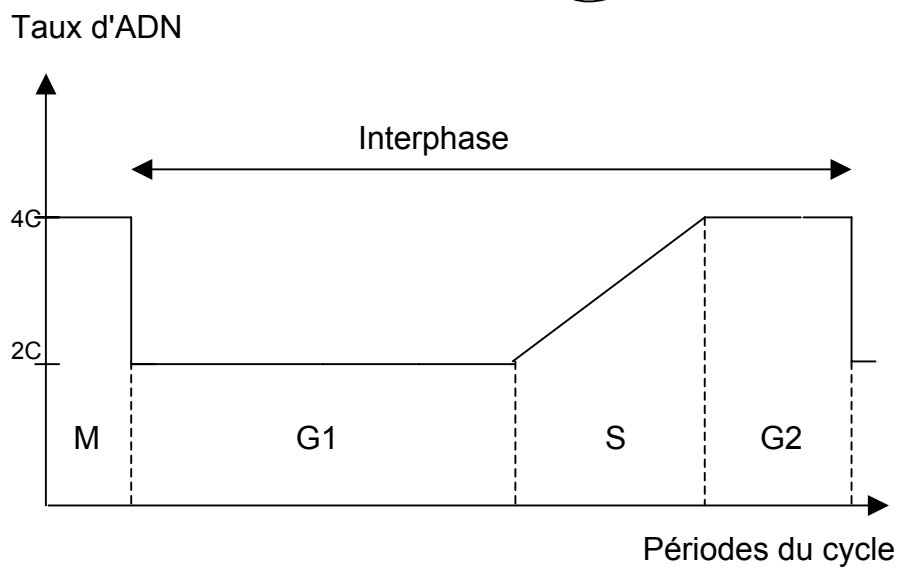
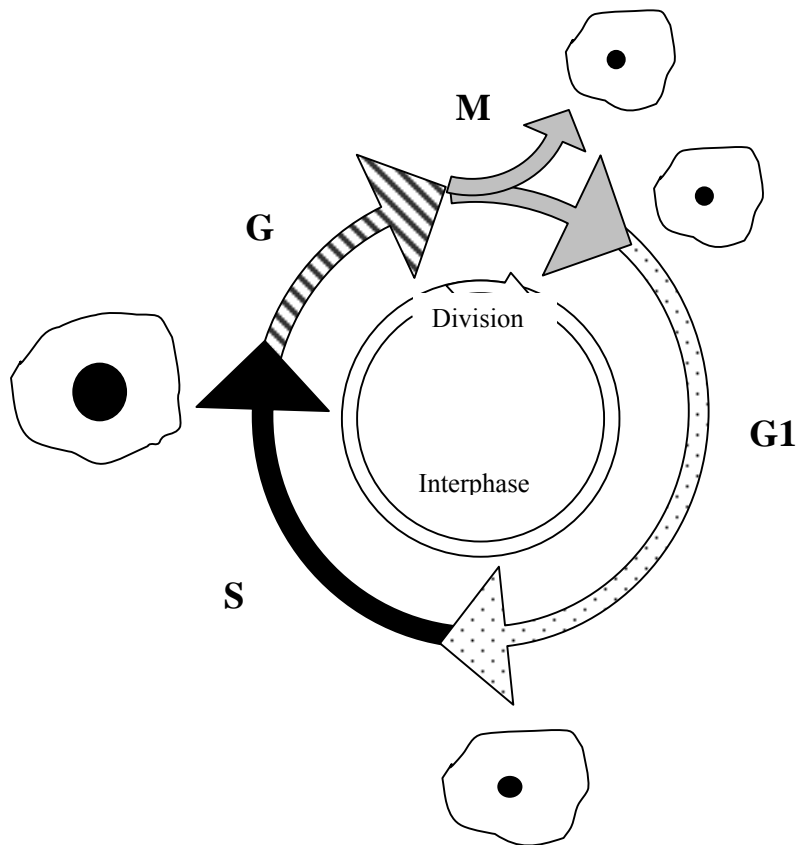
## **2 - 2 - CULTURE DE CELLULES ANIMALES (EUCARYOTES):**

### **2 - 2 - 1 - Le cycle cellulaire:**

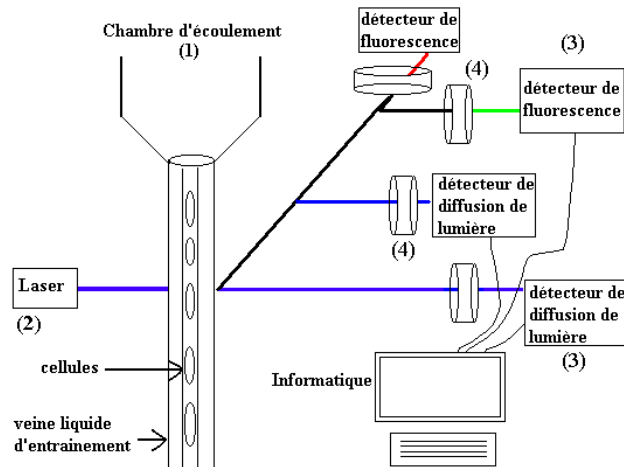
*Définition:* Le cycle cellulaire est représenté par quatre phases successives suivantes:

- Phase S (S pour synthèse): elle commence quand la synthèse de l'ADN démarre et se termine quand le contenu du noyau en ADN a doublé et que les chromosomes se sont répliqués.
- Phase G2 (G pour gap = intervalle): elle se termine lorsque la mitose commence.
- Phase M (M pour mitose): elle comprend la division nucléaire (mitose) et la division cytoplasmique (cytodiérèse). Pendant cette phase, les chromosomes répliqués se condensent à partir de leur état interphasique déployé. Ils sont alors aisément visibles en microscopie photonique.
- Phase G1: elle précède le démarrage de la synthèse de l'ADN; la cellule reprend un rythme de biosynthèse rapide.

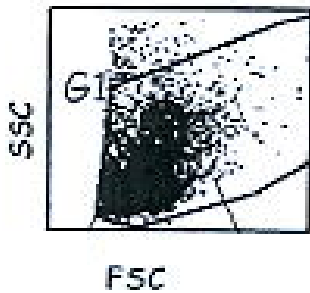
Remarque: Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase et représentent 90% de la durée totale du cycle, voir schémas ci-dessous.



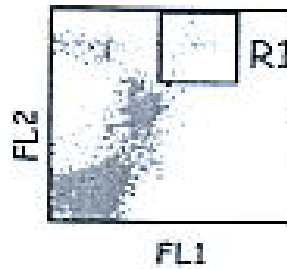
*Moyens d'études:* La microscopie est l'outil de base utilisé dans l'étude du cycle cellulaire. C'est ainsi, par exemple, que le comptage périodique des cellules présentes au microscope permet d'établir la durée d'un cycle cellulaire complet, c.-à-d., le temps en heures nécessaires pour qu'il y ait doublement du nombre total de cellules. D'autre part, l'utilisation de la radioactivité (telle la thymidine tritiée) et son incorporation au milieu de culture permet d'estimer la durée des différentes phases (S, M, ...). Notons également que les analyses du cycle cellulaire ont été grandement simplifiées ces dernières années, grâce à l'utilisation de la cytofluorométrie à flux liquide. Cette dernière consiste à analyser une par une des cellules passant dans une veine liquide devant une source laser à la vitesse de 2000 cellules / seconde. En utilisant des colorants de l'ADN et de l'ARN, ou des protéines et en disposant des sondes spécifiques permettant d'identifier certaines structures sur la membrane plasmique ou dans le cytoplasme, on peut procéder au tri des cellules définies par une combinaison de plusieurs paramètres.



Acquisition :

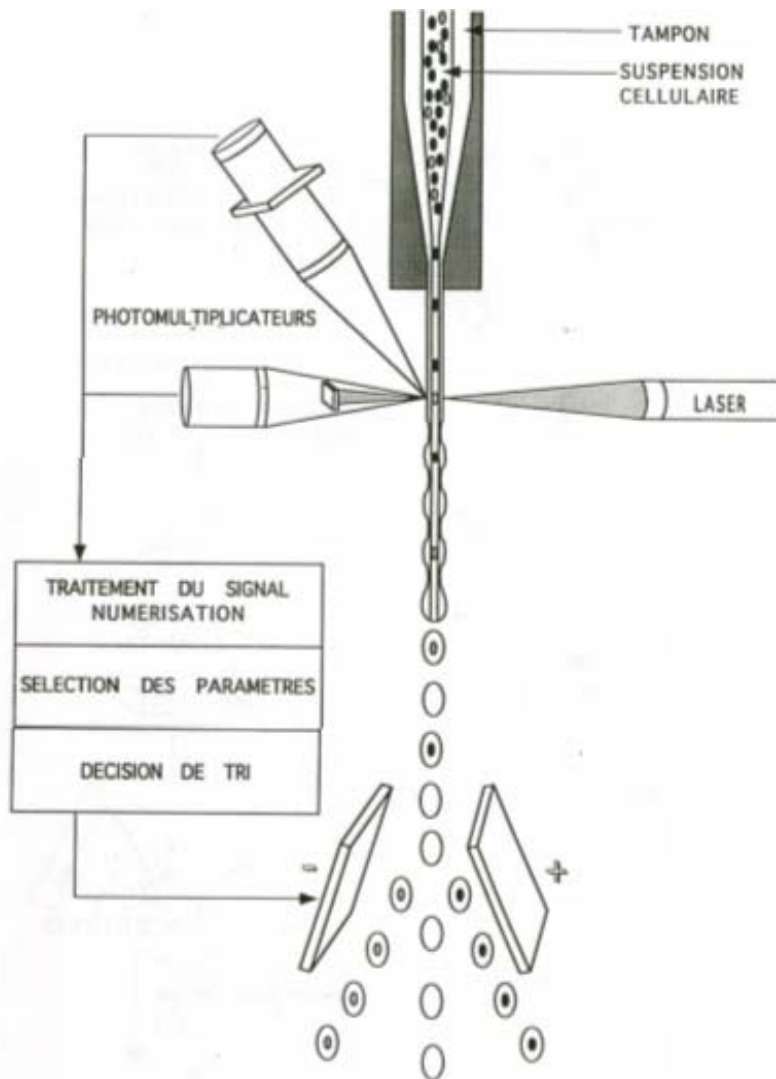


Double  
marquage :



**Fig. Principe de l'analyse en cytométrie en flux**

Une fenêtre nommée G1 est réalisée sur la taille (FSC) et la granulosité (SSC) afin d'éliminer les débris et les cellules mortes. Pour un double marquage, on regarde si les cellules sélectionnées dans G1 expriment les deux marqueurs analysés en FL1 et FL2 dans la région R1.



**Fig. Schéma de fonctionnement d'un trieur de cellules**

## **2 – 2 – 2 – Les différents types de culture:**

La culture de cellules peut se faire soit en "monocouche" qui se prête bien à l'observation microscopique, soit "en masse", c.-à-d. en suspension dans un milieu nutritif liquide.

Les cultures préparées directement à partir des tissus d'un organisme sont appelées "cultures primaires". Dans la majorité des cas, les cellules des cultures primaires peuvent être prélevées de la boîte de culture et utilisées pour former un grand nombre de "cultures secondaires". Elles peuvent être repiquées de cette façon pendant des semaines ou des mois. Ces cellules manifestent souvent les propriétés différentielles du tissu dont elles proviennent: les fibroblastes sécrètent du collagène, les cellules musculaires embryonnaires fusionnent pour former les fibres musculaires géantes, les cellules nerveuses émettent des axones et établissent des synapses avec d'autres cellules nerveuses...etc.

La culture des cellules nécessite la réalisation de milieux nutritifs complexes. Ceux actuellement utilisés sont des mélanges de glucose, d'acides aminés, de certaines protéines, de vitamines et de sels minéraux (voir tableau 19).

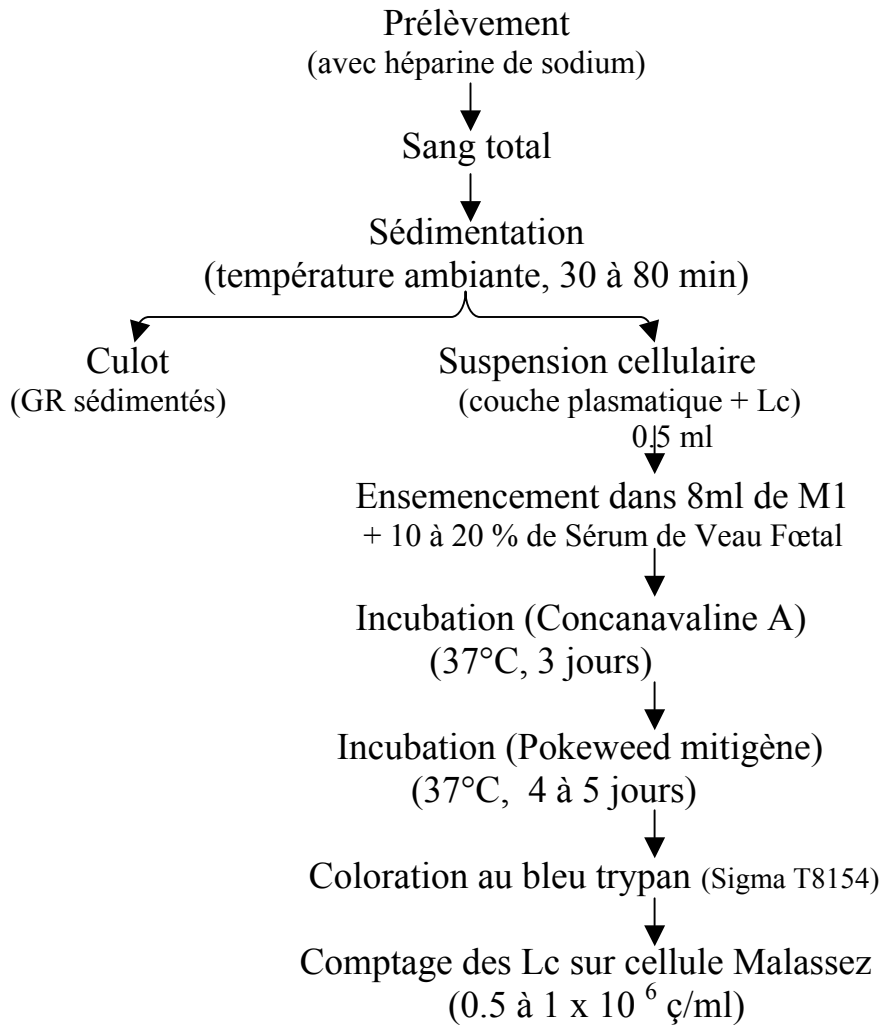


**Tab. 19: Composition type d'un milieu de culture de cellules de mammifères :** (pH 7.4; récipients conservés à 37 ° C dans une atmosphère à 5 % CO<sub>2</sub> et 95 % d'air ) / (\*) pour arrêter la croissance des bactéries / (\*\*) indicateur coloré de pH / (\*\*\*) en général celui du cheval ou du veau fœtal à raison de 10 % du milieu de culture

<b>Acides aminés</b> (presque tous de la série L) (0.1 ou 0.2 mM)	<b>Vitamines</b> (1µM)	<b>Sels</b>	<b>Divers</b>
Arginine / Cystine/ Glutamine / Histidine / Isoleucine / Leucine / Lysine / Méthionine / Phénylalanine / Thréonine / Tyrosine / Valine	Biotine Choline Folate Nicotinamide Panthothénate Pyridoxal Thiamine Riboflavine	NaCl KCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaHCO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub>	Glucose (5 à 10 mM) Pénicilline * Streptomycine * Rouge de phénol** Sérum total ***

Toutefois, il faut encore souvent leur ajouter de petites quantités d'extraits renfermant des facteurs de croissance  
Facteur de croissance: Sérum de veau fœtal (SVF), ou des lectines stimulant la transformation lymphoblastique dans la culture des cellules lymphocytaires: tels la Concanavaleine A qui active de préférence les lymphocytes T (LcT), et le Pokeweed mitogène qui active les lymphocytes T, mais surtout les lymphocytes B (LcB) (voir figure18).

*Intérêt:* La culture de cellules permet d'évaluer l'effet de toxines ou d'agents d'intérêt thérapeutique, et permet aussi l'étude du développement embryonnaire et du métabolisme cellulaire. Enfin, l'intérêt que peut représenter la culture cellulaire est la production en grande quantité de substances d'origine animale douées d'activité thérapeutique ou autre (ex: production d'anticorps monoclonaux par hybridation cellulaire).



**Fig. 18: Mise en culture des cellules lymphocytaires**

**Milieu M1:** (Filtré sur membrane 0.22 µm et conservé à 4 °C)

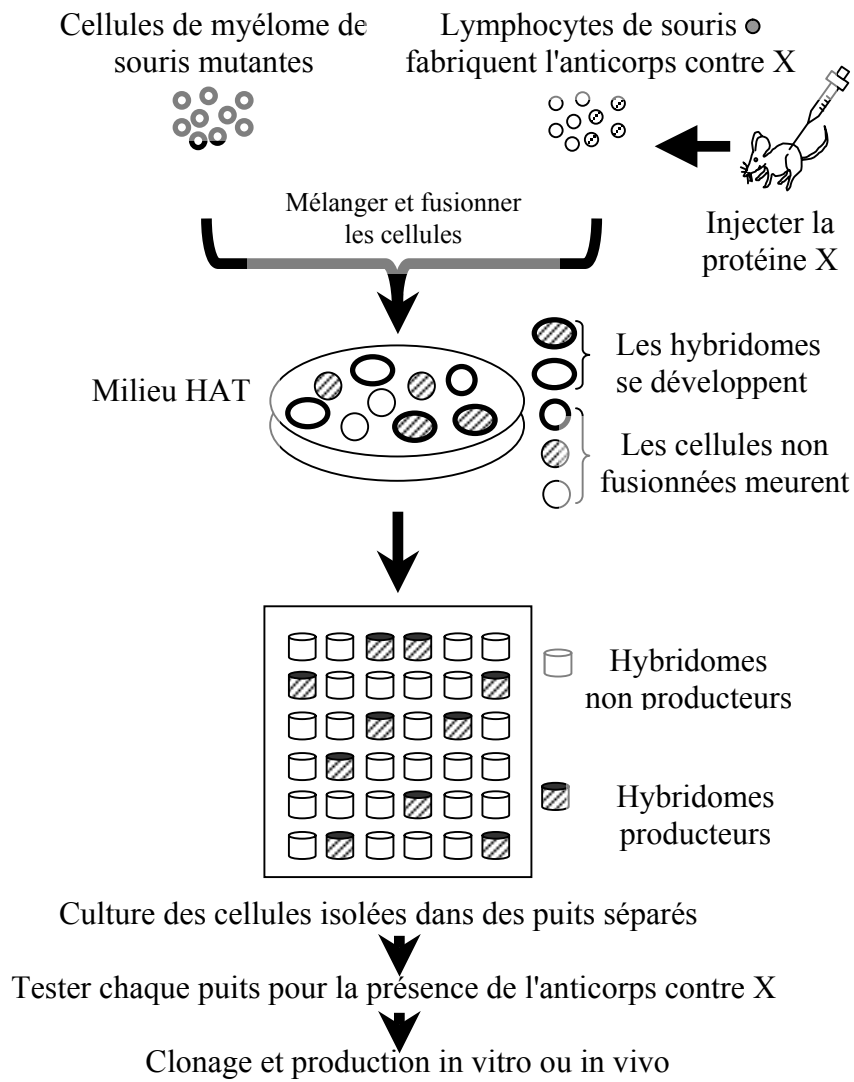
- milieu Ham F10, Ham F12, TC 199 ou RPMI 1640 1X.
- pénicilline : 100 UI/ml, streptomycine: 100 µg/ml, fungizone: 0.25 µg/ml

### **2 – 2 – 3 – L'hybridation cellulaire – application dans la production d'anticorps monoclonaux :**

Tout individu est capable de répondre contre les nombreuses agressions étrangères (multitude d'antigènes) par la synthèse de plusieurs anticorps différents. Ainsi, théoriquement, si on veut obtenir une grande quantité d'un anticorps donné, on procède comme suit : on injecte à un animal l'antigène correspondant, on attend que les anticorps soient produits puis on isole et on cultive les cellules spléniques ou ganglionnaires capables de produire l'anticorps souhaité. Malheureusement, les cellules productrices (clone qui dérive du même lymphocyte B) ne peuvent se diviser indéfiniment en culture. Aussi, afin d'obtenir une grande quantité d'anticorps, il a fallu fusionner les cellules précédentes avec des cellules cancéreuses (myélome) qui confèrent aux cellules hybrides (hybridomes) une immortalité qui favorise leur exploitation (production d'anticorps monoclonaux).

Les cellules du myélome sont adaptées à la culture in vitro et sont déficientes en Hypoxanthine-Guanine PhosphoRybosyl Transférase (HGPRT). L'ensemble des cellules est transféré dans un milieu HAT doit son nom à la présence d'hypoxanthine; améthoptérine et thymine. Ce milieu permet la croissance des cellules avec une HGPRT fonctionnelle, mais les cellules dépourvues de cette enzyme, comme les cellules de myélome non fusionnées utilisées dans cette technique, ne peuvent s'y développer. Aussi, les

lymphocytes normaux ou immuns dégénèrent et meurent spontanément. Les cellules du myélome (HGPRT -) meurent, car la seule synthèse d'acide désoxyribonucléique possible, c.-à-d. celle dite endogène, est bloquée par l'aminoptéridine. Seules peuvent survivre les cellules hybrides, possédant d'une part la voie de synthèse exogène de l'ADN apportée par le lymphocyte de l'animal immunisé et, d'autre part, l'immortalité de la cellule de myélome voir Figure 19).



**Fig. 19: Procédé utilisé pour l'obtention d'anticorps monoclonaux.**

**Remarque:** ces hybridomes sont clonés in vitro (dans les bio-réacteurs) ou in vivo (en les faisant se développer comme cellules tumorales dans un animal récepteur histocompatible).

**Utilisations des anticorps monoclonaux :**

Les anticorps monoclonaux peuvent être employés de manière analogue aux anticorps polyclonaux conventionnels. Les diverses applications de ces molécules sont:

- Dans le domaine de la *recherche* : comme l'antigène utilisé peut ne pas être purifié, après obtention de l'anticorps monoclonal, ce dernier peut servir à l'isolement et la purification par chromatographie d'affinité de l'antigène en cause.
  
- Dans le domaine du *diagnostic médical* (humain ou vétérinaire) : essentiellement utilisés en sérologie courante à l'aide de tests radio-immunologiques ou immuno-enzymatiques pour la détection et la quantification de toutes molécules sériques ou urinaires (hormones, médicament, protéines...). Ils sont également destinés au typage cellulaire et sanguin (Lc T auxiliaires ou suppresseurs, Lc B ...) ainsi que l'identification d'antigènes tumoraux dans le sérum ou sur des cellules et des antigènes viraux ou bactériens dans le diagnostic des maladies infectieuses.

- Dans le domaine *alimentaire* : les anticorps monoclonaux sont utilisés pour la recherche de substances étrangères (contaminants, additifs, élément toxique) pouvant être néfastes pour la santé dans toute sorte de produit et dont toute trace révélée peut entraîner la saisie de l'aliment.
- Autres: contrôle des pesticides et pollution de l'environnement (recherche par radio-immunologie d'insecticides comme le parathion dans les extraits de végétaux, ou de pesticides comme le thiocarbamate qui a l'inconvénient de se répandre rapidement dans les eaux de drainage puis dans les rivières en tuant les poissons).

Il reste beaucoup à faire dans le domaine des anticorps monoclonaux, avec l'évolution des techniques du génie génétique qui modifie et transforme ces molécules en élaborant entre autres des anticorps humains "sur mesure"...

## **Chapitre 3 – BIOCHIMIE DES SUBSTANCES D'ORIGINE MICROBIENNE:**

### **3 – 1 – LES ENZYMES:**

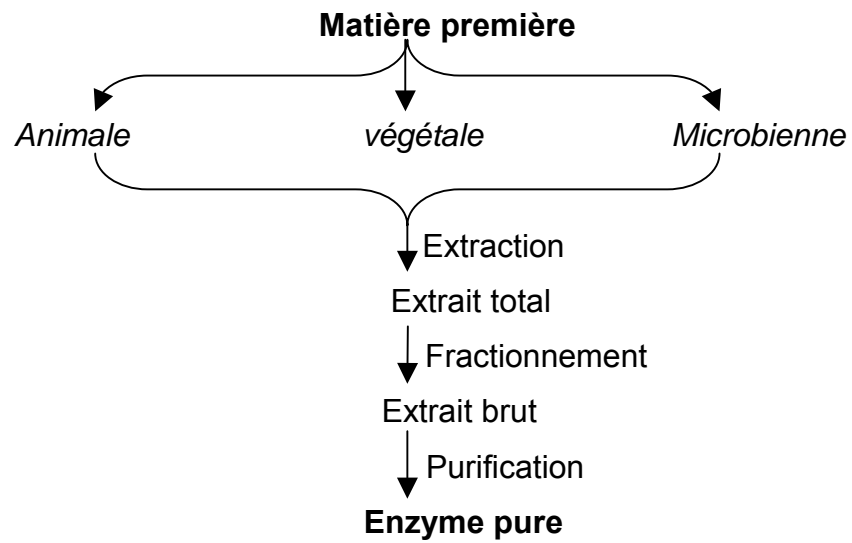
Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Plus de 2000 enzymes ont été, à ce jour, découvertes, dont un tiers, au moins, sont des enzymes à cofacteurs (NAD, NADP, FAD, ATP, CoA). Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières (voir figure 20).

Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les micro-organismes présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes: croissance exponentielle, induction et rétro-inhibition...etc.

#### **3 – 1 – 1 – Caractéristiques de la souche microbienne sélectionnée:**

Actuellement, en plus de certains *Actinomycètes* et levures, deux organismes sont principalement utilisés *Bacillus* et *Aspergillus* (voir tableau 20).





**Fig. 20: Processus général d'isolement et de purification d'une enzyme**

**Tab. 20: Quelques enzymes sécrétées par divers micro-organismes et leur domaines d'application:**

1:Industrie laitière / 2:fromagerie / 3:huiles et graisses /  
 4:glaces/ 5:céréales et amidon / 6:fruits et légumes / 7:sucre /  
 8:confiserie / 9:boulangerie / 10:épices et saveurs / 11:aliments  
 diététiques

<b>Enzymes</b>	<b>Micro-organismes producteurs</b>	<b>Applications</b>
Alpha amylase	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus delemar</i>	<b>3/5/6/7/8/9</b>
Glucose isomérase	<i>Streptomyces albus</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i> <i>Bacillus coagulans</i>	<b>5/6/7</b>
Invertase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Aspergillus usarii</i>	<b>7/8</b>
Lactase	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyceslactis</i>	<b>1/2/4/11</b>
Lipase	<i>Mucor javanicus</i> <i>Lucor mihei</i> <i>Rhizopus arrhizus</i> <i>Aspergillus effusus</i>	<b>2/3</b>
Pectinestérase, Pectine lyase, Polygalacturonase	<i>Aspergillus usarii</i> <i>Aspergillus wentii</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium funiculosum</i>	<b>3/6/10</b>
Protéase	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor mihei</i> <i>Mucor pusillus</i>	<b>1/9</b>

- *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis* produisent environ 50% de l'ensemble des enzymes de fermentation.
- *Aspergillus oryzae* produit environ 30% de l'ensemble des enzymes de fermentation.

Pour la production d'une enzyme industrielle, le choix de la souche appropriée est déterminant, surtout dans la majorité des cas ce sont les applications à des fins alimentaires qui ont connu un développement significatif.

Il s'agit donc principalement de satisfaire les épreuves toxicologiques imposées par les réglementations nationales. Sinon, dans les secteurs non alimentaires (chimie, diagnostic, analyses diverses...), le choix des souches n'est pas soumis aux mêmes contraintes.

De façon générale, les micro-organismes sont sélectionnés selon les principaux critères suivants:

- fournir une bonne production d'enzymes
- En un minimum de temps
- les enzymes extra-cellulaires (généralement des hydrolases) sont préférables aux endo-cellulaires (dont l'extraction est difficile à réaliser).
- La souche doit pouvoir se développer sur des substrats "bon marché".

### 3 – 1 – 2 – Les milieux de production:

Ce sont soit des milieux synthétiques ou complexes. Les substrats contenus dans ces milieux de production figurent sur le tableau suivant:

<b>Substrats</b>	<b>Exemples</b>
Source de carbone et d'énergie	Farine de céréales, farine de soja, amidons de maïs, de pomme de terre, son de blé ou de riz...ainsi que les sous produits tels le lactosérum et les mélasses.
Source d'azote (organique)	Farines de poisson, gélatine, caséine, farine de soja, son, coton, maïs et arachide, Corn steep (obtenu à partir des eaux de trempage du maïs).
Sels minéraux et substances de croissance exigées	Extrait de levure, Corn-steep, huiles végétales, farines de graines oléagineuses

Les matières premières apportant les éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, vitamines...) sont choisies en fonction de:

- La compatibilité avec les réglementations en vigueur (absence d'antiseptiques, d'antibiotiques, de pesticides, de métaux lourds....).
- L'approvisionnement stable en quantité et en qualité.
- Coût aussi peu élevé que possible.

Outre l'équilibre nutritionnel, l'autre point critique concerne la stérilisation. La pureté de la culture devant être maintenue jusqu'au moment de la récolte. La stérilisation (par traitement thermique) ne doit pas provoquer l'apparition de produits défavorables à la croissance et à la synthèse (réaction de Maillard).

Deux exemples de composition (en g/l) des milieux utilisés pour la production de l'alpha-amylase fongique (**A**) et la protéase de *Bacillus* (**B**) sont donnés dans le tableau ci-dessous:

<b>A</b>		<b>B</b>	
Amidon de maïs	24	Hydrolysate d'amidon	50
Corn steep	36	Farine de soja	20
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	47	Caséine	20
CaCl <sub>2</sub>	01	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.3
KCl	0.2		
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.2		

### **3 – 1 – 3 – Conduite de la fermentation:**

Les fermenteurs utilisés atteignent des volumes de 100 à 200 m<sup>3</sup>. Suivant les enzymes et les procédés, la fermentation dure de 30 à 150 heures. Elle se fait dans un milieu riche, fortement aéré et agité où les paramètres physico-chimiques sont régulés en continu: oxygène dissous, pH, température (les fermenteurs doivent être refroidis), moussage (réduit par

l'addition d'antimousse sous forme de composés à base d'huile animale, ou végétale et de silicones).

De plus, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers, et d'autres paramètres physiologiques méritent d'être également régulés. Aussi dans certaines réactions, il faut un inducteur, dans d'autres, il faut éviter la présence de métabolites répresseurs en début ou leur apparition en cours de fermentation.

*L'induction:*

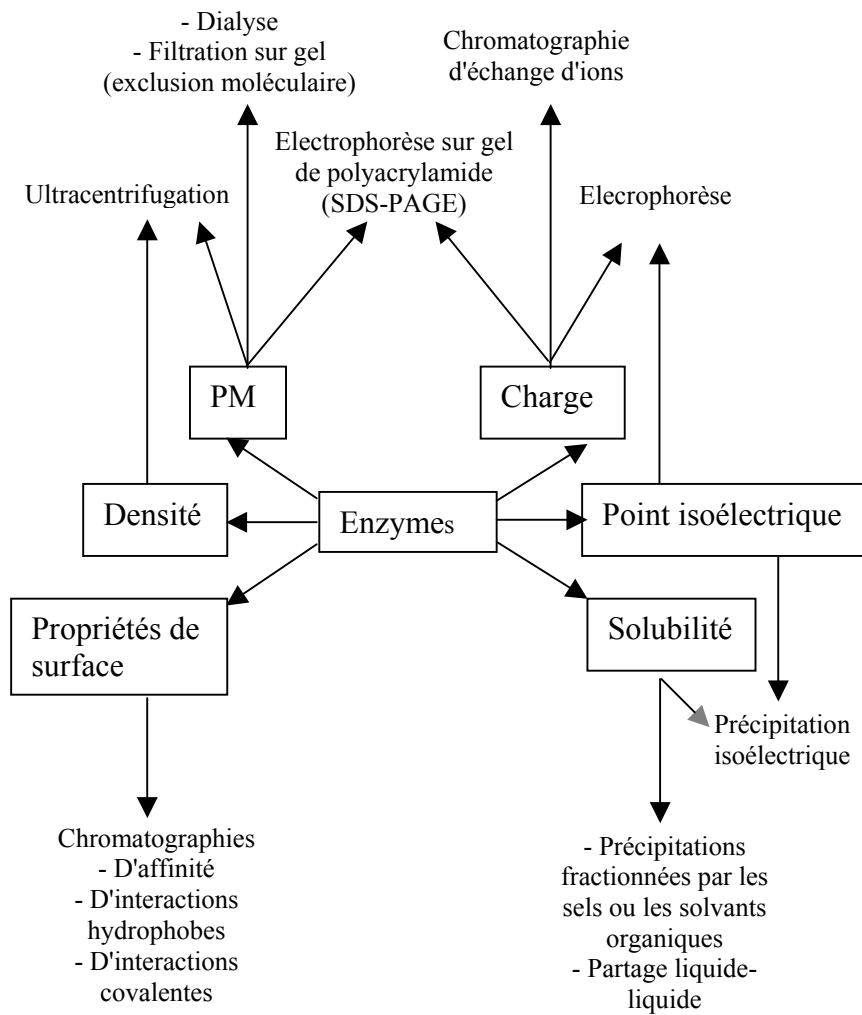
- Les inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase, le xylose pour la xylose isomérase ...)
- Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: cellobiose pour les cellulases).
- Un effet inducteur est très souvent démontré par des analogues de substrats (exemple: isopropyl-béta-D-thiogalactoside qui est l'analogue du lactose pour la  $\beta$ -galactosidase).
- Les co-enzymes peuvent aussi avoir un effet inducteur (exemple: la thiamine augmente la production de la pyruvate carboxylase).
- Les produits de la réaction enzymatique peuvent agir comme inducteurs (exemple: maltodextrine pour l' $\alpha$ -amylase, maltose pour la pullulanase).

*La répression catabolique:* De fortes concentrations en sucres rapidement assimilables peuvent entraîner la répression de la synthèse de l'enzyme.

- Le glucose, le cellobiose, le glycérol, l'amidon répriment la cellulase de *Trichoderma viridae*.
- Le glucose inhibe la synthèse de l'invertase par *Aspergillus nidulans*.
- La synthèse de polygalacturonases par *Aspergillus niger* est inhibée par le glucose et l'acide galacturonique.
- Le glucose et l'arabinose inhibent la synthèse de la pectine transéliminase de *Penicillium expansum*.

### **3 – 1 – 4 – Extraction et purification des enzymes :**

Dès que la fermentation est terminée, la culture est refroidie entre 3 et 5°C. Les enzymes doivent alors être séparées des cellules et du milieu (centrifugation ou filtration); dans le cas des enzymes endocellulaires, la récupération est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes (atomisation ou utilisation du tween 80 et le triton X100). Enfin, les enzymes sont traitées (voir figure 21) de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités.



**Fig. 21: Différentes techniques de séparation et de purification des enzymes selon leur propriétés globales**



Il y a un intérêt évident à utiliser des préparations aussi concentrées que possible en activité enzymatique, surtout dans le secteur alimentaire. Les substances contaminantes qui accompagnent obligatoirement ces préparations sont alors introduites en faible proportion dans les aliments.

Malgré tout, et au cours de la préparation des enzymes fongiques, le risque de production des mycotoxines (ex. les aflatoxines: inducteurs des tumeurs du foie) ne peut être entièrement éliminé. Il en est de même pour les métaux lourds et l'arsenic, dont les teneurs sont limitées par les prescriptions réglementaires.

Sans compter que l'industrie de préparation des enzymes en poudre a dû prendre des mesures pour pallier aux divers inconvénients que causent les enzymes elles mêmes au personnel qui les manipulent. En effet, la poudre d'enzymes protéolytiques (capables de dégrader beaucoup de molécules qui constituent la matière vivante) peut produire des irritations au niveau des muqueuses, des yeux, de la bouche, des voies respiratoires...etc., ainsi que l'apparition de réactions allergiques. Pour pallier à ce problème, les enzymes sont mélangées à des produits tels que le PEG fondu à 50-70°C et granulées sous forme de petites sphères dépourvues de poussières.

Ainsi, l'utilisation des enzymes pour transformer des aliments est soumise à des autorisations émanant des

organismes internationaux: Codex Alimentaire de la FAO-OMS et commissions spécialisées de la CEE.

### **3 – 2 – LES VITAMINES:**

#### **3 – 2 – 1 – Définition et classification:**

les vitamines sont des substances organiques actives, vitales, indispensables en infime quantité à la croissance et au bon fonctionnement de l'organisme. Elles se subdivisent en deux classes:

##### **Les vitamines hydrosolubles:**

- Thiamine (B1): anti-béribérique, vitamine du système nerveux.
- Riboflavine (B2): vitamine de l'énergie et des crampes musculaires.
- Niacine (B3 ou PP) ou nicotinamide: anti-pellagreuse ("Pellagre Preventing").
- Acide pantothénique (B5): vitamine de la peau et des cheveux.
- Pyridoxine (B6): régularise le métabolisme des acides aminés et des protéines.
- Biotine (B8): vitamine de la peau et des cheveux.
- Acide folique (B9): anti-anémique.
- Acide ascorbique (C): sert à la défense de l'organisme.

##### **Les vitamines liposolubles:**

- Rétinol (A): vitamine de la croissance et de la vue.
- Calciférol (D): vitamine du squelette.

- Tocophérol (E): vitamine de la fécondité.
- Phylloquinone (K): vitamine anti-hémorragique.

### **3 – 2 – 2 – Source et importance:**

La découverte des sources vitaminiques naturelles, aliments végétaux et micro-organismes de notre flore intestinale, puis la synthèse chimique de bon nombre de vitamines, incorporées dans les divers produits de la ration alimentaire, ont rapidement porté remède aux maladies par carence.

Alors est apparu, au moins pour certaines vitamines, le risque d'hypervitaminose en raison de la disponibilité des vitamines synthétiques. Par ailleurs, l'évolution des comportements alimentaires, et notamment la diminution de la consommation d'aliments végétaux, les excès de produits antiphysiologiques tels que l'alcool, le tabac, les contraceptifs hormonaux oraux, a entraîné des risques spécifiques de carences vitaminiques.

L'importance métabolique des vitamines est observée en portant l'attention sur les cofacteurs des réactions intermédiaires successives. En effet, les coenzymes en jeu dans ces réactions sont très généralement des dérivés des vitamines, qui en sont les précurseurs. Il s'agit des vitamines dites du groupe B, vitamines hydrosolubles dont les dérivés opèrent généralement dans le cytosol de la cellule.

Au contraire, les dérivés des vitamines liposolubles (A, D,

E, K), insolubles en phase aqueuse, opèrent plutôt en surface ou en profondeur des structures membranaires lipidiques du réticulum endoplasmique des mitochondries et de la membrane plasmique de la cellule.

### **3 – 2 – 3 – Production:**

Presque tous les micro-organismes sont capables d'effectuer la synthèse des vitamines hydrosolubles ou liposolubles. Mais, leur production étant très faible et ces facteurs ne s'accumulant pas dans le milieu de culture, l'industrie de synthèse chimique prend la relève.

Par ailleurs, on peut constater actuellement que les levures (*Torula utilis*; Levure de Boulanger et Levure de bière) constituent une source avantageuse d'un mélange de vitamines hydrosolubles (B1, B2, B3, B5, B8, B9) appelé "complexe B" et utilisé par l'industrie pharmaceutique humaine et vétérinaire. Outre les levures, d'autres micro-organismes présentent aussi la propriété de produire des mélanges de diverses vitamines du groupe B tels: *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megatherium* et *Aspergillus aerogenes*.

Pour la plupart des vitamines, la production par voie microbiologique est associée à l'adjonction au milieu de culture de précurseurs.

En voici quelques exemples:

- Pyrimidine + thiazol levures → **thiamine**.
- Béta-alanine micro-organismes → **acide pantothénique**.

- Béta-ionone  $\xrightarrow{\text{Blakeslea trispora}}$  **béta-carotène** (précurseur de la vitamine A).

- Le processus industriel de la synthèse de la vitamine C, nécessitant une étape microbiologique, se fait selon les étapes suivantes:

D-glucose  $\xrightarrow{\text{réduction}}$  D-sorbitol  $\xrightarrow{\text{oxydation par } \textit{Acetobacter suboxydans}}$   
L-sorbose  $\xrightarrow{\text{oxydation et transformation chimique}}$  **acide L-ascorbique.**

\* **Exemple de la vitamine B12:** cobalamine (aide à la formation des globules rouges).

Le milieu de culture utilisé pour la production industrielle de cette vitamine est composé essentiellement:

- D'une source de carbone (Glucose ou mélasses de betterave ou de citrus).
- D'une source d'azote (farines de poisson, corn steep, hydrolysate de caséine...).
- D'un tampon (CaCO<sub>3</sub>).
- D'une source de cobalt (CoCl<sub>2</sub>).
- D'un précurseur: 5', 6-diméthylbenzimidazol.

La fermentation se déroule à 27°C, pendant 3 jours, avec agitation et aération. Par la suite, le mycélium est séparé par centrifugation, et remis en suspension. La vitamine est extraite soit par choc thermique ou par acidification (sulfite de sodium). Dans ces conditions, la vitamine B12 est libérée. Un concentré de cette vitamine est préparé après filtration et séchage (75 mg de B12 sont obtenus pour un Kg de milieu utilisé).

Le tableau 21 donne quelques exemples de ces vitamines d'origine microbienne.

**Tab. 21: Exemples de vitamines produites par les micro-organismes**

<b>Vitamines</b>	<b>Micro-organismes producteurs</b>
A	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Rhodotorula gracilis</i> <i>Dunaliella sp.</i>
B1	<i>Ashbya gossypii</i> <i>Torula utilis</i> <i>Sacharomyces cerevisiae</i> <i>Eremothecium ashbyii</i>
B2	<i>Clostridium acetobutylium</i> <i>Ashbya gossypii</i> <i>Eremothecium ashbyii</i> <i>Pichia miso</i>
B12	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Propionibacterium shermanii</i>
D	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus niger</i>
E	<i>Euglena gracilis</i>

### **3 – 2 – 4 – Utilisations:**

Les vitamines sont utilisées dans divers domaines:

- Industrie pharmaceutique: elles sont utilisées comme agents curatifs et préventifs essentiellement dans les cas de carences alimentaires.

- Industrie alimentaire: elles sont adjointes aux produits alimentaires en tant qu'additifs, ou en tant que supplément dans l'alimentation des animaux domestiques favorisant l'accroissement de la production de lait, d'œufs ou de viande.
- Industrie cosmétique: elles sont incorporées à certains produits (pommades et shampoings) pour leur multiple propriétés (contre l'apparition des rides ou la chute de cheveux: vit A, B1, B8...).
- Autres: Les vitamines peuvent aussi être adjointes aux milieux de culture dans les fermenteurs, ou servir dans la fabrication des kits de réactifs de dosage enzymatique nécessitant l'intervention de coenzymes.

### **3 – 3 – LES ANTIBIOTIQUES:**

#### **3 – 3 – 1 – Définition et classification:**

L'antibiotique est une substance naturelle ou synthétique, ayant la propriété d'inhiber les systèmes biochimiques indispensables à la vie, la croissance et à la reproduction des bactéries et autres micro-organismes (champignons, levures...) [action bactériostatique]; L'antibiotique peut également détruire ces micro-organismes [action bactéricide].

Les antibiotiques sont produits par les micro-organismes vivants les plus variés, mais surtout par des champignons inférieurs, et sont inefficaces contre les parasites endocellulaires.

Ces molécules naturels sont classées selon leur origine, nature chimique, mécanisme d'action et spectre d'action, on distingue:

- **Les Béta lactamines** (dérivés de deux acides aminés): il s'agit de bactéricides à faible toxicité (ex: Pénicilline, Céphalosporines ...).
- **Les Aminosides** (oligosaccharides aminés): il s'agit de bactéricides ayant une toxicité sur le rein et l'oreille interne (ex: Streptomycine, Gentamycine...).
- **Les Macrolides** il s'agit de bactériostatiques à faible toxicité (ex: Erythromycine, Spiramycine...).
- **Les Polypeptides**: il s'agit de bactéricides ayant une toxicité sur le rein et le système nerveux (ex: Bacitracine, Polymyxine...).
- **Les Dérivés d'un seul acide aminé**: il s'agit de bactériostatique ayant une toxicité sur la moelle osseuse (ex: Chloramphénicol, Cyclosérine...).
- **Les Composés comportant des cycles**: ex: Tétracyclines (bactériostatique ayant une toxicité sur le foie) ; ex: Actinomycines, Novobiocine...
- **Autres**: analogues de structure voisins de nucléosides (ex: Puromycine); structures comportant des systèmes polyéniques conjugués (ex: Nystatine); ainsi que la rifamycine, la vancomycine, et les sulfamides ...



### **3 – 3 – 2 – Activité et mécanisme d'action:**

Chacune de ces substances agit électivement sur un groupe déterminé de germes (spectre d'activité), cette activité pouvant d'ailleurs diminuer, pour un germe donné, par suite d'une sorte d'accoutumance de celui-ci (résistance). Il est possible de titrer l'activité des antibiotiques sur un germe pathogène par diverses méthodes, ce qui permet de conduire le traitement d'une maladie infectieuse (antibiogramme).

L'activité bactérienne s'exerce à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques ou d'un équilibre physico-chimique. Les antibiotiques agissent soit sur une cible unique, soit sur de multiples cibles à la fois.

On distingue:

- Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne; par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (porines), ou par inhibition des autolysines et épaissement de la paroi par production accrue de peptidoglycane. Ex: bêta lactamines, vancomycine, bacitracine et cyclosérine.
- Les antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique; en entraînant une désorganisation, une fuite et une lyse cellulaire. Ex: polymyxines.
- Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques; en inhibant l'ADN gyrase (biosynthèse de l'ADN bactérien); ou en

inhibant la transcription de l'ADN bactérien. Ex: rifampicine, novobiocine.

- Les antibiotiques perturbant la synthèse protéique; en bloquant le stade d'initiation et d'élongation de la chaîne. Ex: tétracyclines, chloramphénicol, aminosides, macrolides.

- Les antibiotiques inhibant d'autres systèmes enzymatiques. Ex: sulfamides.

### **3 – 3 – 3 – Production:**

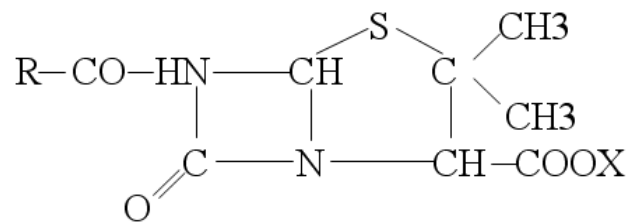
Les antibiotiques peuvent être obtenus par fermentation (voir tableau 22) ou alors par hémisynthèse. Ex: l'ampicilline est une pénicilline G à plus large spectre obtenue par hémisynthèse; le chloramphénicol est le seul antibiotique à être produit par synthèse totale d'une façon rentable).

L'hémisynthèse a pour but de fournir sans cesse de nouveaux produits pour remplacer ceux qui sont devenus inactifs du fait des résistances opposées par certains micro-organismes (suite à l'usage intempestif en thérapeutique humaine ou comme additif alimentaire pour le bétail) ou ceux qui ont montré, à la longue, des effets secondaires indésirables (réactions d'hypersensibilité, néphrotoxicité et audiotoxicité, perturbation de la flore intestinale par tous les antibiotiques absorbés par voie buccale).

**Tab. 22: Quelques antibiotiques de source microbienne produits industriellement**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Micro-organismes producteurs</b>
Aminosidine	<i>Streptomyces sp.</i>
Bacitracine	<i>Bacillus subtilis</i>
Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Gentamycine	<i>Micromonospora purpurea</i>
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Polymyxine B	<i>Aerobacillus polymyxa</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>

**Exemple de production de la pénicilline:**



Cet antibiotique peut être produit par de nombreuses espèces de *Penicillium* (dont *P. notatum*), ainsi que celles appartenant au genre *Aspergillus*. Toutes les pénicillines (G, X, K...) comportent une molécule d'acide 6 amino pénicillinique et elles ne diffèrent que par la constitution de la chaîne latérale.

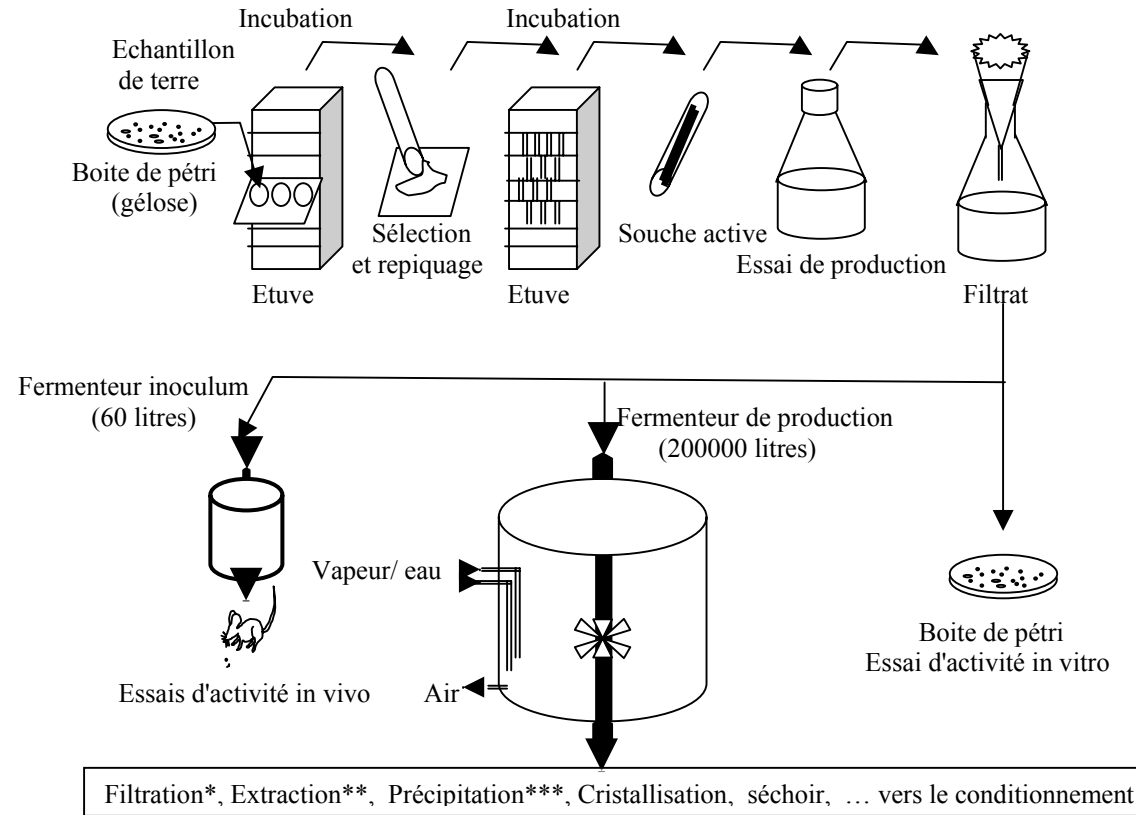
La souche *P. chrysogenum* Q 176 (hautement productrice) est capable de fournir des taux élevés de pénicilline, et présente l'avantage de ne pas produire de pigment jaune indésirable (chrysogénine) qui complique les opérations d'extraction. Ces souches sont conservées pendant des années sous forme de suspension de spores lyophilisées ou de culture sur sol séché. Les milieux de culture industriels (pH après stérilisation = 6) contiennent:

- Une source d'azote: le Corn Steep (3.5 %).
- Pour la croissance et production: du lactose (3.5%) et du glucose (1%).
- Pour l'effet tampon: du carbonate de calcium (1%) et du phosphate monopotassique (0.4%).

Il est souvent rajouté à ce milieu, des silicones (huiles végétales) utilisés comme source d'énergie et surtout comme agents tensio-actifs anti-mousses. Car la fabrication de la pénicilline exige une aération énergique aboutissant à la formation d'une mousse très abondante et qui risque de déborder des fermenteurs. Un nombre important d'antibiotiques sont préparés industriellement dans des fermenteurs (voir figure 22).

Les qualités que doit présenter un nouvel antibiotique, en vue d'une utilisation médicale, outre une activité convenable à large spectre et une production rentable donc un prix de revient raisonnable:

- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme;
- Absence de toxicité;
- Stabilité;
- Bonne tolérance;
- Solubilité dans l'eau à pH acceptable;
- Absence de pyrogènes et de composés histaminiques;
- Absence d'effets secondaires sur la cellule (tératogène), sur le sérum, les hématies (hémolyse), les leucocytes...



**Fig. 22: Préparation industrielle d'un antibiotique d'origine fongique.**

\* sépare le corps microbien du milieu fermenté/ \*\* adsorption sur résines échangeuses d'ions, ou par solvants/ \*\*\* sels

### **3 – 3 – 4 – Utilisations:**

En plus de l'usage médical connu, les antibiotiques sont utilisés soit:

- En biologie moléculaire, les antibiotiques représentant un outil de choix pour les recherches de biochimie pure (mode de formation des parois, duplication de l'ADN, transcription, biosynthèse des protéines...).
- En nutrition animale: utilisés comme additifs, les antibiotiques favorisent la croissance et l'augmentation du poids chez les jeunes animaux et ont un effet prophylactique contre diverses maladies infectieuses. (ex: pénicilline dans l'alimentation du poulet, la tétracycline dans l'alimentation du veau). Cette utilisation peut entraîner l'apparition de résistances aux antibiotiques administrés aux animaux, ou même de réaction d'hypersensibilité chez les personnes qui consomment de la viande ou du lait contenant des antibiotiques.
- En nutrition humaine, et plus exactement pour la conservation des denrées alimentaires (essentiellement aux Etats-Unis et au Japon). Ex: la tétracycline (1 à 5 ppm) incorporée dans la glace destinée à conserver le poisson ou les viandes; la nisine utilisée en fromagerie contre les parasites *Clostridia*.
- Dans le traitement des maladies des plantes: prévention contre certaines parasitoses végétales sous forme de

pulvérisation (spray). Ex: streptomycine, tétracyclines, cycloheximidine.

- Dans d'autres domaines, comme la conservation de certains produits industriels: le papier, les tissus, le cuir, les peintures, trop souvent sujets aux destructions par les micro-organismes (surtout les fungi).

### **3 – 4 – CULTURE DE BIOMASSE:**

#### **3 – 4 – 1 – Définition de la biomasse:**

Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture (animaux, végétaux ou microbiens). La biomasse microbienne est aussi appelée "Single Cell Protein" (SCP) ou protéines d'organismes unicellulaire (POU). Cette biomasse microbienne peut être une source de protéines pour l'alimentation humaine ou animale (servant de complémentarité des produits céréaliers) voir tableau 23.

#### **3 – 4 – 2 – Micro-organismes:**

Selon les substances assimilées par les micro-organismes (bactéries, levures et champignons) en tant que source de carbone, on distingue:

- Les micro-organismes assimilant le CO<sub>2</sub> : telles les algues unicellulaires du genre *Chlorella*.
- Les micro-organismes assimilant le méthane ou le méthanol: tels *Pseudomonas spp.* et *Methylomonas clara*.
- Les micro-organismes assimilant l'éthanol: tel *Candida utilis*.



**Tab. 23 : Représente la composition en g/100g de poids sec  
des organismes cellulaires sélectionnés**

<b>Micro-organismes</b>	<b>Substrats</b>	<b>Azote</b>	<b>Protéines</b>	<b>Lipides</b>	<b>Glucides</b>
<i>Chlorella sorokiniana</i>	CO2	9.6	60	8	22
<i>Agaricus campestris</i>	Glucose	-	36	3	49
<i>Candida utilis</i>	Ethanol	8.3	52	7	-
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lacto-sérum	9	54	6.1	-
<i>Fusarium graminearum</i>	Amidon	-	54	1	-

- Les micro-organismes assimilant les glucides : tels *Candida utilis* sur les pentoses, *Aspergillus niger* sur les hexoses ...etc.

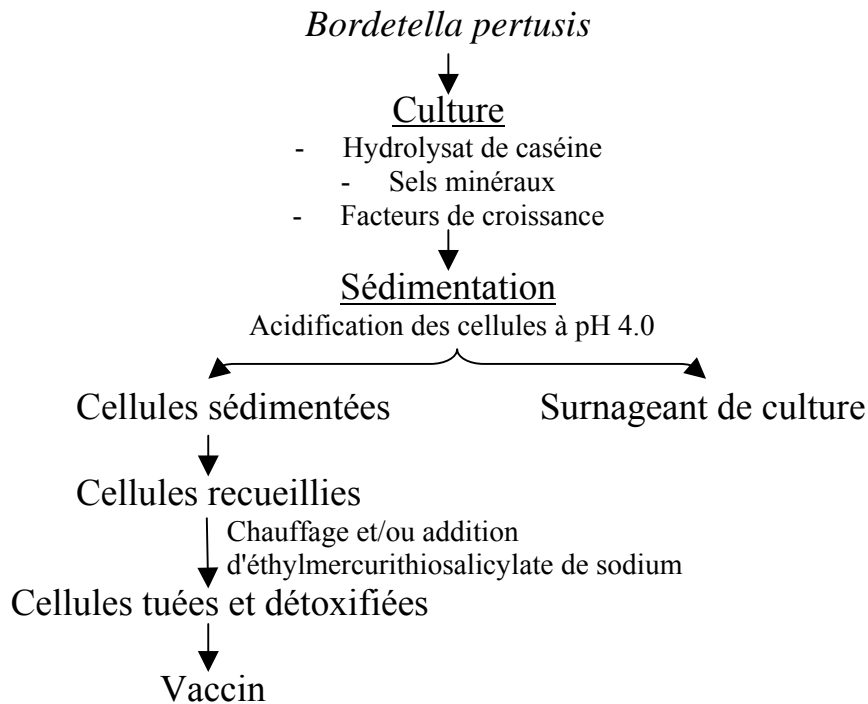
### **3 – 4 – 3 – Objectifs de l'utilisation de la biomasse:**

Parmi les objectifs poursuivis par la culture de biomasse microbienne:

- L'augmentation de la productivité en **protéines** (les bactéries méthylophiles comme *Methylophilus methylotrophus*, cultivées sur méthane ou méthanol fournissent des protéines utilisées dans l'alimentation du bétail).
- L'intensification de la dégradation de la lignocellulose et la production de métabolites primaires tels les **acides aminés** dont 66% est utilisé en nutrition humaine (ex. le glutamate, la lysine et le tryptophane produits par les bactéries des genres *Corynebacterium* et *Brevibacterium*), les **acides organiques** (exemples: acide acétique par *Acetobacter liquefaciens*, acide lactique par *Lactobacillus bulgaricus*, acide citrique par *Aspergillus niger*).
- La production de **bio-insecticides**: certains *Bacillus* produisent des substances toxiques pour d'autres types d'êtres vivants. Ainsi *Bacillus thuringiensis* est pathogène pour les larves de certains insectes, de papillons (chenilles). Les bacilles en voie de sporulation produisent une protéine qui forme une inclusion cristalline bien visible au microscope. Cette protéine est toxique pour les larves. Les

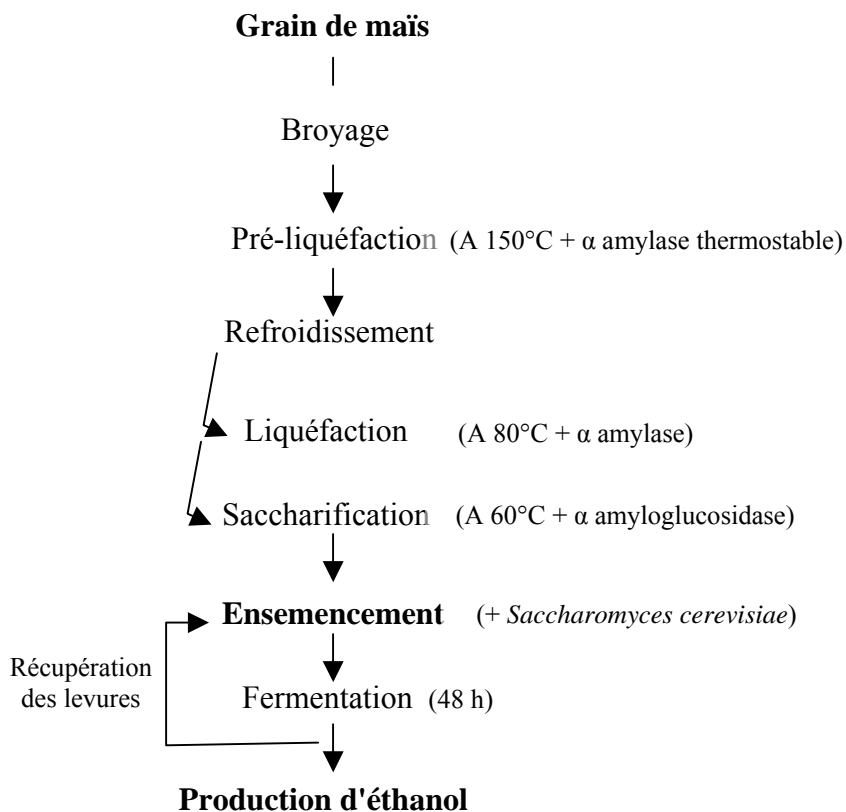
bacilles cultivés à grande échelle, récoltés après le début de la sporulation, séchés sont incorporés aux poudres de protection des récoltes des arbres.

- La fabrication de **vaccins** sous forme de cellules microbiennes vivantes rendues virulentes par atténuation (exemple de *Bordetella pertusis*, agent de la coqueluche, voir figure 23).



**Fig. 23: Production de cellules de *Bordetella pertusis* atténuées (vaccin de la coqueluche)**

- La production d'**alcools**: c'est ainsi que la production fermentaire de l'éthanol permet de pousser sa purification de manière à obtenir un produit utilisable comme solvant ou comme matière première de l'industrie chimique et ce en utilisant des organismes unicellulaires tels: *Saccharomyces cerevisiae* (voir figure 24).
- La production de **pigments** ...etc.



**Fig. 24: Procédé de production d'éthanol à partir des grains de maïs en utilisant *Saccharomyces cerevisiae***

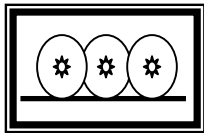
## Chapitre 4 – ENZYMOLOGIE APPLIQUEE:

### 4 – 1 – LES ENZYMES IMMOBILISEES ET LEUR INTERÊT:

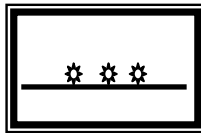
Pour utiliser les enzymes en biotechnologie, il est nécessaire de les immobiliser artificiellement. Ce sont certains groupements chimiques réactifs dans leur structure protéique qui sont accessibles (OH, COOH, NH<sub>2</sub>, SH ...) et vont permettre leur fixation. Ainsi immobilisées, sur des supports solubles ou insolubles, ces catalyseurs offrent la possibilité d'une utilisation répétée dans des domaines très variés.

#### 4 – 1 – 1 – Méthodes d'immobilisation des enzymes:

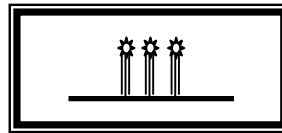
Les méthodes d'immobilisation des enzymes ( ✱ ) sont au nombre de trois:



"L'inclusion"

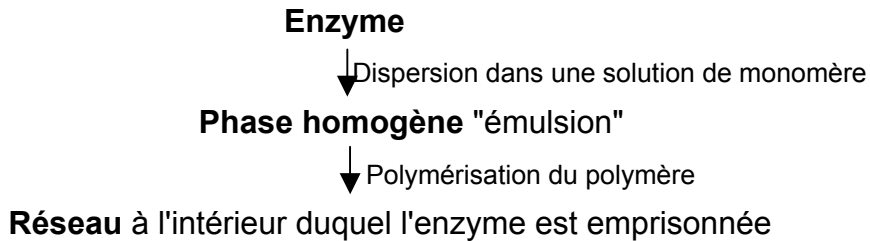


"L'adsorption"



"Par liaisons covalentes"

**A/ L'inclusion:** il s'agit de retenir l'enzyme à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice, schématisé comme suit:



Les matières les plus utilisées sont les gels: de polyacrylamide, d'alginate, d'amidon, de carraghénanes; les fibres de polyacétate de cellulose et les microcapsules de nylon. Cette méthode présente un certain nombre d'avantages et d'inconvénients présentés dans le tableau ci-dessous:

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Elle permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de l'enzyme</li><li>- Elle ne présente aucun caractère de spécificité et est applicable à n'importe quelle enzyme.</li><li>- Elle ne met pas en jeu les groupements actifs de l'enzyme.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- La localisation de l'enzyme à l'intérieur du polymère pose des problèmes stériques (efficacité limitée par accès délicat du substrat vers l'enzyme et du produit en dehors du polymère).- Les conditions de polymérisation (ex.:pH élevé) peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme.</li></ul>

**B/ L'adsorption:** il s'agit de retenir l'enzyme à la surface d'un support insoluble, par l'intermédiaire d'interactions de type secondaire (Interactions électrostatiques de Van Der Waals, Interactions hydrophobes, liaisons hydrogène ...). Les matières utilisées sont organiques (collagène, échangeurs d'ions: CM et DEAE cellulose, albumine, chitine, dextrane, amidon) ou minérales (argiles, verre et silice poreux ...). Les avantages et inconvénients majeurs de cette méthode sont :

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
- L'adsorption est facile à mettre en œuvre, il suffit de mettre en contact l'enzyme et le support.	- Vu que les liaisons sont de type non covalent, il y a risque de désorption de l'enzyme.

**C/ L'immobilisation par liaison covalente :** Il s'agit d'établir des liaisons covalentes entre l'enzyme et le support utilisé, tout en préservant l'activité catalytique de l'enzyme. Les principaux supports utilisés sont les suivants:

- Polysides (dextrane, agarose, cellulose).
- Protéine (collagène).
- Polymères synthétiques (polyacrylamide).
- Silice et verre poreux.

Les tableaux suivants représentent respectivement les méthodes d'activation selon les supports utilisés et les avantages ainsi que les inconvénients de cette méthode.

Groupe fonctionnel		Méthode d'activation
Enzyme	Support	
NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>	Glutaraldéhyde
NH <sub>2</sub>	COOH	Azoture carbodiimide
NH <sub>2</sub>	OH	Bromure de cyanogène
SH	SH	Pont dissulfure

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- solidité de la liaison enzyme-substrat.</li> <li>- L'établissement de pontage entre les molécules d'enzymes leur confère une résistance aux facteurs dénaturants.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- L'immobilisation est plus complexe à réaliser (choix des groupements à activer...).</li> <li>- Les quantités d'enzymes immobilisées sont inférieures par rapport aux deux précédentes méthodes.</li> </ul>



#### **4 – 1 – 2 – Propriétés des enzymes immobilisées:**

On peut citer trois principales propriétés des enzymes immobilisées:

- A/ stabilité et résistance aux conditions du milieu (pH, t°, acidité, ...).
- B/ activité catalytique préservée (site actif bien orienté).
- C/ fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme.

#### **4 – 1 – 3 – Domaines d'applications:**

Grâce à leur grande spécificité d'action (biospécificité), les enzymes constituent un outil de fabrication et d'analyse irremplaçable dans de nombreux secteurs de la recherche, du contrôle et de la production industrielle de métabolites.

##### **Analytique:**

- En médecine, des papiers imprégnés de solutions enzymatiques sont utilisés dans certains tests cliniques (dosage du cholestérol, de l'acide urique, des hormones...).
- Les techniques ELISA utilisent également des enzymes fixées (liées à des anticorps eux-mêmes fixés par adsorption sur les parois de petites cuvettes en plastiques), destinées à des dosages cliniques.

### **Thérapeutique:**

- Le traitement de certains troubles pathologiques (dus à une déficience enzymatique) par l'administration d'enzymes se heurte à des difficultés: destruction par les protéases ou capture et hydrolyse par les macrophages. Pour y remédier, l'enzyme est associée à une molécule protectrice (albumine, dextrane, polyéthylène glycol), ou alors incluse dans des microcapsules ou des globules rouges.

### **Synthèse chimique:**

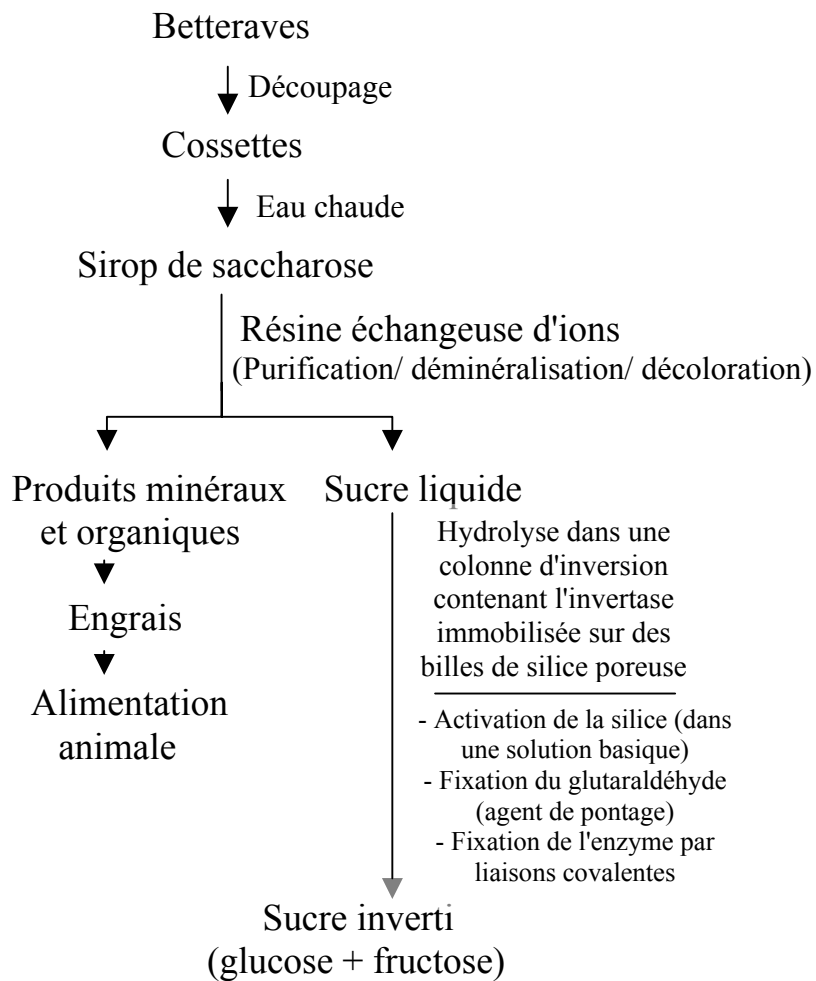
- Il s'agit essentiellement d'unités de fabrication de substances pharmaceutiques: acides aminés, acides organiques, antibiotiques, hormones stéroïdes.... Ainsi, la L aminoacylase extraite d'*Aspergillus oryzae* est fixée par liaisons ioniques sur DEAE Sephadex et utilisée pour la production en continu de la L aminoacide (comme la L mét, la L Ala, L Phe, L Trp, L Val...).

### **Agro-alimentaire:**

- Glucoserie: l' $\alpha$ -amylase fongique transforme l'amidon en sirop sucrant.
- Industrie laitière: la lactase fongique ou de levures transforme le lactose du lait ou du lactosérum en glucose et galactose.
- Sucre interverti: l'invertase de levure produit un sucre interverti ayant un pouvoir sucrant plus élevé et qui cristallise

moins. Aux Etats-Unis, d'importantes quantités de sirops de fructose et glucose sont préparées par voie enzymatique à partir d'amidon de maïs. Le mélange obtenu, l'isoglucose, présente des avantages par rapport aux solutions de saccharose: la solubilité élevée du fructose permet, notamment, de préparer des sirops très concentrés, ne présentant pas de phénomènes de cristallisation.

L'hydrolyse du saccharose permet de produire un sirop équivalent à l'isoglucose (contenant 42% de fructose), utilisé comme édulcorant en biscuiterie, pâtisserie, glaces, boissons, ou pharmacie. Cette hydrolyse peut se faire soit par voie chimique acide, soit par voie enzymatique, à l'aide de l'invertase. Dans ce dernier cas, on évite la formation de produits d'oxydation colorés, qui sont obtenus lorsque l'hydrolyse est effectuée par voie acide, nécessitant un traitement ultérieur des sirops, voir figure 25.



**Fig. 25: Procédé de transformation du sirop de saccharose en sucre inverti en utilisant l'invertase immobilisée**

#### **4 – 1 – 4 – Réacteurs enzymatiques:**

L'enzyme fixée à un support peut très facilement être récupérée en fin de réaction et être réemployée plusieurs fois et même fonctionner en continu dans des installations industrielles appelées "réacteurs enzymatiques". Les divers types de réacteurs employés en génie chimique sont également utilisables en génie biochimique avec toutefois des différences de fonctionnement : température ne dépassant pas 70 – 80 °C, pression normale et milieu stérile.

Dès lors que la manipulation s'effectue à une autre échelle que celle du laboratoire, les problèmes posés deviennent très originaux. Le choix du réacteur dépend, en fait, du type de réaction, du support et de l'utilisation désirée.

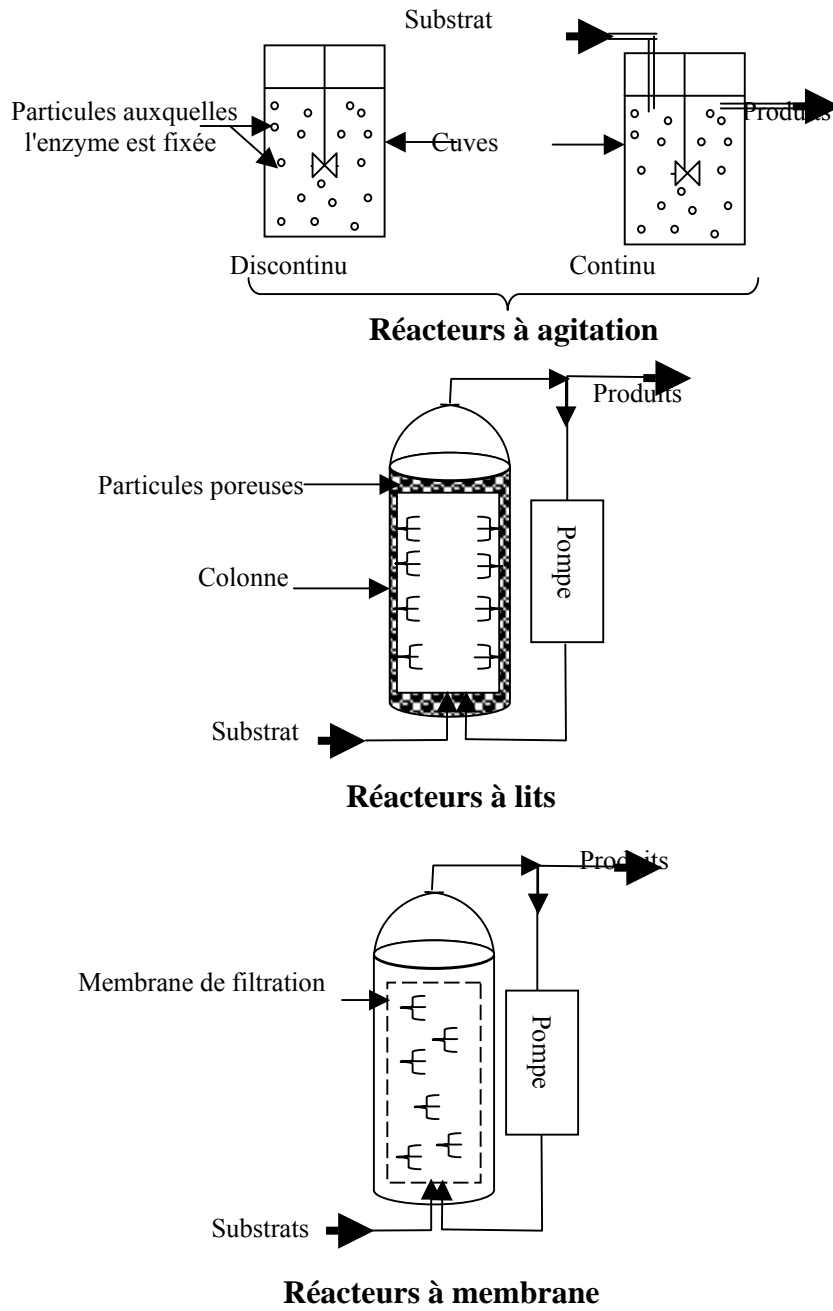
Dans un premier type de réacteur, les enzymes insolubilisées, attachées à des particules, sont brassées dans le substrat. Cette technologie primitive, utilisée dans les industries agro-alimentaires, est simplement dérivée de celles utilisées pour les enzymes solubles. La récupération de l'enzyme insoluble reste délicate et s'opère au prix de grandes pertes. Aussi cette technique est-elle peu utilisée.

Les autres types de réacteurs reposent sur le passage lent du substrat, à une vitesse déterminée par l'expérience, au travers d'une colonne d'enzyme immobilisée. Essentiellement, le produit de réaction circule X fois à travers la même colonne,

jusqu'à l'obtention du rendement adéquat. De ce fait, le problème de la couche non agitée le long du support solide est atténué.

Une variante technique consiste à ultrafiltrer en permanence, le long d'une membrane semi-perméable, les produits de la réaction, l'enzyme insolubilisée restant à l'intérieur du réacteur. Diverses variantes existent, qui ont toutes en commun que le substrat est soustrait et que l'enzyme n'a pas à être récupérée, parce qu'elle est isolée du reste du processus dans une colonne ou dans un réacteur spécifique.

Ces trois types de réacteurs sont schématisés dans la figure 26.



**Fig. 26: Types de réacteurs enzymatiques.**  
(  $\text{E}$  : Molécule d'enzyme )

## **4 – 2 – LES ENZYMES IMMOBILISEES: CAS DES CYCLODEXTRINES**

### **4 – 2 – 1 – Définition des cyclodextrines:**

Les cyclodextrines sont des molécules cycliques (macrocycles) naturelles constituées de six à douze unités d'un sucre, l' $\alpha$  D-glucopyranose. Ces entités oligosaccharidiques présentent la particularité de pouvoir héberger par inclusion réversible) d'autres molécules (solides, liquides ou gazeuses) dans la cavité qu'elles délimitent (1.5nm x 0.7 nm x 0.8 nm), conduisant à la formation de super-molécules (complexes d'association).

Les paramètres qui prédisposent à l'inclusion sont généralement de nature hydrophobe et impliquent plusieurs types d'interactions combinées telles les interactions de Van der Waals.

### **4 – 2 – 2 – Obtention et isolement des cyclodextrines:**

Elles sont obtenues par transformation microbiologique ou enzymatique de l'amidon. Industriellement, les cyclodextrines sont obtenues par action sur un amidon liquéfié, de l'enzyme Cyclodextrine transglycosylase (EC: 2.4.1.19), produite par *Bacillus macerans*, de façon exocellulaire.

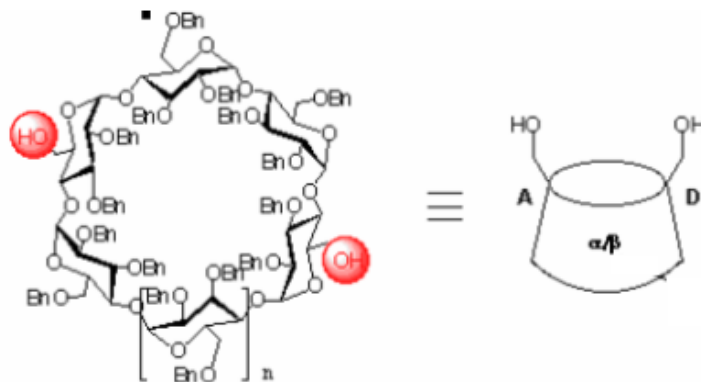


La cyclisation est une réaction réversible qui peut conduire à l'obtention de cycles à 6, 7 ou 8 jusqu'à 10 unités d'alpha-D glucopyranose assemblées par des liaisons  $\alpha$  (1 – 4).

Les trois formes les plus courantes, l' $\alpha$ -cyclodextrine, la  $\beta$ - cyclodextrine et la  $\gamma$ -cyclodextrine, renferment respectivement six, sept et huit unités glycosyle (voir figure 27):



Où Gn : substrat linéaire.



**Fig. 27: Représentation schématique d'une  $\alpha/\beta$  cyclodextrine**

L'isolement et la purification de ces molécules se font en utilisant les propriétés qu'elles ont de former des complexes stoechiométriques cristallisables avec différents solvants apolaires: trichloréthylène, tétrachloroéthane, bromobenzène, cyclohexane.

#### **4 – 2 – 3 – Cyclodextrines et enzymes artificielles:**

La cavité des cyclodextrines est tapissée de fonctions hydroxyles qui, selon le pH de la solution, peuvent être sous forme acide (OH) ou sous forme basique (O<sup>-</sup>). Il en résulte une potentialité de catalyse acido-basique assimilable à celle d'enzymes comme la ribonuléase et les protéases. Parmi les molécules présentant une activité catalytique, les cyclodextrines de Shardingier résultant de la dégradation de l'amidon par la cyclodextrine glucane-glucanotransférase de *Bacillus macerans*. La conversion des cyclodextrines en molécules catalytiques ou enzymes artificielles a été également envisagée en utilisant la β-cyclodextrine à laquelle a été fixé un groupement: O-[4(5)-mercaptométhyl-4(5)-méthyl imidazol-2-yl] benzoate, on obtient une molécule dont le groupe hydroxyl, un noyau imidazole et un groupe carboxylate miment le site actif de la chymotrypsine (chymotrypsine de R. Breslow).

Ces molécules sont capables de reconnaître et fixer un substrat parmi un ensemble de molécules et de catalyser une réaction. La spécificité de cette catalyse pouvant être modifiée par variation de leur architecture interne. Un certain nombre de

réactions catalytiques sont déjà connues et il a ainsi été possible d'obtenir des vitesses de réactions supérieures à celles d'enzymes naturelles voir tableau 24.

**Tab. 24: Quelques propriétés des cyclodextrines glucanotransférases.**

Source (micro- organisme)	pH optimal	T° optimale (°C)	Stabilité		PM (10 <sup>3</sup> )
			pH	t° en °C	
<i>Bacillus macerans</i>	6.0	60	5.5 – 9.5	Jusqu'à 50	145
<i>Klebsellia pneumoniae</i>	5.2 – 7.0	45	5.2 – 8.5	Jusqu'à 50	-

#### **4 – 2 – 4 – Domaines d'applications des cyclodextrines:**

Leur récente production industrielle à coûts modérés, leur disponibilité fondée sur des productions agricoles abondantes ainsi que leur caractère biodégradable confèrent à ces molécules de grandes potentialités économiques.

Elles connaissent déjà d'importantes applications dans les domaines agricole, alimentaire, cosmétique, chimique et pharmaceutique.

##### **- En médecine:**

La solubilité de substances peu ou pas solubles dans l'eau (molécules apolaires) peut être ainsi considérablement

augmentée par leur inclusion dans des cyclodextrines, dont l'anneau saccharidique présente une forte hydrophilie périphérique. Cette propriété trouve des applications dans le domaine du médicament par exemple un anti-inflammatoire, le piroxicam, est commercialisé sous la forme de son complexe d'inclusion avec la  $\beta$  cyclodextrine sous le nom de Brexin®. Sa solubilité dans l'eau passe ainsi de 30 milligrammes par litre à 150 milligrammes par litre en présence de  $\beta$  cyclodextrine. Beaucoup d'autres composés sensibles à l'oxydation ou à la lumière, sont ainsi stabilisés par inclusion dans la cyclodextrine, telles: les prostaglandines E1 et E2 (respectivement stimulant du muscle lisse et vasodilatateur), des antibiotiques du groupe des céphalosporines, l'iode, ainsi que la nitroglycérine utilisée comme vasodilatateur coronaire. Le tableau 25 présente quelques exemples de complexes de principes actifs avec la  $\beta$ -cyclodextrine, ainsi que leur intérêt en vue d'une utilisation médicale.

**Tab. 25: Exemples de complexes de principes actifs avec la  $\beta$ -cyclodextrine**

<b>Propriétés liées à l'utilisation de la cyclodextrine</b>	<b>Principes actifs</b>
Amélioration de la biodisponibilité	- Piroxicam, indométacine
Augmentation de la solubilité	- Stéroïdes: spironolactone - Anti-inflammatoires non-stéroïdiens: ibuprofène, indométacine - Benzodiazépines: diazepam - Vitamines: vitamine K - Barbituriques: phénobarbital
Amélioration de la stabilité de molécules volatiles	- Camphre
Amélioration de la stabilité de molécules oxydables	- Vitamine A
Amélioration de la stabilité de molécules hydrolysables	- Acide acétyl salicylique

- **L'agro-alimentaire:**

La stabilisation d'arômes par inclusion ou encore l'extraction de composants indésirables tels la caféine ou le cholestérol connaissent des développements industriels. Enfin, on sait que l'addition de 1 à 3 p. 100 de cyclodextrines stabilise les émulsions, et une mayonnaise peut ainsi être préparée, sans œufs, en présence de cyclodextrines. Dans le domaine de l'agriculture, l'introduction d'un gaz, l'éthylène, dans ces molécules cages forme un complexe d'inclusion qui, épandu sous forme de solution aqueuse sur certains fruits et légumes, telles les tomates, accélère leur maturation.

- **La parapharmacie et la cosmétologie**

Les cyclodextrines trouvent des applications comme composants actifs de déodorants, pour la diffusion contrôlée de parfums dans des articles de toilette. Par exemple, Les cyclodextrines sont utilisées comme molécules –pièges, à l'intérieur desquelles est encapsulée l'huile essentielle de l'arbre à thé (utilisée comme soin des peaux grasses, nettoie l'épiderme et élimine les impuretés), qui est ainsi protégée de l'oxydation. Dès son application, cette huile est libérée progressivement des cyclodextrines et pénètre dans la peau. La libération contrôlée de l'actif permet d'obtenir une action longue durée. Une fois vidées de leur contenu, telles un buvard, les cyclodextrines absorbent le sébum, évitant ainsi sa décomposition propice au développement bactérien.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alais C. et Linden G. (1997);

**Biochimie alimentaire** – édition Masson. p.p. [111-212].

- Anonyme (1973);

**Les lactosérums. Traitements et utilisations.** APRIA  
(association pour la promotion industrie agriculture) 262 p.

- Argoub I. (2000);

**Valorisation du lactosérum dans l'alimentation du bétail** –  
Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme  
d'ingénieur d'état en agronomie (zootechnie). 46 p.

- Binet C. (1981);

**Vitamines et vitaminothérapie.** Editions Dangles. 237 p.

- Boudet A.-M. (1996);

**La lignification domestiquée.** Biofutur n° 158. p.p.[27-31].

- Boumendjel A. (1994);

**Recherche de pectinase et d'alpha-amylase chez une  
souche locale d'*Aspergillus sp.*** Mémoire de DES en  
biochimie. Département de biochimie. Faculté des sciences.  
Université d'Annaba. 40 p.

- Boumendjel A. (1997);

**Contribution à la mise au point de techniques de purification de l'IgG. Application au typage d'une gammopathie monoclonale.** Thèse de Magistère en immunologie appliquée. Département de biochimie. Faculté des sciences. Université d'Annaba. 95 p.

- Boumendjel A. (2002);

**Extraction et caractérisation de la vincamine, alcaloïde de la pervenche *Vinca minor* (Apocynacées).** Séminaire international sur la qualité et la sécurité dans le secteur agro-alimentaire. Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques. Université de Blida.

- Burstein C. (2000);

**Biotechnologie enzymatique. Mode d'emploi. Industrie alimentaire- environnement- Médical.** Edition Polytechnica. 108 p.

- Canu A. et Peter F. (2001);

**Le préparateur en pharmacie. Microbio-immuno.** Edition Tec et Doc. p.p. [107-111].

- CD – Encarta

- CD – Universalis

- Cheftel J.-C., Cuq J.-L., Lorient D. (1985);

**Protéines alimentaires** – Edition Tec & Doc Lavoisier. p.p. [156-193].



- Clément J.-M. (1978);

**Dictionnaire des industries alimentaires.** Editions Masson. 348 p.

- Cohn E.J. et al. (janvier 1950);

**A system for the separation of the components of human blood. Quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasma.** Harvard Medical School 72. p.p. [465-474].

- Collin J.C., Delancourt R. (juin 1988);

**A propos des méthodes d'analyse des enzymes applicables aux préparations enzymatiques industrielles.** Actualités des industries alimentaires et agroindustrielles. p.p. [448-455].

- Costes C. (1981);

**Protéines foliaires et alimentation** – édition Gauthier-Villars. 266 p.

- Document technique (1993);

**Pectines.** SANOFI. Bio-industries. p.p. [1-23].

- Dupuy P. (1982);

**Use of enzymes in food technology** - édition Tec et Doc Lavoisier. p.p. [177-182].

- Durand G. et Monsan P. (1982);

**Les enzymes : production et utilisations industrielles.** Editions Gauthier-Villars. 352 p.

- Fauvelle F., Debouzy J.-C. (2001);

**Les cyclodextrines pour quoi faire ?** Ann. Pharm. Fr. 59. p.p. [363-365].

- Fiche technique IBF: Product Information (année anonyme);  
**DEAE/CM/SP Trisacryl®M for ion exchange chromatography.** 6 p.
- François R. (1974);  
**Les industries des corps gras.** Edition Tec et Doc. p.p. [243-258].
- Frénot M. et Vierling E. (1997);  
**Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant.** Edition Doin. 285 p.
- Gantet P. et al. (janvier 2001);  
**L'ingénierie métabolique des plantes.** Biofutur 207. p.p. [38-41].
- Godon B. (1991);  
**Biotransformation des produits céréaliers** – édition tec et doc Lavoisier. p.p. [179-186].
- Kamoun P. (1977);  
**Appareils et méthodes en biochimie.** Flammarion médecine-sciences. 236 p.
- Karp G. (1999);  
**Biologie cellulaire et moléculaire (concepts et expériences).** traduction de la 1<sup>ère</sup> édition américaine par Bouharmont J.-édition DeBoeck Université. p.p. [743-773].
- Linden G. et Lorient D. (1994);  
**BIOCHIMIE AGRO-INDUSTRIELLE. Valorisation alimentaire de la production agricole.** Editions Masson. 366 p.

- Minkowski M. (1987);

**Biologie moléculaire de LA CELLULE** (traduction française de Alberts B. and al.) – Edition Flammarion Médecine Sciences. p.p. [160-165].

- Monties B. (1980);

**Les polymères végétaux** – édition Gauthier-Villars. p.p. [46-286].

- Mouranche A. et Costes C. (1985);

**Hydrolases et dépolymérase: enzymes d'intérêt industriel.** Edition Gauthier-Villars. p.p. [106-141].

- Muller J.-Y., Avenard G., Martini E. (1992);

**Les dérivés sanguins** – édition Frison-Roche. 138 p.

- Pastoret P.-P., Govaerts A. Et Bazin H. (1990);

**Immunologie animale** – Edition Flammarion Médecine Sciences. p.p. [613-621].

- Popescu P., Hayes H. et Dutrillaux B. (1998);

**Techniques de cytogénétique animale.** Editions INRA. pp [15-16].

- Pour la science n° 137 mars 1989;

**Sucre de blé.** p.p. [18-19].

- Scriban R. et col. (1993);

**Biotechnologie** – 4<sup>ème</sup> édition Tec & Doc Lavoisier. p.p. [351-456].

- Simon P. et Meunier R. (1970);

**Microbiologie industrielle et génie biochimique** – édition Masson. p.p. [404-411] et [442-495].

- Thibault J.F., Petit R. (1979);

**Les substances pectiques: généralités et domaine d'application dans les industries alimentaires.** Industries alimentaires et agricoles. 12. p.p. [1231-1240].

- Voutquenne L. (2001);

**Saponines et activités hémolytiques. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae.** Ann. Pharm. Fr. 59. p.p. [407-414].

## **ANNEXE**

### **Quelques conseils à suivre pour la préparation et la rédaction d'un mémoire de DES en Biologie Moléculaire et Cellulaire (Biochimie, Microbiologie et Génétique)**

*" A tous ceux qui ont besoin de trouver leur chemin sur les sentiers, routes ou autoroutes de la formation, vers ces diplômes tant recherchés pour leur côté Sésame vers la vie professionnelle..."*

Cette annexe est destinée aux étudiants de fin de cycle qui sont souvent déroutés au moment de réaliser leur projet de mémoire de DES. Ils sont désireux d'en savoir plus, notamment au sujet de la rédaction de leur mémoire, mais aussi au sujet de la soutenance par laquelle ils aimeraient achever leur premier cycle d'études universitaires, avec succès.

Ce ne sont là que quelques conseils qui se voudraient être un guide pour ces candidats. Leur liste est loin d'être limitative et reste à compléter par des milliers d'autres enseignements qui leur seraient octroyés par l'irremplaçable rôle de l'encadreur.

❖ **Choix du thème:**

Le thème de recherche est choisi en fonction de la filière et de la faisabilité.

❖ **Travaux préparatoires:** La réalisation d'un projet de recherche obéit à certaines règles de préparation et normes de conduite, allant de l'organisation quotidienne et régulière des travaux entrepris à la collecte des échantillons, produits, matériels et autres documents indispensables.

- **Planning et organisation quotidienne :** Il s'agit évidemment de tenir un agenda à jour, en prenant des notes à partir du premier rendez-vous avec l'encadreur jusqu'au jour de la soutenance ; de faire un programme général s'étalant sur un calendrier, ainsi qu'une liste des lieux pouvant fournir les échantillons, les produits ou même le matériel et les documents ; et enfin, de constituer des fiches techniques sur lesquelles seront inscrites les compositions des solutions tampon ou des milieux de culture, les étapes et les conditions de manipulation...etc.).
- **Echantillon :** Pour être performant, tout échantillon doit être à la fois représentatif et bien conservé.
- **Produits :** Il est impératif de commencer par s'approvisionner en quantité suffisante en produits divers, qu'il est possible d'ailleurs de récupérer auprès des divers laboratoires de l'université, ou d'autres institutions

susceptibles d'utiliser les produits recherchés : CHU, laboratoires d'analyses médicales, unités industrielles d'agroalimentaire.

- **Matériel** : Un technicien ou ingénieur de laboratoire (à défaut de l'encadreur) doit accompagner la manipulation des divers appareils de laboratoire.
- **Paillasse** : La paillasse doit être intègre et bien sûr équipée d'un minimum de matériel et de solutions tampon avant de commencer toute manipulation.
- **Documentation** : Ne pas omettre évidemment de rassembler les livres et les articles de revues spécialisées, à partir des bibliothèques de l'université ainsi que des autres centres de documentation. Il est également utile d'exploiter les CD spécialisés et les documents d'INTERNET : certaines adresses postales et/ou électroniques peuvent faire l'objet d'un courrier très fructueux.

❖ **Rédaction** :

Une fois que les travaux de préparation ont été entrepris et achevés, ou en voie de l'être, il s'agit de passer à la seconde étape de la réalisation : "la rédaction".

Il a toujours été dit qu'une idée parfaitement possédée par l'esprit trouve aisément son expression juste. Rappelons les fameux vers de Boileau qui avait écrit ceci : « *Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement – Et les mots pour le dire arrivent aisément.* »

La rédaction obéit à des conditions de forme et de fond. Ainsi, dans la rédaction du projet de recherche, il faut être précis et ne dire que ce qu'il faut dire sans verbiage ou délayage.

- **Page de garde** : Doivent y figurer d'une façon claire et lisible tous les éléments de l'en-tête administrative:

<p><b>Ministère.....</b> <b>Université.....</b> <b>Faculté.....</b> <b>Département...</b></p> <p>Mémoire de ... Option..</p> <table border="1"><tr><td><b>Intitulé...</b></td></tr></table> <p>Présenté par ... Les membres du jury ...</p> <p>l'année...</p>	<b>Intitulé...</b>
<b>Intitulé...</b>	

- **Dédicace** : La dédicace n'est pas obligatoire. Etant personnelle, elle doit être brève : éviter de trop charger cette partie.



- **Remerciements** : Les remerciements doivent être adressés en premier lieu à l'encadreur, ensuite aux membres du jury et, enfin, à toute (s) autre (s) personne (s) ayant contribué à la réalisation du mémoire.
- **Sommaire** : Il s'agit de présenter le Plan détaillé du contenu : de l'introduction aux résumés, en faisant référence à la pagination des principales parties, chapitres et sections ou sous-sections.
- **Introduction** : Cette partie doit comporter quelques phrases introductives suivies de la problématique, du but et enfin les grandes étapes du travail.

Le rôle de toute introduction, dit-on, est double :

1-Amener le lecteur au sujet.

2-Poser le sujet : l'indiquer, le délimiter, annoncer les directions de son développement.

- **Partie théorique** : Développer les notions qui ont une relation avec l'aspect pratique sous forme de deux ou trois à quatre chapitres.

**Partie pratique** : *Cette partie doit constituer au minimum le tiers de l'ensemble du document et peut s'étendre au mieux jusqu'à sa moitié.* Elle comporte deux chapitres: matériel et méthodes, puis résultats et discussion.

Citer le laboratoire d'accueil où les manipulations ont été effectuées ; Donner un schéma du protocole expérimental général du travail ; Citer l'appareillage utilisé au fur et à mesure ou lui consacrer une page ; Indiquer la source de

l'échantillon biologique ; Pour chaque technique utilisée, il faut donner un principe et un mode opératoire ; Donner les résultats sous une forme claire et concise tout en comparant avec les données de la littérature.

- **Conclusion** : Elle est la résultante d'une démonstration qui s'est faite, en principe, avec cohérence, ordre et progression. Dans ce cas, différente de son simple résumé, la conclusion doit en comporter les principales implications finales et les résultats concluants du travail dans son ensemble avec de nouvelles perspectives de recherche.
- **Bibliographie** : Chaque référence doit comporter : Le (ou les) nom (s) de (ou des) l'auteur (s) – le titre de l'ouvrage (ou document, article, communication) – l'année – l'édition ou le numéro de la revue – les pages utilisées ; lorsque l'un de ces éléments reste introuvable, il est remplacé par le mot "anonyme" ; lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier est cité par son nom suivi de la notation "*et al*" ou "*et coll*" ; lorsque la référence est issue d'Internet, elle doit comporter de même, les noms de l'auteur, la source bibliographique, ...etc., ainsi que le site d'internet (www.....). Dans leur liste, les références bibliographiques sont disposées selon leur ordre d'apparition dans le document. Il est recommandé

d'utiliser plusieurs documents pour une même partie et non pas un seul document pour plusieurs parties

*Autant de pages = autant de références.*

- **Résumés** : Le rapport doit être résumé dans les trois langues principales : le français, l'arabe et l'anglais en y faisant ressortir la problématique générale et les mots clés. Ces derniers sont reportés juste après le résumé.

❖ **Présentation des résultats** :

- Après avoir élaborer des **tableaux** rassemblant les données obtenues, il est nécessaire de les représenter **graphiquement** afin de donner une première idée de l'aspect général des données étudiées. Ensuite, veiller à utiliser les **tests statistiques** adéquats pour la meilleure interprétation des résultats, et cela, en calculant certains paramètres statistiques servant à les caractériser numériquement.
- Le document informatisé (dit manuscrit) ne doit pas comporter de fautes d'orthographe (recopier correctement les mots et faire attention surtout aux termes scientifiques); il faut éviter d'utiliser trop de couleurs et d'abuser des décorations superflues susceptibles de diminuer la valeur scientifique du mémoire. Le texte du mémoire est, en général, écrit avec la police "Time New Roman" taille 14, interligne 1.5, et justifié.

- Préparation des planches ou des transparents ou encore d'un "Data-show".
- Si le rétroprojecteur ou le Data show sont nécessaires, il faut penser à les réserver pour le jour "J" auprès des services du DICA V en respectant toutes les démarches administratives qui sont préconisées par le département concerné.
- Préparation de la soutenance à blanc "le speech": il faut surtout donner les techniques utilisées et discuter les résultats obtenus.

❖ **le jour J :**

- Le titre du mémoire et le plan général doivent apparaître dès le début de la séance de soutenance.
- Le silence doit régner dans la salle.
- L'exposé oral doit être bref, clair et concis. Il doit se conformer au temps qui est généralement imparti aux candidats, soit vingt (20) minutes.
- Prendre note de toutes les remarques faites par les membres du Jury et des questions qui seront posées.
- S'efforcer de répondre, si possible, aux diverses questions posées. En cas contraire, répondre aux questions jugées essentielles.

❖ **Remarques d'usage complémentaires :**

- Consacrer une page aux *abréviations* si elles sont nombreuses, et, si nécessaire, prévoir une *annexe*.
- Une fois la brochure finalisée et remise, et si tout de même il reste quelques erreurs, il faut envisager une liste des « *errata* » à distribuer aux membres du jury.
- Les tableaux et les figures insérées au document doivent comporter un titre (apparaissant en haut pour un tableau et en bas pour une figure), une référence et, si nécessaire, une légende.
- Les numéros correspondant aux références sont notés entre crochets. Le nom d'un tout autre auteur peut apparaître dans le texte suivi de la notation "in" puis du numéro de la source bibliographique utilisée.
- Le nom scientifique (genre et espèce) des êtres vivants doit être écrit en *italique* d'autant plus facilement que le document est informatisé.

❖ **Les festivités :**

A l'occasion d'une soutenance réussie, une cérémonie pour une collation peut avoir lieu :

- En lui consacrant une salle en dehors des laboratoires et de la salle de soutenance ;
- En se déroulant dans le calme, sans vacarme ;
- Et, en veillant à conserver l'intégrité et la propreté des lieux.

## TABLE DES MATIERES

Introduction

Programme officiel du module de biochimie appliquée

Chapitre I – Biochimie des substances d'origine végétale

1- Les macromolécules de la paroi végétale

1- 1- Rappel sur la composition de la paroi végétale

1- 2- Les protéines

1- 3- Les substances pectiques

1- 4- La cellulose

1- 5- Les hémicelluloses

1- 6- La lignine

1- 7- Les gommes et mucilages

2- Les substances foliaires

2- 1- Les protéines foliaires

2- 2- Les saponines

2- 3- Les lipides foliaires

3- Les métabolites secondaires

3- 1- Les alcaloïdes

3- 2- Les terpènes

3- 3- Les polyphénols

Chapitre II – Biochimie des substances d'origine animale:

1- Le sang

1- 1- Composition et rôle

1- 2- Prélèvement et transfusion

1- 3- Fractionnement industriel du plasma

- 1- 4- Utilisations des divers dérivés sanguins
- 2- Le lactosérum
  - 2- 1- Composition et propriétés
  - 2- 2- Différents types de lactosérum
  - 2- 3- Extraction et utilisation du lactosérum et de ses dérivés
- 3- Culture de cellules animales (eucaryotes)
  - 3- 1- Le cycle cellulaire
  - 3- 2- Les différents types de cultures
  - 3- 3- L'hybridation cellulaire – application dans la production d'anticorps monoclonaux

### Chapitre III – Biochimie des substances d'origine microbienne

- 1- Les enzymes
  - 1- 1- Caractéristiques de la souche microbienne
  - 1- 2- Les milieux de production
  - 1- 3- Conduite de la fermentation
  - 1- 4- Extraction et purification des enzymes
- 2- Les vitamines
  - 2- 1- Définition et classification
  - 2- 2- Source et importance
  - 2- 3- Production
  - 2- 4- Utilisations
- 3- Les antibiotiques
  - 3- 1- Définition et classification
  - 3- 2- Activité et mécanisme d'action
  - 3- 3- Production
  - 3- 4- Utilisations
- 4- Culture de biomasse

4- 1- Définition des Protéines d'Organismes Unicellulaires	
4- 2- Micro-organismes producteurs	
4- 3- Objectifs de l'utilisation de la biomasse	88
Chapitre IV – Enzymologie appliquée:	
1- Les enzymes immobilisées et leur intérêt	
1- 1- Méthodes d'immobilisation des enzymes	
1- 2- Propriétés des enzymes immobilisées	
1- 3- Domaines d'application	
1- 4- Réacteurs enzymatiques	
2- Les enzymes immobilisées: cas des cyclodextrines	
2- 1- Définition des cyclodextrines	
2- 2- Obtention et isolement des cyclodextrines	
2- 3- cyclodextrines et enzymes artificielles	
2- 4- Domaines d'application des cyclodextrines	
Bibliographie	
Annexe	
Table des matières	