

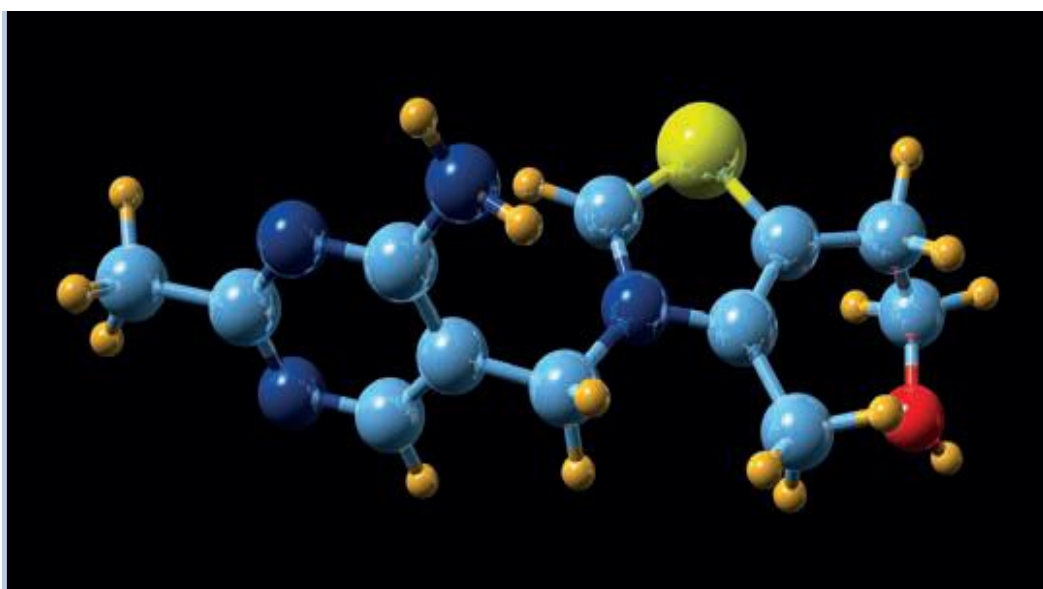
Univeristé Echahid Hamma Lakhde-el Oued
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Cours de

Biochimie appliquée

3^{ème} année Licence Biochimie appliquée

Par Dr Ramdane Farah



Année universitaire:2021/2022

Avant propos

Ce polycopie est le support du cours de* **Biochimie appliquée*** il est destiné pour des étudiants de troisième année Licence de la spécialité biochimie appliquée. Les notions élémentaires dans ce cours constitue la base de la biochimie appliquée, Ce polycopie démontre d'abord la biochimie des substances d'origine végétales qui se sont les métabolites primaires et les métabolites secondaires et leurs interets bilogiques, par la suite la biochimie des substances d'origine animale représentées par le sang,le lait et la culture de la cellule animale et les métabolites microbiennes tel que les enzymes, vitamines, et antibiotiques et enfin termine par l'enzymologie appliquée qui vont permettre aux étudiants de connaitre mieux les notions principales de biochimie pour la cellule végétale, animale ou microbienne.L'ensemble de ces chapitres se veut représenter une référence importante pour les étudiants licence biochimie appliquée.

PAR DR: RAMDANE FARAH

Sommaire

Chapitre. I : Biochimie des substances d'origine végétales

1. Les macromolécules de la paroi végétale.....	1
1.1. Cellulose.....	2
1.2. Hémicellulose.....	3
1.3. Pectines.....	6
1.4. Lignines.....	11
1.5. Gommés et mucilages.....	12
1.6. Glycoprotéines.....	12
2. Substances foliaires.....	13
2.1. Protéines foliaires.....	13
2.2. D'autres constituants de la luzerne.....	16
3. Métabolites secondaires.....	16
3.1. Composés phénoliques.....	17
3.2. Composés terpéniques.....	22
3.3. Alcaloïdes.....	26

Chapitre. II : Biochimie des substances d'origine animale

1. Constituants des liquides biologiques.....	34
1.1. Lait.....	35
1.2. Sang.....	43
2. Culture des cellules animales (eucaryotes).....	53
2.1. Cycle cellulaire.....	53
2.2. Moyens d'études de la cellule.....	55
2.3. Différents types de culture.....	57
2.4. Hybridation cellulaire - application à la production d'anticorps monoclonaux.....	59

Chapitre. III : Biochimie de substances d'origine microbienne

1. Enzymes.....	62
2. Vitamines.....	68
3. Antibiotiques.....	83
4. Culture de biomasse et production d'organismes unicellulaires (P.O.U.).....	89

Chapitre. IV : Enzymologie appliquée

1. Enzymes immobilisés.....	92
1.1. Techniques d'immobilisation des enzymes.....	92
1.2. Propriétés des enzymes immobilisées.....	96
1.3. Domaines d'applications.....	96
1.4. Réacteurs enzymatiques.....	98
2. Enzymes immobilisées: Cas des cyclodextrines.....	103
Références bibliographiques.....	107

Chap. I : Biochimie des substances d'origine végétales

1. Les macromolécules de la paroi végétale

La paroi cellulaire végétale est un édifice multimoléculaire qui assure la rigidité et qui évolue en fonction de l'âge des tissus végétaux. Elle entoure chaque cellule végétale et est essentiellement constituée de polyphénols, protéines et de glucides (90% de la masse de matière sèche) qui peuvent être des hémicelluloses, des pectines ou de la cellulose.

1.1. Cellulose

La cellulose représente le constituant majeur des polysaccharides de la paroi végétale. Elle est formée de résidus de D-glucose liés par des liaisons β -1,4- glycosidiques constituant un polymère linéaire de (500 à 14000) unités de glucose. La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intramoléculaires (stabilité et rigidité), et des liaisons intermoléculaires qui relient plusieurs macromolécules et les maintiennent disposées parallèlement. Ainsi, l'association de nombreuses chaînes de cellulose favorise l'établissement d'un état solide ordonné, pseudocristallin et permet la formation de microfibrilles.

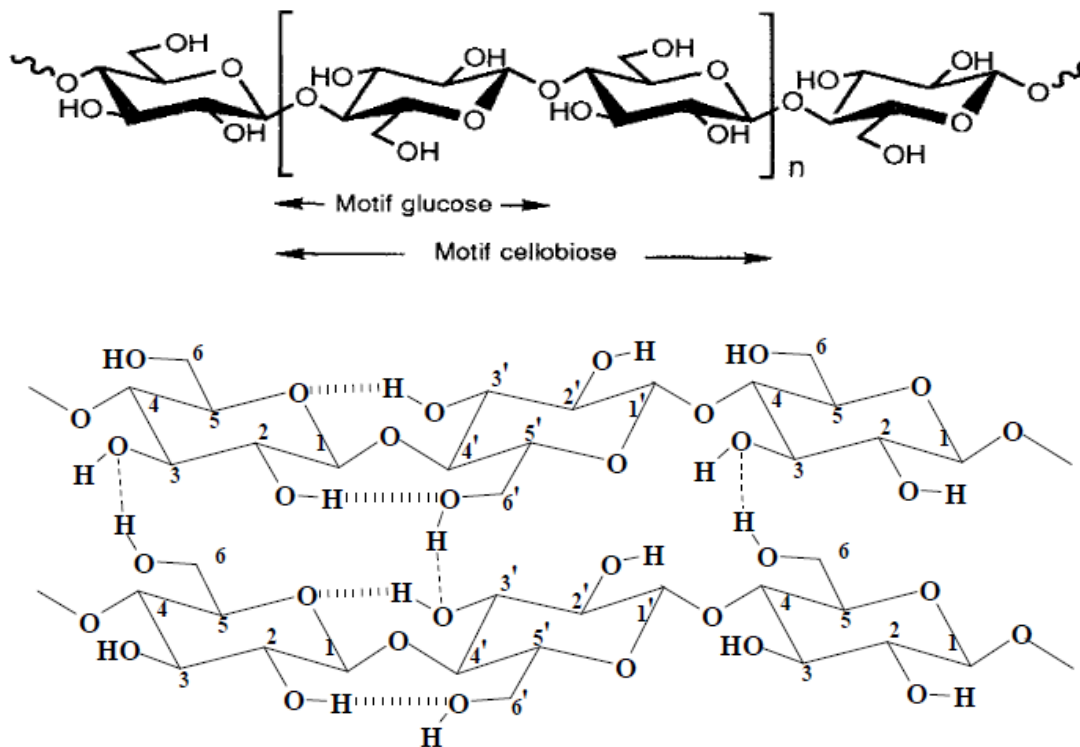


Figure 1: Structure de cellulose et liaisons hydrogène intra et intermoléculaires

➤ Extraction de la cellulose

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.

1.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides hétérogènes possédant une structure plus complexe que celle de la cellulose. Se composent d'une chaîne principale de polysaccharides à laquelle plusieurs chaînes latérales sont attachées. Les hémicelluloses sont nommées selon la nature des résidus sucre de leur chaîne principale. Les hémicelluloses peuvent donc être divisées en quatre grandes classes, à savoir (i) les xylanes, (ii) les mannanes, (iii) les xyloglucanes et (iv) les β -glucanes à liaisons mixtes. Un hémicellulose rencontré généralement dans les parois cellulaires végétales est le glucomannane qui se compose d'unités de β -1,4-mannose et β -1,4-glucose avec des groupements de galactose attachés latéralement à la chaîne principale du polysaccharide. Les hémicelluloses sont liées d'une part aux pectines et d'autre part à la lignine dans la paroi végétale.

Le xylane, β -1,4-D-xylose, est le polymère majeur des hémicelluloses qui se trouvent dans les céréales et le bois dur. Il peut être substitué avec différents groupements latéraux tels que le L-arabinose, le D-galactose, les résidus d'acide acétique, d'acide férulique, d'acide *p*-coumarique et d'acide glucuronique.

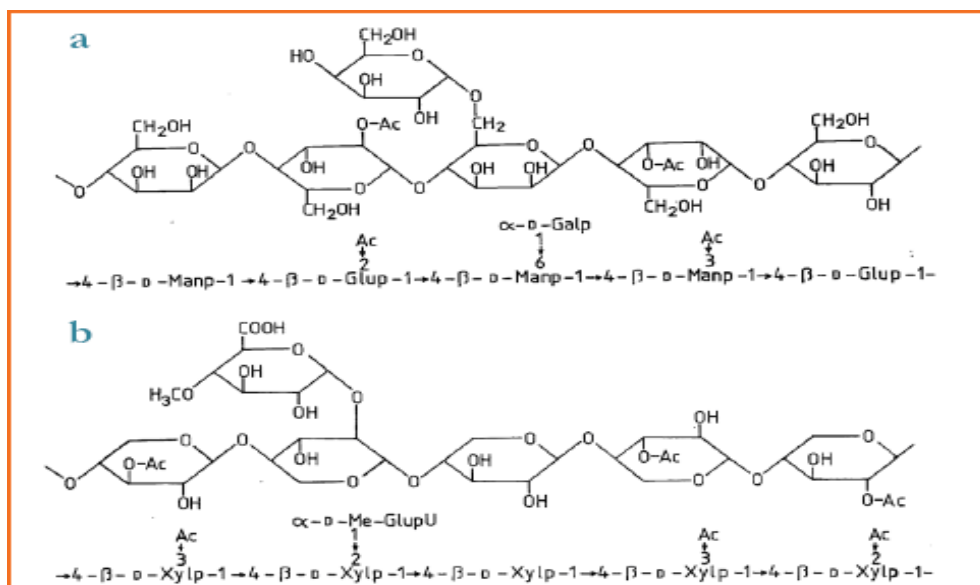


Figure 2: Structure d'hémicellulose

➤ **Extraction d' hémicelluloses**

Les polysaccharides pariétaux alcalinosolubles; cependant certains d'entre-eux tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau.

➤ **Extraction de la cellulose à partir du bois**

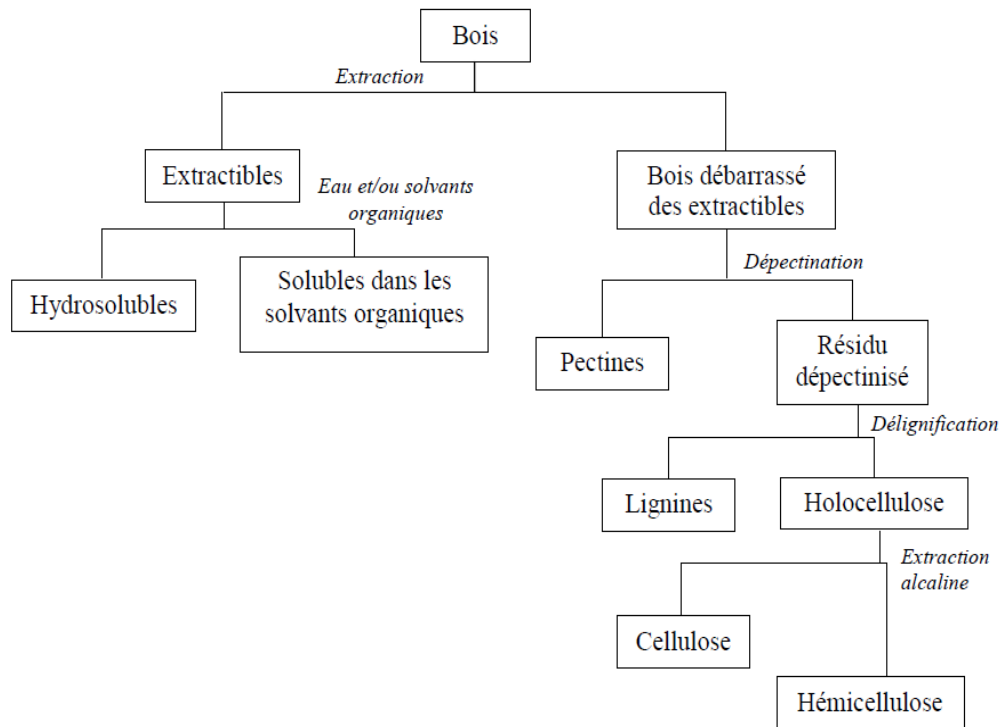


Schéma d'extraction de la cellulose à partir du bois

✚ **Les traitements préalables à l'extraction**

La grande diversité structurale de la paroi ainsi que du matériel végétal (ici le bois) nécessitent au préalable divers traitements afin d'améliorer l'extractibilité de ces polysaccharides pariétaux. Qu'ils soient physiques (broyage explosion à la vapeur, ultrasons), ou chimiques (alcalis, chélateurs de métaux, oxydants, acides).

➤ **Le broyage**

La granulométrie et la forme des particules solides ont une influence sur le rendement d'extraction. Le broyage réduit la taille des particules, augmentant ainsi la surface d'échange disponible pour le solvant d'extraction.

➤ **Elimination des extractibles**

Dans le bois, les extractibles correspondent essentiellement aux tannins, aux composés aromatiques, aux phénols, aux sucres circulants et aux flavonoïdes et peuvent donc être extraits par des mélanges de solvants tels éthanol-eau, éthanol-benzène ou éthanol-toluène.

Déprotéination

Les protéines peuvent être éliminées par une simple extraction à l'eau chaude ou à l'eau froide, ce qui risque cependant de solubiliser une partie des hémicelluloses qui nous intéressent. Des protéases peuvent également être utilisées dans le cas de matériels fortement protéinés.

Dépectination

Les pectines sont extraites selon leur degré de méthylestérification. Les pectines fortement méthylestérifiées sont facilement extraites par l'eau chaude alors que l'extraction des pectines faiblement méthylestérifiées nécessite l'utilisation de chélateurs de calcium tels, l'EDTA, l'imidazole ou encore l'oxalate d'ammonium. Le recours à des enzymes pectinolytiques peut également être envisagé à une échelle industrielle

Déliquification

Celle-ci augmente l'accessibilité des réactifs aux constituants de la matière végétale. Le résidu obtenu, constitué alors de cellulose et d'hémicelluloses est appelé holocellulose. Lors de l'étape de délignification, on remarque un blanchiment du substrat causé par l'extraction ou la dégradation des lignines. Cette décoloration recherchée entre autres dans l'industrie papetière est expliquée par la présence d'acides hexénuroniques qui contribue en partie à la couleur de ce substrat. De nombreuses procédures de délignification sont décrites dans la littérature. Elles se basent soit sur l'extraction des lignines, soit sur leurs dégradations oxydatives.

- **Délignification par la méthode d'acidolyse**

Ces méthodes non dégradatives des cycles phénoliques permettent d'extraire les lignines. Elles sont hydrolysées et il en résulte la formation de produits homologues des trois alcools monomères précurseurs. Le système de solvant le plus utilisé est le dioxane/HCl où généralement le dioxane est à hauteur de 80- 85% et la concentration en HCl peut varier de 10 mM à 2 M.

➤ **Utilisation de la cellulose (Valorisation)**

✚ L'homme n'utilise pas la cellulose pour son alimentation contrairement aux micro-organismes (possèdent cellulase).

✚ Elle a pourtant toujours joué un rôle important sous forme de textiles (rayonnes-viscose) ou de papiers ou même en tant qu'explosifs et matières plastiques (nitrocellulose).

Tableau1: Dérivés de celluloses et leurs utilisations

✚ Dérivés	✚ Caractéristiques	✚ Utilisations
CMC (Carboxy méthyl cellulose de sodium)	Bonne solubilité dans l'eau	Amélioration de structures des crèmes glacées, conservation des farines, contre la dyspepsie au lait (trouble de la digestion)
HPC (Hydroxy propyl cellulose)	Précipite lorsque l'eau atteint 40° à 50°	Dans les produits de boulangerie (ajuster la consistance des pattes, améliorer la rétention d'eau, prolonger la durée de consommation des gâteaux en diminuant la vitesse de rassissement) pour leur effet gélifiant à chaud (confection des beignets, produits panés)
HM PC (Hydroxy méthyl propyl cellulose)	Soluble dans l'eau chaude et gélifiant à une température de l'eau environ 40° à 50°	
MC (Méthy cellulose)		
AC (Acétate de cellulose)	–	Films, bande magnétique, membrane de dialyse

➤ **Elimination d'hémicellulose**

✚ **Hot Caustic Extraction (HCE) ou Extraction alcaline à chaud**

Permet d'éliminer les hémicelluloses de la pâte principalement par les mécanismes de peeling. (Le peeling est une réaction qui s'attaque aux extrémités réductrices des chaînes de cellulose en les dépolymérisant unité par unité jusqu'à ce qu'une réaction concurrente stoppe la réaction en formant une unité terminale stable). Ceux-ci interviennent tant sur la cellulose que sur les hémicelluloses (4-12% NaOH, 90-120°C, 60-120 min).

✚ Cold Caustic Extraction (CCE) ou Extraction alcaline à froid

L'extraction alcaline à froid (6-18% NaOH, 25-40°C, 10-60 min) permet d'atteindre des puretés élevées (jusqu'à 98% de cellulose). L'utilisation de soude concentrée (de 6 à 18% par rapport à la pâte dans la solution) va permettre de provoquer le gonflement des fibres en cassant les liaisons hydrogènes entre les chaînes de cellulose. Une grande partie des hémicelluloses est alors solubilisée très sélectivement.

➤ Utilisation d'hémicellulose

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 ont des propriétés laxatives (médication purgative légère provoquant l'évacuation du contenu intestinal).

1.3. Pectines

La pectine est un polysaccharide hétérogène soluble anionique contenant des chaînes linéaires de résidus d'acide α - (1 \rightarrow 4) -D-galacturonique et de 1,2-D-rhamnose avec des chaînes latérales de D-galactose et de D-arabinose. Ce sont des molécules colloïdales qui ont un rôle de ciment intercellulaire, elle se trouve dans la paroi primaire et principalement localisées au niveau de la lamelle moyenne où elle aide à lier les cellules. Elle est également associée à d'autres substances chimiques composantes de la membrane cellulaire telle que la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine.

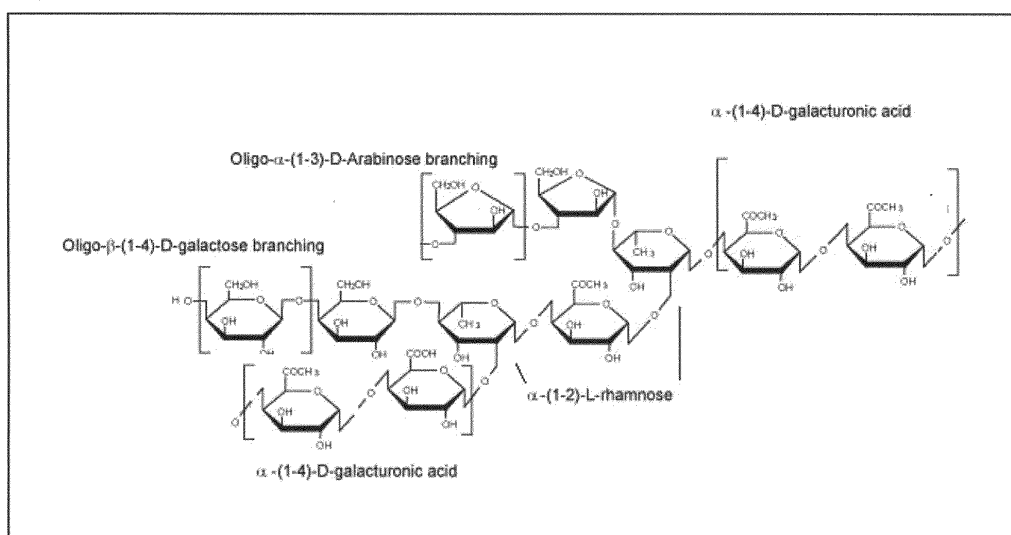


Figure 2 : Structure de la pectine

➤ **Types de pectines**

Les pectines sont identifiées à partir de leur degré de méthylation qui est défini comme étant le nombre de fonctions carboxyliques méthylées pour cent motifs d'acide galacturonique de la chaîne principale résidus totaux). Selon leur degré de méthylation, on distingue:

- Les pectines « hautement méthylées ayant un DM > 50 % sont majoritairement présentes dans la nature.
- Les pectines « faiblement méthylées ayant un DM < 50 % sont obtenues à partir des pectines HM, soit par voie chimique (déestérification alcaline à basse température) ou par voie enzymatique (utilisation de pectines méthylestérases).

Il est aussi possible de modifier chimiquement la structure de la pectine pour lui conférer d'autres propriétés (amidation), en procédant à une dé-estérification des pectines HM en présence d'ammoniaque en suspension alcoolique qui permet de convertir les groupements méthoxyles en groupements amide primaire (CONH₂).

➤ **Extraction de pectine**

Le degré de polymérisation, de méthylestérification et la distribution de ces groupes méthyles sont autant de paramètres qui vont jouer sur la solubilité de ces molécules. C'est pour cela qu'elles sont classées selon leur mode d'extraction; à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique). Le fruit (citron, orange) est l'une des matières végétales les plus riches en substances pectiques.

• **Extraction de la pectine à partir du citron**

Les albédos d'agrumes (citron) préalablement isolés ont subi des traitements préliminaires afin d'obtenir des résidus insolubles dans l'alcool éthylique. Cette étape renferme un traitement par l'eau distillée et un autre traitement par l'alcool éthylique.

a) **Traitement à l'eau distillée**

- **Blanchissement:** ce blanchissement consiste en un chauffage de la matière végétale dans l'eau distillée à une température de 90°C pendant 10min avec un rapport résidus/eau: 1/25

- **Lavage:** plusieurs lavages à l'eau distillée ont été effectués juste après le blanchissement afin de permettre un refroidissement rapide du matériau végétal ainsi que pour l'élimination des composés solubles (sucres par exemple)
- **Filtration et pressage:** cette étape consiste en une filtration à travers la gaze suivie d'un pressage qui aide à l'élimination du maximum d'eau.
- **Séchage:** le matériel végétal est séché dans l'étuve à 95°C.

B) Traitement à l'alcool éthylique: cette étape consiste en un chauffage de la matière végétale obtenu précédemment dans l'alcool éthylique (85%) à une température de 70°C pendant 20min dans un bain marie sous agitation continue avec un rapport massique résidu/ ethanol: 1/5 suivi d'un refroidissement rapide et filtration par la gaze. Cette opération est répétée trois fois, finalement une filtration sous vide est effectuée pour assurer l'élimination maximale de l'alcool éthylique. Les résidus obtenus sont séchés à l'étuve à 50°C. De ce faite la matière première est prête à la solubilisation.

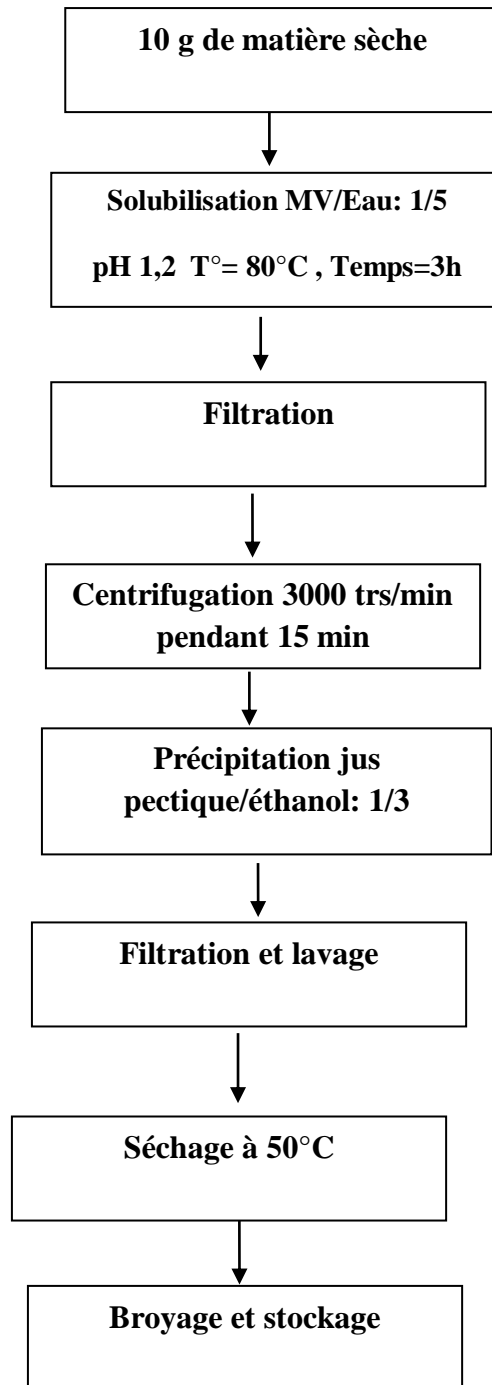


Figure3: Extraction de pectine à partir de citron

➤ **Gélification:** La gélification est un procédé qui consiste à former un gel. On peut définir un gel comme "un système colloïdal : les molécules gélifiantes sont des macromolécules qui forment un réseau en se solvatant. Ce réseau tridimensionnel solide contient entre ses mailles une phase liquide"

- **Cas des pectines hautement méthoxylées HM**

Les pectines HM sont capables de former un gel à pH acide (2.20 - 2.80) en présence d'un sucre, par exemple: le saccharose. Ces deux éléments favorisent les interactions pectine - pectine plutôt que les interactions pectine - eau, ceci suite à la diminution des répulsions électrostatiques (pH acide) et de l'activité de l'eau (présence de sucre). Dans ce cas, le mécanisme de gélification correspond à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupements méthyles et les liaisons hydrogènes entre les groupements carboxyliques des résidus d'acide galaturonique non estérifiés et les alcools secondaires.

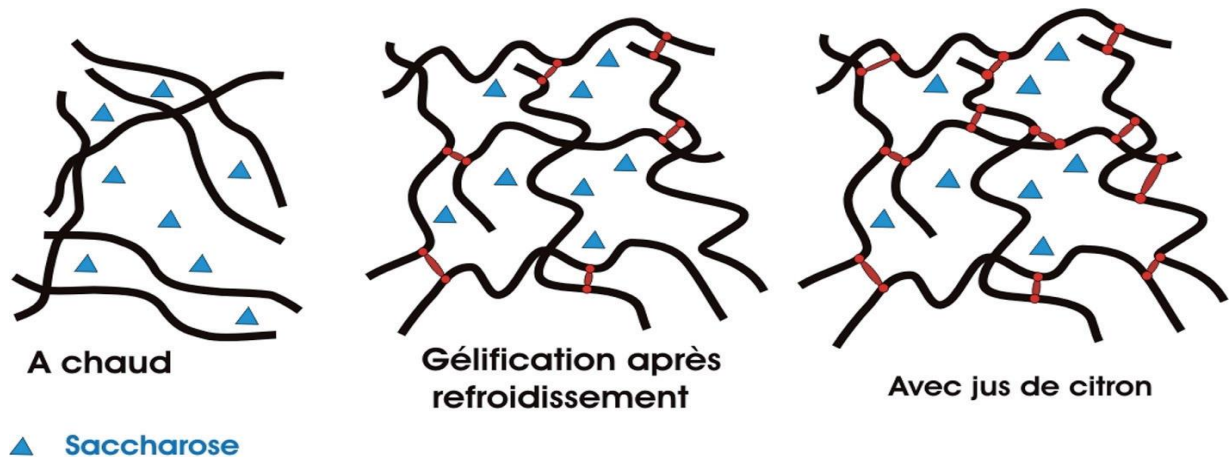


Figure 4: Gélification par formation de liaisons hydrogène sous l'action conjuguée du sucre et de l'acidité du citron : cas des pectines HM

La concentration finale en pectine HM doit être comprise entre 0,2 et 1 % : plus elle est élevée, plus le pH nécessaire à l'obtention du gel sera élevé (milieu moins acide) et moins il faudra de saccharose. Si cette concentration en pectines est moins élevée (cas des fruits pauvres et même moyennement riches en pectines), il faudra en ajouter (ou faire un mélange avec des fruits plus riches en pectines). Pour remédier à ce problème, on utilise souvent du * sucre à confiture * qui n'est autre que du sucre auquel on a ajouté des pectines. Ces pectines peuvent provenir du marc de pomme, du marc de betterave, de la pelure de citron ou d'orange, des graines de caroube, d'extraits d'algues rouges, etc.

Cas des pectines faiblement méthoxylées FM

Dans ce cas, les fonctions acide $-COOH$ sont prépondérantes. Elles sont facilement dissociées en COO^- et H^+ , et, de ce fait, comportent ainsi un nombre important de charges négatives localisées, ce qui rend leur association beaucoup plus difficile. On favorise leur rapprochement en ajoutant des cations divalents comme le calcium Ca^{2+} : ces ions forment

des ponts entre les charges négatives localisées des molécules. La teneur en calcium doit être comprise entre 0,1 et 0,2 % donnant une structure dite de boîte à oeufs ou « egg box».

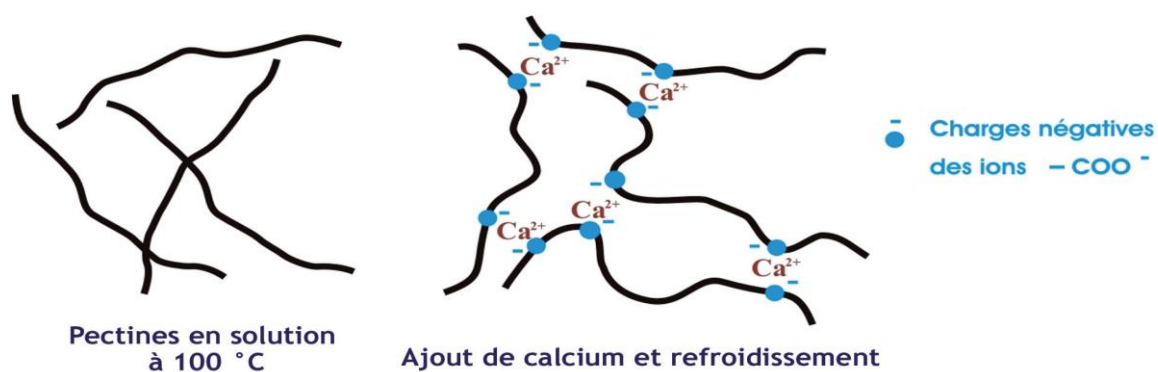


Figure 5: Gélification par formation de liaisons ioniques sous l'action des ions calcium Ca^{2+} : cas des pectines FM

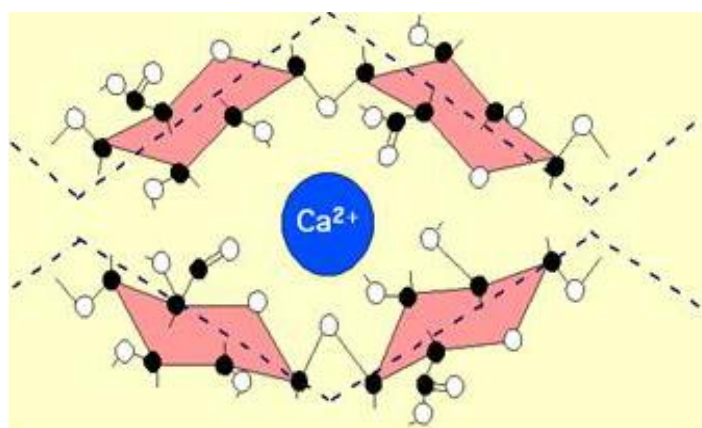


Figure 6: Structure boîte à oeufs ou « egg box».

Contrairement aux pectines HM, l'ajout de sucre n'est pas forcément nécessaire pour la gélification, car la quantité de sucre présente dans les fruits est suffisante pour absorber l'eau et favoriser le rapprochement entre les chaînes de pectines. La concentration finale en pectine doit être également comprise entre 0,2 et 1 % : il faut donc ajouter des pectines (ou mélanger avec des fruits plus riches en pectines) dans le cas où les fruits n'en contiennent pas suffisamment (cas des fruits pauvres et même moyennement riches en pectines).

1.4. les lignines

La lignine, qui est présente exclusivement dans les parois secondaires, est un hétéropolymère complexe dérivé de molécules appelées monolignols. Les principaux: l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique.

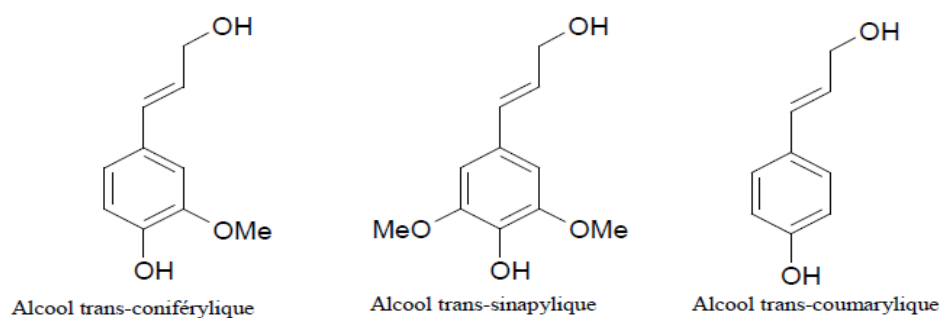


Figure 7: Structure des monolignols

Ex : La vanilline (lignine dont l'élément de base est un alcool coniférylique doté d'un aldéhyde en C7) est l'arôme (additif alimentaire) le plus utilisé en agro-alimentaire.

1.5. Gommages et mucilages

Les gommages et les mucilages sont des polysaccharides hétérogènes dont le poids moléculaire est inférieur à la cellulose. Ce sont des macromolécules hydrophiles colloïdales. Elles ont la propriété de gonfler au contact de l'eau et de former des masses gélatineuses. Ils ont un rôle de lien entre les microfibrilles de cellulose, et de réserve glucidique. Un certain nombre de critères ont été avancés pour différencier gommages et mucilages: Les gommages sont des molécules complexes: a. Toujours hétérogènes et ramifiées b. Contenant des acides uroniques écoulant à l'extérieur du végétal; issus de la transformation de polysaccharides et peut être même de l'amidon; celles se concrètent par dessiccation d. Insolubles dans les solvants organiques ce qui les différencie des résines (de nature terpénique).

1.6. Glycoprotéines

Les parois primaires contiennent de petites quantités de glycoprotéines riches en hydroxyprolines (0,1 à 10% de la matière sèche) comme l'extensine.

- **Structure et élaboration de la paroi végétale**

La cellule végétale est bordée par une paroi et non seulement par une membrane cytoplasmique. On observe ainsi la formation d'un squelette externe se formant autour de la double couche phospholipidique. De l'intérieur vers l'extérieur on voit ainsi la **paroi secondaire** directement en contact avec la membrane plasmique, la **paroi primaire**, puis la **lamelle moyenne**.

Cette paroi possède des **ponctuations** correspondant à des plages de **plasmodesmes**, elles mêmes correspondant à de petits orifices permettant la communication entre les cellules.

- La **lamelle moyenne** est une membrane primitive pectique entre deux cellules, elle est dépourvue de cellulose. Elle sera perforée au niveau des ponctuations par les plasmodesmes qui permettront les échanges intercellulaires.
- La **paroi primaire** est située entre la lamelle moyenne et la paroi secondaire. Elle est constituée de 25 à 30% de cellulose, 30 à 65 % d'hémicellulose, 5 à 35 % de pectines et 0,5 à 5 % de protéines. Elle est absente au niveau des plasmodesmes.
- La **paroi secondaire** est située entre la membrane cytoplasmique et la paroi primaire. Elle est de même composition que la paroi primaire, mais avec des proportions différentes: moins de substance matricielle et plus de cellulose (structure solide et non extensible). Elle est absente au niveau des ponctuations.

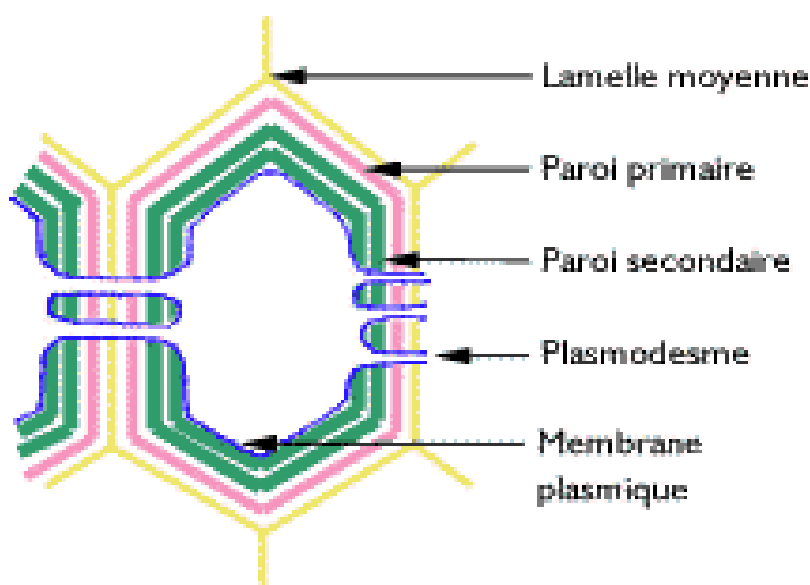


Figure 8 : Modèle simplifié de la paroi végétale

2. Substances foliaires

2.1. Protéines foliaires

Les protéines se composent d'un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Cet enchaînement possède une organisation tridimensionnelle (ou repliement) qui lui est propre. Une protéine est un composé colloïdal macromoléculaire constitué par l'enchaînement d'un grand nombre d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Les

protéines possèdent trois grandes caractéristiques: l'universalité, le caractère indispensable (notamment du fait de la présence dans certaines d'entre elles des acides aminés essentiels), la diversité extraordinaire de propriétés et de fonctions à partir des mêmes éléments constitutifs. Il existe de multiples classifications des protéines, qui s'établissent selon différents critères, tels que la conformation (sphéro ou scléroprotéines), la composition (hétéro et holoprotéines) ou encore la fonction (à activité biologique, de structure, de réserve,...). Les holoprotéines (albumines, globulines, prolamines, glutélines, histones, scléroprotéines) sont constituées uniquement d'acides aminés, au contraire des hétéroprotéines (phosphoprotéines, glycoprotéines, lipoprotéines, nucléoprotéines, chromoprotéines).

La majeure partie des protéines végétale est localisée dans les feuilles. Dans ces feuilles, la structure dominante est l'appareil chloroplastique. Dans le quel, deux catégories de protéines sont représentées: les éléments constitutifs des lamelles chloroplastiques et les protéines hydrosolubles du stroma. Ainsi, cette distinction entre protéines insolubles dans l'eau et protéines hydrosolubles des chloroplastes a conduit à une répartition générale des protéines foliaires:

a) Les protéines hydrophiles, ou protéines blanches

Solubles dans l'eau, sont localisées dans les organites cellulaires. Ainsi, dans la phase soluble du stroma des chloroplastes, se trouvent des protéines, des acides nucléiques, des ribosomes et de nombreuses enzymes catalysant les réactions du métabolisme de cet organite. L'enzyme la plus caractéristique est la RuBisCO- (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase: (E.C. 4.1.1.39)

b) Les protéines hydrophobes, ou protéines vertes

Insolubles dans l'eau, sont principalement les protéines membranaires des chloroplastes, représentant 60 % des éléments constitutifs de ces chloroplastes, les 40 % restant étant des lipides. Ces derniers sont principalement des glycérolipides, ainsi que des pigments. Les principales protéines des lamelles chloroplastiques sont des complexes protéine/chlorophylle (d'où le nom de protéines vertes), intervenant dans le procédé de photosynthèse. Ainsi, le complexe protéine-chlorophylle appelé Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein (LHCP) peut représenter jusqu'à 50 % des protéines membranaires. Les protéines de luzerne possèdent des qualités fonctionnelles intéressantes, les rendant utilisables en industrie alimentaire, pouvant remplacer des protéines de soja ou de blanc d'œuf notamment.

➤ Avantages et inconvénients des protéines foliaires

a) Avantages

- Leur composition intéressante en acides aminés indispensables (Ile, Phe, Trp, Val)
- L'existence de produits latéraux exploitables (lipidiques, quinoniques, pigments, ... etc.)
- L'importance des cofacteurs métalliques puisque la plupart de ces protéines sont fonctionnelles par opposition aux protéines de réserve.
- La facilité à récolter les feuilles (organes aériens) par opposition aux racines, tubercules..etc.

b) Inconvénients

- Le risque de toxicité (phénols, stéroïdes, alcaloïdes dont certains sont toxiques)
- Le risque de ramasser beaucoup d'éléments (polluants, flore bactérienne, fongique ... etc.)

Le procédé suivant mène à l'obtention du concentré protéique de la Luzerne.

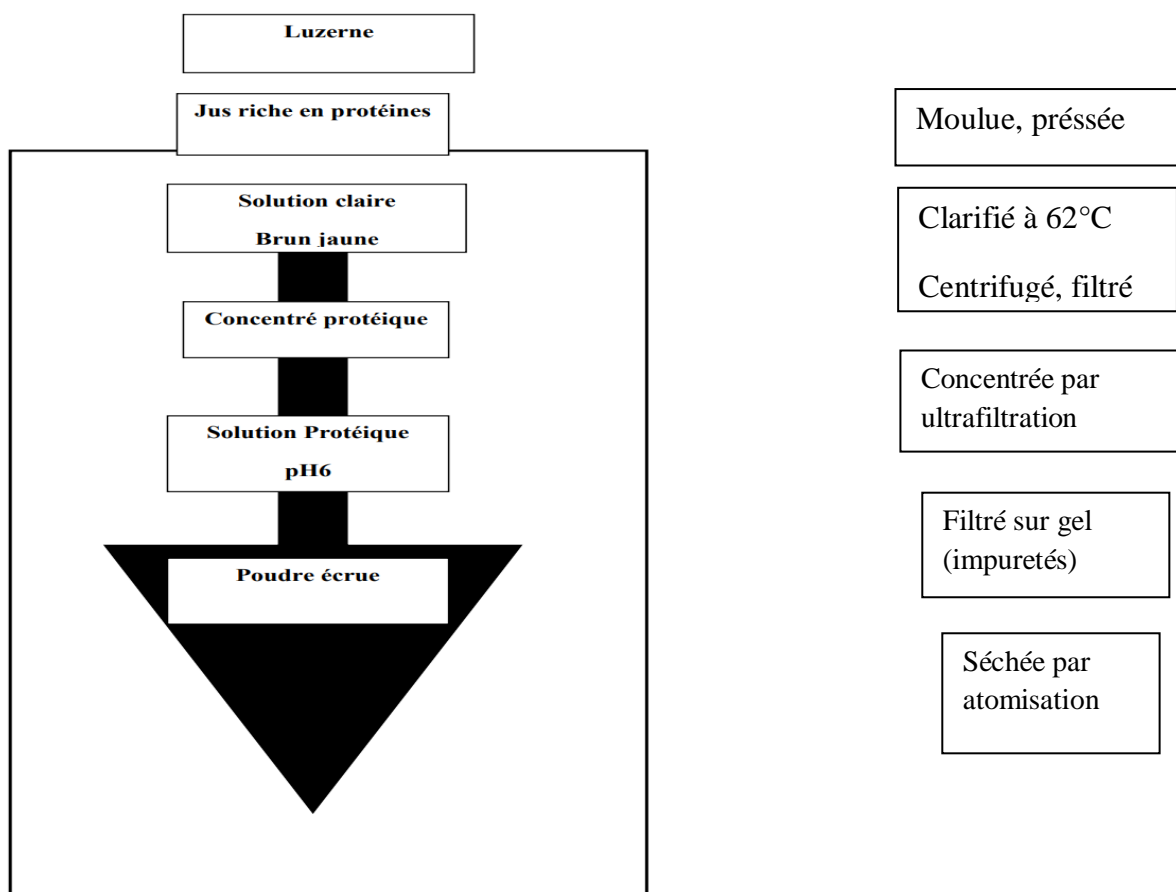


Figure 9 : Obtention de concentré protéique

2.2. D'autres constituants de la luzerne

- Composés phénoliques

Les liaisons entre polyphénols et protéines sont un facteur pouvant entraîner une diminution de la qualité nutritionnelle des aliments.

-Saponines

La teneur en saponines est plus importante dans l'extrait vert obtenu après pressage que dans la plante de départ. Les saponines sont des glucides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Elles sont issues de la combinaison chimique d'un sucre et d'un stéroïde, d'un stéroïde alcaloïde ou d'un triterpène. Elles sont dotées de propriétés tensioactives et ont un pouvoir moussant et peuvent donc servir de détergent. Dans l'organisme animal, elles provoquent la lyse des globules rouges et ont un goût amer. Ce sont donc des facteurs antinutritionnels, diminuant l'utilisation par l'organisme des nutriments en affectant l'utilisation des protéines et la digestibilité. Parmi les saponines de la luzerne, on trouve principalement l'acide médicagénique, l'acide lucernique.

-Colorants

La chlorophylle: principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétiques est extraite traditionnellement de la Luzerne pour la coloration des aliments en vert.

Des carotenes: peuvent également être extraits de la luzerne. Ils sont généralement de couleur orange. En outre, la luzerne est riche en vitamines du groupe B, La vitamine D (calciférol), elle, augmente au cours du séchage et la quantité de vitamine E (tocophérol) diminue lorsque le nombre de coupes augmente.

3. Métabolites secondaires

Le terme «métabolite secondaire», qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, Ces produits, à structure chimique souvent complexe sont très dispersés et très différents selon les espèces. Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement. On distingue classiquement quatre grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les composés phénoliques
- Les saponines
- Les alcaloïdes et composés azotes
- Les composés terpéniques

3.1. Composés phénoliques

Les composants phénoliques sont des métabolismes secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides. On trouve des acides simples jusqu'au grands polymères

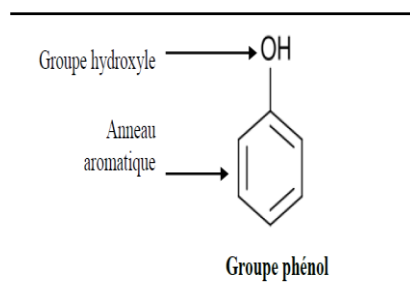


Figure10: Structure d'un phénol

Tableau 2: Principaux types des acides hydroxybenzoïques

Structure	R1	R2	R3	R4	acides hydroxybenzoïques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

Tableau 3: Principaux types des acides hydroxycinnamiques

Structure	R1	R2	R3	Acides hydroxycinnamiques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide p coumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

Les tannins

Le terme tannin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir. Les tannins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire entre 500 et 2000 K Da.

1) Tannins hydrolysables

Qui sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotannins soit l'acide ellagique dans le cas des tannins classiquement dénommés ellagitannins. Les tannins caractérisés par le fait qu'ils se dégradent par hydrolyse chimique ou enzymatique.

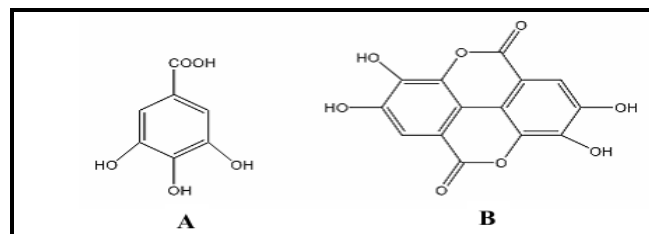


Figure 11 : Structure chimique des acides gallique (A) et ellagique (B)

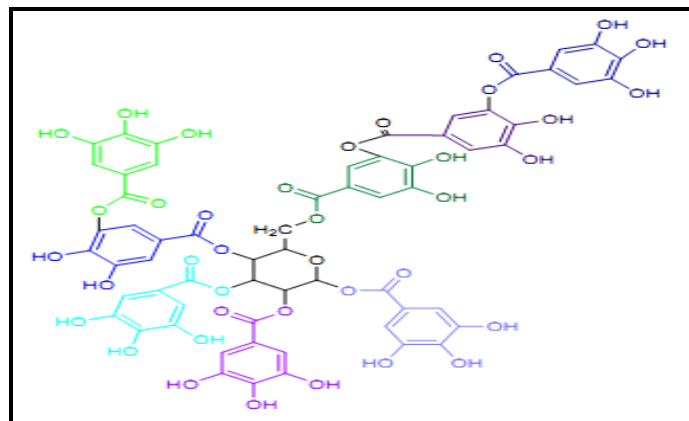


Figure 12 : Structure de base des tanins hydrolysables

2) Tannins condensés

ou tannins catechiques ou proanthocyanidols qui se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes.

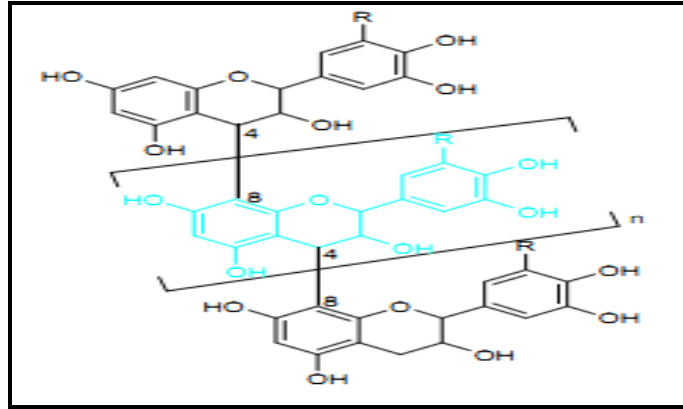


Figure 13: Structure de base des tanins condensés

✚ Lignanes et lignines

- Lignanes

Le terme lignane à l'origine présenté par Haworth en 1936. Les lignanes sont les dimères des unités de phenylpropane (C6C4).

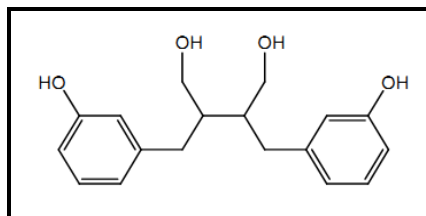
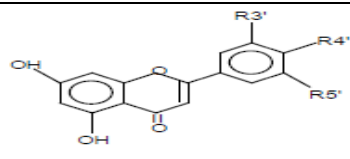
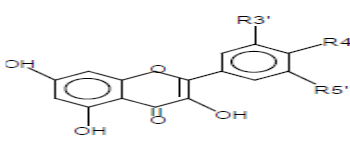
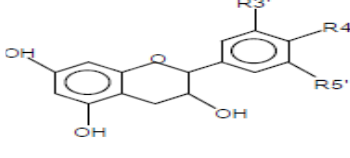
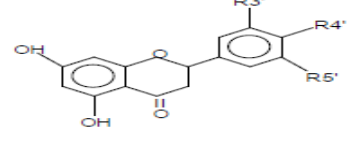
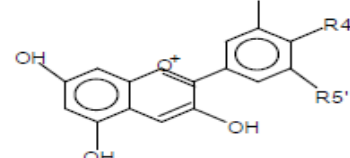
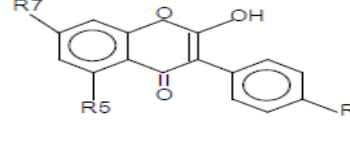


Figure 14 : Structure de lignanes

✚ Flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune). Ils ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P; contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaunes ou en blanc.

Tableau 4 : Principales classes des flavonoïdes

Classes	Structure chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéonine
		OH	OCH ₃	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricitine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictiol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Diadézine

- Biosynthèse des polyphénols

-Voie de l'acide shikimique

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés.

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

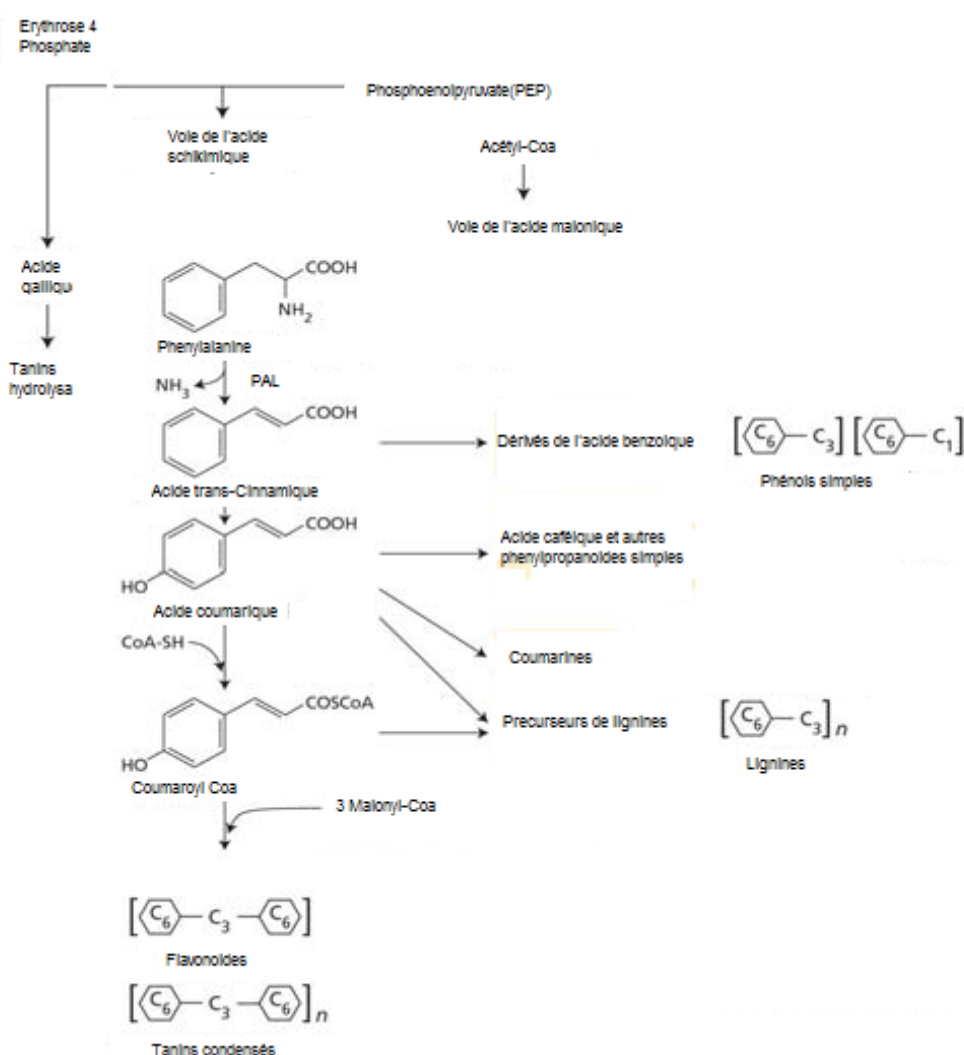


Figure 14: Biosynthèse des composés phénoliques par la voie de l'acide shikimique

- Extraction des composés phénoliques

Les parties à extraire des plantes sont broyées et réduites en poudre qui est, ensuite, macérée dans un mélange hydro-alcoolique méthanol/eau (80-20 v/v) à température ambiante pendant 72h. Après filtration plusieurs fois, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif permettant ainsi d'obtenir l'extrait brut.

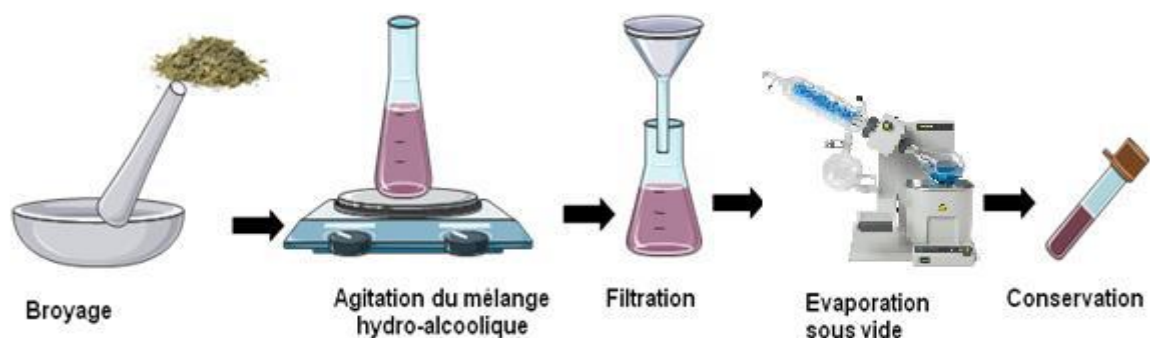


Figure 15: Procédure d'obtention des composés phénoliques

3.2. Composés terpéniques

Les terpènes forment un groupe de produits largement représenté le règne végétal, et d'un intérêt considérable, bien que de structures très diverses. Les dérivés terpéniques peuvent être considérer en tant que polymères du 5- carbone : 2 methyl-1, 3 butadiène ou isoprène.

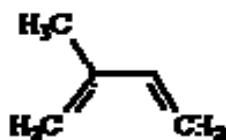


Figure 16 : Structure d'isoprène

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent on distingue : les monoterpènes en C_{10} les sesquiterpènes en C_{15} les diterpènes en C_{20} les triterpènes C_{30} les tetraterpènes en C_{40} et les polyterpènes (~ 4000). Les monoterpènes et les sesquiterpènes volatils sont les principaux composants des huiles essentielles. (Les huiles essentielles de cannelle, thym, girofle ou lavande ont des propriétés antiseptiques et antifongiques.....)

▪ Monoterpènes

Ils comportent deux unités d'isoprène $2(C_5H_8)$. Ils ne possèdent pas une fonction biochimique connue mais ont une fonction biologique, par leur odeur forte. On peut citer le géraniol de la citronnelle (non cyclique) le menthol de la menthe (cyclique)ou bicycliques (pinènes).

- **Sesquiterpènes**

Ils résultent de l'assemblage de trois unités d'isoprène 3(C₅H₈). Ils regroupent les sesquiterpènes linéaires qui sont largement répandus dans le règne végétal, et les sesquiterpènes cycliques dont les composés monocycliques et bicycliques qui sont plus fréquents.

- **Diterpenes**

Ces composés en C₂₀ sont particulièrement abondants chez les Lamiaceae et les Asteraceae même si certains, telles les gibberellines, à rôle d'hormone de croissance, sont universels. Ils peuvent être acycliques ou bi- ou tri-cycliques deux entre eux sont d'une grande importance biologique le rétinol (vitamine A) et le phytol (alcool polyisoprenique d'origine végétale). Les plus intéressants sur le plan pharmacologique sont les diterpènes tricycliques à noyau taxane, issus de différentes espèces mais surtout de *Taxus baccata* L. Le taxol : est utilisé dans le traitement de la tumeur de l'ovaire.

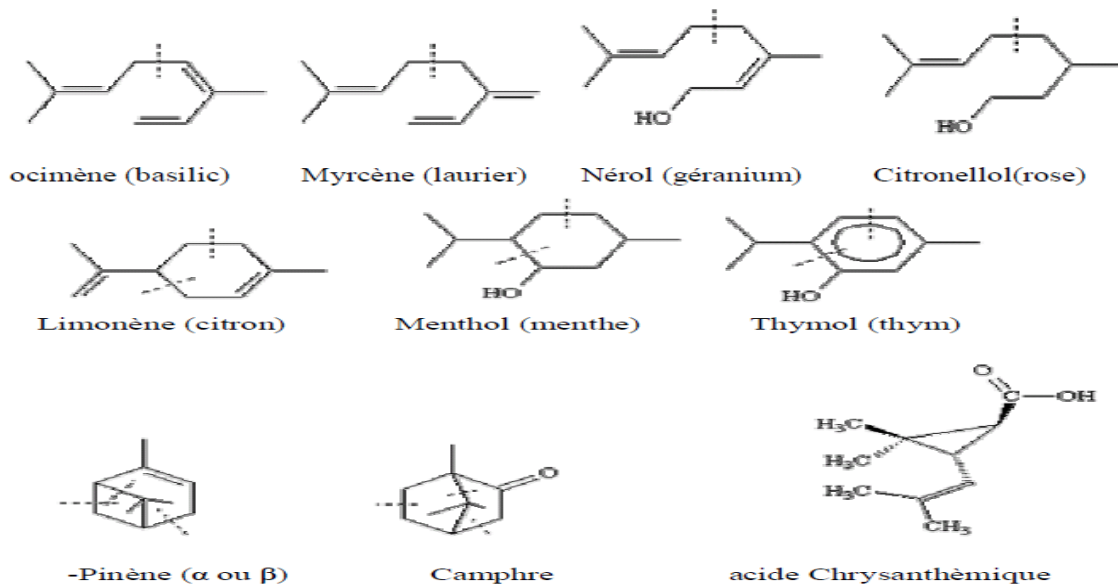


Figure 17 : Structure de quelques monoterpènes

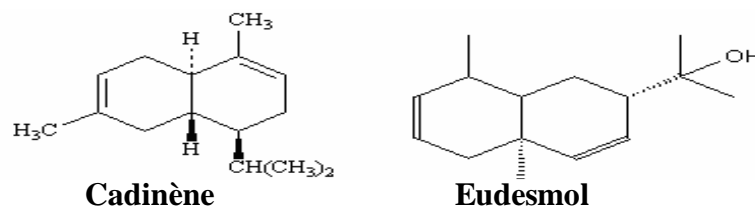


Figure 18 : Structure de quelques sesquiterpènes

- **Triterpenes**

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation de l'époxyqualène ou du squalène. Les stéroïdes peuvent être considérés comme des triterpènes tétracycliques ayant perdu au moins trois méthyles. Ce sont des métabolites secondaires dont l'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel est majeur. On peut en particulier noter l'intérêt des hétérosides cardiotoniques ou des sapogénines spirostaniques qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, des anabolisants et des anti-inflammatoires.

Ex : cholestérol

- **Les tetraterpenes**

Ce sont des molécules tétraterpéniques, constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation.

- ✚ **Les caroténoïdes**

Sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant (safran : *Crocus sativus* L. Iridaceae) mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photodermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation.

- ✚ **Lycopene**

Assez voisin des carotènes. C'est à lui principalement que les tomates doivent d'être colorées en rouge.

- **Les polyterpènes**

Hautement polymérisés (500 à 5000 restes), ce sont les composants des latex. Si le laticifère est endommagé, les particules de polyterpène s'agglomèrent et permettent de refermer les lésions.

Ex : Caoutchouc

- **Biosynthèse des terpènes**

La biosynthèse débute à partir d'une unité activée, l'isopentényl-pyrophosphate ou IPP.

1-Extraction des huiles essentielles (composés terpéniques volatils)

L'hydro-distillation est basée sur l'entraînement des substances volatiles présentes dans les plantes, grâce à la vapeur d'eau. Une quantité, bien déterminée du matériel végétal (coupé en parties très fines), est portée à ébullition dans de l'eau distillée pendant trois heures. Pendant l'ébullition, les cellules végétales éclatent et libèrent leurs contenus. La vapeur dégagée, chargée de l'eau et des huiles, se condensent. Enfin, deux phases se forment et par la différence de densités, les huiles se déposent au dessus de l'eau. L'HE (huile essentielle) obtenue est séparée de la phase aqueuse à l'aide d'une aiguille d'une seringue. Les HE obtenues sont conservées dans des flacons opaques fermés hermétiquement à l'abri de la lumière et à une température de 4 à 6 °C.

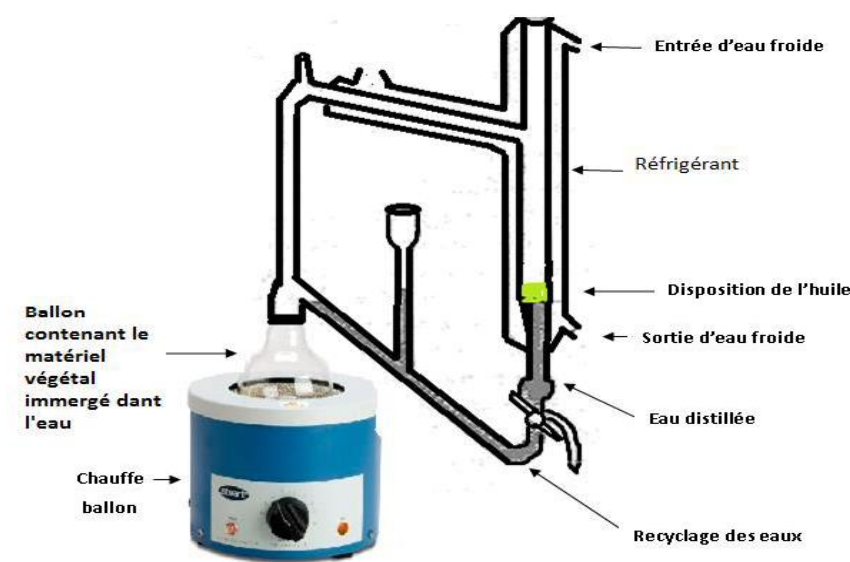


Figure 20 : Extraction des huiles essentielles

3.3. Alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèse et d'activités pharmacologiques. Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées d'origine végétale, à caractère alcalin.

Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques, la plupart du temps à partir des acides aminés tels que la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane. Quelques structures sont

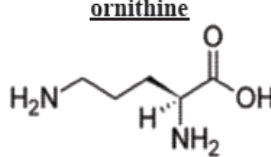

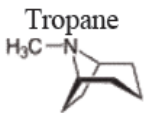
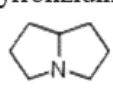
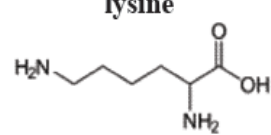

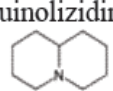
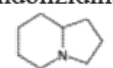
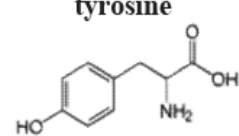
relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes on les divise en (tableau5) :

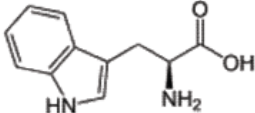
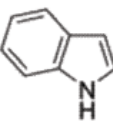
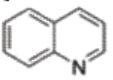
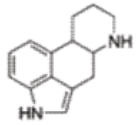
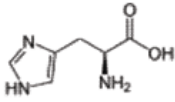

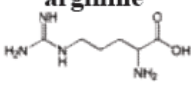
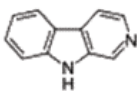
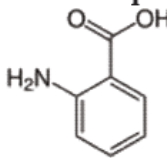
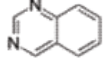
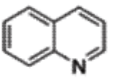
- **Alcaloïdes vrais** : qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique, existent dans la plante sous forme de sels, ont pour origine biosynthétique un acide aminé et sont dotées d'une activité pharmacologique significative

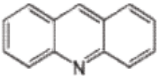
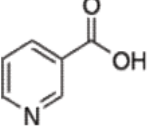


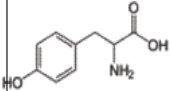
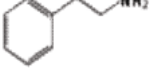
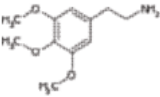
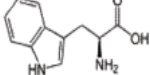
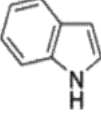
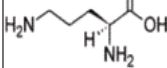

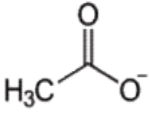

- **Pseudo-alcaloïdes** : qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais, excepté leur origine biosynthétique. Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate

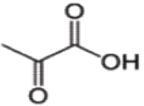
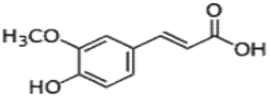
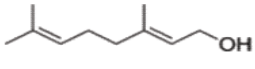
- **Proto-alcaloïdes** qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, les bétalaïnes, les porphyrines.

Tableau 5: Classification des alcaloïdes

ALCALOÏDES VRAIS			
Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
<p>L-ornithine</p> 	Alcaloïdes pyrrolidiniques	<p>Pyrrolidine</p> 	Cuscohygrine, Hygrine
	Alcaloïdes tropaniques	<p>Tropane</p> 	Atropine, Cocaïne, Hyoscyamine, Scopolamine
	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	<p>Pyrrolizidine</p> 	Acétyl-lycopsamine, Europine, Homospermidine, Ilamine, Mételoidine, Rétronécine
<p>L-lysine</p> 	Alcaloïdes pipéridiniques	<p>Pipéridine</p> 	Anaférine, conine, Lobélanine, Lobéline, Pelletière, Pipéridine, Pipérine, Sédamine
	Alcaloïdes quinolizidiniques	<p>Quinolizidine</p> 	Cytisine, Lupinine, Spartéine
	Alcaloïdes indolizidiniques	<p>Indolizidine</p> 	Castanospermine, Swansonine
<p>L-tyrosine</p> 	Alcaloïdes tétrahydroisoquinoliniques simples	<p>Benzyltétrahydroisoquinoline</p>	Codéine, Morphine, Norcoclaurine, Papavérine, Tétrandine, Thébaïne, Tubocurarine
<p>L-tyrosine ou L-phénylalanine</p>	Alcaloïdes phényléthylisoquinoliniques	Alcaloïdes des Amaryllidacées	Crinine, Floramultine, Galantamine, Lycorine

<p>L-tryptophane</p> 	Alcaloïdes indoliques	<p>Indole</p> 	Arundacine, Psilocine, Sérotonine, Tryptamine, Zolmitriptan - Elaeagnine, Harmine - Ajmalicine, Catharantine, Tabersonine
	Alcaloïdes quinoléiniques	<p>Quinoléine</p> 	Chloroquinine, Cinchonidine, Quinine, Quinidine
	Alcaloïdes pyrroloindoliques	<p>Indole</p>	A-yohimbine, Chimonanthéine, Corynanthéidine
	Alcaloïdes de l'ergot de seigle	<p>Ergoline</p> 	Ergotamine, Ergokryptine
<p>L-histidine</p> 	Alcaloïdes imidazoliques	<p>Imidazole</p> 	Histamine, Pilocarpine, Pilosine
	Alcaloïdes manzaminiques	<p>Xestomanzamine</p>	Xestomanzamine A et B
<p>L-arginine</p> 	Alcaloïdes marins	<p>β-carboline</p> 	Saxitoxine, Tétrodotoxine
<p>Acide anthranilique</p> 	Alcaloïdes quinazoliniques	<p>Quinazoline</p> 	Péganine
	Alcaloïdes quinoléiniques	<p>Quinoléine</p> 	Acutine, Bucharine, Dictamine, Folioline, Perforine, Skimmianine

	Alcaloïdes acridoniques	Acridine 	Acronycine, Rutacridone
Acide nicotinique 	Alcaloïdes pyridiniques	Pyridine  Pyrrolidine 	Anabasine, Cassinine, Evoline, Nicotine, Wilforine
PROTO-ALCALOÏDES			
Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
L-tyrosine 	Alcaloïdes phényléthylaminés	Phényléthylamine 	Adrénaline, Anhalamine, Dopamine, Noradrénaline, Hordenine, Mescaline : 
L-tryptophane 	Alcaloïdes indoloterpéniques	Indole 	Yohimbine
L-ornithine 	Alcaloïdes pyrrolizidiniques	Pyrrolizidine 	4-hydroxy-stachydrine, Stachydrine
PSEUDO-ALCALOÏDES			
Précurseur	Groupe d'alcaloïdes	Noyau caractéristique	Exemples
acétate 	Alcaloïdes pipéridiniques	Pipéridine 	Coniine, Conicéine, Pinidine
	Alcaloïdes sesquiterpéniques	Sesquiterpène	Cassinine, Évonine, Maymysine, Wilforine

<p>acide pyruvique</p> 	Alcaloïdes de l'Ephédra	Phényle C	Cathine, Cathinone, Ephédrine, Noréphédrine
<p>acide férulique</p> 	Alcaloïdes aromatiques	Hényle	Capsaïcine
<p>géraniol</p> 	Alcaloïdes terpéniques	Terpénoides	Aconine, Aconitine, Méthyllycaconitine, Actinidine, Atisine, Gentianine
<p>saponines</p>	Alcaloïdes stéroïdiques		Cholestane, Conessine, Jervine, Etioline, Prégnénolone, Solanidine

➤ Extraction des alcaloïdes

a) Extraction par un solvant en milieu alcalin

Les alcaloïdes totaux sont obtenus par le protocole d'extraction des alcaloïdes qui consiste dans un premier temps à une extraction solide-liquide de la poudre végétale à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 5% et du dichlorométhane (CH_2Cl_2); et dans un deuxième temps, à une extraction liquide/liquide de la solution organique obtenue par une solution d'acide chlorhydrique à 3%. Les phases aqueuses acides obtenues successivement, ont été alcalinisées par une solution d'ammoniaque (NH_4OH) à 25%, puis extraites de nouveau par le dichlorométhane. Les phases organiques sont alors séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis évaporées à sec, et nous obtenons pour chaque extrait un mélange d'alcaloïdes appelé alcaloïdes totaux

b) Extraction par un solvant en milieu acide

Deux cas peuvent se présenter: dans le premier, la plante ou partie de la plante pulvérisée est directement épuisée par de l'eau acidifiée; dans le second cas, c'est avec une solution alcoolique ou hydro-alcoolique acidifiée qu'est réalisé l'épuisement, l'extraction est suivie d'une distillation sous vide qui élimine l'alcool et laisse une solution aqueuse acide de sels d'alcaloïdes. Dans les deux cas, on a donc une solution aqueuse de sels d'alcaloïdes qu'il faut purifier. On peut :

- Alcaliniser la solution et extraire les bases par un solvant organique non miscible

- Fixer sélectivement les alcaloïdes contenus dans la solution sur une résine échangeuse d'ions puis les éluer à l'aide d'un acide fort.

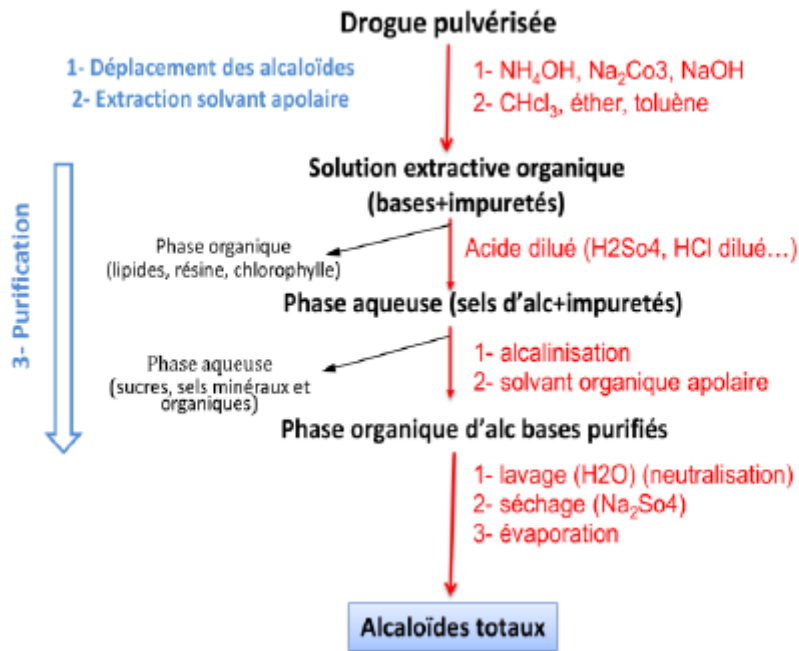


Figure 20: Protocole d'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcalin

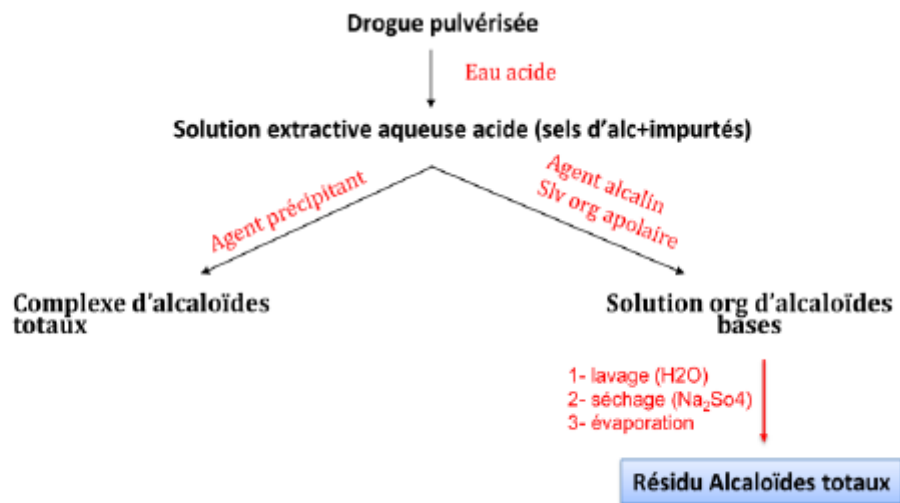


Figure 21: Protocole d'extraction des alcaloïdes dans l'eau acide

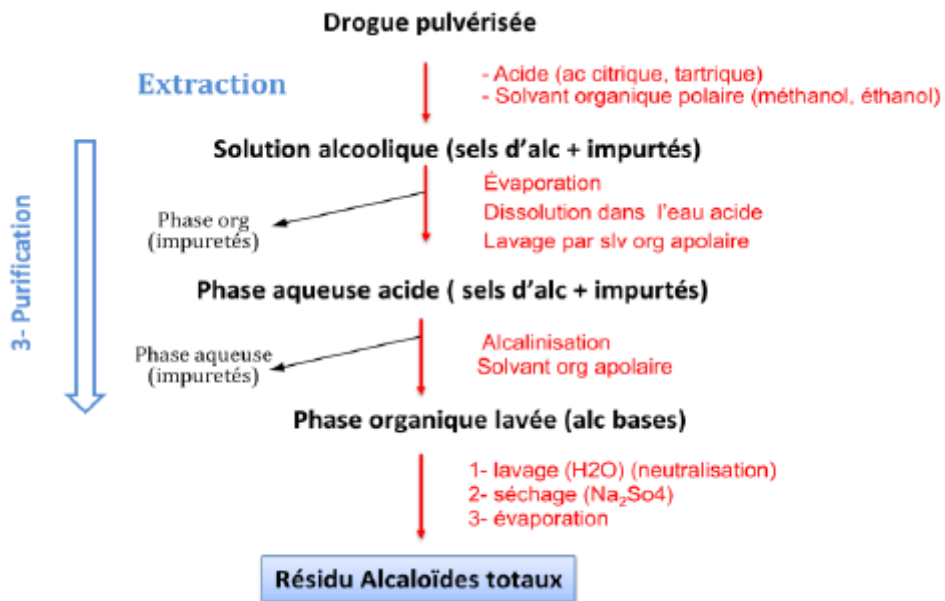


Figure 22: Protocole d'extraction des alcaloïdes dans un milieu acide

Chapitre II – Biochimie des substances d'origine animale

1. Constituants des liquides biologiques

1.1. Lait

Le lait « un liquide biologique de couleur généralement blanchâtre produit par les mamelles des mammifères femelles, aliment de grande valeur nutritive.

Le lait de mammifères présente des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants (eau, protéines, lactose, matières grasses et minérales) mais à des proportions différentes d'une espèce à une autre, surtout pour les protéines, lipides et minéraux, ceci est constaté également à l'intérieur d'une même espèce, voire à l'intérieur des types ou des races d'espèces identiques

1.1.1. Valeur nutritionnelle

Importance économique

Les besoins nutritionnels en lait sont de l'ordre de 3 milliards de litres/an (cas de l'Algérie). Production nationale couvre 40% (80% de bovine). Le coût de l'importation est évalué 600 millions de Dollars/an (1/5 de nos importations totales)

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait est caractérisé par différentes phases instables

- Une phase aqueuse (lactosérum) contenant en solution des molécules de sucre (lactose), des ions et des composés azotés (protéines solubles) et des vitamines hydrosolubles;
- Des phases colloïdales instables, constituées de colloïdes protéiniques (protéines insolubles en particulier caséine);
- Des globules gras (matière grasse + vitamines liposolubles) en émulsion dans la phase aqueuse.

1.1.3. Composition globale

La composition globale du lait (diagramme 1) ne fait apparaître que les grandes catégories de ses constituants et les valeurs données sont des valeurs moyennes. 100 g de lait contient 87 g d'eau et 13 g de matières sèches.

Les principaux constituants de la matière sèche du lait sont

Diagramme 1 : Composition chimique globale du lait (en g par litre de lait)

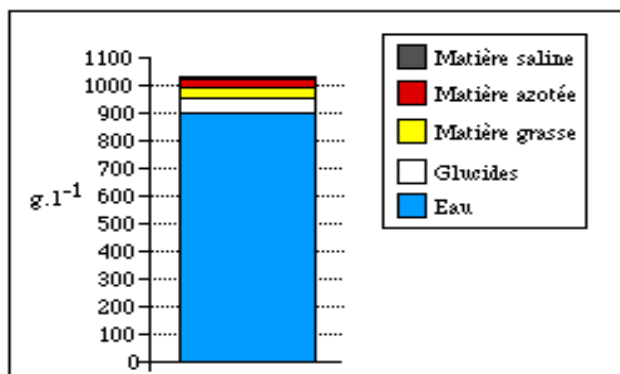


Tableau 6 : Composition de lait humain (g/l)

Protéines	Moyennes	Valeurs extrêmes
Protéines totales	10,60	7,30-20,00
Caséines	3,70	1,40-6,80
Protéines solubles	6,90	4,00-10,00
α-lactalbumine	3,60	1,40-6,00
Lactoferrine	1,50	1.00 3 20
Lysozyme	0,1 2	0, 04 - 0.21
Albumine sérique	0,50	0,20-0,97
IgA sécrétoires	1,00	0,60- 1,60
IgG	0,01	-
IgM	0,01	-
IgD	-	-

✓ **Composition de la matière sèche**

➤ **La matière azotée**

On distingue deux groupes de matières azotées dans le lait : les protéines et les matières azotées non protéiques.

➤ Les protéines

Les protéines constituent un ensemble partagé en deux grandes fractions d'après leur précipitation en milieu acide à pH 4,6. La fraction des caséines coagule dans ces conditions tandis que les autres protéines restent solubles (protéines sériques ou protéines du lactosérum).

• Caséines

Celles-ci sont des glycoprotéines phosphorylées séparées à l'électrophorèse et identifiées d'après leur pouvoir de migration en caséine alpha, bêta, et kappa. Les caséines se constituent en micelles, ce qui les rend plus accessibles à la digestion carboxypeptidasique dans l'intestin.

a) Caséine alpha S1

C'est une molécule qui représente entre 34 et 40% des caséines soit entre 10 et 13g par litre de lait. Elle renferme 199 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 23kDa. Elle est constituée de 2 régions hydrophobes, séparées par une région hydrophile très chargée contenant 8 groupes de phosphate, ce qui en fait la protéine la plus chargée du lait

b) Caséine alpha S2

C'est une molécule qui représente entre 12 et 16% des caséines soit entre 4 et 5g par litre de lait. Elle renferme 207 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 25 kDa. La caséine S2 est la plus hydrophile des caséines et sera très sensible à l'action des ions calcium

c) Caséine bêta

La caséine bêta représente entre 37 et 42% des caséines soit entre 9 et 11g par litre de lait. C'est une molécule qui est constituée de 209 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 24 kDa. Elle est composée d'une région N-terminale hydrophile très chargée négativement et d'une région C-terminale hydrophobe, ce qui lui donne une structure amphiphile. C'est la plus hydrophobe des protéines. La caséine bêta peut subir l'action des protéases et donner des fragments que l'on appelle **caséine gamma**. Ces molécules représentent entre 3 et 5% des caséines soit entre 1 et 2g par litre de lait.

d) Caséine kappa

La caséine kappa représente 8 à 15% des caséines soit 3 à 4g par litre de lait. Elle est constituée de 169 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire voisine de 19 kDa. Elle contient une région N-terminale hydrophobe et une région C-terminale hydrophile faiblement chargée. C'est un copolymère amphiphile. Elle permet de stabiliser les autres caséines.

➤ Les interactions entre les différentes caséines

Les caséines sont organisées en particules sphériques de 0.050 μm ($5 \cdot 10^{-8}$ m) à 0.300 μm ($30 \cdot 10^{-8}$ m) de diamètre. Ces particules sont appelées " **micelles** " de caséines. La micelle de caséines est formée par la combinaison d'environ 92% de protéines (α s1, α s2, β et κ), de quelques fragments peptidiques provenant de la protéolyse de la caséine β et de 8% de produits minéraux dont les principaux sont les phosphates de calcium, plus souvent appelés phosphates de calcium colloïdal (CCP) qui assurent en partie la cohésion.

Le lait contient environ 10^{15} micelles par litre. La micelle est en fait constituée par **un agrégat de submicelles**. Les agrégats sont de petites dimensions : 0.08 à 0.12 μm . Chaque submicelle est formée de 25 à 30 molécules de caséines alpha, beta et kappa. Le cœur de la submicelle est probablement très hydrophobe alors que la surface a un caractère hydrophile les ions calcium assurant ainsi un pontage entre les différentes submicelles

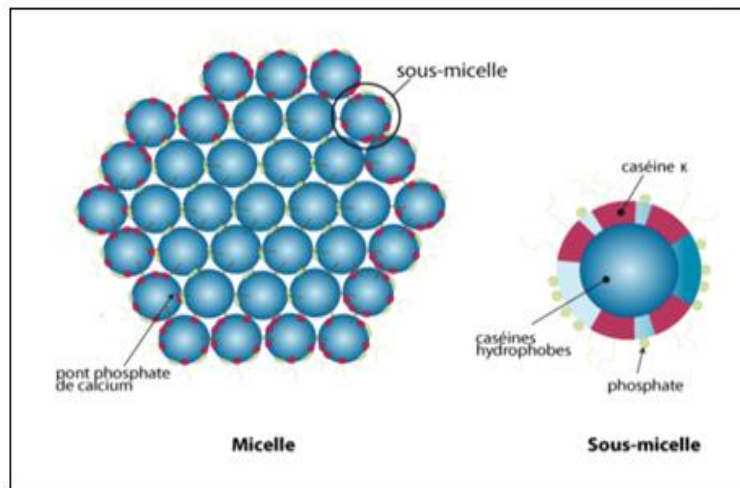


Figure 23 : Structure de micelle

➤ Stabilité de la micelle de caséine

La micelle de caséine est un édifice instable en fonction des conditions du milieu. Elle est plus particulièrement instable sous l'action du pH, de la température et de la protéolyse (figure24).

1) Action des enzymes

De nombreux systèmes enzymatiques sont susceptibles d'entraîner la modification de la structure des caséines.

➤ **Action de la chymosine** : c'est une enzyme (EC 3.4.23.4) encore dénommée présure qui est utilisée dans la coagulation du lait pour le secteur fromager. La chymosine est une protéase qui est obtenue à partir de la quatrième poche (abomassum ou caillette) de l'estomac des ruminants (polygastriques) dans les premières semaines après la naissance des animaux non sevrés.

✚ Cette chymosine est en présence de pepsine mais dans des rapports qui vont varier selon l'âge et l'alimentation. Chez le veau allaité, le rapport chymosine/pepsine est voisin de 1,4 alors que chez le bovin adulte ce rapport est inférieur à 0,15.

✚ Le mécanisme d'action de la chymosine est le suivant : l'attaque de la chymosine se fait essentiellement au niveau des acides aminés volumineux et hydrophobes (Phé, Leu, Tyr). La chymosine va déstructurer la micelle de caséine en intervenant plus spécifiquement au niveau de la caséine kappa qui joue le rôle de colloïde protecteur et produire une coagulation des protéines du lait. La chymosine coupe **une seule liaison peptidique** dans la **caséine kappa**. Il s'agit de la liaison entre Phe¹⁰⁵ et Met¹⁰⁶. La protéine est donc coupée en deux fragments. Un des fragments, la **para-kappa caséine**, basique et hydrophobe, reste attaché à la micelle. L'autre fragment est libéré dans le lactosérum. Ce fragment soluble, appelé **kappa-caséine macropeptide**, est porteur de résidus osidiques, qui lui confère son caractère soluble dans l'eau. La perte des résidus osidiques à la surface des micelles augmente le caractère hydrophobe de celles-ci, elles établissent des interactions hydrophobes et il se forme un gel.

2) Action du pH

La micelle de caséine est stable au pH normal du lait (pH 6,8) et à température ambiante. Quand il y a acidification du milieu il se produit une gélification des protéines. A pH 4,6, le complexe micellaire est détruit et les caséines s'assemblent et précipitent sous la forme d'un coagulum.

✚ Mécanisme d'action des bactéries lactiques

La précipitation sous l'action des **bactéries lactiques** (lactobacilles, streptocoques lactiques) provient d'un abaissement du pH du lait. Le pH initial du lait de vache est 6,6 - 6,7. Les bactéries présentes au départ dans le lait, se multiplient dans le milieu et consomment le

lactose comme sucre producteur d'énergie. Le lactose est dégradé en acide lactique. Le pH diminue du fait de la production d'acide et la caséine précipite le pH atteint 4.8 - 4.6.

3) Action de la température

A haute température, il y a cassure des interactions phosphocalciques sans déphosphorylation des résidus de sérine. Il s'en suit plutôt une désorganisation du granule de phosphate. Un chauffage à 120°C pendant 20 minutes entraîne une déphosphorylation à 80% des caséines β .

Au cours d'un chauffage à 90°C, la β lactoglobuline vient s'associer avec la kappa caséine des micelles soit par des ponts disulfure soit par des interactions hydrophobes. Le complexe kappa caséine- β lactoglobuline se sépare de la micelle si le pH est supérieur à pH 6,9 et entraîne une coagulation du lait par déstructuration de la micelle de caséine. Au cours du chauffage, les protéines du lactosérum vont venir s'adsorber sur les micelles en entraînant une diminution du taux des protéines solubles, une augmentation de la taille des micelles et une augmentation de viscosité.

- **Lactosérum**

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 lait: 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.). Les protéines du lactosérum 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 La proportion des différentes protéines solubles dans le lactosérum est la suivante :

- ✓ **Protéines du lactosérum**

- **β -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);

- **α -lactoglobuline** dite aussi α -lactalbume (22 %), de masse moléculaire voisine de 14174 Da, elle représente le facteur de régulation du système enzymatique du lactose synthétase, son

pHi est de 4.8; cette protéine est riche en tryptophane facteur de régulation du système enzymatique de la lactose synthétase.

- **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);

- **Sérumalbumine** (5 %);

- **Protéoses peptones** (10 %) : on en distingue 2 classes principales: composants issus de la protéolyse enzymatique de la caséine β (β -CN-5P de 14300Da et β -CN-1P de 9900 Da et β -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.

✓ **Lactose** : il s'agit du β - D - galactopyranosyl (1-4) D - glucopyranose α ou β . En solution, la mutarotation amène le mélange β/α 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.

✓ **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.

✓ **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 (B2) qui lui donne sa couleur verdâtre, l'acide pantothénique, la thiamine (B1), la pyridoxine (B6), ainsi que la vitamine C.

✓ **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.

- **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.

➤ **Les techniques de stérilisations de laits**

• **Laits de consommation**

Le lait cru n'est pas de bonne conservation ; il est facilement altéré, surtout par les bactéries qui dégradent le lactose avec production d'acide. Une faible acidification suffit à rendre le lait coagulable à l'ébullition. En outre le lait cru peut apporter des germes pathogènes pour l'homme. D'où la nécessité d'un traitement thermique.

✚ **Laits pasteurisé**

On chauffe le lait afin de réduire la flore banale et de réduire les germes pathogènes. Le traitement usuel est de 15 à 20 secondes à 72-75°C ; il permet de détruire le bacille de Koch (Mycobacterium tuberculosis) et d'inactiver la phosphatase alcaline. Dans ces conditions, l'effet sur les constituants du lait est nul, en dehors d'une faible perte de thiamine et de vitamine C.

✚ **Lait stérilisé**

La méthode de stérilisation en bouteille closes, 20 minutes à 118-120°C, fait subir au lait des modifications assez importantes. Les caséines sont partiellement déphosphorylées, les protéines du sérum sont complètement dénaturées. Des interactions protéines-lactose produisent brunissement. Le goût de cuit apparaît. L'équilibre minéral Ca/P est déplacé vers la forme insoluble. La couche de surface des micelles est modifiée et leur stabilité est réduite.

✚ **Lait HUT**

C'est le traitement de lait à haute température (UHT) pendant un temps très court pour atteindre la stérilisation avec très peu de modification. Les conditions retenues vont de 5 à 10 secondes et de 140 à 150°C, avec montée et descente en températures instantanées. Le lait

UHT est blanc, à bon gout et n'est guère plus modifié qu'un lait pasteurisé ; il peut se conserver plusieurs mois à température ambiante. Les transformations qui peut subir un lait au cours de l'obtention d'un fromage sont dans la figure 24:

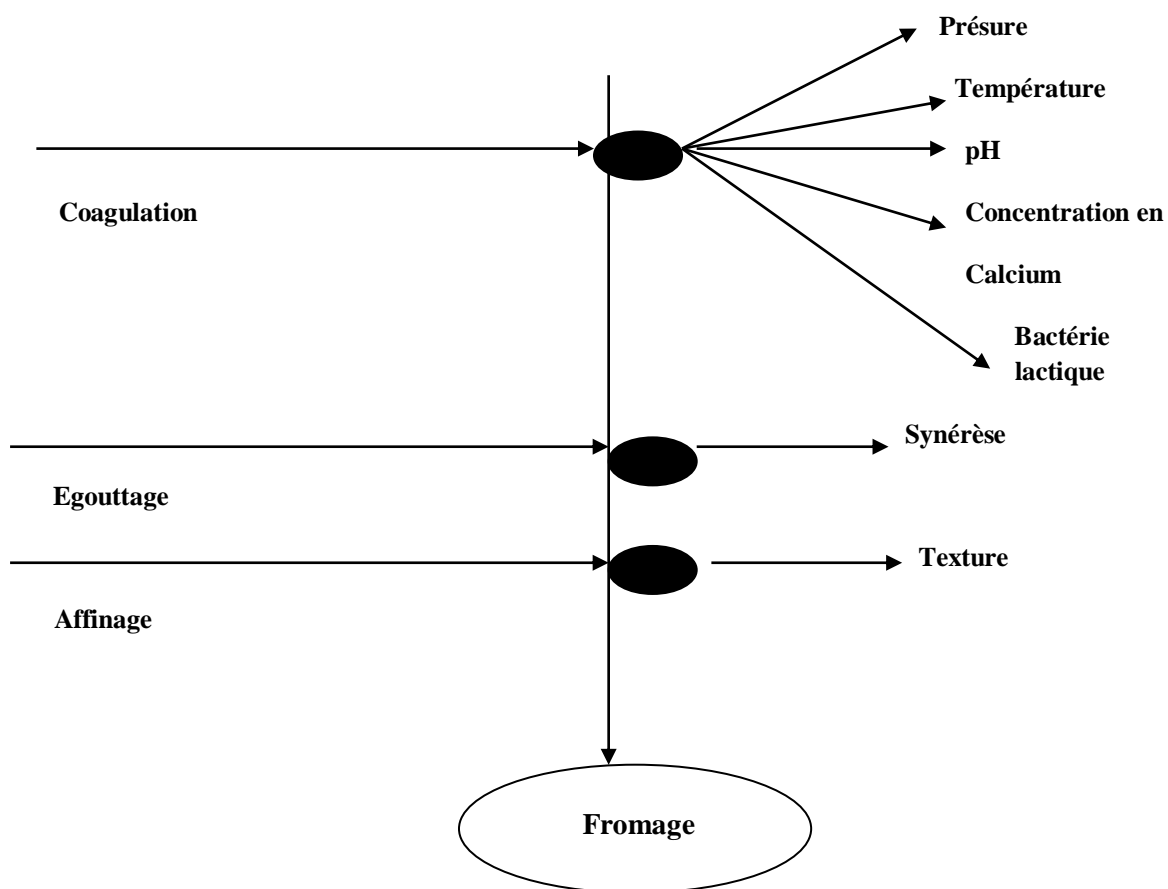


Figure 24: Transformation du lait

Egouttage : L'égouttage c'est la façon de séparer le petit-lait (liquide) du caillé (solide).

Synérèse : définit la séparation d'un liquide de son gel.

Affinage : est la période de maturation pendant laquelle le fromage, ou d'autres aliments, reposent et reçoivent des soins à la cave ou dans un hâloir.

1.2. Sang

1.2.1. Sang total, plasma et sérum

Le sang est un liquide visqueux faiblement alcalin et de saveur salée. Il est opaque et sa couleur varie en fonction de son oxygénation, son volume représente 8 % du poids du corps, le volume sanguin chez un homme est de 5-6 L et de 4-5 L chez une femme.

Le sang frais, utilisé immédiatement après prélèvement est dénommé « sang total ». Le sang total est constitué d'un liquide biologique, le plasma contenant toutes les cellules sanguines et le fibrinogène. Ces cellules ou « éléments figurés du sang » sont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes obtenus lorsque la coagulation est empêchée par l'utilisation d'un anticoagulant. En revanche, si la coagulation a eu lieu, la fraction liquide obtenue après centrifugation est appelée sérum (ne contient plus de fibrinogène, alors utilisée pour la polymérisation du monomère de fibrine en caillot lors de la coagulation)

Il se compose en 2 parties : le plasma et les éléments figurés du sang

a) Plasma

C'est la partie liquide du sang dans laquelle sont suspendues les cellules sanguines. Il se présente sous forme d'un liquide jaunâtre qui contient par litre:

- De l'eau à 91 % ;
- Des substances organiques = nutriments (protides : 75 g ; lipides = 6 g ; glucides : 1 g) ;
- Des produits de déchets = substances intermédiaires du métabolisme : acide urique et urée ; acide lactique ;
- Eléments minéraux : K⁺, Ca⁺, Mg, Ph, Cl⁻, bicarbonates ;
- Gaz dissout : O₂, CO₂, fibrinogène ;
- Vitamines.

b) Les éléments figurés du sang

Les globules rouges

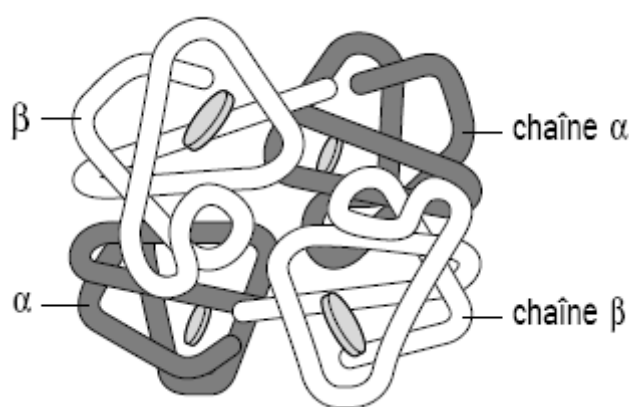
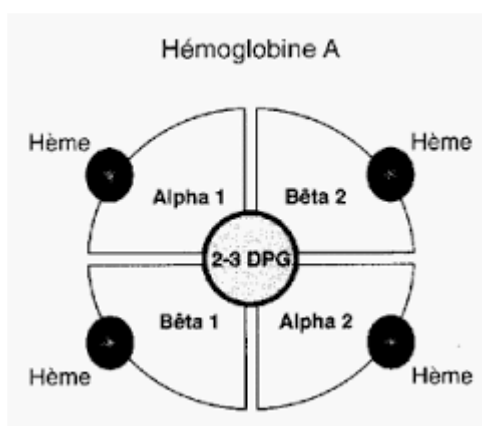
Appelés aussi hématies. Ils permettent d'apporter de l'oxygène à tous les tissus de l'organisme (par les artères) et d'évacuer vers le poumon le gaz carbonique (CO₂), déchet des tissus (par les veines). Ils sont au nombre de 4 à 5,5 millions / mm³. Ils ne contiennent quasiment que de l'hémoglobine qui permet de fixer les gaz (oxygène et gaz carbonique). Le taux

d'hémoglobine se mesure, sa normale est de 12 à 16 g/dl. C'est ce taux d'hémoglobine qui permet de parler d'anémie en cas de déficit de cette protéine.

- **Hémoglobine (Hb)**

- **Structure** : est une protéine globulaire oligomérique constituée d'un groupement prosthétique : l'hème (4%) et d'une protéine appelée globine (96%). Sa molécule est grossièrement sphérique avec un diamètre égal à 5,5 nm.

- **L'hème** : comporte une molécule de protoporphyrine et un atome de fer. En fait, l'hémoglobine contient 4 hèmes dans les quels les atomes de fer sont sous forme ferreux (Fe⁺⁺). A l'état ferrique (Fe⁺⁺⁺), l'hème devient hématine.

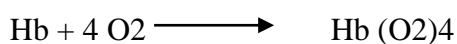


- **La globine**

Elle est formée de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes α (141 acides aminés) et 2 chaînes β (146 acides aminés) ayant des structures tertiaires presque identiques.

- ✓ **Fixation de l'oxygène (oxygénation)**

Une molécule d'hémoglobine peut fixer 4 molécules d'oxygène (O₂) selon un mécanisme d'oxygénation (coopérativité positive).



Désoxy Hb Oxy Hb

- ✚ **Globules blancs**

Ils sont beaucoup moins nombreux que les globules rouges, environ 4000 à 10000/mm³. Ils assurent la défense de l'organisme contre les agressions extérieures: bactéries, virus, parasites

mais aussi les tissus étrangers (greffes). Il existe plusieurs sortes de globules blancs: les polynucléaires neutrophiles, les plus nombreux, qui combattent les bactéries, les lymphocytes (combattent virus, tuberculose, tissus étrangers, fabriquent les anticorps), les monocytes (sorte de glouton qui détruit un peu de tout), les polynucléaires éosinophiles (normale < 500/mm³, combattent les parasites et sont à l'origine des allergies) et enfin les polynucléaires basophiles dont le rôle est très peu connu et qui sont peu nombreux.

Plaquettes

Parfois appelés thrombocytes. Ce sont de tous petits éléments, la normale est de 150000 à 400000/mm³. Ils permettent au sang de coaguler en cas d'effraction d'un vaisseau. En cas de défaut de plaquettes, on a tendance à saigner facilement.

➤ **Protéines plasmatiques**

Les protéines sériques totales comprennent les albumines et les globulines. Le plasma contient en plus une protéine fibreuse, le fibrinogène. L'albumine est une holoprotéine et les autres sont des hétéroprotéines

a) Albumine

Elle représente 60% des protéines plasmatiques. C'est une holoprotéine d'une seule chaîne peptidique de 564 acides aminés. Elle a un pHi de 4,7. Elle est synthétisée par le foie. Elle a une demi-vie de 15 à 20 jours.

- **Rôles :** elle assure
 - Maintien de la pression oncotique
 - Transport des hormones thyroïdiennes
 - Transport d'autres hormones, en particulier les hormones liposolubles
 - Transport des acides gras libres
 - Transport de nombreuses drogues
 - Lie de manière compétitive les ions calcium (Ca²⁺)
 - Tampon pH

b) Globulines

Elles sont synthétisées par le foie. Ce sont des hétéroprotéines qui sont soit des glycoprotéines, soit des lipoprotéines, soit des métalloprotéines.

- **α 1-globulines**

- ✚ **L' α 1-antitrypsine** : Principal inhibiteur de la trypsine mais aussi d'autres enzymes protéolytiques.

- ✚ **L'orosomucoïde** : C'est la coenzyme de la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les chylomicrons.

- ✚ **Prothrombine**

-Il s'agit du Facteur II activé ; C'est une sérine protéase qui va catalyser la transformation du fibrinogène en fibrine. Elle active également les facteurs VII (de la voie extrinsèque), V et VIII (cofacteurs des facteurs Xa et IXa respectivement) et XIII. Il s'agit d'un facteur vitamine K dépendant.

- **α -2-Globulines**

- ✚ **Haptoglobuline**

C'est une glycoprotéine très riche en glucides. Elle a la capacité de se lier à l'hémoglobine de façon équimolaire pour former un complexe. HPT-Hb à la suite d'une hémolyse permettant de conserver le fer de l'hémoglobine.

- ✚ **Macroglobulines**

Protéine synthétisée par le foie. Elle forme des complexes avec différentes enzymes protéolytiques circulantes. Au cours de la réaction inflammatoire, elle semble inhiber les enzymes lysosomiales libérées.

- ✚ **Céruleplasmine**

Elle synthétisée au niveau du foie, transporte 90% du cuivre de l'organisme

- **β -Globulines**

- ✚ **Transferrine**

C'est une métalloprotéine synthétisée dans le foie essentiellement. Elle assure le transport du fer sérique.

- ✚ **Fibrinogène (facteur I)**

Glycoprotéine allongée constituée de six chaînes polypeptidiques identiques deux à deux. Elle peut se polymériser sous l'effet de la thrombine pour constituer un réseau tridimensionnel de fibrine.

- **γ -Globulines**

- **Globulines de défense ou immunoglobulines**

Il existe cinq classes d'immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

- **Processus de coagulation**

- **Hémostase normale**

Une hémostase normale est nécessaire pour que le sang reste contenu à l'intérieur du système vasculaire. Elle passe par l'interaction entre les vaisseaux, les plaquettes et les facteurs de coagulation, et enfin par la limitation du caillot de fibrine et la fibrinolyse. Les troubles de l'hémostase et de la coagulation sont dus à une défaillance des mécanismes hémostatiques.

- **Hémostase primaire**

La paroi vasculaire est la première ligne de défense pour l'hémostase normale. Dans les petits vaisseaux, l'hémostase est assurée en premier lieu par la vasoconstriction. Lorsque l'endothélium vasculaire est lésé, les plaquettes adhèrent au collagène, et à la membrane basale qui se trouvent exposés. Une fois que les plaquettes adhèrent au tissu sous-endothélial, elles libèrent divers médiateurs. Certains de ces médiateurs favorisent la vasoconstriction et tous attirent les autres plaquettes qui vont former un agrégat appelé clou plaquettaire. Le facteur plaquettaire III est exposé pendant la formation du clou plaquettaire et accélère la formation de la thrombine (caillot).

- **Hémostase secondaire**

La coagulation sanguine consiste en une série de réactions enzymatiques dans lesquelles interviennent les protéines plasmatiques (tableau7), les phospholipides et les ions calcium, qui transforment le sang total circulant en un gel insoluble en le piégeant dans un réseau de fibrine. Le mécanisme de la coagulation sanguine comporte toute une série d'étapes, ou cascades, dans lesquelles des protéines plasmatiques spécifiques appelées facteurs de coagulation sont activées les unes après les autres. Les facteurs de coagulation sont souvent désignés par un numéro (I, II, III, etc.) et certains portent un nom, et le facteur anti-hémolytique (facteur VIII). Deux cascades distinctes impliquant des facteurs de coagulation différents, les voies intrinsèque et extrinsèque, peuvent être déclenchées séparément au cours du processus de coagulation, mais conduisent toutes deux à la transformation d'une protéine soluble, le fibrinogène, en caillot de fibrine

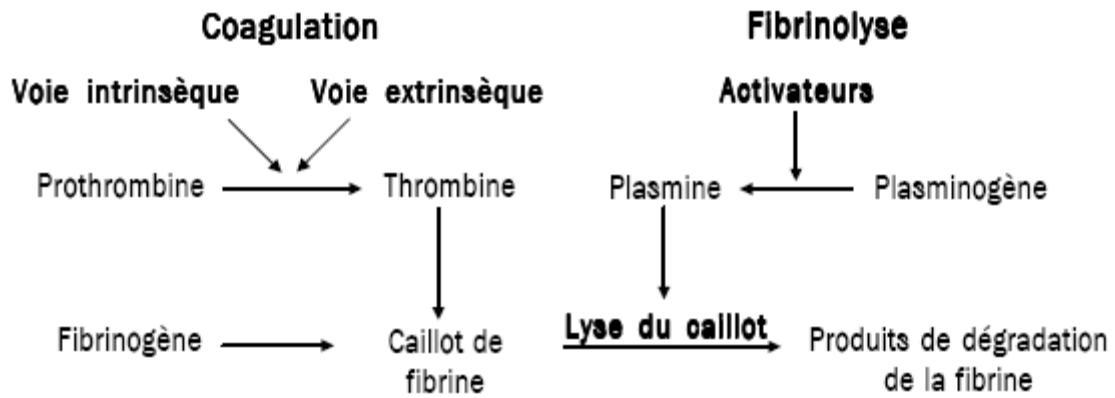


Figure25: Processus de coagulation sanguine

➤ Fibrinolyse

Dans l'hémostase normale, le processus de limitation du caillot peut faire intervenir plusieurs mécanismes, dont les plus importants sont :

- 1- L'élimination, par le flux sanguin au-delà du caillot, des facteurs de coagulation activés.
- 2- L'inactivation des facteurs de coagulation par des inhibiteurs circulants.
- 3- La consommation des plaquettes et des facteurs de coagulation par le processus de coagulation lui-même.
- 4- La dégradation du caillot par une enzyme fibrinolytique, la plasmine (fibrinolyse). La fibrinolyse repose sur l'activation séquentielle de protéines plasmatiques spécifiques conduisant à la formation de plasmine, une enzyme protéolytique. La fonction de la plasmine est de dissoudre le caillot de fibrine qui s'est formé dans le vaisseau. Ces mécanismes contrebalancent le processus de coagulation et empêchent une coagulation incontrôlée du sang. S'ils sont défectueux, il se produit une coagulation anormale (thrombose).

○ Différents types d'anticoagulants sont utilisés pour préparer le plasma

Pour réduire les interférences, plusieurs anticoagulants peuvent être utilisés.

• Sels d'héparines (héparinate de lithium, héparinate d'ammonium)

Les sels d'héparine sont très utilisés pour l'obtention de plasma. Attention, il faut tenir compte du sel utilisé pour éviter les interférences. Par exemple, les sels de lithium ne peuvent pas être utilisés pour le dosage du lithium, les sels d'ammonium ne peuvent pas être utilisés, ni pour le dosage de l'ammonium, ni pour le dosage de l'urée.

- **EDTA**

L'EDTA est l'acide éthylène diamine tetra-acétique. Il inactive le calcium nécessaire à la coagulation, ainsi que d'autres ions comme le magnésium, en formant un complexe inactif. Il ne peut donc pas être utilisé pour doser le calcium, le magnésium et certains métaux lourds (plomb).

- **Citrate de sodium**

Le citrate de sodium inhibe également le calcium. Le citrate est souvent utilisé pour obtenir du plasma en vue d'examens de la coagulation ou pour la mesure de la vitesse de sédimentation. Il ne peut pas être utilisé, par exemple, pour le dosage du sodium.

- **Inhibiteurs de la consommation du glucose (fluorure de sodium, iodoacétate)**

Entre le prélèvement et la préparation du plasma, les cellules sanguines présentes dans le tube sont vivantes et continuent la consommation du glucose et du lactate contenu dans le plasma. Elles réduisent donc leur concentration et faussent l'interprétation de leur dosage. Pour un dosage correct qui ne tient pas compte de ce phénomène, il est nécessaire d'empêcher la consommation de ces composés par les cellules. Le fluorure de sodium ou l'iodoacétate inhibent cette consommation et peuvent être utilisés conjointement à un autre anticoagulant pour le dosage de paramètres comme le glucose et le lactate.

Les tubes pour la préparation du plasma distribués par les fournisseurs contiennent déjà leurs anticoagulants. Un code de couleur international pour le bouchon a été mis en place pour la détermination aisée du type d'anticoagulant utilisé.

Tableau 6: Facteurs de la coagulation sanguine

Facteur	Nom
I	Fibrinogène
II	Prothrombine
III	Facteur tissulaire ou thromboplastine tissulaire
IV	Calcium
V	Proaccélérine (Facteur labile)
VI	Accelerine
VII	Proconvertine (Facteur stable)
VIII	Facteur Antihémophilique A, Globuline antihémophilique
IX	Facteur Antihémophilique B, composant de la thromboplastine plasmatique, Facteur Christmas.
X	Facteur Stuart-Prower
XI	Antécédent de la thromboplastine plasmatique, Hémophilie C, Facteur Rosenthal.
XII	Facteur Hageman.
XIII	Facteur stabilisant la fibrine. Facteur Laki-Lorand.

➤ **Valorisation des composés du sang**

Contrairement à la plupart des coproduits animaux, le sang a connu un grand succès commercial à la fois par rapport à sa collecte et sa transformation. Du fait de sa richesse en protéines (17% en moyenne), on considère parfois le sang comme une « viande liquide ». En effet, il se compose de 60-70% p/p de plasma et de 30-40% p/p de cellule rouges. Le plasma contient de 6 à 8% de protéines. La teneur en protéines des cellules rouges est de 28-30%. La fraction constituée des cellules rouges reste cependant la moins utilisée dans les aliments. Le sang peut tout d'abord être utilisé directement, sans traitement, comme ingrédient; dans ce cas, il est déshydraté par un procédé d'atomisation, ou bien il est concentré par coagulation. Le plasma est en général séparé des hématies par centrifugation. Les protéines peuvent être purifiées et concentrées par des techniques membranaires. Le séchage, par atomisation à des températures atteignant 200°C, permet d'obtenir une poudre blanchâtre, sans odeur ni saveur. Les hématies récupérées sont déshydratées pour former de la farine. En revanche, les

protéines du plasma sont essentiellement utilisées pour l'alimentation humaine, comme agent gélifiant et liant en boulangerie et pour stabiliser les émulsions, ou dans l'alimentation animale.

Fractionnement du plasma

On définit les fractions « coagulantes du plasma » comme des produits de fractionnement du plasma ayant une teneur élevée en certains facteurs de coagulation. Ces fractions sont utilisées en prévention ou en traitement de syndromes hémorragiques, apparaissant lors d'anomalies constitutionnelles ou acquises de l'hémostase. Les deux principales procédures intervenant dans la production des médicaments dérivés du sang (MDS) d'origine plasmatique sont le fractionnement plasmatique et l'élimination/inactivation virale. L'objectif de ces techniques est d'obtenir le produit le plus pur possible, sans altération des propriétés physicochimiques et biologiques de la protéine d'intérêt et sans aucun agent infectieux contaminant. L'albumine est la principale protéine du plasma, avec une concentration variant de 35 à 50 g.l⁻¹. Les facteurs de coagulation sont présents dans des concentrations nettement plus faibles, de 0,1 à 0,2 mg/l pour F VIII et de 3 à 7 mg/l pour le F IX.

Cryoprécipitation

La principale technique de précipitation est la cryoprécipitation. Le plasma humain recueilli pour le fractionnement est conservé à une température inférieure ou égale à -20°C. On obtient une cryoprécipitation en décongelant le plasma à une température comprise entre 2 et 4°C ; il en résulte un cryosurnageant et un cryoprécipité qui seront séparés par centrifugation. Le cryoprécipité a longtemps servi au traitement de l'hémophilie A et de la maladie de Willebrand, étant donné sa composition. Néanmoins son utilisation comporte des limites infranchissables:

- La cryoprécipitation ne permet pas l'atténuation virale et doit donc être suivie de méthodes d'inactivation/élimination virale ;
- Le fractionnement doit être complété par des chromatographies d'affinité pour améliorer la purification ;
- L'utilisation du cryoprécipité seul, sans purification supplémentaire, est contre productif et ne permet pas une valorisation suffisante des dons de sang

Précipitation par l'alcool (méthode de Cohn)

Développée dans les années 40 aux États-Unis par E.J.Cohn, la méthode de Cohn repose sur une succession d'étapes de précipitation par l'éthanol à froid. Il existe des méthodes dérivées (Kistler-Nitschmann). La technique de Kistler-Nitschmann, adaptée de la méthode de Cohn, est couramment utilisée dans les procédés de fabrication en Europe. La mise en jeu de cinq variables permet de séparer les protéines par leur solubilité différentielle dans les solutions éthanoïques. Chaque précipitation est suivie d'une étape de séparation, par centrifugation ou filtration, isolant le précipité du surnageant. La remise en solution du précipité permet de poursuivre la purification de cette même fraction. Les paramètres pris en compte sont la concentration d'éthanol (de 8 à 40 %), le pH (entre 4,5 et 7,4), la concentration protéique (5,1 % au début et 0,8 % aux dernières étapes), la force ionique (0,14 à 0,01 M) et la température (de 0 à - 8°C).

Chromatographie

Les techniques chromatographiques utilisées dans le fractionnement plasmatique permettent une sélection fine et une purification des différentes protéines plasmatiques, surtout de celles présentes en faible concentration. Elles ne doivent pas dénaturer la structure des protéines, ce qui pourrait les rendre non fonctionnelles et/ou plus immunogènes. Elles peuvent être utilisées avec différents objectifs:

- Purifier sélectivement les protéines d'intérêt,
- Séparer les polymères des monomères,
- Eliminer des stabilisants, des agents virucides, des sels et participer à la réduction virale.
- Les principales méthodes chromatographiques sont: l'échange d'ions (anions ou cations), l'immuno-affinité, l'exclusion stérique.

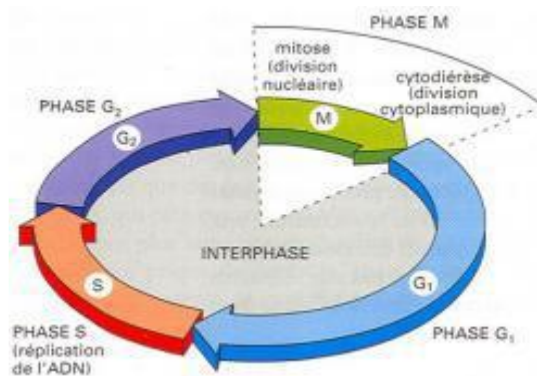
L'ultrafiltration

Est utilisée pour éliminer les composants de faible poids moléculaire (sels, alcool) et permet la concentration des solutions de protéines. Ce procédé a été appliqué dès le début des années 80 à la production de l'albumine et est utilisé lors de l'obtention d'autres protéines.

2. Culture des cellules animales (eucaryotes)

2.1. Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé classiquement en quatre phases, dont la plus importante est la mitose, division du noyau puis de la cellule. Le cycle cellulaire (d'une division à la suivante) a une durée très variable selon qu'il s'agisse d'une cellule sanguine, hépatique, épithéliale par exemple, de quelques heures à plus d'un an. La seule constante est la durée de la phase M (la mitose proprement dite) qui est d'environ 1 à 2 heures. Le reste du cycle est qualifié d'interphase : c'est la partie du cycle pendant laquelle la cellule ne se divise pas, elle est au repos.



Phase G1 (gap1) : présynthèse d'ADN

Phase S : synthèse d'ADN

Phase G2 : postsynthèse d'ADN

Phase M : mitose

Figure 26 : phase de cycle cellulaire

➤ Interphase

Il s'agit d'une période de préparation à la division cellulaire caractérisée par un accroissement du volume cellulaire, la cellule transcrit ses gènes et les chromosomes sont dupliqués à la fin de laquelle l'ADN de la cellule se trouve en quantité double.

➤ Phase mitotique

Le nom mitose provient du grec mitos ou filament. C'est un processus de partage et de distribution des chromosomes par disjonction des chromatides sœurs, aboutissant à la

formation de deux cellules diploïdes et ainsi à la transmission intégrale et égale du matériel génétique. L'évolution morphologique des constituants cellulaires conduit à subdiviser la mitose en 4 étapes successives s'enchainant les unes aux autres. Ce sont dans l'ordre : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

a) Prophase

Le stade le plus long (15 à 60min) Dans le noyau, la chromatine subit une condensation intense aboutissant à des chromosomes individualisables dont chacun est formé par deux chromatides sœurs reliées par un centromère et une protéine nommée cohésine permettant leur union. La membrane nucléaire et le nucléole se fragmentent et disparaissent progressivement libérant ainsi les chromosomes dans le cytoplasme mais qui restent emprisonnés dans la cage des fibres du fuseau.

b) La métaphase

C'est une étape de courte durée 2 à 10min. Le fuseau est complété et les chromosomes s'y fixent via leurs kinétochores. Les microtubules kinétochoriens s'allongent et les chromosomes migrent alors vers le plan équatorial du fuseau où ils se rassemblent. Les oscillations des chromosomes permettent d'aligner leurs centromères sur un même plan formant ainsi la plaque équatoriale située à mi chemin des deux pôles de la cellule. C'est la meilleure période pour observer les chromosomes, les chromatides sont très distinctes mais encore unies par le centromère.

c) L'anaphase

Cette phase est rapide (2à 3min), commence quand le centromère dédoublé de chaque chromosome se sépare en deux, libérant ainsi les chromatides sœurs. Toutes les chromatides sœurs se séparent et se déplacent chacune vers un pôle opposé de la cellule. Ce phénomène est rapide et concerne simultanément l'ensemble des chromosomes de la cellule.

d) La télophase

Elle dure entre 30 et 60 min. Dès qu'un lot complet de 46 chromosomes est rassemblé dans un pôle de la cellule parentale, une enveloppe nucléaire se forme, à partir des fragments de l'enveloppe nucléaire de la cellule mère et des portions de membranes fournies par le réticulum endoplasmique, et rassemble ce lot chromosomique dans un noyau avec apparition des nucléoles. Les chromosomes se décondensent et reprennent la forme d'une chromatine.

La Carycinèse (division du noyau) terminée, la cytotinèse prend le relais par la répartition du cytoplasme et la mise en place de la membrane cellulaire, séparent ainsi les deux cellules filles.

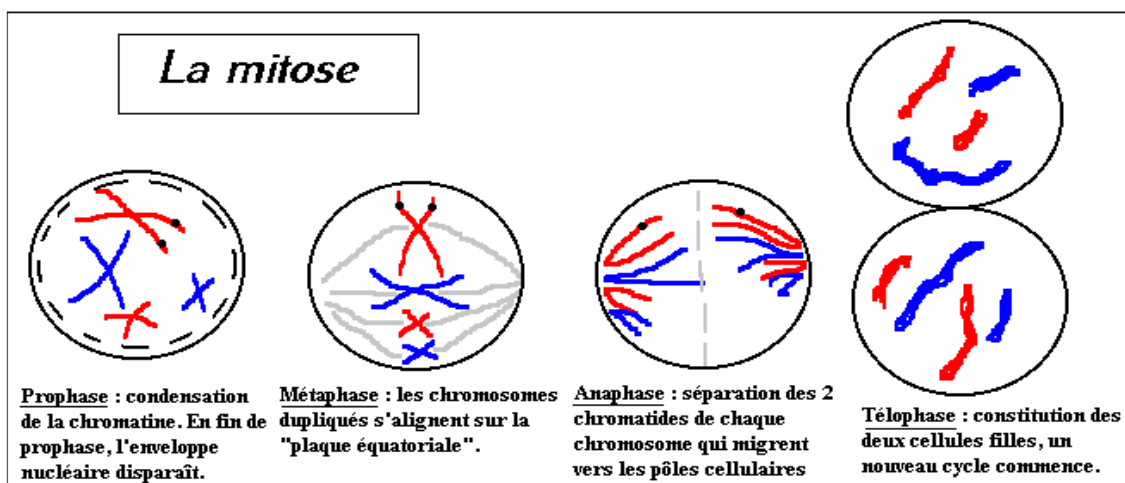


Figure 27: Différentes phases de la mitose

2.2. Moyens d'études de la cellule

- **La microscopie** est l'outil de base utilisé dans l'étude du cycle cellulaire. 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, ...)
- **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.

➤ Le contrôle du cycle cellulaire

Toutes les étapes du cycle cellulaire sont sous la dépendance de 2 familles de protéines interactives (des protéines kinases et des cyclines), constituant un véritable contrôle central qui s'exerce à certains points critiques du cycle (réplication de l'ADN, mitose et cytotinèse).

➤ Cytofluorométrie à flux liquide

Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

- Aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton...

- Aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques.

➤ **Principes de la CMF**

Pour fonctionner un cytomètre en flux nécessite une combinaison de:

Fluidique: Pour introduire et canaliser les cellules,

Optique: Une source d'excitation et de récupération des signaux,

Electronique: Pour convertir les signaux optiques en des signaux électroniques proportionnels et les numériser pour les analyser avec un ordinateur.

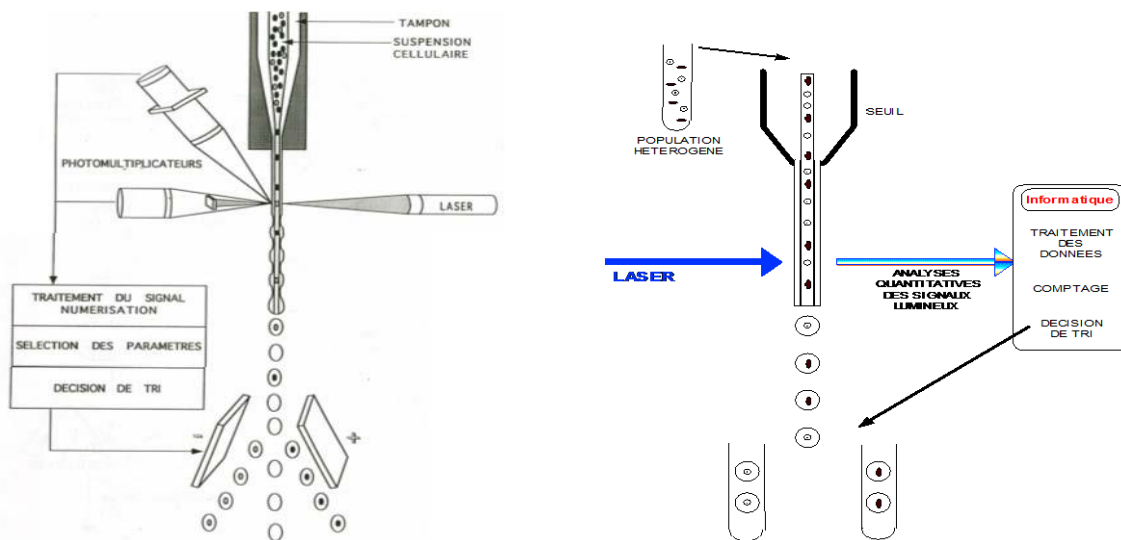


Figure28 : Schéma de fonctionnement d'un trieur de cellules

➤ **Principales applications**

L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la CMF. Certaines de ces applications sont maintenant utilisées régulièrement pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

2.3. Différents types de culture

➤ La culture cellulaire est un ensemble de techniques (procédé) de biologie utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation in vitro.

"Cultures primaires"

Culture initiée à partir de cellules, de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme.

"Cultures secondaires"

Ce sont les cellules de la culture primaire qui sont utilisées pour ensemercer d'autres cultures et ainsi de suite : ce sont donc les cultures secondaires. Ces cellules ainsi obtenues conservent les caractéristiques du tissu d'origine mais leur nombre de divisions est limité comme dans l'organisme.

***Lignée cellulaire**

Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules qui ont subi des modifications génétique qui permettent leur croissance indéfini (une capacité illimitée de division) elles proviennent de tumeurs spontanées ou de cellule transformées par immortalisation.

Il existe deux types de cultures cellulaires

➤ **Culture en suspension (culture en masse)**

Les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension. Les cellules non adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions mais se développent en suspension.

➤ **Culture des cellules adhérentes**

Culture sur support: adhésion des cellules sur la paroi au fond du flacon ou de la boîte de culture.

➤ **Besoins du milieu de culture**

Les milieux de culture doivent répondre aux exigences culturelles des cellules animales. Ces exigences sont multiples et complexes et l'on ne doit pas oublier les exigences en **gaz**. Les cellules animales ont besoin :

- **d'eau**
- **d'ions minéraux** nombreux et variés à des concentrations adéquates. L'osmolarité du milieu doit être celle du sérum physiologique (9 g par L de NaCl). Le pH ne doit le plus souvent guère varier autour de 7 à 7,4.
- **de source de carbone et d'énergie** (glucose par exemple)
- **de source d'azote** : acides aminés obligatoirement
- **de facteurs de croissance** :
 - les acides aminés essentiels
 - les vitamines
 - des acides gras comme l'acide arachidonique
- **des gaz** :
 - le dioxygène les cellules étant aérobies strictes
 - le dioxyde de carbone en général car les tissus sont en permanence dans une atmosphère contenant du dioxyde de carbone ($p = .5,3$ kPa)
- **d'un pH** maintenu constant vers 7,4 :

Il faut donc un système tampon qui est en général le système $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ ou phosphates.

La culture nécessite bien souvent d'autres facteurs, en particuliers des **facteurs de croissance cellulaires hormonaux** comme les interleukines. On évite la multiplication microbienne par l'ajout d'**antibiotiques**.

➤ **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).

2.4. Hybridation cellulaire – application dans la production d’anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ou **monoclonal antibody** sont identiques car produits par un clone de cellules spécialisées du système immunitaire (les plasmocytes). Les anticorps monoclonaux sont très largement utilisés en biologie et en médecine, à la fois comme outils de diagnostic et dans des buts thérapeutiques.

La production de ces anticorps *in-vitro* est très difficile à cause de la faible durée de vie des plasmocytes. *In-vivo*, la production de ces anticorps peut être obtenue en injectant chez l'animal un antigène donné puis extraction de ceux-ci dans le sang. Cette méthode est très coûteuse et très peu d’anticorps sont obtenus.

L'élaboration de la technique des **hybridomes** par **César Milstein** et **Georges köhler** en 1975 a permis d'obtenir une grande quantité d'anticorps à faible coût et ainsi permettre de les utiliser dans de nombreuses applications.

Cette technique consiste à injecter l'antigène d'intérêt chez une souris puis de prélever, au bout de quelques semaines, les cellules de la rate. Parmi ces cellules se trouvent **des plasmocytes** sécrétant des anticorps dirigés spécifiquement contre l'antigène choisi. On fusionne ces plasmocytes avec des cellules de tumeur appelées **cellules myélomateuses** (cellules immortelles) grâce à l'addition de **polyéthylène glycol (PEG)** qui induit la fusion membranaire et permet ainsi d'obtenir **des hybridomes** qui ont la capacité de se multiplier plus rapidement que les cellules normales du corps productrices d'anticorps et de développer indéfiniment des anticorps spécifiques. Les cellules sont ensuite réparties dans des plaques multipuits de telle sorte qu'il n'y ait qu'une cellule par puits. Afin d'éliminer les plasmocytes et les cellules myélomateuses non fusionnées, on utilisera un milieu de culture sélectif (milieu de culture HAT). Les plasmocytes non fusionnés meurent rapidement et les cellules myélomateuses utilisées ayant un gène non fonctionnel pour une enzyme intervenant dans la synthèse des nucléotides-hypoxanthine - guanine - phosphoribosyl - transférase (HGRPT) sont incapable de survivre dans un milieu HAT (hypoxanthine aminoptérine thymidine). Seules les cellules hybrides se multiplient. Au bout d'une dizaine de jours, on recherche dans chaque puits la présence d'anticorps dirigés contre l'antigène utilisé pour immuniser la souris.

On repique les cellules productrices. On isole ainsi quelques clones cellulaires producteurs qui pourront être conservés dans l'azote liquide.

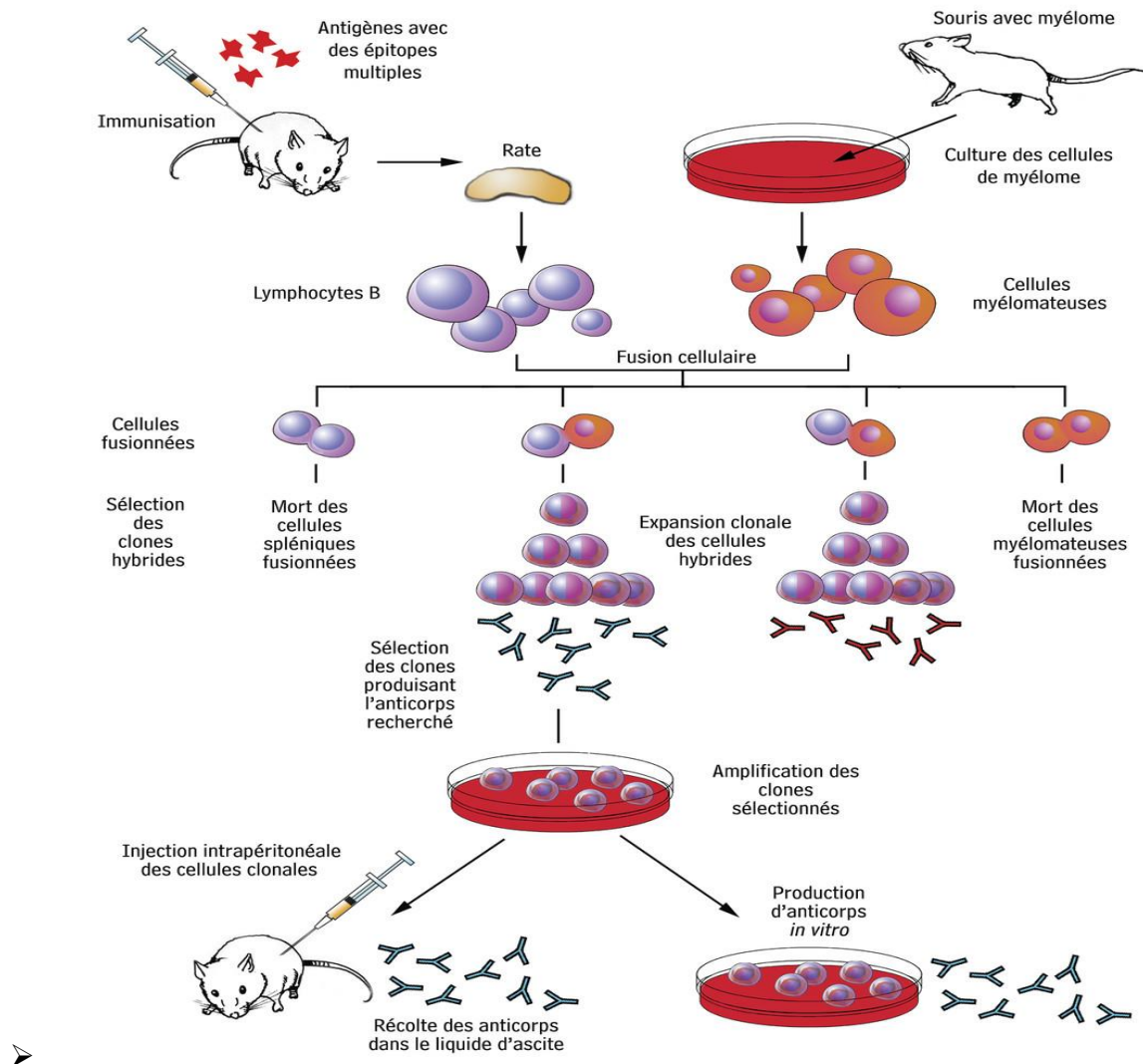


Figure29: Production des anticorps monoclonaux

➤ Applications des anticorps-monoclonaux

- **Test d'ovulation:** les anticorps monoclonaux anti-hormone lutéinisante qui révèlent l'augmentation du taux d'hormone LH (signe précurseur de l'ovulation).
- **Test de grossesse:** le principe repose sur la détection de l'hormone hGC (human Chorionic Gonadotropin) dans les urines par le biais d'une réaction colorée spécifique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-hGC.

- Fabrication **des anticorps monoclonaux** contre des antigènes portés par des cellules tumorales afin de les détruire. L'intérêt de l'utilisation des anticorps monoclonaux pour **un traitement anti-cancereux** réside dans la spécificité de ceux-ci à détruire des cellules cibles. On peut soit utiliser des anticorps seuls (anticorps nus) qui en s'attachant à la cellule entraînent sa mort ou associés à une autre molécule comme une toxine ou un produit radioactif. L'anticorps sert dans ce cas là, à amener vers la cellule tumorale l'élément qui va la détruire.

- **Test ELISA:** utilisation des anticorps monoclonaux comme anticorps traceurs dans le test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Ce type de test est utilisé notamment dans le dépistage de la séropositivité au virus VIH, c'est à dire pour mettre en évidence la présence d'anticorps anti-VIH dans le sérum.

➤ **Inconvénient**

Comme la plupart des anticorps monoclonaux sont produits dans des cellules de rongeurs, on peut observer une réaction immunitaire lors de leur injection chez un patient. Cette immunité inactive progressivement l'action bénéfique de l'anticorps monoclonal. Pour remédier à ce problème, on produit des anticorps "chimériques" ou "humanisés".

Les anticorps "chimériques" sont obtenus par greffage des parties constantes d'immunoglobuline humaine sur les parties variables d'un anticorps de souris.

Chapitre III : biochimie des substances d'origine microbienne

1. Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières. Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement (tableau7).

Tableau 7 : Quelques enzymes secrétées par divers microorganismes et leurs domaines d'applications

Enzymes	Micro-organismes producteurs	Applications
Alpha amylase	<i>Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Rhizopus delemar</i>	3/5/6/7/8/9
Glucose isomérase	<i>Streptomyces albus, Actinoplanes missiriensis, Bacillus coagulans</i>	5/6/7
Invertase	<i>Saccharomyces cerevicae, Kluyveromyces Lactis, Aspergillus usamii</i>	7/8
Lactase	<i>Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis</i>	1/2/4/11
Lipase	<i>Mucor javanicus, Lucor mihei, Rhizopus arrhizus, Aspergillus effusus</i>	2/3
Pectine estérase, pectine lyase, polydalacturonase	<i>Aspergillus usamii, Aspergillus wentii, Aspergillus niger, penicillium funiculosum</i>	3/6/10
Protéase	<i>Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae, Mucor mihei, Mucor pusillus</i>	1/9

1. Industrie laitière/2. Fromagerie/3.huiles et graisse/4.glaces/5.Céréales et amidon/ 6. fruits et légumes/7.sucre/8. confiserie/9.boulangerie/ 10.épices et saveurs/11.aliments diététiques

➤ Classification des enzymes

1. **Les oxydo-reductases** catalysent les réactions d'oxydo-réduction. La plupart de ces enzymes sont connus sous le nom de deshydrogénases, mais certains d'entre eux sont appelés oxydases, peroxydases, oxygénases ou réductases.

2. **Les transférases** catalysent les réactions de transfert de groupes moléculaires d'une molécule à une autre. Cette classe inclut les kinases.

3. **Les hydrolases** catalysent les clivages hydrolytiques.

4. **Les lyases** catalysent les réactions d'élimination d'un substrat, non hydrolytique et non oxydative, ou lyse, avec création d'une double liaison. Dans le sens inverse, les lyases catalysent l'addition d'un substrat à une double liaison d'un second substrat; une lyase qui catalyse une réaction d'addition dans les cellules est souvent appelée synthase.

5. **Les isomérases** catalysent les réactions d'isomérisation ou les réarrangements intramoléculaires.

6. **Les ligases** catalysent les réactions de ligation au cours desquelles deux molécules sont unies. Ces réactions nécessitent un apport d'énergie chimique, le plus souvent sous forme d'ATP. Les ligases sont aussi nommées synthétases. Chaque enzyme a un numéro de code qui permet d'identifier.

➤ **Nomenclature des enzymes:** Une codification permet de donner plusieurs informations sur l'enzyme en question.

Exemple: l'anhydrase carbonique catalyse la réaction 4.2.1.1, ce qui signifie qu'elle agit sur une réaction d'addition au niveau d'une liaison double (premier nombre 4 liaison entre des atomes de carbone et d'oxygène (deuxième nombre 2), que le corps ajoute est une molécule d'eau (troisième nombre 1) et qu'elle est la première de cette espèce (quatrième nombre 1).

Autre exemple : la codification oxidative déaminase.

4), que la réaction crée une codification EC 1.13.12.15 correspond à la 3,4
10), ion 3,4-dihydroxyphenylalanine.

➤ **Production des enzymes industrielles**

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. 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" (moins coûteux)

➤ **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 :

Tableau8: Composition de milieu de culture

Substances	Exemples
Source de carbone et d'énergie	Farine de céréale, farine de soja, amidon 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, farine de graine oléagineuses

➤ **Fermentation**

En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération simple qui permet de produire de la biomasse ou des différents produits par la culture de micro-organismes. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobie et anaérobie.

➤ **Fermenteur**

Appelé également bioréacteur ou propagateur, est un appareil (enceinte) dans lequel on multiplie des microorganismes pour une production optimale (biomasse ou métabolite) dans un environnement avec des paramètres physiques et chimiques contrôlés. est un appareil permettant d'assurer une croissance des microorganismes et une production optimale des différentes molécules.

➤ **Description d'un fermenteur**

- **Une cuve ou enceinte en verre** (pour les modèles de laboratoire) ou en acier inoxydable;
- **Un bouchon** si nécessaire pour ne pas laisser passer l'air du milieu intérieur et celui du milieu extérieur;
- **Une seringue avec cathéter** pour injecter une solution;

- Un système d'agitation comportant une ou plusieurs turbines selon leur taille;
- Des capteurs pour la mesure de la température (thermomètre), du pH (pH-mètre), de la concentration en oxygène dissous (sonde oxymétrique);
- Un système de contrôle-commande géré par ordinateur permettant d'enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement

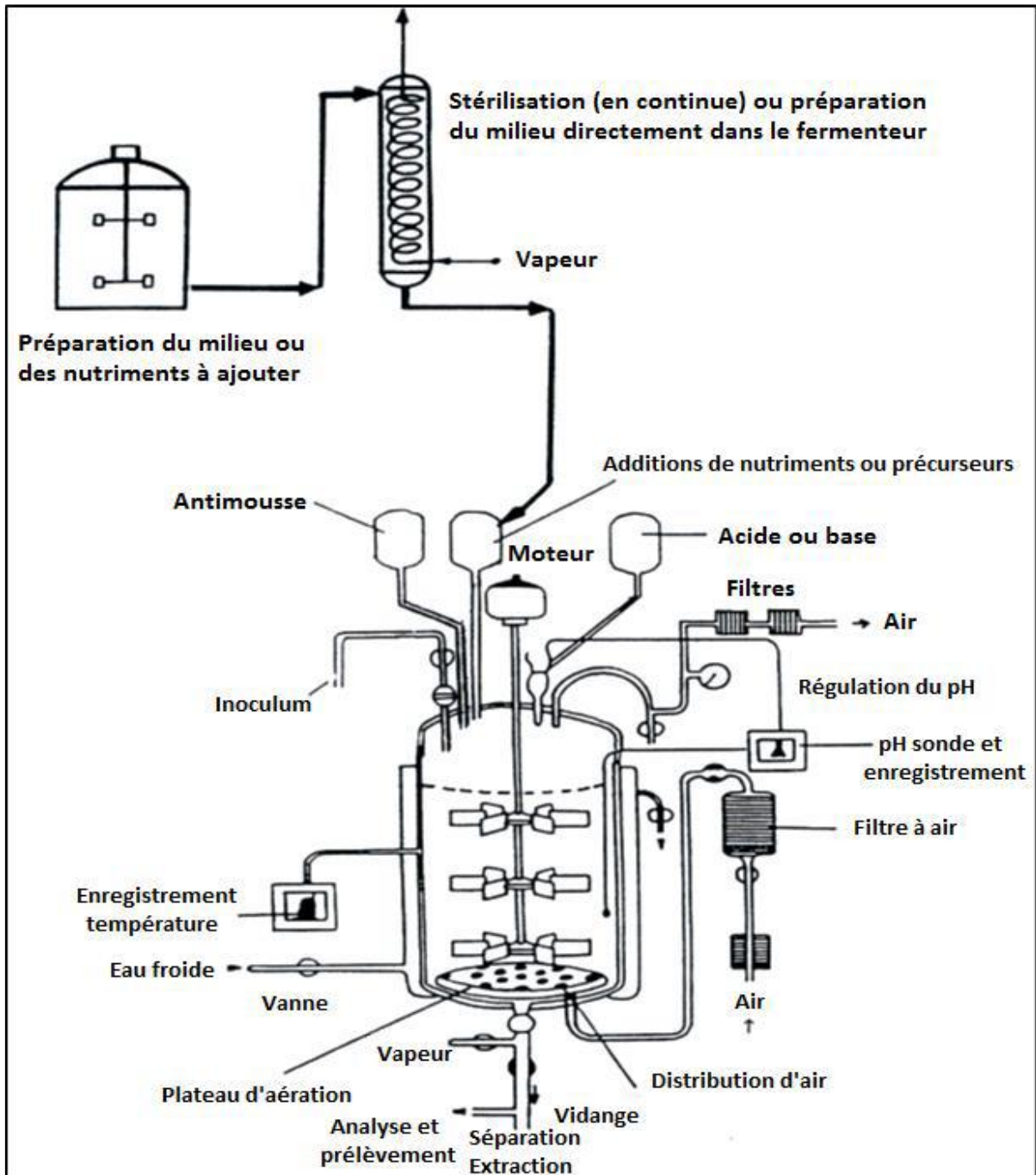


Figure30: Schéma d'un fermenteur

➤ **Étapes de la fermentation**

La fabrication du milieu de culture; la stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture; la préparation de l'inoculum; la production en bioréacteur; l'extraction du produit et sa purification.

➤ **Type des fermenteurs**

Les modèles de laboratoire vont de 0,1 à 15 litres. Les modèles employés pour les tests en vue de l'industrialisation (appelés "pilotes") vont de 20 à 1 000 litres, alors que ceux destinés à la production industrielle peuvent dépasser les 1 000 m³.

➤ **Les diverses techniques de culture**

Deux grandes techniques de culture utilisées dans le fermenteur pour la production des différents produits microbiens; culture discontinue (en batch) et culture continue (renouvelée).

➤ **Culture discontinue :** Le procédé est réalisé dans un système fermé dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes; la quantité de nutriments est donc limitée.

➤ **Culture continue :** La culture du microorganisme se fait en vase non clos de façon à maintenir en permanence en phase exponentielle grâce à:

- Renouveler constamment le milieu de culture;
- Récupérer les produits du métabolisme et les déchets.

➤ **Conduite de la fermentation pour la production d'enzymes**

Les fermenteurs utilisés atteignent des volumes de 100 à 200 m³. 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 (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase), dans d'autres, il faut

éviter la présence de métabolites répresseurs en début ou leur apparition en cours de fermentation.

➤ **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 de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités.

➤ **La purification** est un ensemble d'opérations visant à enlever toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. En principe, n'importe quelle méthode destinée au fractionnement de protéines peut être employée pour la purification d'enzymes.

➤ **Les étapes de la purification (séparation) :** Les étapes de récupération et de purification (brièvement décrit ci-dessous) seront les mêmes pour les enzymes intracellulaires et extracellulaires, une fois que les cellules sont perturbées et que les enzymes intracellulaires sont libérées. La considération la plus importante est de minimiser la perte de l'activité enzymatique souhaitée. ****Enlèvement des débris cellulaires:** La filtration ou la centrifugation peuvent être utilisées pour éliminer les débris cellulaires.

➤ **Enlèvement des acides nucléiques:** Les acides nucléiques interfèrent avec la récupération et la purification des enzymes. Ils peuvent être précipités et éliminés en ajoutant des substances spécifiques comme les polyamines et la polyéthylèneimine.

➤ **Précipitation enzymatique:** Les enzymes peuvent être précipitées en utilisant des sels (sulfate d'ammonium) ou solvants organiques (isopropanol, éthanol et acétone). La précipitation est avantageuse puisque l'enzyme précipitée peut être dissoute dans un volume minimal pour concentrer l'enzyme.

➤ **Séparation par chromatographie:** Il existe plusieurs techniques chromatographiques pour la séparation et la purification des enzymes. Ceux-ci comprennent l'échange d'ions, l'exclusion de taille, l'affinité et l'interaction hydrophobe. Parmi ceux-ci, la chromatographie d'échange d'ions est la plus couramment utilisée pour la purification enzymatique.

➤ **Conservation**

La forme concentrée de l'enzyme peut être obtenue par séchage. Cela peut se faire par des évaporateurs ou des lyophilisateurs. L'enzyme séchée peut être emballée et commercialisée. Pour certaines enzymes, la stabilité peut être obtenue en les gardant dans des suspensions de sulfate d'ammonium. Toutes les enzymes utilisées dans les aliments ou les traitements médicaux doivent être de pureté élevée. Ces enzymes doivent être totalement exemptes de substances toxiques, de microorganismes nuisibles et ne doivent pas provoquer de réactions allergiques. Exemple : L'invertase [β -fructofuranosidases (EC.3.2.1.26)] est une enzyme largement utilisé dans l'industrie des aliments et des boissons pour produire des bonbons, des chocolats, de l'acide lactique et du glycérol, etc. L'invertase est produite par différentes souches de microorganismes, *Saccharomyces cerevisiae* est la souche primaire utilisée pour la production d'Invertase commercialement.

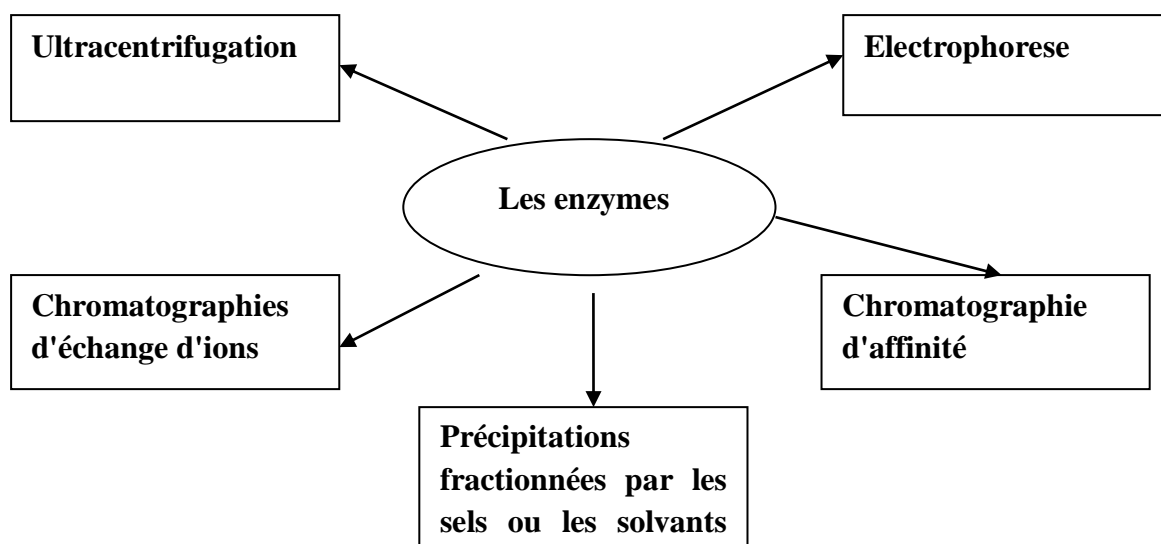


Figure 32 : Différentes techniques de séparation et de purification des enzymes selon leurs propriétés globales

2. Vitamines

Les vitamines sont des substances organiques actives, vitales, indispensables en infime quantité à la croissance et au bon fonctionnement de l'organisme. Les vitamines sont par définition des micronutriments qui ne sont pas synthétisés par l'organisme humain et doivent être apportés dans l'alimentation. Seules les vitamines K et D ne répondent pas à cette définition puisqu'elles peuvent être synthétisées par l'organisme. Chaque organisme a des besoins spécifiques : une molécule peut être une vitamine pour une espèce et ne pas l'être pour une autre. Les vitamines B et C sont majoritairement des précurseurs de coenzymes, molécules qui participent au site actif d'une enzyme, activent des substrats ou sont des

substrats particuliers. Elles doivent être apportées régulièrement et en quantité suffisante par l'alimentation. Chez l'être humain, deux vitamines sont synthétisées par des bactéries intestinales : les vitamines K et B₈. La vitamine D est un dérivé de stéroïde qui peut être synthétisé par la peau exposée au Soleil chez l'homme, et qui possède un rôle hormonal. Un apport insuffisant ou une absence de vitamine provoquent respectivement une hypovitaminose ou une avitaminose qui sont la cause de diverses maladies (scorbut, béribéri, rachitisme, etc.). Un apport excessif de vitamines liposolubles (A et D essentiellement) provoque une hypervitaminose, très toxique pour l'organisme, car l'excès de vitamines liposolubles ne peut être éliminé rapidement par les reins et est stocké dans le foie.

Ces vitamines ont été découvertes par le biochimiste polonais Kazimierz Funk qui, le premier, isola la vitamine B₁ dans l'enveloppe de riz en 1912. Le terme « vitamine » vient du latin « vita » qui signifie vie et du suffixe *amine* qui est le nom d'un radical en chimie (toutes les vitamines ne possèdent pas pour autant le radical amine) Au sens strict, les vitamines sont les amines de la vie, bien qu'on n'y trouve pas que des amines (seulement certaines du groupe B).

➤ **Classifications des vitamines**

Généralement, on sépare les vitamines en deux groupes : les vitamines hydrosolubles (solubles dans l'eau) et les vitamines liposolubles (solubles dans les graisses). Les vitamines liposolubles sont absorbées avec les graisses et, comme celles-ci, sont stockables dans l'organisme (dans les graisses), il est donc difficile de s'en débarrasser. À l'inverse, les vitamines hydrosolubles (à l'exception de la vitamine B₁₂) ne sont pas stockables et les apports excédentaires sont éliminés par la voie urinaire.

Tableau9: Besoins journalières en vitamines

Vitamines	B1	B	B3	B9	B12	A	C	D	E
Homme	1-2	1,8	15-20	0,5	2,5	0,8-1	>90	5-3	15
Femme	0,8-1,5	1,5-2,5	-	-	-	0,7-0,9	>75	-	-
<2ans	0,4	0,6	-	-	-	0,8-1,2	-	-	-
10-15ans	-	2,5	>20	-	-	1,2-2	-	-	-
Valeurs exprimées en mg par jour sauf* vitamines D et B12 en ug par jour									

a) Les vitamines hydrosolubles: Se trouvent presque toutes dans les végétaux, les oeufs et les viands. Les vitamines du groupe B sont des cofacteurs d'enzymes contrôlant le métabolisme des nutriments énergétiques. On regroupe sous le terme de vitamine B environ 8 vitamines de B1 à B12, soit B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 et B12. Les avitaminoses sélectives concernent surtout les vitamines B1, B2, B3, B9 et B12. Leurs rôles sont représentés dans le tableau 10.

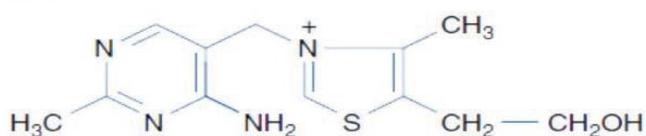
Tableau 10: Rôles des vitamines du groupes B

Vitamine	Nom	Rôle	Conséquence de la carence
Vitamine B ₁	Thiamine	Métabolisme énergétique (notamment dans le complexe Pyruvate déshydrogénase)	Polynévrites, œdèmes, myocardites béribéri
Vitamine B ₂	Riboflavine	Métabolisme énergétique (en particulier dans la chaîne respiratoire), participe à la formation des flavines (FAD/FMN)	Lésions des lèvres et des muqueuses buccales, lésions de la langue, lésions des yeux
Vitamine B ₃ (ou PP)	Nicotinamide ou niacine	Métabolisme énergétique (participe à la formation du NAD ⁺ /NADH), anti-pellagreuse	Maladie du cuir chevelu, pellagre
Vitamine B ₅	Acide pantothénique	Métabolisme énergétique (un des constituants du Coenzyme A), synthèse de certaines hormones	Lésions cutanées, arrêt de la croissance
Vitamine B ₆	Pyridoxine	Métabolisme des acides aminés (décarboxylases, aminotransférases), synthèse de la vitamine B ₃	Lésions cutanées, troubles neurologiques (convulsions), polynévrites
Vitamine B ₈ (ou H)	Biotine	Métabolisme des acides gras, glucides et acides aminés (coenzyme de carboxylation), synthèse des vitamines B ₉ et B ₁₂	Troubles digestifs, ataxie, signes cutanés
Vitamine B ₉ (ou M)	Acide folique	Synthèse des purines, pyrimidines et acides aminés (coenzyme participant au métabolisme des "unités monocarbonées") notamment la méthylation de l'ADN, de l'ARN et des protéines	Troubles digestifs, troubles neurologiques, asthénie
Vitamine B ₁₂	Cobalamine	Métabolisme des acides nucléiques (coenzyme de transfert des radicaux méthyles) notamment dans la synthèse de la méthionine anti-anémique (rôle important dans l'hématopoïèse)	Anémie de Biermer, glossite douleurs neurologiques
Vitamine C	Acide ascorbique	synthèse du collagène, génération des globules rouges (hématies) anti-scorbutique, stimulation des défenses naturelles et immunitaires, Antioxydant (réducteur)	Scorbut, poly-infections et septicémies, Maladies cardiovasculaires et hypertension

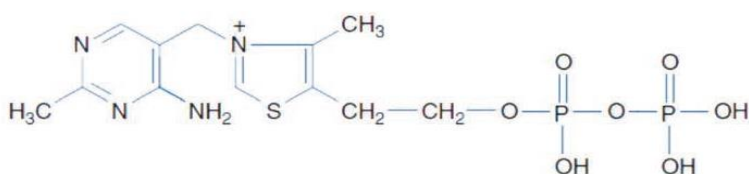
- **Thiamine (B1):** A été la première substance isolée contenant une fonction amine et indispensable à la vie, d'où le terme proposé par Funk en 1910: vitamine. L'absence de ces vitamines dans la ration alimentaire a pour conséquence le développement de maladies carencielles. Bien que le syndrome des mangeurs de riz ou « bériberi » ait été décrit en 2 600 av. J-C, ce n'est qu'au XIXe siècle que l'étiologie carencielle est évoquée et précisée grâce aux observations de Takaki au Japon puis Eijkman et Grinjs en Hollande. La substance active impliquée dans cette carence fut isolée sous forme cristallisée à partir de cuticules de riz par Jansen et Donath en 1926. Depuis, de nombreuses études ont permis d'établir les fonctions biologiques de la thiamine ainsi que son rôle dans des maladies héréditaires ou acquises thiaminodépendantes. Anti-bériberique, vitamine du système nerveux.

La détermination de la structure de la thiamine et sa synthèse furent réalisées en 1936. La thiamine est composée d'un cycle pyrimidique et d'un cycle thiazole soufré et azoté, reliés par un pont méthylène fragile, sensible à l'action de la chaleur et d'une enzyme, la thiaminase. La fonction alcool primaire, portée par le C-5 du noyau thiazole permet, par des réactions de phosphorylation enzymatique, la synthèse des esters mono-(TMP ou thiamine-mono-phosphate), di- (TDP ou thiamine-di-phosphate) aussi nommé TPP pour thiamine-pyrophosphate, et tri- (TTP ou thiaminetri- phosphate)

A : Thiamine



B: Thiamine diphosphate



C: Thiamine triphosphate

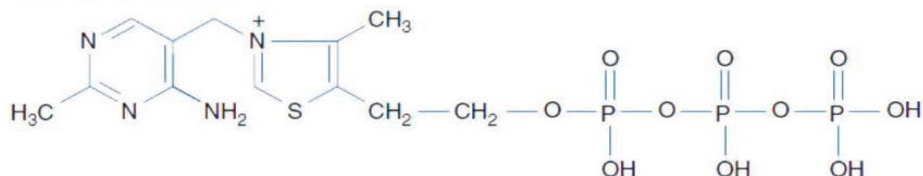


Figure33: Différents formes de vitamine B1

- **Riboflavine (B2):** Cette vitamine du groupe B est en fait la riboflavine un nucléotide qui cristallise sous forme de jolis cristaux jaune orangé. Elle existe sous forme libre et d'ester de phosphate (nucléotide). La vitamine B2 intervient aussi dans le métabolisme énergétique, puisque c'est le cofacteur d'enzymes à flavines (ou flavoprotéines). On en trouve dans la chaîne respiratoire pour transporter les protons issus du NADH,H^+ vers la coenzyme Q ; c'est aussi le cofacteur d'enzymes permettant d'utiliser les acides gras (oxydation), ou de synthèse des acides gras à longues chaînes, ainsi que du catabolisme des purines avec la xanthine-oxydase et des acides aminés pour leur désamination oxydante, bref partout où on trouve des enzymes à FMN ou FAD. Autant dire qu'elle est indispensable; on ne sait pas la produire, pas plus que les bactéries commensales de notre tube digestif (le microbiote intestinal). De plus, elle est vitamine B6 dépendante, montrant des interrelations entre les vitamines du groupe B. Vitamine de l'énergie et des crampes musculaires.

- **Niacine (B3 ou PP) ou nicotinamide:** Il s'agit tout simplement du nicotinamide ou niacine, l'amide de l'acide nicotinique. Ce n'est pas tout à fait une vitamine car on en synthétise pour environ un tiers de nos besoins à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel. Normalement, notre complément en vitamine PP (pour les deux tiers) se trouve dans les céréales, les fruits secs, les viands et les poissons, le lait et les fromages ; les bactéries commensales de notre intestin nous en fournissent un peu aussi. Evidemment, nous avons besoin d'ingérer quotidiennement de la niacine pour assurer le fonctionnement d'un grand nombre d'enzymes à NAD ou NADP, autrement dit la plupart des déshydrogénases, des oxydoréductases et autres réductases ; développer ce chapitre serait une bonne occasion de revoir toute la biochimie métabolique, des catabolismes (glycolyse, voie des pentoses, cycle de Krebs, α -oxydation, dégradation des acides aminés) aux anabolismes, comme ceux du cholestérol et des acides gras anti-pellagreuse ("Pellagre Preventing").

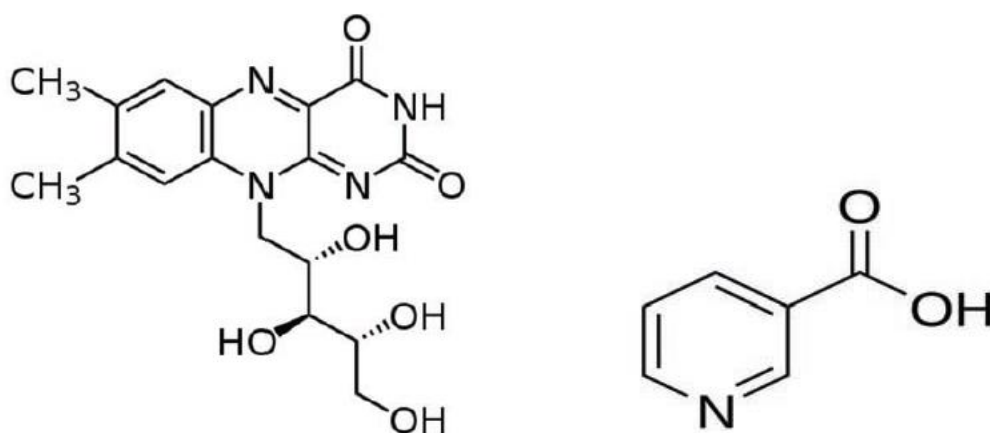


Figure 35: Structure des vitamines B2 et B3

Acide pantothénique (B5): C'est l'acide pantothénique qui entre dans la composition de la coenzyme A. Cette vitamine est très répandue dans la nature (*panthos* : que l'on trouve partout) et on ne connaît pas de carence spécifique, seulement dans les dénutritions sévères donnant de l'insomnie, des nausées et une plus grande sensibilité aux infections. Elle est le cofacteur de nombreuses enzymes du métabolisme des acides gras, des sucres et des acides aminés (métabolisme intermédiaire et cycle de Krebs). Son absorption intestinale est incomplète, on en retrouve donc dans les fèces, et cette vitamine est éliminée dans les urines (l'acide et ses sels). La vitamine B5 est utilisée comme médicament, un peu comme la biotine, pour traiter les alopecies et maladies du système pileux, aussi les plaies et brûlures comme agent cicatrisant (ulcères variqueux, fistules anales), ainsi que les affections pulmonaires chroniques ou des voies aériennes, ou encore les atonies intestinales par un effet parasymphomimétique. On utilise ses sels (Na, Ca) cristallisés et solubles dans l'eau, par voie orale et des voies locales (crèmes, pommades) ; seul le composé dextrogyre est actif. vitamine de la peau et des cheveux.

- **Pyridoxine (B6):** La vitamine B6, ou pyridoxine, est la coenzyme de nombreuses enzymes dont les transaminases, les désaminases et des décarboxylases qui produisent des neuromédiateurs comme la sérotonine, la dopamine, les amphétamines et le Gaba. Elle est essentielle au métabolisme des acides aminés et des protéines (cofacteur d'environ 60 enzymes); pour être active, elle est transformée en phosphate de pyridoxal et éliminée dans les urines sous forme d'acide pyridoxique. On trouve la vitamine B6 dans les céréales et les levures, les fruits et les légumes, les viandes et les abats. Les besoins augmentent au cours de la grossesse et pendant l'allaitement. La carence est exceptionnelle, entraînant une séborrhée, une glossite pellagroïde, une polynévrite voire une dépression avec accès maniaque. Il peut s'agir de causes iatrogènes (traitement à l'isoniazide ou à la D-pénicillamine) ou suite à la grossesse; des convulsions chez le nourrisson ont déjà été rapportées. On utilise les vitamines B1, B6 et B12 en association pour traiter les polynévrites, en particulier reliées à l'alcoolisme où de graves carences en vitamines du groupe B sont retrouvées, ainsi que pour traiter les convulsions du nourrisson, par voie orale ou parentérale, quand elles sont réfractaires aux autres traitements (Valium©, Tegretol©...). La vitamine B6 est aussi utilisée par voies locales dans les dermatoses séborrhéiques et l'acné, régularise le métabolisme des acides aminés et des protéines.

- **Biotine (B8):** Il s'agit de la biotine dont il existe deux isomères, elle se trouvant préférentiellement dans le jaune d'oeuf, et la biotine dans le foie et les rognons, un peu moins

dans les légumes secs, les champignons, le chocolat et les levures, notre flore intestinale en fabriquant un peu. Elle intervient dans le métabolisme des acides aminés comme cofacteur de carboxylases et de transcarboxylases ; dans celui des sucres, la biotine agit sur une enzyme de la gluconéogenèse, et dans celui des acides gras, la biotine est le cofacteur de la première enzyme de leur biosynthèse. La biotine est directement active; elle est absorbée au niveau intestinal et éliminée dans les urines et les fèces. Il n'existe pas de déficit spécifique, en revanche sa carence est retrouvée dans les hypovitaminoses globales, où toutes les vitamines du groupe B font défaut, souvent d'autres aussi, comme après antibiothérapie, au cours de régimes aberrants, par exemple où on ne consommerait que le blanc d'oeuf. On retrouverait des signes cliniques peu spécifiques avec une dermatite squameuse avec atrophie des glandes sébacées et des follicules pileux, une anorexie, des nausées, vitamine de la peau et des cheveux.

- Acide folique (B9): C'est l'acide folique que l'on trouve sous forme de polyglutamates dans le foie, les rognons, les viandes et les légumes verts. Après des transformations dans la muqueuse duodéno-jéjunale, l'acide folique va être stocké sous forme partiellement réduite (dihydrofolate) dans les organes à activité synthétique importante, comme le foie, les reins et les hématies. La coenzyme active est la forme totalement réduite (tétrahydrofolate ou acide folinique). On peut doser ces différentes formes (les folates) dans le plasma et les hématies. L'élimination est biliaire, donc fécale, et urinaire en cas d'excès anti-anémique.

-Cobalamine (B12): C'est une cobalamine, un noyau tétrapyrrolique (un peu comme l'hème) et un nucléotide reliés par un pont aminopropanol. Un atome de cobalt (Co^{2+}) est en liaison de coordination métallique avec les azotes pyrroliques, un azote de la base purique (adénine) du nucléotide et un -OH pour l'hydroxycobalamine (hexacoordination). Cette vitamine est synthétisée par les micro-organismes, mais dans notre alimentation on la retrouve dans le foie, les abats et la viande, un peu le lait, les fromages et les oeufs et il n'y a pas de sources végétales. Elle forme des complexes avec les protéines animales, dont environ la moitié sera absorbée au niveau intestinal. Le passage intestinal nécessite la liaison au facteur intrinsèque gastrique, et c'est au niveau de l'iléon que ces complexes cobalaminefacteur intrinsèque vont se lier sur un récepteur spécifique dans un rapport de 2 molécules de cobalamine pour un récepteur ; après internalisation, la cobalamine est libérée dans le cytoplasme de l'entérocyte ; elle passera dans la circulation liée à des protéines vectrices. Le stockage hépatique est important, et se fait sous forme de méthyl-cobalamine. L'élimination est biliaire avec cycle entéro-hépatique et élimination fécale. La méthyl-cobalamine est responsable de la conversion

homocystéine-méthionine nécessitant aussi le tétrahydrofolate, rendant la méthionine non indispensable. Par ailleurs, la dégradation des acides gras à nombre impair de carbones et de certains acides aminés comme la thréonine, la méthionine et l'isoleucine dégradés en propionyl-CoA, nécessite de la S-adénosyl-cobalamine, cofacteur de la méthyl-malonyl-CoA-mutase pour donner du succinyl-CoA, substrat du cycle de Krebs. Ces deux vitamines agissent de concert dans le transfert de groupements monocarbonés, pour les biochimistes/chimistes ce sont des groupements -CH₃ (méthyle), -CH₂- (méthylène), -CH₂OH (hydroxyméthyle), -CHO (formyle), -CH=NH (formimino-) essentiellement... et pour quoi faire : métaboliser des acides aminés (histidine transformée en glutamate, sérine en glycine, synthétiser la méthionine à partir d'homocystéine), synthétiser des bases puriques et des bases pyrimidiques pour former nos acides nucléiques, ARN et ADN, rien que cela. Et quand on manque de ces vitamines-là, ça se sent... Plus précisément, la synthèse de méthionine nécessite l'action conjointe des deux vitamines alors que dans les autres réactions la vitamine B₉ suffit. Les carences en vitamine B₉ et/ou B₁₂ sont à l'origine d'une anémie mégalo-blastique par asynchronisme nucléo-cytoplasmique et défaut de synthèse de l'ADN touchant les trois lignées sanguines (pancytopénie). La carence en vitamine B₁₂ est connue sous le nom d'anémie pernicieuse ou anémie de Biermer, généralement due à un défaut de sécrétion du facteur intrinsèque ; l'anémie a toutes les caractéristiques de l'anémie par carence en folates. Les troubles neurologiques viennent aggraver le tableau; le diagnostic différentiel de la carence en folates est basé sur les dosages conjoints des folates et de la vitamine B₁₂. Les carences d'apport en vitamine B₁₂ ne sont plus très rares à cause de l'expansion actuelle du végétalisme.

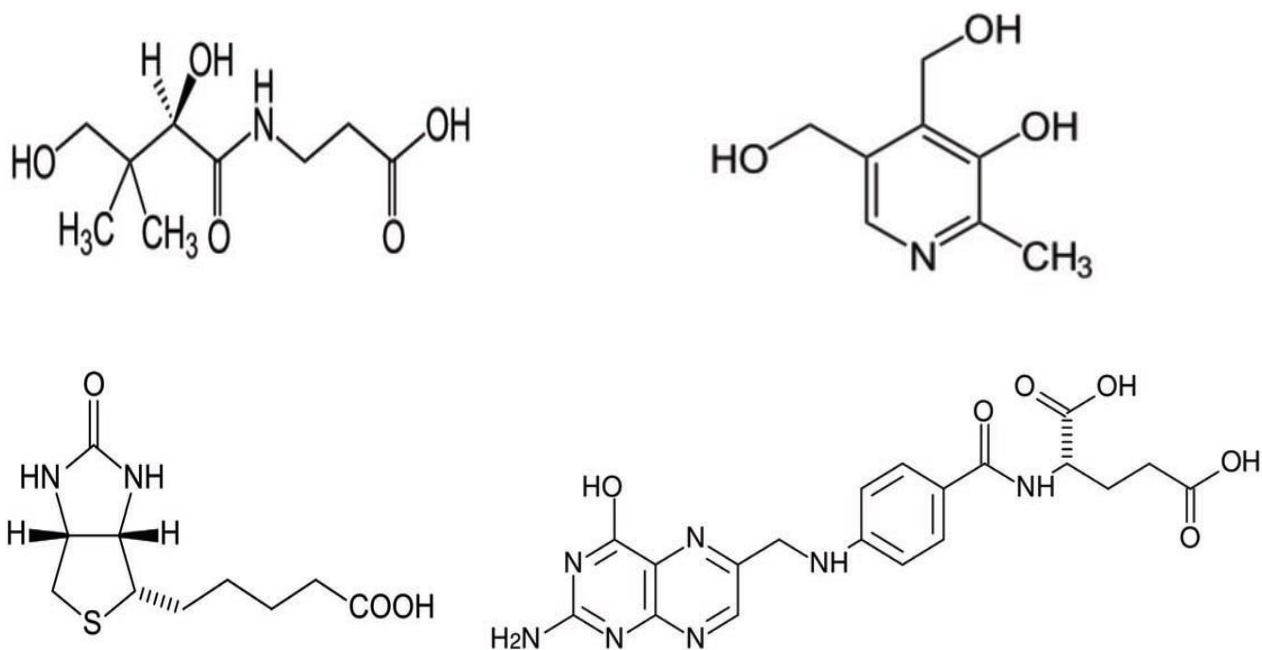


Figure36: Structure des vitamines B5 B6 B8 et B9

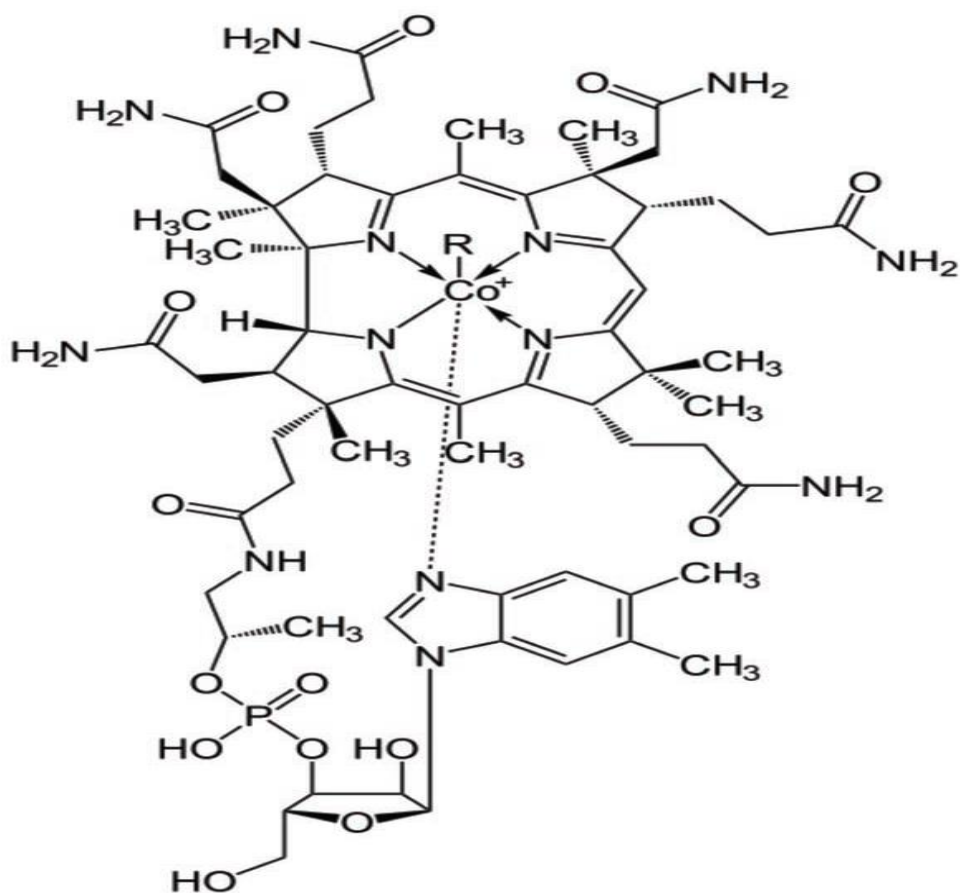


Figure37: Structure du vitamineB12

- **Acide ascorbique (C)**: La vitamine C est un acide organique dont la structure est apparentée à celle des sucres à six atomes de carbone (formule chimique $C_6H_8O_6$). Dans la plante, l'acide ascorbique est principalement présent sous sa base conjuguée: L-Ascorbate sert à la défense de l'organisme L'ascorbate ou l'acide ascorbique constitue la forme réduite de la vitamine C. Par ailleurs, l'ascorbate peut être oxydé en monodéhydroascorbate (MDHA) qui se dissocie rapidement de nouveau en ascorbate et en déhydroascorbate (DHA) ; le DHA est ensuite dégradé ou de nouveau réduit

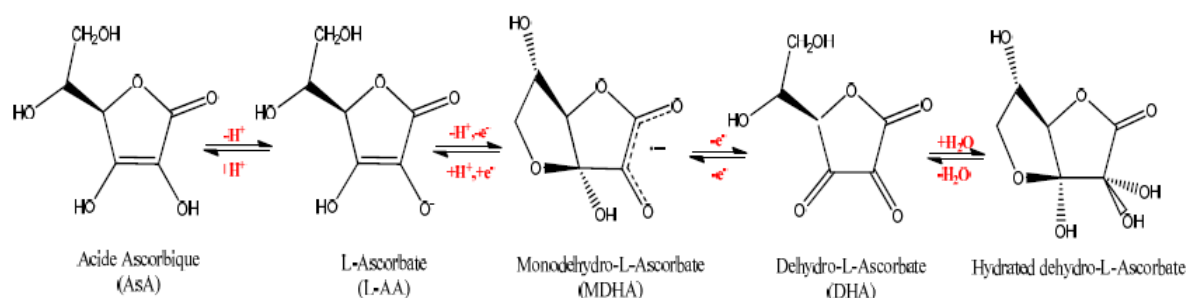


Figure 38: Forme oxydée et réduite de la vitamine C

b) Les vitamines liposolubles: sont uniquement animales pour la plupart, ou sous des formes proches ou de précurseurs dans les végétaux.

- **Rétinol (A)**: Designe le rétinol, ses esters et ses dérivés métaboliques (rétinal, acide rétinoïque, rétinyl phosphate, etc.). En fait, tout composé présentant des caractéristiques biologiques similaires à celles du rétinol, précurseur de la molécule de vitamine A active, est appelé ainsi, c'est un aliment essentiel indispensable à de nombreuses fonctions physiologiques. Le carotène précurseur de la vitamine A (une molécule de carotène deux molécules de rétinol), est un pigment jaune essentiellement trouvé dans les plantes. La vitamine A assure la croissance et la différenciation cellulaire chez le fœtus, en particulier dans la vision, l'intégrité des épithéliums, le fonctionnement membranaire, et joue un rôle dans les réponses immunitaires. Le transfert placentaire de la vitamine A est faible, si bien que les réserves hépatiques sont très basses à la naissance chez le nouveau-né (10 à 40 $\mu\text{g/g}$ de foie). La vitamine A se trouve dans les légumes verts, les produits laitiers, les oeufs et le foie. Le lait féminin contient peu de vitamine A: 54 $\mu\text{mol/l}$ dans le colostrum, puis cette concentration diminue au fur et à mesure de l'allaitement à 1,7 $\mu\text{mol/l}$ à trois mois, vitamine de la croissance et de la vue.

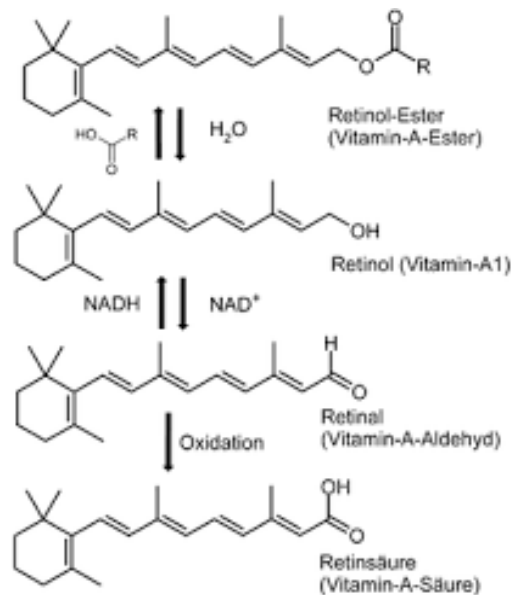


Figure39: Structure de vitamine A et ses dérivés

- **Calciférol (D):** A une structure moléculaire de stéroïde. Elle existe sous différentes formes différant entre elles par leur degré d'hydroxylation (figure40). La vitamine D a deux origines, exogène et endogène. L'origine exogène est représentée par les sources alimentaires (dont la consommation reste toutefois limitée) soit animales essentiellement représentées par les poissons gras (vitamine D3 ou cholécalférol = D3), soit végétales (vitamine D2 ou ergocalciférol = D2). Ces vitamines D2 et D3 sont absorbées dans l'intestin grêle. La seconde origine qui représente en règle générale la majeure partie est endogène sous la forme de vitamine D3. La peau peut la synthétiser à partir de 7-déhydrocholestérol sous l'effet de certains rayonnements UVB (longueur d'onde entre 290 et 315 nm). Sous l'influence de la température (optimal à 37 °C), cette prévitamine D3 est ensuite isomérisée en vitamine D3. En situation d'exposition intense à un ensoleillement important, l'excès de prévitamine D3 formé est transformé en composé inactif sous l'effet de la chaleur. il n'y a pas d'intoxication à la vitamine D suite à une exposition excessive et prolongée au soleil, vitamine du squelette. La 1,25(OH)₂D joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie phosphocalcique avec une régulation des taux sériques de calcium physiologiques en agissant à la fois sur les parathyroïdes, le rein et l'intestin. Dans la cellule intestinale, la 1,25(OH)₂D permet, par un processus actif, d'augmenter l'absorption de calcium et de phosphate lorsque les apports calciques ou phosphorés sont faibles, ou dans certaines circonstances physiologiques (croissance, grossesse, lactation) ou pathologiques (hyperparathyroïdes, granulomatoses...). Ainsi, les échanges phosphocalciques dans le tissu osseux permettent une minéralisation

osseuse satisfaisante. En cas de déficit en vitamine D, la diminution de l'absorption intestinale de calcium et la tendance à l'hypocalcémie vont induire une augmentation de la PTH sérique qui va rétablir une calcémie normale mais aux dépens de l'os en stimulant le remodelage osseux (hyperparathyroïde secondaire) aboutissant à terme à une fragilité de l'os. Si le déficit est profond, cela se traduit par un défaut de minéralisation représenté par le rachitisme chez l'enfant et par l'ostéomalacie chez l'adulte.

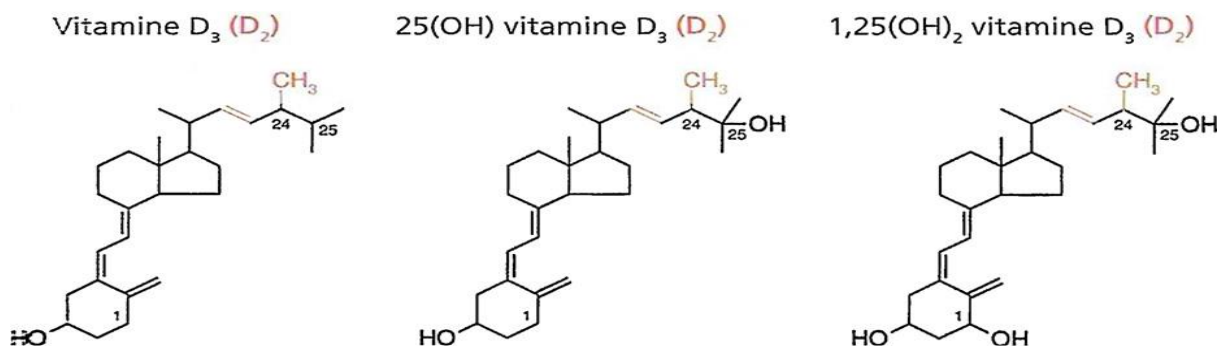


Figure 40 : Différences structurelles entre vitamine D3 et D2 et leurs métabolites

- **Tocophérol (E)**: Appelée aussi α -tocophérol, elle a essentiellement des propriétés antioxydantes et un rôle stabilisateur des lipides membranaires. Elle a de plus un effet inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Son métabolisme est bien connu. 20 à 30 % du contenu intestinal seulement est absorbé. Elle agit en inhibant la peroxydation naturelle des acides gras polyinsaturés (PUFA) présents dans les membranes cellulaires. Elle réagit plus rapidement avec les radicaux peroxydes que ne le font les PUFA. Aussi elle a la possibilité de nettoyer les radicaux libres qui sont produits par la réduction de l'oxygène et les résidus des enzymes oxydatifs. La peroxydation commence lorsqu'un ion H₂ s'échappe d'une double liaison, dévoilant un intermédiaire très réactif qui peut interférer avec une nouvelle molécule d'oxygène. Le radical libre formé va interférer avec une autre chaîne de PUFA et créer un peroxyde stable et des radicaux libres lipidiques. Ainsi, la vitamine E est un antioxydant biaisant cette réaction en chaîne du fait de son habilité à se substituer à l'oxygène dans cette réaction, cela en fournissant un ion H₂ stabilisateur au radical libre. Cette fonction est beaucoup plus importante dans les tissus en croissance dont elle maintient l'intégrité, et en particulier chez le prématuré. Les différents isomères du vitamine de la fécondité tocophérol ont des propriétés et des activités antioxydantes différentes.

- **Phylloquinone (K)**: C'est une naphthoquinone ayant des propriétés antihémorragiques. La forme naturelle comporte la vitamine K1 ou phylloquinone d'origine végétale, et les vitamines K2 ou ménaquinones d'origine bactérienne. Ce sont celles-ci qui sont synthétisées

dans le grêle terminal et le côlon, et qui correspondent à la forme d'origine endogène de la vitamine K. Il en existe un grand nombre, se différenciant par la longueur de la chaîne latérale. Cette source endogène pourrait assurer de 10 à 100 % des besoins chez l'adulte. Chez le fœtus et à la naissance, les taux plasmatiques de vitamine K dépendent du transfert transplacentaire, mais celui-ci est limité; le taux foetal est 20 à 40 fois inférieur à celui de la mère, et de plus, les taux ne sont pas corrélés; même après une dose intraveineuse de 1 mg de vitamine K à la mère juste avant l'accouchement, le taux peut rester indétectable dans le sang du cordon chez le nouveau-né. Comparé aux autres vitamines liposolubles, le taux bas constaté à la naissance n'a pas encore reçu d'explication. Les taux néonataux dépendent de la synthèse endogène qui commence avec le développement de la flore intestinale et de l'apport de vitamine K. Le taux plasmatique est corrélé à la quantité de lait reçue et à la teneur en vitamines de celui-ci. Le lait de femme, colostrum ou lait mature ne contient que très peu de vitamine K, moins de 0,5 µg/l, alors que le lait de vache en contient 100 fois plus ; les formules pour prématurés et nourrissons assurent un apport satisfaisant selon les recommandations de la Société Européenne de Gastroentérologie et de Nutrition Pédiatrique (ESPGAN). L'absorption de la vitamine K1 a lieu dans le grêle proximal et nécessite une concentration en sels biliaires et une fonction pancréatique satisfaisante. La vitamine K est absorbée avec les chylomicrons. Quarante à 70 % de la vitamine K1 est absorbée, et le pic plasmatique survient après 12 heures chez le nouveau-né, contrairement à l'adulte où il apparaît après trois heures. Les vitamines anti-hémorragiques, vitamines K2 d'origine intestinale sont absorbées au niveau de l'iléon terminal et du colon.

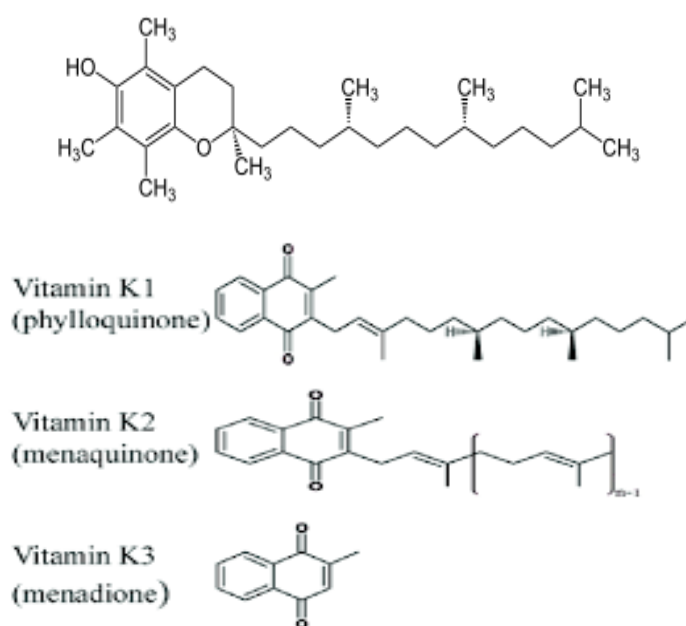


Figure 41: Structure de la vitamine E et les structures de vitamine K

Le tableau 11 résume les principaux rôles des vitamines liposolubles

Tableau11: Rôles des vitamines liposolubles

Vitamine	Nom	Rôle	Conséquence de la carence
Vitamine A	Rétinol	Favorise la croissance, améliore la vision (antixérophtalmique) - coenzyme substrat de la rhodopsine captant la lumière	Manque de croissance, altération des épithéliums, cécité crépusculaire
Vitamine D	Calciférol	Antirachitisme, favorise l'absorption du calcium et du phosphore (prohormone transformée dans le foie en hormone intervenant sur le métabolisme phosphocalcique)	Rachitisme, ostéomalacie, hypoparathyroïdie
Vitamine E	Tocophérols Tocotriénols	Antioxydant, Antistérilité	Stérilité, Anémie hémolytique du nouveau-né
Vitamine K ₁	Phylloquinone	Antihémorragique (coagulation sanguine), fixation du calcium par les os	Hémorragie par avitaminose K
Vitamine K ₂	Ménaquinone		

➤ Sources et importances biologiques

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. Les vitamines ont deux types de rôles une fois transformées dans l'organisme:

- Un rôle coenzymatique pour la plupart (coenzymes substrats, coenzymes de transfert de groupement, coenzymes activateurs de substrats);
- Un rôle hormonal (pour la vitamine D et probablement A pour une part).

On peut définir l'action globale des vitamines selon leur intérêt comme le rôle dans l'hématopoïèse (acide folique), la perméabilité cellulaire (acide ascorbique) les sources alimentaires des vitamines du groupe B sont représentées dans le tableau suivant:

Tableau12: Source en vitamines du groupe B

Vitamines du groupe B	B1	B2	B3	B9	B12
Levures	1-10	2-5	10-60	4 000	/
Farine de blé	0,3-0,5	0,1-0,2	5	300	/
Riz (grain entier)	0,5	0,2-0,5	5	10-20	/
Légumes	0,4-0,6	0,1-0,4	0,5-5	50-250	/
Fruits	< 0,15	< 0,15	0,1-5	10-50	/
Viandes (muscles)	0,1-1	0,1-0,4	6-12	10-50	2-10
Foies	0,3-1	1,5-3	5-25	50-500	20-100
Lait	0,04	0,15	0,4-1	< 10	1-4
Jaune d'oeuf	0,3-0,5	0,3	1-2	10-90	0,4
Fromages	/	0,3-0,7	2-10	100-200	0,2-2
Poissons	/	0,3-0,7	/	/	2-15
Valeurs exprimées en mg/100 g sauf pour B9 et B12 en µg/100 g.					

➤ **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 \longrightarrow **thiamine.**

- Béta-alanine micro-organismes \longrightarrow **acide pantothénique.**

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

D-glucose réduction \longrightarrow D-sorbitol $\xrightarrow{\text{oxydation par } Acetobacter\ suboxydans}$

L-sorbose $\xrightarrow{\text{oxydation et transformation chimique}}$ **acide L-ascorbique.**

➤ 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 shampooings) 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.

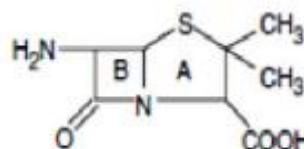
1.3. Antibiotiques

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

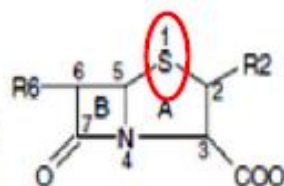
- **Béta lactamines** (dérivés de deux acides aminés): il s'agit de bactéricides à faible toxicité (ex: Pénicilline, Céphalosporines ...).

Dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique
Cycle β -lactame (B) + cycle thiazolidine (A)

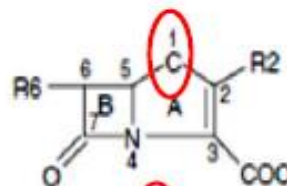


• **Pénames (pénicillines)**

- Pénicillines G et V sensibles aux pénicillinases
- Pénicillines antistaphylococciques résistantes aux pénicillinases : pénicillines M semi-synthétiques
- Pénicillines à large spectre (ampicilline et apparentés) et pénicillines actives sur *Pseudomonas aeruginosa* (carboxypénicillines et uréidopénicillines)
- Amidinopénicillines (pivmécillinam)
- Pénicillines sulfones (sulbactam et tazobactam)



• **Carbapénèmes**



• **Clavames ou oxapénames**

- Acide clavulanique

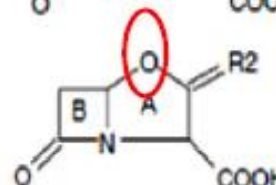


Figure 42: Structure de base des β lactamines

- **Aminosides** (oligosaccharides aminés): il s'agit de bactéricides ayant une toxicité sur le rein et l'oreille interne (ex: Streptomycine, Gentamycine...).

- **Macrolides** il s'agit de bactériostatiques à faible toxicité (ex: Erythromycine, Spiramycine...).

- **Polypeptides**: il s'agit de bactéricides ayant une toxicité sur le rein et le système nerveux (ex: Bacitracine, Polymyxine...).

- **Dérivés d'un seul acide aminé**: il s'agit de bactériostatique ayant une toxicité sur la moelle osseuse (ex: Chloramphénicol, Cyclosérine...).

- **Composés comportant des cycles**: ex: Tétracyclines (bactériostatique ayant une toxicité sur le foie) ; ex: Actinomycines, Novobiocine...

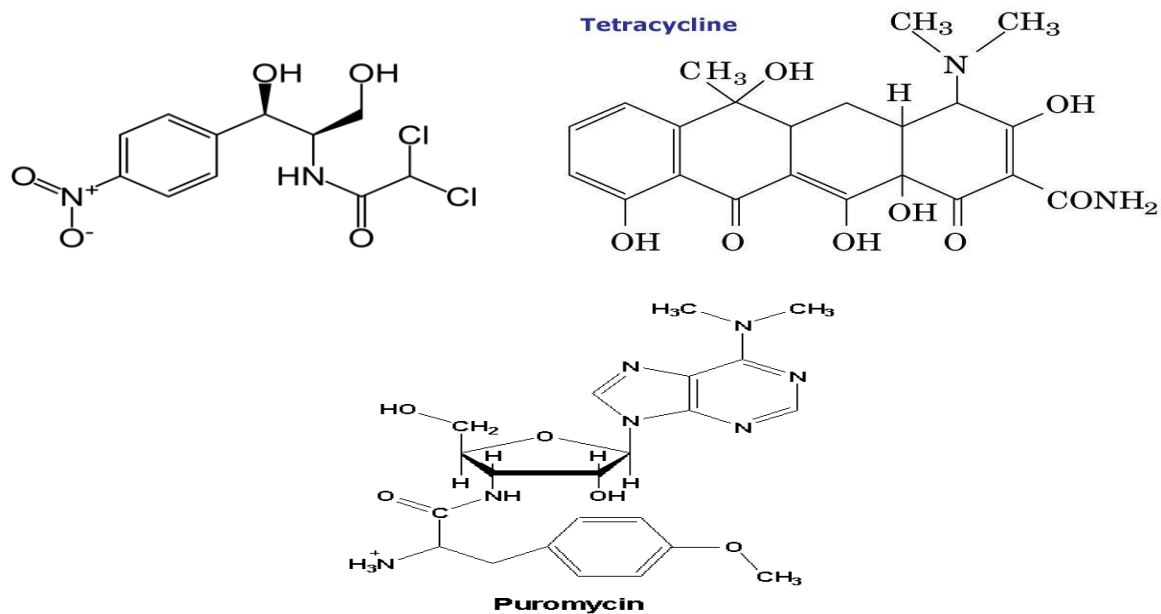


Figure 44: Structure de chlormphinicole, tetracycline et puromycine

➤ **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.

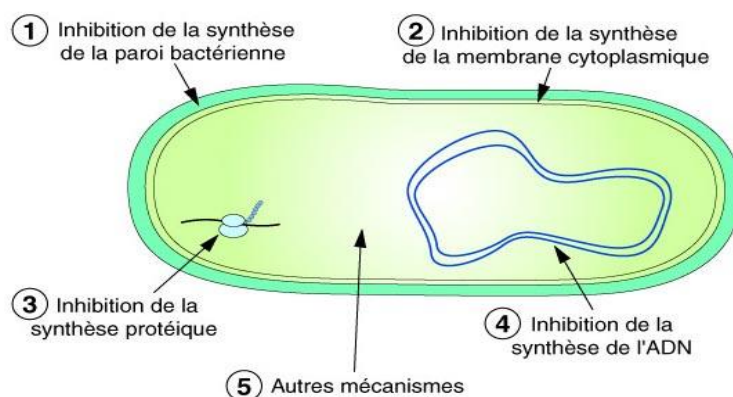


Figure 45 : Mécanisme d'action des antibiotiques

➤ **Résistance bactérienne**

De nombreux antibiotiques sont des produits naturels ou dérivés de produits naturels, souvent synthétisés par des bactéries elles-mêmes pour éliminer leurs compétiteurs dans le milieu environnant. Ces bactéries productrices d'antibiotiques ont en général développé en même temps des mécanismes de résistance leur permettant d'éviter les effets du composé qu'elles produisent. Des gènes de résistance aux antibiotiques pré-existaient donc souvent dans la biosphère bactérienne, avant leur utilisation par l'humain. L'émergence plus ou moins rapide de résistance chez les organismes pathogènes n'est donc pas surprenante, elle est souvent liée soit à l'acquisition par transfert d'un de ces gènes de résistance, soit à une adaptation d'un de ces gènes de résistance à une modification des molécules utilisées. Ainsi, l'amélioration progressive des bêta-lactames par l'industrie (exemple : céphalosporines de 1^{re}, de 2^e puis de 3^e génération) s'est accompagnée d'une évolution concomitante des bêta-lactamases qui se sont progressivement adaptées aux nouveaux composés, sous l'effet de la pression de sélection. Il existe différents mécanismes de résistance, certains généraux qui fonctionnent contre un large spectre d'antibiotiques et d'autres très spécifiques d'un seul. Il existe également des mécanismes de transfert d'une espèce à une autre, ce qui favorise la dissémination de la résistance et qui sont présentés plus bas. Dans tous les cas, le mécanisme aboutit à une action fortement réduite de l'antibiotique sur sa cible ou à une perte d'effet de cette action.

➤ Production

Les antibiotiques peuvent être obtenus par fermentation 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 microorganismes (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).

La pénicilline peut être produite 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. 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.

➤ 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 microorganismes (surtout les fungi).

4. Culture de biomasse et production d'organismes unicellulaires (P.O.U.)

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 complément des produits céréaliers) des vitamines, des antibiotiques, des vaccins, additifs alimentaire aussi es, des aliments et des alcools (bioéthanol...) et d'autres molécules.

➤ **Micro-organismes**

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

- ✚ **Les micro-organismes assimilant le CO₂** : 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*
- ✚ **Les micro-organismes assimilant les glucides** : tels *Candida utilis* sur les pentoses, *Aspergillus niger* sur les hexoses...etc.

➤ **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).
- ✚ 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*.

✚ La production de **pigments** ...etc.

Chapitre VI : Enzymologie appliquée

1. Enzymes immobilisées

➤ Biotechnologie

On appelle biotechnologie les procédés biologiques produisant des substances bénéfiques à l'agriculture, à l'industrie, à la médecine et à l'environnement. La biotechnologie est un domaine hautement interdisciplinaire. Elle tire son efficacité des techniques clés engendrées par les progrès conjoints de la biochimie, de la chimie, de la génétique, des mathématiques, de la microbiologie et de la physique.

➤ Enzyme

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, NH₂, 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.

1.1. Techniques d'immobilisation des enzymes

a) Immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière mécaniquement dans les mailles du réseau d'une matrice polymérique ou dans une microcapsule. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante. L'activité de l'enzyme est dépendante du microenvironnement local de l'enzyme immobilisé (pH, force ionique, diffusion moléculaire, etc.). Il n'y a aucun lien entre les enzymes et le polymère et donc peu de risque de dénaturation de l'enzyme. Cependant, les risques de relargage de l'enzyme ne sont pas négligeables si les mailles du réseau sont larges. D'autre part, si la réticulation est très importante, la cinétique de l'enzyme est ralentie par la diffusion du substrat et du produit. Cette méthode n'est donc pas adaptée à la digestion de protéines et est majoritairement appliquée pour des substrats et produits de faible masse moléculaire. Plusieurs polymères, entre autres l'alginate, le gel de polyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés dans l'immobilisation par inclusion.

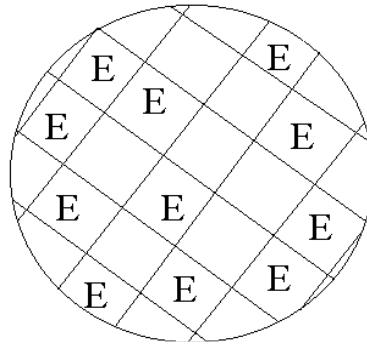


Figure 46 : Enzyme immobilisée par inclusion

Cette méthode est très simple mais possède trois inconvénients principaux:

- ✚ Le réseau formé est presque toujours trop lâche pour retenir complètement l'enzyme.
- ✚ La limitation diffusionnelle des substrats, des produits
- ✚ En présence d'agents complexant le gel se solubilise.

Mais elle a les avantages suivant :

- ✚ Réaction chimique avec l'enzyme limitée
- ✚ Applicables à toutes les enzymes
- ✚ Obtention de supports de formes adaptables
- ✚ Risques de fuites prévenus par réticulation du support après immobilisation

➤ **Inclusion dans une matrice**

Cette technique consiste à enfermer des enzymes dans une membrane semi-perméable. La limitation à des substrats de faible poids moléculaire pour l'enzyme, constitue le désavantage de cette méthode. Le second inconvénient est que la polymérisation interfaciale qui aboutit à la formation des microcapsules entraîne fréquemment une dénaturation des enzymes. Certains ont alors songé à utiliser des fibres creuses à travers lesquelles l'enzyme ne peut diffuser

b) Immobilisation par adsorption

Cette méthode est extrêmement simple puisqu'il suffit de laisser en contact l'enzyme et le support à un pH, une force ionique et une température convenable. Dans ce cas les enzymes sont retenues à la surface d'un support insoluble et inerte par l'établissement d'interactions secondaires entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. Cette immobilisation semble assurer une certaine mobilité conformationnelle à l'enzyme, ce qui permet de conserver les propriétés catalytiques des enzymes immobilisées. Cependant, les enzymes

peuvent se désorber facilement selon les variations de leur environnement (pH, force ionique, température). La concentration en enzyme, le temps de contact, le pH et la quantité du support sont des paramètres qui influencent l'adsorption. Différents supports, tels que les résines échangeuses d'ions anionique ou cationique, du charbon de bois actif, des gels de silice, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux ou des céramiques ont déjà été exploités pour l'immobilisation d'enzymes. Différents types de liaisons interviennent dans les réactions d'adsorption à savoir l'échange d'ions (liaison ionique), interactions hydrophobes, les interactions de Van Der Waals et la liaison hydrogène.

Le gel de silice compte parmi les principales substances adsorbantes et se prête à de nombreuses applications. C'est une forme d'acide silicique composé de granules irréguliers et poreux. Les produits de base sont essentiellement le silicate de sodium et l'acide sulfurique

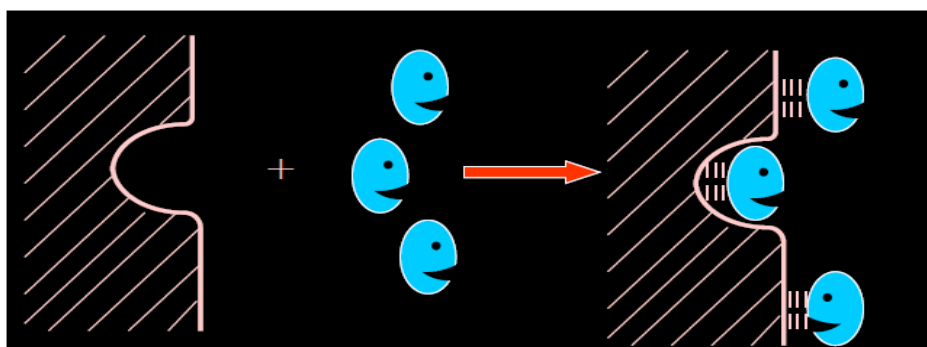


Figure 47 : Enzyme immobilisée par adsorption

Cette technique présente l'avantage de réutiliser le même support pendant 5 ans (sans problème). Le principal inconvénient est la fragilité de la fixation; ce peut être également un avantage si l'on souhaite désorber l'enzyme immobilisée pour la remplacer par une enzyme native. Les autres inconvénients de cette méthode sont les risques de mauvaise accessibilité au site actif, du fait de l'absence de bras espaceur, les difficultés d'utilisation en réacteurs continus du fait d'une désorption progressive de la protéine, qui est alors libérée dans le milieu réactionnel.

c) Immobilisation par liaison covalente

Cette immobilisation est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support. Ces groupes, en général insuffisamment réactifs, nécessiteront une activation préalable. A priori, il faut activer soit l'enzyme, soit le support. Pour des raisons qui tiennent à la difficulté de maintenir l'activité de l'enzyme (l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme peut

conduire à la dénaturation de l'enzyme) et aussi à la faible réactivité chimique des acides aminés (amine primaire, acide carboxylique, parfois thiol, phénol, hydroxyle), on choisit généralement d'activer le support. Afin de lier l'enzyme au support par liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives. Ces fonctions peuvent être créées par réaction directe (cellulose + CNBr par exemple) ou par greffage de composé bifonctionnel (bras espaceur) qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par les enzymes. Ce composé permet de fixer l'enzyme à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de l'enzyme à son substrat. Le tableau présenté montre certain des différents bras espaceurs utilisés pour lier les fonctions des supports et les fonctions portées par l'enzyme.

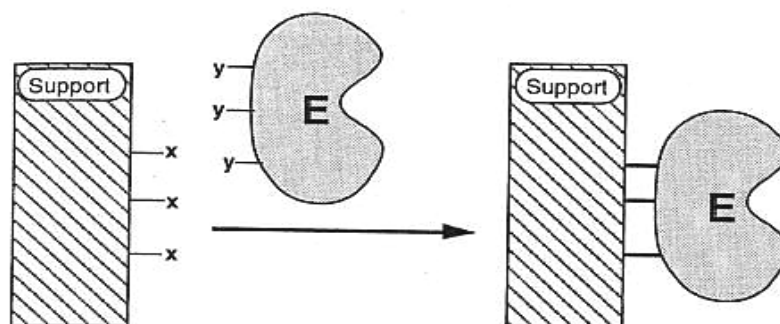


Figure 48 : Enzyme immobilisée par liaison covalente.

Les supports généralement utilisés pour l'immobilisation peuvent être classés en deux grands groupes:

- a)** les supports organiques qui comprennent les polyosides (acétate de cellulose, nitrate de cellulose, dextrane, agarose, alginate, chitosan, amidon), les polymères (le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS), le polyéthylène téréphtalate (PET) etc).
- b)** les supports inorganiques (verre poreux, silice, métalliques, alumino-silicates, etc.)

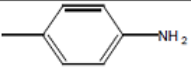
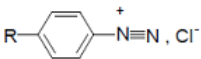
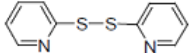
Les supports organiques peuvent être chimiquement activés par différentes techniques, ce qui constitue l'un de leurs principaux avantages car ils permettent la fixation d'enzymes par différentes voies. Les supports inorganiques sont généralement plus stables (résistance à l'usure, aux agents chimiques et aux bactéries) mais la fixation covalente sur ces supports est difficile à cause de leur faible réactivité

1.2. Propriétés des enzymes immobilisées

On peut citer trois principales propriétés des enzymes immobilisées:

- Stabilité et résistance aux conditions du milieu (pH, t°, acidité, ...).
- Activité catalytique préservée (site actif bien orienté).
- Fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme

Tableau 13 : Principaux groupements réactionnels entre le support et enzyme

Groupement fonctionnel au niveau du support	Composé bifonctionnel (bras espaceur)	Groupement fonctionnel au niveau de l'enzyme
-COOH	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Chlorure d'acide (PCl_3, PCl_5)	-NH ₂
-OH	Chlorotriazine ($C_3N_3Cl_2$) Halogénures de cyanogène (BrCN, ClCN)	-NH ₂
-NH ₂	Glutaraldéhyde ($OHC-(CH_2)_3-CHO$)	-NH ₂
-NH ₂	Carbodiimide ($R_1-N=C=N-R_2$) Isothiocyanate ($R-N=C=S$)	-COOH
	Isocyanate ($R-N=C=O$) Isothiocyanate ($R-N=C=S$) Sels de diazonium 	-tyrosine
-SH	4,4'-Dithiodipyridine 	-SH
-SH	3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester	-NH ₂

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.

A) 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.

B) 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.

C) 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 fixé par liaisons ioniques sur DEAE Sephadex et utilisé pour la production en continu de la L aminoacide (comme la L mét, la L Ala, L Phe, L Trp, L Val...).

D) Agro-alimentaire

✚ **Glucoserie:** l' α -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.

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**".

Un bioréacteur est une enceinte permettant la culture de tout type de cellule (animale, végétale, levure, moisissures et bactéries), et répondant à des critères de conception permettant d'influer efficacement sur la culture, de contrôler les paramètres physiques et chimiques (température, pH, aération, substrat...). Il doit permettre une stérilisation facile et un maintien de l'aseptie pendant toute la durée de la culture, et être caractérisé par une résistance mécanique et chimique aux contraintes liées à la culture du microorganisme (surpression, corrosion...) Le type du réacteur idéal pour une production optimale, dépend : des caractéristiques de la souche productrice, du milieu utilisé ainsi que le produit recherché.

➤ **Différents types de bioréacteurs**

Le type du réacteur idéal pour une production optimale, dépend : des caractéristiques de la souche productrice, du milieu utilisé ainsi que le produit recherché (figure 49)

a) Bioréacteurs à fermentation liquide : La performance des bioréacteurs dépend de leur construction géométrique, conception interne, la dispersion du gaz (aération et agitation), et les modes opératoires. Les types de réacteurs les plus utilisés dans les applications industrielles sont les cuves agitées. Dans l'objectif d'évaluer et de comparer des types de bioréacteurs, les critères de base les plus utilisés sont le transfert de masse gaz-liquide, le mixage du liquide, l'hydrodynamique des fluides et les forces de cisaillement. A titre d'exemple, pour une fermentation aérobie, la vitesse de consommation de l'oxygène est souvent très élevée et ainsi la capacité de transfert de matière (oxygène) est très importante dans ce cas. Pour des grandes installations (échelle industrielle), des hétérogénéités peuvent apparaître à cause de l'insuffisante d'agitation et on constate des fluctuations de concentrations des substrats et des produits ce qui diminue les performances des réacteurs. Dans le cas des microorganismes sensibles aux forces de cisaillement, il est approprié d'employer d'autres types de bioréacteurs tels que les colonnes à bulles ou les réacteurs Air-Lift.

b) Bioréacteurs à substrats solides : Pour réaliser une fermentation en milieu solide (FMS), il est nécessaire d'avoir des équipements appropriés. Le développement de la FMS a ainsi

entraîné le développement de fermenteurs solides. Cependant, le choix d'un fermenteur est délicat puisqu'il faut tenir compte de la granulométrie et de la capacité de rétention d'eau du substrat utilisé et de différents paramètres liés à la croissance du micro-organisme tels que : l'agitation, l'aération, la chaleur, etc. Les différents types de réacteurs industriels existants sont principalement destinés à la production de saké ou de sauce soja et présentent généralement une taille de 1 à 2 tonnes, mais certaines sociétés d'ingénierie sont capables de réaliser des réacteurs allant jusqu'à 20 tonnes (société Fujiwara). Le nombre de réacteurs conçus pour la FMS reste cependant encore limité et ceux-ci ne sont pas optimisés.

c) **Bioréacteurs à membrane:** Est un bioréacteurs à flux dans les quelles les membranes sont utilisées pour séparer des enzymes ou des des flux d'alimentations ou des produits, les membranes sont à base de cellulose (nitrate et acétate), polypropylène... appliquées dans les traitement des eaux usées et des gaz résiduaire dans les fermentations... etc.

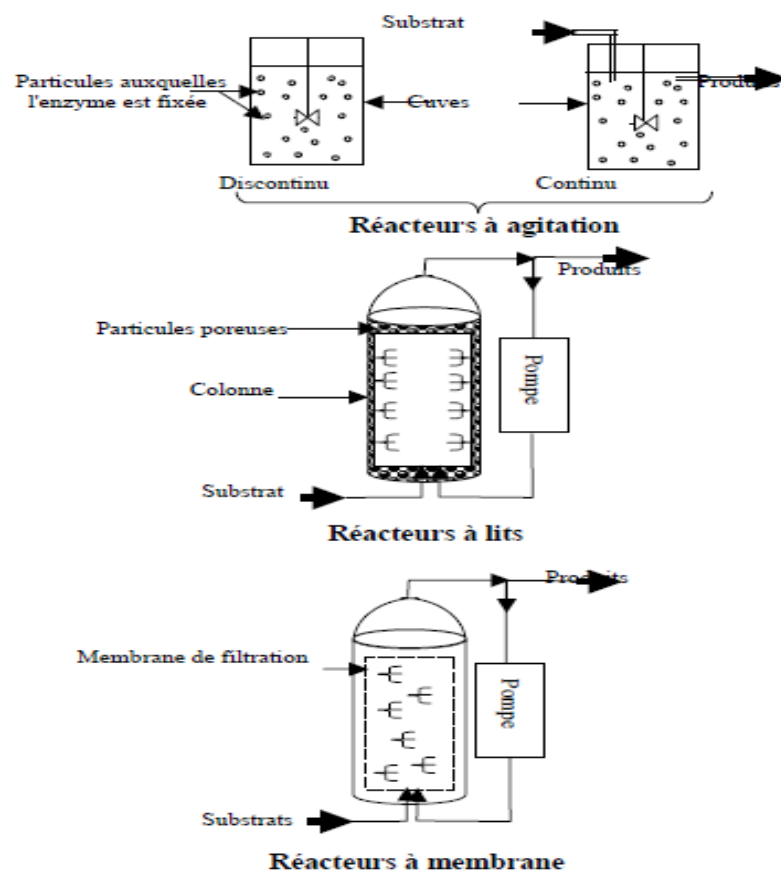


Figure49: Différents types de fermenteurs

➤ **Mode de culture**

-En milieu solide: (fermentation sur milieu solide : FMS) : La culture sur substrat solide est traditionnelle en Asie pour l'obtention de produits dérivés fermentés du riz et du soja. La FMS est décrite comme un processus où les microorganismes sont cultivés sur une matrice solide, servant de support et/ou de substrat, en absence ou presque d'eau libre. Cependant, la matrice doit contenir assez d'eau pour permettre la croissance du micro-organisme. Le maximum d'humidité dépend de la capacité d'absorption du substrat utilisé. Les milieux solides sont l'habitat naturel des champignons, il est donc naturel que la FMS soit mieux adaptée à leur culture par rapport aux micro-organismes unicellulaires. De part leurs propriétés biochimiques, enzymologiques et physiologiques, les champignons permettent de produire des molécules très variées. De plus, la croissance apicale des champignons permet une colonisation rapide du milieu.

-En milieu liquide : La fermentation submergée comprend une large variété de processus microbiens agités et non agités, où la biomasse est complètement encerclée dans le milieu de culture liquide. Celles-ci sont réalisées avec différents substrats, habituellement dissout ou en suspension dans un milieu aqueux. Il existe trois modes de culture sur milieu liquide parfaitement agité.

✓ **Culture liquide agitée en batch :** C'est une culture discontinue, le procédé est réalisé dans un système clos (fermé) dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée, se déroule dans un fermenteur parfaitement mélangé. Un même volume du milieu reste constant dans la cuve et sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation du produit. Après avoir remplis le fermenteur de milieu stérile et l'inoculer, on n'introduit rien, que la solution de correction de pH et l'agent anti-mousse. La croissance se poursuit jusqu'à l'épuisement du milieu nutritif, les conditions extérieures de température, en particulier, étant maintenues constantes et favorables au développement du microorganisme étudié. La croissance bactérienne passe par les phases montrées dans la figure 50

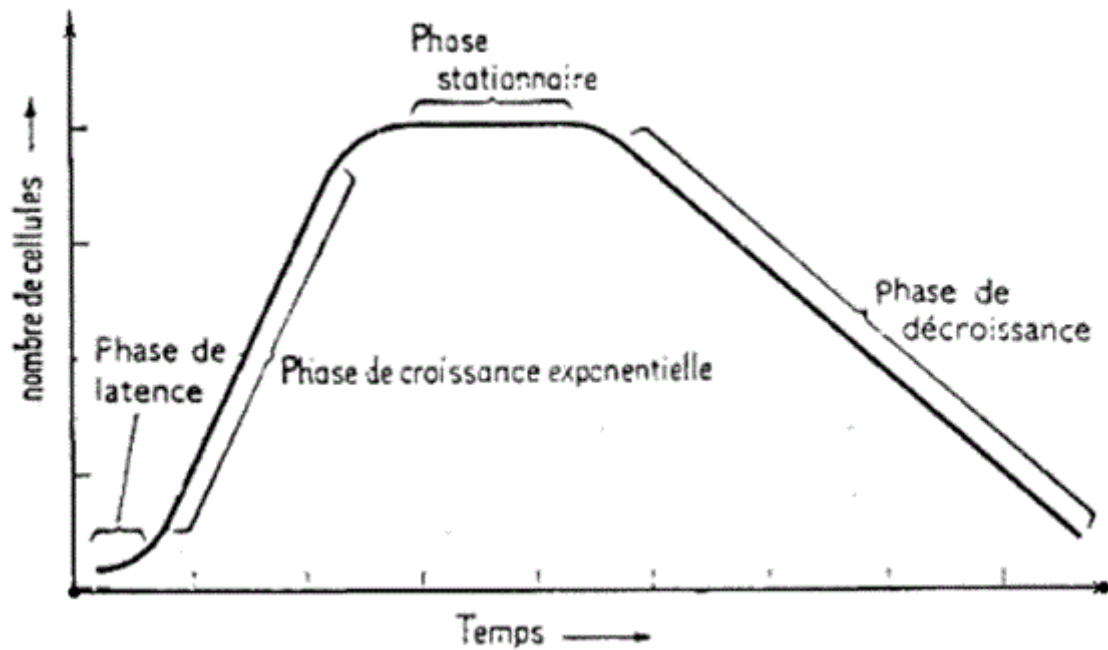


Figure 50: Croissance bactérienne

Phase de latence : C'est une période d'adaptation métabolique du microorganisme au milieu, au cours de laquelle, il synthétise les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats disponibles. Cette phase est sans division cellulaire ($x = x_0$ population constante), la vitesse de croissance est nulle ($\mu=0$).

✚ **Phase d'accélération :** La multiplication cellulaire démarre avec une vitesse spécifique de croissance de plus en plus grande ($0 < \mu < \mu_{\max}$).

✚ **Phase exponentielle :** La croissance est maximale et constante. Les cellules filles croissent au même taux que leurs cellules mères. Le nombre de cellules en culture et leur masse augmente proportionnellement au temps, selon une progression géométrique, d'où l'allure exponentielle du phénomène. En coordonnées semi-logarithmique, $\log x = f(t)$, cette phase est représentée par une droite. Le taux de croissance μ est constant et maximum pendant cette phase (il est nul pendant la phase de latence et stationnaire). Il est graphiquement représenté par la pente de cette droite. La quantité de nutriments est en excès et la biomasse augmente donc le plus rapidement. Les produits formés au cours de cette phase sont les métabolites primaires. Tant que n'apparaît pas de facteur limitant la croissance, la phase exponentielle se poursuit.

Phase de ralentissement : La population ne peut pas croître indéfiniment dans un milieu non renouvelé. Le taux de croissance diminue progressivement, entraînant une augmentation de plus en plus réduite du nombre de cellules. Un ralentissement ou un arrêt de la croissance apparaissent lorsque un nutriment essentiel est épuisé : limitation par le substrat énergétique

Phase stationnaire : C'est le niveau d'accumulation maximum de la biomasse, X atteint son niveau maximum X_f (la croissance cesse). L'augmentation de la concentration cellulaire s'arrête ($\mu = 0$), Ceci se traduit graphiquement par un plateau de durée variable mais généralement courte. Elle fait suite à la consommation des nutriments et à la présence de déchets microbiens bactériostatiques et bactéricides

Phase de décroissance (phase de déclin) : La phase de déclin correspond à la diminution de la biomasse liée à une lyse cellulaire. Le nombre de cellules viables diminue, du fait de la mortalité dont le taux augmente progressivement.

✓ **Culture discontinue alimentée (fed-batch) :** C'est une culture en batch, qui commence dans un petit volume de milieu de culture (pied de la cuve). La culture démarre plus vite par le fait de l'inoculation d'un faible volume par un même taux d'inoculum que précédemment. Cette phase de démarrage correspond à la culture discontinue. Lorsque le microorganisme est en phase exponentielle, le milieu de culture stérile est introduit dans la cuve. Le débit d'alimentation est réglé de tel sorte que la concentration en substrat soit constante dans la cuve et corresponde à une étape de la phase logarithmique de croissance. L'augmentation de la quantité de biomasse dans le fermenteur au cours d'un intervalle de temps est due à la croissance microbienne et à l'augmentation du volume de milieu du fait de l'alimentation en milieu frais. Lorsque la cuve est remplie, l'alimentation est coupée. La culture évolue conformément à la courbe de croissance discontinue. Cela correspond à la phase de ralentissement puis à la phase stationnaire au cours desquelles on observe l'épuisement en substrat du milieu.

✓ **Culture continue :** La croissance continue correspond à un système ouvert dans lequel la population microbienne est maintenue dans un état de croissance équilibré et optimale en phase exponentielle. Cette situation est stabilisée par le renouvellement permanent du milieu de culture, assuré par un apport régulier de milieu nutritif qui est compensé par le retrait simultané du même volume de culture. Les paramètres physico-chimiques de la culture (pH, température, concentration en oxygène et la mousse) sont contrôlés en permanence en cours de culture par leur correction si nécessaire. Dans un milieu non renouvelé, la phase de déclin est vite atteinte. Cela crée des problèmes pour les bio-industries. Du point de vue économique, il est très important de prolonger la phase exponentielle plusieurs jours. La solution est de renouveler constamment le milieu de culture et en récupérant les produits du métabolisme et les déchets. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de chémostat et d'autres équipements plus complexes.

➤ **Comparaison entre la fermentation liquide et la fermentation solide**

Divers problèmes peuvent être rencontrés au cours d'une fermentation en milieu solide. Les principaux obstacles rencontrés sont : la faible capacité à réguler les paramètres influençant la FMS, la forte hétérogénéité du milieu, le passage à grande échelle, l'estimation de la biomasse. La fermentation en milieu liquide (FML) permet un meilleur contrôle des facteurs environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, les produits sont dilués et les extraits enzymatiques peuvent être moins stables. Cependant, la FMS possède de nombreux avantages par rapport à la FML. Tout d'abord, elle se prête bien à la croissance de champignons filamenteux puisqu'elle mime les conditions naturelles de développement de ces micro-organismes. Le procédé se déroulant à de faibles taux d'humidité, le risque de contamination par les bactéries et les levures est moins important. De plus, un ensemencement important permet de contourner une éventuelle contamination par d'autres champignons. Les conditions de stérilité ne sont donc pas aussi strictes qu'en FML. La FMS permet d'utiliser beaucoup moins de liquide par rapport à la FML ce qui permet de réduire le volume d'eau à traiter entraînant ainsi une diminution du coût de production global. Il est également décrit que la FMS permet d'obtenir de meilleurs rendements pour la production d'enzymes. Un des avantages majeurs de la FMS est la valorisation des coproduits solides agroindustriels. Ceci est très important au niveau environnemental et économique

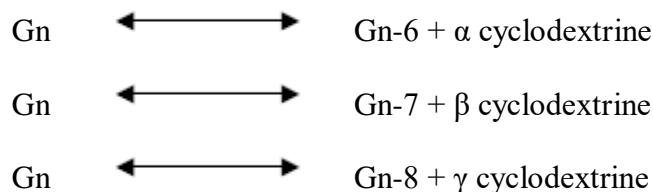
1.5. Enzymes immobilisées: Cas des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des molécules cycliques (macrocycles) naturelles constituées de six à douze unités d'un sucre, l' α 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.

➤ **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 α (1 – 4). Les trois formes les plus courantes, l' α -cyclodextrine, la β - cyclodextrine et la γ -cyclodextrine, renferment respectivement six, sept et huit unités glycosyle :



Où Gn : substrat linéaire

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.

➤ Cyclodextrines et enzymes artificielles

Des études ont permis de montrer que l'extérieur des cyclodextrines (Cds) est tapissé par les fonctions hydroxyles des unités glucose, tandis que les atomes de carbone et d'hydrogène tapissent l'intérieur de la cavité donnent aux cyclodextrines leur caractère amphiphile caractéristique, du à un extérieur relativement hydrophile (surface de contact avec le solvant) et à un cœur relativement hydrophobe (surface de contact avec la molécule invitée). La capacité à former des complexes d'inclusion reste la propriété la plus caractéristique des Cds. En effet, la présence de cette cavité hydrophobe permet la complexation de nombreuses molécules, les seules conditions étant la compatibilité de taille et la polarité de la molécule "invitée". Deux critères de sélection déterminent si une molécule sera complexée ou non par une cyclodextrine donnée:

✚ **La géométrie:** la molécule hôte doit avoir une taille qui s'accorde aux dimensions internes de la cavité. Néanmoins une molécule beaucoup plus grande peut-être incluse partiellement ou si elle possède plusieurs sites d'interactions, donner lieu à la formation de complexes comportant plusieurs molécules (2 ou 3) de cyclodextrines.

✚ **La polarité:** les cyclodextrines complexent de préférence des molécules ou des fonctions apolaires.

De nombreux chercheurs ont modifié structurellement les Cds, en les substituant par des groupements susceptibles de complexer des ions et ayant des propriétés d'hydrolyse de certaines liaisons, permettant ainsi la conception d'enzymes artificiels plus efficaces.

➤ **Domaines d'applications des cyclodextrines**

 **En médecine**

Les substances peu ou pas solubles dans l'eau (molécules apolaires) peuvent être ainsi considérablement augmentées 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 β 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 β 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 (tableau14).

Tableau 14: Exemples de complexes de principes actifs avec la β -cyclodextrine

Propriétés liées à l'utilisation de la cyclodextrine	Principes actifs
Amélioration de la biodisponibilité	Piroxicam, indométacine
Augmentation de la biodisponibilité	Stéroïdes spironolactone, Antiinflammatoire non stéroïdiens: ibuprofène, indométacine Bendodiazepines: diazepam Vitamines: vitamine K Barbutiriques: phénobarbital
Amélioration de la stabilité des molécules volatiles	Camphre
Amélioration de la stabilité des molécules oxydables	Vitamine A
Amélioration de la stabilité des molécules hydrolysables	Acide acetyl 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.

Références bibliographiques

- 1) Baudin B,2019. Les vitamines du groupe B : structures et roles dans le métabolisme, déficits nutritionnels. Revue Francophone des Laboratoires • n° 514. Elsevier Masson SAS.
- 2) Benoît Arnoul-Jarriault. 2006.Extraction des hemicelluloses de pâtes papetières pour la production de pâte à dissoudre. These de doctorat. Universite Grenoble Alpes.216.
- 3) Capucine Massot. Analyse des variations de la teneur en vitamine C dans le fruit de tomate et rôle de l'environnement lumineux. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2010. Français. NNT : 2010AVIG0631.
- 4) Charles Alais, Guy Linden, Laurent Miclo; Biochimie alimentaire – 5^{eme}. Éd. Masson.254p
- 5) Dorothée Colas.2012. Etude de la bioraffinerie des plantes vertes: Application au fractionnement des protéines de luzerne par extrusion bi-vis et chromatographie hydrophobe.Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).pp: 10-39.
- 6) Elodie Sollier. 2009. Microsystèmes pour la préparation d'échantillons sanguins. Biophysique Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- 7) Ferrary O, Hercend C, Peoc'h K, Dauvergne A.2019.9La vitamine B1 : la première vitamine identifiée. Revue Francophone des Laboratoires • n° 514. Elsevier Masson SAS.
- 8) Gaillard O, Desbène C.2013. Caractéristiques immunoanalytiques des vitamines D(formes 25(OH)D et 1,25(OH)2D).Immunoanalytical characteristics of vitamin D (25(OH)D and 1,25(OH)2D). Immuno-analyse et biologie spécialisée. 28: 84-90.
- 9) Gerald Gregori. La cytométrie en flux, principes. Laboratoire de Microbiologie, de Géochimie et d'Ecologie Marine.
- 10) Gergia Barvoletz- Meimon, Xavier Ronot.Culture de cellule animale.3eme ed.INSEM. Lavoisier.
- 11) Guillard JC, Herbeth B, Le Moe G.2007. Les vitamines. Cahier de formation.Biologie.Médicale.Société Phrancophone Vitamines et Biofacteurs.362p.
- 12) Guignard Jean.Louis, 2000. Biochimie végétale. Dunod.257p.
- 13) Guignard, J.L., Dupont, F. 2005. Botanique systématique moléculaire. 13 ed. Masson. Paris: 247-249.

- 14) Hadjer Z.2018. Amélioration de la stabilité des enzymes par moyen d'immobilisation : cas des hydrolases. Thèse de doctorat en sciences biologiques. Université Ibn Khaldoun. Tiert. 122 p.
- 15) Haddadou Imane.2014. Étude des propriétés des membranes cellulosiques issues de différentes espèces de bois algériens.Thèse de doctorat. Université m'hamed Bougara Boumerdes.pp:10-30.
- 16) Haytem JARRAR.2011. Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles.
- 17) Hopkings, W.G. 2003. Physiologie végétale. 2eme éd. De Boeck. Espagne, pp: 140-287
- 18) Jean-Luc Wertz.2011. Document ValBiom – Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.3-16.
- 19) Jordan Perrin.2016. Production de cellulose pure à partir de bois par un procédé d'épuration et de blanchiment propre à base d'ozone, en vue d'une valorisation textile ou chimique.Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes, pp:11-41.
- 20) Kebaili Maya.2019. Valorisation des dechets verts et de biomasses en traitement des eaux .Thèse de Doctorat. Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira.pp: 9-10.
- 21) Mahé Joaquim.2018. La Pectine. Applications d'un polymère biodégradable dans le domaine de la santé.Thèse de Doctorat. Université d'Angers.pp 1-23.
- 22) Mahsa Ghasemi. Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma. Engineering Sciences [physics]. Chimie ParisTech, 2007. English. ffNNT : ff. ffpastel-00005078f
- 23) Malbos D. Buxeraud J. Faure S. Desport JC 2021. La vitamine A. Actualités pharmaceutiques.Supplement preparateur au n° 608 3e trimestre
- 24) René Heller, Robert Esnault, Claude Lance. 2004. Physiologie végétale.Nutrition. Dunod. 336p

25) Ricardo Aarón Chavez Montes. Caractérisation de mutants et transformants d'a -L-arabinofuranosidase chez *Arabidopsis thaliana*. These de Doctorat. Université Toulouse III. Paul Sabatier. Toulouse. 167p

26) Renato Monteiro. Aït Abdelmalek Belloumi. Bchini Nessim. UE Immunologie: Les anticorps monoclonaux et protéines de fusion thérapeutiques.

27) Salle B.-L , Delvin E, Claris O. 2005. Vitamines liposolubles chez le nourrisson. Archives de pédiatrie 12 :1174–1179.

28) Sébaoui Ouiza. 2018. Modélisation et optimisation de l'extraction de la pectine à partir du zeste de citron et de son utilisation dans l'encapsulation des composés phénoliques des margines de l'industrie oléicole. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammri. Tizi-Ouzou. p 120.

29) Sylvie Meyer, Catherine Reeb, Bosdeveix Robin. 2008. Botanique : Biologie et physiologie végétales. 2^{ème} ed. Maloine. 498p.

30) Vilain A.-C. 2010. Qu'est-ce que le lait ?. Revue française d'allergologie 50:124–127

31) Zouabia Yamina. 2012. Fonctionnalisation des polysaccharides en vue de la préparation de divers amphiphiles associatifs. Etude comparative des propriétés physicochimiques. Thèse de Doctorat. Université Saad Dahleb Blida. P 142.

Site internet

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Vitamine>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Antibiotique>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme>

<https://fr.wikipedia.org/wiki/Bioreacteur>.