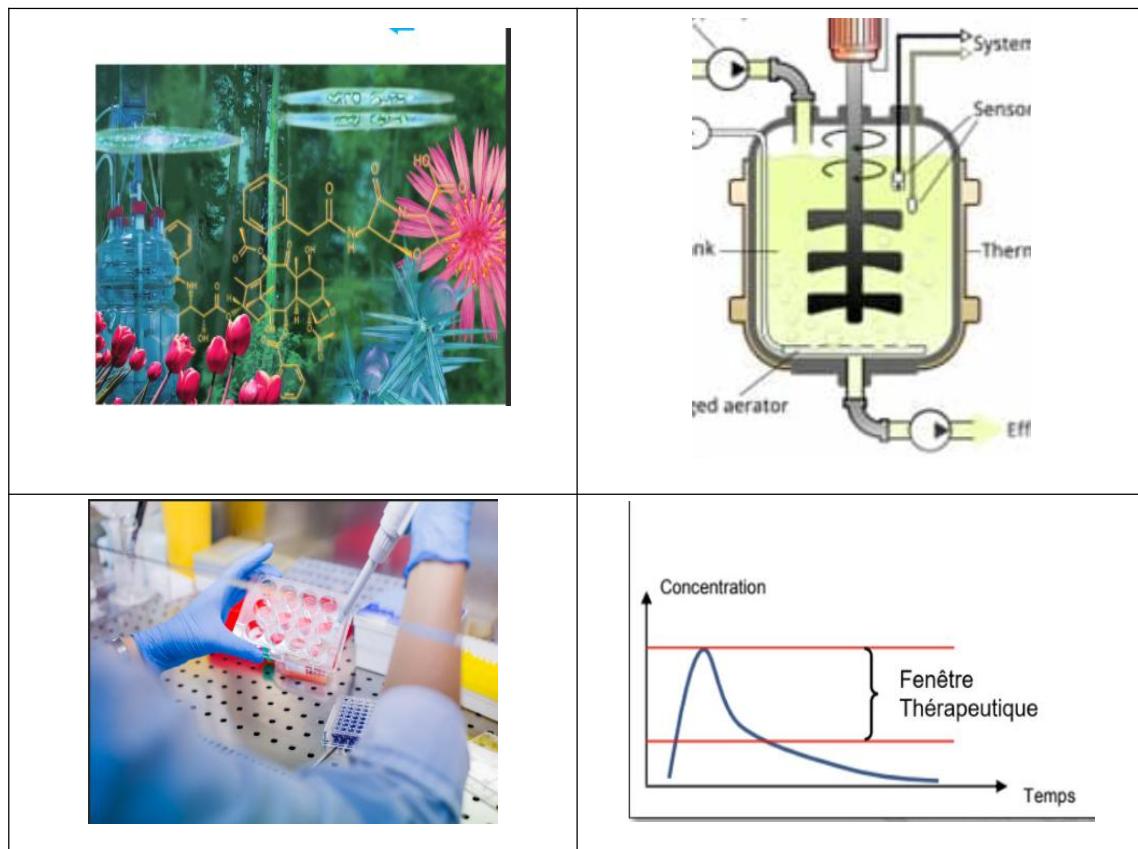


Université Ferhat Abbas Setif-1
Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie
Département De Biochimie

Polycopié du cours
Biochimie Appliquée



Destiné aux étudiants inscrits en 3ème année Licence Biochimie

Par Dr. Thoraya Guemmaz

Avant propos

Chapitre 1. Biochimie des substances d'origine végétale

1. Métabolites primaires.....	2
1.1. Glucides végétaux.....	3
1.1.1. Glucides des parois	4
1.1.1.1. Cellulose	4
1.1.1.2. Pectines.....	8
1.1.2. Glucides de réserve.....	12
1.1.2.1. Amidon.....	12
1.1.2.2. Inuline.....	14
1.2. Lipides végétaux.....	14
1.3. Protéines végétales.....	15
2. Métabolites secondaires	17
2.1. Composés phénolique.....	17
2.1.1. Biosynthèse.....	18
2.1.2. Classification.....	18
2.1.2.1. Phénols simples et acides phénoliques	18
2.1.2.2. Flavonoïdes.....	19
2.1.2.3. Tannins	19
2.1.2.4. Coumarines.....	20
2.1.3. Extraction des composés phénoliques	21
2.1.4. Rôle des composés phénoliques.....	22
2.1.4. Activités Biologiques des composés phénoliques.....	23
2.2. Alcaloïdes.....	23
2.2.1. Biosynthèse.....	24
2.2.2. Classification	24
2.2.3. Extraction des alcaloïdes.....	25
2.2.4. Rôle des alcaloïdes dans les plantes.....	26
2.2.5. Activités biologiques	27
2.3. Terpénoïdes.....	27
2.3.1. Classification.....	28
2.3.2. Extraction.....	29
2.3.3. Rôles physiologiques des terpénoïdes.....	30
2.2.4. Activités biologiques et utilisations des terpénoïdes.....	31

Chapitre II. Biochimie des substances d'origine animale

1. Le sang.....	33
1.1. Composition et rôle.....	33
1. 2. Prélèvement et transfusion sanguine.....	33
1.3. Séparation des différents constituants du sang.....	34
1.4. Etiquetage et Contrôle ABO.....	36
1.5. Fractionnement industriel du plasma	37
1. 5.1. Précipitation différentielle à l'éthanol.....	38
1.5.2. Cryoprécipitation du plasma.....	39
1.5.3. Ultrafiltration.....	40
1.5.4. Chromatographie.....	40
1.6. Mécanisme de la coagulation sanguine.....	41
1.6.1. Hémostase	41
1.6.2. Facteurs de coagulation sanguine.....	42
1.6.3. Inhibiteurs des facteurs de coagulation.....	43
2. Le lactosérum.....	45
2 .1. Définition et propriétés.....	45
2.2. Types de lactosérum.....	45
2 .2.1. Lactosérum acide.....	45
2.2.2. Lactosérum doux.....	46
2.3. Composition des lactosérum.....	46
2.3.1. Lactose.....	46
2.3.2. Protéines du lactosérum.....	47
2.3.3. Sels minéraux.....	49
2.3.4. Vitamines	49
2.4. Valorisation du lactosérum et de ses dérivés.....	49
2.4.1. Extraction des protéines.....	50
2.4.2. Précipitation.....	51
2.4.3. Ultrafiltration.....	51
2.4.4. Fermentation.....	51
2.4.5. Séchage.....	52
2.5. Utilisations du lactosérum.....	52
2.5.1. Alimentation animale.....	52
2.5.2. Alimentation humaine.....	52
2.5.3. Complément alimentaire pour les sportif.....	53
2.5.4. Biotechnologie.....	53
2.5.5. En industrie pharmaceutique	53
3. Culture Cellulaire.....	56
4. 3.1. Introduction.....	57
3.2. Culture primaire.....	57
3.3. Culture secondaire (Repiquage).....	57
3.4. Systèmes de culture cellulaire.....	58
3.5. Conditions de culture.....	59

3.6. Contaminations des cultures.....	61
3.7. Applications des cultures de cellules.....	61
3.7.1. Systèmes de modèles.....	61
3.7.2. Tests de toxicité.....	62
3.7.3. Recherche sur le cancer.....	62
3.7.4. Virologie.....	62
3.7.5. Usine de production.....	62
3.7.6. Thérapie génique.....	63
3.7.7. Hybridation cellulaire – application dans la production d'anticorps monoclonaux.....	63
3.7.8. Utilisations des anticorps monoclonaux	65

Chapitre III. Biochimie des substances d'origine microbienne

1. Introduction.....	62
2. Procédés de fermentation	65
2.1. Fermentation ou procédé discontinu ou batch.....	65
2.2. Fermentation ou procédé discontinu alimenté ou fed-batch.....	65
2.3. Fermentation ou procédé continu	65
3. Métabolites primaires.....	66
3.1. Biomasse	66
3.1.1. Micro-organismes producteurs.....	66
3.1.2. Utilisations de la biomasse.....	67
3.2. Acides organiques.....	68
3.2.1. Acide citrique.....	68
3.2.2. Acide lactique.....	69
3.2.3. Acide acétique.....	69
3.3. Enzymes	70
3.3.1. Conditions de la fermentation.....	71
3.3.2. Extraction (séparation) et purification des enzymes.....	71
3.3.3. Exemples d'enzymes.....	72
3.4. Vitamines.....	74
3.4.1. Définition et classification	74
3.4.2. Vitamine B12.....	76
3.4.3. Utilisations de la vitamine B12	76
4. Métabolites secondaires	77
4.1. Antibiotiques	77
4.1.1. Classification des antibiotiques.....	77
4.1.2. Activité et mécanisme d'action.....	77
4.1.3. Production.....	78
4.1.4. Utilisations.....	79
4.2. Production de bio-insecticides.....	81

Chapitre IV. Enzymologie appliquée

Enzymes immobilisées	87
1. Définition	87
2. Techniques de l'immobilisation des enzymes.....	87
2. 1. Adsorption	87
2.2. Inclusion ou piégeage	88
2.3. Liaison covalente	89
3. Intérêt de l'immobilisation des enzymes.....	91
4. Domaines d'application.....	91
5. Réacteur enzymatique.....	93
5.1. Réacteur à lactose	93
Enzymes artificielles	
1. Définition	94
2. Molécule hôte	94
3. Cyclodextrines et leur intérêt dans l'utilisation en industrie agroalimentaire.....	95
3.1. Séquestration du cholestérol.....	96
3.2. Stabilité des produits et conservateurs alimentaires.....	96
3.3. Conditionnement et emballage.....	96
Références	97

Avant propos

Ce polycopié est le support du cours de Biochimie appliquée qui est destiné pour les étudiants de troisième année Licence spécialité de biochimie. Les notions élémentaires dans ce cours constituent la base de la biochimie appliquée, ce polycopié démontre que les différentes substances biologiques peuvent avoir des origines multiples. Qu'elles soient végétales, animales ou microbiennes. La biochimie appliquée fait le lien entre la biochimie des substances naturelles et leurs applications dans des domaines variés comme l'agriculture, l'environnement, la production d'énergie, l'alimentation animale et humaine, la santé et de nombreux autres domaines plus proches du monde industriel (papeterie, cosmétique, agro-alimentaire, pharmacie, chimie....).

Ce cours englobe quatre chapitres; le premier concerne les substances d'origine végétale, métabolites primaires et métabolites secondaires, leurs structures chimique, et leurs différentes utilisations et applications. Le deuxième chapitre discute des substances d'origine animale et insiste sur celles du plasma et du lactosérum et des cultures cellulaires. Quant au troisième chapitre, il concerne les substances d'origine microbienne (bactéries, levures et moisissures) produites par fermentation. Le quatrième et dernier chapitre discute des enzymes utilisées dans les différentes industries, quelles soient immobilisées ou artificielles.

Chapitre 1. Biochimie des substances d'origine végétale

Cette partie s'intéresse essentiellement à l'étude de la phytochimie (Chimie des plantes) à savoir : structure, classification, extraction et purification des substances naturelles issues des plantes ; et de la pharmacognosie (du grec ; pharmacon = drogue, gnosis = connaissance), qui traite les matières premières d'origine naturelle ayant un intérêt médicale.

Les végétaux sont des organismes autotrophes qui peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organique complexe par photosynthèse.

La photosynthèse est la réaction chimique qui synthétise de l'oxygène et de matière organique à partir de gaz carbonique et de lumière.

Les réactions chimiques continues autotrophes qui ont lieu dans le protoplasme vivant des cellules végétales donnent lieu à deux sortes de produits : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

1. Métabolites primaires

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Un métabolite primaire est typiquement présent dans de nombreux organismes taxonomiquement éloignés. Il est également désigné par métabolite central, qui prend même le sens plus restrictif de métabolite présent dans tous les organismes ou cellules en croissance autonome.

Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux (indispensables) d'un organisme, mais possède typiquement une fonction *écologique* importante, c'est-à-dire une fonction relationnelle. Un métabolite secondaire est typiquement présent dans un ensemble taxonomiquement restreint d'organismes (Plantes, Champignons, Bactéries...).

Les métabolites primaires sont caractérisés par leur caractère nécessaire et vital à la survie de la cellule, de l'organisme :

- les acides aminés, source primaire de construction des Protéines
- les glucides, source d'énergie, paroi cellulaire
- les lipides, source d'énergie, membranes cellulaires

1.1. Glucides végétaux

Les glucides peuvent être définis comme des structures aldéhydiques ou cétoniques poly hydroxylées, ayant une formule générale $(CH_2O)_n$ d'où leur nom d'hydrate de carbone. Elaborés par photosynthèse au départ, les glucides constituent l'apport énergétique essentiel chez les êtres vivants (animaux, végétaux et microorganisme). Les glucides, éléments de stockage et de transport de l'énergie, interviennent également comme élément de structure et de soutien cellulaire (paroi, adhésion intercellulaire), et enfin comme signaux de reconnaissance. Ce sont des précurseurs de tous les métabolites secondaires.

Les végétaux se différencient des animaux par la présence de très nombreuses variétés d'oses caractérisant certaines espèces. Comme l'apiose, sucre en C₄ que l'on trouve chez le persil (tetrose, hydroxyméthyl tetrose). Parmi les pentoses, le xylose et l'arabinose constituant des xylanes et arabanes.

- Biogénèse des glucides

Le premier sucre en C₆ formé lors de la biogénèse des glucides végétaux est le fructose-1,6 diphosphate, ensuite interviennent les principaux inter conversions des oses et la biosynthèse des polyosides. Le premier sucre en C₃ formé est le glyceraldéhyde phosphate (GAP). Ce dernier peut être convertit en Dihydroxyacetone phosphate (**DHAP**).

La formation des trioses (GAP+DHAP) permet d'obtenir le Fructose-1,6-diphosphate grâce à une aldolase. Ce dernier est transformé en F-6-P sous l'action d'une phosphatase puis en G-1-P. A partir du G-1-P se formeront les divers sucres de la plante par des réactions de

conversion et de condensation. Le G-1-P joue un rôle primordial dans la biosynthèse des polyosides végétaux.



- Classification des glucides végétaux

Les glucides sont subdivisés en osides simple et osides complexes. On peut distinguer selon la fonction les classes suivantes :

- Glucides du métabolisme intermédiaire : Glu, Gal, Fru, Ara, Rha, Apiose, Ribose, Man
- Glucides des parois : Cellulose, Hémicellulose, Callose
- Glucides de réserve : Amidon, Inuline

1.1.1. Glucides des parois

La paroi cellulaire est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose, hemicellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine).

1.1.1.1. Cellulose

La cellulose est le composé naturel le plus abondant sur terre. C'est l'élément structural majoritaire. Elle assure le rôle de renfort pour les parois et détermine les propriétés du bois selon l'orientation et le degré de cristallinité des micofibrilles de cellulose. C'est un homopolysaccharide linéaire de glucanes, d'unités d'anhydroglucopyranoses liées par des liaisons glycosidiques β ($1 \rightarrow 4$) (Figure 1). Le degré de polymérisation est de l'ordre de 10 000 et est variable selon l'espèce étudiée.

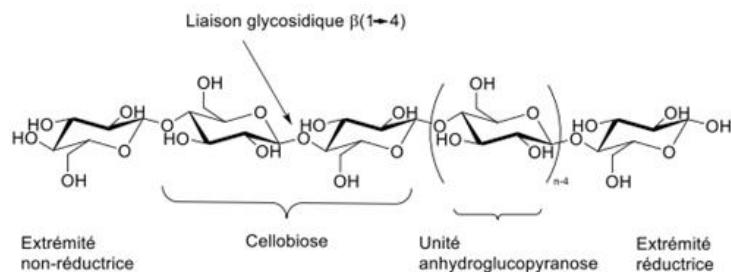


Figure 1 : Représentation de la structure moléculaire de la cellulose

Sa structure moléculaire met en évidence la présence d'une quantité importante de groupements hydroxyles. Ces derniers permettent d'établir des interactions de type liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires entre deux groupements hydroxyles de la même molécule (liaison *intra*) et entre les chaînes situées dans un même plan (liaison *inter*) (**Figure 2**). Ainsi ces associations permettent la formation de microfibrilles de cellulose et expliquent l'insolubilité de la cellulose dans l'eau.

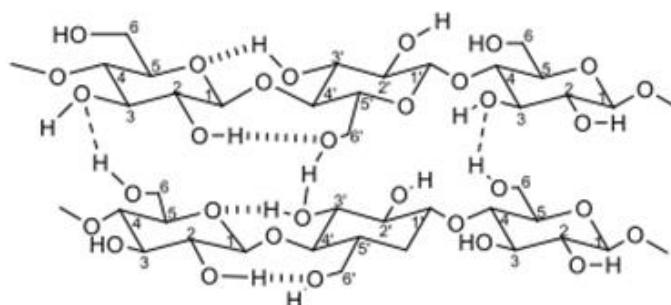


Figure 2 : Liaisons hydrogène inter et intramoléculaire dans la cellulose

L'appareil de Golgi, ainsi que le plasmalemme sont les lieux de préformage des chaînes cellulosiques pour leur mise en place dans la paroi cellulaire. Ces chaînes subissent une phase de polymérisation et d'allongement par des liaisons osidiques (covalentes). Ensuite une étape d'association, par des liaisons hydrogènes, pour lier les chaînes d'un même plan en microfibrilles qui s'orientent selon des angles différents dans les parois.

Les microfibrilles s'enroulent étroitement et fournissent ainsi une résistance mécanique à la plante face aux stress externes et à la pression osmotique interne. Elles servent aussi de

structure d'ancre aux autres polysaccharides des parois cellulaires, notamment aux hémicelluloses et aux pectines (Figure 3).

Il s'en suit une grande résistance aux attaques chimiques, la cellulose est insoluble dans tous les solvants, excepté la liqueur ammoniale de schweitzer. L'hydrolyse enzymatique est réalisée seulement par quelques cellulase microbiennes, exemple : bactérie de la panse des ruminants, Actinomyces du sol... La cellulose est caractérisée par une grande résistance mécanique ce qui explique l'emploi de certaines fibres végétales comme textiles.

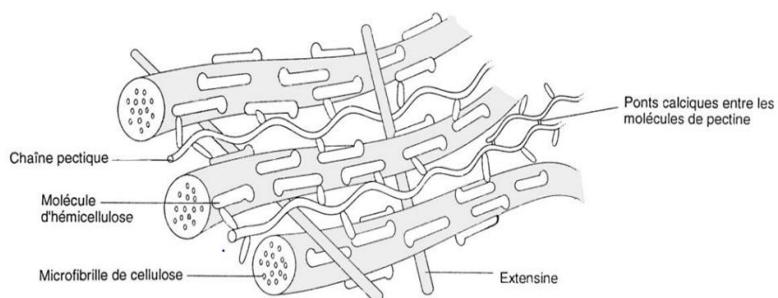


Figure 3 : Représentation schématique de l'interconnexion des microfibrilles de celluloses, de l'hémicellulose et des pectines.

- Principales sources de la cellulose

La fibre de coton : est obtenue partir de cotonnier (*Gossypium*, Malvacées). La fibre de coton contient 95% de cellulose, le reste étant constitué de protéines, de cires et de pectines.

Le lin : *Linum usitatissimum* (Linacée) donne des fibres composées de 72% de cellulose, utilisé pour les fils chirurgicaux stériles non résorbables.

Le genre *Stypa*, poussant dans les déserts.

La ramie (*Boehmeria nivea*), famille des Urticales sont utilisés pour la fabrication de cordes, sacs et papier à cigarettes.

Bamboo appartient à la famille des *Poaceae*

La cellulose est également biosynthétisée par des bactéries telles qu'*Acetobacter*. Elle se trouve sous forme très cristalline dans les parois cellulaires d'algues.

Dans la littérature, on parle rarement de l'extraction de la cellulose mais plutôt de purification de la cellulose ou encore d'une façon plus explicite de l'enrichissement en cellulose. Cet enrichissement résulte de l'élimination de tous les contaminants qui peuvent exister tant phénoliques que pectiques ou hémicellulosiques.

- Utilisations de la cellulose

Comme la cellulose est un produit non toxique, biodégradable et un polymère à haute résistance à la traction et à la compression, la cellulose est largement utilisée dans divers domaines tels que les industries textiles, papetière, pharmaceutique, alimentaire, cosmétiques, les nanotechnologies et les systèmes d'administration de médicaments dans le traitement du cancer et d'autres maladies.

Les groupements hydroxyles de la cellulose peuvent réagir partiellement ou totalement avec différents réactifs chimiques pour donner des dérivés cellulosiques possédant des nouvelles propriétés.

- Industrie de papier : sous forme de fibres brutes pour la fabrication de pâte à papier

- **Industrie de textile** : fabrication de fibres textiles artificielles (acétate de cellulose, viscose, rayonne, fibranne...). Ces fibres de cellulose artificielles sont de plus des précurseurs pour la fabrication de fibres de carbone thermiquement isolantes utilisées comme renfort des matériaux de protection thermique de l'industrie aérospatiale.

- Agroalimentaire

- L'estérification de la cellulose a permis le développement de plastiques biodégradables (comme la cellophane) utilisables dans la filière agroalimentaire.

- Les éthers de cellulose et l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) également appelé hypromellose sont quant à eux utilisés en tant qu'épaississants ou gélifiants pour contrôler la viscosité d'un milieu. Ces types de cellulose sont utilisés dans la fabrication des boissons, des fromages, des crèmes glacées, des sauces et des produits de boulangeries.

-Nanotechnologies et industrie pharmaceutique

Ethylcellulose (EC), utilisé dans la micro encapsulation des médicaments (un système d'administration de médicaments) pour contrôler la libération des médicaments et pour protéger les principes actifs contre la dégradation.

Sous forme microcristalline et sous forme Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). Elle est utilisée comme liant pour fabriquer des comprimés à partir de poudre.

-Production de l'énergie (Source de Biocarburant)

Les termites possèdent des bactéries capables de transformer de manière efficace et économique les déchets de bois en sucres pour la production d'éthanol. Les enzymes trouvées dans le tube digestif des termites et produites par ces bactéries symbiotiques sont en effet capables de convertir le bois en sucre en 24 heures. Le potentiel de la filière cellulosique est énorme et les technologies évoluent rapidement.

La cellulose peut être décomposée en sucres en utilisant *Trichoderma reesei* pour les convertir d'abord en sucres puis en gaz. De plus, un groupe de bactéries ont la capacité de digérer la cellulose en anaérobiose et produire du dioxyde de carbone et du méthane.

-Autres utilisations

Préparation des peintures, colles ou encore en cosmétiques (dentifrices).

1.1.1.2. Pectines

C'est Braconnot, en 1825, qui isola pour la première fois des composés particuliers à partir d'extrait de fruit. Il les baptisa pectines (du grec pektos signifiant gelée) pour leurs propriétés gélifiantes.

Les pectines jouent un rôle important dans la rigidité et la structure du tissu végétal. Elles sont retrouvées dans la paroi primaire et la lamelle moyenne impliquée dans l'adhésion cellulaire.

Dans ces zones, ce biopolymère forme un réseau plus ou moins lâche, dépendant du type cellulaire. Les pectines sont surtout abondantes dans les fruits où elles assurent, au départ,

la rigidité des tissus, elles sont progressivement hydrolysées au cours de la maturation.

Les pectines jouent également un rôle dans la défense de la plante. Lorsqu'un agent pathogène digère la paroi cellulaire par l'intermédiaire d'enzyme, les pectines sont les premiers substrats. Les enzymes sécrétées par ces agents dégradent les pectines et libèrent des oligogalacturonides (POS). Ces molécules agissent ensuite comme des molécules de signal initiant la réponse immunitaire de la plante, stimulant ainsi la production de molécules oxygénées (H_2O_2 et O_2^\cdot), d'inhibiteurs de protéase et d'antimicrobiens comme les phytoalexines.

Les pectines sont majoritairement formées de monomères d'acide galacturonique (Figure 4). Ce monomère est un acide uronique, obtenu par oxydation du carbone 6 du monosaccharide de galactose.

Plus de 17 autres monosaccharides peuvent entrer dans la composition des pectines dans différentes proportions en fonction de l'origine de celles-ci. Ces monosaccharides sont principalement : le rhamnose, l'arabinose, le galactose et le xylose (Figure 5).

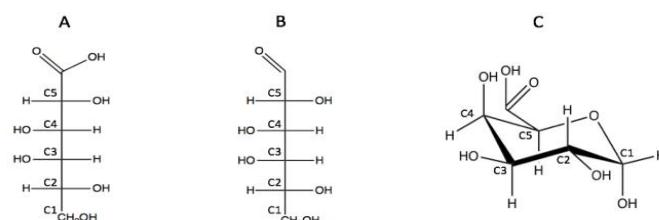


Figure 4 : Représentation du D-acide galacturonique (A), D-galactose (B) et du cycle pyranose (C).

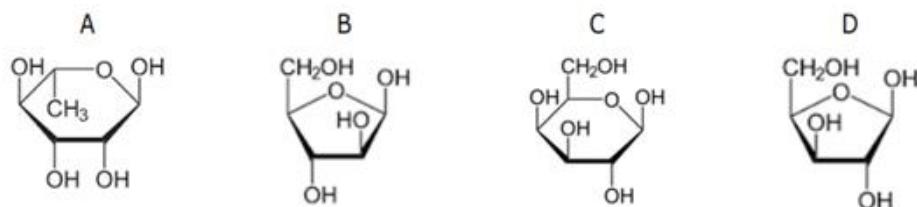


Figure 5. Représentation des molécules de rhamnose (A), arabinose (B), galactose (C) et xylose (D).

D'autre part, les monomères d'acide galacturonique sont présents sous différentes formes dans le squelette pectinique. Leurs fonctions hydroxyles peuvent subir une réaction d'acétylation par l'acide acétique. Et leurs fonctions acides peuvent être amidées par une amine, formant la pectine amidée, neutralisées par des cations ou encore estérifiées. Ces modifications dépendantes de l'origine de la pectine auront un impact sur les différentes propriétés de celle-ci (Figure 6).

Lorsqu'une région est essentiellement formée d'acide galacturonique non méthylée, des ions calcium divalents peuvent provoquer la jonction de deux chaînes et ainsi former une sorte de réticulation de la solution de pectines (formation d'une boîte à œuf et ainsi formation d'un gel) (Figure 7).

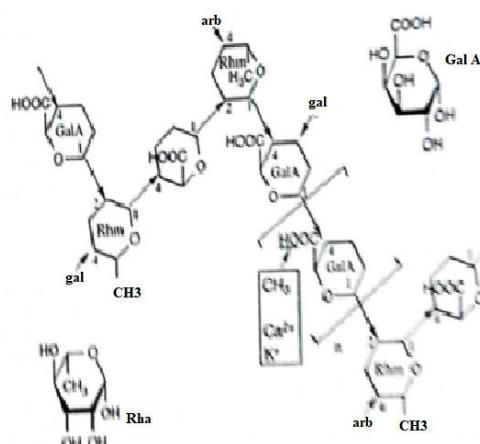


Figure 6 : Structures des pectines.

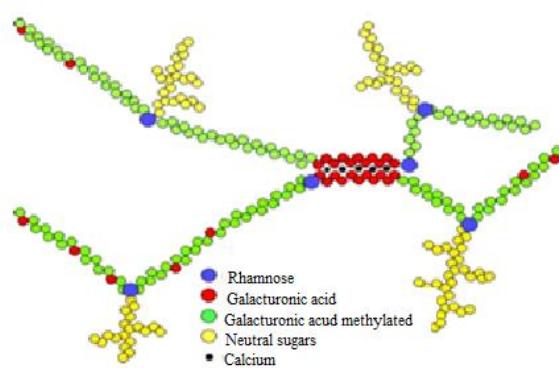


Figure 7 : Schéma général de la structure des pectines

Sources des pectines

Les deux principales sources industrielles de pectines ;

- Les zestes de fruits de divers Citrus (Rutaceae), d'où les pectines constituent les sous-produits de fabrication des jus de fruits.
- Les fruits de divers Rosacées en particulier du pommier.

D'autres sources moins utilisées existent comme la betterave à sucre, la mangue et le fruit de la passion.

-Utilisations des pectines

a-Additif alimentaire

La pectine a d'abord été utilisée pour ses propriétés gélifiantes. On la retrouve dans les confitures pour compléter celle issue du fruit. Les pectines sont des sous-produits des manufactures de conserve. Les déchets produits comme les peaux et les noyaux sont utilisés pour extraire la pectine.

Les pectines sont utilisées dans la préparation des confitures, des gelées, des marmelades et des conserves. La formation des complexes de protéine-polysaccharide peut être utilisée pour améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines. Les interactions protéine-pectine améliorent la solubilité, la gélification et le comportement moussant des concentrés protéiques.

b-Industrie pharmaceutique

La pectine était l'un des ingrédients principaux utilisés dans des pastilles pour le mal de gorge comme adoucissant. Dans les produits cosmétiques, elle agit en tant que stabilisateur et est employée dans les préparations curatives de blessures et particulièrement et surtout dans les adhésifs médicaux, tels que les dispositifs de colostomie.

Comme prophylactique naturel, la pectine agit contre l'empoisonnement des cations toxiques. Elle s'est montrée efficace dans l'élimination du plomb et du mercure dans l'appareil gastro-intestinal et les organes respiratoires. Les combinaisons de celle-ci avec d'autres

colloïdes ont été largement utilisées pour traiter la diarrhée, particulièrement chez les enfants en bas âge ; elles retiennent l'eau.

Dans les formulations à libération contrôlée, les hydrogels de pectine se trouvent dans les comprimés comme liant

c-Domaine agricole

Les oligosaccharides acides dérivés de pectines (POS) peuvent induire des réponses biologiques chez certaines plantes. Les oligogalacturonides sont impliqués dans les réactions de défense, la croissance et le développement des végétaux

1.1.2. Glucides de réserve

1.1.2.1. Amidon

L'amidon se compose d'amylopectine (polymère ramifié de D-glucopyranose dont les ramifications de glucose sont liées en α (1→6) et α (1→4)) et d'amylose représentant environ 25% de l'amidon ; polymère linéaire de D-glucopyranose dont les unités sont liées en α (1→4)) (Figure 8).

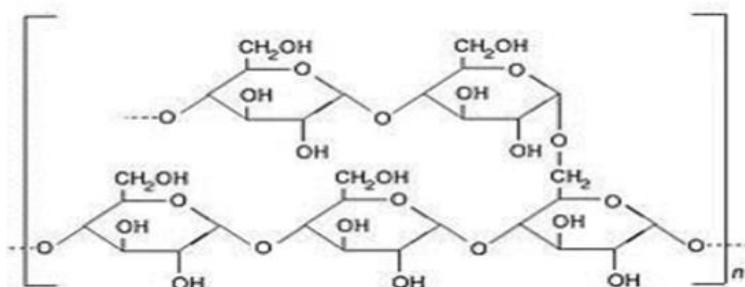


Figure 8 : Structure de l'amidon

L'amidon est une source d'énergie de l'être humain jouant un rôle comparable à celui des graisses de réserve. Un gramme d'amidon apporte 17,6 kJ. Cent grammes de frites ou chips de pomme de terre peuvent alors apporter de 30 à 50 % respectivement du besoin quotidien d'énergie pour un adulte.

Principales sources d'amidon

Céréales : le blé (*Triticum sp*), blé dur (*Triticum durum*), blé tendre (*Triticum aestivum*) ; l'orge (*Hordeum vulgare*) ; le riz (*Oryzae sativa*) et le maïs (*Zea mais*).

Les graines : essentiellement les graines des légumineuses telles que les petit poids, la fève, la lentille et le haricot.

Les plantes à tubercules : la pomme de terre et la patate douce.

Les fruits : banane, le châtaigne.

Utilisations de l'amidon

Production du glucose

Le glucose est produit sous forme de poudre ou de sirop. Il est utilisé dans les industries alimentaires. Les industries alimentaires utilisent l'amidon sous forme modifiée, non modifiée, de sirop de glucose et de dextrose (D-glucose). Il est utilisé comme épaississant (potages, sauces, ...).

Produits pharmaceutiques

Le glucose peut être utilisé dans la préparation des médicaments comme excipient, dans la préparation des solutions injectables à base de glucose. Le glucose est utilisé pour préparer le fructose (pour les diabétiques).

Il est également utilisé dans le capsulage des gélules et dans l'obtention de cachets sous forme de cyclodextrines. Les cyclodextrines permettent d'augmenter la solubilité et l'absorption des médicaments. La quantité nécessaire de produit étant ainsi très réduite, elle entraîne une diminution des effets indésirables tels que les irritations d'estomac.

Colle : L'amidon est un adhésif naturel de bonne qualité. Il existe deux types de colles fabriquées à partir d'amidon modifié et de dextrines, la colle en poudre séchée sur séchoirs rotatifs et la colle liquide.

Papier : Les amidons anioniques et cationiques sont très utilisés en papeterie. Ils sont ajoutés :

Dans la presse, lorsque la feuille de papier a été formée et partiellement séchée, l'amidon modifié est ajouté sur un ou sur les deux côtés de la feuille afin d'augmenter le fini et les propriétés d'impression du papier, le papier obtenu est d'une blancheur importante.

Industrie textile

L'amidon joue un rôle important dans l'industrie textile :

Il forme une couche protectrice entourant les fils afin d'éviter leur désagrégation au cours du tissage.

Il est utilisé pour la finition des vêtements afin de les rendre plus fermes, plus rigides et plus lourds.

Il permet l'impression du tissu ou la création de certaines couleurs sur la surface du textile.

1.1.2.2. Inuline

L'amidon est parfois remplacé par un polymère de fructose, l'inuline, molécule à degré de polymérisation (30-35 unités) formée par l'association d'unités fructofuranoses liées en β (2-1).

On trouve l'inuline essentiellement dans les organes souterrains : le bulbe d'oignon et la racine d'asperges.

1.2. Lipides végétaux

Les lipides sont les graisses et les substances apparentées. Ils sont généralement hydrophobes, insolubles dans l'eau. Les plantes utilisent essentiellement les lipides pour stocker de l'énergie (huiles végétales) et pour la structure (membranes phospholipidiques). Les lipides sont généralement des macromolécules, non issues de polymérisation.

Les lipides ou corps gras sont réservés dans **les fruits, les feuilles et les graines**, plus rarement dans les tiges. Les plantes qui synthétisent ces lipides sont appelées oléagineuses.

Les teneurs en matières grasses sont sujettes à des variations, étant influencées par les facteurs saisonniers et géographiques, d'une part, et par les facteurs génétiques, d'autre part.

Les oléoplastes sont des organites spécifiques des cellules végétales spécialisés dans le stockage des lipides, essentiellement sous forme de plastoglobules (gouttelettes lipidiques sphériques).

Les galactolipides et les phospholipides entrent ordinairement dans la constitution des membranes, surtout des organites cellulaires. Ils peuvent être abondants dans les réserves lipidiques des graines.

Triglycérides

De nombreuses plantes stockent l'énergie sous forme d'huile, particulièrement dans les graines et les fruits des plantes dites oléagineuses (olives, tournesol, colza ...). Les huiles possèdent une proportion de liaisons carbone-hydrogène supérieure à celle des glucides. En moyenne, à poids égal, les huiles libèrent trois fois plus d'énergie que les sucres ou les protéines.

Tous les triglycérides sont formés de trois molécules d'acides gras unies à une molécule de glycérol.

Les acides gras diffèrent selon les plantes qui les produisent ; ceci implique une grande diversité de composition des matière grasse des plantes oléagineuses.

1.3. Protéines végétales

Suivant leur origine botanique et leur fonction physiologique dans la plante, les protéines végétales se caractérisent par une grande diversité de structure et de propriétés physicochimiques.

Les protéines se présentent donc sous des aspects physiques différents (protéines fibreuses ou globulaires). Dans la cellule végétale, on distingue :

1.3.1. Protéines solubles (globulaires), au niveau cellulaire, les protéines hydrosolubles sont présentes dans le cytosol, dans le stroma des chloroplastes, dans la matrices mitochondriale et dans nucléoplasme. La protéine la plus importante est la rubilose bisphosphate carboxylase / oxygénase (RuBisCO) ; essentielles dans la fixation du CO₂ lors de la photosynthèse. Cette

enzyme est localisée dans les chloroplastes, elle représente 40 à 80 % des protéines foliaires totales solubles du soja, de la luzerne et de la plupart des céréales.

1.3.2. Protéines insolubles, de poids moléculaire généralement élevé, associées à des lipides, elles participent à l'architecture de tous les systèmes membranaires.

1.3.3. Protéines de réserve, protéines majeures sans activité biologique, généralement de poids moléculaires élevés et plus au moins solubles. Ces protéines sont mises en réserve par les plantes, qu'elles mobilisent dès les premiers stades de la germination.

Utilisations des protéines

En industries agroalimentaires, les protéines végétales occupent une place de choix tant par leur valeur et propriété nutritionnelle par rapport à la source animale.

En raison de leur grande richesse en protéines (90 % sur matière sèche) les isolats protéiques sont très utilisés pour la nourriture du bétail mais aussi en alimentation humaine.

La luzerne représente, avec les tourteaux oléagineux et les graines de légumineuses, la source végétale la plus utilisée pour l'obtention industrielle de protéines.

Les **tourteaux** sont les sous-produits solides obtenus après extraction de l'huile des graines des **oléagineux**. Sous-produits de la trituration, industrie de fabrication de l'huile, ils représentent généralement de 50 à 75 % de la masse des graines. Les **tourteaux** sont utilisés en alimentation animale.

2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires représentent toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante par opposition aux métabolites primaires et dont la nature et la teneur peuvent être modifiées par des facteurs abiotiques, facteurs environnementaux (exposition, altitude, climat, saison, âge, ...), et les molécules induites par des facteurs biotiques, telles les phytoalexines excitées par la présence d'un pathogène. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent des dizaines de milliers de molécules différentes classées en familles chimiques telles que les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes etc. Outre leur très grande diversité chimique, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes spécialisés.

On distingue classiquement trois grandes catégories de métabolites secondaires chez les végétaux :

- Les composés phénoliques
- Les composés terpéniques
- Les alcaloïdes

2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances chimiques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est lié directement au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction (éther, ester, hétéroside...etc.). Le phénol est le composé de base de ce groupe et les dérivés portant plus de deux noyaux benzéniques sont appelés les polyphénols (Figure 9).

Ces composés forment le principe actif de nombreuses plantes médicinales. Ils sont localisés dans : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit.

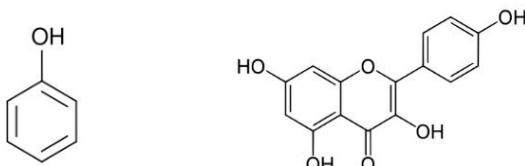


Figure 9 : Structure d'un phénol et celle d'un polyphénol (kaempférol)

2.1.1. Biosynthèse

Les composés phénoliques sont des dérivés non azotés où le cycle aromatique est issu principalement du métabolisme de l'acide Schikimique et ou de celui du Malonyl CoA (Figure 10). La majeure partie des composés aromatiques est constituée de la famille des phénol propanoides, qui dérivent de la phénylalanine ou de la tyrosine. La désamination de cet acide aminé par une enzyme clé: la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), conduit à l'acide cinnamique par la réaction suivante ;

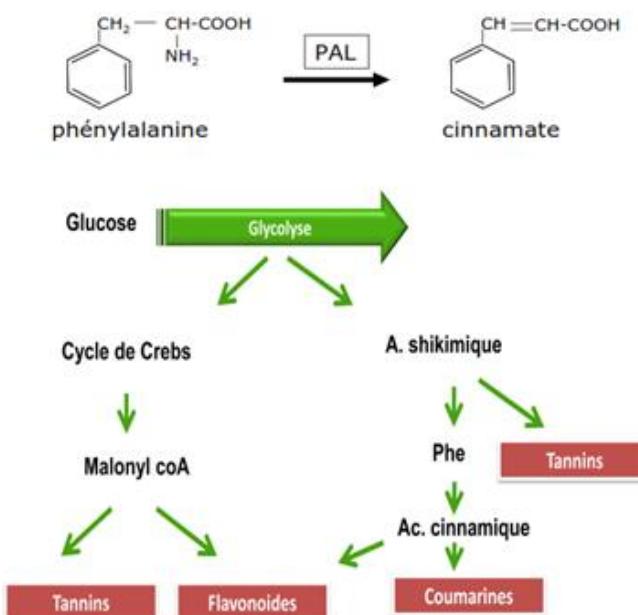
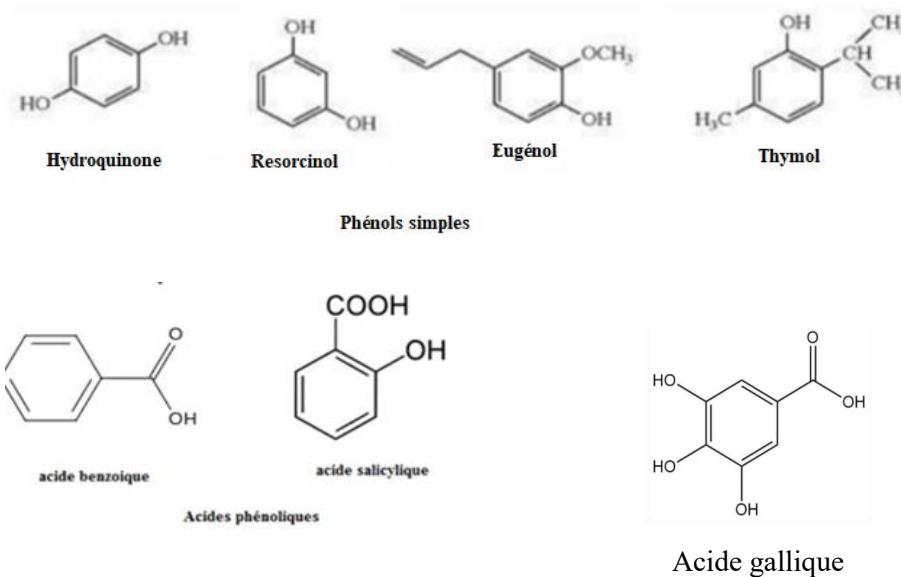


Figure 10 : Origines des composés phénoliques

2.1.2. Classification

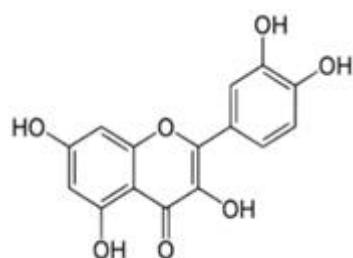
2.1.2.1. Phénols simples et acides phénoliques

Certains des plus simples composés phytochimiques bioactifs sont constitués d'un seul anneau phénolique (Figure 11). Structurellement, les composés phénoliques comportent un noyau aromatique portant un ou plusieurs groupes hydroxyles substitués et vont de la molécule phénolique simple à des composés hautement polymérisés.

**Figure 11 : Structures de quelques phénols simples et acides phénoliques**

2.1.2.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provient du latin "flavus", signifiant "jaune", ils sont des pigments polyphénoliques presque toujours hydrosolubles qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaunes ou en blanc. Ils ont un champ d'action important et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Ex : la quercétine (Figure 12)

**Figure 12 : Structure de la quercétine**

2.1.2.3. Tanins

Ils sont d'origine végétale, ce sont des composés polyphénoliques de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux. Ceux-ci donnent un goût amer aux écorces, aux fruits et aux feuilles et les rendent imprévisibles à la consommation pour les insectes et le bétail.

Cette propriété astringente (sensation de dessèchement en bouche), provoque une baisse d'appétence chez le bétail et surtout une diminution de la digestibilité des protéines (surtout chez les insectes et leurs larves, les chenilles essentiellement et bloquent leurs enzymes digestives). Ils augmentent la résistance au pathogènes, augmentent la qualité du bois ou des fibres (résistance contre le vent). S'accumulent dans les téguments des semences et jouent un rôle crucial dans la dormance et la germination et augmentent la qualité du bois ou des fibres.

Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils se dissolvent dans l'eau, l'acétone et l'alcool. On les trouve, pratiquement, dans tous les végétaux, mais ils sont particulièrement abondants chez les Conifères, les Fagacées et les Rosacées. Ex : l'acide ellagique (**Figure 13**).

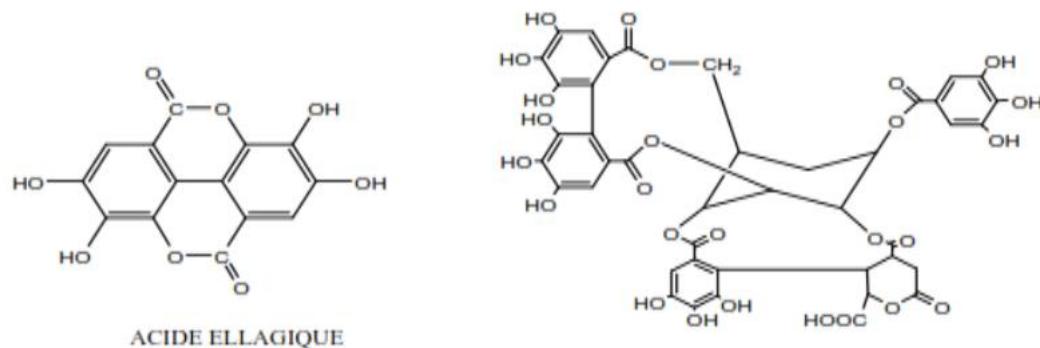


Figure 13 : Structures de tanins simples et complexes

2.1.2.4. Coumarines : Les coumarines sont des lactones des acides cinnamiques (Figure 14).

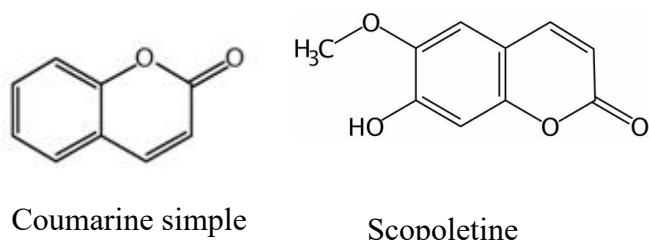


Figure 14 : Structures de coumarines

Les coumarines ont été isolés pour la première fois, dans le *Coumarouna odorata*. Ils sont largement distribués dans tous le règne végétal et possèdent des propriétés très diverses. Ces composés sont souvent synthétisés en réponse à des attaques pathogènes. Plusieurs coumarines ont des propriétés bactériostatiques, ces composés représentent donc des phytoalexines chez un certain nombre de plantes (Ex : la scopolétine qui s'accumule chez le tabac au cours de la réaction hypersensible).

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans des solvants organiques ou des solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire .

2.1.3. Extraction des composés phénoliques

2.1.3.1. Extraction par macération à froid

Les parties à extraire des plantes sont broyées et réduites en poudre qui est, ensuite, macérée dans du méthanol à température ambiante pendant une certaine période (durée). Après filtration, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un évaporateur rotatif permettant ainsi d'obtenir un extrait brut.

2.1.3.2. Extraction par macération à chaud (Soxhlet)

Un **extracteur de Soxhlet** (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie utilisée en chimie analytique et en chimie organique qui permet de faire une extraction continue par solvant d'un composé ou espèce chimique contenue dans une poudre solide. Cet appareil porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet.

Dans cette méthode, le solide est soumis à l'extraction plusieurs fois avec un solvant organique. Le choix du solvant dépend de la nature polaire des substances à extraire. Un Soxhlet se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur est insérée une cartouche dans laquelle est placé la poudre contenant l'espèce à extraire ; puis un réfrigérant (9-10-11) est adapté au-dessus de l'extracteur (il est également souhaitable d'utiliser un chauffe-ballon avec agitation magnétique intégrée, afin d'éviter des à-coups

d'ébullition qui provoquent une remontée du liquide contenu dans le ballon et non de vapeurs de solvant pures. À défaut on peut placer des billes de verres dans le ballon) (Figure 15).

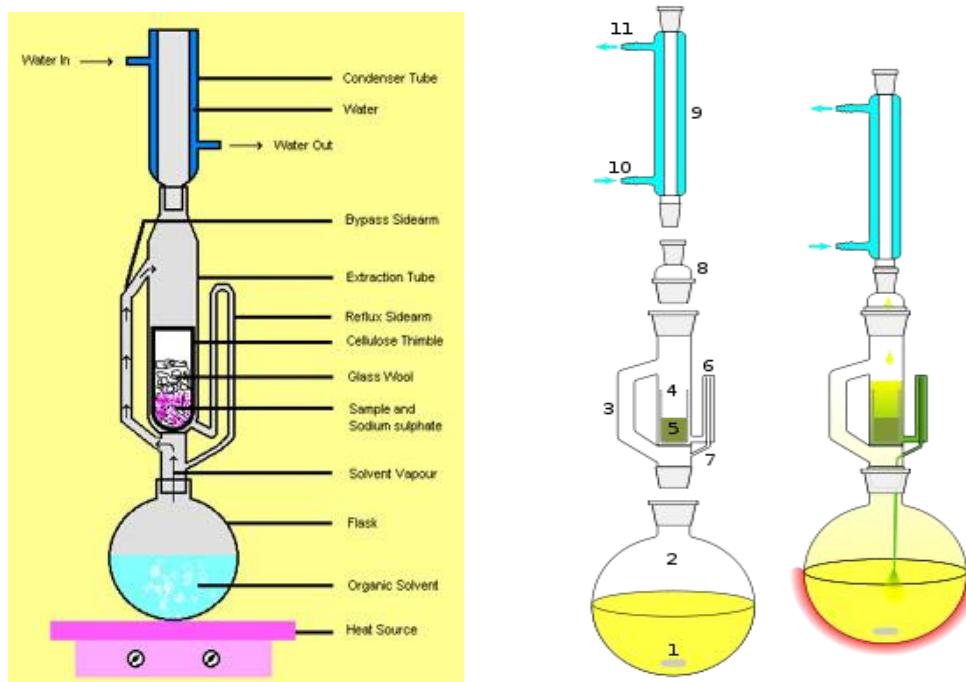


Figure 15 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet

Quand le ballon est chauffé, les vapeurs du solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles. Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon.

2.1.4. Rôles des composés phénoliques

- **Molécules de dissuasion :** Certains polyphénols (tanins) ont le goût amer et astringent, ce qui éloigne les herbivores. Les coumarines jouent aussi un rôle de protection chez les plantes.

- Attraction des polliniseurs : Les flavonoïdes sont responsables de la coloration du pollen, des fleurs et des fruits donc de l'attraction des insectes polliniseurs et la dispersion des graines.

- Rôle de soutien structurel : La lignine, constituante du bois, sa rigidité permet la croissance verticale des plantes et le transport de l'eau par capillarité à toutes les cellules. Elle a aussi un rôle de protection parce qu'elle est très difficile à digérer par les herbivores.

2.1.5. Activités Biologiques des polyphénols

L'activité antioxydante des polyphénols, réside dans leur capacité à piéger les radicaux libres, chélation des ions métalliques ou inhiber les enzymes responsables de la formation des radicaux. Ces caractéristiques permettent de leur attribuer plusieurs activités biologiques ; antioxydantes, anti-ulcéreuses, antibactériennes, antifongique, antiinflammatoires, antitumorales, analgésiques, vasodilatoires.....

2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules organiques mono ou polycycliques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azotées, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doués, à faibles doses, de propriétés pharmacologiques marquées. Ce nom dérive du mot alcalin. Les alcaloïdes ont la propriété de former des sels et d'être amers, la plupart de ces molécules ont une activité biologique puissante et certaines d'entre elles sont de puissants poisons et (donc) de grands médicaments (Morphine, Codéine, Cocaïne...) (Figure 16).

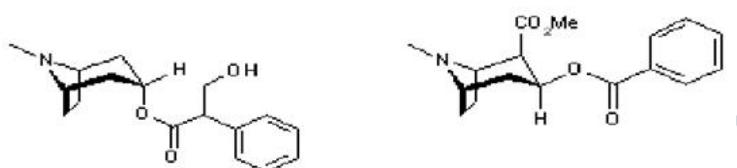


Figure 16 : Structure de l'atropine (à gauche) et celle de la cocaïne (à droite)

2.2.1. Biosynthèse

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acide aminés tels que le tryptophane, l'ornithine, la lysine, l'asparate, l'anthranilate, la phénylalanine et la tyrosine.

Ces acides aminés sont décarboxylés en amines qui sont couplées à d'autres squelettes carbonés.

2.2.2. Classification

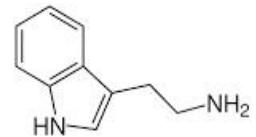
Selon l'origine biosynthétique structurale, les alcaloïdes sont classés en plusieurs groupes. Seuls les plus importants seront cités;

Alcaloïdes dérivés de l'Ornithine et de la lysine	
Les alcaloïdes Tropaniques : renfermant le noyau tropane. Sont thérapeutiques sur le système nerveux central, exemple ; l' Atropine qui est rencontrée chez Datura sp. Elle est souvent utilisée en tant qu'antidote de certains gaz neurotoxiques.	
Les alcaloïdes pyrrolizidiniques : formés de deux cycles pyrroles. Ne sont pas thérapeutiques mais toxiques. Se trouvent entre autres chez Senecio vulgaris . Ex. Cocaine	
Les alcaloïdes quinolizidiniques : comme la Lupanine, ce sont des hétérocycles azotés bicycliques. Ils sont abondants dans les Lupins (Lupinus sp.) Ils sont plus ou moins toxiques.	
Les alcaloïdes indolizidiniques : ont comme noyau caractéristique l'indolizidine, ils sont rares chez les végétaux. Exemple la Castanospermine, inhibitrice des glucosidases, se trouvant chez Castanospermum australe	
- Les alcaloïdes pipéridiniques : renfermant le noyau pipéridine. Ils sont peu thérapeutiques. Rencontrés chez le Grenadier (Punica granatum)	
Les alcaloïdes dérivés de l'acide nicotinique Ont comme précurseur l'acide Nicotinique. Comme la nicotine de l'espèce Nicotiana tabacum (Tabac). Ils sont insecticides, fongicides, réduisent l'appétit mais à caractère addictif.	
Les alcaloïdes dérivés de la Phénylalanine et de la Tyrosine	
- Les phénéthylamines : sont des alcaloïdes monoamines. Ils ont des propriétés pharmacologiques marquées, efficaces contre les crises de migraine. Ex. la Khatinone de Catha edulis (khat).	
Les Isoquinoléines : La structure de base est le cycle benzo-pyridine. Exemple de la Papaverine qui est obtenu à partir du pavot somnifère (Papaver somniferum) utilisée en pharmacognosie comme spasmolytique et comme	

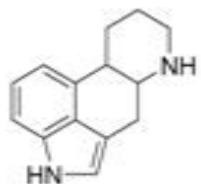
musculotrope. Son action résulterait principalement d'une activité inhibitrice de la phosphodiesterase. Ex. **Morphine**

Les alcaloïdes dérivés du Tryptophane

- Les tryptamines : constitué d'un noyau d'indole, sont hallucinogènes c'est-à-dire provoquent des altérations des perceptions, de la pensée et de l'humeur. Exemple de l'**Harmine** et de l'**Harmaline** de l'**Agaric hallucinogène** et de **Peganum harmala**



Les ergolines : Dérivent d'un noyau tétracyclique octahydroindoloquinoléique. Les dérivés de l'ergoline sont notamment utilisés en pharmacie comme vasoconstricteurs, dans le traitement des migraines ou pour lutter contre la maladie de Parkinson. Ex. l'ergoline, l'ergotamine et l'ergotoxine trouvées dans l'Ergot de seigle (**Claviceps purpurea**).



2.2.3. Extraction des alcaloïdes

2.2.3.1. 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

2.2.3.2. 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.

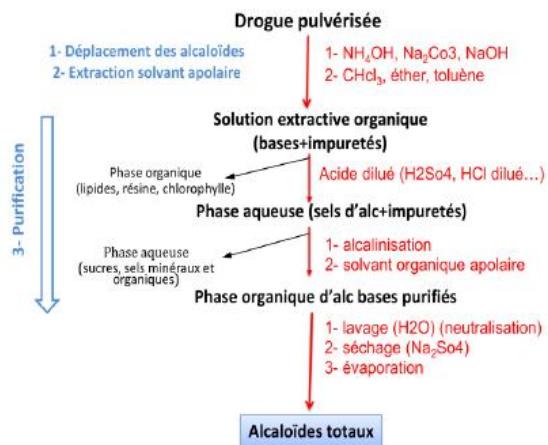


Figure 17: Protocole d'extraction des alcaloïdes dans un milieu alcalin

2.2.4. Rôles des alcaloïdes dans les plantes

Le rôle des alcaloïdes dans les plantes est souvent inconnu, et leur importance dans le métabolisme de la plante n'est pas très bien définie. Une plante peut contenir plus de cent alcaloïdes différents, mais en général leur concentration ne représente pas plus de 10% du poids sec. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont apparemment pas essentiels à leur reproduction. Pourtant, plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes. La nicotine empêche la croissance des larves du tabac. Le composé pur est également appliqué comme insecticide efficace. En outre, des alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV.

Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante. Parfois, ils n'ont pas de rôle précis et sont simplement des sous-produits du métabolisme végétal.

2.2.5. Activités biologiques

- **Psychotropes** : Ils peuvent modifier le fonctionnement normal du cerveau mais la plupart de ces substances ont également un potentiel d'abus et/ou de dépendance. Ex. La cocaïne extraite des feuilles de la Coca (*Erythroxylum coca*).

- Effet sur l'activité du système nerveux central (SNC).
- Antidépresseurs
- Troubles du sommeil

- **Anticancéreux** : Ce sont des antimitotiques. Ainsi, les cellules restent bloquées au stade de la mitose et ne peuvent pas se diviser. Ex. le Paclitaxel (**Taxol**). 10 kg d'écorce d'*If* du pacifique (*Taxus sp.*) donnent à peine 1 gramme de produit actif.

- **Stimulants** : Boissons énergisantes et des friandises comme la caféine (de *Coffea sp.*). Plusieurs médicaments, analgésiques et des médicaments destinés à soulager les symptômes du rhume et de la grippe.

- **Antipaludéens** : La quinine extraite de *Quinquina sp.* inhibe la protéase qui dégrade les acides aminés de l'hémoglobine des Plasmodiums (Agent de la malaria).

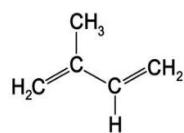
- **Antalgiques** : La morphine et la codéine sont des antalgiques majeurs de référence. La morphine est un alcaloïde naturel de l'Opium qui provient de: *Papaver somniferum*. La capsaïcine est utilisée comme analgésique dans les patchs dermiques pour soulager la douleur.

2.3. Les terpénoïdes

Les terpènes ont été nommés par Friedrich Kekulé von Stradonitz en référence à la térébenthine qui contient des hydrocarbures (térébenthine se dit en allemand « Terpentin »).

Les terpènes sont des hydrocarbones naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc).

Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isoprénique (**2-methyl-1,3-butadiene**) à cinq atomes de carbone (C_5H_8) (Figure 18).

**Figure 18 :** Structure de l'unité isoprène

Le précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique obtenu après condensation enzymatique de trois molécules d'acetyl CoA. Sa phosphorylation suivie d'une décarboxylation aboutie à l'unité isoprénique de base : le pyrophosphate d'isopentényle (IPP)

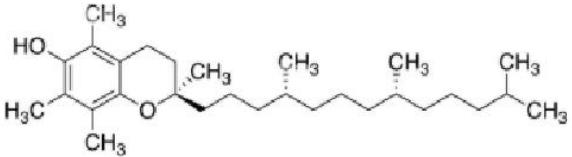
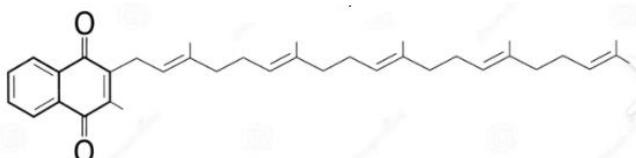
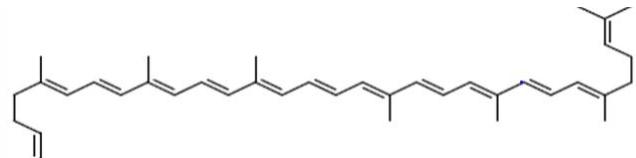
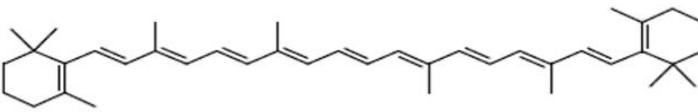
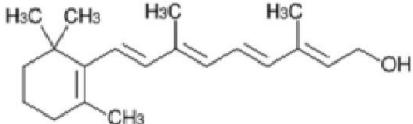
2.3.1. Classification

Les terpènes sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci. Leur squelette de carbone est constitué d'unités isopréniques reliées entre eux. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. En fonction du nombre n (entier) d'unités, on peut distinguer (Figure 19) (Tableau 1).

$n=1$	C_5H_8	Isoprène	
$n=2$	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	Monoterpène (Huiles essentielles)	
$n=3$	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}$	Sesquiterpène (Huiles essentielles)	
$n=4$	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$	Diterpène Ex. Vitamines E et K	
$n=5$	$\text{C}_{25}\text{H}_{40}$	sesterpène	
$n=6$	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}$	triterpène	
$n=8$	$\text{C}_{40}\text{H}_{64}$	Tétraterpène Ex. Lycopène, Caroténoides et Xanthophiles	
$(\text{C}_5\text{H}_8)_n$		Polyterpène Ex. Caoutchouc , Gutta percha	

Figure 19 : Quelques exemples d'assemblage des isoprènes

Tableau 1 : Structures cycliques de quelques terpénoïdes

Vitamine E	
Vitamine K₂	
Lycopène, Donne une couleur rouge aux tomates, pastèque, papaye et pamplemousse.	
β-carotène, Donne une couleur rouge à orange aux carottes, mangue, abricot, citrouilles et cerises.	
Vitamine A (Rétinol), Dérivé du β-carotène	

2.3.2. Extraction des terpénoïdes

Les terpénoïdes sont extraites par deux techniques: l'hydrodistillation ou la macération.

1- L'hydrodistillation est appliquée dans le cas des huiles essentielles; cette technique est basée sur l'entraînement des substances volatiles présentes dans les plantes avec les vapeurs de l'eau. La verrerie utilisée dans ce but est le Clevenger (Figure 20). Une quantité, bien déterminée du

matériel végétal (coupé en parties très fines), est portée à ébullition dans de l'eau distillée. 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'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse à l'aide d'une aiguille d'une seringue. Les huiles essentielles 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 par hydrodistillation (Clevenger)

2- La macération est appliquée dans le cas du reste des terpénoïdes; elle peut être à froid ou à chaud (Soxhlet). Les solvants organiques utilisés sont apolaires, ex. Hexane, éther de pétrole, cyclohexane...etc.

2.3.3. Rôles physiologiques des terpénoïdes

Les fonctions biologiques des terpènes n'ont pas encore complètement élucidées.

1- De nombreuses plantes produisent des **terpènes volatiles** (huiles essentielles) dans le but de:

- Attirer des insectes pour la pollinisation.
- Expulser d'autres animaux qui se nourrissent de ces plantes.

2- Les plantes produisent une grande variété de produits formés à base d'isoprène, certains d'entre eux sont des métabolites primaires comme des stéroïdes et des groupes prosthétiques des enzymes et vitamines en chaînes latérales (vitamine K, E). Certains terpènes sont des

phytohormones comme l'acide abscisque ou les gibberellines (diterpènes) ou des phéromones d'invertébrés, ces derniers jouent un rôle important en tant que composés signal et régulateurs de croissance des plantes.

3- Cependant la majorité des composés terpéniques sont des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Les caroténoïdes servent de pigment nécessaires dans la photosynthèse (xanthophyles), et sont responsables des couleurs variant du jaune au rouge dans les fleurs et les fruits (piments, curies). Cette coloration attire les polliniseurs.

4- Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animaux. Certains terpènes sont toxiques vis-à-vis de certains insectes ou nématodes. Cette action pouvant s'effectuer par une action directe sur les récepteurs du goût.

2.3.4. Activités biologiques et utilisations des terpénoïdes

- Depuis l'antiquité, certaines caractéristiques et fonctions biologiques des mono- et sesquiterpènes étaient connues pour l'homme et celles-ci ont été utilisées indirectement par l'exploitation des épices en tant que parfums et conservateurs.
- Les monoterpènes et les sesquiterpènes possèdent une activité anti-microbienne contre un large éventail de bactéries et de champignons. Le camphre et le menthol sont utilisés comme insecticides, nettoyants, agents anti-allergéniques et solvants
- Les terpénoïdes constituent une des bases des industries des parfums, des arômes, des colorants alimentaires.
- Certains terpénoïdes possèdent des propriétés physiologiques puissantes et spécifiques: vitamines, hormones et substances de croissance des végétaux.

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

En technologie alimentaire : Les caroténoïdes sont utilisés comme colorants naturels dans beaucoup de denrées alimentaires: dans les huiles, fromages fondus et margarines (coloration par le β -carotène).

En industrie pharmaceutique : Ex. le taxol (alcaloïde diterpenique), un agent anti-cancéreux. Il inhibe la division cellulaire par stabilisation de la tubuline et du fuseau mitotique. Certains composés terpéniques et ont montré leurs bioactivités telles que les inhibiteurs de la production d'oxyde nitrique, l'activité anti-tumorale, effets anti-inflammatoires, anti-oxydants, anti-agrégratifs et anti-coagulants, activité sédative et analgésique.

La Gutta-percha, issue du latex naturel obtenu à partir d'arbres de l'espèce *Palaquium gutta*, montre des propriétés adhésives, est un bon isolant électrique et est bio-inerte. Du fait que ce matériau ne se dégrade pas lorsqu'il est immergé dans l'eau de mer et de plus qu'il conserve des propriétés électriques isolantes étonnantes, il a été le matériau « miracle » qui a rendu possible l'exploitation des câbles sous-marins ou souterrains, jusqu'à la découverte du polyéthylène en 1933. En revanche, il ne résiste pas à une exposition prolongée aux UV.

Il trouve des utilisations dans le domaine des adhésifs, en chirurgie, notamment dentaire, et plus spécifiquement en endodontie où on l'utilise pour obturer les canaux pulpaires une fois la dent dépulpée.

Chapitre II. Biochimie des substances d'origine animale

1. Le sang

1.1. Composition et rôle

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

La centrifugation permet de distinguer:

- Les cellules (45% du volume du sang total chez l'homme). Il s'agit des globules rouges (érythrocytes), globules blancs (leucocytes) et plaquettes (thrombocytes). Le nombre de chaque catégorie est apprécié par numération globulaire, et ce par examen du frottis sanguin sous microscopie optique.
- Une partie liquide "le plasma", qui renferme de l'eau, des sels minéraux, des vitamines, des enzymes, des hormones, des glucides, des lipides (Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogène constitue le sérum). Plusieurs méthodes colorimétriques, enzymatiques et électrophorétiques permettent d'apprécier le taux plasmatique de ces différents constituants.

1. 2. Prélèvement et la transfusion sanguine

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

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

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

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

1.3. Séparation des différents constituants du sang

L'utilisation du sang total dans le traitement des hémorragies date du début du XX^{ème} siècle. Cependant, la logique de la transfusion sélective est de proposer chaque constituant sanguin sous la forme la plus adaptée en pureté et en concentration. Le malade ne recevra ainsi que le dérivé correspondant à un besoin spécifique, en quantité suffisante, avec une qualité qui limitera au maximum l'injection de cellules ou de protéines contaminantes dont l'effet thérapeutique n'est pas recherché.

Aussi, on comprend aisément pourquoi le sang total est devenu un produit dépassé. L'application des techniques physico-chimiques d'isolement et de purification permet de préparer des dérivés sanguins spécifiques adaptés à chaque situation. Les éléments cellulaires et plasmatiques contenus dans le sang sont aujourd'hui disponibles à l'état séparé.

Le sang est constitué de globules rouges, de plaquettes, de leucocytes et de plasma. La séparation des constituants permet de réduire les risques chez le receveur, en lui apportant uniquement les éléments nécessaires à son rétablissement, évitant ainsi les effets indésirables des différents produits.

Cette séparation peut être réalisée, soit lors d'un don de sang par des automates (aphérèse) qui prélèvent exclusivement les éléments du sang souhaités lors du don (plasma, plaquettes, globules rouges) et réinjectent les autres constituants au donneur; soit lors d'un don de sang total, plus rapide que le don par aphérèse, dont les constituants seront séparés par le service de préparation.

Le sang total est centrifugé afin d'obtenir les différentes couches des constituants du sang (globules rouges, plasma et plaquettes si déleucocytation non réalisée avant). Lors de la centrifugation, les globules rouges se déposent au fond de la poche de prélèvement. Le plasma reste en surface, alors que les globules blancs et les plaquettes restent en suspension dans le plasma au-dessus des globules rouges.

Après centrifugation, les poches de sang total sont pressées afin de garder dans la poche exclusivement les globules rouges, en bas de la poche, et obtenir ainsi des Concentrés de Globules Rouges (CGR). Les autres constituants sont récupérés dans les autres poches du kit de prélèvement pour fabriquer, éventuellement, des mélanges de Concentré de plaquettes (MCPS) et du plasma.

La poche de plasma riche en plaquettes est à son tour centrifugée pour en extraire les plaquettes. Le plasma ainsi récupéré est congelé et les plaquettes seront mélangées avec 4 ou 5 autres donneurs de même groupe afin de réaliser des mélanges de concentrés plaquettaires (MCPS).

Les poches de sang total sont déleucocytées (suppression des globules blancs) soit avant la séparation avec un filtre qui bloque le passage des globules blancs et des plaquettes, soit après la séparation par la presse avec un filtre qui ne bloque que les leucocytes.

Les CGR obtenus à partir des aphérèses ou du don de sang total sont conservés dans une solution de SAGM (Saline Adénine Glucose Mannitol) durant 42 jours.

Cette solution de conservation permet de préserver le métabolisme des globules rouges, maintenir l'intégrité de la membrane des hématies et le niveau de 2-3 DPG, ajuster l'hématocrite, réduire la viscosité et l'hémolyse dans les poches. Ces CGR sont conservés entre 2 et 6°C afin de réduire les risques bactériens.

Les conditions de conservation (température et durée de conservation) différent d'un élément à un autre, et sont résumés dans le tableau 1.

Tableau 1: conditions de conservation des différents éléments du sang.

Dérivé sanguin	Conditions de Conservation	
	Température	Durée
Globules rouges	+ 4°C	42 jours
Globules blancs	Ambiante	Quelques heures
Plaquettes	+ 22°C	5 jours avec agitation
Plasma	- 30°C à -40°C	1 à 2 ans

1.4. Etiquetage et Contrôle ABO

Lorsque les résultats des laboratoires de la qualification biologique du don sont conformes aux exigences réglementaires, les CGR sont étiquetés et un dernier contrôle est réalisé après étiquetage afin d'éviter toute erreur d'étiquetage. Les produits sanguins non conformes seront étiquetés : "Impropre à la transfusion".

Enfin, le service de préparation vérifie le groupage ABO de la poche à partir de la tubulure. Cette vérification permet de détecter les éventuelles erreurs de qualification du produit sanguin, une erreur d'identification du produit (problème d'étiquetage, inversion tube/poche entre deux nouveaux donneurs), afin de réduire le risque immunologique.

À la suite de la séquence de transformation du sang total, on se retrouve avec trois composants sanguins : le plasma, les plaquettes et les globules rouges (culot globulaire). Ces trois composants périssables constituent ce qu'on appelle les produits sanguins labiles.

En fonction de l'état du malade, les besoins en composants sanguins diffèrent. Certains patients ont besoin de plasma, d'autres de plaquettes, alors que d'autres requièrent des culots globulaires (globules rouges). La transformation du sang total en différents produits favorise un traitement plus efficace, car le malade peut recevoir uniquement les composants dont il a besoin.

Tous les produits sanguins labiles fabriqués sont entreposés en zone de quarantaine, en attendant que toutes les analyses de qualification des dons (analyse des groupes sanguins et tests de dépistage) soient complétées. Par la suite, les produits répondant aux normes seront entreposés pour fins de conservation et, enfin, acheminés aux hôpitaux.

Le sang prélevé chez les donneurs est conservé jusqu'à sa centrifugation dans la solution anticoagulante CPD. Il est rapidement acheminé vers les centres de transfusion où les dérivés sanguins labiles et/ou stables sont préparés.

1.5. Fractionnement industriel du plasma

Le fractionnement du plasma est une méthode physico-chimique permettant de séparer les différentes protéines du plasma. Les médicaments dérivés du sang (MDS) sont des produits sanguins stables, obtenus par procédé industrielle de fractionnement plasmatique. Des méthodes de purification et d'élimination/ inactivation virales sont ensuite mises en œuvre.

Ils sont indiqués pour compenser les déficits constitutionnels ou acquis de certaines protéines plasmatiques, ou pour traiter certains états pathologiques médicaux ou chirurgicaux.

Les médicaments dérivés du sang sont classés en différentes catégories :

- L'albumine
- Les immunoglobulines
- Les facteurs de la coagulation
- Les inhibiteurs de la coagulation
- Les colles biologiques

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

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

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

1.5.1. Précipitation différentielle à l'éthanol

Le fractionnement du plasma pour la préparation des produits thérapeutiques est apparu en 1949 suivant la description de Cohn. La méthode consiste en précipitations successives d'un mélange plasma-alcool en faisant varier la concentration d'éthanol, la force ionique, la température, le pH et la concentration en protéines (Figure 1).

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

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

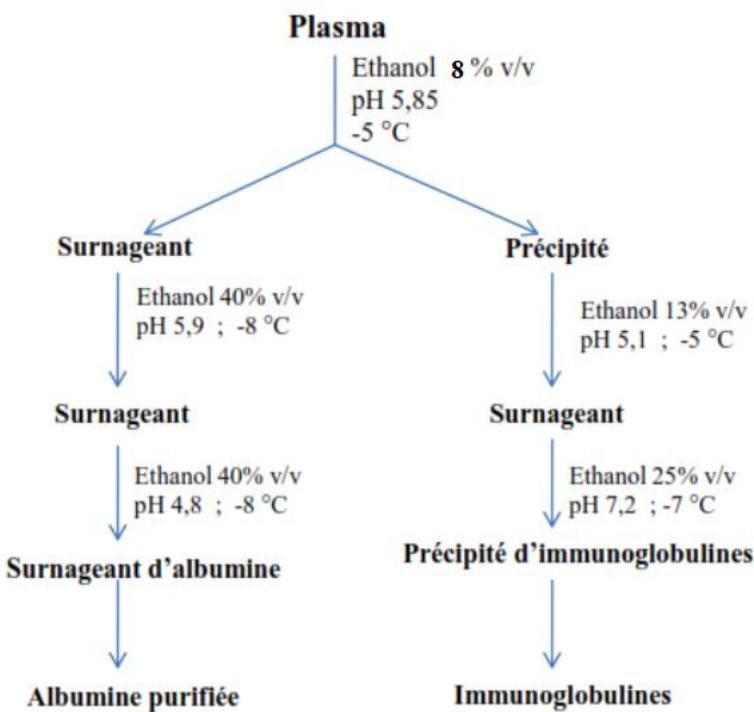


Figure 1 : Schéma du fractionnement à l'éthanol selon Cohn

1.5.2. Cryoprécipitation du plasma

En effet, c'est en 1964 que Pool a constaté que la décongélation à une température inférieure à 4 °C du plasma aboutit à la formation d'un cryoprécipité qui contient, entre autres protéines, le facteur antihémophilique A ou facteur VIII.

La cryoprécipitation est fondée sur une congélation du plasma à -70 °C suivie d'une étape de décongélation à une température comprise entre +2 à +4 °C. Cette technique permet l'isolement :

- D'un cryoprécipité utilisé pour extraire et purifier le facteur VIII, le facteur de Von Willebrand et le fibrinogène.
- D'un cryosurnageant, à partir duquel sont obtenues les autres protéines d'intérêt (complexe prothrombique, antithrombine, immunoglobulines, albumine...) (Figure 2)

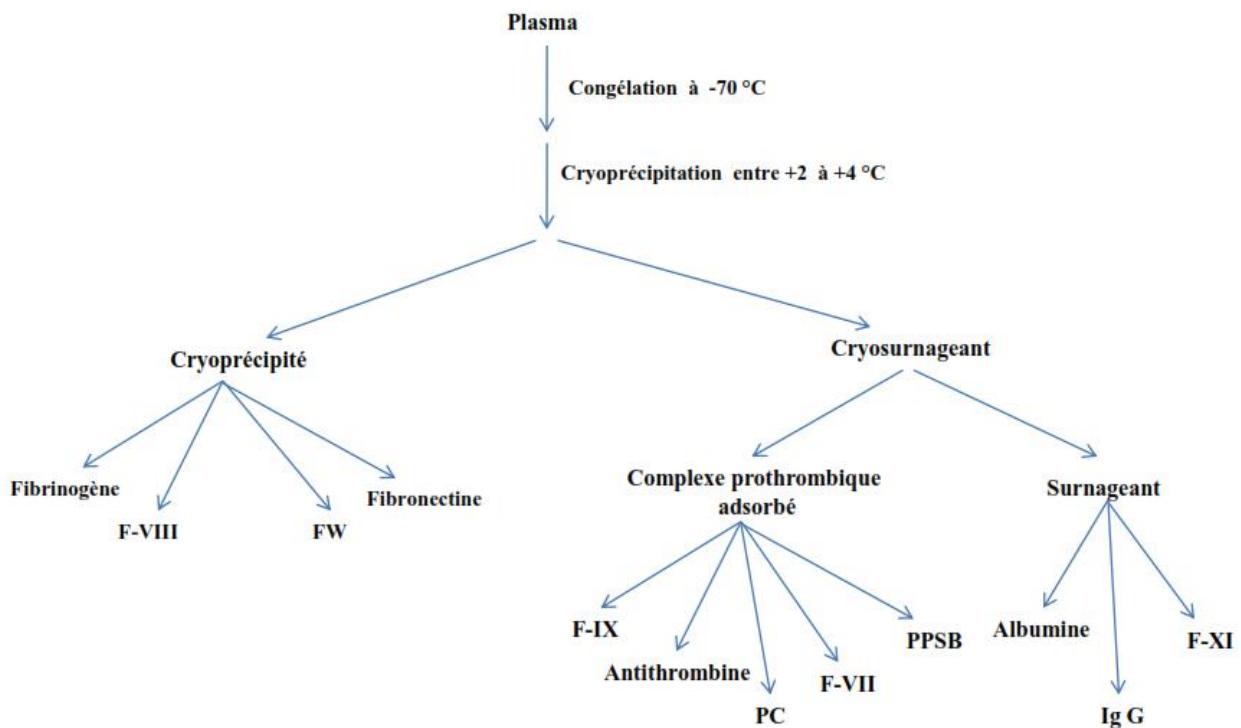


Figure 2: Schéma général du fractionnement des protéines plasmatiques par la méthode Pool

1.5. 3. Ultrafiltration

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

1.5.4. Chromatographie

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

1.6. Mécanisme de la coagulation sanguine

1.6.1. Hémostase

L'hémostase concerne l'ensemble des phénomènes qui contribuent à l'arrêt du saignement (lutte contre l'hémorragie) et ceux qui maintiennent le sang à l'état fluide dans les vaisseaux (lutte contre la thrombose). Elle résulte de trois processus complémentaires : L'hémostase primaire, la coagulation et la fibrinolyse.

Hémostase primaire

L'hémostase primaire est l'ensemble des phénomènes qui contribuent à l'arrêt du saignement par formation d'un caillot ou clou plaquettaire. Elle fait intervenir la paroi vasculaire, les plaquettes et deux facteurs plasmatiques, le facteur de Von Willebrand (vWF) et le fibrinogène. Le clou plaquettaire (thrombus blanc) ainsi constitué est instable et doit être consolidé par l'activation de la coagulation

Coagulation

La coagulation est le processus qui aboutit à la formation de fibrine nécessaire à la consolidation du clou plaquettaire. Il s'agit d'une séquence de réactions enzymatiques permettant l'activation de facteurs plasmatiques inactifs en protéases actives. Elle est divisée en deux voies. La voie extrinsèque et la voie intrinsèque, suivie d'une voie commune après l'activation du Facteur X (FX).

Elle nécessite l'intervention de nombreux facteurs plasmatiques, nommés de I à XIII. Ces facteurs sont présents sous forme de précurseurs inactifs dans le sang. Lorsqu'ils sont activés par protéolyse, on leur adjoint la lettre « a ». Les facteurs sont synthétisés par le foie.

Fibrinolyse

La fibrinolyse assure la dégradation enzymatique de la masse fibrino-plaquettaire à l'issue de la réparation vasculaire en une durée de 48 à 72 heures. Elle fait intervenir le plasminogène, synthétisé par le foie, et circulant sous forme inactive dans le plasma. Il sera activé par l'intermédiaire d'activateurs par clivage d'une liaison entre acides aminés pour

devenir la plasmine. Ce phénomène doit rester localisé et la circulation de plasmine doit être régulée pour maintenir un équilibre physiologique.

1.6.2. Facteurs de coagulation

La coagulation permet au sang fluide de se transformer en un corps insoluble et solide. Elle est liée à la transformation du fibrinogène, protéine sanguine soluble, en protéine insoluble, la fibrine. Cette transformation du fibrinogène est assurée par les 13 facteurs de la coagulation, protéines sanguines inactives qui sont activées par des réactions enzymatiques en cascade (Figure 3).

Les 13 facteurs de la coagulation sont :

I - Fibrinogène

II - Prothrombine

III - Facteur tissulaire (thromboplastine tissulaire ou facteur 3 plaquettaire)

IV - Calcium

V - Proaccélérine

VI - Accélérine

VII - Proconvertine

VIII - Facteur anti-hémophilique A

IX - Facteur anti-hémophilique B

X - Facteur Stuart

XI - Facteur Rosenthal

XII - Facteur Hageman (ou facteur de contact)

XIII - Facteur de stabilisation de la fibrine (FSF)

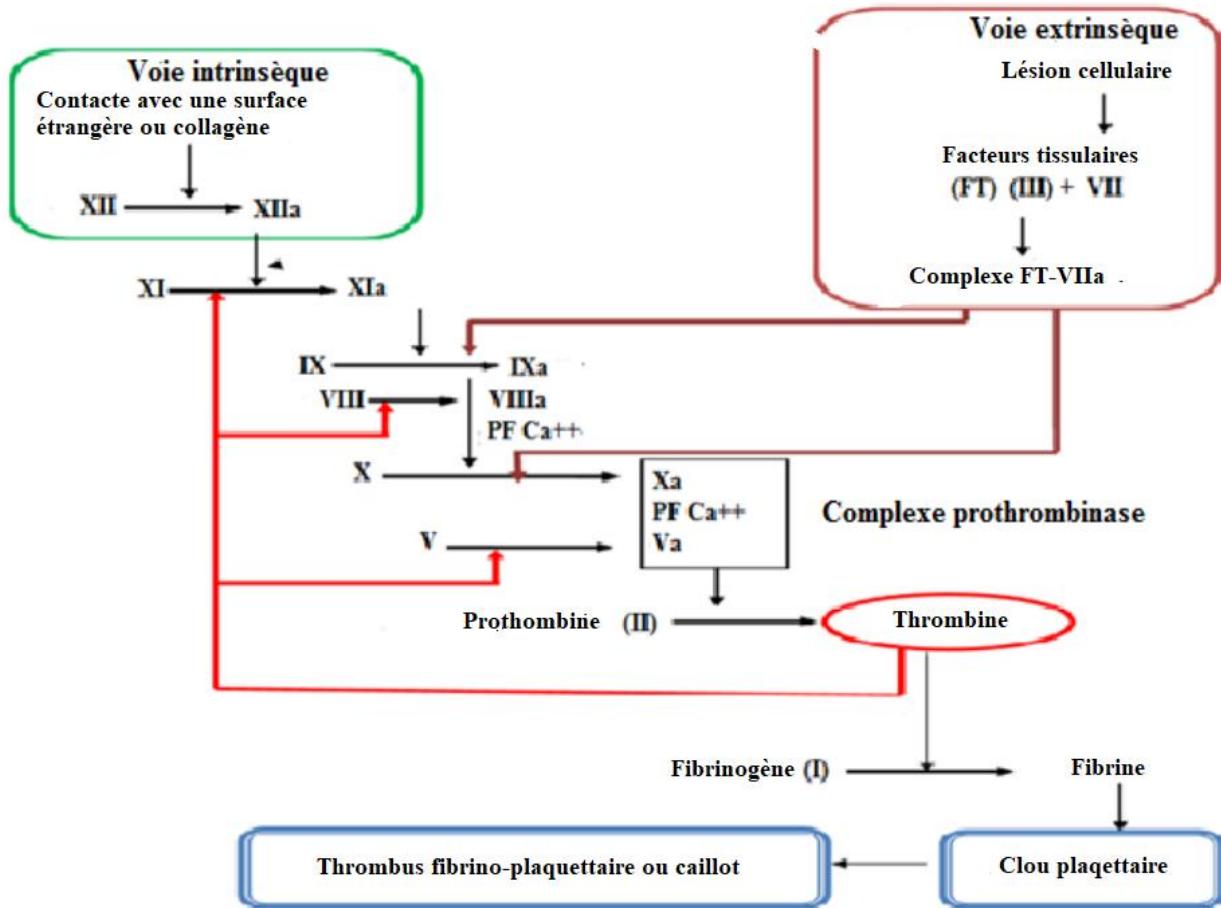


Figure 3 : Schéma résumant la cascade de coagulation du sang

1.6.3. Inhibiteurs des facteurs de coagulation

A côté de ces facteurs existent dans le plasma des systèmes inhibiteurs : système des anti-thrombines, système protéine C-protéine S, inhibiteur de la voie extrinsèque (TFPI pour *Tissue Factor Phathway Inhibitor*). Ils sont prédominants dans le plasma et régulent en permanence le processus d'hémostase (Tableau 2).

Tableau 2 : Différents Inhibiteurs des facteurs de coagulation et leurs niveaux d'action

Nom du facteur	Fonction
Antithrombine	Inhibe les facteur IIa et Xa
Proteine C	Inactive les facteur Va et VIIa, elle est vitamine K dépendante
Protéine S	Cofacteur de la protéine C, elle est vitamine K dépendante
Inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI)	Inhibe le complexe facteur tissulaire-facteur VIIa et Xa
Trombomoduline + Protéine C, ce dernier activé par la protéine S	Inhibe les facteur VIIIa et Va

2. Le lactosérum

2 .1. Définition et propriétés

C'est un liquide jaune pâle verdâtre (dont l'eau représente environ 90 %), contenant les éléments solubles du lait. Le lactosérum est un co-produit provenant de la fabrication de certains produits du lait : fromages, caséines et leurs dérivés. Le lactosérum est obtenu suite à la coagulation des caséines sous l'action de la présure (lactosérum doux), ou suivant l'acidification du lait (lactosérum acide). 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.

Le lactosérum est un produit intéressant par ses teneurs en protéines riches en acides aminés indispensables (lysine et tryptophane), en lactose et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B comme la thiamine et la riboflavine. Il représente essentiellement une source d'énergie et de carbone de part son teneur élevée (75% de la matière sèche) en lactose. D'autres éléments de valeur s'y retrouvent, dont les protéines (10% de la matière sèche), le calcium (0.45% de la matière sèche), le phosphore (0.40% de la matière sèche), et les vitamines hydrosolubles, sont les plus importants.

2.2. Types de lactosérum

Le lactosérum est considéré comme un produit dérivé de la fabrication des fromages. On distingue deux types de lactosérum: celui résultant de la coagulation des laits non acides, par la présure, et qu'on appelle "lactosérum doux" et celui résultant, de la fabrication des fromages à pâtes fraîches, à pâtes molles ou de la caséine lactique appelle "lactosérum acide".

2 .2.1. Lactosérum acide

Obtenu après la coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4.6 par ajout d'acide fort ou d'acide lactique. La caséine est combinée à des sels de calcium, l'acidification entraîne sa déminéralisation qui fait passer dans le sérum une part importante d'élément minéraux, notamment le calcium et le phosphore. Les lactosérum acides sont moins riches en lactose et plus riche en minéraux. Les teneurs élevées en acide lactique et en minéraux posent des difficultés pour la déshydratation; aussi les lactosérum

acides sont souvent utilisés à l'état liquide alors que les sérums doux sont généralement déshydratés. Le lactosérum acide provient de la fabrication des pâtes fraîches et des pâtes molles, son pH varie entre 4.5 - 5.

2.2.2. Lactosérum doux

Il est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable, on obtient alors un sérum doux, pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. Le lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite (Emmenthal, Saint Paulin, Edam.....etc.), est de pH variant entre 5 et 6.3.

2.3. Composition des lactosérum

Selon le procédé de coagulation et la composition initiale du lait (donc la saison, la race des animaux, le type d'alimentation, etc.), la composition du lactosérum peut varier sensiblement. Les lactosérum sont riches en lactose et potassium. Dans le lactosérum acide une partie du lactose a été transformé en acide lactique; les lactosérum doux sont pauvres en calcium (reste dans le caillé pour participer à la coagulation des protéines), alors que les lactosérum acides sont riches en calcium.

2.3.1. Lactose

Le lactose est le principal constituant du lactosérum, Il s'agit du β -D- galactopyranosyl (1-4) α ou β -D-glucopyranose ; ce qui est à l'origine de la présence de deux lactoses stéréoisomères réducteurs. 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. Le lactose est caractérisé par :

Une solubilité limitée.

Un pouvoir sucrant faible. Sa seule source importante dans la nature est le lait et les produits laitiers.

2.3.2. Protéines du lactosérum

Deux grandes familles de protéines entrent dans la composition du lait, la première famille est constituée de caséines qui représentent environ 80% des protéines totales du lait et la seconde est composée des protéines solubles constituées essentiellement de β -lactoglobuline (β -LG), α -lactalbumine (α -LA), albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines (Ig) et les protéases peptones. A l'échelle industrielle, ces protéines solubles sont extraites à partir du lactosérum.

Les protéines du lactosérum représentent 17 % du total des matières azotées du lait, et représentent 0.6 à 0.7 % de la matière sèche du lactosérum. Elles ont une meilleure valeur nutritionnelle, compte tenu leur teneur en acides aminés essentiels, soufrés et en lysine (Tableau 1).

Tableau 1 : Teneurs en acides aminés (AA) de la poudre du lactosérum

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

Les différentes protéines du lactosérum sont :

β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline (β -LG) ou β -lactalbumine est la plus abondante des protéines du lactosérum, elle représente environ 2 à 4 g/L, ce qui correspond à 50% des protéines totales du lactosérum. Il s'agit d'une protéine globulaire de structure compacte, composée de 162 résidus d'acide aminés et dont la masse moléculaire relative est de 18.3 KDa. Jusqu'à présent, 9 variantes génétiques ont été identifiées dans cette protéine. Bien que le rôle physiologique de

la β -lactoglobuline soit encore mal défini. Cette protéine est d'une très grande qualité nutritive grâce à son contenu élevé en acides aminés essentiels, notamment la leucine et la lysine. De plus, elle est riche en méthionine et en cystéine. Principales sources de soufre.

α -lactoglobuline

L' α -lactoglobuline ou α -lactalbumine est une protéine globulaire de structure primaire présentant de nombreuses homologies de séquences avec le lysozyme de l'œuf de poule, avec 47 résidus d'acides aminé identiques sur 123, son poids moléculaire est de 14 KDa et se présente avec une concentration de 1 à 1.5 g/L de lactosérum (environ 20% des protéines totales de lactosérum). L' α -lactalbumine est une protéine fonctionnelle très intéressante par sa composition riche en tryptophane, qui en fait une base de fabrication de peptides destinés à l'alimentation diététique. Cette protéine intervient comme cofacteur dans la biosynthèse du lactose, à partir du galactose et du glucose.

Immunoglobulines

Les immunoglobulines (12 %) se réfèrent à une famille hétérogène des glycoprotéines, ayant une activité d'anticorps. L'immunoglobuline se compose de quatre classes : IgG1, IgG2, IgA, IgM, et IgE. Ceux-ci ont été identifiés dans le lait. Le lait de vache contient 0.6 à 1.0 g/L d'immunoglobulines, 80% de ceux -ci sont des IgG.

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.

Sérum albumine (BSA)

La sérum albumine (5 %), cette protéine représente 0,1 à 0,4 g/L des protéines du lait, elle est constitué de 582 acides aminés. Les liaisons des acides gras stabilisent la molécule de la protéine contre la dénaturation par la chaleur.

Autres protéines mineures possédant une activité biologique: la lactoferrine et la lactoperoxydase, qui possèdent une activité bactéricide ou bactériostatique sur certaines espèces pathogènes.

2.3.3. sels 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

2.3.4. 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, la thiamine (B1), la pyridoxine (B6), ainsi que la vitamine C.

2.4. Valorisation du lactosérum et de ses dérivés

Le lactosérum est un co-produit de l'industrie fromagère. Lorsqu'il est déversé dans une rivière, il engendre des effets polluants.

Ces effets néfastes causés à l'environnement pourraient être évités d'autant que le lactosérum est une matière noble dont il y a encore beaucoup à tirer. En effet, on en extrait donc du lactose (les méthodes d'extraction sont voisines de celles qui sont utilisées en sucrerie de cannes ou de betterave), mais aussi de l'acide lactique et de la riboflavine (Vit B2).

Les progrès de la technologie ont permis ces dernières décennies de résoudre les problèmes de valorisation d'un produit agricole qui contient encore la moitié de la matière sèche du lait. À cette fin, il faut procéder à une série d'exactions:

- 1) éliminer l'eau, le principal constituant du lactosérum
- 2) éliminer une partie des minéraux.
- 3) extraire le lactose
- 4) enrichir et extraire les protéines sériques

L'industrie du lactosérum s'est considérablement développée depuis l'an 2000 et a vu la progression de marchés se chiffrant en milliards de Dollars, de poudre de lactosérum, de protéines de lactosérum, de fractions de protéines de lactosérum, sans parler du marché du lactose, du lactose pharmaceutique, et des dérivés du lactose.

2.4.1. Extraction des protéines

L'apport alimentaire en protéines est indispensable car il existe des acides aminés essentiels qui ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. De plus, elles possèdent des activités biologiques très variées (enzymatiques, hormonales, structurales et motrices). C'est pourquoi leurs extractions et purifications, visant à obtenir des concentrés, se révèlent utiles.

Les protéines de lactosérum sont proposées sur le marché, soit sous forme d'isolats soit comme concentrés.

Isolats de protéines sériques (WPI, whey protein isolate) : ils sont obtenus par chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Complètement débarrassés du lactose, ils ont une teneur en protéines d'environ 90 %. Ils sont plus riches en protéines que les concentrés et présentent des propriétés fonctionnelles différentes, en raison notamment de leur richesse en immunoglobulines.

Concentrés de protéines sériques Whey Protein Concentrate WPC : ils contiennent en général 35 à 85% de protéines. Ces concentrés sont préparés à basse température afin de préserver la conformation native des protéines. Ces protéines sont ensuite intégrées à l'aliment.

Les concentrés de protéines sériques (WPC) de bonnes qualités organoleptiques sont principalement utilisés dans l'alimentation animale, la fabrication des fromages frais, des produits diététiques, glaces, sauces et en boulangerie-pâtisserie. Les concentrés de protéines sériques sont très recherchés en diététique en raison de leur très haute valeur nutritive. Les produits pour sportifs pour le contrôle du poids à base de protéines sériques sont en constant développement en Europe.

2.4.2. Précipitation

La précipitation avec du sulfate d'ammonium permet la séparation des protéines. Cette technologie utilise leur solubilité différentielle, en changeant la force ionique du milieu, il est possible de précipiter et de séparer plus ou moins rapidement différentes protéines. A faible force ionique, les protéines sont solubles dans le milieu, mais quand la force ionique du milieu est augmentée, elles seront privées de leur couronne d'eau, s'aggloméreront et formeront un précipité.

2.4.3. Ultrafiltration

L'ultrafiltration permet de récupérer les protéines du lactosérum tout en éliminant le lactose et sels minéraux. Ces opérations assurent la rétention des protéines en amont de la membrane filtrante (rétentat) et laissent apparaître un perméat constitué essentiellement d'eau, de lactose et sels minéraux. Ces procédés peuvent permettre d'obtenir des concentrés à 80% de protéines. De plus, ils n'altèrent pas la forme initiale de la protéine. Les protéines peuvent enfin être séparées du rétentat par des techniques de chromatographie et précipitation décrites ci-dessous.

2.4.4. Fermentation

Elle consiste à utiliser des procédés biologiques pour la valorisation du perméat de lactosérum qui conserve la quasi-totalité du lactose, des minéraux et des vitamines. En effet, l'hydrolyse du lactose permet de générer deux monosaccharides (glucose et galactose) qui sont utilisables dans l'industrie laitière, les pâtes alimentaires, la confiserie et les boissons gazeuses

Les protéines du lactosérum traversent plus rapidement l'estomac que les caséines. Dans l'estomac, la fraction soluble des protéines de lait est évacuée rapidement alors que les caséines précipitent au contact du pH acide du milieu en formant un réseau protéique dense. Ainsi, les protéines de lactosérum qui sont rapidement digérés par l'estomac, peuvent être considérées comme des protéines « rapides », entraînant une élévation rapide (courte durée) de la teneur en acides aminés du plasma sanguin (ou hyperaminoacidémie). Au contraire, les caséines qui sont digérés progressivement, sont qualifiées de protéines « lentes ».

2.4.5. Séchage

La poudre de lactosérum est obtenue par élimination partielle de l'eau puis par déshydratation par atomisation en tour de séchage. La lyophilisation est une autre technique de séchage qui donne de bons résultats.

2.5. Utilisations du lactosérum

2.5.1. Alimentation animale

Chez le veau : l'ultra filtrat du lactosérum à l'état liquide et bien toléré par le veau après sevrage. Le lactosérum peut remplacer la totalité de l'eau de boisson. Cependant, l'incorporation exagérée de lactosérum dans l'alimentation des animaux domestiques présente un déséquilibre nutritionnel ainsi que certains troubles digestifs.

2.5.2. Alimentation humaine

Industrie des Boissons : Le lactosérum pasteurisé est additionné à cinq types de jus de fruits (orange, raisin, fraise, banane et pomme) en plus de l'ajout de saccharose et d'acide ascorbique. Les boissons obtenues ont une grande valeur diététique, digestion facile et rapide. Elles sont légères et désaltérantes.

Industrie laitière : La poudre de lactosérum acide peut remplacer la poudre de lait écrémé pour la fabrication des yaourts, sans atteindre à la qualité ni à l'arôme de ces derniers. Le lactosérum est utilisé dans la préparation des laits infantiles.

Dans la confiserie : Le lactosérum a d'importantes utilisations dans la fabrication de certains bonbons.

En boulangerie : La combinaison du lactose avec les matières azotées (réaction de Maillard) donne des complexes stables (contre le rancissement). Amélioration du goût et l'arôme du pain ; amélioration des caractéristiques internes et externes, affinage de la coloration, pâte plus tendre et augmentation du rendement.

Dans les glaces et crèmes glacées : La poudre de lactosérum doux peut remplacer jusqu'à 25% de quantité du lait écrémé. Lactosérum acide peut remplacer une partie du sucre pour la fabrication des sorbets de bonne qualité.

2.5.3. Complément alimentaire pour les sportifs

L'arrivée des concentrés de protéines de lactosérum a été une révolution dans le monde du conditionnement physique et de la musculation. Leur haute teneur en protéines et leur faible teneur en graisses et en calories en feraient un complément de choix avant et après l'entraînement physique. L'absorption d'environ 20 g de protéines durant ou juste après l'exercice est suffisant pour maximiser la synthèse post-entraînement des protéines musculaires. La stimulation de l'anabolisme musculaire semble plus marquée en situation de récupération après un exercice musculaire intense et après ingestion d'acides aminés indispensables (notamment de leucine).

2.5.4. Biotechnologie : Vu sa composition, le lactosérum constitue un excellent milieu de culture, notamment pour tous les micro-organismes susceptibles de métaboliser le lactose. Il peut être soumis à de nombreuses fermentations conduisant à des acides, des alcools, des enzymes et des vitamines.

2.5.5. En industrie pharmaceutique

La lactoferrine et la lactoperoxidase, possédant des propriétés antibactériennes, sont utilisée pour préparer différents produits de désinfection utilisés en oto-rhino-laryngologie, comme les solutions de bain de bouche, les pastilles pour la gorge et les dentifrices.

La β -lactoglobuline peut remplacer le sérum de veau fœtal dans la culture de cellules d'hybridomes de souris avec des résultats satisfaisants pour la production des anticorps.

Le lactose peut être isolé des autres éléments du lactosérum par cristallisation ou ultrafiltration. Subir une hydrolyse par une lactase, le glucose et le galactose résultants seront utilisés dans l'industrie agroalimentaire (confiseries et pâtisserie) et l'industrie pharmaceutique (substitut du glucose).

Le lactose permet d'obtenir, par isomérisation, le lactulose qui est fréquemment utilisé en tant que laxatif pour traiter la constipation et pour traiter des maladies telles que l'encéphalopathie hépatique (cirrhose du foie).

L'hydrolyse contrôlée des protéines peut également permettre d'éliminer leurs propriétés allergènes, et elles peuvent donc être utilisées pour la fabrication de produits hypoallergéniques. Enfin, une hydrolyse très poussée conduit à de petits peptides composés de seulement 2 à 5 acides aminés. Ceux-ci ont souvent un rôle très actif sur le plan biologique.

Les isolats de protéines sont particulièrement riches en immunoglobulines qui jouent le rôle d'anticorps et ont pour effet de stimuler le système immunitaire. Cet effet thérapeutique a également été observé chez l' α -lactalbumine, en effet son hydrolyse libérerait certains di- et tri-peptides capables d'amplifier la réponse immunitaire en augmentant le nombre de lymphocytes sanguins. Des résultats similaires ont été observés avec la lactoferrine. De manière générale, des essais ont montré que l'ingestion de quelques grammes d'isolat de lactosérum chaque jour chez des patients immunodéficients avait des résultats positifs sur les fonctions immunitaires ; particulièrement chez des personnes atteintes du sida et de l'hépatite B.

En effet, l' α -lactalbumine, La β -lactoglobuline et la lactoferrine possèdent toutes des propriétés antivirales. C'est le plus souvent une forme modifiée de ces protéines qui est la plus efficace. La β -lactoglobuline modifiée a également des capacités d'inhibition de l'infection par le VIH importantes. La protéine du lactosérum ayant le plus d'activité anti-virale reste la lactoferrine ; puisqu'elle inhibe plusieurs virus tels que le VIH, l'hépatite C, l'herpès et le cytomegalovirus humain. Dans le cas de l' α -lactalbumine, alors que sa forme naturelle n'a aucun effet, sa forme succinylée a une grande affinité pour la protéine gp120 du VIH-1 ce qui permet d'inhiber l'infection des cellules.

Des propriétés anti-bactériennes ont également été révélées chez les protéines du lactosérum. C'est, en général, l'hydrolyse de ces protéines par des endopeptidases qui libère des peptides aux propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Grâce à sa capacité de liaison au fer, la lactoferrine peut faire baisser le niveau de fer d'un milieu et ainsi inhiber la croissance des bactéries le métabolisant. Elle jouerait aussi un rôle sur la modification des membranes bactériennes, ce qui lui confère des propriétés bactériostatiques. L'utilisation de la lactoferrine est donc courante dans les dentifrices ou les bains de bouches puisqu'elle empêche l'adhésion de certaines bactéries sur la plaque dentaire.

3. Culture Cellulaire

3.1. Introduction

La culture cellulaire est une technique de laboratoire permettant de faire vivre *in vitro* des cellules, de diverses natures et d'origines, d'en modifier les propriétés ou d'augmenter leur nombre, afin d'en disposer en grande quantité pour ce qu'on veut en faire. La culture cellulaire n'est pas une fin en soi, mais un outil indispensable à la biologie cellulaire eucaryote.

Il s'agit d'obtenir un type de cellule vivante, de trouver un moyen de le faire survivre dans les conditions artificielles du laboratoire, au mieux de la faire proliférer, tout en maintenant des conditions de stress acceptables. Les conditions et les propriétés du milieu de culture sont pour cela capitales.

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés aujourd'hui dans les sciences de la vie. La culture des cellules animale en dehors de l'organisme permet l'observation des cellules vivantes dans des conditions favorables. De plus, une culture cellulaire représente un système expérimental beaucoup plus simple qu'un animal entier et elle fournit un système qui peut être étudié dans des conditions soigneusement contrôlées.

Culture de tissus est le terme général englobant le prélèvement de cellules, tissus ou organes d'un animal ou d'une plante et leur placement ultérieur dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. Cet environnement est généralement constitué de récipients de cultures appropriés en verre ou en plastique contenant un milieu liquide ou semi solide qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance. La culture d'organes entiers ou de fragments d'organes intacts dans l'intention d'étudier leur fonctionnement ou leur développement prolongés est appelée **Culture d'organe**.

Lorsque les cellules sont retirées des fragments d'organe avant, ou pendant la culture, interrompant ainsi leurs relations normales avec les cellules voisines, on appelle cela **Culture de cellules**.

Les cultures préparées directement à partir des tissus d'un organisme sont appelées "cultures primaires". Dans la majorité des cas, les cellules des cultures primaires peuvent être

prélevées de la boîte de culture et utilisées pour former un grand nombre de "cultures secondaires". Elles peuvent être repiquées de cette façon pendant des semaines ou des mois.

Ces cellules manifestent souvent les propriétés différentielles du tissu dont elles proviennent: les fibroblastes sécrètent du collagène, les cellules musculaires embryonnaires fusionnent pour former les fibres musculaires géantes, les cellules nerveuses émettent des axones et établissent des synapses avec d'autres cellules nerveuses...etc.

3.2. Culture primaire

Lorsque les cellules sont prélevées chirurgicalement d'un organisme et placées dans un environnement de culture approprié, elles se fixent, se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une **Culture primaire**. Il existe deux méthodes de base pour faire cela. Dans la première, pour les **Cultures d'explants**, de petits morceaux de tissus sont fixés sur un récipient de culture en verre ou en plastique traité et baignés dans du milieu de culture. Après quelques jours, des cellules individuelles se déplacent de l'explant de tissus vers la surface du récipient de culture ou le substrat où elles commencent à se diviser et proliférer.

Dans la deuxième, méthode la plus généralement utilisée, ce processus est accéléré en ajoutant des enzymes de digestion (protéolytiques), telles que la trypsine ou la collagénase, à des fragments de tissus pour dissoudre le ciment maintenant les cellules ensemble. Ceci crée une suspension de cellules individuelles qui sont placées dans des récipients de culture contenant un milieu de culture pour les laisser pousser et se diviser. Cette méthode est appelée **dissociation enzymatique**.

3.3. Culture secondaire (Repiquage)

Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible, elles doivent être repiquées pour leur donner de la place afin d'avoir une croissance continue. Cela se fait généralement en les retirant aussi délicatement que possible du substrat avec des enzymes.

Ces enzymes sont similaires à celles utilisées pour obtenir la culture primaire et sont utilisées pour rompre les liaisons protéiques liant les cellules au substrat.

Certaines lignées cellulaires peuvent être récoltées en grattant délicatement les cellules du fond du récipient de culture. Une fois libérées, les cellules en suspension peuvent être divisées et placées dans de nouveaux récipients de culture.

Lorsqu'un surplus de cellules est disponible, il est possible de les traiter avec des agents cryoprotecteurs adaptés, comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou le glycérol, de les congeler délicatement puis de les stocker à des températures cryogéniques (en dessous de – 130°C) jusqu'à ce qu'on en ait besoin.

3.4. Systèmes de culture cellulaire

Deux systèmes de base de culture cellulaire sont utilisés pour cultiver des cellules. Ils sont essentiellement basés sur l'aptitude des cellules à pousser attachées sur un substrat de verre ou de plastique traité (**systèmes de culture mono-couche**) ou à flotter librement dans le milieu de culture (**systèmes de culture en suspension**).

Les cultures mono-couches sont généralement cultivées dans des boîtes, flacons T, flacons roulants ou plaques multipuits traités pour la culture de cellules, le choix se faisant en fonction du nombre de cellules nécessaires, de la nature de l'environnement de culture, du coût et des préférences personnelles (Figure 5).



Figure 5: Flacons T et plaques multipuits utilisés dans les cultures cellulaire.

Les cultures en suspension sont généralement cultivées:

1. Dans des flacons Spinner (rotation magnétique) ou dans des Erlenmeyers agités dans lesquels les cellules sont activement gardées en suspension dans le milieu (Figure 6);

2. Dans des récipients de culture stationnaires comme les flacons T et les bouteilles dans lesquels, bien qu'elles ne soient pas maintenues en agitation, les cellules sont incapables de se fixer (Figure 6).

De nombreuses lignées cellulaires, surtout celles dérivées de tissus normaux, sont considérées comme **adhérentes**, c'est-à-dire qu'elles poussent uniquement lorsqu'elles adhèrent à un substrat leur convenant.



Figure 6: Erlenmeyers agités utilisés pour les cultures en suspension.

Certaines lignées cellulaires qui ne sont plus considérées comme normales (fréquemment désignées par **cellules transformées**) sont souvent capables de croître soit fixées à un substrat soit en flottant librement en suspension ; elles sont **en suspension**.

De plus, certaines cellules normales, comme celles trouvées dans le sang, ne se fixent pas normalement aux substrats et poussent toujours en suspension.

3.5. Conditions de culture

La culture cellulaire se base sur l'utilisation d'outils, que sont :

- Un endroit stérile et le restant, pour manipuler les cellules sans les contaminer.
- Un endroit remplissant les conditions nécessaires à la vie des cellules : un incubateur (Figure 7).



Figure 7: Incubateur à CO₂

- Milieux de culture, qui varient selon le type de cellule et ce que l'on veut en faire. D'autres matériels sont également utiles :

- un réfrigérateur (+4 °C) pour stocker les milieux de culture.
- un congélateur (-80 °C, ou un congélateur à azote liquide) pour stocker les cellules congelées.

Un environnement "heureux" permet aux cellules de faire plus que juste survivre en culture. Généralement, cela signifie un environnement qui, au minimum, permet aux cellules d'augmenter en nombre par division cellulaire.

La culture des cellules nécessite la réalisation de milieux nutritifs complexes. Ceux actuellement utilisés sont des mélanges de glucose, d'acides aminés, de certaines protéines, de vitamines et de sels minéraux (Tableau 3).

Tableau 3: Composition type d'un milieu de culture de cellules de mammifères.

Acides aminés	Vitamines	Sels	Divers
Arginine / Cystine/ Glutamine / Histidine / Isoleucine / Leucine / Lysine / Méthionine / Phénylalanine / Thréonine / Tyrosine / Valine	Biotine Choline Folate Nicotinamide Panthothénate Pyridoxal Thiamine et Riboflavine	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ NaHCO ₃ CaCl ₂ MgCl ₂	Glucose Antibiotiques * (Pénicilline, Streptomycine et la Gentamicine) Rouge de phénol** Sérum du veau fœtal Facteur de croissance (EGF)

pH 7,4 ; récipients conservés à 37 °C dans une atmosphère à 5 % CO₂; * pour arrêter la croissance des bactéries / ** Indicateur de pH.

3.6. Contaminations des cultures

Il existe deux types principaux de contamination des cultures cellulaires : chimique et biologique.

La contamination chimique est la plus difficile à détecter car elle est due à des agents, tels que les endotoxines, plastifiants, ions métalliques ou traces de désinfectants chimiques qui sont invisibles. Les effets sur la culture cellulaire associés aux endotoxines sont décrits en détails dans le bulletin technique : Endotoxines et culture Cellulaire.

Les contaminants biologiques sous forme de levures à croissance rapide, bactéries et champignons ont un effet visible sur la culture (changement de turbidité ou de pH du milieu) et sont ainsi plus faciles à détecter (surtout en Absence d'antibiotiques dans le milieu de culture). Cependant, deux autres formes de contaminations biologiques, les mycoplasmes et les virus, ne sont pas faciles à détecter.

Il existe deux conditions majeures pour éviter les contaminations.

- 1) un entraînement correct à la mise en œuvre de techniques de bonne asepsie de la part de la personne qui cultive les cellules.
- 2) un équipement, matériel en plastique, en verre et des milieux correctement conçus, entretenus et stérilisés.

3.7. Applications des cultures de cellules

La culture cellulaire est devenue un des outils majeurs utilisés en biologie cellulaire et moléculaire. Certains des domaines importants dans lesquels la culture cellulaire joue actuellement un rôle majeur sont brièvement décrits ci-dessous:

3. 7.1. Systèmes de modèles

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier :

- 1) la biologie et la biochimie cellulaires de base,
- 2) les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- 3) les effets des médicaments sur les cellules,
- 4) le processus et le déclenchement du vieillissement et 5) les études nutritionnelles.

3.7.2. Tests de toxicité

Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules. Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

3.7.3. Recherche sur le cancer

Les cellules normales et les cellules cancéreuses pouvant toutes deux être cultivées, les différences de base entre elles peuvent être étudiées de près. De plus, il est possible, en utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses. Ceci permet ainsi d'étudier les mécanismes conduisant à ce changement.

Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

3.7.4. Virologie

Une des utilisations les plus précoces et les plus importantes des cultures cellulaires a été la réplication de virus dans les cultures cellulaires (à la place des animaux) pour les utiliser dans la production de vaccins. Les cultures cellulaires sont également largement utilisées en détection clinique et isolement de virus, ainsi qu'en recherche fondamentale pour étudier comment ils se développent et infectent les organismes.

3.7.5. Usine de production

Alors que les cellules cultivées peuvent être utilisées pour produire de nombreux produits importants, trois domaines se sont montrés plus intéressants. Le premier est la production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de vaccins.

Ceci comprend les vaccins contre la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole. Le deuxième est la production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des protéines présentant une valeur médicale ou commerciale. Ceci inclut les

anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc. Le troisième est l'utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes. La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce. Toutefois, des tests sont en cours sur des organes artificiels comme le pancréas, le foie et les reins. Une réserve potentielle de cellules et tissus de remplacement peut ressortir de travaux en cours réalisés avec des cellules souches adultes et embryonnaires. Ce sont des cellules qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents. Apprendre à contrôler le développement de ces cellules représente un espoir pour de nouvelles approches de traitements pour une large variété de pathologies.

3.7.6. Thérapie génique

La capacité de transfecter ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) a fourni un outil précieux aux biologistes moléculaires désireux d'étudier les effets cellulaires de l'expression de ces gènes (nouvelles protéines).

Ces techniques peuvent également être utilisées pour produire ces nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier. Les cellules d'insectes sont largement utilisées comme usines cellulaires miniatures pour exprimer des quantités substantielles de protéines qu'elles fabriquent après avoir été infectées par des baculovirus génétiquement modifiés.

3.7.7. Hybridation cellulaire – application dans la production d'anticorps monoclonaux

Tout individu est capable de répondre contre les nombreuses agressions étrangères (multitude d'antigènes) par la synthèse de plusieurs anticorps différents. Ainsi, théoriquement, si on veut obtenir une grande quantité d'un anticorps donné, on procède comme suit (Figure 8):

- 1- On injecte à un animal l'antigène correspondant,
- 2- On attend que les anticorps soient produits puis;
- 3- on isole et on cultive les cellules spléniques ou ganglionnaires capables de produire l'anticorps souhaité.

Malheureusement, les cellules productrices (clone qui dérive du même lymphocyte B) ne peuvent se diviser indéfiniment en culture. Aussi, afin d'obtenir une grande quantité d'anticorps, il a fallu fusionner les cellules précédentes avec des cellules cancéreuses (myélome) qui confèrent aux cellules hybrides (hybridomes) une immortalité qui favorise leur exploitation (production d'anticorps monoclonaux).

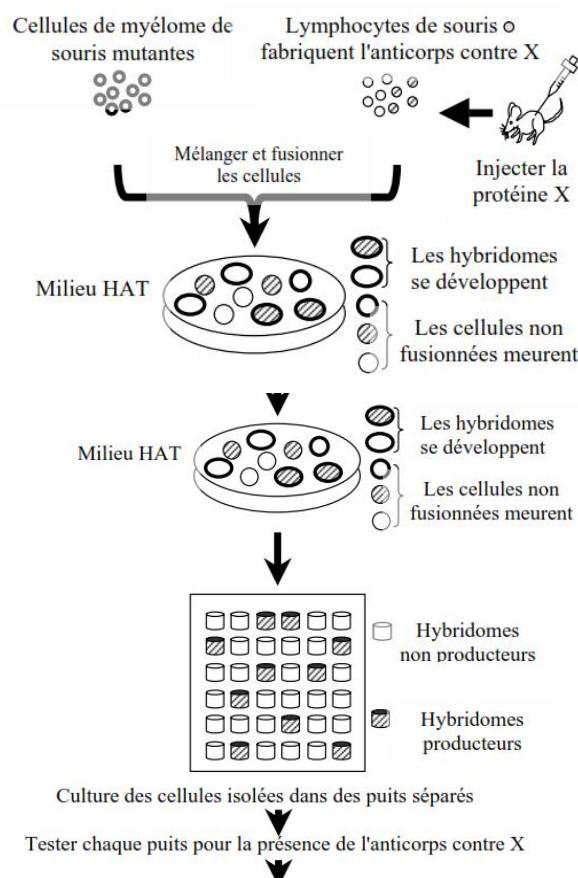


Figure 8: Procédé utilisé pour l'obtention d'anticorps monoclonaux

Les cellules du myélome sont adaptées à la culture *in vitro* et sont déficients en Hypoxanthine-Guanine PhosphoRybosyl Transférase (HGPRT). L'ensemble des cellules est transféré dans un milieu HAT qui doit son nom à la présence d'hypoxanthine; améthoptérine et thymine.

Ce milieu permet la croissance des cellules avec une HGPRT fonctionnelle, mais les cellules dépourvues de cette enzyme, comme les cellules de myélome non fusionnées utilisées dans cette technique, ne peuvent s'y développer.

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

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

3.7.8. Utilisations des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux peuvent être employés de manière analogue aux anticorps polyclonaux conventionnels.

Les diverses applications de ces molécules sont:

- Dans le domaine de la recherche : comme l'antigène utilisé peut ne pas être purifié, après obtention de l'anticorps monoclonal, ce dernier peut servir à l'isolement et la purification par chromatographie d'affinité de l'antigène en cause.

- Dans le domaine du *diagnostic médical* (humain ou vétérinaire) : essentiellement utilisés en sérologie courante à l'aide de tests radio-immunologiques ou immunoenzymatiques pour la détection et la quantification de toutes molécules sériques ou urinaires (hormones, médicament, protéines...).

Ils sont également destinés au typage cellulaire et sanguin (Lc T auxiliaires ou suppresseurs, Lc B ...) ainsi que l'identification d'antigènes tumoraux dans le sérum ou sur des cellules et des antigènes viraux ou bactériens dans le diagnostic des maladies infectieuses.

Dans le domaine alimentaire : les anticorps monoclonaux sont utilisés pour la recherche de substances étrangères (contaminants, additifs, élément toxique) pouvant être néfastes pour la santé dans toute sorte de produit et dont toute trace révélée peut entraîner la saisie de l'aliment.

- Autres: contrôle des pesticides et pollution de l'environnement (recherche par radio-immunologie d'insecticides comme le parathion dans les extraits de végétaux, ou de pesticides comme le thiocarbamate qui a l'inconvénient de se répandre rapidement dans les eaux de drainage puis dans les rivières en tuant les poissons).

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

Chapitre III. Biochimie des substances d'origine microbienne

1. Introduction

La microbiologie industrielle utilise des microorganismes cultivés à grande échelle soit pour produire de la biomasse, des métabolites primaires ex. les acides organiques, les acides aminés et les protéines) et des métabolites secondaires (ex. des antibiotiques) ou encore la bioconversion d'une molécule d'intérêt.

Toute fermentation industrielle a pour objectif de produire une substance d'intérêt en quantité la plus grande, dans le temps le plus court et au moindre coût possible. Pour ce faire, on doit cultiver un microorganisme dans des conditions physico-chimiques contrôlées au sein d'une enceinte de grand volume spécialement conçue à cet effet : le bioréacteur ou fermenteur.

Un bioréacteur, appelé également fermenteur ou propagateur, est un appareil dans lequel on multiplie des micro-organismes (levures, bactéries, champignons microscopiques, algues, cellules animales et végétales) pour la production de biomasse, ou pour la production d'un métabolite.

Les fermenteurs sont des récipients (enceintes, cuves) en verre (pour les fermenteurs destinés le plus souvent au laboratoire), ou le plus souvent en acier inoxydable, de dimension très variable en passant de l'ordre de 5 à 25 litres pour les fermenteurs laboratoire à l'ordre de mètres cubes pour les fermenteurs industriels (Figure 1).

Ces récipients sont munis le plus souvent d'appareillages et de dispositifs de contrôles (pH-mètre, extracteur des gaz, sondes, agitateurs, etc.) et de matériels annexes (vannes, pompes, filtres, etc.) nécessaires pour assurer une facilité et le bon fonctionnement de la fermentation, ainsi que la récupération des produits, tout en assurant le contrôle des conditions nécessaires à la production (Figure 2).

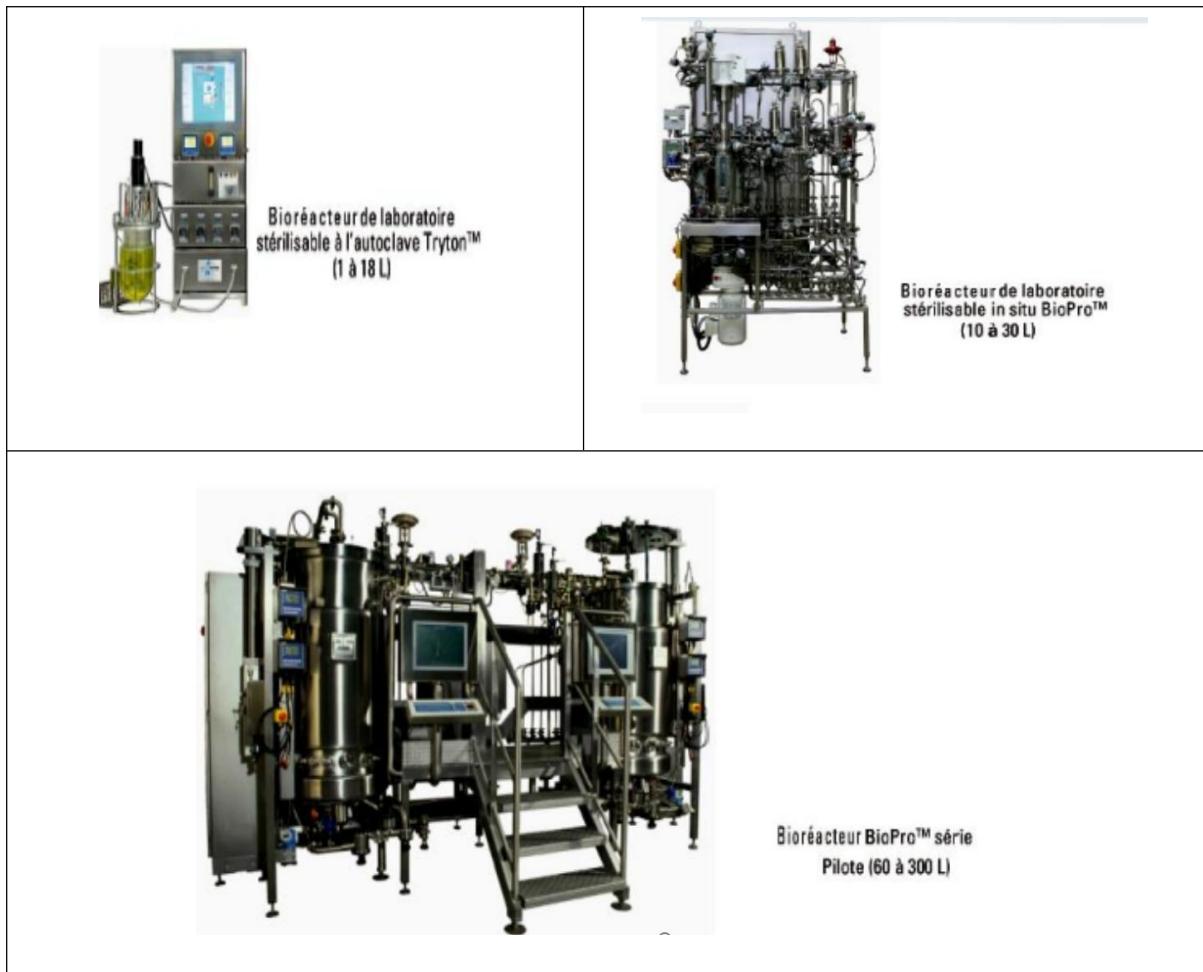


Figure 1: Fermenteurs avec différentes capacités

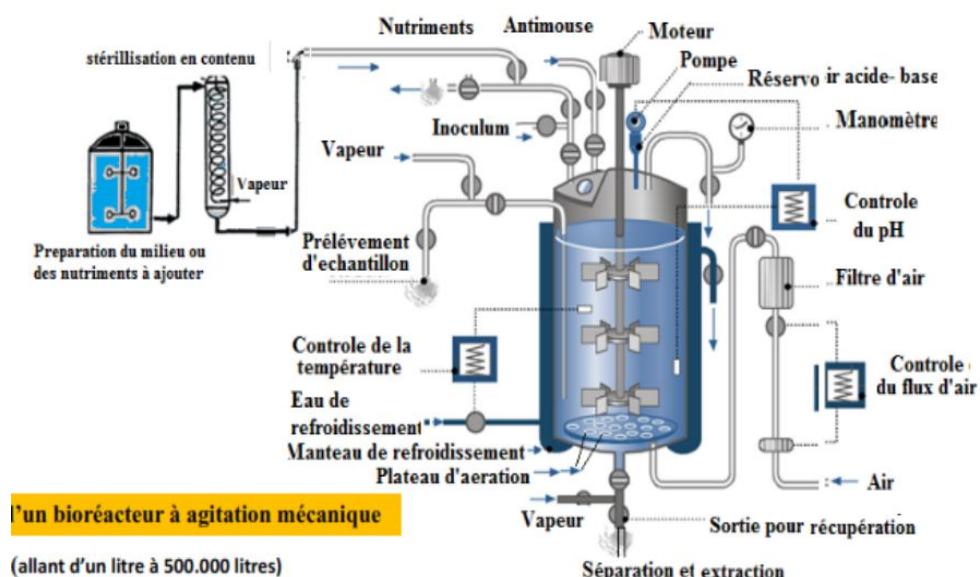


Figure 2 : Schéma d'un fermenteur avec les dispositifs de contrôles nécessaires à la production

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation

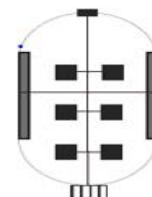
- La fabrication du milieu de culture ;
- La stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
- La préparation de l'inoculum ;
- La production en bioréacteur ;
- L'extraction du produit et sa purification.

2. Procédés de fermentation

2.1. Fermentation ou procédé discontinu ou batch

Le substrat est introduit au début de la réaction

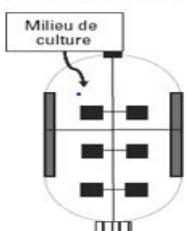
Procédé batch
Fermentation
discontinue



2.2. Fermentation ou procédé discontinu alimenté ou fed-batch

Le substrat est introduit tout au long de la réaction mais sans qu'il y ait soutirage du milieu; le volume augmente.

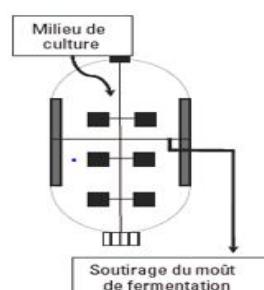
Procédé fed-batch
Fermentation
discontinue alimentée



2.3. Fermentation ou procédé continu

Le bioréacteur est alimenté en continu en substrat; le substrat est introduit tout au long de la réaction. Alimentation en substrat et un soutirage du milieu à un même débit (pour que le volume reste constant).

Procédé de
culture continue



Avantages

- La transformation des substrats peut se poursuivre indéfiniment et l'appareillage est utilisé à plein ((intérêt économique)).

Inconvénient

- Un fonctionnement sur des temps longs peut engendrer la modification du matériel biologique (mutation des microorganismes).

Les produits libérés par le métabolisme au cours de la phase exponentielle de la croissance sont appelés « métabolites primaires », il s'agit de produits non spécifiques (acides aminés, nucléotides, vitamines, acides organiques, éthanol) (Figure 3).

Le terme « métabolite secondaire » est utilisé dans le cas de produits spécifiques de l'anabolisme, dont l'apparition est liée à la phase stationnaire de la croissance (antibiotiques, agents immuno-supresseurs, agents hypocholestérolémiant, agents antitumoraux, bioinsecticides).

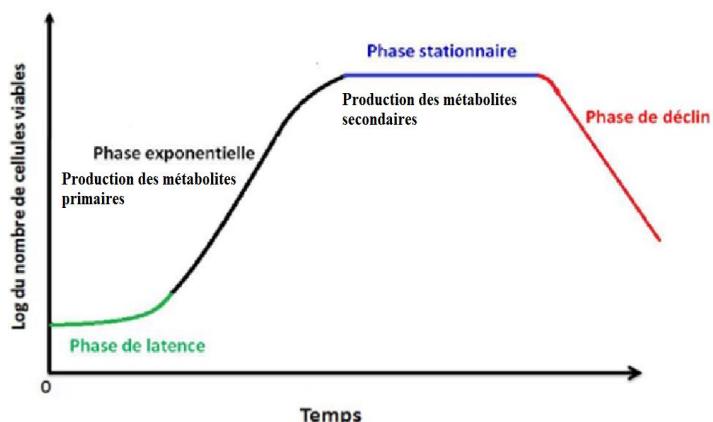


Figure 3 : Différentes phases de la croissance bactérienne.

3. Métabolites primaires

3.1. La biomasse

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

3.1.1. Micro-organismes producteurs

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

- 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 oses.

3.1.2. Utilisations de la biomasse

a-Source de protéines et acides aminés

- L'augmentation de la productivité en protéines (les bactéries méthylo trophes 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 (comme substrat) et la production de métabolites primaires tels les acides aminés, qui sont utilisés en nutrition humaine (ex. le glutamate, la lysine et le tryptophane produits par les bactéries des genres *Corynebacterium* et *Brevibacterium*).

b-Source de probiotiques

Les probiotiques sont des bactéries ou des levures (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*...) naturellement présentes dans l'organisme. Ces micro-organismes vivants participent à différentes fonctions : la digestion, l'immunité... Certains peuvent être pris sous forme de compléments alimentaires. Les plus connus sont les levures de bière ou encore les bactéries lactiques que l'on trouve dans les yaourts.

Rôles des probiotiques

C'est dans l'intestin que tout se joue, siège de notre flore intestinale. Celle-ci contient de bonnes et de mauvaises bactéries. Sa bonne santé ne tient qu'à l'équilibre entre ces deux. Et lorsque ces dernières sont en surnombre, elles sont responsables de divers problèmes de santé : infections à répétition, mauvaise digestion, allergies... Consommer des probiotiques aide à rétablir cette harmonie.

- Ils favorisent alors une bonne digestion, régulent le transit intestinal et diminuent la fréquence des diarrhées,
- Ils favorisent la synthèse des vitamines B et K.
- Ils luttent contre l'infection à *Helicobacter pylori*, une bactérie responsable des ulcères gastroduodénaux. Leur consommation en parallèle d'un traitement antibiotique permet de lutter contre les effets secondaires du traitement comme les diarrhées.

Fabrication de vaccins

La fabrication de vaccins sous forme de cellules microbiennes vivantes rendues virulentes par atténuation (exemple de *Bordetella pertussis*, agent de la coqueluche).

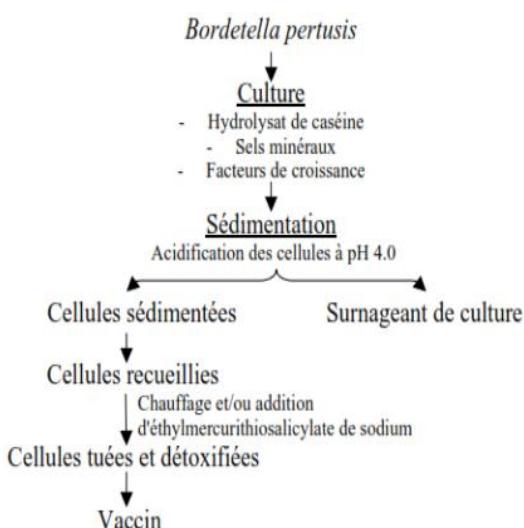


Figure 4 : Production de cellules de *Bordetelle pertussis* atténueées (Vaccin de la coqueluche)

La biomasse microbienne est utilisée dans : boulangerie, fromagerie, production de cellules pour les fermentations.

3.2. Acides organiques

Ce sont des composés chimiques de faibles poids moléculaires se caractérisant par la présence d'au moins une fonction carboxylique;

Ces acides sont produits naturellement par tous les organismes tels que les micro-organismes, les plantes, les animaux et les êtres humains.

Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques qui sont principalement employés dans l'industrie alimentaire comme additifs alimentaires et sont utilisés comme agent de conservation, acidulant ou antioxydant.

Les exemples les plus connus sont l'acide acétique (vinaigre) et l'acide citrique qui est utilisé, notamment, comme antioxydant dans l'industrie alimentaire.

3.2.1. Acide citrique

- L'acide citrique est un intermédiaire du cycle de Krebs. L'acide citrique était extrait à l'origine à partir de citron (un citron contient 7 % à 9 % d'acide citrique). En 1923, une fermentation microbienne produisant des taux élevé d'acide citrique a été développée.
- Il est très utilisé dans l'industrie alimentaire (boissons, jus de fruits, confiserie...) avec un taux de 60% de la production annuelle ; l'industrie pharmaceutique et cosmétique en utilisent 10% et aussi l'industrie chimique (détergents, traitement des tissus, fabrication de plastique...).
- Différents micro-organismes sont utilisés mais *Aspergillus niger* reste le meilleur champignon producteur d'acide citrique.

3.2.2. Acide lactique

- Il est produit par *Lactobacillus delbrucki* sur milieu à base de lactosérum, mélasses et oses purs. Des champignons filamenteux comme Rhizopus sont aussi utilisé pour la production.
 - L'utilisation de co-produits solides, comme la bagasse de canne à sucre ou la pulpe de manioc, semble également être une bonne alternative pour la production d'acide lactique.
- La température de production est comprise entre 30°C et 37°C selon le microorganisme utilisé;

Des quantités importantes sont produites annuellement pour de nombreuses utilisations de cet acide, dans l'industrie alimentaire (jus de fruits, limonades, sirops, confitures,...), l'industrie pharmaceutique (lactate de fer et de chaux), l'industrie du cuir et des textiles et l'industrie des plastiques.

3.2.3. Acide acétique

La fermentation acétique est un processus biochimique où l'éthanol est oxydé en acide acétique par le biais de bactéries acétiques dans des conditions stricts d'aérobiose, elle nécessite donc une très forte aération.

L'acide acétique est un métabolite microbien très répandu. Cependant malgré sa facilité d'obtention par voie microbiologique, les énormes quantités d'acide acétique utilisées par l'industrie sont obtenues par voie chimique.

Les bactéries acétiques sont de gram négatif. Tous les membres de la famille des *Acetobacteraceae* sont strictement aérobies et leur métabolisme est strictement respiratoire où aux environs de 30 °C, leurs pH optimum de croissance est entre 5,4 et 6,3 .

Elles sont très tolérantes aux pH acides. Leurs implications dans la fermentation acétique ont été mises en évidence par Pasteur en 1868. Leur développement se manifeste par la formation d'un voile de surface sur le vin ou le cidre (la mère du vinaigre). Seul ce voile contient des cellules vivantes aérobies strictes. Les acétobacters oxydent plus l'éthanol que le glucose, par contre les *Gluconobacter* ont plus d'affinité au glucose que pour l'éthanol. Un arrêt de l'oxygénéation ou l'absence de l'éthanol entraîne la mort des cellules.

La résistance des bactéries à l'acide acétique et leur acidophilie, restent encore inexpiquée. Il est possible que la richesse de la membrane de ces bactéries en acide gras saturés la rende relativement imperméable à cet acide qui se trouve sous forme indissociée dans les conditions industrielles.

3.3. Enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières (Animale, Végétale et microbienne).

Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les micro-organismes présentent de

nombreux avantages comme source d'enzymes: croissance exponentielle, induction et rétro-inhibition...etc

Tous les microorganismes produisent les enzymes, et donc un très grand nombre d'entre eux peuvent être utilisé pour une production industrielle. Afin de choisir le microorganisme idéal, on doit se baser sur les points suivants:

- Le rendement : choisir une espèce ou une souche qui donne un maximum de production en un minimum de temps.
- Un microorganisme qui produit une enzyme extracellulaire est préféré à un autre qui donne une enzyme endocellulaire (pour faciliter la récupération).
- On choisit toujours un microorganisme non exigeant (facile à isoler et à cultiver, croître sur des substrats peu coûteux, etc.)
- Pour une utilisation alimentaire, on prend des microorganismes non pathogènes.

3.3.1. Conditions de la fermentation

La fermentation se fait dans un milieu riche, où les paramètres physico-chimiques sont régulés en continu: oxygène, pH, température, mouillage (réduit par l'addition d'antimousse). De plus, la mesure de l'activité enzymatique est effectuée à intervalles réguliers.

Les inducteurs doivent être présents dans les milieux de production (exemple: l'amidon pour l'amylase, l'urée pour l'uréase, le xylose pour la xylose isomérase)

Certaines molécules agissent comme inducteurs à faible concentration et comme répresseur à fortes doses (exemple: cellobiose pour les cellulases).

Les co-enzymes peuvent aussi avoir un effet inducteur (exemple: la thiamine augmente la production de la pyruvate carboxylase).

Les milieux de production sont soit des milieux synthétiques ou complexes. Les matières premières apportant les éléments nutritifs (énergie, carbone, azote, phosphore, soufre, vitamines...)(Tableau 1)

Tableau 1 : Matières premières apportant les éléments nutritifs

Substrats	Exemples
Source de carbone et énergie	Farine de céréales, farine de soja, amidons de maïs, de pomme de terre, les sous produits tels le lactosérum et les mélasses.
Source d'azote (organique)	Farines de poisson, gélatine, caséines, farines de soja, coton, maïs et arachide.
Sels minéraux et substances de croissances	Extrait de levure, huiles végétales, farines de graines oléagineuses.

3.3.2. Extraction (séparation) 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. Enfin, les enzymes sont traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Différentes techniques de séparation et de purification des enzymes selon leurs propriétés globales.

Exemples d'enzymes produites par fermentation

Le tableau 2 présente quelques enzymes produites par fermentation

Tableau 2 : Exemples d'enzymes produites par fermentation, les microorganismes utilisés et les différentes utilisations des enzymes.

Amylases	hydrolyse de l'amidon en sucres solubles	<i>Aspergillus oryzae</i> et <i>A. niger</i> (moisissure) <i>Bacillus subtilis</i> (bactérie)	-Élimination de l'amidon dans les jus et les extraits de fruits, ce qui les clarifie et facilite leur filtration -Conversion de l'amidon de céréales en sirops de sucres (tel le sirop de maïs).
----------	--	--	---

			<ul style="list-style-type: none"> -Accélération de la levée de la pâte à pain. - Production des détergents
Invertase	hydrolyse le saccharose en glucose et fructose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> et <i>Candida utilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Réduire la cristallisation dans les sirops. - Son action donne un sirop plus fluide, qui a un plus grand pouvoir sucrant et qui cristallise moins facilement que le saccharose
Lactase (β -Galactosidase) (α -galactosidase)	hydrolyse le lactose en glucose et galactose	<i>Aspergillus niger</i> et <i>Aspergillus oryzae</i> .(moisisseur) <i>Kluyveromyces fragilis</i> (levure) <i>Candida</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Éliminer le lactose (délactoser) du lait, ce qui le rend plus digeste pour les personnes souffrant d'intolérance au lactose. - Son action donne un lait plus sucré. - Accélérer la fabrication du fromage frais.
Lipases	hydrolyse les lipides en acides gras et glycérides	<i>Saccharomyces lipolytica</i> (levure) ; <i>Aspergillus niger</i> (moisisseur) <i>Pénicillium roqueforti</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Candida lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Produire davantage de composés d'arômes dans les fromages et autres produits laitiers - Les lipases peuvent être utilisées pour améliorer la saveur des fromages, de la crème glacée, de la margarine, du beurre, de pâtisseries et d'autres produits. - Elles permettent également d'éliminer les graisses insolubles dans les préparations de poissons et de blancs d'œufs destinées à la déshydratation. - Production des détergents
Glucose isomérase	conversion du glucose en fructose	<i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Arthrobacter</i> <i>Microbacterium</i> et	<ul style="list-style-type: none"> - La glucose isomérase est surtout utilisée pour la fabrication de sirop de maïs riche en fructose. - Ce sirop est d'abord produit par l'action d'amylases sur l'amidon de maïs. <p>Le glucose qui en résulte est ensuite traité avec</p>

		Actinoplanes.	<p>le glucose isomérase, ce qui rend le sirop plus sucré (le fructose a un pouvoir sucrant supérieur à celui du glucose).</p> <p>- Il est très utilisé en confiserie et dans la préparation de boissons non alcoolisées.</p>
Glucose oxydase	transformation du glucose en acide gluconique par oxidation	Aspergillus niger, Pénicillium	<p>- Une autre enzyme, la catalase (produite par <i>Aspergillus niger</i> ou <i>Micrococcus lysodeikticus</i>), est jointe à la préparation enzymatique pour décomposer le peroxyde d'hydrogène formé.</p> <p>- Cette préparation est employée principalement pour éliminer le glucose des blancs d'œuf ou des œufs entiers avant leur séchage, ce qui aide à prévenir leur brunissement, leur détérioration et améliore leurs propriétés moussantes.</p>
Pectinases	hydrolyse de la pectine	<i>Aspergillus niger</i> (moisissure) ; <i>Rhizopus oryzæ</i> ; Penicillium	<p>- Clarifie le jus de fruits et de légumes, empêcher la gélification ; hydrolyser la pectine des fruits et d'éviter ainsi la formation de gel lorsque celui-ci est contre-indiqué (jus de fruits concentrés, par exemple).</p> <p>- Production des détergents</p>
Enzymes protéolytiques (Proteases)	hydrolyse des protéines en acides aminés	<i>Aspergillus oryzæ</i> (moisissure) ; <i>Bacillus subtilis</i> (bactérie)	<p>- Améliorer la texture de la pâte à pain (action sur le gluten de la farine)</p> <p>- Attendrissement de la viande.</p> <p>- Production des détergents</p>
Rennine (ou rennet)	Coagulation de la caséine du lait	<i>Mucor pusillus</i> (moisissure) ; <i>Mucor miehei</i> (moisissure);	<p>- Coaguler le lait pour la fabrication de fromages</p> <p>- La rennine fongique peut remplacer la présure bovine pour la fabrication de fromages.</p>

Autres enzymes et leurs domaines d'utilisation

En agroalimentaire

- Les cellulases sont très utilisées pour la clarification des jus de fruits.
- La papaïne attendrit la viande avant la cuisson.

En biologie moléculaire

Les enzymes utilisées sont les ADN ligases, ADN polymérases, les enzymes de restriction et toutes les enzymes agissant sur l'ADN et l'ARN.

3.4. Vitamines

3.4.1. Définition et classification

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

Vitamines hydrosolubles

- Thiamine (B1): anti-béribérique, vitamine du système nerveux.
- Riboflavine (B2): vitamine de l'énergie et des crampes musculaires.
- Niacine (B3 ou PP) ou nicotinamide.
- Acide pantothénique (B5) Biotine (B8): vitamines de la peau et des cheveux.
- Pyridoxine (B6): régularise le métabolisme des acides aminés et des protéines.
- Acide folique (B9): anti-anémique.
- Cobalamin (B12): Elle est très importante chez les animaux, qui l'utilisent comme cofacteur dans la synthèse de l'ADN et dans le métabolisme des acides gras et des acides aminés. Elle est important dans le fonctionnement normal du système nerveux via son rôle dans la synthèse de la myéline, et dans le système circulatoire dans la maturation des globules rouges dans la moelle osseuse.
- Acide ascorbique (C): sert à la défense de l'organisme.

Les vitamines liposolubles

- Rétinol (A): vitamine de la croissance et de la vue.
- Calciférol (D): vitamine du squelette.
- Tocophérol (E): vitamine de la fécondité.
- Phylloquinone (K): vitamine anti-hémorragique.

Presque tous les micro-organismes sont capables d'effectuer la synthèse des vitamines hydrosolubles ou liposolubles (**Tableau 3**). 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, B6 et 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*.

Tableau 3 : Exemples de vitamines produites par des microorganismes

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

3.4.2. Vitamine B12

Le milieu de culture utilisé pour la production industrielle de la vitamine B12 est composé essentiellement:

- D'une source de carbone (Glucose ou mélasses de betterave ou de citrus).
- D'une source d'azote (farines de poisson, écorce de maïs, caséine...).
- D'un tampon (CaCO_3).
- D'une source de cobalt (CoCl_2).
- D'un précurseur: 5', 6-diméthylbenzimidazol.

Utilisations de la vitamine B12

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

4. Métabolites secondaires

4.1. Antibiotiques

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on parle d'antibiotique bactéricide et dans le second cas d'antibiotique bactériostatique.

Un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, fabriquées par des micro-organismes: des champignons ou d'autres bactéries. Ces dernières les produisent pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles ils sont en compétition dans leur biotope.

4.1.1. Classification des antibiotiques

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

- Les Béta lactamines, (dérivés de deux acides aminés) Ex: Pénicilline, Céphalosporines
- Les Aminosides (oligosaccharides aminés), : Ex: Streptomycine, Gentamycine...
- Les Macrolides, Ex: Erythromycine, Spiramycine....
- Les Polypeptides: Ex: Bacitracine, Polymyxine....
- Les dérivés d'un seul acide aminé, : Ex: Chloramphénicol, Cyclosépine....
- Les Composés comportant des cycles, : Ex: Tétracyclines, Actinomycines, Novobiocine...
- Autres: analogues de structure voisins de nucléosides ex: Puromycine); structures comportant des systèmes polyéniques conjugués (ex: Nystatine); ainsi que la riframycine, la vancomycine et les sulfamides

4.1.2. Activité et mécanisme d'action

Chacune de ces substances agit électivement sur un groupe déterminé de germes (spectre d'activité), cette activité pouvant d'ailleurs diminuer, pour un germe donné, par suite d'une sorte d'accoutumance de celui-ci (résistance).

Il est possible de titrer l'activité des antibiotiques sur un germe pathogène par diverses méthodes, ce qui permet de conduire le traitement d'une maladie infectieuse (antibiogramme).

L'activité bactérienne s'exerce à l'échelle 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 multiple cibles à la fois.

- Les antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne; par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (porines), ou par perturbation de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Ex: béta lactamines, vancomycine, bacitracine et cyclosépine.

- 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'elongation de la chaîne. Ex: tétracyclines, chloramphénicol, aminosides, macrolides.

4.1.3. 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 un antibiotique à produit par synthèse totale d'une façon rentable.

L'hémisynthèse permet d'obtenir sans cesse de nouveaux produits pour remplacer

- Les antibiotiques devenus inactifs du fait des résistances opposées par certains microorganismes (suite à l'usage intensif 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 orale).

La penicilline G 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, et présente l'avantage de ne pas produire de pigment jaune indésirable (chrysogénine) qui complique les opérations d'extraction. Ces souches sont

conservées pendant des années sous forme de suspension de spores lyophilisées ou de culture sur sol séché. ...

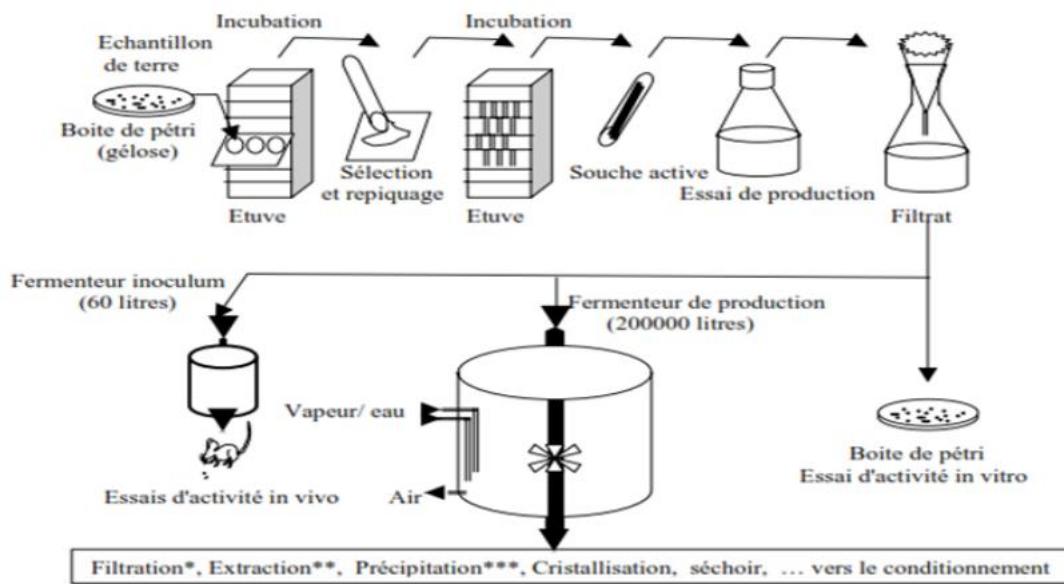
Les milieux de culture industriels (pH après stérilisation = 6) contiennent:

- Une source d'azote: écorces de maïs (3.5 %).
- Sources de carbone et d'énergie : 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 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.

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

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



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

Figure 4 : Préparation industrielle d'un antibiotique d'origine fongique

4.1.4. Utilisations

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

- En biologie moléculaire, les antibiotiques représentant un outil de choix pour les recherches de biochimie pure (mode de formation des parois, duplication de l'ADN, transcription, biosynthèse des protéines...).

En nutrition animale: utilisés comme additifs, les antibiotiques favorisent la croissance et l'augmentation du poids chez les jeunes animaux et ont un effet prophylactique contre diverses maladies infectieuses. (ex: pénicilline dans l'alimentation du poulet, la tétracycline dans l'alimentation du veau).

- En nutrition humaine, et plus exactement pour la conservation des denrées alimentaires (essentiellement aux Etats-Unis et au Japon). Ex: la tétracycline 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).

4.2. 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.

Chapitre IV. Enzymologie appliquée

1. Enzymes immobilisées

1. 1. Définition

Le terme « enzymes immobilisées » est défini comme « Enzymes qui sont physiquement attachées à des supports solides spécifiques et inertes, et qui peuvent être utilisés de manière répétée et continue tout en maintenant leurs activités catalytiques ».

L'utilisation d'enzymes immobilisées en biotechnologie présente certains avantages tels que : 1) un seul lot d'enzymes peut être utilisé de manière multiple ou répétitive. 2) les enzymes immobilisées sont généralement plus stables que les enzymes mobiles. 3) la réaction pourrait être contrôlée rapidement en éliminant l'enzyme de la solution réactionnelle.

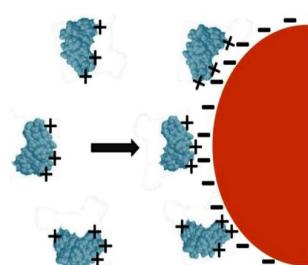
Un avantage supplémentaire est la séparation facile de l'enzyme du produit, ce qui permet d'éviter toute contamination. De plus, l'utilisation d'enzymes immobilisées permet le développement d'un système réactionnel multi-enzymatique.

1.2. Techniques de l'immobilisation des enzymes

1. 2.1. Adsorption

L'immobilisation enzymatique sur une surface solide par adsorption est l'une des méthodes les plus simples d'immobilisation.

Les mécanismes d'adsorption sont basés sur des liaisons faibles telles que les forces de Van der Waal, les interactions électrostatiques et hydrophobes.



L'enzyme est dissoute dans la solution et le support solide est mis en contact avec la solution enzymatique pendant une période de temps déterminée dans des conditions appropriées qui maintiennent l'activité enzymatique.

Le support peut être collagène, cellulose, albumine, argile, verre, silice,...etc.

L'immobilisation par adsorption est un procédé simple et économique, sans réactif, peu coûteux et généralement non destructif vis-à-vis de l'activité enzymatique. La fixation de l'enzyme est rapide et non dénaturante.

Néanmoins, cette technique présente des inconvénients : les enzymes sont faiblement liées au support par une faible liaison physique, de sorte que les changements de température, de pH ou de force ionique peuvent entraîner une désorption enzymatique.

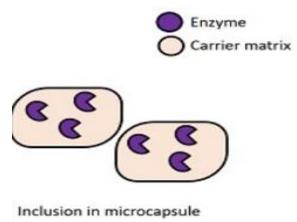
1.2.2. Inclusion ou piégeage

Le piégeage est une méthode d'immobilisation dans laquelle les enzymes sont incluses dans des réseaux polymériques à faible coût. Diverses matrices peuvent être utilisées pour le piégeage, comme l'alginate de calcium, collagène, triacétate de cellulose, polyacrylamide, gélantine, Agar, caoutchouc de silicone, alcool polyvinyle et polyuréthane.

Dans cette méthode, les enzymes sont immobilisées par piégeage gel/fibre ou micro-encapsulation. Les enzymes sont retenues dans les réseaux du gel tandis que les substrats et les produits sont autorisés à traverser, ce qui réduit la fuite des enzymes, améliore la stabilité et permet la génération de réactions enzymatiques. Comme il n'y a pas de liaisons covalentes entre les enzymes et les matrices de support, les conformations enzymatiques sont maintenues, assurant les activités catalytiques élevées.

Piégeage (Encapsulation)

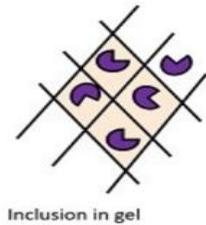
Dans l'immobilisation par encapsulation, l'enzyme n'est pas directement attachée à la surface d'appui mais piégée dans une microcapsule dont la membrane ne permet que la traversée du substrat et des produits mais retient l'enzyme, ce qui limite la diffusion de l'enzyme.



Le processus d’immobilisation par piégeage se déroule en deux étapes : (1) mélange de l’enzyme dans une solution de monomère, suivi de (2) polymérisation de solution de monomère par une réaction chimique ou par des conditions expérimentales changeantes.

Inclusion

L’enzyme est retenue par un réseau de polymère insoluble, les mailles de la matrice assurent physiquement la rétention de l’enzyme mais laisse diffuser le substrat et le produit.



Avantages

- Réactions de polymérisation bien connues
- Obtention de supports adaptables: films, fibres, billes..
- Peut se faire sur n’importe quelle enzyme
- Pas d’interaction avec les groupements fonctionnels de l’enzyme.

Inconvénients

- Problèmes d’encombrement stérique
- Conditions de polymérisation (pH , température) peuvent entraîner des dénaturations enzymatiques.
- De plus, les enzymes piégées sont susceptibles de souffrir de fuites si la taille des pores de la matrice de support est trop grande.

1.2.3. Liaison covalente

L’immobilisation enzymatique par liaison covalente est l’une des méthodes les plus utilisées, dans laquelle des complexes stables entre des groupes fonctionnels sur des molécules enzymatiques et une matrice de support sont formés par des liaisons covalentes.

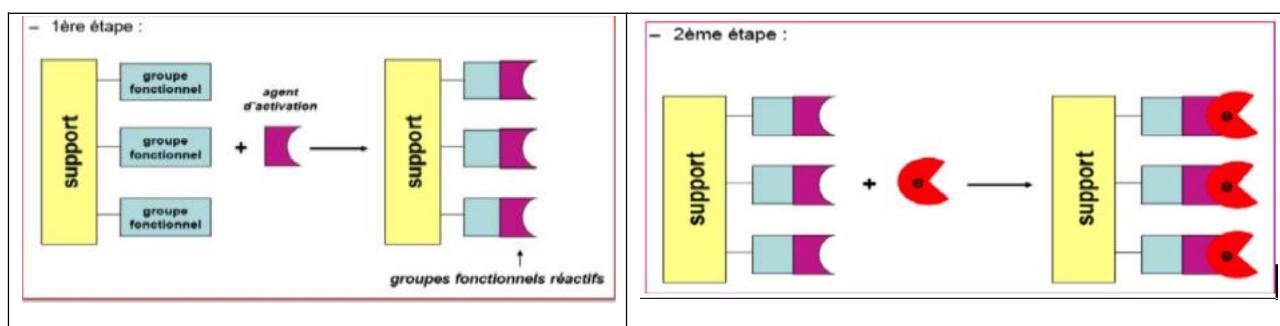
Le groupe fonctionnel présent sur l’enzyme, à travers lequel une liaison covalente avec support pourrait être établie, ne devrait pas être essentiel pour l’activité enzymatique qui

implique généralement la liaison via les chaînes latérales de la lysine (groupe ε-amino), de la cystéine (groupe thiol) et des acides aspartique et glutamique (carboxylic group).

La procédure de liaison de l'enzyme au support solide passe généralement par deux étapes :

1) Activation de la surface à l'aide de molécules de liaison telles que le glutaraldéhyde ou le carbodiimide et

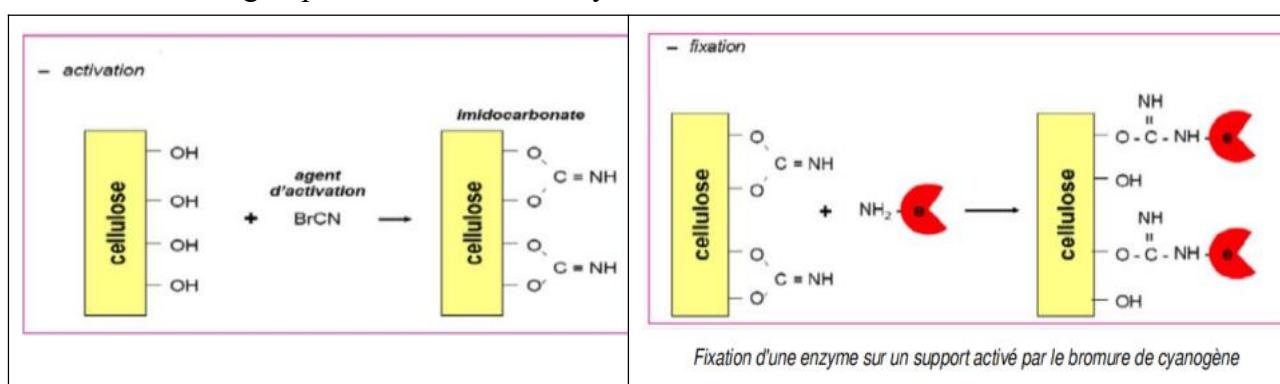
2) Couplage covalent enzymatique au support activé. Les molécules de liaison sont des réactifs multifonctionnels (glutaraldéhyde ou carbodiimide) qui agissent comme un pont entre la surface et l'enzyme via une liaison covalente.



Exemple:

- Agent d'activation BrCN (Bromure de Cyanogène)

- Fixation sur un groupement amine de l'enzyme.

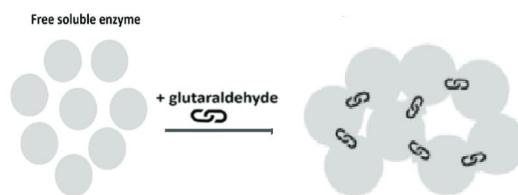


Différents linkers sont utilisés pour différentes surfaces (matériau inorganique, polymère naturel ou synthétique, membranes) et protocoles d'immobilisation (directement sur la surface du transducteur ou sur une fine membrane fixée sur le transducteur).

L'immobilisation covalente fournit de fortes liaisons entre les enzymes et la matrice de support et, par conséquent, peu de fuite d'enzyme du support peut se produire.

Fixation par réticulation

Procédé d'association des différentes unités d'enzymes à l'aide d'agents réticulant



Avantages

- Fortes stabilités
- Grand choix de méthodes et grande variétés de supports
- Possibilité de protection du site actif

Inconvénients

- L'étape d'activation allonge la durée de l'expérience.
- Quantité d'enzyme immobilisée limitée.
- Risques de modifications chimiques de l'enzyme (perte d'activité).

1.3. Intérêt de l'immobilisation des enzymes

- Augmenter leur stabilité et leur résistance aux conditions du milieu (pH et température)
- Obtenir des activités enzymatiques constantes
- Préservation de l'enzyme après lavage et reexploitation du support.

1.4. 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, dextrans, 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 boulangerie, 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.

1.5. Réacteur enzymatique

Un réacteur enzymatique est défini comme un dispositif dans lequel une réaction de conversion chimique est catalysée par une enzyme. Principe: Ils ont pour fonction la production, en continu, du ou des produits de conversion du substrat. Le principe de ces réacteurs repose sur le passage lent du substrat (vitesse déterminée par l'expérience) au travers d'une colonne d'enzyme immobilisée. Le choix du réacteur dépend du type de réaction, du support et de l'utilisation désirée.

1.5.1. Réacteur à lactose

Ce type de réacteur est utilisé pour fabriquer du lait sans lactose. L'hydrolyse de ce dernier en glucose et galactose est catalysée par la β -galactosidase.

Le lait est déposé en continu sur la colonne remplie de l'enzyme immobilisée, le lactose est alors hydrolysé en glucose et galactose. Ainsi, le lait se trouve débarrassé du lactose sans avoir perdu ses propriétés nutritives et en préservant l'ensemble de ses constituants.

2. Enzymes artificielles

2.1. Définition

Une enzyme artificielle est une molécule synthétique relativement petite créée pour imiter le site actif d'une enzyme naturelle. Elle est bâtie à partir d'une molécule hôte responsable de la liaison sélective avec le substrat, et à laquelle on ajoute des groupes fonctionnels pour obtenir une activité catalytique. Initialement, les molécules hôtes utilisées étaient essentiellement des cyclodextrine, des éther couronne ou des calixarène. Leur performances restent encore très en dessous des performances réalisées par les enzymes naturelles. Depuis, d'autres approches ont suivi telles que l'utilisation de peptides ou d'anticorps (abzymes).

2.2. Molécule hôte

Entité moléculaire dont la structure présente des cavités capables d'inclure des molécules avec lesquelles elle peut former des complexes. Ex. les calixarènes, les éther couronnes, les Abzymes (les anticorps catalytiques) et les Cyclodextrines.

Les cyclodextrines sont des molécules cycliques naturelles constituées de sous-unités glucopyranose liées en α -(1,4) (des oligosaccharides cycliques). Ces produits naturels provenant de la dégradation enzymatique de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*, ont été découverts en 1891 par Villiers. Les trois cyclodextrines naturelles les plus courantes se composent de 6, 7 ou 8 unités α -D-glucopyranose en configuration chaise reliées entre elles par des liaisons α -(1,4).

Industriellement, les CD sont produits par voie enzymatique avec la cyclodextrine glucosyltransférase à partir d'amidon modifié. Il s'agit d'un procédé économique, dont la production est estimée à 150 tonnes par an. Le produit obtenu est non toxique, car il n'est pas absorbé dans le tractus gastro-intestinal supérieur et est entièrement transformé par la microflore colique.

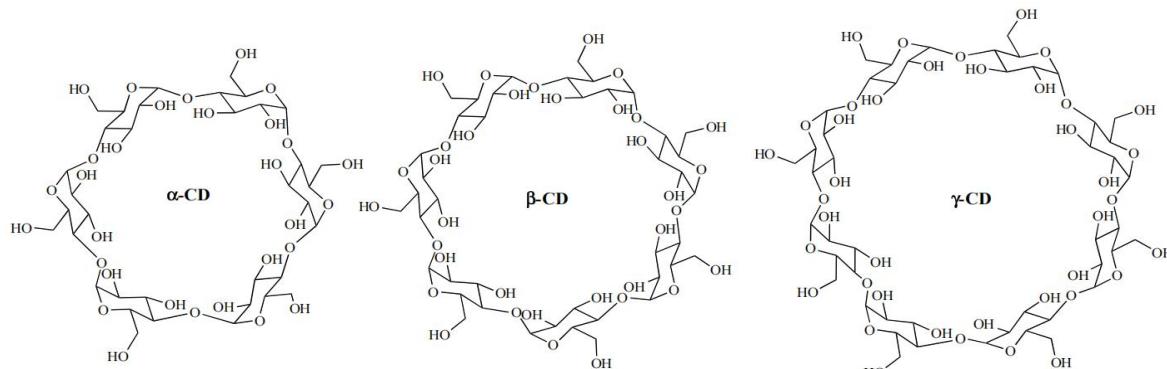


Figure 1 : Structures chimiques des cyclodextrines

De par sa forme, il s'agit d'un cône tronqué caractérisé par la présence de groupes OH primaires et secondaires, respectivement, sur les bords . Il se caractérise par la présence de cavités aux propriétés hydrophobes. Dans ce cas, comme dans d'autres complexes, les forces de Van der Waals et hydrophobes assurent la cohésion de l'hôte et de l'hôte, permettant ainsi un ajustement partiel ou total de la cavité.

L'établissement d'un complexe d'inclusion permet de varier la réactivité de l'hôte, ce qui rend son utilisation possible dans de nombreux domaines. De plus, comme ces récepteurs peuvent améliorer la biodisponibilité, ils conviennent aux systèmes de distribution fonctionnels. On les retrouve dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, textile, de transformation et de fermentation, ainsi que dans les systèmes et applications chimiques environnementaux et autres.

2.3. Cyclodextrines et leurs intérêt dans l'industrie agroalimentaire

Les CD offrent actuellement un large éventail d'applications dans l'industrie agroalimentaire. Les composés aromatiques peuvent être complexés par les CD afin de les protéger de l'oxydation, des réactions photo-induites, de la décomposition thermique, de la perte par volatilité ou sublimation, et d'atténuer l'impact des goûts et odeurs indésirables. Par conséquent, la durée de conservation du produit est prolongée.

Les CD sont également utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour solubiliser les colorants alimentaires, incorporer des ingrédients fonctionnels (tels que les acides gras polyinsaturés et les vitamines) et piéger ou éliminer les composants indésirables des produits. La réduction du cholestérol dans les aliments est probablement l'une des principales utilisations commerciales des CD dans l'industrie agroalimentaire.

2.3.1. Séquestration du cholestérol

La tendance croissante des consommateurs à rechercher des produits « sans » (sans sucre, sans gluten, etc.) a mis en évidence la capacité des CD à éliminer certains composés d'une matrice alimentaire donnée. Malgré l'existence d'une alternative au lait à faible teneur en cholestérol, les personnes souffrant d'hypertension ou d'athérosclérose souhaitent souvent un produit sans cholestérol. Parmi les nombreuses techniques développées par les entreprises agroalimentaires pour réduire le cholestérol dans les aliments, la méthode la plus efficace pour réduire la teneur en cholestérol des produits laitiers est actuellement l'action séquestrante des CD.

Une étude plus spécifique sur les effets de l'ajout des CD sur la qualité du jus de poire a montré que l'ajout de β -CD améliore significativement la qualité globale du jus en réduisant le

brunissement sans modification significative de l'arôme. L'utilisation de CD a également été étudiée pour ralentir le brunissement enzymatique du jus de pomme, du jus de banane fraîche et du jus de pêche.

2.3.2. Stabilité des produits et conservateurs alimentaires

La maîtrise du brunissement aux différentes étapes de la transformation des aliments est essentielle à la préservation des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des produits. La couleur est une propriété sensorielle qui influence fortement l'acceptabilité des aliments. Le degré de brunissement dépend de la présence d'oxygène, de substances réductrices, d'ions métalliques, du pH, de la température, de l'activité de plusieurs enzymes oxydantes (dont la polyphénol oxydase (PPO)) et de la lumière. Les CD sont apparus, au cours des dernières décennies, comme un moyen de contrôler le brunissement enzymatique de divers aliments causé par la PPO.

2.3.3. Conditionnement et emballage

La préparation de polymères contenant du CD a été étudiée dans le domaine alimentaire, dans le but d'y inclure des composés antimicrobiens et antioxydants complexés.

L'industrie agroalimentaire recherche constamment des solutions pour améliorer la sécurité et la durabilité des produits alimentaires, tout en préservant leur qualité et en minimisant leur impact environnemental. L'un des résultats de cette recherche est le développement d'emballages actifs et intelligents, dans lesquels des composés sont ajoutés aux emballages afin de prolonger la durée de conservation des aliments ou de fournir des informations sur leur état en temps réel. Les applications des CD dans les emballages actifs sont nombreuses.

De plus, comme les CD sont des oligosaccharides à base d'amidon et donc biodégradables, si le matériau utilisé est également facile à dégrader (par exemple, le chitosane, la cellulose ou l'acide polylactique), l'ensemble de l'emballage pourrait être considéré comme biodégradable.

Liste bibliographique

Badis, D. (2012). Valorisation d'un rejet industriel: cas de la transformation du lactosérum en produits d'un intérêt alimentaire et textuel. Mémoire de Magister. Université Saad Dahlab de Blida.

Benaissa, M. (2018). Valorisation du lactosérum par les bactéries lactiques. Thèse de Doctorat en Sciences. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Faculté des Sciences de la nature et de la vie.

Breneton, J. (1999). Pharmacognosie Phytochimie Plantes medicinales. Lavoisier Tec et Doc. 1120 pages.

Florence Déclaire Mabou1 *, Irma Belinda Nzeuwa Yossa2. (2021) TERPENES : structural classification and biological activities . *Journal Of Pharmacy And Biological Sciences*. Volume 16, Issue 3 , PP 25-40

Durant, G., et Monsan, P. (1974). Les enzymes immobilisées. Collection : Actualités scientifiques et techniques en industrie agro-alimentaires. Centre de documentation internationale des industries utilisatrices de produits agricoles. 339 pages

Gonzalez Pereira, A.; Carpena, M.; García Oliveira, P.; Mejuto, J.C.; Prieto, M.A.; Simal Gandara, J. Main Applications of Cyclodextrins in the Food Industry as the Compounds of Choice to Form Host–Guest Complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1339. <https://doi.org/10.3390/ijms22031339>

Hanefeld, U., Caob, L. and Magner, E. (2013). Enzyme immobilisation: fundamentals and application. *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6211

Marina Marranzano1,* , Rosa L. Rosa 2 , Mariano Malaguarnera3 , Rosa Palmeri 2 , Matilde Tessitori 2 and Antonio C. Barbera. (2018). Polyphenols: Plant Sources and Food Industry Applications. *Current Pharmaceutical Design*, **24**, 4125-4130

Martinaa, K., Binelloa, A., Lawsona, D., Jicsinszkyb, L., Cravotto, G. (2013). Recent Applications of Cyclodextrins as Food Additives and in Food Processing . *Current Nutrition & Food Science*, Vol. 9, No. 2: 1-14.

Masters, J. R. W. (2000). Animal cell culture. 3rd edition Oxford university press. 315 pages.

Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., García-Carmona, F. and Lopez-Nicolás, J.-M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science & Technology* 104: 132–143.

Motta, J. F. G., FREITAS, B. C. B., ALMEIDA, A. F., MARTINS, G. A. S., BORGES, S. V. Use of enzymes in the food industry: a review. Food Science and Technology. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.106222>

Naga Jyothi. B., G. Sravani and Sruthi. K. (2019). A Short Review on Artificial Enzymes. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. (2019) 9 (2): 206-212. <https://doi.org/10.21276/ijpbs.2019.9.2.28>.

Ozatay, S. (2020). Recent Applications of Enzymes in Food Industry. *Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology*, 6 (1), 17-30.

Power, O., Jakeman, P. and Fitz Gerald, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids* (2013) 44:797–820 DOI 10.1007/s00726-012-1393-9

Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. 398 pages.

Sine, J-P. (2010). Enzymologie et application. Ellipses Edition Marketiong S. A. 247-441.

Singla RK. (2012). Artificial Enzymes. <http://www.webmedcentral.com>

Tian X. (2016). Food processing by-products as natural sources of antioxidants: a mini review. *Adv Food Technol Nutr Sci Open J.SE*(2): S7-S17. doi: 10.17140/AFTNSOJ-SE-2-102