

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité/Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire.

Mémoire de Master

Thème :

**Extraction du lysozyme du blanc d'œuf de poule et mise en évidence de son
activité antibactérienne sur : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli***

Présenté par :

- Lare N'pagyendou Eric
- Sabi-Ali Akomola

Membres du jury :

Présidente : Mme Torche Asma

MCB à l'université de Guelma

Examinatrice : Mlle Boumaaza Aouatef

MAA à l'université de Guelma

Encadreur : Mr Mokhtari Abdelhamid

MCB à l'université de Guelma

Juin 2015

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions Dieu pour nous avoir accordé la santé, la force et les connaissances nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous adressons aussi notre vif remerciement à tous les membres du jury :

La présidente Mme Torch Asma, maitre de conférence à l'université de Guelma pour avoir accepté présider cette soutenance; à l'examinatrice Mme Boumaaza Aouatef, qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.

Nous exprimons également notre remerciement à Mr MOKHTARI Abdelhamid pour avoir accepté de nous encadrer ; mais aussi pour son soutien et sa disponibilité. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous adressons aussi nos remerciements à Mme Hayette Ayed pour son soutien et son aide précieux dans la réalisation de ce travail

Nos remerciements s'adressent ensuite à tout le corps administratif de l'université 08 Mai 1945 de Guelma ; pour leur disponibilité mais surtout pour leurs connaissances intellectuelles dont ils n'ont cessé de nous gaver durant tout notre parcours.

Nous exprimons nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance aux techniciennes de laboratoire pour leur aide et leur disponibilité.

Nos sentiments de reconnaissances vont également à l'encontre de toute personne qui, de près ou de loin, directement ou indirectement a participé à la réalisation de ce travail.

DÉDICACE

JE DÉDIE CE TRAVAIL À

A MON CHER ONCLE, POUR SON SOUTIEN ET SON ENCOURAGEMENT, SANS
LUI, CE TRAVAIL N'AUerait PAS VU LE JOUR. QUE DIEU TE BÉNISSE ET
À SES FEMMES POUR LEUR CONSEIL

A MON CHER PÈRE (PAIX À SON ÂME) POUR SON AMOUR IMMENSE, SES
SACRIFICES ET SURTOUT SES PRIÈRES POUR MOI

A MA CHÈRE MÈRE, POUR SON AMOUR ET SON ENCOURAGEMENT

A TOUS CEUX QUI M'ONT SOUTENU NOTAMMENT MES FRÈRES, MES SŒURS,
MES AMIS, MES COUSINS ET COUSINES POUR LEUR ATTACHEMENT

" SEUL LE TRAVAIL LIBÈRE "

SABI ALI AKOMOLA

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 01	Représentation d'une cellule bactérienne	1
Figure 02	Paroi d'une bactérie Gram+	2
Figure 03	Paroi d'une bactérie Gram-	2
Figure 04	Représentation schématique des principaux peptidoglycanes	4
Figure 05	Portion de chaîne de glycane	4
Figure 06	Comparaison entre Bactérie Gram+ et Gram-	5
Figure 07	Représentation schématique des Acides aminés(en rouge) constituant le site actif du lysozyme	9
Figure 08	Action du lysozyme sur le peptidoglycane	10
Figure 09	Représentation du peptidoglycane indiquant les liaisons chimiques clivées par les hydrolases	11
Figure 10	Structure primaire du lysozyme du blanc d'œuf de poule	14
Figure 11	Structure primaire du lysozyme(les acides aminés colorés en rouge et en bleu correspondent respectivement aux acides aminés acides et basique ;les pointillés les ponts disulfures)	14
Figure 12	Structure tertiaire du lysozyme du blanc d'œuf de poule	15
Figure 13	Schémas Représentatif de la Méthode des puits	26
Figure 14	Présentation du gel d'électrophorèse	33
Figure 15	Diamètre d'inhibition du lysozyme sur <i>S.aureus</i> (a) ; du comprimé sur <i>S.aureus</i> (b) ; du lysozyme sur <i>E. coli</i> (c); du comprimé sur <i>E. coli</i> (d)	34
Figure 16	Effet de la concentration sur la lyse de <i>S.aureus</i>	36
Figure 17	Effet du temps sur la lyse de <i>S.aureus</i>	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 01	Présentation des différentes origines du lysozyme et leurs quantités	7
Tableau 02	Pourcentage d'Acides Aminés dans la Structure Secondaire du LYS	15
Tableau 03	Les Protéines du Blanc d'œuf de Poule	16
Tableau 04	Préparation des Dilutions de Solution Mère (Volume Totale = 2ml)	19
Tableau 05	Préparation des échantillons à doser (Volume Totale=3,1ml)	19
Tableau 06	Préparation des échantillons du Surnageant à 20% d'Ethanol	20
Tableau 07	Préparation des échantillons du Surnageant à 40% d'Ethanol	20
Tableau 08	Préparation des échantillons (culot et surnageant 20et 40%) pour la mesure de l'absorbance	21
Tableau 09	Préparation des échantillons avec le Lysozyme à 40% pour la mise en évidence de l'effet de la concentration	28
Tableau 10	Préparation des échantillons avec le comprimé pour la mise en évidence de l'effet de la concentration	28
Tableau 11	Préparation des échantillons avec le lysozyme à 40% pour la mise en évidence de l'effet du temps	29
Tableau 12	Préparation des échantillons avec le comprimé pour la mise en évidence de l'effet du temps	29
Tableau 13	Présentation des résultats de la Centrifugation	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 14	Absorbance et concentration protéique des Echantillons à 20%	31
Tableau 15	Absorbance et concentration protéique des Echantillon à 40%	31
Tableau 16	Absorbance des échantillons (culot et surnageant 20 et 40%)	32
Tableau 17	Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme	35
Tableau 18	Absorbance des échantillons (Lysozyme à 40%) pour la mise en évidence de l'effet de la concentration	35
Tableau 19	Absorbance des échantillons (comprimé) pour la mise en évidence de l'effet de la concentration	36
Tableau 20	Absorbance des échantillons (lysozyme 40%) pour la mise en évidence de l'effet du temps	37
Tableau 21	Absorbance des échantillons (comprimé) pour la mise en évidence de l'effet du temps	37

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
C-1	Carbone Numéro 1
C-4	Carbone Numéro 2
°C	Degré Celsius
DAP :	l'Acide méso-diaminopimélique
DO	Densité optique
EDTA	acide éthylène-diamine-tétra acétique
Fig.	Figure
Kda	Kilo Dalton
LPS	Lipoprotéopolysaccharidique
LT	Transglycosilase lytique
LYS	Lysozyme
mg/l	Milligramme par Litre
NAM	N-Acétilmuramique
NAG	N-Acétylglucosamine
nm	Nanomètre

N	Normalité
UI	Unité international
PG	peptidoglycane
PH	Potentiel Hydrogène
PI	Point Isoélectrique
SDS	Sulfate dodecyl sodium
Tab	Tableau
V/V	Volume pour volume

Introduction

Depuis l'antiquité jusqu'à nos jours, le premier souci de l'homme a toujours été de survivre dans cet environnement hostile qu'est le nôtre. C'est dans ce souci qu'il s'est vu obligé de créer, d'innover et d'approfondir sans cesse ses connaissances dans tous les domaines de la vie, en vue non seulement de manger à sa faim mais aussi de pouvoir se soigner et de se protéger des maladies; qu'elles soient virales, microbiennes ou bactériennes.

Les bactéries pour leur part sont non seulement à l'origine de plusieurs pathologies, mais constituent également un obstacle majeur pour l'industrie agroalimentaire notamment en ce qui concerne la conservation des denrées alimentaires. Actuellement, les scientifiques traquent des composés qui présentent des activités biologiques variées (antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses ou même anti-hypertensives) et ouvrent des perspectives prometteuses en santé humaine et animale.

C'est dans ce sens que le lysozyme du blanc d'œuf découvert par Alexandre Fleming en 1922 s'est révélé efficace puisqu'il a la capacité de tuer les bactéries en détruisant leur paroi (Proctor et *al.*, 1988). Aujourd'hui l'essor des biotechnologies est à l'origine d'une véritable révolution concernant l'identification des protéines notamment celle de l'œuf; ce qui fait du lysozyme l'une des protéines les plus valorisées au monde.

Dans le souci d'élucider les propriétés de cette protéine dite « antibiotique naturelle » que nous avons entrepris cette étude qui comporte, d'une part une recherche bibliographique dans le but de mieux connaître le lysozyme et de rassembler les domaines d'application de cette protéine et d'autre part un travail pratique dont l'objectif est d'extraire le lysozyme présent dans le blanc d'œuf grâce à une technique de précipitation à l'éthanol; de déterminer sa pureté, grâce à une électrophorèse et enfin de tester son activité bactériolytique ou bactériostatique sur des souches bactériennes.

Pour cela nous avons structuré ce travail en quatre chapitres interdépendants:

-le premier chapitre est destiné à présenter la bactérie ainsi que sa paroi qui constitue le substrat du lysozyme.

-le deuxième chapitre est consacré aux généralités sur le lysozyme, ses propriétés physico-chimiques ainsi que ses modes d'actions sur la paroi bactérienne.

-le troisième chapitre est consacré aux méthodes et techniques utilisées pour l'extraction et la purification du lysozyme.

-le quatrième chapitre concerne les résultats obtenus et les discussions.

1-Définition et présentation de la cellule bactérienne

Une bactérie est un organisme unicellulaire procaryote, c'est-à-dire une cellule dépourvue de noyau contrairement aux organismes eucaryotes qui ont un noyau [1]. La cellule bactérienne est entourée par une enveloppe rigide (la paroi) qui lui garde sa forme, lui confère sa résistance et entoure une autre enveloppe plus mince, la membrane. Elle est également constituée de plusieurs organites (des ribosomes, des substances de réserve, des pigments, des vacuoles à gaz etc...) Tous noyés dans le cytoplasme. La cellule bactérienne est haploïde car, son appareil nucléaire est formé d'un chromosome unique [2]. À côté de ces éléments constants, la cellule bactérienne peut posséder une capsule, des flagelles, un pili ou fimbriae (**Fig.01**).

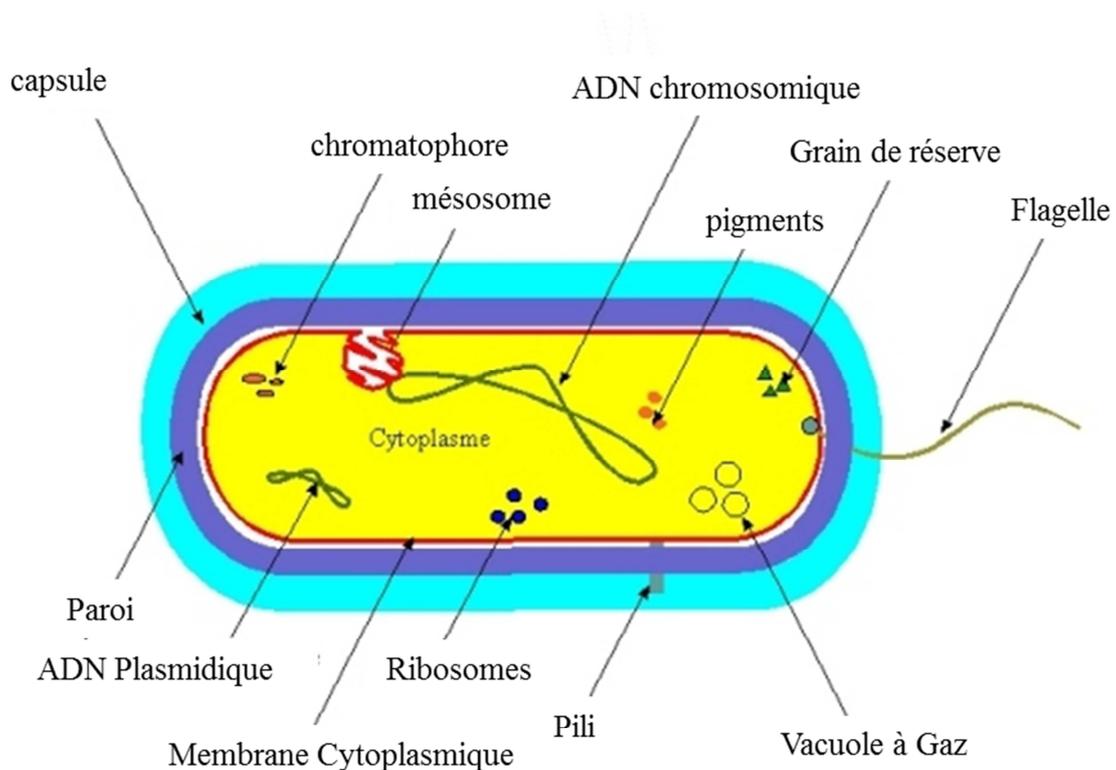


Figure 01 : Présentation d'une cellule bactérienne [1]

2-La paroi bactérienne

La paroi est l'enveloppe caractéristique de la cellule procaryote. Elle est un véritable exosquelette qui lui confère sa forme et lui permet de résister à la forte pression osmotique interne comprise entre 5 et 20 atmosphères. La paroi est notamment formée d'un polymère ; le peptidoglycane encore appelé mucopeptide, muréine ou encore muco complexe. Certaines couches de la paroi sont le site de nombreux déterminants antigéniques majeurs.

Chez les bactéries à gram+, les parois épaisses et denses sont principalement constituées de peptidoglycane, ou de mureine. Ces parois présentent une structure lamellaire, faite de chaînes glucidiques reliées entre elles par des peptides (**Fig.02**).

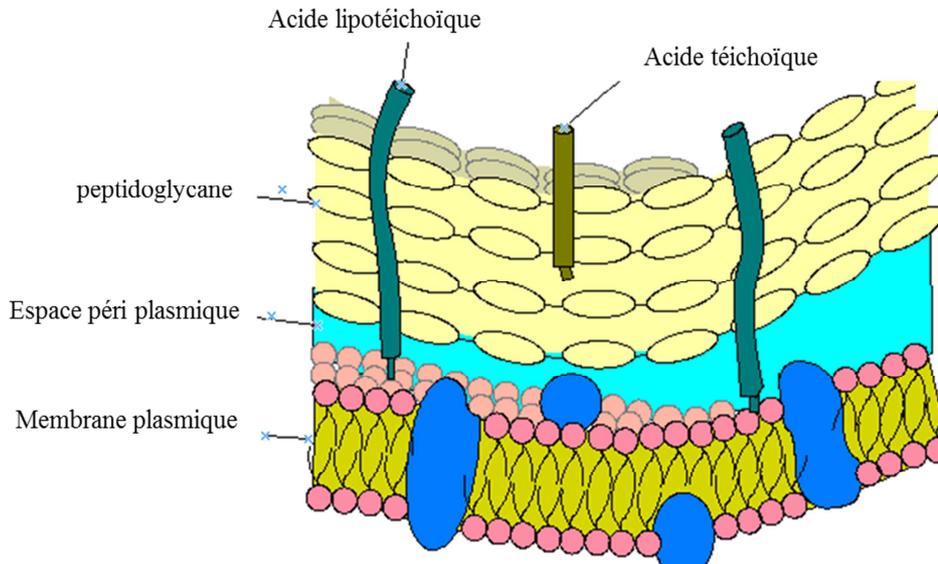


Figure 02 : Paroi d'une bactérie gram positif [3]

Chez les bactéries à gram-, les parois fines sont constituées d'une couche de mucopéptide (plus lâche qu'une paroi épaisse) (**Fig.03**). Mais les parois fines doivent être recouvertes d'une membrane externe. La paroi est séparée de la membrane par l'espace péri plasmique [4].

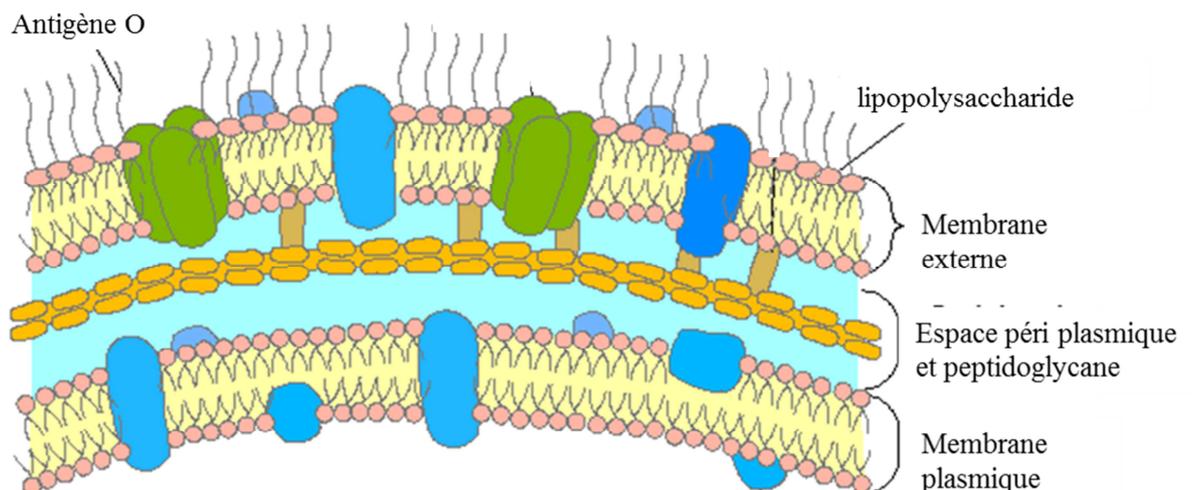


Figure 03 : Paroi d'une bactérie gram négatif [3]

La distinction entre bactéries gram positif et bactéries gram négatif repose sur une différence de composition pariétale.

La paroi des bactéries gram positif est riche en acide teichoïque, absent chez les bactéries gram négatif et en acide diaminopimélique, moins abondant chez les gram négatif lesquelles ont une paroi plus riche en lipides.

Les différents constituants de la paroi sont à l'origine de nombreuses propriétés antigéniques qui permettent la distinction sérologique d'espèces bactériennes proches aussi bien chez des gram positif (*Streptococcie*) que des gram négatif (*Salmonella*, *Proteus*, etc.). La paroi bactérienne est plus ou moins perméable à certains solvants. Cette propriété est mise à profit par le microbiologiste Danois Hans Christian Gram, en 1884 dans la coloration de gram. Le cytoplasme des bactéries est coloré par le violet de gentiane. La paroi des bactéries gram négatif, perméable à l'alcool, permet à celui-ci de décolorer le cytoplasme, alors que la paroi des bactéries gram positif, imperméable à l'alcool, ont un cytoplasme qui reste de couleur violette.

La synthèse de la paroi bactérienne peut être inhibée par certains antibiotiques (Bacitracine, Pénicillines). Certaines bactéries ne possèdent pas de parois, c'est le cas des mycoplasmes (*Mycoplasma pneumoniae*), bactéries normalement présentes dans la flore des muqueuses chez l'homme [2].

3-Composition chimique de la paroi bactérienne

C'est dans les années 1950 que les parois bactériennes ont été isolées pour la première fois à partir de bactéries brisées mécaniquement. Les parois ont généralement une couche basale (basal layer), responsable de la rigidité, de la souplesse et de l'élasticité, et une couche spécifique (spécifique layer) qui est spécifique des souches ou des espèces (Strozyk, 1977).

3-1:La couche basale

La composition chimique de la couche basale est commune à la plupart des bactéries. Elle est essentiellement composée de quelque acides aminés et d'acétylhexosamines, formant un polymère appelé peptidoglycane (glycopeptide, mucopeptide, glycosaminopeptide ou muréine étant synonymes de peptidoglycane) renfermant de l'acide N-acétylmuramique, du N-acétylglycosamine, de la L-Lysine ou de l'acide méso-diaminopimélique(DAP), de l'acide D-. L'on peut, dans quelque cas, trouver du glycolle, de la L-sérine, L-thréonine et de l'acide D-aspartique.

Le peptidoglycane pariétale résulte de la polymérisation de disaccharides formant des chaines de glycanes et reliées entre elles par l'intermédiaire de chaines peptidiques conférant à la bactérie une certaine rigidité.

En effet le peptidoglycane enveloppe toute la bactérie et cette enveloppe peut être vidée de son contenu cellulaire. Lavée et analysée au microscope électronique, on voit qu'elle conserve la forme de la bactérie. C'est donc à cette enveloppe que la bactérie doit sa forme spécifique. En dépit de nombreuses variation, on constate une remarquable unité de structure des peptidoglycanes pariétaux dans le monde bactérien (Fig.04).

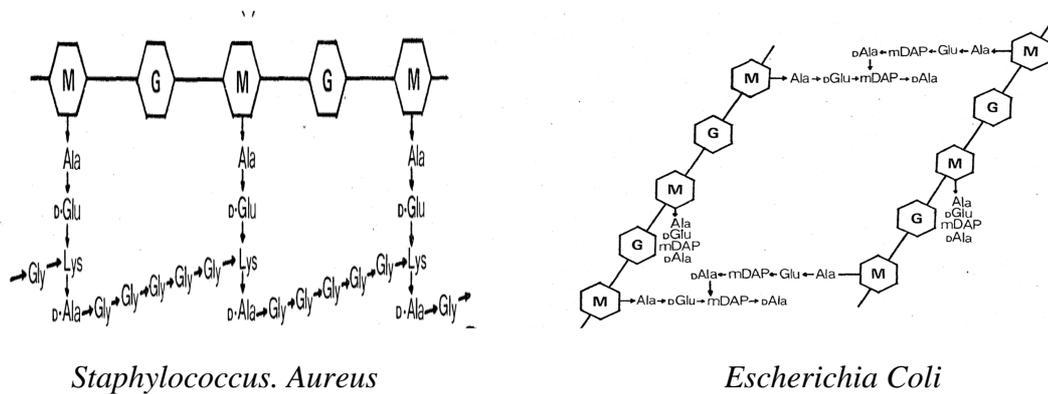


Figure 04 : Représentation schématique des principaux peptidoglycanes (Strozyk, 1977)

La partie glycane du peptidoglycane consiste en une chaîne linéaire de résidu N-acétylglycosamine et d'acide N-acétylmiramique, reliés entre eux par des liaisons β-1,4 (Fig.05), le groupement carboxyle des résidus d'acide N-acétylmiramique servant de point d'attache aux chaines peptidiques. C'est cette structure qui constitue le substrat du lysozyme, et dont la destruction spécifique entraîne la lyse de la bactérie (Strozyk ,1977).

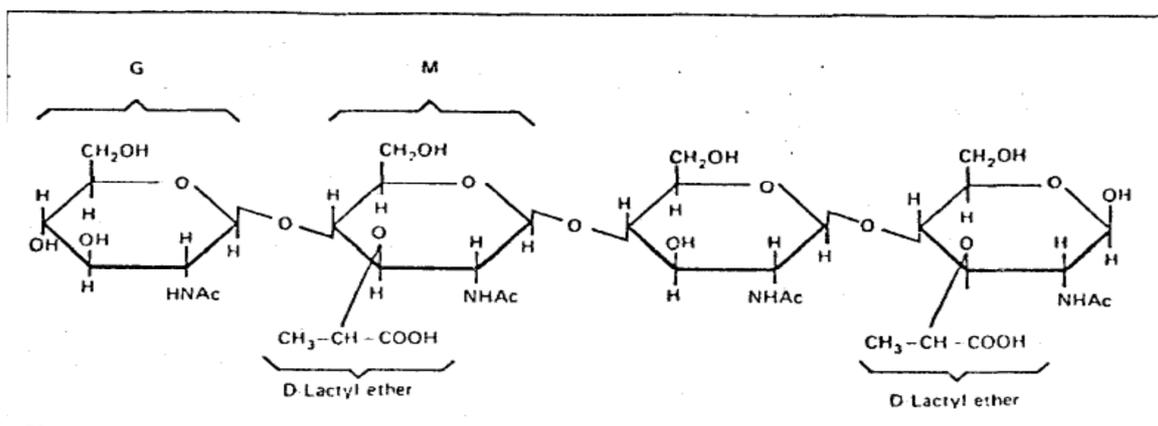


Figure 05 : Présentation d'une portion de chaîne de glycane (Strozyk, 1977).

3-2 : la couche spécifique

Cette couche est caractéristique de la souche ou de l'espèce considérée et possède une composition variée (**Fig.06**) :

- Chez les bactéries à gram+ où la paroi est épaisse, elle renferme des acides téichoïques du type ribitol ou glycérol, de l'acide teichuronique et des polysaccharides.
- Chez les bactéries à gram-, la paroi présente une structure différente et renferme essentiellement un complexe lipoprotéopolysaccharidique (LPS) et des polymères de l'acide muramique [4].

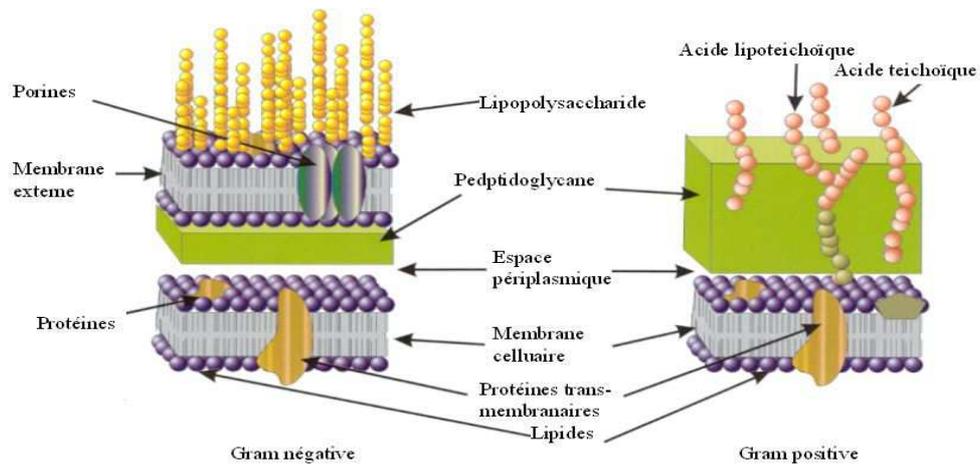


Figure 06 : Comparaison entre bactérie gram positif et gram négatif [3]

1-Historique de la découverte du lysozyme

Les livres de bactériologie de la fin du 19ème siècle décrivent la culture de bactéries à l'intérieur d'œufs de poules. Laschtschenko, un professeur d'hygiène de l'université de Tomsk (Russie), se questionna sur la faisabilité de l'utilisation des œufs pour la culture de microorganismes et découvrit ainsi, le pouvoir bactéricide du blanc d'œuf de poule dès 1909 et en a conclu que celui-ci contenait des enzymes à caractère bactériolytique (Laschtschenko, 1909).

En effet, depuis 1900 de nombreux scientifiques ont décrit l'action antibactérienne de la salive et des sécrétions corporelles (Bloomfield, 1919). Sir Alexander Fleming fit une découverte similaire en 1921. Tandis qu'il souffrait d'un rhume, une goutte coulant de son nez, tomba sur la surface d'un milieu gélosé contenant une culture bactérienne. Autour de cette goutte, les bactéries ont commencé à disparaître et Fleming a été le premier à conclure que les sécrétions nasales Contenaient une substance lytique. Fleming a appelé cette substance "lysozyme".

Dans son premier article sur le lysozyme, Fleming décrit que l'enzyme est présente dans les sécrétions du corps humain telles que les larmes, les sécrétions nasales et la salive, dans les tissus du corps et spécialement dans le cartilage. Le lysozyme est, de plus, retrouvé chez les animaux, les tissus végétaux et dans de grandes proportions dans le blanc d'œuf (Fleming, 1922).

Les lysozymes de différentes origines montre des activités bactéricides différentes en fonction des microorganismes, Fleming en a conclu qu'il existait différents types de lysozymes (Fleming, 1932).

2-Origine et présentation du lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire découvert par Fleming A. En 1922. Il est constitué de 129 résidus d'acides aminés hautement structuré, de poids moléculaire de 14,3kda et qui présente une activité enzymatique optimum à PH égale à 6,2 [6]. Elle se compose d'un cœur hydrophobe et d'une couronne hydrophile. L'activité enzymatique du lysozyme dépend évidemment, des facteurs environnementaux tels que le ph, la température et la pression osmotique. Ces dépendances sont différentes pour chaque type de lysozyme.

Cette enzyme est très stable dans une large gamme de température. Le lysozyme en poudre peut être conservé pendant de longues périodes (plus de 6 mois) à des températures supérieures à 30 °C sans perdre de son activité (Proctor et al, 1988).

Tous les lysozymes catalysent avec une efficacité variable l'hydrolyse des polymères de sucre substitués qui forme la paroi de certaines bactéries. Dès que cette paroi est digérée, la bactérie éclate sous la pression du cytoplasme : les lysozymes ont donc une action bactériolytique. La plupart d'entre eux catalysent également l'hydrolyse de la chitine (Strozyk, 1977). Il existe plusieurs types de lysozyme dont les caractéristiques diffèrent selon leur origine. Le tableau suivant indique les différentes sources de lysozyme et leurs quantités (voir **Tableau.01**).

Tableau 01 : Présentation des différentes Origines du lysozyme et leur quantité (Dacosta, 1993).

Source du lysozyme	Quantité de lysozyme (mg/l)
Œuf de poule (blanc)	3000-5000
Salive humaine	150-200
Lait maternel	15-500
Lait de vache	0.13-0.3
Jus de chou-fleur	28
Larmes humaine	7000

3- Classification du lysozyme

Le lysozyme est très répandu dans la nature. Cette observation a été le point de départ de différentes études sur l'évolution du lysozyme et de la caractérisation de différentes familles de lysozymes. En 1932, Fleming fait l'observation que les lysozymes issus de différents tissus et sécrétions ont des capacités antibactériennes assez variables (Fleming, 1932).

De manière générale, le terme lysozyme est utilisé pour désigner le lysozyme de blanc d'œuf de poule, qui est en effet le représentant classique de ce type d'enzyme. Avec le développement des études sur le lysozyme, il est vite devenu évident qu'il existait des types de lysozymes distincts de celui du blanc d'œuf de poule et d'autres types de lysozymes ont ainsi été découverts chez les oiseaux, les phages, les bactéries, les mycètes, les invertébrés et les plantes (Jollès et *al.*, 1984).

A la suite de cela, les lysozymes ont été divisés en différents types : Lysozymes de type-*c* (pour "chicken"), lysozymes de type-*g* (pour "goose"), lysozymes de type-*i* (pour "invertebrate"), lysozymes de type-*ch.* (pour *Chalaropsis*), les lysozymes de plantes, les lysozymes bactériens et les lysozymes phagiques (Liu, 2006). Le lysozyme de blanc d'œuf de poule est associé aux lysozymes de type-*c*.

Dans chacun des grands phylums dans lequel le lysozyme a été identifié, celui-ci peut jouer des rôles différents. Les génomes de bactériophages codent des lysozymes dont le rôle est de favoriser le relargage de virions par la lyse de la cellule hôte ou de faciliter l'infection (Fastrez, 1996). Les lysozymes bactériens jouent un rôle dans l'autolyse, l'élongation et la division cellulaire (Höltje, 1996).

Chez les végétaux, les lysozymes ont également une activité chitinase et auraient un rôle protecteur aussi bien contre les infections bactériennes que fongiques (Beintema, 1996). Chez certains organismes (ruminants, insectes) du lysozyme est exprimé à différents endroits du tractus digestif. Ces enzymes auraient un rôle digestif et permettraient entre autre d'utiliser les bactéries comme source d'énergie, de phosphore et d'azote (Hultmark, 1996).

Les lysozymes diffèrent par leurs structures, leurs propriétés physicochimiques, et leurs critères immunologiques. Le seul critère commun à toutes ces enzymes est la capacité à cliver la liaison β -glycosidique entre le C-1 du NAM et le C-4 du NAG du PG.

4-Mode d'action du lysozyme

Alors que la lyse des bactéries sous l'action du lysozyme de blanc d'œuf était connue depuis longtemps, les premiers travaux d'identification du substrat dégradé par le lysozyme datent des travaux de Meyer (Meyer et al., 1946). Ce sont toutefois les travaux de Salton sur la dégradation de la paroi purifiée de *Micrococcus Lisdéikticus* qui permirent d'élucider la nature chimique du substrat (Salton, 1960). Ses travaux ont permis de connaître non seulement la structure chimique de ses protéines, mais ont donné également des renseignements intéressants sur la spécificité de l'enzyme.

En effet, Le lysozyme peut agir comme une opsonine non spécifique innée en se fixant à la surface bactérienne, réduisant ainsi la charge négative et facilitant la phagocytose de la bactérie. En d'autre terme, le lysozyme facilite la phagocytose par les leucocytes (Fourquier et al., 2003). De plus il peut agir comme une enzyme lytique capable de lyser les bactéries, en particulier celle à Gram+, indépendamment de leur pouvoir pathogène.

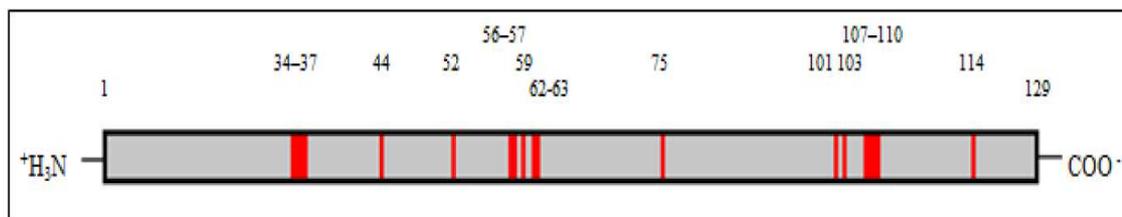


Figure 07 : Représentation schématique des acides aminés (en rouge) constituant le site actif du lysozyme (Hamon, 2004).

En revanche, les bactéries à gram- sont généralement résistantes à cette enzyme grâce à la couche externe de lipopolysaccharide(LPS) qui les caractérise. Cette couche LPS couvre la paroi muréique (par exemple, une couche de peptidoglycane) et la protège contre l'attaque par le lysozyme en empêchant l'accès à cette enzyme.

4-1-Bactéries à Gram+

Le lysozyme agit sur la couche de peptidoglycane de la paroi d'une variété d'organisme et il hydrolyse cette couche rigide. Avec des organismes à gram+ comme *Bacillus Mégathérium* ou *Micrococcus lysodéikticus*, la couche de peptidoglycane est exposée à l'extérieur et il suffit simplement d'exposer ses organismes à l'action du lysozyme qui converti ces cellules en protoplastes. Toutefois, l'action du lysozyme peut être empêchée sur ces cellules par la présence de certaines substances sur la paroi extérieure de ces cellules rendant la couche sensible inaccessible à l'enzyme.

Des études concernant la structure chimique exacte de ces parois ont montré que celle-ci étaient loin d'avoir une structure homogène ne contenant qu'une seule classe de polymère. En effet, de nombreuses bactéries à gram+ peuvent contenir des quantités considérable de phosphate organique dans leur paroi ; c'est le cas de (*Staphylococcus Aureus*), alors que d'autre n'en sont que très peu pourvues ou pas du tout (*Micrococcus lysodéikticus*). Ces composés riche en phosphate ont été regroupés sous le terme générale d'acides teichoïques et renferment essentiellement du Glycérol-phosphate ou du Rubitol-phosphate.

Concernant la lyse bactérienne, l'enzyme attaque les peptidoglycanes constituant la paroi des bactéries (particulièrement les bactéries gram positif). En effet, le lysozyme hydrolyse les liaisons covalentes ($\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique) entre l'acide N-acétyl-muramique avec le 4^e atome de carbone du N-acétyl-glucosamine (**Fig.08**).

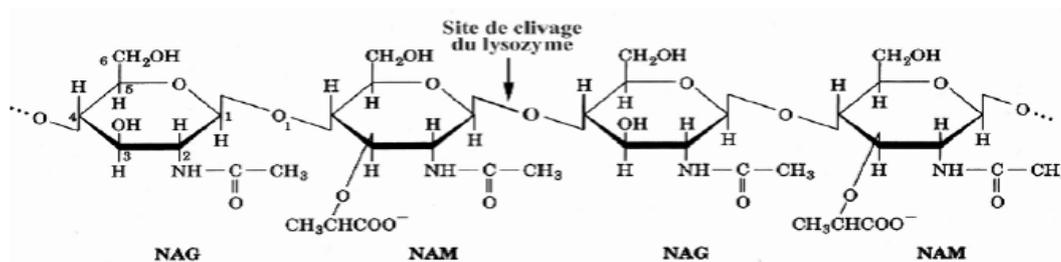


Figure 08 : Action du lysozyme sur le peptidoglycane [6]

La molécule de peptidoglycane se trouve associée avec le site de fixation de l'enzyme (binding site) situé dans un creux entre les deux domaines. Cela contraint la molécule de substrat à adopter la conformation de l'état de transition. Les acides aminés Glu 35 (acide glutamique, acide aminé numéro 35), et l'Asp 52 (acide aspartique, acide aminé numéro 52) se sont révélés être indispensables à l'activité enzymatique. La Glu 35 agit comme donneur de proton au pont glycosidique, clivant la liaison C-O du substrat, tandis que l'Asp 52 sert de nucléophile permettant la formation transitoire d'une enzyme glycosylée. Celle-ci réagit alors avec une molécule d'eau, donnant le produit final de l'hydrolyse et l'enzyme dans sa forme initiale (Strozyk ,1977).

4-2-Bactéries à Gram-

Le lysozyme ne manifeste aucune activité lytique directe sur les bactéries à gram- comme il le fait sur les bactéries à gram+. Cependant il est possible de la provoquer si au préalable on fait subir à ces bactéries un traitement convenable. Dans les bactéries à gram-, la paroi présente une plus grande complexité contenant de 8-30% de lipides, des protéines et des polysaccharides. Ici la couche de peptidoglycane est intercalée entre la membrane cytoplasmique et la couche externe formée de lipopolysaccharide. Cette couche de peptidoglycane n'étant pas exposée à l'extérieur, une certaine manipulation est nécessaire en vue de démasquer le substrat de l'enzyme : chauffage à 100°C pendant 10min, utilisation de chloroforme, d'acétone, PH alcalin, de l'EDTA (Strozyk ,1977).

5-Autres enzymes de dégradation du peptidoglycane

Le métabolisme du PG est un processus dynamique puisque cette structure grandit et se divise en parfaite synchronisation avec la croissance et la division cellulaire. En effet, la chaîne polysaccharidique du PG est la cible de nombreuses hydrolases (**Fig. 09**).

- ❖ La liaison β -1,4 entre les résidus NAM et NAG est clivée par le lysozyme et par les transglycosylases lytiques (LT).
- ❖ La liaison β -1,4 entre les résidus NAG et NAM est hydrolysée par des glucosaminidases et les amidases sont responsables du clivage de la liaison NAM-L-Ala.
- ❖ Les lysozymes et les transglycosylases lytiques clivent la même liaison mais génèrent différents produits de réaction.
- ❖ Tandis que les lysozymes catalysent une réaction hydrolytique, les LT clivent la liaison β -glycosidique par transglycosylation intramoléculaire aboutissant à la formation d'acide 1,6-anhydromuramique. Le rôle de cette structure n'est pas connu mais il a été émis l'hypothèse que l'énergie de cette liaison pourrait être utilisée pour des réarrangements des chaînes de glycines (Pfeiffer et al., 2006).

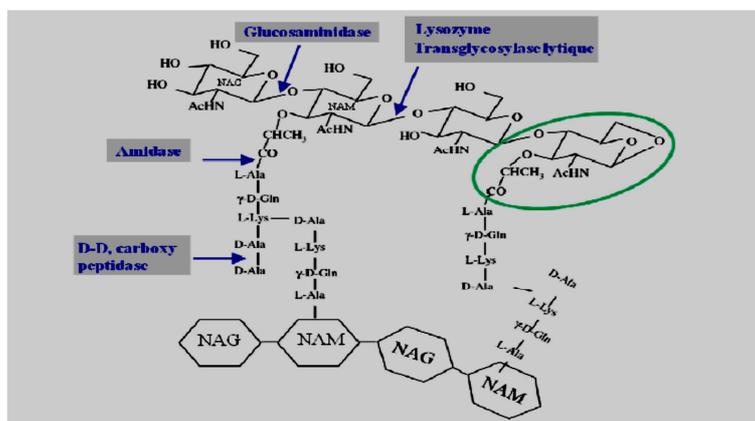


Figure 09 : Représentation du PG indiquant les liaisons chimiques clivées par les hydrolases (Pfeiffer et al, 2006).

6-Les inhibiteurs du lysozyme

Les inhibiteurs du lysozyme sont assez nombreux. En effet, le lysozyme peut être inhibé par :

- ✓ Les dérivés d'indole qui ont la capacité de dénaturer le site actif du lysozyme
- ✓ L'imidazole qui induit la formation d'un complexe de transfert de charge
- ✓ Les agents de surfaces actives telles que le dodécyl sulfate de sodium, le dodécane de sodium, et le dodécyl alcool.

7-Application biotechnologique du lysozyme

Le lysozyme est la protéine du blanc d'œuf qui à l'heure actuelle est de loin la plus valorisée. Son intérêt a été prouvé dans plusieurs domaines tels que l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique, dans les laboratoires de recherches et pour le diagnostic médical.

7-1-Domaine pharmaceutique

Les propriétés antimicrobiennes du lysozyme sont également exploitées en industrie pharmaceutique (Proctor et *al.*, 1988). Le lysozyme est reconnu comme étant un agent immunologique et a été surnommé « antibiotique endogène ». Grâce à cette propriété, cette enzyme est utilisée dans la thérapie virale et bactérienne notamment dans le traitement d'angine de la gorge (lysopaine), des aphtes (lyso 6) ainsi que des caries dentaires.

Le lysozyme est également utilisé comme analgésique chez les personnes souffrant de cancer et comme agent stimulant dans les traitements par les antibiotiques. Il peut être également incorporé à de nombreuses crèmes afin de protéger les peaux sèches contre les lésions inflammatoires (Lésniérowski et *al.*, 2007).

Le lysozyme se présente donc aujourd'hui comme un antibactérien naturel de plus en plus utilisé en pharmacie (surtout au Japon et aux USA). Sa grande stabilité thermique aux PH acides et le maintien de son activité en présence de sel et de sucres permettent sa mise en jeu dans de nombreux domaines [7].

7-2-Domaine agro-alimentaire

L'application du lysozyme s'effectue à plusieurs niveaux. En effet :

Le lysozyme est connu pour son pouvoir bactéricide puisqu'il tue les bactéries notamment les Gram+ au nombre des quels figure les pathogènes les plus communs comme le staphylocoque, le streptocoque, ou le redoutable bacille du charbon [8]. L'industrie agro-alimentaire l'utilise comme conservateur naturel en fromagerie pour limiter la prolifération des bactéries butyriques dans les fromages (Proctor et *al.*, 1988). Le lysozyme peut être également utilisé dans la conservation de la viande, du poisson des fruits et légumes frais [9].

Le lysozyme sert également comme agent antibactérien afin de contrôler l'acidité induit par les bactéries lors du brassage de la bière (Cunningham et *al.*, 1991) ainsi que du vin ; ce qui permet d'obtenir un vin de bonne qualité (Daeschel et *al.*, 1999).

Le lysozyme est une partie du système immunitaire inné. Des niveaux de lysozymes réduits ont été associés à une dysplasie broncho-pulmonaire chez les nouveaux nés. En effet, les enfants nourries au lait maternisé manquant de lysozyme dans leur alimentation ont un taux de maladies diarrhéiques trois(3) fois plus important. C'est pourquoi, en France Dubois-Prévost a proposé en 1970 que le lysozyme puisse être associé dans les formules de fabrication d'aliment pour enfants ; de façon à obtenir des produits aussi proches que possible du lait humain (Gerbaux et *al.*, 1997).

7-3-Domaine de la recherche

Le lysozyme a la capacité de détruire non seulement la paroi des bactéries, mais aussi de certaines cellules. Il est donc utilisé dans ce domaine pour l'extraction des molécules protéiques ou d'acide nucléiques tel que l'ADN par exemple [10].

7-4-Diagnostic médicale

Le dosage du lysozyme, chez l'homme permet d'évaluer le degré d'activité (production et destruction) des lignées médullaires granulocytaires et monocytaires. Les taux sériques et urinaires normaux sont compris entre 3 et 15 mg/l et les taux de lysozyme urinaire sont inférieurs à 2 mg/l. Ce dosage fait partie d'éléments de diagnostic de certaines maladies telles que les leucémies (Karle et *al.*, 1974), certaines affections rénales (tubulopathie) (Vander Linde, 1981) et il participe également à la surveillance de rejet de greffe d'organes (Jones et *al.*, 1999).

8-Inconvénients liés au lysozyme

Le lysozyme peut aussi être la cause de pathologies. En effet, une mutation sur le gène du lysozyme peut être à l'origine de la formation de dépôts d'amyloïde (amylose d'Ostertag). De par sa nature protéique, le lysozyme a des propriétés immunogènes et peut provoquer des allergies et des réactions anaphylactiques (Le Moli, 1986). Ce potentiel semblant être modéré, cette immunogénicité représente un problème mineur chez l'homme (Bianchi, 1982).

Toutefois, quant à l'utilisation du lysozyme dans l'alimentation, il a été montré chez la souris et le rat, que la tolérance orale du lysozyme est de 4 g/kg (Bianchi, 1982). C'est suite à ces études que les autorités ont pu conclure que l'addition d'une faible quantité de lysozyme dans certains produits ne présentait pas de danger manifeste pour la santé humaine. En France par exemple, l'utilisation du lysozyme dans l'industrie agroalimentaire est réservée à deux grandes filières que sont les technologies fromagère et viticole (Masschalck, 2003).

9-Propriété physico-chimique

Les propriétés des acides aminés (charge, hydrophobicité...) Détermine la structure de la protéine. On distingue entre autre :

9-1-Structure primaire

Toutes les protéines sont formées d'une succession d'acides aminés liés les uns aux autres dans un ordre précis. Le lysozyme, par exemple, est formé de l'union de 129 acides aminés (**Fig.10**). Le premier est la lysine, le second, la valine, le troisième, la phénylalanine ... Et le dernier, le 129e, est la leucine. La séquence des acides aminés d'une protéine (quel acide aminé est le premier, le second, le troisième, ..., le dernier) constitue ce qu'on appelle la structure primaire de la protéine (**Fig.11**).

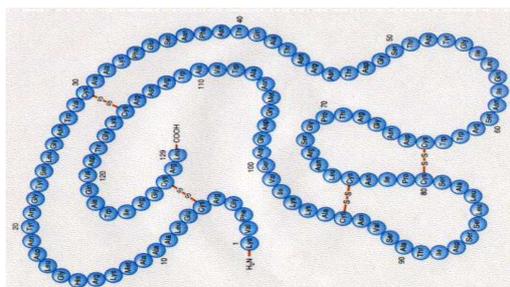


Figure 10 : Structure primaire du lysozyme (Hamon, 2004)

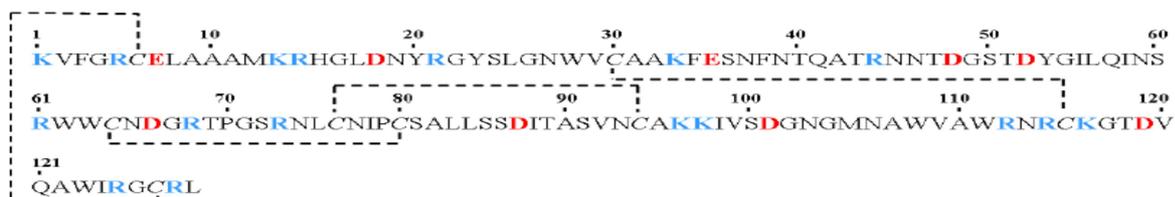


Figure 11 : Structure primaire du lysozyme (les acides aminés colorés en rouge et en bleu correspondent respectivement aux acides aminés acides et basique ; les pointillés les ponts disulfures) (Michael, 2008).

9-2-Structure secondaire

Certaines parties de la chaînes d'acides aminés adoptent une structure régulière appelée structure secondaire. On reconnaît deux grands types de structure secondaire : les hélices α et les feuillets plissés β (Bernard, 2001). Le lysozyme est majoritairement constitué d'hélice α ; elle représente 39% de la structure secondaire du lysozyme (**Tab.02**).

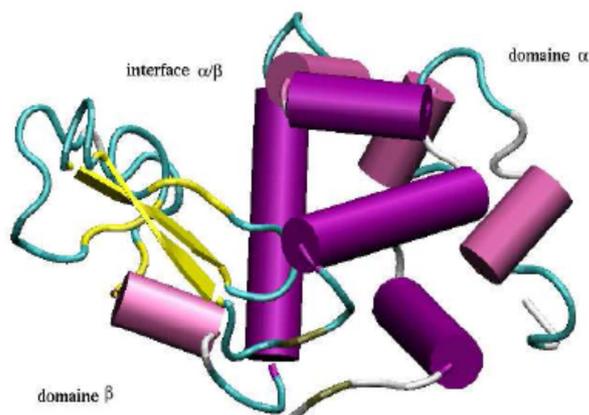
Tableau 02 : Pourcentage d'Acides Aminés dans la Structure Secondaire du LYS

Structure secondaire	Lysozyme
Hélice α	39(51% d'acides aminés)
Feuillet β	11(14% d'acides aminés)

9-3-Structure tertiaire

La structure tridimensionnelle du LYS s'organise en deux domaines Séparés par un « Sillon » : Un de ces deux domaines, dénommé domaine α , est constitué majoritairement d'hélice α , alors que le second domaine, dénommé domaine β , se compose d'une hélice α et d'un feuillet β antiparallèle constitué de trois brins (**Fig. 12**) (mckenzie et *al.*, 1991).

La structure tertiaire de cette protéine est stabilisée par quatre ponts disulfures. Trois de ces ponts disulfures impliquant les résidus Cys6-Cys127, Cys30-Cys115, Cys64-Cys80 du LYS sont des ponts disulfures intra domaines : les deux premiers se situent au niveau du domaine α et le troisième au niveau du domaine β . Le quatrième pont disulfure impliquant le résidu Cys76-Cys94 du lysozyme est un pont disulfure entre les domaines α et β (Permyakov, 2000).

**Figure 12** : Structure tertiaire du lysozyme(Hamon ;2004)

1-Matériel utilisés au laboratoire :

Plusieurs matériels ont été utilisés au laboratoire pour la réalisation de cette étude (Voir annexe 01)

2- Extraction du lysozyme

2-1-Description de la matière première (œuf de poule)

L'œuf est un corps organique de dimensions variables dont l'objectif initial est d'assurer aux espèces ovipares la reproduction de leur espèce. Il est très riche en protéines, en vitamines, en sels minéraux et son poids moyen est de 60g.

La majorité des protéines de l'œuf y compris le lysozyme que nous avons décidé d'extraire se trouvent dans le blanc d'œuf en proportion variable comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau 03 : Les protéines du blanc d'œuf de poule

Protéines	Proportion (% de l'extrait sec)	Masse Moléculaire	Glucides (%)	Point Isoélectrique	Propriété
Ovalbumine	54	45	3,5	4,5	Agent gélifiant, propriété moussante
Conalbumine (Ovotransferrine)	12	77,7	2	6	Fixation de calcium métallique inhibiteur de bactérie
Ovomucoïde	11	28	23	4,1	Inhibe la trypsine, allergisante
Ovo globuline ₁	4	49	-	5,5	Propriété moussante
Ovo globuline ₂	4	49	-	5,8	
Lysozyme	3,5	14,3	0	10,7	Lyse des polysaccharides pariétaux des bactéries Gram+, Propriété moussante

Ovo mucine	3,5	200-8000	25	4,5-5	Facteur de viscosité, agent gélifiant
Ovo inhibiteur	1,5	49	6	5,1	Inhibe plusieurs protéases
Ovoflavoprotéine	0,8	32	14	4	Une mole de protéine fixe une mole de vitamine B2
Ovo macroglobuline	0,5	760-900	-	4,5	Propriété moussante, inhibiteur de l'hémagglutination virale
Avidine	0,5	68	-	10	Fixe fortement la biotine

2-2- Préparation du blanc d'œuf (précipitation)

L'albumine a été recueillie manuellement (4 œufs = 100ml) et mis dans deux béchers contenant chacun 100ml d'albumine. On dilue ensuite chaque échantillon d'albumine trois fois son volume avec une solution de NaCl à 0,05M.

L'étape suivante consiste à agiter chaque échantillon pendant 5min suivi d'un ajustement du pH à 4 avec une solution d'acide acétique à 1N.

La dernière étape de l'extraction consiste à diluer dans un premier temps un 1^{er} échantillon avec 20% d'une solution homogène d'éthanol à (95%) (V/V) qu'on incube pendant 4h à 25°C et dans un deuxième temps un 2^{ème} échantillon avec 40% d'une solution d'éthanol à (95%) (V/V) qu'on incube pendant 8h à 25°C; de façon à favoriser la précipitation des protéines.

2-3- Extraction du lysozyme

La protéine du lysozyme est séparée des extraits éthanoliques du blanc d'œuf (20% et 40%) par simple centrifugation. Une centrifugeuse (Sigma) à rotor fixe a été utilisée pour séparer le surnageant contenant le lysozyme du culot. La centrifugation a été effectuée à 6000tr/min pendant 15minutes dans des tubes en plastique de 45ml. Le surnageant ainsi obtenu est conservé à 4°C.

3- Dosage des protéines

3-1-La méthode de Bradford

➤ Principe

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique qui permet de doser la concentration protéique d'un échantillon. Cette méthode est basée sur l'adsorption d'un colorant le bleu de coomassie G250 qui se lie à des molécules de protéines à pH acide selon deux façons. Le groupe de triphénylméthane se lie aux résidus hydrophobes des acides aminés alors que les groupes sulfonâtes anioniques interagissent avec les chaînes latérales cationiques des protéines (les chaînes latérales de l'arginine, de la lysine et de l'histidine). Ceci entraîne la formation d'un complexe chromogène présentant un maximum d'absorption à 595nm. Il existe une corrélation entre la quantité de colorant formé dans une solution et la concentration en protéine.

➤ Gamme étalon

La première étape de cette méthode consiste en la réalisation d'une gamme étalon à partir de quelques tubes de concentrations connues. On utilise généralement de la BSA (Bovine Sérum Albumine) comme protéine standard. Cette gamme permet d'établir une courbe d'étalonnage de la concentration en fonction de l'absorbance mesurée.

Les concentrations utilisées pour cette gamme doivent être comprises dans la zone linéaire du colorant utilisé : ici entre 0.1 à 1.4mg/ml. Une fois les points correspondant à la gamme positionnés sur le plan on les relie par une droite approximant la linéarité de la courbe théorique. Pour se faire, plusieurs réactifs ont été préparés notamment le réactif de Bradford et la solution Stock de BSA (Bovine sérum albumine) (voir annexe 02).

3-2-Protocole expérimental

❖ Préparation des dilutions de BSA

La première étape consiste en la réalisation d'une série de dilutions de différentes concentrations connues à partir de la solution mère comme l'indique le tableau ci-dessous.

Tableau 04 : Préparation des Dilutions de la solution mère (Volume Totale = 2ml)

	T0, 25	T0, 5	T1	T1, 4
BSA Stock (2mg/ml)	0,25ml	0,5ml	1ml	1,4ml
Eau Distillée	1,75ml	1,5ml	1ml	0,6ml
Concentration BSA en mg/ml	0,25	0,5	1	1,4

❖ Préparation de la gamme étalon

La deuxième étape consiste à utiliser cinq points pour tracer la droite pour un volume réactionnel total de 3.1ml par échantillon (voir **Tab.05**).

Tableau 05 : Préparation des échantillons à doser (Volume Totale=3,1ml)

N° du Tube	Volume de BSA	[BSA] des Dilutions (mg/ml)	Réactif de Bradford (ml)
1(Blanc)	0,1ml H ₂ O	0	3
2	0,1	0,25	3
3	0,1	0,5	3
4	0,1	1	3
5	0,1	1,4	3

La mesure de l'absorbance a été réalisée avec le spectrophotomètre évolution 600. L'absorbance de tous les tubes est mesurée à une longueur d'onde de 595nm. Les valeurs obtenues à partir des tubes de la gamme étalon permettent de tracer une droite étalon: absorbance= f (concentration) (voir annexe 2). Cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon à doser. Les échantillons sont préalablement mis à l'obscurité pendant 15minutes avant de mesurer l'absorbance afin que l'équilibre de fixation Protéine-colorant s'établisse. Le pigment forme alors un complexe avec les protéines, sa structure est modifiée par cette interaction et sa longueur d'onde d'absorbance maximale est déplacée de 465 à 595nm.

3-3- Préparation des échantillons de lysozyme à doser

Pour évaluer la concentration des protéines qui sont présentes dans les surnageants obtenus à partir des extraits éthanoliques du blanc d'œuf, il suffit d'utiliser le même volume que celui utilisé pour les points de la gamme (volume total et volume du réactif), d'en lire l'absorption à 595nm au spectrophotomètre puis d'en reporter la mesure sur la courbe étalon qui nous donnera la concentration correspondante.

Ainsi pour chacun des surnageants (20% et 40%), trois dilutions à différents volume (10µl, 50µl, 100µl) ont été réalisées. Dans le premier tube, on prélève 10µl du surnageant à 20% ou 40% auquel on ajoute, 90µl d'eau distillée et 3ml de Bradford et ainsi de suite pour les autres tubes (voir **Tab.06** et **Tab.07**).

Tableau 06 : Préparation des échantillons du Surnageant à 20% d'éthanol

N° du Tube	Volume du surnageant (20%)	Volume d'eau Ajoutée	Réactif de Bradford
1	10µl	90µl	3ml
2	50µl	50µl	3ml
3	100µl	0µl	3ml

Tableau 07 : Préparation des échantillons du Surnageant à 40% d'éthanol

N° du Tube	Volume du surnageant (40%)	Volume d'eau Ajoutée	Réactif de Bradford
1	10µl	90µl	3ml
2	50µl	50µl	3ml
3	100µl	0µl	3ml

Le calcul des concentrations protéiques de chaque échantillon se fera grâce à l'équation de la courbe d'étalonnage suivante :

$$Y = aX+b \quad (\text{voir annexe 02})$$

4-Précipitation du lysozyme

Dans le but de concentrer le surnageant en lysozyme, il a été procédé à une précipitation par ajustement du pH à 10,7 ce qui correspond au point isoélectrique du lysozyme (PI) pour lequel la charge net du lysozyme est nul. Par la suite une centrifugation a été réalisée comme précédemment à 6000trs/min pendant 15min ; ce qui a permis non seulement d'éliminer l'éthanol mais aussi, de récupérer le culot contenant le lysozyme.

Le culot est resuspendu dans 10ml de tampon Tris-HCl à pH 7,5 dans un tube de 45ml et conservé à 4°C. La détermination de la concentration des protéines a été effectuée par la méthode de Bradford comme le montre le tableau ci-dessous. Ce nouveau dosage a été effectué pour déterminer la concentration globale de l'ensemble des protéines présent dans l'échantillon ; principalement celle du lysozyme afin d'apprécier l'efficacité de cette précipitation.

Pour la préparation des échantillons, elle a été réalisée de la manière suivante. On prélève 50µl de l'échantillon auquel on ajoute 50µl d'eau distillée.

Tableau 08 : Préparation des échantillons (culot et surnageant 20et 40%) pour la mesure de l'absorbance

Nature du prélèvement	Volume prélevé	Volume d'eau Ajoutée	Réactif de Bradford
Surnageant 20%	50µl	50µl	3ml
Surnageant 40%	50µl	50µl	3ml
Culot 20%	50µl	50µl	3ml
Culot40%	50µl	50µl	3ml

5-Protocoles d'électrophorèse

5-1- Electrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique entre autre pour vérifier le degré de purifications des échantillons protéiques a analysé et donc d'évaluer la qualité des techniques d'extractions des protéines.

5-2- Théorie de l'électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) consiste à séparer les protéines selon leurs poids moléculaires, par migration de celles-ci sous l'effet d'un champ électrique dans un gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970). La SDS-PAGE s'effectue en conditions dénaturantes, par utilisation d'un tampon Tris-Glycine contenant du SDS (tampon de migration ou tampon de Laemmli).

Le SDS ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$) est un détergent anionique fort qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques. En conséquence les protéines sont dénaturées ; elles perdent leur structure tridimensionnelle native et les stabilises sous une forme déroulée. Ainsi, les protéines ont toutes le même rapport charge sur masse, et ne sont plus séparées en fonction de charges électriques uniformes. De plus, ces charges étant négatives, les protéines vont migrer selon leurs poids moléculaires, de la cathode (haut du gel) vers l'anode (bas du gel).

La migration des protéines au cours de la SDS-PAGE s'effectue à l'intérieur d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Le polyacrylamide est un ensemble de macromolécules poreuses, résultant de la copolymérisation de 2 monomères : l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et le N- méthylène-bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) qui assure le pontage entre les chaînes d'acrylamide.

Le gel de polyacrylamide agit comme un tamis moléculaire retenant plus ou moins les protéines en fonction de leur taille et de celle des pores. La distance de migration du polypeptide-SDS est proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Par conséquent, une protéine de bas poids moléculaire migre plus loin à travers les pores du gel qu'une protéine de poids moléculaire plus élevé. Plus ce gel est de grande taille, plus la résolution est importante en affichant des spots bien séparés.

➤ Préparation des gels de polyacrylamide

Les gels discontinus de polyacrylamide sont constitués de 2 gels de réticulations différentes, superposés l'un à l'autre.

- Le premier gel, dit stacking gel ou gel de concentration, est de faible réticulation, ce qui permettant aux protéines de pénétrer facilement et de se concentrer à l'interface avec le second gel.
- Le second gel, appelé gel de séparation, a une forte réticulation et permet aux protéines d'être séparées par SDS-PAGE.

Les volumes des différents constituants du gel discontinu sont indiqués ci-dessous:

En effet, le gel permettant la séparation est un gel de 10% d'acrylamide. Il est composé de :

- 20ml de la solution A
- 15ml de la solution B
- 0,6ml d'une solution SDS 10%
- 24ml d'eau distillée
- 300 μ l d'une solution persulfate d'ammonium 1, 5%
- 20 μ l de TEMED

NB : pour la composition des solutions A et B, (voir annexe 03)

Le gel de concentration dit stacking à 4% d'acrylamide, est un gel à pore large concentrant les échantillons avant leur migration. Il est composé de :

- 2,66ml de la solution A
- 5ml de la solution C
- 0,2ml d'une solution SDS 10%
- 12,2ml d'eau distillée
- 100 μ l d'une solution persulfate d'ammonium 1,5%
- 10 μ l de TEMED

➤ Préparation des échantillons

Les échantillons (les surnageant des extraits ethanologique du blanc d'œuf à 20% et 40%, le témoin Hexalyse et l'albumine) sont mis en suspension dans le tampon de charge.

Ils sont préalablement dénaturés à 100°C pendant 5mn, en présence d'un réducteur (β -mercaptoéthanol) et un détergent anionique (SDS) (voir annexe 03).

➤ Préparation de la SDS-PAGE

Le gel non polymérisé a été coulé à l'aide d'une pipette entre des plaques de verre préalablement assemblées. Un peigne 10 dents a ensuite été inséré entre les plaques de verre. Puis, le gel a été laissé à polymériser à température ambiante (23-25°C) pendant 1h. Avant de commencer la SDS-PAGE, le peigne a été retiré et les puits formés ont été soigneusement rincés à l'eau distillée, puis séchés avec du papier filtre.

La cuve d'électrophorèse a été remplie avec le tampon de migration Tris-Glycine- SDS (tampon TGS) (voir annexe 03). Les échantillons (50 μ l) sont déposés dans les puits. Le gel est alors soumis à un courant de 50 ma pendant 1h30 minutes permettant la concentration et la migration des échantillons.

Migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées et révélés dans le gel par une solution au bleu de coomassie qui contient aussi de l'éthanol et de l'acide acétique. En effet, le gel est transféré dans un bac rempli de bleu de coomassie. On laisse colorer pendant 2heurs. Après ce temps, le colorant est vidé et le gel est décoloré par une solution de décoloration préalablement préparée jusqu'à éclaircissement complet du fond du gel.

6- Etudes microbiologiques

6-1-les Espèces Bactériennes étudiées

- L'espèce *Escherichia coli*

Ce sont des bacilles ou coccobacille à Gram- appartenant à la famille des entérobactériaceae. Ils sont responsables d'une gastro-entérite infantile (GEI) après consommation des aliments contaminés tel que l'eau, la viande.

- L'espèce *Staphylococcus Aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques, à Gram+, appartenant à la famille des micrococcaceae. Il sont immobile, peuvent être isolés en amas ou en grappe de raisin.

Ils produisent des antérotoxines après injection d'un aliment contaminé tel que le lait, la viande.

6-2-Milieus de cultures utilisés

Suivant les techniques employées et les souches étudiées, les milieux de cultures utilisés sont :

- Gélose Nutritive (GN) : c'est un milieu d'isolement non sélectif. Ce milieu est utilisé pour le repiquage des souches.
- Muller Hinton (MH) : cette gélose est reconnue comme étant le milieu de référence pour l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques et toute autre substance qui possède une activité antimicrobienne.

6-3- Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne du lysozyme a été étudiée par la méthode de diffusion en puits et par turbidimétrie.

6-3-1-Préparation des suspensions bactériennes

Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures pures et fraîches. Les souches sont d'abord cultivées sur gélose nutritive solide pour avoir des cultures de moins de 24h. Les suspensions bactériennes sont obtenues en diluant plusieurs colonies pures dans 9ml de gélose nutritive liquide. Dans le cas de *S. Aureus*, la mesure de la densité optique à 660nm doit être comprise entre 0,8 et 1,0. Ces valeurs correspondent à une population de 10^8 Cellule / ml.

A-Méthode de diffusion en puits

➤ Principe

Pour la mise en évidence de l'action lytique du lysozyme par les souches tests, nous avons choisi la méthode de diffusion des puits.

Cette méthode est basée sur le principe que cette substance protéique est capable de diffuser dans un milieu de culture solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. Cette action lytique se manifeste par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits (voir Fig.14).

➤ Protocole

Cette méthode est réalisée sur la gélose MH, le milieu de culture stérile et fondu est versé aseptiquement dans les boîtes de pétri avec une épaisseur de 4mm dans chaque boîte. Après solidification, et à l'aide d'un écouvillon stérile, la surface du milieu de culture est ensemencé par l'une des suspensions de souches bactériennes. Les puits sont réalisés à la surface à l'aide d'une pipette pasteur, par la suite une quantité de 100µl (lysozyme ou comprimé) est déposé aseptiquement dans ces puits. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. Trois répétitions sont réalisées pour chaque test. L'évaluation de l'inhibition est réalisée par mesure du diamètre d'inhibition.

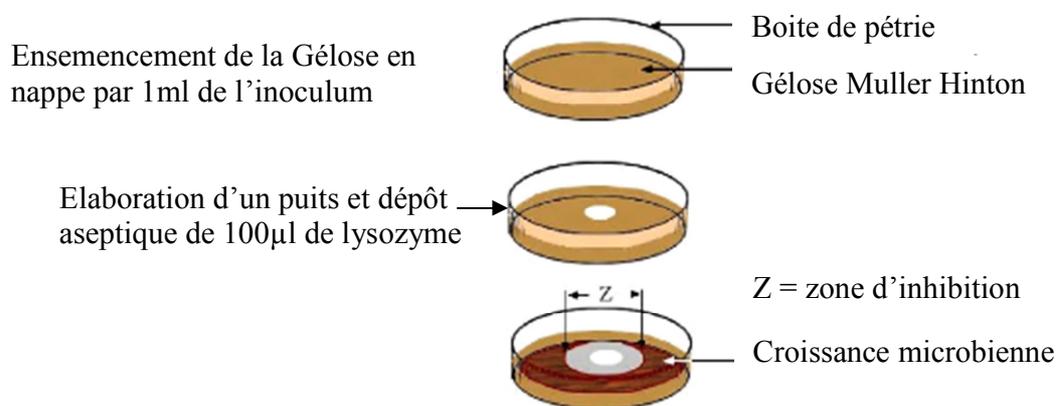


Figure 13 : Schémas Représentatif de la méthode des puits

B -Turbidimétrie

La turbidimétrie est la mesure du degré de turbidité d'une suspension. Elle est déterminée grâce à un système optique qui mesure la diminution, due à l'absorbance, de l'intensité d'un rayon lumineux traversant une suspension bactérienne. En effet, les bactéries intactes forment une suspension homogène qui absorbe à 660 nm, tandis qu'une solution contenant un lysat bactérien présentera une absorbance inférieure à la même longueur d'onde.

La turbidimétrie a été utilisée pour étudier, deux paramètres à savoir :

- L'effet de la concentration du lysozyme sur la lyse de *S. Aureus*.
- L'effet du temps sur la lyse de *S. Aureus*.

b*₁-l'effet de la concentration du lysozyme sur la lyse de *S. Aureus

✓ Préparation de la suspension microbienne

Une suspension microbienne de *S. Aureus* estensemencée dans 10 ml de bouillons Nutritif liquide et incubé à 37° pendant 24h. Lorsque l'absorbance mesurée à 660 nm est évaluée à 0,8 - 1,0 correspondant à une concentration cellulaire de 10⁸ cellules/ml, elles sont récupérées par centrifugation à 3900trs/min pendant 10min. Ces cellules subissent ensuite une série de lavage avec de l'eau distillée (5ml) dans le but d'éliminer toutes traces du milieu de culture.

✓ Protocole du test

Un volume de 1 ml de la suspension microbienne de *S. Aureus* ont été traitées avec une gamme de 10-100 µl de lysozyme, à 1 mg / ml, pour obtenir des concentrations finales de 10 à 1000 µg. Cette série de solution ont été incubées à 37 ° C / 90 min. L'absorbance est mesuré à 660 nm en utilisant le spectrophotomètre (JENWAY 6305) (voir Tableau 9). Enfin, le pourcentage d'inhibition a été déterminé à partir du pourcentage de réduction de la turbidité par rapport au témoin "blanc". La formule est la suivante:

Inhibition (%) = (Abs du témoin *S. Aureus* – Abs du test *S. Aureus*) X 100 / Abs du témoin *S. Aureus*

D'un autre côté, l'activité catalytique du lysozyme est mesurée par la diminution de l'absorbance à 660 nm d'une suspension de *S. Aureus* due à la lyse des bactéries. Une unité de lysozyme correspond à l'activité enzymatique qui provoque une variation de 0,001 absorbance par minute dans des conditions opératoires bien définies (ph = 7,4 température 37°C).

Tableau 09: Préparation des échantillons avec le lysozyme à 40% pour la mise en évidence de l'effet de la concentration

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suspension (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lysozyme (µl)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Eau distillée (µl)	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

Dans l'objectif d'évaluer l'efficacité des techniques d'extraction sur l'activité catalytique du lysozyme, il a été entrepris de mesurer l'activité lytique d'un témoin, l'Hexalyse, qui est un comprimé à base du lysozyme (Voir annexe composition du comprimé Hexalyse). Le protocole de mise en œuvre du test de l'effet des concentrations de l'Hexalyse sur la lyse de *S. Aureus* est identique à celui du lysozyme (voir **Tableau 10**). Mais préalablement il fallait dissoudre un comprimé d'Hexalyse dans 5 ml de tampon Tris-Hcl à ph 7,5 et les dilutions variés de 100-1000 µl de lysozyme, à 5 mg / ml, pour obtenir des concentrations finales de à 500 à 5000 µg.

Tableau 10: Préparation des échantillons avec le comprimé(Hexalyse) pour la mise en évidence de l'effet de la concentration

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Suspension (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Comprimé (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Eau distillée (µl)	990	980	970	960	950	940	930	920	990	900

***b*₂-Effet du temps sur la lyse de *S. Aureus* par le lysozyme**

Un volume de 1 ml de la suspension microbienne de *S. Aureus* contenant environ 10^8 cellules /ml (absorbance à 660nm = 0,8 à 1,0) a été traitée avec 100 µl de lysozyme (1 mg /ml) et incubé à 37°C pendant différentes périodes de temps allant de 0 à 120 min. A chaque intervalle l'absorbance est mesurée à 660 nm (voir **Tableau 11**).

Tableau 11: Préparation des échantillons avec le lysozyme à 40% pour la mise en évidence de l'effet du temps

Temps (min)	10	20	30	45	60	90	120
Suspension (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Lysozyme (µl)	100	100	100	100	100	100	100
Eau distillée (µl)	900	900	900	900	900	900	900

Aussi il a été entrepris un test témoin avec l'Hexalyse et le protocole de mise en œuvre est identique à celui de l'effet de temps sur la lyse de *S. Aureus* par le lysozyme (voir **Tableau 12**).

Tableau 12: préparation des échantillons avec le comprimé pour la mise en évidence de l'effet du temps

Temps (min)	10	20	30	45	60	90	120
Suspension (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Comprimé (µl)	100	100	100	100	100	100	100
Eau distillée (µl)	900	900	900	900	900	900	900

:

1-Précipitation des protéines du blanc d'œuf

Le lysozyme représente environ 7 à 8% des protéines du blanc d'œuf et à un $pH_i = 11$, nettement supérieur à celui des autres protéines du blanc d'œuf. Par conséquent l'extraction du lysozyme s'effectue grâce à une diminution de la solubilité des protéines totale du blanc d'œuf. Ainsi, l'extraction du lysozyme du blanc d'œuf avec de l'éthanol à 20 et 40 % a donné de très bon résultats puisqu'elle a permis de précipiter la majeure partie des protéines.

En effet, si les protéines sont électriquement chargées de la même façon, elles auront tendance à se repousser, donc à ne pas s'agréger. Au contraire, si elles sont électriquement neutres, cette répulsion disparaît, et l'agrégation devient possible. On peut utiliser ce phénomène soit en jouant sur le pH de la solution ou avec des électrolytes. En effet cette précipitation a été d'autant plus favorisée par le pH acide des échantillons ajusté préalablement dans ce but (voir protocole expérimental). De plus, une phase de désorption effectuée en présence de NaCl permet d'accélérer ce processus de précipitation.

Au cours de cette phase, il y'a une compétition entre les protéines et les ions sodium qui finissent par se substituer aux protéines fixé à l'eau. Cette alternance est basée sur la force ionique du sodium supérieur à celle des protéines. La centrifugation appliquée par la suite a permis de séparer une majorité des protéines "précipitées" autres que le lysozyme. Le tableau ci-dessous donne les résultats de cette centrifugation (voir **Tableau 13**).

Tableau 13 : Présentation des résultats de la centrifugation

	Volume Totale (ml)	Surnageant obtenu (ml)	Culot obtenu
Précipitation à 20% d'éthanol	496	188,6	Grande Quantité
Précipitation à 40% d'éthanol	666	283,6	Grande Quantité

2-Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode colorimétrique de Bradford. Pour doser les protéines des diverses fractions, il est nécessaire de disposer d'une référence que constitue la courbe d'étalonnage absorbance (595nm) = f (mg de protéine par tube).

Cette courbe d'étalonnage réalisée à partir de la solution de sérum albumine bovine (BSA) à 2 mg/ml (voir annexe 02) nous a permis de déduire l'équation de la droite à partir de laquelle les concentrations protéiques de nos échantillons ont été calculées.

Cette équation se présente sous la forme de :

$$Y = 38,906 X \text{ (avec } Y = \text{ absorbance et } X = \text{ concentration protéique).}$$

Etant donné que les échantillons ont été dilués, le calcul de la concentration protéique doit prendre en considération le facteur de dilution. Dans ce cas :

$$[X] = \frac{Y}{38,906} \times Fd \text{ (Fd : facteur de dilution)}$$

Une fois cette équation déterminée, le calcul de la concentration protéique des échantillons inconnu se fait aisément comme le montre les tableaux ci-dessous.

Tableau : 14 Absorbance et concentration protéique des échantillons à 20%

	Absorbance	Facteur de Dilution	Concentration [g/ml]	Concentration [g/l]
10µl	0,0379	0,1	0,000097	0,097
50µl	0,0475	0,5	0,000610	0,61
100µl	0,1258	0	0,0032	3,2

Tableau 15 : Absorbance et concentration protéique des échantillons à 40%

	Absorbance	Facteur de dilution	Concentration [g/ml]	Concentration [g/l]
10µl	0,0124	0,1	0,0000317	0,0318
50µl	0,0433	0,5	0,000556	0,556
100µl	0,1601	0	0,00411	4,115

Les résultats obtenus sont satisfaisants puisqu'ils révèlent d'une part, la présence d'une quantité importante de protéines dans les deux échantillons. D'autre part, ils montrent également que la précipitation avec de l'éthanol à 40% a été la plus efficace puisqu'elle a favorisée la précipitation d'une plus grande quantité de protéines.

La seconde précipitation a été effectuée à un PH égale à 10,7. Cette valeur correspond au point isoélectrique du lysozyme.

Ce réajustement du pH a favorisé la précipitation du lysozyme et a donné lieu à de très bons résultats puisqu'il nous a permis de récupérer après la centrifugation une quantité importante de culot donc du lysozyme.

Les résultats des deux échantillons (20 et 40%) sont consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16 : Absorbance des échantillons (culot et surnageant 20 et 40%)

Nature du prélèvement	Absorbance mesurée	Concentration en [g/ml]	Concentration en [g/l]	FD
Surnageant 20%	0,183	0,0023	2,35	0,5
Surnageant 40%	0,207	0,0026	2,66	0,5
Culot 20%	0,073	0,00093	0,93	0,5
Culot40%	0,102	0,0013	1,31	0,5

3- Electrophorèse verticale

Pour vérifier l'efficacité de l'extraction après l'étape de précipitation du lysozyme au point isoélectrique, nous avons décidé de préparer un gel d'électrophorèse sur un support acrylamide/bis-acrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). En comparant les méthodes mise en œuvre par des travaux précédents, l'électrophorégramme nous a permis de mettre en évidence la présence des protéines. On rappelle que toutes les protéines sont chargées négativement par les SDS et de cet fait, les composés les plus léger vont migrer le plus loin c'est à dire vers l'anode [+].

On observe que pour les puits F0 (albumine), F1(Hexalyse), F2 (culot 20%), F3 (culot 40%), les bandes de migration sont identiques. Cela traduit la présence de protéines de poids moléculaire identique ; c'est le cas pour les bandes N° 1, N° 2 et N°3. Ces bandes traduisent belle et bien ce qui était attendu. En effet, d'après les résultats obtenus le dosage protéique a indiqué des valeurs supérieur à la concentration du lysozyme qui est estimé aux alentours de 3 g/l, ce qui veut dire que des protéines autres que le lysozyme sont encore présentes et non éliminés.

On peut donc supposer que les protéines qui sont présentes correspondent au :

- Conalbumine "ovotransferrine" (82000 daltons)
- ovalbumine (46000 dalton)
- lysozyme (14600 dalton)

Le fait d'observer une différence d'intensité des bande du puit F3 et F4 traduit bien la réussite de l'extraction du lysozyme suite à l'élimination partiel des protéines du blanc d'œuf.

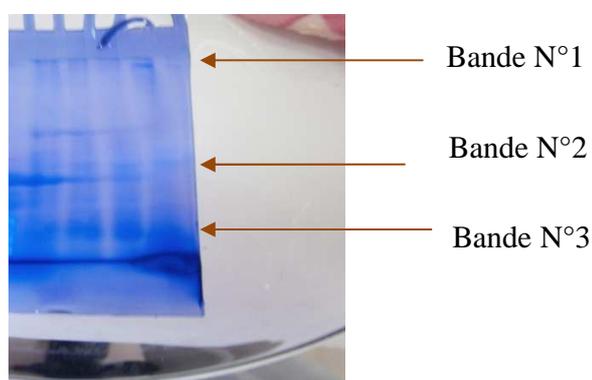


Figure 14 : Présentation du gel d'électrophorèse

4- Etude de l'activité antibactérienne du lysozyme

a-Méthode diffusion en Puits

Nous avons étudié l'activité antibactérienne du lysozyme du blanc d'œuf sur des souches bactériennes *S. aureus* et *E. coli* respectivement en tant que représentant des bactéries à gram positif et gram négatif, par la méthode de diffusion en puits sur un milieu gélosé Muller Hinton (MH).

L'activité antibactérienne du lysozyme exprimée en milligrammes par unité de volume (ml) est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant le lysozyme. Nous avons considéré une souche sensible si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 10 mm ; résistante si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 10 mm. La sensibilité est intermédiaire si le diamètre est égal à 10 mm.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne, ont permis de constater ce qui suit :

La souche microbienne de *S. aureus* testée est sensible à l'action inhibitrice des différents extraits du lysozyme obtenue après ajustement du pH à 10,7 et précipitation. L'effet antibactérien du lysozyme est plus important avec l'échantillon non dilués et il diminue avec les dilutions successives. Les résultats des diamètres sont résumés dans le **tableau 17**.

Les diamètres d'inhibition mesurés sont respectivement de 1,8 cm pour le lysozyme contenu dans le culot à 20% et de 3,4cm pour le culot à 40%. *S. aureus* est une souche poly-résistante aux antibiotiques et l'activité inhibitrice du lysozyme sur cette souche est excellente avec la solution mère et la dilution à 75%. Par contre, *E. coli* est totalement résistante aux différentes dilutions. Cette insensibilité s'explique par le fait que le lysozyme attaque beaucoup plus la paroi des bactéries Gram+(**Fig.15**). Les bactéries à Gram- comme *E. coli*, nécessitent un traitement préalable à la chaleur ou à l'EDTA ce qui explique donc leur insensibilité. Les résultats du test avec l'hexalyse révèlent une sensibilité des souches vis-à-vis du lysozyme du comprimé. Mais cette sensibilité est beaucoup moins importante que celui du lysozyme extrait avec le culot correspondant à l'extrait de l'éthanol à 40%. Cette différence de sensibilité s'explique par la nature du solvant, celui de l'hexalyse est constitué d'un tampon Tris-Hcl ; alors que dans l'échantillon de 40% la présence de l'éthanol a certainement favorisé la diffusion du lysozyme. L'éthanol n'a aucun effet sur la résistance ou la sensibilité des souches étudiées dans le milieu Mueller Hinton. L'éthanol entre dans la composition de plusieurs préparations thérapeutiques (Brehon et al 2000). Son efficacité dans l'étude de l'activité antibactérienne est confirmée (Drago et al 2000). Pour cette raison, L'éthanol a été utilisé comme solvant pour l'étude de l'activité antibactérienne.

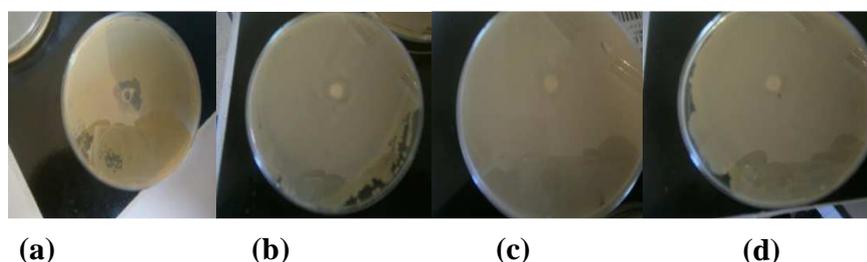


Figure 15 : Diamètre d'inhibition du lysozyme sur *S.aureus* (a) ; du comprimé sur *S.aureus* (b) ; du lysozyme sur *E. coli* (c); du comprimé sur *E. coli* (d)

Tableau 17 : Diamètre d'inhibition des souches testées par le lysozyme

Souches Bactériennes	Tube 1	Tube2	Diamètre d'inhibition
<i>Escherichia Coli</i> +Lys à 20%	-	-	-
<i>Escherichia Coli</i> +Lys à 40%	-	-	-
<i>Staphylococcus A.</i> +Lys à 20%	+	+	1,5cm ; 1,8cm
<i>Staphylococcus A.</i> +Lys à 40%	+	+	3,8cm ; 2,4cm
<i>Staphylococcus A.</i> +Hexalyse	+	+	1,3cm ; 1,4cm
<i>Escherichia Coli</i> +Hexalyse	-	-	-

b- Turbidimétrie

L'effet de deux paramètres sur la lyse de *S. aureus* par le lysozyme a été étudié. Cette étude a pour but d'arriver à mettre en place une procédure standard pour la détermination des paramètres critiques qui influent négativement sur la croissance de *S. aureus*. Le premier test réalisé a pour objectif de déterminer l'effet de la concentration du principe actif "le lysozyme" sur la lyse de *S. aureus*. Les résultats obtenus sont consignés dans les **tableaux 18 et 19**.

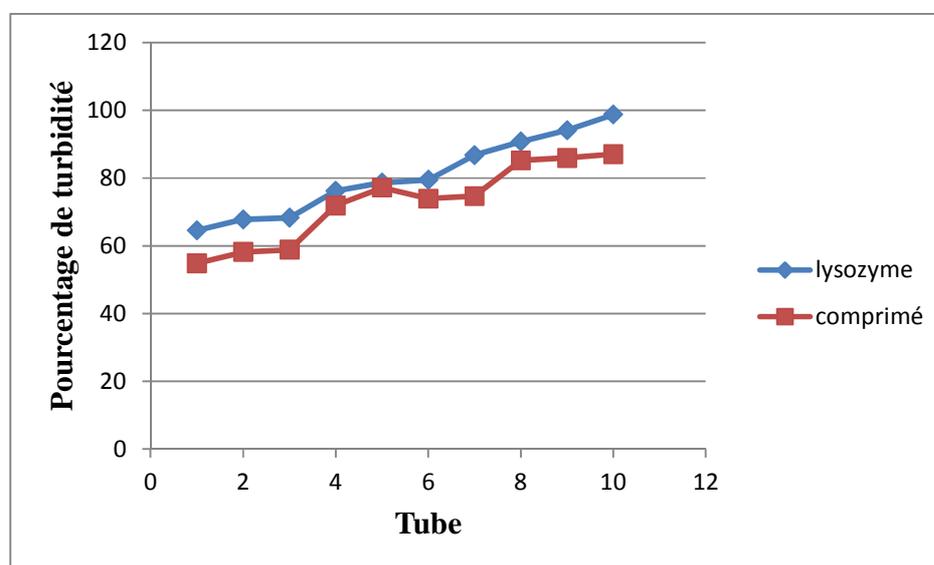
Tableau 18: Absorbance des échantillons (Lysozyme à 40%) pour la mise en évidence de l'effet de la concentration

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO	0,390	0,354	0,349	0,262	0,235	0,226	0,146	0,102	0,065	0,014
% de diminution de la turbidité	64,54	67,78	68,27	76,18	78,63	79,45	86,72	90,72	94,09	98,72

Tableau 19: Absorbance des échantillons (comprimé) pour la mise en évidence de l'effet de la concentration

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
DO	0,497	0,460	0,453	0,309	0,295	0,287	0,279	0,163	0,155	0,143
% de diminution de la turbidité	54,81	58,18	58,81	71,90	77,18	73,90	74,63	85,18	85,90	87

Une augmentation presque linéaire dans le pourcentage de réduction de la turbidité de 64% à 98% a été observée avec l'augmentation de la concentration du lysozyme, de 0,13 mg/ml à 1,3 mg/ml. Dans ce cas de figure, la concentration d'activité enzymatique qui permet une telle réduction du pourcentage de turbidité (98%) est de 12 UI.mL^{-1} . Comme le montre la **figure 16**, pour une suspension cellulaire de 10^8 de *S. aureus* cellules/ml qui a été traité avec l'hexalyse, le pourcentage de réduction de la turbidité est passé de 54,81% à 87% pour une gamme de concentration allant de 0,5 mg/ml à 5 mg/ml. Soit une concentration de l'activité enzymatique maximale qui est égale à $10,63 \text{ UI.mL}^{-1}$.

**Figure 16 :** Effet de la concentration sur la lyse de *S.aureus*

Concernant le deuxième test qui a pour objectif de mettre en évidence l'effet de la lyse induit par le lysozyme en fonction du temps et de le comparer avec celui du comprimé.

Les résultats obtenus sont consignés dans les **tableaux 20 et 21**.

Tableau 20: Absorbance des échantillons (lysozyme 40%) pour la mise en évidence de l'effet du temps

Temps (min)	10	20	30	45	60	90	120
DO	0,789	0,775	0,081	0,073	0,070	0,055	0,037
% de diminution de la turbidité	28,27	29,54	92,63	93,36	93,63	95	96,63

Tableau 21: Absorbance des échantillons (comprimé) pour la mise en évidence de l'effet du temps

Temps (min)	10	20	30	45	60	90	120
DO	0,432	0,400	0,375	0,351	0,280	0,255	0,151
% de diminution de la turbidité	63,69	66,38	68,48	70,50	76,47	78,57	87,31

Les résultats obtenus avec les échantillons traités avec le lysozyme montrent une réduction brusque de la turbidité qui passe de 28% à 92% après un temps d'incubation de 10 mn à 30 mn. Après ce temps de 30 mn peu de changement dans le pourcentage de turbidité a été observé (voir **Figure 17**).

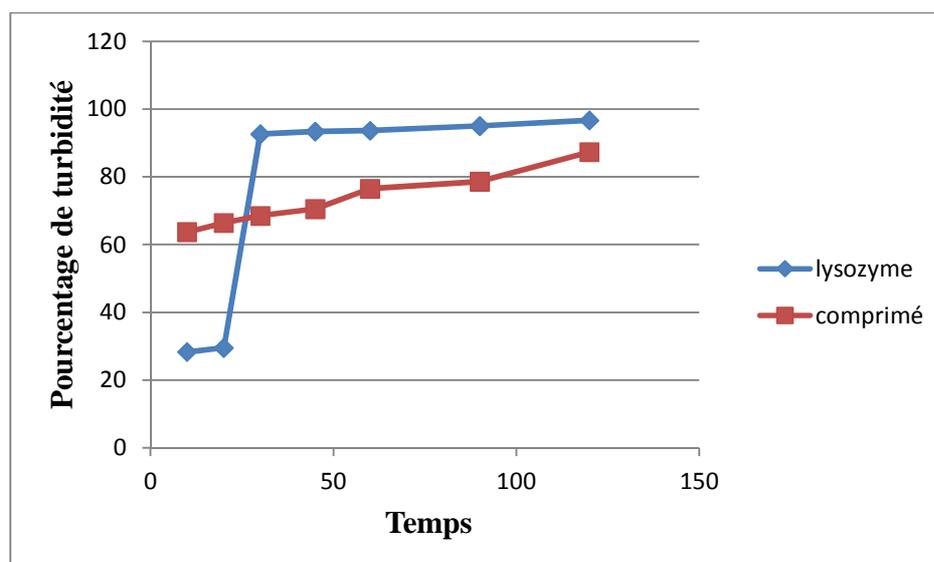


Figure 17 : Effet du temps sur la lyse de *S.aureus*

Pour la suspension de *S. aureus* qui a été testé avec l'hexalyse on observe une diminution linéaire de la réduction de turbidité qui varie de 63,69% à 87,31% après un temps d'incubation de 10 mn à 120 mn. Ces résultats démontrent belle et bien que le lysozyme du blanc d'œuf et celui de l'hexalyse permettent la destruction du peptidoglycane de la paroi bactérienne de *S. aureus* en catalysant l'hydrolyse de la liaison osidique qui relie la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique.

D'un autre côté, les différences qui ont été observés avec les valeurs de pourcentage de diminution de la turbidité des souches traités avec le lysozyme extrait du blanc d'œuf et celui de l'hexalyse pourrait s'expliquer par le non-respect des conditions optimale de stockage du médicament "hexalyse". En effet une augmentation de la température pourrait nuire à la stabilité du lysozyme du médicament et par conséquent sur son activité catalytique.

Conclusion et Perspectives

Aujourd'hui, même si le lysozyme reste encore moins connu du public, elle est néanmoins l'une des protéines les plus valorisées au monde surtout dans le domaine médicale où elle constitue une source fiable des principes actifs de plusieurs médicaments.

Cette étude a pour objectif, d'extraire dans un premier lieu le lysozyme présent dans le blanc d'œuf de poule par précipitation à l'éthanol à 20 et 40%, dans un deuxième lieu de vérifier l'efficacité de l'extraction grâce à une électrophorèse verticale et enfin de tester son activité par une méthode de diffusion en puits et par turbidimétrie sur des souches bactériennes telles que *Staphylococcus A.* et *Escherichia C.* connu pour leurs pouvoirs pathogènes.

Les résultats obtenus ont révélés la présence d'une quantité importante de lysozyme dans le blanc d'œuf. Néanmoins, la proportion de lysozyme présente dans l'échantillon extrait avec de l'éthanol à 40% est supérieure à celle obtenue à 20%. Les concentrations respectives des protéines sont de 4,11g/l et 3,2 g/l. Après réajustement du pH au point isoélectrique du lysozyme la concentration protéique mesuré est de 1,31g/l pour le culot à 40% d'éthanol et 0,93 g/l pour le culot à 20% d'éthanol. L'électrophorèse a révélé non seulement la présence du lysozyme mais aussi d'autres protéines telle que le Conalbumine et l'ovalbumine.

Les tests microbiologiques effectués dans ce travail sont très promoteurs vu que le lysozyme a révélé une activité antibactérienne sur *S. aureus* alors que chez *E. coli*, une résistance au lysozyme a été observée. Cette résistance vis-à-vis du lysozyme résulte du fait que *E. coli* est une bactérie à Gram- et donc nécessite un traitement préalable avec l'acide, de l'EDTA, etc....

Les tests de turbidimétries révèlent également un pourcentage de diminution de turbidité en faveur des souches traités avec le lysozyme extrait du blanc d'œuf qu'avec ceux de l'hexalyse. Ces valeurs sont respectivement de 98% pour le lysozyme contre 87% pour l'hexalyse. Le temps d'incubation est estimé à 30mn pour l'inhibition de 92% des souches traités avec le lysozyme du blanc d'œuf.

Bien qu'ayant une valeur nutritionnelle élevée, l'œuf dans son entité a une mauvaise image à cause de la présence de cholestérol dans le jaune. Cette image tant de plus en plus à disparaître et disparaîtra totalement d'autant plus que les recherches ont prouvé que les composants de l'œuf, plus particulièrement le lysozyme peut avoir un grand intérêt.

En perspective, une purification par chromatographie échangeuse de cation du lysozyme permettrait d'étudier les propriétés physico-chimiques de cette protéine et d'élargir son potentiel ou d'améliorer ses applications déjà connues. Nous sommes persuadés que le lysozyme est loin d'avoir livré tous ses secrets et que les années avenir pourraient voir un « boom » de ses applications.

Résumé

Le lysozyme est une enzyme capable de détruire la paroi bactérienne. Cette lyse est beaucoup plus efficace sur les bactéries à Gram+ alors que celles à Gram- nécessitent un traitement préalable à l'acide ou à l'EDTA. L'objectif de notre étude est d'extraire d'une part le lysozyme présent dans le blanc d'œuf par précipitation avec de l'éthanol à 20% et à 40 %, d'apprécier l'extraction grâce à une électrophorèse verticale, et d'autre part d'effectuer sa quantification par la méthode de Bradford et enfin de tester son activité antibactérienne sur des souches pathogènes ; à savoir *Staphylococcus A.* et *Escherichia C.* La proportion de lysozyme présente dans le culot de l'échantillon extrait avec de l'éthanol à 40% est la plus élevée. La concentration protéique mesurée est de 1,31g/l. L'électrophorèse a révélé pour sa part la présence du lysozyme ; mais aussi d'autres protéines telles que le Conalbumine et l'ovalbumine. Cette étude a révélé la présence en quantité importante du lysozyme dans le blanc d'œuf. Néanmoins, l'extraction avec de l'éthanol à 40% a été plus efficace puisqu'elle nous a permis d'observer une quantité de lysozyme plus élevée. Le test de l'activité antibactérienne du lysozyme est réalisé sur gélose Muller Hinton par la méthode de diffusion en puits et par turbidimétrie. Ces expériences ont montrés d'une part, une sensibilité remarquable de *S. aureus* vis à vis du lysozyme alors qu'*E. coli* a affiché une résistance à cette protéine. Aussi, il faut noter que le pourcentage turbidimétrique le plus élevé a été observé avec le lysozyme précipité à 40% d'éthanol soit 98%. Le temps d'incubation nécessaire pour l'inhibition de 92% des souches traités avec le lysozyme du blanc d'œuf est estimé à 30mn.

Les mots clés

Hexalyse, lysozyme, méthode de Bradford, paroi bactérienne, *Staphylococcus A.* et *Escherichia C.*

Abstract

Lysozyme is an enzyme capable of destroying the bacterial wall lysis. This is much more effective on Gram + bacteria, while Gram- ones require prior treatment with acid or EDTA. The aim of our study is to extract on one hand lysozyme present in egg white by precipitation with 20% ethanol and 40%, on the other hand to perform its quantification by the Bradford method and finally to test its antibacterial activity on pathogenic strains; namely *Staphylococcus A.* and *Escherichia C.* Lysozyme proportion in the base of the sample extracted with 40% ethanol was the highest. Measured protein concentration was 1,31g/l. Electrophoresis has revealed the presence of Lysozyme; but other proteins also, such as Conalbumine and I'ovalbumine. This study revealed the presence in large quantities of lysozyme in egg white. However, the precipitation with 40% ethanol was more effective because it enabled us to observe the highest amount of lysozyme. The test of antibacterial activity of lysozyme is performed on Muller Hinton agar by well diffusion method and turbidimetrically. These experiments showed a remarkable sensitivity of *staphylococcus A.* towards lysozyme while *Escherichia C.* displayed a resistance to this protein. Also, it is worth noting that the highest [] Percentage that was observed with the 40% precipitated ethanol, that is, 98%. The necessary incubation time for the inhibition of 92% of strains treated with egg white Lysozyme is estimated at 30 minutes.

Key words

Lysozyme, Bradford method, bacterial wall, *Staphylococcus* and *Escherichia A. C*

حالياً، وتطور التكنولوجيا قد وضعت البروتينات، وخاصة الموجودة في زلال البيض (الليزوزيم) في قلب البحث العلمي.

الليزوزيم هو انزيم القادر على تحليل الجدار البكتيري. ويعتبر أكثر فعالية عند بكتيريات غرام (+) اما البكتيريات غرام (-) تحتاج إلى معالجة مسبقة مع حمض أو EDTA.

والهدف من دراستنا هو استخراج الليزوزيم الموجود في زلال البيض عن طريق الترسيب مع 20% من الإيثانول و 40%، وتحديد كميته بطريقة برادفورد وأخيراً لاختبار النشاط المضاد للبكتيريات على السلالات الممرضة وهي المكورات العنقودية *Eshérichia coli* والقولونية *Staphylococcus aureus*

وكشفت هذه الدراسة وجود كميات كبيرة من الليزوزيم في زلال البيض. ومع ذلك يبقى الترسيب مع 40% من الإيثانول أكثر فعالية لأنه مكننا من استخراج كمية كبيرة من الليزوزيم.

لاختبار النشاط المضاد للبكتيريا للليزوزيم المدروس باستخدام جلوز مولر هينتون بواسطة طريقة الانتشار أظهرت هذه التجارب حساسية ملحوظة من المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus*. اما السلالة الأخرى أظهرت مقاومة لهذا البروتين.

الكلمات المفاتيح

الليزوزيم، طريقة برادفورد، الجدار البكتيري، المكورات العنقودية والقولونية *A. C*

Annexe 01

1-Matériels utilisés au laboratoire :

- Agitateur magnétique
- Bécher en verre (1000ml, 400ml, 250ml, 100ml)
- Balance de précision
- Bain marie
- Burette
- Bec bunsen
- Boites de pétri
- Cylindre Gradué de 100ml
- Centrifugeuse
- Electrophorèse
- Eprouvette
- Flacon de (120ml, 500ml)
- Hanse de Platine
- Incubateur
- Micropipette
- Papier buvard
- PH mètre
- Spectrophotomètre
- Tubes à essais
- Tube en plastique de 45ml

2-Les réactifs :

- Acide Acétique : 100ml
- Bleu de Coomassie : 1g
- Ethanol: 1l
- Glycine: 10g
- Mercaptoéthanol: 5g
- NAOH: 10g
- Nacl : 10g
- SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium)

-TRIS-Hcl: 1g

-Serum Albumine Bovine (BSA) 2g

3- Les Milieu de cultures

-Gélose Nutritive

-Gélose Muller-Hinton

-Agarose

-Tryptone

-Extrait de viande

Annexe 02

1- Préparation du Réactif de Bradford

Dissoudre 50 mg de bleu de Coomassie G250 dans 25 ml d'éthanol à 95%. A cette solution, ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85% (p / v). Diluer la solution concentrée avec 425 ml d'eau distillée (volume total 500 ml) puis filtré sur papier Wattman N°2.

➤ Composition du Réactif de Bradford

- Bleu de coomassie G250.....50mg
- Ethanol à 95%.....25ml
- Acide Phosphorique(H₃PO₄) à 85%.....50ml
- Eau Distillée.....500ml

NB : conserver à l'abri de la lumière à 4°C.

➤ Composition de la solution mère Stock

- BSA.....100mg
- Eau Distillée.....50ml

Tableau 14 : Absorbance des échantillons de la Gamme Etalon (Volume Totale=3,1ml)

N° du Tube	[BSA] des Dilutions (mg/ml)	Absorbance mesurée
1(Blanc)	0	-
2	0,25	0,0092
3	0,5	0,0146
4	1	0,0249
5	1,4	0,0351

2-Traçé de la courbe d'étalonnage

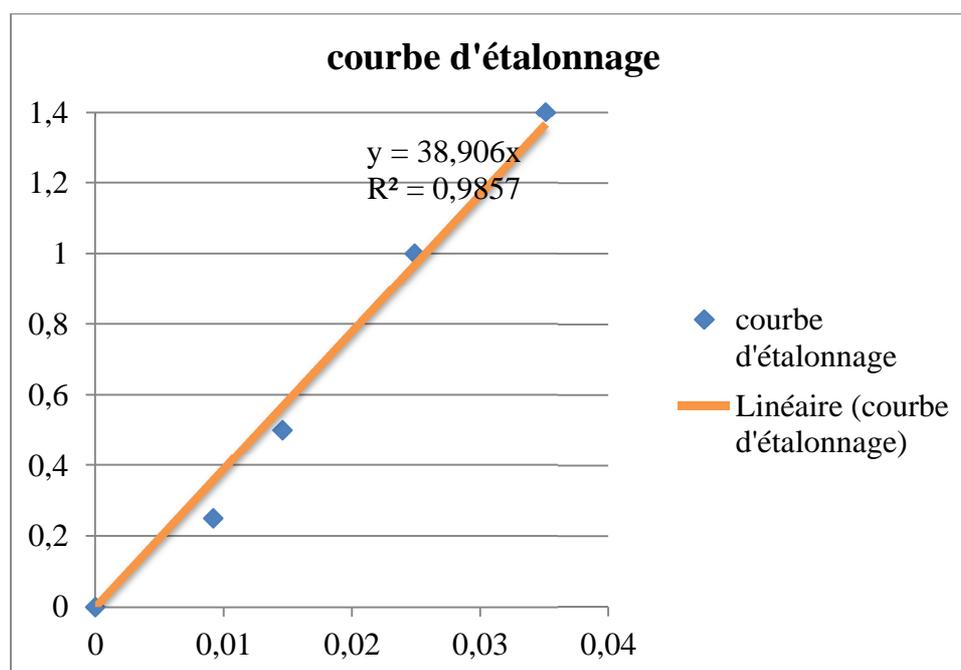


Figure 21 : Courbe d'Etalonnage [protéine]=f(Absorbance)

3- les autres solutions préparées pour l'électrophorèse

❖ Solution SDS 10%

SDS.....1g
 H₂O.....10ml

❖ Solution persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium.....1gou 1ml
 H₂O.....10ml

❖ Tampon de dépôt : Tris 1M pH= 8

Tris.....0,4g
 Eau distillée.....100ml } Ajuster le pH à 8

A 8 ml de ce tampon, ajouter :

Glycerol.....1ml
 SDS.....0,1g
 EDTA (0,5M).....1,8g
 B-mercaptoéthanol.....0,5ml
 Bleu de bromophénol.....0,1g

❖ Solution A : Acrylamide-bis-acrylamide

Acrylamide.....	3g
Bis-acrylamide.....	0,8
Eau distillée.....	100ml

❖ Solution B : Tampon Gel de Séparation (Tris-Hcl1, 5M ; pH 8,8)

Tris base.....	31,3g
H2O.....	150ml
Hcl 10N.....	pH 7, 8

❖ Solution C : Tampon gel de concentration (Tris-Hcl 0,5M ; pH 6,8)

Tris-base.....	3g
H2O.....	150ml
Hcl10N.....	pH 8,8

❖ Solution D : Tampon d'électrophorèse(Tris0, 025M ; Glycine 0,192M ; SDS01% ; pH8, 3)

Tris base.....	4g
Glycine.....	12,4g
SDS.....	1g
H2O.....	1000ml

Liste des références bibliographiques

- 1- Bernard A. ,2001 : les enzymes biocatalyseurs protéiques .éd .ellipse :23, 28, 101p.
- 2- Beintema J. J.; Terwisscha van Scheltinga. A. C., 1996: Plant lysozymes Extraction, 75:75-86.
- 3- Bloomfield A. L., 1919: The fate of bacteria introduced in the upper air passages, 12:317-322.
- 4- Brehon S., et al. 2000. L'alcool dans les médicaments : analyse des risques et de l'information des spécialités administrées par voie orale ou injectable. J Pharm Clin 19 : 32-48.
- 5- Dacosta Y. , 1993: "Extraction Process", 1080, 4 748.
- 6- Daeschel M.A., Bruslind L., Clawson J., 1999: Application of the enzyme lysozyme in brewing Technology. Q., 36, 2, 219-222.
- 7- Drago, L., Mombelli, B., De Vecchi, E., Fassina, M. C., Tocalli, L. & Gismondo, M. R. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. J Chemother 12, 390–395.
- 8- Dubois-Prevost., 1970 : Aliment Yie; 58, 4449
- 9- Fastrez J, 1996. Phage lysozymes Extraction, 75:35-64.
- 10- Fleming A., 1922: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, 93,306,317p.
- 11- Fouquier Hélène; Lenka Grunclov; Václav Hysps; Petr Kopásek, 2003: Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata* (the sequence, phylogeny and post-feeding regulation; Developmental & Comparative Immunology Volume 27), Pages 651-660.
- 12- Hamon Véronique, 2004: Influence de la Pression sur la Dynamique du Lysozyme, éd : université D'Orléans, 138 :25-28.
- 13- Høltje J. V, 1996: Bacterial lysozymes Extraction, 75:65-74.
- 14- Hultmark D., 1996: Insect lysozymes Extraction, 75:87-102.
- 15- Jolles P., Jolles J., 1984: What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday, 165-189.

- 16-** Jones J. W.; Jones B. T.H. K.; 1999: Serum Lysozyme activity can differentiate infection from rejection in organ transplant recipients, 84:134-137.
- 17-** Karle H.; Hansen N. E., 1974: Lysozyme and leukemia Diagnostic, prognostic and pathogenic significance of lysozyme measurements, 136:2451-2455.
- 18-** Laemmli U. K., 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 227, 680 – 685.
- 19-** Laschtschenko P., 1909: Über die keimtötende und entwicklungshemmende Wirkung von Hühnereiweiß. Z. Hyg. Infekt. Krankheiten, 419-426.
- 20-** Leśnierowski G., 1997: Isolation of lysozyme from hen egg white using the crystallization, ultrafiltration and ion exchange methods.
- 21-** Liu M., Zhang S., Liu Z., Li H. and Xu A. , 2006 : Characterization, organization and expression of Amphi Lys C, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* , 367:110-117.
- 22-** Meyer K. and Hahnel E., 1946: The estimation of lysozyme by a viscosimetric method, 163, 723-732.
- 23-** McKenzie H. A., 1991: Lysozyme and α -lactalbumin: structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry*, 41, 173-315.
- 24-** Michael Nigen, 2008 : Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme ; mécanismes, structures et stabilité *Biomolécules*. Ed : Agro campus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes.
- 25-** Permyakov E. A.; Berliner L. J., 2000: α -Lactalbumin structure and function. *FEBS Letters*, 473.
- 26-** Proctor A.; Cunningham F.E., 1988: The chemistry of lysozyme and its use as a food Preservative and a pharmaceutical, 359, 395.
- 27-** Salton M. R.J.; John Wiley, 1960: *Microbiological cell walls*, 269-274.
- 28 -** Vanderlin R. E., 1981: Urinary enzyme measurements in the diagnosis of renal disorders, 11:189-201.

Sites Web

- [1] : [Http : /www.bactérioblog.over-blog.com-12387707.html](http://www.bactérioblog.over-blog.com-12387707.html) (structure de la cellule bactérienne et coloration de Gram) ; consulté le 01-02-2015.
- [2] : <http://www.bacterio.cid.fr/bacdico/bacteriogène/structure-html#morphologie> (cellule bactérienne) ; consulté le 08-03-2015.
- [3] : <http://www.ebiologie.fr/cours/5/7/> (la-paroi-bactérienne) ; consulté le 17-02-2015
- [4] : www.Antibiotique.eu/leur-fonctionnement.html ; consulté le 18-04-2015
- [5] : <http://www.ebiologie.fr/cours/5/7/> (la-paroi-bactérienne) ; consulté le 17-02-2015
- [6] : <http://fr.m.wikipedia.org/wiki/lysozyme> (lysozyme) consulté le 08-02-2015.
- [7] : [http : www.google.com/search ?q=Proctor et Cunningham. Client=ms-android-lge&gws-rd=cr&oq](http://www.google.com/search?q=Proctor+et+Cunningham.+Client=ms-android-lge&gws-rd=cr&oq) (biotechnologie sanitaire) ; consulté le 17-02-2015.
- [8] : <http://www.inra.fr/Grand-public/Alimentation-et-santé/Tous-les-dossiers> (blanc d'œuf contre les bactéries) ; consulté le 21-02-2015.
- [9] : <http://www.wikipedia.com> (protéine) ; consulté le 09-03-2015.
- [10] : <http://www.google.com/search?q=duboisprevost+lysozyme&btnG=&hl=fr&client=ms-android-lge&gws-rd=cr> (Utilisation Actuelle et Potentielle des Protéines du Blanc d'œuf de poule) ; consulté le 02-03-2015.
- [11] : <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/produit/90082>. Consulté le 12-04-2015.