

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité/Option: Qualité de produit et sécurité alimentaire.
Département: Biologie

Thème :

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule :Etude bibliographique

Présenté par :

Barkaoui Zineb

Benslimane Maroua

Devant le jury composé de :

Présidente:	Mme Torche	M.C.B	Université de Guelma
Examineur :	Mr Mezroua	M.A.A	Université de Guelma
Encadreur :	Mr Mokhtari	M.C.B	Université de Guelma

Juin 2018

Remerciements

En premier, nous dédions tous nos remerciements à dieu ALLAH qui nous a donné la volonté et le courage pour avoir réalisé ce travail, ainsi qu'aux personnes qui nous ont apporté leur aide.

La réalisation de ce travail a été possible grâce à la collaboration de plusieurs personnes, c'est l'occasion de les remercier et de leurs avouer nos profondes reconnaissances. Nous tenons à remercier notre encadreur monsieur « Mokhtari » et notre présidente de jury madame « Torche » et notre examinateur monsieur « Mezroua » sans oublier tous nos enseignants, les travailleurs de la faculté des SNV_ STU et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

On réserve enfin nos derniers remerciements aux gens qui nous aidées le près ou de loin pour réaliser ce travail.

Dédicace

*Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je
dédie le fruit de ce modeste travail :*

A mes parents ‘Amor et Fatima’ qui m’ont tout le temps aidée,

A mon mari ‘Hamza’ qui n’a jamais cessé de me soutenir,

A mon ‘bébé’ qui je l’aime plus que le monde,

A mes frères ‘Badis et Djalal’,

A ma petite sœur ‘Wafa’,

A ma tante Mounia et ses enfants Anwar et Amir.

A toute ma famille et ma belle-famille.

A mes chers amis : Zineb, Ahlem, Amira, Khawla, Radia.

*A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m’aiment, à tous
que j’aime, je dédie ce travail.*

Maroua

Résumés

Egg white contains various proteins including lysozyme

Alexander Fleming identified the first enzyme capable of degrading peptidoglycan and causing lysis of the bacteria. For this reason, it was called lysozyme.

Our work is part of a bibliographic research of chicken egg white lysozyme. This study aims to:

A presentation of egg white and its composition, a description of the structure of lysozyme and its mechanism of action on bacterial walls and actual uses is potential in different industries and a discussion of extraction methods, purifications and assays of proteins.

Key words: egg white, bacterium, lysozyme, extraction, purification.

Le blanc d'œuf contient diverses protéines dont le lysozyme

Alexander Fleming identifia la première enzyme capable de dégrader le peptidoglycane et de causer la lyse de la bactérie. Pour cette raison, elle fut appelée lysozyme.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une recherche bibliographique de lysozyme de blanc d'œuf de poule. Cette étude a pris pour objectif :

Une présentation du blanc d'œuf et de sa composition, une description de la structure du lysozyme et de son mécanisme d'action sur les parois des bactéries et des utilisations effectives est potentielle dans les différentes industries et une discussion des méthodes d'extractions, de purifications et de dosages des protéines.

Mots clés : blanc d'œuf, bactérie, lysozyme, extraction, purification.

يحتوي بياض البيض على العديد من البروتينات بما في ذلك الليزوزيم.

حدد ألكسندر فليمنج أول إنزيم قادر على تحلل البيتيوغلينان وتسبب تحلل البكتيريا. لهذا السبب، كان يطلق عليه الليزوزيم.

عملنا هو جزء من بحث ببليوغرافي عن الليزوزيم لبياض بيض الدجاج. يهدف إلى:

عرض لبياض البيض وتكوينه، وصف لبنية الليزوزيم وآلية عملها على الجدران البكتيرية والاستخدامات الفعلية المحتملة في الصناعات المختلفة ومناقشة طرق استخراج، تنقية وفحص البروتينات.

الكلمات المفتاحية: بياض البيض، البكتيريا، الليزوزيم، الاستخلاص، التنقية.

Liste des abréviations

AA : Acides Aminés

AJR : Apports Journaliers Recommandés

Asp : Aspartate

CAMP :Cationic antimicrobial peptides

Da :Dalton

DAP : A diaminopimélique

Glu : Glutamate

HEWL : Hen egg white lysozyme

KDa : kilodalton

LPS : lipopolysaccharides

LYS: lysozyme

NAG : N-acetylglucosamine

NAM : N-acétylmuramique

OVAX : protéine X apparentée à l'ovalbumine

PG : Peptidoglycane

pI : (Point isoélectrique)

S. aureus : Staphylococcus aureus

SIC : (streptococcal inhibitor of complément)

TA : (Acides téichoïques)

UV : Ultra –Violette

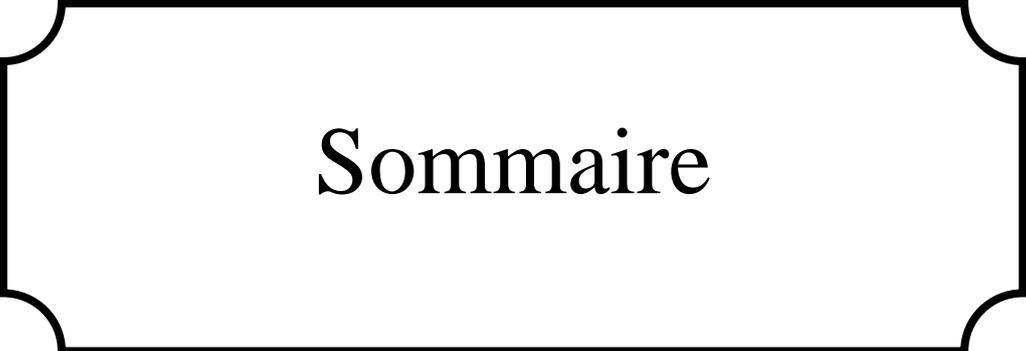
WTA : Wall teichoic acids

Liste de Figures

Figure 1 : Représentation schématique des différents compartiments de l'œuf.....	4
Figure2 : les composants de coquille d'œuf.....	7
Figure3 : Structure primaire de lysozyme.....	14
Figure 4 : Structure tridimensionnelle du lysozyme	15
Figure 5 : Structure du PG et site de clivage du lysozyme.....	16
Figure6 : le site actif de lysozyme de poule.....	16
Figure 7 : Séquence de réaction de glycosyle hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique.....	17
Figure 8 : Structure et modification du PG.....	19
Figure 9: représentation schématique d'une cellule bactérienne.....	23
Figure 10: représentation schématique de la membrane cytoplasmique d'une cellule bactérienne	24
Figure 11: représentation schématique du peptidoglycane.....	26
Figure 12 : Représentation de la structure de paroi Gram+.....	27
Figure13 : Représentation schématique de la structure de paroi Gram-.....	28
Figure 14 : Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme.....	31
Figure 15 : Les différents types d'ampoule à décanter.....	34
Figure 16 : Précipitation au sulfate d'ammonium	36
Figure 17 : Schéma générale d'une dialyse	36
Figure 18 : La membrane millipore.....	38
Figure 20 : La filtration par gravité.....	38
Figure 21 : La filtration sous vide	39

Liste de tableaux

Tableau 1: Composition nutritionnelle de 100g d'œuf.....	3
Tableau 2 : Composition du jaune d'œuf de poule.....	4
Tableau 3 : Principales protéines du blanc d'œuf	6
Tableau 4. Principales protéines globulaires constituant le blanc d'œuf de poule.....	7
Tableau5 : Principales caractéristiques de lysozyme.....	14
Tableau 6 : Structures secondaires de lysozyme.....	15
Tableau 7 : Mécanisme proposé de résistance aux CAMP chez S. aureus.....	20
Tableau 8 : la composition chimique de paroi chez les Gram+ et les Gram-.....	25



Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre 1 : les œufs de poule

I. Caractéristiques des œufs	03
II. Structure et composition de l'œuf.....	03
II.1 Le jaune	04
II.2 La membrane vitelline.....	05
II.3 La coquille.....	05
II.4 Le blanc.....	05
III. Les défenses de l'œuf.....	07
III.1 Les défenses physiques de l'œuf.....	07
III.1.1 La coquille.....	07
III.1.2 L'albumen.....	08
III.1.3 la membrane vitelline.....	08
III.2 Les défenses chimiques de l'œuf.....	08
III.2.1 Le pH du blanc.....	08
III.2.2 activités biologiques de protéines du blanc d'œuf.....	08
III.2.2.1.Activités antivirales.....	08
III.2.2.2 Activités antiprotéasiques.....	10
III.2.2.3 .Activités immuno-modulantes.....	10
III.2.2.4 Activités anti-hypertensives.....	11
III.2.2.5 Fixations spécifiques.....	11

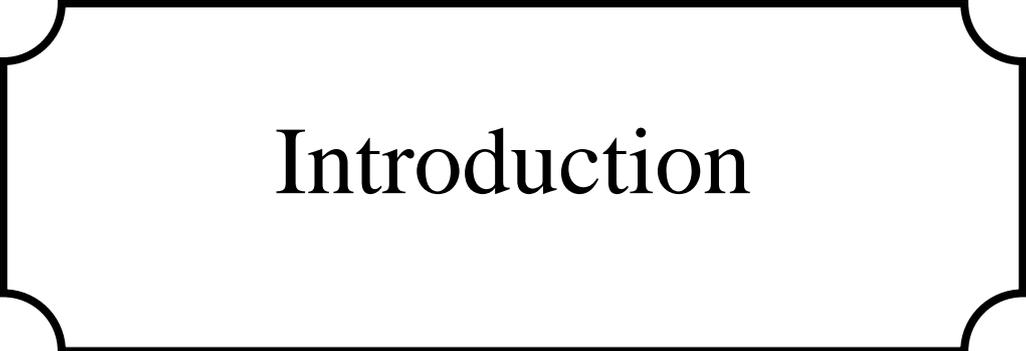
Chapitre 2 : Le lysozyme

I. Les étapes importantes dans la découverte du lysozyme.....	12
II. Généralités.....	13
II.1 Les origines de lysozyme	13
II.2 Les différentes familles de Lysozymes.....	13
III. Caractéristiques de lysozyme.....	13
IV. Structures de lysozyme.....	14
IV.1 Structure primaire.....	14

IV.2 Les structures secondaires	15
IV.3 Structure tertiaire.....	15
V. Mécanisme d'action du lysozyme.....	15
V.1 Le site actif de Lysozyme.....	16
V.2 Action du lysozyme sur les bactéries.....	18
a) Bactéries à Gram positif.....	18
b) Bactéries à Gram négative.....	18
VI.2 Mécanismes de résistance contre le lysozyme.....	18
VI.2.1 Inhibition de l'action lytique du lysozyme	19
VI.2.2 Inhibition de l'action non lytique du lysozyme	19
VI.2.3 Inactivation du lysozyme.....	20
VII. Applications de lysozyme.....	21
VII.1 Dans le domaine Pharmaceutique.....	21
VII.1.1 Action anti inflammatoire :.....	21
VII.1.2 Action antibactérienne.	21
VII.2 Dans le domaine Agroalimentaire.....	22
Chapitre 3 : Les cellules bactériennes	
I. Définition d'une bactérie.....	23
II. Structure de la cellule Bactérienne	23
II.1.1. la composition chimique de membrane cytoplasmique.....	24
II.1.2. la composition chimique de la paroi.....	24
II.1.2.1 Elément structural de base : Peptidoglycane.....	25
II.1.2.2 Différences entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif.....	26
Chapitre 4 : les différentes méthodes d'extraction de protéines	
I. les techniques d'extraction.....	29
I.1 Généralités sur les méthodes d'extraction	29
I.1.1 Définition et principe	29
I.1.2 Critères de choix et préparation de la matière première.....	29
I.2 Méthodes d'extraction	30
I.2.1 Méthodes physique	30
I.2.1.1 Choc osmotique	30
I.2.2 Méthodes mécaniques	30
I.2.2.2 Broyage ou agitation avec des abrasifs.....	30

I.2.2.3 Bombe à disruption	30
I.2.2.4 Sonication.....	30
I.2.3 Extraction chimique	31
I.2.3.1 Extraction liquide-liquide	31
A) Extraction liquide-liquide discontinue.....	31
B)Extraction liquide-liquide continue.....	32
I.2.3.2 Extraction liquide-solide.....	32
II les techniques de purification.....	32
II.1 Généralités.....	32
II.1.1 Définition	32
II.1.2 Objectifs de la purification des enzymes.....	33
II.2 Moyens de purification.....	33
II.2.1. Méthode basée sur les différences de solubilité.....	33
II.2.1.1 Précipitation.....	33
II.2.2 Méthodes basées sur la taille des molécules.....	34
II.2.2.1 Dialyse.....	34
II.2.2.2 La centrifugation.....	35
II.2.2.3 Filtration	35
2. 1. 3. 4. Ultrafiltration.....	38
II.2.2 Méthodes basées sur les propriétés ioniques.....	38
II.2.2.1 Chromatographie	38
II.2.2.2 Electrophorèse	41
III. Méthodes de dosage des protéines.....	41
III.1.1 Méthodes physico-chimiques.....	41
III.1.1.Méthode de kjeldahl.....	41
III.1.2 Méthode de Biuret.....	42
III.1.3 Méthode de Lowry.....	42
III.1.4 Méthode de Bradford.....	42
III.2 Méthodes physiques.....	42
III.2.1 Spectrophotométrie Ultra –Violette (UV)	42
III.2.2. Fluorimétrie.....	43
III.2.3 Turbidimétrie.....	43
IV les techniques de conservation : Lyophilisation.....	44
Conclusion.....	45

Références bibliographiques.....	46
Références Web graphiques.....	51



Introduction

Introduction

La valorisation des composants de l'œuf, plus particulièrement des protéines est une voie nécessaire au développement de l'industrie des ovoproduits. Le blanc d'œuf de poule est une source naturellement riche en protéines présentant un intérêt prouvé ou potentiel en industrie agro-alimentaire et pharmaceutique ou dans les laboratoires de recherche. Le blanc d'œuf, également appelé albumen est composé d'environ 9,77 % à 10,67 % de protéines, 0,03% de lipides, 0,4 à 0,97% de sucres et 0,05 % de cendres le tout en solution dans l'eau (Nys et Guyot, 2011).

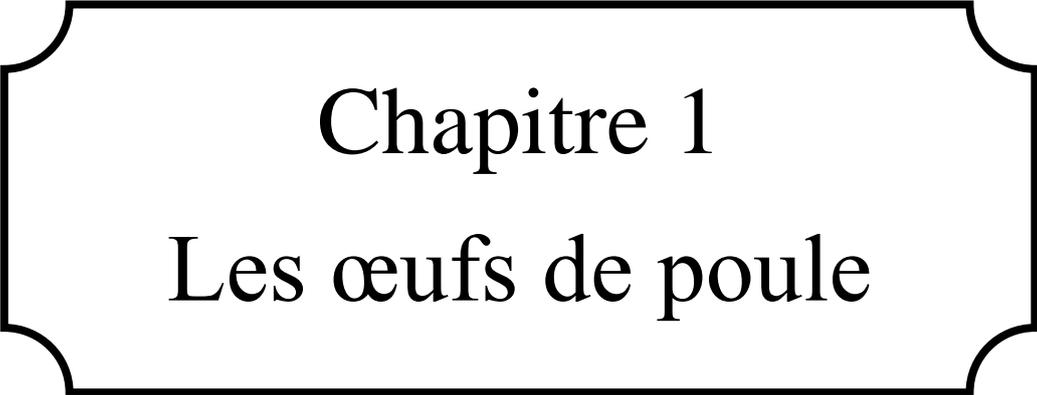
Le lysozyme est la protéine du blanc d'œuf est de loin la plus valorisée. La principale source industrielle de lysozyme est le blanc d'œuf de poule qui en contient 3 à 6 g/kg. Il s'agit d'une protéine qui a été découverte en 1922 par Alexander Fleming. Les propriétés enzymatiques de cette protéine lui confèrent une action bactéricide essentiellement sur les bactéries Gram+. En effet, Il s'agit d'une hydrolase acide (EC 3.2.1.17), Elle a la particularité de détruire la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des peptidoglycanes la constituant. Cette propriété a incité certains auteurs à la qualifier d'antibiotique corporel (Guerin-Dubiard, 2010).

Le lysozyme est une enzyme très répandue dans la nature. On le trouve chez l'homme dans la salive, les larmes, le sang, l'urine, le lait. On peut également le trouver dans le lait de vache, dans le blanc d'œuf de nombreuses espèces d'oiseaux et chez les végétaux. On le rencontre aussi chez certaines bactéries ou chez certains virus. Les larmes humaines constituent la source la plus riche actuellement connue ; cependant pour des raisons d'approvisionnement, la source la plus utilisée pour la purification et l'obtention de quantités importantes de lysozyme est le blanc d'œuf de poule qui en renferme une quantité non négligeable.

Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point, notamment par précipitation à pH alcalin en présence de NaCl, par chromatographie d'échange d'ions, par chromatographie d'affinité ou par ultrafiltration. Le lysozyme se présente donc aujourd'hui comme un antibactérien naturel de plus en plus utilisé (surtout au Japon et aux USA) comme conservateur naturel des aliments et en pharmacie. Sa grande stabilité thermique aux pH acides et le maintien de son activité en présence de sel et de sucres permettent la mise en jeu dans de nombreux domaines (Guillou, 1976).

Dans la synthèse qui sera présentée nous parlerons, après une présentation du blanc d'œuf et de sa composition, de la structure du lysozyme et de son mécanisme

d'action sur les parois des bactéries et des utilisations effectives est potentielles dans les différentes industries et nous discuterons des méthodes d'extractions, de purifications et de dosages des protéines.



Chapitre 1
Les œufs de poule

Chapitre 1 : Les œufs de poule

L'œuf est connu depuis toujours comme un aliment d'une grande valeur nutritive, facile à digérer, et très utilisé en diététique humaine ; il convient donc d'exposer les connaissances acquises sur l'œuf (Arzour et Lakehal, 2006).

I. Caractéristiques des œufs

L'œuf peut être défini comme une source peu énergétique de protéines parfaitement équilibrées et de lipides de très bonne digestibilité, assurant par ailleurs 20 à 30 % du besoin journalier de l'homme en de nombreux minéraux et vitamines (pour 100g d'œuf). Il est cependant déficient en glucides, calcium et vitamine C (Tableau1). Ces qualités font de l'œuf un aliment particulièrement indiqué pour les populations sensibles à l'équilibre de leur ration enfants, personnes âgées ou convalescentes. L'œuf est enfin la seul aliment d'origine animale capable d'être conservé à l'état cru pendant une période notable à température ambiante (Zaaboube et Benrahou, 2014).

Tableau 1: Composition nutritionnelle de 100g d'œuf [1]

Composition	Quantité	AJR*
Energie – Calories	145 kcal	7%
Protéines	12.3 g	25%
Glucides	0.7 g	0%
Sucres	0.685 g	1%
Lipides	10.3 g	15%
Sodium	128 mg	5%
Calcium	68.6 mg	9%
Vitamine C	0 mg	0%

AJR* : Apports Journaliers Recommandés

II. Structure et composition de l'œuf

L'œuf de poule est divisé en trois compartiments principaux : le jaune (ou vitellus), le blanc (ou albumen), et la coquille qui sert d'enveloppe protectrice. La membrane vitelline entoure le jaune et contient les constituants de ce dernier (figure 1).

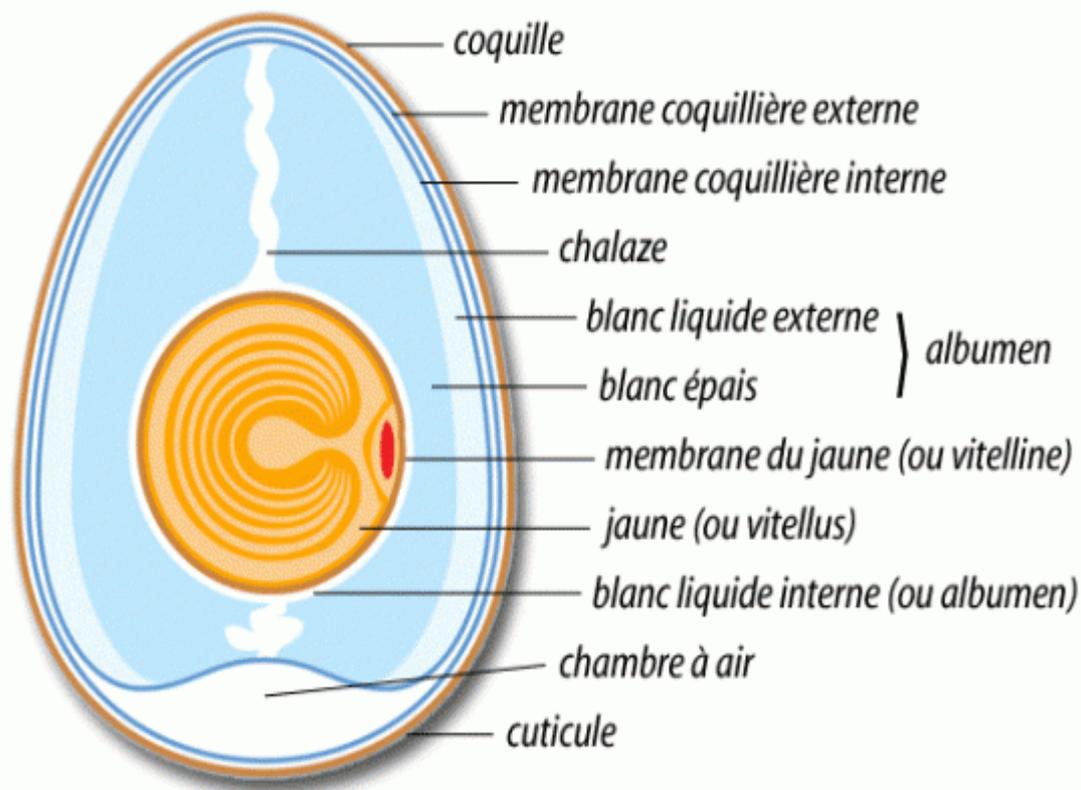


Figure 1 : Représentation schématique des différents compartiments de l'œuf[2].

II.1 Le jaune

Le jaune est composé de 51% d'eau, de 30% de lipides, de 16% de protéines et de 0,6% de glucides. Il est également riche en phosphore, contient la plupart du fer de l'œuf et renferme des vitamines (tableau 2) (Guerin-Dubiard et al, 2010).

Tableau 2 : Composition du jaune d'œuf de poule.

Constituants du jaune d'œuf	% de la matière sèche
Lipides	62,5
Protéines	33,0
Glucides	1,2
Cendres	3,5

II.2 La membrane vitelline

La membrane vitelline est de nature protéique ; elle entoure et contient le jaune. Elle a une épaisseur totale d'environ 10 µm et peut être divisée en trois couches: une couche médiane continue au centre comprise entre deux couches fibreuses que sont la couche interne (équivalent de la *zona pellucida* chez les mammifères) et la couche externe. Certains auteurs évoquent la présence d'une quatrième couche, la *zona radiata*, située sous la couche interne fibreuse (Figure1) (Nys and Guyot, 2011).

II.3 La coquille

La coquille, compartiment le plus externe de l'œuf, assure la protection de l'embryon contre les agressions extérieures. Elle est composée de 95% de matière minérale (carbonate de calcium sous forme de calcite), de 3,5% de matière organique (protéines, polysaccharides et protéoglycanes) et de 1,5% d'eau (Protais J, 1988).

II.4 Le blanc

Le blanc constitue une réserve nutritive de nature protéique pour l'embryon au cours de son développement. Il peut être divisé en quatre structures distinctes : le blanc liquide interne, le blanc épais, le blanc liquide externe et les chalazes.

- Le blanc liquide interne, au contact du jaune, est entouré par le blanc épais.
- Ce dernier, présentant l'aspect d'un gel, est en contact avec la coquille aux deux extrémités de l'œuf.
- Le blanc liquide externe est en contact direct avec les membranes coquillières.
- Les chalazes sont des fibres qui maintiennent le jaune en suspension au milieu de l'œuf.
- La différence de texture entre le blanc liquide et le blanc épais est liée à la répartition inégale d'une protéine majeure du blanc, l'ovomucine, cette dernière étant quatre fois plus abondante dans le blanc épais, lui donnant sa texture gélatineuse (Anton et al, 2010).

Le blanc est composé de 88% d'eau, de 10,6% de protéines et de 0,9% de glucides. Il contient également des minéraux (0,5%) et une faible quantité de

vitamines hydrosolubles, uniquement du groupe B. Depuis, quatre études protéomiques ont permis l'identification d'environ 240 protéines dans le blanc (Tableau 3) (Guerin-Dubiard et al, 2010).

Le blanc contient également les acteurs antimicrobiens les plus concentrés et les plus actifs qui assurent la défense moléculaire antimicrobienne principale de l'œuf. Le lysozyme, l'ovotransferrine ou les β -défensines sont les plus connus mais des études récentes ont mis en évidence l'ovoinhibiteur et l'OVAX (protéine X apparentée à l'ovalbumine) ainsi que de nombreux autres candidats antimicrobiens dans le blanc d'œuf (Bourin et al, 2011).

Tableau 3 : Principales protéines du blanc d'œuf (Protais J, 1988).

Protéines	%	Caractéristiques importantes
Ovalbumine	54	Phosphoglycoprotéine immunogénique
Ovotransferrine	12	Fixe le fer, antimicrobien
Ovomucoïde	11	Inhibiteur de trypsine
Ovomucine	1,5-3,5	Viscosité; hémagglutination virale
Lysozyme	3,4-3,5	Lyse les parois des bactéries Gram+ ; antimicrobien
Globuline G1	4	Antibactérien
Globuline G2	4	Antibactérien
Ovoinhibiteur	0,1-1,5	Inhibiteur de protéase à serine
Flavoprotéine	0,8	Fixe la riboflavine
Ovomacroglobuline	0,5	Propriétés antigéniques
Cystatine	0,005	Inhibiteur des protéases à SH
Avidine	0,005	Fixe la biotine ; antimicrobien

En termes de quantité, le lysozyme représente un des principaux constituants protéiques du blanc d'œuf avec une concentration de 3,6 g.L⁻¹ (Tableau 4).

Tableau4. Principales protéines globulaires constituant le blanc d'œuf de poule d'aprèsStevens (Stevens, 1991).

Protéines	Concentration massique (g.L-1)	Masse moléculaire (kg.mol-1)	pI
Ovalbumine	57	45	4,5
Ovotransferrine	13	76	6,0
Lysozyme	3,6	14,3	10,7
Ovomucine	3,7	230 – 8300	4,5 – 5

III. Les défenses de l'œuf

III.1 Les défenses physiques de l'œuf

La protection physique de l'œuf est assurée par trois lignes de défense. La coquille, la couche de blanc épais par sa viscosité et enfin, la membrane vitelline. Les barrières physiques sont surtout importantes vis-à-vis des microorganismes à transmission horizontale et qui sont retrouvés dans le milieu de vie de la poule.

III.1.1 La coquille

La coquille avec ses trois composantes (Figure 2), la cuticule, la coquille et les membranes coquillières constitue le premier rempart physique contre les germes. La cuticule, régule les échanges gazeux et hydriques de l'œuf avec le milieu extérieur et permet en bouchant les pores de la coquille de réduire la pénétration des bactéries (Cook et al, 2003).

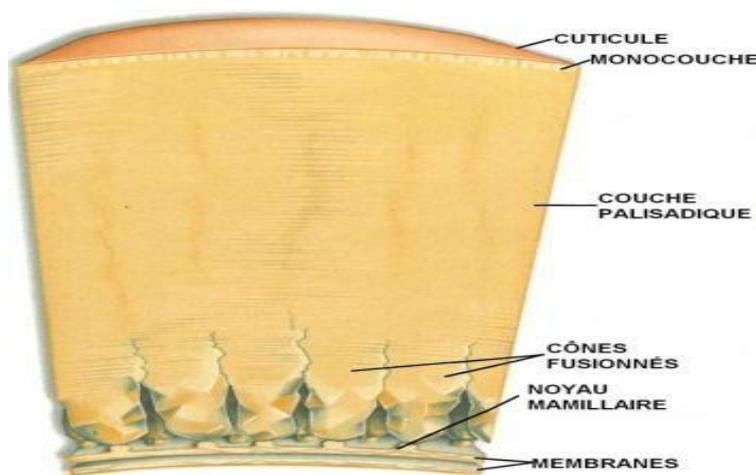


Figure2 : les composants de coquille d'œuf [3].

III.1.2 L'albumen

L'albumen est de nature très visqueuse notamment du fait de la présence du lysozyme et de l'ovomucine qui par des liaisons non covalentes s'organisent en réseaux denses gélifiés (Miller et al, 1982). La viscosité de l'albumen constitue un obstacle à la progression des bactéries particulièrement pour celles qui ne possèdent pas de flagelle et celles à motilité réduite. Sa pression osmotique élevée est également défavorable à la survie de beaucoup de microorganismes (Gantois et al, 2009).

III.1.3 La membrane vitelline

La membrane vitelline constitue le dernier rempart physique contre le passage des germes les plus résistants vers le jaune. Si l'albumen est hostile au développement des microorganismes à cause de ses propriétés physiques et chimiques, le jaune constitue au contraire, un milieu très riche et très favorable à leur prolifération (Van Immerseel et al, 2007).

III.2 Les défenses chimiques de l'œuf

III.2.1 Le pH du blanc

Le pH alcalin de l'albumen constitue un rempart contre une multitude de microorganismes dont de nombreux champignons, moisissures et bactéries (Valenti et al, 1985). Ainsi, à titre d'exemple, Henry et Garibaldi 1975 rapportent que le passage d'un pH 7.1 à un pH 8.1 rend l'albumen bactéricide contre *Staphylococcus aureus* quelle que soit la concentration en lysozyme. De la même manière, (Tranter et Board, 1984) rapportent qu'une chute du pH du blanc de 8,8 à 7,4 inhibe l'activité bactéricide contre les salmonelles.

III.2.2 Activités biologiques de protéines du blanc d'œuf

III.2.2.1. Activités antivirales

➤ Lysozyme

Dans les mécanismes de défense du système respiratoire contre les microorganismes, le lysozyme serait également efficace via un effet promoteur sur l'activité ciliaire de la muqueuse nasale de l'homme (Hisamatsu et al, 1986).

➤ L'ovotransferrine

L'ovotransferrine est une protéine chélatant les ions métalliques et appartient à la famille des transferrines qui sont membres dans divers fluides animaux (transferrine

sanguine, lactoferrine du lait). L'ovotransferrine est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 77 700 Da contenant deux sites de liaison du fer. Comme toutes les transferrines, l'ovotransferrine est composé de deux lobes homologues. Chaque lobe a la capacité de lier le fer ferrique avec extrêmement de fortes affinités (Abdallah et El hage Chahine, 1999).

Un grand nombre d'auteurs indépendants ont trouvé que l'ovotransferrine a un effet bactériostatique sur bactéries à Gram négatif et que cet effet est bloqué si la protéine est saturée de fer (Baron et al, 1998). L'hypothèse majeure avancée pour cette activité a été que l'ovotransferrine produit un environnement déficient en fer. Le fer est essentiel pour toutes les formes de vie. Il participe à de nombreux processus biologiques majeurs (Andrews et al, 2003).

La teneur en fer dans le blanc d'œuf était généralement insuffisante pour permettre la saturation de l'ovotransferrine (Thapon et Bourgeois, 1994).

Valenti et al(1986) et Baron (1998) ont également émis l'hypothèse que l'activité antibactérienne de l'ovotransferrine puisse résulter d'un effet direct sur les membranes de certaines bactéries, telles *Salmonella enteritidis*.

➤ Les défensines

Les défensines sont de petites protéines cationiques riches en cystéine (2-6 kDa) impliquées dans la défense innée de l'hôte et trouvé dans de nombreuses espèces vivantes (vertébrés, invertébrés, plantes).

Ces molécules sont caractérisées par des cystéines conservées impliquées dans les liaisons disulfures, ce qui les rend extrêmement compact et stable. La plupart de ces molécules possèdent une activité à large spectre dirigée contre bactéries à Gram positif et à Gram négatif, mais aussi contre les champignons et les virus.

➤ l'ovomucine

L'activité anti-hémagglutinante de cette glycoprotéine fibrillaire a tout d'abord été mise en évidence contre le virus influenza du porc, avant d'être confirmée par Tsuge contre le rotavirus bovin et le virus de la maladie de Newcastle des poules.

III.2.2.2 Activités antiprotéasiques

Les thiol-protéases sont impliquées dans les mécanismes de pénétration des bactéries dans les tissus sains, dans les clivages protéiques de précurseurs pour la réplication virale, dans la facilitation de l'invasion de l'hôte par les parasites, dans l'utilisation des protéines de l'hôte ou la dégradation des molécules immunitaires de l'hôte (Blankenvoorde et *al*, 1996).

➤ La cystatine

La cystatine de blanc d'œuf, qui est un inhibiteur des thiol-protéases, est de ce fait un agent antibactérien et antiviral potentiel. En effet, la cystatine d'œuf réduit la production de virus par des cellules infectées par le poliovirus, elle s'est également montrée efficace contre les infections à rotavirus humain et les diarrhées qui en résultent lorsqu'il est inoculé à des souris (Ebina et Tsukada, 1991), ou contre *Porphyromonas gingivalis*, qui est un micro-organisme fréquemment associé aux périodontites (Blankenvoorde et *al*, 1996). Elle montre par ailleurs peu d'effets secondaires en comparaison des inhibiteurs synthétiques de protéases (Nakai, 2000).

III.2.2.3 .Activités immuno-modulantes

Le développement des résistances bactériennes aux antibiotiques encourage l'identification d'immunostimulants efficaces pour améliorer les mécanismes de défense des hôtes. Un tel produit a été obtenu par fermentation de blanc d'œuf par *Saccharomyces cerevisiae*. Son administration par voie orale améliore l'activité phagocytaire non spécifique des neutrophiles chez le porcelet et le veau. Il pourrait par conséquent renforcer le système de défense de l'hôte contre les maladies infectieuses (Nakai, 2000).

➤ Les cystatines de type 2

La cystatine de blanc d'œuf, agissent sur la réponse immunitaire des hôtes via le réseau des cytokines. La cystatine de poule stimule la production d'oxyde nitrique par les macrophages péritonéaux de souris et la production d'interleukines par les lignées cellulaires de fibroblastes gingivaux humains et les splénocytes de souris, à des concentrations physiologiques (Kato et *al*, 1979). Elle peut donc être envisagée pour la défense contre les agents infectieux ou parasitaires, ainsi que dans la lutte contre les métastases cancéreuses (Nakai, 2000).

III.2.2.4 Activités anti-hypertensives

L'ovalbumine est la protéine majeure du blanc d'œuf. Sa séquence et sa structure tridimensionnelle la classent dans la famille des sérines (inhibiteur de protéases à sérine). Cependant, contrairement aux autres membres de cette famille, l'ovalbumine ne possède pas d'activité inhibitrice de protéases hormis dans certaines conditions très particulières (Cuccioloni *et al*, 2004).

➤ L'OVAX

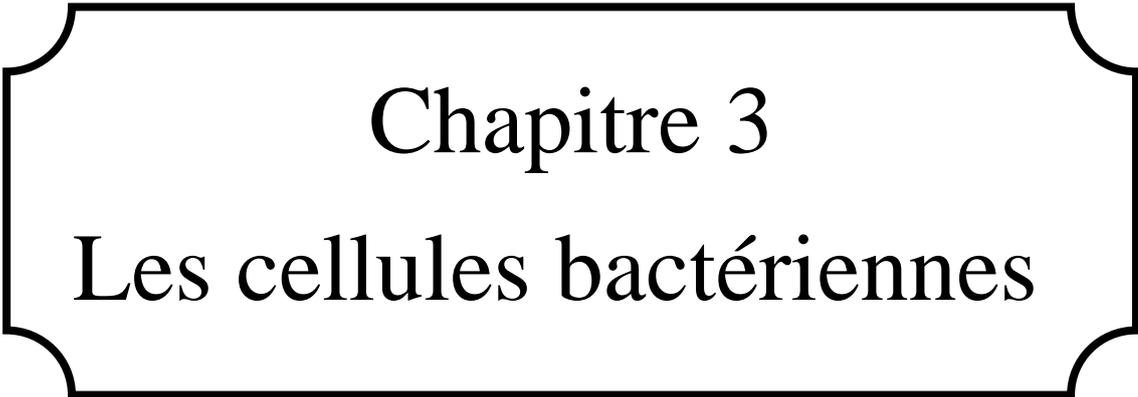
OVAX (protéine X apparentée à l'ovalbumine) est une protéine glycosylée liant l'héparine de 45 kDa à la famille ov-serpine, qui comprend la protéine ovalbumine, la principale protéine de blanc d'œuf. La quantité d'OVAX dans le blanc d'œuf est 100 fois moins concentrée que l'ovalbumine. En dépit de l'identité de séquence élevée entre OVAX et l'ovalbumine. Un brevet pour l'utilisation d'OVAX comme agent anti-*Listeria* a été déposé (Réhault-Godbert *et al*, 2013).

III.2.2.5 Fixations spécifiques

Plusieurs protéines du blanc d'œuf sont capables de fixer de manière spécifique certains ligands. La flavoprotéine offre une forte affinité pour la riboflavine, la thiamin-binding protein pour la thiamine, et l'avidine pour la biotine (Réhault-Godbert *et al*, 2013).

➤ Avidine

Le système avidine-biotine est utilisé dans une très large gamme d'applications biochimiques et diagnostiques, en raison de l'absence d'interaction entre d'une part la chaîne latérale portant le groupement carboxylique de la biotine et d'autre part l'avidine. Ce site peut donc être modifié chimiquement et fixé à un grand nombre de matériel biologique actif sans altération de la fixation de l'avidine sur l'autre partie de la biotine, dérivée ou conjuguée (Réhault-Godbert *et al*, 2013).



Chapitre 3

Les cellules bactériennes

Chapitre3 : les cellules bactériennes

I. Définition d'une bactérie

Les bactéries sont des organismes unicellulaires microscopiques. Il en existe des milliers de types différents, et elles vivent dans tous les environnements possibles, partout dans le monde. Elles vivent dans la terre, dans la mer et dans les profondeurs de la croûte terrestre. On a même rapporté que certaines bactéries vivaient dans les déchets radioactifs [3].

II. Structure de la cellule Bactérienne

La bactérie est entourée par une paroi rigide, structure complexe contenant des polysaccharides, des protéines et des lipides (figure 3). C'est cette paroi qui maintient la forme de la cellule et protège celle-ci contre le danger d'une lyse osmotique lorsque la cellule se trouve dans un milieu hypotonique. La paroi est une couche hétérogène constituée de peptidoglycanes. Les peptidoglycanes sont des polymères qui contiennent à la fois des unités glucidiques et des unités peptidiques [4].

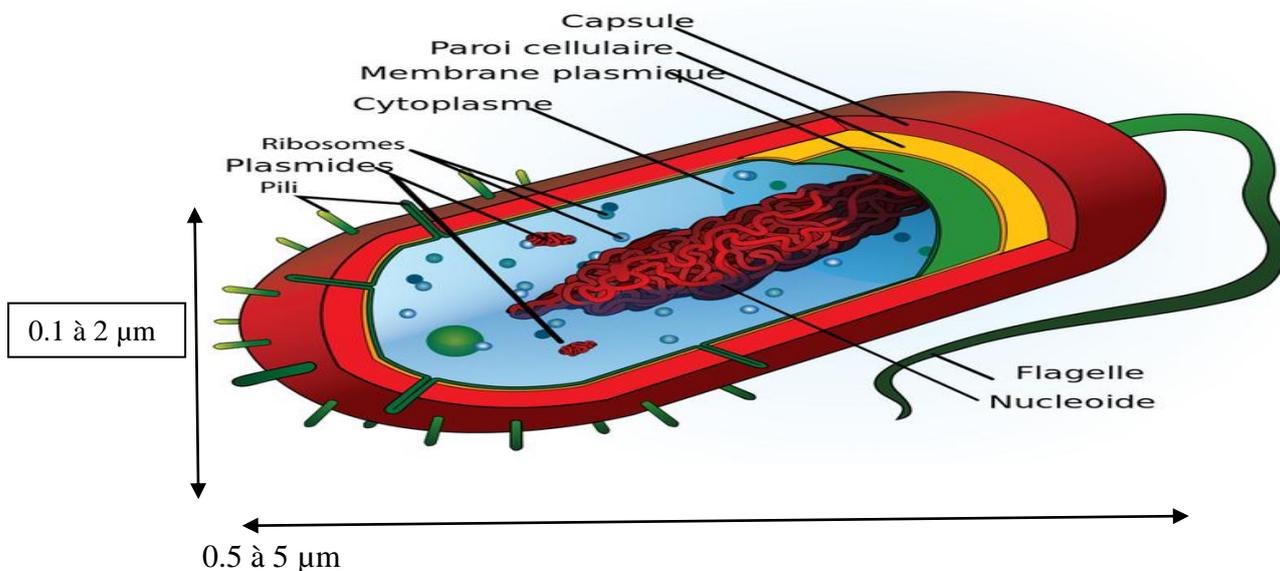


Figure9: représentation schématique d'une cellule bactérienne [5]

II.1.la composition de l'enveloppe de bactéries

L'enveloppe externe de bactéries est composée de deux couches(Figure3) :

- Une membrane cytoplasmique
- Une paroi

II.1.1. la composition chimique de membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique limite le cytoplasme de la bactérie. Elle est composée de:

- 30 à 40 % de lipides
- 60 à 70 % de protéines
- Glucides : constituants mineurs quantitativement, liés de façon covalente aux protéines (glycoprotéines) (Figure 4) [6].

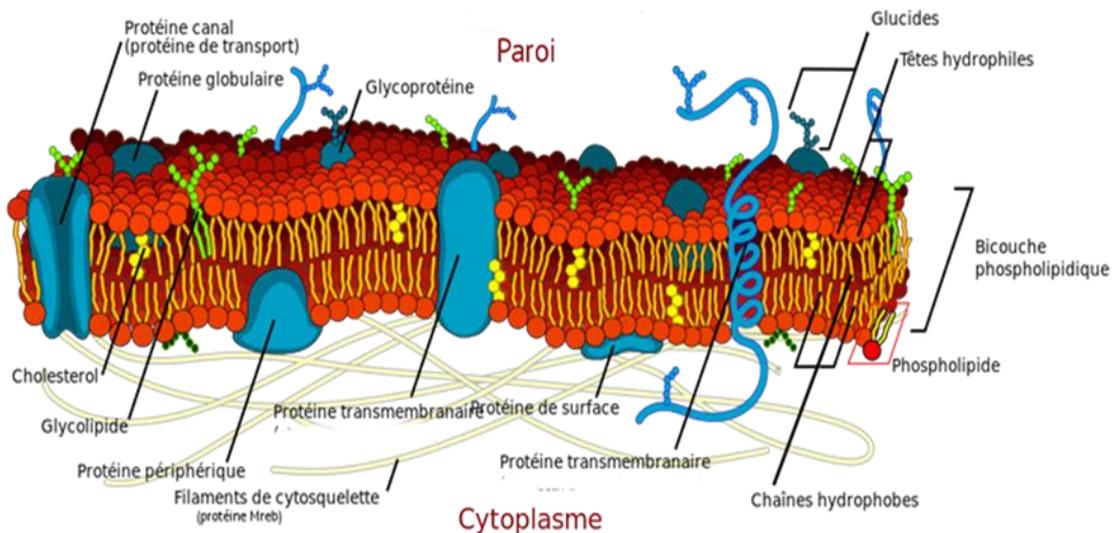


Figure 10: représentation schématique de la membrane cytoplasmique d'une cellule bactérienne [5].

II.1.2. la composition chimique de la paroi

C'est une structure semi-rigide complexe conférant forme et rigidité à la cellule et protégeant la membrane plasmique. La paroi représente 20% du poids sec des bactéries (Tableau 5). Elle est composée d'un réseau macromoléculaire, le peptidoglycane ou muréine. Le peptidoglycane est constitué d'une répétition d'un disaccharide, formant des chaînes reliées entre elles par des polypeptides. Cet assemblage en treillis enveloppe toute la cellule et lui confère une résistance suffisante pour contrer la forte pression osmotique intracellulaire. Ainsi, l'absence de paroi provoque rapidement une lyse de la cellule (Ghuysen et al, 1968).

La mobilité bactérienne nécessite également la présence de cette paroi. En effet, les structures flagellaires permettant cette mobilité ont besoin d'exercer une force sur une surface solide afin de permettre le mouvement. La paroi joue également un rôle important lors de la division cellulaire ou de la sporulation, essentiellement

chez les bactéries à Gram positif. Chez ces dernières, la formation du septum de division, et donc la séparation finale des deux cellules filles, se fait par synthèse de peptidoglycane. De nombreuses autres molécules sont présentes dans la paroi (GHUYSEN et al, 1968).

Tableau9 : la composition chimique de paroi chez les Gram+ et les Gram-[6].

	Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
Osamines		
-N-acétylglucosamine (NAG)	+++	+
-N-acétylmuramique (NAM)		
-galactosamine		
Acides aminés	24 à 35 %	50 %
A diaminopimélique (DAP)	+++	+
Acides teichoïques		
-polyribitol-phosphate	+++	-
-polyglycérol-phosphate		
Oses : glucose, galactose, mannose, fucose, rhamnose...	20 à 60 %	20 à 60 %
Lipides	1 à 2,5 %	22 %

II.1.2.1 Elément structural de base : Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est un polymère complexe formé de 3 éléments différents :

- une épine dorsale faite d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique;
- un ensemble de chaînes latérales peptidiques identiques, composées de 4 acides aminés et attachées à l'acide N-acétylmuramique ;
- un ensemble de « ponts interpeptidiques » identiques. L'épine dorsale est la même pour toutes les espèces bactériennes tandis que les chaînes latérales détérapeptides et les ponts interpeptidiques varient d'une espèce à l'autre.

La plupart des chaînes latérales comportent la L-alanine en position 1 (attachée à l'acide N-acétylmuramique), le D-glutamate en position 2, l'acide diaminopimélique, la lysine ou un autre acide aminé en position 3, et la D-alanine en position 4. La figure 5 donne une représentation schématique du peptidoglycane [6].

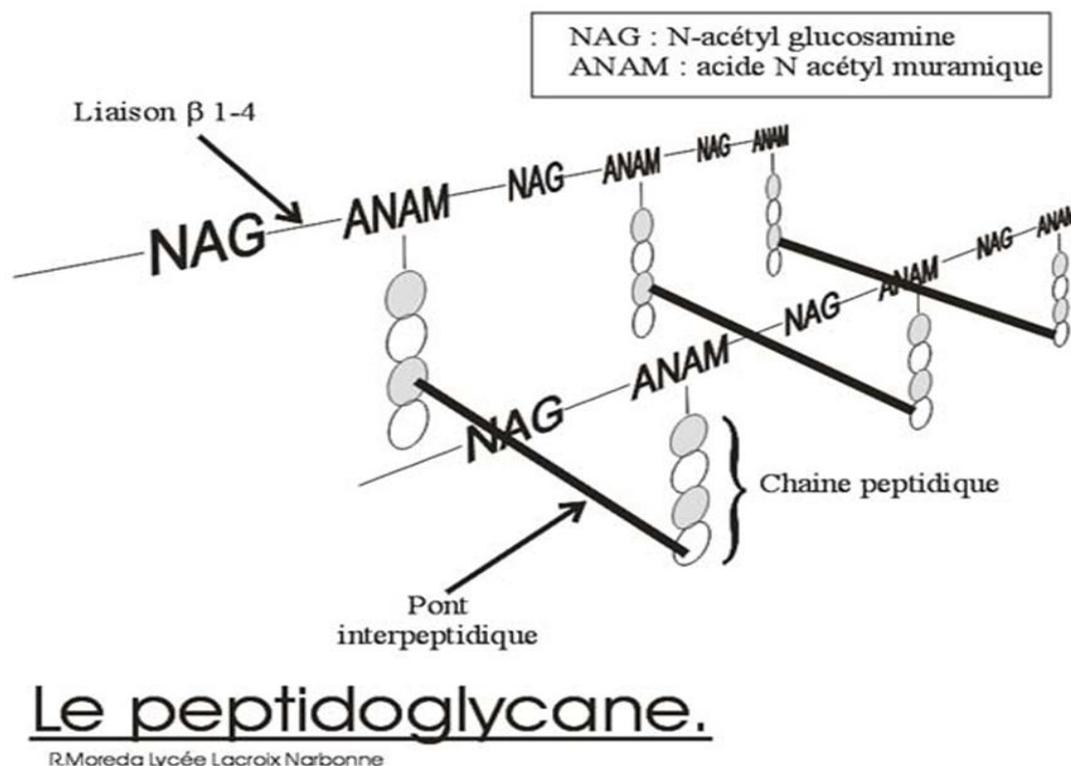


Figure 11 : représentation schématique du peptidoglycane [6]

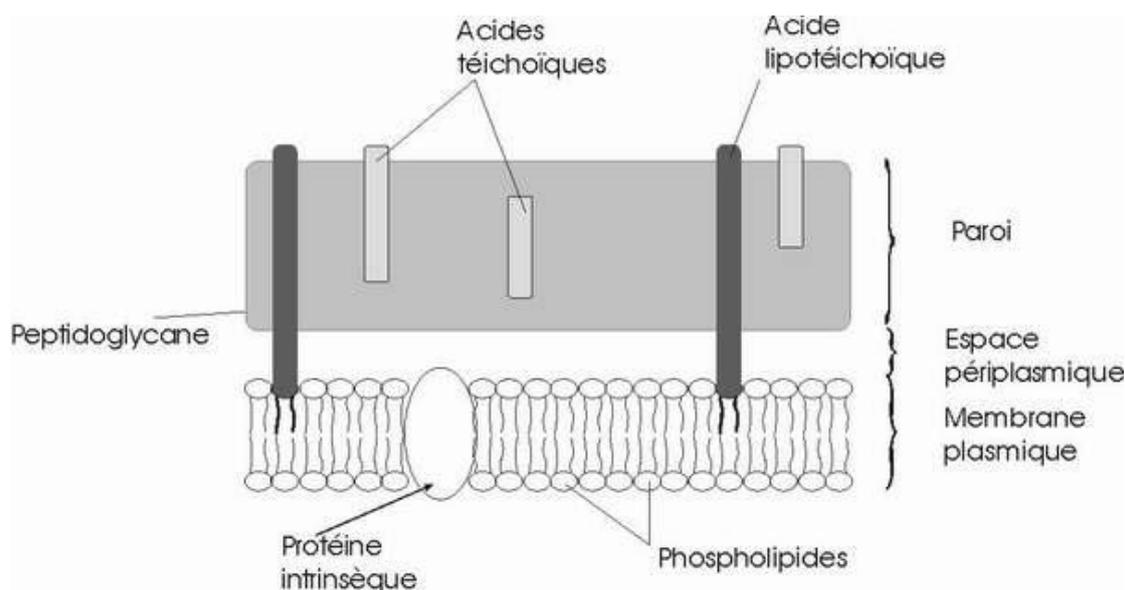
Il faut noter que les ponts inter peptidiques, qui assurent la fermeture de ce véritable « filet » qu'est le peptidoglycane, sont constitués chez *Staphylococcus aureus* d'une chaîne de 5 molécules de glycine entre la D-alanine terminale et la L-lysine en position 3.

II.1.2.2 Différences entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif

Les bactéries sont généralement classées en deux groupes selon la morphologie de leur enveloppe élément structural de base qui est étroitement associée à la réponse à la coloration de Gram (Emilie, 2011).

➤ Paroi de bactéries à Gram positif,

Il y a de nombreuses couches de peptidoglycane qui représentent jusqu'à 90 % des constituants de la paroi bactérienne (figure 6). Celle-ci contient aussi un feutrage (10 à 50 % du poids sec de la paroi) d'acides teichoïques (polymères du glycérol ou du ribitol phosphate) associés étroitement au peptidoglycane et faisant parfois saillie à la surface de la bactérie. Certains, les acides lipoteichoïques, sont placés transversalement et s'enfoncent jusqu'à la membrane cytoplasmique. En général il n'y a pas ou peu de protéines dans la paroi des bactéries à Gram positif(Koch, 2003).



Paroi d'une bactérie Gram positif.

R. Morel de Lycée Lacroix Nantonne

Figure 12: Représentation de la structure de paroi Gram+ [6].

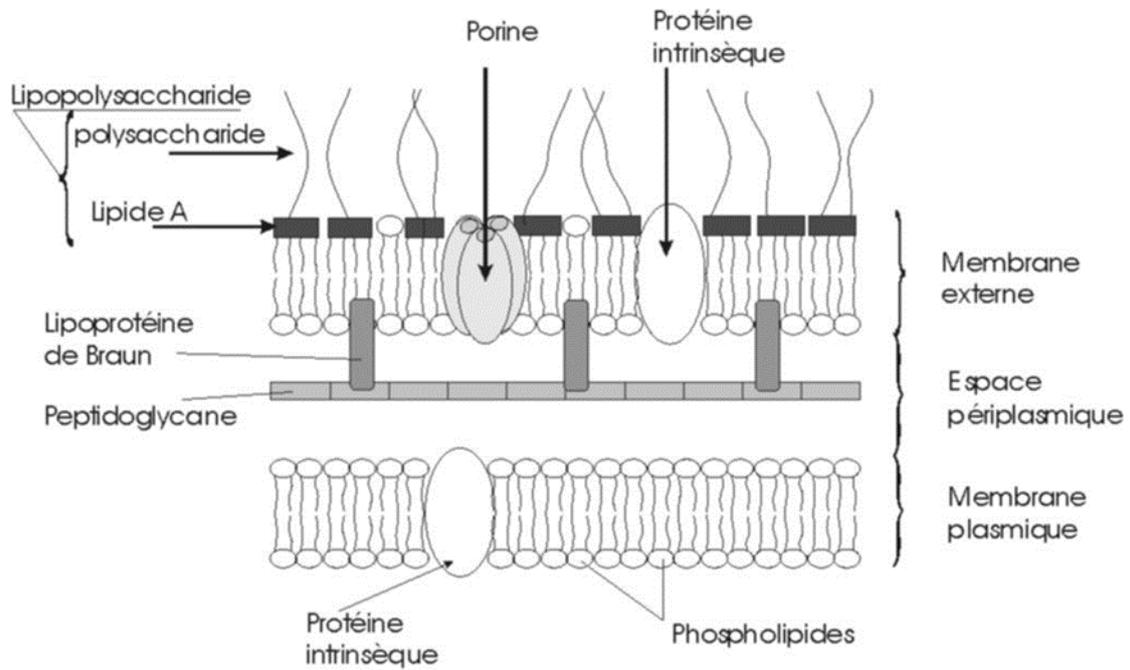
➤ Paroi de bactéries à Gram négatif,

Il n'y a qu'une seule ou au plus deux couches de peptidoglycane qui ne représente que 5 à 20 % des constituants de la paroi bactérienne. Mais 3 polymères situés en dehors du peptidoglycane viennent compléter la paroi (Figure 7): des lipoprotéines, une « membrane externe » qui contient du lipopolysaccharide. Les lipoprotéines sont le lien entre le peptidoglycane et la « membrane externe » : le composant protéine est un polymère de 15 acides aminés qui forme une liaison peptidique avec le tétra peptide des chaînes latérales du peptidoglycane ; le composant lipide est relié à la « membrane externe » (Koch, 2003).

La « membrane externe » est constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle tout ou partie des phospholipides de la couche la plus externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide. Au sein de cette « membrane externe », qui est une mosaïque fluide, se trouvent associés au moins deux types de protéines spécifiques : certaines sont dites protéines de structure car elles consolident la membrane externe; d'autres, appelées « porines » permettent le passage des petites molécules hydrophiles et en particulier, sur le plan médical, des antibiotiques (β -lactamines, tétracyclines, quinolones...).

Sur le plan immunologique, le lipopolysaccharide constitue l'antigène O des bactéries à Gram négatif. Le LPS est un lipide complexe auquel est attaché un

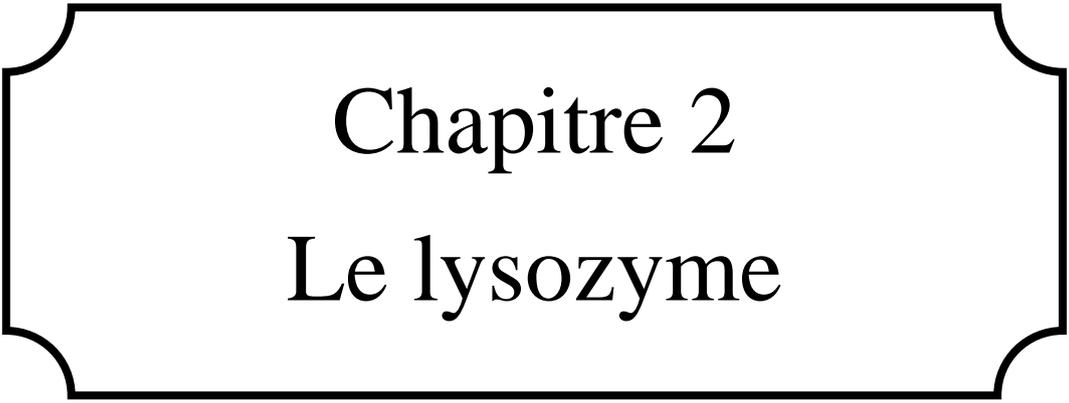
polysaccharide qui est responsable de la spécificité antigénique de l'antigène O. Sur le plan physiopathologique, le LPS, extrêmement toxique, représente l'endotoxine des bactéries à Gram négatif (Koch, 2003).



Paroi d'une bactérie Gram négatif.

R.Moreda Lycée Lacroix Nabonne

Figure 13: Représentation schématique de la structure de paroi d'une bactérie Gram-
[6].



Chapitre 2
Le lysozyme

Chapitre 2 : Le Lysozyme

Le lysozyme est depuis 75 ans une protéine considérablement étudiée. Il sert d'enzyme modèle dans de nombreux domaines comme la chimie, l'enzymologie, la cristallographie, la génétique, la biologie moléculaire, l'immunologie et l'évolution. Malgré ces études, de nombreux aspects concernant le rôle biologique de cette molécule ne sont pas encore précisément connus (Laurent, 2008).

I. Les étapes importantes dans la découverte du lysozyme

Les livres de bactériologie de la fin du 19^{ème} 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.

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

Depuis sa découverte, le lysozyme et particulièrement le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEWL pour henegg white lysozyme) sert de modèle pour de nombreuses études. En 1963, la structure primaire du HEWL a été publiée par deux groupes de recherche différents. Ce fut la première enzyme séquencée comportant les

20 acides aminés classiques. Deux ans plus tard, le HEWL a été la première enzyme dont la structure en trois dimensions a été élucidée (Canfield, 1963).

II. Généralités

II.1 Les origines de lysozyme

Il existe plusieurs types de lysozyme dont les caractéristiques diffèrent selon leur origine. On le trouve dans le blanc d'œuf, dans des sécrétions comme les larmes, dans les membranes des muqueuses, ainsi que chez des virus bactériens. Il constitue un membre atypique de la classe des hexosaminidases (Stevens, 1991). Le lysozyme de blanc d'œuf possède une saveur sucrée 200 fois plus intense que celle de la protéine édulcorante thaumatine [5].

II.2 Les différentes familles de lysozymes

- Les lysozymes ont été divisés en différents types :
- Les lysozymes de type-c (pour "chicken"),
- Les lysozymes de type-g (pour "goose"),
- Les lysozymes de type-i (pour "invertebrate"),
- Et les lysozymes de type-ch (pour Chalaropsis),

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule est associé aux lysozymes de type-c. Il est à noter que les lysozymes de type-ch (dont la mutanolysine) ont la capacité de cliver du PG (peptidoglycane) modifié par O-acétylation alors qu'il n'est pas hydrolysé par les autres types de lysozyme (Laurent, 2008).

III. Caractéristiques de lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire de faible poids moléculaire (Tableau 6). Elle contient un nombre conséquent d'acides aminés ionisables : environ 20 %.

Tableau5 : Principales caractéristiques de lysozyme (Nigen, 2009).

Caractéristiques	Œuf de poule
Nombre d'acides aminés	129
Poids moléculaire (Da)	14300
Rayon hydrodynamique (Å)	19
pI (Point isoélectrique)	10,7
Nombre de résidus cystéine	8
Nombre de ponts disulfures	4
Nombre d'acides aminés acides	9
Nombre d'acides aminés basiques	16

IV. Structures du lysozyme

La molécule comprend 2 domaines, l'un constitué majoritairement d'hélices α et l'autre montrant un profil de repliement particulièrement complexe dans lequel l'arrangement de la chaîne protéique se fait en trois sections orientées de manière antiparallèle. Ce fut la première description d'un feuillet dans une protéine globulaire. De plus, le HEWL a été la première enzyme pour laquelle un mécanisme d'action détaillé a été proposé (Laurent, 2008).

IV.1 Structure primaire

Le lysozyme est constitué respectivement de 129 AA liés entre eux par des liaisons d hydrogènes (Figure 7).

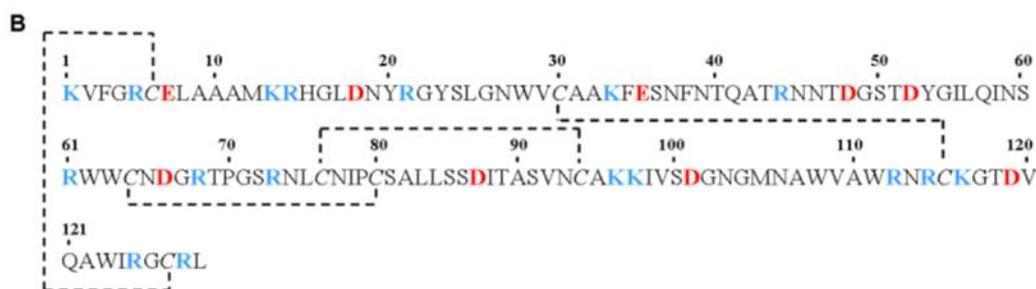


Figure3 : Structure primaire de lysozyme (Nigen, 2009).

IV.2 Les structures secondaires

Sa structure secondaire est constituée majoritairement d'hélices α . Elles représentent 39 % des structures secondaires du LYS (Tableau 7).

Tableau 6 : Structures secondaires de lysozyme (Nigen, 2009).

Structures secondaires	lysozyme
Hélices α	39 % (51 acides aminés)
Feuillets β	11 % (14 acides aminés)

IV.3 Structure tertiaire

Sa structure tertiaire se présente sous forme d'une seule chaîne repliée sur elle-même et contient huit cystéines formant quatre ponts disulfures, le rendant très compact et stable. (Wang et al, 2007). La structure tridimensionnelle du lysozyme est présentée dans la figure9.

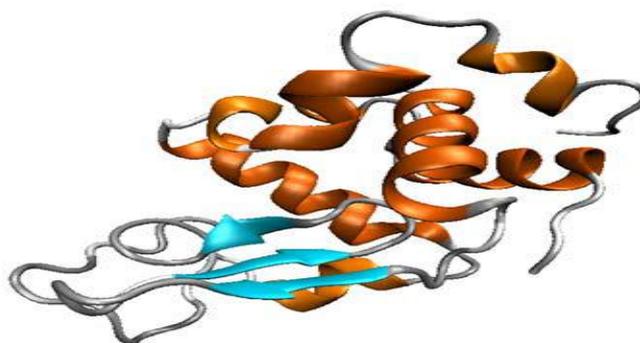


Figure 4: Structure tridimensionnelle du lysozyme (Wang,2007).

V. Mécanisme d'action du lysozyme

Le lysozyme est une enzyme qui désorganise les parois des cellules bactériennes. Il digère la paroi cellulaire des bactéries, en hydrolysant les liaisons glycosidique $\beta(1-4)$ entre l'acide N-acétylmuramique (NAM) et la N-acetylglucosamine (NAG) des polysaccharides, ou alternent le NAM et la NAG, consistant les peptidoglycanes de la paroi cellulaire bactérienne (Figure 10) (Kuroki,1993).

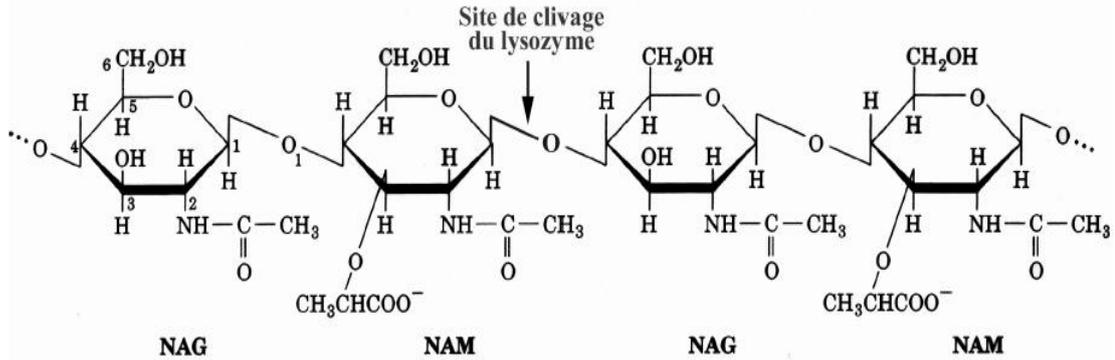


Figure 5: Structure du PG et site de clivage du lysozyme.

V.1 Le site actif de Lysozyme

Le site actif de Lysozyme est une longue fente profonde dans la surface de la protéine. Cette fente se lie à un polysaccharide long de six sucres aminés (par exemple NAM-NAG-NAM-NAG-NAM-NAG). Le substrat de polysaccharide est correctement positionné par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes. Cependant, ce n'est pas un ajustement parfait. Pour que la 4^{ème} unité de sucre s'adapte à sa position, elle doit être déformée pour former une conformation moins stable. Cela augmente la tension sur le lien entre les unités de sucre 4^{ème} et 5^{ème}, le lien qui doit être rompu (Laurent, 2008).

Certains acides aminés présents dans le site actif, Asp-52 et Glu-35, sont vitaux pour l'action catalytique du Lysozyme (Figure 11). Ces résidus interagissent avec les 4^{ème} et 5^{ème} unités de sucre, rompant la liaison carbone-oxygène entre eux en insérant une molécule d'eau à cet endroit (hydrolyse)(Figure 10) (Vocadla, 2001).

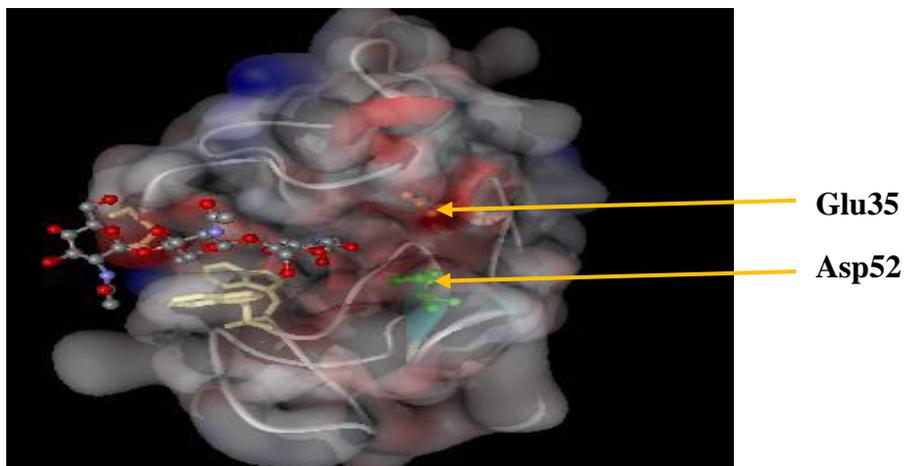


Figure6 : le site actif de lysozyme de poule [7]

Tout d'abord, la chaîne latérale d'acide carboxylique de Glu-35 donne un proton à l'oxygène de la liaison C-O instable, la cassant. Cela forme un intermédiaire avec un atome de carbone chargé positivement (instable). Asp-52 agit pour stabiliser cet intermédiaire soit par des interactions électrostatiques, soit par une liaison covalente au carbone. Ensuite, un -OH provenant de l'eau attaque le carbone pour donner le produit final hydrolyse. Le H⁺ supplémentaire de l'eau attaque le COO⁻ de Glu-35 en reconstituant le proton qui a été perdu plus tôt (Figure 12). Le lysozyme libère ensuite la chaîne brisée et est capable de lier un nouveau substrat sur la paroi cellulaire bactérienne (Vocadlo, 2001).

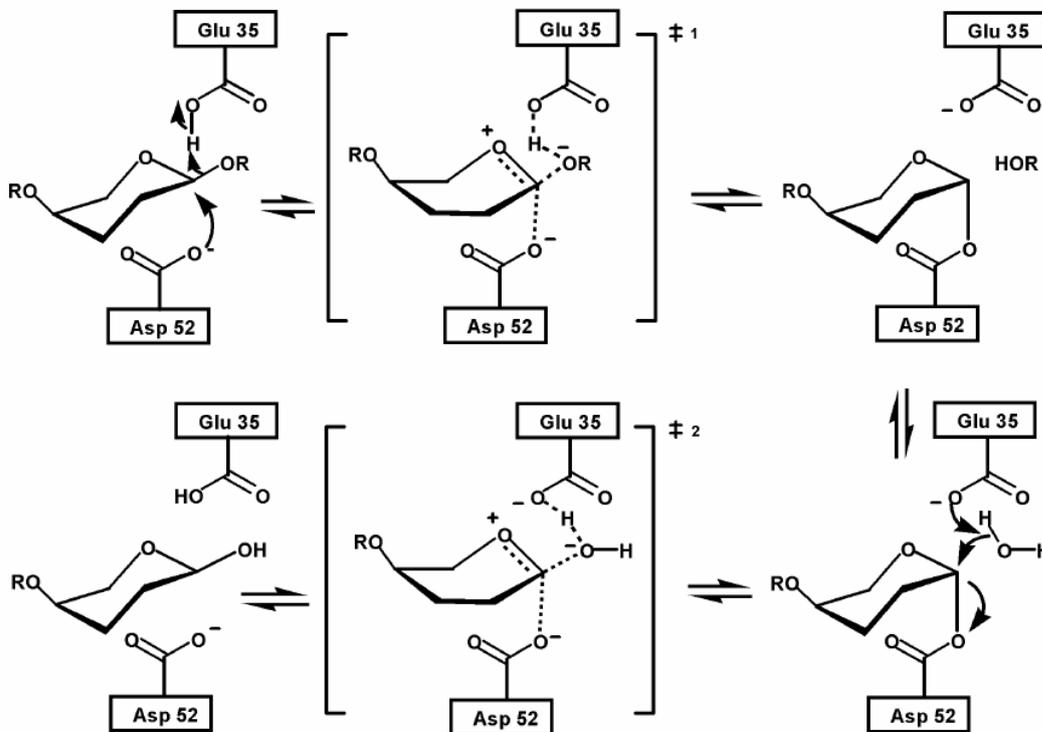


Figure 7: Séquence de réaction de glycolase hydrolase permettant une rétention de configuration anomérique (ex : lysozyme).

Les lysozymes de divers organismes ne diffèrent pas uniquement par leur structure mais aussi par leurs mécanismes d'action. Tandis que les lysozymes de type c (dont le HEWL) conservent la configuration anomérique, les lysozymes de type g, ch et les lysozymes phagiques hydrolysent le substrat en inversant la configuration anomérique). La liaison au substrat et l'activation des enzymes inversant la configuration est très similaire à celles gardant la conformation (Laurent, 2008).

VI.2 Action du lysozyme sur les bactéries

Le lysozyme agit sur les bactéries Gram positif, bien que de nombreuses espèces aient développé des modifications de la composition chimique de leur paroi visant à les rendre résistantes à l'action de cette enzyme.

a) Bactéries à Gram positif

L'action lytique du lysozyme sur les bactéries peut être attribuée simplement à la dissolution des structures rigides de la paroi cellulaire. Pour une étude détaillée du mécanisme de l'action du lysozyme, trois bactéries à Gram positif dont les parois isolées ont été complètement digérées par le lysozyme *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus megaterium* (Herbert et al, 2007)

b) Bactéries à Gram négative

Les bactéries à coloration Gram négative sont résistantes à l'action lytique du lysozyme, en raison de la composition de leur peptidoglycane et de sa protection par la membrane externe (Herbert et al, 2007).

VI.2 Mécanismes de résistance contre le lysozyme

Les bactéries ont co-évolué avec les effecteurs du système immunitaire de l'hôte, dont fait partie le lysozyme. Il n'est donc pas surprenant que certaines bactéries aient développé des systèmes de défense leur procurant un avantage sélectif sur les autres. La présence de tels mécanismes peut aider à comprendre les phénomènes de colonisations persistantes et/ou d'infections chroniques (Dommette et al, 2005). Bien que le principe de ces modes de défense ait été proposé depuis de nombreuses années, ce n'est que depuis peu que les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance commencent à être identifiés. De ces mécanismes de résistance, 3 catégories de fonctions ont été identifiées :

- l'inhibition de l'action lytique du lysozyme
- l'inhibition de l'action non lytique du lysozyme
- l'inactivation du lysozyme.

VI.2.1 Inhibition de l'action lytique du lysozyme :

Certaines bactéries produisent du PG résistant aux muramidases. Les principales modifications connues sont l'O-acétylation du NAM et la dé-N-acétylation du NAG (Figure 13). Ces changements provoquent une modification du site de reconnaissance du lysozyme envers son substrat entraînant une réduction de son activité lytique.

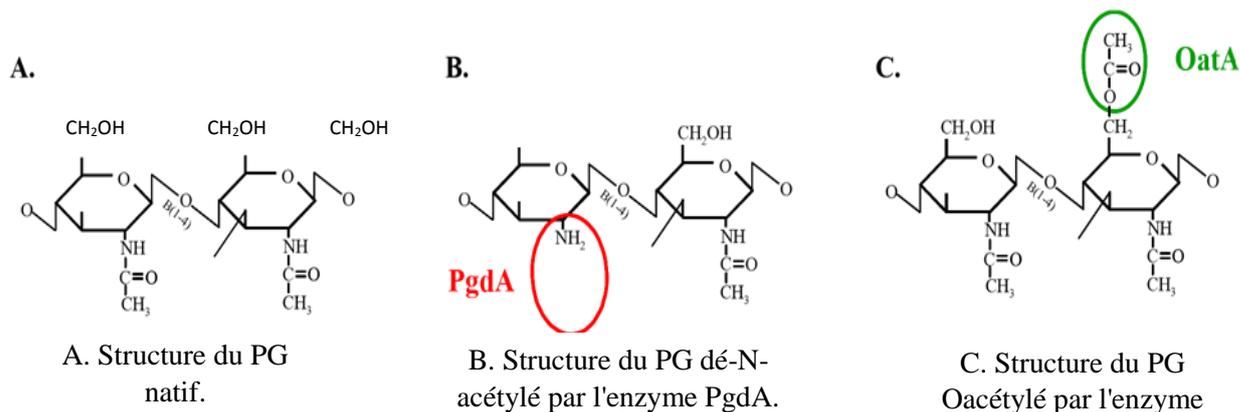


Figure 8 : Structure et modification du PG (Clarke, 1992).

VI.2.2 Inhibition de l'action non lytique du lysozyme :

Le mode d'action non lytique du lysozyme semble être provoqué soit par l'activation de l'autolyse bactérienne soit par la perturbation de la membrane plasmique. Dans ces deux cas, la première étape consiste en l'attraction électrostatique du lysozyme chargé positivement par les acides teichoïques et lipoteichoïques et/ou les phospholipides (chargés négativement) de la surface bactérienne. Les mécanismes de défense mis en place par les bactéries ont pour but d'empêcher cette attraction en modifiant la charge ionique pariétale (Peschel, 2002).

Deux modifications des molécules anioniques ont à ce jour été identifiées comme conférant une résistance accrue aux CAMP (Cationic antimicrobial peptides): la D-alanylation des TA (Acides téichoïques) et l'ajout de L-lysine aux phosphatidylglycérol (Tableau 8).

Bien que l'absence de WTA (Wall teichoic acids) chez *S. aureus* provoque une augmentation de la sensibilité au lysozyme il semblerait que l'élément lui conférant sa résistance soit plutôt la D-alanylation des WTA que les WTA eux-mêmes (Bera et al, 2006).

Tableau 7 : Mécanisme proposé de résistance aux CAMP chez *S. aureus*(Laurent, 2008).

Mécanismes de résistance	Souche sauvage	Souches mutantes sensibles
A. Incorporation des D-alanine dans Les acides téichoïques		
B. Incorporation des L-lysine dans les phosphatidylglycérol		

VI.2.3 Inactivation du lysozyme

Afin de se prémunir de l'action du lysozyme, certaines bactéries ont la capacité de produire des agents inhibant son action. A ce jour, seuls deux inhibiteurs protéiques ont été clairement identifiés. L'inhibiteur protéique du lysozyme le mieux caractérisé a été découvert récemment et "par hasard" chez *Escherichia coli*.

Le second inhibiteur protéique décrit se nomme SIC (streptococcalinhibitor of complément) et a été caractérisé chez *Streptococcus. pyogenes*. (Ferne-King et al, 2002).

VII. Applications de lysozyme

Le lysozyme est utilisé depuis plusieurs années dans les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

VII.1 Dans le domaine Pharmaceutique

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 contre des infections virales ou bactériennes (par exemple : traitement d'angine de la gorge (Lysopaine), des aphtes. Le lysozyme est également utilisé comme analgésique chez les personnes souffrant de cancer et comme agent stimulant dans les traitements par des antibiotiques.

Il a été aussi utilisé dans la prophylaxie et la thérapie des leucopénies induites par des radiations ionisantes. Le lysozyme a été testé dans des traitements d'infections de la bile chez l'homme par des coliformes et dans les otites externes induites expérimentalement chez le chien. Le lysozyme est utilisé depuis longtemps chez les Japonais en médecine douce [8].

VII.1.1 Action anti inflammatoire :

Réduction des processus inflammatoires associés à des cancers; action contre les inflammations péritonéales; Effets antiviraux et analgésiques dans le cadre de parodonties inflammatoires;

➤ Exemple de la lysopaine :

Médicament disponible sans ordonnance, utilisé dans le traitement d'appoint des affections de la gorge et de la bouche. Contient du Lysozyme (5mg par comprimé) et du chlorure decétylpyridinium (antiseptique de la famille des ammoniums quaternaires) [8].

VII.1.2 Action antibactérienne :

Réduction de la mortalité chez des patients atteints de tétanos; antagoniste de l'inflammation induites par des œufs d'Ascaris; réduction de l'incidence des caries; renforcement de l'action des ATB dans le cas de broncho-pneumopathies et tuberculose respiratoire; réduction des bactéries dans les lésions cutanées chez les patients atteints de Lèpre [8].

VII.2 Dans le domaine Agroalimentaire

Le lysozyme ((E1105) est un conservateur qui garde en bon état de conservation certaines denrées alimentaires. Son utilisation en tant qu'additif est limitée au fromage et à certaines boissons alcoolisées. Le lysozyme peut également être utilisé en tant qu'auxiliaire technologique dans d'autres applications s'il est détruit ou enlevé lors de la fabrication de la denrée alimentaire [8].

Ajouté au vin dès que le moût commence à fermenter, il permet d'éviter le développement de bactéries responsables de l'arrêt involontaire des fermentations, des fermentations lentes, de l'augmentation des acides volatils. Il permet un arrêt total ou un contrôle de la fermentation malolactique et une stabilisation après fermentation malolactique [9].

Le lysozyme est utilisé au Japon pour améliorer la conservation des produits marins congelés comme les huîtres ou les crevettes. Des travaux récents ont, par ailleurs, montré que l'utilisation du lysozyme permettait d'inhiber la croissance de *Listeria monocystogenes* à une température de 5 °C [8].

Chapitre 4

Les différentes méthodes
d'extraction de protéines

Chapitre 4 : les différentes méthodes d'extraction de protéines

Pour l'isolement d'une enzyme, deux grandes étapes constituent le processus d'obtention de la biomolécule : l'extraction et la purification (Figure 14) (Laurent, 1982).

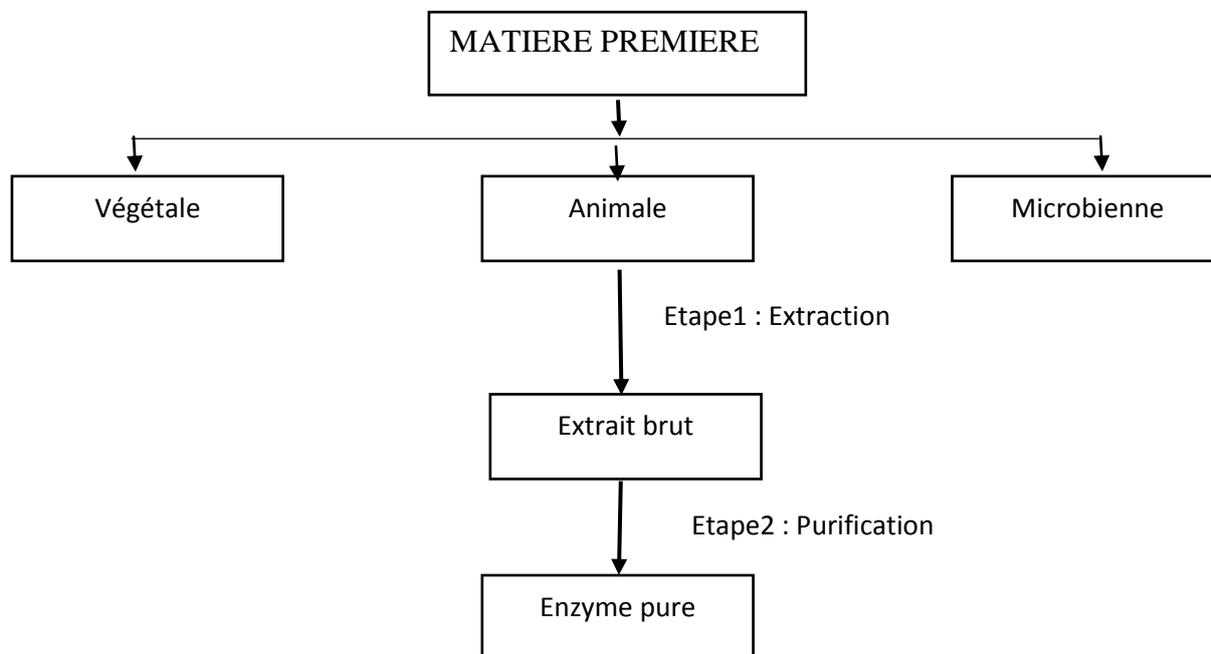


Figure 14 : Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme (LAURENT, 1982).

I. les techniques d'extraction

I.1 Généralités sur les méthodes d'extraction

I.1.1 Définition et principe

Le mot extraction est formé de deux mots d'origine latine : « ex » et « traction » qui signifie tiré à l'extérieur. On peut dire que le mot extraction désigne l'action de séparer une substance quelconque du composé dont elle fait partie. Les méthodes d'extraction correspondent au transfert sélectif d'un soluté contenu dans le milieu initial vers un second milieu dans lequel il est soluble en vue de son isolement (BRISSET, 2005).

I.1.2 Critères de choix et préparation de la matière première

Bien qu'il n'y ait aucune règle précise et rapide pour choisir le tissu et/ou l'organisme pour l'isolement d'une enzyme, il est toujours préférable de choisir une source enrichie en

cette enzyme particulière, d'autres éléments sont à prendre en considération (KUMAR et GARG, 2006):

- vérifier si l'enzyme est produite universellement (chez les animaux, les plantes aussi bien que des micro-organismes) ou confiné à un royaume particulier.
- dans le cas où l'enzyme visée est universellement produite, choisir une enzyme microbienne ou animale de préférence, car il est plus facile de travailler sur ce type de matériel biologique comparativement aux végétaux, puisque les plantes sont généralement riches en composés phénoliques, qui sont convertis en quinones au contact de l'air, ces quinones se lient avec la protéine enzymatique pour la rendre inactive.
- pour le tissu animal, on devra sacrifier l'animal dans le laboratoire ou apporter le tissu d'un abattoir.
- dans le cas des micro-organismes, on devra les accroître dans un milieu approprié de croissance dans des conditions aseptiques.

I.2 Méthodes d'extraction

I.2.1 Méthodes physique

I.2.1.1 Choc osmotique : permet de briser certaines cellules fragiles avec un minimum de dommages. Les cellules sont incubées dans une solution hypo-osmotique. Cherchant à rétablir l'équilibre osmotique, l'eau pénètre dans la cellule et finit par causer une rupture de la membrane plasmique (LEBLANC, 2013).

I.2.2 Méthodes mécaniques

I.2.2.1 Congélation-décongélation : Suite à un refroidissement brusque et à la concentration du soluté intra et extracellulaire, la formation de cristaux intra et extracellulaires entraîne des cassures dans la cellule (LAURENT, 1982).

I.2.2.2 Broyage ou agitation violente en présence de microbilles de verre désintègre les microorganismes avec rupture de la paroi (LAURENT, 1982).

I.2.2.3 Bombe à disruption : consiste en une chambre pressurisée dans laquelle les cellules sont traitées avec de l'azote à haute pression. La pression force l'azote à se solubiliser dans les liquides. On libère alors la pression tout d'un coup; l'azote en solution reprend son état gazeux, forme des bulles à l'intérieur des cellules et les fait éclater (LEBLANC, 2013).

I.2.2.4 Sonication : l'application des ultrasons dans un liquide crée le phénomène connu sous le nom de cavitation. Des aires de compression et raréfaction apparaissent, et les cavités s'effondrent rapidement. Les bulles produites dans les cavités sont comprimées à plusieurs cen-

taines d'atmosphère. Ces chocs constituent les éléments de destruction des tissus cellulaires : tout d'abord, une attaque de la structure cellulaire, puis une lyse. L'efficacité de cette technique est liée à des paramètres tels que le pH, la température et la force ionique du milieu de suspension, ainsi que du temps d'exposition aux ultrasons. (LAURENT, 1982).

II.2.3 Extraction chimique

C'est une technique plus utilisées en industrie, consiste à mélanger le produit en solution aqueuse avec un petit volume de solvant organique dans lequel il est très soluble. On agite ensuite vigoureusement le mélange pour permettre au produit de se déplacer de la phase aqueuse vers la phase organique, puis on récupère celle-ci. Le choix du solvant est déterminant dans l'efficacité de l'extraction. Il repose sur plusieurs critères (Tessier, 2007) :

- la solubilité du produit dans la phase organique par rapport à la phase aqueuse (coefficient de partage) ;
- la stabilité du produit dans la phase organique ;
- la sélectivité du solvant (faible solubilité des impuretés).

Après l'extraction, les phases sont séparées, dans le cas des protéines qui ne sont pas solubles ou sont déstabilisées dans des solvants organiques, on peut les extraire en créant deux ou plusieurs phases aqueuses séparables, à l'aide de polymères hydrophiles comme le polyéthylèneglycol (PEG) et le dextrane (Tessier, 2007).

I.2.3.1Extraction liquide-liquide :

C'est une opération qui consiste à extraire un ou plusieurs constituants d'une solution A (solvant initial) au contact d'un solvant liquide B (solvant d'extraction) pour lequel le ou les constituants à isoler ont une grande affinité par rapport au liquide initial. Les deux solvants A et B sont non miscibles. L'extraction liquide-liquide est aussi nommée extraction par solvant. (Brisset, 2005). Il existe deux types d'extraction liquide-liquide :

A) Extraction liquide-liquide discontinue :

Elle est réalisée grâce à des ampoules à décanter. Il existe plusieurs modèles d'ampoules à décanter (Figure15). Celles ayant la tubulure au-dessus du robinet sont les plus utilisées, car elles permettent de mieux visualiser l'interface et donc de mieux séparer les deux phases.

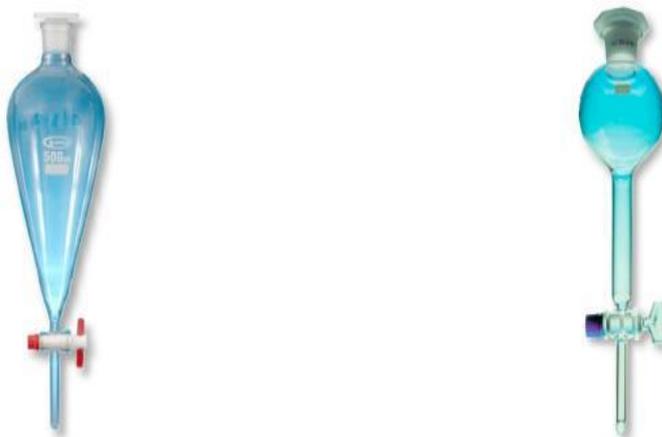


Figure 15 : Les différents types d'ampoule à décanter [10].

B) Extraction liquide-liquide continue :

Lorsque le produit à isoler est relativement soluble dans la phase à extraire, l'extraction discontinue peut se révéler insuffisante. On peut alors utiliser une méthode d'extraction en continu. Le solvant est recyclé et passe continuellement à travers la solution à extraire

I.2.3.2 Extraction liquide-solide

Ce procédé d'extraction est de plus en plus utilisé. Une extraction liquide-solide se déroule en deux étapes. Une première étape consiste en un passage d'un soluté (ou de solutés) d'un milieu liquide à un milieu solide, ce dernier ayant pour finalité de retenir ce (ou ces) soluté (s). La seconde étape consiste en une élution du soluté d'intérêt, par un solvant approprié, permettant de rompre les interactions soluté-matrice de la phase solide. La « fixation » du soluté doit donc être réversible. Les relations entre la phase solide et les solutés sont des interactions de type Van der Waals, électrostatiques, ou de type liaisons hydrogène (BRISSET, 2005).

II les techniques de purification

II.1 Généralités

II.1.1 Définition

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

La purification d'une protéine donnée passe par l'étude de différents critères la caractérisant, et permettant de la séparer des autres molécules (taille, forme, charge...) (CEZARD, 2009).

II.1.2 Objectifs de la purification des enzymes

Alors, la purification des enzymes a comme objectifs essentiels d'avoir (HAINQUE et al, 2008 ; CEZARD, 2009):

- Un maximum du rendement de l'enzyme ;
- Un maximum de pureté possible ;
- Un maximum de son activité catalytique.

II.2 Moyens de purification

Les méthodes sont celles utilisées dans la purification des protéines. On peut désigner les différentes méthodes en fonction de leur propriété générale de purification (CEZARD, 2009):

- Méthodes basées sur les différences de solubilité.
- Méthodes basées sur la taille des molécules.
- Méthodes basées sur les propriétés ioniques.

II.2.1. Méthode basée sur les différences de solubilité

II.2.1.1 Précipitation

Les techniques de précipitation consistent à rendre une protéine insoluble dans un solvant donné. Cette solubilité dépend de l'hydratation de ces protéines, de leurs structures et leur PH. (CEZARD, 2009).

✓ Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$: La précipitation différentielle est une technique plus douce qui préserve en générale la structure, et donc la fonction des protéines (peu dénaturante, elle n'altère pas non plus l'activité des éventuelles enzymes (CEZARD, 2009). Le sulfate d'ammonium (SA) est utilisé comme un sel favorisant la précipitation : c'est un sel très soluble dans l'eau, permettant d'atteindre des forces ioniques très élevées (CEZARD, 2009). L'addition du sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque une déshydratation et précipitation des protéines, induisant ainsi le phénomène de relargage (l'avantage du relargage est que les protéines conservent leur conformation native et peuvent être dissoutes sans dénaturation) (ABDELLAOUI, 2007). Les ions sulfates et

ammonium sont petits et neutralisent efficacement les charges des protéines. Cette méthode devra être suivie d'un lavage pour éliminer le sel résiduel (en général par dialyse, gel de filtration) (CEZARD, 2009) (Figure16).

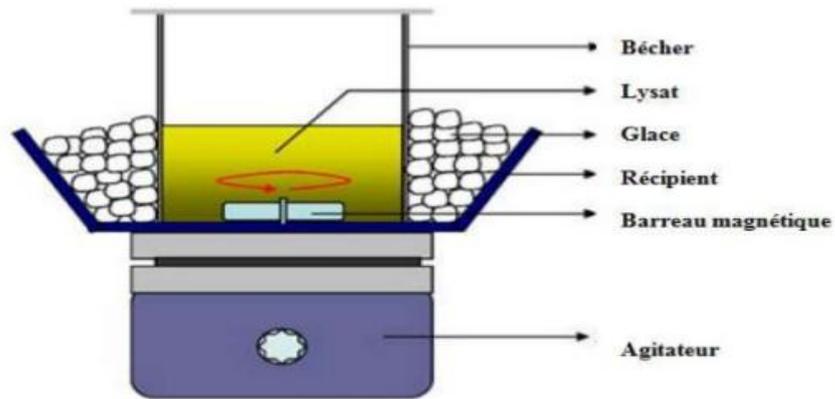


Figure 16 : Précipitation au sulfate d'ammonium (WENK et FERNANDIS, 2007).

II.2.2 Méthodes basées sur la taille des molécules

II.2.2.1 Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Les membranes de dialyse utilisées se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors le nom de « boudin » de dialyse. Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre-dialyse (Figure 14) (HAINQUE et al., 2008).

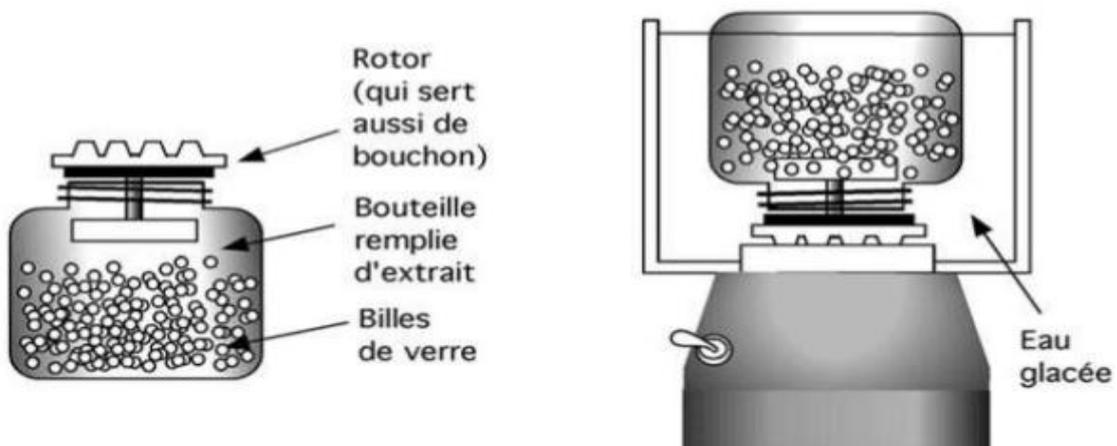


Figure 17 :Schéma générale d'une dialyse (HAINQUE et al, 2008).

II.2.2.2 La centrifugation

La centrifugation est une méthode permettant de séparer les constituants d'un mélange sur la base de leur différence de densité dans un solvant. Dans cette méthode, les molécules de protéine sont soumises aux forces (centrifuges) de la gravité (les molécules de protéine sont des macromolécules). En effet, si la particule a une densité plus élevée que le fluide en lequel elle est immergée, elle tend à émigrer en bas, suivant la direction de force de pesanteur. Ce déplacement des particules dans le sens de la force centrifuge est dénommé sédimentations ; lorsque les particules en suspension dans leurs solvant sont ainsi placées dans le rotor d'une centrifugeuse, la mise en œuvre de la centrifugation génère une accélération qui pousse les particules vers l'extérieur du rotor, donc vers le fond du tube de centrifugation. La vitesse à laquelle se déplacent les particules est proportionnelle à (HAINQUE et al, 2008):

- la force gravitationnelle à laquelle les particules sont soumises (dans le cas d'une simple sédimentation, cette force est due à la seule pesanteur) ;
- la masse des particules ;
- la différence entre la densité des particules et celle du solvant.

II.2.2.3 Filtration

La filtration est l'opération qui consiste à séparer les particules solides qui se trouvent en suspension dans un liquide par une membrane, tout en limitant son colmatage pour obtenir un dialysant (Lesmolécules de grandes tailles, protéines par exemple, restent dans le boudin de dialyse). Contre – dialyse (Les petites molécules contenues dans le boudin sortent du sac de dialyse vers le liquide de contre –dialyse) (Hainque et al, 2008). On distingue deux types de procédés, la filtration tangentielle et la filtration frontale.

Le matériel de filtration regroupe les filtres 'Il existe deux types de filtre, les filtres d'épaisseur et les filtres membranes(Figure 18)et les entonnoirs.



Figure 18: La membrane millipore.

La filtration consiste à séparer les constituants d'un mélange liquide -solide par passage à travers un milieu filtrant. Elle est beaucoup plus rapide que la sédimentation. Il existe plusieurs procédés de filtration :

➤ Filtration gravimétrique (filtration par gravité)

Dans cette méthode, l'entonnoir de laboratoire équipé d'un papier filtre est utilisé. La différence de pression est créée par la hauteur du liquide sur le filtre (Figure 19).

La filtration gravimétrique présente les inconvénients suivants:

- La filtration est lente.
- La difficulté de récupération de la phase solide isolée, surtout lorsqu'elle est peu abondante.
- La séparation est incomplète: le solide retient une quantité non négligeable de liquide (Benabdllah, 2016).

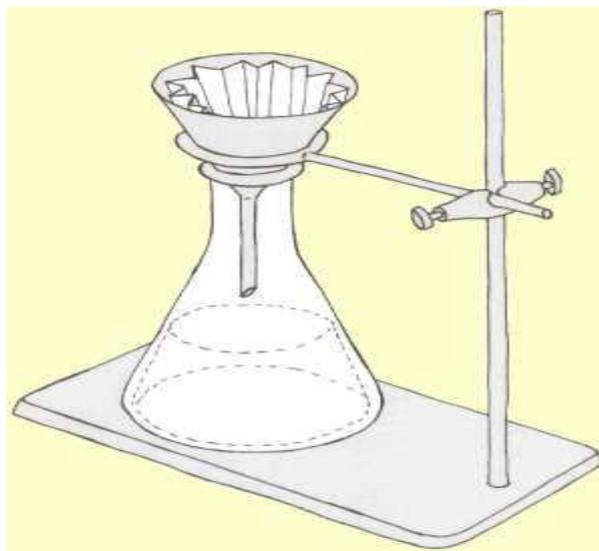


Figure 19 : La filtration par gravité.

➤ Filtration sous vide

La vitesse de filtration est augmentée par la création d'une dépression en aval du matériau filtrant. C'est le mode de filtration utilisé d'une manière courante pour les verres frittés et les membranes filtrantes. Des entonnoirs spéciaux adaptés sur une fiole à succion, dans laquelle on crée une dépression, sont utilisés. L'entonnoir est adapté sur la fiole par l'intermédiaire d'un cône en caoutchouc, qui collera à la fiole et l'entonnoir lorsque la dépression est établie (Figure 18) (Benabdillah, 2016).

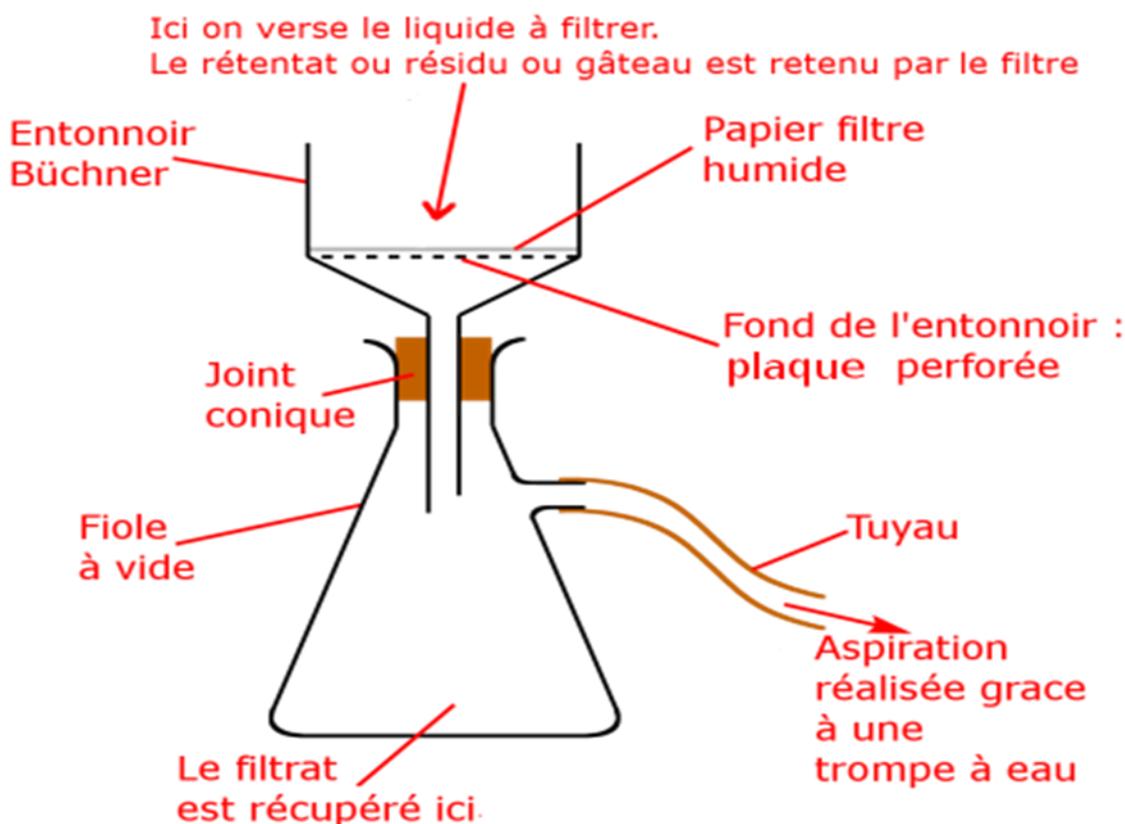


Figure 18 : La filtration sous vide (Derambure, 2008).

➤ Filtration sous pression

La vitesse de filtration est augmentée en exerçant une pression sur le liquide à filtrer en amont du matériel filtrant représenté par une membrane filtrante. La filtration sous pression évite le moussage et l'évaporation du solvant; elle est d'un emploi fréquent dans l'industrie. Ce système de filtration sous pression avec membranes filtrantes existe également sous forme de cartouches filtrantes (millipore) adaptable sur une seringue pratique pour la filtration des petits volumes de solution à filtrer. Au laboratoire, la microfiltration stérilisante à l'aide du

dispositif Swinnex Millipore est une filtration sous pression. Ce dispositif est constitué de deux pièces plastiques, que l'on visse l'une sur l'autre enserrant une membrane filtrante.

II. 2. 2. 4. Ultrafiltration

C'est une séparation de macromolécules en solution dans une phase dispersante. Il s'agit d'une membrane avec une porosité très faible (25 nm) qui peut retenir les protéines et les acides nucléiques. Elle permet la concentration des solutions de macromolécules et l'élimination de la plupart des contaminants de petite masse moléculaire (sels, glucides...).

Les applications de l'ultrafiltration et de la microfiltration sont plus analytiques, outre la clarification et les filtrations stériles, on cite également:

- Les analyses microbiologiques et tests de stérilité.
- Les analyses gravimétriques.
- Les isollements des cellules d'un liquide céphalo-rachidien.
- Les analyses de poussières.
- Les isollements de virus.

II.2.3 Méthodes basées sur les propriétés ioniques

II.2.3.1 Chromatographie

➤ Définition

La chromatographie est la plus importante de toutes les méthodes de purification. Bien que ce soit la technique qui trouve l'application la plus large, la chromatographie est une méthode relativement simple de séparation du composé désiré de ses impuretés, ou d'isoler différents composants d'un mélange. Elle sert en analyse pour identifier et qualifier des composés au sein d'échantillons divers. Les méthodes chromatographiques sont des méthodes mettant en jeu différents processus physicochimiques (Burgot, 2011).

➤ Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé (s) à l'égard de deux phases. L'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. L'échantillon est entraîné par la phase mobile à travers la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une

différence de vitesse de progressions des produits et donc l'élution. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature des phases mobile et stationnaire (Bourguet et Auge, 2008).

➤ Types de chromatographie

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et leur désorption sur la phase stationnaire, soit de leur différente solubilité dans chaque phase. On peut classer les méthodes chromatographiques selon la nature des phases utilisées ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation.

- Chromatographie sur colonne (C. C)

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la C.C peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes. Dans notre cas, il a été question d'une CC de gel silice 60 utilisée en premier lieu, elle permet de dégraisser l'extrait, d'éliminer les pigments chlorophylliens et autres produits ne faisant pas l'objet de ce travail et bien sûr dans la mesure du possible, de partager le tout en bloc de composés plus ou moins similaires (Madi, 2009).

- Chromatographie analytique sur couche mince (CCM)

Cette méthode se repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en général un mélange de solvants, adapté au type de séparation recherché, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de polyamide ou de silice. Elle nous permet d'avoir les empreintes du contenu polyphénolique et/ou flavonique de l'extrait étude phytochimique de l'espèce *Globularia alypum* L (BOUTITI, 2004).

La chromatographie sur couche mince préparative (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre (20x20 cm) ou sur feuille semi-rigide

de matière plastique ou d'aluminium. Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu. En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique est très utile car la transposition à partir de CCM analytique vers des techniques spectroscopiques est facile à réaliser. Le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts (purs et propres) pour l'opération d'identification structurale (Mahdjar, 2013).

- Chromatographie sur papier (CP)

a) La chromatographie sur papier Wathman analytique

Cette technique de séparation repose sur le phénomène de partage des constituants d'un extrait entre la phase stationnaire et la phase mobile. Elle utilise une phase stationnaire constituée par l'eau elle-même absorbée par la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle. La phase mobile est le plus souvent un mélange très polaire de solvants organiques et de l'eau, qui entraîne les molécules séparées avec des vitesses différentes, selon leur degré d'affinité vis-à-vis des deux phases. Elle est généralement appliquée pour la séparation et parfois la purification des produits en faible quantité, soit en mode monodimensionnel ou bidimensionnel (Mahdjar, 2013).

b) Chromatographie sur colonne sur gel de silice

Cette technique a été réalisée en 1906 par le botaniste Mikhail Tswelt, et jusqu'à nos jours elle est appliquée dans nos laboratoires. Cette technique repose sur le phénomène d'absorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits apolaires sont élués les premiers. La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases :

La phase stationnaire: C'est le support solide, qui est la colonne contenant une quantité calculée de gel silice préparée sous forme de bouillie dans le moins polaire des solvants utilisés.

La phase mobile:représente le solvant d'éluion utilisé qui est en générale un mélange de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire(Mahdjar, 2013).

II.2.3.2 Electrophorèse

Le terme électrophorèse couvre une gamme étendue de techniques. Dans tous les cas, l'échantillon contenant les protéines à séparer est placé dans un champ électrique qui provoque un déplacement des protéines chargées. La vitesse de migration d'une telle protéine est proportionnelle au champ électrique appliqué. Le facteur de proportionnalité est défini comme la mobilité électrophorétique : c'est une propriété intrinsèque à chaque protéine. Ainsi, les protéines migrent à des vitesses différentes ce qui permet de les séparer. En pratique, la séparation est peu souvent effectuée en veine liquide à cause de la convection, mais plutôt sur un gel support, qui peut être inerte ou interagir avec les protéines (CEZARD, 2009).

- **Electrophorèse sur gel**

Tous les points du support sont au même pH, et les protéines migrent en fonction de leur charge nette. Celles qui ont un point isoélectrique égal au pH du tampon restent neutres et ne se déplacent pas. On peut jouer sur un certain nombre de paramètres, comme la nature du gel, du tampon, la présence de détergents etc (CEZARD, 2009).

III. Méthodes de dosage des protéines

Il existe plusieurs méthodes de dosage déjà répertoriées, on peut citer :

III.1 Méthodes physico-chimiques

III.1.1.Méthode de kjeldahl

Pendant longtemps et jusqu'à des temps récents, elle a été à peu près la seule méthode valable pour la détermination de l'azote. La teneur en protéines de la matière organique est obtenue par multiplication de la teneur en azote minéral par un coefficient moyen qui représente la richesse en azote des protéines animales ou végétales. La teneur en azote minéral est donnée par dosage soit après minéralisation ou pyrolyse du produit, soit directement à l'aide de méthodes d'activation. La méthode de Kjeldahl est une méthode simple, facile à mettre en œuvre, précise, fiable et peu coûteuse. Par ailleurs, la méthode de Kjeldahl ne permet pas de doser les nitrates et les nitrites (Guillou et al, 1976).

III.1.2 Méthode de Biuret

C'est une méthode classique non standardisée. Son principe est basé sur la coloration pourpre du complexe des ions cuivriques avec les liaisons peptidiques en milieu alcalin. L'intensité de la coloration est directement liée à la teneur en protéines. Cependant la longueur d'onde varie avec la nature de la protéine ; la lecture photométrique est faite entre 540 et 650 nm. La réaction de Biuret est peu sensible, sa simplicité et sa relative spécificité ont entraîné son utilisation pour le dosage des céréales mais elle n'est pas impliquée pour le dosage des protéines du lait à cause du lactose et de la matière grasse. De plus la méthode est affectée par la teneur en azote non protéique (Guillou et al, 1976 ; Brown et al, 1983).

III.1.3 Méthode de Lowry

La méthode de Lowry est une méthode dérivée de celle du Biuret. Elle utilise le réactif de FolinCiocalteu qui en présence d'une protéine est réduit en un complexe bleu de molybdène. Lowry a fortement augmenté la sensibilité du dosage en faisant précéder la réaction d'un pré traitement par un réactif au cuivre en milieu basique. La lecture de la coloration est faite à 750 nm pour le maximum de sensibilité. La spécificité de la méthode est faible, elle se prête mal aux dosages des protéines dans les milieux biologiques ou produits alimentaires (lait, oeufs, céréales ...) (Godon et Loisel, 1981).

III.1.4 Méthode de Bradford

La méthode de Bradford (1976) est un dosage colorimétrique qui permet d'estimer la quantité de protéine contenue dans un extrait. Cette méthode a pour principe la formation de complexes entre le bleu de Coomassie et les résidus basiques et aromatiques des protéines. Elle est basée sur le changement d'absorbance qui se manifeste par la modification de la couleur du Bleu de Coomassie qui se fixe sur les liaisons peptidiques et se stabilise sous forme anionique. La solution initialement marron vire au bleu en présence de protéines, déplaçant la bande d'absorption de 465 nm à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant ainsi la concentration en protéines dans l'échantillon. La méthode de Bradford est très sensible, rapide et stable (Mbarga panda, 2012).

III.2 Méthodes physiques

Parmi les méthodes physiques, on peut citer :

III.2.1 Spectrophotométrie Ultra –Violette (UV)

La spectrophotométrie est une méthode de mesure des absorbances de molécules d'une solution selon les longueurs d'onde des groupements chromophores de ces molécules. On parle alors de spectrophotométrie moléculaire dans l'UV ou bien le visible. Le dosage des protéines par mesure ultra-violette est lié à la présence d'acide aminé aromatique (tyrosine et tryptophane) dont le maximum d'absorption est à 275 nm et des liaisons peptidiques qui absorbent à 190 nm. La spectrophotométrie UV est une méthode simple et rapide, elle est peu coûteuse, qui peut être facilement mis en œuvre sur le terrain. De faibles volumes d'échantillons sont nécessaires (inférieur à 10 ml) et de l'analyse dure moins de 2 min, mais l'absorbance ultra violette des protéines n'est pas très intense et le dosage n'est pas très précis (Godon et Loisel, 1981).

III.2.2. Fluorimétrie

Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons visibles ou du proche UV. C'est le phénomène de photoluminescence. Si l'émission a lieu immédiatement après l'excitation (quelques nanosecondes), on parle de fluorescence. La technique d'analyse correspondante est la fluorimétrie. C'est une méthode très sensible pour la mise en évidence et le dosage des composés fluorescents à l'état de traces: elle permet de détecter ces composés à des concentrations très faibles. Comme le spectre d'absorption, le spectre de fluorescence d'un composé est une caractéristique aussi spécifique qu'un diagramme de diffraction RX. Les protéines réémettent à 340 nm la lumière qu'elles absorbent à 275 nm et la fluorescence ainsi apparue peut être utilisée pour le dosage des protéines. Cette méthode est rapide non destructive, et non pas affectée par la diffusion de la lumière, ce qui permet de l'utiliser directement sur les suspensions sans filtration ni centrifugation. Mais de nombreuses substances non protéiques contenues dans les aliments sont aussi fluorescentes, de sorte que ce dosage est mieux adapté à des travaux de recherche qu'à l'analyse de routine des produits alimentaires (Godon et Loisel, 1981).

III.2.3 Turbidimétrie

La turbidimétrie adopté dans cette étude est utilisée pour la détermination de l'intensité de clarification des eaux souterraines, de surface : usée ou potable. Par définition, la turbidité est la mesure de l'aspect plus ou moins trouble de l'eau; c'est l'inverse de la limpidité, elle n'est toutefois pas une mesure directe des matières en suspension dans l'eau, mais plutôt une mesure de leur effet de diffusion sur la lumière. Un faisceau lumineux direct

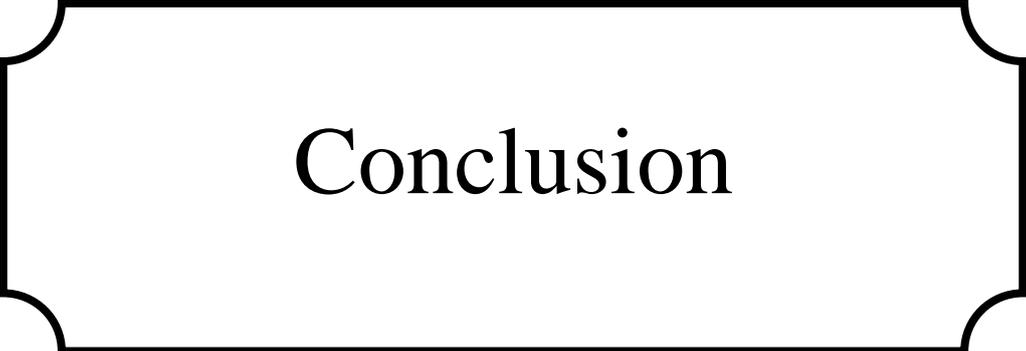
est relativement peu affecté dans une eau parfaitement pure; cependant, même les molécules d'un fluide pur diffusent la lumière jusqu'à un certain point. Les Standard Méthodes for the Examinaisons of Water and Wastewater définissent la turbidité comme étant « l'expression de la propriété optique qui fait que la lumière est diffusée et absorbée plutôt que transmise sans changement de direction ni d'intensité de flux à travers un échantillon ». Elle est causée par diverses matières particulaires ou colloïdales composées de limon, d'argile, de composés organiques ou inorganiques ainsi que du plancton et d'autres micro-organismes (Ben Thayer et al, 2007).

Ces particules très fines sont de bons adsorbants pour les micropolluants organiques et les métaux lourds et sont également des très bons supports pour les microorganismes. La turbidité joue un rôle très important comme indicateur d'efficacité de traitement.

Le principe de la turbidimétrie est simple ; l'intensité d'un faisceau lumineux traversant une suspension de particules protéiques par exemple, est diminuée par suite de la diffusion due à ces particules. Le changement d'intensité est lié à leur quantité, donc à la teneur en protéines (Godon et Loisel, 1981). Cependant, il est difficile de corrélérer la turbidité à une concentration massique de solides car la taille, la forme et l'indice de réfraction influent sur la diffusion de la lumière et sont sans lien avec la masse. C'est pourquoi la turbidité est évaluée en unités néphélémétries de turbidité (UNT) et non en termes de concentration de matières en suspension (MES) par volume d'eau (en mg/l, par exemple) (Groupe scientifique sur l'eau, 2003) (Lounnas ,2008).

III. la technique de conservation : Lyophilisation

Autrefois appelée cryodesiccation est un procédé de séchage dont le principe consiste à sublimer le glace d'un produit congelé: l'eau du produit passe donc directement de l'état solide à vapeur. La lyophilisation est un processus de déshydratation qui consiste en l'élimination de l'eau par sublimation. Le principal avantage de cette technique est la qualité supérieure du produit fini. Grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit, la lyophilisation réduit les risques de la réaction d'altération et inhibe la croissance des micro-organismes. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité (Machacine, 2007).



Conclusion

Conclusion

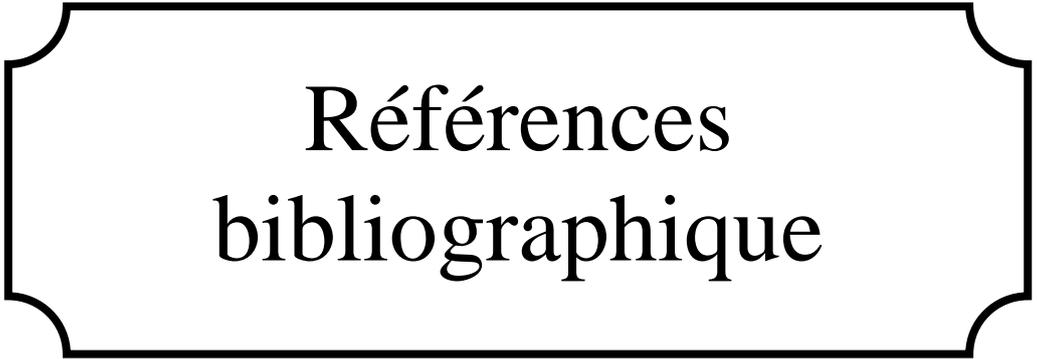
Bien qu'ayant une valeur nutritionnelle élevée, l'œuf dans son entité a une mauvaise image à cause de la présence de cholestérol dans le jaune. Cette image tant de plus en plus à disparaître et disparaîtra totalement d'autant plus que les recherches ont prouvé que les composants de l'œuf, plus particulièrement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

Dans le cadre précis de notre étude, nous nous sommes intéressés à un groupe de protéines retrouvées dans de très nombreux processus physiologiques : les lysozymes. Aujourd'hui, même si le lysozyme reste encore moins connu du public, il est néanmoins l'une des protéines les plus valorisées au monde surtout dans le domaine médicale où il constitue une source fiable des principes actifs de plusieurs médicaments.

Cette enzyme s'attaque au peptidoglycane (PG), structure que l'on retrouve exclusivement et presque universellement chez les bactéries. Ses propriétés antibactériennes sont utilisées pour des applications préventives telles que la supplémentation des laits maternisés et des applications curatives sous forme de médicaments contre la toux, certaines affections buccales et autres. Depuis une dizaine d'années, le champ d'action du lysozyme s'est considérablement élargi du fait de son utilisation en industrie fromagère.

Une activité de recherche fondamentale concernant notamment les méthodes d'obtention, de fractionnements et de dosages protéiques, notamment celles utilisées en industrie agro- alimentaire, ont fait l'objet de nos activités de recherches actuelles. Une bonne stratégie d'obtention d'une enzyme dans les meilleures conditions possibles comportera donc le bon choix du matériel biologique de départ, le choix des techniques d'extraction les plus adaptées à ce dernier et les techniques de séparation et de purification adéquates aux propriétés physico-chimiques de l'enzyme.

Nous sommes persuadés que ces protéines sont loin d'avoir livré tous leurs secrets et que les années à venir pourraient voir un "boum" de leurs applications.



Références
bibliographiques

- Abdallah et el hage chahine. (1999).**Transferrin, the mechanism of iron release by ovotransferrin.(p: 912-920).
- Abdellaoui. (2007).** Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'Aspergillus Niger Isole du Sol de la Région de Boumerdes. thèse de magister : Université M'hamed BOUGARA de BOUMERDES. (p: 36).
- Andrews, S, Robinson, A et Rodríguez-Quiñones,F. (2003).**Bacterial iron homeostasis. (p : 215-237).
- Anton, M., F. Nau, V. Lechevalier, C. Guerin-Dubiard and T. Croguennec. (2010).** Egg products: functional ingredients for complex matrices Les ovoproduits: des ingrédients fonctionnels pour des matrices complexes, INRA Productions Animales, (p : 215-224).
- Arzour née Lakehal Nedjoua.(2006).**Appréciation des risques bactériologiques dans les oeufs et Les ovo produits.
- Baron, F. (1998)** Etude du comportement de Salmonella Enteritidis dans le blanc d'oeuf. Ph. D Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Ben Thayer B., KhalifaRiahi K., Boudhraa H., (2007).** Élimination de la turbidité par oxygénation et filtration successives des eaux de la station de Sfax, (p :355-365).
- Ben Abdallah H. (2016).**Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Université Ferhat Abbas de Sétif.
- Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, and F. Götz. 2006.** The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. (p:4598-4604).
- Blankenvoorde M, Henskens Y,Veerman E, Andnieuw et Amerongen A. (1996)** Inhibition of the growth and cysteine proteinase activity by human salivary cystatin S and chicken cystatin.(p:847-850).
- Bloomfield A. (1919).** The fate of bacteria introduced in the upper air passages. Bull. Johns Hopkins Hosp. (p : 317-322).
- Bourguet E et Auge C. (2008).** Les technique de laboratoire purification et analyse des composés organiques. Ellipses. Paris. (p : 77- 90).
- Bourin M, Gautron M, Berges S, Attucci G, Le Blay, V. Labas, Nys Y et Rehault-Godbert S.(2011).** Antimicrobial Potential of Egg Yolk Ovoinhibitor, a Multi domain Kazal-like Inhibitor of Chicken Egg, Journal of Agricultural and Food Chemistry.(p:12368-12374).

Boutiti.A, (2004).Etude phytochimique de l'espece Globularia Alypum, Mémoire magister. Université Mentouri de Constantine. (p:11-15).

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (p: 248-254).

Brisset J. (2005). Chimie analytique en solution principes et applications. Lavoisier. Paris. (P:477).

Brown P, Clark R, Labarre D et Ross S. (1983). A comparison of methods for protein analysis of human milk. Federal Pro Engineer.(p:42).

Burgo T. (2011). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. 3ème Ed. Paris.4.

Canfield, R. (1963).The amino acid sequence of egg white lysozyme. J. Biol.Chem.(p :2698-2707).

CezardF. (2009). Biotechnologies en 26 fiches. Dunod. Paris. (P: 82- 118- 120- 131).

Clarke, et Dupont. (1992). O-acetylated peptidoglycan: its occurrence, pathobiological significance, and biosynthesis.(p:85-91).

Cook M, Beissinger G, Toranzos, Rodriguez, et W. J. Arendt.(2003). Trans shell infection by pathogenic micro-organisms reduces the shelf life of non-incubated bird'seggs: a constraint on the onset of incubation?. Lond.(p:270).

Cuccioloni M, Sparapani L, Amici M, Lupidi G, Eleuteri A et Angeletti M.(2004).Kinetic and equilibrium characterization ofthe interaction between bovine trypsin and I-ovalbumin. (p:199).

Derambure I. (2008). Büchner - filtration sous vide des sciences de l'eau.(p :365).

Dommett, R., M. Zilbauer, J. T. George, et M. Bajaj-Elliot.(2005). Innate immune defence in the human gastrointestinal tract. Mol. Immunol.(p:903).

Ducatelle. (2007).Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis: what are the unique properties of this serotype?.

Ebina, T.; Tsukada, K. (1991). Protease inhibitors prevent the development of human rotavirus-induced diarrhea in suckling mice. (p:35).

- Fernie-King B ,Seilly A, Davies et Lachmann. (2002).** Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme.(p:70).
- Fleming, A. (1922).** On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions.(p:306).
- Gantois, I, Ducatelle F, Pasmans F. Haesebrouck, Humphrey, et VanImmerseel. (2009).** Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. Fems Microbiology Reviews.(p:718).
- Ghuysen J, Stroninger J et Tipper D. (1968).**Bacterial cell walls Comp.(p:53).
- Godon B, Loisel W.(1981).** Analyse des constituants alimentaires. Techniques d'analyse et de contrôle dans l'industrie agro-alimentaires, Lavoisier, Paris. (P :187).
- Guerin-Dubiard, Anton, Gautron Y, Nys et Nau. (2010),** Composition de L'œuf, Science et technologie de l'œuf Volume II. (p : 176).
- Guillou H, Pelissier J, Grappin R. (1976).** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. (p : 143).
- Hainque B. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. London.5.
- Herbert, S., A. Bera, C. Nerz, D. Kraus, A. Peschel, C. Goerke, M. Meehl, A. Cheung, and F. Götz.(2007).** Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci.
- Hebert L. (2008).** Etude de la résistance au lysozyme chez Enterococcusfaecalis. L'université de CAEN.
- Hisamatsu K, Yamauchi Y, Uchida M et Murakami Y. (1986).** Promotive effect of lysozyme on the ciliary activity of the human nasal mucosa. (P: 290).
- Kato A, Ogino K, Kuramoto Y et Kobayashi K. (1979).** Degradation of the carbohydrate units of ovomucin during egg white. Journal of Food Science. (P: 1341).
- Koch A. (2003).** Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. Clin. Microbiol.
- Kumar A et Garg N. (2006).**Enzymology: enzyme purification. School of biotechnology Devi Ahilya University 2.

Kuroki R, Weaver et B. Matthews. (1993). A covalent enzyme-substrate intermediate with saccharide distortion in a mutant T4 lysozyme. *Science*.

Laurent J. (1982). Les enzymes production et utilisations industrielles. Gauthier- Villars. France. (P :51- 55).

Le Blanc B. (2013). Cours de biochimie des protéines. Université de Sherbrooke. Consulté en ligne le: 06/11/2014. <http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5d.html>

Li-Chan, E. et S. Nakai, 1989, Biochemical basis for the properties of egg white, *Critical Reviews of Poultry Biology*. (P: 21).

Lounnas A. (2008). Amélioration des procédés de clarification des eaux de la station hamadikromade Skikda. Mémoire de magister, université Skikda.(p : 92).

Machacine A. (2007).Apport du procédé de lyophilisation sur la qualité des fraises marocaines.

Madi., A. (2009).caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (thym et sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques,Mémoire de magister, Université Mentouri Constantine.

Mahdjar S. (2013).Contribution à l'Etude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Mbarga panda S., (2012). Etude de quelques paramètres biochimiques au cours de l'acclimatation des vitroplantes de *xanthosoma*. Mémoire Présenté en vue del'obtention du Diplôme de Professeur, Université de Yaoundé I.(p :64).

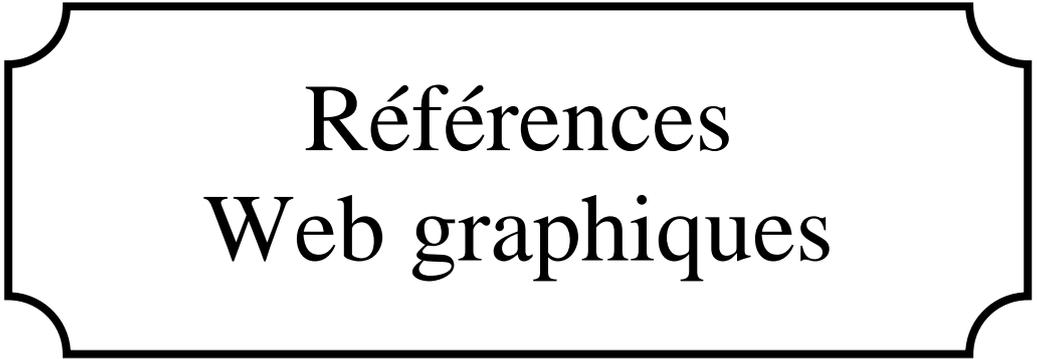
Michael Nigen. (2009). Interactions et assemblages entre l'alpha lactalbumine et le lysozyme: mécanismes, structures et stabilité.

Miller S, Kato et Nakai.(1982). Sedimentation Equilibrium Study of the Interaction between Egg-White Lysozyme and Ovomucin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.(p: 30).

Nakai S. (2000). Molecular Modification of Egg Proteins for Functional Improvement. In: SIM, J.S.

Nys Y et Guyot N.(2011). Egg formation and chemistry, Improving the safety and quality of eggs and egg products. Volume 1: Egg chemistry, production and consumption. Cambridge, UK, Wood head Publishing.(p:132).

- Peschel, A. (2002).** How do bacteria resist human antimicrobial peptides?(p:186).
- Protais J. (1988)** La qualité de l'oeuf de consommation L'aviculture Française, Editions Rosset. (p :761-772).
- Réhault-Godbert S, Labas V, Hervé-Grépinet V, Slugocki C, Berges M, Bourin M, Brionne A, Poirier J, Gautron J, Coste F et NYS Y. (2013).** Ovalbumin-related Protein X.(p:288).
- Stevens L. (1991).** Egg white proteins. Comparative Biochemistry and Physiology Biochemistry & Molecular Biology. (P: 100).
- Tessier L. (2007).** Technologies des bioprocédés industriels. CCDMD. Québec. (p:193- 194).
- Thapon J et Bourgeois. (1994).**Présentation générale de l'oeuf.Ed :Tec&Doc Lavoisier. 2.
- Tranter H et Board R. (1984).**The Influence of Incubation-Temperature and Ph on the Antimicrobial Properties of Hen Egg-Albumin. Journal of Applied Bacteriology.
- Valenti P, Visca P, Antonini G et Orsi N.(1985).** Antifungal Activity of Ovotransferrin towards Genus Candida. Mycopathologia.175.
- Valenti P, Visca P, Antonini G et Orsi N. (1986).**Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and Candida cells. (p:271).
- Van Immerseel, F, Gantois I, Pasmans F et Haesebrouck. (2007).**variations in the water quality of a karstic aquifer using UV spectrophotometry.
- Vocadlo, D. J., G. J. Davies, R. Laine, and S. G. Withers. 2001.** Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate.412.
- Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A., Dauter, Z., 2007.** Triclinic lysozyme resolution. Acta Cryst.
- Wenk M et Fernandis A. (2007).**A manual for biochemistry protocols. World scientific.248.
- Zaaboube H et Benrahou A. (2014).**Etude de la conformation et de la composition des œufs de la poule locale, comparaison avec les œufs de souche commerciale.



Références
Web graphiques

Références Web graphique

- [1] <https://informationsnutritionnelles.fr/oeuf> consulté le 15 mars 2018 à 10 :30.
- [2] <http://www.audomainedes3coqs.e-monsite.com/pages/abc-de-la-basse-cour/schema-de-l-oeuf.html> consulté le 18 mars 2018 à 11 :30.
- [3] <http://pointsdecerise.canalblog.com/archives/2018/04/03/36212742.html> consulté le 15 mars 2018 à 11 :00.
- [4] <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html> consulté le 21 Avril 2018 à 09 :00.
- [5] <http://www.antibiotique.eu/leur-fonctionnement.html> consulté le 12 mai 2018 à 15 :00.
- [6] <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html> consulté le 15 mai 2018 à 13 :00.
- [7] <http://pdb101.rcsb.org/motm/9> consulté le 07 juin 2018 à 22 :00.
- [8] <https://www.health.belgium.be/fr/alimentation/substances-specifiques-ajoutees/enzymes-alimentaires/enzymes-autorisees/quelques> consulté le 07 juin 2018 à 16 :00.
- [9] <https://www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/lysozyme.php> consulté le 07 juin 2018 à 21:00.
- [10] <https://www.servilab.fr/catalogue/consommables/ampoules> consulté le 15 juin 2018 à 23:00.