

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ DE BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie industrielle

Intitulé du mémoire

**Production de l'enzyme Glucose Oxydase à partir
d'*Aspergillus niger* : application industrielle**

Présenté par : Kettal Meriem el batoul

Devant les jurys composés de :

Pr Chemat Zoubida	U. Saad Dahleb-Blida1	Présidente
Dr Chennouf Zohra	U. Saad Dahleb-Blida1	Examinatrice
Pr Laribi Hassiba	U. Saad Dahleb-Blida1	Promotrice
Dr Chemlal Radia	U. Houari Boumediene-Alger	Co-promotrice

Année universitaire 2022/2023

RESUME

L'enzyme la glucose oxydase (GOx) a une importance industrielle considérable, elle est utilisée pour catalyser l'oxydation du glucose afin de contrôler le glucose dans le sang. La production du GOx a remarquablement augmenté avec la période de fermentation, la culture et l'extraction de l'enzyme à partir de la souche, le pH 5,0-6,0 et la température variée entre 30 et 35°C ont été considérés comme des conditions optimales pour la culture. Le glucose et la peroxydase se sont avérés être une bonne combinaison de réactifs pour une activité maximale du GOx. Des études sur l'activité enzymatique ont été réalisées en fonction du temps, et la période de 168 heures s'étant conclue être le temps optimal pour l'activité enzymatique.

Mots clés : Glucose oxydase ; *Aspergillus niger* ; Diabète ; Bandelettes sanguines ;
Surveillance de la glycémie.

ABSTRACT

The glucose oxidase (GOx) enzyme has considerable industrial importance and used in catalyzes the oxidation of glucose for monitoring the glucose in the blood. The glucose and peroxidase were found to be a good combine reagent for maximum GOx activity. Remarkably Gox production was increased in the ages of spores, the cultivation and the extraction of the enzyme from the fungi was reached, the pH 5.0–6.0 and the temperature between 30 and 35°C were searched to be optimum for GOx cultivation. Enzyme activity studies were carried out with different time in which 168 hours was found to be the optimal time for GOx activity.

Key words: Glucose oxidase; *Aspergillus niger*, Diabetes; Blood strips; Glucose monitoring.

ملخص

انزيم الجلوكوز وكسيديس له أهمية صناعية كبيرة، يستخدم لتحفيز أكسدة الجلوكوز لمراقبة الجلوكوز في الدم. أثبت الجلوكوز والبروكسيد أنهما مزيج جيد من المتفاعلات للكشف على نشاط الانزيم، كما زاد إنتاج الانزيم بشكل ملحوظ مع زيادة عمر البراغي، التخمر واستخلاص الانزيم من الفطريات يتوجب درجة حموضة من 5 إلى 6 ودرجة حرارة بين 30 إلى 35 درجة للصنع الأقصى.

حققت دراسات على نشاط الانزيم بالنسبة للوقت، وكان 168 ساعة هو الوقت الذي حقق نشاط أقصى

الكلمات الدالة: أكسيد الجلوكوز، فطر الرشاشيات النيجر؛ شرائط الدم، داء السكري؛

مراقبة الجلوكوز.

REMERCIEMENT

Au début et avant tout nous remercions **Allah** qui nous avoir donné le courage, la santé et la patience de finaliser ce travail.

Nos remercions sincèrement notre encadrante pédagogique le Professeur « **Hassiba Laribi** » ainsi que notre Co-encadrante le Docteur « **Radia Chemlal** » pour leurs connaissances, compétences et professionnalisme et surtout leur disponibilité sans faille et sans qui le mémoire ne serait pas achevé.

Les mots me manquent pour remercier les personnes les plus chères à mon cœur : ma famille, mes parents. Je leur suis extrêmement reconnaissante pour leurs soutiens indéfectibles, conseils, encouragements et tout ce qu'ils m'apportent pour mon bien-être dans la vie de tous les jours, Rien de tout cela n'aurait été possible sans leur aide et bénédictions.

J'aimerais exprimer ma gratitude à toutes les ingénieures de labo du département génie des procédés Madame **Nesrine, Karima, Nafissa, Naziha** et Monsieur **Rachid** et un remerciement spécial pour **Mr Taher** pour son aide et d'avoir été toujours là quand j'avais besoin de lui, et le grand merci à **Mr Tefahi** le responsable du laboratoire d'Hygiène pour la souche utilisée dans notre étude et son encouragements infini.

Promo 2023 des PHI merci pour tout je suis ravi de rencontre des gens comme vous, je vous souhaite tous que de réussite, bonheur et santé.

Je remercie sincèrement tous mes amis, qui m'ont soutenu et encouragé pendant la période de recherche ; aussi mes collègues du laboratoire 116 et 251 merci de permettre laisser des souvenirs inoubliables de cette journée ;

Doctorante **Soumia** je te remercie infiniment pour ton aide de connaissances de matériels et surtout de conseils et encouragements tu seras une émerveillant docteur ;

Doctorant **Billel** merci pour ton soutien constant et de ton aide de connaissances et de conseils qu'Allah facilite ton chemin ;

Ma très chère amie et sœur **Rofaida** merci d'être toujours à mes côtés bien vaillante, une bulle d'énergie je te souhaite plein de succès et de bonheur ma moitié.

Et merci à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin durant ce travail.

Meriem El Batoul

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LE DIABETE

1. Introduction 2
2. Epidémiologie (en monde, en Algérie) 2
3. Différents types de diabète 3
4. Autosurveillance glycémique (ASG) 5

CHAPITRE 2 : LES BANDELETTES REACTIVES DE GLYCEMIE

1. Généralité 7
2. Historique 7
3. L'anatomie des bandelettes de glycémie 8
4. Méthodes d'analyse 12

CHAPITRE 3 : GLUCOSE OXYDASE

1. Introduction 13
2. Structure de la glucose oxydase 16
3. Action catalytique de la glucose oxydase 18
4. Caractéristiques de la glucose oxydase 18
5. Applications de la glucose oxydase 20

DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE

- 1.1 MATERIEL 23
- 1.2 METHODES 25
 1. Microorganisme 25
 2. Fermentation 27
 3. Extraction 28
 4. Dosage enzymatique 30
 5. Le rendement d'activité 31

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

- I. La fermentation 32
- II. L'activité enzymatique 33
- III. Le rendement du dosage enzymatique 34

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 36

LA BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Statistiques des diabétiques selon la FID	02
Figure 2 : Tendence de la prévalence standardisée selon l'âge, en Algérie	03
Figure 3 : Anatomie d'une bandelette de test.....	09
Figure 4 : Première génération de biosenseurs enzymatiques du glucose, basés sur la mesure du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction.....	10
Figure 5 : Biosenseurs enzymatiques de deuxième génération du glucose, basés sur l'utilisation de médiateurs redox.....	11
Figure 6 : Biosenseurs enzymatiques de troisième génération pour le glucose, basés sur un transfert direct d'électrons du site actif de la glucose oxydase vers l'électrode.....	12
Figure 7 : Le processus de développement de la glucose oxydase	13
Figure 8 : Cycle de vie fongique généralisé.....	15
Figure 9 : Les spores fongiques d' <i>Aspergillus niger</i>	16
Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la glucose oxydase.....	16
Figure 11 : Le site actif de la GOx du <i>P. amagasakiense</i>	17
Figure 12 : Mécanisme général de réaction de la GOx en présence de glucose comme substrat.....	18
Figure 13 : cellule de Malassez double quadrillage	25
Figure 14 : le quadrillage de la cellule Malassez.....	27
Figure 15 : Diagramme de fermentation d' <i>Aspergillus niger</i>	28
Figure 16 : Diagramme d'extraction de l'enzyme GOx à partir d' <i>Aspergillus niger</i>	29
Figure 17 : Courbe représente l'activité du GOX en fonction du temps.....	34
Figure 18 : Histogramme représente le rendement enzymatique du GOX durant le temps....	34

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : La taxonomie de la souche	14
Tableau II : Mesure du dosage enzymatique.....	30
Tableau III : Développement d' <i>Aspergillus niger</i> durant la période de fermentation	32
Tableau IV : l'absorbance en fonction du temps.....	33

LISTE DES ABREVIATIONS

ASG : autosurveillance glycémique

GOx / GOD : glucose oxydase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

FID : Fédération internationale du diabète

A : Aspergillus

P : Penicillium

GRAS : generally recognized as safe (généralement reconnu comme sûr)

NaCl : Chlorure de sodium

UI : Unité Internationale

kDa : kilo Dalton

K_m : constante de Michaelis

FAD : flavine adénine dinucléotide

FADH₂ : flavine-adénine-dinucléotide (forme réduite)

EC: European community

ATCC: American type culture collection

pH : potentiel d'Hydrogène

PDA : potato dextrose agar

HCl : acide chlore hydrique

KCl : Chlorure de potassium

K₂ HPO₄ : Permanganate de potassium

MgSO₄, 7H₂O : Sulfate de potassium

rpm : tours par minute

MPa : mégapascal

MW : poids moléculaire

DO : oxygène dissous

UV : Ultra-violet

SSF : solide fermentation

ABS : absorbance



INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERAL

Le diabète est un problème majeur de santé publique, une hausse régulière du nombre des cas de diabète et de la prévalence de la maladie a été enregistrée ces dernières décennies [1]. Suite à cette situation de nombreux dispositifs d'autosurveillance glycémique (ASG) ont vu le jour ces dernières années, les patients sont de plus en plus engagés dans la prise en charge et le suivi de leur maladie grâce à l'utilisation de ces dispositifs ASG [2].

Parmi ces ASG, les bandelettes réactives de glycémie, qui sont des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro et qui peuvent être utilisées comme test d'orientation de diagnostic. L'Agence Nationale Française d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) a publié un rapport sur le test de glycémie qui stipule que ce dernier peut être utilisé lors d'un dépistage communautaire comme moyen d'orientation de diagnostic. L'enzyme servant de base aux kits de détection du glucose est la glucose oxydase (GOx). Ainsi, de nombreux capteurs de glucose sont disponibles sur le marché utilisant de la GOx immobilisée [3,4,5].

La valeur du marché mondial des biocapteurs de glucose a été estimée à 548 milliards de \$ ce qui correspond à 11% des dépenses totales de la santé dans le monde. Les prévisions pour 2035, sont de 627 milliards de \$ [6].

En 2017, l'Algérie a dépensé 434 Millions de \$ (51,3 milliards de Dinars Algériens) entre médicaments et Bandelettes pour les patients diabétiques [7]. Pour la même année, la Caisse nationale des assurances social (CNAS) a remboursé environ 13,5 Milliards DA par an par rapport aux frais des bandelettes.

Suite à la situation actuelle de la politique nationale de notre pays concernant l'arrêt de l'importation des produits et de les remplacer par les produits locaux, en encourageant la production nationale. Dans ce contexte s'inscrit notre projet de fin d'étude startup dont l'objectif est d'essayer de produire l'enzyme glucose oxydase à partir de la souche *Aspergillus niger*. Ce travail s'articule autour des points suivants :

- Etude bibliographique qui se compose de trois chapitres : chapitre sur le diabète, chapitre sur les bandelettes et le dernier chapitre sur la glucose oxydase ;
- Partie matériel et méthodes ;
- Résultats et discussion et on termine notre étude par une conclusion et perspectives.



PREMIERE PARTIE :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



CHAPITRE 1

LE DIABETE

1.1. Introduction

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est une maladie chronique grave qui se déclare lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (hormone qui régule la concentration de sucre dans le sang, ou glycémie), ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser correctement l'insuline qu'il produit. Il est l'une des quatre maladies non transmissibles prioritaires ciblées par les dirigeants mondiaux. Une hausse régulière du nombre des cas de diabète et de la prévalence de la maladie a été enregistrée ces dernières décennies [1].

1.2. Epidémiologie

1.2.1. Dans le monde :

D'après les statistiques de la Fédération Internationale du Diabète (FID) datant de 2021, le monde compte près de 537 millions d'adultes âgés de 20 à 79 ans, soit 9,3 % vivant avec le diabète. Selon ces statistiques, ce nombre devrait augmenter jusqu'à 643 millions d'ici 2030 et à 783 millions d'ici 2045 (**figure 1**) [6].

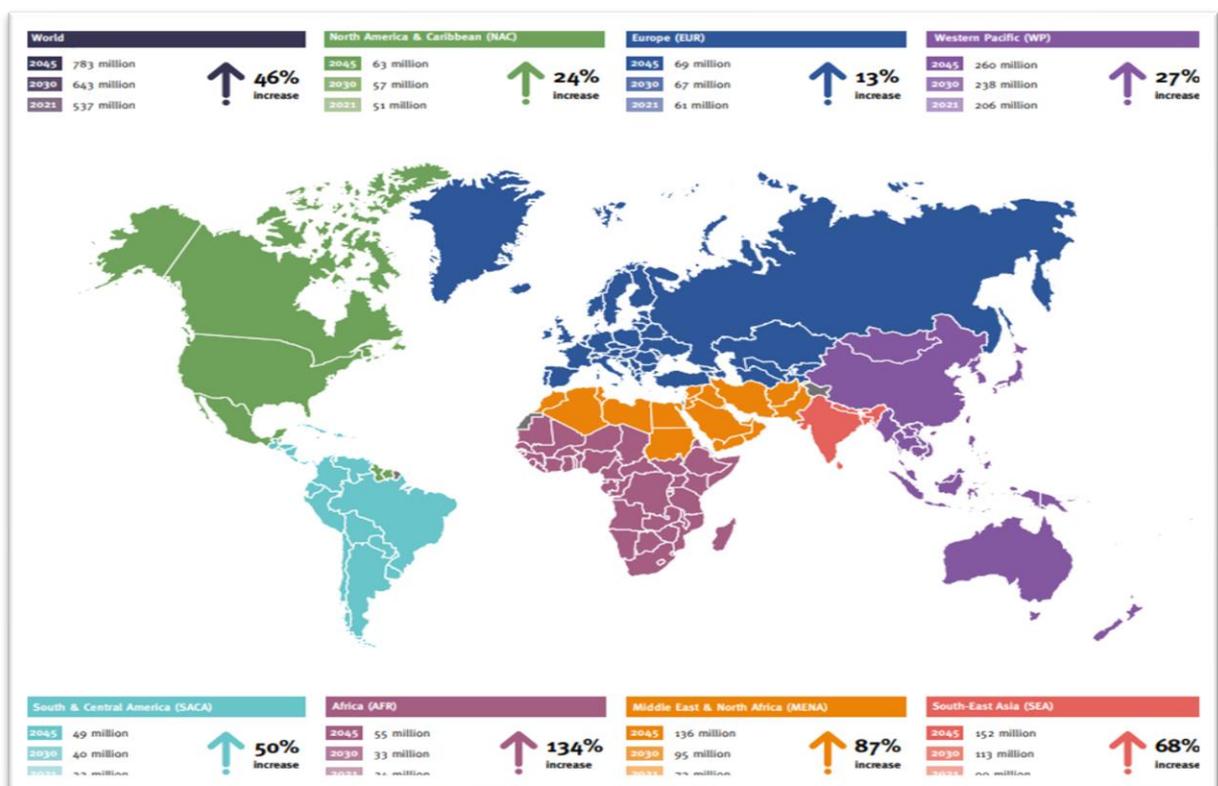


Figure 1 : Statistiques des diabétiques selon la FID [6].

1.2.2. En Algérie :

Une étude menée par le ministère de la Santé, en coordination avec l'OMS, entre 2016 et 2018, a révélé que 14,4% des Algériens âgés de 18 à 69 ans, soient environ 4 millions de personnes atteintes de diabète [1]. Le taux de prévalence du diabète est passé de 8% en 2003 à 10% en 2012 pour atteindre 14.4% en 2018 (**figure 2**) [8].

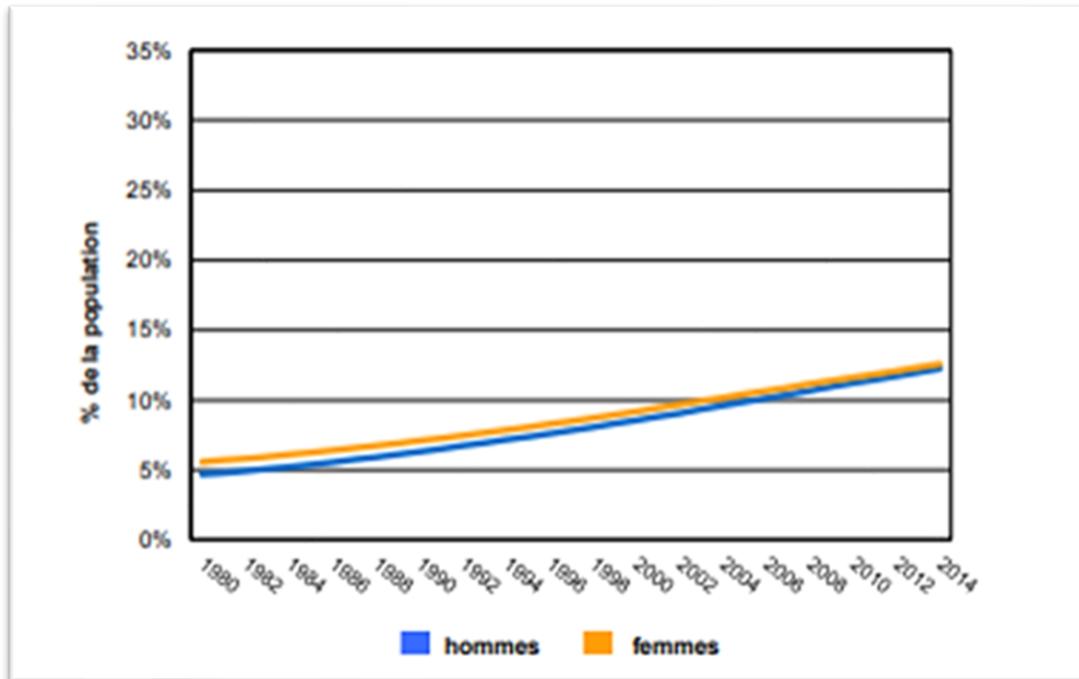


Figure 2 : Tendence de la prévalence standardisée selon l'âge, en Algérie [8].

1.3. Différents types de diabète

1.3.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 correspond à une maladie auto-immune résultant de la destruction progressive des cellules bêta (β) des îlots de Langerhans du pancréas, qui en temps normal synthétisent l'insuline, conduisant à une carence absolue en cette hormone. L'hyperglycémie, par carence insulinaire, apparaît lorsque plus de 80 % des cellules β sont détruites. Le diabète de type 1 survient chez un individu génétiquement prédisposé, il est déclenché par des facteurs environnementaux [9].

1.3.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est associé à une insulino-résistance, éventuellement liée à une insuffisance plus ou moins marquée de l'insulinosécrétion. Ce type de diabète n'est pas insulino-dépendant mais il devient au fil des années par épuisement progressif de

l'insulinosécrétion. On note que 80% des diabétiques de type 2 sont en excès pondéral. Généralement, le diabète de type 2 est diagnostiqué chez des patients âgés de plus de quarante ans, cependant, la recrudescence de l'obésité dans les populations jeunes mène à la détection de cas de diabète de type 2 chez des adolescents de plus en plus fréquemment. Des antécédents familiaux sont retrouvés dans plus de 50% des cas [10].

1.3.3. Formes intermédiaires

Il existe des formes intermédiaires de diabète :

- Diabète de type 2 rapide : forme dans laquelle la destruction des îlots est plus rapide que dans le diabète de type 2 classique, ainsi l'évolution de l'insuffisance de l'insulinosécrétion est plus rapide ;
- Diabète de type 1 lent : forme également appelée LADA (Latent Auto-immune Diabetes in Adults), dans laquelle la destruction des îlots de Langerhans par un processus auto-immun se fait d'une manière lente.

Ainsi, on peut constituer tout un spectre d'états diabétiques allant du diabète de type 1 classique au diabète de type 2 classique [10].

1.3.4. Etat prédiabétique

Le terme « prédiabète » est utilisé pour désigner une anomalie de la glycémie à jeun, une intolérance au glucose ou un taux d'HbA1c allant de 6 à 6.4 ; par conséquent les personnes sont exposées à un risque élevé de diabète et de complications liées à la maladie.

On distingue deux situations d'états prédiabétiques :

- Intolérance aux hydrates de carbones caractérisée par une glycémie à jeun normale mais une glycémie anormalement haute après une charge de glucose ;
- Anomalie de la glycémie à jeun non diabétique dans laquelle c'est la glycémie à jeun qui est anormalement élevée.

L'état prédiabétique est le plus souvent asymptomatique, cependant il existe un risque de conversion en diabète de 25 à 50% sur dix ans. Ce risque sera minimisé par l'instauration de mesures hygiéno-diététiques préventives fondées sur une perte de poids et la pratique d'une activité physique régulière. Cette anomalie de la glycémie n'induit pas de risque de microangiopathies (Atteinte des petits vaisseaux sanguins) mais elle peut être à l'origine de complications macro-angiopathies (Atteinte des gros vaisseaux et artères) dont la fréquence dépendra de l'association à d'autres facteurs de risque cardiovasculaires [10].

1.3.4.1. Diabète gestationnel

D'après l'OMS, le diabète gestationnel est défini comme étant « un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable, débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse, quels que soient le traitement nécessaire et l'évolution dans le post-partum ».

Cette définition englobe particulièrement deux catégories de patientes :

- Catégorie 1 : les patientes ayant un diabète méconnu antérieur à la grossesse qui persistera alors après l'accouchement ;
- Catégorie 2 : les patientes développant une mauvaise tolérance au glucose durant la grossesse. Ce trouble disparaît souvent dans le post-partum immédiat.

Il existe aussi une troisième situation, bien moins fréquente, dans laquelle un diabète de type 1 se déclare au cours de la grossesse [11].

1.3.4.2. Autres formes de diabète

Les types particuliers comprennent une grande variété de dysfonctionnements relativement peu courants. Notamment, le type MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) qui est en rapport avec une anomalie génétique touchant l'insulinosécrétion. D'autres anomalies génétiques touchent le récepteur à l'insuline. Le diabète peut aussi se déclencher chez des individus vivant avec certaines conditions de vie et/ou certaines pathologies, telles que [2] :

- Maladies pancréatiques (pancréatectomie, pancréatite, cancer, etc...) ;
- Maladies endocriniennes (syndrome de Cushing, hyperthyroïdie, acromégalie, etc...) ;
- Syndromes génétiques (syndrome de Down, syndrome de Turner, etc...) ;
- Infections virales (rubéole congénitale, cytomégalovirus, etc...) ;
- Prise de certains médicaments ou certains agents chimiques (glucocorticoïdes, thiazides, statines, antiépileptiques, etc...) ;
- Etat de stress.

1.3.5. Autosurveillance glycémie (ASG)

L'autosurveillance glycémique consiste en l'ensemble des techniques réalisables par les diabétiques permettant la mesure de la glycémie capillaire, mais aussi la détection dans les urines du glucose (glycosurie) et des cétones (cétonurie). L'ASG est un système global de

prise en charge de la maladie par le patient lui-même. Elle comprend l'autocontrôle ainsi que l'adaptation de son traitement, de ses activités physiques et de son alimentation en fonction des résultats de l'autosurveillance, avec le plus d'autonomie possible. Elle est considérée comme élément central du schéma thérapeutique des diabétiques. Le plus souvent réalisé par le diabétique lui-même, l'ASG est également considérée comme un acte infirmier, au vu du code de la sante public français, pouvant se pratiquer à domicile ou dans un établissement de santé. L'ASG conventionnelle a pour intérêts et objectifs [2, 3] :

- Ajustements thérapeutiques ;
- Identifier les hypoglycémies et les hyperglycémies.

CHAPITRE 2

LES BANDELETTES REACTIVES DE GLYCEMIE

1. Généralités

Les bandelettes glycémiques sont des dispositifs médicaux, appartenant à la classe des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV), destinés à un usage unique pour la lecture de la glycémie. On parle généralement de bandelette quand le principe de la réaction chimique est la colorimétrie [3].

2. Historique

L'autocontrôle glycémique est défini par l'ensemble des techniques réalisables par le diabétique permettant de mesurer sa glycémie capillaire, mais aussi la détection du glucose des cétones urinaires [12, 13].

Ce n'est qu'en 1940 que l'ASG a débuté, une vingtaine d'années après la découverte de l'insuline. Les contrôles de la glycémie étaient évalués par une mesure qualitative de la glycosurie. L'estimation quantitative de la mesure du glucose est apparue en 1941 avec le comprimé Clinitest®, suivie par les bandelettes Clinistix® en 1945. Quelques années plus tard, la recherche des corps cétoniques dans les urines est rendue possible grâce au comprimé Acetest®. Cependant, le contrôle de la glycosurie seule n'était pas suffisant pour refléter la glycémie réelle. L'ASG s'est orientée alors vers le développement des bandelettes glycémiques et surtout la mise au point et le perfectionnement des appareils de lecture de bandelettes et leur miniaturisation. En 1956, l'ASG est possible avec la bandelette Glukotest®. La glycémie est estimée par visualisation directe de la quantité de lumière réfléchi à la surface de la bandelette utilisant le principe de la photométrie. Elle met en œuvre la réaction chimique enzymatique encore d'actualité, faisant intervenir le couple glucose oxydase (GOx) /peroxydase (POD). Quelques années plus tard, ces méthodes d'analyse glycémique ont été largement utilisées. Malgré son efficacité, ce type de contrôle visuel, par photométrie sur bandelette, simple sera peu à peu abandonné au profit des techniques plus précises. En effet, la fiabilité de ce type de contrôle glycémique était bonne pour apprécier une glycémie, mais peu fiable lorsque ces tests sont utilisés à des fins diagnostiques. Le premier lecteur de glycémie portable commercialisé, principalement destiné aux cabinets médicaux et non pas directement au patient, est le Reflomat® utilisant les bandelettes Reflotest®. Ce réflectance-mètre utilisant le système enzymatique du glucose oxydase/peroxydase est reconnu comme fiable [14, 15].

Le sursaut technologique de l'ASG a commencé au début des années 80, grâce au développement de techniques simplifiées et ambulatoires de mesure de la glycémie capillaire. Le véritable lecteur portable plus adapté au patient fut le Glucometer® I. La suite des années 80 est marquée par l'accélération technologique relative à l'ASG. Au début du XXI^e siècle, le OneTouch Ultra® est le premier lecteur permettant la lecture en seulement 5 secondes. Ce dernier lecteur utilise la technique dite électrochimique, mais avec mesure colorimétrique. L'avantage était le gain de temps réalisé grâce à la diminution de la durée de la réaction additionné du faible volume sanguin capillaire nécessaire à cette mesure et la facilité du prélèvement. Parallèlement au développement constant et croissant d'appareils portables de lecture glycémique capillaire, l'évolution dans l'obtention d'une goutte de sang est marquée par la mise sur le marché des auto-piqueurs. Ces premiers auto-piqueurs, qui semblent des méthodes archaïques aujourd'hui et surtout douloureuses. Les lancettes sont également affinées sur les 4 biseaux. Le début des années 2000 offre un nouveau concept, celui du lecteur glycémique sur sites dits alternatifs. Les sites de prélèvement sont essentiellement l'avant-bras, le bras et la base du pouce. Ils permettent un meilleur confort dans l'ASG évitant ainsi les douleurs au niveau des extrémités des doigts.

L'innovation majeure du début du XXI^e siècle réside dans la mesure continue de la glycémie plasmatique par le biais de capteurs implantés. Malgré l'aspect invasif, cette technique de mesure continue de la glycémie représente une aide en particulier pour la détection des excursions hyper et hypoglycémiques passant inaperçues entre les mesures habituelles de la glycémie capillaire. Ces récentes technologies vont se développer et s'améliorer comme cela a été le cas pour les lecteurs. Des méthodes de mesures glycémiques peu invasives et non invasives sont en cours d'évaluation. D'autres ne sont actuellement qu'au stade de la recherche [14, 15].

3. L'anatomie des bandelettes de glycémie

La magie des tests de glycémie à domicile prend vie lorsque chaque couche fonctionne de manière adéquate, en association avec les autres couches, pour générer un résultat de test précis (**figure 3**) [16].

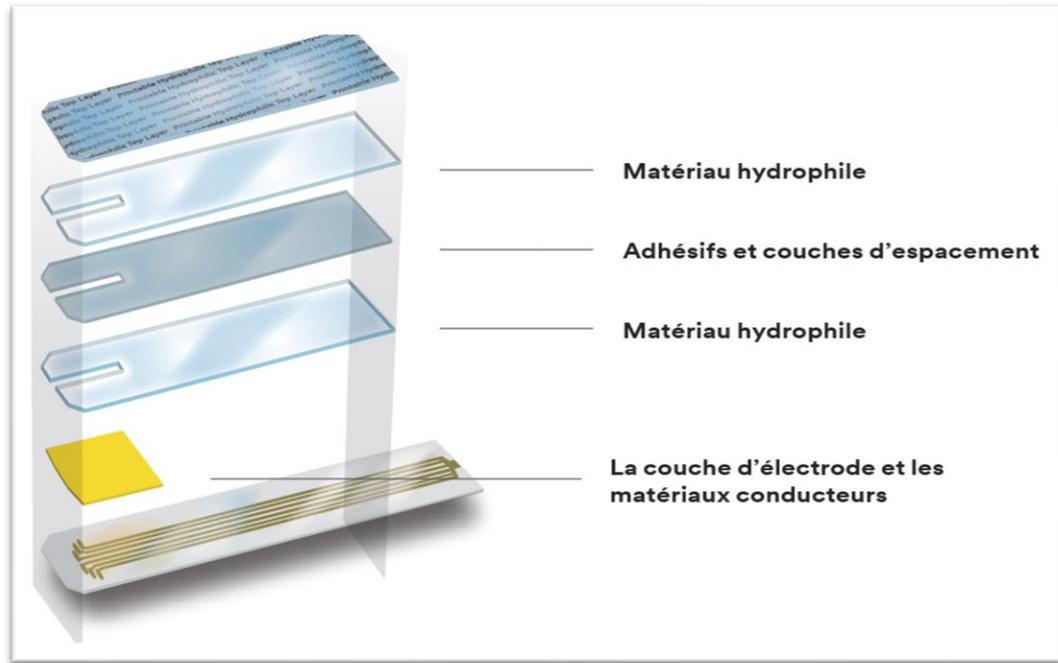


Figure 3 : Anatomie d'une bandelette de test [16]

3.1. La face avant de la bandelette de test

Elle protège les couches intérieures du monde extérieur et peut également permettre l'insertion de symboles de marque ou d'autres visuels utiles [16].

3.2. La chambre de prélèvement sanguin

La chambre de test est généralement constituée d'au moins trois couches de matériaux combinées entre elles pour favoriser l'écoulement du fluide dans un espace homogène de la chambre. L'interopérabilité des couches garantit la présentation d'un échantillon reproductible pour l'analyse [16].

3.3. Matériau hydrophile

Favorise la circulation du fluide depuis l'entrée de la chambre jusqu'à l'endroit où le(s) capteur(s) du système mesure(nt) la glycémie. La couche supérieure hydrophile est généralement transparente pour permettre à l'utilisateur de voir que le sang a rempli la chambre, ce qui facilite la vérification visuelle du test en cours [16].

3.4. Adhésifs et couches intercalaires

Fixent le film de la couche supérieure hydrophile et la couche inférieure conductrice contenant les électrodes de la bandelette de test et le revêtement réactif [16].

3.4.1 **La couche enzymatique :** Une fois que le sang remplit le canal capillaire, des mesures électrochimiques peuvent être effectuées à l'aide d'une couche enzymatique spécifique qui utilise le glucose pour générer une charge électrique. Chaque fabricant disposera probablement d'une recette personnalisée pour la

couche enzymatique, laquelle est conçue pour générer des résultats cohérents pour une concentration donnée de glucose dans le sang. La couche d'enzyme recouvre généralement la totalité du canal capillaire afin de préserver une surface de mesure constante [16].

3.5. La couche d'électrode et les matériaux conducteurs

Le signal de réponse électrochimique au niveau du site de test enzymatique passe par le circuit de la bandelette de test jusqu'au glucomètre. Le glucomètre calcule la quantité de glucose en fonction d'un ou de plusieurs signaux présentés par la bandelette de test au testeur pour analyse [16].

Le glycomètre est utilisé pour doser rapidement et de façon efficace le glucose dans le sang ou dans d'autres fluides corporels permettant ainsi d'avoir les actions nécessaires si le taux de sucre est élevé ou bas. Le dosage du glucose dans le sang par le glycomètre peut permettre de contrôler la glycémie et donc de prévenir l'hyperglycémie ou l'hypoglycémie, réduire les risques liés aux complications de diabète ou encore permettre aux diabétiques de vérifier l'efficacité de leurs traitements incluant l'insuline [17].

Le dosage du glucose par un senseur peut se faire par la mesure de l'oxygène consommé ou de la quantité du peroxyde d'hydrogène produite par la réaction enzymatique ou encore par l'utilisation de médiateurs immobilisés pour transférer les électrons de la glucose oxydase vers l'électrode. Les biosenseurs enzymatiques pour le glucose peuvent être subdivisés selon leur évolution :

- La première génération de biosenseurs du glucose consiste en des réponses électriques dues au produit de la réaction d'oxydation qui est diffusé jusqu'au transducteur. Ces biosenseurs déterminent la quantité de glucose dans les échantillons à partir du peroxyde d'hydrogène produit par l'oxydation du glucose avec la glucose oxydase (figure 4) [18, 19].

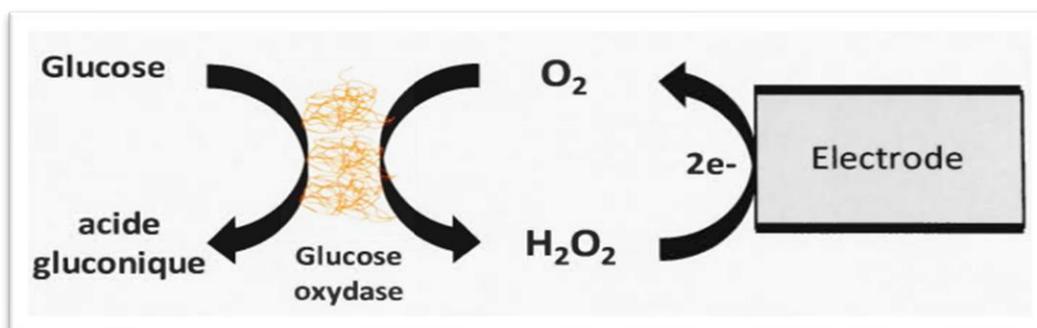


Figure 4 : Première génération de biosenseurs enzymatiques du glucose, basés sur la mesure du peroxyde d'hydrogène produit par la réaction [19].

- Une seconde génération de biosenseurs a été développée (**figure 5**) à cause de certains inconvénients de ceux de la première génération (nécessité d'un potentiel élevé 0.6V pour des mesures ampérométriques du peroxyde d'hydrogène) [20], qui peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène provoquant ainsi une diminution apparente de l'activité enzymatique. Plusieurs médiateurs spécifiques (ferrocène, ferricyanide, quinines, etc.) sont présents entre la réaction et le transducteur (l'électrode) générant ainsi des réponses plus significatives [21]. L'utilisation de médiateurs redox élimine la nécessité de l'oxygène (variable) pour le transfert d'électrons à la surface de l'électrode [18]. Également, les aspects de diffusion qui peut ralentir le processus à la surface de l'électrode sont éliminés. Les biosenseurs de la seconde génération présentent aussi des limites à leurs utilisations (compétitions élevées entre le médiateur redox et l'oxygène, modifications de réponses dues aux interférences avec d'autres espèces électro-actives, etc.) [19].

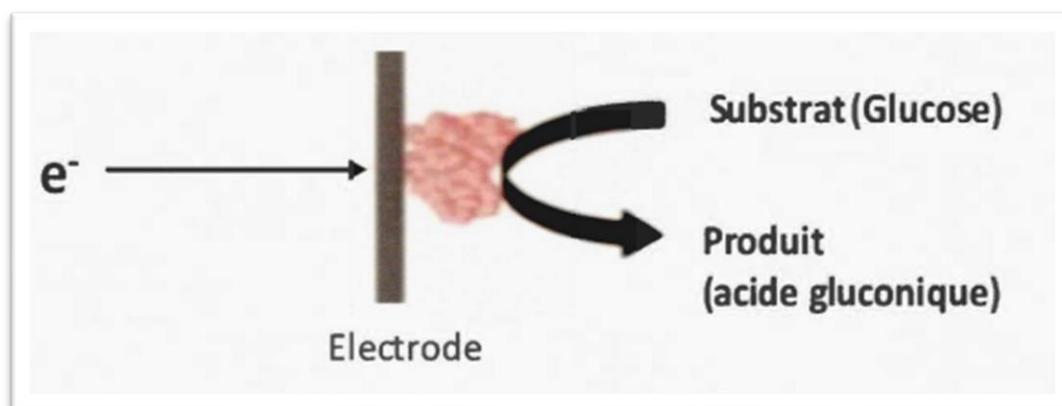


Figure 5 : Biosenseurs enzymatiques de deuxième génération du glucose, basés sur l'utilisation de médiateurs redox [19].

- Pour la troisième génération, la réaction produit elle-même des réponses (**figure 6**). Cette troisième génération se base sur un transfert direct des électrons du centre actif de l'enzyme vers l'électrode.
Les biosenseurs du glucose basé sur l'utilisation de nanotubes de carbone sont considérés comme la prochaine génération de biosenseurs ultra-sensible et ultra-rapide [22]. La glucose oxydase est immobilisée par des liaisons covalentes entre groupements amines de l'enzyme et groupements carboxyles des nanotubes. La réduction du peroxyde d'hydrogène généré par la réaction d'oxydation du glucose par le glucose oxydase sur les nanotubes va permettre une détection sélective du glucose [19].

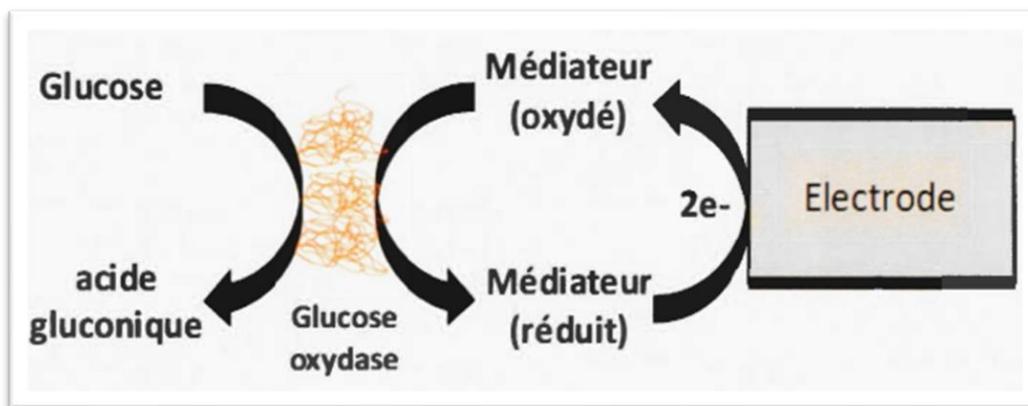


Figure 6 : Biosenseurs enzymatiques de troisième génération pour le glucose, basés sur un transfert direct d'électrons du site actif de la glucose oxydase vers l'électrode [19].

4. Méthodes d'analyse

Les bandelettes sont quasiment basées sur le même principe. Elles sont constituées d'une couche supérieure absorbante sur laquelle la goutte de sang est déposée et aspirée par capillarité. Finement poreuse ou recouverte d'une membrane sur sa face interne, elle retient les globules rouges et laisse diffuser le plasma vers les couches inférieures contenant les réactifs, essentiellement la glucose oxydase (ou éventuellement l'hexokinase) associée à un chromogène [23]. Ainsi, la technologie de la bandelette peut être basée sur :

4.1 Méthode de la glucose oxydase/ peroxydase

La glucose-oxydase (GOx) catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, et dans une deuxième réaction catalysée par la peroxydase (POD), oxyde un accepteur chromogène d'oxygène incolore sous sa forme réduite, en sa forme coloré oxydée [3].

4.2 Méthode de l'hexokinase

Cette méthode repose sur le système enzymatique hexokinase (HK). Le glucose est phosphorylé par l'adénosine triphosphate (ATP) en glucose-6-phosphate, qui, en présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase, est oxydé en 6-phosphogluconate par le nicotinamideadénine dinucléotide (NAD^+), couplée à sa réduction en NADH [24]. En présence de la diaphorèse comme catalyseur, le NADH formé, réduit le tétrazolinum en formazan coloré quantifiable [3].

CHAPITRE 3

GLUCOSE OXYDASE

1. Introduction

La glucose oxydase (β -D-glucose : oxygène-1-oxydoréductase, EC 1.1.3.4) est une flavo-enzyme, appartenant à l'oxydoréductase [25] et également appelée glucose aéro-déshydrogénase. Elle catalyse l'oxydation du β -D-glucose ($C_6H_{12}O_6$) en gluconolactone ($C_6H_{10}O_6$), en utilisant l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, elle est convertie en acide D-gluconique et en peroxyde d'hydrogène [26]. Il est désigné sous le nom de GOx ou GOD. L'activité de la GOx a été rapportée pour la première fois par Muller (1928) dans des extraits d'*Aspergillus niger*. Par la suite, Fleming a isolé la pénicilline à partir de la moisissure *Penicillium notatum*, qui est identique à la GOx découverte par Muller et qui est désignée sous le nom de pénicilline A. Afin de la distinguer de la pénicilline, son nom a été changé en notatine. Actuellement, elle est détectée dans différentes sources, notamment les insectes, le miel, les algues et les microchampignons.

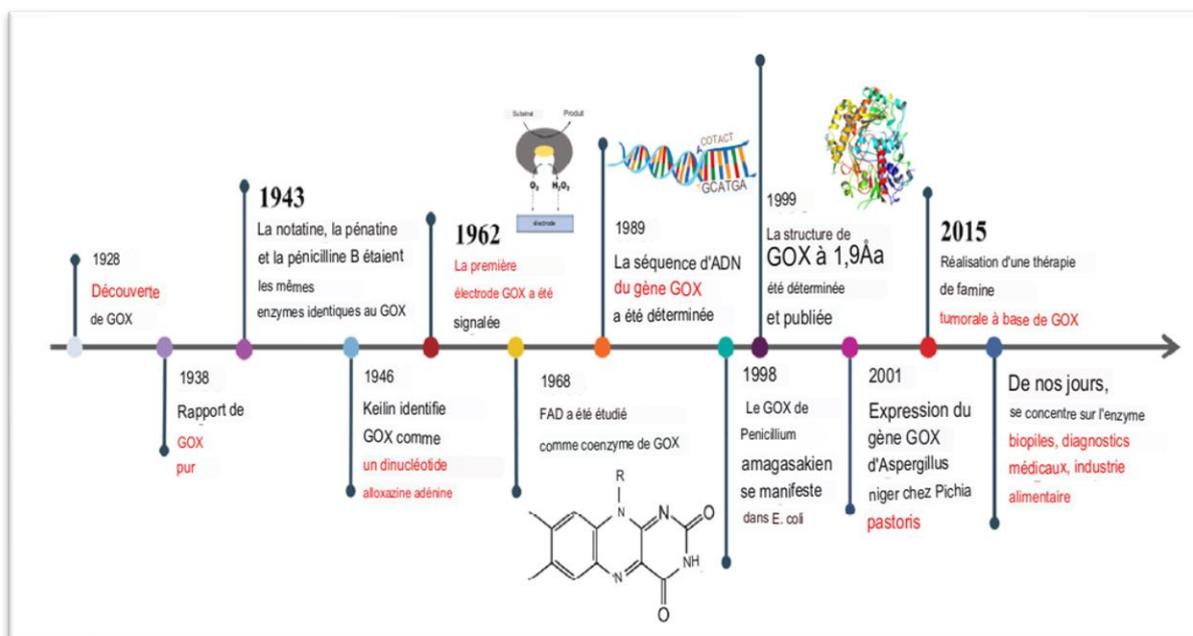


Figure 7 : Le processus de développement de la glucose oxydase [27].

Les sources de GOx largement utilisées sont *A. niger*, *P. notatum*, *P. glaucum*, *P. amagasakiense*, *P. purpurogenum*, *P. variable* et *Alternaria alternate* [28].

Il existe quatre types d'enzymes qui oxydent le glucose comme substrat principal :

- Glucose déshydrogénases ;
- Les glucose déshydrogénases quinoprotéiques ;
- Glucose I-oxydases;
- Glucose 2-oxydases.

Les deux premières enzymes ont un taux de renouvellement plus élevé et sont plus spécifiques du β -D-glucose [29]. Parmi les glucoses déshydrogénases et les glucose déshydrogénases quinoprotéiques, la dernière est instable. Les glucose 2-oxydases oxydent non seulement le glucose en acide gluconique et en peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres glucides comme la xylose et la gluconolactone.

- Production du GOx par *Aspergillus niger* :

Aspergillus niger est un producteur bien connu d'acides organiques, d'enzymes, de régulateurs de croissance des plantes et de mycotoxines et d'antibiotiques. La souche est une prodigieuse exportatrice d'espèces de protéines homologues, elle est capable de produire certaines enzymes en quantités de kg/m³ dans des conditions adéquates et elle est généralement considérée comme sûr (GRAS) et a une longue histoire d'utilisation dans l'industrie de la fermentation [30].

Le **tableau I** représente la classification de la souche *A. niger*.

Tableau I : La taxonomie de la souche [30].



Aspergillus awamori (*A. niger*)

Règne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Class	<i>Deutéromycètes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Sous-genre	<i>Circumdati</i>
Section	<i>Nigri</i>
Espèce	<i>Awamori (niger)</i>
Souche	<i>Aspergillus niger</i>

LES SPORES :

Les spores sont généralement définies comme de petits corps reproducteurs qui se détachent des espèces microbiennes (bactéries et champignons) pour s'accumuler dans l'organisme pour produire une nouvelle descendance. Au cours de ce processus, elles ne fusionnent pas avec d'autres corps reproducteurs, mais elles germent tôt ou tard. Elles varient considérablement en termes d'origine, de taille, de forme, de pigmentation, de fonctions biologiques, etc. Les spores microbiennes ont un diamètre compris entre 1 et 50 μm [30].

Les spores fongiques jouent un rôle important dans le cycle de vie des champignons (**figure 8**). Ils produisent des spores en tant qu'agents de dispersion, de reproduction et de survie. Les spores de dispersion sont produites en grand nombre. Elles facilitent la migration des souches et germent facilement. Les spores de survie sont formées dans des conditions défavorables et sont relativement peu nombreuses.

Les champignons produisent des spores **sexuelles et/ou asexuées**. Les principales classes de champignons produisant des spores sexuées sont les *zygomycètes* (*Rhizopus*), les *ascomycètes* (*Neurospora*, *Talaromyces*), les *Basidiomycètes* (*Puccinia*, *Agaricus*) et leurs spores sont appelées respectivement *zygospores*, *ascospores*, *basidiospores* respectivement.

Il existe une autre classe de champignons, les *deutéromycètes* (*Penicillium*, *Aspergillus*) qui ne produisent que des spores **asexuées** appelées conidies [30].

De nombreux champignons sont capables de produire plus d'un type de spores, par exemple, *Neurospora crassa* produit deux types de spores tels que les micro-conidies et macroconidies.

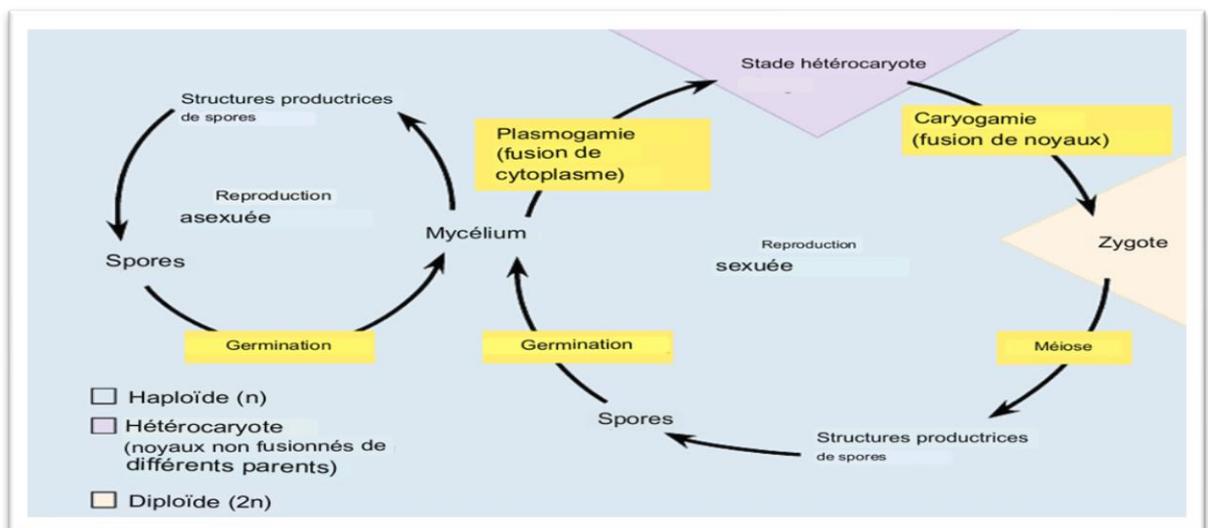


Figure 8 : Cycle de vie fongique généralisé [31]

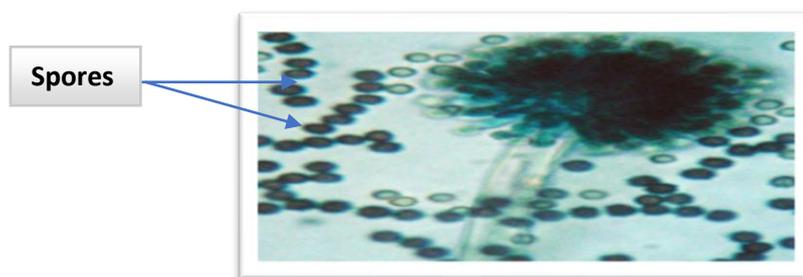


Figure 9 : les spores fongiques d'*Aspergillus niger* [32]

2. Structure de la glucose oxydase

La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* est un homodimère [33], composé de deux sous-unités identiques à chaîne polypeptidique et liées de façon covalente par des liaisons disulfures. Chaque sous-unité porte une molécule de coenzyme étroitement liée mais non covalente, appelée flavine adénine dinucléotide (FAD), qui agit comme un transporteur d'oxydoréduction dans la catalyse en tant que cofacteur. Le poids moléculaire de l'enzyme GOx est de 150 K Daltons. Certaines enzymes de *P. amagasakiense* sont glycosylées, avec une teneur en hydrates de carbone de 11 à 13 %, qui sont du type à haute teneur en mannose [34]. En 1960, Hecht et Kusai ont soigneusement étudié chaque GOx cristallisé d'*A. niger* et de *P. amagasakiense*. Les principaux résidus préservés du site actif de l'enzyme de *P. amagasakiense* sont Tyr-73, Phe-418, Arg-516, Trp-430, Asn-518, His-520 et His- 563 [35]. Parmi ces sites actifs, **Witt et al. (2000)** ont montré que l'Arg-516 était impliqué dans la liaison efficace du β -D-glucose pour la GOx. L'Asn-518 y contribue dans une moindre mesure et le reste des résidus aromatiques -Tyr-73, Phe-418 et Trp-430 - joue un rôle important dans l'orientation correcte du substrat ainsi que dans la vitesse maximale d'oxydation du glucose. La structure tridimensionnelle de la GOx est présentée à la **figure 10** et les principaux résidus du site actif de la GOx de *P. amagasakiense* sont présentés dans la **figure 11**.



Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la glucose oxydase [36]

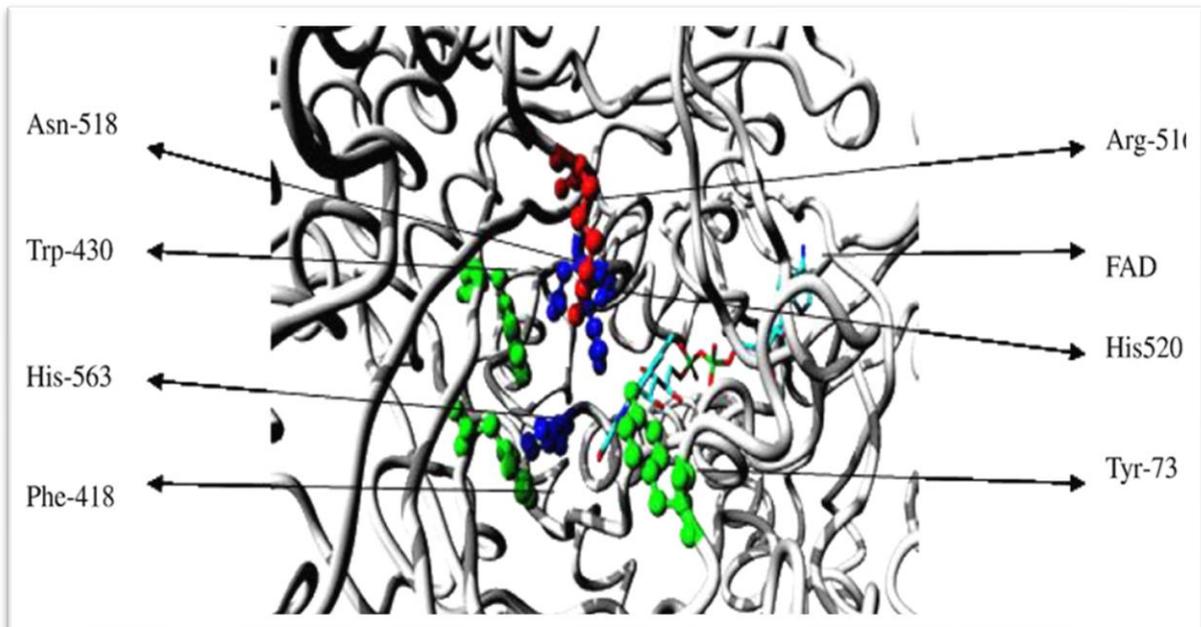


Figure 11 : Le site actif de la GOx du *P. amagasakiense* [38].

Les principales propriétés de la glucose oxydase d'*Aspergillus niger* sont [30] :

- Le coefficient d'extinction molaire d'une solution à 1 % (p/v) à 280 nm est de 13,8 (dans une solution jaune de phosphate de potassium 0,1M pH 7,0) ;
- La protéine native est acide, avec un point isoélectrique (pI) de 4,2 ;
- Le coefficient de diffusion de l'holoenzyme dans le NaCl 0,1M est de $4,94 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$;
- Le variateur natif GOx a un poids moléculaire de 160 kDa (composé de deux sous-unités de 80 kDa) ;
- Les dimensions du GOx sont de $70\text{\AA} \times 55\text{\AA} \times 80\text{\AA}$. Chacune des sous unités est un sphéroïde compact dont les dimensions approximatives sont $60\text{\AA} \times 52\text{\AA} \times 37\text{\AA}$;
- La distance minimale entre la flavine et la surface du monomère est de 13\AA . Les deux parties isoalloxazine sont séparées par une distance de $60\text{\AA} \times 52\text{\AA} \times 37\text{\AA}$;
- Constante de Michaelis (apparente) $K_m = 33 \text{mM}$;
- Activité moléculaire (nombre de tours) = $2,28 \cdot 10^4$.

3. ACTION CATALYTIQUE DE LA GLUCOSE OXYDASE

La glucose oxydase d'*Aspergillus niger* est une protéine qui catalyse l'oxydation du β -D-glucose en δ -gluconolactone à l'aide d'oxygène moléculaire, qui s'hydrolyse ensuite en acide gluconique, avec libération simultanée de peroxyde d'hydrogène. Cette réaction comporte des étapes réductrices et oxydatives. Dans l'étape réductrice, GOx catalyse l'oxydation du β -D-glucose en D-glucono- δ -lactone, qui subit une hydrolyse non enzymatique pour donner de l'acide gluconique. Ensuite, l'anneau de flavine adénine dinucléotide (FAD) de GOx est réduit en FADH₂[38]. Dans l'étape oxydative, la GOx réduit est réoxydé par l'oxygène pour donner du H₂O₂. En 1992, Witteveen a découvert que l'enzyme lactonase (EC 3.1.1.17) d'*A. niger* était responsable de la catalyse de l'hydrolyse du glucono- δ -lactone en acide gluconique [39]. Le mécanisme réactionnel général de la GOx est présenté dans la **figure 12**.

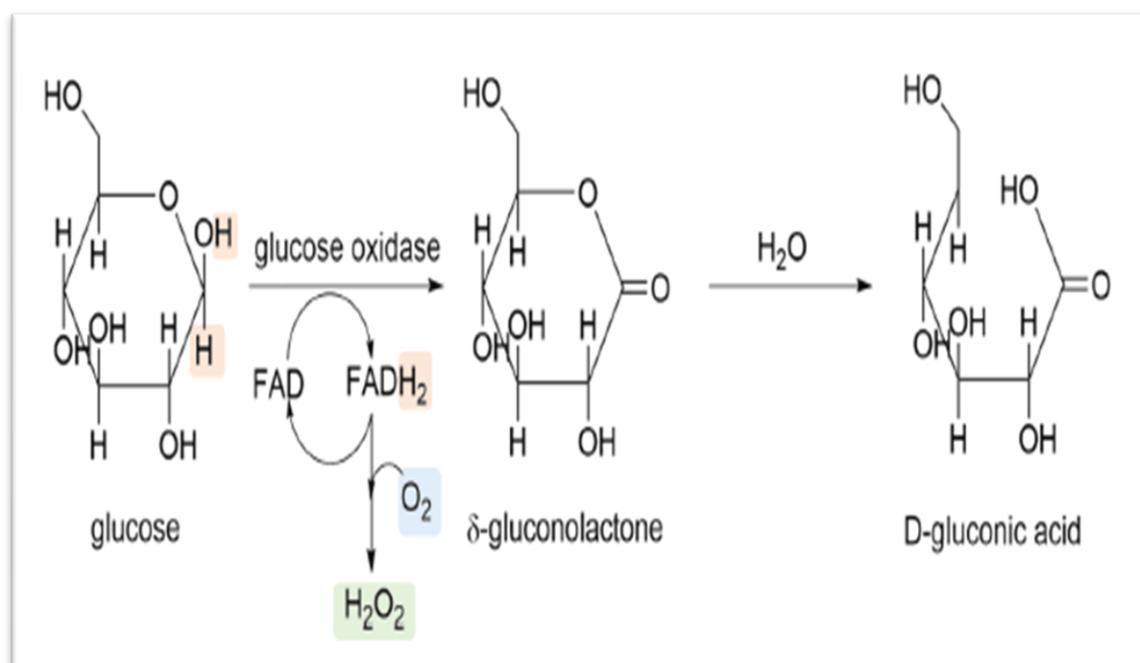


Figure 12 : Mécanisme général de réaction de la GOx en présence de glucose comme substrat [36].

4. CARACTÉRISTIQUES DE LA GLUCOSE OXYDASE

La glucose oxydase est une enzyme bien caractérisée. Elle catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique par l'intermédiaire de l'oxygène moléculaire. Elle oxyde également le mannose et le galactose à un rythme plus lent, mais pas les autres sucres. Les principales caractéristiques de l'enzyme sont :

- SPÉCIFICITÉ DE LA GOx :

L'activité de la GOx est hautement spécifique au β -D-glucose ($C_6H_{12}O_6$) et elle est négligeable avec les autres sucres. Le β -D-glucose subit une oxydation sur son C-1 en présence d'oxygène en δ -glucono-1, 5-lactone ($C_6H_{10}O_6$), ce dernier est instinctivement hydrolysé en acide D-gluconique ($C_6H_{12}O_7$). La grande spécificité de la GOx vis-à-vis du glucose permet de le détecter dans des échantillons très complexes tels que l'urine, la salive, le sang et d'autres fluides corporels, contenant de nombreux autres sucres et divers agents réducteurs non glucidiques. Ces caractéristiques structurelles et la régiosélectivité de la réaction permettent de distinguer clairement la GOx de la pyranose oxydase, cette dernière oxydant le D-glucose sur le C-2 [40, 41].

- pH OPTIMALE ET STABILITÉ :

L'activité de la GOx dépend principalement de l'état d'ionisation des acides aminés dans le site actif ; le pH joue un rôle important dans le maintien de la bonne conformation de l'enzyme. La majorité des protéines ne sont actives que dans une petite plage de pH, généralement comprise entre 5 et 9. Le pH optimal de la GOx varie entre 5,0 et 7,0. Les GOx fongiques et de levure ont des pH optimaux dans la gamme acide à neutre. En revanche, la GOx de *P. funiculosum* et de *P. canescens* présente des optima de pH légèrement alcalins de 6 à 8,6 [42, 43].

- TEMPÉRATURE OPTIMALE ET STABILITÉ :

Les enzymes sont très sensibles aux changements de température. La vitesse de réaction d'une enzyme varie de manière exponentielle avec la température. Pour chaque augmentation de 10 °C de la température, la vitesse de réaction d'une enzyme double. À des températures comprises entre 40 °C et 70 °C, l'activité enzymatique diminue fortement et la plupart des enzymes sont dénaturées. On sait que les enzymes présentent une activité maximale à une température spécifique, appelée température optimale de l'enzyme. La température optimale la plus basse pour la GOx est de 25-30 °C chez *P. funiculosum*, et la plus élevée de 40-60 °C chez *A. niger* et *P. amagasakiense* ATCC 28686 [44, 43, 45].

- STABILITÉ DE STOCKAGE :

La demi-vie de la GOx est d'environ 30 minutes à 37 °C. La GOx immobilisée serait plus efficace pour une application à 37 °C. Les alcools polyhydriques, y compris l'éthylène glycol, l'érythritol, le glycérol, le sorbitol, le xylitol et le polyéthylène glycol, ont montré un effet stabilisateur sur la GOx d'*A. niger* [46]. La préparation lyophilisée de la GOx reste stable pendant au moins 6 mois à -20 °C.

5. APPLICATIONS DE LA GLUCOSE OXYDASE

La glucose oxydase joue un rôle clé dans plusieurs applications industrielles et commerciales. L'utilité de la GOx dans divers domaines a incité à explorer de nouvelles sources de GOx à partir d'autres espèces de champignons et d'insectes pour répondre à la demande de propriétés améliorées telles qu'une activité catalytique plus élevée, La discussion suivante tentera de couvrir les principales applications ainsi que les principes de fonctionnement respectifs utilisés [47, 48].

○ BIOSENSEUR DE GLUCOSE POUR LA SURVEILLANCE DU DIABÈTE :

Le diabète sucré est une maladie mortelle causée par un excès de glucose dans le sang. Afin de maintenir ce niveau de glucose et de détecter les fluctuations qui conduisent à l'hyperglycémie ou à l'hypoglycémie, il est nécessaire de le surveiller en permanence. Actuellement, cette surveillance est effectuée à l'aide d'échantillons de sang prélevés au doigt et d'un lecteur de glycémie portable plusieurs fois par jour. Dernièrement, de nombreux capteurs de glucose disponibles sur le marché sont basés sur le glucose oxydase immobilisée. La GOx est l'une des enzymes prometteuses qui peut être utilisée dans les biocapteurs. La GOx est couramment utilisée pour construire des biocapteurs ampérométriques pour l'industrie médicale et alimentaire [49, 50]. Dans ce cas, un potentiel électrique constant est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence, ce qui favorise la réaction catalytique, qui entraîne un flux de courant proportionnel à la concentration de la molécule cible [51].

Les différents types de biocapteurs basés sur la GOx sont énumérés ci-dessous [51] :

- Surveillance du glucose pour les fermentations (Vodopivec et al., 2000).
- Biocapteur à fibre optique pour l'analyse du glucose dans les boissons non alcoolisées (Chudobova et al., 1996).
- Biocapteur jetable de type bandelette pour la surveillance du sang et du sérum (Cui et al., 2001).
- Biocapteur de type bandelette pour le sang (colorant GOD-HPR) (Kim et al., 2001).
- Biocapteur thermique miniaturisé (Harborn et al., 1997).
- Capteur de glucose pour le sang total (Santoni et al., 1997).
- Biocapteur de glucose pour le sérum de sang humain (Zhu et al., 2002).

○ LES PILES À COMBUSTIBLE BIOLOGIQUE :

Certains appareils bioélectroniques ont besoin d'une petite quantité d'énergie pour fonctionner. Ces dispositifs convertissent l'énergie biochimique en énergie électrique en utilisant l'ADN comme biocatalyseur. La pile à biocarburant est un système à deux électrodes qui est modifié par des enzymes biocatalytiques pour oxyder ou réduire spécifiquement les substrats. En général, l'oxydation du glucose a lieu à l'anode à l'aide de l'enzyme GOx ou glucose déshydrogénase. Ces enzymes sont couplées à une cathode contenant une enzyme réduisant le dioxygène comme la lactase ou la cytochrome oxydase, le dioxygène et le glucose sont des molécules de carburant solubles dans l'eau que l'on trouve à la fois dans les fluides corporels et dans le sang, et ces molécules sont converties aux électrodes en molécules de dégradation d'origine naturelle. La tension maximale autorisée par la thermodynamique de l'oxydation du glucose et de la réduction du dioxygène est d'environ 1V [52, 53].

○ ADDITIF POUR LES ALIMENTS ET LES BOISSONS :

La GOx joue un rôle très important dans l'amélioration de la durée de conservation des aliments et des boissons en détruisant le glucose résiduel et l'oxygène. Le H₂O₂ libéré par l'enzyme agit comme un bon bactéricide et peut ensuite être éliminé par la catalase, qui convertit le H₂O₂ en eau et en oxygène. La GOx est également utilisée dans les bouteilles de boissons avant leur fermeture afin d'éliminer l'oxygène de la partie supérieure de la bouteille [54].

○ LA PRODUCTION DE VINS À FAIBLE TENEUR EN ALCOOL :

La demande de vins à faible teneur en alcool étant de plus en plus forte, des études ont été menées sur la faisabilité de l'utilisation de diverses technologies. La GOx a une fonction potentielle dans l'industrie vinicole, où elle diminue la teneur en alcool du vin par l'élimination du glucose. Les rapports d'analyse ont montré que le vin traité par GOx réduit la teneur potentielle en alcool du vin de 2 %. En outre, il inhibe la détérioration du vin grâce à son effet bactéricide pendant le processus de fermentation [55].

○ HYGIÈNE ORALE :

En raison de l'activité antimicrobienne de la GOx, elle est largement utilisée dans les produits d'hygiène bucco-dentaire [56]. Le H₂O₂ produit par la GOx agit comme un bactéricide utile.

○ ACIDE GLUCONIQUE :

La GOx est utilisée comme source commerciale d'acide gluconique et de ses dérivés, qui sont produits par l'hydrolyse de la δ - glucono-1,5- lactone. L'acide gluconique est principalement utilisé comme additif alimentaire en tant que régulateur d'acidité, dans la stérilisation, dans les industries du métal et du cuir et il est également utilisé dans le ciment pour augmenter la résistance dans des conditions climatiques extrêmes. L'acide gluconique est naturellement présent dans le miel, les fruits et le vin [57-58].

○ L'ACIDE GLUCONIQUE EST UTILISÉ DANS L'INDUSTRIE TEXTILE :

En raison de l'action blanchissante de l' H_2O_2 , la GOx est utilisée comme méthode de production d' H_2O_2 . **Tzanov et al** ont montré que la GOx sur des supports d'alumine et de verre permettait d'obtenir des taux de récupération de H_2O_2 plus élevés, jusqu'à 0,35 g/L et 0,24 g/L respectivement. Un autre avantage est que dans ce processus, il n'y a pas d'ajout supplémentaire de stabilisateur car l'acide gluconique généré est lui-même un stabilisateur puissant. En 2008, **Opwis et al** ont découvert l'utilisation simultanée de la GOx et de la POD pour le processus de décoloration et le blanchiment des fibres naturelles dans les industries textiles.



DEUXIEME PARTIE :
PARTIE PRATIQUE



Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche Analyse fonctionnelle n°116 et le labo pédagogique n°251 du département des Génie des procédés de l'université Saad Dahleb Blida1. Les expériences ont été menées depuis le 21 Mars jusqu'au 6 Juillet 2023.

1. MATERIEL

1.1 Matériel biologique

- **Souche fongique** : Au cours de cette étude, la souche *Aspergillus niger* a été fournie par Mr Tafahi (Laboratoire d'Hygiène), cultivée sur milieu gélosé PDA (Potato Dextrose Agar).

1.2 Préparation du milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Le milieu PDA a été préparé au niveau du laboratoire pour le repiquage de la souche *Aspergillus niger* (Voir Annexe 1).

1.3 Produits chimiques et réactifs

Les produits chimiques et réactifs utilisés lors de notre étude sont les suivants :

- Acide Chlorhydrique (HCl) et l'Hydroxyde de sodium (NaOH)(Honeywell) pour l'ajustement du pH ;
- Glucose (SIGMA) ;
- Phénol (SIGMA-ALDRICH) ;
- Urée (BIOCHEM) ;
- Agar Agar (Rapid Labs) ;
- Ethanol pour la stérilisation ;
- NaCl (TM MEDIA) pour la préparation d'eau salé ;
- L'eau physiologique stérile ;
- L'eau distillée stérile.

1.4 Verreries

Les verreries utilisées lors de notre étude sont les suivantes :

- Bécher de 25ml, 100ml, 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Des tubes à essai ;
- Des fioles jaugées de 250ml, 500ml, 1000ml ;
- Papier filtre ;

- Des pipettes de 5ml, 10ml ;
- Erlenmeyer de 500ml, 1000ml ;
- Burette de 10ml, 100ml ;
- Spatule ;
- Pissette ;
- Entonnoir ;
- Eprouvette ;
- Verre de montre ;
- Pro pipette ;
- Barreau magnétique ;
- Les boîtes de pétries ;
- Les pipettes pasteurs ;
- Bec bunsen.

1.5 Matériel et appareillages

Les appareils utilisés lors de notre étude sont les suivants :

- Autoclave (AESCULAP) ;
- Four Pasteur (MLW) ;
- Incubateur (Memmert) ;
- pH mètre (HANNA) ;
- Shaker (WiseCube) ;
- Plaque chauffante (DLAB) ;
- Spectrophotomètre (SHIMADZU) ;
- Centrifugeuse (Eppendorf) ;
- Balance Analytique (Nimbus) ;
- Réfrigérateur (Panasonic) ;
- Microscope optique (LABOVAL 4) ;
- Cellule de Malassez (Assistent) ;
- Micro pipette (SCI LOGEX) ;
- Ultra Turrax (WiseTis).

2. METHODES

2.1 MICROORGANISME

La souche d'*Aspergillus niger*, a été repiquée sur un milieu Potato Dextrose Agar à 30°C pendant 7 jours. Après son développement, la souche est conservée au congélateur (4°C).

2.1.1 Préparation de la solution fongique

Après incubation d'*Aspergillus niger*, 10 ml d'eau distillée stérile sont versés sur la boîte pour la collecte des spores. La suspension ainsi préparée est filtrée sur papier Watman.

A partir de ce filtrat, on a réalisé une dilution de 10^{-1} dans un tube contenant d'eau physiologique. La concentration en spores est déterminée par comptage sur cellule de Malassez (10^7 spores /ml) **Magnusson et al., (2003)**.

1.2.2 Le dénombrement cellulaire par comptage sur la cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles : Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage [59].

→ Le volume correspondant au quadrillage total est égal à $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$

→ Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible,

Soit $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

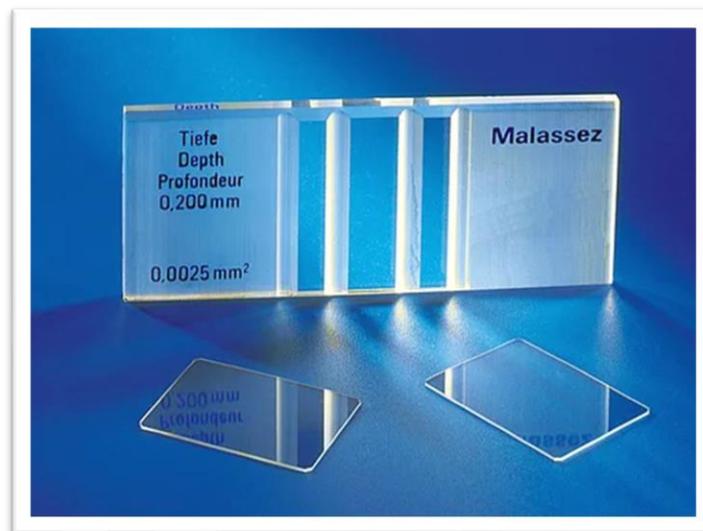


Figure 13 : cellule de Malassez double quadrillage [60].

- Remplissage de la cellule de numération
 - ◆ Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
 - ◆ Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate.
 - ◆ Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergés dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier [59].

- Numération
 - ◆ Observer à l'objectif **x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
 - ◆ Observer ensuite à l'objectif **x40** pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
 - ◆ Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage [59].

- Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soit : - n : nombre de cellules comptées.

- V : volume de comptage.

- f : facteur de dilution.

- N : nombre de cellules par litres.

Si on a **n** cellules dans **V** litres, alors on a **N** cellules dans un litre :

$$N \times V = n \times 1$$

$$N = n / V$$

Si la solution avait été diluée :

$$N = (n / V) \times f$$

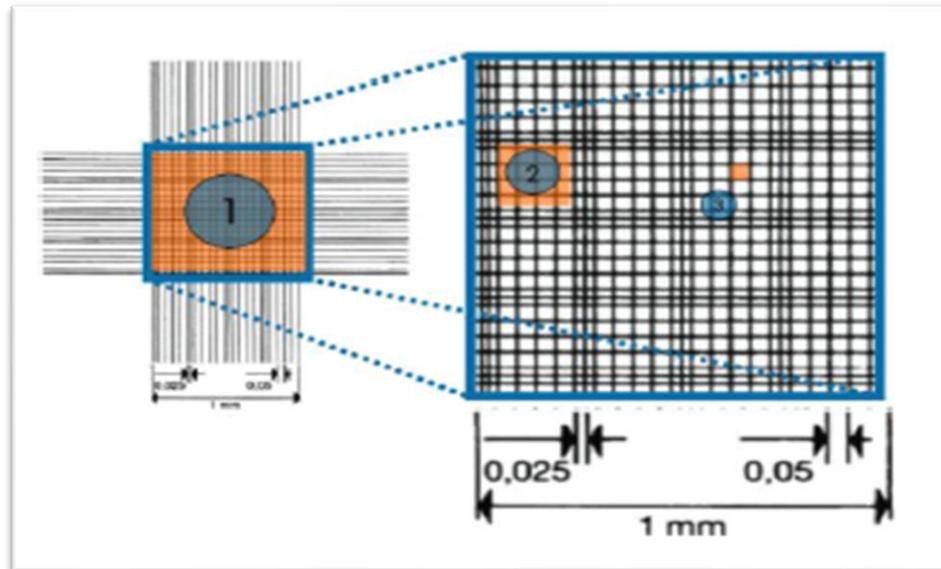


Figure 14 : le quadrillage de la cellule Malassez [61].

2.2 FERMENTATION

Pour l'étape de fermentation nous avons fait préparer un milieu de culture :

- Dans une fiole conique de 250ml, nous met 50ml de milieu de culture contenant [62] :
 - 0,2% d'Urée ;
 - 0,4% de KH_2PO_4 ;
 - 0,001% de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (des concentrations élevées de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ inhibe l'activité de GOx) (Yang et al 1996) et (Hamid et al 2003).
 - 10% du glucose.

Le milieu préparé est inoculé avec 5ml de suspension sporale de concentration $10^7 - 10^8$ spores / 1ml et 10ml.

Les principales étapes sont résumées dans le diagramme représenté par la **figure 14** (Willis, 1966) et (Hamid et al. 2003).

- Afin de déterminer le temps optimal de production de L'enzyme, des prélèvements sont effectués toutes les 24 heures suivis d'une série d'homogénéisations et centrifugations des échantillons à 6000rpm pendant 20 minutes dans le but de séparer la biomasse du surnageant qui est récupéré par la suite pour le dosage des activités de la glucose oxydase.

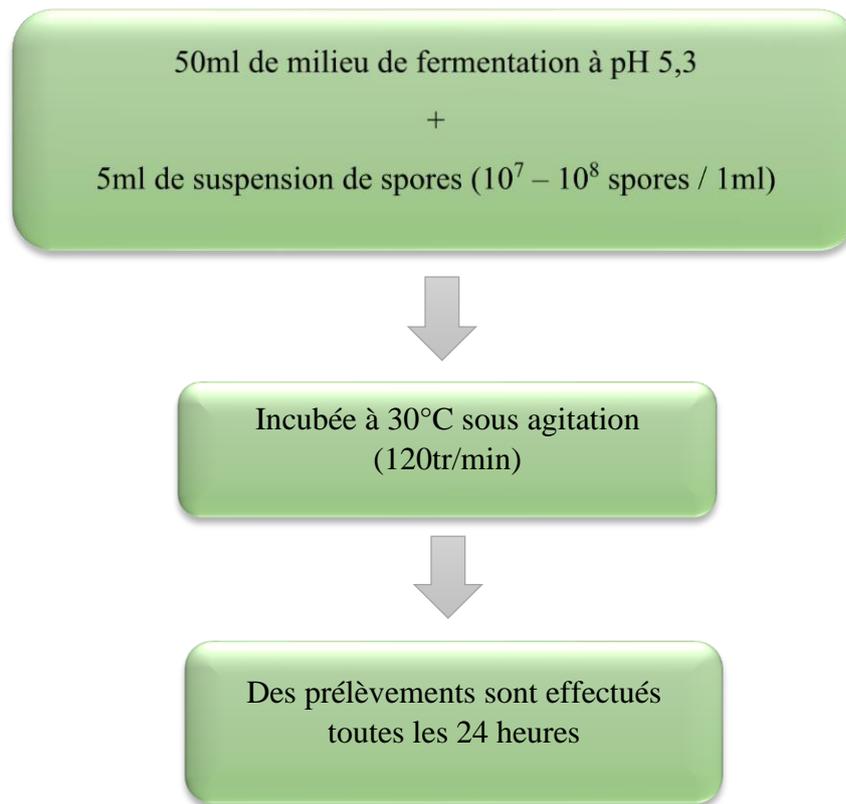


Figure 15 : Diagramme de fermentation d'*Aspergillus niger*.

1.2.1 EXTRACTION

Les étapes d'extraction de la glucose oxydase à partir d'*Aspergillus niger* est réalisé selon le protocole décrit par **Khawar (1990)**, les principales étapes sont résumées dans le diagramme ci-dessous (**figure 16**)

Il s'agit d'une extraction solide-liquide, l'étape de lavage est nécessaire pour éliminer les résidus du milieu de culture, La biomasse fermentée se fait filtrer pour extraire l'enzyme intracellulaire, En dernière étape, le filtrat on le centrifuge, et le surnageant on le filtré sur un papier filtre et le filtrat se fait doser pour avoir l'activité du glucose oxydase.

PARTIE PRATIQUE

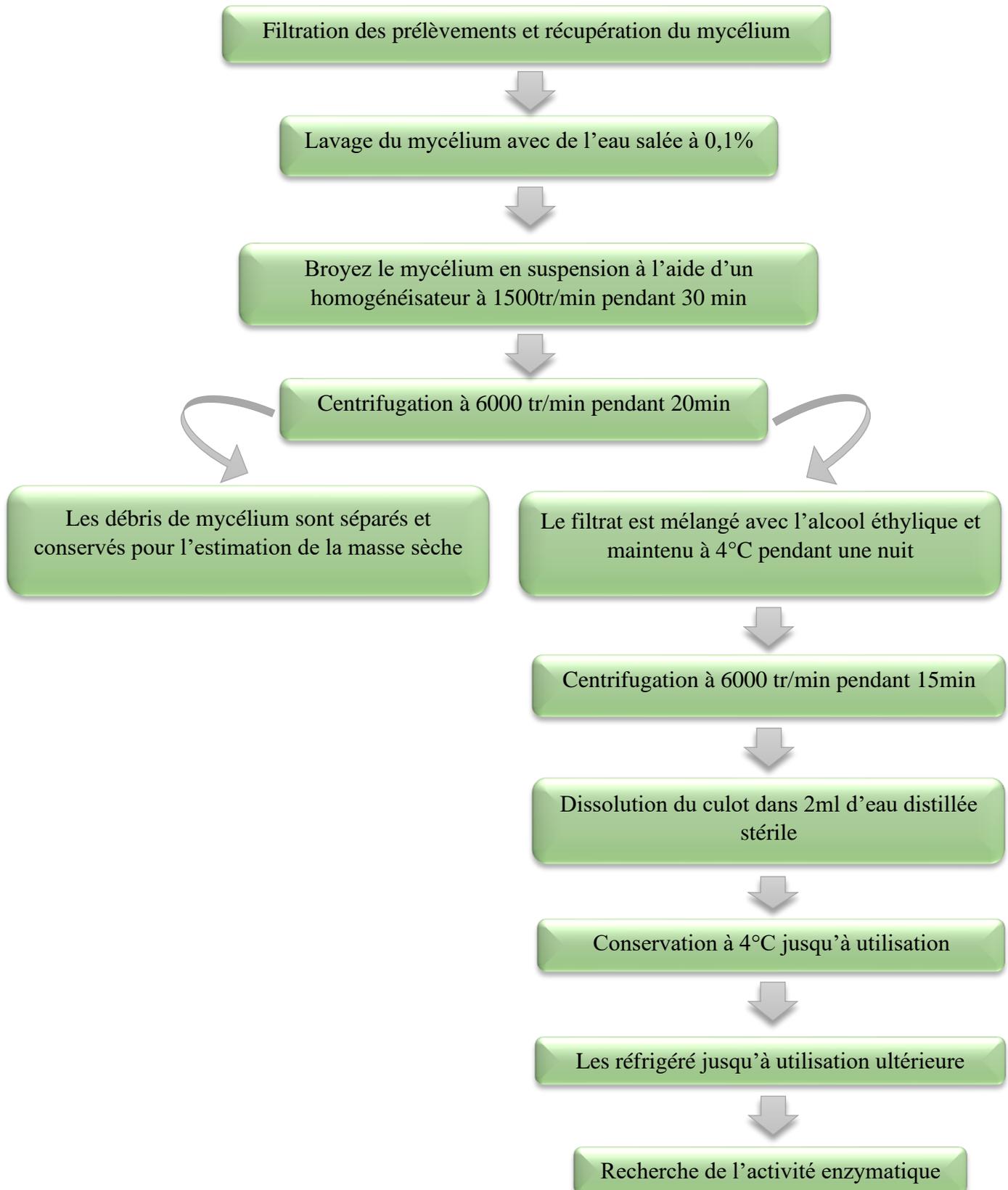
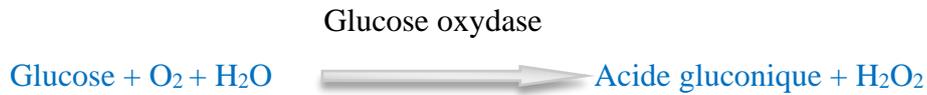


Figure 16 : Diagramme d'extraction de l'enzyme GOx à partir d'*Aspergillus niger*.

1.2.2 DOSAGE ENZYMATIQUE (méthode de Trinder)

La glucose oxydase (GOx) catalyse l'oxydation du β-D-glucose en acide gluconique selon la réaction suivante :



Dans une deuxième réaction indicatrice, le peroxyde d'hydrogène formé réagit ensuite, en présence de peroxydase (POD), avec un chromogène pour donner un produit coloré (la quinonéimine) qui est absorbé à 505 nm.



1.2.2.1 Réactifs

Réactifs 1 : Solution tampon

- Tampon Tris pH = 7
- Phénol

Réactifs 2 : Enzymes

- Péroxydase
- 4-Amino-Antipyrine

Réactifs 3 : Standard

- Glucose

1.2.2.2 Mode opératoire

- Longueur d'onde : 505nm (492-550) ;
- Température : 37°C (20-25°C) ;
- Cuve : 1cm d'épaisseur ;
- Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur le blanc réactif.

Tableau II : Mesure du dosage enzymatique

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard	--	30µl	--
Echantillon	--	--	30µl
Réactif de travail	3ml	3ml	3ml

Mélangez et lisez les DO après incubation de 10 minutes à 37°C ou 30min à 20-25°C. La coloration est stable pendant 30 minutes.

1.2.2.3 Calcul d'activité enzymatique

Une unité d'activité enzymatique est défini comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation d'une micro molaire par minute de substrat dans les conditions optimales, le terme d'activité fait référence à une unité totale d'enzyme dans la solution.

D'après l'adsorption on a pu calculer l'activité enzymatique, en appliquant la loi suivante :

$$\text{L'activité enzymatique à } 30^{\circ}\text{C} = \frac{\Delta A * V}{l * A_{505} * \mu}$$

Avec :

ΔA : l'absorbance de l'échantillon

V : le volume du mélange réactionnel

l : la longueur du tube

A_{505} : coefficient d'absorption à 505nm

μ : solution de glucose oxydase

1.2.3 LE RENDEMENT D'ACTIVITE

Le rendement est calculé par la loi :

$$\text{Taux de rendement} = \frac{(\text{Absorbance finale} - \text{Absorbance initiale})}{\text{Absorbance finale}} * 100$$



TROISIEME PARTIE :

RESULTAT ET DISCUSSION

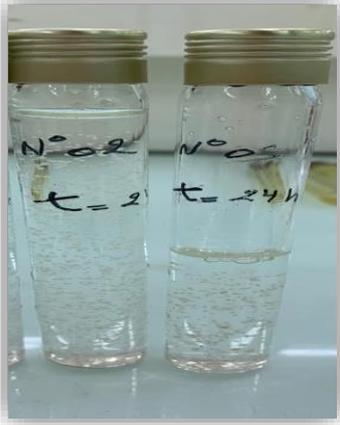
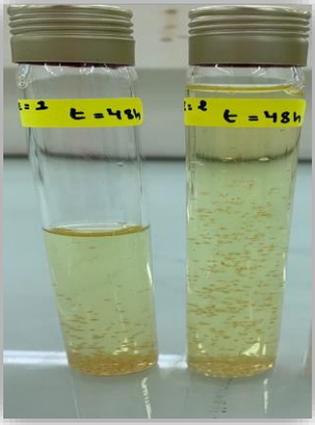
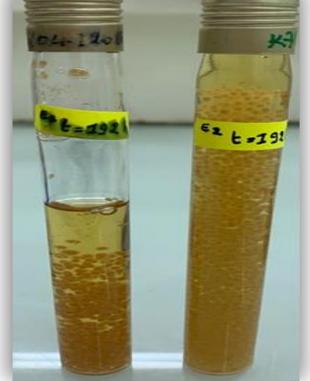
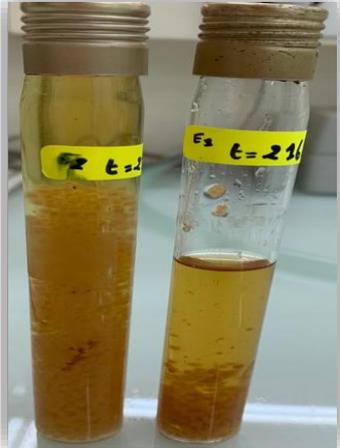


RESULTATS ET DISCUSSION

I. LA FERMENTATION

Durant la fermentation, on a suivi la croissance d'*A. niger* pendant 15 jours (tableau III).

Tableau III : Développement d'*Aspergillus niger* durant la période de fermentation.

Croissance d' <i>Aspergillus niger</i> en fonction du temps de la fermentation		
24 h	48 h	72 h
		
96 h	169 h	192 h
		
216 h		
		

Nous remarquons clairement le développement de la souche, Il y a eu une phase exponentielle de 72 à 216 h. La sporulation d'*A. niger* a commencé pendant la phase de croissance active et s'est poursuivie même après l'arrêt de la synthèse du mycélium. La production d'acide gluconique pourrait être associée à la croissance car sa libération correspond à la respiration fongique. Son taux d'évolution s'est également poursuivi après le vieillissement du mycélium. Cela pourrait être dû à la respiration endogène et à la formation de spores puisque non seulement le mycélium s'est formé pendant la croissance des champignons en SSF, mais des spores ont également été produites (**Lareo et al, 2006**).

La sporulation des champignons filamenteux dépend généralement des nutriments et de la teneur en eau du milieu. Il a été rapporté que la limitation des nutriments et l'augmentation de la teneur en eau permettent d'obtenir un bon rendement de sporulation **Larroche & Gros (1992) [30]**.

II. L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'activité enzymatique a été détectée par dosage selon la méthode de Trinder, les absorbances obtenues à 505nm sont présentées dans le tableau IV. On constate que l'absorbance est maximale (ABS= 0.701) au bout de 168h de fermentation.

Tableau IV : l'absorbance en fonction du temps

<i>Temps (h)</i>	<i>L'absorbance (ABS)</i>
0	0,09
24	0,245
48	0,261
72	0,296
96	0,259
168	0,701
192	0,309
216	0,369
240	0,372

A partir de ces absorbances (**tableau IV**), on a calculé l'activité enzymatique, les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 17**. D'après cette figure, on remarque que l'activité enzymatique augmente durant la période de fermentation entre 24h et 168h, l'activité maximale est atteinte au bout de 168h de production.

RESULTATS ET DISCUSSION

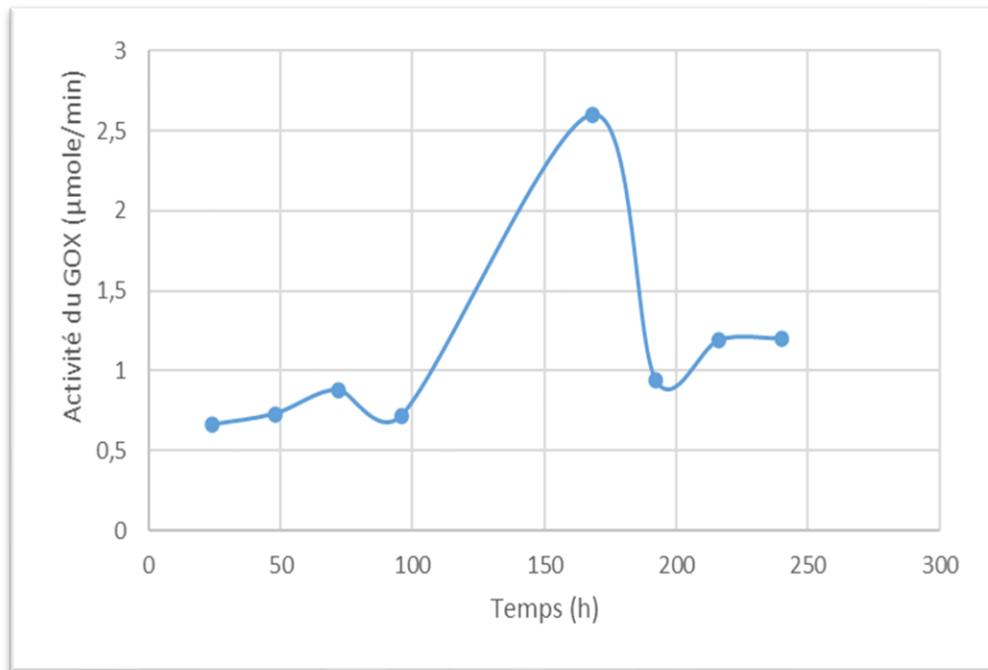


Figure 17 : courbe représente l'activité du GOx en fonction du temps.

III. LE RENDEMENT DU DOSAGE ENZYMATIQUE

Après avoir faire le dosage enzymatique, nous avons calculé le taux de rendement durant le temps.

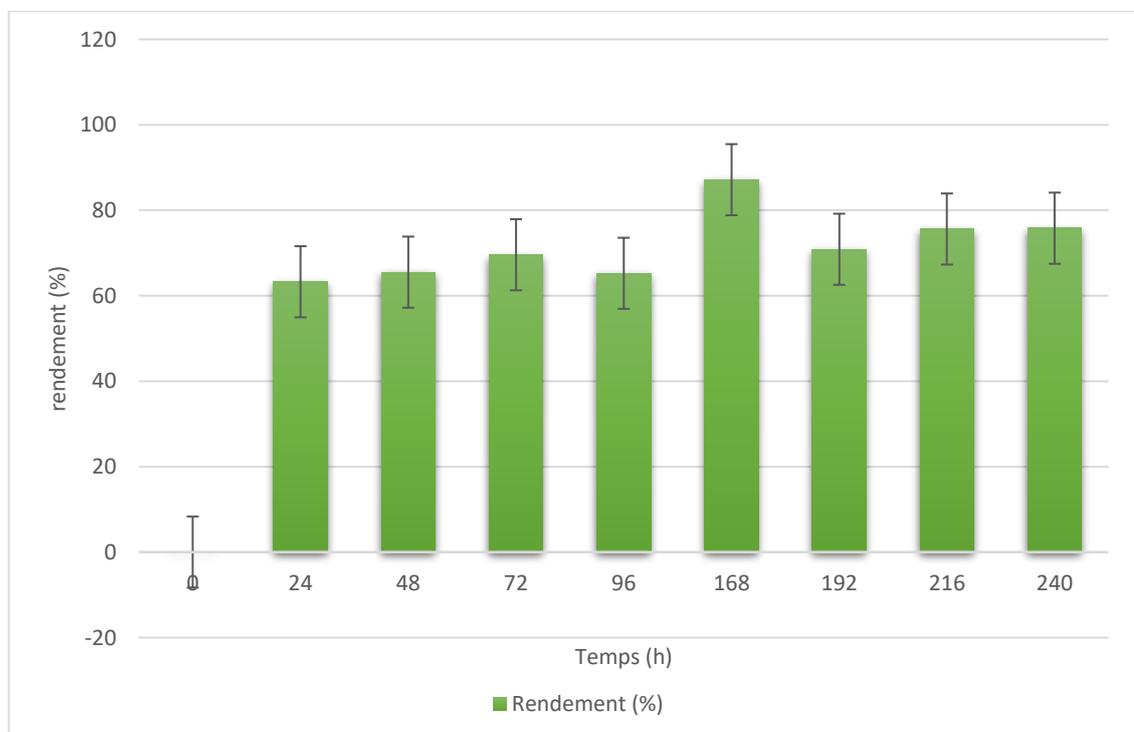


Figure 18 : Histogramme représente le rendement enzymatique du GOx durant le temps.

RESULTATS ET DISCUSSION

Nous remarquons clairement que le rendement optimal est de 87.16% après 168h de production, ce rendement correspond au rendement trouvé par **Farshad Darvishi. (2017)** où il a trouvé une activité optimale de la glucose oxydase est de 370 U/L après 7 jours de culture. **Fiedurek and Gromada. (2000)** ont obtenu une activité maximale après 72h. **Halpern. (1981)** a constaté que les GOx des spores âgées pouvaient mieux réaliser la réaction de bioconversion du glucose en acide gluconique que les spores jeunes. Il a même remarqué qu'au cours de la fermentation, la glucose oxydase était probablement présente dans les mycéliums et les spores. Ainsi, Les spores d'*A. niger* âgées de 200 heures ont conservé l'activité de la glucose oxydase et elles sont considérées comme un réservoir de la glucose oxydase. **Halpern. (1981)** rapporte que l'extraction liquide-liquide peut fournir des extraits avec une activité $>250\text{U mg}^{-1}$ de l'enzyme GOx.

La glucose oxydase peut être extracellulaire comme intracellulaire, Les constats sur la localisation de la glucose oxydase sont ambigus. Plusieurs auteurs rapportent que l'enzyme d'*A. niger* est intracellulaire (**Willis, 1966 ; Zetalaki, 1968 ; Van Dijken, 1980 ; Witteveen et al, 1993**), alors qu'elle est extracellulaire selon **Mischak et al. (1985)**. Ces différents rapports sur sa localisation dans la cellule pourraient être attribués aux conditions de la croissance et à l'âge des cultures fongiques.



CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La production de la glucose oxydase est un procédé qui suscite un intérêt constant en raison des nombreuses applications et de la possibilité de l'obtenir à partir de sources entièrement renouvelables.

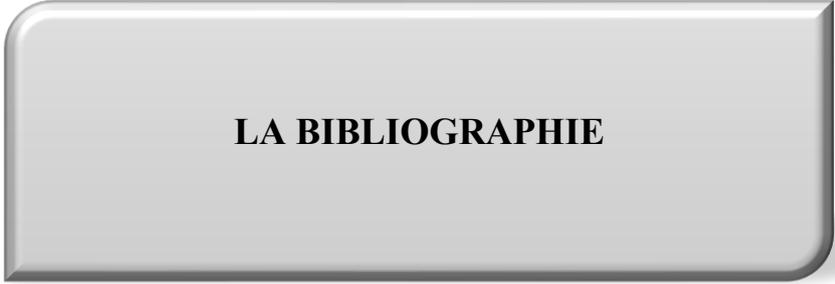
Dans cette étude, on s'est intéressée à la production de l'enzyme GOx à partir d'*Aspergillus niger* sur un milieu de culture optimisé à pH 5.5 et à une température de 30°C.

Il serait intéressant à l'avenir de compléter cette étude par une purification de l'enzyme et voir l'effet du pH et de la température sur le développement de la culture.

Par ailleurs, Il serait nécessaire d'isoler de nouvelles souches productrices ou améliorées pour produire des GOx à faible coût et à haut rendement avec une activité et une stabilité élevée. Un autre défi reste à relever est la compréhension des propriétés structurelles des GOx, qui constitue une contrainte majeure pour leur application à grande échelle.

Avec les progrès technologiques, les GOx auront une plus grande application commerciale à l'avenir, l'*Aspergillus niger* montre une réelle possibilité de production, ces observations ouvrent donc des perspectives nouvelles de recherches à savoir :

- Identifier génétiquement la souche d'*Aspergillus niger* ;
- Connaitre les conditions optimales de culture et de production du GOx ;
- Etablir la localisation d'enzyme dans les spores ;
- Purification de l'enzyme par des méthodes chromatographiques.



LA BIBLIOGRAPHIE

- [1]: Organisation Mondiale de la Santé, « RAPPORT MONDIAL SUR LE DIABÈTE » Genève, 2016.
- [2]: F. Merette, L'autosurveillance du diabète, quel lecteur pour quel patient ? Rouen, 2015.
- [3]: E. h. Rahhou, L'autosurveillance glycémique des patients diabétiques : des méthodes conventionnelles vers des méthodes non invasives, Lille, 2016.
- [4]: Degani et Heller, 1988.
- [5]: Newman et Turner, 2005.
- [6]: I. D. Federation « L'ATLAS DU DIABÈTE DE LA FID » 10th édition 2021.
- [7]: Lakhdar Griene, Auto surveillance glycémique : De la performance analytique à la pertinence clinique, 21ème Congrès National de Diabétologie / SADIAB 14 – 16 novembre 2019 ; Hôtel El Aurassi, Alger.
- [8]: O. M. Santé « Profils des pays pour le diabète, 2018 » Genève, 2018.
- [9]: E. h. Rahhou, L'autosurveillance glycémique des patients diabétiques : des méthodes conventionnelles vers des méthodes non invasives, Lille, 2016.
- [10]: F. Merette, L'autosurveillance du diabète, quel lecteur pour quel patient ? Rouen, 2015.
- [11]: D. Hulot, Mise en place d'une méthode d'évaluation de l'insulinosécrétion chez les patients diabétiques de type 2 non insulines dans une perspective d'adaptation thérapeutique, Rouen, 2015.
- [12]: H. a. d. santé (HAS) « Bon usage des technologies de santé, L'autosurveillance glycémique dans le diabète type2 : une utilisation très ciblée » Paris, avril 2011.
- [13]: C. Mériot « L'autocontrôle glycémique en pratique » *Actualités pharmaceutiques*, n° 1478, pp. 16-26, 2008.
- [14]: P. V. L. V. Dufaitre Patouraux, Technologie et fiabilité de l'autosurveillance glycémique : historique et état actuel, Bruxelles, 2003.
- [15]: J. Schlienger « Dans les coulisses de la chimie clinique : histoire de la glycémie et de la Glycosurie » *Médecine des maladies métaboliques*, pp. 81-85, 07 juillet 2013.
- [16]: Kim Haglund, ingénieur support pour les produits de pointe, 3M Health Care
David Franta, directeur mondial des activités de microfluidique, 3M Health Care, « Les principes scientifiques des bandelettes : le guide de l'ingénieur relatif à la fabrication de bandelettes pour tests de glycémie de précision. Science Behind the Strip 12pp_2021.
- [17]: Yoo and Lee 2010.

- [18]: Wang, 2001.
- [19]: DJATOUGBÉVI M.K (STABILISATION DES ACTIVITÉS CATALYTIQUES DES OXYDASES ÉVALUÉES PAR ZYMOGRAPHIE : LE CAS DE LA DIAMINE OXYDASE), (Mars 2019), 19-21.
- [20]: Reach et Wilson, 1992 ; Sasso et al., 1990 ; Zhang et al., 1994 ; Wang, 2001.
- [21]: Cass et al., 1984 ; Frew et Hill, 1987.
- [22]: Lin et al., 2004.
- [23]: G. Desch, Aspects biochimiques et analytiques du diagnostic et de la surveillance du diabète, Bordeaux, 2001.
- [24]: C. Higgins, « Measurement of circulating glucose: The problem of inconsistent sample and methodology, » Newcastle, janvier 2008.
- [25]: V. Leskovac, S. Trivić, G. Wohlfahrt, J. Kandrač, and D. Peričin, "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors," *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 37, pp. 731-750, 2005.
- [26]: H. J. Hecht, D. Schomburg, H. Kalisz, and R. D. Schmid, "The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 8, pp. 197-203, 1993.
- [27]: Wang, F.; Chen, X.; Wang, Y.; Li, X.; Wan, M.; Zhang, G.; Leng, F.; Zhang, H. Insights into the Structures, Inhibitors, and Improvement Strategies of Glucose Oxidase. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 9841. <https://doi.org/10.3390/ijms23179841>.
- [28]: K.-A. Caridis, P. Christakopoulos, and B. J. Macris, "Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternata*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 34, pp. 794-797, 1991.
- [29]: R. Wilson and A. Turner, "Glucose oxidase: an ideal enzyme," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 7, pp. 165-185, 1992.
- [30]: SUMITRA RAMACHANDRAN, "Use of spores of *Aspergillus niger* obtained by Solid-state fermentation for the production of gluconic acid", Laboratoire de Génie Chimique et Biochimique – Université Blaise Pascal, 2008.
- [31]: <http://www.biology.lsu.edu/heydrjay/1002/Chapter24/lifecycles/lifecycle.html>
- [32]: www.moldbacteria.com
- [33]: J. Raba and H. A. Mottola, "Glucose oxidase as an analytical reagent," *Critical reviews in Analytical chemistry*, vol. 25, pp. 1-42, 1995.

- [34]: H. Kalisz, J. Hendle, and R. Schmid, "Structural and biochemical properties of glycosylated and deglycosylated glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 47, pp. 502- 507, 1997.
- [35]: H. Witt, W. Luck, H. C. Hennies, M. Claszen, A. Kage, U. Lasz, O. Landt, and M. Becker, "Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis," *Nat Genet*, vol. 25, pp. 213-216, 2000.
- [36]: Bankar, SB, Bule, M. V, Singhal, RS et Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxydase - Un aperçu. *Biotechnology Advances*, 27 (4), 489–501.
- [37]: Wohlfahrt et al., 1999.
- [38]: M. Comotti, C. Della Pina, E. Falletta, and M. Rossi, "Aerobic oxidation of glucose with gold catalyst: hydrogen peroxide as intermediate and reagent," *Advanced synthesis & catalysis*, vol. 348, pp. 313-316, 2006.
- [39]: C. F. Witteveen, M. Veenhuis, and J. Visser, "Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 58, pp. 1190-1194, 1992.
- [40]: H. J. DANNEEL, E. RÖSSNER, A. ZEECK, and F. GIFFHORN, "Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products," *European journal of biochemistry*, vol. 214, pp. 795-802, 1993.
- [41]: H. Umbreen, M. A. Zia, and S. Rasul, "Kinetic characterization of glucose aerodehydrogenase from *Aspergillus niger* EMS-150-F after optimizing the dose of mutagen for enhanced production of enzyme," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 44, pp. 1105-1112, 2013.
- [42]: M. Tonelotto, R. D. P. B. Pirota, P. D. S. Delabona, G. D. O. F. Barros, A. M. Golubev, I. Polikarpov, and C. S. Farinas, "Isolation and characterization of a β -galactosidase from a new Amazon Forest strain of *Aspergillus niger* as a potential accessory enzyme for biomass conversion," *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 32, pp. 13-22, 2014.
- [43]: M. Sukhacheva, M. Davydova, and A. Netrusov, "Production of *Penicillium funiculosum* 433 glucose oxidase and its properties," *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 40, pp. 25-29, 2004.
- [44]: K. Wilson and J. M. Walker, *Principles and techniques of practical biochemistry*: Cambridge University Press, 2000.

- [45]: H. M. Kalisz, H.-J. Hecht, D. Schomburg, and R. D. Schmid, "Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1080, pp. 138-142, 1991.
- [46]: W. N. Ye, D. Combes, and P. Monsan, "Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 10, pp. 498-502, 1988.
- [47]: D. Hatzinikolaou, J. Macris, P. Christakopoulos, D. Kekos, F. Kolisis, and G. Fountoukidis, "Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*," *Biotechnology Letters*, vol. 18, pp. 547-552, 1996/05/01 1996.
- [48]: J. Fiedurek and A. Gromada, "Screening and mutagenesis of molds for improvement of the simultaneous production of catalase and glucose oxidase," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 20, pp. 344-347, 1997.
- [49]: E. Wilkins and P. Atanasov, "Glucose monitoring: state of the art and future possibilities," *Medical engineering & physics*, vol. 18, pp. 273-288, 1996.
- [50]: L. D. Mello and L. T. Kubota, "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries," *Food Chemistry*, vol. 77, pp. 237-256, 2002.
- [51]: L. A. Terry, S. F. White, and L. J. Tigwell, "The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, pp. 1309-1316, 2005.
- [52]: T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H.-H. Kim, and A. Heller, "A miniature biofuel cell," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 8630-8631, 2001.
- [53]: N. L. Taylor, D. A. Day, and A. H. Millar, "Targets of stress induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism," *Journal of experimental botany*, vol. 55, pp. 1- 10, 2004.
- [54]: Razi Vaccine & Serum Research Institute DOI: 10.22092/ARI.2019.126286.1341.
- [55]: Sophie Meillon. Impact de la réduction d'alcool sur la perception sensorielle des vins et acceptabilité par les consommateurs. Sciences du Vivant [q-bio]. AgroParisTech, 2009. Français.
- [56]: J. Afseth and G. Rølla, "Clinical experiments with a toothpaste containing amyloglucosidase and glucose oxidase," *Caries research*, vol. 17, pp. 472- 475, 1983.

- [57]: A. Crueger and W. Crueger, "Glucose transforming enzymes," in *Microbial enzymes and biotechnology*, ed: Springer, 1990, pp. 177-226.
- [58]: J. Klein, M. Rosenberg, J. Markoš, O. Dolgoš, and M. Krošlák "Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* study of mass transfer in an airlift bioreactor," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 10, pp. 197-205, 2002.
- [59]: SAFRI HANANE, ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA CONSERVATION DE LA SEMENCE DU BOUC, Page 5-6, 2015.
- [60]: <https://khiatlabo.com/>
- [61]: <https://www.semanticscholar.org/author/S.-Bankar/152160565>.
- [62]: Shazia Khurshid, Muhammad Akram Kashmiri, Zahid Quershi and Waqar Ahmad, *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(9), pp. 1674-1678, 28 February, 2011.

LES ANNEXES

Annexe 01

La Composition de milieu de culture utilisé :

- Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre.....200 g

Agar.....15 g

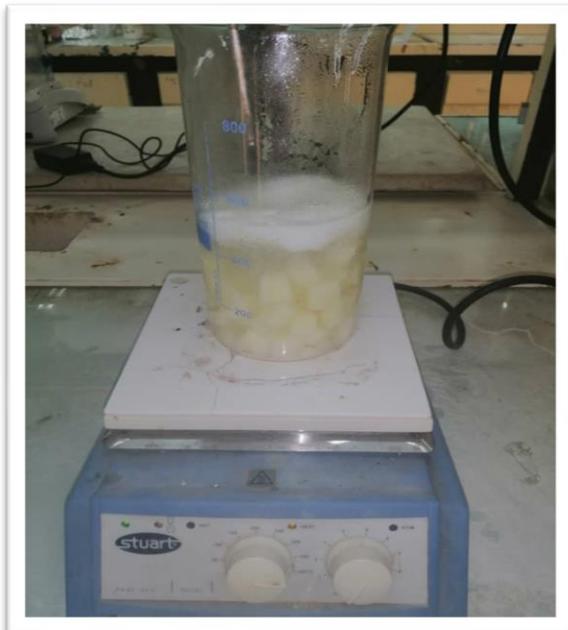
Glucose.....20 g

Eau distillée..... 1000 ml

pH final= $5,6 \pm 0,2$

Ramollir la pulpe de pomme de terre dans 300 ml d'eau en chauffant. Ajouter ensuite le glucose et l'agar. Porter à ébullition pour solubiliser l'agar puis filtrer sur gaze et compléter à un litre avec de l'eau distillée.

NB : Le milieu est stérilisé par autoclave durant 20 min à 120 °C.



Annexe 02

La préparation du solution Tampon Phosphate pH 7.2

Ingrédients	Unités
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	1.15 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	2.95 g
Eau distillée	250 ml

Et on ajuste le pH avec solution Na OH de (10M)

L'eau Physiologique pH 7

Ingrédients	Unités
NACL	9 g
EAU DISTILLEE	1000 ml

Stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 min.