# Biochimie et technologies d'analyse

L'enseignement de la biochimie a pour but de donner les connaissances de base indispensables pour :

- comprendre la structure, la composition et les propriétés des produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (bioproduits) et leurs altérations ;
- comprendre et mettre en œuvre la méthodologie des analyses en laboratoire et en atelier de fabrication ;
- comprendre et appliquer les techniques d'étude en recherche et développement ;
- comprendre les règles d'hygiène et de sécurité mises en œuvre dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (bioindustries).

Cet enseignement doit être conduit à l'aide d'exemples empruntés aux bioindustries et en étroite relation avec les autres enseignements professionnels. L'articulation avec les activités technologiques sera constamment recherchée.

L'ensemble de cet enseignement permet d'acquérir les compétences suivantes du référentiel des activités professionnelles : C2.1, C2.2, C2.4 et C3.1.

### Module 1 Biochimie structurale

Contenus	Commentaires
1. L'eau, solvant principal des biomolécules	
1.1. Les caractères physiques et chimiques de l'eau	On dégagera les corrélations entre les rôles et les caractéristiques physiques et chimiques de l'eau (propriétés de solvant, polarité, ionisation).
1.2. L'activité de l'eau (a <sub>w</sub> )	On donnera une définition de l'a <sub>w</sub> .  On montrera, à l'aide d'exemples, l'influence de l'eau sur la conservation et la stabilité d'un produit. On présentera les méthodes de mesure de la teneur en eau et de l'a <sub>w</sub> .
1.3. Les électrolytes	En liaison avec le cours de sciences physiques et chimiques.
1.4. Les solutions tampons	En liaison avec le cours de sciences physiques et chimiques.
2. Les structures moléculaires de base et les structures simples	
2.1. Les acides aminés	
2.1.1. Structure et configuration 2.1.2. Classification	On donnera leur classification en fonction de la nature
2.1.3. Propriétés physiques et chimiques, applications aux technologies d'analyse	du radical. On expliquera le principe de la séparation des acides aminés par chromatographie d'échange d'ions et par électrophorèse.

#### 2.2. Les glucides simples

- 2.2.1. Les oses et leurs dérivés
  - Structure, configuration, isoméries
  - Différents types d'oses et dérivés d'oses
  - Propriétés physiques et chimiques, applications aux technologies d'analyse

#### 2.2.2 Les osides simples

- Liaison osidique
- Classification : holosides et hétérosides
- Structure et propriétés des principaux osides simples, applications aux technologies d'analyse

#### 2.3. Les nucléotides

- 2.3.1. Structure des nucléotides : pentoses, bases azotées, nucléosides monophosphates, di et tri-phosphates
- 2.3.2. Propriétés physiques et chimiques des bases azotées et des nucléotides, applications aux technologies d'analyse

#### 2.4. Les lipides

- 2.4.1. Les molécules constitutives des lipides simples
  - Définition et classification des lipides
  - Constituants des lipides
  - . Acides gras naturels : structure et configuration, classification, principaux représentants, propriétés physiques et chimiques
  - . Alcools : glycérol, alcools gras

#### 2.4.2. Les homolipides

- Les glycérides : structure et propriétés, applications aux technologies d'analyse
- Les cérides
- 2.4.3. Les hétérolipides
  - Les glycérophospholipides : acides phosphatidiques, lécithines
  - Les sphingolipides : sphingomyélines, glycolipides
- 2.4.4. Les autres substances à caractère lipidique
  - Les lipides isopréniques : caroténoïdes, stérols, stéroïdes
  - Les icosanoïdes
- 2.4.5. Les méthodes de préparation et d'analyse

On décrira les propriétés physiques et chimiques permettant de comprendre les principes des méthodes d'analyse d'actualité.

Les propriétés des osides simples présentant un intérêt analytique ou industriel seront soulignées. On présentera les principales méthodes d'analyse des osides simples.

On évoquera la classification en lipides simples ou homolipides, en lipides complexes ou hétérolipides.

Les homolipides seront abordés sur le plan de leur définition et de leurs caractéristiques structurales. On privilégiera l'étude des propriétés physiques et chimiques des glycérides ayant un intérêt analytique ou industriel d'actualité.

On donnera leur structure générale. La structure bipolaire des lécithines et des sphingolipides sera mise en évidence. On soulignera l'intérêt des lécithines dans l'industrie alimentaire.

On présentera les principales méthodes de préparation et d'analyse des lipides : extraction par solvants, chromatographies.

#### 3. Les structures macromoléculaires

- 3.1. Les différentes forces mises en jeu : hydrophilie, hydrophobie, radicaux apolaires et polaires
- 3.2. Les peptides et les protéines
  - 3.2.1. Liaison peptidique : structure, propriétés
  - 3.2.2. Peptides d'intérêt biologique
  - 3.2.3. Conformation spatiale des peptides et des protéines

- 3.2.4. Propriétés physiques et chimiques des protéines, applications aux technologies d'analyse
- 3.2.5. Classification des protéines : holoprotéines, hétéroprotéines
- 3.3. Les polyholosides (glucides complexes)
  - 3.3.1. Les polyholosides homogènes : amidon, glycogène, cellulose
  - 3.3.2. Les polyholosides hétérogènes : carraghénates, alginates, gommes
  - 3.3.3. Structure et propriétés des principaux polyholosides, applications aux technologies d'analyse
  - 3.3.4. Les glycoconjugués
- 3.4. Les acides nucléiques
  - 3.4.1. L'ADN
    - Structure et répartition
    - Séquençage
    - Propriétés physiques et chimiques, dénaturation et hybridation
    - Méthodes d'extraction et de préparation
  - 3.4.2. Les ARN
    - Structure, classification, répartition
    - Propriétés physiques et chimiques

On donnera des exemples de molécules ou ions hydrophiles, hydrophobes et amphiphiles, de radicaux polaires et apolaires.

On précisera les caractéristiques géométriques de la liaison peptidique. On donnera le principe de la réaction du biuret.

On donnera des exemples de structure de peptides d'intérêt biologique : peptides hormonaux, neuropeptides, peptides antibiotiques.

On hiérarchisera les différents niveaux de structure des peptides et des protéines : structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. On illustrera par des exemples simples.

On définira les protéines fibreuses et les protéines globulaires. On décrira schématiquement trois types de structure secondaire : hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , coude  $\beta$ . On mettra en évidence la relation entre l'intégrité de la structure spatiale et l'activité biologique. On décrira les principales propriétés des protéines

On décrira les principales propriétés des protéines ayant un intérêt en fabrication ou en analyse.

On définira holoprotéine et hétéroprotéine. On montrera à l'aide d'exemples la diversité des hétéroprotéines.

On évoquera la notion de fibres alimentaires.

Les propriétés des polyholosides présentant un intérêt analytique ou industriel seront soulignées.

On indiquera les caractéristiques structurales (structures primaire et tridimensionnelle) de l'ADN.

On indiquera les caractéristiques structurales les plus importantes des ARN.

### Module 2 Enzymologie

Contenus	Commentaires
1. Caractéristiques générales des enzymes et de la catalyse enzymatique	
1.1. Structure des enzymes, notion de coenzyme	
1.2. Spécificité de la réaction enzymatique 1.2.1. Centre actif	On envisagera la notion de centre actif au sens large : fixation du substrat et site catalytique, site de fixation
1.2.2. Site de fixation 1.2.3. Site catalytique	du coenzyme sur l'apoenzyme, sites de régulation.
1.3. Classification des enzymes	
1.4. Isoenzymes, complexes multienzymatiques	
2. Cinétiques enzymatiques michaeliennes	
2.1. Vitesse de réaction	
<ul><li>2.2. Cinétiques dans le cas d'un seul substrat et d'un seul produit</li><li>2.2.1. Modèle de Michaelis et Menten</li></ul>	On démontrera l'équation de Michaelis dans le cas d'une réaction à un seul substrat et à un seul produit. On explicitera ses représentations graphiques.
2.2.2. Détermination des paramètres cinétiques	
2.3. Facteurs influençant la réaction enzymatique     2.3.1. Facteurs physico-chimiques : pH, température, force ionique     2.3.2. Effecteurs chimiques : inhibition compétitive, inhibition non compétitive, inhibition incompétitive, inhibition mixte, inhibition par excès de substrat, activation	Les représentations graphiques des inhibitions compétitive, non compétitive et incompétitive devront être connues.
3. Cinétiques enzymatiques non michaeliennes	
3.1. Cinétiques à deux substrats	On présentera les conditions permettant de ramener ces cinétiques à un modèle michaelien.
3.2. Cinétiques allostériques 3.2.1. Structure des enzymes allostériques 3.2.2. Modèles de fonctionnement allostérique	<b>*</b>

4. Structure et mode d'action des principaux coenzymes	On complétera la notion de coenzyme en présentant la structure des principaux coenzymes, en précisant la partie active de la molécule et la (les) réaction (s) catalysée (s).
5. Régulation de l'activité enzymatique	On évoquera quelques changements de conformation de la molécule enzymatique :
6. Méthodes d'étude de la réaction enzymatique, applications aux technologies d'analyse	En liaison avec les activités technologiques en analyse biochimique, on détaillera les méthodes spectrophotométriques, fluorimétriques, électrochimiques et la bioluminescence.
7. L'activité enzymatique : détermination, expression	En liaison avec les activités technologiques en analyse biochimique, on décrira les méthodes de dosage : méthodes cinétiques en continu ou en "deux points", méthodes directes ou méthodes couplées.  On précisera les différents modes d'expression de l'activité enzymatique et les systèmes d'unités employés.
8. Applications de l'enzymologie en analyse	
et en production	
8.1. Techniques utilisées	Les principes des techniques seront étudiés en liaison avec les activités technologiques en analyse biochimique.
<ul><li>8.1.1. Immobilisation des enzymes</li><li>8.1.2. Techniques immunoenzymatiques</li><li>8.1.3. Électrodes à enzymes</li></ul>	On indiquera les méthodes d'immobilisation et les propriétés des enzymes immobilisées.
8.2. Applications analytiques	Ces applications feront l'objet de manipulations au laboratoire.
8.2.1. Dosage enzymatique de métabolites 8.2.2. Détermination d'activités enzymatiques	Voir paragraphe 7 de ce module.
<ul><li>8.3. Applications industrielles</li><li>- Dans les industries alimentaires</li><li>- Dans les industries pharmaceutiques</li></ul>	On donnera des exemples de différentes applications : amylases et industrie des amidons, glucose-isomérases et industrie du fructose, pectinases et industrie des boissons, protéases et lipases.

### Module 3 Bioénergétique

Contenus	Commentaires
1. Variation d'enthalpie d'une réaction	
2. Réactions exergoniques et endergoniques	
3. Cas des réactions d'oxydo-réduction	On donnera la loi de Nernst et la relation $\Delta G'_0 = -n F \Delta E'_0$
4. Couplage énergétique, composés riches en énergie	On définira l'énergie de liaison et la notion de "liaison riche en énergie". On montrera la diversité des composés à vocation énergétique.
5. Formation d'ATP dans les mitochondries, les chloroplastes et les bactéries	
5.1. Phosphorylation oxydative mitochondriale	Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale sera exposé en envisageant la nature, le rôle et la localisation membranaire des constituants. On montrera l'obtention d'un gradient protomoteur au niveau des complexes et le rôle de l'ATP synthase.
5.2. Photophosphorylation et photosynthèse	
5.3. Phosphorylation oxydative bactérienne	En liaison avec le cours de microbiologie. On montrera que le site des réactions diffère chez les procaryotes (au sein de la membrane plasmique) et chez les eucaryotes (thylakoïdes des chloroplastes, mitochondries). On notera que la chaîne respiratoire est également le site privilégié de la régénération de l'ATP chez les bactéries.

### Module 4 Biochimie métabolique

Contenus	Commentaires
	Toute étude exhaustive du métabolisme est exclue. Les voies dont l'étude sera détaillée, sont précisées dans les commentaires ci-dessous. Les autres voies abordées de façon sommaire seront introduites à partir de documents. On dégagera les étapes clés des voies métaboliques (conservation ou production d'ATP, oxydo-réductions produisant des coenzymes réduits, décarboxylations, désaminations). Les bilans moléculaires et énergétiques des différentes voies métaboliques abordées seront établis et comparés.
1. Métabolisme des glucides	
1.1. Glycolyse	La glycolyse sera détaillée.
1.2. Devenir du pyruvate en anaérobiose : fermentations lactique et éthanolique, autres fermentations d'intérêt industriel	Les fermentations lactique et éthanolique seront détaillées.
1.3. Devenir du pyruvate en aérobiose	La décarboxylation oxydative du pyruvate sera détaillée.
1.4 Régulation de la glycolyse, effet Pasteur	
<ul> <li>1.5. Autres voies du métabolisme glucidique</li> <li>- Voies des pentoses phosphates</li> <li>- Interconversions des oses</li> <li>- Glycogénolyse</li> <li>- Glycogénogénèse</li> </ul>	La présentation des autres voies restera sommaire. On montrera l'intérêt de la voie des pentoses phosphates. On schématisera l'articulation du métabolisme du glycogène avec la glycolyse.
2. Cycle de Krebs	
2.1. Différentes étapes	On détaillera les différentes étapes du cycle de Krebs.
2.2. Bilan énergétique	
3. Métabolisme des lipides	
3.1. Catabolisme des acides gras : activation, transport, β-oxydation	On détaillera la β-oxydation des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone. On indiquera le rôle des navettes dans le passage des groupements acyles à travers la membrane mitochondriale.

<ul><li>3.2. Présentation des autres voies métaboliques</li><li>- Oxydation des acides gras insaturés</li></ul>	La présentation des autres voies restera sommaire. On mentionnera le rancissement des aliments lié à l'oxydation des acides gras insaturés.
- Biosynthèse des acides gras	On se limitera à un schéma général de la biosynthèse des acides gras, en relation avec les produits oléagineux.  La localisation membranaire des acyltransférases sera présentée.
<ul> <li>Biosynthèse et dégradation des triglycérides, biosynthèse des glycérophospholipides</li> </ul>	presentee.
4. Métabolisme des composés azotés	
4.1. Activité protéolytique	On détaillera les processus d'altération des aliments.
4.2. Réactions de décarboxylation, de désamination et de transamination des acides aminés	On traitera de façon détaillée, en liaison avec le cours de microbiologie, les réactions de décarboxylation, de désamination et de transamination.

### Activités technologiques en analyse biochimique

- 1. Ces enseignements sont dispensés dans des laboratoires spécialisés réservés à la biochimie, en groupes d'ateliers dont l'effectif ne peut être supérieur à 15 étudiants.
- **2.** Au cours des deux années de formation, les étudiants sont conduits dans le cadre des « activités technologiques en analyse biochimique » à :
  - préparer, étalonner et conditionner des solutions titrantes, des solutions tampons, des réactifs et milieux nécessaires aux analyses et aux contrôles ;
  - préparer les appareils et installations nécessaires à la mise en œuvre des techniques abordées ;
  - réaliser les mesures de paramètres physico-chimiques nécessaires à la conduite des analyses effectuées :
  - analyser et prévenir les risques professionnels, individuels, collectifs et environnementaux liés à ces activités technologiques ;
  - se conformer aux contraintes réglementaires et normatives.

Ces différents points correspondant aux compétences C1. 1.1., C1. 1.2., C1. 1.4., C2. 3., C4. 3.1. et C4. 4 ne font pas l'objet d'une description détaillée dans le programme des « activités technologiques en analyse biochimique » dans la mesure où ils seront systématiquement abordés au cours des différentes manipulations.

- **3.** Ce programme répertorie et propose une grande diversité de méthodes. La plupart seront étudiées et mises en œuvre en tant qu'activités technologiques en laboratoire. Il n'est cependant pas interdit d'envisager d'autres technologies (particulièrement lorsqu'une technique émergente se généralise dans les laboratoires d'analyses).
- Il inclut les opérations unitaires devant être mises en oeuvre lors des « activités technologiques en analyse biochimique ».
- **4.** Les techniques devront, dans toute la mesure du possible, être réalisées sur des produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques (bioproduits).
- 5. Lorsque cela est précisé, certaines méthodes et leurs principes pourront n'être abordés que d'un point de vue théorique. Les étudiants devront cependant connaître le principe des méthodes, la nature et le rôle des différents éléments constitutifs des appareillages concernés ainsi que les contraintes et risques spécifiques. Ils devront également être en mesure d'exploiter les résultats expérimentaux obtenus par ces techniques.
- 6. Il sera largement fait appel à l'outil informatique dans le cadre de ces enseignements (compétence C5. 2).
- 7. Ces activités technologiques seront l'occasion de sensibiliser les étudiants au coût des appareils (achat et maintenance), matériels et produits.
- **8.** L'ensemble de ces enseignements permet d'acquérir les compétences suivantes du référentiel des activités professionnelles : C1. 1, C1. 6, C2. 3, C2. 4, C4. 2, C4. 4.

Contenus	Commentaires
1. Préparation et conservation des échantillons et produits  1.1. Broyage, homogénéisation 1.2. Minéralisation, calcination 1.3. Evaporation, dessiccation 1.4. Centrifugation 1.5. Filtration, ultrafiltration 1.6. Précipitation, relargage 1.7. Dialyse 1.8. Sonication 1.9. Distillation	Ces techniques ne feront pas l'objet de manipulations particulières mais seront mises en œuvre lors de la préparation des échantillons et réactifs utilisés lors des diverses activités technologiques prévues au programme.
2. Analyses gravimétriques et physicochimiques  2.1. Détermination du taux de matière sèche 2.2. Détermination du taux de cendres, détermination des pourcentages de matières organiques et minérales 2.3. Détermination de l'a <sub>w</sub> *(activité de l'eau) 2.4. Détermination des caractéristiques rhéologiques d'un échantillon	On définira les diverses caractéristiques rhéologiques d'un échantillon. On mettra en œuvre une méthode de mesure d'une de ces caractéristiques sur un bioproduit.
3.1. Détermination de points d'équivalence 3.1.1. Méthodes chimiques - Acidimétrie - Oxydo-réduction  3.1.2. Méthodes physiques - pHmétrie - Potentiométrie - Conductimétrie - Conductimétrie 3.2. Détermination de paramètres chimiques par utilisation d'électrodes spécifiques, d'électrodes à oxygène	On mettra en œuvre ces méthodes à l'occasion : - de la préparation et du contrôle des réactifs nécessaires aux analyses ; - de la détermination des caractéristiques de bioproduits.
4. Analyses mettant en œuvre des méthodes optiques  4.1. Polarimétrie 4.2. Réfractométrie 4.3. Spectrophotométrie d'absorption moléculaire	

<sup>\*</sup>Cette technique ne pourra faire que l'objet d'une présentation théorique. Les étudiants devront être en mesure d'exploiter des résultats expérimentaux obtenus par cette technique.

4.3.1. UV-Visible	On mettra en œuvre cette méthode à l'occasion de la préparation, de l'analyse et du contrôle de
	bioproduits
4.3.2. IR*	
4.3.3. IRTF*	
4.4. Spectrophotométrie d'absorption atomique	On appliquera cette technique à l'analyse
	d'éléments présents dans les bioproduits.
4.5. Spectrophotométrie d'émission moléculaire	
4.5.1. Fluorimétrie	
4.5.2. Bioluminescence*	
4.5.3. Chimioluminescence*	
4.6. Spectrophotométrie d'émission atomique	
4.6.1. Photométrie de flamme	
4.6.2. Spectrophotométrie d'émission	
plasma*.	
4.7. Photométrie des milieux troubles	
4.7.1. Turbidimétrie	
4.7.2. Néphélométrie	
5 Analyses mettent en muyre des techniques	
5. Analyses mettant en œuvre des techniques chromatographiques	
chi omatogi apmques	
5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).	
5.2. Chromatographie en phase liquide basse	Il sera fait mention de l'utilisation préparative de
pression	cette technique.
5.2.1. Partage	conte teominque.
5.2.2. Adsorption	
5.2.3. Affinité	Technique à étudier en relation avec le
	programme d'activités technologiques en
	biologie cellulaire et moléculaire.
5.2.4. Gel filtration	
5.2.5. Échange d'ions	
5.2.6. Hydrophobie	
5.3. Chromatographie en phase liquide haute	Il sera fait mention de l'utilisation préparative de
performance (HPLC) isocratique, à	cette technique.
gradient et détecteurs associés	On présentera les principes des différents
	détecteurs utilisables y compris le détecteur à
	spectrométrie de masse.
5.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG),	
détecteurs associés	
6. Analyses mettant en œuvre des techniques	
électrophorétiques	
6.1. Électrophorèse sur support des protéines	
6.2. Électrophorèse SDS-PAGE	Cotto tookuisus sono à átralian an malatian an 1
6.3. Électrophorèse en gel d'agarose	Cette technique sera à étudier en relation avec le
	paragraphe 8.3.: « analyses de produits
6.4 Électrophorèse capilleire*	d'amplification ».
6.4. Électrophorèse capillaire* 6.5. Électrofocalisation*	
6.6. Électrophorèse bidimensionnelle*	
6.7. Immunoélectrophorèse	Application aux contrôles de pureté d'un réactif.
o. /. minunociceurophorese	rippineation aux controles de purcte d'un réactif.

\*Cette technique ne pourra faire que l'objet d'une présentation théorique. Les étudiants devront être en mesure d'exploiter des résultats expérimentaux obtenus par cette technique.

### 7. Analyses mettant en œuvre des techniques enzymatiques

- 7.1. Détermination d'activités enzymatiques
- 7.2. Dosage de substrats par méthode enzymatique
  - 7.2.1. Méthodes en point final
  - 7.2.2. Méthodes cinétiques
- 7.3. Réalisation et utilisation d'électrodes spécifiques (capteurs enzymatiques)

Ces techniques seront mises en oeuvre au cours du suivi d'une purification d'enzyme et de l'analyse des bioproduits.

## 8. Analyses mettant en œuvre les techniques de la biologie moléculaire

- 8.1. Extraction et digestion d'acides nucléiques
  - Extraction d'ADN plasmidiques ou chromosomiques et/ou d'ARN (à partir de microorganismes, tissus vivants animaux ou végétaux)
  - Digestion par des enzymes de restriction
- 8.2. Amplification d'acides nucléiques par PCR
- 8.3. Analyse des produits d'amplification
- Préparation des réactifs et matériels
  - Électrophorèse sur gel puis analyse des gels

Techniques réalisées in extenso :

- extraction;
- purification;
- quantification.

Validation des réactifs. Réalisation des gels d'agarose. Électrophorèse et lecture.

### 9. Réalisation d'opérations unitaires mettant en œuvre des techniques biochimiques

9.1. Ultrafiltration ou échange d'ions

Voir le programme d'activités technologiques d'opérations unitaires.

Une de ces deux opérations unitaires devra être mise en œuvre au cours de la formation. Ultrafiltration : application au domaine alimentaire ou pharmaceutique pour :

- purification;
- concentration de protéines ;
- séparation de molécules.

Échange d'ions : application au domaine alimentaire pour :

- déminéralisation ;
- décoloration ;
- séparation de molécules.

Une de ces deux opérations unitaires devra être mise en œuvre au cours de la formation. Application au domaine alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique.

9.2. Formulation ou émulsion