



Apports des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales

Yohan Rigaldie, Gérard Demazeau

► To cite this version:

Yohan Rigaldie, Gérard Demazeau. Apports des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 2004, 62 (2), pp.116-127. <10.1016/S0003-4509(04)94290-3>. <hal-00138561>

HAL Id: hal-00138561

<https://hal.science/hal-00138561v1>

Submitted on 24 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Apports des hautes pressions aux sciences pharmaceutiques et médicales

Y. Rigaldie[†], G. Demazeau

Résumé. L'étude des effets des hautes pressions sur les systèmes biologiques datent du début du ^{xx}^e siècle, mais les premières applications industrielles dans ce domaine ont vu le jour dans les années 1990. Depuis la commercialisation de produits agro-alimentaires « pascalisés » afin d'améliorer leur durée de conservation, de nombreux axes de recherches ont été développés en biosciences et continuent à se diversifier. Les travaux réalisés dans ces dix dernières années, d'une part en recherche appliquée (nouvelles méthodes d'obtention de molécules bioactives ; décontamination et stérilisation de produits d'origine biologique, de matériel médico-chirurgical, de molécules thérapeutiques et de formes galéniques fragiles ; élaboration de vaccins) et d'autre part en recherche fondamentale (exploration et simulation des mécanismes d'agrégation des protéines), mettent particulièrement en évidence les applications en sciences médicales et pharmaceutiques qui pourraient bénéficier de cette technologie émergente.

Summary. Since the beginning of the 20th century, effects of high pressure on biological systems have been studied, but the first applications in this domain have been developed in the 90's and concerned the preservation of food-stuff. Hence, much research work has been undertaken in order to develop high pressure effects in Biosciences. In the last decade, new methods or processes using high pressure (obtaining therapeutic molecules; decontamination or sterilization of biological stuff, sensitive drugs and drug carriers; development of vaccines; using high pressure as a tool in order to simulate and explore the mechanisms of proteins aggregation) underlining the potentialities of this technology in Medical and Pharmaceutical Sciences.

Key-words: High pressure, Pharmacy, Medicine.

Mots-clés : Hautes pressions, Pharmacie, Médecine.

Historique

L'étude et la maîtrise du paramètre thermodynamique pression sont récentes. Les premiers travaux réalisés remontent approximativement à la fin du ^{xix}^e siècle avec Regnard [1, 2] qui a mis en évidence l'effet inhibiteur des hautes pressions

sur les levures de bière. Puis Hite [3] a étudié l'action de la pression sur les micro-organismes présents dans le lait et la viande et fut le premier à montrer que la pression pouvait être utilisée afin d'accroître la durée de conservation des aliments. L'intérêt pour l'utilisation de la pression dans le domaine des biosciences s'est maintenu durant la première moitié du ^{xx}^e siècle, et parmi les principaux travaux réalisés, on peut citer : l'observation de la « coagulation » de l'albumine entre 600 et 700 MPa par Bridgman [4] ; l'amélioration de la durée de conservation des fruits traités sous hautes pressions par Hite [5] ; les travaux de Basset *et al.* sur la sensibilité à la pression de différents micro-organismes et composés biologiques tels que les bactéries végétatives *S. aureus*

Présentation devant l'Académie nationale de pharmacie, séance du 2 juillet 2003.

LPCHP, Laboratoire de physico-chimie des hautes pressions (Interface hautes pressions ENSCPB-ICMCB), École nationale supérieure de chimie et de physique de Bordeaux (ENSCPB), 16, avenue Pey Berland, F33608 Pessac Cedex.

et *B. prodigiosus*, les spores bactériennes de *B. subtilis*, les toxines tétanique et diphtérique, les virus de l'herpès et de la fièvre aphteuse [6-11] ; la mise en évidence par Grant *et al.* de la dénaturation des protéines [12] ; la première formalisation des effets de la pression sur les réactions enzymatiques par Laidler [13].

Il faut cependant souligner que si l'étude du paramètre thermodynamique pression a concerné dès le début la conservation des aliments, et des travaux dans les biosciences, il n'a pas suscité tout de suite un grand intérêt industriel dans ce domaine. C'est en chimie du solide et en sciences des matériaux que depuis plus de 40 ans, les hautes pressions ont été développées comme outil de synthèse ou de mise en forme tant dans le domaine des sciences fondamentales que des sciences appliquées. Et c'est d'ailleurs en sciences des matériaux que les premières applications industrielles ont été développées (synthèse du diamant pour outils de coupe et d'usinage [14], synthèse de l'oxyde CrO_2 pour l'enregistrement magnétique [15, 16], cristalllogénèse à basse température du quartz α pour oscillateurs et résonateurs [17]...).

Il faudra attendre les travaux menés au Japon notamment par Hayashi [18] et le début des années 1990 pour que se développe dans ce pays un intérêt croissant pour l'application des hautes pressions dans le domaine des biosciences, et plus précisément pour la conservation des aliments. Ce programme a abouti à l'industrialisation de la technologie des hautes pressions isostatiques dans le domaine agroalimentaire. À la fin de l'année 1995, un total de sept compagnies japonaises fabriquaient des produits traités par hautes pressions : confitures, crèmes glacées, jus de fruit, produits lactés... Depuis la commercialisation de produits pascalisés* s'est étendue à la France, l'Espagne et aux États-Unis. En juin 2000, la FDA a édité un ouvrage de synthèse et de recommandations concernant les techniques alternatives de stérilisation des produits agroalimentaires dans

lequel un chapitre est consacré aux hautes pressions [19]. Cependant le développement de cette technologie dans le domaine agroalimentaire est freiné en particulier par la faible valeur ajoutée des produits alimentaires qui n'est pas toujours à la hauteur en surcoût engendré, en investissement et en fonctionnement de l'équipement.

Généralités

Définitions

La pression est une grandeur définie comme le quotient d'une force par unité de surface. Sa valeur en unité S.I. s'exprime en pascal (Pa) : $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N.m}^{-2}$. Comme le pascal est une très petite unité, le mégapascal (10^6 Pa ou 1 MPa) est plus couramment utilisé dans le domaine des Hautes Pressions. Les anciennes unités telles que le bar ($1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$) et l'atmosphère normale ($1 \text{ atm} = 1\,013,25 \text{ hPa}$) sont encore parfois admises du fait de leur commodité d'utilisation à l'échelle humaine.

La pression dynamique, créée par ondes de chocs, permet d'atteindre des valeurs proches de 10^3 GPa pendant quelques microsecondes. Elle s'accompagne toujours d'une élévation de température. La pression statique, générée dans un volume défini, peut être maintenue de façon relativement durable et atteindre des valeurs maximales de l'ordre de 400 GPa [20]. Dans ce cas, seul le paramètre thermodynamique pression varie (la température évolue peu pendant la compression). Si le module de la pression est le même dans toutes les directions de l'espace, alors la pression est isostatique ; sinon elle est non-isostatique et souvent uniaxiale (c'est le cas, par exemple, d'une pression uniaxiale engendrée par une machine à fabriquer des comprimés).

Pour les applications dans le domaine des biosciences, la pression utilisée est isostatique et transmise par un fluide, généralement de l'eau, on parle alors de pression hydrostatique (les gaz, très compressibles, sont rarement employés du fait de l'énergie emmagasinée). La transmission de la pression est instantanée et uniforme, il n'y a pas d'apparition de gradient comme dans le cas de la température.

* Le mot « pascalisation » a été donné par les scientifiques japonais aux traitements de produits alimentaires sous hautes pressions et température ordinaire, dénomination symétrique de « pasteurisation » caractérisant un traitement à hautes températures mais à pression ordinaire.

Principe de fonctionnement et équipement

Le principe de traitement est simple (*fig. 1*). La pression hydrostatique est transmise par l'intermédiaire d'un liquide : le fluide transmetteur. Le produit à traiter, généralement conditionné dans un emballage hermétique déformable, est placé dans une enceinte. La pression générée se maintient sans apport énergétique et s'exerce uniformément à travers tout le produit.

Les besoins de l'industrie agroalimentaire ont nécessité le développement d'équipements générateurs de hautes pressions adaptés. La conception de l'équipement est fonction de la nature du produit à traiter : il existe ainsi des installations de type « batch » pour traiter les produits préemballés, et des installations en semi-continu pour le traitement de produits liquides en vrac [21].

Principe général gouvernant les réactions sous pression

La variation de volume accompagnant une réaction est un paramètre primordial pour évaluer le rôle de la pression. L'évolution de ces réactions est gouvernée par le principe de Le Chatelier : « les phénomènes qui s'accompagnent d'une réduction de volume sont favorisés par une augmentation de la pression, et inversement ». Ce principe permet de prévoir l'action des hautes pressions notamment sur les systèmes biologiques.

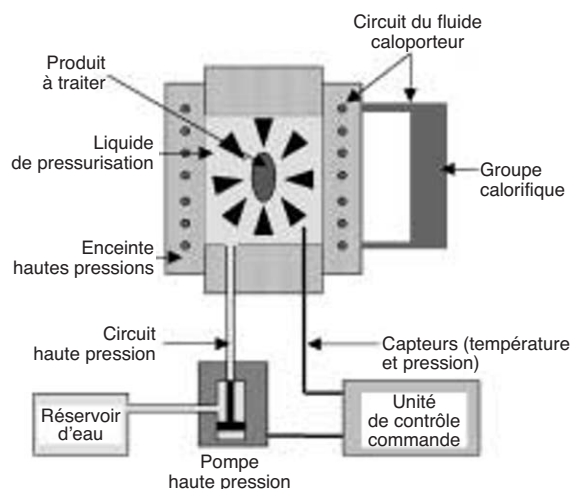


Figure 1. Représentation schématique d'un dispositif de hautes pressions.
Schematic drawing of high pressure set ups.

Effets de la pression sur les liaisons chimiques

En raison de la faible quantité d'énergie transmise par la pression hydrostatique les liaisons covalentes ne sont pas altérées. Par contre les liaisons de faible énergie (interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, ioniques et électrostatiques) peuvent être modifiées de façon irréversible (*tableau I*).

Effets de la pression sur les réactions physico-chimiques et biochimiques

En s'appuyant sur la théorie d'Eyring (existence d'un complexe labile de transition noté A^* entre les états A et B d'un équilibre), c'est la variation de volume entre l'état transitoire et l'état final (ΔV^*) qui détermine le sens de la réaction [23]. Une réaction possédant un $\Delta V^* < 0$ sera activée par une augmentation de pression.

Du point de vue des phénomènes physiques mis en jeu, la pression contribue à un rapprochement des molécules les unes par rapport aux autres, ce phénomène peut conduire à des transitions de phases (liquide-solide ou liquide-gel) en privilégiant l'état de plus faible volume. Comme dans le cas de l'eau ou des lipides, ces transitions peuvent être réversibles après dépressurisation. Les transitions de phases des lipides contenus dans les biomembranes ont particulièrement été étudiées [24-26].

Effets de la pression sur les biomolécules

La pression n'agit pas de la même manière sur toutes les biomolécules, les plus sensibles étant

Tableau I. — Barosensibilité des liaisons chimiques d'après Federighi *et al.* [22]
Barosensitivity of chemical bounds, from Federighi et al. [22]

Type de liaison	ΔV de formation (ml/mol)	Action de la pression sur la liaison
Covalente	- 10	Renforcement
Ionique	+ 10 par ion engagé	Rupture
Hydrogène	- 3 à + 1 < 0	Effet réduit ou renforcement
Hydrophobe	> 0 10 à 20	Déstabilisation Stabilisation si $P > 100$ MPa Rupture si $P < 100$ MPa

les protéines. Selon le principe de Le Chatelier, la pression doit modifier la conformation des protéines dans le sens d'une diminution du volume total. Le volume des protéines natives est la résultante de trois termes : le volume des atomes qui la constituent, le volume des cavités internes, le troisième terme est lié à la solvatation de la macromolécule. Ainsi, son application tend à favoriser le déplissement et la dissociation protéique qui s'accompagnent d'une augmentation de l'interface protéine-solvant et induit ainsi la transformation d'une partie de l'eau libre en eau liée. Cependant l'eau liée étant beaucoup moins compressible que l'eau libre, ce phénomène s'inverse en augmentant la pression (notamment au-delà de 300 MPa). On favorise alors l'agrégation protéique. Cette dernière transformation ne serait que partiellement réversible au cours de la décompression [21].

La structure native de la protéine est un équilibre entre des interactions stabilisatrices et déstabilisatrices au sein de la chaîne polypeptidique et avec le solvant. L'état natif reste stable dans une zone étroite qui dépend des conditions environnementales (structure de la protéine, température, pression, solvants, pH, sels). La pression agit comme un paramètre physico-chimique qui perturbe l'équilibre entre les différentes interactions (interactions intramoléculaires, interactions intermoléculaires, interactions solvant-protéine) [23].

La structure primaire des protéines est assurée par des liaisons peptidiques covalentes. Ces liaisons n'étant pas affectées par la pression, confèrent à la structure primaire des protéines une certaine barotolérance [27].

Les modifications des structures secondaires induites par les hautes pressions dépendent de chaque protéine et sont difficiles à prévoir. La structure secondaire n'est détruite qu'à partir de très fortes pressions : 1,2 GPa [28-30].

La destruction de la structure tertiaire par la pression est provoquée par la rupture de liaisons hydrogènes et ioniques à partir d'une pression de 100 MPa à 200 MPa [31]. La pression provoque le déploiement des protéines globulaires et conduit alors à une diminution du volume de la molécule. En effet, ce phénomène accroît les contacts entre le solvant, les groupements non polarisés et les acides aminés présents à l'intérieur

de la protéine [32]. Cependant, le déploiement de la protéine, induit par la pression est variable selon les régions de la molécule [33]. Cet état transitoire est appelé globule fondu (« *molten globule* »), il apparaît entre 100 MPa et 300 MPa et peut conduire à la formation d'agrégats ou de gels protéiques en raison de l'exposition de groupes hydrophobes en surface [34-36].

Dans le cas des structures quaternaires, la pression dissocie les monomères constituant la protéine à des pressions inférieures à 150 MPa. Cette dissociation est accompagnée par un ΔV pouvant atteindre - 500 ml/mol. [37].

Les propriétés fonctionnelles d'une protéine donnée dépendent étroitement de la structure spatiale de la molécule ; toute variation de celle-ci peut entraîner d'importantes variations de sa fonction. Ainsi, les hautes pressions peuvent bloquer des fonctions cellulaires en dénaturant les protéines (exemple : la modification de la structure d'une enzyme peut induire l'arrêt d'une réaction du métabolisme) [38].

Applications médicales et pharmaceutiques

Effets des hautes pressions sur les parasites

Peu d'études concernent l'effet des hautes pressions sur des parasites. Des travaux concernant la recherche de procédés non-thermiques de stabilisation des jus de fruits et de l'eau de boisson montrent que 60 secondes à 550 MPa suffisent pour rendre non viable et non infectieux *Cryptosporidium parvum* [39]. *Trichinella spiralis* est tué après 10 minutes d'exposition à 200 MPa [40].

Un procédé alternatif de stérilisation par les hautes pressions : « la pascalisation »

L'action de la pression sur les protéines, les réactions enzymatiques (inhibition de la transcription) et les constituants lipidiques et protéiques des membranes des micro-organismes conduit à leur inactivation. Les similitudes entre les diagrammes d'inactivation des micro-organismes et les diagrammes de dénaturation des protéines permettent de suggérer que la dénaturation des protéines jouerait un rôle clé dans l'inactivation par hautes pressions des micro-

organismes [38, 41, 42]. Au niveau membranaire, les transitions de phases des lipides provoquées par les hautes pressions contribuent à diminuer la fluidité des biomembranes, à déstabiliser les fonctions des protéines membranaires et par voie de conséquence à désorganiser les échanges (diffusion, transport actif) entre le milieu intracellulaire et extracellulaire [43, 44].

L'ensemble des auteurs s'accorde sur le classement des micro-organismes en fonction de leur résistance à la pression.

Les levures et les moisissures sont les formes les plus sensibles, leur inactivation survient à des pressions comprises entre 200 MPa et 400 MPa.

Les bactéries à Gram négatif sont moins résistantes que les bactéries à Gram positif dont l'inactivation nécessite des pressions de l'ordre de 500 MPa à 600 MPa (exemple de *S. aureus*). Ce phénomène s'expliquerait essentiellement par la différence de structure entre leur paroi : les bactéries à Gram positif possèdent une paroi contenant en fortes proportions du peptidoglycane et en plus faibles proportions des lipides et des protéines, alors que ces proportions s'inversent dans le cas des bactéries à Gram négatif. Le peptidoglycane est formé de liaisons covalentes résistantes à la pression alors que les protéines et les lipides sont fortement affectés.

Pour les moisissures comme pour les bactéries, les formes sporulées sont plus résistantes que leur forme végétative. Les spores bactériennes possédant le record de tolérance à la pression, elles représentent un enjeu important dans beaucoup de protocoles de stérilisation par les hautes pressions (les spores de *Bacillus sp.* demeurent viables après des pressions supérieures à 1 GPa) [45, 46, 6]. Leur inactivation nécessite la mise en place de nouvelles stratégies (combinaison de la pression avec la température ou avec des agents chimiques, répétition de cycles de pressurisation-dépressurisation...) [47].

Trois applications directes de ces travaux concernent le domaine des sciences pharmaceutiques :

La stérilisation des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés usuels trop énergétiques (chaleur, rayonnements ionisants) ou parfois inadaptés (filtration stérilisante)

Nos premiers travaux montrent qu'il est possible d'inactiver (réduction > 6 log) des micro-

organismes normalisés par la Pharmacopée européenne tels que *Candida albicans*, les spores d'*Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les spores de *Bacillus subtilis*. Les conditions thermodynamiques de pression et de température retenues ($P \leq 500$ MPa et $T \leq 37$ °C) permettent d'une part la sauvegarde de l'intégrité physico-chimique de molécules d'intérêt thérapeutique (peptides, insuline, anticorps monoclonaux...) et d'autre part de respecter une compatibilité avec les équipements industriels disponibles [48].

Les mêmes protocoles peuvent être appliqués aux formes galéniques modernes tels que les systèmes médicamenteux nanodispersés élaborés à base de polymères biodégradables (sphérulites®, nanocapsules et nanosphères)

Dans le cas des sphérulites®, des traitements allant jusqu'à 500 MPa n'altèrent pas la répartition granulométrique, les lipides constituant des membranes et le taux d'encapsulation du colorant (amarante) contenu dans les sphérulites® [48].

Nous avons pu observer le comportement de sept types de nanoparticules sous hautes pressions. Elles se différencient par trois critères : leur type (nanosphère ou nanocapsule), la nature du polymère (PHDCA : Poly (hexadécylecyanoacrylate), PEG-PHDCA : poly (MePEG₂₀₀₀ cyanoacrylate-co-hexadécylecyanoacrylate) 1:4, PHDCA-Pluronic F68®) et leur méthode d'obtention (nanoprécipitation ou émulsion/évaporation de solvant). Les différentes techniques analytiques mises en œuvre (granulométrie laser, mesure du potentiel de surface, analyse spectrophotométrique, mesure de la turbidité, microscopie électronique à balayage, analyse des spectres infrarouge) ne montrent pas de modification significative de l'ensemble des systèmes dispersés étudiés après des traitements à plusieurs barèmes de pressions (200 MPa, 300 MPa, 400 MPa et 500 MPa) [48, 49].

Les liposomes ont fait l'objet d'études de stabilité sous hautes pressions encourageantes [50, 51].

La pascalisation de matériaux implantables et du matériel médico-chirurgical

D'après une étude de Delacour [52], l'activité sporicide des hautes pressions hydrostatiques peut être augmentée par un agent chimique ou par la chaleur. La combinaison des hautes pres-

sions (280 MPa) et de la soude 2N pendant une heure à 45 °C permet d'obtenir une activité sporicide de 6,42 log₁₀ contre 4,11 log₁₀ à pression atmosphérique. De telles procédures pourraient être appliquées aux traitements des déchets hospitaliers.

Inactivation de virus par les hautes pressions

Les capsides virales, comme les protéines polymériques, sont susceptibles d'être dissociées par un traitement hautes pressions [53, 54]. Les premiers travaux réalisés sur l'inactivation virale par les hautes pressions ont concerné principalement des bactériophages [10, 55-57].

Les études récentes ont pour objet l'inactivation de virus pathogènes pour l'homme ou d'intérêt médical : inactivation des virus Sindbis à 175 MPa [58], de la grippe, de l'herpès [59, 60], des virus HCMV et HSV-1 [61] et de l'hépatite A [62]. Néanmoins le virus non enveloppé responsable de la poliomyélite (poliovirus) n'est pas inactivé à 600 MPa [63]. Les travaux de Shigehisa *et al.* [64] ont montré que les hautes pressions permettaient d'inactiver le virus HIV de plus de 5 log avec des traitements à 350 MPa à 25 °C pendant 10 minutes.

Des examens par microscopie électronique ont révélé des ruptures des capsides des particules virales de HSV-1. De plus, après un traitement par hautes pressions à 300 MPa, aucun des virions ne pouvait s'attacher aux cellules cibles. La formation de particules virales non infectieuses après un cycle sous hautes pressions avait déjà été rapportée dans le cas d'autres virus plus complexes comme le rotavirus et le virus enveloppé *Vesicular Stomatitis Virus* [59].

Une réduction de 5 log a été observée dans le cas du *Simian Immunodeficiency Retrovirus* (SIVmac251 et SIVagm) après une pressurisation à 150 MPa pendant 10 heures ou à 200 MPa pendant 3 heures à température ambiante. Un traitement prolongé de 100 heures laisse entrevoir une réduction de 8 log à 9 log permettant ainsi la fabrication de vaccin [65].

Les travaux d'Otake *et al.* [54] sur une souche de laboratoire de HIV-1 (HTLV IIIB) et deux souches cliniques (KK-1 et KK-2) montrent une corrélation entre la réduction de l'activité de leur transcriptase inverse, induite par les hautes pres-

sions et la réduction du nombre de particules virales.

Sur la base de ces travaux, deux types d'applications médicales sont envisageables : la décontamination virale de produits d'origine biologique (les produits sanguins) et l'élaboration de vaccins.

Le traitement de produits sanguins sous hautes pressions

Peu de travaux ont été publiés sur la stérilisation des produits sanguins et aucun d'eux ne traite de façon systématique de l'action des hautes pressions sur l'activité biologique des différents constituants du sang. D'après Shigehisa *et al.* [63] l'effet des hautes pressions sur des préparations commerciales de plasma provoquerait une déformation des plaquettes mais pas d'altérations des gammaglobulines, de la thrombine, antithrombine ou du facteur IX à l'exception du facteur VIII. Les hautes pressions pourraient être utilisées pour produire du plasma ou des produits dérivés du sang exempts de virus, ou encore pour décontaminer du matériel médico-chirurgical. Il a même été envisagé d'utiliser les hautes pressions pour un traitement *ex vivo* du sang de patients souffrant d'affections virales graves pour diminuer la charge virale circulante.

Des travaux récents réalisés pour le compte de la société Boston Biomedica Incorporation ont montré que des répétitions rapides de cycles de pressurisation-dépressurisation à une température proche de 0 °C étaient plus performantes qu'à la température ambiante ou à -40 °C pour inactiver un phage lambda (6 log de réduction après 10 à 20 minutes de traitement). Les conditions de traitement permettent de conserver l'activité des protéines plasmatiques (IgG, IgM et le facteur X) [66]. Les derniers résultats obtenus grâce à ce procédé breveté et baptisé « *Pressure Cycling Technology* » ou « PCT » [67] montre qu'il permet d'inactiver à la fois des virus enveloppés (HIV, HSV) et des virus non-enveloppés (Parvovirus) sans dégrader les facteurs de coagulations et les immunoglobulines [68].

D'un point de vue réglementaire, la FDA [19], propose de choisir le bactériophage λ d'*E. coli* comme indicateur biologique de contrôle du déroulement du processus de stérilisation par les hautes pressions visant à éliminer les virus. La biologie de ce bactériophage est bien connue, il

est relativement facile à manipuler et ne présente aucun danger d'infection pour l'homme.

*L'élaboration de vaccins
à l'aide des hautes pressions*

Cette thématique a été initiée en France dans les années 1950. Les recherches de Basset *et al.* [69] et de l'Institut Pasteur de Paris sur l'action de la pression sur les virus étaient sur le point de déboucher sur la fabrication d'un vaccin contre la poliomyélite. Ces travaux ont été abandonnés après la commercialisation du vaccin de Sabin en 1957.

Le processus de dénaturation des protéines par les hautes pressions provoque la formation irréversible d'états intermédiaires qui dans le cas des protéines virales se traduit par la perte de leur caractère infectieux et la conservation (et parfois même un renforcement) de leur pouvoir immunogène. Ainsi les protéines du virus de la fièvre de Rift Valley barotraitées à 225 MPa, à 25 °C, pendant 30 minutes possèdent un pouvoir immunogène supérieur à celui des particules virales formolées et ont permis d'immuniser des souris contre un type sauvage du virus de la fièvre de Rift [70].

Dans le cas du rotavirus (virus non-enveloppé), les hautes pressions altèrent la protéine Vp4 responsable de la fixation des particules virales sur les cellules cibles. Les virus devenus non-infectieux conservent leur pouvoir immunogène et peuvent être utilisés pour élaborer un vaccin [71]. Ainsi les procédés hautes pressions peuvent être considérés comme une méthode alternative aux méthodes chimiques couramment utilisées dans la fabrication des vaccins [72].

Les hautes pressions ayant pour particularité de stabiliser les protéines dans des conformations intermédiaires, les travaux actuels de virologie moléculaire s'orientent vers l'étude des mécanismes qui conduisent d'une part à l'assemblage des particules virales [72-74] et d'autre part à la perte du caractère infectieux des virus après traitement sous hautes pressions [75].

Effets des hautes pressions sur les prions

Les prions sont des petites protéines d'environ 30 kDa sans structure secondaire importante et très résistantes aux procédés de destruction clas-

sique des protéines. L'inactivation irréversible des prions par la pression nécessiterait d'atteindre des valeurs supérieures à 1 GPa. Des pressions supérieures à 500 MPa permettent d'inactiver le prion responsable de l'encéphalopathie spongiforme du hamster de Syrie [76].

D'un point de vue plus fondamental, l'étude des états intermédiaires des protéines et de leur agrégation provoquée par les hautes pressions, revêt un intérêt grandissant. Les hautes pressions permettent d'explorer les chemins réactionnels conduisant à l'agrégation protéique ou à une architecture macromoléculaire anormale (provenant d'un mauvais repliement des chaînes polypeptidiques lors de la phase de décompression) [77, 78]. L'isolement de structures protéiques anormales ou agrégées analogues à celles impliquées dans la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, des encéphalites spongiformes ou encore dans de nombreux cancers, permettrait le développement de molécules antagonistes capables de prévenir ou de bloquer ce phénomène [73, 79, 80].

Apports des hautes pressions dans le domaine des biotechnologies

L'utilisation de micro-organismes barophiles dans des bioréacteurs sous pression conduit à des bioconversions de composés dans des conditions économiques particulièrement satisfaisantes (exemple de la production de l'eau oxygénée, de l'acétaldéhyde par Nelles *et al.* [81] et de la L-phénylalanine par Matsunaga [82]). La synthèse de peptides actifs et de l'aspartame sous l'action de la thermolysine a été réalisée par Kunugi *et al.* (1997) [83].

L'action des hautes pressions entraîne la dissociation des couples antigènes-anticorps sans dénaturer chacune des deux entités. Cette observation est à la base de la conception de nouveaux supports d'immunoaffinité et de procédés de bio-séparation permettant l'obtention de composés de degré de pureté requis pour les applications thérapeutiques [84, 85].

La congélation sous hautes pressions

Le diagramme de phase de l'eau en fonction de la température et de la pression caractérisé notamment par le ΔV positif lors du passage de

l'eau liquide à la glace I permet d'envisager deux types d'applications :

1. la conservation à températures négatives de produits d'origine biologique sans congélation (puisque l'eau reste liquide à -20°C sous 200 MPa),
2. la congélation en favorisant la transition de l'eau vers la glace IV, ces deux phases possédant quasiment la même densité (la pression favorise la présence de nombreux germes au détriment de cristaux de grande taille qui provoquent des altérations tissulaires).

De nombreux travaux de développement de cette nouvelle technique de congélation ont été entrepris dans le domaine agroalimentaire. La conservation de produits biopharmaceutiques, de produits dérivés du sang, de cellules et d'implants pourrait être envisagée.

La synthèse chimique sous hautes pressions

Une conséquence directe du principe de Le Chatelier est la favorisation de chemins réactionnels ayant pour conséquence l'augmentation du rendement de certaines synthèses chimiques ou la simplification de schéma réactionnel pour l'obtention de molécules thérapeutiques.

De nombreuses réactions peuvent être effectuées : cyclo additions, substitutions nucléophiles, réactions de Diels-Alder, réactions organométalliques et transformations stéréospécifiques [86, 87]. On peut citer l'exemple de la synthèse de molécules antitumorales sous hautes pressions [88] ou encore la synthèse énantiosélective de molécules pharmacologiquement actives [89].

Élaboration de gels

L'élaboration de gels protéiques ou de gels mixtes protéine-polysaccharide de structure régulière peut présenter un intérêt en cosmétologie et en galénique. Il est également possible d'obtenir rapidement des gels parfaitement homogènes à partir d'excipients couramment utilisés en galénique comme les alginates ou des carragénates [90, 91].

Conclusions

Les premières réflexions sur l'action des hautes pressions sur les systèmes biologiques ne sont pas nouvelles, mais ont été longtemps négligées. La

maîtrise actuelle de la conception des équipements (tant au niveau des laboratoires qu'à l'échelle industrielle), les performances des outils analytiques modernes et les bases conceptuelles faisaient défauts au début du siècle. Les travaux sur les produits agroalimentaires et leur commercialisation ont contribué à déclencher un regain d'intérêts pour cette technologie.

De par le peu d'énergie mise en jeu, les hautes pressions isostatiques sont particulièrement bien adaptées aux produits biologiques. Les applications des hautes pressions dans les domaines des sciences pharmaceutiques et médicales sont nombreuses et concernent divers secteurs : la mise au point de nouvelles méthodes d'obtention de molécules thérapeutiques (synthèse chimique, méthode de bioséparation), la décontamination et la stérilisation de produits d'origine biologique comme le sang et ses dérivés, de molécules thérapeutiques et de formes galéniques fragiles, de matériel médico-chirurgical ; l'élaboration de vaccins ; l'obtention de gels pour des applications galéniques et cosmétologiques ; la congélation de produits biologiques. Les hautes pressions s'avèrent être également un outil précieux en recherche fondamentale pour comprendre les mécanismes conduisant à l'agrégation des protéines telles que les prions.

La stérilisation et la décontamination semblent être des applications très prometteuses, mais si le frein économique à leur développement ne s'applique pas aux produits de Santé comme il est présent pour les produits agroalimentaires du fait de la différence de valeur ajoutée, il demeure néanmoins une étape réglementaire à franchir. Il s'agit d'instaurer un dialogue avec les instances réglementaires afin d'accompagner le développement industriel de procédés alternatifs de stérilisation utilisant les hautes pressions et de prévoir également un système de vigilance adapté aux produits « pascalisés » afin de détecter l'éventuelle émergence de toxines, de nouveaux allergènes ou de souches devenues barorésistantes [92].

Remerciements

Nous tenons particulièrement à exprimer tous nos remerciements au Dr Patrick Masson pour

l'intérêt qu'il a porté à nos travaux et pour son soutien, à l'ANRT et à la Société BERTIN pour avoir soutenu une bourse de thèse m'ayant permis d'aborder la thématique de recherche « Apport des hautes pressions dans le domaine des biosciences ».

Références

1. Regnard P. Note sur les conditions de la vie dans les profondeurs de la mer. *CR Société de Biologie* 1884; 36: 164-8.
2. Regnard P. Recherches expérimentales sur l'influence des très hautes pressions sur les organismes vivants. *CR Acad. Sc* 1884; 98: 745-7.
3. Hite BH. The effects of pressure in the preservation of milk. *Bull WV Univ Agric Exp Sta Morgantown* 1889; 58: 15-35.
4. Bridgman PW. The coagulation of albumen by pressure. *J Biol Chem* 1914; 19: 511-2.
5. Hite BH, Gidding NJ and Weakley CH. The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables. *Bull WV Univ Agric Exp Sta Morgantown* 1914; 146: 1-67.
6. Basset J, Macheboeuf A. Étude sur les effets biologiques des ultrapressions : résistance des bactéries, des diastases et des toxines aux pressions très élevées. *CR Acad Sc* 1932; 195: 1431-3.
7. Basset J, Macheboeuf MA et Perez JJ. Effet sur les effets biologiques des ultrapressions. Modification des la spécificité antigénique des sérums sous l'influence des pressions très élevées. *CR Acad Sc* 1935; 200: 496-8.
8. Basset J, Nicolaus S et Macheboeuf MA. L'action de l'ultrapression sur l'activité pathogène de quelques virus. *CR Acad Sc* 1935; 200: 1882-4.
9. Basset J, Wollman E et Macheboeuf MA. Études sur les effets biologiques des ultrapressions : action des pressions très élevées sur les bactériophages des spores et sur les autolysines. *C R Acad Sc* 1935; 200: 1072-5.
10. Basset J, Wollman E, Macheboeuf MA et Bardach M. Études sur les effets biologiques des ultrapressions : action des pressions très élevées sur des bactériophages et sur un virus invisible (virus vaccinal). *C R Acad Sc* 1933; 196: 1138-9.
11. Basset J, Wollman E, Macheboeuf MA et Bardach M. Études sur les effets biologiques des ultrapressions : action des pressions très élevées sur les tumeurs. *C R Acad Sc* 1935; 200: 1247-8.
12. Grant EA, Dow RB and Franks WR. Denaturation of egg albumin by pressure. *Science* 1941; 94 (2452): 6161-6.
13. Laidler KJ. The influence of pressure on the rates of biological reactions. *Arch Biochem* 1950; 30: 226-40.
14. Demazeau G. Diamants de synthèse et produits dérivés, Pour La Science. Hors Série. avril/juin 2002 — LES DIAMANTS — du Coeur de la Terre au Coeur du Pouvoir, 2002, 46-51.
15. Lafon F and Demazeau G. Le quartz- α : Un ancien matériau à la base d'applications du futur- part I. *Matériaux et Techniques* 1997, 3-4: 11-7.
16. Lafon F and Demazeau G. Le quartz- α : Un ancien matériau à la base d'applications du futur- part II, *Matériaux et Techniques* 1997; 5-6: 17-24.
17. Demazeau G. Composés ferro- et ferrimagnétiques : l'enregistrement magnétique en profite, « *Le Courrier du CNRS* ». 1985, n° Numéro spécial : La Valorisation au CNRS, 61-62, 50.
18. Hayashi R. Application of high pressure to food processing and preservation: philosophy and development, Engineering and Food. *Elsevier Appl Sci, Londres* 1989; Vol 2: 815.
19. US. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies, <http://vm.cfsan.fda.gov>
20. Ruoff AL, Luo H and Vohra YK. The closing diamond anvil optical window in multimegabar research. *J App Physics* 1991; 69 (9): 6413-6.
21. Lambert Y. Application du paramètre pression dans les procédés de l'agro-alimentaire : pascalisation, transport de masse, congélation et mise au point d'une gamme d'emballage, Thèse : Génie des procédés : Bordeaux 1 : 1999, N° d'ordre : 2107.
22. Federighi M, Vidon M, Mescle J-F et Pilet MF. Traitement hautes pressions et denrées alimentaires — revue APF-01-2003-1-1-1111-101019-art1-bibliographique. *Microbiologie Aliments Nutrition* 1995; 13: 115-26.
23. Balny C et Masson P. Effects of high pressure on proteins. *Food Rev International* 1993; 9 (4): 611-28.
24. Winter R and Pilgrim WC. A SANS study of high pressure phase transitions in model biomembranes. *Ber Bunseng Phys Chem* 1989; 93: 708-17.
25. Braganza LF and Worcester DL. Structural changes in lipid bilayers and biological membranes caused by hydrostatic pressure. *Biochemistry* 1986; 25 (23): 7484-8.
26. Winter R. Effects of hydrostatic pressure on lipid and surfactant phases. *Current opinion in colloid & interface science* 2001; 6: 303-12.
27. Heremans K. Aspects théoriques des effets des hautes pressions sur les biomacromolécules, Technologies agro-alimentaires. *Dossier scientifique de l'IFN* 1993; 3: 3-20.

28. Wong PTT and Heremans K. Pressure effects on protein secondary structure and hydrogen exchange in chymotrypsinogen. *Biochim Biophys Acta* 1998; 956: 1-9.
29. Silva J-L and Weber G. Pressure stability of proteins. *Ann Rev Phys Chem* 1993; 44: 89-93.
30. Taniguchi Y and Takeda N. Pressure-induced secondary structure of proteins studied by FT-IR spectroscopy, High Pressure and Biotechnology. Balny C, Hayashi R, Herremans K, Masson P (eds), Colloque Inserm\ John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 115-22.
31. Cheftel J-C. Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: an overview, High pressure and biotechnology. Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson P, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 195-209.
32. Weber G and Drickamer HG. The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Quarterly Rev Biophys* 1983; 16: 89-112.
33. Jonas J. High pressure NMR studies of proteins and membranes, High Pressure and Biotechnology. Balny C, Hayashi R, Herremans K, Masson P (eds), Colloque Inserm\John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 123-7.
34. Masson P. Action de la pression hydrostatique sur les protéines : émergence de la biotechnologie des hautes pressions, applications pharmaceutiques et médicales potentielles. *Ann Pharm Fr* 1999; 57: 49-55.
35. Jonas J, Ballard L, Bondos S and Thirumoorthy K. Detection of folding intermediates by high pressure NMR techniques, Proceedings of AIRAPT-17, Manghnani MH, Nellis WJ and Nicol MF (eds), 271-274, Universities Press, Hyderabad, India, 2000.
36. Heremans K, Meersman F, Rubens P and Smeller L. High pressure protein unfolding and aggregation, Proceedings of AIRAPT-17, Manghnani MH, Nellis WJ and Nicol MF (eds), 280-283, Universities Press, Hyderabad, India, 2000.
37. Masson P. Pressure denaturation of proteins, High Pressure and Biotechnology. Balny C, Hayashi R, Herremans K, Masson P (eds), Colloque Inserm\John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 89-99.
38. Balny C, Masson P and Heremans K. High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochimica et Biophysica Acta — Protein structure and molecular enzymology* 2002; 1595 (1-2): 3-10.
39. Slifko TR, Raghubeer E and Rose J-B. Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. *J Food Protection* 2000; 63 (9): 1262-7.
40. Ohnishi. Pressurization of *Trichinella spiralis*. Japanese-only book of Japanese pressure consortium, proceedings, 1993, chapter 17.
41. Hawley SA. Reversible pressure-temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry* 1971; 10: 2436-42.
42. Smeller L. Temperature-pressure phase diagram of proteins, Internet Journal of the high Pressure School, Proceedings of IHPS3, Warsaw, 1999.
43. Macdonald AG. The role of membrane fluidity in complex processes under high pressure, Current perspectives in high pressure biology, Jannasch HW, Marquis RE and Zimmerman AM. 1987, 207-223. London, Academic Press.
44. Macdonald AG. Effects of high hydrostatic pressure on natural and artificial membranes, High pressure and biotechnology. Balny C, Hayashi R, Heremans K and Masson P (eds) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext LTD, 1992, 67-75.
45. Larson WP, Hartzell TB and Diehl HS. The effects of high pressure on bacteria. *J Inf Diseases* 1918; 22: 271-9.
46. Clouston JG and Wills PA. Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure. *J Bacteriol* 1969; 97: 684-90.
47. Delacour H, Cléry C, Masson P and Vidal DR. Inactivation des spores bactériennes par les hautes pressions hydrostatiques. *Ann Pharm Fr* 2002; 60: 38-43.
48. Rigaldie Y. Sur l'impact des traitements sous hautes pressions dans la décontamination et la stérilisation de formes pharmaceutiques renfermant des molécules thérapeutiques sensibles aux procédés énergétiques. Thèse : Physico-chimie de la matière condensée : Bordeaux 1 : 2002, N° d'ordre : 2526.
49. Brigger I, Armand-Lefevre L, Chaminade P, Besnard M, Rigaldie Y, Largeteau A, Andreumont A, Gislain L, Demazeau G and Couvreur P. High Hydrostatic pressure treatment as a new sterilization process for thermally and hydrolytically labile drug carriers. *J Pharm Sc*, 2003 (in Press).
50. Beney L, Perrier-Cornet J-M, Hayert M and Gervais P. Influence of bilayer compressibility on the morphological behaviour of liposomes during a high pressure treatment, High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology. K Heremans (ed), Leuven University Press, Leuven, 1997, 175-8.
51. Hayert M, Perrier-Cornet J-M and Gervais P. Why do yeasts die under pressure?, High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, Heremans K (ed), Leuven University Press, Leuven, 1997, 205-8.
52. Delacour H. Intérêts des hautes pressions hydrostatiques dans l'inactivation des spores bactériennes, Thèse d'exer-

-
- cice de Pharmacie : Lyon : 2000, N° d'identification : 2000LYOP086.
53. Pontes L, Fornells LA, Giogo V, Araujo JRV, Sepulveda A, Villas-Boas M, Bonafe CFS and Silva J-L. Pressure inactivation of animal viruses: potential biotechnological applications, High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology, Heremans K (ed), Leuven: Leuven University Press, 1997, 91-4.
54. Otake T, Mori H, Kawahata T, Izumoto Y, Nishimura H, Oishi I, Shigehisa T and Ohno H. Effects of high hydrostatic pressure treatment on HIV infectivity, High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology. Heremans K (ed), Leuven University Press, Leuven, 1997, 233-6.
55. Heden CG. Effects of hydrostatic pressure on microbial system. *Bacteriological Review*, 1964; 28 (1): 14-29.
56. Marquis RE and Matsumura P. Microbial life under pressure. Microbial life in extreme environments, Academic Press, New York, 1978, 105-8.
57. Gro M and Ludwig H. Pressure-temperature-phase diagram for the stability of bacteriophage T4, High Pressure and Biotechnology. Balny C, Hayashi R, Herremans K, Masson P (eds), Colloque Inserm, Ed. John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 57-9.
58. Butz P, Habison B and Ludwig H. Influence of high pressure on a lipid coated virus, High pressure and biotechnology. Balny C, Hayashi R, Heremans K, Masson. P (eds), Colloque INSERM/John Libbey Eurotext, Londres, 1992, 61-4.
59. Silva J-L, Luan P, Glaser M, Voss EW and Weber G. Effect of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J Virol* 1992; 66: 2111-7.
60. Overman J-R and Lewis AM. *Jr Biol Med* 1959; 102: 329-33.
61. Nakagami T, Shigehisa T, Ohmori T, Tajiri S, Hase A, Kimura T and Yamanishi K. Inactivation of herpes viruses by high hydrostatic pressure. *J Virol Met* 1992; 38: 255-61.
62. Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E and Richards GP. Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J Food Prot* 2002; 65 (10): 1605-9.
63. Wilkinson N, Kurdziel AS, Langton S, Needs E and Cook N. Resistance of polio virus to inactivation by high hydrostatic pressures. *Innovative food science & emerging technologies* 2001; 2: 95-8.
64. Shigehisa T, Nakagami T, Ohno H, Otake T, Mori H, Kawahata T, Morimoto M and Ueba N. Inactivation of HIV in blood plasma by high hydrostatic pressure, High Pressure Bioscience and Biotechnology, Elsevier Applied Science, Amsterdam, 1996, 273-8.
65. Jurkiewicz E, Villas-Boas M, Silva M, Weber G, Hunsmann G and Clegg RM. Inactivation of simian immunodeficiency virus by hydrostatic pressure. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 6935-7.
66. Bradley DW, Hess RA, Tao F, Sciaba-Lentz L, Remaley AT, Laugharn J-J and Manak M. Pressure cycling technology: a novel approach to virus inactivation in plasma. *Transfusion*, 2000; 40: 193-200.
67. Laugharn J-R, James A, Bradley, David W, Hess and Robert A. Rapid cryobaric sterilization and vaccine preparation. U.S. Patent 6,270,723. August 7, 2001.
68. Manak M. Inactivation of plasma pathogens by pressure cycling technology. Blood product safety & transmissible spongiform encephalopathies, Cambridge healthtech institute's eight annual, Washington DC, February 4-7 2002.
69. Basset J, Lepine P et Chaumont L. Effet des hautes pressions sur le virus de la poliomyélite, *Ann Inst Pasteur* 1956; 90: 575-96.
70. Perche PY, Clery C, Bouloy M, Burkhart MF, Masson P and Michel P. *Am J Trop Med Hyg* 1997, 57 (3S): 256-7.
71. Pontes L, Cordeiro Y, Giogo V, Villas-Boas M, Barreto A Araujo JR and Silva JL, Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rota virus particles is associated with changes in the spike protein Vp4. *Trends Biochem Sci* 2001; 26 (10): 612-8.
72. Silva JL, Oliveira AC, Gomes AMO, Lima LMTR, Mohana-Borges R, Pacheco ABF and Foguel D. Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1595: 250-6.
73. Silva JL, Foguel D, Royer CA, Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. *Trends Biochem Sci* 2001; 26 (10): 612-8.
74. Gaspar LP, Terezan AF, Pinheiro AS, Foguel D, Rebello MA and Silva JL, The metastable state of nucleocapsids of enveloped viruses as probed by high hydrostatic pressure. *J Biol Chem* 2001; 276 (10): 7415-21.
75. Gaspar LP, Silva ACB, Gomes AMO, Freistas MS, Ano Bom APD, Schwarcz WD, Mestecky J, Novak MJ, Foguel D and Silva JL, Hydrostatic pressure induces the fusion-active state of enveloped viruses. *J Biol Chem* 2002; 277 (10): 8433-9.
76. Masson P and Tonello C. Potential applications of high pressures in pharmaceutical science and medicine. *High Pressure Research* 2000; 19: 223-31.
77. Torrent J, Alvarez-Martinez MT, Heitz F, Liautard JP, Balny C and Lange R. Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry* 2003; 42 (5): 1318-25.
-

78. Lullien-Pellerin V, Balny C. High-pressure as a tool to study some protein's properties: conformational modification, activity, oligomeric dissociation. *Innovative food science and emerging technologies* 2002; 3: 209-21.
79. Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB and Cohen FE. Pathway complexity of prion protein assemble into amyloid, *J Biol Chem* 2002; 277 (24): 21140-8.
80. Ferreira ST and De Felice FG. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS letters* 2001; 498 (2-3): 129-34.
81. Nelles LP. Enzymatic production of hydrogen peroxide and acetaldehyde in a pressure reactor. *Biotechnol Bioeng* 1990; 36: 834-8.
82. Matsunaga T. N- (benzyloxycarbonyl)-L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester production by immobilized *Nocardia opaca*: thermolysis under hydrogen high pressure in water organic solvent system. *J Ferment Bioeng* 1989; 67: 399-403.
83. Kunugi S, Kitayaki M, Yanagi Y, Tanaka N, Lange R and Balny C. The effect of high pressure on thermolysin. *Eur J Biochem* 1997; 248: 567-74.
84. Lemay P, Estevez-Burugorri L, Largeteau A, Demazeau G. Effets des pressions hydrostatiques sur des couples antigène-anticorps : application à un procédé de bioséparation, Actes du colloques « La pression pourquoi ? Ses effets sur la matière, des atomes aux systèmes complexes », Banyuls-sur-mer, 6-10 novembre 2000.
85. Lemay P. The use of high pressure for separation and production of bioactive molecules. *Biochimica et Biophysica Acta — protein structure and molecular enzymology* 2002; 1595 (1-2): 357-66.
86. Matsumoto K and Acheson RM, Organic synthesis at high pressures, 1991, J Wiley (Ed), NewYork
87. Isaacs NS, The role of high pressure methods in organic chemistry. *Tetrahedron* 1991; 47: 8463-97.
88. Camara C, d'Angelo et Dumas F. Synthèse de sesuiterpènes à activité antitumorale par reaction de Michael asymétrique sous hautes pressions, Actes du colloques « La pression pourquoi ? Ses effets sur la matière, des atomes aux systèmes complexes », Banyuls-sur-mer, 6-10 novembre 2000.
89. Katagiri N, Ito Y, Shiraishi T, Maruyama T, Sato Y and Kaneko C. *Nucléosides et Nucléotides* 1996 ; 15 : 631-47.
90. Schwertfeger M. Alterations of calcium alginate gel dispersion by high pressure treatment, Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Ludwig (Ed), Proceedings of the International Conference oh High Pressure Bioscience and Biotechnology, Heidelberg, August 30-September 3, 1998, 337-40.
91. Steyer B, Bera F, Massaux C, Sindic M, Blecker Ch and Deroanne C. Carrageenan gelification under high hydrostatic pressure: preparation and processing of solutions and analysis of gels obtained, Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology, Ludwig (Ed.), Proceedings of the International Conference oh High Pressure Bioscience and Biotechnology, Heidelberg, August 30-September 3, 1998, 352-6.
92. Ludwig H. Cell Biology and high pressure: applications and risks. *Biochimica et Biophysica Acta- Protein Structure and Molecular Enzymolgy* 2002; 1595 (1-2): 390-1.