

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

9/93

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Departement : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

الدرسة الوطنية المتعددة التخصصات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

SEPARATION DES PROTEINES SERIQUES
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Propose par :

Mr N. MAMERI

Etudie par :

Mlle A. BENKARA MOSTEFA

Dirige par :

Mme NMAMERI
Mr NMAMERI

PROMOTION 93

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
Departement : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة — BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

PROJET DE FIN D'ETUDES

SUJET

SEPARATION DES PROTEINES SERIQUES
PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Propose par :

Mr N. MAMERI

Etudie par :

Mlle A. BENKARA MOSTEFA

Dirige par :

Mme N.MAMERI
Mr N.MAMERI

PROMOTION 83

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

A U X

M I E N S

REMERCIEMENTS

Au terme de cette étude, je voudrais adresser mes remerciements à Mme N.MAMERI et M. N.MAMERI pour les orientations qu'il m'ont données, pour les suggestions et conseils qu'ils n'ont cessé de prodiguer tout au long de son élaboration. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier messieurs et madame les membres du jury qui ont bien voulu prendre sur leur temps pour évaluer et apprécier ce travail.

S O M M A I R E

	Page
INTRODUCTION	1
PARTIE I : Etude theorique	
CHAPITRE 1 / LE SANG	3
1.1 Composition du sang	3
1.1.1 Les propriétés fonctionnelles des protéines plasmatiques	6
1.1.1.1 Comportement à froid	6
1.1.1.2 Comportement à la chaleur	6
1.1.1.3 Capacité émulsifiante	6
1.1.2 Les propriétés nutritionnelles des protéines ...	6
1.2 Valorisation du sang	7
1.2.1 Les anticoagulants	7
1.2.2 Les conservateurs	8
1.3 Techniques de valorisation	8
1.4 Domaines d'exploitations	11
1.4.1 Alimentation pour bétail	12
1.4.2 Alimentation des animaux de compagnie	12
1.4.3 Pharmacie	12
1.4.4 Engrais	12
1.4.5 Alimentation humaine	13
CHAPITRE 2 / LES PROTEINES	
2.1 Définition	14
2.2 Classification	15
2.2.1 Classification suivant la forme globale	15
2.2.1.1 Protéines fibreuses	15
2.2.1.2 Protéines globulaires	15
2.2.2 Classification suivant la solubilité	15
2.2.2.1 Les albumines	16
2.2.2.2 Les globulines	16

2.2.2.3	Les protamines et les histones	16
2.2.3	Classification suivant la composition	16
2.2.3.1	Les haloprotéines	16
2.2.3.2	Les hétéroprotéines	16
2.3	Structure des protéines	17
2.3.1	Structure primaire	17
2.3.2	Structure secondaire	18
2.3.2.1	Etat hélicoïdal ou hélice α	18
2.3.2.2	Etat étiré ou structure en feuillets plissés	20
2.3.3	Structure tertiaire	21
2.3.4	Structure quaternaire	21
2.3.5	Liaisons intervenant dans la structure spatiale	22
2.3.5.1	Les liaisons disulfures	22
2.3.5.2	Les liaisons ioniques	22
2.3.5.3	Les liaisons hydrogènes	22
2.3.5.4	Les liaisons hydrophobes	23
2.3.6	Dénaturation des protéines	23
2.3.6.1	Agents dénaturants	23
a/	La température	23
b/	PH extrêmes	24
c/	Solvants organiques et détergents	24
d/	L'urée et le chlorure de guanadine	24
2.3.6.2	Effet de la dénaturation	24
2.4	Principales propriétés des protéines	25
2.4.1	Solubilité	25
2.4.1.1	Les électrolytes	25
2.4.1.2	Le PH	25
2.4.1.3	Solvants organiques	26
2.4.2	Masse moléculaire	26
2.4.2.1	Filtration sur gel de dextrane	26
2.4.2.2	Ultracentrifugation	26
2.4.3	Caractère amphotère	26

2.5 Purification des protéines	27
2.5.1 Principes de purification	27
2.5.1.1 Fractionnement par force ionique croissante	27
2.5.1.2 Fractionnement par point isoélectrique	27
2.5.1.3 Filtration sur tamis moléculaire	27
2.5.1.4 Chromatographie sur échangeurs d'ions	28
2.5.1.5 Chromatographie d'affinité	28
2.5.1.6 Immuno-adsorption	29
2.5.1.7 Cristallisation.....	29
2.5.2 Détermination quantitative des protéines	29
2.5.2.1 Turbidimétrie	29
2.5.2.2 Calorimétrie	29
2.5.2.3 Spectrophométrie	29
2.5.2.4 Activité biologique	29
2.5.3 Critère de pureté	30
2.5.3.1 Critère d'ultracentrifugation	30
2.5.3.2 Critère chromatographique	31
2.5.3.3 Critère électrophorétique	31
2.5.3.4 Critère immunologique	32
2.6 Les protéines sériques	32
2.6.1 La sérum albumine	33
2.6.2 Les globulines	33
2.6.2.1 Les α . globulines	33
2.6.2.2 Les α . globulines	33
2.6.2.3 Les β . globulines	33
2.6.2.4 Les γ . globulines	33
CHAPITRE 3 / LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE	34
3.1 Historique	35
3.2 Principes fondamentaux	36
3.2.1 Données théoriques	36
3.2.1.1 Le facteur de capacité	36
3.2.1.2 Le facteur de sélectivité	37
3.2.1.3 Le nombre de plateaux	38
3.2.1.4 Résolution des pics	39
3.2.1.5 Facteurs d'asymétrie	39

3.2.2	Systeme chromatographique	39
3.2.2.1	Une phase mobile	39
3.2.2.2	Une phase stationnaire	39
3.2.2.3	Une pompe	40
3.2.2.4	Une colonne	40
3.2.2.5	Un detecteur	40
3.2.3	Analyse chromatographique	41
3.2.3.1	Analyse qualitative	42
3.2.3.2	Analyse quantitative	42
3.2.4	Facteurs dont depend la separation	42
3.2.4.1	La temperature	42
3.2.4.2	La granulometrie	42
3.2.4.3	Dimension de la colonne	43
3.2.4.4	Le debit	43
3.3	Les differentes techniques chromatographiques	43
3.3.1	Chromatographie d'exclusion sterique	43
3.3.1.1	Phase stationnaire	44
3.3.1.2	Phase mobile	44
3.3.2	Chromatographie par echange d'ions	44
3.3.2.1	Phase stationnaire	45
1°/	Capacite	45
2°/	Polarite	45
3°/	Granulometrie	45
4°/	Sellectivite	45
3.3.2.2	Phase mobile	46
1°/	La force ionique	46
2°/	Le PH	46
3.3.3	Chromatographie en phase inversee	46
3.3.3.1	Phase stationnaire	46
3.3.3.2	Phase mobile	47
3.3.4	Chromatographie d'affinite	47
3.3.4.1	Phase stationnaire	47
1°/	Support	48
2°/	Effecteurs	48
3.3.4.2	Phase mobile	48

PARTIE II : Etude expérimentale

1- Etude des rejets	49
* Recueil de l'effluent	49
* Préparation du sérum	49
1.1 Analyse quantitative	50
* Mode opératoire	
a- Préparation de la gamme	50
b- Mesure photométrique	50
c- Courbe d'étalonnage	50
d- Dosage	51
Réactif cuprotartrique de GORNALL	52
1.2 Analyse qualitative	52
1.3 Résultats	
1.3.1 Analyse quantitative	52
1.3.2 Analyse qualitative	52
1.4 Conclusion	53
2- Etude chromatographique	53
2.1 La filtration sur gel	55
* Mode opératoire	
a- Préparation du gel	55
b- Préparation du solvant	56
c- Le débit	56
d- Dépôt de l'échantillon	56
e- Recueil et lecture des fractions	56
2.2 La chromatographie d'échange d'ions	56
* Mode opératoire	
Première séparation	
a- Préparation du gel	56
b- Préparation de la phase éluante	57
c- Débit d'étalonnage	57
d- Préparation de l'échantillon	57
e- Recueil et lecture des fractions	57

Deuxième séparation

a- Phase mobile	57
b- Dépôt	58
2.3 Résultats et interprétations	58
2.3.1 La filtration sur gel	62
2.3.2 La chromatographie d'échange d'ions	62
Première séparation	62
Seconde séparation	63
3- Conclusion	63
CONCLUSION (Finale)	65
ANNEXE	66
BIBLIOGRAPHIE	68

PARTIE I :
ETUDE THEORIQUE

INTRODUCTION

" Supprimez les laboratoires; les sciences physiques deviendront l'image de la stérilité et de la mort. Elles ne seront plus que des sciences d'enseignement limitées et impuissantes et non des sciences de progrès et d'avenir.

Rendez leur les laboratoires et avec eux réapparaîtra la vie, sa fécondité et sa puissance " .

Louis Pasteur

C'est dans ce genre de laboratoire qu'est née la biotechnologie, carrefour des fonctions biologiques et de la technologie moderne, utilisée, de nos jours dans un contexte artisanal, agricole ou industriel.

L'importance de son développement qui s'est accru durant la dernière décade et ne cesse de prendre de l'ampleur, est sans doute liée à la rencontre entre les besoins sociaux et économiques.

Ainsi, la nécessité de trouver des procédés nouveaux, peu consommateurs d'énergie, utilisant des matières premières polluant peu l'environnement s'affirme de plus en plus, au fur et à mesure que ces besoins deviennent insatisfaits, conséquence inévitable de la récession économique mondiale.

Aujourd'hui, la biotechnologie trouve ses applications dans des domaines aussi larges que le sont les domaines de la santé, de l'agriculture et enfin, de l'environnement.

Ce sont surtout des pays comme les U.S.A, les pays Européens et particulièrement le Japon, qui sont les précurseurs des programmes biotechnologiques alors que l'on vient à peine, dans les pays sous développés de prendre conscience que la biotechnologie prend une place prépondérante dans le domaine des sciences de l'avenir.

Un paradoxal système, régissant ces pays, fait que l'on importe du matériel biologique, utilisé à diverses fins, alors qu'il n'est qu'une nouvelle forme acquise, grâce à la biotechnologie, de produits gaspillés dans l'indifférence la plus totale.

A ce propos, une réalité importante, qui reste jusqu'à présent négligée, voir même inaperçue en Algérie, est le fait que nos industries de viande, que représentent essentiellement les abattoirs, constituent de véritables filons, dans le sens où des quantités inimaginables de matières nutritives sont contenues dans les effluents d'abattage et sont donc rejetées en même temps que ces derniers.

Il est vrai que des techniques de pointe, visant à valoriser ce que l'on appelle à tort " les sous-produits d'abattage " ont été élaborées, mais aucune d'elles n'a été véritablement exploitée à échelle industrielle car les installations coûteuses requièrent des investissements importants, tant pour l'acquisition de l'équipement technologique nécessaire que pour la formation de la main d'oeuvre qualifiée, investissements dont les charges ne pourraient être recouvertes sans une étude économique sérieuse et approfondie.

Dans l'étude qui a fait l'objet de ce travail, nous nous proposons de mettre au point une méthode de séparation des protéines contenues dans les effluents sanguins des abattoirs.

Le choix de la chromatographie liquide comme procédé, nous a été suggéré par l'avantage qu'il présente, à savoir la conservation des propriétés biologiques des produits à séparer et par conséquent, leur qualités nutritives.

Nous nous sommes intéressés à la question de voir, dans quelle mesure la chromatographie pouvait contribuer, d'une part, à la récupération des biomolécules que sont les protéines et d'autre part, à la dépollution de l'environnement de ces effluents biologiques.

CHAPITRE 1 / LE SANG

Selon les différentes civilisations que connut le monde depuis sa création, le sang était vénéré car représentait la source même de la vie ou alors frappé d'interdit car considéré impur.

Nous sommes loin aujourd'hui de ces temps obscurs; les sciences ont balayé ces croyances pour laisser place aux véritables connaissances qui reconnurent au sang ses vertus biologiques.

Le sang des abattoirs surtout, constitue un pôle d'intérêt pour les études effectuées sur la valorisation des effluents biologiques, laquelle est devenue une nécessité tant sur le plan de l'économie que sur le plan de l'environnement.

1.1 Composition du sang :

Le sang se compose d'un liquide, le plasma, dans lequel baignent des éléments, qui sont essentiellement les globules rouges ou hématies, les globules blancs ou leucocytes et les plaquettes sanguines. [1]

Une centrifugation, fondée sur la différence de densité existant entre le plasma ($d=1.03$) et les éléments figurés qui s'y trouvent en suspension ($d=1.09$) permet une bonne séparation de ces deux composants du sang, après action préalable d'un anticoagulant. [2]

On recueillera le cruor, formé par les leucocytes et les hématies d'une part, le plasma d'autre part dans la proportion 1/3, 2/3. Notons que le cruor est une phase consistante. [1]

Si on laisse coaguler puis sédimenter le sang, on obtient un exsudat, le serum, qui a la même composition que le plasma, sauf qu'il ne contient pas de fibrinogène. [1]

La comparaison de la composition de ce serum à celle du lait fait ressortir la plus grande richesse en protéines du premier (Tab1.1). [1]

Par litre	Sérum sanguin	Lait
Protides	70 à 80 grammes	34 grammes
Lipides	5 à 6 grammes	35 grammes
Glucides	1 gramme	49 grammes
Sels minéraux	8 à 9 grammes	9 grammes
Autres substances	2 à 3 grammes	traces
Matière sèche totale	86 à 99 grammes	127 grammes

Tableau 1-1 : compositions comparées du sérum et
du lait

Globalement, la composition en acides aminés des protéines du sang entier fait ressortir leur richesse en lysine et tryptophane, ce qui en fait un complément intéressant des céréales mais aussi leur pauvreté en isoleucine et en acides aminés soufrés tels la méthionine et la cystine.
(tableau 1-2) [1]

Indice chimique *							
Acides Aminés	Farine de sang	Plasma bovin séché	Farine de viande de boeuf	Caséine bovine	Oeufs	Protéine de lactosérum	Farine de poisson
Thr	106	180	114	120	140	168	143
	75	128	82	86		120	102
Val	102	146	102	123	133	114	120
	151	109	76	92		86	90
Met	23	29	66	80		51	82
Met+Cys	67		107	123	238	125	146
	28		45	52		52	
Ile	33	69	107	121	124	133	114
	27	56	86	98		107	92
Leu	53	144	118	125	121	124	114
	44	119	97	102		107	93
Phe	130	107	94	88		64	68
Tyr	76		93	124		63	76
Phe+Tyr	136		98	134	128	82	92
	106		77	104		64	71
Lys	181	180	166	157	121	159	155
	149	148	137	129		131	127
Trp	36	173	132	127	145	127	109
	25	119	90	87		87	75
His		206	211	159	150	100	170
		135	138	104		65	111

* Indice chimique ("Chemical score") : % de la teneur de chaque acide aminé du produit par rapport à celle de chaque acide aminé d'un produit de référence.

Produit de référence : mélange FAO (d'après la recommandation de "Food and Nutritional Board of the National Academy of Sciences", 1974). Les valeurs en italique indiquent des indices calculés avec les protéines de l'oeuf comme référence.

Tableau 1-2 Composition en acides aminés de différents composés d'origine animale

1.1.1 Les propriétés fonctionnelles des protéines plasmatiques :

La principale propriété des protéines du plasma est leur propriété liante, c'est à dire leur capacité d'améliorer la cohésion et la stabilité des mélanges. [1]

1.1.1.1 Comportement à froid : Le comportement à froid des protéines est une donnée intéressante car elles conservent une bonne solubilité dans ses conditions, ainsi que leur faible pouvoir gonflant, ce qui entraîne leur simple utilisation en tant qu'apport protéique. [1]

1.1.1.2 Comportement à la chaleur : Sous l'action de la chaleur, un gel se forme par coagulation des protéines. Ces dernières commencent à coaguler vers une température de 60°C; un gel commence à se former à 65°C. La force du gel augmente jusqu'à 75°C puis n'évolue plus.

Si la température passe de 77°C à 92°C, il apparait une rupture partielle de ce gel perceptible en microscope électronique à balayage. [1]

Des études effectuées sur la formation et les caractéristiques des gels de plasma montrent que le degré d'élasticité et de liaison avec l'eau, augmente lorsque la concentration en protéines et en sels croît et lorsque le PH décroît de 9 à 6°. [1]

Ces phénomènes d'interaction entre protéines de plasma, protéines d'oeuf, soja et stabilisateurs sont actuellement mal connus mais recèlent sans doute d'intéressantes possibilités.[2]

1.1.1.3 Capacité émulsifiante : Le plasma de boeuf présente de très bonnes propriétés émulsifiantes même à de faibles concentrations. Une solution de 1% de concentration peut émulsifier 115 fois son volume d'huile.

1.1.2 Les propriétés nutritionnelles des protéines :

De nombreuses études ont montré que la valeur nutritive des protéines dépendait de façon primordiale de leur composition en acides aminés. [3]

En ce qui concerne l'alimentation du bétail, des vingt acides aminés composant une protéine, seuls huit à douze sont estimés importants ou essentiels et dont la nature est en relation étroite avec l'espèce et l'état physiologique dans lequel se trouve l'animal. En effet, n'étant pas synthétisés par son organisme en quantité notable, ils doivent être inclus dans son alimentation. [3]

A propos de la valeur nutritionnelle des protéines de sang, on peut dire que leur composition moyenne en acides aminés est voisine de celle des protéines du lait et celles de l'oeuf; en particulier, les acides aminés essentiels y sont présents en quantité convenable. [3]

1.2 Valorisation du sang :

La progression des techniques de valorisation de l'industrie de l'abattage des animaux de boucherie est accélérée par l'importance des charges engendrées par la pollution due au rejet dans le milieu naturel de sang. [1;2]

La solution la plus souvent adoptée vise simplement à s'en débarrasser. La plus grande partie du sang est ainsi séchée en vue de son incorporation dans les aliments du bétail ou comme engrais. [1]

De toutes les parties constituant le sang, le plasma est sans nul doute la partie la mieux valorisée, bien qu'il ne représente qu'une faible partie du potentiel protéique du sang qui, dès la saignée, constitue un terrain favorable à la prolifération des micro organismes. Son altération, par conséquent est rapide. Ainsi, sa conservation à l'état liquide et sa préservation de toute altération s'imposent d'elles mêmes et ce, par action d'anticoagulants d'une part, et par action d'anti microbien d'autre part. [1]

1.2.1 Les anticoagulants :

Ces substances chimiques doivent être employées en association avec le NaCl afin que le milieu dans lequel baignent les globules rouges soit nettement hypertonique. On évitera ainsi l'hémolyse. [2]

On utilise à présent les sels d'acide éthylène diamine tetracétique (E.D.T.A) qui apportent certains avantages de conservation malgré leur coût supérieur à celui des anticoagulants classiques. Ils agissent par blocage de l'ion calcium, prévenant ainsi la formation de fibrine. Il est efficace à raison de 1g par litre de sang traité additionné de 1,5 g de NaCl. [2]

1.2.2 Les conservateurs :

Outre l'addition de produits anticoagulants, il n'est pas exclu que, pour garantir une meilleure conservation du sang (ou de ses produits dérivés liquides), on puisse faire usage de conservateurs, sous la réserve bien évidente qu'ils soient réglementairement autorisés à l'utilisation. [2]

En Allemagne, on utilise comme conservateur l'ammoniac qui a la propriété d'élever le PH sans altération notable des protéines du point de vue alimentaire. [2]

L'ammoniac est efficace en adjonction au sang à partir de 0,1% et on peut l'utiliser jusqu'à 0,5%. A la dose de 0,2%, il assurerait une bonne conservation du sang destiné à la cuisson ou au séchage pour l'alimentation animale.

On utilise également l'azide de sodium (NaN_3) à raison de 0,2 g par litre de sang traité. [1]

Différentes technologies peuvent être mises en oeuvre pour limiter ou stopper les altérations du sang. Elles font appel surtout à l'action du froid (réfrigération, coagulation), complétées parfois par l'action du vide. [2]

1.3 Techniques de valorisation :

On retiendra deux modes de traitement du plasma post centrifugation. Ce sont des techniques que l'on appelle modes de préconcentration sur membrane, destinées à l'extraction et à la préparation des fractions protéiques. [1]

Ces deux procédés de préconcentration sont essentiellement l'osmose inverse (O.I) et l'ultrafiltration (U.F) pouvant être définies comme techniques de séparation sur membrane en phase liquide qui utilisent comme force motrice, un gradient de pression. [4]

La membrane qui permet cette séparation est une membrane semi perméable ou permsélective et constitue une barrière qui favorise certains transferts par rapport à d'autres , entre les deux milieux liquides qu'elle sépare, permettant ainsi de concentrer les macromolécules dissoutes dans l'un des milieux. [5]

Les membranes d'osmose inverse et d'ultrafiltration ont la propriété d'effectuer une séparation en fonction des dimensions des molécules ou de leurs poids moléculaires; tout constituant dont le poids est égal ou supérieur à un seuil caractéristique de leur membrane appelé seuil de coupure (cut-off en anglo saxon) sera retenu par cette membrane, alors que tout constituant de poids inférieur passera; si le seuil de coupure se situe dans le bas de l'échelle des poids moléculaires, on parlera de membranes d'osmose inverse; s'il se situe dans le haut de l'échelle on parlera de membrane d'ultrafiltration. fig 1-1 [5]

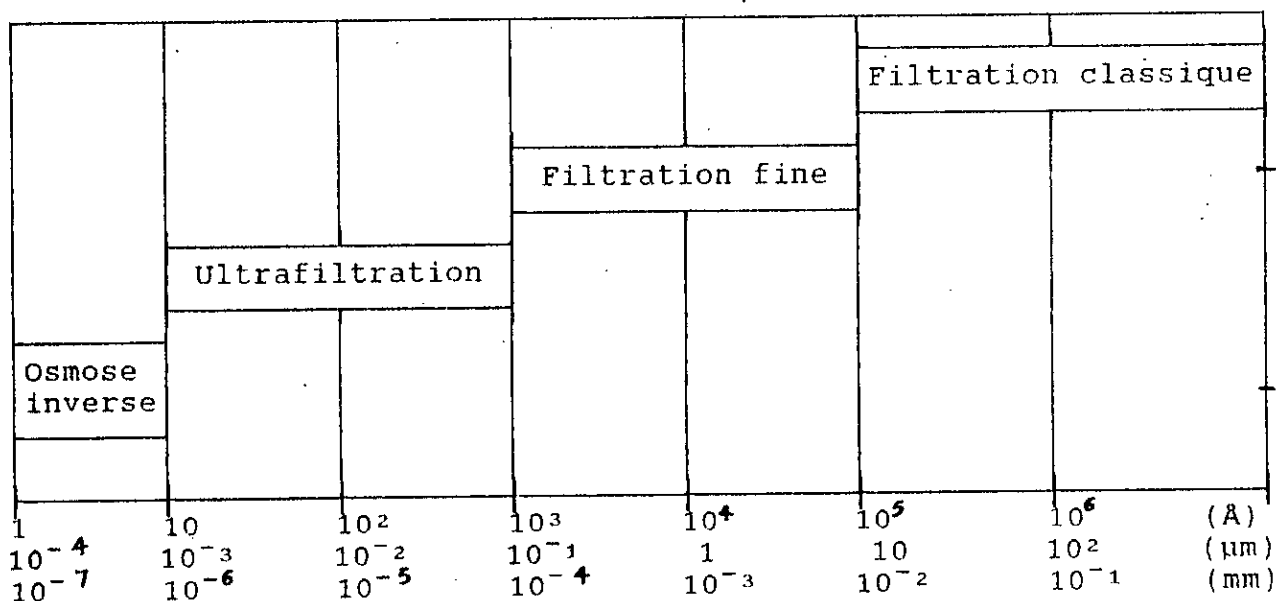


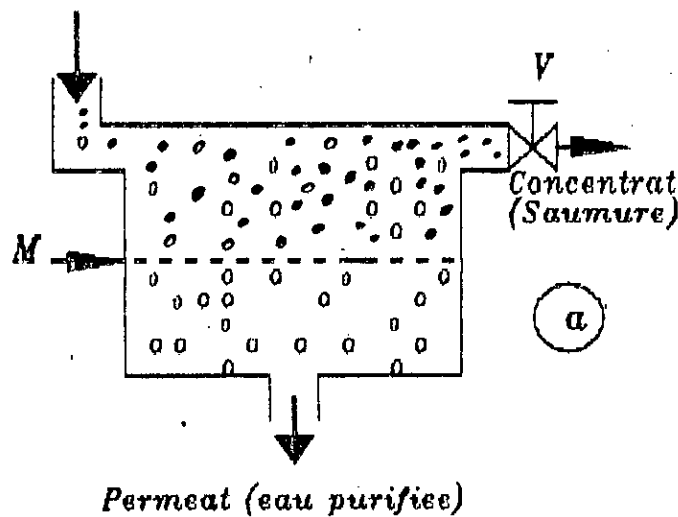
fig 1.1 : Situation de l'osmose inverse et de l'ultrafiltration dans l'ensemble des procédés de séparation en fonction de la taille des particules.

La frontière entre les deux techniques n'est pas très nette. La plupart des scientifiques sont toutefois d'accord pour que l'on parle:

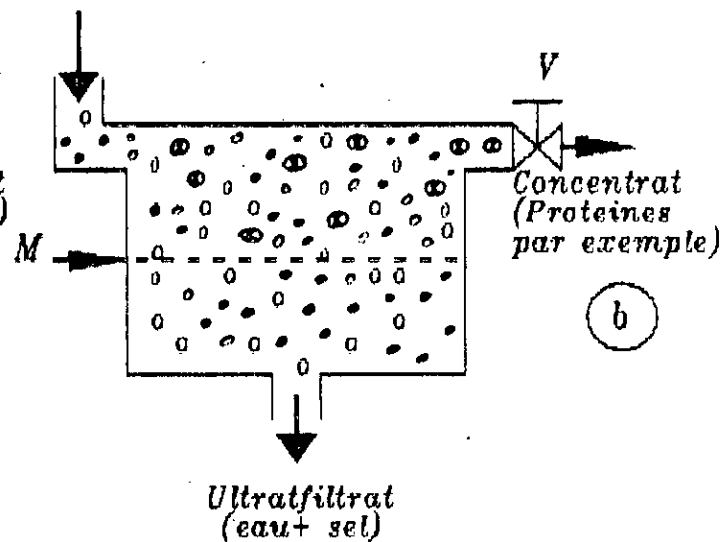
-D'osmose inverse, dès que la taille des molécules à séparer est du même ordre de grandeur que celle du solvant; par exemple : Sels, sucres, acides aminés, ..., en solutions aqueuse (fig1.2.a),

-D'ultrafiltration, lorsque la taille des molécules à séparer est dix (10) à cent (100) fois supérieur à celle du solvant; par exemple : protéines, polymères divers. (fig1.2.b) [5]

*Alimentation sous pression
(solution saline)*



*Alimentation sous pression
(eau+sels+protéines par exemple)*



M Membrane
V Vanne de réglage
⊙ Osmose inverse

○ Eau
● Sel
⊙ Macromolécule
⊙ Ultrafiltration

fig1.2 : Comparaison de l'osmose inverse et l'ultrafiltration

Ce sont des études effectuées sur les membranes d'osmose inverse, sous l'impulsion de l'office of Saline Water aux Etats-unis, qui ont servi de tremplin à l'essor de l'ultrafiltration dans le domaine industriel, qui date de 1968, bien que ce soit un procédé de séparation assez ancien. Il est en effet utilisé dans les laboratoires de biologie, pour des concentration ou des purifications de protéines depuis le début du siècle. [5]

Une nouvelle variable de commande du procédé de séparation a été introduite, permettant une ouverture sur des investigations pouvant aboutir à l'amélioration du procédé du point de vue sélectif. [4]

Il s'agit du couplage d'un champ électrique à un procédé d'ultrafiltration; Il est apparu, aux essais de cette technique que, bien que de bonnes conditions de séparation peuvent être obtenues durant la phase de mise en régime de la membrane, l'inconvénient réside dans le fait qu'une fois le conditionnement achevé, la qualité du fractionnement diminue notablement.

Néanmoins, l'électro-ultrafiltration reste une technique pleine de promesses pour le cas où les molécules à retenir présentent une charge globale non nulle, telles les protéines. [4]

La composition moyenne de plasma concentré sur membrane indique une richesse en protéines supérieur à 88% de la matière sèche, ce qui peut justifier un emploi éventuel comme additif alimentaire. En ce qui concerne les propriétés fonctionnelles, les protéines concentrées sur membrane ne sont pas notablement dégradées, conservant ainsi certaines de leurs propriétés. [1]

Il apparait ainsi que l'application des procédés à membranes à la préconcentration du plasma permet de commercialiser un produit nouveau concentré bien adapté à la préparation de certaines spécialités alimentaires.

1.4 Domaines d'exploitations :

En France, les débouchés les plus importants des produits de la valorisation du sang sont les suivants :

1.4.1 Alimentation pour bétail :

Représente actuellement le domaine d'utilisation du sang et ses dérivés le plus important en volume, ce qui représente plus de 50% d'une masse de sang collecté de 38 000t; est utilisée essentiellement la farine de sang entier issue d'une cuisson. [1]

Généralement, le sang entier de qualité cuiseur est issu d'une collecte non alimentaire (sang dégouttage) mais il subit une stérilisation; les aliments obtenus sont moyennement digestes. [1]

1.4.2 Alimentation des animaux de compagnie :

Le sang, dans ce cas, transformé en poudre, est utilisé comme charge protéique; son effet colorant peut aussi être favorable à certaines doses.

Au delà d'un certain seuil, il donne une couleur grise ou noire aux produits finis et ceci limite son développement commercial. [1;2]

1.4.3 Pharmacie :

Une expansion de ce secteur semble possible grâce à l'utilisation du cruor en tant que colorant.

Les produits sont utilisés pour fabriquer des principes actifs, commercialisés ensuite auprès des laboratoires produisant les spécialités pharmaceutiques. [1]

Le sérum et le plasma sont utilisés pour la fabrication de vaccins. [1]

Les protéines extraites du cruor ou du sang peuvent subir des transformations ultérieures comme des séparations par membranes, ultracentrifugation ou électrophorèse. [2]

On procède souvent à la lyophilisation des produits pharmaceutiques extraits du sang pour obtenir des produits de bonne solubilité.

1.4.4 Engrais :

Le sang est l'une des sources organiques les plus riches en azote. Cependant, son utilisation à l'usage d'engrais tend à devenir de plus en plus négligeable. [2]

Le sang est utilisé sous la forme de farine de sang entier, d'une part, et du cruor, d'autre part. Leur usage est réservé aux cultures spécialisées et exigeantes telles que les cultures maraîchères et florales. [2]

1.4.5. Alimentation humaine :

C'est à cause de sa forte couleur que le sang entier n'a qu'une application limitée en alimentation humaine. Néanmoins, il est utilisé ; ainsi que ses dérivés, plus pour leurs qualités technologiques, à savoir le pouvoir liant et émulsifiant du plasma, le pouvoir colorant du cruor, que pour leurs qualités nutritionnelles. Ainsi, il est mêlé étroitement aux viandes et son action est irréversible même aux températures de cuisson. [1;2]

2.2 Classification :

Des problèmes relatifs à la structure des protéines rendaient toute tentative de classification de ces dernières sujettes à des compromis fréquents, aussi bien qu'à des décisions arbitraires. [8]

Néanmoins, les progrès accomplis dans la détermination des conformations des protéines ont fait naître les modes de classification suivants:

2.2.1 Classification suivant la forme globale :

On peut distinguer deux grandes classes de protéines:

2.2.1.1 Protéines fibreuses : encore appelés scleroprotéines, elles sont constituées de fibres ou fibrilles et sont pratiquement insolubles. [6]

Elles sont formées par une longue chaîne peptidique ou de plusieurs groupes de chaînes. [8]

On range dans ce groupe les fibroïnes de la soie, les ticollagènes des tissus conjonctifs et enfin la mycine, principal constituant du muscle.

2.2.1.2 Protéines globulaires : On les appelle encore spheroprotéines en raison de leur forme sphérique ou ovoïde; elles sont en général plus facilement solubles. [10]

Elles se caractérisent par la présence de chaînes peptidiques, pliées ou enroulées sur elles mêmes de façon très compacte. [8]

Dans ce groupe, on range notamment les albumines et les globulines dont nous allons parler ci-après.

2.2.2 Classification suivant la solubilité :

On distingue en général :

2.2.2.1 Les albumines : ce sont des protéines solubles dans l'eau et qui précipitent par addition de sulfate d'ammonium. [10]

Dans ce groupe, on distingue la serum albumine, protéine plasmatique, l'ovalbumine, protéine présente dans le blanc d'oeuf et la lactalbumine, présente dans le lait. [10]

Leur point isoélectrique est en général nettement inférieur à 7, révélant ainsi un caractère acide. [11]

2.2.2.2 Les globulines : ce sont des protéines qui sont insolubles dans l'eau pure mais le sont dans les solutions salines diluées. Elles précipitent par addition de sulfate d'ammonium comme les précédentes.

Parmi ce type de protéines, on cite les glycoprotéines, résultant de l'association d'une protéine avec un groupement glucidique, et les lipoprotéines, associations des chaînes hydrophobes des lipides et celles des acides aminés constituant les protéines. [12]

2.2.2.3 Les protamines et les histones : ce sont des protéines solubles, caractérisées par un très net caractère basique dû à la présence de lysine et d'arginine en très forte proportion, leur conférant un point isoélectrique élevé. [10]

2.2.3 Classification suivant la composition :
On distingue deux grands groupes :

2.2.3.1 Les haloprotéines : constituées uniquement par l'enchaînement des acides aminés. [13]

2.2.3.2 Les hétéroprotéines : appelées également protéides, comportent, outre l'enchaînement des amino-acides, un groupement prosthétique lequel est non polypeptidique qui est lié de manière covalente. [12;14]

2.3.2 Structure secondaire :

Les bases d'approche du problème de la conformation des protéines ont été élaborées par Linus Pauling et ses collaborateurs à l'institut de technologie de Californie vers 1950. [11]

Ils définirent ainsi la structure secondaire d'une protéine, laquelle concerne l'organisation de la chaîne dans l'espace, sous l'effet de liaisons non covalentes, entre éléments constitutifs proches qui assurent la conformation native de la protéine. [6]

On distingue en général deux types principaux de structure secondaire :

2.3.2.1 Etat hélicoïdal ou hélice α : C'est la conformation la plus stable pour une chaîne polypeptidique car elle représente la structure énergétique la plus faible. [6;15]

Les plans peptidiques s'enroulent autour d'un axe et les résidus d'acides aminés se retrouvent régulièrement les uns au dessus des autres après un certain nombre de tours.

Angles et distances sont identiques plan après plan. [15]

Le pas de l'hélice est de 5.4 Å et l'élévation par résidu est de 1.5 Å.

L'angle formé par deux plans successifs est de 80° et l'hélice comprend 3.6 résidus par tour. (fig2.1). [6,11]

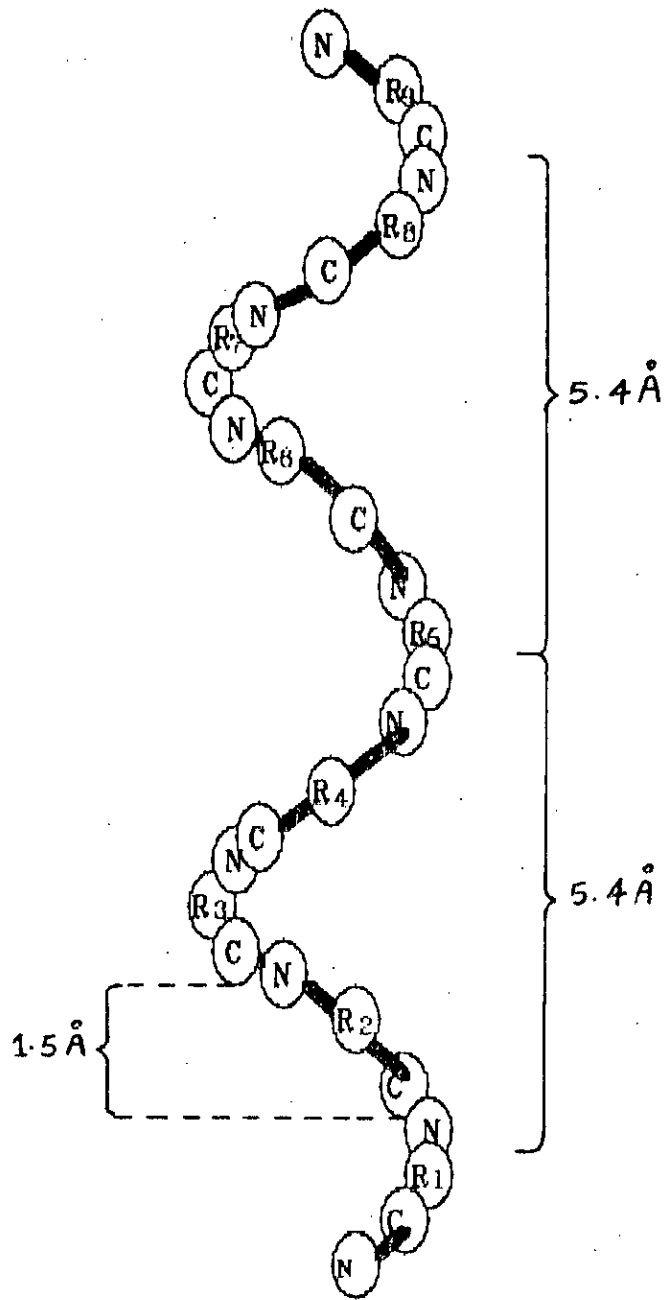
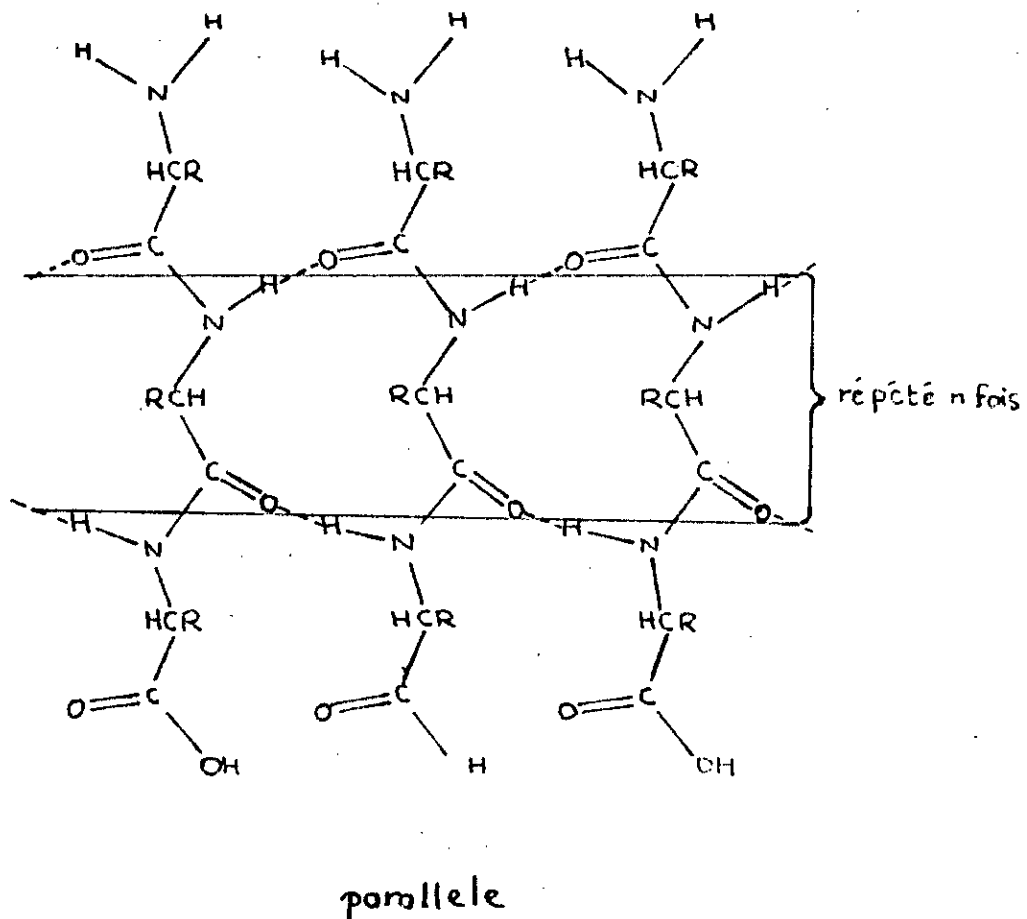


fig2.1 : Dimension de l'hélice α

Plusieurs hélices peuvent s'enrouler les unes autour des autres à la manière d'un câble torsadé, spiralé, formant ainsi des fibres assez volumineuses et assez résistantes en raison des nombreuses liaisons qui s'établissent. [10]

2.3.2.2 Etat étiré ou structure en feuillets plissés : Cette structure est moins stable du point de vue énergétique que la précédente donc, elle se forme de façon moins spontanée. [8;10]

Dans ce genre d'organisation, il semble que les chaînes peptidiques soient en fait complètement allongées et liées entre elles par des liaisons hydrogène entre chaînes adjacentes pour former des " feuillets plissés ", parallèles ou antiparallèles (fig2.2). [10]



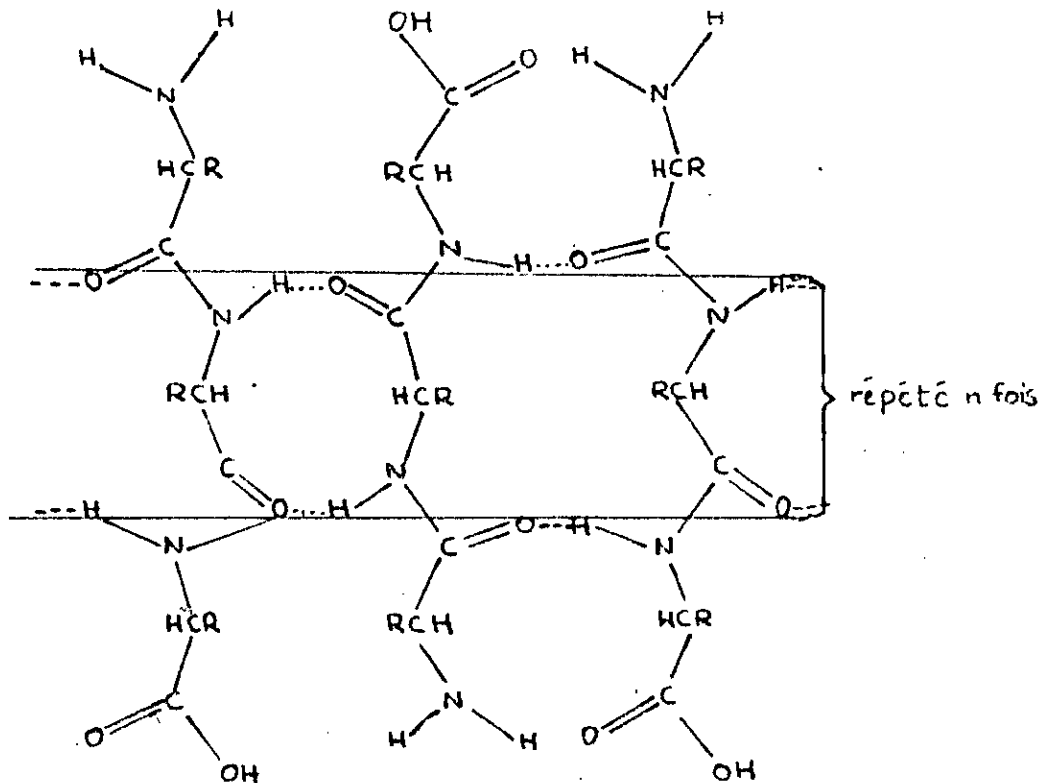


fig2.2 : Structure en feuillets pliés

3.3 Structure tertiaire :

La chaîne d'une protéine structurée partiellement ou en totalité en structure secondaire se replie, s'enroule sur elle même de façon à assurer le plus de liaisons possibles, intrachaines et interchaines, abaissant ainsi son énergie interne et accroître sa stabilité. Cette organisation dans l'espace de la chaîne protéique déjà organisée, correspond à la structure tertiaire de la protéine. [7]

La structure tertiaire a une importance capitale pour l'activité biologique des protéines. En effet, les résidus d'acides-amino très éloignés les uns des autres dans la séquence peuvent se trouver très proches en raison des repliements et former ainsi des régions indispensables au fonctionnement de la protéine, par exemple, le site actif (ou catalytique) des enzymes. [10]

2.3.4 Structure quaternaire :

On dit que les protéines possèdent une structure quaternaire si elles renferment deux chaînes polypeptidiques ou plus, unies par des liaisons autres que covalentes. [8]

Dans le cas d'une certaine variété de protéines enzymatiques, la structure quaternaire influe fortement sur l'activité.

Une très faible modification de structure, de conformation, peut entraîner un changement de cette dernière, dont il résulte soit une inhibition, soit une activation. [7]

2.3.5 Liaisons intervenant dans la structure spatiale :
Ce sont notamment :

2.3.5.1 Les liaisons disulfures : Ce sont essentiellement des ponts disulfures établis entre deux résidus de cystéine. Ces liaisons se rompent facilement par réduction. [7]

Les ponts disulfures permettent le maintien côte à côte de parties éloignées d'une chaîne de protéines. Ils peuvent également maintenir ensemble plusieurs chaînes distinctes. Ainsi rencontre-t-on des ponts disulfures intrachânes et interchânes (fig2.3). [9]

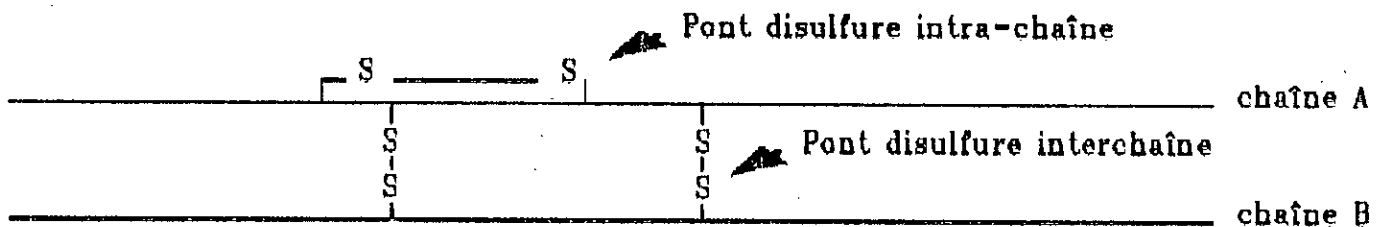


fig2.3 : Liaisons disulfures

2.3.5.2 Les liaisons ioniques : C'est une liaison non covalente qui s'établit entre un radical chargé positivement et un radical chargé négativement, liant ainsi soit deux parties d'une même chaîne, soit deux chaînes différentes. [10]

2.3.5.3 Les liaisons hydrogènes : Ce type de liaison covalente se forme lorsque sont à proximité l'un de l'autre, d'une part, un atome d'hydrogène, lié à un azote ou à un oxygène et d'autre part, un doublet électronique non partagé d'un autre azote ou oxygène. [7]

Les liaisons hydrogène peuvent soit être intrachânes et maintenir la conformation hélicoïdale de la chaîne par exemple, soit permettre des interchânes. [7;10]

2.3.5.4 Les liaisons hydrophobes : Un certain nombre d'acides ont une chaîne latérale hydrophobe (Aliphatique ou aromatique) apolaire, qui ne forment pas de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau. [10;15]

Lorsque le repliement de la chaîne polypeptidique permet une association côte à côte de ces chaînes, elles constituent un solvant organique les uns pour les autres, ce qui les amène à être hors de l'eau. [15]

2.3.6 Dénaturation des protéines :

La conformation tridimensionnelle (Structure primaire, secondaire, tertiaire et, le cas échéant, quaternaire) est le propre d'une protéine native, l'état natif d'une protéine étant l'ensemble des états conformationnels très voisins que peut présenter cette dernière en étant biologiquement active. [8]

Cette conformation peut être désorganisée sans que soit rompue la moindre liaison peptidique par rupture uniquement des liaisons établies par des forces relativement faibles qui sont responsables du maintien des structures énoncées plus haut et qui peuvent être facilement rompues par différentes manipulations s'accompagnant d'une perte d'activité biologique. On appelle dénaturation cette dernière; elle peut être provoquée par une variété d'agents chimiques ou physiques. [8;10]

La perte de l'activité peut être restreinte, cependant, elle est souvent irréversible, les conditions permettant le retour à la conformation native étant encore inconnues. [15]

2.3.6.1 Agents dénaturants : Est agent dénaturant tout agent provoquant la rupture de liaisons assurant le maintien de la structure de la protéine. [9]

Ce sont :

a/ La température : La formation des liaisons hydrogène est exothermique, et une élévation de température tend à les rompre.

La rupture d'une seule liaison n'étant pas suffisante pour entraîner la dislocation de tout l'édifice protéique, le phénomène de dénaturation est généralement associé à la scission en cascade d'un grand nombre de liaisons. [10;15]

D'un autre côté, la formation de liaisons hydrophobes est légèrement endothermique; Un abaissement de température les rompt. [15]

b/ PH extrêmes : Les PH extrêmes sont connus pour dénaturer les protéines. Cet effet du PH peut être associé à l'apparition de groupes chargés au sein de la structure globulaire d'une part, et à la suppression d'une liaison électrostatique à l'intérieur d'une autre région hydrophobe. [15]

c/ Solvants organiques et détergents : L'addition de solvants peu polaires solubles dans l'eau, amène le milieu à ressembler à celui que constitue l'intérieur de la molécule protéique; Les interactions apolaires entre chaînes latérales aliphatiques ou aromatiques diminuent et sont remplacées par des interactions identiques avec le solvant, ce qui les dénature facilement. [10;15]

Les détergents ont une action similaire à la seule différence, qu'ils ne provoquent pas la précipitation des protéines comme l'éthanol.

d/ L'urée et le chlorure de guanadine : Ces deux produits font des liaisons hydrogène avec l'eau ou avec les peptides et doivent leur action dénaturante à la formation de telles liaisons avec le squelette polypeptidique. [10;15]

2.3.6.2 Effet de la dénaturation : Outre l'activité biologique, un certain nombre de propriétés de la protéine dénaturée sont généralement modifiées du fait de la rupture des liaisons hydrogènes et hydrophobes dont est tributaire la structure native des protéines. [15]

Il en résulte que la réactivité chimique des groupements réactifs ionisables masqués dans la structure native augmente, ainsi que la viscosité intrinsèque de la protéine. [9;15]

2.4 Principales propriétés des protéines :

Ces propriétés sont les suivantes :

2.4.1 Solubilité :

Certaines protéines sont solubles dans l'eau pure (Albumines), d'autres ne se dissolvent qu'en présence de sels neutres ou encore lorsque le milieu est légèrement acide ou faiblement alcalin. [9;10]

Un certain nombre de facteurs peuvent influencer le solubilité dont on citera :

2.4.1.1 Les électrolytes : Les sels neutres interviennent en fonction de leur concentration et de la charge des ions c'est à dire la force ionique. [10]

2.4.1.2 Le PH : La solubilité d'une protéine est minimale au voisinage du point isoélectrique. (fig2.4) [9]

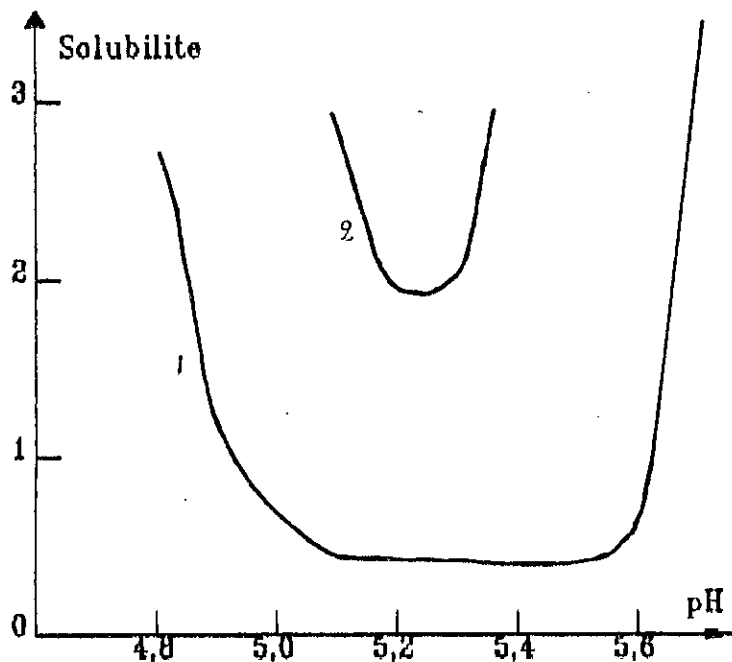


fig2.4 : Influence du PH sur la solubilité d'une protéine (B.lactoglobuline) au voisinage de son point isoélectrique.
Courbe 1 : $\mu = 0,001$ M
Courbe 2 : $\mu = 0,02$ M

2.5 Purification des protéines :

Chaque année, de nouvelles protéines sont isolées et les techniques permettant de les purifier et d'en démontrer l'homogénéité continuent à être améliorées et raffinées. [15]

2.5.1 Principes de purification :

L'obtention d'une protéine simple et pure est en général une tâche longue et délicate, car^{on} est en présence de plusieurs centaines de protéines ayant des propriétés chimiques et physiques voisines, propriétés qui sont à la base des techniques de séparation. [10;15]

Les étapes les plus caractéristiques d'une purification sont les suivantes :

2.5.1.1 Fractionnement par force ionique croissante : Le relargage " Salting-out " des protéines à force ionique élevée est variable d'une protéine à une autre. [10]

Il est donc possible d'éliminer progressivement un pourcentage important des composés étrangers par élévation, par palier, de la concentration saline du milieu. Les molécules et les protéines qui précipitent en un temps sont recueillies par centrifugation et sont ainsi éliminées. [10;12]

2.5.1.2 Fractionnement par point isoélectrique : Une zone de PH peut être expérimentalement mise en évidence où la solubilité de la protéine recherchée est minimale, provoquant ainsi sa précipitation. [12.15]

Cette zone est variable d'une protéine à une autre. Une élévation ou abaissement du PH à faible force ionique, autorise une élimination progressive d'une nouvelle partie de constituants étrangers. [15]

2.5.1.3 Filtration sur tamis moléculaire : A ce stade de la purification, l'élimination des protéines étrangères à celle qui est recherchée est généralement très avancée. On fait alors appel aux méthodes de séparation de plus grande finesse. Il s'agit de la filtration sur tamis moléculaire laquelle sépare les molécules de même solubilité que celle que l'on veut isoler mais de masse moléculaire sensiblement différentes. (fig 2.5) [17]

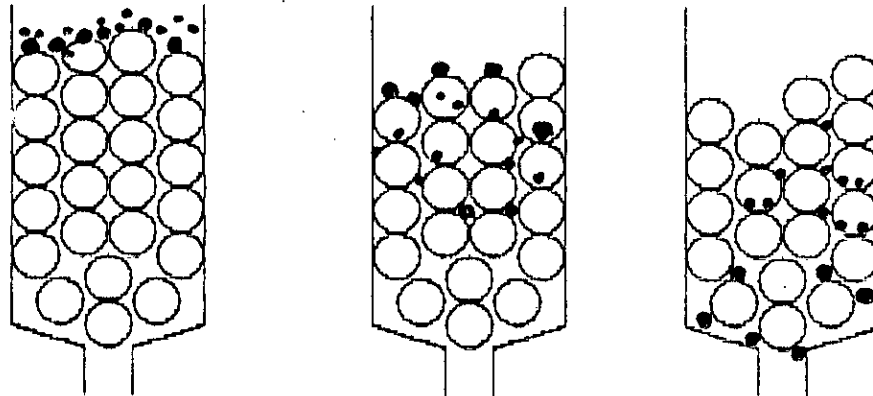


fig2.5 : Principe de filtration sur tamis moléculaire
(SEPHADEX)

2.5.1.4 Chromatographie sur échangeurs d'ions : La chromatographie sur échangeurs d'ions est basée sur la capacité des protéines à se lier aux groupes chargés de ces derniers. La fixation est forte si la charge de la protéine est forte (PH éloigné du point isoélectrique) et de signe opposé à celui des charges de l'échangeur. [17]

2.5.1.5 Chromatographie d'affinité : elle permet de purifier une protéine enzymatique qui est susceptible de se combiner très spécifiquement à un composé donné pour former un complexe du type enzyme-substrat. Ce composé est fixé de manière covalente à un support pulvérulent inerte que l'on met dans une colonne chromatographique. [10;12]

Si on verse un mélange protéique, seule , la protéine qui se combine aux composés restera fixée, on pourra l'en décrocher par un éluant approprié. [12]

2.5.1.6 Immuno-adsorption : cette technique ressemble beaucoup , dans son principe, à la méthode précédant celle-ci. Le composé en question n'est autre qu'un anticorps spécifique à la protéine qui, dans ce cas, est un antigène. Il suffira ensuite de dissocier le complexe anticorps antigène ainsi formé sur la colonne pour récupérer la protéine purifiée. [10]

2.5.1.7 Cristallisation : Elle permet parfois d'obtenir une protéine pure. On a pu préparer des protéines enzymatiques à un très grand état de pureté. La cristallisation se fait très souvent à partir d'un milieu salin concentré. C'est toujours la dernière étape. [12;15]

2.5.2 Détermination quantitative des protéines :

Tout au long d'une purification, il est nécessaire de mesurer la quantité des protéines présentes dans les solutions isolées. Cette mesure peut être assurée par plusieurs moyens dont :

2.5.2.1 Turbidimétrie : L'ensemble des protéines est rendu insoluble par dénaturation en milieu extrêmement acide. Les agrégats de protéines insolubles diffusent la lumière et la densité optique est d'autant plus élevée qu'ils diffusent plus traduisant une concentration plus élevée. [15]

2.5.2.2 Colorimétrie : Un certain nombre de composés peut conduire à des réactions colorées avec les motifs peptidiques des protéines ou avec certaines de leurs chaînes latérales. La coloration, c'est à dire la densité optique, est proportionnelle à la concentration en protéines. [15;18]

2.5.2.3 Spectrophotométrie : Lorsque la purification est avancée et que les solutions sont disponibles en faibles quantités, il est nécessaire de ne pas provoquer la destruction du composé dosé.

On utilise alors l'absorbance des acides aminés aromatiques contenus dans les protéines, le plus souvent à 280nm, zone où le triptophane et la tyrosine absorbent le plus. [18]

2.5.2.4 Activité biologique : Dans la plupart des cas, les protéines que l'on cherche à isoler sont caractérisées par une propriété spécifique. [15]

On peut donc suivre l'évolution de la purification en mesurant cette propriété telle que l'activité catalytique pour une enzyme. [12]

2.5.3 Critère de pureté :

La majeure partie des études effectuées sur les protéines, doivent l'être sur des produits purs et ces études ne sont entreprises que si plusieurs critères concordent pour montrer qu'une protéine isolée est exempte de tout constituant étranger.

Les critères exigés sont les suivants :

2.5.3.1 Critère d'ultracentrifugation : Les paramètres du comportement des protéines à l'ultracentrifugation dépendent à la fois de la forme et du poids moléculaire de la protéine. [18]

Dans le diagramme résultant, la protéine pure apparaît sous la forme d'un pic unique asymétrique. Les impuretés apparaissent soit comme des pics distincts, soit comme un épanchement adjacent au pic principal.

La figure 2.6 schématise ces possibilités.

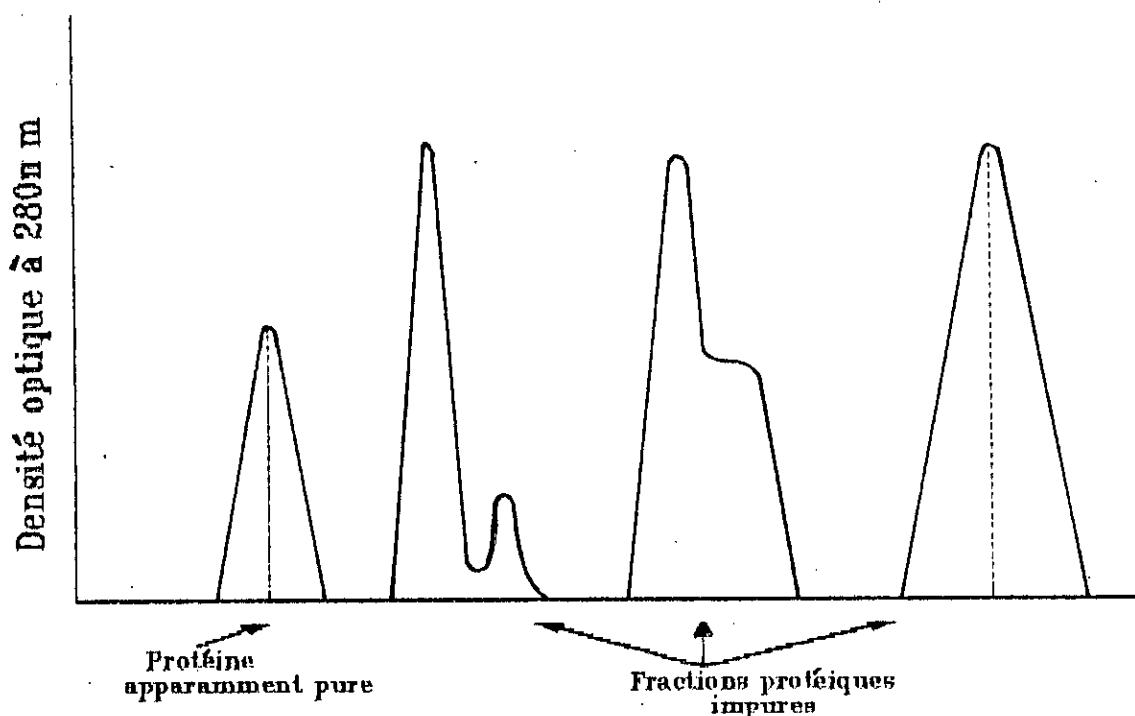


fig 2.6 : Diagramme d'ultracentrifugation de protéines pures et impures.

2.5.3.2 Critère chromatographique : L'obtention d'un pic symétrique et unique dans le diagramme d'éluion d'une colonne de chromatographie peut apporter une preuve supplémentaire à l'homogénéité du matériel étudié. [18]

Les schémas obtenus sont semblables à ceux décrits sur la fig2.6.

2.5.3.3 Critère électrophorétique : C'est actuellement incontestablement un des meilleurs critères de pureté. [18]

L'électrophorèse désignait initialement la migration différentielle de particules colloïdales, chargées électriquement par action d'un champ électrique. Cette propriété a été utilisée par Tiselius en 1937 pour mettre au point cette nouvelle méthode d'analyse. [12]

C'est donc également une technique de séparation de différents constituants ionisables d'un mélange, fondée sur leur encombrement moléculaire et leurs différences de charges globales. [19;20]

Le schéma suivant traduit l'intégration de la séparation d'un mélange de protéine du sérum sanguin.

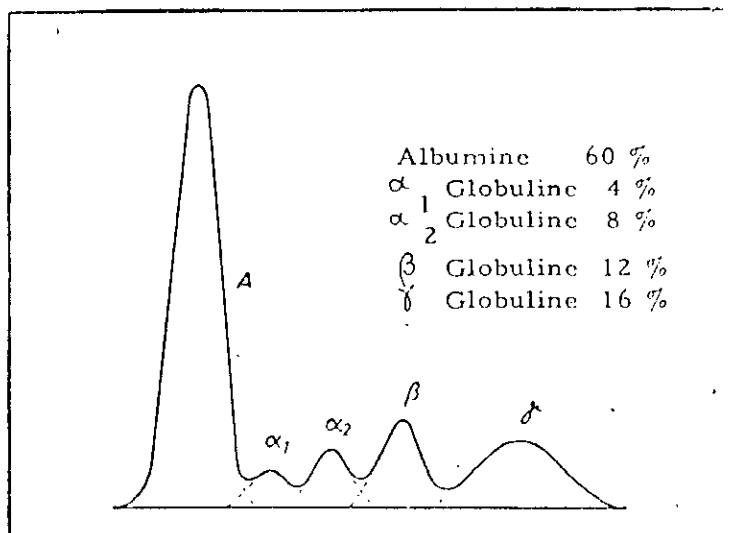


fig.2.7 : Diagramme électrophorétique.

Par conséquent, l'obtention d'un pic unique et symétrique s'avère être un excellent critère de pureté.

2.5.3.4 Critère immunologique : l'immunoélectrophorèse est actuellement la méthode de choix, compte tenu de l'étroite spécificité des réactions antigènes-anticorps. [18;20]

Cela se passe de la manière suivante : Lorsque l'on injecte dans le courant sanguin d'un animal un constituant macromoléculaire étranger à l'organisme, celui-ci synthétise en défense une protéine (globuline), apte à se lier spécifiquement à cette macromolécule étrangère (Antigène). [15]

Une telle protéine (Anticorps) forme l'antigène un complexe inactivé qui est ultérieurement détruit par l'organisme.

Il se forme autant d'anticorps qu'il a été injecté d'antigènes différents et le mélange d'anticorps formés est contenu dans le sérum que l'on peut obtenir à partir du sang de l'animal (immunosérum).

L'immunoélectrophorèse consiste à réaliser une électrophorèse sur gel, dans une dimension, de la protéine étudiée, puis, à laisser diffuser dans le gel, dans une seconde dimension, un immunosérum préparé par une injection de cette protéine à un animal. [15]

Protéine et anticorps diffusent jusqu'à se rencontrer et coprécipitent en donnant un arc de précipitation Ag-Ac, la zone de précipitation est ensuite marquée par un colorant. La vitesse de diffusion dans le gel, variable d'un antigène à l'autre, ajoutée au pouvoir séparateur de l'électrophorèse. [15]

La présence d'un unique arc de précipitation indique la formation que d'un complexe antigène-anticorps; on pourra en conclure que la protéine qui a servi d'antigène est pure. [18]

2.6 Les protéines sériques :

Elles comprennent surtout les fractions albumines et globulines du plasma car la plus grande partie du fibrinogène disparaît au cours du processus de coagulation qui accompagne la préparation du sérum.

2.6.1 La sérum albumine : cette fraction des protéines sériques est la plus abondante des protéines du sérum, sa masse étant d'environ 60% de la masse totale des protéines. [8]

Sa structure primaire consiste en une séquence de 582 acides aminés disposés en une seule chaîne peptidique. [12]

Ces acides aminés ont permis l'identification de sites ionisables de la protéine et le calcul de sa charge nette par un dosage acido-basique, qui a permis la détermination de son point isoélectrique. [21]

Le procédé d'ultrafiltration a permis de concentrer le sérum en cette protéine et qui s'en trouve enrichi d'environ 163% en fin d'opération. [22]

2.6.2 Les globulines : elles peuvent être séparées de l'albumine par précipitation sélective au sulfate de sodium. [1]

L'immunoélectrophorèse nous permet de distinguer :

2.6.2.1 Les α_1 globulines : leur poids moléculaire varie de 41 à 70 KDa. Ce sont des protéines qui sont riches en glucides avec un taux pouvant atteindre 40%. [1]

2.6.2.2. Les α_2 globulines : ce sont des protéines qui se caractérisent par leur haut poids moléculaire qui varie entre 150 et 850 KDa. Elles contiennent, comme les précédentes, des glucides à un taux de 8%. [1;12]

2.6.2.3 Les β globulines : la sidérophiline est la plus importante de ce groupe et assure le transport du fer dans l'organisme. Leur masse moléculaire est de 80 KDa.

2.6.2.4 Les γ globulines : cette fraction des protéines sériques contient la plupart des anticorps circulants. Ce sont des immunoglobulines qui forment une famille de protéines étroitement associées possédant tout ce que nous connaissons de l'activité anticorps du sérum. [23]

CHAPITRE 3 / LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

L'un des principaux objectifs de la biochimie est de comprendre et de décrire les structures fondamentales des biomolécules, qui sont à la base même de leurs fonctions biologiques.

La chromatographie liquide peut, par les avantages qu'elle offre, comme nous le verrons ultérieurement, résoudre certains problèmes dans lesquels le biochimiste se débat sans cesse.

Il est aisé de comprendre que l'isolation d'une protéine sous sa forme la plus pure est un tâche rendue ardue par la difficulté que présentent les différentes analyses structurales comprenant entre autres, la fragmentation des protéines et la détermination de leur séquence en acides aminés, quand on sait qu'une simple bactérie comme E.coli peut contenir quelques milliers de protéines, aussi différentes les unes que les autres de par leurs structures.

L'intégration de la chromatographie dans les analyses biochimiques peut donc avoir un impact appréciable sur les recherches qu'effectue le biochimiste et peut rendre sa quête de découvertes nouvelles moins onéreuse.

Dans notre souci d'être clairs et simples, nous nous proposons dans ce chapitre de ne citer que les techniques chromatographiques ayant une relation étroite avec les principales propriétés des protéines comme le résume le tableau suivant :

Séparation selon	la dimension	la charge	la solubilité	l'activité biologique
chromatographie dite	de filtration sur gel	d'échange d'ions	en phase inverse	d'affinité

Tableau 3.1 : Propriétés des protéines et la technique chromatographique correspondante.

Néanmoins, ces différentes méthodes de séparation possèdent un point commun, lequel est la sauvegarde de la structure et de la stabilité de la protéine native.

3.1 Historique :

La chromatographie liquide connut le jour en 1903 lorsqu'un botaniste russe du nom de C ET, isola et purifia par ce moyen les pigments chlorophylliens. [19;24]

Le terme " chromatographie" créé par lui sur des racines grecques et signifiant "enregistrement graphique des couleurs", se réfère aux bandes de différentes couleurs obtenues sur les colonnes remplies de carbonate de calcium, faisant office de phase séparatrice.

En effet, ayant observé ce phénomène, il découpa la colonne de carbonate selon les bandes colorées. En éluant chaque tronçon par un solvant approprié, il obtint les différents pigments pratiquement purs. [24;25]

Après une certaine période de sommeil, la chromatographie liquide fut remise à l'honneur dans des laboratoires allemands par KUHN et LEDERER qui développent la méthode, en 1931, pour séparer des colorants naturels. [25]

Les vingt (20) années qui suivirent la redécouverte de la chromatographie sont marquées par un développement plus approfondi de la technique et par la découverte de variantes distinctes. [24]

Une des étapes les plus importantes est la mise au point par MARTIN et SYNGE, en 1952, de la chromatographie de partage gaz-liquide. Les retombées des recherches effectuées sur cette variante profitèrent également à la chromatographie en phase liquide grâce à une généralisation de la théorie et de ses applications qui aboutit à l'introduction de nouvelles techniques telle la chromatographie sur couche mince par STAHL. [19;24]

Vers les années soixante (60), ces études déclenchèrent à leur tour un renouveau considérable de la technique originelle qui déboucha sur la chromatographie moderne appelée à ses débuts "chromatographie en phase liquide à hautes performances" (H.P.L.C : High Performance Liquid Chromatography) et qui est toujours en pleine évolution à l'heure actuelle. [24]

La chromatographie est donc devenue une technique universelle d'analyse qualitative et quantitative et les progrès ne pourraient porter que sur la rapidité et la spécificité des différentes méthodes. [25]

3.2 Principes fondamentaux :

La chromatographie, selon STRAIN, est basée sur la migration différentielle des composants d'un mélange sous l'influence du déplacement d'un fluide, constituant la phase mobile, sur un milieu poreux doué de propriétés physico-chimique, constituant la phase stationnaire. [19]

3.2.1 Données théoriques :

La qualité de l'analyse chromatographique est obtenue si les conditions suivantes sont remplies.

- Les constituants à séparer ont des affinités pour la phase stationnaire.
- Les pics d'élution sont bien séparés, symétriques et Gaussiens.
- L'analyse est rapide.

Ainsi pourra-t-on définir :

3.2.1.1 Le facteur de capacité : Ceci est autre que le rapport du temps t_R pendant lequel le soluté est retardé par la phase stationnaire au temps (t_0) pendant lequel le soluté est entraîné dans la phase mobile. Ce rapport est noté k . (fig 3.1.) [24;25]

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Les volumes sont déduits à partir du débit :

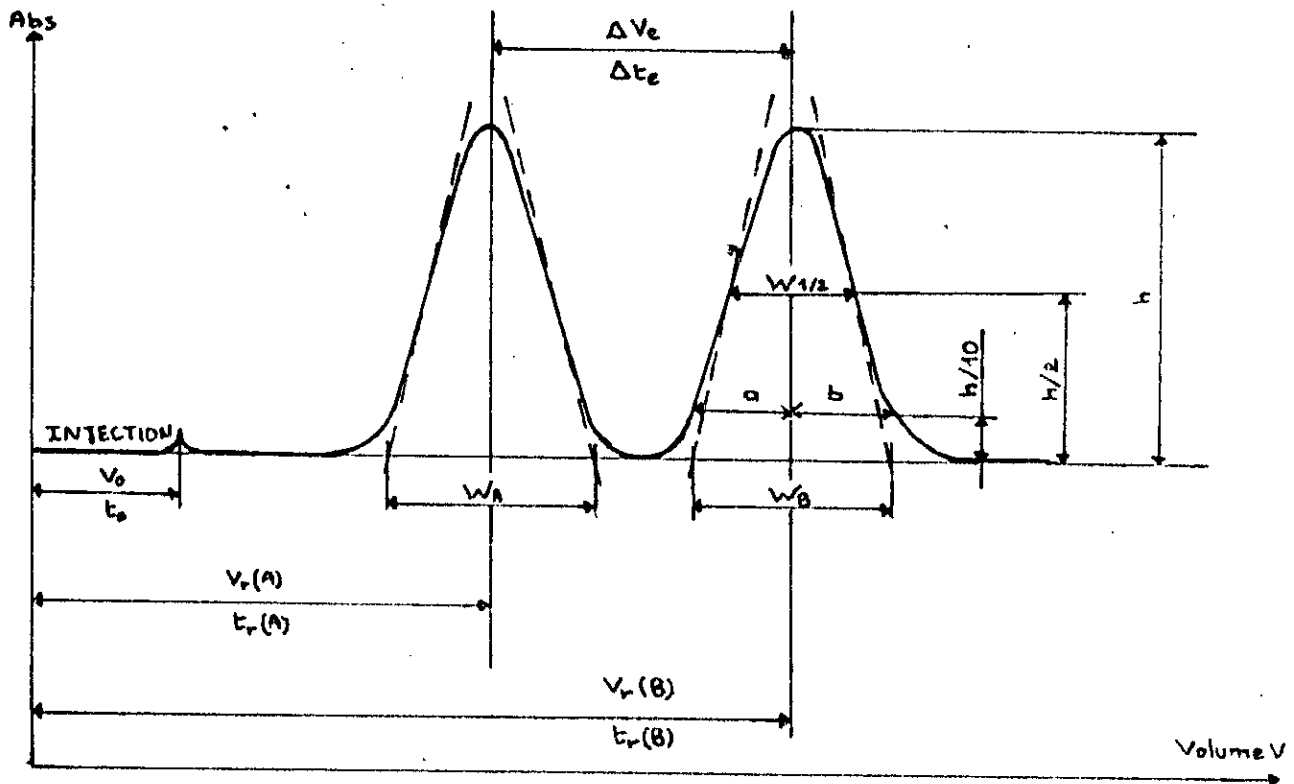


fig 3.1 : Chromatogramme illustrant les définitions

k exprime le volume de colonne nécessaire à l'éluion d'un soluté.

Sa valeur optimale est comprise entre 1,5 et 4. [26]

3.2.1.2 Le facteur de sélectivité : appelé également facteur de rétention relative; il décrit la position, l'un par rapport à l'autre, de deux pics adjacents et dans tous les cas, il est égal ou supérieur à 1.

Ce rapport est noté α .

$$\alpha = \frac{k(B)}{k(A)}$$

3.2.1.3 Le nombre de plateaux : Un pic chromatographique doit présenter une distribution Gaussienne comme nous l'avons vu précédemment. La courbe de distribution est généralement caractérisée par son écart type, σ . [25]

La figure 3.1 illustre les deux définitions utilisées pour la largeur d'un pic. W , largeur à la base du pic, est la portion de la ligne de base délimitée par les tangentes aux points d'inflexion et $W = 4\sigma$. [25]

$W_{\frac{1}{2}}$, largeur à mi-hauteur, est mesurée à 50% de la hauteur totale du pic et $W_{\frac{1}{2}} = 2,354\sigma$ [24.25]

Le nombre de plateaux N caractérise la performance de la colonne dont la qualité se mesure par la largeur des pics chromatographiques.

$$\text{Par conséquent : } N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \simeq 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \simeq 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{\frac{1}{2}}}\right)^2 \quad [24]$$

Le nombre de plateaux théoriques est proportionnel à la longueur de la colonne et l'on peut donc calculer une grandeur indépendante de cette longueur; c'est la hauteur équivalente à un plateau théorique (H.E.P.T) .

La H.E.P.T a pour dimension une longueur, elle est égale à : [25]

$$\text{H.E.P.T} = \frac{\text{longueur de la colonne}}{N}$$

La colonne chromatographique est d'autant plus efficace que la hauteur du plateau est faible ou que le nombre de plateaux est élevé. [24]

3.2.1.4 Résolution des pics : par définition; la résolution de deux pics est le rapport entre la distance ΔV_e séparant leur maxima et la valeur moyenne de leurs largeurs au niveau de la ligne de base.

Elle est notée R : [24]

$$R = \frac{\Delta V_e}{\left(\frac{W_A + W_B}{2}\right)}$$

Une expression plus analytique de R reflète la sélectivité, la capacité et l'efficacité de la colonne où: [26]

$$R = 1/4 \cdot \underbrace{\frac{\alpha - 1}{\alpha}}_{\text{selectivité}} \cdot \underbrace{\sqrt{N}}_{\text{efficacité}} \cdot \underbrace{\frac{k}{k+1}}_{\text{capacité}}$$

3.2.1.5 Facteur d'asymétrie : noté Af, il exprime la déviation du pic obtenu par rapport au pic théorique Gaussien, mettant en cause la qualité du remplissage de la colonne chromatographique. [26]
d'où : Af = b/a

3.2.2. Système chromatographique :

Le dispositif de séparation chromatographique est très simple en lui-même (fig 3.2) Il nécessite :

3.2.2.1 Une phase mobile : la phase mobile d'un système chromatographique joue un rôle actif dans le mécanisme de séparation sauf pour le cas de la chromatographie stérique. [24]

Les phases mobiles utilisées pour les analyses peuvent être constituées par une seule substance ou par un mélange de deux composés ou plus suivant les caractéristiques recherchées. [25]

3.2.2.2. Une phase stationnaire : il existe une très grande variété de supports. Ainsi, de nombreuses combinaisons sont envisageables avec les différents solvants; c'est une des raisons de l'efficacité et de l'universalité des méthodes d'analyses. [24]

Dans tous les processus chromatographiques en phase liquide, la séparation est le résultat d'interactions entre l'échantillon et la phase stationnaire. [24]

Cette dernière peut être constituée par des corps solides poreux dont la composition chimique, la structure et la dimension des particules diffèrent en fonction de l'application. [24]

3.2.2.3 Une pompe : En chromatographie en phase liquide, le débit de la phase mobile est l'un des paramètres les plus fréquemment modifiés. Ainsi, doit-il être contrôlé par l'usage d'une pompe qui, d'une part, alimente la colonne en solvant frais de façon continue et d'autre part, de recueillir des fractions de volume égal. [24;26]

3.2.2.4 Une colonne : les colonnes les plus fréquemment utilisées en analyse chromatographique sont des tubes de verre dont le diamètre doit être rigoureusement constant. [24]

Dans la partie inférieure de la colonne, un dispositif simple permet de maintenir la phase stationnaire en place. Ce sera une plaque de métal ou de porcelaine percée où une rondelle de verre frittée, qui peut être mobile ou fixe. La première est plus pratique car elle permet la récupération de la phase avec beaucoup de facilité. [24;25]

3.2.2.5 Un détecteur : Le détecteur le plus couramment utilisé en chromatographie liquide est le détecteur à absorption U.V.

Un détecteur de ce type, à longueur d'onde variable entre 190 et 800 nm convient pratiquement pour tous les types d'échantillons. [24;25]

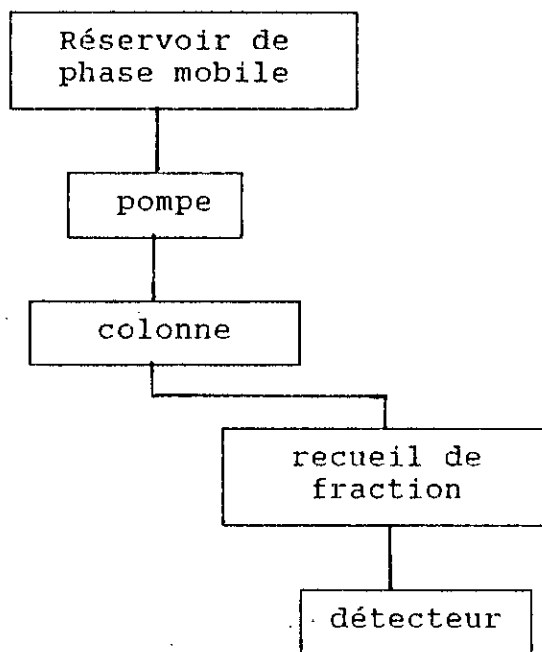


fig 3.2 Schéma fonctionnel d'un système de chromatographie en phase liquide.

3.2.3 Analyse chromatographique :

L'analyse chromatographique se fait par transfert des molécules de l'échantillon dans la phase mobile qui est pompée au travers d'un lit de matériaux, constituant la phase stationnaire contenue dans la colonne. Ainsi, les composants de l'échantillon dissouts dans l'éluant peuvent, réversiblement et continuellement interagir avec cette dernière. [26]

Après leur passage dans la colonne, les différents composants de l'échantillon sont séparés et chacun d'eux est dosé au moyen du détecteur U.V. [24]

Ainsi, on peut obtenir un chromatogramme illustré dans la figure 3.1 et qui servira de base à l'analyse qualitative et quantitative.

3.2.3.1 Analyse qualitative : Elle est surtout basée sur la comparaison des temps de rétention des pics obtenus avec ceux mesurés sur une solution connue et dans les conditions identiques. Ce qui reviendrait en des termes plus simples, à effectuer une identification des pics. [24]

3.2.3.2 Analyse quantitative : Elle est basée sur l'aire des pics. Il est donc important de réaliser à ce sujet que la réponse des détecteurs peut varier considérablement; Ainsi est-il indispensable d'effectuer un étalonnage approprié du détecteur dans des conditions identiques à celle de l'analyse réalisée. [24;25]

3.2.4 Facteurs dont dépend la séparation :
Les plus importants sont les suivants :

3.2.4.1 La température : en chromatographie liquide, il convient d'attacher une grande importance à la température à laquelle s'effectuent les séparations, elle peut parfois aider à réaliser ou à contrôler certaines de ces dernières. [24;25]

Une température supérieure à l'ambiante est surtout utilisée pour réduire la viscosité de la phase éluante et pour augmenter la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile. [24]

En général donc, un accroissement de température améliore la résolution et rend la chromatographie plus rapide. [27]

Malheureusement, l'instabilité de beaucoup de protéines à température élevée ne permet pas d'utiliser ces avantages. [27]

3.2.4.2 La granulométrie et la dimension des pores : La granulométrie a d'abord une influence sur la vitesse de percolation. En effet, plus les grains sont fins, plus la vitesse est réduite. [24]

Par contre, si l'on utilise de gros grains, la vitesse de filtration sera plus grande et le contact entre les molécules du soluté et l'adsorbant rendue difficile, donnant aussi une efficacité moyenne. [25]

De bons résultats sont obtenus avec une granulométrie relativement étroite, les pores des particules doivent être suffisamment larges pour permettre l'entrée et la sortie des molécules. [24]

3.2.4.3 Dimension de la colonne : L'efficacité d'une colonne est fonction de ses dimensions. Cette efficacité croît selon le rapport L/D^2 . [25]

L = longueur occupée par la phase stationnaire.
D = diamètre de la colonne.

3.2.4.4 Le débit : il doit être aussi constant que possible. Généralement, il augmente en même temps que la taille des grains, et lorsque la hauteur du gel diminue. [28]

3.3 Les différentes techniques chromatographiques :

Les protéines sont isolées essentiellement par les méthodes suivantes :

3.3.1 Chromatographie d'exclusion stérique :

Appelée également la filtration sur gel, cette technique fut introduite en 1959 par PORATH et FLODIN comme technique de purification des immunoglobulines. [27]

En chromatographie d'exclusion stérique, les composants d'un échantillon sont séparés en fonction de leur taille. [25]

Les colonnes à remplissage d'exclusion stérique, se comportent d'une certaine manière à l'inverse d'un tamis.

Les molécules dont l'encombrement moléculaire dépasse la dimension des pores de remplissage, ne pénètrent pas à l'intérieur des grains alors que les plus petites y ont accès. [25;29]

Par conséquent, les molécules les plus grosses traversent rapidement la colonne alors que les molécules plus petites sont retardées par ce phénomène. [27]

Ce processus donne des chromatogrammes dont les premiers pics correspondent aux molécules les plus grosses et les derniers aux molécules les plus petites. [24;25]

3.3.1.1 Phase stationnaire : les remplissages de colonnes d'exclusion stériques consistent en des gels polymères rigides, à dimension de pores contrôlée .

Ces gels se distinguent par leur indice de rétention d'eau, d'où la taille des molécules relenties. [24]

La taille des grains intervient dans la vitesse de l'écoulement et dans la finesse de séparation. [25]

Le domaine de fractionnement s'étend sur une vaste échelle de poids moléculaire. Ainsi, pour les protéines globulaires, s'étend de 0,7 à 800 KDa. [25]

3.3.1.2 Phase mobile : le liquide d'éluion en chromatographie doit servir uniquement de vecteur de l'échantillon. Si la solubilité de ce dernier dans la phase mobile est faible, la détermination des masses moléculaires, peut être faussée par des mécanismes d'adsorption ou de partage. [24;26]

Les phases mobiles les plus communément utilisées sont des solutions tamponnées de tris ou de phosphate, contenant en général du NaCl ou du KCl. [27]

3.3.2 Chromatographie par échange d'ions :

La découverte de l'échange d'ions date du milieu du XIXème siècle lorsque THOMPSON et WAY remarquèrent que du sulfate d'ammonium après percolation à travers un tube rempli de terre, se transformait en sulfate de calcium. [27]

L'échange d'ions est un procédé dans lequel les ions d'une certaine charge, contenus dans une solution, sont éliminés de cette dernière par adsorption sur un matériau solide, pour être remplacés par une quantité équivalente d'autres ions de même charge émis par le solide. Les ions de charge opposée ne sont pas affectés. [27]

Ce procédé est donc tout indiqué pour la séparation des composés ioniques et notamment les protéines.

3.3.2.1 Phase stationnaire : suivant leur fonction, les échangeurs sont désignés comme échangeurs d'anions ou de cations. [24]

L'échangeur d'ions est un support solide comportant des groupements fonctionnels ionisés fixés, porteurs de charges positives ou négatives (appelées sites échangeurs) ainsi que des ions mobiles de charge contraire assurant la neutralité électrique. Ces ions mobiles sont échangeables avec d'autres ions de même charge. [27]

En général, les remplissages utilisés en chromatographie d'échange ionique sont constitués par des polymères de masse molaire élevée ou par des gels de silicé sur lesquels ont été greffés chimiquement des groupements ioniques. [24]

En chimie organique et en biochimie, on utilise souvent des résines à base de cellulose sur lesquelles ont été greffées des groupements basiques tel que le diethyl aminoéthyl (D.E.A.E) ou des groupements acides tel que le carboxyméthyl (C.M). [27]

Un échangeur d'ions se caractérise par les propriétés suivantes:

1°/Capacité : elle correspond à sa concentration en groupements actifs. [25]

2°/Polarité : elle indique la variation de la capacité de l'échangeur. Elle détermine donc la zone de PH dans laquelle l'échangeur est utilisable. [24]

3°/Granulométrie : elle intervient dans l'équilibre d'échange. Les grains fins possèdent une capacité plus importante car les groupements actifs placés à l'intérieur des grains sont plus rapidement accessibles que dans un grain de taille plus élevée. [27]

4°/Sélectivité : l'affinité d'un échangeur est variable pour les différents types d'ions à concentrations identiques. Ainsi, les ions trivalents sont plus fortement adsorbés que les ions divalents, et eux même plus fortement que les ions monovalents. [25]

De la même façon, l'affinité croît avec le poids atomique.

3.3.2.2 Phase mobile : La rétention d'un soluté ionique sur une colonne échangeuse d'ions est fonction de deux paramètres de la phase éluante: sa force ionique, son PH

1°/ La force ionique d'une phase mobile dépend de la concentration et de la charge des ions dissouts dans l'éluant. C'est le paramètre le plus important. [25]

A faible force ionique, la compétition pour les groupes chargés de l'échangeur d'ions est minime et les substances sont fixées fortement dans ces conditions. En augmentant la force ionique, on réduit l'interaction entre l'échangeur d'ions et les substances de l'échantillon, provoquant ainsi son élution. [28]

2°/ Le PH est la seconde variable intervenant dans la rétention d'un soluté ionique, surtout pour les échangeurs anioniques ou cationiques faibles. [24]

Ainsi, une diminution de PH diminue l'ionisation des échangeurs de cations faibles; De même, une augmentation de PH peut diminuer l'ionisation d'échangeurs d'anions faibles. [24]

De la même façon, le PH intervient dans la charge nette d'une molécule amphotère. Le changement de PH en direction du point isoélectrique d'une protéine par exemple, la rend neutre et par conséquent, provoque son élution. [27]

3.3.3 Chromatographie en phase inversée :

La chromatographie en phase inversée est employée en biochimie dans la séparation de molécules à faible poids moléculaire, se basant sur leur hydrophobie. [27]

Elle utilise la solubilité des composants d'un échantillon comme le fait un chimiste lors de la purification d'un échantillon brut, en partageant ses composants entre deux solvants, l'un hydrophile et l'autre lipophile. Les composés les moins hydrophobes se retrouvent dans la phase hydrophile alors que ceux qui le sont plus, se retrouvent dans la phase lipophile. [27]

3.3.3.1 Phase stationnaire : La silice recouverte par une couche de groupement greffés d'octadecylsilyles (phases O.D.S) est le remplissage le plus employé en chromatographie en phase inversée. [24;27]

Cette phase greffée constitue la phase hypophile alors qu'un mélange de solvants aqueux et organiques constitue la phase hydrophile. [27]

3.3.3.2 Phase mobile : Les phases mobiles, généralement utilisées en chromatographie à polarité de phase inversée sur phase stationnaire greffées, sont constituées par un mélange d'eau et d'un solvant miscible moins polaire (un alcool). Leur pouvoir extracteur est d'autant plus prononcé que la concentration en solvant peu polaire est importante. [21;24]

Dans tous les cas, l'élution des composés hydrophiles sera plus rapide que celle des composés hydrophobes puisque la phase mobile se doit d'être plus hydrophile que la phase stationnaire. [27]

3.3.4 Chromatographie d'affinité :

La chromatographie d'affinité trouve ses applications dans le domaine de purification d'enzyme, d'antigène, d'anticorps et dans la résolution de formes et dénaturée (inactivée) d'une protéine. [28]

Elle est basée sur les interactions entre ligands liés par covalence à un support inerte, qui constitue la phase fixe, et son partenaire d'affinité en solution. [30]

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité en fixant le ligand sur le support. [30]

Les substances qui ne présentent pas d'affinité particulière pour ce ligand ne sont pas retenues par la colonne, tandis que les substances capables de le reconnaître sont plus ou moins retardées ou fixées sur la colonne. On élimine ensuite toute trace de produits indésirables par des lavages successifs. [28;30]

Enfin, on élue les substances retenues en décomposant le complexe et ce, par modification des conditions du milieu : changement de PH, utilisation d'un dénaturant réversible ou l'on fait passer une solution contenant un ligand ayant pour les macromolécules retenues, plus d'affinité que le ligand fixé. [26;32]

3.3.4.1 Phase stationnaire : Le gel d'affinité se constitue d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux par l'intermédiaire d'une chaîne latérale :
le bras fixateur ou "spacer" en anglo-saxon. [29]

1°/ Support : dans le cas des immunoadsorbants, on a utilisé très largement la cellulose, les premières succès remontent aux années cinquante (50) avec CAMPBELL et ses collaborateurs. [30]

On utilise les polymères acidiqes tels que le carboxyméthyl cellulose et les sépharoses activées. [30]

2°/ Effecteurs : Peuvent être effecteurs (ligands fixes) toutes les substances capables de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant par surcroit, un groupement assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. [30]

3.3.4.2 Phase mobile : La phase mobile en chromatographie d'affinité joue différents rôles. [30]

Initialement, elle est constituée par un tampon additionné de substances dont le rôle est de protéger la liaison entre le ligand et le support. Le PH et la force ionique de l'éluant sont choisis de manière à éviter les interactions entre le support et les partenaires d'affinités. [30]

L'éluion est réalisée soit par un tampon de PH différent, induisant le changement de conformation de la protéine, soit par un milieu de force ionique donnée.

PARTIE II :
ETUDE EXPERIMENTALE

L'étude effectuée dans cette partie porte sur la séparation des protéines contenues dans les effluents des abattoirs par chromatographie liquide et ce, dans le but de contribuer par ce procédé à la valorisation des rejets à haute valeur nutritive.

Mais avant d'entamer le coeur même de la question, il importe d'effectuer une analyse qualitative et quantitative des rejets afin de déterminer la nature des principales protéines sériques présentes dans ces derniers et la proportion de chacune d'elles; ce qui nous permettra de porter un choix sur la méthode chromatographique à utiliser pour leur séparation.

1 Etude des rejets :

Les effluents de l'abattoir du Ruisseau, dans cette étude, consistent en général, après la saignée, en un mélange de sang d'ovins et de bovins.

* Recueil de l'effluent :

Le sang est recueilli dans un récipient aseptisé. Après addition d'un agent anti-microbien, de l'azide de sodium dans notre cas, la coagulation s'opère instantanément.

Le récipient peut être gardé pendant une nuit à une température de 4°C, le temps nécessaire à la formation totale du sérum.

* Préparation du sérum :

Le caillot de fibrine, conséquence de la coagulation, reste au fond du récipient, tandis que le sérum constitue le surnageant.

Ce sérum est de couleur rouge, traduisant une hémolyse. Il contient donc une certaine quantité de débris de globules rouges éclatés et quelques plaquettes sanguines qui seront facilement séparées du sérum par simple centrifugation. Cette opération est réalisée dans une centrifugeuse JOUAN, en opérant sous vide à une vitesse de 2500 tr/mn pendant 10 mn.

Le sérum est ensuite gardé à basse température jusqu'à son utilisation.

1.1 Analyse quantitative :

Cette analyse est basée sur la réaction du biuret, entre les liaisons polypeptidiques des protéines et le sulfate de cuivre en milieu alcalin. La coloration stable obtenue permet une mesure photométrique.

* Mode opératoire :

a- Préparation de la gamme :

Nous avons fait une dilution au dixième (1/10) du sérum étalon (Bovine Sérum Albumine : B.S.A)

Dans sept (7) tubes, nous avons réparti en ml :

	I	II	III	IV	V	VI	VII blanc
Sérum	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1	—
NaCl 9p.1000	0,50	0,40	0,30	0,20	0,10	0	1
Réactif de GORNALL	4	4	4	4	4	4	4

La coloration se développe en 30 mn à température du laboratoire à l'obscurité.

b- Mesure photométrique :

Elle se fait en cuve, en quartz, de dimension 10 X 10 mm à 540 nm en réglant le zéro sur le blanc.

c- courbe d'étalonnage :

La correspondance entre les tubes de la gamme et le taux de protides par litre se calcule de la façon suivante:

Si le sérum étalon contient par exemple 80 g p.1000

le tube I contient $\frac{80 \text{ mg} \times 0,50}{10(\text{dilution})} = 4 \text{ mg}$, ce qui correspond à 40g p.1000

le tube II contient $\frac{80 \text{ mg} \times 0,60}{10(\text{dilution})} = 4,8 \text{ mg}$ ce qui correspond à 48g p.1000

le tube III contient 5,6 mg et correspond à 56g p.1000

le tube IV contient 6,4 mg et correspond à 64g p.1000

le tube V contient 7,2 mg et correspond à 72g p.1000

le tube VI contient 8,0 mg et correspond à 80g p.1000

La courbe d'étalonnage peut ainsi être établie en inscrivant en abscisse directement les taux en g p.1000 correspondant aux densités optiques des différents tubes.

d- Dosage :

Dans deux tubes nous avons réparti en ml :

	Dosage	blanc
Sérum	0,1	—
Sérum physiologique à 9 p.1000	0,9	1
Réactif de GORNALL	4	4

Nous avons laissé la coloration se développer à l'obscurité, à température du laboratoire.

Le zéro est réglé sur le blanc puis la densité de l'échantillon est mesurée au spectrophomètre.

En reportant la densité optique lue pour le dosage sur la courbe d'étalonnage, on obtient directement de taux de protides en g p.1000

Réactif cuprotartrique de GORNALL :

Nous avons dissout séparément dans une petite quantité d'eau et mélangé dans l'ordre :

Sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	1,5 g
Tartrate double de potassium et de sodium	6,0 g
Soude exempte de carbonate	30,0 g
Iodure de potassium	1,0 g
Eau distillée	1000 ml

La solution a été conservée à l'obscurité.

1.2 Analyse qualitative :

Cette analyse est basée sur la migration des protéines dans un champ électrique d'après leur charge.

La technique utilisée est une électrophorèse sur cellogel en milieu basique. Les protéines placées dans ce milieu acquièrent ainsi une charge globale négative et migrent de la cathode vers l'anode. La migration est arrêtée dès que la séparation est suffisante.

1.3 Résultats :

1.3.1 Analyse quantitative:

Le taux des protéines totaux contenus dans le sérum est relativement élevé comme le laissait prévoir la bibliographie (Tableau 1.1), ce qui indique la richesse effective du rejet étudié avec un taux de 72g/l dans ce cas.

1.3.2 Analyse qualitative :

Le résultat de l'analyse qualitative est reporté sur le diagramme électrophorétique suivant :

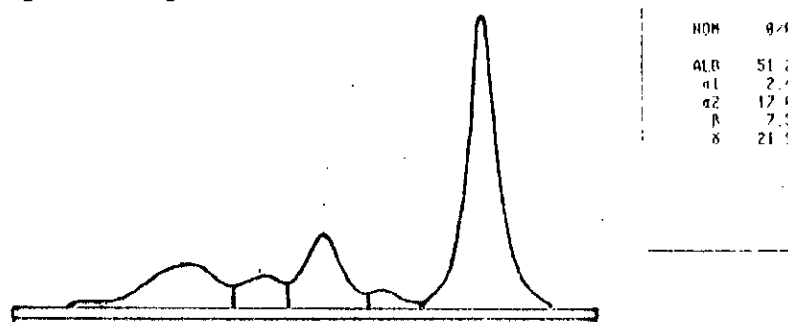


fig 1.1 Diagramme électrophorétique du rejet de l'abattoir

Ce diagramme illustre une composition normale en protéines sériques, avec les fractions sérum-albumine et gamma-globuline prédominantes, la première avec un pourcentage en masse de 51,2 %, la seconde avec un taux de 21,9 % de la masse totale des protides.

1.4 Conclusion :

Les fractions des protéines sériques les plus intéressantes à récupérer sont donc le sérum albumine et les gamma-globulines de part leur contribution dans la masse totale des protides rapportés à un litre d'effluent s'évaluant à 73,1 % soit 52,63g.

Ces deux fractions sont d'autant plus intéressantes que deux méthodes chromatographiques peuvent être employées à leurs récupération et séparation; l'une d'elle se basant sur la taille des molécules protéiques ou leur poids moléculaire représentée en la chromatographie d'exclusion stérique (sérum-albumine = 69 KDa; gamma-globulines = 150 KDa), l'autre se basant sur leur polarité, mise en évidence par l'électrophorèse. En effet, il apparait au cours de la migration que la sérum-albumine est plus négative que les gamma-globulines, ce qui était à prévoir étant donné que la première est une protéine acide avec un point isoélectrique de 4.6. [22]

2 Etude chromatographique :

Notre choix s'est arrêté sur deux méthodes de séparation : la filtration sur gel et la chromatographie d'échange d'ions; Dans les deux cas, le dispositif utilisé est illustré par la fig (2.1).

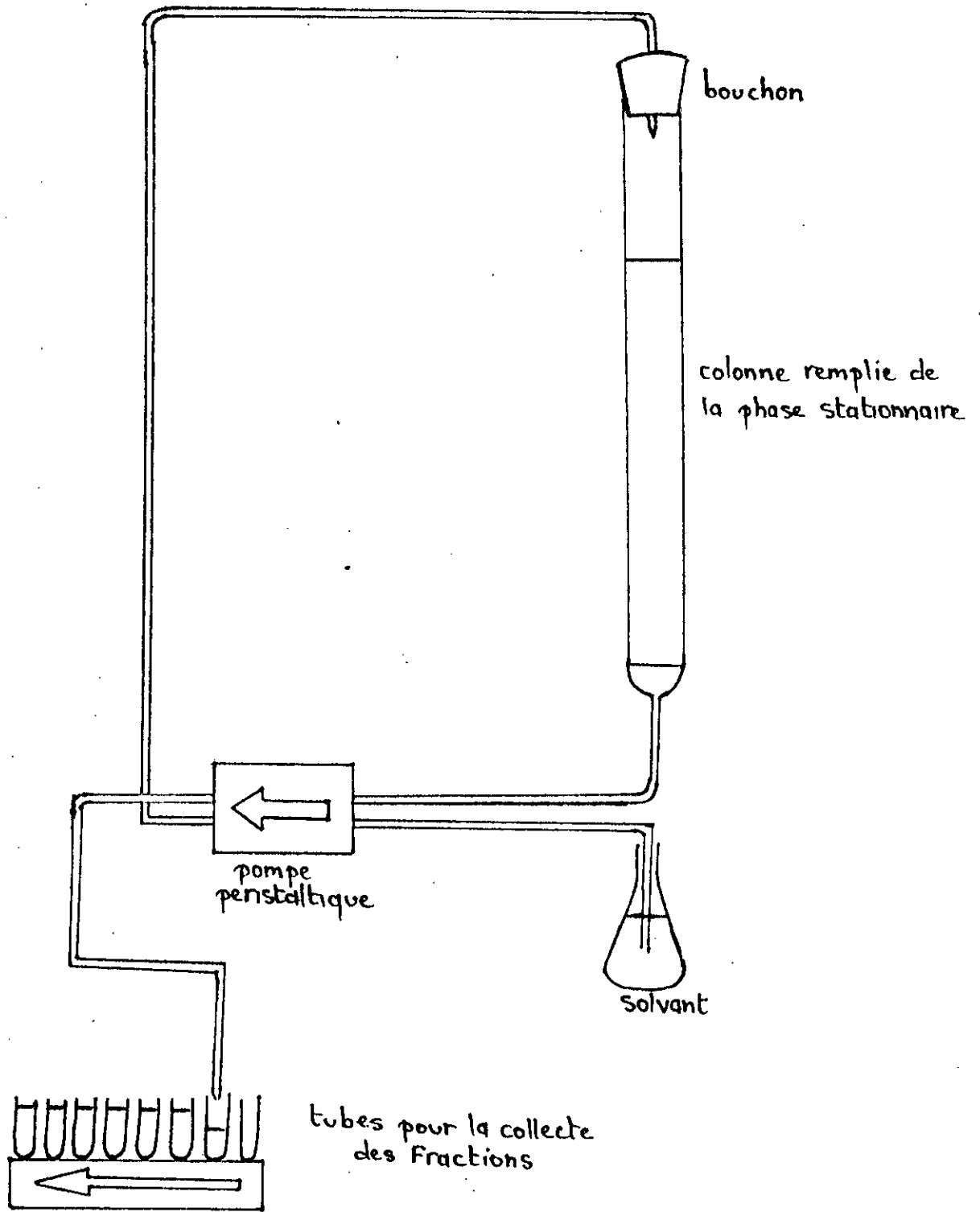


Fig 2.1.- Schema illustrant le dispositif experimental

2.1 La filtration sur gel :

Le gel utilisé dans cette séparation est le gel SEPHADEX G.200 fortement hydrophile dont les caractéristiques sont les suivantes : [26]

Produit	Zone de fractionnement efficace (KDalton)	Volume de gel par g.sec (ml)	Temps de gonflement(h) 20°C
SEPHADEX G.200	5 - 200	20 - 40	72

Les poids moléculaires respectifs des protéines qui nous intéressent se trouvent dans la zone de fractionnement donc ce gel est tout à fait indiqué pour leur séparation.

* Mode opératoire :

a- Préparation du gel :

Nous avons pesé la quantité nécessaire à une hauteur de colonne de 30cm pour un diamètre de 1,5cm ainsi qu'une quantité d'agents-anti microbien (NaN_3) à raison de 0.02g par dm^3 de gel.

La colonne utilisée est une colonne de la firme PHARMACIA-SEPHADEX, d'une hauteur totale de 50cm.

Le gel a été mis dans de l'eau distillée puis laissé gonfler pendant 3 jours.

Les fines particules sont décantées 2 à 3 fois dans l'eau, la dernière décantation se fait dans le tampon.

Ensuite, nous avons déposé le gel en plusieurs fois, s'aidant d'une pipette Pasteur qui doit toucher les parois de la colonne. Nous avons alors laissé le gel se stabiliser à l'intérieur de la colonne puis avons alimenté cette dernière en solvant, réglé le débit et la laissé s'équilibrer pendant une nuit à température du laboratoire. [27]

b- Préparation du solvant :

Le tampon consiste en un mélange de 0,1 M tris (hydroxyméthyl) aminométhane et 0,2 M de NaCl. Ce tampon est utilisé dans la purification des immunoglobulines. [27]

c- Le débit :

Le débit recommandé est de 70 ml/cm²/heure. [27]

Ce qui dans notre cas, revient à 0,033 ml/mn.

Il est délivré par une pompe Watson-Marlow modèle 503 U.

d- Dépôt de l'échantillon :

Le sérum est dilué au dixième et nous avons déposé un volume équivalent à 2 mg de protéines totales, à l'aide d'une pipette.

e- Recueil et lecture des fractions :

Les fractions ont été recueillies toutes les 10 mn et la lecture s'est faite à spectrophotomètre Milton ROY-Spectronic 1201 à 280 nm.

2.2 La chromatographie d'échange d'ions :

La phase stationnaire utilisée est un gel de Silice à phase greffée dont les caractéristiques sont les suivantes. [31]

Substrat	Groupements fonctionnels	Capacité ionique (pH=8)	Densité
Silice à larges pores	Amine primaire, secondaire, tertiaire	280 µEq /g	0,4 à 0,5g/ml

Ce gel est un échangeur d'anions faible.

*** Mode opératoire :**

Première séparation :

a- Préparation du gel :

Nous avons pesé une quantité de gel équivalente à une hauteur de colonne de 10 cm pour un diamètre de 2 cm.

La colonne utilisée dans ce cas est une colonne Normandie (France) Laboratoire d'une hauteur totale de .

Ce gel est ensuite trempé dans un volume 50:50 eau/méthanol puis déposé dans la colonne de la même façon que pour l'expérience précédente.

La colonne a été lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que tout le méthanol ait disparu, ce qui peut être facilement vérifié par une lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde supérieure à la fréquence de coupure du méthanol qui s'évalue à 205 nm. [24]

Le contre ion est par la suite placé en lavant la colonne avec le tampon contenant un sel et ce, à très faible débit pour que le gel soit bien imprégné.

L'excès de sel est alors éliminé par un lavage au tampon (seul) du gel avec un volume équivalent à 20 fois celui de la colonne. [31]

b- Préparation de la phase éluante :

Elle consiste en un mélange de 0,01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ à pH = 8 avec 1 M NaCl. [24;31]

c- Débit :

Nous l'avons choisi d'après les recommandations de la société AMICON-MATREX (31), à savoir 0,3 ml/mn

d- Préparation de l'échantillon :

L'échantillon est composé d'un mélange synthétique de protéines étalon, la B.S.A et les gamma-globulines, disponibles au niveau du laboratoire. Elles ont été diluées dans le tampon puis, nous avons déposé un volume équivalent à 10 mg de protéines totales.

e- Recueil et lecture des fractions :

Le recueil des fractions se fait à un intervalle de temps égal à 10 mn et la lecture se fait par spectrophotométrie à 280 nm

Deuxième séparation :

Les conditions opératoires sont identiques aux précédentes avec un apport de variations au niveau de la nature de la phase éluante et la quantité du dépôt.

a- Phase mobile :

Elle est constituée par 0,01 M de tris (hydroxy-méthyl) amino-méthane /HCl à pH = 8 [31], additionne de 0,05 M NaCl uniquement pour fixer le contre ion.

Après obtention du premier pic, nous avons ajouté au tampon 0,05 M de NaCl. [24]

b- Dépôt :

Nous avons déposé l'équivalent de 2 mg de protéines totales.

2.2 Résultats et interprétation :

Les résultats de l'étude chromatographique sont illustrés par les fig (2.1), fig (2.2), fig (2.3).

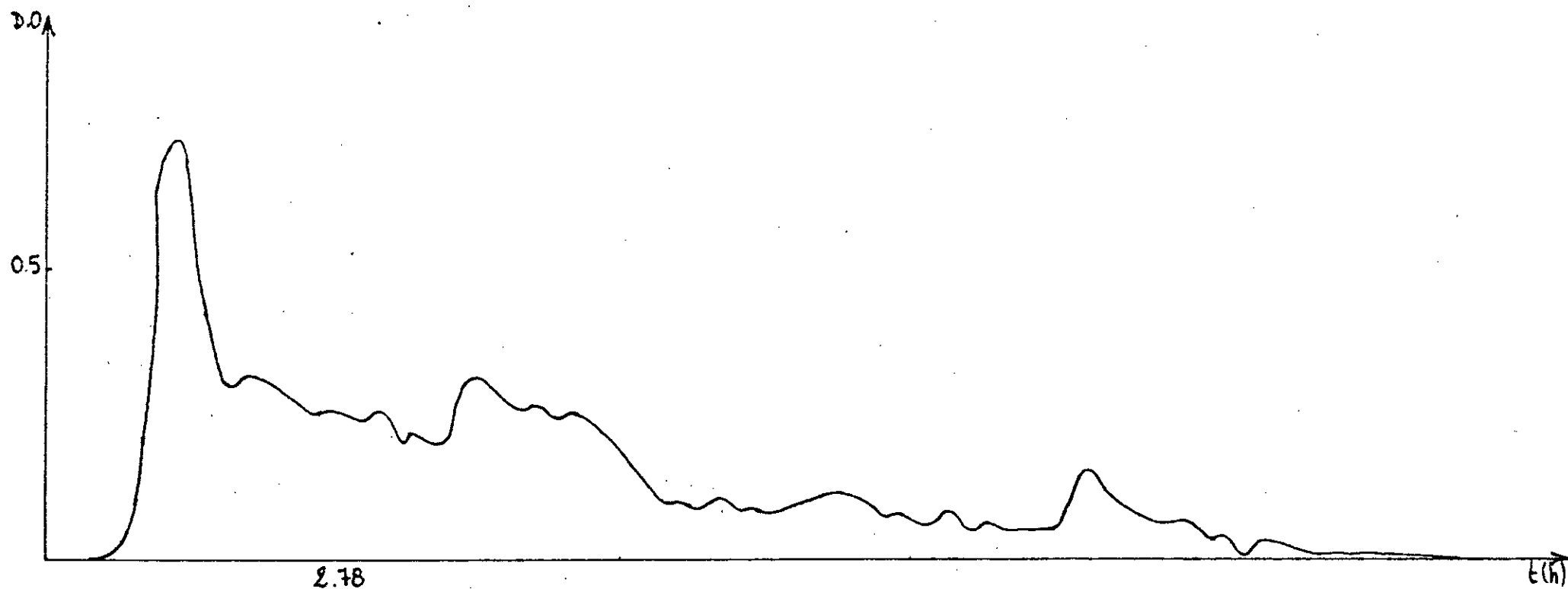


Fig 2.1 - Diagramme d'elution de serum ovin sur Sephadex G-200
Dimension du gel : 1.5 x 30 cm . Eluant : tampon tris - HCl 0.1M
contenant 0.2 M NaCl . Debit : 0.03 ml / mn . Echantillon : 2mg

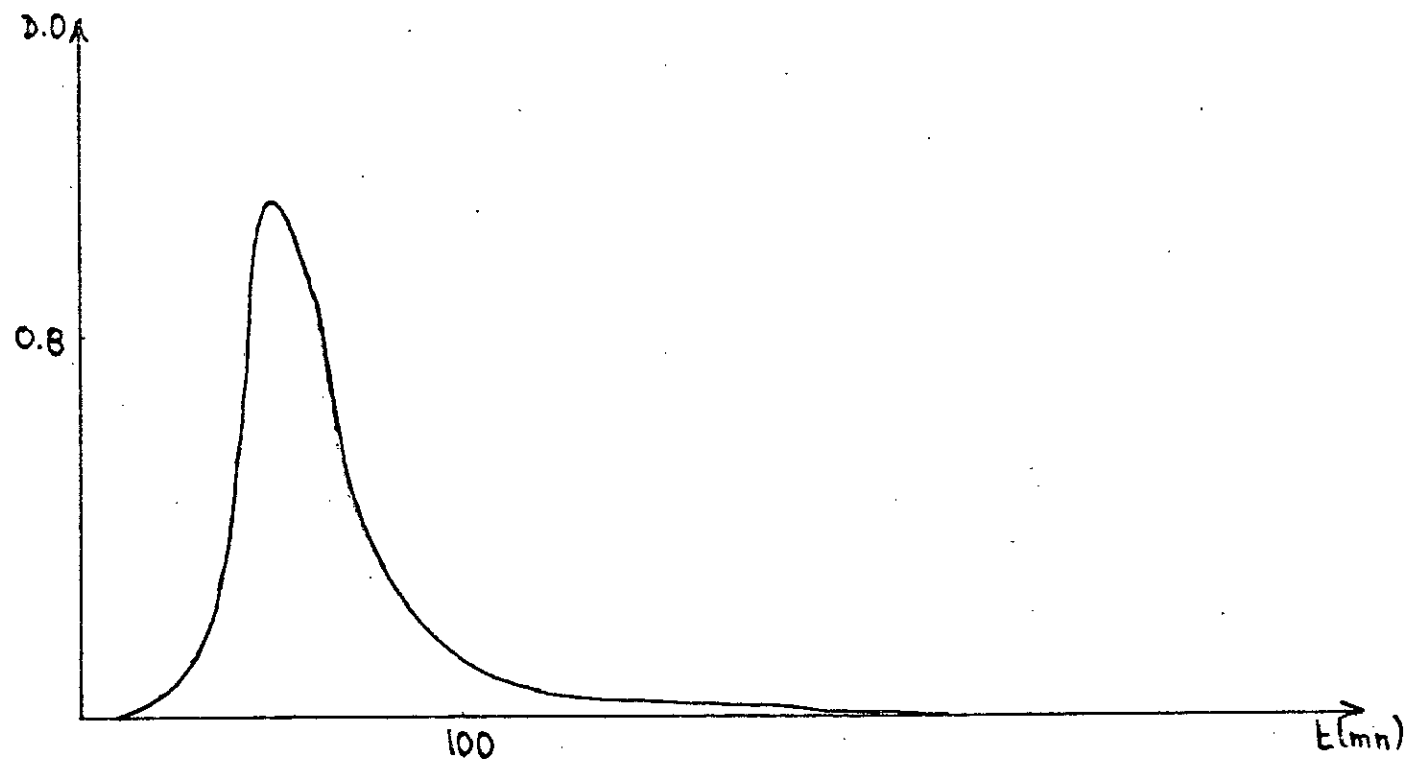


fig 2.2 - Diagramme d'élution d'un mélange artificiel des protéines
bovin serum albumine et gamma-globuline surgel de
Silice Amicon
Dimension du gel = 2×10 cm. Eluant : tampon phosphate $0.01M$
 $pH = 8$ contenant $1M$ de $NaCl$. Débit = $0.3 ml/mn$.
Echantillon = $10mg$

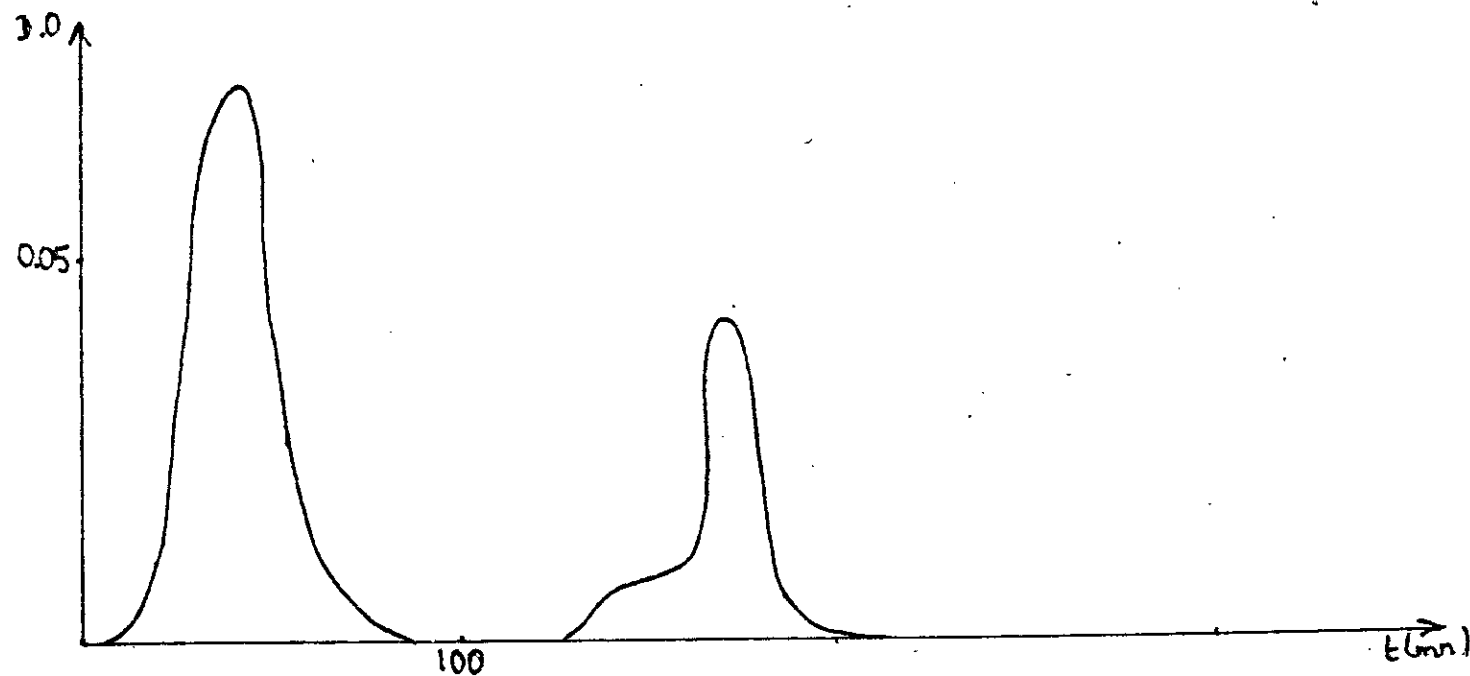


fig 2.3 - Diagramme d'elution d'un melange artificiel des proteines
 bovin serum albumine et gamma-globuline sur gel de
 Silice Amicon
 Dimension du gel : 2X10 cm . Eluant : tampon tris - HCl , 0.01M
 pH = 8 . Debit = 0.3ml / mn . Echantillon = 2mg

2.3.1 La filtration sur gel :

Le premier pic ne peut que correspondre aux gamma-globulines, vu qu'elles possèdent le poids moléculaire le plus élevé .

Le reste des chromatogramme est une suite de pics non identifiés car la courbe d'étallonnage permettant leur identification n'a pu être établi, les poids moléculaires des différentes protéines sériques étant donné sous forme d'intervalle. De plus, les autres protéines sériques ne sont pas disponibles sous forme étalon.

On remarque par contre l'absence d'un important pic qui devrait se situer à la fin du chromatogramme et représenter la sérum-albumine.

Cette absence pourrait être justifiée par l'élution progressive de cette protéine avec le reste de l'échantillon, le gel n'étant pas assez gonflé pour la garder dans ses pores.

Une autre hypothèse est envisageable, selon laquelle, la concentration en NaCl étant trop forte, le relargage des protéines serait probable.

2.3.2 La chromatographie d'échange d'ions :

Première séparation :

Un seul pic a été obtenu avec une densité optique maximale relativement importante.

Ce qui laisserait supposer que les deux protéines ont été éluées em même temps et que la séparation n'a donc pas pu avoir lieu.

L'explication que l'on pourrait donner à ce résultat négatif est la suivante : La concentration en NaCl étant importante, les contre ions chlorures accaparent les sites ionisables, les rendant inaccessibles aux protéines, provoquant ainsi leur élution immédiate.

L'hypothèse du relargage n'est pas négligé également, bien que l'on se trouve assez loin des points isoélectriques des protéines concernées.

Seconde séparation :

Le chromatogramme obtenu se compose de deux pics, assez éloignés l'un de l'autre; La séparation dans ce cas a pu être obtenue.

Le premier pic correspond aux gamma-globulines car ces dernières ne sont pas retenues à des pH supérieur à 6,5. [27]

Par filiation, le second correspond à la B.S.A.

3 Conclusion :

Les analyses quantitative et qualitative du rejet de l'abattoir du Ruisseau ont montré que l'effluent contenait 72 g/l de protéines et que les fractions les plus importantes contribuaient à raison de 73,1 % de la masse totale.

Ainsi, la mise en évidence de son importante valeur nutritionnelle nous à amener à réaliser des séparations par chromatographie liquide dans le but de la récupérer.

Pour se faire, le poids moléculaire des protéines les plus représentées dans l'effluent, c'est à dire la sérum-albumine et les gamma-globulines, ainsi que leur polarité ont été les critères sur lesquels s'est basé notre choix quant aux techniques à étudier : la filtration sur gel pour le premier et la chromatographie d'échange d'ions pour la second.

Par la première méthode, la séparation n'a pu être obtenue.

L'hypothèse avancée pour expliquer ce résultat négatif met en cause le gonflement mal réalisé du gel utilisé d'une part et le relargage des protéines par la forte concentration en sel du tampon d'autre part.

Par la seconde méthode, une première tentative de fractionnement des protéines, soldée par un échec, a permis de mettre en évidence les paramètres à modifier pour obtenir une bonne séparation à la seconde, dans un premier temps, évidemment.

Aussi, la concentration en sel dans le tampon a été réduite, ainsi que la quantité des protéines à déposer.

Ce qui nous a donc amenés à concentrer le tampon de 0,05 M en sel et ce, dans la fixation de l'ion compensateur, puis, à utiliser cette même concentration dès que le premier pic a été obtenu, pour augmenter la force ionique du solvant et hâter de ce fait, l'élution de la protéine restée fixée.

Quant à la quantité de protéines à déposer, elle a été réduite au cinquième soit 2 mg.

CONCLUSION

" Là où il y'a la lumière, il y'a aussi de l'ombre "

Goethe

Les objectifs assignés à cette étude, à savoir les analyses quantitative et qualitative des rejets d'abattoir et la séparation des principales fractions protéiques contenues dans l'effluent ont été atteints.

Au terme de cette étude, nous avons opté pour la chromatographie d'échange d'ions, utilisant comme phase stationnaire un gel industriel de la firme américaine MATREX-AMICON. Ce gel offre certains avantages représentés par une gamme variée de pH ainsi que de nature du tampon.

Malheureusement, le temps qui nous a été imparti ne nous a pas permis de pousser nos investigations plus loin que la détermination des conditions en vue d'obtenir un fractionnement des protéines d'une solution synthétique composée des principaux étalons. D'autre part, le procédé a montré la complexité du processus de séparation et la difficulté de la maîtrise totale des divers paramètres intervenant dans cette dernière.

De ce fait, notre étude constitue le premier maillon d'une longue chaîne de recherches aboutissant à l'optimisation et à la validation de la méthode de séparation de solutions beaucoup plus complexes que celle que l'on a utilisée. Elle a permis, néanmoins de mettre à jour les premiers paramètres qui pourraient constituer un centre d'intérêt pour les prochaines études, afin d'améliorer les résultats, tant sur le plan qualitatif que quantitatif, études qui devraient porter sur la question de voir une possibilité d'extrapolation du procédé chromatographique à échelle industrielle, accompagnée d'une étude économique représentative, ce qui, par ailleurs, permettrait de déterminer dans quelle mesure la chromatographie liquide contribue à la dépollution de l'environnement des rejets d'abattoirs et trouver un large domaine d'exploitation des produits récupérés.

ANNEXE

TECHNIQUE D'ELECTROPHORESE DES PROTEINES

* SUR CELLOGEL *

Principe : L'électrophorèse de zone est une technique très employée pour séparer les protéines d'après leur charge électrique.

Les protéines, molécules amphotères sont placées dans un milieu basique, elles acquièrent ainsi une charge globale négative et migrent de la cathode vers l'anode.

on obtient habituellement 5 zones ayant une charge décroissante :

- L'albumine.
- Alpha 1 globulines.
- Alpha 2 globulines.
- Beta globulines.
- gamma globulines.

Elles sont déplacées dans le cellogel sous l'influence du champ électrique, la migration est arrêtée dès que la séparation est suffisante. On effectue alors une fixation par colorant.

Technique :

Conserver le cellogel dans une solution de méthanol à 35 %.

1°/ Immerger le cellogel dans le tampon (200 ml par 3 membrane) pendant 15 mn minimum.

2°/ Sécher légèrement chaque membrane entre deux feuilles de papier filtre pour éliminer l'excès de tampon.

3°/ Reposer la face absorbante (Surface Mate) en plaçant le coin coupé en bas, à droite.

4°/ Placer la membrane sur le portoir Sebia.

5°/ Migration : pendant 32 mn à 200 volts.

6°/ Fin de migration : Arrêter le juivateur - déconnecter les cuves - Numérotter les bandes en utilisant le sérum comme marqueur.

7°/ Coloration : Présenter le face absorbante du cellogel contre le colorant (important) immerger et agiter immédiatement.

temps 5mn.

8°/ Décoloration : 3 ou 4 bains jusqu'à obtention d'un fond parfaitement blanc.

9°/ Transparence à froid :

a Déshydrater le cellogel dans un bain méthanol pur 3 à 5 mn.

b Immerger ensuite dans la solution de transparence 1mn à 1mn30 en agitant, étendre la membrane sur une plaque de verre très propre (face absorbante contre le verre). Eliminer rapidement les bulles d'air et laisser 1 H à température ambiante. (on peut accélérer le séchage et seulement après transparence totale, en plaçant les plaques de verre sur une source de chaleur : 50 - 60°C. Laissez refroidir avant de détacher les membranes.

10°/ Evaluation quantitative :

a lecture densitométrie.

b Elution : découper de cellogel "humide" et dissoudre les différentes fractions dans l'acetone pur.

(globulines dans 3 ml - albumine dans 9 ml)
lecture au photomètre - Rouge panceau 530 N.m;

BIBLIOGRAPHIE

- [1] O.Quebriac et C.Bourgeois, "Valorisation du sang animal", Ed.APRIA, 1985
- [2] B.Houlier, "Récolte et traitement du sang des abattoirs; description des procédés" Ed.Cemagref, 1987
- [3] M.Hegedüs, "Traditional and new concepts in protéine evaluation of feeds", Acta Veterinaria Hungarica, 1989
- [4] G.M Rios, E.Lapeze et J.L.Cup "Essais de fractionnement de protéines sur membrane minérale". Entropie N°152, p.58-64;1989
- [5] A.Maurel, "Osmose inverse et ultrafiltration: considérations théoriques" , année ?
- [6] D.Mameri, cours de biochimie , 4ième année, 1991
- [7] J.Lavollay, "La chimie des êtres vivants" Ed ,1970
- [8] H.A.Harper, Y.W Rodwell et P.A Mayes, "Précis de biochimie", Ed.Presse de l'Université; Laval(1982)
- [9] C.Kessous, "Biochimie générale". O.P.U, 1987
- [10] F.Weil, "Biochimie générale", Ed.Masson, 1974
- [11] J.Barry et E.M.Barry, "Eléments de biochimie structurale", Ed.Masson, 1971
- [12] K.Kruh, "Biochime: étude médicale et bioligique".Tome 1, Ed.Masson, 1985
- [13] A.Foudil, "Hydrolyse enzymatique des déchets solides d'abattoirs", P.F.E, 1992
- [14] Dictionnaire médical LAROUSSE, 1986
- [15] E.Chapeville, "Biochime", Ed.Flammarion, 1974

[16] C.Audigié, G.Dupont et F.Zonsgain, "principes des méthodes d'analyse biochimique"

[17] K.Heide et H.G Schwick, "Salt fractionation of immunoglobuline", chapitre 7, Blackwell publication, 1978

[18] P.luiso t, "Biochimie générale et médicale" Ed.Simep, 1983

[19] M.Debatisse, "Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires". Vo.2 , Ed Apria, Paris, 1981.

[20] F.Percheron, "Abrégé de biochimie générale", Tome 1, Ed Masson, 1980

[21] N.Simonnot, G.Grevillot, M Bailly "Chromatographie d'échange d'ions des protéines : mode phénoménologique du comportement acido basique de l'albumine". Lavoisier ; P.179.184, 1991
Récents progrès en génie des procédés. Vol 6

[22] M.Y.Jaffrin; J.P.Charrier "Optimisation of albumine production by U.F".
Lavoisier p.299-303, 1992

[23] J.F.Bach, "Immunologie", Ed. Flammarion, 1979

[24] R.W.Yost, L.S.Ettre et R.D.Conlon "Pratique de la chromatographie liquide".
Ed

[25] A.Berthillier "chromatographie et ses applications".
Ed Dunod, 1972

[26] J.M.Frere; C.Gerday "Les méthodes de purification et d'analyse des protéines", Ed. Masson, 1981

[27] D.M.Weir "HANDBOOK of experimental immunology".
Scientific publication, 1978

[28] "Manuel de travail pour chromatographie d'échange d'ion".
SEPHADEX

[29] K.H.Altgelt, "Gel permeation chromatography",
Ed Altgelt, 1971

[30] "chromatography affinity". SEPHADEX

[31] Fiche technique d'utilisation du gel matrex. AMICON