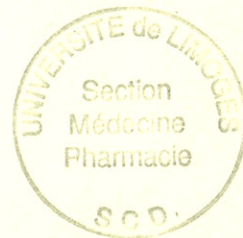


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



SCD UNIV.LIMOGES



D 035 147870 9

**FRACTIONNEMENT DE PEPTIDES ISSUS D'HYDROLYSATS
DE PROTEINES DE COLZA
PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE
A BASSE PRESSION**

THESE 348 / 1

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 décembre 2004

pour l'obtention du

Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Morad EL GUEDDARI**

né le 21 juillet 1979

Membres du jury

Président-directeur : **M. Philippe CARDOT**....Professeur à la faculté de Pharmacie de Limoges

Juges : **M. Ivan MARC**.....Directeur de recherche CNRS, ENSIC, INPL (Nancy)

M. Serge BATTU.....Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Limoges

M. Olivier ZAMBON.....Auditeur industriel

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

ODART Nicole

PHARMACODYNAMIE

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOMATHEMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée au LABORATOIRE DES SCIENCES DU GENIE CHIMIQUE - GROUPE GENIE DES PROCÉDES BIOTECHNOLOGIQUES ET ALIMENTAIRES (Nancy) sous la direction de Mme. Christelle HARSCOAT et de M. Ivan MARC.

REMERCIEMENTS

A mes juges,

M. **Philippe Cardot**, professeur de chimie analytique d'exception dont j'apprécie les qualités humaines et le professionnalisme et qui me fait l'honneur de présider ce jury. Trouvez ici l'expression de ma plus sincère amitié car si j'en suis là c'est en grande partie grâce à vous.

M. **Ivan Marc** qui me fait l'honneur d'encadrer les travaux de cette thèse. Pour votre accueil, votre aide et votre bonne humeur, je tiens à vous adresser mes plus sincères remerciements.

M. **Serge Battu** qui me fait l'honneur de juger ce travail aujourd'hui. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance pour vos remarques et votre franc parler.

M. **Olivier Zambon** qui me fait l'honneur de juger ce travail aujourd'hui. Merci de ta présence et surtout de ton amitié.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire LSGC-GPBA et tout particulièrement Mme. Christelle HARSCOAT et M. Xavier FRAMBOISIER pour leur patience, leur disponibilité et leur amitié.

A mes camarades de la filière Pharma Plus,

Aline, Audrey, Christine, Fouad, Julie, Loic, Mickaël, Nicolas, Samd, Zaza et Zyrille.

A ma ville de cœur Nancy,

Clarinette, July, Mon pierro, Cyril R, Arnaud & Clémence, mon super coloc Nico & Christine, Petite Sev & son doudou, grande Alex, Anneka, Mike & Eli, Lolo, Audrey & le gros, Estelle & Alex, Fatima, Aurélie G, Marilyne , Marilo, Aurélie M, Pauline, Manu & Adeline, Noëlle, Damien, Amélie, Laure... Vous m'avez accueilli dans vos vies, vous faites maintenant partie de la mienne. Je ne vous oublierai jamais.

A mes ami(e)s,

Ma promo Pharmacie Limoges & Nancy, équipe de la pharmacie Daron que j'adore, QC Lab Invanz version 2003, équipe du CAV, François B & Ingrid, Maître Guillaume D, Granguy, TOC, Pierre Boss, Colt, Cecile C & Delphine B du département achat, Laurent Coudrier & J. S. Bach, Laurent Camus un ami en or, Elodie & Stéphane, Saïd & Nadia et toute la petite famille, Mme Tabbaza et tout le petit monde de la pharmacie, sublime Emilie Sagarzazu, Audrey P. & Michel, Lia et Stéphane, Aurélie Vedrenne adorée, Marie Bonnetblanc, Marie-Charlotte D, incroyable Nasslie, Ol, le poup & Emilie, Dr Parini, Pharmacie Badoc, Hélène P, Sanae, guapa Sylvia, Sergio, Nini (brillantissime frère du Wiwi), Sochate M., Habibe B, Stéphanie D, Olivier dit Toulouse, Claire André - Julie Barthe - Pierre Schmuck - Cyril Rollet - Arnaud Cristinelli je vous aime, pouet-pouet & l'OM (c'est pour toi le Yo que je fais ça !), Marie sœur de la fouine, Mour la classe, l'acro (désolé !!!), équipe de rugby de St Amant-Tallande, Neuvic d'Ussel, Simona Angela Acatincai te sarut, la ZUP de Laurence, Arnaud Laurent, Daniel Emeli, Nathalie R, Zyril & Caro, Samd & sa petite famille, El tiranos Loic & Emilie, Carlo (Beira mar), Wakidou, M. Fatimi merci d'avoir cru en moi, M. Philippe Cardot le phénomène, Olivier Zambon et rza! ti Fatima M.

A ma famille, à ma mère de lait et au Maroc.

Astier Yoann, Bennouar Hadj, Besson Frédéric, Depierre François, Dussel Florent, Maazi Wissam, Rongier Florian et Sudrot Gaëtan. Plus qu'une amitié, vous faites partie de ma vie, vous êtes tout simplement ma seconde famille.

Papa, Mama,

Vous avez quitté le Maroc, ce pays qu'est le votre pour la France

Vous avez quitté le Maroc, ce pays qu'est le votre pour fonder une famille à l'avenir meilleur,

Vous avez quitté le Maroc, ce pays qu'est le votre pour Nadia, Asmae, Adnane, Majda et moi,

Aujourd'hui, voici le premier fruit de l'ensemble de vos sacrifices.

Aujourd'hui, papa et mama vous êtes Docteur en Pharmacie.

Ce titre est le votre et vous reviens tout naturellement de droit. Je vous aime.

"Travail avec ta tête aujourd'hui, si tu ne veux pas travailler avec tes mains demain"

Abdellah EL GUEDDARI, ouvrier

Nadia, Asmae, Majda, Adnane,

votre grand frère vous aime du fond du cœur, je serais toujours là.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
---------------------	----------

INTRODUCTION	3
---------------------	----------

Partie 1: Le colza	.
---------------------------	----------

I. Utilisation du colza	6
--------------------------------	----------

I.1. L'huile de colza	7
-----------------------	---

I.1.1. Extraction de l'huile de colza	7
---------------------------------------	---

I.1.2. Utilisation de l'huile de colza	9
--	---

I.2. Les tourteaux de colza	11
-----------------------------	----

I.2.1. Matières premières de l'alimentation animale	11
---	----

I.2.2. Valorisation des tourteaux de colza	12
--	----

II. Les hydrolysats de protéines de colza	12
--	-----------

II.1. Nature des protéines de colza	12
-------------------------------------	----

II.1.1. La fraction globuline	14
-------------------------------	----

II.1.2. La fraction albumine	14
------------------------------	----

II.1.3. Les autres protéines du colza	15
---------------------------------------	----

II.2. De la protéine aux hydrolysats	15
--------------------------------------	----

II.2.1. Extraction des protéines de colza	15
---	----

II.2.2. Hydrolyse enzymatique des protéines	17
---	----

II.3. Intérêt des hydrolysats de protéines de colza	19
---	----

II.3.1. Intérêt nutritionnel	19
------------------------------	----

II.3.2. Intérêt technologique	19
-------------------------------	----

Partie 2 : La chromatographie d'exclusion stérique _____

I.	La chromatographie liquide haute performance _____	22
II.	Principe de la chromatographie d'exclusion stérique _____	23
	II.1. La phase stationnaire : le gel _____	24
	II.1.1. Notion de gel – transition sol-gel _____	24
	II.1.2. Les différentes natures de gel _____	26
	II.2. La phase mobile _____	28
	II.3. Théorie sur la ségrégation chromatographique _____	28
III.	Paramètres d'élution _____	30
	III.1. Le volume d'élution V_e _____	30
	III.2. Le coefficient de diffusion K_d _____	32
IV.	Etude des performances de la colonne _____	35
	IV.1. Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique _____	35
	IV.1.1. Détermination expérimentale de la HEPT _____	35
	IV.1.2. Paramètres contrôlant l'efficacité d'une colonne _____	36
	IV.1.3. Etalonnage "absolu" selon la HEPT _____	39
	IV.2. Résolution de la séparation _____	41

Partie 3 : Etudes expérimentales _____

A- Matériel & Méthodes

I.	Obtention des échantillons peptidiques	45
I.1.	Préparation du concentrat protéique	46
I.2.	Hydrolyse enzymatique	46
I.3.	Précipitation et ultrafiltration des hydrolysats	47
II.	Fractionnement des hydrolysats peptidiques	48
II.1.	Réactifs	48
II.2.	Matériel	48
II.3.	Préparation de la colonne chromatographique	49
II.4.	Montage expérimental	51
III.	Le gel de polyacrylamide : Bio-Gel® P	52
IV.	Détecteur : le réfractomètre différentiel	53
IV.1.	Le système optique	53
IV.2.	Mesure du signal en sortie du réfractomètre	54
V.	Kit de calibration de la colonne : les polymères	55
V.1.	Mesure des tailles moléculaires	55
V.1.1.	La taille moléculaire en nombre : Mn	56
V.1.2.	La taille moléculaire en poids : Mp ou Mw	57

V.1.3. L'indice de polydispersité : I	57
V.2. Les pullulanes	57
V.3. Les Poly-éthylènes Glycol	58

B- Résultats & Discussion

I. Paramètres d'éluion d'un soluté	61
I.1. Détermination des volumes de la colonne	62
I.2. Répétabilité	63
II. Etalonnage de la colonne selon le volume d'éluion	64
II.1. Paramètres responsables du fractionnement	64
II.2. Analyse d'échantillons peptidiques	67
II.2.1. Peptides élués avec le volume mort de la colonne	70
II.2.2. Peptides et droite de calibration des PEG	73
II.2.3. Peptides et droite de calibration des pullulanes	75
II.2.4. Peptides "particuliers"	76
II.2.5. Discussion	78
III. Etalonnage selon le coefficient de diffusion	79
CONCLUSION	84
TABLE DES ILLUSTRATIONS	86
ANNEXES	89
BIBLIOGRAPHIE	97

ABREVIATIONS

A	Coefficient de diffusion de turbulence
B	Coefficient de diffusion longitudinale
C _m	Coefficient de transfert de masse pour la phase mobile
C _s	Coefficient de transfert de masse pour la phase stationnaire
D	Nombre global de dispersion
Da	Daltons (1kD = 1000 Da)
DH	Degré d'hydrolyse
D _m	Diffusivité moléculaire du soluté (cm ² /s)
dp	Diamètre des particules du support (μm)
E	Enzyme
h	Hauteur réduite équivalente à un plateau théorique
<i>h_{tot}</i>	Nombre total de liaisons peptidiques
<i>h</i>	Nombre de liaisons peptidiques clivées
ha	Hectare
HEPT ou H	Hauteur équivalente à un plateau théorique (cm)
IR	Indice de réfraction
k	Constante de vitesse
k'	Facteur de capacité
K	Coefficient de partage
K _d	Coefficient de distribution
L	Hauteur de la colonne (cm)
M	Masse molaire (g/mol)
MM	Masse moléculaire (Da)
Mn	Taille moléculaire en nombre (Da)
Mp ou Mw	Taille moléculaire en poids (Da)
N	Nombre de plateaux théoriques d'une colonne chromatographique
pI	Point isoélectrique
S	Substrat
S	Unité Svedberg
Tr	Temps de rétention du soluté (s)

u	Unité de masse atomique (1u = 1dalton)
U	Vitesse interstitielle moyenne de la phase mobile (cm/s)
u	Vitesse réduite
V_0	Volume de solvant interstitiel (mL)
V_e	Volume d'élution (mL)
V_i	Volume de solvant présent à l'intérieur des particules de gel (mL)
V_m	Volume occupé par la matrice gel (mL)
V_t	Volume totale de la colonne (mL)
W	Largeur d'un pic chromatographique (cm)
λ	Facteur de proportionnalité du coefficient de diffusion turbulente ($\lambda \approx \frac{1}{11}$)
Φ	Facteur de tortuosité ($\Phi = 2/3$)

Ala	(A)	Alanine
Arg	(R)	Arginine
Asn	(N)	Asparagine
Asp	(D)	Acide aspartique
Cys	(C)	Cystéine
Gln	(Q)	Glutamine
Glu	(E)	Acide glutamique
Gly	(G)	Glycine
His	(H)	Histidine
Ileu	(I)	Isoleucine
Leu	(L)	Leucine
Lys	(K)	Lysine
Met	(M)	Méthionine
Phe	(F)	Phénylalanine
Pro	(P)	Proline
Ser	(S)	Sérine
Thr	(T)	Thréonine
Trp	(W)	Tryptophane
Tyr	(Y)	Tyrosine
Val	(V)	Valine

INTRODUCTION

Parmi les sources de protéines végétales, et vu l'accroissement de sa production, le colza s'avère être une source incontournable. En Europe et en France, le colza occupe le premier rang des surfaces cultivées. Leur intérêt d'application dans le domaine de l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique repose sur leurs propriétés gélifiantes, émulsifiantes, antioxydantes et nutritionnelles.

Cette étude s'inscrit dans le cadre du développement d'une action plus large visant à maîtriser le fractionnement de peptides issus d'hydrolysats de protéines de colza par différentes techniques séparatives s'appuyant sur des propriétés physico-chimiques variées, dans le but d'étudier les effets nutritionnels et biofonctionnels de ces fractions peptidiques.

L'objectif est d'appréhender la technique de chromatographie d'exclusion stérique à basse pression et de valider ses caractéristiques séparatives en vue d'une utilisation sélective basée sur la distribution des tailles moléculaires. Couplée à d'autres techniques séparatives, cette technique pourrait conduire à l'obtention de fractions à propriétés ciblées en vue d'applications variées particulièrement dans les domaines de la santé et des cosmétiques.

Chromatographie d'exclusion stérique (Size exclusion chromatography), Chromatographie de perméation de gel (Gel permeation chromatography), Chromatographie de filtration sur gel (Gel filtration chromatography), l'ensemble de ces désignations traduit un seul et même phénomène, celui de la rétention sélective de molécules suivant leur taille, au travers d'une matrice constituée d'un gel. La particularité de cette technique analytique réside dans l'absence, théorique, d'interactions physico-chimiques entre la phase stationnaire gel et le soluté ; a priori, la taille de la molécule est l'unique critère de séparation.

Dans la réalité, malgré les spécifications fournies par les fabricants de supports chromatographiques, il semble fort peu probable que le seul effet de la taille moléculaire soit l'élément discriminant de la séparation. C'est pourquoi, il est nécessaire d'étudier la qualité et

l'efficacité de la séparation de mélanges complexes de peptides dont l'une des caractéristiques réside dans la variété de composition pour une masse ou une taille moléculaire donnée.

Le but de ce travail est de valider les propriétés de séparation d'une colonne chromatographique d'exclusion stérique permettant de séparer des molécules de 100 Da à 1800 Da ; pour cela, deux kits d'étalonnage seront employés, l'un à base de poly-éthylène glycol (PEG) et l'autre constitué de pullulanes. Ceci conduira à établir un protocole d'étalonnage et à déterminer si les peptides, de taille et de composition différentes, répondent aux critères de ségrégation préconisés par le fabricant. Les résultats seront observés et quantifiés au regard de l'utilisation de données présentes et de travaux antérieurs, afin de vérifier l'efficacité de la démarche.



Partie 1

Le colza

Brassica napus L. variété *oleifera* Metzg. est l'hybride naturel d'un chou et d'un navet ; il fait partie de la famille des Brassicacées. Son nom est originaire du hollandais "Kolzaad" signifiant graine de chou. L'intérêt du colza repose essentiellement sur l'emploi alimentaire de son huile et de son tourteau. Mais depuis quelques années, un intérêt technologique croissant est né de la valorisation des protéines présentes dans le tourteau.

I. Utilisation du colza

En Europe, les surfaces consacrées aux graines oléagineuses sont estimées à 5,4 millions ha en 2000/2001, dont 3 millions ha (56 % des surfaces) pour le colza ; vient ensuite le tournesol avec 2 millions ha (37 % des surfaces), le soja n'occupe que 340 000 ha (7 % des surfaces). La France est le premier producteur européen de graines oléagineuses, avec 5,7 millions de tonnes en 2000/2001, devant l'Allemagne (3,6 millions de tonnes) et l'Italie (1,3 millions de tonnes).

En France, la culture de colza, qui ne couvrait que 50 000 ha en 1960, occupe actuellement plus de 900 000 ha. Le colza est actuellement la première ressource oléagineuse française [1].

Cet intérêt croissant pour la culture de colza s'explique par les avantages que présente cette culture facilement intégrable dans les assolements céréaliers et surtout par sa capacité à générer une quantité importante de sous-produits valorisables.

Après avoir été mis en cause dans l'induction de pathologies cardiaques, le colza a beaucoup évolué ces 20 dernières années. Il est devenu un centre d'intérêt pour les sélectionneurs qui l'ont transformé en colza "0" puis en colza "00", colza dépourvu des composés toxiques que sont l'acide érucique et les glucosinolates (hétérosides soufrés). Cette variété "00" a permis de développer les intérêts du colza [Le Page et al. , 1992].

La principale utilisation du colza est son huile, elle est principalement employée dans le domaine de l'alimentation humaine. L'extraction par pression de l'huile fournit un tourteau, co-produit utilisé pour l'alimentation animale.

1.1. L'huile de colza

La principale utilisation des cultures de colza est la production d'huile, elle est essentiellement employée dans le domaine de l'alimentation humaine. Elle est également utilisée dans l'industrie (peintures, lubrifiants, cosmétiques...). Plus récemment, cette huile est employée, de façon croissante, pour la production de biocarburants.

1.1.1. Extraction de l'huile de colza

Les graines de colza se composent essentiellement de lipides et de protéines (**Tableau 1**). La composition de la graine dépend de l'espèce considérée. Il existe plus de 3000 variétés dont les plus répandues sont *Brassica campestris*, colza d'été très répandu au Canada, et *Brassica napus*, colza d'hiver très présent en Europe.

Tableau 1. Composition de la graine de colza non décortiquée [Bohl, 1998].

Protéines	23 %
Lipides	40 - 47 %
Humidité	10 %

Le passage de la graine de colza à l'huile se décompose en trois étapes [**Colin, 1992**] :

1/ Pression à froid

Le traitement de base de la graine de colza est la trituration. Elle se décompose en cinq étapes (**Figure 1**): le tri et le nettoyage des graines, le dépelliculage visant à enrichir le tourteau en protéines et à l'appauvrir en cellulose, l'aplatissage ou floconnage et, enfin, la cuisson suivie de la pression. Cette opération de trituration vise à obtenir l'huile brute de pression et les tourteaux gras.

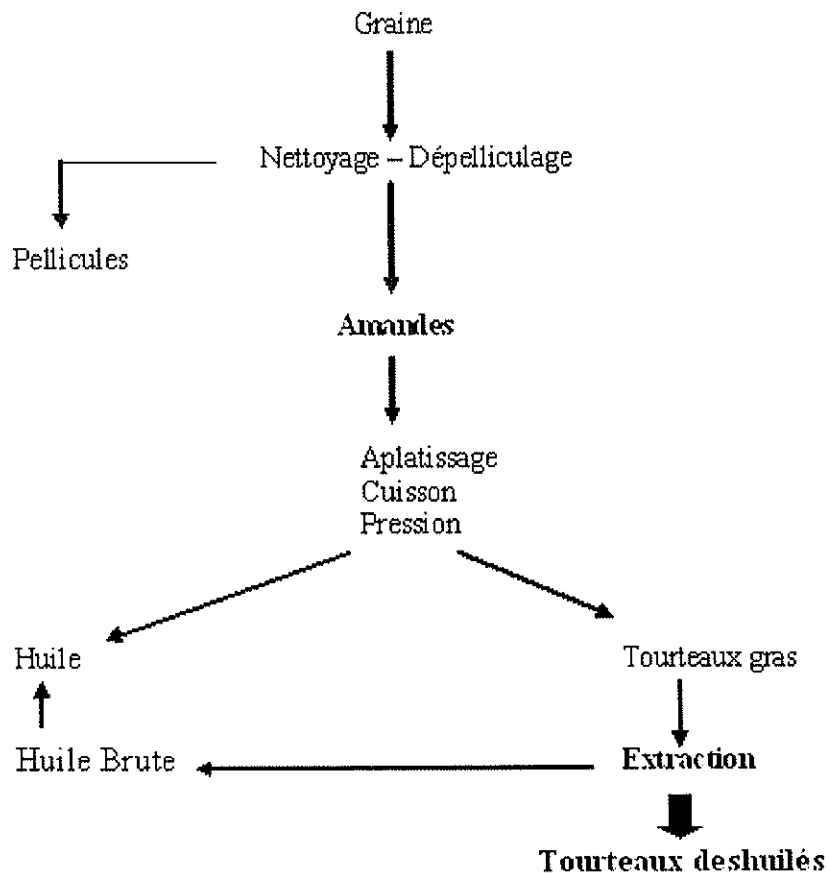


Figure 1. Principe de transformation des graines de colza [Baudet et al. , 1988].

2/ Extraction de l'huile résiduelle

L'huile résiduelle sera extraite par un solvant apolaire de qualité alimentaire.

3/ Raffinage

L'huile brute, constituée de 95 % de triglycérides (triacyl-glycérols), sera raffinée pour éliminer les impuretés et être utilisable comme huile comestible.

I.1.2. Utilisation de l'huile de colza

- **Les qualités nutritionnelles de l'huile de colza [1]**

En matière d'huile alimentaire, l'huile de colza comporte un très bon profil en acides gras :

- 8 % d'acides gras saturés,
- 60 % d'acides gras monoinsaturés, dont 58 % d'acide oléique que l'on trouve aussi dans l'huile d'olive,
- 32 % d'acides gras poly-insaturés dont 23 % d'acide linoléique, précurseur de la famille des acides gras oméga 6 et 9 % d'acide alpha linoléique, précurseur de la famille des acides gras oméga 3 (Tableau 2).

Tableau 2. Importance des acides gras Omega 6 et Omega 3 pour la santé [Lorgeril et al. , 1994]

	OMEGA 6	OMEGA 3
Régulation de la lipémie	Baisse de la cholestérolémie	Baisse de la triglycéridémie
Coagulation sanguine (Fonction plaquettaire)	Effet pro-agrégant	Régulation de l'effet pro-agrégant
Autres fonctions	Fonction reproductrice Intégrité de l'épiderme Fonction immunitaire et réponse inflammatoire	Régulation de la fonction immunitaire et de la réponse inflammatoire. Fonctionnement du système nerveux (composition des membranes nerveuses)

L'intérêt des nutritionnistes pour l'huile de colza se justifie, d'une part par la faible teneur en acides gras saturés, cette huile est alors intéressante sur le plan diététique pour compenser l'apport excédentaire d'acides gras saturés présents sous forme de graisses cachées dans l'alimentation ; d'autre part, les deux acides gras poly-insaturés, linoléique et alpha

linoléique sont indispensables à la vie, ils doivent obligatoirement être fournis par l'alimentation, ils sont dits "essentiels".

- **Huile alimentaire**

Le débouché premier de l'huile de colza concerne l'industrie alimentaire (mayonnaises et sauces émulsionnées, biscuiterie, biscotterie...). L'utilisation directe de l'huile de colza par le consommateur vient en deuxième position.

- **Production de biocarburant : le Diester® [1]**

L'huile subit une estérification par le méthanol, la réaction donne lieu à un ester méthylique et du glycérol. Cet ester méthylique est plus connu sous le nom de Diester®.

Le Diester® est destiné à être incorporé dans le gazole, sans modification des moteurs et ni correction de l'injection, afin de lutter contre la pollution urbaine provoquée par les transports. Il réduit les émissions de particules (-20 %), de monoxyde de carbone (-15 %), et de composés toxiques (benzène, hydrocarbures imbrûlés). De plus, sa biodégradabilité rapide et importante (98 % en 21 jours) fait de l'huile de colza un composant propre pour l'environnement.

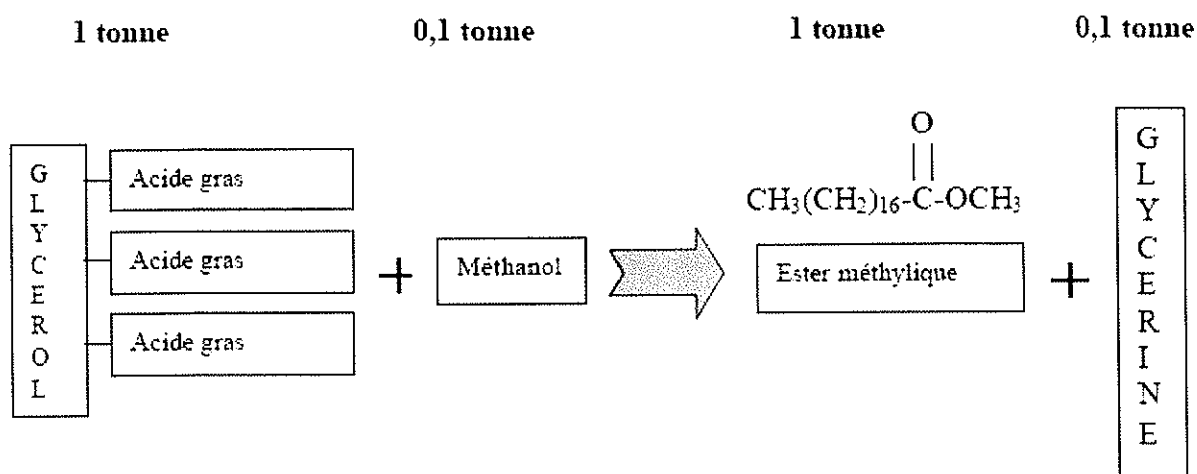


Figure 2. Procédé de fabrication du Diester® [1].

1.2. Les tourteaux de colza

Le tourteau est un co-produit de l'industrie huilière, il est obtenu après trituration et extraction de l'huile brute (**Figure 1, p.7**). Il est composé principalement de protéines et de glucides (**Tableau 3**).

Tableau 3. Composition du tourteau de colza [Bohl, 1998].

Protéines	30 - 38 %
Lipides	1,5%
Glucides	30 - 35 %
Cellulose	13 %
Cendres	6 - 8 %
Humidité	10 %

1.2.1. Matières premières de l'alimentation animale

Actuellement le tourteau de colza est essentiellement utilisé en alimentation animale (mono et poly-gastrique, volaille), il en représente la principale source de protéines. La raison pour laquelle le colza n'a pas été initialement utilisé dans le domaine de l'alimentation humaine et animale est due à la présence des composés toxiques, acide érucique et glucosinolates (hétérosides soufrés) [**Baudet et al. , 1988**] :

- L'acide érucique (50% des acides gras totaux), est un acide gras soupçonné de provoquer des maladies cardio-vasculaires.
- Les glucosinolates sont des substances goitrigènes, elles provoquent un blocage de la glande thyroïde par non fixation d'iode entraînant ainsi une hypertrophie de la thyroïde et par conséquent un retard voir un arrêt de la croissance chez les animaux qui consomment ces tourteaux.

Dès lors, les travaux se sont concentrés sur l'étude de l'élimination de ces composés. La première variété "0", apparue à la fin des années 60, est une variété de colza à faible teneur en acide érucique. La variété "00" est apparue au début des années 80, c'est une variété de colza sans acide érucique et à faible teneur en glucosinolates, cette variété "00" a permis d'améliorer considérablement la qualité des tourteaux dans l'alimentation animale.

I.2.2. Valorisation des tourteaux de colza

L'utilisation des tourteaux a été très longtemps basée sur son utilisation sans modification, comme fertilisant à effet insecticide et fongicide suite à la présence de glucosinolates et comme absorbant de contaminants (hydrocarbures ou métaux lourds). Mais depuis quelques années, la valorisation des tourteaux de colza a pris une autre ampleur, elle concerne leur potentiel protéagineux.

Les protéines, composés les plus abondants du tourteau, pourraient être utilisées comme complément protéique à l'alimentation animale ou humaine, et des fractions peptidiques à propriétés spécifiques pourraient être identifiées et isolées (adhésif, détergent, émulsifiant, agent mouillant...). Face à cette perspective des programmes de valorisation des protéines du tourteau se développent dans de nombreux domaines tels que l'alimentaire, la pharmacie et la cosmétique [Lemarié et al. , 1996].

II. Les hydrolysats de protéines de colza

II.1. Nature des protéines de colza

La fraction protéique de la graine est majoritairement constituée de deux familles de protéines, *les globulines* et *les albumines*, mais présente également des prolamines et des glutélines (**Tableau 4**).

La majorité des globulines est représentée par les *cruciférines*, protéines de masse molaire élevée de type 12S, alors que les albumines sont représentées par les *napines*, protéines à faible masse molaire de type 2S. Les albumines et les globulines se différencient par leur structure, leur composition en acides aminés, le nombre et l'arrangement de chaînes poly-peptidiques [Lemarié et al. , 1996].

Tableau 4. Répartition en pourcentages des différentes familles de protéines présentes chez le colza.

	Albumines	Globulines	Prolamines	Glutélines
Colza (1)	15 – 46 %	40 – 60 %	-	-
Colza (2)	13,4 - 46,1 %	26,5 - 65,36 %	-	-
Colza (3)	44 – 52 %	20 – 25 %	3 – 4 %	6 – 9 %

(1) : [Lemarié et al. , 1996].

(2) : [Godon, 1996].

(3) : [Linden et Lorient, 1994].

Les albumines présentent généralement des teneurs élevées en acides aminés soufrés et en lysine. En revanche, les globulines ont une composition caractéristique des protéines de réserve ; elles sont riches en arginine, en acide aspartique / acide glutamique et leurs amides.

La teneur élevée en protéines 2S constitue une particularité des graines de crucifères appartenant au genre *Brassica*, ce qui différencie le colza des autres sources de protéines végétales [Guéguen, 1998].

Une étude a été réalisée pour cinq variétés de colza *Brassica napus* et trois variétés de *Brassica campestris*, sur la séparation des protéines et leur composition en acides aminés. Les fractions protéiques isolées ont montré des profils chromatographiques et électrophorétiques similaires. Elles diffèrent par leur teneur en cystéine et en méthionine, ainsi que par leur

composition en acides aminés [Godon, 1996]. Outre les facteurs agronomiques et variétaux, le degré de maturation des graines à la récolte influence leur teneur en protéines qui augmente continuellement entre 35 et 70 jours après la floraison alors que la teneur en lysine décroît pendant la même période.

II.1.1. La fraction globuline

Dans la graine de colza, les protéines globulaires sont des molécules de grande taille. Elles sont représentées par les protéines de type 11-12S dont la masse molaire est comprise entre 300 et 400 kg/mol. Elles ont une structure compacte, résultant de l'association de plusieurs sous-unités (6 dans le cas du colza et du tournesol). Ces sous-unités sont constituées de l'association de deux chaînes poly-peptidiques de natures physico-chimiques différentes, une chaîne acide et une chaîne basique reliée par des ponts disulfures [Lemarié et al. , 1996].

La *cruciférine* est la principale représentante des globulines. Il s'agit d'une glycoprotéine neutre contenant 13% de glucides [Rozañ, 1997]. Celle du colza se différencie des autres globulines du type 12S par ses caractéristiques physico-chimiques ; son point isoélectrique (pI) se situe à un pH élevé (7,2 au lieu de 5 chez les autres espèces), et très fortement hydrophobe et soluble en milieu salin (NaCl 5%), elle présente une sensibilité moyenne à l'agrégation par la chaleur, une gélification progressive lors d'un chauffage entre 50 et 90 °C et une dénaturation entre 80 et 83 °C à pH 6-10.

La fraction globuline constitue la part essentielle des protéines de réserves de la graine.

II.1.2. La fraction albumine

Dans le colza, les albumines sont représentées par les *napines*, en proportion variable (15-46 %) selon les variétés. Ce sont des protéines basiques, d'un pI supérieur à 10, de faible masse molaire (8000 à 14000 g/mol). Caractérisées par une teneur élevée en acides aminés soufrés (cystine) et en lysine, ces protéines sont solubles dans l'eau. [Schweizer, 2002]. Les *napines* sont constituées de deux chaînes poly-peptidiques reliées par deux ponts disulfures

[Guéguen, 1998]. Ces deux liaisons leur confèrent une grande résistance à la température [Lemarié et al. , 1996].

Cette fraction albumine constitue les protéines à activités biologiques dans la graine telles que les LTP (Lipid Transfert Protein) ou des enzymes [Dasgupta et al. , 1995].

II.1.3. Les autres protéines du colza

Outre ces fractions, il existe dans les graines de nombreuses autres protéines qui ont un rôle physiologique ou de défense. Elles sont peu connues dans le colza, à l'exception des *oléosines* qui représentent 10 à 15 % des protéines totales. Les *oléosines* constituent une famille de protéines de faible masse molaire, localisées à la surface des globules lipidiques des graines riches en huile assurant ainsi la stabilité des globules.

II.2. De la protéine aux hydrolysats

II.2.1. Extraction des protéines de colza

Après la trituration des graines de colza (**Figure 1, p.7**), deux produits sont obtenus, l'huile brute et le tourteau. Les protéines, composés les plus importants du tourteau, sont ensuite extraites selon le procédé décrit **Figure 3**. Les protéines solubilisées en milieu alcalin sont récupérées sous forme d'isolats protéiques après précipitation, ou addition d'adjuvants ou ultrafiltration.

Par définition, nous parlons d'un isolat si la teneur en protéines est supérieure à 90 % ; de concentrat si cette valeur est comprise entre 65 et 90 %, et de farine si cette valeur est inférieure à 65 %.

La méthode la plus utilisée est la production de concentrats ou d'isolats de protéines de colza par précipitation.

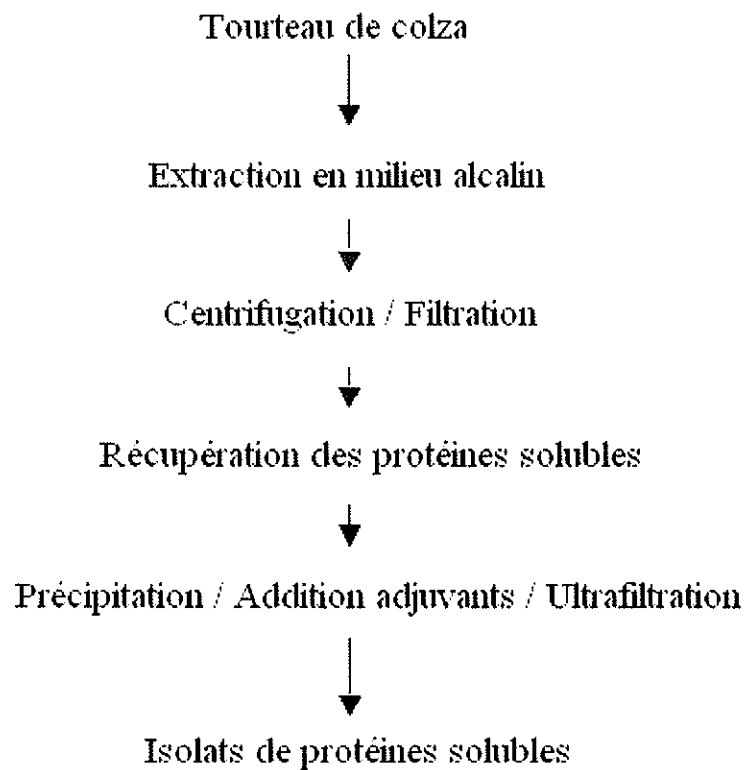


Figure 3. Procédé d'extraction des protéines de colza
[Vioque et al. , 2000].

Exemple de méthode d'extraction :

L'équipe dirigée par Tzeng [Tzeng et al. , 1988] ont obtenu des isolats détoxifiés (c'est-à-dire sans glucosinolates) en procédant à l'ultrafiltration des solutions de protéines à pH 7 ou 9 en présence d'hexamétaphosphate de sodium.

II.2.2. Hydrolyse enzymatique des protéines

Pour obtenir des peptides de tailles et de propriétés définies, on procède soit par synthèse chimique des molécules cibles soit par hydrolyse des protéines. Lorsqu'une valorisation des protéines est souhaitée, il est préférable de procéder par hydrolyse enzymatique plutôt que chimique car l'hydrolyse chimique est peu sélective et conduit souvent à la formation de produits secondaires non désirés [Schweizer, 2002].

La réalisation de l'hydrolyse enzymatique des protéines s'effectue en deux étapes :

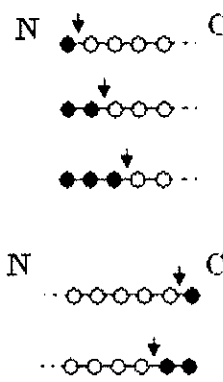

- 1/ le clivage d'un petit nombre de liaisons peptidiques qui déstabilise la structure native de la protéine et expose un grand nombre de liaisons,
- 2/ la libération des peptides par hydrolyse.

L'hydrolyse enzymatique permet d'obtenir des molécules de masses molaires variées, pouvant aller de gros peptides aux acides aminés libres. Cela nécessite une bonne sélection de l'enzyme et des conditions opératoires adéquates (concentration du substrat, rapport enzyme/substrat, pH, température, force ionique, activité de l'eau). Les enzymes employées sont essentiellement des protéases, elles sont classées en deux groupes, les exo-peptidases et les endo-peptidases [Rao et al. , 1998].

- les exo-peptidases (**Tableau 5**) agissent à l'extrémité des chaînes polypeptidiques. Elles sont classées en fonction du site d'action ciblé, amine (N) ou acide carboxylique (C) terminal.
 - Les *aminopeptidases* agissent au niveau du N terminal de la chaîne polypeptidique. Leur action permet de libérer un résidu simple d'acide aminé, un dipeptide, ou un tripeptide.
 - Les *carboxypeptidases* agissent sur les bornes C terminal de la chaîne polypeptidique et libèrent un acide aminé simple ou un dipeptide. Les carboxypeptidases peuvent être divisés en trois sous-groupes, *carboxypeptidases à sérine*, *métallocarboxypeptidases*, et *carboxypeptidases à cystéine*. La formation des groupes est basée sur la nature des résidus d'acide aminé cible des enzymes.

- Les endo-peptidases (**Tableau 5**) sont caractérisées par leur action préférentielle dans les régions intérieures de la chaîne polypeptidique, loin des terminaisons N et C. La présence du groupe aminé ou carboxylique libre a une influence négative sur l'activité enzymatique. Les endo-protéases sont divisées en quatre sous-groupes basés sur leur mécanisme catalytique, *protéases à sérine*, *protéases aspartiques*, *protéases à cystéine*, et *métalloprotéases*.

Tableau 5. Classification des protéases [Rao et al. , 1998].

PROTEASES	MODE D'ACTION
<p>Exo-peptidases</p> <p>➤ Aminopeptidases</p> <p>➤ Carboxypeptidases</p>	
<p>Endo-peptidases</p>	

Le contrôle de l'hydrolyse est réalisé par la mesure du degré d'hydrolyse (*DH*), qui est défini comme le rapport des liaisons peptidiques clivées sur les liaisons peptidiques initialement présentes [Adler-Nissen, 1986].

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100$$

DH : degré d'hydrolyse.

h : nombre d'équivalents de liaisons peptidiques coupées par kilogramme de protéines.

h_{tot} : nombre total de liaisons peptidiques par kilogramme de protéines.

Le contrôle du degré d'hydrolyse est important dans le cas de protéines végétales. En effet, une hydrolyse trop importante peut conduire au développement d'un goût amer des produits.

II.3. Intérêt des hydrolysats de protéines de colza

II.3.1. Intérêt nutritionnel

Les personnes intolérantes au gluten, au lait... ; les personnes connaissant un déficit enzymatique partiel gênant la digestion de protéines classiques ; les personnes ayant subi une intervention chirurgicale ou connu une maladie gastrique ou intestinale... l'ensemble de ces personnes est incapable d'absorber les protéines de masse molaire élevée présentes dans l'alimentation classique. Or le rôle essentiel des protéines alimentaires, animales ou végétales, est de fournir les acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines de l'organisme humain ou animal.

L'apport de protéines suffisamment dégradées, pour une bonne digestibilité et un pouvoir allergisant minime, serait alors d'un intérêt nutritionnel et sanitaire primordial. De plus, les protéines de colza ont une composition bien équilibrée en acides aminés essentiels [Benamouzig et al. , 2003].

II.3.2. Intérêt technologique

L'aptitude des protéines à former des gels, des émulsions, des adhésifs, des mousses ou des films dépend de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité dans différents milieux à un pH donné, réactivité), de leur composition en acides aminés et de la structure de la molécule.

Depuis quelques années, la modification des protéines, par l'intermédiaire de réactions chimiques ou enzymatiques, a permis de développer et d'orienter la production de colza vers de nombreux secteurs :

- de nombreuses applications sont envisageables en Pharmacie et Cosmétologie : enrobage des molécules actives, composition des milieux de culture cellulaire...

- utilisations des hydrolysats protéiques comme biopolymères dans les vernis, les peintures, les mousses et les colles.

L'étude et l'exploitation des effets nutritionnels et biofonctionnels des protéines, présentes dans le tourteau de colza, nécessitent en premier lieu de maîtriser la fragmentation peptidique pour ensuite mieux travailler sur l'identification. A cet effet, différentes techniques qualitatives et séparatives s'appuyant sur des propriétés physico-chimiques variées sont employées.

Dans le cadre de ce travail j'utilise la chromatographie d'exclusion stérique à basse pression. Cette technique analytique va permettre de classer les fractions peptidiques, obtenues après hydrolyse enzymatique, selon leur taille moléculaire.

Partie 2

La Chromatographie d'exclusion stérique

I. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les solutés d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile liquide le long d'une phase stationnaire. Lors de l'élution, les solutés vont se répartir de façon sélective entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cet état d'équilibre du soluté entre les deux phases est matérialisé par le coefficient de partage K.

$$K = \frac{\text{Concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration du soluté dans la phase mobile}}$$

Les facteurs physico-chimiques qui interviennent dans le partage des solutés à séparer entre les phases mobile et stationnaire sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille, la polarité et la charge électrique. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on privilégie l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique (**Figure 4**).

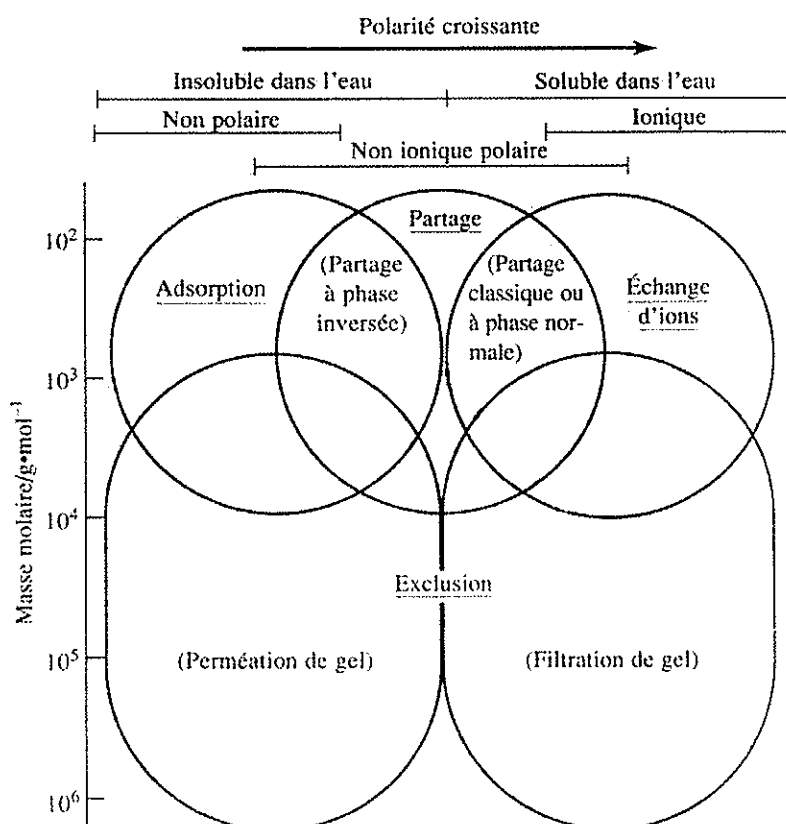


Figure 4. Domaines d'application de la chromatographie liquide haute performance [Skoog et al. , 1997].

- **La chromatographie d'adsorption**

Les solutés sont adsorbés sur une phase stationnaire polaire.

- **La chromatographie par échanges d'ions**

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques dissous dans la phase mobile aqueuse.

- **La chromatographie de partage**

La phase stationnaire est un solvant fixé sur les particules d'un support inerte. La chromatographie de partage est subdivisée en plusieurs catégories.

1/ La phase stationnaire permet de distinguer la *chromatographie de partage liquide-liquide* et la *chromatographie de partage liquide-phase greffée*. Pour le partage liquide-liquide il s'agit d'adsorption physique, alors que le partage liquide-phase greffée implique des liaisons covalentes.

2/ La polarité des phases mobile et stationnaire permet de distinguer la chromatographie de partage en mode normale de celle en mode inversé. En *chromatographie de partage en mode normal*, la phase stationnaire est polaire et la phase mobile non polaire. En *chromatographie de partage en mode inversé*, la phase mobile est polaire et la phase stationnaire apolaire.

- **La chromatographie d'exclusion stérique**

La phase stationnaire est un gel. La séparation des solutés est basée sur leur taille moléculaire, les grosses particules sont exclues des pores du gel alors que les petites particules y diffusent librement.

II. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique

Plusieurs appellations différentes sont employées pour désigner la chromatographie d'exclusion stérique (Size exclusion chromatography : **SEC**) :

- **Chromatographie de perméation sur gel** (Gel permeation Chromatography : **GPC**), lorsque la phase mobile est de nature organique.
- **Chromatographie de filtration sur gel** (Gel Filtration Chromatography : **GFC**), lorsque la phase mobile est une solution aqueuse.

II.1. La phase stationnaire : le gel

Les gels sont des états intermédiaires entre l'état solide et l'état liquide ; par conséquent, leur classification est difficile [Favre, 2004]. La phase dispersante est un solvant et la phase dispersée est composée de petites particules régulières et bien calibrées.

Le substrat du gel (grains, billes ou perles) résulte de la liaison de macromolécules assemblées les unes aux autres de manière à former un ensemble régulièrement réticulé. Mis en présence du solvant les "grains" gonflent par pénétration du solvant à l'intérieur du grain.

Les solutés de dimension inférieure au diamètre des mailles du réseau diffusent à l'intérieur de la matrice gel, alors que les solutés plus volumineux restent à l'extérieur.

II.1.1. Notion de gel – transition sol-gel

Les solutions de polymères concentrées peuvent, dans certains cas former des liaisons transversales et ainsi donner naissance à un réseau, emprisonnant une quantité importante de liquide. Cette situation correspond à un état spécifique qualifié de gel (dénomination attribuée à T. Graham vers 1850). La transformation correspondante, qualifiée de "**transition sol-gel**" (**Figure 5**), s'apparente à une cristallisation, et provoque un départ de solvant, dont une partie est expulsée du réseau au point de gélification. Cette transition reste mal comprise pour les systèmes mettant en jeu des polymères.

Les propriétés du gel dépendent beaucoup des interactions des deux composants : d'une part, le liquide empêche le réseau de polymères de s'effondrer en une masse compacte et, d'autre part, le réseau empêche le liquide de s'écouler.

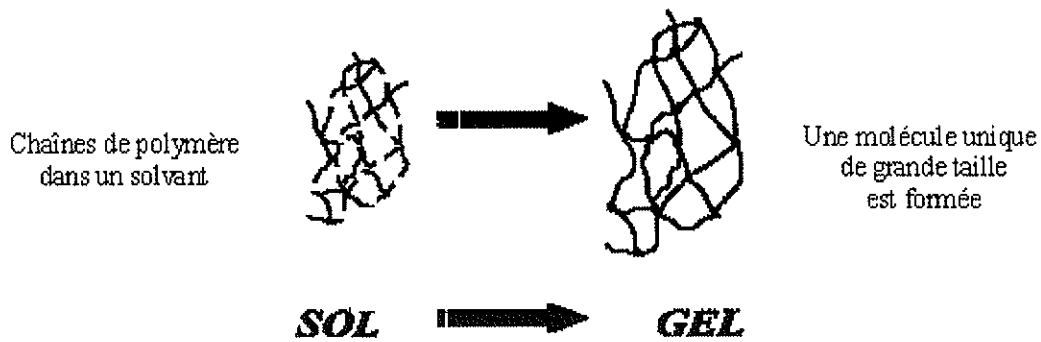


Figure 5. La transition sol-gel [Favre 2004].

Les forces d'agglutination sont principalement des interactions intermacromoléculaires, de natures polaires, complexantes ou ioniques.

- Si elles ne suffisent pas à compenser les forces et l'entropie de dispersion, on a affaire à un système microdispersé : un **sol**.
- Si, à l'inverse, elles deviennent prépondérantes, il y a floculation et même précipitation.
- S'il n'y a pas précipitation des particules, on aboutit à la constitution d'un réseau tridimensionnel de macromolécules qui supporte et retient plusieurs couches de solvant ; c'est le phénomène de **gélification**.

Ce processus progressif correspond à la formation d'un amas de polymères de taille croissante qui va atteindre finalement celle du récipient où s'effectue la gélification : c'est le **point de gel**. L'ensemble est pris en masse dans un état semi-liquide, semi-solide : le **gel**.

Une propriété intéressante des sols est leur viscosité, c'est-à-dire leur résistance à l'écoulement et au cisaillement. A l'échelle moléculaire, la viscosité mesure l'intensité des forces de frottement qui s'opposent aux déplacements des molécules du liquide les unes par rapport aux autres lorsqu'on les met en mouvement.

Le paramètre qui caractérise le mieux les gels est, non plus la viscosité, mais la rigidité, qui mesure leur résistance à la déformation ou à la pénétration.

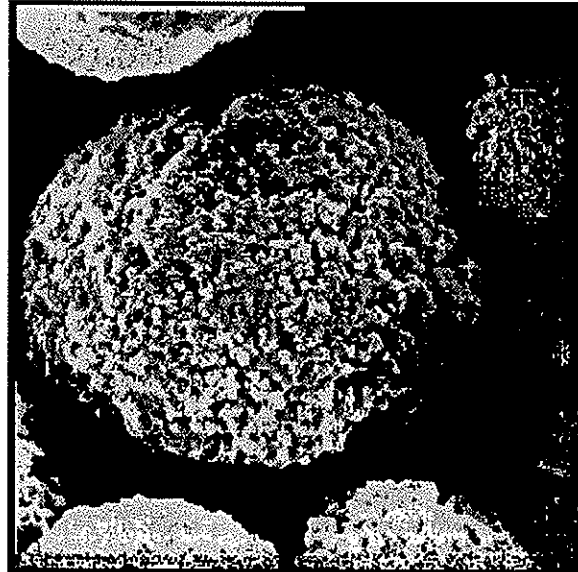


Figure 6. Image au microscope électronique de particules de gel
[Ettre, 1991].

Les propriétés des gels reposent sur la combinaison de propriétés hydrodynamiques et physico-chimiques propres aux solutions, tout en offrant le comportement des solides [Prausnitz, 1995].

II.1.2. Les différentes natures de gel

Un gel est formé de deux milieux dispersés l'un dans l'autre, l'un étant considéré comme *solide* formant un réseau irrégulier et emprisonnant des molécules de *liquide*. On distingue deux grandes familles de gels : les aérogels, obtenus principalement par voie minérale, se caractérisent par le fait qu'ils maintiennent leur structure au séchage, à l'inverse des xérogels, dont le réseau s'effondre si l'on extrait le solvant [Rosset et al. , 1991].

- Xérogels

Ce sont des structures faiblement réticulées et capables d'absorber dans leurs pores de grandes quantités de solvant. Ils gonflent de plusieurs fois leurs volumes secs et leurs porosités augmentent en proportion du volume de solvant absorbé. Ils s'utilisent principalement avec des solutions aqueuses.

- **Gels de dextrane** (Sephadex[®]). Ils sont obtenus à partir du dextrane polyholoside polymérisé obtenu par culture de bactéries dans des solutions de saccharose. Afin d'obtenir un substrat réticulé, on fait réagir le dextrane en milieu alcalin avec un réactif bifonctionnel : l'épichlorhydrine de glycérol qui forme avec deux hydroxyles portés par des chaînes différentes des liaisons éthers. Ces molécules sont insolubles dans l'eau, mais la présence de nombreux groupes hydroxyles les rendent particulièrement hydrophiles.

- **Gels de polyacrylamide** (Bio-Gel[®]). Ils sont obtenus par copolymérisation de l'acrylamide avec le N, N-méthylènebisacrylamide.

- **Gels de polystyrène** (Styragel[®]). Ils sont obtenus par polymérisation des dérivés du vinyl benzène ou styrène en présence d'un agent réticulant le divinyl benzène. Ils sont réticulés à 2 %. Ils ne doivent pas être utilisés avec des solvants polaires.

- **Aérogels**

Les substrats de cette catégorie sont des verres poreux plutôt que des gels. La taille de leurs pores est fixe. Ils peuvent être hydrophiles ou lipophiles. Ces gels de silice possèdent des sites d'adsorption, il est donc nécessaire de désactiver par silanisation les groupements hydroxyles de manière à supprimer les phénomènes d'adsorption qui peuvent retarder excessivement les espèces polaires.

Le choix du gel approprié va dépendre de la limite d'exclusion (masse molaire à partir de laquelle la molécule est totalement exclue des pores de la matrice gel) et de la courbe d'étalonnage (généralement le logarithme de la masse molaire en fonction du volume d'élution). La partie linéaire de la courbe d'étalonnage, domaine de perméation sélective, doit correspondre au domaine des masses moléculaires des constituants à séparer.

II.2. La phase mobile

La phase mobile doit être capable de solubiliser l'échantillon. Si la solubilité de l'échantillon dans la phase mobile est faible, la détermination des masses moléculaires peut être faussée par des mécanismes d'adsorption. De plus, la concentration de l'échantillon ne doit pas être trop élevée, car les pores de la matrice gel risquent d'être saturés.

Solvant	Point d'ébullition °C	Densité	Viscosité	Indice de réfraction	Température d'utilisation °C	Utilisation
Tétrahydrofuranne	66	0.8892	0.51 à 25°C	1.4070 ²⁰	amb.-45	Général, polymères et petites molécules
Trichloro-1-2-4 benzène	213	1.4634 ²⁵	0.50 à 135°C	1.5524 ²⁵	130-160	Polyoléfines
Toluène	110.60	0.866 ²⁰	0.52 à 25°C	1.4893 ²⁴	amb.-70	Caoutchoucs et élastomères
m-Crésol	202	1.034 ²⁰	16.9 à 20°C	1.5348 ²⁰	30-135	Polyesters et polyamides
Diméthyl N-N'formamide	153	0.9445 ²⁵	0.90 à 25°C	1.42803 ²⁵	amb.-85	Polyuréthanes, acrylates, cellulose, esters, acrylonitrile
Chloroforme	61.2	1.489 ²⁰	...	1.4476 ²⁰	Ambiante	Epoxy, silicones, polymères vinyliques, petites molécules
Tétrachloro 1-1-2-2 éthane	146.5	1.58658 ²⁵	...	1.49419 ²⁰	amb.-100	Composés de bas poids moléculaires
Trifluoroéthanol	73.6	1.3823 ²⁵	0.9 à 38°C	1.2907 ²⁰	amb.-40	Certains polyamides
Eau*	100	0.9999 ²⁰	1.0 à 20°C	1.3330 ²⁰	amb.-65	Polyélectrolytes et liqueurs biologiques

* Des tampons aqueux sont parfois nécessaires pour stabiliser le pH, la composition moléculaire et la taille moléculaire

Figure 7. Solvants les plus couramment employés en chromatographie d'exclusion stérique [Dalmeyda, 1994].

II.3. Théorie sur la ségrégation chromatographique

Le support gel de la chromatographie d'exclusion stérique est un ensemble de petites particules constituant un réseau de pores uniformes, dans lesquels les molécules de soluté et de solvant peuvent diffuser. Une fois l'équilibre de diffusion établi, le solvant qui se trouve à l'intérieur des grains n'est accessible qu'aux molécules ayant une dimension inférieure à celui des pores (Figure 8) ; on parle de **tamissage moléculaire**.

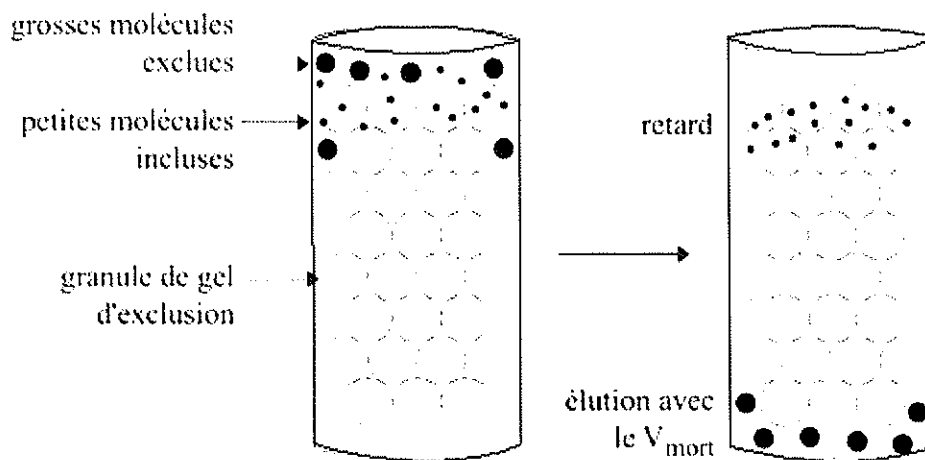


Figure 8. Principe du tamisage moléculaire [2].

Les grosses molécules, exclues de la totalité ou d'une partie seulement des pores du gel, migrent plus rapidement que les petites molécules, qui peuvent pénétrer dans un plus grand nombre de pores. Les molécules quittent donc le gel dans l'ordre décroissant de leurs masses moléculaires (Figure 9).

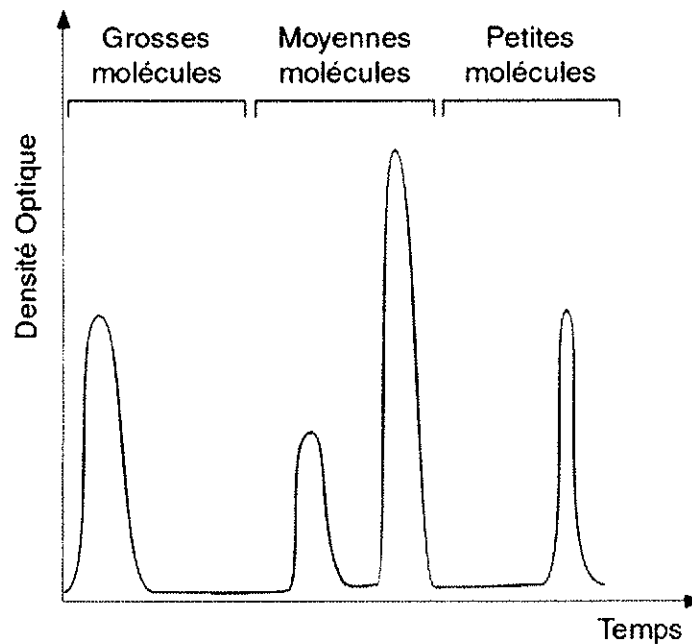


Figure 9. Elution par ordre décroissant des masses moléculaires [2].

III. Paramètres d'éluion

III.1. Le volume d'éluion V_e

La colonne chromatographique est une suspension de "particules de gel" dans un solvant. Le volume total de la colonne (V_t) est occupé par la matrice gel (V_M), le solvant présent à l'intérieur des particules de gel (V_i) et par le solvant interstitiel (V_o), ce qui conduit à l'expression suivante [Determann, 1969] :

$$V_t = V_o + V_i + V_M$$

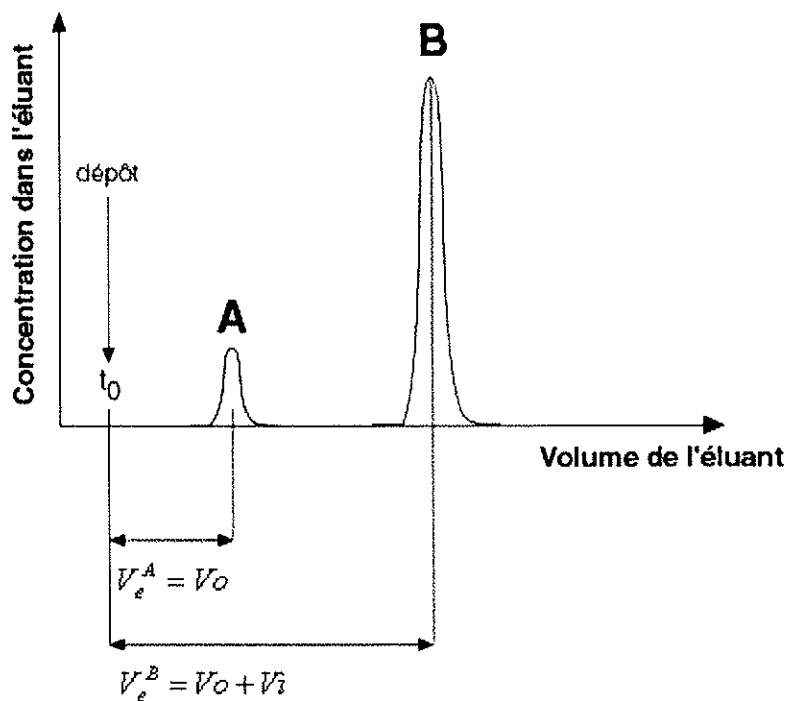


Figure 10. Diagramme des volumes d'éluions [2].

- La détermination du **volume mort** (V_o) s'effectue par l'éluion d'un composé A de masse moléculaire élevée totalement exclu par les pores des particules de gel.

$$V_{\text{élution}}^A = V_o$$

- Le **volume total** V'_t est facile à mesurer, c'est le volume intérieur du tube de verre (compris entre les surfaces inférieure et supérieure de la masse de gel). Il est cependant possible d'accéder au **volume total accessible au solvant** V_t ($V_t = V'_t - V_M$), il est obtenu par l'élution d'un composé B de masse moléculaire si petite qu'il aurait accès à l'ensemble des pores de la matrice.

$$V_{\text{élution}}^B = V_t = V_o + V_i$$

- Le **volume interne de solvant** V_i occupé dans les particules de grains dépend de la porosité du gel. Il est possible de déterminer V_i en connaissant V_o et V_t :

$$V_t = V_o + V_i$$

$$V_i = V_t - V_o$$

- Un soluté partiellement retenu par les pores de la matrice en gel, possède un **volume d'élution** V_e situé entre les deux extrêmes V_o et V_t . Ce type de composé ne peut accéder qu'à une fraction K_d (**coefficient de diffusion**) du volume intérieur V_i .

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i$$

En chromatographie d'exclusion stérique, il est possible de déterminer pour chaque valeur du volume d'élution, la masse moléculaire correspondante. Il suffit pour cela de porter le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution. La courbe obtenue (**Figure 11**) présente une partie linéaire, le *domaine de perméation sélective*, domaine où la masse moléculaire est directement liée au volume d'élution des solutés élués. La *limite d'exclusion* définit l'ensemble des solutés totalement exclus par la matrice gel. La *limite de perméation* est la limite en dessous de laquelle les solutés ont accès à l'ensemble des pores de la matrice gel.

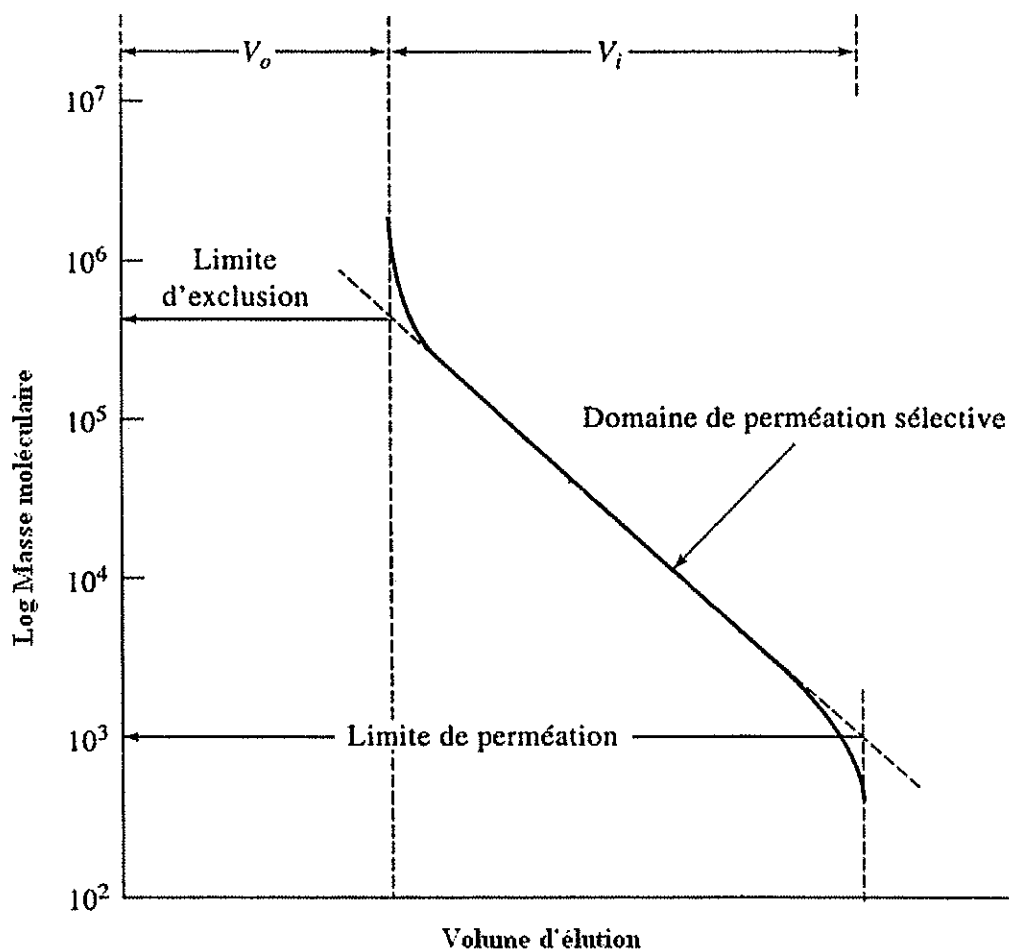


Figure 11. Variation théorique du volume d'éluion en fonction du logarithme de la masse moléculaire [Skoog et al. , 2003].

III.2. Le coefficient de diffusion K_d

Lors de l'éluion des solutés dans la colonne, les molécules sont situées soit dans l'espace interstitiel où elles sont entraînées par le liquide, soit dans les pores où le liquide stagne. De par son encombrement, la molécule ne peut occuper qu'une partie du volume des pores, il s'établit un équilibre de concentration représenté par le **coefficient de diffusion K_d** :

$$K_d = \text{volume des pores disponible à la molécule} / \text{volume total des pores.}$$

Dans le cas où les molécules sont représentées par des sphères de rayon r et les pores par des cylindres de rayon r_o (**Figure 12**).

$$K_d = \frac{(r_o - r)^2}{r_o^2} = \left(1 - \frac{r}{r_o}\right)^2$$

Deux cas de figure, la molécule pénètre dans le pore ($r < r_o$) ou la molécule est exclue du pore ($r > r_o$) :

$$K_d = \left(1 - \frac{r}{r_o}\right)^2 \quad r < r_o$$

$$K_d = 0 \quad r > r_o$$

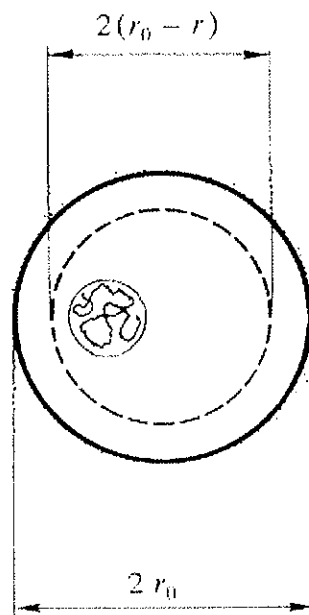


Figure 12. Pore cylindrique de diamètre $2r_o$ vu de face. Le pore contient une macromolécule de diamètre $2r$. Le cercle en pointillés définit le volume disponible pour la macromolécule [Cloizeaux et Jannink, 1987].

Il est possible de déterminer expérimentalement K_d , pour cela il est nécessaire de connaître le volume mort (V_o) et le volume total accessible au solvant (V_t) :

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

- Si $K_d = 0$, le composé est totalement exclu de la matrice gel.
- Si $0 < K_d < 1$, le composé est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K_d .
- Si $K_d = 1$, le composé a une inclusion totale dans les pores du gel.
- Si $K_d > 1$, le composé est adsorbé dans la matrice gel.

Le coefficient de diffusion K_d dépend des propriétés physiques de chaque molécule, de leur taille et de leur volume de solvation. De plus, pour un gel donné et un composé donné, K_d est une constante, indépendante des dimensions de la colonne et du tassement du gel. A l'aide de la représentation graphique (**Figure 13**) du coefficient de distribution en fonction du logarithme de la masse moléculaire, il est possible de comparer les données de supports différents et d'un même support au cours du temps [Irvine, 1997].

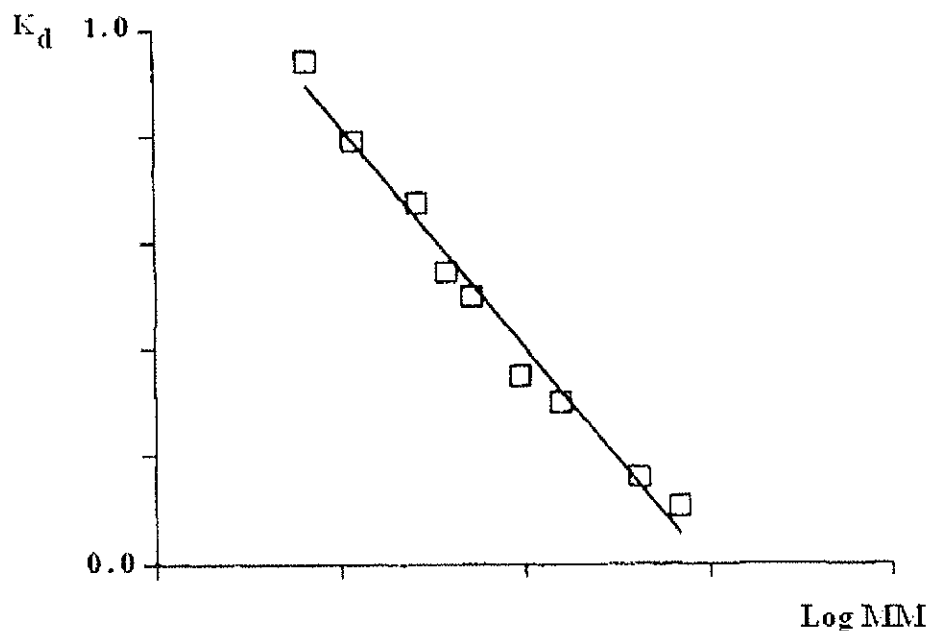


Figure 13. Courbe théorique représentant le coefficient de diffusion (K_d) en fonction du logarithme de la masse moléculaire (Log MM) [Irvine, 1997].

IV. Etude des performances de la colonne

IV.1. Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique

Un procédé chromatographique de séparation peut être considéré comme une série d'étapes hypothétiques dans chacune desquelles l'équilibre, entre les concentrations du soluté dans les phases mobiles et stationnaires, est atteint. Chaque étape se nomme un plateau et est supposée correspondre à une hauteur spécifique de la colonne. Bien que la séparation réelle ne se produise pas de cette manière, le concept de **hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT)** s'est avéré extrêmement utile pour caractériser l'efficacité de la colonne.

IV.1.1. Détermination expérimentale de la HEPT

Le calcul de la hauteur équivalente à un plateau théorique fournit la mesure exacte d'une colonne de chromatographie. Habituellement, on utilise la méthode développée par Glueckauf [Glueckauf, 1965]. On trace les tangentes et on détermine la largeur (W) du pic ainsi que le volume d'élution (V_e) (Figure 14).

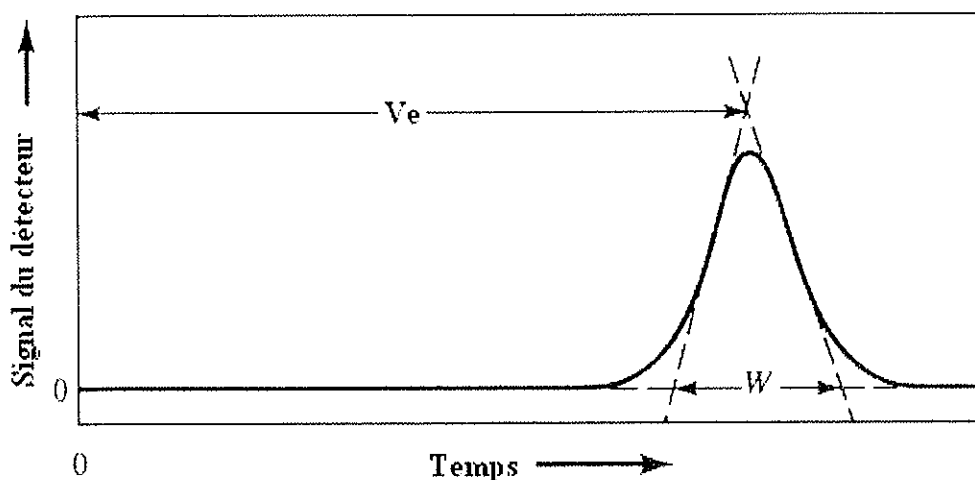


Figure 14. Détermination de la largeur W d'un pic chromatographique
Méthode de GLUECKAUF [Skoog et al. , 1997].

Le nombre de plateaux N , peut être facilement calculé à partir du chromatogramme d'une substance monodisperse :

$$N = \left(\frac{4.V_e}{W} \right)^2 \quad (1)$$

En divisant la hauteur de la colonne L par N , on obtient la hauteur H correspondant à un seul plateau. Cette valeur est d'autant plus petite, c'est-à-dire la colonne est d'autant plus efficace que la base du pic W d'élution est plus étroite.

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

L'introduction des grandeurs réduites par Knox [Knox, 1977] permet de comparer les performances de différents types de colonne, selon la granulométrie des phases de remplissage, la viscosité des solvants et le coefficient de diffusion des solutés :

- la *hauteur réduite équivalente à un plateau théorique* (h)
- la *vitesse réduite* (u)

$$h = \frac{H}{dp} \quad (3)$$

$$u = \frac{U.dp}{Dm} \quad (4)$$

Dm : diffusivité moléculaire du soluté (cm²/s)

dp : diamètre des particules du support (μm)

L'ensemble des grandeurs réduites sont sans dimension.

IV.1.2. Paramètres contrôlant l'efficacité d'une colonne

De très nombreuses études théoriques et expérimentales ont été consacrées au développement de relations quantitatives qui décrivent les effets des paramètres expérimentaux sur les valeurs de H . Il existe une douzaine d'expressions pour calculer H mais aucune d'entre elles ne permet d'expliquer parfaitement les interactions physiques complexes et leurs effets sur l'élargissement des pics, et donc leur rôle sur l'efficacité des colonnes.

Dans les années 50, des études théoriques de l'élargissement des pics sont menées par des ingénieurs chimistes hollandais, elles ont permis d'établir l'équation de Van Deemter [Van Deemter et al. , 1956] :

$$H = \frac{2.D}{U} + (\text{Contribution du transfert de masse}) \quad (5)$$

En utilisant l'équation (5), Van Deemter a supposé, d'une part que le transfert de masse est une fonction linéaire de la vitesse de la phase mobile U et, d'autre part que le nombre de dispersion global D est la composante d'un terme de diffusion turbulente et d'un terme de diffusion moléculaire (longitudinale) :

$$D = \phi.Dm + \lambda.U.dp \quad (6)$$

$\phi.Dm$: diffusion moléculaire

$\lambda.Udp$: diffusion turbulente

ϕ étant un facteur de tortuosité ($\phi = 2/3$) et λ est un facteur de proportionnalité du coefficient de diffusion turbulente ($\lambda \approx 1/11$). D'où une équation globale pour la hauteur équivalente à un plateau théorique de la forme générale :

$$H = A + \left(\frac{B}{U}\right) + CU \quad (7)$$

$$\boxed{H = A + \left(\frac{B}{U}\right) + (Cs + Cm).U} \quad (8)$$

- *A* représente le *coefficient de diffusion de turbulence* résultant des inhomogénéités de vitesses d'écoulement et de chemin du soluté autour des particules de gel [Skoog et al. , 1997].

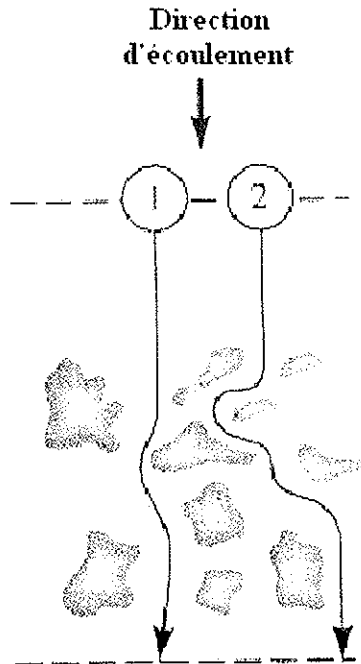


Figure 15. Exemple de trajet de deux molécules pendant l'élution [Skoog et al. , 1997].

Comme le montre la **Figure 15**, la longueur des trajets d'une molécule peut varier de manière importante ; dès lors, le temps de séjour dans la colonne pour des molécules de même espèce est lui-même également variable.

- *B* le *coefficient de diffusion longitudinale*, représente la diffusion résultant du mouvement brownien du soluté dans la phase mobile. La contribution de la diffusion longitudinale à la HEPT est inversement proportionnelle à la vitesse linéaire de la phase mobile donc plus la vitesse linéaire est faible, meilleure est la séparation des solutés. L'influence du phénomène de diffusion longitudinale est négligeable face au coefficient de diffusion de turbulence et à la résistance au transfert de masse.
- *C* symbolise la *résistance au transfert de masse* du soluté à l'interface de la phase stationnaire. Les indices inférieurs "*m*" et "*s*" de *C* se rapportent respectivement au transfert de masse dans les phases mobiles et stationnaires.

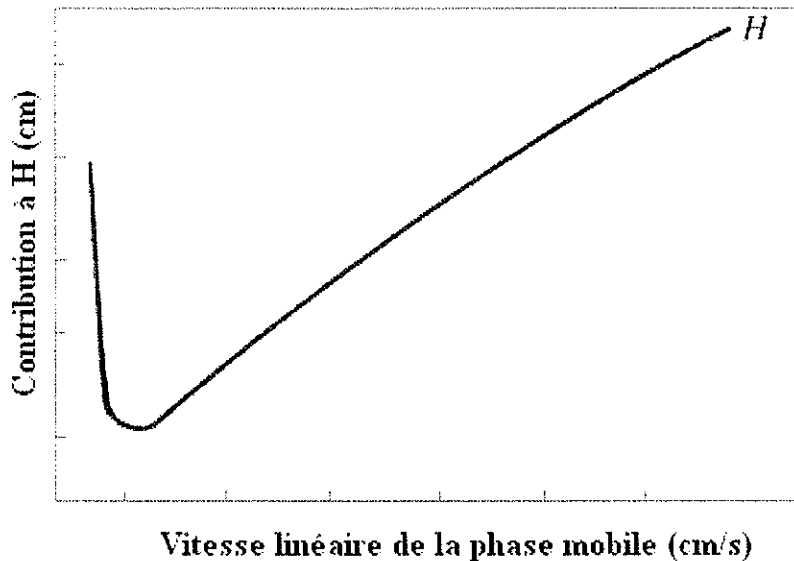


Figure 16. Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la hauteur équivalente à un plateau théorique [Skoog et al. , 1997].

La courbe **Figure 16** montre la variation des termes de l'équation (8) en fonction de la vitesse de la phase mobile. Elle démontre qu'il existe une **vitesse d'écoulement optimale** où **H est minimale et l'efficacité de séparation maximale.**

IV.1.3. Etalonnage "absolu" selon la HEPT

L'équation développée par Van Deemter, $H=A+B/U+CU$, a permis de mettre en évidence l'importance de facteurs chromatographiques tels que la diffusion turbulente, la diffusion longitudinale et le temps de mise en équilibre.

Ces facteurs A , B et C dépendent de la masse molaire du soluté élué et sont des constantes pour chaque peptide. Il est donc possible de déterminer pour chaque peptide, et donc pour une masse molaire donnée d'un peptide, les conditions optimales d'élution c'est-à-dire trouver le débit optimal d'élution (U) permettant d'avoir un HEPT le plus faible possible [Shioya et al. , 1982].

La détermination de la hauteur minimale ou HEPT optimale s'effectue graphiquement (**Figure 17**). Elle nécessite de faire varier le débit d'élution d'un soluté de masse molaire connue et de reporter la HEPT calculée en fonction du débit d'élution. Le calcul de la HEPT s'effectue expérimentalement, il nécessite l'emploi de la méthode de Glueckauf, développée au paragraphe II.2.

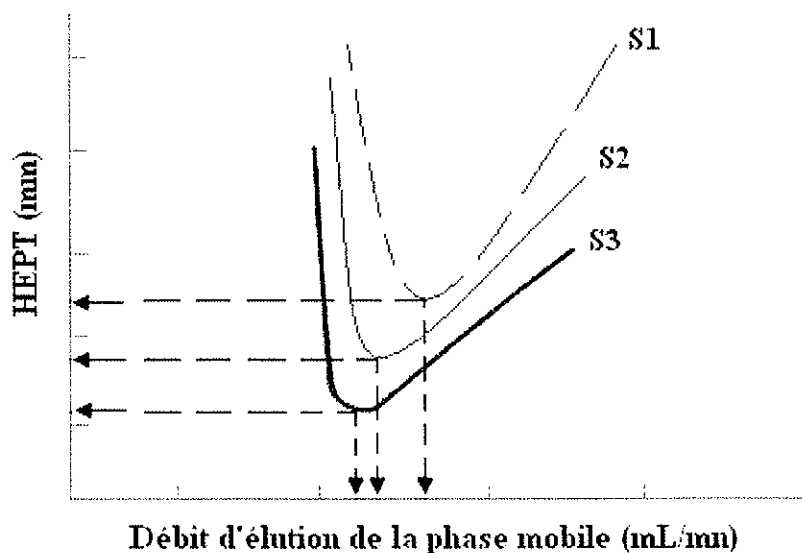


Figure 17. Détermination expérimentale de la HEPT minimale et du débit d'élution optimal ; cas de trois solutés S1, S2 et S3 [Shioya et al. , 1982].

Un étalonnage de la colonne selon la HEPT est alors possible. Cet étalonnage nécessite de déterminer le débit d'élution optimal correspondant à la HEPT minimale, sur un certain nombre de solutés de masses moléculaires connues. Le débit optimum de chaque soluté est ensuite exprimé en fonction du logarithme de la masse moléculaire, il en résulte une droite de calibration linéaire (**Figure 18**).

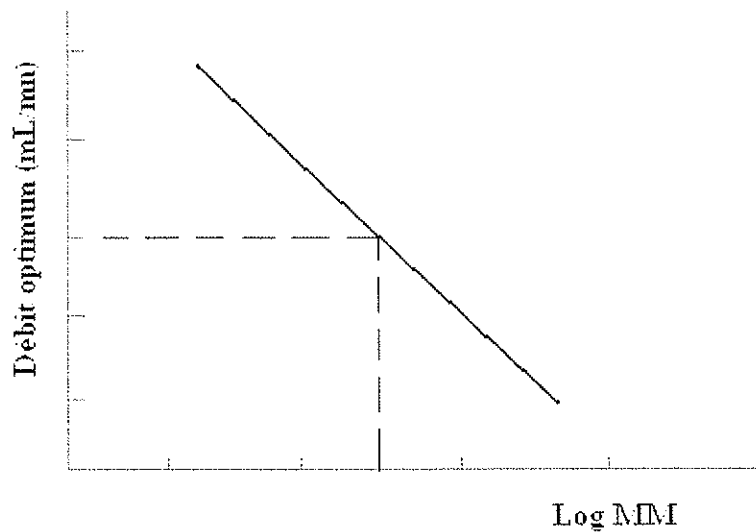


Figure 18. Droite de calibration : débit optimum nécessaire à une HEPT minimum en fonction du logarithme de la masse moléculaire [Shioya et al. , 1982].

Un soluté de masse moléculaire inconnue doit avant tout être élué à des débits variables afin de déterminer graphiquement le débit optimum d'élution. Il est ensuite alors possible d'estimer la masse moléculaire du soluté à l'aide de la droite de calibration.

IV.2. Résolution de la séparation

Les possibilités d'améliorer la ségrégation de la chromatographie d'exclusion stérique restent relativement restreintes [Dalmeyda, 1994].

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$

- **Le coefficient de sélectivité α** est lié à la taille des molécules étudiées et à la porosité des gels. En effet, les faibles différences de diffusion de molécules voisines sont compensées par la dimension variable des pores. On recherchera donc des matrices gel dont les diamètres sont proches de celles des molécules à séparer et dont la porosité est très homogène. Une uniformité entre la taille des molécules éluées et la porosité des gels tend à donner une meilleure sélectivité.

- *Le facteur de capacité du composé le plus retenu k'* permet de décrire la vitesse de progression des solutés dans la colonne. Il est relativement petit et, dans les meilleures conditions, il est égal à 1. D'autre part, le rapport V_i/V_M ne peut pas varier dans de grandes proportions puisqu'il dépend de la porosité de la matrice gel qui est fonction de la masse moléculaire des substances à séparer. Alors, k' sera relativement petit (0,5 à 2) et difficilement améliorable.
- *Le nombre de plateaux théoriques (N)* est modifié par la variation de la longueur de la colonne, ou la variation du débit de la phase mobile.

Le fractionnement des solutés par chromatographie d'exclusion stérique est directement influencé par la porosité de la matrice gel. Le choix du gel dépend de la nature de la phase mobile et de la masse moléculaire des solutés à séparer.

Volume d'élution ou coefficient de diffusion, la colonne est étalonnée en fonction de la masse moléculaire des solutés élués. En aucun cas la conformation moléculaire des molécules étalon n'est prise en compte pour déterminer la droite de calibration de la colonne chromatographique. L'estimation des masses moléculaires sera donc **relative** à un type de molécules étalon employées lors de l'étalonnage. Néanmoins, il est possible à l'aide de la Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique de tracer une courbe d'étalonnage **absolu** qui ne tient pas compte des facteurs géométriques du soluté. L'inconvénient majeur de cette méthode est le facteur temps, afin de déterminer le débit d'élution optimal il est nécessaire pour chaque peptide de construire le graphique HEPT en fonction du débit d'élution. Il faut en effet faire varier le débit d'élution à plusieurs reprises pour un seul et même peptide afin d'obtenir le débit optimal. Cette méthode n'est donc pas envisageable pour la suite de l'étude.

Une fois la colonne chromatographique étalonnée, l'objectif d'identifier des peptides inconnus, de petite taille, inclus dans un mélange complexe est alors possible.

Partie 3

Etudes expérimentales

A- MATERIEL & METHODES

B- RESULTATS & DISCUSSION

MATERIEL

&

METHODES

L'hydrolyse enzymatique des tourteaux de colza est employée afin d'obtenir des peptides de petite taille. Mon travail, situé en aval de la préparation des échantillons peptidiques issus des protéines de colza, consiste à utiliser la chromatographie d'exclusion stérique dans le but de fractionner les hydrolysats peptidiques pour ensuite en estimer leur taille moléculaire.

I. Obtention des échantillons peptidiques

Les échantillons à fractionner par chromatographie d'exclusion stérique sont des hydrolysats de protéines végétales ayant subi différentes étapes de traitement dont une étape permettant d'éliminer toutes les molécules de très grandes tailles moléculaires et assurer ainsi un bon fonctionnement de la séparation par filtration sur gel. Les échantillons injectés ont une teneur peptidique de 1 g/L.

Mode d'obtention, constitué de quatre étapes :

- concentration protéique
- hydrolyse enzymatique
- précipitation
- filtration

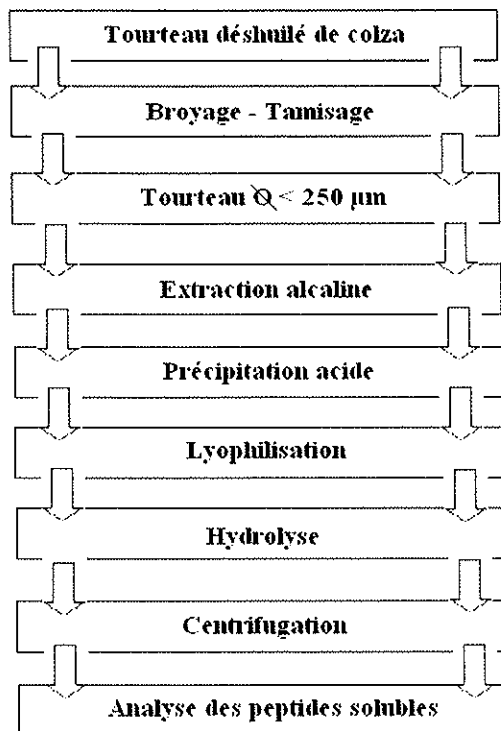


Figure 19. Schéma du procédé de traitement du tourteau de colza [Schweizer et al. , 2002].

1.1. Préparation du concentrat protéique

La farine de tourteau est placée dans une cuve avec 100 litres de soude à 0,2 M afin d'extraire les protéines à l'aide d'un turbo mélangeur (3600 tr/mn). Cette extraction est effectuée à température ambiante, la dissipation d'énergie mécanique étant suffisante pour la solubilisation des protéines. L'extraction est arrêtée après 30 minutes. Le tourteau est ensuite séparé de l'extrait à l'aide d'un décanteur centrifuge horizontal. Après avoir ajusté le pH à 4,5 avec de l'acide chlorhydrique (35 % v/v), les précipités sont concentrés par un séparateur à assiettes (6400 g) en mode clarification jusqu'à un volume de 30 litres. La dernière étape consiste en une centrifugation finale à 3000 g pendant 10 minutes. Le concentrat protéique est alors lavé deux fois à l'eau osmosée.

1.2. Hydrolyse enzymatique

L'enzyme utilisée est l'Alcalase[®] 2,4 L ; c'est une enzyme à large spectre d'action. Elle présente une activité maximale à une valeur de pH de 7 et une température de 60 °C.

L'hydrolyse est réalisée à l'échelle pilote dans un réacteur de volume réactionnel de 15 L. Les conditions opératoires (température de réaction, pH, concentration protéique du milieu et rapport enzyme sur substrat) sont représentées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique [Bounaas, 2002].

	Alcalase[®] 2.4 L
Température de la réaction	60 °C
pH	9
Concentration protéique	40 g/L
Rapport E/S	1/10
Volume de milieu réactionnel	15 litres
Agitation	450 tr/mn
NaOH	8 N

La soude est utilisée pour réaliser la régulation de pH. L'inactivation de l'enzyme est effectuée par de la vapeur. La réaction est arrêtée après cinq heures. La **Figure 20** montre le schéma du montage expérimental.

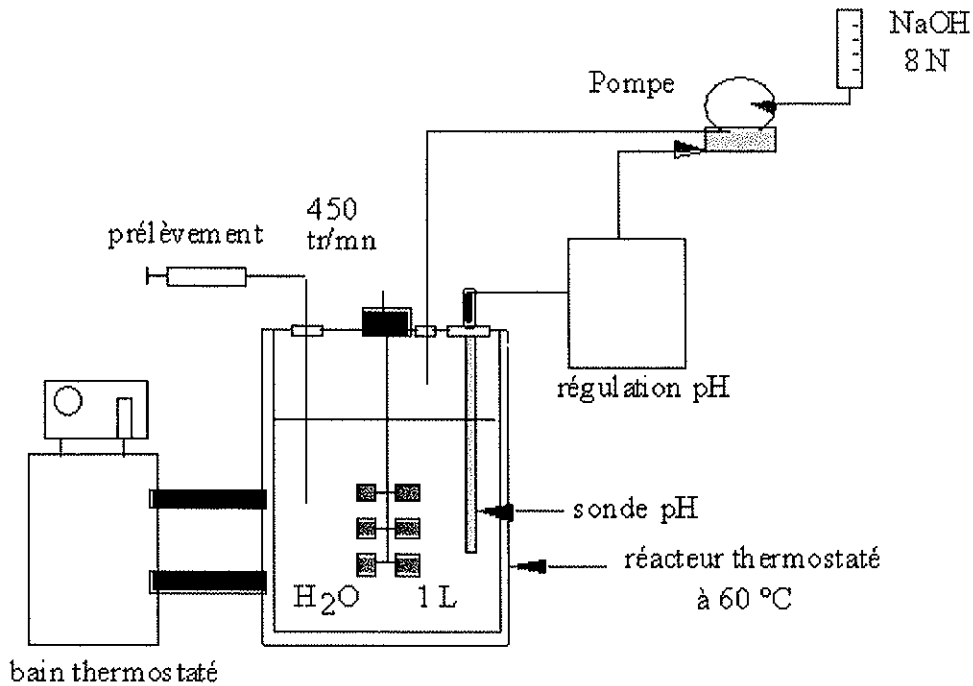


Figure 20. Montage expérimental de l'hydrolyse enzymatique [Schweizer et al. , 2002].

1.3. Précipitation et ultrafiltration des hydrolysats

Les hydrolysats subissent une étape de précipitation afin d'éliminer les plus grosses protéines solubles de l'hydrolysat.

Les hydrolysats (précipités ou non) sont ensuite filtrés sur des membranes planes en acétate de cellulose (millipore) pour éliminer les composés de masses molaires élevées. La **Figure 21** représente le schéma du dispositif expérimental de filtration.

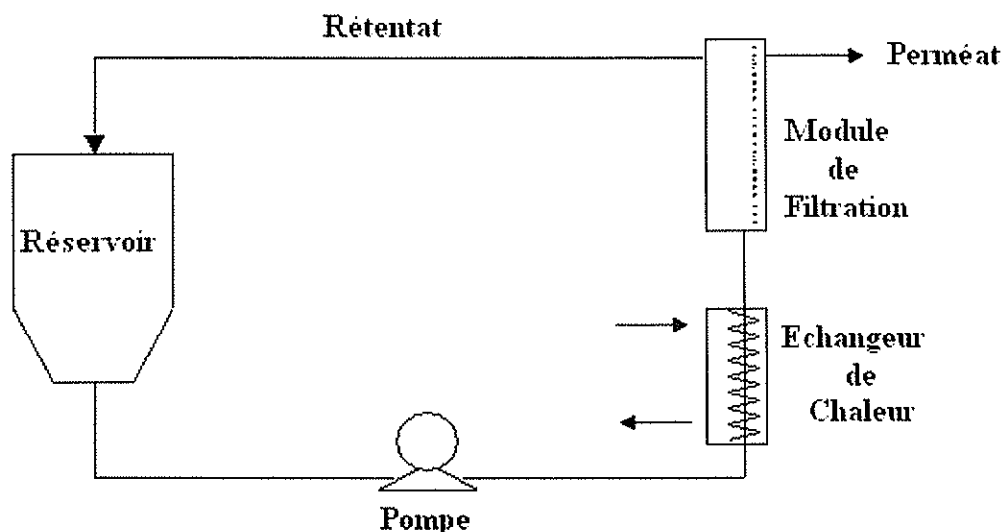


Figure 21. Schéma du dispositif expérimental de l'ultrafiltration [Bounaas, 2002].

II. Fractionnement des hydrolysats peptidiques

II.1. Réactifs

Acide acétique glacial ($C_2H_4O_2$)	Sigma A-6283
Kit de calibration de Polyéthylèneglycol	American Polymer Standards Corporation
Kit de calibration de pullulanes	Polymer Laboratories

II.2. Matériel

Colonne	Econo [®] 500 x 15 mm (BIO-RAD n° 737-1150)
Phase stationnaire	BIO-GEL [®] P2 extra fin (100-1800 Da) (BIO-RAD n° 150-4118)
Adaptateur de flux	Flow adaptator, 15 mm (BIO-RAD)
Pompe DYNAMAX [®]	RAININ [®] model SD-200
Réfractomètre	PERKIN ELMER [®] , Series 200
Logiciel d'acquisition	Logiciel CHROMA, BIOSYSTEM

Le Bio-Gel® P2 a été utilisé pour sa fine granulométrie (100-1800 Da) qui autorise une bonne résolution. Les Bio-Gels® P sont des gels de polyacrylamide poreux très hydrophiles non chargés. Ils sont compatibles avec une large gamme de solvants organiques dilués. Le gel est stable à température ambiante et à des pH compris entre 2 et 10.

Tableau 7. Description du gel Bio-Gel® P2 [3].

Matrice	Gel de polyacrylamide
Taille des particules	
Médium	90 – 180 μm
Fin	45 – 90 μm
Extra-fin	< 45 μm
Résistance	
pH	2-10
Pression	15 psi
Solvant organique	< 20 %
Température de travail	4 – 80 °C
Autoclavable	120°C pendant 30 mn à pH 5,5 – 6,5

II.3. Préparation de la colonne chromatographique

La colonne Econo® (500 x 15 mm) n'est pas fournie pré-remplie, sa préparation s'effectue en deux étapes : *préparation du gel* et *remplissage de la colonne*.

- **Préparation du gel**

Dans un premier temps (**Figure 22**), 20 g de gel sec sont mélangés peu à peu avec 160 mL d'acide acétique 50 mM (1). Après hydratation pendant 4 heures (2) le surnageant est éliminé et un volume de tampon, égal à deux fois le volume du lit, est rajouté (3). Après sédimentation, le surnageant est à nouveau éliminé (4). Ce cycle est répété quatre fois.

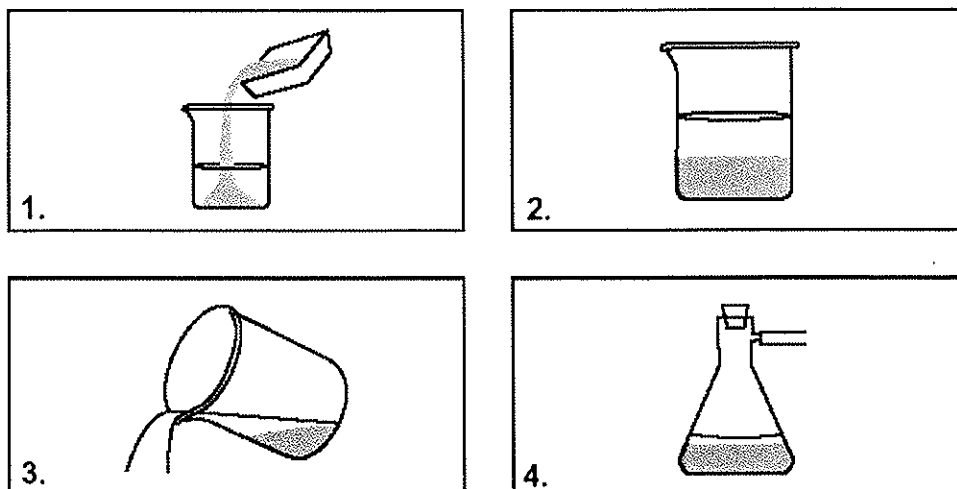


Figure 22. Préparation du gel [3].

- **Remplissage de la colonne**

Dans un deuxième temps (**Figure 23**), la colonne vide est remplie à 20% avec du tampon (5). La solution de gel est ensuite versée dans la colonne (6) en évitant la formation de bulles d'air (la sortie de la colonne étant ouverte et obturée par un fritté). Lorsque la colonne est remplie à la hauteur souhaitée, l'adaptateur de flux est inséré et environ un volume de lit de tampon est percolé au débit de 0,14 mL/mn. Après cette étape, la sortie de la colonne est fermée et suite au tassement du gel l'adaptateur de flux est ajusté à la hauteur du lit. Avant de commencer une séparation, la colonne est stabilisée pendant au moins 30 minutes avec l'éluant au débit de 0,14 mL/mn.

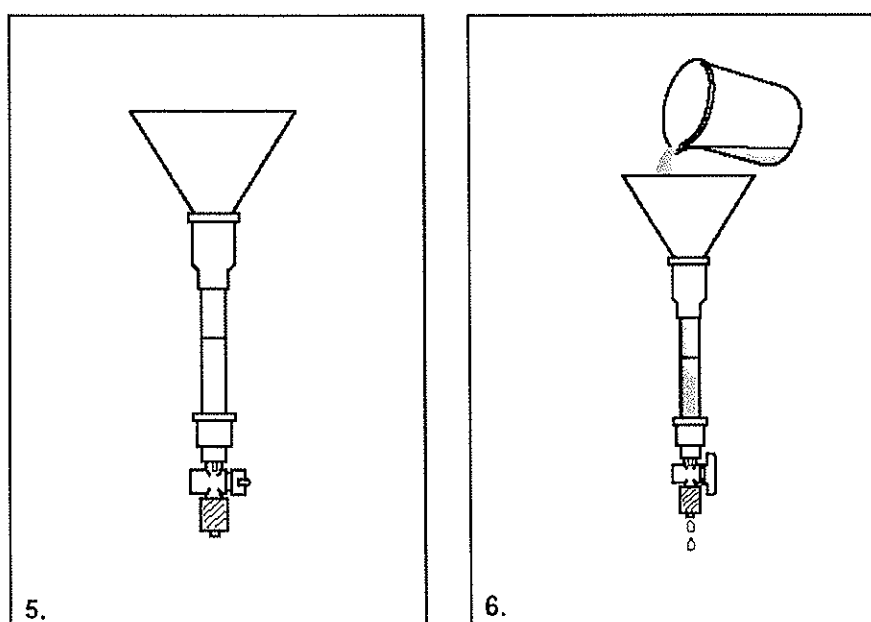


Figure 23. Remplissage de la colonne chromatographique [3].

Lors du remplissage de la colonne, des particules peuvent s'agglomérer, produisant des flots de particules à petit ou large diamètre. Une telle polydispersité dans les dimensions particulaires, couplée aux variations de densité de compactage, est à l'origine d'une résistance à l'écoulement du liquide et induit un profil non-uniforme de vitesse. De plus, la fraction de vide dans la colonne est plus grande le long de la paroi, le fluide rencontrant moins de résistance, la vitesse moyenne près de la paroi est alors plus grande qu'au centre du lit.

II.4. Montage expérimental

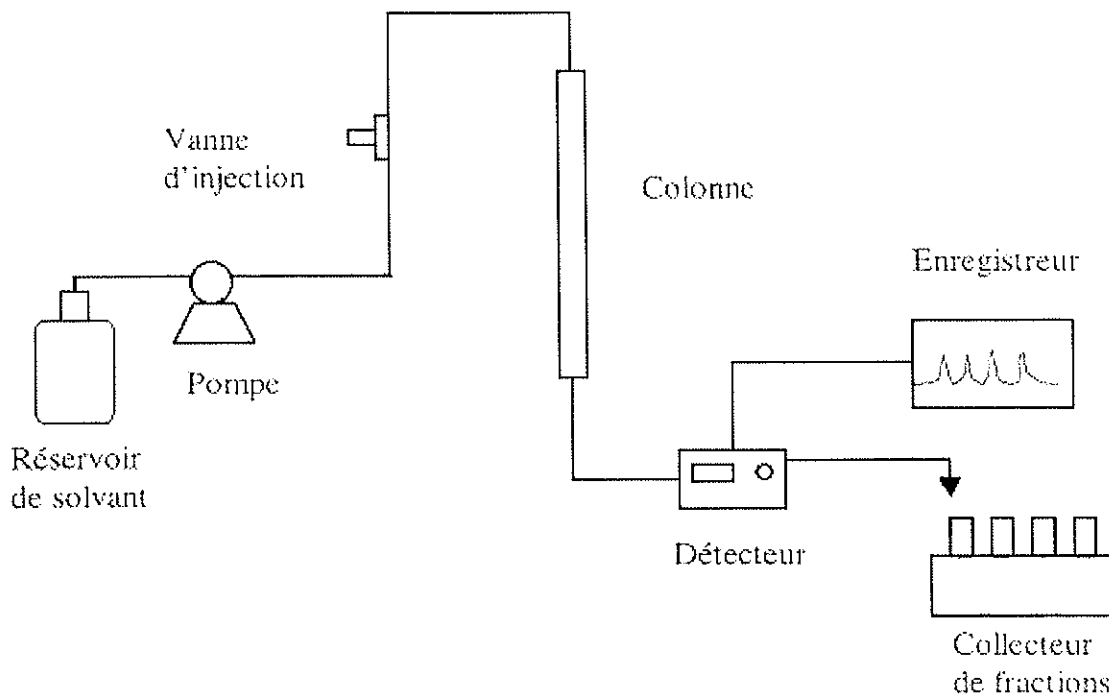


Figure 24. Schéma du montage expérimental.

La phase mobile est une solution d'acide acétique à 50 mM (pH=3 ; dégazé à l'hélium) [Franek et al. , 2000]. Cette phase permet un bon gonflement du gel, une bonne dissolution de l'échantillon et est compatible avec la phase stationnaire. La phase mobile diffuse à travers la colonne grâce à une pompe à un débit de 0,14 mL/mn. Le liquide diffuse à la surface du support par un adaptateur de flux. On injecte 0,2 à 0,3 mL de l'échantillon, contenant les molécules en solution aqueuse, au niveau d'une vanne à trois voies. Les constituants de

l'échantillon sont séparés dans la phase stationnaire et détectés en continu au niveau du réfractomètre. Les signaux émis par le détecteur sont enregistrés et traités par le logiciel CHROMA. Les fractions d'hydrolysats peuvent être collectées à la sortie du détecteur.

III. Le gel de polyacrylamide : Bio-Gel® P

Les perles de polyacrylamide du Bio-Gel® P sont préparées par la copolymérisation de l'acrylamide avec le N, N-méthylènebisacrylamide en présence de persulfate d'ammonium et de β -diméthylamino-propionitrile [3].

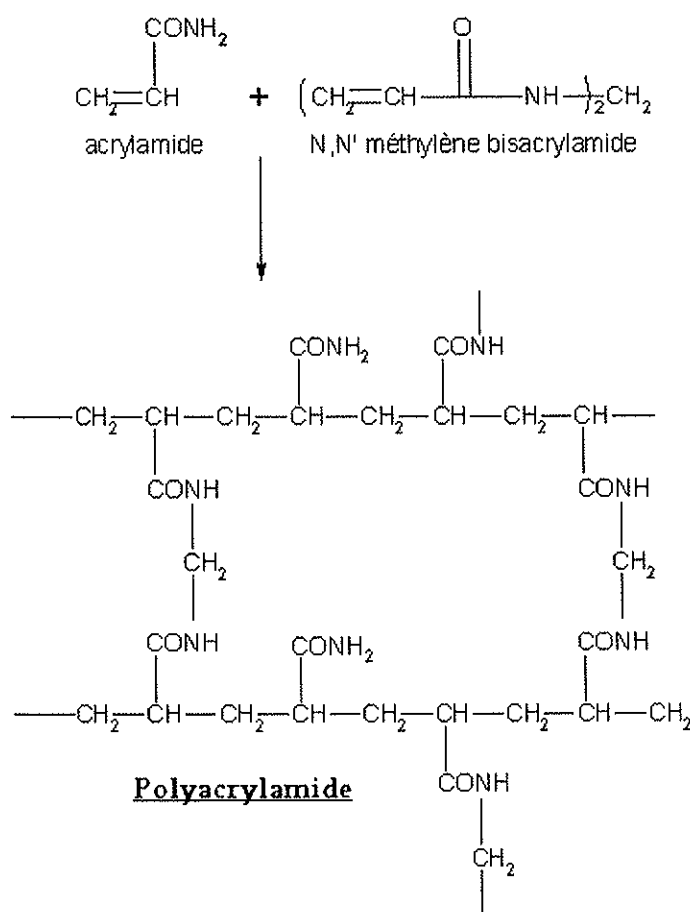


Figure 25. Gel de Polyacrylamide [Burgot et Burgot , 2002].

Les Bio-Gel® P sont compatibles avec les acides organiques dilués. L'alcool, jusqu'à 20 % v/v, peut être employé pour augmenter la solubilité des peptides sans changer les propriétés d'exclusion des gels.

Gel	Particle Size Range, Hydrated Beads (μM)	Typical Hydrated Bed Volume, ml/g of Dry Gel	Typical Flow Rates (cm/hr)*	Typical Fractionation Range/Nominal Exclusion Limit (Daltons)**, †
Bio-Gel P-2 Gel, Fine	45-90	3	5.0-10	100-1.800
Bio-Gel P-2 Gel, Extra Fine	< 45		< 10	100-1.800
Bio-Gel P-4 Gel, Medium	90-180	4	15-20	800-4.000
Bio-Gel P-4 Gel, Fine	45-90		10.0-15	800-4.000
Bio-Gel P-4 Gel, Extra Fine	< 45		< 10	800-4.000
Bio-Gel P-6 Gel, Medium	90-180	6.5	15-20	1.000-6.000
Bio-Gel P-6 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1.000-6.000
Bio-Gel P-6 Gel, Extra Fine	< 45		< 10	1.000-6.000
Bio-Gel P-8DG Gel	90-180	6.5	15-20	1.000-6.000
Bio-Gel P-10 Gel, Medium	90-180	7.5	15-20	1.500-20.000
Bio-Gel P-10 Gel, Fine	45-90		10.0-15	1.500-20.000
Bio-Gel P-30 Gel, Medium	90-180	9	7.0-13	2.500-40.000
Bio-Gel P-30 Gel, Fine	45-90		6.0-11	2.500-40.000
Bio-Gel P-60 Gel, Medium	90-180	11	4.0-6	3.000-60.000
Bio-Gel P-60 Gel, Fine	45-90		3.0-5	3.000-60.000
Bio-Gel P-100 Gel, Medium	90-180	12	4.0-6	5.000-100.000
Bio-Gel P-100 Gel, Fine	45-90		3.0-5	5.000-100.000

Figure 26. Propriétés des Bio-Gels® P [3].

IV. Détecteur : le réfractomètre différentiel

IV.1. Le système optique

Le réfractomètre différentiel mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'éluant en sortie de la colonne [4]. La sensibilité est d'autant plus grande que la différence d'indice de réfraction des solutés à séparer et de la phase mobile est grande.

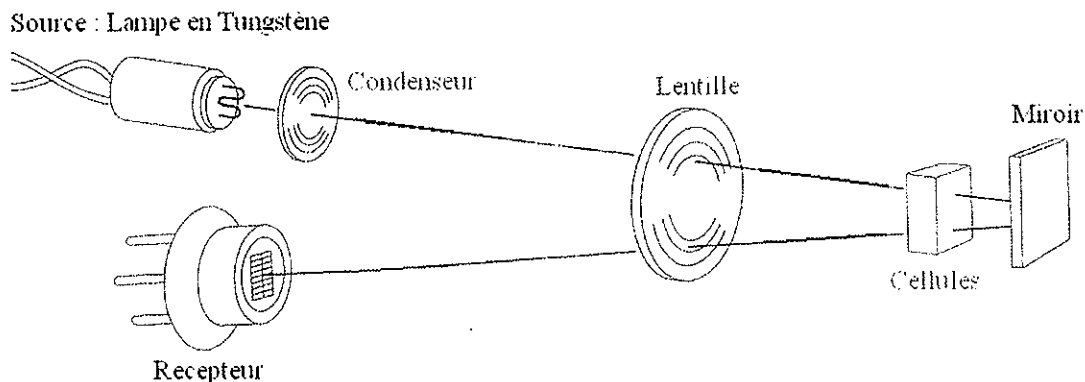


Figure 27. Chemin optique du faisceau incident [Perkin-Elmer®, 1993].

Le détecteur permet de mesurer la déviation d'un faisceau lumineux, provoquée par le changement de l'indice de réfraction de la partie mesurée par rapport à celui de la partie de référence lors du passage dans la cellule (**Figure 28**). Un côté de la cellule contient le solvant de référence (solvant de la phase mobile) d'indice de réfraction n_0 qui est statique pendant le procédé de mesure. L'autre côté contient la solution échantillon ayant l'indice de réfraction n .

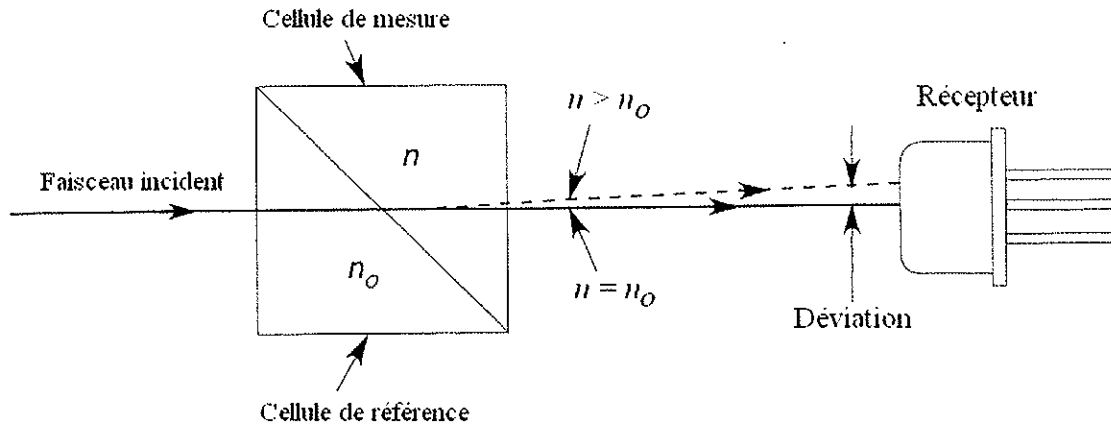


Figure 28. Réfraction d'un faisceau incident [Perkin-Elmer®, 1993].

IV.2. Mesure du signal en sortie du réfractomètre

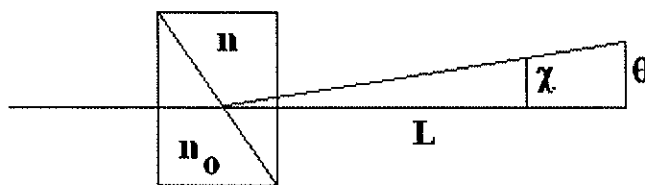


Figure 29. Faisceau incident et loi de Snells-Descartes [Brébec et al. , 1999].

La loi de Snells-Descartes (**Annexe 6**) sur la réfraction est appliquée à l'interface liquide-liquide de la cellule ; il est alors possible de calculer le signal en sortie du réfractomètre [Brébec et al. , 1999] :

$$n_0 \cdot \sin(45) = n \cdot \sin \theta = n \cdot \sin(45 - \theta) \quad (1)$$

Pour des angles très petits il est possible d'écrire :

$$\sin(45 - \theta) = \sin(45) - \tan \theta = \sin(45) - \frac{\chi}{L} \quad (2)$$

La combinaison des équations (1) et (2) prouve que l'accroissement de l'indice de réfraction (IR) est proportionnel à la déviation χ .

$$\frac{n - n_0}{n} = \frac{\chi}{L \cdot \sin(45)} \quad (3)$$

A faible concentration, n peut être remplacé par n_0 , elles ont presque la même valeur.

$$\underline{IR_{signal} = IR_{calculé} \cdot \frac{n - n_0}{n_0}} \quad (4)$$

V. Kit de calibration de la colonne : les polymères

Les deux familles de polymères, pullulanes et PEG, sont commercialisées sous forme de kits de calibration pour la chromatographie d'exclusion stérique. L'intérêt d'avoir choisi ces polymères est que la plage des masses moléculaires disponibles pour ces composés est en adéquation avec la plage de fractionnement du Bio-Gel[®] P2 (100-1800 Da). De plus, les polymères utilisés présentent une grande monodispersité.

V.1. Mesure des tailles moléculaires

La masse molaire d'une molécule est la masse d'une mole de cette molécule définie à partir des atomes la composant et exprimée en gramme par mole (g/mol). La masse moléculaire est exprimée en Dalton (Da); elle est définie et calculée par différentes techniques.

Dans la suite de l'étude, on parlera indifféremment de masse moléculaire et de taille moléculaire.

La masse moyenne d'un polymère est caractérisée principalement par deux valeurs, la taille moléculaire moyenne en nombre **Mn** et la taille moléculaire moyenne en poids **Mp** [Dalmeyda, 1994]. Le rapport de ces deux valeurs caractérise la dispersion des tailles autour de la valeur moyenne, c'est l'indice de polydispersité I.

Ces tailles sont exprimées en **u** (unité de masse atomique).

L'unité de masse atomique **u** est le 1/12ème de la masse réelle d'une mole de ¹²C.

$$u = \frac{1}{12} \times \frac{0,012}{6,02 \cdot 10^{23}} = 1,67 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

$$1 u = 1 \text{ dalton (Da)}.$$

V.1.1. La taille moléculaire en nombre : Mn

C'est une taille moyenne, caractéristique de la distribution de l'échantillon analysé. Les propriétés de l'échantillon sont liées à la proportion de constituants de faible masse molaire.

Elle est exprimée en **u** (unité de masse atomique).

$$\bar{Mn} = \frac{\sum (n_i \cdot Mi)}{\sum n_i} = \frac{\sum (c_i)}{\sum \frac{c_i}{Mi}}$$

n_i et c_i représentent respectivement le nombre et la concentration pondérale de chaque molécule de masse Mi .

i étant le degré de polymérisation, $i = 1$ (monomère) à $i = \text{infini}$.

V.1.2. La taille moléculaire en poids : M_p ou M_w

C'est une taille moyenne, caractéristique de l'échantillon analysé. Elle donne une évaluation assez précise de la quantité de constituants de masse molaire élevée qui ont une incidence sur la résistance mécanique du polymère.

Elle est exprimée en u (unité de masse atomique).

$$\overline{M}_p = \frac{\sum (n_i \cdot M_i^2)}{\sum (n_i \cdot M_i)} = \frac{\sum (c_i \cdot M_i)}{\sum c_i}$$

V.1.3. L'indice de polydispersité : I

C'est le rapport de M_p sur M_n .

$$I = \frac{M_p}{M_n}$$

La polydispersité représente l'inhomogénéité de l'échantillon. Plus l'intervalle de taille est étroit, plus sa valeur sera faible.

V.2. Les pullulanes

Le pullulane est un polysaccharide biodégradable [Gebelin, 1993]. C'est un glucane extracellulaire neutre synthétisé par *Aureobasidium pullulans*, aussi appelé *Pullularia pullulans*. La structure cyclique et non chargée du pullulane est une succession d'unité maltotriose - élément de base, le glucose - liées par des liaisons α -1,6 glycosidiques (Figure 30).

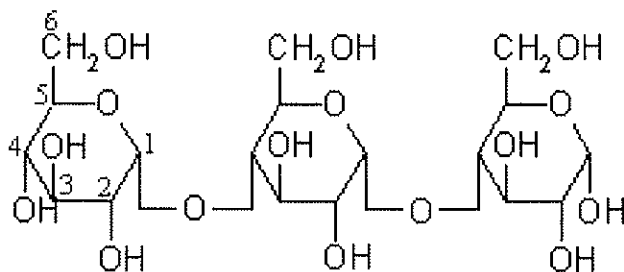


Figure 30. Unité maltotriose d'une structure pullulane.

Les pullulanes employés lors de l'étalonnage de la colonne chromatographique possèdent les caractéristiques décrites dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Tailles moléculaires et indices de polydispersité des pullulanes employés lors de l'étalonnage.

pullulanes		
Mp (Da)	Mn (Da)	I
404000	357522	1,13
5900	5413	1,09
738	738	1,00
180	180	1,00

V.3. Les Poly-éthylènes Glycol

Les poly-éthylènes glycols (PEG) sont synthétisés par polymérisation catalytique d'éthylène glycol et d'oxyde d'éthylène. Ce sont des polymères solubles dans l'eau dont la masse moléculaire varie en fonction du nombre de groupements d'oxyde d'éthylène n dans la molécule. Les PEG sont des molécules aliphatiques et non chargées.



Figure 31. Formule chimique des Poly-éthylènes glycols.

Les PEG employés lors de l'étalonnage de la colonne chromatographique possèdent les caractéristiques décrites dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Tailles moléculaires et indices de polydispersité des PEG employés lors de l'étalonnage.

PEG		
Mp (Da)	Mn (Da)	I
76	76	1,00
450	450	1,00
800	775	1,03
1000	1000	1,00
1200	1200	1,00
2000	2000	1,00
2200	2150	1,02
2700	2550	1,06
3200	3200	1,00
4000	4000	1,00
5000	4850	1,03

RESULTATS

&

DISCUSSION

Le but de ce travail est d'étalonner la colonne chromatographique à l'aide de kits de calibrations, PEG et pullulanes, afin de pouvoir estimer la taille moléculaire des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de colza. Dans un second temps, je confronterais les résultats de mon étalonnage avec l'élution d'échantillons peptidiques de masses molaires connues. Les échantillons peptidiques employées sont issus de la synthèse chimique et de kits de calibration commerciaux.

I. Paramètres d'élution d'un soluté

L'étalonnage de la colonne a nécessité l'emploi d'un kit de calibration de pullulanes et de PEG. Le choix de ces polymères est dû à la large plage des masses moléculaires disponibles et à leur grande monodispersité. Ces kits m'ont permis de couvrir l'ensemble de la gamme de fractionnement du Bio-Gel® P2 (100-1800 Da) et ainsi permis de déterminer le volume mort (V_0) et le volume total accessible (V_t) de la colonne.

Il est important de noter que l'étalonnage s'est essentiellement effectué avec le kit de PEG. Pour le kit de pullulanes, seules quatre tailles (180, 738, 5900 et 404000 Da) suffisent à couvrir la zone de fractionnement du Bio-Gel® P2.

Tableau 10. Données expérimentales d'élution du kit de PEG dans la matrice Bio-Gel® P2.

PEG (Da)	Temps rétention (mn)	Volume d'élution (mL)
35000	136	19,0
2550	134	18,8
2000	151	21,2
1200	150	21,0
1200	150	21,1
1200	149	20,9
1000	150	21,1
775	169	23,6
450	188	26,3
400	193	27,1
194	242	33,9
106	285	39,8
76	296	41,5

Débit : 0,14 mL/mn

Tableau 11. Données expérimentales d'élution du kit de pullulanes dans la matrice Bio-Gel® P2.

pullulanes (Da)	Temps rétention (mn)	Volume d'élution (mL)
180	331	46,3
180	326	45,6
738	246	34,4
738	251	35,1
738	247	34,6
5900	142	19,8
5900	134	18,7
404000	133	18,6

Débit : 0,14 mL/mn

1.1. Détermination des volumes de la colonne

- La détermination du volume mort (V_0) de la colonne nécessite l'injection de polymères de tailles moléculaires supérieures à 1800 Da.

Tableau 12. Détermination expérimentale du volume mort de la colonne.

	Volume d'élution (mL)
PEG 35000	19,0
PEG 2550	18,8
pullulane 404000	18,6
pullulane 5900	19,8
pullulane 5900	18,7

Volume mort 19,0 mL ± 0,5 mL

Le volume d'élution du PEG 2000 se situe dans la zone de transition entre la limite supérieure de fractionnement et le volume mort du Bio-Gel® P2. Il n'est donc pas pris en considération lors de la détermination du volume mort, ni même dans la partie linéaire de la courbe d'étalonnage (Figure 32).

- L'injection de polymères de masses moléculaires inférieures à la gamme de fractionnement du Bio-Gel[®] P2 (100 Da) permet de déterminer le **volume total** V_t , Seul le PEG 76 répond à ce critère ($V_{PEG\ 76} = 41,5\ mL$), le volume total expérimental de la colonne exprimé pour le kit de PEG est donc de **41,5 mL**.

Le kit de pullulanes ne contenant pas de polymère de masse moléculaire suffisamment faible, le volume total fera l'objet d'une estimation. La limite inférieure de fractionnement du Bio-Gel[®] P2 étant de 100 Da, nous considérons le volume total du kit de pullulanes comme étant égal au volume d'élution d'un pullulane de masse moléculaire de 100 Da.

Le volume d'élution du pullulane 100 Da sera obtenu par calcul après détermination expérimentale de l'équation de la droite d'étalonnage (**Figure 32**).

- Le calcul du **volume interne** de solvant présent dans les particules de gel est le suivant :

$$\text{Volume interne} = \text{Volume total} - \text{Volume mort}$$

Pour le kit de calibration PEG ; le volume interne est de $V_i = 22,5\ mL$.

1.2. Répétabilité

La répétabilité est un élément permettant de caractériser la fidélité des mesures qui doivent être effectuées par un même opérateur, sur un même ensemble d'instruments, avec une méthode unique.

Dans le but de vérifier cette fidélité, des polymères ont été injectés à trois reprises, les résultats sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13. Répétabilité, détermination du volume d'élution moyen à partir de trois mesures.

	Volume d'élution (1)	Volume d'élution (2)	Volume d'élution (3)	Volume moyen (mL)	Ecart type (mL)
PEG 1200	20,9	21,1	21,1	21,0	0,12
Pullulane 180	46,3	45,6	-	46,0	0,49
Pullulane 738	34,4	35,1	34,6	34,7	0,36
Pullulane 5900	19,8	18,7	-	19,3	0,78

La répétabilité est très satisfaisante (moins de 1 % d'écart à la moyenne pour le PEG 1200 et moins de 5 % pour les pullulanes) et reflète le bon fonctionnement de la colonne.

II. Etalonnage de la colonne selon le volume d'élution

II.1. Paramètres responsables du fractionnement

La colonne de Bio-Gel[®] P2 est étalonnée en traçant une courbe reliant les volumes de rétention de solutés de masses molaires données aux logarithmes de leurs masses. Les kits de polymères témoins, PEG et pullulanes (**Annexe 1**), de tailles moléculaires connues sont utilisés à cet effet.

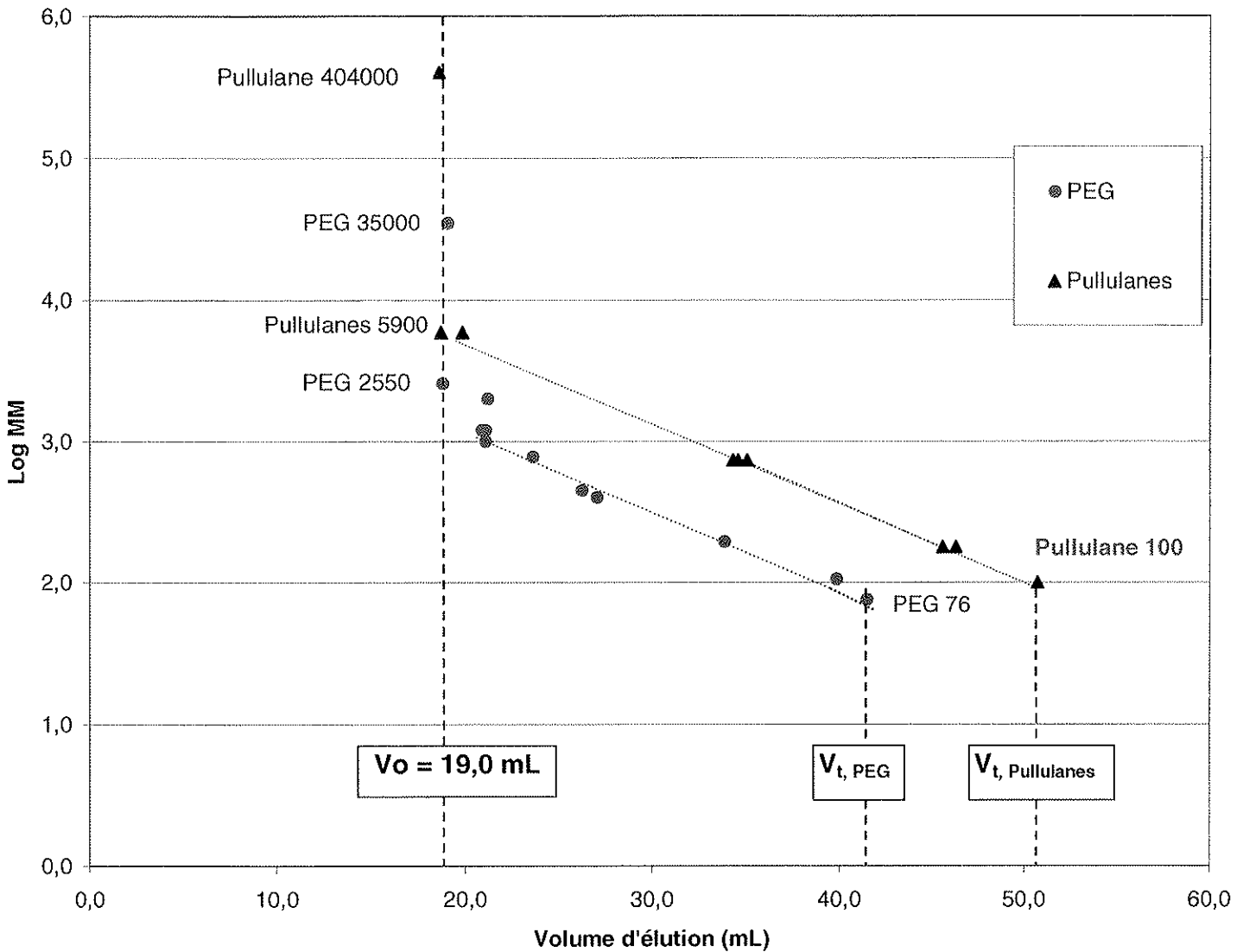


Figure 32. Étalonage de la colonne Bio-Gel[®] P2 à l'aide des kits de calibration PEG et pullulanes. Logarithme de la Masse Moléculaire (MM) en fonction du volume d'éluion (V_e).

L'éluion des deux kits de calibration de polymères ont mis en évidence l'existence de deux droites d'étalonage pour la même colonne Bio-Gel[®] P2.

A partir de la Figure 32, il est aisé de remarquer que les polymères ayant une masse moléculaire supérieure à la limite de fractionnement du Bio-Gel[®] P2 (1800 Da) apparaissent au niveau du volume mort de la colonne ($V_0=19,0$ mL). De plus, il est important de noter que

le volume total de la colonne, et donc le volume interne, est différent en fonction du kit de polymères employé. Notons ici la position du pullulane 100 qui, rappelons le, n'est qu'une estimation théorique d'après l'hypothèse énoncée au paragraphe I.1.

- Dans le cas des pullulanes, la droite d'étalonnage a pour équation $\text{Log } MM = -0,0542.V_e + 4,7492$ ($R^2 = 0,996$). Cette équation va permettre de calculer le volume d'élution théorique du pullulane 100 qui n'est autre que le volume total de la colonne :

$$\underline{V_{e, Pullulane\ 100} = V_{t, Pullulanes} = 50,7 \text{ mL}}$$

Connaissant le volume total de la colonne, il est désormais possible de déterminer le volume interne de la colonne dans le cas des pullulanes :

$$\underline{V_{i, Pullulanes} = 50,7 - 19,0 = 31,7 \text{ mL}}$$

- Le kit des PEG révèle, quant à lui, une droite d'étalonnage d'équation $\text{Log } MM = -0,0566.V_e + 4,2189$ ($R^2 = 0,978$).

Au travers de ces deux droites de calibration d'équations totalement différentes, il semble se dégager l'influence de deux paramètres.

- Comme décrit dans la partie théorique, les molécules sont bien fractionnées selon leur "**Taille**" ou plus exactement selon leur masse molaire. Dans les deux familles de polymères, les solutés sont élués dans l'ordre inverse de leur masse moléculaire.
- Dans le cas présent, les solutés sont certes élués en fonction de leur masse molaire, cependant chaque famille de polymères possède sa propre droite de calibration. Il est clair, à la vue du graphique, que deux polymères de même masse molaire n'ont pas forcément le même volume de rétention (PEG 775, $V_e=23,6 \text{ mL}$ – pullulane 738 $V_e=34,7 \text{ mL}$ en moyenne). Cette constatation permet d'introduire le second paramètre

mis en jeu lors de l'éluion : la "**Conformation moléculaire**". Si l'on pose l'hypothèse que les interactions entre solutés et phase stationnaire sont très faibles, alors la conformation moléculaire prise par le soluté dans le solvant prend toute son importance dans la divergence de ces deux droites de calibration (les pullulanes sont des molécules cycliques non chargées et les PEG des molécules aliphatiques non chargées). La conformation spatiale de la molécule illustre la capacité qu'a un soluté à pénétrer dans un pore (**Figure 33**).

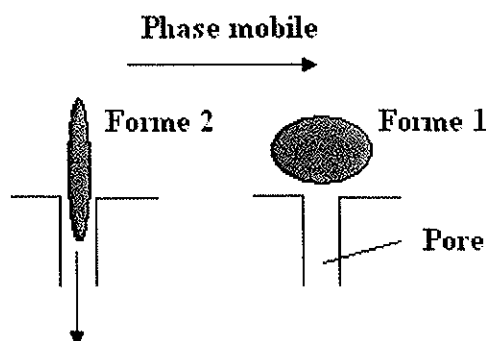


Figure 33. Illustration de l'influence de la conformation moléculaire d'un soluté.

Après avoir déterminé l'équation des deux droites de calibration, il est maintenant intéressant de connaître le comportement de peptides dans le Bio-Gel[®] P2.

II.2. Analyse d'échantillons peptidiques

La deuxième partie de mon travail fut d'étudier le comportement d'échantillons peptidiques de masses moléculaires connues face à ces deux droites de calibration. Les peptides employés à cet effet sont soit des peptides issus du commerce, soit des peptides synthétisés au sein du laboratoire au cours de travaux de recherche antérieurs. Les peptides d'origine synthétique concernent les analogues alpha 3 et alpha 5 ainsi que les peptides identifiés par une séquence en acides aminés matérialisée par des lettres. Dans les deux cas de figure, peptides synthétiques ou commerciaux, la masse moléculaire des échantillons a été vérifiée par spectrométrie de masse (**Annexe 7**).

Le débit de travail étant de 0,14 mL/mn, l'éluion d'un composé nécessite en moyenne 8 heures. Face à cette réalité et après l'étalonnage de la colonne, mon travail d'éluion d'échantillon peptidique fut limité à la représentation graphique **Figure 34**.

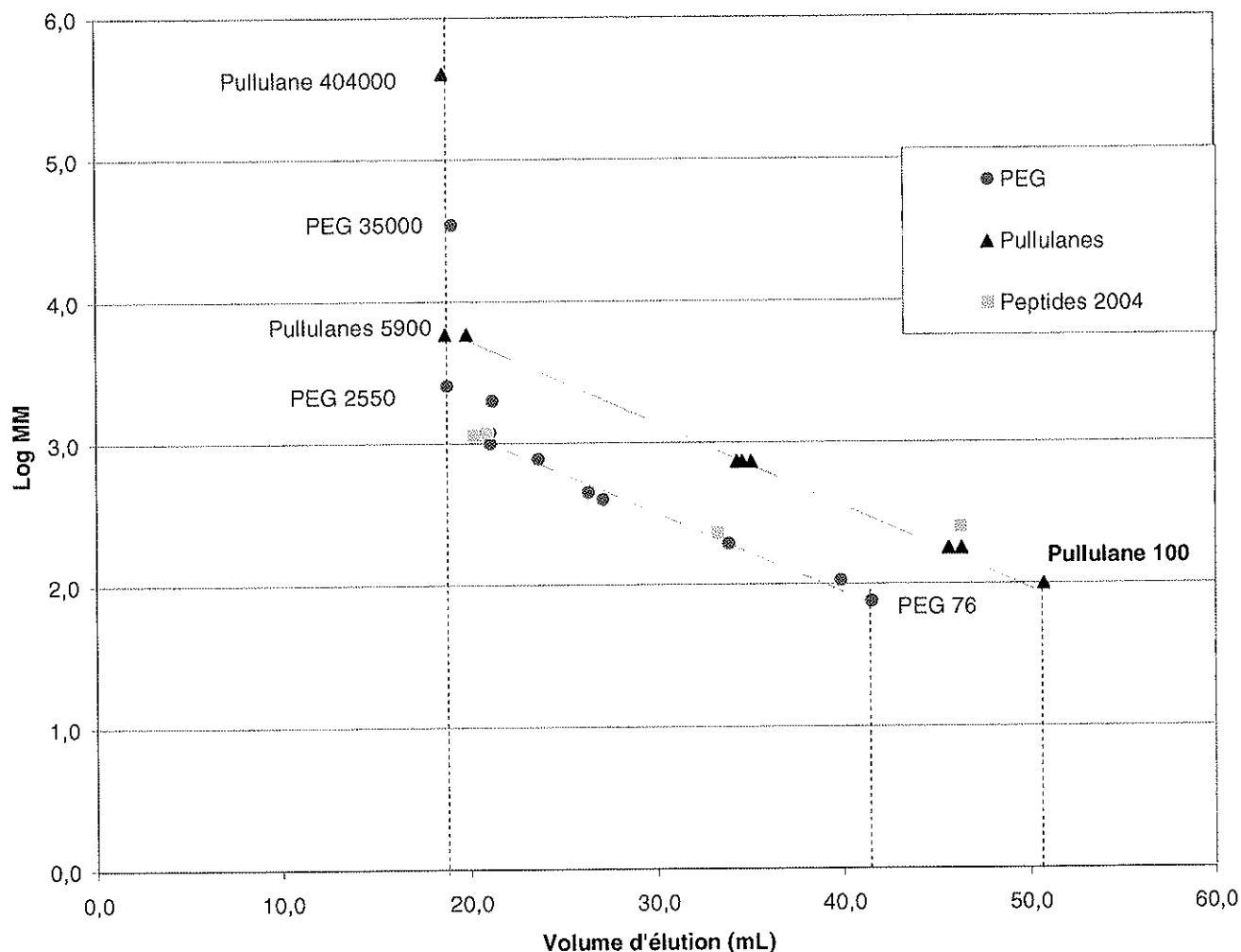


Figure 34. Peptides élués en 2004 (ce travail) et droites de calibration.

Mon travail reste préliminaire et bien que venant en complément de l'étude réalisée par Bounaas [Bounaas, 2002]. C'est pourquoi la presque totalité des données d'éluion des peptides (**Annexe 2**) sont le résultat d'expériences conduites par Bounaas en 2002.

Les conditions opératoires mises en jeu par Bounaas et la partie expérimentale de ce travail sont, dans la mesure du possible, identiques (température de travail, pompe, détecteur...). Cependant, l'emploi de la même colonne pour les deux séries d'études a conduit

à des effets de tassement de la matrice gel et les conditions de stockage à 4 °C (risque de dessèchement du gel) ont dû modifier les paramètres d'élution de la colonne. Malgré cela, le volume mort obtenu par Bounaas ($V_0 = 19,8 \text{ mL}$) et celui obtenu deux ans après, en 2004 ($V_0 = 19,0 \text{ mL}$) sont assez peu différents (< 5 %) et permettent donc de considérer comme valables les résultats expérimentaux de Bounaas pour le reste de l'étude.

Globalement, et compte tenu de ce qui a été exposé ci-avant, nous pouvons considérer que les deux courbes d'étalonnage encadrent pratiquement l'ensemble des résultats expérimentaux.

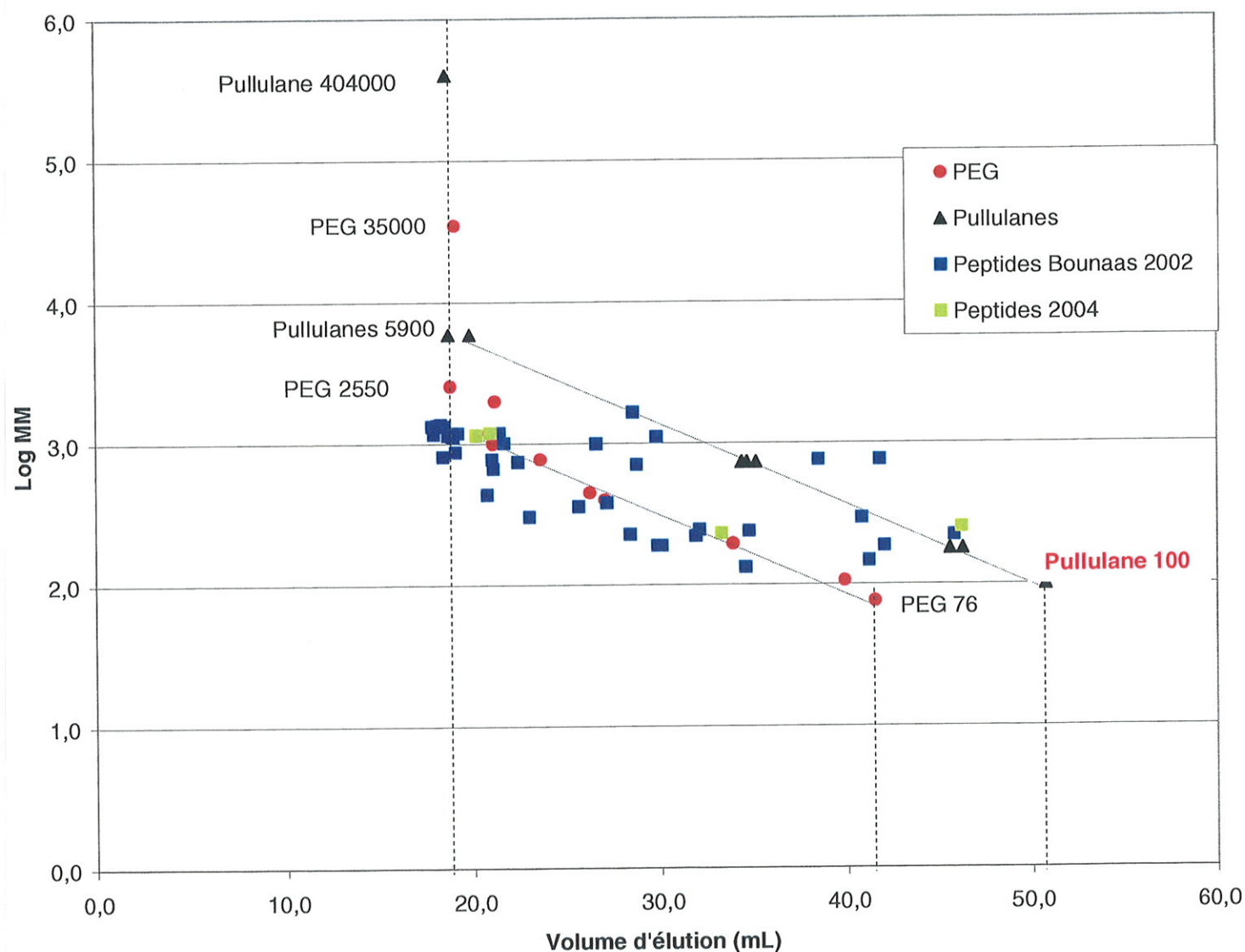


Figure 35. Peptides élués en 2002 par Bounaas et en 2004 (ce travail) et droites de calibration.

La **Figure 35** montre la superposition des deux droites de calibration obtenues en 2004 et le volume d'élution des peptides élués en 2004 et par Bounaas en 2002. Il est intéressant de remarquer graphiquement qu'une partie des peptides se positionne dans le voisinage ou le prolongement de chacune des droites de calibration issues des kits de PEG et de pullulanes, tandis que quelques peptides se répartissent de part et d'autre de ces deux droites de calibration ou se situent au niveau du volume mort de la colonne. Essayons maintenant de trouver, si possible, un dénominateur commun à ces différentes répartitions peptidiques.

Afin de mieux appréhender les commentaires, les caractéristiques physico-chimiques des acides aminés sont présentées en **Annexe 3**.

II.2.1. Peptides élués avec le volume mort de la colonne

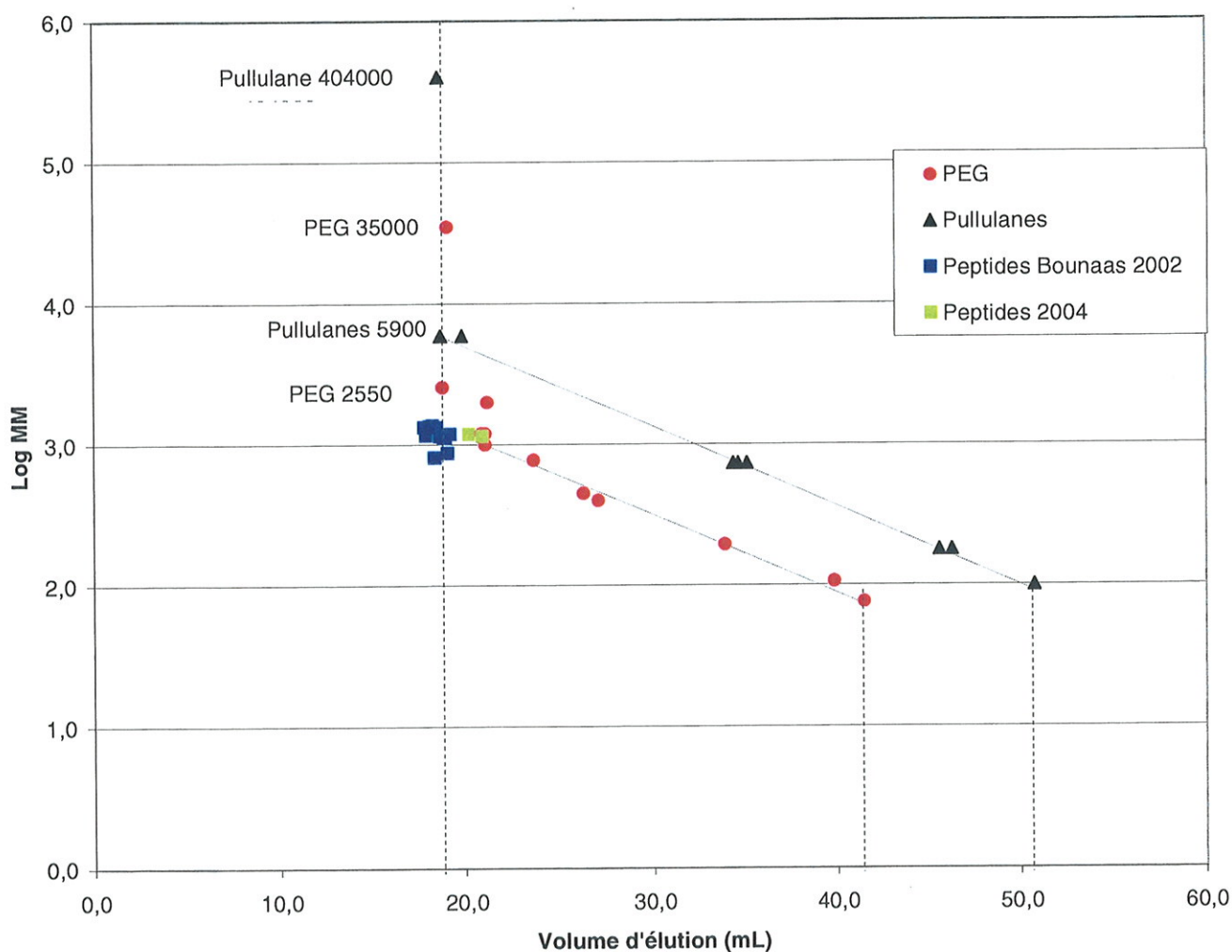


Figure 36. Peptides élués avec le volume mort de la colonne.

Les peptides élués appartiennent essentiellement à deux familles, les analogues peptidiques Alpha 3 et Alpha 5 des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine. Les analogues présentés dans le **Tableau 14** diffèrent selon le positionnement de l'acide aminé Alanine dans la séquence.

Les analogues peptiques Alpha 3 et Alpha 5 (à l'exception du peptide Ala8-Alpha5) sont des peptides électropositifs et de masses molaires élevées. La différence réside dans les propriétés structurales de la séquence peptidique, les analogues peptidiques Alpha 5 sont aliphatiques et les analogues Alpha 3 aromatiques.

Tableau 14. Peptides élués avec le volume mort de la colonne.

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Volume d'éluion (mL)	Propriétés structurales et de charges de la séquence peptidique	
KNFFKE	812,0	18,4	Neutre	Aromatique
Ala2-Alpha3	1363,7	18,3	2+	Aromatique
Ala11-Alpha3	1347,5	18,1	2+	Aromatique
Ala6-Alpha3	1332,7	18,5	+	Aromatique
Ala7-Alpha3	1332,5	17,8	3+	Aromatique
Ala12-Alpha5	1194,5	19,2	+	Aliphatique
Ala12-Alpha5 (2004)	1194,5	20,9	+	Aliphatique
Ala11-Alpha5	1178,5	18,8	+	Aliphatique
Ala9-Alpha5	1164,5	17,9	+	Aliphatique
Ala7-Alpha5	1151,5	18,6	+	Aliphatique
Ala7-Alpha5 (2004)	1151,5	20,2	+	Aliphatique
Ala10-Alpha5	1150,5	18,7	2+	Aliphatique
Ala2-Alpha5	1134,4	18,8	+	Aliphatique
Ala8-Alpha5	1109,3	18,9	Neutre	Aliphatique

Dans le cas des analogues peptidiques Alpha 3, la structure moléculaire a pu être estimée à l'aide du système Indy Silicon Graphics utilisant le programme DYANA. Le calcul des distances géométriques et la minimisation d'énergie ont permis d'estimer la structure moléculaire possédant la plus faible énergie (**Figure 37**).

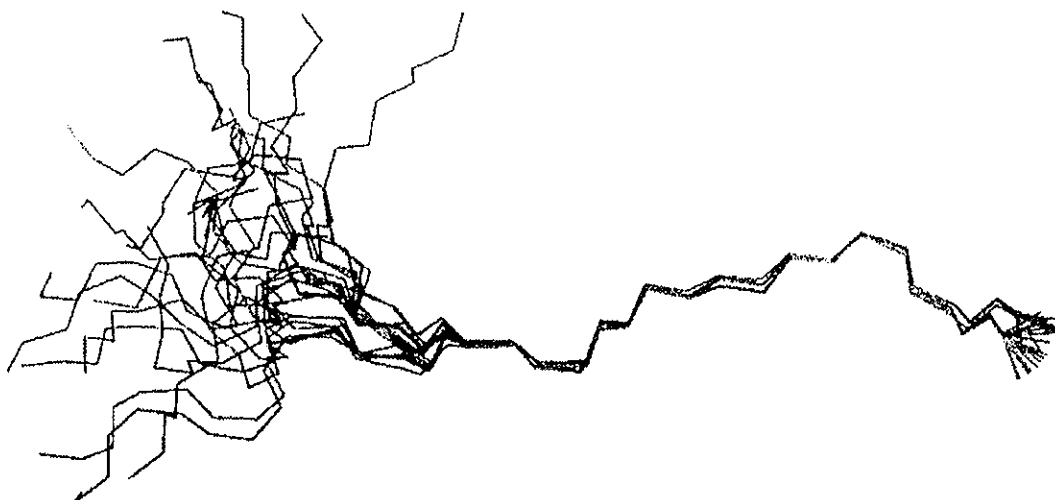


Figure 37. Simulation du modèle moléculaire de l'analogue peptidique Ala12-Alpha 3 (superposition de 23 modèles de basse énergie) [Skok et al. , 2001].

La simulation informatique (**Figure 37**) met en évidence une molécule linéaire possédant une partie stable quel que soit le modèle énergétique trouvé.

Cette structure linéaire empêche l'inclusion des molécules au sein des pores du support gel, ce qui explique peut-être pourquoi les peptides Alpha 3 sont élués avec le volume mort. Or, cette élution rapide n'a, en théorie, pas lieu d'être sachant que la limite supérieure de fractionnement du Bio-Gel[®] P2 est de 1800 Da.

Dans le cas des analogues Alpha 5, les peptides ont une masse molaire plus petite que les Alpha 3 tout en étant élués avec le volume mort.

Les peptides KNFFKE et Ala8-Alpha5 sont neutres et de masses molaires élevées. La différence réside dans le fait que KNFFKE est aromatique et Ala8-Alpha5 aliphatique.

II.2.2. Peptides et droite de calibration des PEG

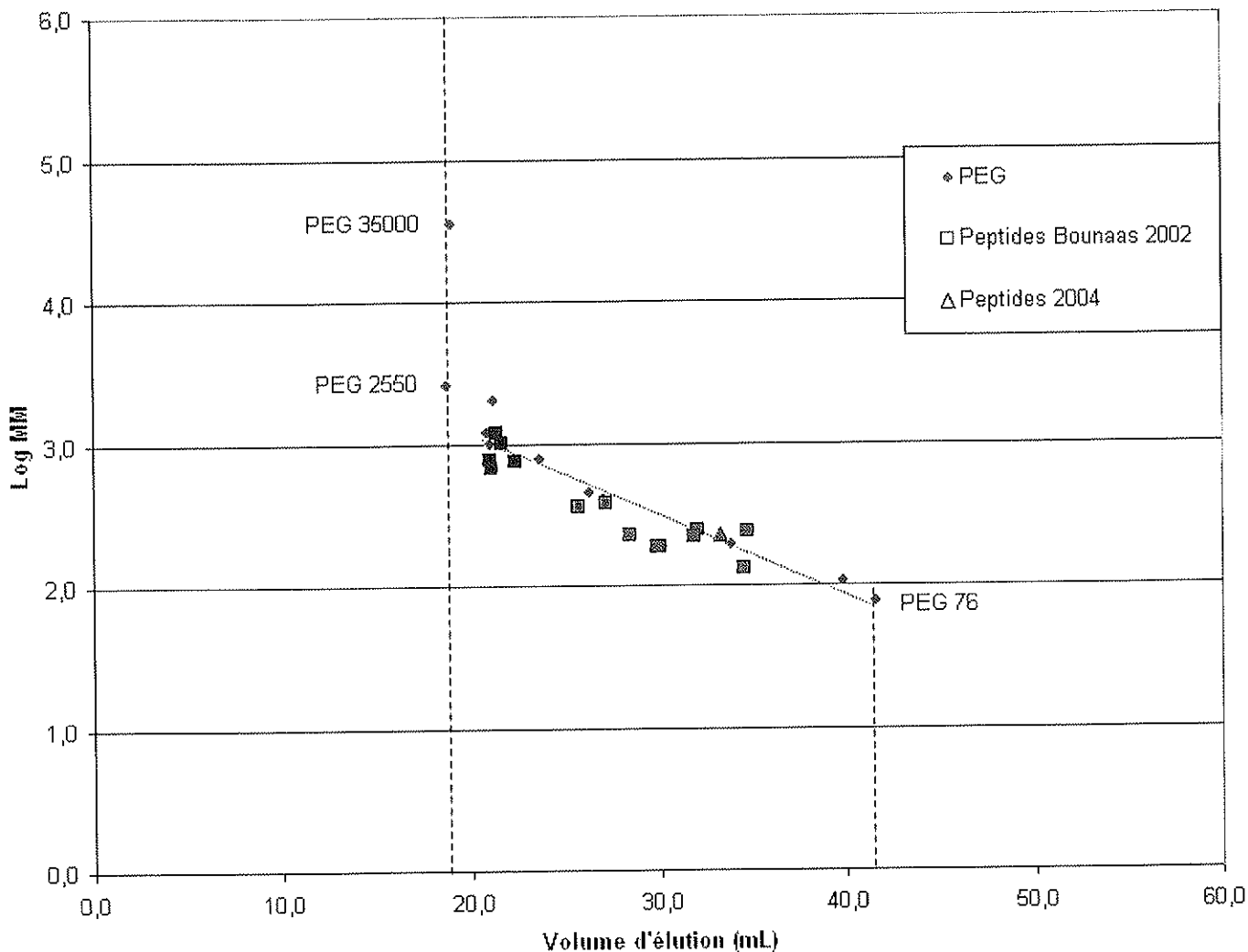


Figure 38. Peptides positionnés le long de la droite de calibration des PEG.

Les peptides positionnés le long de la droite de calibration des PEG dans la **Figure 38** ont été classés en trois catégories. La formation des groupes est basée sur le positionnement des peptides le long de la droite de calibration et d'après les caractères physico-chimiques illustrés dans le **Tableau 15**.

Les peptides du groupe **A**, de masses molaires supérieures à 600 g/mol, sont élués avec un volume d'éluion identique. A la vue du **Tableau 15**, ces peptides peuvent être subdivisés

en deux sous-unités, les peptides aromatiques / électropositifs et les peptides aliphatiques / électronégatifs.

Les deux peptides du groupe **B** ont une masse molaire comprise entre 400 et 300 g/mol et ont pour seule différence la présence, ou non, d'acides aminés aromatiques dans la séquence peptidique. Ils sont élués selon l'ordre décroissant de leur masse molaire.

Contrairement aux deux autres groupes, le groupe de peptides **C** semble être homogène. Ils sont aliphatiques et neutres, excepté pour le peptide Alanine-Histidine qui est électronégatif. Et pourtant, malgré cette uniformité de caractère, les peptides ne sont pas parfaitement élués le long de la droite de calibration.

Tableau 15. Peptides positionnés le long de la droite de calibration des PEG.

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Volume d'éluion (mL)	Propriétés structurales et de charges de la séquence peptidique	
Elodoisine	1188,0	21,4	-	Aliphatique
Interleukine	1005,0	21,7	-	Aliphatique
Angiotensine	774,9	21,0	+	<i>Aromatique</i>
TVTFKF	741,9	22,4	+	<i>Aromatique</i>
Pep.R.Erythro	664,9	21,1	+	<i>Aromatique</i>
VYV	379,4	27,2	Neutre	<i>Aromatique</i>
Leu-Leu-Leu	357,6	25,7	Neutre	Aliphatique
Leu-Leu	244,4	32,1	Neutre	Aliphatique
Gly-Tyr	238,2	34,7	Neutre	Aliphatique
Gly-Gly-Pro (2004)	229,1	33,3	Neutre	Aliphatique
Ala-His	226,3	28,4	+	Aliphatique
Ala-Met	220,3	31,9	Neutre	Aliphatique
Gly-Gly-Gly	189,3	30,1	Neutre	Aliphatique
Ala-Val	188,2	29,9	Neutre	Aliphatique
Gly-Gly	132,2	34,5	Neutre	Aliphatique

A**B****C**

Il est intéressant de remarquer que la charge électrique est la seule propriété qui puisse permettre de différencier les analogues Alpha 5 électropositifs, élués avec le volume mort de la colonne (**Tableau 14**), des deux peptides Elodoisine et Interleukine. En effet, l'ensemble des peptides sont aliphatiques et de masses molaires élevées (> 1000 g/mol).

II.2.3. Peptides et droite de calibration des pullulanes

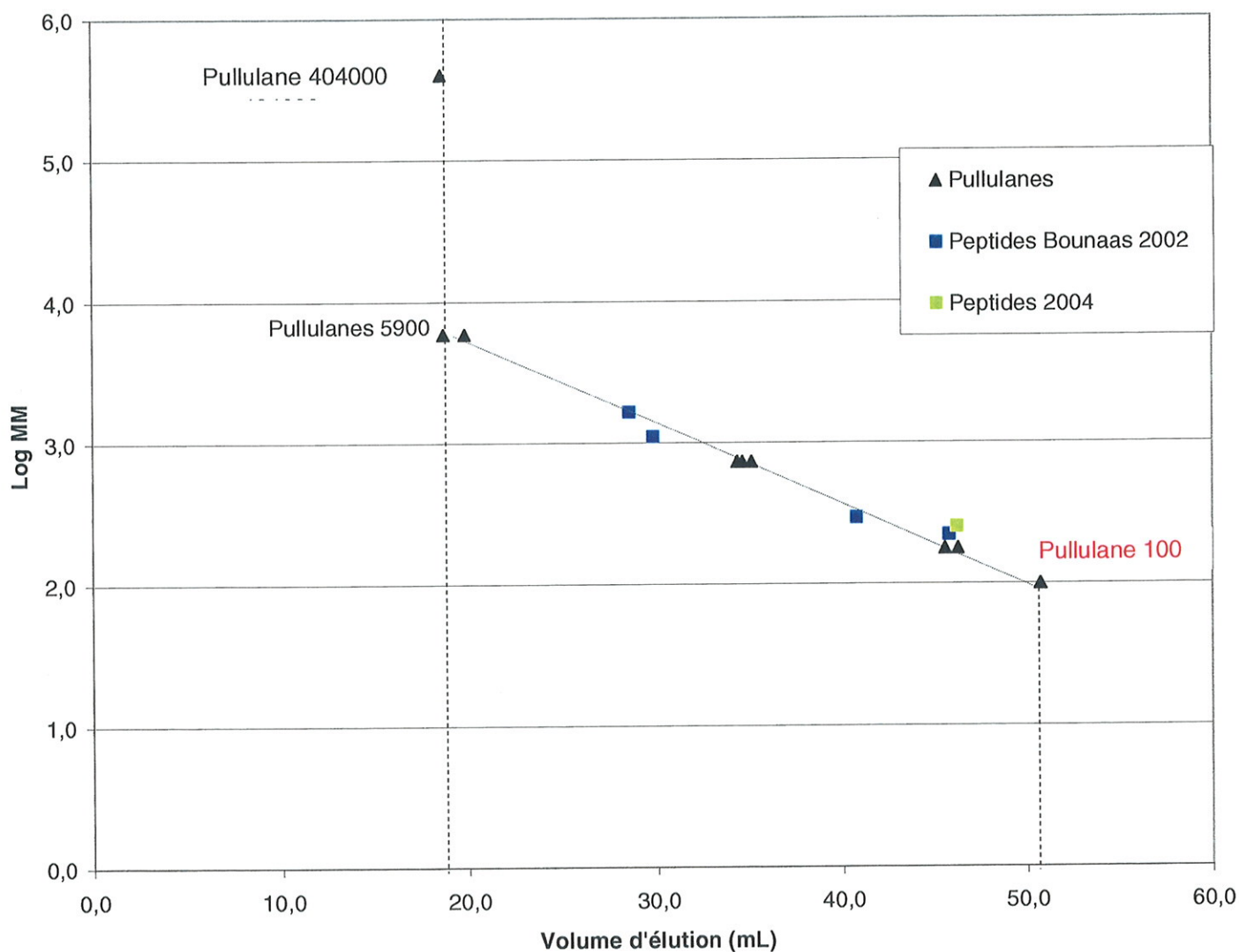


Figure 39. Peptides positionnés le long de la droite de calibration des pullulanes.

Tous les peptides présentés dans le **Tableau 16** ont une masse molaire comprise dans la limite de fractionnement de la colonne Bio-Gel[®] P2 (100-1800 Da) et sont élués par ordre décroissant des masses molaires. De plus, ils ont tous la particularité d'être neutres et d'avoir un ou plusieurs acides aminés aromatiques.

On constate cependant que l'ACTH, à l'image des analogues Alpha 3 élués avec le volume mort de la colonne (**Tableau 14**), est un peptide électropositif de masse molaire élevée.

Tableau 16. Peptides positionnés le long de la droite de calibration des pullulanes.

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Volume d'éluion (mL)	Propriétés structurales et de charges de la séquence peptidique	
ACTH 11-24	1652,0	28,6	4+	Aromatique
WGNFAVFNGV	1110,3	29,8	Neutre	Aromatique
Leu-Tyr	294,4	40,8	Neutre	Aromatique
Gly-Phe	222,2	45,8	Neutre	Aromatique
Ala-Tyr (2004)	252,3	46,2	Neutre	Aromatique

II.2.4. Peptides "particuliers"

Tableau 17. Peptides à positionnements non standardisés.

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Volume d'éluion (mL)	Propriétés structurales et de charges de la séquence peptidique	
TISYDY	760,9	41,8	-	Aromatique
TVTYDY	760,8	38,4	-	Aromatique
RYVFYFV	993,2	26,6	+	Aromatique
LHRH	702,7	28,8	2+	Aromatique
Pro-Ala	186,0	42,0	Neutre	Aliphatique
Ala-Gly	146,2	41,2	Neutre	Aliphatique
Lys-Tyr-Lys	437,6	20,7	+	Aromatique
Arg-Lys	302,4	23,0	2+	Aliphatique

Les trois peptides suivants : TISYDY, TVTYDY et LHRH possèdent sensiblement la même masse molaire et contiennent tous les trois des cycles aromatiques. Parmi les trois peptides étudiés, la seule différence visible dans le **Tableau 17** réside dans la charge, la LHRH est le seul peptide électropositif. TISYDY et TVTYDY, électronégatifs, sont certes élués dans la même "zone", mais ils ne sont pourtant pas élués sur la même droite de calibration (non représentée dans la **Figure 40**).

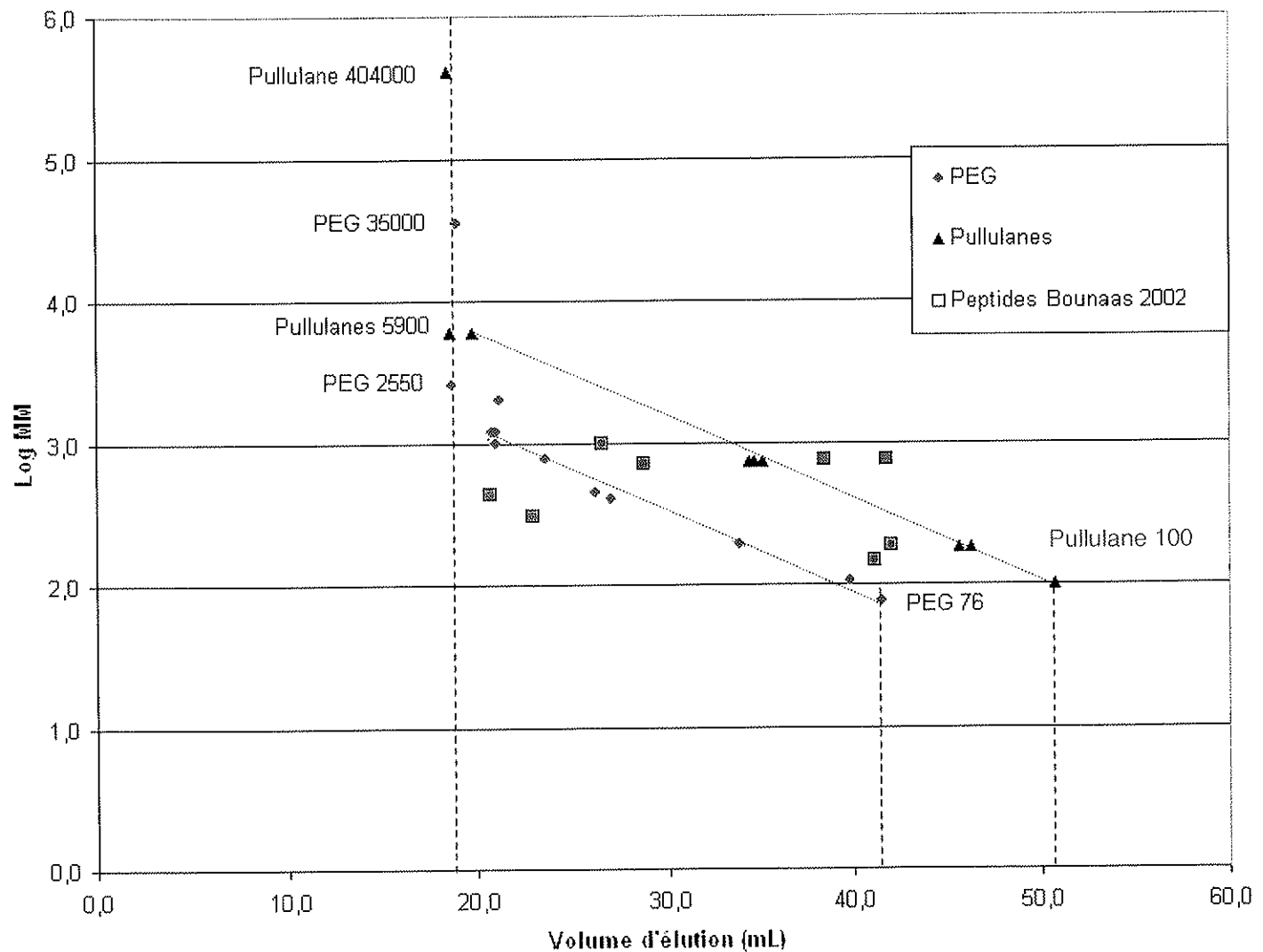


Figure 40. Peptides à positionnements non standardisés.

II.2.5. Discussion

Ce travail de calibration de la colonne Bio-Gel[®] P2 a conduit à mettre en exergue plusieurs observations. Avant tout, l'emploi de polymères de natures différentes a permis de conclure sur l'influence de leur taille moléculaire, comme cela était attendu, mais aussi sur l'importance de la conformation spatiale de la molécule dans leur capacité différente à pénétrer dans les pores de la matrice.

Au cours de l'étude, l'injection de peptides a conduit à classer les peptides en fonction de leur positionnement par rapport aux deux séries étalons. Quatre classes de peptides ont ainsi été définies :

- **les peptides élués avec le volume mort de la colonne.** Ces peptides, rapidement élués et exclus des pores, possèdent une masse molaire très inférieure (moyenne : 1187,0 g/mol \pm 139,6 g/mol) à la limite supérieure de séparation (1800 Da). Ils sont principalement constitués de molécules linéaires faiblement chargées ou de molécules comprenant au moins un acide aminé aromatique assez fortement chargé,
- **les peptides suivant la droite de calibration des PEG.** Ces peptides sont élués assez rapidement mais séparés à l'identique des PEG ; ces peptides sont majoritairement des aliphatiques non chargés pour les petites tailles, faiblement chargés négativement pour les tailles plus élevées ou faiblement chargés positivement pour ceux comprenant au moins un aromatique ; on observe ici une analogie forte avec la structure spatiale des PEG,
- **les peptides suivant la droite de calibration des pullulanes.** Ces peptides sont élués plus lentement et séparés de manière similaire aux pullulanes ; ce sont des molécules neutres contenant au moins un aromatique ; ici, le comportement de ségrégation est une copie de celui des pullulanes,
- **les peptides "particuliers".** Ces peptides dont l'élution ne correspond en rien aux caractéristiques précédentes nécessitent de réaliser plusieurs essais pour valider une analyse discriminatoire.

Il existe de nombreuses zones d'ombre dans l'interprétation de l'élution des peptides dans la colonne. La chromatographie d'exclusion stérique fractionne les molécules selon leur masse molaire cependant il semblerait à la vue des résultats expérimentaux que d'autres paramètres rentrent en jeu. Des paramètres tels que la conformation moléculaire et des phénomènes d'adsorption ont une part importante dans la ségrégation des solutés et pourraient expliquer pourquoi deux molécules de masses moléculaires identiques possèdent un volume d'élution différent ; ou pourquoi, malgré l'uniformité de caractères, les peptides ne sont pas parfaitement élués le long de la droite de calibration.

III. Etalonnage selon le coefficient de diffusion

Lors de l'élution des solutés dans la colonne, les peptides n'accèdent qu'à une fraction K_d du volume intérieur des pores ($V_e = V_o + K_d \cdot V_i$). Un étalonnage de la colonne Bio-Gel[®] P2 en fonction du coefficient de diffusion est donc envisageable ; le coefficient de diffusion de chaque soluté est exprimé en fonction du logarithme de leur masse molaire.

La **Figure 41** représente l'étalonnage de la colonne de Bio-Gel[®] P2 selon le K_d des kits de polymères témoins, PEG et pullulanes.

A l'image de l'étalonnage selon le volume d'élution, la **Figure 41** représente les deux droites de calibration issues des deux kits de polymères :

- Kit des PEG : $K_d = -0,696 \cdot \text{Log } M + 2,2420$ ($R^2 = 0,937$)
- Kit des pullulanes : $K_d = -0,546 \cdot \text{Log } M + 2,0724$ ($R^2 = 0,997$)

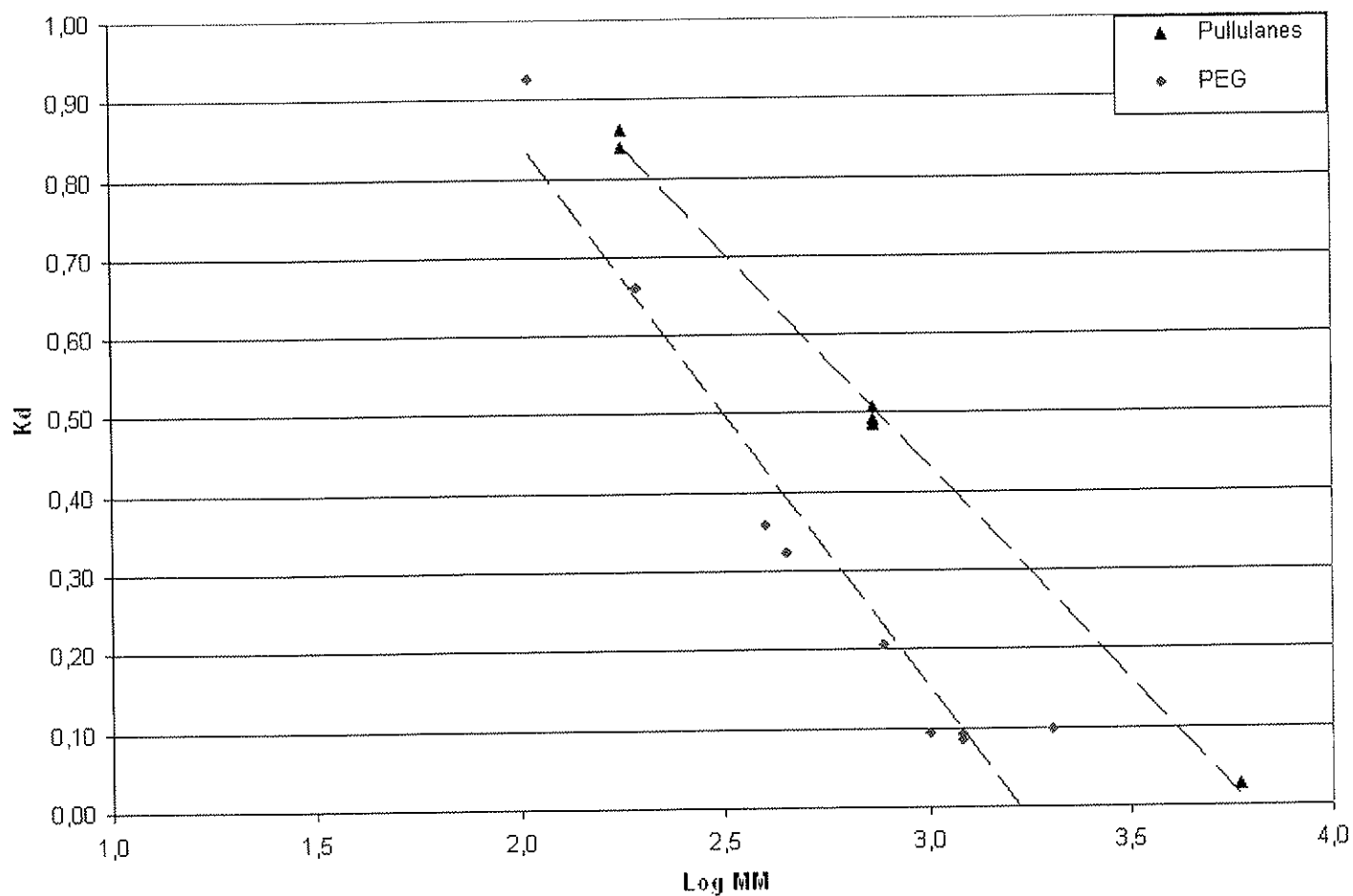


Figure 41. Etalonnage de la colonne Bio-Gel® P2 à l'aide des kits de calibration PEG et pullulanes.
Coefficient de diffusion (K_d) en fonction Logarithme de la Masse Moléculaire (MM).

L'ensemble bleu matérialise les peptides suivant la droite de calibration des PEG et l'ensemble vert matérialise les peptides suivant la droite de calibration des pullulanes (Tableau 18).

Tableau 18. Peptides élués le long des deux droites de calibration exprimées en fonction du coefficient de diffusion K_d .

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Log M	K_d
Elodoisine	1188,0	3,1	0,11
Interleukine	1005,0	3,0	0,12
Angiotensine	774,9	2,9	0,09
TVTFKF	741,9	2,9	0,15
Pep.R.Erythro	664,9	2,8	0,09
VYV	379,4	2,6	0,36
Leu-Leu-Leu	357,6	2,6	0,30
Leu-Leu	244,4	2,4	0,58
Gly-Tyr	238,2	2,4	0,70
Ala-His	226,3	2,4	0,42
Ala-Met	220,3	2,3	0,57
Gly-Gly-Gly	189,3	2,3	0,49
Ala-Val	188,2	2,3	0,48
Gly-Gly	132,2	2,1	0,69
Gly-Gly-Pro	229,1	2,4	0,63
Ala-Tyr	252,3	2,4	0,86
ACTH 11-24	1652,0	3,2	0,30
WGNFAVFNG	1110,3	3,0	0,34
Leu-Tyr	294,4	2,5	0,69
Gly-Phe	222,2	2,3	0,85

Connaissant le comportement des peptides élués par Bounaas d'après un étalonnage en fonction des volumes d'élution, analysons maintenant le comportement de ces même peptides selon un étalonnage en fonction du coefficient de diffusion (Figure 42).

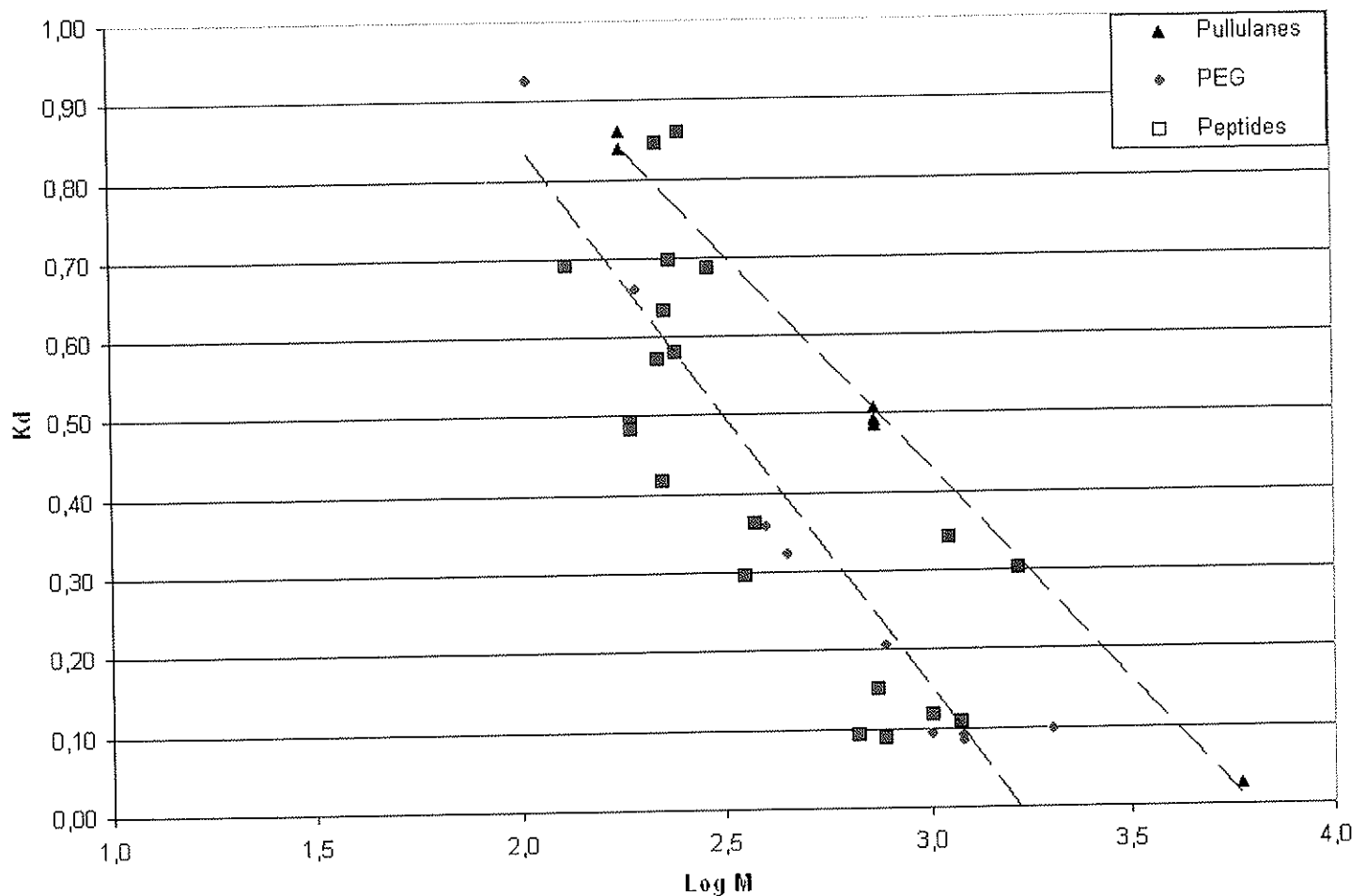


Figure 42. Etalonnage selon le coefficient de diffusion K_d et répartition des peptides élués par Bounaas (2002).

Ce type d'étalonnage en fonction du K_d permet de confirmer la tendance qu'ont certains peptides à suivre les courbes de calibration des kits de polymères.

L'intérêt premier de cet étalonnage en fonction du coefficient de diffusion est de visualiser les effets de tassement de la colonne au cours du temps et donc d'assurer une légitimité supplémentaire à l'étalonnage selon le volume d'éluion.

Comme cela a été décrit dans la partie théorique, le coefficient de diffusion dépend certes des propriétés physiques de chaque molécule (masse molaire et volume de solvation), mais l'intérêt est que, **pour un gel donné et un composé donné, K_d est une constante, indépendante des dimensions de la colonne et du tassement du gel [Irvine, 1997].** Cette

propriété permet de valider l'hypothèse émise au paragraphe II.1.1. En effet, le tassement de la colonne Bio-Gel[®] P2 (sur une période de deux ans) semble avoir été minime d'où la faible incidence sur la qualité de fractionnement :

- par analogie à l'étalonnage selon le volume d'élution, les peptides injectés par Bounaas se positionnent parfaitement avec la droite de calibration du kit de pullulanes.
- dans le cas du kit de PEG, les peptides suivent une même tendance, toutefois en léger décalage avec la droite de calibration.

L'étalonnage selon le coefficient de diffusion est donc le garant de la reproductibilité des résultats. Afin de mesurer cette fidélité, il est donc préférable d'étalonner la colonne selon le K_d pour ainsi pouvoir analyser les résultats de l'élution chromatographique sans tenir compte des effets de tassement de la colonne au cours du temps.



CONCLUSION

Ce travail avait pour objectif premier de valider les propriétés et les performances de séparation d'une colonne chromatographique d'exclusion stérique à basse pression. Le gel employé, le Bio-Gel[®] P2 (BIO-RAD), est susceptible de séparer des molécules peptidiques de 100 Da à 1800 Da ; ceci afin de pouvoir fractionner par la taille, les peptides issus du mélanges complexes constitués par les hydrolysats de protéines, de colza notamment. Face à la grande diversité des tailles du complexe peptidique, il est important de vérifier les caractéristiques théoriques de la colonne et de valider son étalonnage par l'utilisation de molécules étalon. Molécules calibrées, à structure et de compositions connues, convenablement choisies pour présenter des tailles entrant dans le domaine de perméation sélective de la colonne.

Pour cela, deux kits d'étalonnage de polymères aux caractéristiques différentes ont été employés : l'un à base de poly-éthylène glycol (PEG) et l'autre constitué de pullulanes. Chacun de ces deux kits a conduit, comme attendu, à l'établissement d'une droite d'étalonnage respectant l'élution décroissante des tailles moléculaires. Toutefois, il a été mis en évidence que les droites d'étalonnage ne se superposaient aucunement. Les pullulanes, cycliques et non chargés, sont élués plus tardivement que les PEG de même masse molaire, molécules aliphatiques non chargées. Ce résultat est très certainement lié à la conformation spatiale des molécules. En effet, les PEG sont des molécules "linéaires" alors que, pour une même masse, les pullulanes "cycliques" pénètrent plus aisément dans les pores du gel et sont ainsi élués plus lentement que les PEG. Pour ceux-ci, l'élution rapide observée, correspondraient à une exclusion partielle des pores de la matrice.

Une autre contribution intéressante de ce travail a été mise en évidence en montrant que la quasi-totalité des résultats d'élution des peptides connus, injectés à travers une même colonne sur une durée de deux ans, était "encadrée" par les deux droites de calibration, celle des PEG et celle des pullulanes. Ceci a conduit à classer les peptides en quatre groupes en fonction de leur positionnement par rapport aux deux séries étalons et leurs caractéristiques physico-chimiques essentielles :

- les peptides rapidement élués, exclus des pores et apparaissant avec le volume mort,
- les peptides élués assez rapidement et possédant une analogie forte avec la structure spatiale des PEG,

- les peptides élués plus lentement et séparés de manière similaire aux pullulanes.
- les peptides dont l'élution nécessite plusieurs essais avant de conclure sur une analyse discriminatoire.

Il apparaît, à la vue des résultats, que la chromatographie d'exclusion stérique permet effectivement de fractionner les molécules selon leur masse molaire mais que les règles qui régissent leur séparation ne sont pas basées que sur le seul critère de la taille moléculaire. D'autres facteurs interviennent de manière manifeste, comme la structure spatiale, la charge ou peut-être aussi le caractère hydrophobe. Il est évident que les phénomènes régissant la séparation des peptides ne reposent pas sur une seule propriété de masse comme semblent l'indiquer les fabricants de supports chromatographiques.

L'utilisation des résultats d'élution des peptides sur une durée de deux ans a conduit à prendre en considération un autre effet qui semble jouer sur les performances de la séparation : la compaction du lit. De manière à mesurer l'impact de ce paramètre, il est nécessaire de tenir compte du coefficient de diffusion K_d . Un étalonnage selon le K_d , présente l'avantage d'être totalement indépendant de la géométrie de la colonne et du tassement du gel contrairement à l'étalonnage selon le volume d'élution. Ce coefficient de diffusion apparaît donc comme un indicateur de la fidélité des résultats au cours du temps.

Ce travail reste préliminaire mais montre à l'évidence qu'il est nécessaire de poursuivre l'étude en utilisant des molécules aux propriétés variées d'un point de vue de la composition en acides aminés, de la taille, de la forme et du caractère hydrophobe notamment. Par ailleurs, une démarche complémentaire à ce travail devra être engagée pour prendre en compte le réel effet de la structure spatiale des molécules sur les propriétés impliquées dans la séparation des peptides. Ainsi, la séparation de peptides contenus dans des milieux complexes issus d'hydrolysats végétaux pourra conduire à l'obtention de fractions aux propriétés biofonctionnelles particulières.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure	1.	Principe de transformation des graines de colza	8
Figure	2.	Procédé de fabrication du Diester®	10
Figure	3.	Procédé d'extraction des protéines de colza	16
Figure	4.	Domaines d'application de la chromatographie liquide haute performance.....	22
Figure	5.	La transition sol-gel.....	25
Figure	6.	Image au microscope électronique de particules de gel.....	26
Figure	7.	Solvants les plus couramment employés en chromatographie d'exclusion stérique	28
Figure	8.	Principe du tamisage moléculaire	29
Figure	9.	Elution par ordre décroissant des masses moléculaires.....	29
Figure	10.	Diagramme des volumes d'élutions.....	30
Figure	11.	Variation théorique du volume d'élution en fonction du logarithme de la masse moléculaire	32
Figure	12.	Pore cylindrique de diamètre $2r_0$ vu de face. Le pore contient une macromolécule de diamètre $2r$. Le cercle en pointillés définit le volume disponible pour la macromolécule	33
Figure	13.	Courbe théorique représentant le coefficient de diffusion (K_d) en fonction du logarithme de la masse moléculaire (Log MM).....	34
Figure	14.	Détermination de la largeur W d'un pic chromatographique	35
Figure	15.	Exemple de trajet de deux molécules pendant l'élution.....	38
Figure	16.	Effet de la vitesse d'écoulement de la phase mobile sur la hauteur équivalente à un plateau théorique.....	39
Figure	17.	Détermination expérimentale de la HEPT minimale et du débit d'élution optimal ; cas de trois solutés S1, S2 et S3	40
Figure	18.	Droite de calibration : débit optimum nécessaire à une HEPT minimum en fonction du logarithme de la masse moléculaire	41
Figure	19.	Schéma du procédé de traitement du tourteau de colza	45

Figure 20.	Montage expérimental de l'hydrolyse enzymatique	47
Figure 21.	Schéma du dispositif expérimental de l'ultrafiltration	48
Figure 22.	Préparation du gel.....	50
Figure 23.	Remplissage de la colonne chromatographique.....	50
Figure 24.	Schéma du montage expérimental.	51
Figure 25.	Gel de Polyacrylamide	52
Figure 26.	Propriétés des Bio-Gels® P.....	53
Figure 27.	Chemin optique du faisceau incident.....	53
Figure 28.	Réfraction d'un faisceau incident.....	54
Figure 29.	Faisceau incident et loi de Snells-Descartes	54
Figure 30.	Unité maltotriose d'une structure pullulane.....	58
Figure 31.	Formule chimique des Poly-éthylènes glycols.....	58
Figure 32.	Etalonnage de la colonne Bio-Gel® P2 à l'aide des kits de calibration PEG et pullulanes. Logarithme de la Masse Moléculaire (MM) en fonction du volume d'éluion (V_e).....	65
Figure 33.	Illustration de l'influence de la conformation moléculaire d'un soluté.	67
Figure 34.	Peptides élués en 2004 (ce travail) et droites de calibration.	68
Figure 35.	Peptides élués en 2002 par Bounaas et en 2004 (ce travail) et droites de calibration.	69
Figure 36.	Peptides élués avec le volume mort de la colonne.....	70
Figure 37.	Simulation du modèle moléculaire de l'analogue peptidique Ala12-Alpha 3 (superposition de 23 modèles de basse énergie)	72
Figure 38.	Peptides positionnés le long de la droite de calibration des PEG.....	73
Figure 39.	Peptides positionnés le long de la droite de calibration des pullulanes.....	75
Figure 40.	Peptides à positionnements non standardisés.	77
Figure 43.	Etalonnage de la colonne Bio-Gel® P2 à l'aide des kits de calibration PEG et pullulanes. Coefficient de diffusion (K_d) en fonction Logarithme de la Masse Moléculaire (MM).....	79
Figure 42.	Etalonnage selon le coefficient de diffusion K_d et répartition des peptides élués par Bounaas (2002).....	82
Figure 43.	Réfraction, réflexion d'un rayon lumineux.....	95

Tableaux

Tableau 1.	Composition de la graine de colza non décortiquée.....	7
Tableau 2.	Importance des acides gras Omega 6 et Omega 3 pour la santé	9
Tableau 3.	Composition du tourteau de colza	11
Tableau 4.	Répartition en pourcentages des différentes familles de protéines présentes chez le colza.	13
Tableau 5.	Classification des protéases	18
Tableau 6.	Conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique	46
Tableau 7.	Description du gel Bio-Gel® P2.....	49
Tableau 8.	Tailles moléculaires et indices de polydispersité des pullulanes employés lors de l'étalonnage.	58
Tableau 9.	Tailles moléculaires et indices de polydispersité des PEG employés lors de l'étalonnage.	59
Tableau 10.	Données expérimentales d'élution du kit de PEG dans la matrice Bio-Gel® P2.....	61
Tableau 11.	Données expérimentales d'élution du kit de pullulanes dans la matrice Bio-Gel® P2.....	62
Tableau 12.	Détermination expérimentale du volume mort de la colonne.....	62
Tableau 13.	Répétabilité, détermination du volume d'élution moyen à partir de trois mesures.....	64
Tableau 14.	Peptides élués avec le volume mort de la colonne.....	71
Tableau 15.	Peptides positionnés le long de la droite de calibration des PEG.....	74
Tableau 16.	Peptides positionnés le long de la droite de calibration des pullulanes.....	76
Tableau 17.	Peptides à positionnements non standardisés.	76
Tableau 18.	Peptides élués le long des deux droites de calibration exprimées en fonction du coefficient de diffusion K_d	81

ANNEXES

<i>Annexe 1. Résultats expérimentaux de ce travail (2004)</i>	90
<i>Annexe 2. Peptides élués par Hadia Bounaas (2002)</i>	91
<i>Annexe 3. Propriétés physico-chimiques des acides aminés</i>	93
<i>Annexe 4. Chromatogramme du mélange de PEG 775, 194 & 106</i>	94
<i>Annexe 5. Chromatogramme du mélange de pullulane 180, 738 & 5900</i>	94
<i>Annexe 6. Lois de Snell – Descartes</i>	95
<i>Annexe 7. La spectrométrie de masse.</i>	96

Annexe 1. Résultats expérimentaux de ce travail (2004)

PEG	Temps (mn)	V (mL)	Log MM	Kd
35000	136	19,0	4,5	0,00
2550	134	18,8	3,4	-
2000	151	21,2	3,3	0,10
1200	150	21,0	3,1	0,09
1200	150	21,1	3,1	0,09
1200	149	20,9	3,1	0,08
1000	150	21,1	3,0	0,09
775	169	23,6	2,9	0,21
450	188	26,3	2,7	0,32
400	193	27,1	2,6	0,36
194	242	33,9	2,3	0,66
106	285	39,8	2,0	0,93
76	296	41,5	1,9	1,00

pullulanes	Temps (mn)	V (mL)	Log MM	Kd
100	-	50,7	2,0	1,00
180	331	46,3	2,3	0,86
180	326	45,6	2,3	0,84
738	246	34,4	2,9	0,48
738	251	35,1	2,9	0,51
738	247	34,6	2,9	0,49
5900	142	19,8	3,8	0,03
5900	134	18,7	3,8	-
404000	133	18,6	5,6	-

Peptides	M	Temps (mn)	V (mL)	Kd	Log M
Gly-Gly-Pro	229,1	237,7	33,3	0,63	2,4
Ala7-alpha5	1151,5	144,1	20,2	0,05	3,1
Ala-Tyr	252,3	330,2	46,2	1,21	2,4
Ala12-alpha5	1194,5	149,4	20,9	0,09	3,1

PEG			pullulanes		
V mort	V total	Vi	V mort	V total	Vi
19,0	41,5	22,5	19,0	50,7	31,7

Débit = 0,14 mL/mn

MM masse moléculaire (Da)
M masse molaire (g/mol)
V volume d'élution (mL)

Annexe 2. Peptides élués par Hadia Bounaas (2002)

Peptides	Masse molaire (g/mol)	Volume d'éluéon expérimental (mL)	Origine des peptides
ACTH 11-24	1652,0	28,6	Neosystems S.A
Ala2-Alpha3	1363,7	18,3	Synthèse chimique
Ala11-Alpha3	1347,5	18,1	Synthèse chimique
Ala6-Alpha3	1332,6	18,5	Synthèse chimique
Ala7-Alpha3	1332,5	17,8	Synthèse chimique
Elodoisine	1188,0	21,4	Neosystems S.A
Ala12-Alpha5	1194,5	19,2	Synthèse chimique
Ala11-Alpha5	1178,5	18,8	Synthèse chimique
Ala9-Alpha5	1164,5	17,9	Synthèse chimique
Ala7-Alpha5	1151,5	18,6	Synthèse chimique
Ala10-Alpha5	1150,5	18,6	Synthèse chimique
Ala2-Alpha5	1134,4	18,8	Synthèse chimique
WGNFAVFNGV	1110,3	29,8	Synthèse chimique
Ala8-Alpha5	1109,4	18,9	Synthèse chimique
Interleukine	1005,0	21,6	Neosystems S.A
RYVFYFV	993,2	26,6	Synthèse chimique
KNFFKE	812,0	18,4	Synthèse chimique
Angiotensine	774,9	21,0	Neosystems S.A
TISYDY	760,9	41,8	Synthèse chimique
TVTYDY	760,8	38,4	Synthèse chimique
TVTFKF	741,9	22,4	Synthèse chimique
LHRH	702,7	28,8	Neosystems S.A
Pep.R.Erythro	664,9	21,1	Neosystems S.A
Lys-Tyr-Lys	437,6	20,7	Sigma G-1142
Arg-Lys	302,4	23,0	Sigma A-4783
Leu-Tyr	294,4	40,8	Serva 51935
Leu-Leu	244,4	32,1	Serva 51860
Gly-Tyr	238,2	34,7	Sigma G-3502

Ala-His	226,3	28,4	Sigma C-9625
Ala-Met	220,3	31,9	Sigma A-2253
Gly-Gly-Gly	189,3	31,3	Serva 51480
Ala-Val	188,2	30,1	Serva 51210
Pro-Ala	186,0	29,9	Serva 52205
Ala-Gly	146,2	31,1	Serva 51110
Leu-Leu-Leu	357,6	25,7	Serva 51870
Gly-Phe	222,2	45,8	Sigma G-2752
Gly-Gly	132,2	34,5	Merck 4233

Peptides	Séquence en acides aminés
ACTH 11-24	KPVGKKRRPVKVYP
Ala2-Alpha3	AAGYKHEIKYNA
Ala11-Alpha3	APGYKHEIKYAA
Ala6-Alpha3	APGYKAEIKYNA
Ala7-Alpha3	APGYKHAIKYNA
Ala12-Alpha5	AMGSKGNRTDSA
Ala11-Alpha5	AMGSKGNRTDAA
Ala9-Alpha5	AMGSKGNRADSA
Ala7-Alpha5	AMGSKGARTDSA
Ala10-Alpha5	AMGSKGNRTASA
Ala2-Alpha5	AAGSKGNRTDSA
Ala8-Alpha5	AMGSKGNATDSA
Angiotensine	VYIHPF
Interleukine	VQGEESNDK
Elodoisine	(pGlu)PSKDAFIGLM-NH ₂
Pep.R.Erythro	MRLFV
LHRH	(pGlu)HWSYGLRPG-NH ₂

- Angiotensine :** Angiotensine I/II (3-8), humaine
- Pep.R.Erythro :** Peptide résistant à l'érythromycine
- Interleukine :** β-Interleukine-I (163-171), humaine

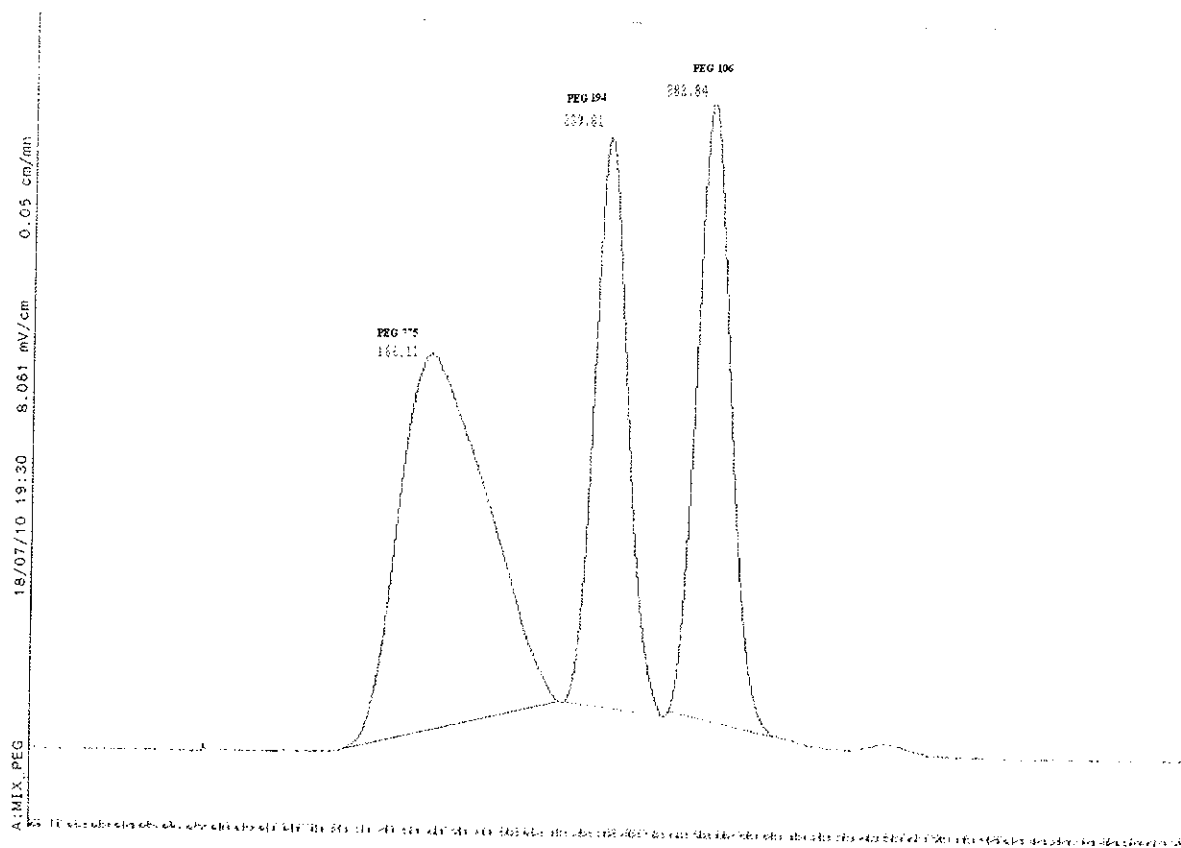
Annexe 3. Propriétés physico-chimiques des acides aminés

Ala (A)	Alanine	Aliphatiques
Gly (G)	Glycine	
Ileu (I)	Isoleucine	
Leu (L)	Leucine	
Val (V)	Valine	Aromatiques
Phe (F)	Phénylalanine	
Tyr (Y)	Tyrosine	
Trp (W)	Tryptophane	Dicarboxyliques et leurs amides
Asp (D)	Acide aspartique	
Asn (N)	Asparagine	
Glu (E)	Acide glutamique	
Gln (Q)	Glutamine	Dibasiques
Lys (K)	Lysine	
His (H)	Histidine	
Arg (R)	Arginine	Alcools
Ser (S)	Sérine	
Thr (T)	Thréonine	Soufrés
Cys (C)	Cystéine	
Met (M)	Méthionine	Iminoacides
Pro (P)	Proline	

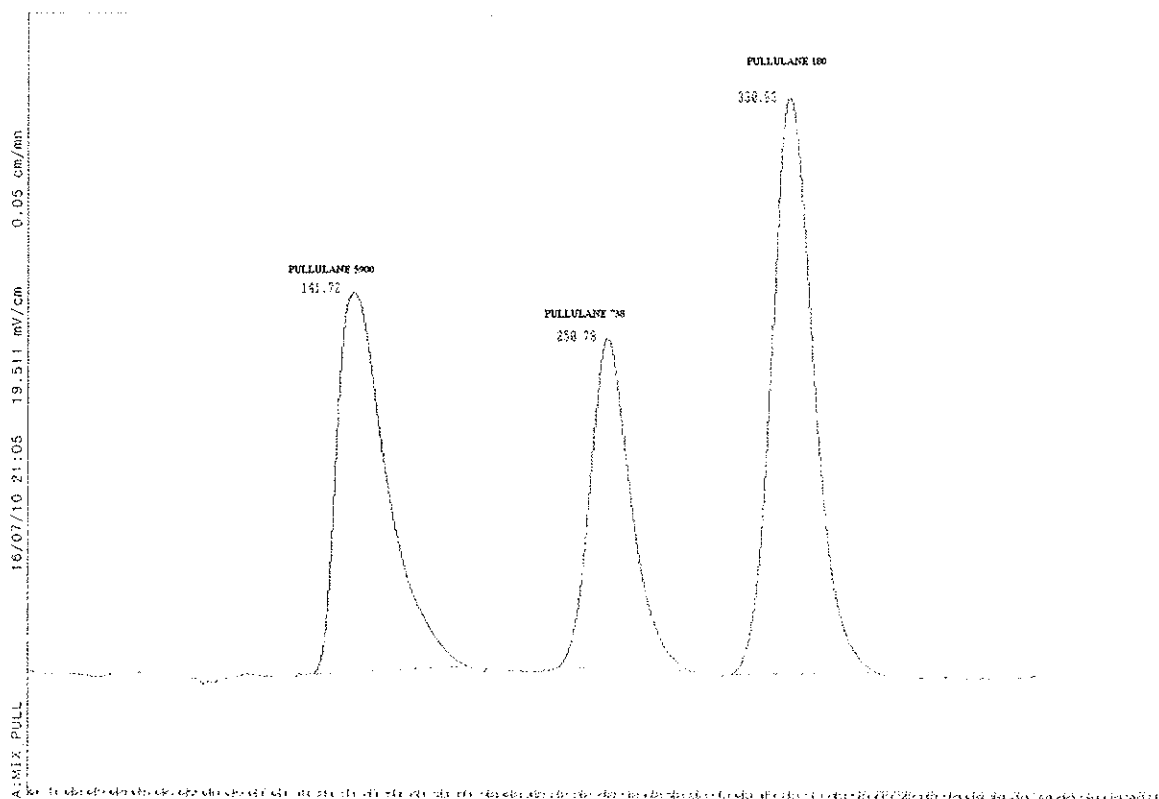
Ala (A)	Alanine	Hydrophobes
Gly (G)	Glycine	
Ileu (I)	Isoleucine	
Leu (L)	Leucine	
Val (V)	Valine	
Phe (F)	Phénylalanine	
Tyr (Y)	Tyrosine	
Trp (W)	Tryptophane	
Met (M)	Méthionine	
Asn (N)	Asparagine	Hydrophiles
Gln (Q)	Glutamine	
Arg (R)	Arginine	
Ser (S)	Sérine	
Thr (T)	Thréonine	

Lys (K)	Lysine	Chargés +
His (H)	Histidine	
Arg (R)	Arginine	
Asp (D)	Acide aspartique	Chargés -
Gln (Q)	Glutamine	
Le reste des acides aminés		Neutres

Annexe 4. Chromatogramme du mélange de PEG 775, 194 et 106



Annexe 5. Chromatogramme du mélange de pullulane 180, 738 et 5900



Annexe 6. Lois de Snell – Descartes

Ces lois ont été énoncées par Snell et Descartes au XVII^{ème} siècle.

On considère un dioptré (interface entre deux milieux transparents homogènes d'indices optiques différents) séparant deux milieux homogènes et isotropes d'indices optiques respectifs n_1 et n_2 . Soit un rayon lumineux arrivant sur ce dioptré en un point I appelé point d'incidence. On suppose que le milieu 1 est celui du rayon incident. Le plan contenant le rayon incident ainsi que la normale en I au dioptré est appelé plan d'incidence

L'indice n d'un milieu caractérise la vitesse de propagation de la lumière dans ce milieu. L'indice n d'un milieu est défini par le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide, notée c et celle mesurée dans ce milieu, notée v :

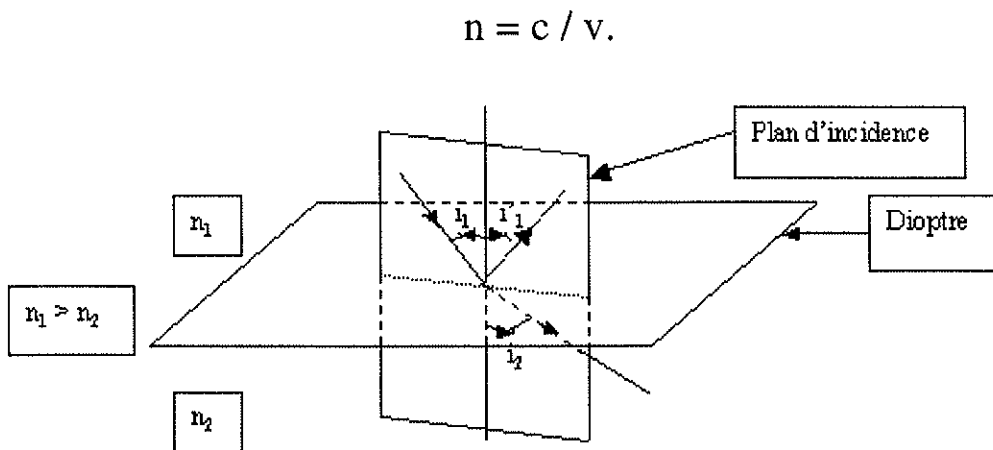


Figure 44. Réfraction, réflexion d'un rayon lumineux.

Lois de Snell - Descartes :

Le rayon incident, le rayon réfléchi et le rayon réfracté sont situés dans un même plan, le plan d'incidence.

Le rayon réfléchi est symétrique au rayon incident par rapport à la normale à l'interface. L'angle de réflexion i'_1 est opposé à l'angle d'incidence i_1 . La relation liant ces deux angles en valeur algébrique est la suivante : $i'_1 = -i_1$.

L'angle d'incidence i_1 et l'angle de réfraction i_2 vérifient la relation suivante :

$$n_1 * \sin(i_1) = n_2 * \sin(i_2).$$

Si le milieu 2 est plus réfringent que le milieu 1, donc si $n_2 > n_1$, alors $i_2 < i_1$: le rayon dans le milieu le plus réfringent est plus proche de la normale au dioptré au point d'incidence que le rayon dans le milieu le moins réfringent.

Par ailleurs, il faut noter qu'il y a toujours une partie du rayonnement qui est réfléchié sur un dioptré.

Annexe 7. La spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est fondée sur la mesure de la déviation imposée à la trajectoire d'atomes ionisés, sous l'action d'un champ électrique et d'un champ magnétique (cette déviation est d'autant plus faible que les ions sont plus lourds).

Les molécules dans leur état naturel seront ionisées à l'état gazeux afin d'obtenir leur masse molaire m , en analysant le rapport masse sur charge (m/z).

- m est le nombre de masse du composé exprimé en unité de masse atomique (uma),
- z est le nombre de charge(s),
- Les spectres présentés seront fonction de m/z et du pourcentage d'intensité (%).

Le spectromètre de masse est utilisé soit en introduisant directement l'échantillon dans la source à l'aide d'un pousse seringue (mode infusion), soit après une séparation par Chromatographie Liquide Haute Performance (mode couplage).

- En mode infusion : l'échantillon liquide est injecté dans l'appareil à un débit constant. Le spectre de masse obtenu correspond alors à l'ensemble des composés présents sans séparation.
- En mode couplage C.L.H.P./S.M. : les composés de l'échantillon injecté en C.L.H.P. subissent une première étape de séparation (dans la colonne C.L.H.P.), avant d'entrer dans le spectromètre de masse. Ainsi, il est possible d'avoir le spectre de chaque pic obtenu en C.L.H.P.. Le spectromètre de masse est utilisé pour identifier les solutés séparés par C.L.H.P..

Le solvant de reprise des échantillons avant injection en masse est très important parce qu'il doit favoriser l'ionisation des molécules. Généralement, le mélange méthanol/eau (50/50 - v/v) est utilisé.

BIBLIOGRAPHIE

- [Adler-Nissen, 1986] *"Enzymic hydrolysis of food proteins"*
J. ADLER-NISSEN.
Elsevier applied science publishers, London, 1986, p.427.
- [Baudet et al. , 1988] *"Tourteau à basse teneur en glucosinolates"*
J.J. BAUDET, P. BURGHART et J. EVRARD.
Cahiers techniques du colza, CETIOM, Paris, 1988, p.52.
- [Benamouzig et al. , 2003] *"Nutritional value of rapeseed protein measured by rats and humans"*
**R. BENAMOZIG, S. BEROT, C. BOS, J. EVRARD, C. GAUDICHON,
C. MORENS, R. NTOUNDA, A. QUINSAC et D. TOME.**
11th International Rapeseed Congress, Copenhague, 2, 2003, p.572.
- [Bohl, 1998] *"Hydrolyse enzymatique de protéines de colza : caractérisation des
fractions peptidiques par chromatographie liquide"*
S. BOHL.
Th. : Doct : Nancy, 1998, p.114.
- [Bounaas, 2002] *"Fractionnement des peptides issus de la culture de colza par
chromatographie d'exclusion de taille basse pression"*
H. BOUNAAS.
Rapport de DEA, GPBA, Nancy, 2002, p.49.
- [Brébec et al. , 1999] *"Hprépa Optique 1ère année MPSI - PCSI - PTSI"*
**J.-M. BREBEC, P. DENEVE, T. DESMARAIS, M. MENETRIER, B.
NOEL et C. ORSINI.**
Hachette supérieur, 1999, p.223.

- [Burgot et Burgot, 2002] *"Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : méthodes chromatographiques, électrophorèse et méthodes spectrales"*
G. BURGOT et J.L. BURGOT.
 Médicales internationales, Tec & Doc, Paris, 2002, p.306.
- [Cloizeaux et Jannink, 1987] *"Les polymères en solution : leur modélisation et leur structure"*
J. des CLOISEAUX et G. JANNINK.
 Les éditions de physique, Courtabeuf, 1987, p.845.
- [Colin, 1992] *"Colza – Une plante d'avenir"*
M. L. COLIN.
 Th. : Doct : Nancy, 1992, p.171.
- [Dalmeyda, 1994] *"Création d'un didacticiel pour l'enseignement de la chromatographie en phase liquide"*
V. DALMEYDA.
 Mémoire diplôme d'ingénieur, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, 1994, p.95.
- [Dasgupta et al. , 1995] *"Deduced amino acid sequence of 2S storage protein from Brassica species and their conserved structural features"*
J. DASGUPTA, S. DASGUPTA, S. GHOSH, B. ROY et RK. MANDAL.
 Indian J. Biochem. Biophys. , 32, 1995, p.378-384.
- [Determann, 1969] *"Gel Chromatography: Gel Filtration, Gel Permeation, Molecular Sieves"*
H. DETERMANN.
 Masson, Paris, 1969, p.195.
- [Ettre, 1991] *"1991: A year of anniversaries in chromatography – part I"*
L. S. ETTRE.
 TSWETT to partition chromatography, international Laboratory, 1991, p.18.

- [Favre, 2004] *"Génie de la formulation : Gels"*
E. FAVRE.
Polycopié du cours de troisième année ENSIC, Nancy, 2004.
- [Franek et al. , 2000] *"Plant protein hydrolysates : preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures"*
F. FRANEK, O. HOHENWARTER et H. KATINGER.
Biotechnol. Prog. , 16, 2000, p.688-692.
- [Gebelin, 1993] *"Biotechnological Polymers: Medical, Pharmaceutical and Industrial Applications, a Conference in Print"*
C. G. GEBELIN.
Lancaster: Technomic Publishing Company, Florida, 1993, p.222.
- [Glueckauf, 1965] *"Ion exchange and its applications"*
E. GLUECKAUF.
Society of chemical industry, London, 1965, p.34.
- [Godon, 1996] *"Protéines végétales – 2^{ème} édition"*
B. GODON.
Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 1996, p.666.
- [Guéguen, 1998] *"Protéines d'oléagineux : développer des utilisations non alimentaires"*
J. GUEGUEN.
CETIOM-Oléoscope, 44, 1998, p.18-21.
- [Irvine, 1997] *"Size exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review"*
G. B. IRVINE.
Anal. Chim. Acta. , 352, 1997, p.387-397.
- [Knox, 1977] *"Practical Aspects of LC Theory"*
J.H. KNOX.
J. Chrom. Sci., 15, 1977, p.352-364.

- [Lemarié et al. , 1996] *"Protéines du colza: quels usages industriels"*
J. LEMARIE, M.A. de LOOZE et D. RIVAUD.
CETIOM-Oléoscope, 36, 1996, p.9-18.
- [Le Page et al. , 1992] *"Colza, quels usages industriels?"*
R. Le PAGE, P. BURGHART et P. CARRE.
CETIOM-Oléoscope, 11, 1992, p.5-12.
- [Linden et Lorient, 1994] *"Biochimie agro-industrielle : valorisation de la production agricole"*
G. LINDEN et D. LORIENT.
Masson, Paris, 1994, p.367.
- [Lorgeril et al. , 1994] *"Mediterranean alpha linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease"*
M. de LORGERIL, S. RENAUD, P. SALEN, I. MONJAUD, N. MAMELLE, J. L. MARTIN, J. GUIDOLLET, P. TOUBOUL et J. DELAGE.
The Lancet, 343, 1994, p.1454-1459.
- [Perkin-Elmer[®], 1993] *"Serie 200 Refractive Index Detector: User's Manual"*
PERKIN-ELMER[®].
The Perkin-Elmer[®] corporation, USA, 1993.
- [Prausnitz, 1995] *"Some new frontiers in chemical engineering thermodynamiques"*
J. M. PRAUSNITZ.
Fluid Phase Equilib. , 104, 1995, p.1-20.
- [Rao et al. , 1998] *"Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases"*
MALA B. RAO, APARNA M. TANKSALE, MOHINI S. GHATGE et VASANTI V. DESHPANDE.
Microbiol. Mol. Biol. Rev. , 62, 1998, p.597-635.

- [Rosset et al. , 1991] "*Chromatographies en phases liquide et supercritique - 3^{ème} édition*"
R. ROSSET, M. CAUDE et A. JARDY.
Masson, Paris, 1991, p.919.
- [Rozaan, 1997] "*Traitement technologiques et prise alimentaire (exemple du tourteau de colza industriel)*"
P. ROZAN.
Th. : Doct : Nancy, 1997, p.275.
- [Schweizer, 2002] "*Fractionnement et identification de petits peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines de colza*"
M. SCHWEIZER.
Th. : Doct : Nancy, 2002, p.168.
- [Shioya et al. , 1982] "*Estimation of molecular weights of peptides by determination of height equivalent to a theoretical plate in size exclusion chromatography*"
Y. SHIOYA, H. YOSHIDA et T. NAKAJIMA.
J. Chromatogr. A , 240, 1982, p.341-348.
- [Skok et al. , 2001] "*Structure of epitopes recognized by the antibodies to α (181-192) peptides of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: extrapolation to the structure of acetylcholine-binding domain*"
M. SKOK, E. LYKHMUS, S. BOBROVNIK, S. TZARTOS, T. TSOULOUFIS, R. VANDERESSE, F. COUTROT, M. THONG CUNG, M. MARRAUD, D. KRIKORIAN et M. SAKARELLOS-DAITSIOTIS.
J. Neuroimmunol. , 121, 2001, p.59-66.
- [Skoog et al. , 1997] "*Chimie analytique, traduction et révision de la 7^{ème} édition américaine*"
D. A. SKOOG, D. M. WEST et F. J. HOLLER.
De Boeck & Larcier s.a., De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1997, p.870.

- [Skoog et al. , 2003] *"Principes d'analyse instrumentale – 1^{ère} édition"*
D. A. SKOOG, F. J. HOLLER et T. A. NIEMAN
 De Boeck Diffusion s.a., De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 2003,
 p.956.
- [Striegel, 2001] *"Longitudinal diffusion in size-exclusion chromatography: a stop-flow size-exclusion chromatography study"*
A. M. STRIEGEL.
 J. Chromatogr. A , 932, 2001, p.21-31.
- [Tzeng et al. , 1988] *"Preparation of Rapeseed Protein Isolate by Sodium Hexametaphosphate Extraction, Ultrafiltration, Diafiltration and Ion-Exchange"*
Y. M. TZENG, L.L. DIOSADY et L. RUBIN.
 J. Food Sci. , 53, 1988, p.1537-1541.
- [Van Deemter et al. , 1956] *"Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography"*
J. J. Van DEEMTER, F. ZUIDERWEG, et A. KLINKENBERG.
 Chem. Eng. Sci. , 5, 1956, p.271-289.
- [Vioque et al. , 2000] *"Partially hydrolysed rapeseed protein isolates with improved functional properties"*
J. VIOQUE, R. SANCHEZ-VIOQUE, A. CLEMENTE, J. PEDROCHE et F. MILLAN.
 JAOCS, 77, 2000, p.447-450.

[1] <http://www.cetiom.fr> (Novembre 2004)

[2] <http://www.123bio.net> (Juin 2004)

[3] <http://www.biorad.com> (Juillet 2004)

[4] <http://www.viscoteck.com> (Juillet 2004)

BON A IMPRIMER N° 348

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

N° d'identification :

TITRE :

Fractionnement de peptides issus d'hydrolysats de protéines de colza par chromatographie d'exclusion stérique à basse pression.

Thèse soutenue le 15 décembre 2004

Par **Morad EL GUEDDARI**

RESUME :

L'intérêt du colza, *Brassica napus* L. variété *oleifera* Metzg. , repose essentiellement sur l'emploi alimentaire de son huile et de son tourteau. Mais depuis quelques années, un intérêt technologique croissant dans le domaine pharmaceutique, cosmétique et industriel est né de la valorisation des protéines présentes dans le tourteau.

Ce travail a pour objectif de valider les propriétés et les performances de séparation d'une colonne chromatographique d'exclusion stérique à basse pression; ceci afin de pouvoir fractionner par la taille, les peptides issus du mélange complexe constitué par les hydrolysats de protéines, de colza notamment. Face à la grande diversité des tailles du complexe peptidique, il est important de vérifier les caractéristiques théoriques de la colonne et de valider son étalonnage par l'utilisation de molécules étalon, les PEG et les pullulanes.

Il apparaît, à la vue des résultats, que la chromatographie d'exclusion stérique permet effectivement de fractionner les molécules selon leur masse molaire mais que les règles qui régissent leur séparation ne sont pas basées que sur le seul critère de la taille moléculaire. D'autres facteurs interviennent de manière manifeste, comme la structure spatiale, la charge ou peut-être aussi le caractère hydrophobe.

L'utilisation des résultats d'élution des peptides sur une durée de deux ans a conduit à prendre en considération un autre effet qui semble jouer sur les performances de la séparation : la compaction du lit. De manière à mesurer l'impact de ce paramètre, il est nécessaire de tenir compte du coefficient de diffusion K_d .

MOTS-CLES : Chromatographie d'exclusion stérique, Peptides, Colza, Bio-Gel® P2, PEG, pullulanes.

Membres du jury

Président-directeur : **M. Philippe CARDOT**...Professeur à la faculté de Pharmacie de Limoges

Juges : **M. Ivan MARC**.....Directeur de recherche CNRS, ENSIC, INPL (Nancy)

M. Serge BATTU.....Maître de conférences à la faculté de Pharmacie de Limoges

M. Olivier ZAMBON.....Auditeur industriel