

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة فرحات عباس - سطيف 1

Université Ferhat Abbas - Sétif 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

Thèse

Présentée Par :

Tahar MEKHALIF

Pour l'Obtention du diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

Option : Génie des Polymères

THEME

.....

***SYNHESE ET CARACTERISATION DE RESINES
FONCTIONNALISEES ET ETUDE DE LEUR AFFINITE
Vis-à-vis DE L'ALBUMINE HUMAINE « HSA »***

.....

Soutenue le :

Devant la commission d'examen :

M. A. MERZOUKI	Professeur	Université de Sétif 1	Président
M. N. BELATTAR	Professeur	Université de Sétif 1	Rapporteur
M^{me} M.-C. MILLOT	Professeur	Université de Paris Est	Co-rapporteur
M^{me} R. ZAGHDOUDI	Professeur	Université de Skikda	Examineur
M. F. DJAZI	Professeur	Université de Skikda	Examineur
M. S. NACEF	Professeur	Université de Sétif 1	Examineur

Remerciements

Ce travail a été encadré par *Noureddine BELATTAR*, professeur au Département de biochimie, de l'université de Sétif 1, Maître de conférences. Si la gentillesse et la disponibilité sont peut être les qualités humaines les plus évidentes, j'ai plus particulièrement apprécié le dévouement, l'enthousiasme et la rigueur scientifique avec lesquels il a su diriger mon travail. Toujours à l'écoute, Mr Belattar m'a accordé une très grande liberté d'action. Grâce à ses connaissances j'ai pu bénéficier de stages au sein du laboratoire LMCPE-CNRS en France. Que je remercie pour leur accueil durant mon séjour. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier *Pr. M-C Millot* d'avoir accepté d'être mon co-directeur, Je lui exprime mes remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Qu'elle accepte ma respectueuse considération. J'exprime toute ma gratitude à Mr Benjamin Carbonnier Professeur à l'université de Paris 12, pour avoir assuré le couronnement de ce travail pendant presque deux années. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé et prodigué des conseils.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **A. MERZOUKI**, Professeur à l'Université de Sétif 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider ce jury.

Je remercie aussi les membres du jury, Madame **R. ZAGHDOUDI** et Monsieur **F. DJAZI**, Professeurs à l'Université de Skikda et Monsieur **S. NACEF**, Professeur à l'Université de Sétif 1, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail et apporter leur expertise.

Je présente mes remerciements les plus sincères à l'équipe du laboratoire de Biochimie, LRPCSI ainsi que groupe de techniciens de l'université de Skikda, et le laboratoire de chimie de Sétif.

Les personnes qui m'ont accueilli à l'Institut de chimie et des matériaux Paris-Est, et tout spécialement les membres de l'équipe Systèmes polymères complexes, qui m'ont permis d'évoluer dans un environnement scientifique très riche et diversifié et plus particulièrement M. Guerouache et M. K. Kham. Leurs conseils, leurs discussions et aussi les chaleureux moments passés avec eux auront permis une ouverture d'esprit et une amélioration certaine de la qualité de mon travail.

Je voudrais remercier également mes collègues à l'université de Skikda en particulier : M. H Ayadi et Dr H. Akkari pour leur soutien. Un grand merci à mes parents et mes frères et sœurs pour leur soutien constant, leur présence et la confiance dont ils ont fait preuve.

Résumé

Nous avons étudié les paramètres qui conditionnent la purification d'une protéine en chromatographie d'affinité. Par la suite, nous avons effectué la projection de cette étude sur des copolymères que nous utilisons dans la préparation de phases stationnaires. L'objet de ce travail était donc le développement des supports sélectifs pour l'analyse d'une protéine cible qui est la HSA.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'interagir spécifiquement avec la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa purification. La synthèse ayant conduit à l'obtention de supports dérivés de polymères réticulés, dotés d'excellentes propriétés, pouvant être utilisés comme phases stationnaires en chromatographie d'affinité au stade analytique.

Parallèlement à cela l'étude contribue à élucider le mécanisme régissant les interactions entre la HSA et la surface du polymère. Pour chaque étape, nous avons étudié l'influence de certains paramètres afin de mettre en évidence leur rôle et de les optimiser dans le but de préparer des résines ayant des propriétés déterminées.

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir pour cette étape de synthèse, et par les résultats concordants, l'obtention effective des fonctions chimiques prévues sur la chaîne de polymère. La substitution a conduit à disposer d'un polymère dérivé du polystyrène réticulé comportant à des taux assez importants, des groupements SO_3H , aminoacides et colorant.

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir, dans les différentes étapes de synthèse, l'obtention des fonctions désirées :

$-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$ et $-\text{COL}-\text{NH}-$, sur les molécules de polystyrène réticulé et des molécules d'acides aminés sur les molécules d'agarose réticulé également. Les groupements sont majoritairement greffés en position para sur les noyaux aromatiques et sont uniformément répartis à travers toute la masse du copolymère.

L'étape intermédiaire d'hydrolyse qui suit l'étape de nitration a permis l'obtention de taux de substitution en groupements actifs élevés. Ce qui conduit à des taux améliorés en groupements colorant et acides aminés. Les analyses quantitatives ont confirmé ces taux. Il est à noter cependant que ces taux sont surestimés en raison de la présence de groupements parasites formés durant les étapes antérieures. Nous obtenons en fin de réaction des résines mixtes.

Nous pouvons ainsi dire que l'Albumine présente une bonne affinité vis à vis des résines préparées, mais cette affinité diffère d'une surface à une autre.

Les isothermes d'adsorption à 25°C de l'albumine sur les matériaux à propriétés adsorbantes sont de type Langmuir. Ces résultats suggèrent que l'adsorption est due à la présence de sites actifs caractérisés par la nature des fonctions qui les constituent.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

Å : *Angström*

Ac : acétyle

Acry : méthacrylate

ADN : acide désoxyribonucléique

AIBN : azoisobutyronitrile

AMBN : 2,2'-azobis(2-méthylbutyronitrile)

ATP : adénosine-5'-triphosphate

BCP : Bromocrésol Pourpre

BSA : albumine du sérum bovin

CCM : chromatographie sur couche mince

CLHP : chromatographie liquide haute performance

CPL : Chromatographie en phase liquide

da : densité apparente

Da : dalton

DCM : dichlorométhane

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

dg : densité à l'état gonflé

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : N, N-diméthylformamide

DO : densité optique

DS : degré de substitution

DTGA : analyse thermo différentielle

DVB : divinylbenzène

AE : acétate d'éthyle

EDA : éthylènediamine

EGDMA : éthylèneglycoldiméthacrylate

éq : équivalent

GTP : guanosine triphosphate

h : heure

HSA : albumine du sérum humain

IgA : immunoglobulines A

IgG : immunoglobulines de type G

IR : infrarouge

K_D : constante de dissociation

M : molaire

MeOH : méthanol

mg : milligramme

Milieu PBS : tampon phosphate

min : minute

MIP : polymères imprimes

ml : millilitre

mM ou mmol : millimole
MMA : acide méthacrylique
MS : spectrométrie de masse
PBC : pourpre de bromocrésol
PCl₅/POCl₃ : Penta chlorure de Phosphore/Oxychlorure de Phosphore
Pd(OAc)₂ : Acétate de Palladium
pH : *potentiel* hydrogène
pI : point isoélectrique
pMB : *p*-Methoxybenzyle
ppm : partie par million
PS : polystyrène
SDS : dodécylsulfate de sodium
ST-DVB : styrene-divinyl benzene copolymère
TA : température ambiante
Tampon Tris : Tampon tris(hydroxyl)aminométhane
TBAF : fluorure de tétra-*n*-butylammonium
TGA : Analyse Thermogravimétrique
THF : tétrahydrofurane
TMS : tetraméthylsilane
UF : ultrafiltration
US : ultrasons
UV : ultraviolet
V : volume
ΔH : Enthalpie
ΔS : Entropie
μl : microlitre
μmol : micromole

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

PARTIE SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ANALYSE DES PROTEINES

I.1. STRUCTURE ET PROPRIETES DES PROTEINES

I.1.1. Structure des protéines.....	4
I.1.1.1. Les acides aminés	4
I.1.1.2. La liaison peptidique	4
I.1.1.3. Conformations des protéines.....	5
I.1.1.4. Le Protéome.....	7
I.1.2. Les protéines du plasma sanguin	8

I.2. METHODES ANALYTIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE PROTEINES.....11

I.3. ETUDE de L'ALBUMINE 12 |

I.3.1. Introduction	12
I.3.2. Les Protéines.....	12
I.3.2.1. Définitions et caractéristiques générales.....	12
I.3.2.2. Organisation structurale.....	12
I.3.3. Etude de l'albumine humaine.....	13
I.3.3.1. Généralités.....	13
I.3.3.2. Structure biochimique de l'albumine	13
I.3.3.3. Propriétés physico-chimiques de l'albumine humaine.....	14
I.3.3.4. Fonction physiologique de l'albumine	15
I.3.3.4.1. Régulation de la pression osmotique	15
I.3.3.4.2. Transport plasmatique et détoxification	15
I.3.3.5. Thérapeutique.....	18

CHAPITRE II

ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES POLYMERES

II.1. Introduction.	19
II.2. Isothermes d'adsorption.....	19
II.3.1. Isotherme de LANGMIUR.	20
II.3.2. Isotherme de FREUNDLICH.....	21
II.3.3. Isotherme de TEMPKIN.	22
II.4. Cinétique d'adsorption.	23
II.5. Réversibilité de l'adsorption.	24
II.6. Technique d'analyse de l'adsorption.	24
II.6.1. Mécanisme de l'adsorption à l'interface solide/ liquide.....	25
II.6.1.1. Adsorption des protéines.....	25
II.6.1.2. Interaction protéines et matériaux.....	26
II.7. Conclusion.	28

CHAPITRE III

LES PROCEDES CHROMATOGRAPHIQUES

III.1. Introduction.	29
III.2. La chromatographie liquide des protéines.....	29
III.2.1. Chromatographie par perméation de gel.....	29
III.2.2. Chromatographie de type hydrophobe.....	29
III.2.3. La Chromatographie d'échange d'ions.	30
III.2.4. La Chromatographie d'affinité.....	31
III.2.4.1. Chromatographie sur colorants.....	32
III.2.4.2. Chromatographie sur les métaux chélatés.....	33
III.2.4.3. Chromatographie sur les acides aminés.....	33
III.2.4.4. Les phases stationnaires de la chromatographie d'affinité.....	33
III.3. Conclusion	36

CHAPITRE IV

LES SUPPORTS CHROMATOGRAPHIQUES

IV. 1. Diversité des supports	37
IV.1.1. Les supports hydrophobes.....	37
IV.1.2. Les supports échangeurs d'ions.....	37
IV.1.3. Les supports polaires.....	38
IV.1.4. Les phases à accès restreint.....	39
IV.1.5. Les supports d'affinité.....	39
IV.1.6. Conclusion.	41
IV.2. LES SUPPORTS DES Copolymères Styène-vinylbenzène	42
IV.2.1. Synthèse des copolymères ST-DVB.	42
IV.2.1. 1. Procédé en masse :	42
IV.2.1. 2. Procédé en solution:	42
IV.2.1. 3. Procédé émulsion :	43
IV.2.1. 4. Procédé en suspension:	43
IV.2.2. Matrices ST-DVB.	44

CHAPITRE V

PARTIE EXPERIMENTALE : SYNTHESE ET CARACTERISATION PHISICOCHIMIQUE DES RESINES.

V.1. Introduction	45
V.2. PREPARATION DES PHASES STATIONNAIRES	46
V.2.1. Synthèse d'une resine ps-pbc preparation de l'adsorbant	46
V.2.1.1 Fonctionnalisation des copolymères ST-DVB.....	48
V.2.1.2.Réaction de fixation de la molécule de PBC	55
V.2.2. Synthèse d'une resine sulfonique ps-so ₃ h	58
V.2.2.1.Préparation d'un adsorbant du poly (styrene sulfonates de sodium)	59
V.2.3. CARACTERISATION ET CONDITIONNEMENT DES RESINES PREPAREES.....	61
V.2.3.1. Spectroscopie Infrarouge.....	61
V.2.3.2. Microscope optique	61
V.2.3.3. Lavage des résines.....	62
V.2.3.4. Préparation de la suspension.....	62
V.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	63
V.3.1. Les dérives aminées du PS.....	63
V.3.2. Analyse spectroscopique infrarouge IR.....	63
V.3.3. Effet de milieux réactionnel sur l'état des billes.....	67

V.4. CARACTERISATION DES ADSORBANTS PREPARES	71
V.4.1. Introduction.....	71
V.4.2. Caractéristiques des matériaux utilisés comme adsorbants.....	71
V.4.2.1. Etude de l'adsorption de l'albumine sur les résines préparées.....	72
V.4.2.1.1. Méthode de dosage de la concentration de l'albumine.....	72
V.4.2.1.2. Isothermes d'adsorption de l'albumine.....	73
V.4.2.1.3. Détermination des constantes d'affinité.....	78
V.4.2.2. Etude de l'affinité de l'albumine pour les surfaces préparés.....	79
V.4.3. Résultats et discussions.....	83
V.4.4. Conclusion.....	84
V.5. ESSAI DE PURIFICATION DE LA PROTEINE A PARTIR D'UN PLASMA SANGUIN	85
V.5.1. Définition du plasma sanguin.....	85
V.5.2. Description de l'expérience.....	86
V.5.3. Résultats et discussions.....	87
V.6. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE	88
V.6.1. Etude de l'adsorption de l'albumine sur colonne de PS-PBC.....	88
V.6.2. Résultats et discussion.....	89
V.7. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE DE L'ALBUMINE SERIQUE HUMAINE SUR PS-SO₃H	95
V.7.1. Détermination de la concentration de l'albumine.....	95
V.7.2. Résultat et Discussion.....	96
CHAPITRE VI	
SYNTHESE DE POLYSTYRENE MODIFIES PAR LE BROMOCRESOLE PURPLE ET PORTANT UN BRAS ESPACEUR « EDA »	
VI. 1. INTRODUCTION :	98
VI. 2. SYNTHESE DE RESINES PORTANT UN BRAS ESPACEUR AMINE:	99
VI. 2. 1. resine ammine derivee du ps-chloriosulfonique (voie A)	101
VI. 2. 2. resine ammine derivee du ps-chloromethyle (voie B)	106
VI. 2. 3. Caracterisation des resines preparees	109
VI. 2. 3.1. Caracterisation de la resines PSCH ₂ Cl	109
VI. 2. 3.2. Caracterisation de la resines aminée	109
VI.3. PREPARATION DES RESINES FINALES (PS-EDA-PBC) : greffage du ligand	110
VI.4. CONDITIONNEMENT :	112
VI.5. CARACTERISATION	113
a. Acidimétrie.....	113

b. Argentimétrie	113
c. Analyse FTIR.....	113
d. Propriétés de gonflement des résines Préparées	113
e. Analyse au microscope optique.	114
VI. 6. RESULTATS ET DISCUSSION	117
VI. 6.1. Spectroscopie Infrarouge	117
VI.6.2. Caractérisation thermique des résines	121
VI.6.3. Discussions	122
VI.6.4. Conclusion	122
VI.7. ESSAIS D’ADSORPTION DE LA HSA SUR LES RESINES PREPAREES.....	123
VI.7.1. Isotherme d’Adsorption de la HSA	123
VI.7.1.1. Détermination des Isothermes d’Adsorption	123
VI.7.1.2. Modèles des Isothermes d’Adsorption	129
VI. 8. MISE EN EVIDENCE DE LA SPECIFITE DES RESINES VIS-A-VIS	
DE LA HSA.....	135
VI. 9. DISCUSSIONS.....	138
<i>CONCLUSION GENERALE</i>.....	142
<i>PERSPECTIVES DE TRAVAIL</i>.....	144

Liste des Figures :

- Figure I. 1 :** Structure des acides L- α -aminés. R correspond aux chaînes latérales.
- Figure I. 2 :** Formation d'une liaison peptidique.
- Figure I. 3 :** Les quatre niveaux de structures des protéines.
- Figure I. 4 :** Abondances de 70 protéines du plasma exprimées sur échelle en logarithme décimal qui s'étend sur 12 ordres de grandeur.
- Figure I. 5 :** Représentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines dans le plasma humain.
- Figure I. 6 :** Structure tridimensionnelle de l'albumine avec ses 3 domaines et ses ponts disulfures.
- Figure II. 7.** Étape de la diffusion d'une molécule lors de son adsorption.
- Figure II. 8 :** Mécanisme de l'adsorption d'une protéine à la surface du matériau.
- Figure II. 9 :** Schéma des principales liaisons non covalentes qui participent à la stabilisation du complexe protéine- matériau.
- Figure III. 10.** Principe de chromatographie d'affinité.
- Figure III. 11.** Principe de fonctionnement d'un bras espaceur.
- Figure IV. 12 :** Structure du Copolymère Styrène-DVB.
- Figure V. 13 :** Structure des deux formes du Pourpre de Bromocrésol (PBC).
- Figure V. 14 :** Immobilisation du colorant sur le polystyrène.
- Figure V. 15 :** Mécanisme de la réaction de nitration.
- Figure V. 16 :** Effets des conditions de la réaction de nitration des microsphères de polystyrène
- Figure V. 17 :** Mécanisme de la réaction d'amination du PS.
- Figure V. 18 :** Cinétique de la réaction d'amination (reduction) du PSNO₂.
- Figure V. 19 :** Réaction de la fixation de la molécule du colorant 'PBC' sur le PSNO₂.
- Figure V. 20 :** Formule globale d'une résine mixte.
- Figure V. 21 :** Cinétique de la réaction de fixation du **PBC** sur le **PSNO₂**.
- Figure V. 22 :** Formule d'une résine PS-DVB sulfonâtes
- Figure V. 23:** Spectres FT-IR des résines préparées ; le copolymère Styrène-divinylbenzene PS-DVB, (a) et de ses dérivés, PS-NO₂ (b), PS-NH₂ (c) et le PS-BCP, portant la molécule de colorant (d).
- Figure V. 24 :** Spectres IR des résines copolymère Styrène-divinylbenzène sulfonatées.

Figure V. 25 : Photos au Microscope Optique, Observations Modification de l'aspect externe des billes.

Figure V. 26 : Spectre ADT et ATG: PS and PS-PBC, vitesse de chauffage 10°C/min.

Figure VI. 27 : Courbe d'étalonnage permettant de déterminer la concentration de l'albumine en solution.

Figure VI. 28 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur, PS-NH-PBC et PS-SO₃H : variation de Γ , concentration interfaciale, en fonction de C concentration de la solution d'albumine, a pH 7,35.

Figure VI. 29 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur **PS-NH-PBC** : variation de Γ , concentration interfaciale, en fonction de C, concentration de la solution d'albumine a pH 4,2

Figure VI. 30 : Isothermes (lineaires) d'adsorption de la HSA sur les supports préparés.

Figure. VI. 31 : Modélisation de Langmuir et de Freundlich des isothermes d'adsorption de la HSA sur les résines préparées.

Figure VII. 32 : Illustre un profil d'histogrammes obtenu suite à la purification de la HSA a partir d'un plasma humain avec les supports d'affinité préparés a). **PS-PBC** b) **PSSO₃H**.

Figure VIII. 33 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'élution de HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), T0 (Acétate de sodium 0,025M pH 4,2), T1 (Tris-HCl 0,05M-Sodium Thiocyanate 0,5M, pH 8,2).

Figure VIII. 34 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'élution de HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), T0 (Acétate de Sodium 0,05M, pH 4,2), T1 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 1M, pH 8, 2), T2 (Tris-HCl, 0,5M, CNNaS 1M, pH 8, 2), T3 (Tris- HCl 0,05M, CNNaS 0,5M, pH 8, 2).

Figure VIII. 35 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'élution de la HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), T₀ (Acétate de sodium 0.1M a pH4,2),T1 (Tris-HCl 0,1M, pH8,2).

Figure VIII. 36 : Profile chromatographique d'adsorption et d'élution de HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), Ve (Volume d'élution), T0 (Acétate de sodium 0.1M a pH 4, 2), T2 (Tris-HCl 0,05M, Sodium Thiocyanate 0,5 M, pH 8, 2).

Figure VIII. 37 : Profile chromatographique d'adsorption et d'élution de la HSA sur le Polystyrène sulfonate **PS-SO₃Na**.

Figure IX. 38 ; Schéma de la réaction d'attachement de EDA au support PS.

Figure IX. 39 : Schéma de la réaction de synthèse de la résine PS modifiées, voie **(I)**.

Figure IX. 40: Schéma de la réaction de fixation du PBC sur résine PS modifiées, voie **(I)**.

Figure XI. 41 : Schéma de la réaction de synthèse de la résine PS modifiées, voie **(II)**.

Figure IX. 42 : Schéma de la réaction de fixation du PBC sur résine MR modifiées, voie **(II)**.

Figure IX. 43 : Structure du violet de bromocrésol '**PBC**'.

Figure IX. 44 : Structure des deux résines préparées.

Figure IX. 45 : Photos au Microscope Optique, agrandissement 100x; Observations : Modification de l'aspect externe des billes.

Figure IX. 46 : Spectres IR des résines préparées : a) PSSO₂Cl b) PSCH₂Cl, c) PSSO₂EDA d) PSCH₂EDA e) PSSO₂EDA-PBC f) PSCH₂EDA-PBC

Figure IX. 47. Spectre ATD et ATG: FI et FII, vitesse de chauffage 10°C/min.

Figure IX. 48: Courbe d'étalonnage de la HSA.

Figure IX. 49 : Isotherme d'adsorption de la HSA sur les résines FI et FII : (T=25°C). variation de M, concentration interfacial, en fonction de C, concentration de la solution d'albumine.

Figure IX. 50. Isotherme d'adsorption à 37° C de l'albumine sur différents supports préparés

Figure. IX. 51 : Modélisation de Langmuir et de Freundlich des isothermes d'adsorption de la HSA sur les résines préparées

Figure IX. 52 : Illustre un profil d'histogrammes obtenu suite à la purification de la HSA a partir d'un plasma humain avec les supports d'affinité préparés a). **FI** b) **FII**.

Liste des Tableaux :

Tableau I. 1 : Principaux constituants du plasma humain [2].

Tableau V. 2 : Données d'adsorption dans l'IR du copolymère styrène-divinylbenzène et de ses dérivées.

Tableau VI. 3 : Les principales caractéristiques des résines étudiées.

Tableau VI. 4 : Paramètres des isothermes d'adsorption à 25 C° de l'albumine, sur les différents supports obtenus.

Tableau VI. 5. Des enthalpies libres standards.

Tableau VI. 6 : Calculs des paramètres de Langmuir et de Freundlich.

Tableau VIII. 7 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis le PS- PBC en présence de l'Acétate de Sodium 0,025M, pH 4,2.

Tableau VIII. 8 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis le PS- PBC en présence de l'Acétate de Sodium 0,05M, pH 4,2.

Tableau VIII. 9 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis le **PS-PBC** en présence d'Acétate de Sodium 0,1M, pH 4,2.

Table VIII. 10: Analyses des résines MR and MR modifiées.

Table IX. 11 : Analyses des résines *MR* et MR modifiées.

Tableau IX. 12 : Les résines **FI** et **FII** obtenues ci-dessus à l'étape **IV** présentent les caractéristiques suivantes.

Tableau IX. 13 : Bande des spectres infrarouges de la résine Merrifield modifié.

Tableau IX. 14 : Paramètres des isothermes d'adsorption à 25 °C de l'albumine, sur les différents supports.

Tableau IX. 15 : Des enthalpies libres standards por FI et FII.

Tableau IX. 16 : Calculs des paramètres de Langmuir et de Freundlich

Introduction générale

Les protéines biomolécules indispensables aux être vivants, sont des constituants exceptionnellement importants des cellules vivantes, non seulement d'un point de vue quantitatif (elles représentent en générale plus de la moitié du poids sec des cellules), mais aussi du point de vue qualitatif, puisque à côté des protéines dites structurales, on trouve des protéines ayant un rôle biologique fondamental en particulier les enzymes, catalyseurs biologiques indispensables au déroulement des réactions dans les cellules des organismes vivants [1-5].

L'immobilisation des protéines sur des supports organiques ou inorganiques est à l'origine d'un grand nombre de travaux de recherche avec des applications extrêmement importantes en biologie, en pharmacie ou aussi en biochimie.

Les procédés d'adsorption dans le domaine de la biologie tendent à se développer rapidement et sont essentiellement utilisés pour l'élimination et la séparation des protéines. L'attention a été focalisée par la suite sur l'utilisation de nouveaux adsorbants à base de matériaux polymères naturels ou synthétiques.

Parmi les différentes matrices organiques, on trouve les polymères. Les applications des polymères, connaissent actuellement un développement très important dans le domaine des biomatériaux. L'élaboration de ces derniers sous forme de biomatériaux par des méthodes adaptées au contrôle de ces propriétés est donc d'un intérêt fondamental dans la mesure où elle peut conduire à des structures nouvelles et à la mise en évidence des interactions moléculaires impliquées.

Ces polymères présentent un intérêt croissant car leurs applications ne cessent de se diversifier, trouvant beaucoup d'application dans le domaine médical et pharmaceutique.

Ces matériaux sont de très bonnes matrices d'immobilisation de protéines et d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. Ainsi des interactions spécifiques entre des hémoprotéines ou enzymes et des polymères favorisent la formation de complexes direct entre les matériaux et les sites actifs de la biomolécule.

Cette propriété très particulière et rare permet de concevoir des bioadsorbants spécifiques. Parallèlement ces matériaux organiques, les polymères synthétiques modifiés, ont également été utilisés pour immobiliser des molécules biologiques.

Toutefois, les composés les plus importants dans la pratique sont ceux qui associent une ou plusieurs entités « complexantes » appelées ligands. Les coordinats peuvent être des

molécules organiques ou inorganiques ou des anions, ou assez rarement des cations comme l'ion nitrosonium NO^+ . C'est à un complexe colorant le PBC, que nous limiterons notre propos.

Dans ce contexte le polymère qui fait l'objet de ce travail est le polystyrène, polymère largement utilisée dans un bon nombre de ces domaines. L'intérêt accordé à ce matériau se justifie par son abondance, sa facilité de synthèse, sa capacité d'échange, sa porosité et sa biocompatibilité.

L'attention a été concentrée par conséquent sur l'utilisation de nouveaux adsorbants à base de matériaux polymères modifiés. Dans ce travail nous tacherons de mettre en évidence le rôle éventuel du PBC dans les complexes se produisant à la surface des polymères modifiés.

Les propriétés de ces matériaux organiques riches en molécules de PBC comme matrices d'immobilisation d'hémoprotéines notamment la HSA pourraient contribuer à l'amélioration du phénomène d'adsorption entre le matériau et la protéine cible et par conséquent augmenter les performances des supports préparés par un phénomène de complexation capable d'immobiliser sélectivement la protéine [6].

Comme protéine, nous avons choisi l'Albumine du sérum humain 'HSA'. Les différents polymères préparés ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques et thermiques avant d'être utilisés comme matrices d'immobilisation. Les propriétés adsorptives des supports immobilisés ont été étudiées.

Le but de notre travail est donc l'étude de phénomène « adsorption-désorption » de l'albumine humaine sur des supports polymérique synthétisés dans notre laboratoire.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'interagir spécifiquement avec la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa purification.

Avec ce support solide, nous avons cherché à immobiliser la molécule de PBC avec le minimum de variations structurales ou fonctionnelles. La synthèse ayant conduit à l'obtention de polymères dérivés du polystyrène réticulé, doté d'excellentes propriétés mécaniques, chimiques,...etc., pouvant être utilisés comme phases stationnaires en chromatographie d'affinité au stade analytique.

Nous avons envisagé que l'adsorption de la protéine sur le support solide (PS-PBC) préparé dans la première partie de ce mémoire pourrait être limitée par l'encombrement stérique. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une diamine comme bras espaceur pour une meilleure sélection et une plus forte adsorption. Cela nous permettrait de fixer beaucoup plus de protéines et de vérifier si les sélections fonctionnaient.

Nous avons en effet mis au point un nouveau procédé de préparation (synthèse et conditionnement) de résines de polystyrène fonctionnalisées contenant des molécules de PBC. Ces résines sont capables d'adsorber spécifiquement la HSA permettant ainsi leur utilisation comme adsorbants pour la fabrication de la phase stationnaire des colonnes d'épuration. Ainsi, cet espaceur est avantageusement compatible avec nos objectifs.

Ce travail est constitué de deux parties principales, et sera présenté selon le plan suivant :

- Dans une première partie nous présenterons une synthèse bibliographique sur : les protéines, l'adsorption d'une manière générale, le mécanisme d'adsorption des protéines sur les polymères, la diversité des supports, les procédés chromatographiques.
 - La deuxième partie comprenant les différentes étapes expérimentales, est aussi consacrée aux méthodes de travail suivies. Une discussion des différents résultats obtenus sera exposée.

Enfin on terminera avec une Conclusion générale.

Chapitre I

ANALYSE DES PROTEINES

I. 1. STRUCTURE ET PROPRIETES DES PROTEINES

I. 1. 1. Structure des protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées d'un enchaînement d'acides aminés unis par des liaisons peptidiques [1].

I. 1. 1. 1. Les acides aminés

Chez l'homme, ainsi que chez de nombreuses espèces, il existe vingt acides aminés différents qui composent les protéines. Un acide aminé est une substance organique contenant un carbone tétraédrique central (α) sur lequel sont fixés une fonction amine, une fonction acide carboxylique, un hydrogène et un groupement variable appelé chaîne latérale (R) (figure I-1).

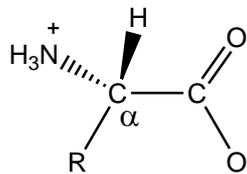


Figure I. 1 : Structure des acides L- α -aminés.

Hormis la glycine pour laquelle R est un hydrogène, ce carbone est asymétrique pour tous les acides. Pour les acides aminés naturels, la configuration du centre chiral est en général L, (selon la nomenclature de Fischer, les formes D des acides aminés sont extrêmement rares. A l'état naturel, les acides aminés possèdent une structure zwitterionique. Cela signifie que l'entité est globalement neutre, alors que l'atome d'azote porte une charge positive ($-\text{NH}_3^+$) et la fonction acide carboxylique se transforme en carboxylate ($-\text{COO}^-$).

Ces acides aminés présentent différentes propriétés physicochimiques suivant la nature des chaînes latérales. Ils peuvent être polaires, hydrophobes, acides ou basiques. Un code de trois lettres et un code d'une lettre permettent de désigner les 20 acides aminés qui sont présentés en annexe 1.

I.1.1.2. La liaison peptidique

La liaison entre deux acides aminés, appelée liaison peptidique [1], est représentée sur la figure I-2. Elle se forme par une réaction de condensation entre le groupe α -carboxyle d'un acide aminé et le groupe α -amine d'un autre acide aminé donnant lieu à une liaison amide. Il en résulte une chaîne d'acides aminés constituant des peptides ou des protéines suivant le nombre d'acides aminés impliqués. Le terme protéine désigne les chaînes polypeptidiques dont le nombre de

résidus est supérieur à 100. Lorsque le nombre de résidus est inférieur à 50, on parle de peptides, entre 50 et 100, on parle indifféremment de peptides, de petites protéines ou de polypeptides. Les groupes libres situés aux extrémités opposées d'une chaîne peptidique sont appelés le groupe N-terminal pour le groupe amine et le groupe C-terminal pour le groupe carboxyle.

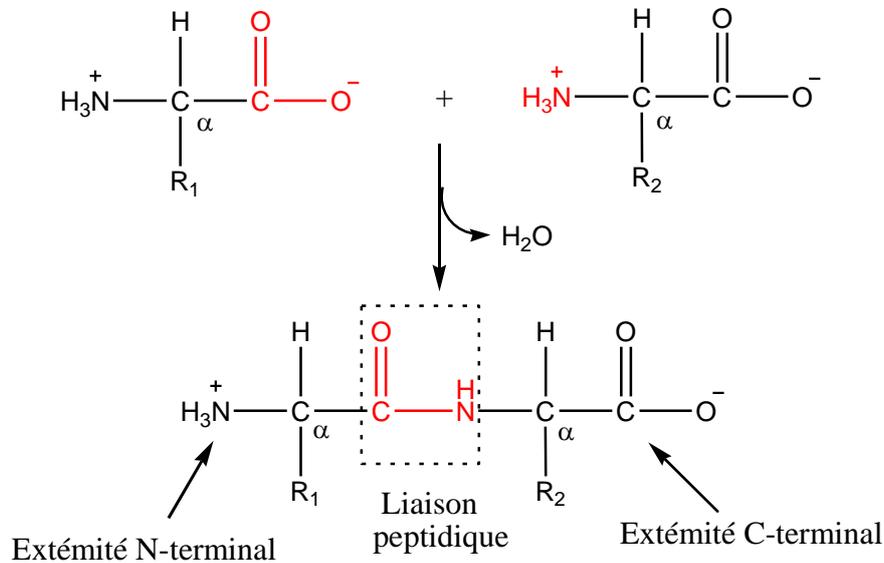


Figure I. 2 : Formation d'une liaison peptidique.

Il est convenu de numérotter les acides aminés d'une chaîne peptidique en allant de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. Du fait de la présence de nombreux groupements acido-basiques. La charge globale portée par une protéine dépend donc du nombre de résidus acides et de résidus basiques ainsi que du pH de la solution dans laquelle elle se trouve. Le pH pour lequel la protéine ne possède aucune charge nette correspond au point isoélectrique (pI) de la protéine.

I.1.1.3. Conformations des protéines

Il a été montré que la liaison peptidique est plane en raison de la présence d'un système conjugué. Il n'existe donc que deux configurations possibles du groupe peptidique, les isomères *trans* et *cis*. En général, les groupes peptidiques sont dans la configuration *trans*. L'isomère *cis* est en effet très défavorisé par l'encombrement stérique des chaînes latérales. Cependant, les autres liaisons N-C α et C α -C (figure I-2) sont des liaisons simples à libre rotation. Il en résulte de nombreuses conformations (c'est-à-dire des repliements) ou structures tridimensionnelles

possibles des protéines. Cependant, dans les conditions physiologiques, chaque protéine possède une seule conformation spécifique, appelée état natif.

La structure des protéines, illustrée en figure I-3, peut être définie selon quatre niveaux [2] :

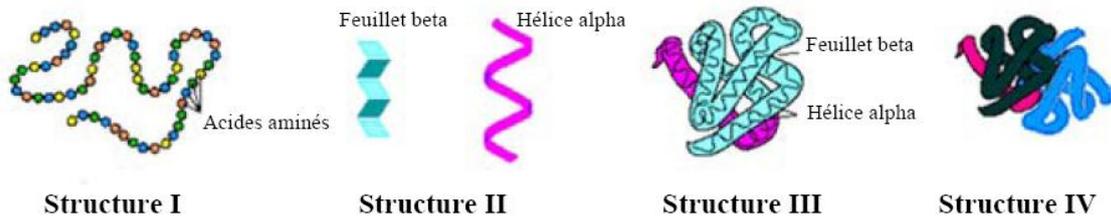


Figure I.3 : Les quatre niveaux de structures des protéines.

- **La structure primaire (I)** qui correspond à la séquence proprement dite de la protéine, c'est-à-dire à l'enchaînement des acides aminés.
- **La structure secondaire (II)** qui décrit le premier niveau de repliement de l'enchaînement peptidique. Elle est assurée par des interactions de type liaisons hydrogène entre les acides aminés voisins et se caractérise par une conformation répétitive localisée. Il existe deux types de structure secondaire : l'hélice α et le feuillet β .
- **La structure tertiaire (III)** correspond au repliement et à l'assemblage en domaine des différents éléments de la structure secondaire. Il s'agit de la structure tridimensionnelle de la protéine. Elle est stabilisée par des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène, des liaisons ioniques ou encore des ponts disulfures (S-S), véritable liaison covalente formée par oxydation entre les fonctions thiols de deux cystéines.
- **La structure quaternaire (IV)** concerne les protéines constituées de plusieurs chaînes polypeptidiques et correspond à l'association de celles-ci par des interactions semblables à celles établies à l'intérieur d'une chaîne polypeptidique, c'est-à-dire des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogène et dans certains cas, des ponts disulfures.

La structure primaire d'une protéine détermine une conformation spatiale unique décrite par la structure tertiaire ou quaternaire. D'une façon générale, la fonction d'une protéine dépend de sa conformation et repose sur sa capacité à interagir avec une autre molécule (ligand) de manière spécifique. La fixation du ligand entraîne souvent un changement conformationnel dans la structure de la protéine qui est impliquée dans son mécanisme d'action [1-3].

La structure finale des protéines est stabilisée par des interactions non covalentes entre les acides aminés, voire covalente avec la formation de ponts disulfures. La rupture de ces interactions aboutit à la perte de la conformation tridimensionnelle de la protéine. La protéine est dite alors dénaturée et ne peut plus assurer sa fonction biologique [4]. Les facteurs pouvant provoquer la dénaturation d'une protéine sont :

- la chaleur qui engendre une agitation thermique des atomes de la macromolécule et provoque une rupture des interactions faibles, comme les liaisons hydrogène,
- des pH extrêmes qui modifient les charges des chaînes latérales des acides aminés et altèrent donc les liaisons ioniques et les liaisons hydrogène,
- une forte force ionique,
- un solvant organique,
- des agents réducteurs de thiols qui permettent la rupture des ponts disulfures. Suivant certaines conditions douces de dénaturation, les protéines peuvent se replier spontanément et retrouver leur conformation native lorsqu'elles sont replacées dans des solvants adéquats comme un tampon au pH optimum de l'activité de la protéine.

I. 1. 1. 4. Le Protéome

Les protéines sont indispensables aux processus biologiques et jouent de nombreux rôles sur la structure et sur le fonctionnement de l'organisme. Elles sont donc présentes aussi bien dans les fluides biologiques que dans les membranes, les tissus, les muscles... Par analogie avec le terme génome, le protéome désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe à un instant donné et dans un environnement donné. Le génome est constant alors que le protéome est dynamique. En effet, il varie selon le type de cellule, son environnement et son activité. Un gène peut coder pour plusieurs protéines.

De plus, en raison des variations possibles de la séquence des 20 acides aminés, du nombre d'acides aminés et des conformations, il existe bien plus de protéines que de gènes dont le nombre est estimé entre 20 000 et 25 000. De plus, des modifications post-traductionnelles telles que des acétylations, des phosphorylations et des glycosylations peuvent avoir lieu et contribuent à l'immense diversité des protéines.

En fonction de leurs activités biologiques, on distingue plusieurs grandes classes de protéines comme les enzymes, les protéines de régulation (hormones peptidiques), les protéines de structure, qui assurent la rigidité structurale de la cellule (collagène), les protéines de protection (immunoglobulines ou anticorps), les protéines de transport (hémoglobine) et les protéines contractiles qui participent à la contraction musculaire...

Les protéines remplissent des fonctions beaucoup trop nombreuses pour qu'une liste ou une classification précise puisse être établie. Dans le cadre de cette étude, le plasma sanguin a été utilisé comme matrice réelle. A cet effet, seules seront détaillées les protéines contenues dans ce fluide biologique.

I. 1. 2. Les protéines du plasma sanguin

Le sang circule dans le corps tout entier et sert de milieu de transport et d'échange de nombreuses substances (nutriments, métabolites, oxygène, hormones...) vers les cellules et dans tous les organes. Il permet de réguler le milieu intérieur et participe à la défense de l'organisme. En terme de volume, 45% du sang est constitué d'éléments figurés représentés à 99% par les globules rouges (ou érythrocytes), à 0,2% par les globules blancs (ou leucocytes) et de 0,6 à 1 % par les plaquettes (thrombocytes). Les 55 % restants constituent la partie liquide du sang, le plasma sanguin. Le plasma est constitué de 90% d'eau et de 10% de solutés tels que des substances nutritives comme des sels minéraux (électrolytes), des glucides, des lipides, des vitamines, des hormones ou encore des déchets métaboliques.

Le plasma est un fluide extrêmement riche en protéines si bien qu'il constitue le milieu le plus étudié pour leurs analyses. La protéine la plus abondante du plasma est l'albumine qui joue un rôle essentiel dans le transport. Les protéines de coagulation comme le fibrinogène et les immunoglobulines, qui protègent l'organisme d'agressions externes par des agents pathogènes, sont également présentes en forte concentration. En outre, le plasma contient des protéines messagères (hormones peptidiques et protéiques) pour réguler le métabolisme. D'autres protéines peuvent être anormalement présentes dans le plasma et marquent alors un dysfonctionnement de l'organisme (Tableau I-1) [5, 6].

Pour illustration, après une crise cardiaque, la myoglobine est libérée dans le plasma. Certaines protéines peuvent être sécrétées à partir de cellules cancéreuses ou de tissus malades. Ces protéines sont des marqueurs biologiques ou biomarqueurs potentiels. Par définition, un biomarqueur est une caractéristique qui peut être mesurée objectivement comme indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathologique ou comme réponse à une intervention thérapeutique [4].

Tableau I. 1 : Principaux constituants du plasma humain [2].

Constituant	Quantité (mmol.L ⁻¹) / Concentration
Eau	91 % de la masse plasmatique
Ions inorganiques	< 1 % de la masse plasmatique
Na ⁺	145 mmol.L ⁻¹
K ⁺	4 mmol.L ⁻¹
Ca ²⁺	2,5 mmol.L ⁻¹
Mg ⁺	1,5 mmol.L ⁻¹
Cl ⁻	103 mmol.L ⁻¹
HCO ³⁻	24 mmol.L ⁻¹
Phosphates (surtout HPO ₄ ²⁻)	1 mmol.L ⁻¹
SO ₄ ²⁻	0,5 mmol.L ⁻¹
Protéines	7 % de la masse plasmatique
Albumines	40-45 g.L ⁻¹
Globulines	25-40 g.L ⁻¹
Fibrinogènes	2-4 g.L ⁻¹
Nutriments	
Glucoses et autres glucides	5,6 mmol.L ⁻¹ / 1 g.L ⁻¹
Acides aminés totaux	2 mmol.L ⁻¹ / 0,4 g.L ⁻¹
Lipides totaux	7,5 mmol.L ⁻¹ / 5 g.L ⁻¹
Cholestérol	4 – 7 mmol.L ⁻¹ / 1,5 – 2 g.L ⁻¹
Vitamines	0,05–100 µmol.L ⁻¹ / 0,001–3 mg.L ⁻¹
Oligo-éléments	0,1–10 µmol.L ⁻¹ / 0,01 – 3 mg.L ⁻¹
Hormones	10 ng.L ⁻¹ – 0,5 g.L ⁻¹
Déchets	
Urée	5,7 mmol.L ⁻¹ / 340 mg.L ⁻¹
Créatinine	0,09 mmol.L ⁻¹ / 10 mg.L ⁻¹
Acide urique	0,3 mmol.L ⁻¹ / 50 mg.L ⁻¹
Bilirubine	3 – 18 µmol.L ⁻¹ / 0,2 – 1,2 mg.L ⁻¹
Gaz	
CO ₂	1 mmol.L ⁻¹
O ₂	0,1 mmol.L ⁻¹
N ₂	0,5 mmol.L ⁻¹

Grâce à l'abondance et l'hétérogénéité des protéines présentes dans le plasma, ce milieu est extrêmement riche d'informations pour le diagnostic clinique [5], mais en pratique, l'analyse des protéines demeure très complexe. Plus de 300 protéines ont déjà été répertoriées comme protéines du plasma et elles sont représentées sur une très large gamme dynamique de concentrations, comme en témoigne la figure I-4. L'albumine est présente à une concentration d'une dizaine de mg.mL⁻¹ alors que les interleukines, protéines minoritaires, sont seulement à des teneurs de l'ordre du pg.mL⁻¹.

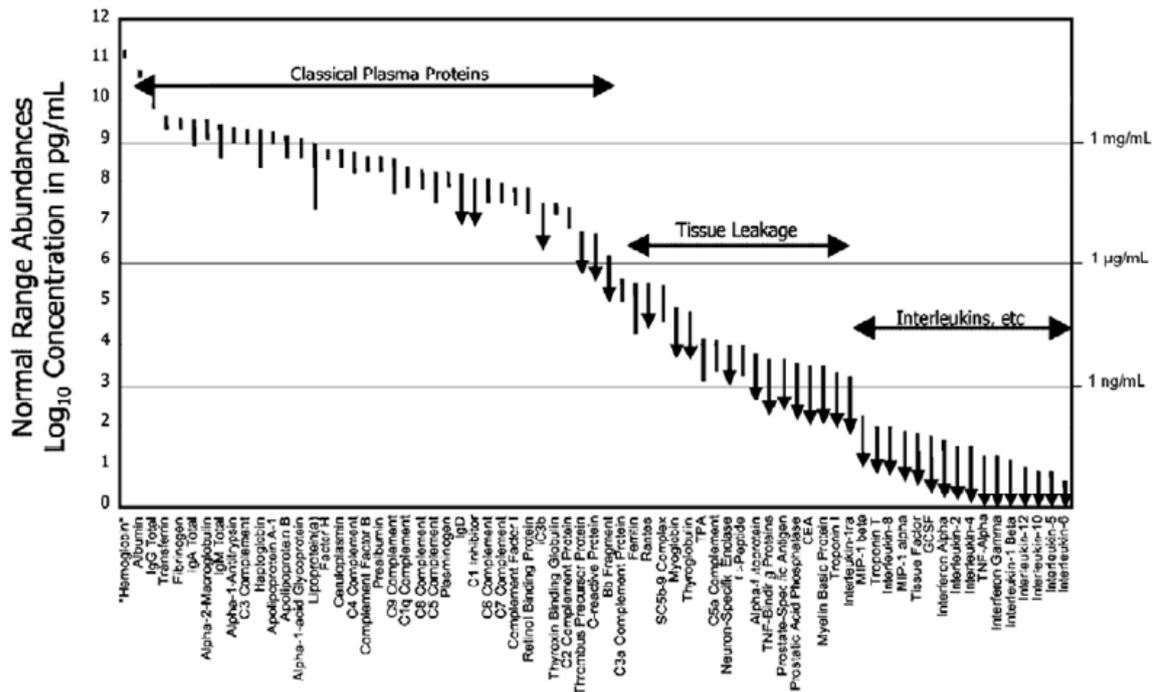


Figure I. 4 : Abondances de 70 protéines du plasma exprimées sur échelle en logarithme décimal qui s'étend sur 12 ordres de grandeur.

L'albumine représente à elle seule plus de la moitié de la totalité des protéines du plasma et les 10 protéines majoritaires correspondant à 90 % de la totalité des protéines du plasma. Il s'agit par exemple des immunoglobulines, de la transferrine, de l'haptoglobuline, et des lipoprotéines etc... Si on prend en compte toutes les protéines majoritaires et moyennement majoritaires, il apparaît au final que 22 protéines correspondent à 99 % de la masse totale des protéines du plasma comme illustré sur la figure I.5.

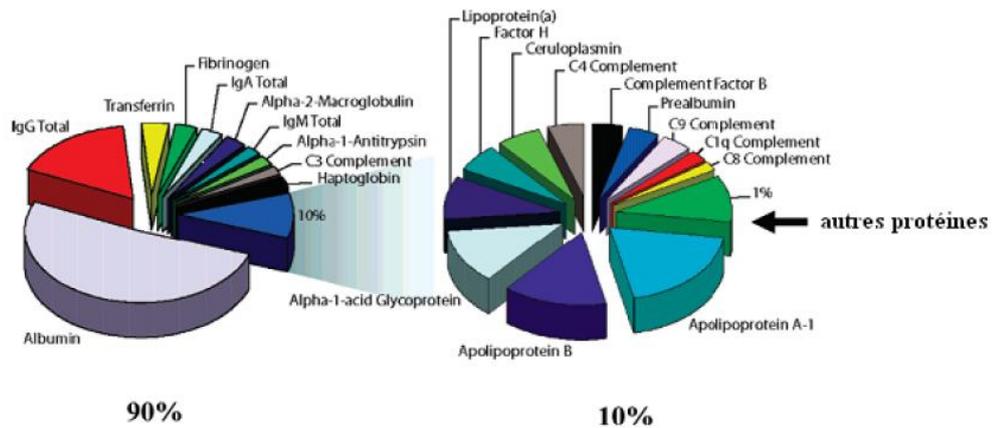


Figure I. 5 : Représentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines dans le plasma humain.

De forts besoins émergent actuellement au niveau de l'analyse des protéines minoritaires et les grandes tendances actuelles concernent notamment l'identification et la quantification de biomarqueurs. Pour illustration, les protéines marqueurs de cancers (l'antigène prostatique spécifique, PSA ou l'antigène carcino-embryonnaire, ACE) sont présentes dans le plasma à des concentrations de l'ordre du ng.mL^{-1} voire du pg.mL^{-1} . Leur analyse dans le plasma constitue actuellement un réel challenge lié à la sensibilité des outils analytiques.

I. 2. METHODES ANALYTIQUES POUR L'IDENTIFICATION DE PROTEINES

On distingue différentes approches pour l'analyse de protéines. L'approche la plus classique dite « protéomique descriptive » consiste à analyser de manière exhaustive l'ensemble des protéines exprimées à un instant donné dans un échantillon biologique. La seconde approche est plus spécifique et appelée « protéomique clinique » [6, 7]. Cette approche en pleine expansion actuellement est fondée sur l'analyse de profils protéiques dans des échantillons biologiques pour la détection de nouveaux biomarqueurs protéiques spécifiques d'un état physiologique ou pathologique. La détection de biomarqueurs va ainsi permettre de réaliser un dépistage, un diagnostic d'une pathologie ou encore le suivi d'un traitement.

D'une façon générale, dans la recherche de biomarqueurs, la découverte de biomarqueurs potentiels est suivie d'étapes d'évaluation et de validation jusqu'au développement du dosage de la molécule pour des applications cliniques. En raison de la complexité des fluides biologiques, de la gamme dynamique étendue des protéines plasmatiques et de la très faible concentration des biomarqueurs, les techniques analytiques doivent être extrêmement spécifiques et sensibles.

Il existe deux stratégies d'analyse des protéines : du haut vers le bas « top-down » et du bas vers le haut « bottom-up » [8]. Dans l'approche « top-down », un mélange protéique est séparé en plusieurs fractions et chaque protéine individuelle intacte est analysée par spectrométrie de masse. Cette approche nécessite notamment des spectromètres de masse hautement résolutifs car les protéines sont identifiées par leur masse moléculaire. L'approche « bottom-up » quant à elle consiste à passer par une étape de digestion des protéines soit après une étape de séparation des protéines, soit sans séparation préliminaire « Shotgun ». Les peptides peuvent être ensuite séparés avant d'être analysés par spectrométrie de masse. L'étape de digestion consiste à cliver les protéines (isolées ou en mélange) au moyen d'une enzyme protéolytique pour produire des fragments peptidiques. L'attribution de chaque peptide détecté est faite par comparaison des masses expérimentales aux masses théoriques des peptides générés *in silico* des banques de données informatiques. Cette technique permet l'identification des peptides qui sont attribués à chaque protéine digérée

I. 3. ETUDE DE L'ALBUMINE

I. 3. 1. INTRODUCTION :

Les macromolécules jouent un rôle fondamental dans les processus biologiques. Les plus importantes d'entre elles sont les protéines, molécules fonctionnelles, et les acides nucléiques, molécules informationnelles.

La complexité et la labilité des protéines ont constitué pendant longtemps un obstacle à leur étude. C'est principalement l'application des méthodes chimiques et physiques qui a fait progresser d'une manière décisive ce domaine de la biochimie.

La formation de la structure des protéines dépend pour une part de l'enchaînement des éléments constitutifs, les acides aminés, en une séquence polypeptidique. Elle dépend d'autre part de l'environnement cellulaire ; les conditions locales qui existent à l'intérieur des compartiments cellulaires, solvant, pH, force ionique, viscosité, température, conditionnent les propriétés conformationnelles d'une protéine. Le rôle du solvant est d'une grande importance.

I. 3. 2. LES PROTEINES

I. 3. 2. 1. Définitions et caractéristiques générales:

Selon leur localisation cellulaire, on peut distinguer plusieurs types de protéines : les protéines globulaires cytosoliques solubles dans les solvants aqueux et les protéines membranaires. Parmi ces dernières, certaines dites extrinsèques sont en interaction faible avec une face de la membrane cellulaire dont elles sont aisément dissociables. Les protéines intrinsèques traversent la bicouche lipidique de la membrane de part en part. Les protéines intrinsèques sont insolubles dans les solvants aqueux et ne peuvent être extraites qu'à l'aide de détergents. Il existe enfin des protéines fibreuses, insolubles dans les solvants aqueux, telles les kératines des cheveux et de la peau.

Lors de la biosynthèse protéique, l'information contenue dans l'ADN (acide désoxyribonucléique) est traduite en une chaîne polypeptidique. Certaines protéines subissent en outre des modifications covalentes, soit au cours de la biosynthèse (événements cotraductionnels), soit après terminaison de la chaîne (événements post-traductionnels).

I. 3. 2. 2. Organisation structurale :

La chaîne polypeptidique qui résulte de l'information monodimensionnelle contenue dans l'ADN doit se replier pour former la structure tridimensionnelle compacte et fonctionnelle. Malgré le grand nombre de conformations qu'une chaîne polypeptidique peut adopter a priori, il

n'existe qu'un nombre restreint de motifs structuraux dans les protéines, et une même chaîne polypeptidique conduit à une conformation unique ou à un très petit nombre de conformations voisines de protéine native. Certaines parties de la chaîne s'ordonnent en structures régulières, essentiellement les hélices α , les structures β . Ces segments de structures régulières et des segments de la chaîne non ordonnés en structures régulières interagissent entre eux pour former des « unités de construction » dont l'assemblage engendre la structure de la protéine.

Dans la nomenclature introduite par K. U. Linderstrom-Lang [?], on distingue structures primaire, secondaire et tertiaire. M. Rossmann [?] a introduit la notion de structure supersecondaire. Le terme de conformation se réfère à l'ensemble des structures secondaires, supersecondaires et tertiaires. J. D. Bernal [?] a introduit le terme de structure quaternaire pour désigner le résultat de l'association non covalente de sous-unités moléculaires.

I. 3.3. ETUDE DE L'ALBUMINE HUMAINE:

I. 3.3.1. Généralité

L'albumine est une protéine plasmatique produite par le foie, l'intervalle normal de concentration en albumine dans le sang est 35 à 50 g/l, et elle représente habituellement environ 60% des protéines plasmatiques, toutes les autres protéines du plasma sont désignées collectivement sous le nom de globulines.

L'albumine est essentielle pour le maintien de la pression oncotique indispensable pour la bonne répartition des liquides entre les vaisseaux sanguins et les tissus.

I. 3.3.2. Structure biochimique de l'albumine :

Le sérum albumine humaine est une protéine monocaténaire de 585 résidus ayant un poids moléculaire de 68000 daltons. La séquence polypeptidique a été depuis confirmée par la séquence génomique.

Une étude de la séquence en acides aminés a permis de dénombrer 35 cystéines dont les positions influent sur la structure tertiaire de la molécule en la stabilisant par 17 ponts sulfures.

L'organisation de la molécule en domaines et boucles a été confirmée par les études de fragmentation de l'albumine, en particulier, l'action du bromure de cyanogène.

Celle-ci a permis l'obtention de trois fragments A, B et C résultant d'une coupure au niveau des résidus méthionines 123 et 198 localisés sur les brins reliant les boucles [10, 11-13] (figure I-6).

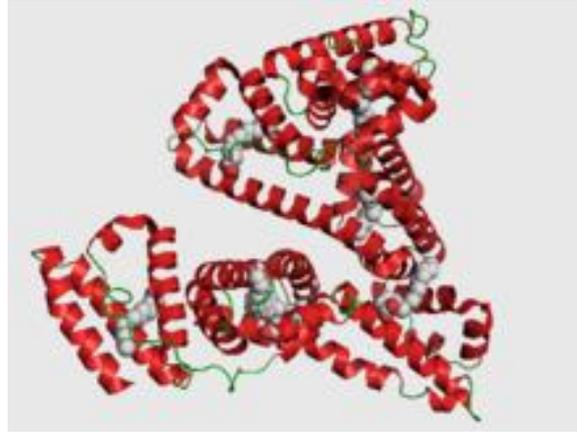


Figure I. 6 : Structure tridimensionnelle de l'albumine avec ses 3 domaines et ses ponts disulfures [9].

I. 3. 3. 3. Propriétés physico-chimiques de l'albumine humaine

A l'intérieur du pool des protéines plasmatiques, l'albumine humaine occupe quantitativement et qualitativement une place prépondérante, c'est en effet le constituant majeur du sérum.

Le taux d'albumine humaine est compris entre 38 et 44 g/l dans une population normale, lorsque l'albumine est dépourvue de tous les ligands, c'est une protéine incolore, dont la molécule porte plus de 200 résidus chargés, ce qui confère une hydrophilie importante et lui assure une grande solubilité.

Sa charge électrique nette est de -18 dans les conditions physiologiques, et son point isoélectrique se situe entre 4,8 et 5,6 sa valeur exacte dépend de la force ionique du milieu.

L'hydrophilie élevée de l'albumine, lui permet de prendre en charge 75 à 80% de l'effet oncotique du plasma. C'est une protéine soluble isolée de la fraction V de colin, qui peut être obtenue sous forme cristallisée par addition de sels minéraux.

Elle est dotée d'une grande capacité de combinaison in-vivo (acides gras, bilirubine, quinine, strychnine, pénicilline). Grâce à ses groupements tyrosyl, elle peut aisément fixer l'iode.

Une couche dense de molécules d'albumine disposées sur une surface dans le sens de leur longueur (couchées) correspond à une concentration interfaciale d'environ $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; une couche dense de molécules orientées perpendiculairement à la surface (debout) donne une concentration interfaciale de $0,71 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. La séparation des différentes formes moléculaire est réalisée par la technique de l'électrophorèse en gel polyacrylamide, c'est la molécule la plus rapide en électrophorèse [11-15].

I. 3. 3. 4. Fonction physiologique de l'albumine

L'albumine est synthétisée dans le foie sous forme de précurseurs, la prépro-albumine puis la pro-albumine. Cette dernière débute par un propéptide de 6 aminoacides, Arg-gly-val-phe-arg-arg, qui devance la chaîne polypeptidique constituant l'albumine.

Physiologiquement cette synthèse se fait à son maximal, la capacité de synthèse peut cependant être augmentée en cas de pertes urinaires importantes.

Normalement, un homme de 70 Kg synthétise 14 grammes d'albumines par jour, son taux de synthèse varie entre 120 et 200 mg/Kg/j et sa demi-vie intravasculaire est comprise entre 14 et 20 jours [11, 12].

Diverses fonctions sont attribuées à l'albumine, dont la plus importante consiste en sa capacité à fixer et à transporter une multitude de ligands et à débarrasser l'organisme de produits toxiques.

L'albumine peut s'associer de façons non covalentes avec des molécules plus petites et avec des ions, ceci est dû à l'existence dans sa structure de plusieurs régions de liaison présentant des affinités plus ou moins fortes pour certains ligands.

De plus, ils existent sur la molécule d'albumine quelques sites particuliers de fixation covalente de certaines substances. Grâce à son affinité remarquable pour les cations métalliques univalents et divalents et pour les anions de petite ou grosse taille, l'albumine possède un grand pouvoir tampon [16, 17].

I. 3. 3. 4. 1. Régulation de la pression osmotique

De plus, vu sa forte concentration dans le plasma sanguin (3 à 4,5%) chez l'homme, l'albumine joue un rôle très important dans le maintien de la pression osmotique. Elle est responsable à elle seule de 75% de la pression osmotique colloïdale totale du plasma en empêchant la fuite de l'eau contenue dans le plasma vers les tissus. Ce rôle est favorisé par la taille de la molécule, par sa charge électrique élevée et par sa capacité de liaison avec les amines et peut également constituer une source très importante de protéines et d'acides aminés [10].

Dans les cas d'hyponutrition, le faible taux de SA dans l'organisme entraîne des œdèmes. Elle a également un pouvoir tampon, limitant ainsi les variations de pH du sang, notamment lors de l'accumulation du gaz carbonique [18].

I. 3. 3. 4. 2. Transport plasmatique et détoxification

A cause de son abondance naturelle, l'albumine joue également un rôle important dans le transport d'une très grande variété de substances endogènes et exogènes, dont certaines peuvent être toxiques pour l'organisme lorsqu'elles sont à l'état libre [19]. La SA contribue ainsi à la

détoxification de l'organisme en se liant avec certains métabolites; cette fonction atteint un degré ultime de spécialisation chez le cobra de Chine, qu'elle protège contre son propre venin [20, 21].

Les ligands endogènes [10, 13] : Parmi lesquels on trouve les acides aminés, les acides gras, les hormones (la thyroxine, l'œstradiol), la bilirubine, le calcium, sans ces ligands l'albumine seraient éliminées par les reins. L'albumine peut lier également des métaux toxiques comme le cuivre, le nickel et le mercure; associés à l'albumine, dans ce cas, ils ne passent plus à travers les filtres rénaux. L'albumine constitue aussi un réservoir d'oxyde nitrique, impliqué dans un nombre croissant de processus physiologiques et possède une fonction anti-oxydante majeure en séquestrant les radicaux libres de l'oxygène [10].

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène. Le rôle physiologique de cette production basale de dérivés réactifs de l'oxygène n'est pas totalement connu, mais certaines de ces molécules pourraient avoir une fonction dans les processus de signalisation cellulaire. Dans certaines situations, cette production augmente fortement, entraînant un stress oxydatif que l'on définit comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules.

En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les dérivés réactifs de l'oxygène (superoxyde O_2^- , hydroxyle OH, peroxyde d'hydrogène H_2O_2) ont été impliqués dans l'altération de plusieurs fonctions de l'endothélium incluant le tonus vasculaire et donc dans un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques comme le cancer, les maladies cardiovasculaires (l'athérosclérose). L'hypertension, le diabète, le tabagisme, peuvent agir en tant que cofacteurs en augmentant la production des radicaux libres [22, 23].

Les antioxydants peuvent être définis comme toutes substances, présentes, à faible concentration par rapport au substrat oxydable et sont capables de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques comme le super oxyde dismutase (cuivre, zinc, manganèse), catalase (fer), le glutathion peroxydase (sélénium) mais aussi de petites molécules liposolubles comme la vitamine E (α -tocophérol), la β -carotène ainsi que des petites molécules hydrosolubles comme l'acide urique et la vitamine C (l'acide ascorbique), le glutathion [23] et des protéines comme l'albumine [24].

Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux (antioxydants primaires) en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux

libres oxygénés (antioxydants secondaires). En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire.

Seule, la cystéine (34) libre de l'albumine est très accessible aux radicaux libres réactifs ce qui permet à l'albumine de jouer un rôle antioxydant et un rôle protecteur contre les radicaux libres dans le milieu extracellulaire. Une autre étude [25] a montré que la perfusion de sérum albumine humaine diminue le degré du peroxyde d'hydrogène au niveau du myocarde. Ce fait supporte la possibilité que l'albumine puisse être considérée comme étant l'un des piègeurs (scavenger) de métabolites de l'oxygène in vivo.

L'oxyde nitrique (NO) est l'une des molécules de signalisation les plus répandues qui participent au fonctionnement de presque toutes les cellules et des organes du corps. Dans le sang le NO n'existe que sous une forme active. Il peut être associé aux acides aminés et aux protéines qui ont une fonction thiol libre, pour former un groupe nitrosothiol. La concentration de NO est faible par comparaison à celle des nitrosothiols qui est de l'ordre de 7µM dont 96 % sont sous formes de nitrosothiols et 82 % sont sous forme de nitroso-S-albumine [26].

L'albumine prolonge l'action de l'oxyde nitrique c'est-à-dire quelle le transporte jusqu'aux groupes thiol des molécules de faible poids moléculaire comme la cystéine libre du plasma, agissant directement au niveau des plaquettes qui possèdent une enzyme ou un récepteur dans leurs membranes, et permettant la libération de NO à l'intérieur des cellules plaquettaires [27]. Cet enzyme/récepteur est activé ou exposé quand les plaquettes sont déjà activées.

Ligands exogènes [17, 19, 28] : L'albumine lie réversiblement et transporte différents types de médicaments (dont les plus connus sont l'ibuprofène, le diazépam, et la warfarine, la digitoxine, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, etc.). Cette liaison contrôle la présence et la concentration active de ces composés dans le sang et fournit un réservoir pour une durée d'action plus étalée dans le temps. La SA peut influencer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion des composés thérapeutiques. Par exemple les composés qui ont une affinité élevée pour l'albumine se lient à plus de 95 % à la protéine, comme par exemple le naproxen, la warfarine et la digitoxine, exigent une dose plus forte pour atteindre une concentration effective dans le sang. En même temps, ils seront distribués à une vitesse plus lente pour atteindre leurs sites d'activité [17]. L'existence et le rôle d'un récepteur de l'albumine dans la membrane de l'hépatocyte, impliqué dans le transfert des ligands et suggéré par Reed et Burrington [29], demeure encore un sujet de discussion.

Dans la plupart des cas, plus de 50 % des anesthésiques généraux administrés peuvent se lier à l'albumine, c'est le cas du propofol (2,6-diisopropylphenol) [30], anesthésique d'action

rapide et brève, généralement administré par voie veineuse. De la forte liaison entre le propofol et la SA, résulte une faible concentration d'anesthésique libre, diminuant ainsi son effet. Cette liaison influence le mécanisme du propofol dans le SNC (système nerveux central) pour induire l'anesthésie [30, 31]. Dans tous les cas, les sites de tous ces ligands ont été précisément identifiés sur la molécule cristallisée [28, 16].

In vivo, on rencontre aussi d'autres problèmes liés à la compétition entre des médicaments et d'autres métabolites endogènes pour le même site de l'albumine. C'est particulièrement vrai pour les acides gras, qui normalement ont des taux de 0,1 et 2 moles par mole de SAH et peuvent entrer en compétition avec d'autres médicaments qui se lient à la protéine [17]. Un changement d'interaction entre l'anesthésique et la SA, induit par les acides gras ou d'autres médicaments qui entrent en compétition pour le même site de liaison, ou bien encore des modifications génétiques de la protéine, peuvent entraîner des changements cruciaux dans la concentration pharmacologiquement active de l'anesthésique [28].

Il est évident que toute information concernant les propriétés de la SA, comme par exemple la variation de ses propriétés volumétriques lors de la fixation de ligands, fournit des informations pour essayer de les modifier, ou pour contrôler les interactions de la protéine avec des composés thérapeutiques, afin d'optimiser leur transport et leur distribution dans le corps.

I. 3. 3. 5. THERAPEUTIQUE

Protéine majoritaire du plasma, l'albumine est aussi quantitativement, un constituant d'une importance physiologique considérable. Ses fonctions importantes sont :

Le maintien de la pression colloïdo-osmotique et la nutrition des tissus. L'albumine exerce la première de ces deux activités en maintenant l'eau dans le système circulatoire, un gramme d'albumine retient environ 15 ml d'eau, l'albumine totale retient ainsi 600 ml d'eau par litre de plasma ou en le retirant des espaces extravasculaires en circuit.

L'administration de solution d'albumines représente ainsi le remède le plus efficace et de plus prompt effet dans le traitement des diverses formes de chocs (post-hémorragique, post opératoire, traumatique, péritonéal, de brûlures...etc.) et représente un remède irremplaçable dans l'œdème cérébral, dans l'insuffisance hépatique aigüe et dans les états de cirrhose hépatique ascétique et néphrose. Dans ces deux dernières conditions l'administration de l'albumine outre l'action osmotique et l'augmentation excessive de la diurèse, favorise l'apport spécifique de protéines homologues entièrement assimilables.

L'albumine a été également utilisée comme matériau de recouvrement de matériaux synthétiques de façon à minimiser les risques d'adhésion placentaire et donc la formation de caillots.

Chapitre II

ADSORPTION DES PROTEINES SUR LES POLYMERES

II.1. INTRODUCTION :

L'adsorption des protéines sur une surface solide est un évènement important dont l'étude permet d'apprécier les qualités du matériau et consiste à répondre à certaines questions essentielles telles que la quantité des protéines adsorbées, la nature et la force des interactions et à estimer l'affinité de la protéine pour la surface avec laquelle elle entre en contact.

La nature chimique de la surface solide joue également un rôle important puisque elle-même peut présenter plusieurs domaines de liaisons et d'interactions qui contribuent à la formation de complexes entre protéines et la surface du solide.

Ainsi Fukuzaki et al. [32] ont étudié l'adsorption de l'albumine du sérum bovin (BSA) sur des particules d'acier inoxydable en fonction du pH de la solution et il a été démontré que la protéine s'adsorbe spontanément sur les particules d'acier inoxydable, quelle que soit sa charge. D'autres études, y compris celles de Nord et al. [33, 34], ont permis d'observer une adsorption maximale de la BSA sur des particules de polystyrène près de son pI.

Des techniques électrochimiques ont été également mises en place pour étudier l'adsorption des protéines sur différentes surfaces solides [35-37]

Tout atome ou molécule qui s'approche d'une surface subit une attraction qui peut conduire à la formation d'une liaison entre la molécule et la surface; ce phénomène constitue l'adsorption, à ne pas confondre avec l'absorption qui se produit lorsque les molécules adsorbées pénètrent au cœur du solide ou du liquide adsorbant.

II.2. ISOTHERMES D'ADSORPTION :

On peut décrire un processus d'adsorption à l'aide des modèles théoriques ou empiriques qui représentent la relation entre la quantité d'impuretés adsorbées par unité de masse de solide et la concentration d'impuretés en solution. On obtient une telle courbe à partir des résultats d'essais de laboratoire effectués à une température constante. Pour se faire, on introduit des quantités connues de solide dans des volumes d'eau à traiter et après un temps de contact donné, on mesure la concentration résiduelle d'impuretés en solution. Afin d'extraire cette information, il est nécessaire de modéliser les données expérimentales en utilisant une isotherme d'adsorption. [38-50].

Remarque préliminaire :

Une ambiguïté de langage fait que le mot isotherme désigne parfois la présentation graphique d'un résultat de mesure brut, ou parfois l'équation d'une courbe utilisée pour décrire ce résultat.

L'isotherme d'adsorption relie la quantité **S** d'une espèce adsorbée par unité d'aire, de masse ou de volume d'adsorbant à la concentration **C_e** de cette espèce en solution à l'équilibre. Elle présente la réponse globale de l'adsorbant à la présence de l'adsorbat: la courbe tracée est le résultat de tous les phénomènes qui entraînent une baisse de concentration en solution regroupés sous l'appellation générique adsorption; ainsi elle recouvre des phénomènes multiples tels que la complexation ou la précipitation de surface, l'échange d'ions, l'oxydo-réduction. Notons enfin que la grande majorité des isothermes publiées dans la littérature ont été obtenues en batch et quelques autres en colonne.

Les conditions à respecter pour réaliser une isotherme d'adsorption sont:

- l'équilibre doit être atteint, d'où l'importance d'étudier la cinétique de sorption avant de tracer l'isotherme;
- les paramètres physico-chimiques doivent être maintenus constants, notamment la température et le pH, la force ionique étant fixée au départ.

La notion d'équilibre ne doit pas occulter l'aspect dynamique du phénomène d'adsorption :

L'équilibre est établi quand la quantité instantanée de soluté qui s'adsorbe est égale à la quantité instantanée de soluté qui se désorbe [51, 52].

Nous allons décrire maintenant les quelques équations d'isothermes les plus utilisées :

II. 3. 1. Isotherme de LANGMIUR:

Le type d'isotherme le plus simple a été défini par Langmuir. [53]. D'autres études ont également utilisées l'isotherme de Langmuir pour décrire l'adsorption des protéines sur des surfaces solides [32, 54, 55-58]. La surface du solide est représentée par un nombre de sites définis

L'application expérimentale de l'équation de Langmuir peut être placée sous la forme graphique suivant la formule: L'isotherme de LANGMIUR est proposée en 1918 [Weber et coll, 1991]. C'est un modèle simple et largement utilisé. Il est basé sur les hypothèses suivantes:

- ♦ L'espèce adsorbée est située sur un site bien défini de l'adsorbant (adsorption localisée).
- ♦ Chaque site n'est susceptible de fixer qu'une seule espèce adsorbée

♦ L'énergie d'adsorption de tous les sites est identique et indépendante de la présence des espèces adsorbées sur les sites voisins (surface homogène et d'interactions entre espèces adsorbées).

Il est applicable à l'adsorption monomoléculaire du soluté (S) à la surface de l'adsorbant (A) à l'équilibre. Elle est exprimée par la relation suivante [Dipa et coll., 2002; Avom et coll., 2001]:

$$Q_e = Q_m \cdot [K_L \cdot C_e / (1 + K_L \cdot C_e)] \quad (2)$$

Q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre (mg/g).

Q_m : Capacité maximale d'adsorption de la monocouche (mg/g).

K_L : Paramètre de LANGMUIR.

Dans le cas d'une faible quantité de soluté adsorbée, le terme $K_L \cdot C_e$ peut être très inférieur à (1) et il est alors négligé. La relation de LANGMUIR se réduit alors à une relation directe entre la capacité d'adsorption et la concentration à l'équilibre de l'adsorbât en phase liquide :

$$Q = Q_m \cdot K_L \cdot C_e \quad (3)$$

Dans le cas d'une forte quantité de soluté adsorbée, le terme $K_L \cdot C_e$ devient largement supérieur à (1). Cela implique que Q_e tend vers Q_m .

Par ailleurs, la linéarisation de l'équation par passage aux inverses donne :

$$C_e/Q_e = [(1/Q_m \cdot K_L) + (C_e/Q_m)] \quad (4)$$

L'équation obtenue est celle d'une droite de pente $1/Q_m$ et d'ordonnée à l'origine $1/Q_m \cdot K_L$.

K_L , ce qui permet de déterminer deux paramètres d'équilibre de la relation Q_m et K_L .

II. 3. 2. Isotherme de FRUNDLICH :

En 1926 FREUNDLICH a établi une isotherme très satisfaisante qui peut s'appliquer avec succès à l'adsorption des gaz, mais qui a été principalement utilisée pour l'adsorption en solution, [Arias et coll., 2002].

Si la surface n'est pas uniforme, c'est-à-dire, si les molécules adsorbées ne sont pas en interactions entre elles, on utilise l'équation de FREUNDLICH [59] :

Elle repose sur les équations empiriques suivantes :

$$Q_e = K_F \cdot C_e^{1/n} \quad (5)$$

Q_e : Quantité adsorbée à l'équilibre (mg/g).

C_e : Concentration d'équilibre du corps dissous (mg/l).

K_F, n : Constantes qu'il faut évaluer pour chaque solution et pour chaque température.

L'équation de FREUNDLICH est cependant plus utile sous la forme logarithmique :

$$\ln Q_e = \ln K_F + 1/n \ln C_e \quad (6)$$

Il s'agit de l'équation d'une droite de pente $1/n$ et d'ordonnée à l'origine $\ln K_F$.

II. 3. 3. Isotherme de TEMPKIN

Tempkin se base sur le fait que la chaleur d'adsorption varie linéairement avec le degré de recouvrement ; cette variation peut être liée à l'hétérogénéité de la surface, ou à des interactions latérales entre molécules adsorbées [60].

L'isotherme de Tempkin [Arsianoglu et al. 2005; Baar, 2006] est représentée par l'équation suivante :

$$\Theta = RT/\Delta Q \cdot \ln K_0 \cdot C_e \quad (9)$$

Θ : représente le taux de recouvrement de la surface de l'adsorbant, il est donné par la relation :

$$\Theta = Q_e/Q_m \quad (10)$$

C_e : Concentration à l'équilibre en (mg/l).

K_0 : Constante d'équilibre.

ΔQ : Variation de la chaleur d'adsorption (kJ/mole).

Q_e : Quantité adsorbée en (mg/g).

Q_m : Capacité maximale d'adsorption en (mg/g).

La linéarisation du modèle de tempkin a donné l'équation suivante :

$$Q_e = Q_m \cdot RT/\Delta Q \ln K_0 + Q_m RT/\Delta Q \ln C_e \quad (11)$$

Si on trace $Q_m = f(\ln C_e)$, on obtient une droite de pente et d'ordonnée à l'origine qui nous permettent le calcul de K_0 et ΔQ .

II. 4. CINETIQUE D'ADSORPTION

La cinétique de l'adsorption des protéines plasmatiques a été largement étudiée en utilisant divers techniques expérimentales [61- 64].

Le processus réactionnel de l'adsorption d'un soluté à la surface d'un adsorbant est complexe. En effet, le soluté doit atteindre la surface active et son cheminement vers celle-ci se décompose en plusieurs étapes de transfert modifiant à chaque fois les potentiels chimiques des différentes espèces.

L'équilibre de l'adsorption est atteint quand tous les sites de la surface sont saturés ce qui correspond à la capacité de surface. Celle-ci correspond à une concentration en protéine faible, Brash et coll. [65] ont déterminé, par exemple, des valeurs de $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ pour l'albumine.

Dans le plasma, les cinétiques et les équilibres sont différents en raison de la compétition entre les différentes protéines [66].

Il est admis, en général, que le processus de l'adsorption peut être divisé en trois étapes:

- Le soluté diffuse vers le grain de l'adsorbant.
- Le soluté diffuse dans les pores de l'adsorbant.
- L'adsorption à lieu.

Si l'adsorbant n'est pas poreux, c'est l'étape du transfert de masse externe qui contrôle la vitesse d'adsorption, et si l'adsorbant est poreux (ce cas est le plus souvent), c'est l'étape de transfert de masse interne qui limite la vitesse d'adsorption. La figure suivante schématise les transferts de matière successifs :

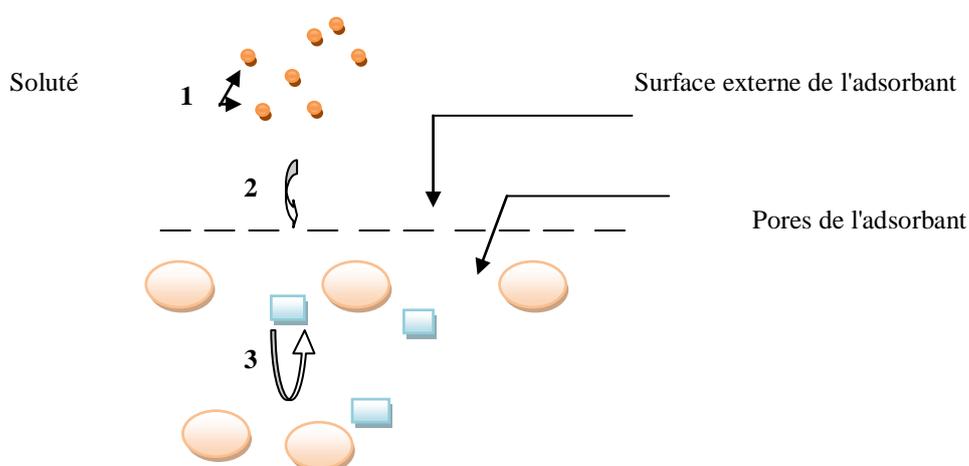


Figure II. 7. Étape de la diffusion d'une molécule lors de son adsorption.

- (1) : Le soluté diffuse vers l'adsorbant.
- (2) : Le soluté diffuse les pores de l'adsorbant.
- (3) : L'adsorption proprement dite.

II. 5. REVERSIBILITE DE L'ADSORPTION

La réversibilité de l'adsorption des protéines sur la surface d'un matériau est fondamentale. D'une manière générale, ces composés présentent des particularités probablement dues à la complexité de leur structure comparée à celle des petites molécules.

SODERQUIST ET COLL [67], proposent par exemple, un processus d'adsorption désorption en trois étapes. Dans un premier temps, les protéines s'adsorbent très rapidement, et atteignent un pseudo-équilibre, la réversibilité à ce stade est possible.

Dans un deuxième temps, quand 50 à 60% de la surface est couverte par les protéines celles-ci peuvent subir un réarrangement de structure contribuant à renforcer l'interaction protéine/surface. Enfin, une dénaturation ou une désorption des protéines peut avoir lieu, au cours du temps.

En générale, l'adsorption apparaît irréversible, dans le cas de surface hydrophobe au contraire, on a observé des adsorptions réversibles et irréversibles dans le cas de surface hydrophile.

Lorsque la surface d'un matériau est en contact avec plusieurs types de protéines, celles-ci peuvent entrer en compétition dans les mécanismes d'adsorption. Une protéine de type A pourra contribuer à désorber une protéine de type B. la composition de la première couche de protéines adsorbées sur le matériau, peut donc changer au cours du temps, ce qui modifiera le comportement de la surface vis-à-vis des protéines plasmatiques [68].

Les protéines désorbées peuvent avoir subi un changement conformationnel qui altère leur activité biologique [64]. Ainsi, MIZUTANI ET COLL [69] ont montré que des protéines adsorbées sur le verre perdaient progressivement leur activité au cours du temps et se dissociaient-en sous unités.

En fin, nous pouvons dire que le processus d'adsorption des protéines sur une surface solide présente plusieurs considérations que rares sont les surfaces ou bien les protéines susceptibles de ne développer qu'un seul type d'interaction spécifique, c'est ce qui rend l'étude d'un tel phénomène complexe.

II. 6. TECHNIQUES D'ANALYSE DE L'ADSORPTION

Plusieurs techniques expérimentales sont actuellement utilisées pour obtenir des informations concernant l'adsorption des protéines sur les surfaces.

Parmi les différentes méthodes, celles qui permettent de déterminer la concentration de la protéine libre à l'équilibre avec un matériau sont les plus simples. Des méthodes chimiques et biochimiques sont de même employées, comme les techniques immunologiques.

Les techniques analysent seulement le mécanisme d'adsorption d'une protéine donnée sur un matériau adsorbant. La spectroscopie et les méthodes optiques sont plus précises.

II. 6. 1. Mécanisme de l'adsorption à l'interface solide/liquide

Comme nous l'avons dit précédemment, l'adsorption des protéines plasmatiques est le premier évènement qui se produit lors de tout contact du sang avec un matériau [70, 71]. Ceci conduit à une nouvelle interface riche en protéines dont, la composition, la structure, et finalement le caractère thrombogène sont étroitement liés à la nature et à l'activité des protéines adsorbées sur la surface du matériau.

L'adsorption des protéines peut s'accompagner de changement conformationnel, protégeant ou démasquant ainsi les sites actifs.

II. 6. 1. 1. Adsorption des protéines

Plusieurs caractéristiques thermodynamiques ou chimiques peuvent expliquer l'adsorption d'une protéine sur une surface. Les plus importants sont :

- La diminution de l'énergie libre du processus d'adsorption.
- Le caractère amphipatique des protéines, avec leurs séquences hydrophobes-hydrophiles
- La nature macromoléculaire des protéines.

• Aspect thermodynamique

Comme il a été décrit le mécanisme d'adsorption est régi par la relation d'équilibre (1). L'énergie de formation du complexe PS est donnée par la relation (2)

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad [12]$$

La formation du complexe sera thermodynamiquement possible si la réaction de formation est exothermique, ce qui est caractérisé par une valeur de ΔG négative. L'adsorption sera donc un fait, caractérisé par les trois paramètres ΔH , ΔS et T .

Ainsi, l'adsorption de l'albumine sur un polystyrène modifié par des charges négatives dépend du pH du milieu qui contribue à rendre ΔH plus ou moins négative [72].

• Caractère amphipatique des protéines

La chaîne polypeptidiques des protéines est formée d'enchaînement d'acides aminés, don les substituants latéraux peuvent être chargés négativement/positivement, polaire/ non polaire, hydrophobes/ hydrophiles. Ces caractéristiques donnent la possibilité à de nombreuses liaisons éventuellement réversibles, de se former.

• Nature macromoléculaire des protéines

L'influence du poids moléculaire, donc de la taille des protéines peut avoir une importance dans les phénomènes d'adsorption. La taille de la protéine chargée est le plus liée à la force ionique du milieu [73].

II. 6. 1. 2. Interaction protéines et matériaux

□ Transport

L'approche de la protéine à la surface du matériau est gouvernée par plusieurs étapes (Figure II.8) dont les plus importantes peuvent être de la façon suivante [74, 75]:

- 1- diffusion de la protéine vers la couche d'adsorption.
- 2- adsorption avec changement de conformation.
- 3- réaction éventuelle entre espèces adsorbées.
- 4- désorption des protéines natives et des nouvelles espèces formées au centre du matériau.
- 5- diffusion des espèces dans la solution.

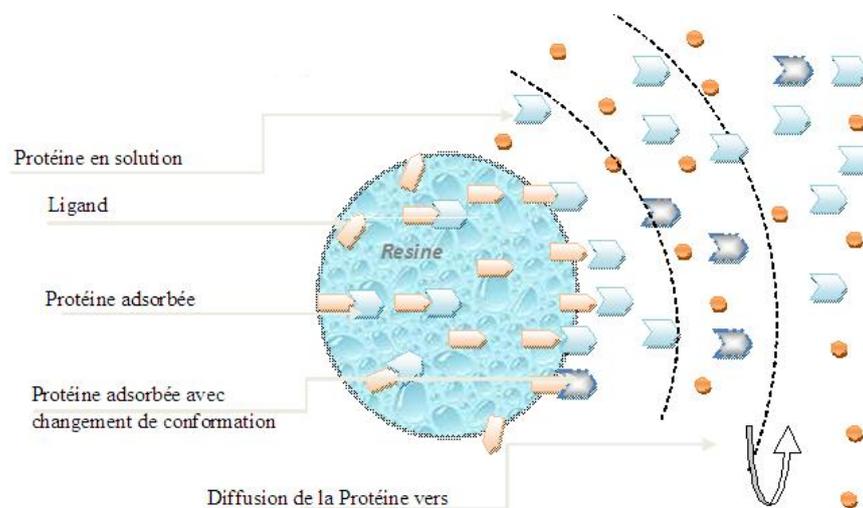


Figure II. 8 : Mécanisme de l'adsorption d'une protéine à la surface du matériau.

□ Modes d'interactions

Les interactions entre protéines et la surface du matériau peuvent être de différentes natures (Figure II.9)

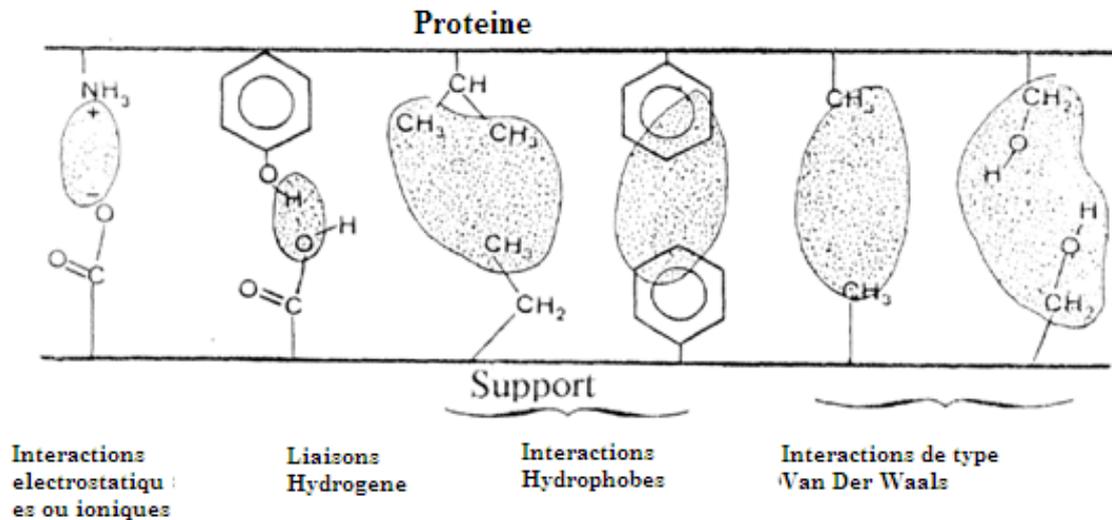


Figure II. 9 : Schéma des principales liaisons non covalentes qui participent à la stabilisation du complexe protéine- matériau.

* Interactions ioniques

Les interactions ioniques se forment entre un résidu chargé de la protéine et les sites d'ancrages de signes opposés de la surface du matériau. Ce type de liaison est aussi à la base de la chromatographie liquide par échange d'ions.

Au pH inférieur au pI (leur charge globale est nulle, il y a équilibre entre les charges (+) et (-) de la molécule), les protéines substances enphotères, se charge positivement pour se fixer sur le support polycationique, par contre, au pH supérieur au pI la protéine se charge négativement et se fixe alors sur un échangeur anionique. Néanmoins, l'adsorption de protéines chargées négativement sur des surfaces négatives est possible et se fait parfois spontanément [76].

* Interactions hydrogènes

La liaison hydrogène est fonction de la composition de la surface et se rencontre en particulier dans le cas des substrats polaires. Des interactions de ce type peuvent se développer soit avec les fonctions amides des enchaînements peptidiques des protéines, soit avec l'eau liée à ces composés [6, 17].

* **Interactions hydrophobes**

Ces interactions se forment entre des substituants non polaires en milieux aqueux, les molécules d'eau constituent avec ces groupements, de structures compactes, au contact desquelles elles s'organisent. La liaison hydrogène libère les molécules d'eau, ce qui contribue à augmenter l'entropie d'adsorption [77].

La protéine qui s'approche de l'interface va donc provoquer la désorption des molécules d'eau et établir des liaisons qui mettent en jeu des forces de type van der Waals ou dipole-dipole [78].

Les protéines plasmatiques fortement amphipatiques ont une grande affinité pour ces surfaces. A leur surface les protéines plasmatiques forment des couches monomoléculaires correspondant à des concentrations superficielles de l'ordre de 1 à 5 mg/ml [79].

II.7. Conclusion

L'adsorption de protéine plasmatique sur le matériau est un phénomène important dont l'étude permet d'apprécier les qualités du matériau. En outre, dans un autre domaine, celui de la chromatographie liquide, la connaissance des caractéristiques d'adsorption des phases stationnaires vis-à-vis des protéines est fondamentale pour l'espèce à purifier.

Chapitre III

LES PROCÉDES CHROMATOGRAPHIQUES [80-82].

III. 1. INTRODUCTION

Les techniques chromatographiques occupent actuellement une place importante dans les procédés de purification des protéines, biomolécules de haute pureté. Le choix d'un procédé chromatographique dépend étroitement des interactions susceptibles d'être mises en jeu entre les constituants du soluté d'une part et les caractéristiques physico-chimiques développées par une phase stationnaire en particulier d'autre part.

III. 2. LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DES PROTÉINES [83-85].

La chromatographie liquide est une des anciennes méthodes de séparation et depuis quelques dizaines d'années a connu un essor spectaculaire, elle devient actuellement une méthode disponible pour l'analyse et la séparation des molécules d'origine biologique en particulier, les protéines.

La chromatographie liquide peut généralement se classer en quatre sous-ensembles selon le mécanisme d'interaction ou de rétention entre les solutés à séparer la phase stationnaire et la phase mobile.

III. 2. 1. Chromatographie par perméation de gel (GPC)

Aussi nommée chromatographie d'exclusion stérique, elle permet la séparation des macromolécules par élution dans l'ordre inverse de leur taille [86], elle utilise la différence de pénétration des constituants sur un gel de polymère. Les molécules dont le diamètre est inférieur à une certaine valeur sont les seules à pouvoir pénétrer dans les pores du gel et sont donc retardées dans leur traversée de la colonne [87].

III. 2. 2. Chromatographie de type hydrophobe

La chromatographie de type hydrophobe met en jeu les différences entre les diverses interactions de type hydrophobe existant entre les molécules à purifier et le support chromatographique.

On distingue en fait deux catégories de séparation selon l'hydrophobie :

☐ La chromatographie de séparation dans lesquelles la phase stationnaire comporte des radicaux polaires, permet d'effectuer l'élution des molécules adsorbées par un solvant peu polaire tel que l'hexane ou le chloroforme.

☐ La chromatographie dite en phase inversée, utilise une phase stationnaire constituée d'une forte densité de chaînes hydrophobes (groupes alkyles souvent C₈ ou C₁₈) et un éluant de polarité variable (gradient d'acétonitrile ou de 1- propanol).

L'élution par une solution à gradient décroissant en force ionique sur des supports moins hydrophobes (alkyles de C₁ à C₅ ou phényles) est également réalisée pour la purification de protéines [88].

III. 2. 3. La chromatographie d'échange d'ion [89, 90].

La phase stationnaire permet un échange d'ions, c'est-à-dire un solide comportant des groupements fonctionnels ionisés, fixés d'une façon covalente, et des ions mobiles de signe contraire assurant l'électro-neutralité. Les ions, retenus au voisinage des groupements fonctionnels par des forces d'attraction électrostatiques, sont échangeables en nombre équivalent avec ceux de la solution mise en contact avec l'échangeur.

Les séparations par échange d'ions s'adressent plus particulièrement aux espèces ionisées ou ionisables, encore que certaines séparations de solutés non ioniques puissent également être obtenues. En chromatographie d'échange d'ions dans le domaine de la biochimie, de nombreuses substances d'intérêt biologique (acides aminés, protéines...), dont l'analyse ne peut être effectuée par chromatographie en phase gazeuse en raison de leur trop faible volatilité, sont solubles dans l'eau et facilement ionisées en agissant sur le pH de la solution, elle se prêtent bien à la chromatographie d'échange d'ions. La matrice est constituée par réseau macromoléculaire tridimensionnels, le plus souvent un copolymère styrène-divinylbenzène, sur le quel sont greffés des groupements fonctionnels.

La structure du polymère détermine les propriétés mécaniques du support et la facilité d'accès des différentes espèces aux sites échangeurs, laquelle régit à la fois la sélectivité et la cinétique des échangeurs. Le gonflement étant fonction de la forme ionique de l'échangeur. Ce sont essentiellement pour les résines échangeuses des cations des dérivés :

* Sulfoniques ----- SO₃H (SE- Cellulose)

* Carboxyliques ----- COOH (CM- Sephadex)

Les résines échangeuses d'anions sont préparées par fixation de groupements amines, par exemple les celluloses échangeuses d'anions sont préparées par fixation de groupements diethylaminoéthyles -CH₂-CH₂-N(C₂H₅)₂ (DEAE- Sepharose).

III. 2. 4. La chromatographie d'affinité [91, 92].

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie par adsorption dans laquelle la molécule à purifier est adsorbée spécifiquement et de façon réversible par un produit fixateur complémentaire (ligand), qui est immobilisé sur un support insoluble (matrice). Le facteur de purification atteint souvent plusieurs milliers et le rendement en produit actif est généralement très élevé.

Beaucoup de séparations spectaculaires ont pu être accomplies en une seule étape, procurant un gain de temps considérable par rapport à des méthodes moins sélectives composées de multiples étapes.

La chromatographie d'affinité a un effet de concentration qui permet de traiter commodément de grands volumes. Le caractère hautement sélectif des séparations a pour origine la spécificité naturelle des molécules agissant réciproquement. Pour cette raison, la chromatographie d'affinité peut être employée :

- Pour purifier des produits contenus dans les mélanges biologiques complexes.
- Pour séparer la forme active d'un produit de son dérivé inactif.
- Pour séparer de petites quantités de produits biologiques des grandes quantités d'impuretés.

Principes et applications de la chromatographie d'affinité :

La chromatographie d'affinité c'est le type de chromatographie le plus sélectif, une protéine peut être purifiée d'un facteur 10^3 à 10^4 en une seule fois [84].

Le principe de la chromatographie d'affinité repose sur la reconnaissance entre une molécule du mélange à séparer et une molécule greffée sur la résine, que l'on appelle le ligand, ces deux molécules interagissant de manière hautement spécifique [85].

- ♦ L'adsorption de la molécule à séparer sur le ligand fixé à la résine est effectuée dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, concentration de la molécule à adsorber...) favorables à la liaison molécule-ligand.
- ♦ Dans ces conditions, les molécules du mélange à séparer qui n'ont pas (ou peu) d'affinité pour le ligand sont éluées au fur et à mesure qu'on le fait passer sur la résine.
- ♦ On désorbe ensuite les molécules spécifiquement fixées au ligand en modifiant les conditions physico-chimiques de telle sorte que la liaison molécule-ligand soit rompue : le plus souvent, on ajoute une tierce molécule qui entre en compétition avec le ligand greffé pour la molécule à séparer. Le principe est montré dans la figure suivante :

On peut, donc distinguer les étapes suivantes [84].

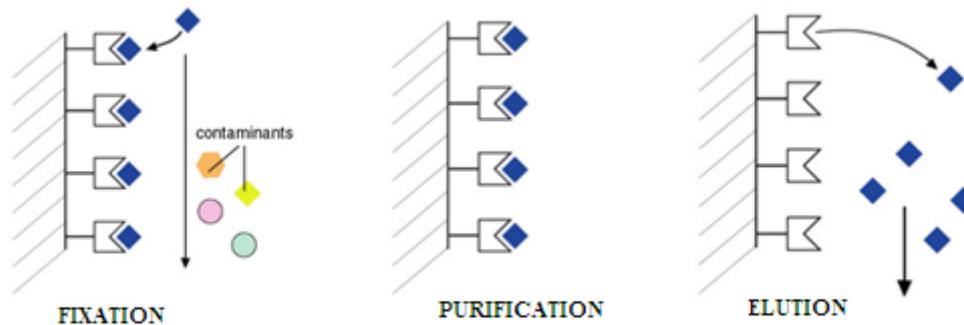


Figure III. 10. Principe de chromatographie d'affinité [85].

*** Etape de fixation**

Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

*** Etape de purification**

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.

*** Etape d'éluion**

La molécule purifiée est décrochée de la colonne et recueillie dans l'éluant. Souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction au moins est une protéine (**S**), l'autre sera qualifié de ligand (**L**) de cette protéine :



L'association de **S** et de **L** forme le complexe **SL**. Le constant définissant cet équilibre est :

$$K_a = (S) \cdot (L) / (SL)$$

III. 2. 4. 1. Chromatographie sur colorants

Cette technique est aussi appelée chromatographie de pseudo-affinité. Un des colorants utilisés est le bleu de Cibacron. Donc la chromatographie sur colorant ne permet pas de retenir la molécule d'intérêt, mais les composants que le colorant reconnaît, c'est pourquoi cette technique est qualifiée de pseudo affinité.

Chromatographie sur colorants immobilisés est l'exemple idéal pour illustrer les interactions multiples car le colorant lui-même rassemble plusieurs propriétés. Son caractère aromatique favorise le transfert de charge, son degré d'hydrophobicité non négligeable permet l'interaction sur certains acides aminés et son caractère ionique est parfois très prononcé. La structure de certains cofacteurs permet la purification d'enzymes. Le Blue Trisacryl M est un gel d'affinité utilisé pour la purification d'une large variété d'enzymes, protéines comme des kinases ou l'albumine, interférons et autres facteurs de coagulation. La matrice de base est le Trisacryl GF200, un support macroporeux sur lequel le Cibacron bleu est lié de façon covalente. [93, 94].

Il a été démontré que des enzymes se fixent sur le bleu de Cibacron, notamment les déshydrogénases à coenzyme NAD⁺ de par la ressemblance structurale avec le NAD⁺. Donc ce colorant se comporte comme un analogue structurel de l'ADP, l'AMP, l'ATP et le GTP, ce qui lui permet de retenir des protéines liant des nucléotides. Mais il n'est pas spécifique d'une protéine ce qui ne fait pas un bon ligand pour séparer des protéines liant les nucléotides.

Cette technique est néanmoins beaucoup utilisée car, même si la molécule d'intérêt n'est pas liée spécifiquement, celle-ci est colorée donc plus pratique à manipuler. Pour séparer la molécule d'intérêt des autres composants que le colorant reconnaît s'ils sont présents dans le mélange, il faut effectuer une autre chromatographie d'affinité avec un ligand spécifique.

III.2. 4. 2. Chromatographie sur les métaux chélates

La chromatographie sur les métaux chélates est une technique basée sur le fait que souvent de métaux de transitions peuvent former des complexes avec des molécules contenant des atomes O, N et S comme les protéines. Ces métaux interagissent plus particulièrement avec des acides aminés comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine et cystéine [95].

III. 2. 4. 3. Chromatographie sur les acides aminés

La chromatographie sur les acides aminés immobilisés est également basée sur les interactions ioniques, hydrophobiques et aromatiques. Dans certain cas la spécificité très élevée peut être expliquée par la disposition spatiale du ligand, lequel est compatible avec des sites sur la molécule à séparer.

III. 2. 4. 4. Les phases stationnaires de la chromatographie d'affinité

Elles sont généralement constituées d'un support, d'un ligand et éventuellement d'un bras espaceur liant le ligand au support. La préparation d'une bonne phase stationnaire conditionne

l'efficacité d'une séparation en chromatographie d'affinité, tant en ce qui concerne le choix du support que celui du ligand à immobiliser.

*** Les supports chromatographiques**

Le premier support conçu à partir de l'idée fondée sur l'affinité spécifique a été réalisé en 1910 par STRAKENSTEIN [96] qui a purifié l' α -amylase par adsorption sur un substrat insoluble (amidon). L'un des plus grands obstacles a été certainement celui de la préparation des phases stationnaires avec des propriétés satisfaisantes, donc l'utilisation d'un support de chromatographie liquide d'affinité des protéines doit généralement exiger des caractéristiques dont certaines sont liées à l'utilisation particulière que l'on veut en faire [96, 97] :

- Une insolubilité complète et une hydrophilie suffisante.
- Une perméabilité ou une porosité suffisante comprise entre 300 et 1000Å.
- Une stabilité chimique, physico-chimique et biologique au cours du couplage et ensuite au cours de la purification.
- Une compatibilité et un minimum d'interaction indésirables avec les constituants dans le milieu à séparer.
- Une rigidité mécanique et de bonnes propriétés hydrodynamiques.
- Une disponibilité des groupes chimiques pouvant être activés et couplés au ligand choisi.

Ainsi toute sorte de polymères réticulés peut être utilisée comme support pour fixer des groupements conférant au polymère des propriétés adsorbantes utilisable en chromatographie.

La fixation d'espèces réactives sur les supports polymères constitue le critère le plus important dans le choix de ces matériaux.

*** Les ligands**

En chromatographie d'affinité, un ligand attaché par une liaison covalente sur un support insoluble, doit être capable de former avec la molécule à séparer un complexe spécifique et dissociable [97-99]. Les ligands spécifiques qui ont été couplés pour préparer les phases stationnaires sont si nombreux qu'il n'est pas possible de décrire tout en détail. Outre la stabilité vis à vis de la molécule à purifier, le ligand doit posséder au moins une fonction chimique disponible et capable de réagir sur le support insoluble pour être immobilisé. Néanmoins, ce groupe ne doit pas être impliqué dans des interactions entre le ligand immobilisé et la molécule à purifier. Il est aussi évident que le ligand doit présenter une solubilité convenable dans le solvant utilisé pour procéder à l'opération de couplage et doit rester intact et stable pendant la réaction de couplage [100].

*** Les bras espaceurs [101]**

Le site actif d'un produit biologique est souvent utilisé dans la profondeur de la molécule et des adsorbants préparés par couplage direct de petits ligands, pouvant présenter de faibles capacités en raison d'interférences stériques entre la matrice et les produits se fixant sur le ligand afin de faciliter le couplage.

Pour obtenir une bonne purification en chromatographie d'affinité, il faut que la formation du complexe du soluté à purifier avec le ligand immobilisé sur un support solide corresponde le plus possible à la formation du complexe correspondant en solution. Malheureusement, ceci est rarement le cas, en particulier lorsqu'il s'agit d'une macromolécule à purifier de haute masse molaire, d'un ligand de faible masse molaire avec une constante de formation du complexe faible et une concentration du ligand relativement faible également.

Afin de résoudre ce problème d'accessibilité stérique, CAUTRCASAS et ses collaborateurs [101], ont proposé, pour la première fois, d'interposer, entre le support et le ligand, un substituant appelé bras ou espaceur [101].

Le bras espaceur doit posséder une longueur suffisante. S'il est trop court, il sera inefficace et le ligand ne pourra pas fixer les produits de l'échantillon. S'il est trop long, les effets non spécifiques deviendront prédominants et diminueront le caractère sélectif de la séparation. O'CARRA et Coll [102] ont montré que des bras très longs sont susceptibles de se combiner par interactions hydrophobes à des substances de l'échantillon et très souvent il est constitué de six groupes méthylènes ($-CH_2-$). D'autre part, il est évident que la molécule constituant le bras, doit présenter deux fonctions chimiques réactives, dont l'une est disponible pour fixer le ligand.

Enfin, il est très important lors du choix d'un bras, de prendre aussi en considération la nature de cet espaceur, car l'introduction de ce dernier peut favoriser la formation d'introductions non désirables qui perturbent la séparation sélective envisagée. Ces interactions parasites sont de nature hydrophobe ou polaire selon justement la nature chimique du bras espaceur.

***Rôle du Bras espaceur**

En chromatographie d'affinité, la chaîne de carbone et/ou autres atomes qui positionnent un groupe fonctionnel de la matrice solide auquel il est lié par covalence et la rend plus accessible à un ligand et moins limitée par l'encombrement stérique de la matrice.

Les effecteurs sont des ligands qui fixent toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler. Ces substances doivent posséder un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation.

Pour rendre certains ligands accessibles au site de fixation sur la molécule avec laquelle ils interagissent, il est nécessaire d'augmenter la longueur de la chaîne carbonée à l'extrémité de laquelle se situe le groupement activé. Cette chaîne additive s'appelle un bras espaceur.

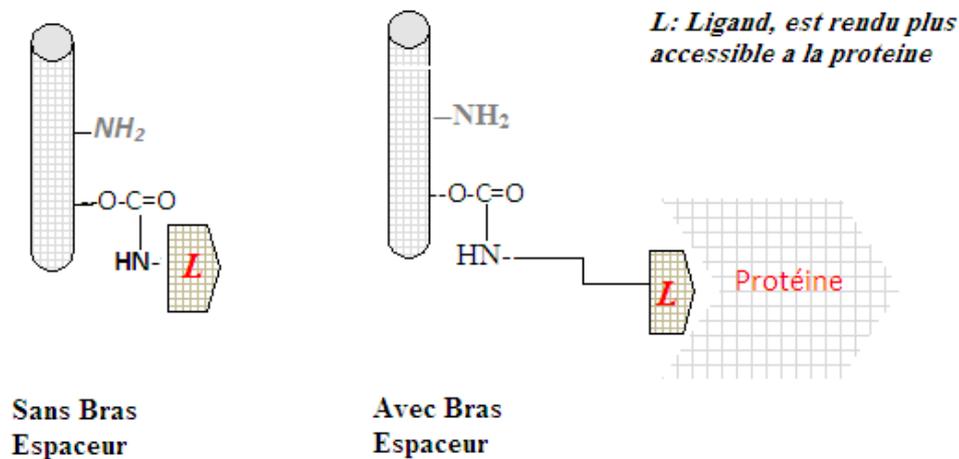


Figure III. 11. Principe de fonctionnement d'un bras espaceur.

Le bras espaceur permet de pallier les problèmes stériques dûs à la présence du support solide lors de l'approche de la protéine vers les ligands et nuisaient aux futures interactions potentielles. Il permet d'étudier dans de bonnes conditions stériques les interactions protéines/support. Mais aussi de contrôler le caractère hydrophile de cette partie de l'espace sans altérer la molécule biologique [103, 104].

III. 4. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons parlé de la chromatographie liquide comme une technique d'analyse chimique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange. Donc, nous avons expliqué le principe des différents types de cette technique les plus répandus, et spécialement la chromatographie liquide des protéines. Aussi, nous avons étudié les paramètres qui conditionnent l'efficacité de la séparation d'une protéine en chromatographie d'affinité. Dans le chapitre suivant, nous allons effectuer la projection de cette étude sur le copolymère ST-DVB que nous utiliserons dans la préparation d'une phase stationnaire.

CHAPITRE IV

LES SUPPORTS CHROMATOGRAPHIQUES

IV. 1. DIVERSITE DES SUPPORTS

Une très grande variété de phases est disponible [105] ; elles sont généralement classées en fonction de la nature des interactions qu'elles développent avec l'analyte (polaires, hydrophobes, ioniques). Les supports les plus utilisés pour l'extraction de protéines sont décrits ci-après.

IV. 1. 1. Les supports hydrophobes

Les supports à polarité de phase inversée génèrent des interactions hydrophobes avec l'analyte. En effet, le support utilisé est le plus souvent une silice greffée par de longues chaînes carbonées (C18) ou un polymère organique hydrophobe. Ces phases sont particulièrement adaptées pour les échantillons aqueux, car l'eau présente une très faible force éluante sur ce type de support.

La SPE de partage inverse a montré des résultats prometteurs pour l'analyse de protéines dans des échantillons biologiques par spectrométrie de masse car le protocole s'est révélé simple, robuste et reproductible. Ainsi, des profils des petites protéines (30 kDa) après ultrafiltrations de sérums des patients atteints de cancer du sein ont pu être établis [106]. L'analyse de petites protéines ciblées dans du plasma a également été réalisée après extraction sur des supports C18 en plaques 96 puits [107, 108] ou des précolonnes C18 couplées en ligne à l'analyse par LC-MS [109, 110].

Comme précédemment mentionné, ces supports sont aussi utilisés afin de dessaler les échantillons peptidiques obtenus après digestion à la trypsine en vue d'une analyse par spectrométrie de masse. Pour cela, les peptides sont percolés sur ce type de support où ils sont retenus et les sels du tampon de digestion sont alors éliminés par simple percolation d'eau. Nous verrons de nombreux exemples dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

IV. 1. 2. Les supports échangeurs d'ions

En fonction des acides aminés présents dans la protéine et le pH du milieu, la charge globale de la protéine peut être nulle (au point isoélectrique de la protéine), positive ou négative. Si les protéines sont ionisées, le mécanisme de rétention sur un support solide peut être basé sur un mécanisme d'échange d'ions. Les supports d'extraction, comme les phases stationnaires utilisées en chromatographie d'échange d'ions, sont des silices ou des résines polymériques greffées par des groupements acides (acides carboxylique ou sulfonique) ou basiques (amine) qui

jouent respectivement le rôle d'échangeur de cations (SCX, «*sorbent cation exchange*») et d'anions (SAX, «*sorbent anion exchange*»). En adaptant le pH de la solution, les composés ionisés sont retenus sur le support activé par des groupements de charges opposées.

L'interaction est de type électrostatique et l'élution est réalisée en se plaçant à un pH pour lequel les analytes sont sous forme moléculaire. Pour des solutés ionisés quel que soit le pH, l'élution peut être réalisée par une solution de grande force ionique. L'échange d'ions a par exemple été utilisé comme méthode complémentaire à d'autres techniques de traitement d'échantillon pour l'extraction de protéines et l'établissement de profils protéiques du sérum humain [111] ou pour l'extraction de peptides issus de la digestion trypsique de la caséine [112].

Un autre type de support a récemment été exploité pour l'analyse de protéines basiques dans des échantillons biologiques : les nanotubes de carbones multi-parois [113]. Après oxydation par de l'acide nitrique, ces nanotubes présentent des charges négatives. Ce support, une fois conditionné en micro-colonne, a servi de support d'extraction en ligne de protéines basiques comme le cytochrome *c* (pI = 10) et l'hémoglobine (pI = 7) qui présentent des charges positives au pH de travail, c'est-à-dire 5-6. L'élution séquentielle de ces deux protéines a été effectuée en variant la solution éluante.

De plus, l'application de ces supports pour l'extraction de protéines dans des milieux biologiques a été montrée sur l'hémoglobine dans le sang humain. En particulier, l'albumine est négativement chargée à pH = 6 et n'est donc pas retenue sur ce support d'extraction.

IV. 1. 3. Les supports polaires

Les phases polaires (silice vierge ou greffée par des groupements polaires) sont donc, généralement dédiées à l'extraction de molécules présentes dans des milieux peu polaires et l'élution est effectuée en augmentant la polarité de la phase mobile. Ces phases sont donc peu utilisées pour l'analyse de fluides biologiques.

Une alternative à l'extraction de composés polaires est la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC, «*Hydrophilic Interaction Chromatography*»).

Il s'agit d'une technique de séparation où la phase stationnaire est hydrophile et la phase mobile est hydro-organique, c'est-à-dire constituée en majorité d'un solvant peu polaire comme l'acétonitrile et d'un faible pourcentage d'eau qui constitue alors le solvant de forte force éluante. Les composés à analyser se partagent entre la phase mobile et une fine couche enrichie en eau qui est partiellement immobilisée à la surface de la phase stationnaire. Cette technique a été utilisée en protéomique clinique pour l'extraction de protéines glycosylées [114] et de peptides glycosylés [114,115] dans le plasma. En effet, le glycoprotéome est largement étudié

en protéomique clinique puisque des glycosylations anormales de protéines semblent être associées à des maladies comme le cancer. Toutefois, cette approche se limite à des composés supportant de fortes teneurs en solvant.

IV. 1. 4. Les phases à accès restreint

Les phases à accès restreint ou RAM (*Restricted Access Materials*) permettent d'éliminer les protéines de haute masse moléculaire pour l'analyse de peptides. En effet, de nos jours, un grand intérêt est porté à l'analyse du peptidome dans les fluides biologiques en raison de son grand potentiel pour le diagnostic clinique [116]. Les RAM combinent un mécanisme d'exclusion stérique permettant d'éliminer des protéines de masses moléculaires élevées et un mécanisme de partage permettant la rétention des petites molécules.

Des RAM fonctionnalisées à la surface interne des pores avec des groupements échangeurs de cations ont été appliqués pour l'extraction de peptides ou de petites protéines [117-120], mais peu d'études portent sur ces supports pour ce domaine d'application.

IV. 1. 5. Les supports d'affinité

D'une façon générale, les supports cités ci-dessus constituent un gain en sélectivité. Toutefois, la co-extraction de composés interférents de nature proche des analytes d'intérêt peut atténuer voire masquer le signal du soluté recherché à l'état de trace. C'est pourquoi des procédures d'extraction beaucoup plus spécifiques sont nécessaires pour l'analyse de protéines ciblées. Ces techniques mettent en jeu des supports d'affinité utilisant des molécules biologiques.

La chromatographie d'affinité est une technique qui sépare les molécules sur la base de leur fonction biologique ou de leur structure chimique. Les ligands immobilisés sur les supports d'affinité ont une affinité spécifique pour la biomolécule d'intérêt [121]. Il existe plusieurs types de ligands disponibles : synthétiques (analogues de l'acide boronique), biologiques (fragments d'ADN), des nucléotides (ATP, GTP), des coenzymes, des vitamines, des lectines, des anticorps... Citons en particulier les supports d'affinité sur métal chélaté (IMAC) où un atome métallique est immobilisé sur un support solide. L'adsorption des protéines est basée sur la coordination entre ce métal et un groupement à la surface de la protéine.

Les IMAC sont beaucoup utilisés pour l'adsorption des protéines et des peptides phosphorylés par une interaction entre les groupements phosphates chargés négativement et l'ion chélaté immobilisé sur le support. Le support est constitué d'un complexe entre un ligand (acide nitrilotriacétique ou acide iminodiacétique) et un cation ou atome métallique comme les ions ferriques (Fe^{3+}) ou gallium (Ga^{3+}) [122,123]. Des ions zirconium peuvent aussi être utilisés

et permettent d'obtenir des phases plus sélectives pour les phosphopeptides [124]. Par ailleurs, les glycoprotéines sont bien retenues par affinité sur des supports de lectines immobilisées [114].

Des supports d'affinité à base d'anticorps sont aussi fréquemment utilisés pour l'analyse de protéines. Le mécanisme de rétention repose sur la reconnaissance moléculaire provenant de la complémentarité spatiale et fonctionnelle du site de reconnaissance de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène. La forte interaction antigène-anticorps a souvent été appliquée pour l'enrichissement de protéines spécifiques ou pour la déplétion de protéines interférentes dans les échantillons biologiques complexes.

En effet, l'analyse de protéines faiblement abondantes dans un milieu tel que le plasma est gênée par l'abondance des protéines majoritaires. Afin de simplifier la complexité de l'échantillon plasmatique ou sérique, il est donc possible d'éliminer ces protéines majoritaires.

Pour cela, il existe des colonnes commerciales remplies de phase stationnaire sur laquelle sont greffés des anticorps spécifiques des protéines majoritaires du plasma. Cette technique est appelée immunodéplétion [125]. Bio-Rad commercialise une colonne (Bio-Rad Aurum Serum Protein) éliminant l'albumine et les IgG qui sont les deux classes de protéines les plus abondantes du plasma et représentées respectivement à 45 mg.mL^{-1} et 10 mg.mL^{-1} de plasma. La colonne MARS (« *Multiple Affinity Removal System* ») commercialisée par *Agilent Technologies*, permet la déplétion des 6 protéines les plus abondantes du plasma : l'albumine, la transferrine, les IgG, les IgA, l'antitrypsine et les haptoglobulines ou celle de 14 protéines majoritaires (colonne MARS Human 14, Agilent). Sigma-Aldrich commercialise une colonne (ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion) éliminant les vingt protéines les plus abondantes du plasma, ce qui correspond à 97 % de la totalité des protéines plasmatiques.

Bien que cette stratégie soit efficace, ces colonnes sont extrêmement coûteuses, de l'ordre de 3 500 euros pour les colonnes MARS Human 14. De plus, des protéines minoritaires peuvent être retenues sur le support par des interactions non spécifiques [126]. Elles peuvent aussi être liées à des protéines abondantes du plasma comme l'albumine et sont alors éliminées lors de la déplétion [127,128]. Aucune étude n'a montré de façon quantitative la proportion de protéines non spécifiquement liées sur les protéines majoritaires ou sur le support des colonnes de déplétion.

Une autre technique appelée Equalizer™ [129] va permettre de réduire les différences d'abondance entre les protéines. Cette technique comprend des billes poreuses immobilisées par une vaste librairie de ligands différents. Ainsi, dans un mélange complexe, les protéines complémentaires de ces ligands vont se combiner à ces derniers. Si la diversité de la librairie est

assez grande, il est théoriquement possible d'avoir un ligand pour chaque protéine d'un mélange complexe, ce qui permet que chaque protéine soit adsorbée.

Quand un échantillon comme du sérum est exposé à de tels ligands, les protéines abondantes satureront rapidement leurs ligands complémentaires et la majorité de ces protéines n'est pas retenue. Par contre, une protéine peu abondante ne saturera pas ses ligands et la majorité de cette protéine sera liée aux billes. Après lavage des protéines non retenues ou très faiblement retenues, les protéines retenues sur les billes sont éluées. Il en résulte un échantillon possédant toutes les protéines qui étaient présentes dans l'échantillon initial avec une gamme dynamique beaucoup plus restreinte.

L'inconvénient majeur de cette technologie est qu'après avoir égalisé les concentrations protéiques, il n'est plus possible de faire des comparaisons quantitatives de niveau d'expression des protéines entre deux états comme par exemple ceux d'un patient selon qu'il soit malade ou sain.

IV. 1. 6. CONCLUSION

L'analyse d'une protéine ciblée fait appel aux techniques analytiques issues de la protéomique. En effet, que l'objectif soit une analyse quasi exhaustive des protéines d'un échantillon (analyse protéomique) ou l'analyse d'une seule protéine, la résolution apportée par les méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase liquide et la spécificité apportée par la spectrométrie de masse permettent l'identification de la protéine. L'usage de la chromatographie en phase liquide pour l'analyse des protéines a considérablement évolué ces dernières années grâce aux sources d'ionisation à pression atmosphérique. De plus, la miniaturisation de la LC qui est actuellement en plein essor, permet un gain en sensibilité considérable. Ces techniques font aussi appel à une étape de digestion enzymatique afin de fragmenter la protéine d'intérêt en peptides qui seront séparés et analysés par spectrométrie de masse. L'intérêt de l'immobilisation des enzymes pour la mise au point d'une analyse automatisable a été abordé et fera l'objet du chapitre V.

Par ailleurs, on a vu que l'analyse de protéines dans des échantillons réels était un véritable challenge. En effet, les échantillons biologiques sont très complexes et les interférents peuvent gêner voire masquer la détection du composé cible. Des techniques de traitement d'échantillon en SPE ont été décrites, mais l'analyse d'une protéine ciblée nécessite des approches beaucoup plus ciblées d'extraction de protéines afin d'éliminer la plupart des composés interférents gênant l'identification du composé d'intérêt. Le développement de supports sélectifs pour l'analyse de protéines ciblées fera aussi l'objet du chapitre suivant.

IV. 2. LES SUPPORTS DE COPOLYMERES STYRENE-VINYLBENZENE

IV. 2. 1. SYNTHÈSE DES COPOLYMERES ST-DVB [130, 131]:

Le polystyrène réticulé est un copolymère vinylique, il est fabriqué par polymérisation entre styrène et divinylbenzène (DVB), selon la figure suivante :

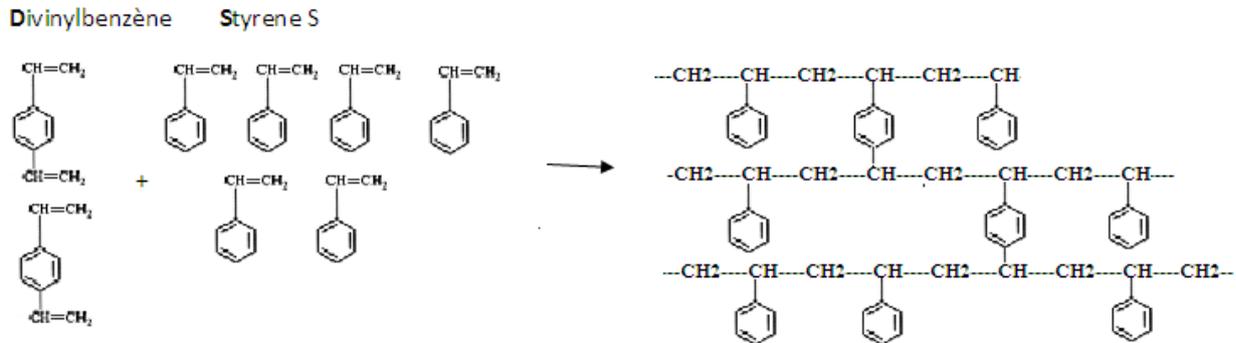


Figure IV. 12 : Structure du Copolymère Styrène-DVB.

La polymérisation du styrène peut s'effectuer suivant quatre méthodes:

IV. 2. 1. 1. Procédé en masse [132-134]:

Les procédés discontinus et les procédés continus sont également possibles, mais dans les procédés discontinus, l'élimination de la chaleur dégagée par la réaction et le contrôle de la température sont difficiles. Les poids moléculaires moyens sont généralement peu élevés et la répartition du poids moléculaire est large. L'élimination du styrène monomère, qui est nécessaire pour l'obtention des polystyrènes d'une grande thermoplasticité, est aussi difficile.

Les procédés continus reposent sur la pré-polymérisation par charges dans des chaudières en acier inoxydable ou en aluminium, à 85 C°. Lorsque la polymérisation est réalisée à environ 35%, la solution visqueuse de polystyrène dans le styrène monomère est coulée dans une colonne dont le gradient de température est de 100 à 200 C°, le polymère fondu est récupéré au fond de la colonne, puis extrudé et granulé. On utilise normalement la chaleur comme seul catalyseur, et l'absence de résidus catalytiques permet d'obtenir un produit final doté de bonnes propriétés électriques.

IV. 2. 1. 2. Procédé en solution [133]:

Le monomère de styrène est dissous dans un solvant inerte tel que le benzène ou la cyclohexanone. Les solutions ainsi obtenues sont difficiles à agiter en raison de leur grande viscosité et les problèmes de transfert de chaleur existent ici encore, bien que ce soit à un moindre

degré. L'élimination des traces de solvant est difficile et coûteuse et les polymères obtenus sont en pratique souvent utilisés sous forme de solutions pour les applications telles que les produits d'enduction et les produits d'imprégnation.

IV. 2. 1. 3. Procédé émulsion [134]

Le monomère est mélangé à l'eau, à un catalyseur soluble dans l'eau et à un agent émulsionnant tel que l'oléate de sodium à 5%. On ajoute également des tampons, car ce procédé dépend beaucoup pour sa réussite de la valeur du pH. Les problèmes de transfert de chaleur sont négligeables, étant donné que la phase aqueuse joue un grand rôle dans la dispersion de la chaleur. Après précipitation, le produit est lavé pour éliminer les agents émulsionnants mais il subsiste normalement une certaine quantité d'impuretés. Cette méthode donne des produits dont les poids moléculaires sont les plus élevés, mais leur clarté et leur couleur sont quelque peu moins bonnes que celles des produits obtenus par polymérisation en masse.

IV. 2. 1. 4. Procédé en suspension [133-137]

Le monomère de styrène est mis en suspension dans l'eau, en présence d'un catalyseur soluble dans du styrène (tel que le peroxyde de benzoyle) et d'un stabilisateur. Lorsqu'on agite le mélange, le styrène se divise en fines gouttelettes contenant chacune un peu de catalyseur, ainsi ce procédé est apparenté au procédé "en masse" sans présenter la difficulté du contrôle de la température de réaction. Le produit est obtenu sous forme de petits granules qu'on peut facilement laver et sécher.

Dans tous les procédés exposés ci-dessus, on a travaillé avec le dernier procédé, la présence de divinylbenzène doit être évitée. Ce corps a une fonctionnalité de quatre et peut ainsi former une résine thermodurcissable par liaison latérale. L'existence d'environ 1% de divinylbenzène dans le styrène monomère provoquera la formation d'une couche dure imperméable aux solvants, tandis qu'une quantité même de l'ordre de 0.003% a un effet sensible sur les propriétés du polystyrène obtenu et provoque le phénomène appelé "crazing" (craquelure).

Le divinylbenzène offre toutefois de nombreuses possibilités s'il est bien utilisé. Utilisé en petites quantités (environ 0,5%), il donne des caoutchoucs butadiène/styrène plus faciles à traiter. Par ailleurs les polymères en perles de styrène et de divinyl benzène obtenus par pontage sont très utilisés pour la préparation des résines échangeuses d'ions. On fait réagir les polymères obtenus sur des agents de sulfonation pour obtenir des acides polysulfoniques aromatiques insolubles et solides. Le divinyl benzène a été également copolymérisé avec les polyesters non

saturés pour donner des produits d'une grande importance dans le domaine des enduits et des adhésifs.

IV. 2. 2. MATRICES ST-DVB [138, 139].

Le ST-DVB est un gel présenté sous forme de billes qui possède toutes les qualités exigibles d'une matrice destinée à immobiliser des molécules biologiquement actives. Les groupes benzéniques (C_6H_6) situés sur les chaînes de PS peuvent être aisément utilisés pour fixer par covalence un ligand et c'est la matrice la plus appréciée et la plus largement utilisée.

La forme des billes confère au gel des propriétés d'écoulement parfaites avec une canalisation minimale dans le lit qui assure des séparations rapides. Les adsorbants ayant pour matrice le copolymère ST-DVB sont stables dans les conditions expérimentales très diverses telles qu'un pH élevé ou bas, la présence de détergents et/ou d'agents dissociants tels que le chlorhydrate de guanidine, ou dans les conditions qui nécessitent l'emploi de solvants organiques et des températures élevées.

Cependant les matrices trop réticulées sont moins abondamment substituées et possèdent une capacité plus faible car la réticulation réduit le nombre de sites disponibles pour la fixation du ligand.

La plus importante des applications que peuvent avoir ces résines en biochimie, est la séparation des mélanges par chromatographie sur colonne, à des fins analytiques ou préparatives. Ainsi, elles sont utilisées pour la séparation des polypeptides, des protéines, des hormones, des enzymes et aussi pour leur concentration [140-45].

Chapitre V (partie expérimentale)

SYNTHESE ET CARACTERISATION DES RESINES

V. 1. Introduction

L'objectif principal que nous voulons atteindre à travers ce travail consiste donc à préparer et sélectionner un support pour la chromatographie en phase liquide. Ce support doit répondre à un ensemble de critères chromatographiques, chimiques et physico-chimiques afin d'éviter certains problèmes inhérents aux supports chromatographiques naturels tels que l'agarose en particulier.

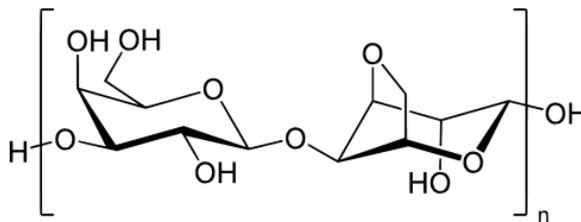


Figure IV. 13 : Structure du l'agarose

En effet l'agarose, le sépharose....., polymères naturels, présentent de très sérieux inconvénients.

- ♦ Caractère aléatoire de la qualité de ce produit.
- ♦ Biodégradabilité facile par les bactéries et certaines enzymes.
- ♦ Instabilité à la chaleur, au froid ($T < 0^{\circ}\text{C}$), aux agents dissociants et aux détergents.
- ♦ Présence de sites d'adsorption non spécifiques vis-à-vis de macromolécules biologiques
- ♦ Très faible résistance à la pression dans les colonnes de chromatographie, ce qui limite leur utilisation au niveau préparatif et industriel.

Ces inconvénients étant ainsi répertoriés, il est possible de définir les caractéristiques du support que nous recherchons.

- ♦ Matériau macromoléculaire réticulé synthétique, de structure chimique aussi bien définie que possible.
- ♦ Fabrication aisée et reproductible.
- ♦ Présentation sous forme de sphères d'une taille moyenne de 200 à 400 μm .
- ♦ Matériau hydrophile, non biodégradable, résistant à des pressions de plusieurs bars et à la chaleur, aux solvants, aux détergents et aux agents dissociants.
- ♦ Bonnes performances chromatographiques.
- ♦ Faible prix de revient.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'interagir spécifiquement avec la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa purification.

La synthèse ayant conduit à l'obtention de polymères dérivés du polystyrène réticulé, doté d'excellentes propriétés mécaniques, chimiques,...etc., pouvant être utilisés comme phases stationnaires en chromatographie d'affinité au stade analytique.

Parallèlement à cela l'étude doit contribuer à élucider le mécanisme régissant les interactions entre la HSA et la surface du polymère.

Pour chaque étape, nous avons étudié l'influence de certains paramètres afin de mettre en évidence leur rôle et de les optimiser dans le but de préparer des résines ayant des propriétés déterminées.

V. 2. PREPARATION DES PHASES STATIONNAIRES

V. 2. 1. SYNTHÈSE D'UNE RESINE PS-PBC - préparation de l'adsorbant :

Dans cette étude nous avons utilisé le polystyrène comme matrice ou support inerte sur lequel nous avons immobilisé le violet de bromocrésol (PBC) (Figure V. 14).

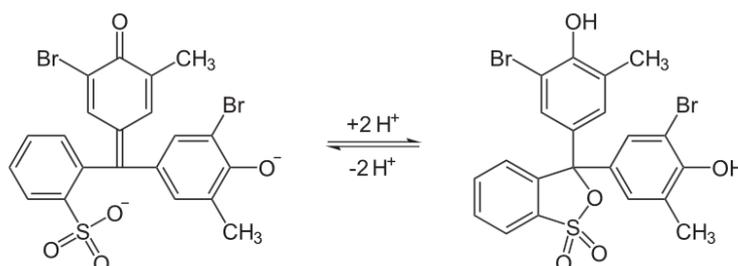


Figure V. 14 : Structure des deux formes du Pourpre de Bromocrésol (PBC).

Le polystyrène réticulé est un copolymère vinylique, il est synthétisé par polymérisation entre le styrène et le divinylbenzène (DVB), selon le schéma réactionnel de la figure IV. 13.

Nous avons choisi comme matériaux de départ le PS réticulé à 2% par le divinylbenzène. C'est un gel présenté sous forme de billes qui possède toutes les qualités exigibles d'une matrice destinée à immobiliser des molécules biologiquement actives. Les cycles benzéniques (C_6H_6) situés sur les chaînes de PS peuvent être aisément utilisés pour fixer par covalence un ligand. La forme des billes confère au gel des propriétés d'écoulement parfaites avec une canalisation minimale dans le lit qui assure des séparations rapides.

Les adsorbants ayant pour matrice le copolymère ST-DVB sont stables dans les conditions expérimentales très diverses telles qu'un pH élevé ou bas, la présence de détergents et/ou d'agents dissociant tel que le chlorhydrate de guanidine, ou dans les conditions qui nécessitent l'emploi de solvants organiques et des températures élevées [146].

Au préalable la réaction d'amination du polystyrène réticulé est effectuée par nitration avec un mélange H_2SO_4/HNO_3 concentrés. D'une façon générale, la réaction avec l'acide est facile et permet d'obtenir des supports ayant de bonnes caractéristiques. La nitration des supports ST-DVB est une étape très importante dans la synthèse des résines fonctionnelles. Cette réaction consiste à greffer des groupements nitro ($-NO_2$) fortement électroattracteurs sur les noyaux aromatiques des chaînes de polystyrène. Le produit nitré (PS- NO_2) obtenu subit une réaction d'hydrolyse qui conduit à un polystyrène aminé résultant de la réduction de l'attaque des groupements NO_2 par l'acide chlorhydrique dans un mélange de (CH_3COOH/HCl), à $60^\circ C$ en présence de $SnCl_2$ comme catalyseur (Figure V.15).

Le couplage du PBC sur le polystyrène aminé est réalisé par une simple réaction de substitution des groupements NH_2 [147]. Les différentes étapes de ce processus sont résumées dans le schéma réactionnel suivant :

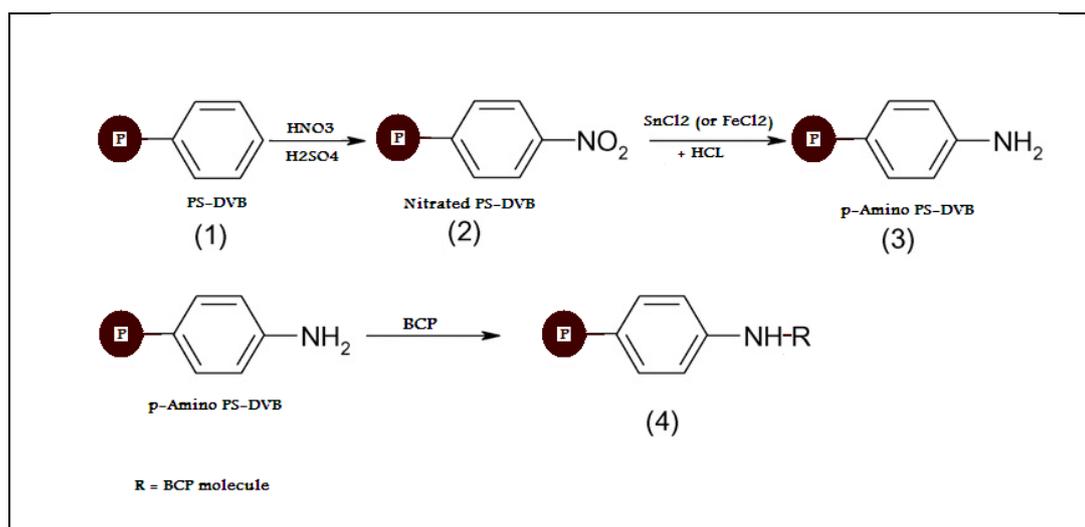


Figure V. 15 : Immobilisation du colorant sur le polystyrène.

L'objectif de cette partie du travail consistait donc à réaliser un support, dont la structure chimique finale est représentée par la figure V. 21, susceptible d'être utilisé en chromatographie sur colonne permettant l'adsorption de la HSA.

V. 2.1. 1. Fonctionnalisation des copolymères ST-DVB

1. Activation des billes de PS :

Dans cette partie nous avons procédé à la réaction d'amination du polystyrène réticulé, pour obtenir une résine fonctionnalisée permettant la fixation d'un ligand, il s'agit de la molécule du colorant (violet de bromocrésol). Une nitration du polystyrène est effectuée en optimisant le temps et la température de la réaction. Le produit nitré (PS-NH₂) obtenu subit une réaction de réduction des groupes NO₂ en une nouvelle fonction NH₂, par l'acide chlorhydrique dans un mélange de (CH₃COOH/HCl) en présence de SnCl₂ ou FeCl₂. Le produit résultant est un polystyrène aminé. Enfin, on fixe le ligand (colorant) sur le support aminé (PS-NH₂), afin d'obtenir une résine 'dye-like'.

▪ Méthode de fonctionnalisation des copolymères ST-DVB

Cette synthèse comporte plusieurs étapes :

- En première étape, l'acide nitrique réagit avec le polystyrène réticulé pour donner une réaction de nitration classique [148-150], conduisant au poly(nitro-styrène) (PS-NO₂). La réaction est effectuée dans l'acide acétique comme le montre la figure V-15. Elle consiste à faire réagir l'acide nitrique en présence d'acide sulfurique sur des billes de polystyrène préalablement lavées et gonflées dans l'acide acétique. Il est nécessaire d'opérer avec un excès d'acide. Il faut noter que les pourcentages de substitution des unités monomères en fonction (-NO₂) sont compris entre **60 et 65%**.

- La deuxième étape est une réduction du poly(nitro-styrène) (PS-NO₂), la réaction est conduite dans un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide acétique à la température de 60°C en présence des catalyseurs SnCl₂ et FeCl₂, respectivement.

Par cette méthode les groupements amines se forment avec plus de **45%** de taux conversion. La réaction, effectuée, en présence de SnCl₂, conduit à des résines ayant des taux plus élevés en groupements amines. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3 de l'annexe 4.

D'une façon générale, les réactions sont faciles et permettent d'obtenir des supports ayant de bonnes caractéristiques. Les conditions de synthèse de ces résines (PS-NO₂ et PS-NH₂) sont résumées dans l'annexe 1.

▪ Nitration des copolymères ST-DVB

Une attention particulière est donnée à l'application des dérivés nitrés des copolymères ST-DVB, de nos jours ces supports sont des intermédiaires réactifs très utilisés en synthèse organique pour la préparation de nombreux polymères fonctionnels et de réactifs supportés.

L'importance ces dérivés est bien illustrée par le nombre élevé de supports auxquels ils peuvent donner naissance. Plusieurs travaux ont été consacrés à ces matériaux [150-152].

La nitration des supports ST-DVB est une étape très importante dans la synthèse des résines fonctionnelles. Cette réaction consiste à fixer des groupements nitro (-NO₂) fortement électronégatifs et électrodonneurs sur les noyaux aromatiques des chaînes de polystyrène, mais elle présente l'inconvénient d'être accompagnée de réactions secondaires.

L'objectif de cette partie du travail consiste en la réalisation de polymères fonctionnels susceptibles d'être utilisés comme résines intermédiaires dans la préparation des supports « dye-like ».

Nous avons choisi comme matériaux de départ le PS réticulé à 2% de divinylbenzene. Ce choix est conditionné par plusieurs considérations :

- * la modification chimique du PS est relativement aisée en raison de la réactivité facile des substitutions électrophiles du noyau aromatique du styrène monomère et de la remarquable stabilité des chaînes du polymère.
- * les propriétés mécaniques des résines dérivées de ce polymère tridimensionnel sont excellentes et le rendent tout à fait apte à un usage en tant que phase stationnaire.
- * le copolymère de départ (ST-DVB) se présente sous la forme de particules sphériques de diamètre compris entre 200-400 µm à l'état sec, c'est à partir de celui-ci que toutes les synthèses ont été réalisées.

Nous avons donc effectué la substitution chimique sur le noyau benzénique du polystyrène. La réaction d'amination du PS réalisée à des taux de substitution variables, a été obtenue à partir des polymères préalablement gonflés dans de l'acide acétique (CH₃COOH).

▪ Réaction de nitration du copolymère ST-DVB

La réaction de nitration du benzène peut être effectuée même à température ambiante en utilisant HNO₃ (98%) ou le mélange HNO₃/H₂SO₄ et conduit au mononitrobenzène. La réaction de nitration des noyaux aromatiques des copolymères ST-DVB est une réaction de substitution électrophile, l'agent électrophile formé dans cette réaction est NO₂⁺, il a été mis en évidence par spectrographie infrarouge. En général on utilise pour sa formation le mélange d'acide sulfurique et nitrique concentrés :



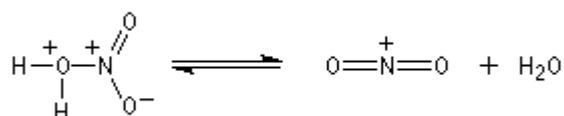
La réaction de nitration est une réaction instantanée et très exothermique, si la température s'élève anormalement, en particulier, si on coule trop rapidement le produit ou si l'agitation n'est pas assez rapide ou si la réfrigération est insuffisante, il peut y avoir explosion, les produits polynitrés sont des explosifs. La conduite d'une nitration demande donc des soins particuliers, si l'on veut éviter des accidents très graves.

■ **Mécanisme [150].**

Il s'agit d'une réaction qui se passe en plusieurs stades :

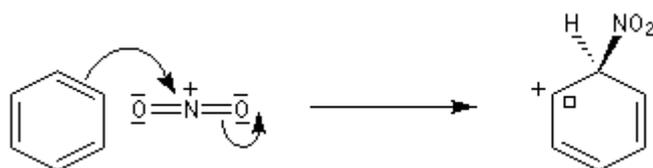
Premier stade : Formation de l'électrophile.

L'acide sulfurique joue un double rôle. C'est un réactif protogène qu'améliore le caractère nucléofuge du groupement (-OH) de l'acide nitrique en le protonant.



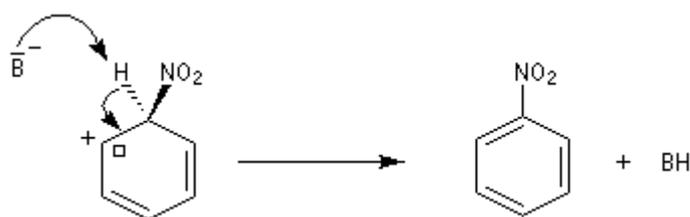
Le véritable réactif électrophile est le cation nitronium NO_2^+ . On dispose de plusieurs preuves de l'existence de cet ion comme agent nitrant. L'une d'elles est le fait qu'on peut utiliser comme réactif de nitration, le mélange : $\text{NO}_2\text{BF}_4/\text{BF}_3$. Le chimiste américain d'origine hongroise George A. Olah a aussi montré le rôle de l'hexafluoroplatinate de nitronium $\text{NO}_2^+\text{PF}_6^-$ qui apporte directement le cation nitronium NO_2^+ . Avec le benzène, en milieu homogène (solvant CH_3NO_2), cette étape est cinétiquement déterminante, G. Olah a obtenu le prix Nobel en 1994.

Deuxième stade : formation de l'intermédiaire de Wheland.



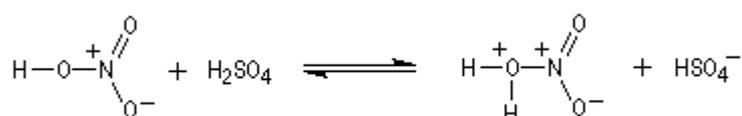
Troisième stade : restauration de l'aromaticité.

L'absence d'effet isotopique primaire, montre que l'arrachage de l'atome d'hydrogène par la base n'a pas lieu dans l'étape cinétiquement déterminante. B^- symbolise une base du milieu réactionnel HSO_4^- ou NO_3^- .



Comme nous le verrons plus loin, le groupe ($-\text{NO}_2$) est fortement désactivant et les dérivés nitrés réagissent beaucoup moins vite que le benzène.

L'image ci-dessus représente le cation NO_2^+ . Conformément aux prévisions de la méthode VSEPR, cet ion est linéaire. Sa présence dans les réactifs nitrants a été montrée de plusieurs manières : La réaction entre H_2SO_4 et HNO_3 fournit NO_2^+ comme l'atteste l'étude de **Gillespie, Hughes & Ingold (1950)**, NO_2^+ a été détecté directement par spectroscopie Raman.



C'est aussi un déshydratant énergétique qui permet le déplacement de l'équilibre de formation de l'électrophile en captant l'eau formée.

La nitration d'un hydrocarbure benzénique de la forme Ar-R s'effectue principalement sur les positions «ortho» et «para» du cycle, et la proportion dans laquelle s'obtient les deux isomères dépend fortement de la grosseur R, qui encombre plus ou moins l'approche de la position ortho.

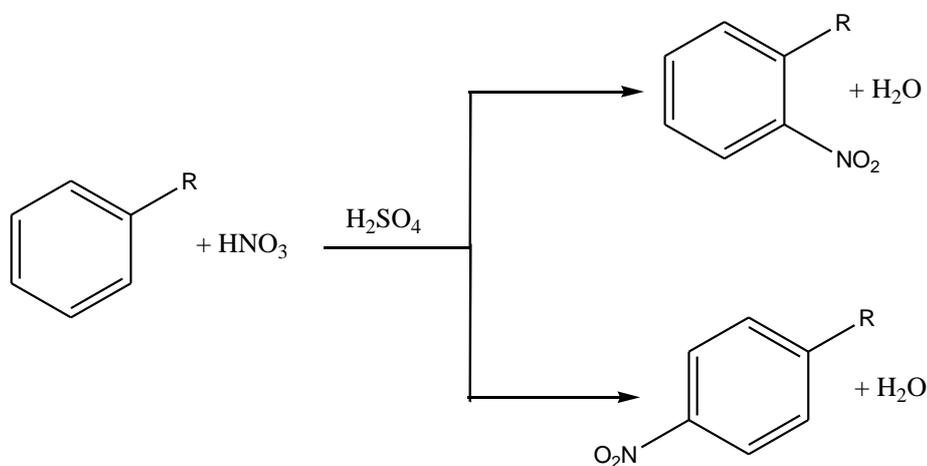


Figure V. 16 : Mécanisme de la réaction de nitration.

2. Optimisation des paramètres réactionnels.

Il est connu que la réaction de nitration du benzène se fait à température comprise entre 50 et 55°C, pendant environ une heure, mais les noyaux benzéniques existant sur les chaînes de PS sont liés à d'autres molécules similaires de styrène constituant les unités répétitives, donc il y a des encombrements stériques. A cause de la réticulation (présence de DVB et de ses dérivés), il a fallu effectuer des changements des conditions de la réaction à savoir la température et le temps de réaction, afin d'optimiser le taux de substitution, soit le taux de nitration.

Les figures suivantes illustrent les valeurs optimales de la température et du temps :

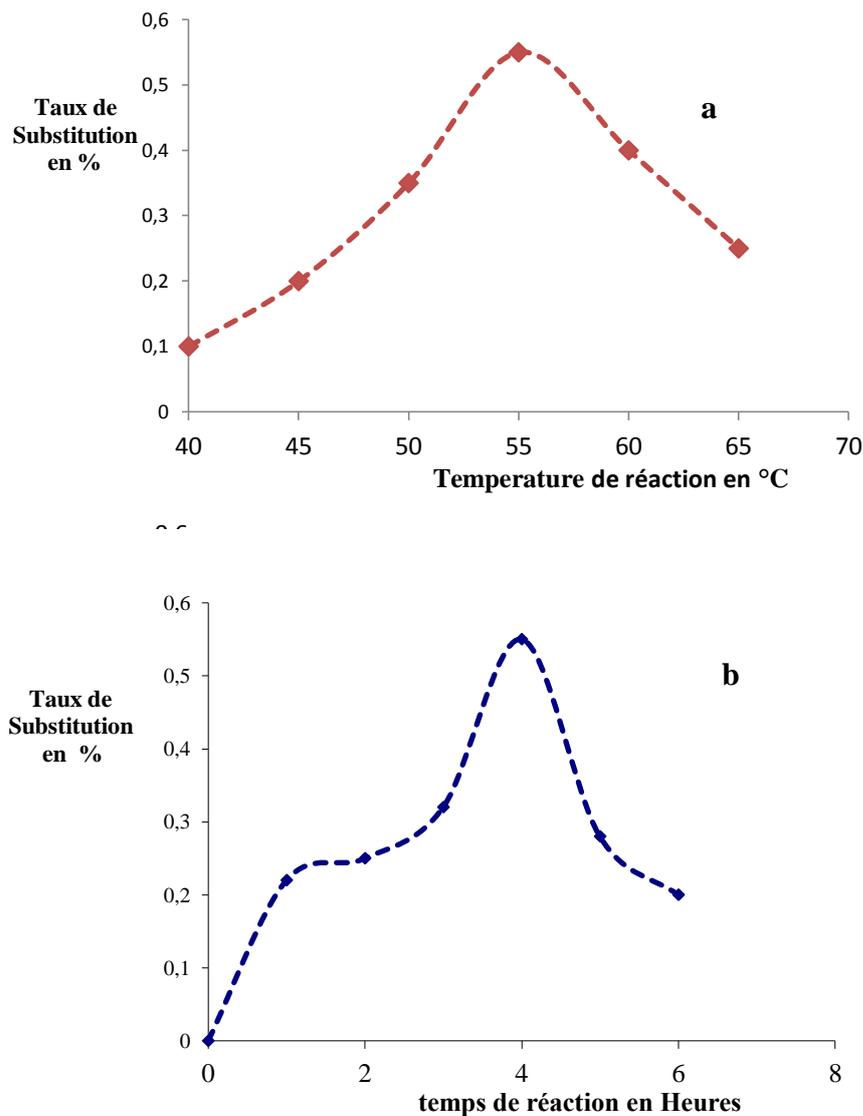


Figure V. 17 : Effets des conditions de la réaction de nitration des microsphères de polystyrène : a) Effet de la température de réaction, b) cinétique de nitration.

3. Réduction du Polynitrostyrène réticulé (PS-NO₂-DVB)

La deuxième partie de cette étape est réservée à une méthode de fonctionnalisation, par conversion des groupements nitro en groupements amines. Le but de cette méthode est d'obtenir un groupe réactif susceptible d'interagir avec la molécule de colorant. Pour atteindre cet objectif, une méthode en deux procédures différentes utilisant deux catalyseurs différents le **SnCl₂** et le **FeCl₂**, a été adoptée.

On dispose d'excellents procédés pour préparer des amines primaires par réduction de composés azotés. On peut obtenir les amines par hydrogénation ou par réduction, des composés non substitués. Dans l'industrie on utilise le fer (Fe) comme réducteur du fait de son coût moins élevé. La réduction électrochimique des dérivés aromatiques est également possible à la cathode d'un électrolyseur. La réduction des groupes Nitro en groupe Amino s'effectue en milieu acide, le réactif le plus utilisé est l'acide chlorhydrique en présence de chlorure d'étain. Un autre procédé est fourni par action du chlorure de fer (FeCl₂). Cette réaction n'est pas instantanée, elle évolue lentement et il y a formation progressive des groupes NH₂. C'est le changement de l'absorbance de ces groupes que nous allons exploiter pour étudier la cinétique de la réaction par une méthode spectroscopique.

Les dérivés nitro aromatiques constitue une voie d'accès intéressante aux amines aromatiques par réduction du groupe NO₂. L'introduction directe d'un groupe NH₂ n'est en effet possible que sur des cycles fortement appauvris en électrons ou en utilisant des bases très fortes, il s'agit dans ce cas d'une réaction de substitution nucléophile aromatique S_NAr.

La réduction du dérivé nitro par un métal en milieu acide, conduit à un sel d'ammonium, après un traitement basique, on obtient le dérivé amino. La réaction est illustrée par la transformation nitrobenzène- aniline, par la figure V. 18

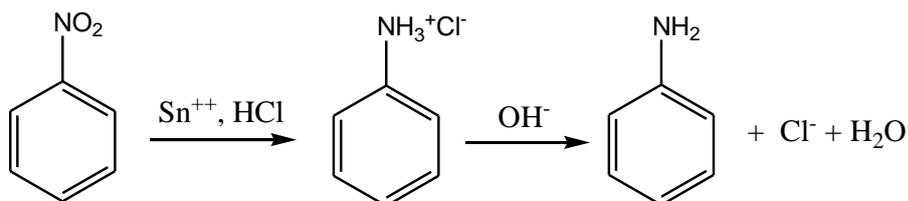


Figure V. 17 : Réaction d'amination du nitrobenzène

Toutefois, l'association de molécules d'amines primaires par liaison hydrogène est très importante, la solubilité dans l'eau est diminuée du fait de leur masse moléculaire élevée et conduit a une liaison forte de type : $\text{-N}\dots\text{H-O-H}$

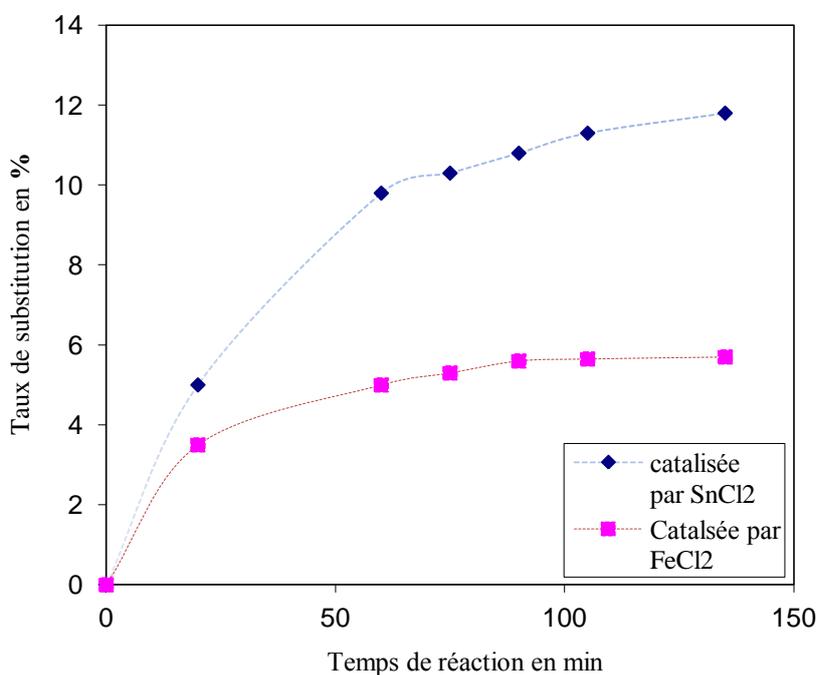


Figure V. 18 : Cinétique de la réaction de réduction du PSNO₂-DVB

La figure V.19 montre que la réaction de réduction se poursuit pour atteindre son maximum a un taux de conversion d'environ 6% avec le FeCl₂ et de 12% avec le SnCl₂.

L'examen de la courbe montre aussi que la réaction est interrompue après moins de 2 heures. La pente initiale de la vitesse de réaction, dans ce cas est $a = 0,175$ et $a' = 0,25$, donc une vitesse initiale obtenue avec le SnCl₂ 1,5 fois plus importante qu'avec le FeCl₂. Ce qui justifie le meilleur rendement obtenu avec SnCl₂.

V. 2.1. 2. REACTION DE FIXATION DE LA MOLECULE DE PBC

1. Préparation de la résine ‘fixation du ligand’

La synthèse de la résine se fait en deux étapes successives, d’abord la réaction de nitration du polystyrène réticulé qui aboutit au produit intermédiaire PS-NO₂ et réduction des groupes amino en groupe amine, puis fixation de la molécule de PBC sur sur l’intermédiaire (PS-NH₂-DVB) afin d’obtenir une résine fonctionnelle dont les taux de substitution sur les motifs monomères sont importants, aussi nous avons suivi la cinétique de la réaction (figure V16 et figure V18).

En fait, il a déjà été démontré au laboratoire que la cinétique de la fixation de la cystéine sur les résines PS-SO₂Cl, s’est révélée difficilement reproductible, car la réaction s’effectue en milieu hétérogène, composé de plusieurs phases peu compatibles, le polymère insoluble, le solvant organique et les réactifs hydrosolubles. Cette hétérogénéité n’a pas permis d’obtenir un taux de substitution satisfaisant.

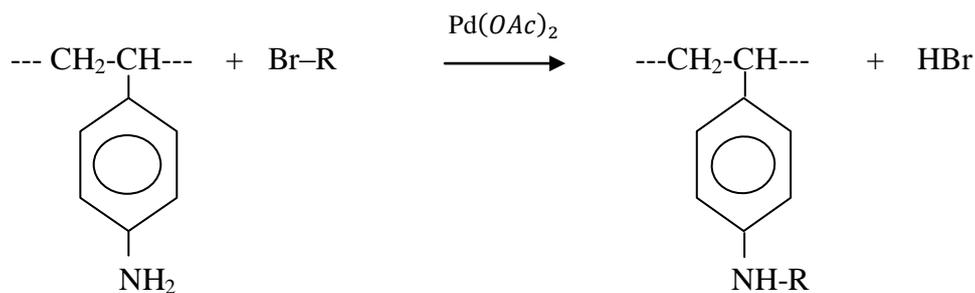
Pour essayer d’accélérer la réaction de substitution, un mélange eau/dioxane a été utilisé comme milieu réactionnel. Dans ces conditions, la cinétique de la fixation du colorant est représentée par la figure V. 22.

Il est évident que dans ce cas, la vitesse de la réaction est considérable et que, pour obtenir par exemple un taux de substitution de **2,4 meq** par gramme de résine, un temps de réaction de **2 heures** environ est nécessaire.

En outre, pour obtenir des résultats plus reproductibles, il est nécessaire de maîtriser les autres paramètres susceptibles d’influencer la réaction comme, par exemple, la quantité de résine à préparer et la vitesse d’agitation du milieu réactionnel.

2. Fixation de la molécule de colorant « PBC »

La fixation de la molécule de colorant ‘Pourpre de Bromocrésol’ fait intervenir la réaction du Br dans molécule PBC sur les groupes aminés du poly(para amine styrène) dans un mélange dioxane/eau (1/10, v/v) en présence de Pd(OAc)₂ comme catalyseur de réaction [152]. La réaction est effectuée en ajoutant progressivement une solution de soude, afin de neutraliser l’acide bromhydrique généré au cours de la réaction, ce qui nous permet de suivre la progression de la réaction.



Où **R** représente la molécule de **PBC** :

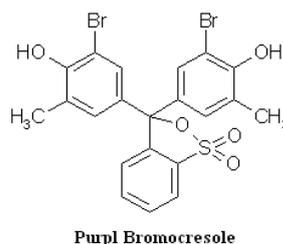


Figure V. 19 : Réaction de fixation de la molécule du colorant 'PBC' sur le PSNH₂.

Cependant, la présence d'une solution aqueuse de soude dans le milieu réactionnel entraîne en parallèle des réactions d'hydrolyse. Ces réactions, entre en compétition avec la fixation de la molécule du colorant 'PBC', conduisant finalement à une résine (PS-NH-PBC) qui contient à la fois des groupes aminés et des groupements de ligand selon la formule générale ci-dessous :

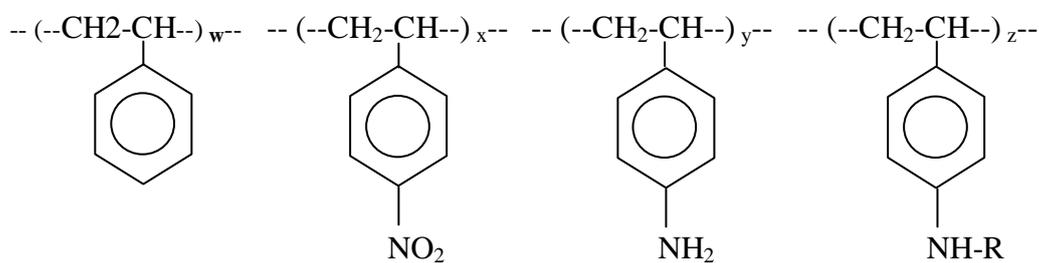


Figure V. 20 : Formule globale d'une résine mixte.

3. Cinétique de la réaction

En présence d'un mélange d'eau et de dioxane. Une synthèse a été faite en faisant varier le temps de réaction, la température étant fixe. La cinétique de la réaction de synthèse est représentée sur la figure V.21.

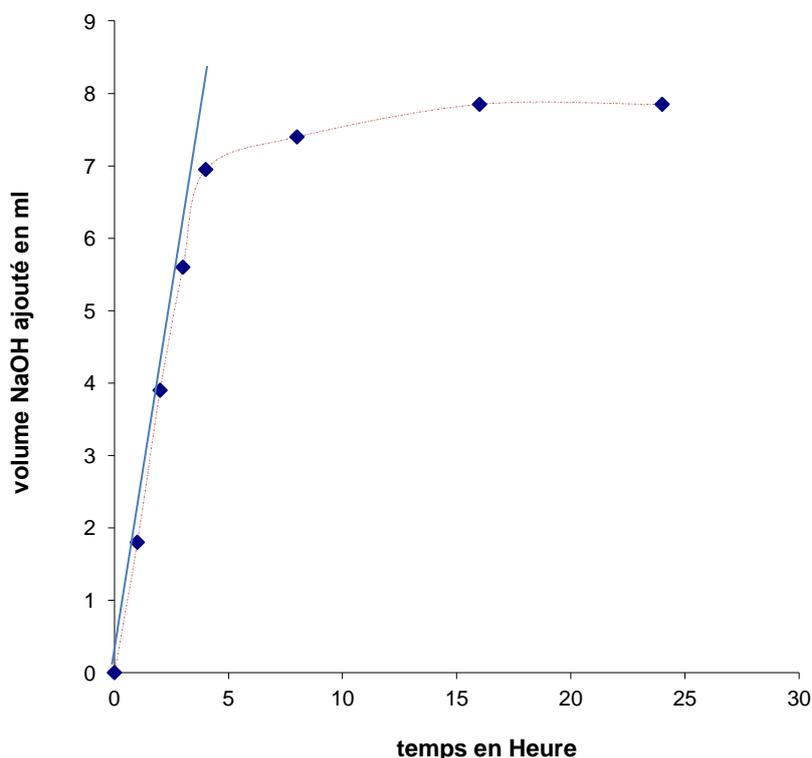


Figure V. 21 : Cinétique de la réaction de fixation du **PBC** sur le **PSNO₂**.

L'examen de la courbe de variation du volume de NaOH (ml) ajouté afin de maintenir le pH à sa valeur initiale en fonction du temps montre que la consommation de soude est interrompue après **2 heures environ**. La pente, dans ce cas est **a = 1,38**, ce qui correspond à une vitesse initiale de réaction d'environ **$0,9 \cdot 10^{-2}$ mol/h**.

La figure V.19 montre que la réaction de substitution par des molécules de colorant sur la résine, croit pour atteindre un plateau de saturation ; cette valeur représente le taux limite de substitution.

Il faut remarquer qu'à partir de cette cinétique, la production d'une résine dye-like a donné lieu à un taux de substitution en ligand modeste.

En effet, la résine ayant un taux de substitution en colorant PBC de **(2,4 meq/g)** a été obtenue pratiquement après 2 heures de temps de réaction lorsque le Pd(OAc)₂ est utilisé comme catalyseur [147].

Cependant la réactivité du système, est affaiblie par la difficulté de l'accessibilité des sites fonctionnels sur les particules.

Les groupes NH_2 et NO_2 peuvent aussi constituer un obstacle par l'effet non négligeable de l'encombrement stérique des substituants et ralentir ainsi l'accès des molécules de colorant plus volumineux. De même, les groupements parasites (qui se forment en cours et ralentissent fortement la réaction) confirment ainsi notre hypothèse (formation d'une résine mixte).

Cinétique de fixation du colorant (PBC):

Les résines étant insolubles, le dosage se fait en phase hétérogène. Le dosage des molécules d'acide HBr générées au cours de la réaction permet la quantification des groupements substitués dans la solution de colorant.

Le dosage des groupements **Colorant (PBC)** fixées sur la résine se fait par titration avec une solution de NaOH (0,1N), le suivi de la courbe de titration permet de déduire leur taux de substitution de la résine ainsi préparée, comme la montre la courbe de titration (figure V.22) portée ci-dessous. On notera que la résine contient également des groupes susceptibles de réagir en parallèle.

V. 2. 2. SYNTHÈSE D'UNE RESINE SULFONIQUE $\text{PS-SO}_3\text{H}$.

Cette partie est consacrée à l'étude de la réaction de sulfonation du copolymère ST/DVB par l'acide chlorosulfurique et consiste à introduire un groupement sulfonique sur le polystyrène. Il est nécessaire de comparer ce résultat (modele) avec ceux obtenus dans le cas des résines portant des molécules de colorant.

La synthèse d'une résine sulfonique se fait en deux étapes successives, d'abord chlorosulfonation du polystyrène réticulé, qui aboutit au produit intermédiaire $\text{PS.SO}_2\text{Cl}$, puis conversion des groupes sulfoniques SO_3H sur celle-ci par l'intermédiaire d'une réaction d'hydrolyse. Afin d'obtenir une résine bifonctionnelle dont les taux de substitution sur les motifs monomères, sont importants.

En fait, il a déjà été démontré au laboratoire que la cinétique de fixation de la cysteine sur les résines PSSO_2Cl , s'est révélée difficilement reproductible, car la réaction s'effectue en milieu hétérogène, composé de plusieurs phases peu compatibles, le polymère insoluble, le solvant organique et les réactifs hydrosolubles. Cette hétérogénéité n'a pas permis d'obtenir un taux de substitution satisfaisant. Pour essayer d'accélérer la réaction de substitution, un milieu basique a été utilisé comme milieu réactionnel.

V. 2. 2. 1. PREPARATION D'UN ADSORBANT DU POLY (STYRENE SULFONATES DE SODIUM)

Le gel adsorbant du poly(styrène chlorosulfonyl) sous forme de billes sphériques préparé par le procédé de polymérisation radicalaire en suspension dans l'eau, à l'aide de l'acide chlorosulfonique comme agent de sulfonation, comme décrit précédemment [153-154].

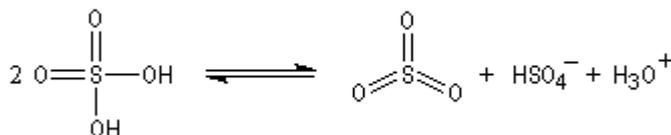
En bref, le travail consiste à chlorosulfoyer les particules du copolymère styrène-divinylbenzène, 98% / 2%, sous forme de billes sphériques, de 200 μ de diamètre, avec un excès d'acide chlorosulfonique dans le 1, 2-dichloroéthane. La réaction a été réalisée à 40 ° C pendant 4 heures sous agitation douce, enfin les particules chlorosulfonées sont filtrées, lavées et séchées.

Cette réaction est suivie d'une réaction de chloration, en traitant les billes obtenues à 105 °C pendant 2 heures avec un mélange d'agents de chloration $\text{PCl}_5/\text{POCl}_3$ (7,5 g de PCl_5) dissous dans 20 ml de POCl_3 afin d'obtenir sur le polystyrène une substitution en groupes chlorosulfonyl ($-\text{SO}_2\text{Cl}$) assez uniforme. Les particules ainsi chlorées ont été, de la même manière, filtrées, lavées et séchées. Enfin, une partie du gel homogène du copolymère du styrène-divinylbenzène chlorosulfonyl a été hydrolysée avec du NaOH 1M puis équilibrée avec une solution NaOH 10^{-2} M jusqu'à ce que l'équilibre de l'échange d'ions de sodium a été atteint. Le poly (styrène sulfonate de sodium) obtenu est séché sous vide à 50°C et conservé jusqu'à son utilisation comme adsorbant.

. Mécanisme de la réaction de sulfonation des copolymères St/DVB

La réaction de sulfonation des noyaux aromatiques des copolymères ST/DVB est une réaction de substitution électrophile et réalisable en deux étapes, la première étape est une réaction de sulfonation. Cette réaction n'est pas instantanée, elle évolue lentement et il y a formation des groupes SO_3H . Il s'agit d'une réaction par stades. On va se placer dans le cadre d'un contrôle cinétique de la réaction.

- Formation de l'électrophile : l'électrophile est le trioxyde de soufre SO_3 ou sa forme protonée HSO_3^+ . Nous allons raisonner avec SO_3 .



- On peut écrire plusieurs formes mésomères pour SO_3 : puisque O est plus électronégatif que S, les formes qui possèdent un atome de soufre déficient en électrons ont un poids statistique élevé.

La synthèse consiste à faire réagir l'acide sulfurique concentré sur des billes de polystyrène préalablement lavées et gonflées dans le dichloroéthane. Il est nécessaire d'opérer en excès d'acide sulfurique, la réaction passant par la formation d'un produit intermédiaire.

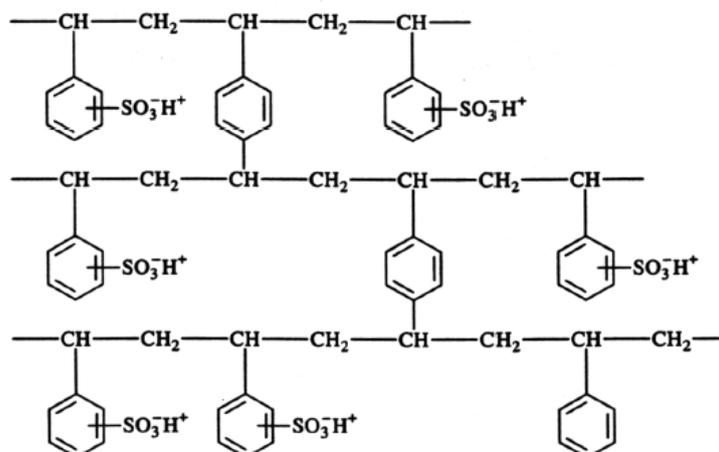


Figure V. 22 : Formule d'une résine PS-DVB sulfonique

V. 2. 3. CARACTERISATION ET CONDITIONNEMENT DES RESINES PREPAREES

La caractérisation des résines synthétisées a été effectuée à l'aide de trois méthodes d'analyse : dosage acidimétrique, spectroscopie infrarouge et microscope optique.

V. 2. 3. 1. Spectroscopie infrarouge

L'analyse spectroscopique infrarouge permet une identification rapide des fonctions présentes dans les différentes résines.

Les spectres IR sont obtenus au moyen d'un spectrophotomètre à faisceau, type FTIR-8300 Shimadzu, sur des pastilles d'environ 100 mg obtenues par compression d'une poudre du polymère dispersée à 5 % dans du KBr anhydre.

Malgré de très nombreuses bandes d'absorption (figure.V. 25) du polymère, on distingue cependant nettement les bandes caractéristiques des différentes substitutions réalisées, les fonctions suivantes sont ainsi observées, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$ et $-\text{NH-COL}$.

V. 2. 3. 2. Microscope optique

La taille et la qualité des grains de résine ont été contrôlées qualitativement à l'aide d'un microscope permettant des grossissements de 100 fois.

V. 2. 3. 3. Lavage des résines.

Avant de procéder à l'étude de leurs propriétés adsorbantes, les résines ont fait l'objet d'un protocole de conditionnement. Ceci est destiné, d'une part, à éliminer tout reliquat de produit de synthèse susceptible d'interagir avec la protéine à séparer et d'autre part, à équilibrer les résines à un pH compatible avec le milieu plasmatique.

Ainsi les résines sont lavées avec des solutions aqueuses 1,5 M en chlorure de sodium puis 1M en citrate trisodique, et enfin à l'eau.

Les résines sont ensuite équilibrées au pH physiologique par du tampon phosphaté puis lavées à l'eau distillée et séchées.

V. 2. 3. 4. Préparation des suspensions.

Les échantillons de résine, ainsi préparés, et qui seront utilisés dans la suite des expérimentations, sont toujours préalablement pesés à l'état sec et mis en suspension dans un volume connu de tampon de pH = 7,30 à 7,35.

Les suspensions ont été utilisées après élimination des plus fines particules. Cette élimination est obtenue par des centrifugations successives, entre chacune desquelles le surnageant est remplacé par un volume équivalant de tampon.

Les suspensions de résines sont considérées comme débarrassées des fines particules lorsqu'on n'observe plus de surnageant.

Après élimination des fines particules, la concentration des suspensions de résines est contrôlée par prélèvement d'un volume connu, centrifugation, élimination du surnageant, et séchage du culot.

Le poids de l'extrait sec, déduction faite du poids des sels contenus dans le culot mis à sécher, permet de préciser la concentration réelle de la suspension de résine débarrassée des fines particules.

V. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir pour cette étape de synthèse, et par les résultats concordants, l'obtention effective des fonctions chimiques prévues sur la chaîne de polymère. La substitution a conduit à disposer d'un polymère dérivé du polystyrène réticulé comportant à des taux assez importants, des groupements SO_3H , NO_2 , amines et colorant 'PBC'. L'analyse chimique a montré que la réaction avec l'acide nitrique/sulfurique suivit d'une hydrolyse conduit donc aux deux dérivés nitro et amine.

V. 3. 1. Les dérivés aminées du PS

Dans la synthèse de cet intermédiaire, le polymère du type PS- NO_2 contient de l'azote en quantité importante. Dans ce cas, les dosages des groupes amines ont été effectués par la méthode spectroscopique. Il apparaît ainsi que le taux de substitution du polystyrène par les groupements amines peut ainsi atteindre 60 % (tableau V.3) des noyaux aromatiques.

Il apparaît également, que nous avons pu synthétiser par des réactions effectuées en phase hétérogène, des résines porteuses de groupements fonctionnels, NO_2 et NH_2 et avec des taux de substitution variables.

En effet, la détermination des valeurs moyennes des compositions ne nous renseigne en aucune manière quant à l'hétérogénéité de la distribution des groupements fonctionnels dans la phase solide ; celle ci provient du fait que les cinétiques globales sont la résultante d'une part de la vitesse locale des réactions au sein du polymère, et d'autre part, de la diffusion des réactifs depuis la surface jusqu'au cœur des résines.

V. 3. 2. Analyse spectroscopique infrarouge (IR)

L'étude, par analyse spectroscopique infrarouge, de la composition des résines préparées a été effectuée par comparaison des spectres obtenus (Figure V.24) avec un ensemble de spectres typiques (PS) et un nombre de revues bibliographiques [156-158].

Les données de l'adsorption dans l'infrarouge du copolymère et de ses dérivés sont résumées dans le tableau V.2.

Tableau V. 2 : Données d'adsorption dans l'IR du copolymère styrène- divinylbenzène et de ses dérivées.

Liaison	Fonction	Nombre d'onde (cm⁻¹)	Affectation, Mode de vibration
N-H	Amine secondaire	1375- 1315 1350- 1250 1380	
C- C	Aromatique	1580	Vibration de valence
	Noyau aromatique p Substitué	1006	
C-H	Noyau aromatique non Substitué	699 et 759 1493 et 1453	stretching
N-O	aromatique	1250	-
N=O	Nitro	1530 1350	As Str St
C- N	Amine	1020-1220	Moyenne,
N- H	Amine primaire (2 bandes)	3500- 3300	N- H élongation
	Amine secondaire (1 bande)	1650- 1550 1600- 1490	- N- H déformation
C- NO₂	Aromatique	1530- 1500 1370- 1330	Stretching, intense, deux bandes
S=O	Sulfone	1380-1300	<i>Stretching symetrique</i>
	Sulfonique de SO ₃	1345	<i>Stretching</i>
C-S		1100-1000 740-690	
C-Br	Halogénure	590-510	forte

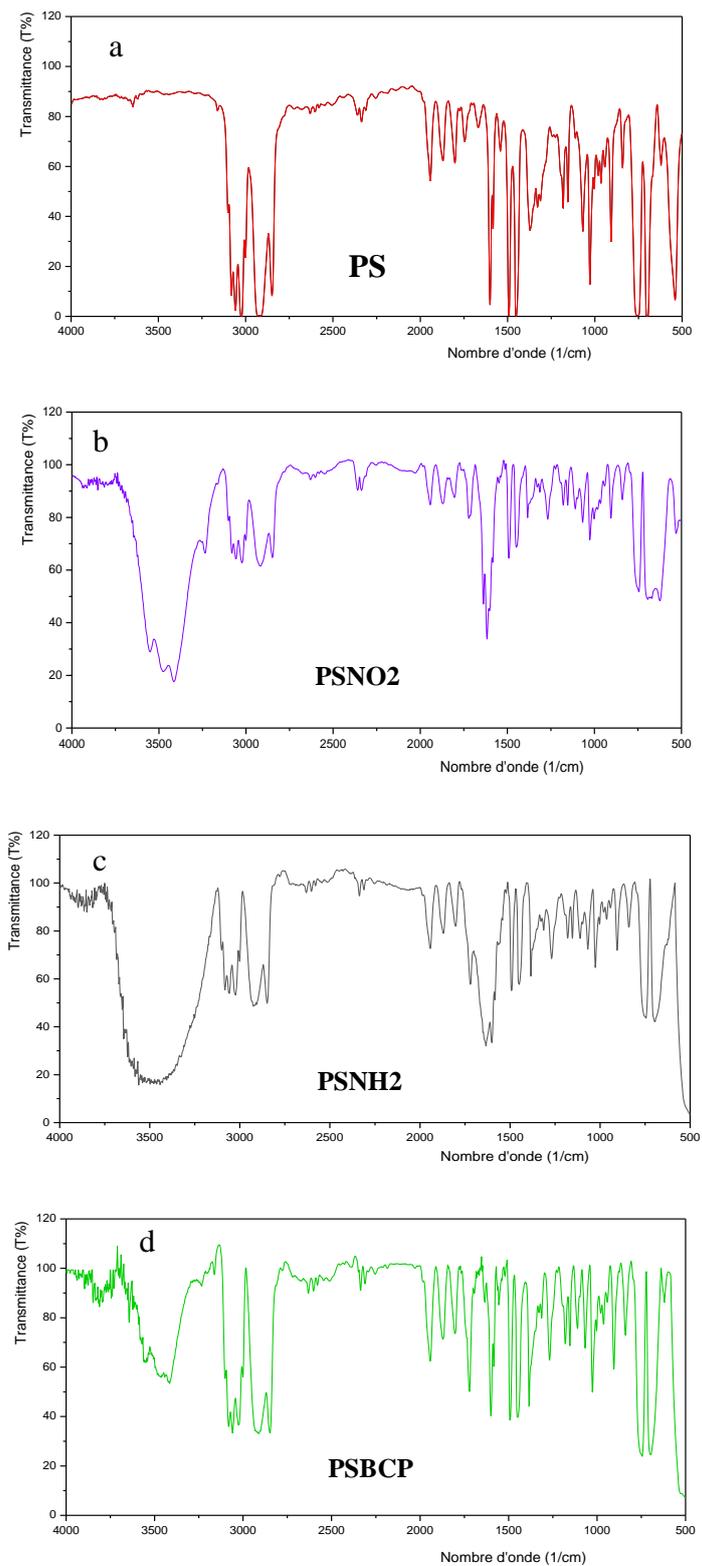


Figure V. 23: Spectres FT-IR des résines préparées ; le copolymère Styrène-divinylbenzène PS-DVB, (a) et de ses dérivés, PS-NO₂ (b), PS-NH₂ (c) et le PS-BCP, portant la molécule de colorant (d).

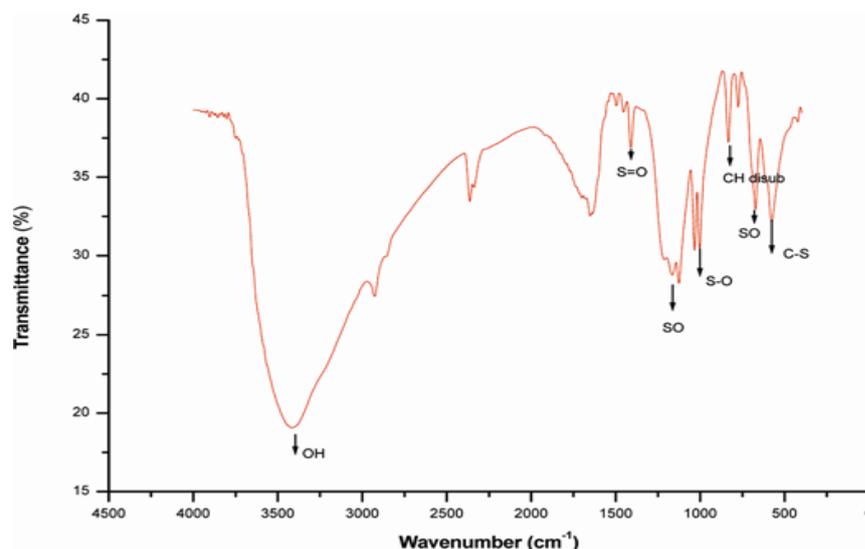


Figure V. 24 : Spectres IR des résines copolymère Styrène-divinylbenzène sulfonatées.

Les spectres des différents types de résine sont illustrés sur la figure V. 24 et figure V. 25. L'investigation des résines nitrées nécessite, en premier lieu, l'évaluation de la résine neutre c-à-dire du copolymère St-DVB.

En comparant les spectres des différentes résines, on peut noter les caractéristiques suivantes : le spectre du copolymère St-DVB ? est caractérisé par plusieurs étroites et fortes bandes d'absorption. Le spectre de la résine intermédiaire aminée est caractérisé par un petit nombre de larges bandes et contrairement au spectre de la résine nitrée, elle contient un petit nombre d'autres bandes étroites.

Une caractéristique des spectres infrarouges des amines primaires et secondaires est la présence d'une absorbance, assez faible, entre 3500 et 3300 cm^{-1} , correspondant aux vibrations de valences N-H, les amines primaires présentent deux bandes de cette nature dans cette région, tandis que les amines secondaires n'en présentent qu'une. Par suite de l'existence de liaisons hydrogènes l'adsorption est déplacée vers des fréquences plus faibles, mais les liaisons hydrogènes NH.....N étant plus faibles que liaisons hydrogènes OH.....O, le déplacement est lui même plus faible et les bandes d'absorption ne sont pas aussi intenses que celles des groupes OH liés par liaisons hydrogènes. On identifie les absorptions dues aux vibrations C-N dans ce cas (amines aromatiques) qui absorbent vers 1300 cm^{-1} [158]. Les spectres de la figure V.24 illustrent ces effets.

Dans l'intervalle d'absorption $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ apparaissent quelques bandes qui correspondent aux vibrations aromatiques. Elles sont étroites et fortes dans la figure (a) alors qu'elles sont considérablement affaiblies dans le reste des spectres.

Une situation opposée est observée dans le cas des bandes d'absorption à 755 cm^{-1} et à 695 cm^{-1} , qui proviennent du cycle benzénique monosubstitué.

Dans la figure (b), le spectre d'une résine nitrée partiellement hydrolysée est présent et peut bien être utilisé pour illustrer, au moins qualitativement, l'hétérogénéité des résines.

A partir de cette description il est évident que la présence des groupes NO_2 peut être reconnue sur la base des deux pics étroits et intenses à 1450 cm^{-1} et 1490 cm^{-1} attribués aux vibrations de valence symétrique et asymétrique des groupes N=O , respectivement.

Dans les deux spectres de résines amines on peut observer des pics à 1620 cm^{-1} qui n'apparaissent pas dans la figure (a). Dans l'intervalle 1250 à 1100 cm^{-1} des spectres de la figure (b), figure (c) et figure (d) se forme une bande d'absorption intense qui correspond aux groupes fonctionnels contenant la liaison CN , dans cet intervalle il y a un nombre de plusieurs petites bandes correspondant au cycle aromatique monosubstitué.

L'intensité de ces différents pics augmente avec le taux de substitution permettant ainsi d'estimer les taux de substitution des différents groupes fonctionnels fixés. Toutefois on peut observer un pic correspondant à la présence de la liaison R-Br au environ de 600 et caractéristique de la présence de la molécule du colorant.

L'introduction de groupements sulfoniques est confirmés par l'analyse IR (figure V. 25) les pics caractéristiques à 1033 et 1006 cm^{-1} due au stretching symétrique des groupements SO_3 et ceux du noyau aromatique para substitué respectivement ont été observés pour les résines sulfonées. L'absorbance du noyau aromatique monosubstitué à 699 et 759 cm^{-1} (bande CH) et 1493 1453 cm^{-1} (stretching) disparaissent suite à l'introduction de groupements sulfoniques.

V. 3. 3. Effet du milieu réactionnel sur l'état des billes

L'examen en microscopie optique des grains a été effectué à l'aide d'un microscope type « OLYMPUS » permettant un grossissement de 100 fois.

Le polystyrène réticulé de départ se présente sous forme de billes parfaitement sphériques en fin de réaction de modification. Certaines billes, en proportions faibles, ont éclaté dans le milieu rendant les résines plus fragiles.

On obtient enfin (après éclatement des billes) des fragments de taille et de morphologie très variables, ainsi que le révèle les clichés photographiques reproduits dans la figure V.26.

Un contrôle qualitatif et quantitatif au microscope optique nous a permis de vérifier que l'échantillon n'est pas grossièrement détruit puisqu'au microscope, on ne peut repérer que quelques fragments de grains de dimensions très différentes.

Les rendements en billes sphériques étant d'environ 95 %. Il semble que la résine à fonction amine-colorant a subi les dégâts les moins importants. Cette résine présente une meilleure résistance aux pressions internes. L'observation au microscope révèle un aspect très caractéristique des particules éclatées, qui se présentent en forme de fleurs.

Cependant, on remarque que les résines ainsi préparées sont devenues très hydrophiles et se présentent comme des hydrogels.

Contrôle de la réaction

Comme la réaction est une réaction auto catalytique hétérogène, procédant couche par couche, la diffusion des réactifs à l'intérieur de la matrice du copolymère peut constituer une barrière limitant la vitesse de cette réaction. Le faible taux de réticulation (taux DVB) des supports initiaux et l'étape de gonflement qui précède la réaction garantissent l'expansion du réseau et assure une diffusion plus rapide des réactifs, d'où un contrôle de la vitesse par la réaction chimique elle-même. Plusieurs travaux ont confirmé ce résultat [130].

La réaction secondaire de réticulation est une réaction consécutive à la réaction de sulfonation. Les observations faites à ce sujet expliquent la réaction extrême de pontage se produisant essentiellement quand le taux de DVB et les températures sont élevés.

Dans les conditions favorisant la réaction secondaire, la diffusion peut devenir lente et introduire un greffage plus important sur les couches superficielles des billes de copolymères. Ce phénomène est observé si des billes complètement sèches sont utilisées.

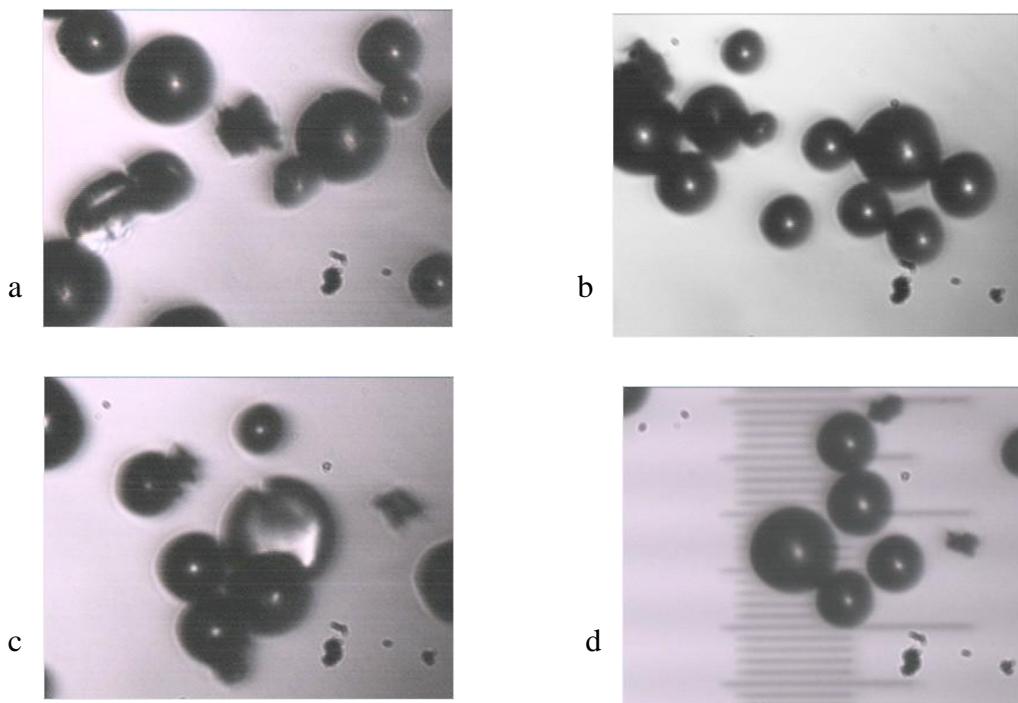


Figure V. 25 : Photos au Microscope Optique, Observations : Modification de l'aspect externe des billes a) fragments, b) différentes dimensions, c) aspect d'une bille éclaté d) taille des billes.

Les propriétés thermiques dessupports préparés

La stabilité thermique de PS et PS-BCP a été étudiée sous atmosphère d'azote par TGA et ATD.

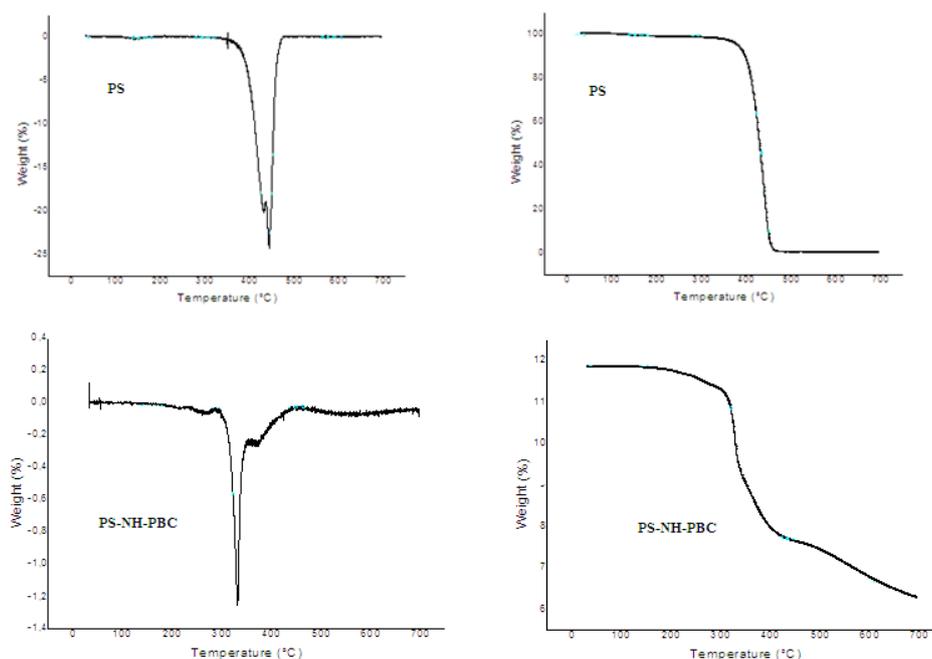


Figure V. 26 : Spectre ATD et ATG: PS et PS-PBC, vitesse de chauffage 10°C/min.

L'analyse thermique différentielle conduit à des conclusions importantes sur la stabilité du polymère dérivé du PS sous l'effet de la température. Cette analyse montre qu'une diminution de la stabilité thermique est observée pour le support polystyrène-colorant, par rapport au PS. Le PS pur montre un processus de perte de poids avec l'apparition d'un pic à environ 350 °C. Le polystyrène modifié PS-PBC montre une perte de poids à partir de 280 °C (figure 27a). Sur la figure 4b, le processus de dégradation en une seule étape pour le PS est surtout visualisé.

Toutefois, cette diminution de la stabilité n'affecte en aucun cas l'utilisation des supports PS-PBC dans la plage d'utilisation, étant donné que ceci est habituellement effectué à des températures inférieures à 100 °C. Les courbes TGA et DTGA pour PS et PS-PBC sont présentés dans la figure 27. Deux échantillons présentent un pic endothermique à 450 °C et 350 °C dans la première montée en température, ce qui pourrait être attribué à la présence de groupes sulfoniques dans les chaînes de polymère. Comme prévu, ils ne peuvent pas être attribués à la fusion de l'état cristallin parce que le polymère est réticulé et donc pratiquement totalement amorphe.

Cependant, le processus de dégradation de la résine PS-PBC est visualisé en plusieurs étapes, montrant la dégradation progressive des molécules de colorant. Nous avons donc obtenu des polymères stables, et l'analyse au microscope a confirmé ces résultats.

Ainsi les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir, dans les différentes étapes de synthèse, par des résultats concordants, l'obtention des fonctions désirées :

-NO₂, -NH₂, --NH-COL et -SO₃H sur les molécules de polystyrène réticulé. Les groupements sont majoritairement greffés en position para sur les noyaux aromatiques et sont uniformément répartis à travers toute la masse du copolymère.

L'étape intermédiaire d'hydrolyse qui suit l'étape de nitration a permis l'obtention de taux de substitution en groupements amine élevés. Ce qui conduit à des taux améliorés en groupements colorant. Les analyses quantitatives ont confirmé ces taux. Il est à noter cependant que ces taux sont surestimés en raison de la présence parasite de groupements nitro formés durant les étapes antérieures. Nous obtenons en fin de réaction des résines mixtes.

V. 4. CARACTERISATION DES ADSORBANTS PREPARES.

V. 4. 1. INTRODUCTION

La préparation de matériaux insolubles que nous avons appelés “DYE-LIKE” a donc été envisagée, le matériau de base est une résine polystyrène, se présentant sous forme de billes, qui est modifiée par la fixation de groupes amino et de colorant par un pont (-NH) (réaction d’amination figure V.19 et figure V.20. N.BELATTAR et Col ont pu démontrer les propriétés “heparin-like” de ces résines modifiées. Des supports de PS-DVB fonctionnalisés par des groupements chlorosulfonyle modifiés par des acides aminés ont également pu être préparés et leur affinité vis-à-vis de l’albumine étudiée [130].

V. 4. 2. CARACTERISTIQUES DES MATERIAUX UTILISES COMME ADSORBANTS

Les polymères de PS constituent potentiellement des matériaux hémocompatibles [159] qu’il convient de caractériser du point de vue de l’adsorption des protéines du plasma.

Notre choix s’est porté sur la plus abondante des protéines du sérum humain, à savoir l’albumine humaine.

Les principales caractéristiques structurales des résines étudiées sont portées dans le tableau VI.3, nous avons présentés aussi des photos de microscopie effectuée sur les échantillons de résines sèches (Figure V. 26).

Tableau V. 3 : Les principales caractéristiques des résines étudiées

Résine	Diamètre des billes	Taux de substitution %	Taux de substitution (meq/g)
PS-NH₂	200 µm	61,5	3,35
PS-NH-COL a.SnCl ₂ b.FeCl ₂	200 µm	50 en NH ₂ 23 =	2,4 1,12
PS-SO₃H		3,5 en SO ₃ H	70

Durant la réaction d’hydrolyse la résine nitrée est catalysée par :

- a. Réaction d’amination catalysée par le SnCl₂
- b. Réaction d’amination catalysée par le FeCl₂

V. 4. 2. 1. Etude de l'adsorption de l'albumine sur les résines préparées

Dans cette partie du travail, nous avons délibérément choisi de travailler sur un système défini et simplifié que nous dénommons système purifié, c'est à dire dépourvu de toute autre protéine plasmatique que celle qui nous intéresse, à savoir l'Albumine humaine.

Nous avons donc essayé de tester l'affinité de cette protéine vis à vis des résines préparées. Nous avons alors étudié les différents paramètres qui expriment ce phénomène : constante d'affinité, surface spécifique.

V. 4. 2. 1. 1. Méthode de dosage de la concentration de l'albumine

Avant toute procédure de dosage, l'Albumine qui se trouve initialement sous forme de particules solides, obtenue de la compagnie de chimie SIGMA et qui est de type (A- 1953) est dissoute dans une solution phosphatée (20 mM) qui constitue la solution tampon et qui sert à équilibrer l'Albumine dans un pH physiologique de 7,3.

La méthode utilisée pour doser la concentration de l'Albumine est celle de la colorimétrie en utilisant le réactif de Macart [160-162] comme colorant. Celui-ci entraîne l'apparition d'une coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'Albumine présente dans la solution.

Tout d'abord, on établit une concentration donnant la densité optique mesurée à 595 nm après addition du réactif en fonction de la concentration de la protéine.

Pour lire la densité optique (D.O), on a utilisé un spectrophotomètre visible de type (SPECTRONIC 77) et deux cuvettes en verre.

On prépare des solutions constituées de 200 µl de la solution d'Albumine et de 4 ml du réactif de Macart, dans la cuvette de référence la solution d'Albumine est remplacée par la solution tampon.

Après un temps d'incubation de 20 minutes, on lit la densité optique correspondant à la concentration de la protéine à une longueur d'onde fixée à 595 nm. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue est représentée sur la figure **V. 28**.

Le réactif de Macart utilisé pour les dosages est préparé selon le mode opératoire décrit dans l'annexe 5.

La solution de HSA à différentes concentrations, est mise à incuber à 25°C, avec une concentration donnée de résine pendant 20 mn. Après décantation de la résine, le surnageant est prélevé et sa concentration en HSA mesurée. Les isothermes d'adsorption sont établies en portant la concentration de HSA adsorbée en fonction de la concentration de HSA

initialement introduite. Les concentrations sont lues sur la courbe d'étalonnage.

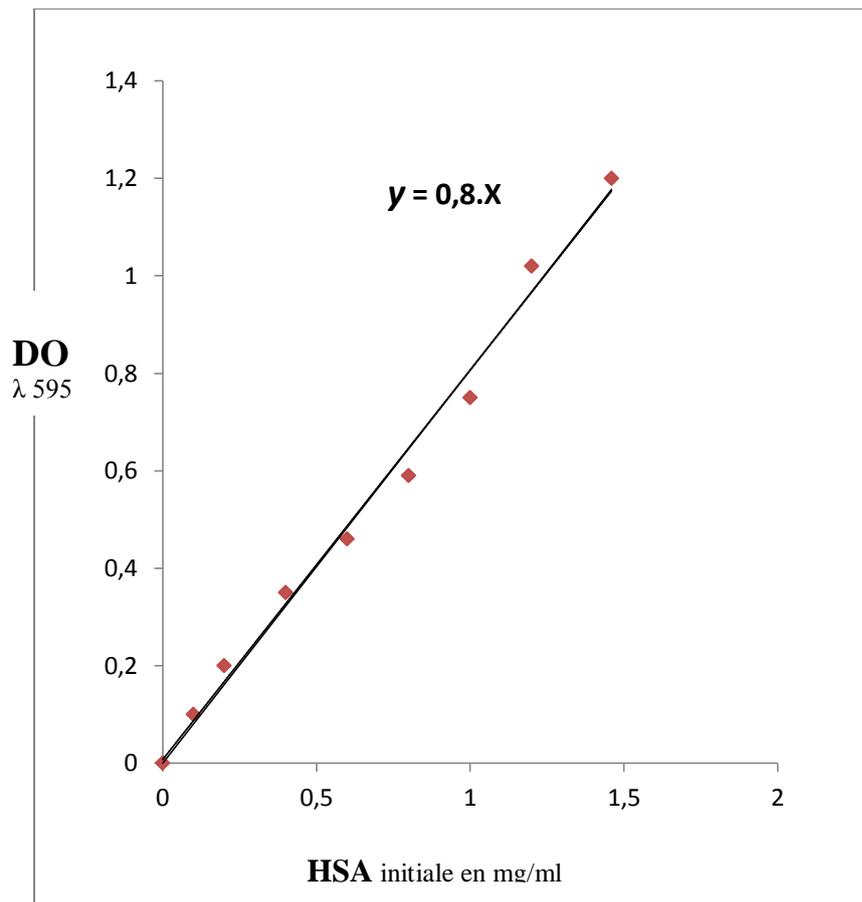


Figure V. 27 : Courbe d'étalonnage permettant de déterminer la concentration de l'albumine en solution.

V. 4. 2. 1. 2. Isothermes d'adsorption de l'albumine

Pour apprécier l'affinité de l'Albumine pour les résines préparées, il est nécessaire d'établir les isothermes d'adsorption.

Les solutions d'Albumine sont mises en contact avec des masses fixes (10mg) de résines dans des tubes à essais, maintenus à la température ambiante de 25°C ; ils y sont sous agitation magnétique pendant 20 mn.

Pour le dosage, il est nécessaire de diluer les solutions d'albumine afin d'avoir des résultats précis et des concentrations comprises entre 0 et 1,2 mg/ml, le domaine où la loi de Beer-Lambert reste vérifiée.

La figure VI.29 montre les isothermes d'adsorption des deux résines. On constate que dans les deux cas, la concentration de HSA adsorbée sur la résine, donne lieu à une augmentation initiale de la quantité adsorbée pour de faibles concentrations (adsorption presque quantitative puis croît pour atteindre un plateau de saturation aux fortes concentrations.

Les courbes typiques obtenues avec l'interface PS-SO₃H et PS-PBC traduisant les variations de la concentration interfaciale Γ avec la concentration de la solution d'équilibre sont présentées sur la figure VI.29. On remarque :

* une croissance rapide de Γ aux faibles concentrations.

* L'existence d'un plateau de saturation aux fortes concentrations (valeur notée Γ_{∞}) qui est pratiquement atteint a une concentration de l'ordre de 1,2 g/ml et 1,0 g/ml pour les résines PS-SO₃H et PS-NH-PBC, respectivement.

Dans l'hypothèse d'une adsorption de la HSA sur ces résines, cette concentration au plateau de saturation représente la capacité d'adsorption limite de la résine pour l'albumine, les sites étant alors saturés. Partant de ces simples observations qualitatives on a conclu que les isothermes étaient de type LANGMUIR. Une telle assertion peut être vérifiée de manière quantitative, comme nous allons le montrer (Figure VI. 28).

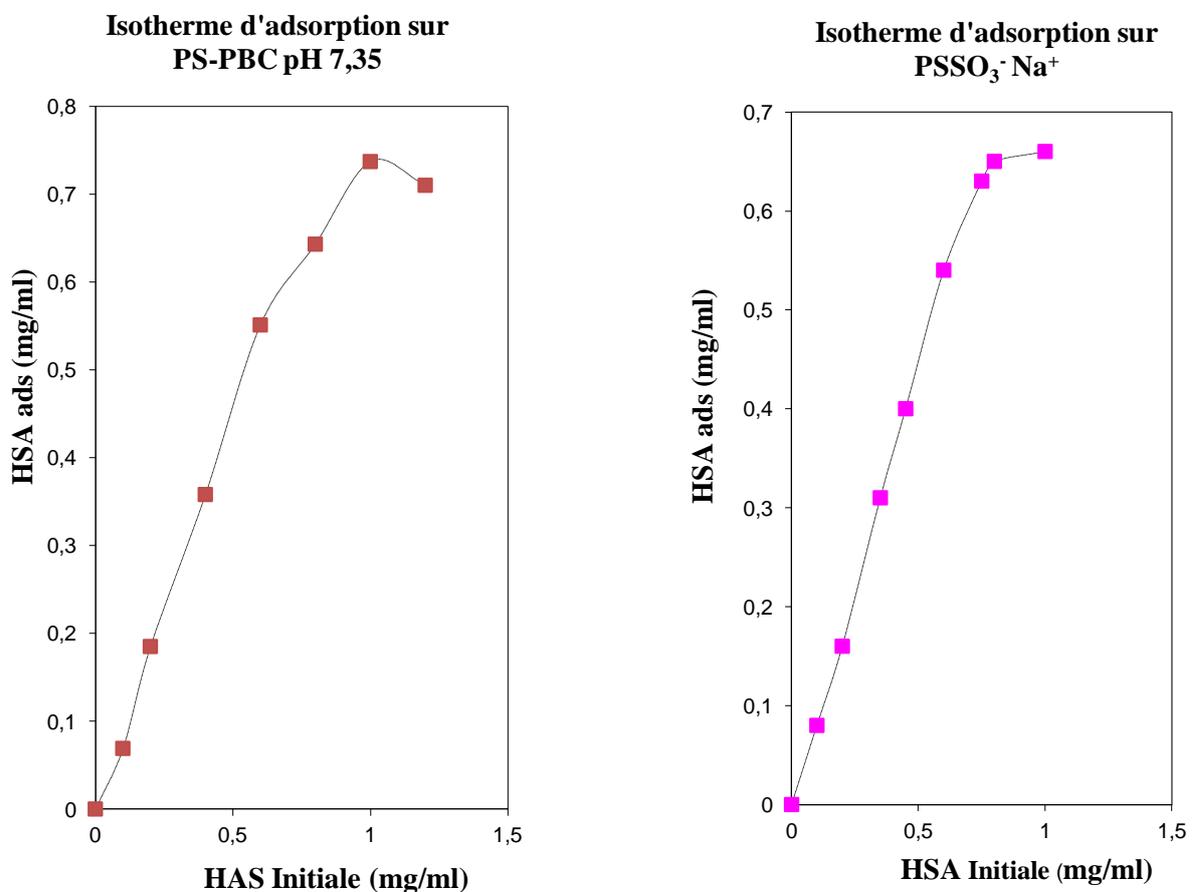


Figure V. 28 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur, PS-NH-BCP et PS-SO₃Na : variation de Γ , concentration interfaciale, en fonction de C concentration de la solution d'albumine, a pH 7,35.

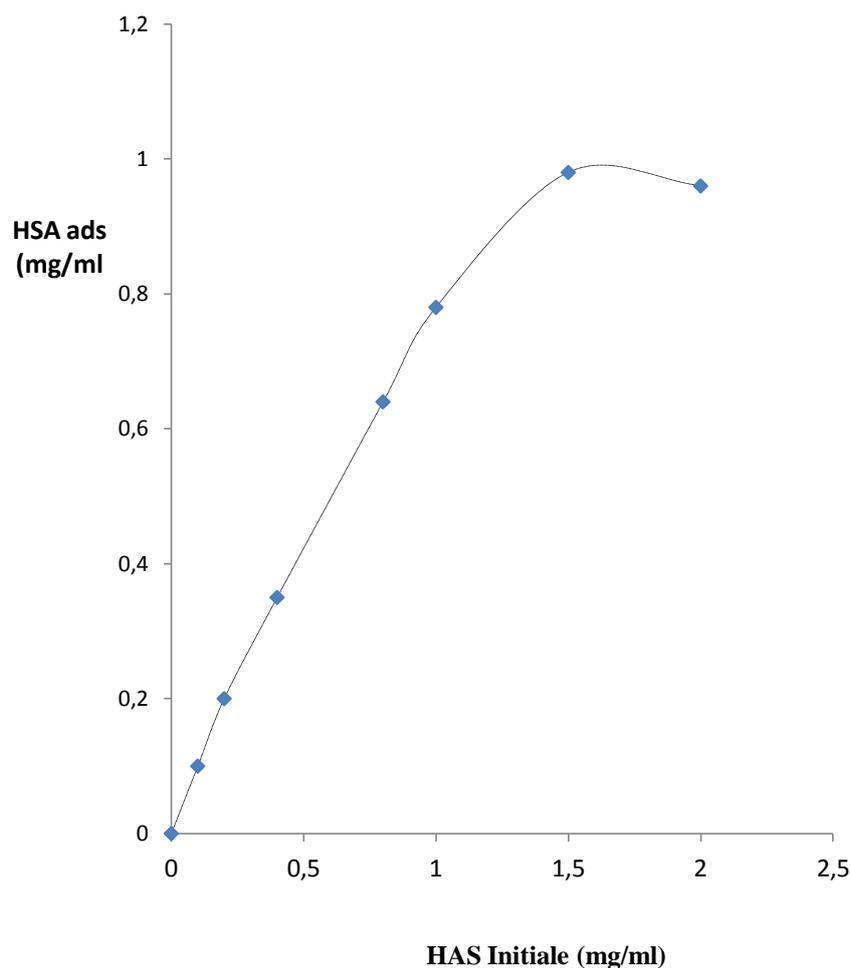


Figure V. 29 : Isothermes d'adsorption à 25°C, de l'albumine sur **PS-NH-PBC** : variation de Γ , concentration interfaciale, en fonction de C , concentration de la solution d'albumine a pH 4,2.

L'isotherme d'adsorption de l'albumine sur l'adsorbant peut être assimilée à un Langmuir type de modèle dans la forme. Le plateau de saturation de l'albumine adsorbée à l'interface est atteint à 1,93 mg/ml (Figure 30). La constante d'affinité déterminée sur la base de l'équation de Langmuir, où θ représente la fraction de surface couverte et $1-\theta$ la fraction libre, confirme les résultats précédents et la valeur obtenue est élevée (de l'ordre de 10^6 M^{-1}) (figure VI. 31). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour les ligands colorants tels que le vert de bromocrésol (réactif de choix pour la détermination de l'albumine) et le bleu de bromophénol qui se lie étroitement à l'albumine avec une constante d'affinité de $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ et $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ respectivement.

Ce résultat démontre clairement la grande efficacité du groupe sulfonate substitué sur la chaîne polymère de la matrice dans le procédé d'adsorption de l'albumine du sérum humain.

Les interactions à l'interface entre les deux entités sont probablement régies par divers mécanismes. Lorsque l'adsorption a été réalisée, on a utilisé un pH physiologique (pH = 7,3), l'albumine a une charge nette négative, tandis que les groupes acide sulfonique à la surface de la matrice de polystyrène ont une charge négative qui conduit à un effet répulsif. Par conséquent, dans ce cas, l'adsorption est due à des interactions électrostatiques entre la charge négative des groupes sulfoniques et l'amine chargée positivement : lysine, guanidine, arginine et imidazole histidine de la HSA. Ainsi, les interactions électrostatiques sont prédominantes par rapport à celles hydrophobes.

Ceci est développé plus tard par les noyaux aromatiques et les groupes alkyle dans les chaînes polymériques, d'une part, et les résidus hydrophobe d'acides aminés de l'albumine, qui sont localisés dans le premier domaine d'acides gras liés, d'autre part.

Ces résultats présentés ici confirment le fait qu'il est possible de reproduire, *in vivo*, l'interaction entre la HSA et ses ligands endogènes ou exogènes. Dans ce contexte, l'introduction de groupes sulfonate sur les gels de polystyrène adsorbants leur confère des propriétés **dye-like**. L'interaction des molécules en solution avec l'interface est décrite, dans le cas d'une adsorption de type **LANGMUIR**, par l'équation de réaction :



On a représenté une molécule en solution, **S** est un site de fixation de l'interface et **A**, la molécule adsorbée. Les constantes de vitesse pour l'adsorption et la désorption sont respectivement **k_i** et **k_j**.

La condition d'équilibre chimique s'écrit :

$$k_a C (\Gamma_\infty - \Gamma) = k_d \Gamma \quad (2)$$

Soit, après transformation, et en posant :

$$K = k_a / k_d \quad (3)$$

Une étude des variations de $\theta/1-\theta$ en fonction de C doit donc être faite, et les résultats expérimentaux ont été portés sur Tableau VI.4. Sur la figure VI. 29 On observe effectivement des droites, et le tableau VI.4 résume les données qui peuvent être obtenues à savoir l'adsorption correspondant au plateau Γ_∞ et les constantes d'affinité **K** (à partir de la pente).

Tableau V. 4 : Paramètres des isothermes d'adsorption à 25 C° de l'albumine, sur les différents supports obtenus.

Type de résine	Γ_{∞} (μ g / g)	K (L / M)	Surface spécifique (cm^2 / g)
PSSO₃H	$6,25 \cdot 10^4$	$\approx 2,8 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$
PS-NH-PBC (pH7,35)	$7,5 \cdot 10^4$	$\approx 6,8 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$
PS-NH-PBC (pH4,2)	$1,5 \cdot 10^5$	$\approx 8,8 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$
* PS SO₂LSys	$2,8 \cdot 10^4$	$\approx 2 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^5$

*Reference cite de notre [precedent travail \[1626171\]](#)

Des études effectuées avec des interfaces d'aire connue ont montré que Γ_{∞} était pour l'albumine, voisin de $0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, donnée qui correspond bien à l'existence d'une monocouche dense de molécules non déformées (voir 1^{ier} chapitre).

En postulant l'existence de monocouches saturées dans le plateau de l'isotherme, dans le cas des matériaux étudiés, il est possible de calculer leur surface spécifique par la relation simple :

$$\text{Surface Spécifique} = \frac{\Gamma_{\infty} (\mu\text{g} / \text{g})}{0,2 (\mu\text{g} / \text{Cm}^2)} \quad (4)$$

Ce postulat est précisément justifié par l'existence d'isothermes de type Langmuir et les surfaces spécifiques ainsi obtenues, portées dans le tableau VI.4, sont plus significatives que celles que l'on tirerait, par exemple, d'une méthode BET.

Plusieurs corrélations peuvent être établies entre les résultats obtenus et les informations complémentaires en notre possession.

* dans le cas des billes de PS-NH-COL nous obtenons une surface spécifique supérieure à celle correspondant aux billes de **PS-SO₃H**.

* cet ordre parait tout à fait compatible avec les observations au microscope où les billes

comprenant des dérivés du COL paraissent être les plus crevassées.

* enfin, on note une bonne corrélation entre la surface spécifique et le taux caractéristique de mise à l'équilibre, le taux de mise à l'équilibre d'adsorption et plus grand sur les billes à forte porosité, la diffusion dans des pores étroits non exposés au flux hydrodynamique limite alors la vitesse de la réaction (la cinétique).

* les données montrent l'impact du pH sur la capacité d'adsorption du support pour la HSA. Les tracés de la Figure VI.26 indiquent que le support a une affinité élevée ($> 10\text{mg/g}$) pour la HSA par rapport aux conditions précédentes, en comparaison à celle du même support et également d'un support échangeur de cations classique.

V. 4. 2. 1. 3. Détermination des constantes d'affinité

L'autre information essentielle fournie par l'étude des isothermes concerne les constantes d'affinité, $K_{\text{SO}_3\text{H}}$ et $K_{\text{NH-COL}}$. A partir des courbes expérimentales précédemment établies nous avons pu calculer les constantes d'affinité de l'albumine pour les deux résines. Pour cela nous avons supposé que l'albumine réagissait sur un seul site actif de la résine et nous avons alors assimilé la quantité de HSA adsorbée à saturation, au nombre total de sites du polymère accessibles à la protéine (isotherme de Langmuir). Nous avons ensuite déterminé la surface recouverte en fonction de la concentration en HSA libre.

Pour une concentration de HSA, X , correspond une concentration de HSA adsorbée Y ; Y est équivalent au nombre de sites occupés et $(X-Y)$ est la concentration en HSA libre. Observons qu'elles ne varient pas d'une manière spectaculaire selon la résine.

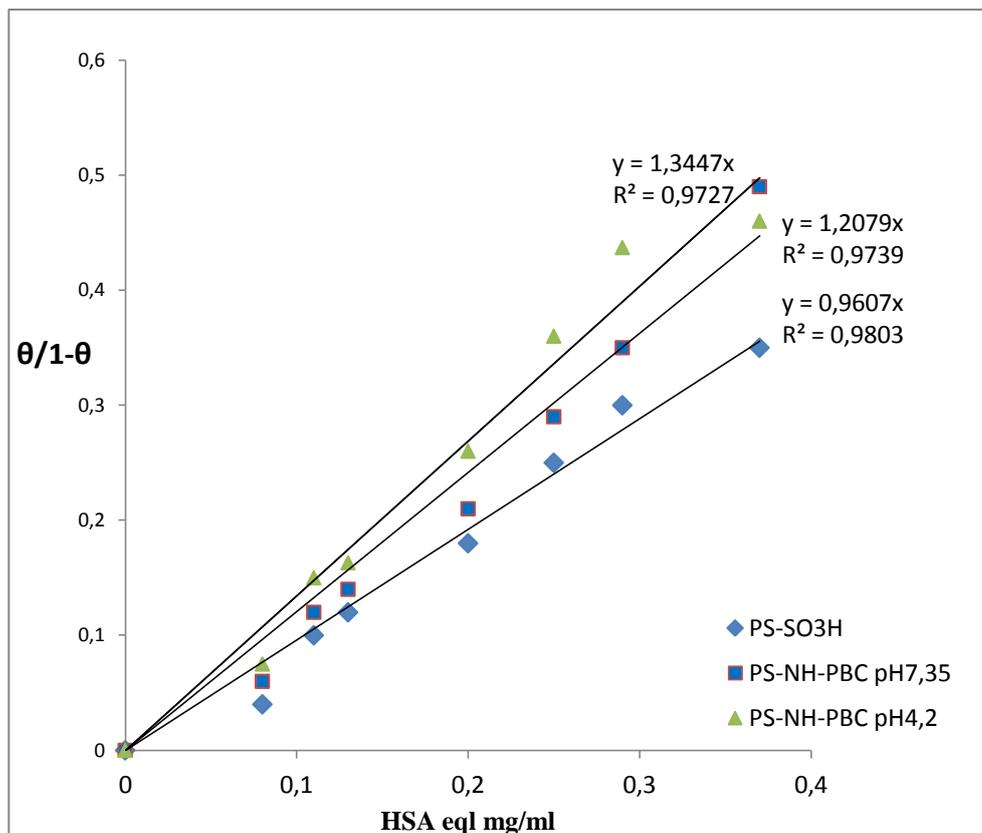


Figure V. 30 : Isothermes (lineaires) d'adsorption de la HSA sur les supports préparés
 ◆ PSSO₃H, ■ PS-NH-PBC (pH7,35), ▲ PS-NH-PBC (pH4,2)

V. 4. 2. 2. Etude de l'affinité de l'albumine pour les surfaces préparées

L'existence pour l'albumine d'isothermes de Langmuir implique que l'affinité de la protéine pour une interface donnée n'est pas fonction du degré de saturation de l'interface. La seule interaction entre molécules adsorbées est l'interaction de surface exclue, qui est automatiquement prise en compte dans un modèle d'adsorption sur site. Il est donc intéressant d'estimer, en ce cas, la variation, de l'enthalpie libre standard ΔG^0 caractérisant le processus d'adsorption.

Nous verrons que l'on peut effectuer le même calcul pour les résines PS-SO₃H et PS-NH-COL.

Le processus d'adsorption d'une protéine est complexe : il y a compétition pour l'interface entre macromolécules et molécules de solvant ou ions occupant son voisinage. Subsiste la compétition avec le solvant, que l'on peut décrire sous forme d'une réaction chimique d'équation:



A et A : Symbolisent les molécules de protéine en solution et dans l'état adsorbé, H₂O

constitue le solvant à l'interface. Cette équation de réaction est analogue à celle de type Langmuir, en tenant compte du fait qu'un site est en moyenne occupé par n molécules de solvant, libérées lors du processus d'adsorption. La condition d'équilibre chimique s'écrit alors

$$\mu + n \mu^{H_2O} = \mu_A + n \mu^{H_2O} \quad (6)$$

La constante d'équilibre associée au processus d'adsorption s'écrit alors :

$$K_e = \frac{C_A [a_{H_2O}]^n}{C [a_{H_2O}]} = \exp[-\Delta G_a/RT] \quad (7)$$

Dans ces équations, (a_i ($i = H_2O$), H_2O) est une activité, et ΔG_a l'enthalpie libre standard de la réaction. Ces relations supposent aussi que les solutions de protéines sont idéales en volume et à l'interface conformément aux hypothèses de théorie de Langmuir.

En fait la plupart des théories tiennent compte de la compétition qui existe entre le monomère et le solvant pour l'évaluation de ΔG_a , qui exprime la condition d'équilibre chimique sous la forme.

$$\mu = \mu_A \quad (8)$$

Ce qui exprime un "découplage" entre l'équilibre d'adsorption du solvant et du polymère. Par la suite, on en déduit une constante d'équilibre apparente :

$$K_a = [C_A / C] = \exp [-\Delta G_a / RT] \quad (9)$$

En ce qui concerne l'albumine, la relation entre la constante d'affinité K (tableau VI.4) et K_a s'établit. Ainsi, aux faibles concentrations C , la fraction de sites occupés, est voisine de zéro et l'équation de Langmuir prend la forme simplifiée :

$$K_C = \Gamma / \Gamma_\infty \quad (10)$$

La concentration interfaciale " volumique" C_A s'écrit :

$$C_A = \Gamma / \delta \quad (11)$$

Où δ est l'épaisseur de la couche adsorbée. Par la suite :

$$K_a = K\Gamma_\infty / \delta \quad (12)$$

Pour nos calculs nous avons choisi $\delta = 40\text{\AA}$ (hypothèse de molécules allongées sur l'interface).

Dans le tableau VI.5 sont portées les valeurs des enthalpies libres standards apparentes d'adsorption.

Tableau V. 5. Des enthalpies libres standards.

Adsorbant	$[-\Delta G/RT]_{Alb}$
PS-NH-COL (a pH 4,2)	~ 3,0
PS-NH-COL (a pH 7,35)	4,2
PSSO₃H	4,55

ΔG est la fonction la plus importante pour l'étude de cet équilibre chimique et permet donc de définir le sens de la réaction et son positionnement. Toute réaction chimique ne peut progresser que si l'enthalpie libre du système réactionnel diminue comme c'est le cas. Une transformation spontanée se caractérise donc par une évolution telle que $\Delta G < 0$ (réaction exergonique), On a coutume de dire qu'une réaction de type : $A + B = C + D$, avec une contante d'équilibre de 10^4 peut être considérée comme quantitative, à température ambiante

Pour un taux de substitution du PS-NH-PBC « **a** » l'activité de la résine PS-NH-COL dépend du taux de groupe NH_2 et $NH-COL$, nous avons donc déterminé le taux de substitution de la résine préparée exprimé par l'équation :

$$\mathbf{a} = C_{COL} / [C_{NH_2} + C_{COL}] \times 100$$

Où C_{NH_2} et C_{COL} sont, pour la résine choisie, les taux respectifs de groupes nitrates et de groupes amines liés au polystyrène. adimensionnel (**a**), ont été trouvés égaux à :

$$\mathbf{a}_{PSCOL} = 71,65 \%$$

$$\mathbf{a}_{PSSO_3H} = 70 \%$$

Modélisation de Langmuir et de Freundlich

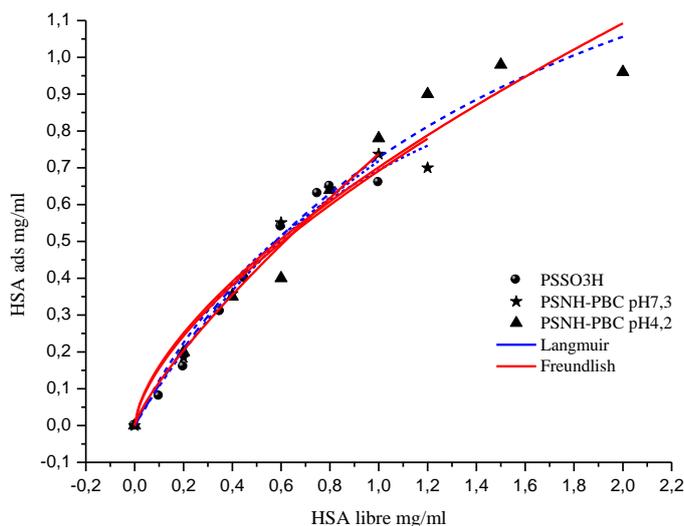


Figure. V. 31 : Modélisation de Langmuir et de Freundlich des isothermes d'adsorption de la HSA sur les résines préparées

Tableau V. 6 : Calculs des paramètres de Langmuir et de Freundlich

Langmuir	K_L	Q_e	R^2
PS-SO3H	1,998	0,56	0,978
PS-NH-BCP pH7,3	1,454	0,912	0,974
PS-NH-BCP pH4,2	1,922	0,609	0,957
Freundlich	K_F	n	R^2
PS-SO3H	0,738	0,799	0,967
PS-NH-BCP pH7,3	0,692	0,649	0,956
PS-NH-BCP pH4,2	0,701	0,639	0,935

V. 4. 3. Résultats et discussion

La substitution via une fonction amine (-NH₂) par une molécule du ligand 'PBC' augmente la capacité d'adsorption. Ceci peut être attribué à une diminution globale de la charge nette de la résine.

Trois observations s'imposent alors :

- Pour les deux types de supports, ces énergies ne sont pas très élevées, si l'on tient compte du fait qu'elles constituent la somme de nombreuses énergies de liaison de la protéine avec l'interface. Il s'agit d'adsorption ne faisant pas intervenir de liaisons quasi-chimiques. ΔG^a résulte d'interactions de type Van der Waals ou de type hydrogène.

- L'affinité de la HSA pour l'interface PS-NH-PBC est supérieure à celle du PS-SO₃H, mais les différences ne sont pas spectaculaires. L'affinité relativement faible pour les billes de PS-SO₃H est sans doute à attribuer à un effet de charge, il y aurait même, une répulsion faible entre la résine fortement anionique et la protéine qui, à pH 7,35, est largement au-dessus de son point isoélectrique (pI).

- Il est enfin utile de comparer, pour les deux supports, les quantités d'albumine correspondant aux plateaux de saturation.

L'isotherme d'adsorption de l'albumine sur l'adsorbant peut être assimilée à un modèle de type Langmuir dans la forme. Le plateau de saturation de l'albumine adsorbée à l'interface était atteint à $7,5 \times 10^4$, $6,25 \times 10^4$ et $1,5 \times 10^5$ mg/ml pour le PSSO₃H, PSNH-BCP a pH 7,35 et le PS-NH-BCP a pH 4,2, respectivement.

La constante d'affinité déterminée sur la base de l'équation de Langmuir, où θ représente la fraction de surface couverte avec l'albumine adsorbée et le $[1 - \theta]$ représente l'albumine libre, résultat confirmé précédemment et les valeurs obtenues sont relativement élevées.

Ce résultat démontre clairement la grande efficacité du groupe sulfonate substitué sur la chaîne polymère de la matrice dans le procédé d'adsorption de l'albumine du sérum humain. Les interactions à l'interface entre les deux entités sont probablement régies par divers mécanismes. Lorsque l'adsorption est réalisée à pH physiologique (pH = 7,35), l'albumine a une charge nette négative, tandis que les groupes acides sulfoniques à la surface de la matrice de polystyrène ont une charge négative qui conduit à un effet répulsif.

Par conséquent, dans ce cas, l'adsorption est due à des interactions électrostatiques entre la charge négative des groupes sulfoniques et l'amine chargée positivement : lysine, guanidine, arginine et imidazole histidine de la HSA. Ainsi, les interactions électrostatiques sont prédominantes par rapport à celles hydrophobes. Ceci est développé plus tard par les noyaux aromatiques et les groupes alkyle dans les chaînes polymériques, d'une part, et les résidus

hydrophobes d'acides aminés de l'albumine, qui sont localisés dans le premier domaine d'acides gras lié, d'autre part.

Ces résultats présentés ici confirment le fait qu'il est possible de reproduire, in vivo, l'interaction entre l'HSA et ses ligands endogènes ou exogènes. Dans ce contexte, l'introduction de groupes sulfonate sur les gels de polystyrène adsorbants confère par la suite des propriétés **dye-like**.

V. 4. 4. Conclusion

Les résultats présentés ici confirment le fait qu'il est possible de mimer l'activité adsorbant de certains colorants et protéines en fonctionnalisant un polymère support avec des fonctions similaires à celles portées par un colorant. Ces résultats suggèrent que l'adsorption est due à la présence de sites actifs caractérisés par la nature des fonctions qui les constituent. Nous pouvons ainsi dire que l'Albumine présente une bonne affinité vis à vis des résines préparées, cette affinité diffère d'une surface à une autre.

Les isothermes d'adsorption à 25°C de l'albumine sur les matériaux à propriétés adsorbantes sont de type Langmuir dont les constantes de l'équation représentative **a** et **b** sont respectivement égale à **2.15** et **2.08**.

- La seule interaction entre molécules adsorbées est l'interaction de surface exclue.
- Les surfaces spécifiques calculées sont en bonne corrélation avec l'état des surfaces observées au microscope.

Pour la HSA, les valeurs des énergies libres standards apparentes d'adsorption ont pu être calculées et indiquent que :

- * l'affinité de la HSA vis à vis du PS-NH-PBC est supérieure à celle du PS-SO₃H.
- * les liaisons avec l'interface ne seraient pas de type quasi-chimique, mais de type Van Der Waals ou hydrophobes.

La valeur de ΔG^0 est négative le changement de l'ordre moléculaire de la protéine favorisant l'augmentation de l'entropie, le mécanisme d'adsorption dépend, en fait beaucoup de la nature des interfaces protéine/solvant, protéine/surface solide et solvant/surface solide.

V. 5. ESSAI DE PURIFICATION DE LA PROTEINE A PARTIR D'UN PLASMA SANGUIN

Dans un médicament à usage humain ou vétérinaire, la protéine plasmatique utilisée doit être présente sous une forme hautement purifiée et ne pas être associée à des substances indésirables susceptibles d'être délétères pour l'organisme, y compris d'autres protéines plasmatiques. La sélectivité du support est donc un paramètre clé pour distinguer la protéine cible des contaminants.

La mise au point d'un procédé de purification d'une protéine plasmatique est donc un travail complexe, compte tenu des caractéristiques sanitaires et réglementaires exigées.

Dans notre cas, le matériel de départ contenant la protéine plasmatique à purifier consiste en un matériel de constitution complexe, dans lequel la protéine d'intérêt est présente en combinaison avec de très nombreuses substances, y compris des protéines, des lipides, des glucides, des acides aminés, des sels minéraux, et des déchets métaboliques.

V. 5. 1. Définitions du plasma sanguin :

Le **plasma sanguin** est le composant liquide du sang un peu visqueux, transparent et jaunâtre chez le sujet sain. Il constitue 55 % du volume total du sang.

L'isolement du plasma est effectué par simple centrifugation du sang total. Ceci permet de séparer par gravité les cellules sanguines de leur liquide biologique, après ajout d'un anticoagulant, et de récupérer le surnageant. Le liquide jaunâtre que l'on observe après cette opération est le plasma sanguin.

Le **plasma sanguin** est composé à 91 % d'eau, et contient une grande variété de solutés. Parmi ces solutés, on trouve :

1. les solutés minéraux.
2. les gaz respiratoires (O₂, CO₂)
3. Les solutés organiques.

On peut distinguer deux grandes catégories dans cette classe de solutés.

- Les substances en transit : les nutriments (lipides, glucides, acides aminés), les déchets métaboliques (urée, acide urique, bilirubine), et les hormones.
- Les protéines plasmatiques (60 à 80 g/l) : ensemble, elles ont un effet tampon qui contribue à maintenir le pH à 7,38, à équilibrer la pression osmotique et oncotique et à conférer au sang sa viscosité (consistance).

Protéines plasmatiques

Le plasma contiendrait trois cents protéines différentes. Les protéines les plus représentées en proportion sont les suivantes :

- Albumine. : + de 50 %
- Anticorps (Immunoglobulines): 20 % (essentiellement des IgG)
- Fibrinogène : 5 %
- Alpha 1 antitrypsine : 4 %
- Alpha 2 macroglobuline : 4 %
- Transferrine : 3 %
- Lipoprotéines (HDL et LDL) : 8 %

Un plan d'expériences a été effectué dans le but d'explorer l'influence des dilutions sur la capacité de l'albumine humaine (HSA) utilisée en tant que protéine cible à pH=4,2.

V. 5. 2. Description de l'expérience

Pour la séparation de la HSA l'expérience est réalisée sur une fraction protéique plasmatique humaine. L'expérience consiste à utiliser notre support d'affinité pour la fixation sélective de la protéine (HSA) du plasma sanguin, notre support constitue un matériau solide sur lequel sont immobilisées les molécules de colorant se liant spécifiquement à ladite protéine plasmatique.

Pour immobiliser cette protéine du plasma sanguin sur le support, comprenant une étape au cours de laquelle on met en contact un échantillon de plasma contenant la protéine plasmatique avec le support d'affinité. La solution de départ étant déjà très concentrée (dilution au 1/16) elle subit ensuite plusieurs dilution aux demis. Le pH de la suspension est ajusté à 4,2 avec le tampon phosphate PBS 0.2 M.

Comprenant aussi les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon contenant la protéine du plasma sanguin avec le support d'affinité,
- b) libérer la protéine à partir des complexes formés à l'étape (a),
- c) récupérer ladite protéine du plasma sanguin sous une forme purifiée. Le filtrat et les éluats suivants sont récupérés et leur teneur en protéines est suivie par la mesure de l'absorption à 650 nm (D.O).

V. 5. 3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

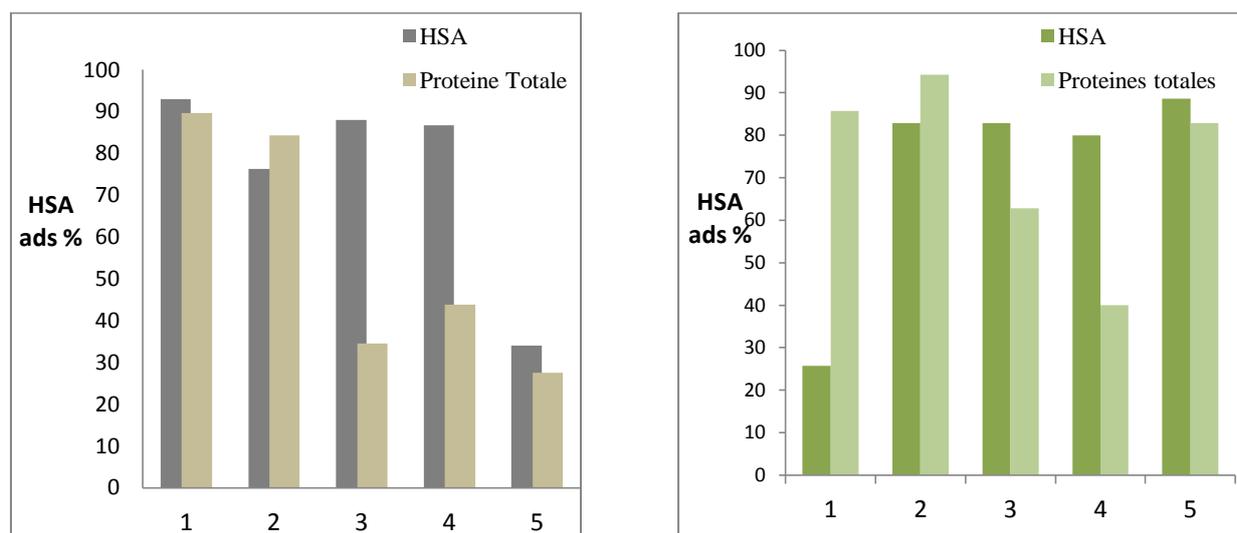


Figure V. 32 : illustre un profil d'histogrammes obtenu suite à la purification de la HSA a partir d'un plasma humain avec les supports d'affinité préparés a). **PS-BCP** b) **PSSO₃H**.

Aux concentrations moyennes le rendement de cette fraction est compris entre 95 et 90% en Albumine. Le concentré de cette protéine obtenu est de haute pureté, est fortement enrichi en HSA, la fixation de celle-ci sur le support est nettement plus grande que la totalité des protéines en présence, mais renfermant encore d'autres constituants.

Par contre aux faibles et très forte concentrations les fractions de ces concentrations renferment pratiquement les mêmes quantités, mêmes rendements des différents constituants. Les autres fractions séparées sont également intéressantes pour les protéines qu'elles contiennent, à savoir le fibrinogène, et autres.

Puisqu'aux faibles concentrations presque la totalité des constituants protéiques sont adsorbés d'une manière aléatoire, les sites de fixations à la surface de notre support sont disponibles.

Aux fortes concentrations la vitesse initiale d'adsorption est telle que le phénomène a lieu d'une manière aléatoire conduisant à un mélange de constituants adsorbés à la surface du matériau.

La figure V.33 montre que le rendement en HSA est influencé principalement par la dilution (dans la zone optimale : pH= 4,2).

Pour ce qui est des résines PS-SO₃H on peut noter : Le rendement de cette fraction en Albumine n'est pas aussi intéressant puisqu'on peut observer la présence et en quantités aussi importantes du reste des protéines concurrentes. La fixation de celle-ci sur le support n'est pas exclusive, mais renfermant encore d'autres constituants.

V. 6. ETUDE CHROMATOGRAPHIQUE

Dans la première partie nous nous sommes attachés à faire des rappels biochimiques sur : la structure, la biosynthèse et le rôle de l'albumine, ainsi que l'étude clinique (pathologique). Quant à la deuxième partie, nous avons procédé à la purification de l'albumine humaine par la chromatographie d'affinité sur le colorant immobilisé, qui est une approche efficace pour la purification des protéines à usage analytique ou thérapeutique.

V. 6. 1. Etude de l'adsorption de l'albumine sur colonne de PS-BCP

Les effets de la concentration initiale de la HSA et la force ionique sur la capacité d'adsorption de la HSA sur le PS-PBC ont été étudiés. Les expériences ont été menées en discontinue dans des conditions bien définies, au préalable la résine (5g) a été coulée dans une colonne sous un débit constant de 0,25 ml / min afin d'obtenir un lit de gel homogène, lavée à l'eau distillée pour éliminer le colorant libre puis équilibrée avec le tampon initial (T_0) d'adsorption acétate de sodium-acide acétique à différentes forces ioniques entre 0,025, 0,05 et 0,1M, pH à 4,2. L'albumine humaine à la concentration de 10 mg a été solubilisée dans 1 ml du tampon initial puis déposée sur la résine. Dans ces conditions une fraction d'albumine non adsorbée est récupérée dans le tampon de lavage. La fraction adsorbée est éluée de la colonne en utilisant différents tampons d'éluion.

En jouant sur la force ionique en utilisant comme tampons : Tris-HCl 0,1M, pH 8, 2, Tris-HCl 0,05M- Sodium Thiocyanate 0,5M, pH 8, 2, Tris-HCl 0,1M-NaCl 1M, pH 8, 2, Tris-HCl 0,1M-CNNaS 1M, pH 8, 2, Tris-HCl 0,1M - CNNaS 0,5M, pH=8, 2, acétate de sodium 0,5 - NaCl (1M).

V. 6. 2. Résultats et discussion :

Les études d'adsorption ont été effectuées dans la colonne en changeant la force ionique sur la phase mobile entre 0,025, 0,05 et 0,1 M.

Pour le premier tampon d'adsorption (Acétate de Sodium 0,025M, pH 4,2), le fractionnement de l'albumine humaine sur le PS-PBC a permis d'obtenir 2 fractions (2pics). La première fraction est obtenue lors de l'étape de lavage de la résine par le tampon initial T0. La fraction adsorbée est éluée par l'application d'un deuxième tampon **T1** (Tris-HCl 0,05M, Sodium Thiocyanate 0,5M, pH = 8,2) (Figure 9). Le dosage protéique de l'albumine dans ces deux fractions par la méthode de Bradford a permis d'obtenir une capacité d'adsorption du PS-PBC à l'interface de 56,9% (Tableau VIII.6).

Tableau V. 7 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis du PS- PBC en présence de l'Acétate de Sodium 0,025M, pH 4,2.

HSA	Fraction de HSA non adsorbée	Fraction de HSA adsorbée	Fraction de HSA Récupérée
Quantité en mg	4,31	5,69	5,65
Rendement en %	-	56,9%	99,3%

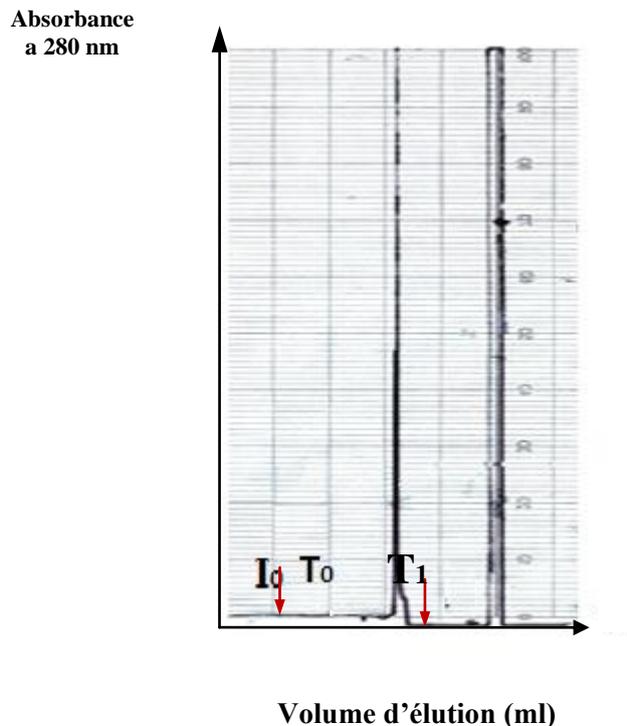


Figure V. 33 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'élution de la HSA sur le polystyrène Fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), T0 (Acétate de sodium 0,025M pH 4,2), T1 (Tris-HCl 0,05M-Sodium Thiocyanate 0,5M, pH 8,2).

Pour le deuxième tampon d'adsorption (Acétate de Sodium 0,05M, pH 4,2), le fractionnement de l'albumine humaine sur le PS-PBC a permis d'obtenir aussi deux fractions (2pics) (Figue 33) dont la première est récupérée lors de l'étape de lavage de la résine. La deuxième fraction adsorbée est éluee de la colonne par l'application successive de trois tampons d'élution différents T1 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 1M, pH 8,2), T2 (Tris-HCl, 0,5M, CNNaS 1M, pH 8,2) et T3 (Tris- HCl 0,05M-CNNaS 0,5M, pH 8,2). La détermination de l'albumine dans ces deux fractions a permis d'obtenir une adsorption à l'interface moindre de l'ordre de 45,4% (Tableau VIII. 7).

Tableau V. 8 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis du PS-PBC en présence de l'Acétate de Sodium 0,05M, pH 4,2.

HSA	Fraction de HSA non adsorbée	Fraction de HSA adsorbée	Fraction de HSA éluée par le tampon T1	Fraction de HSA éluée par le tampon T2
Quantité en mg	5,46	4,54	1,77	2,52
Rendement %	-	45,4%	39 %	55,5%

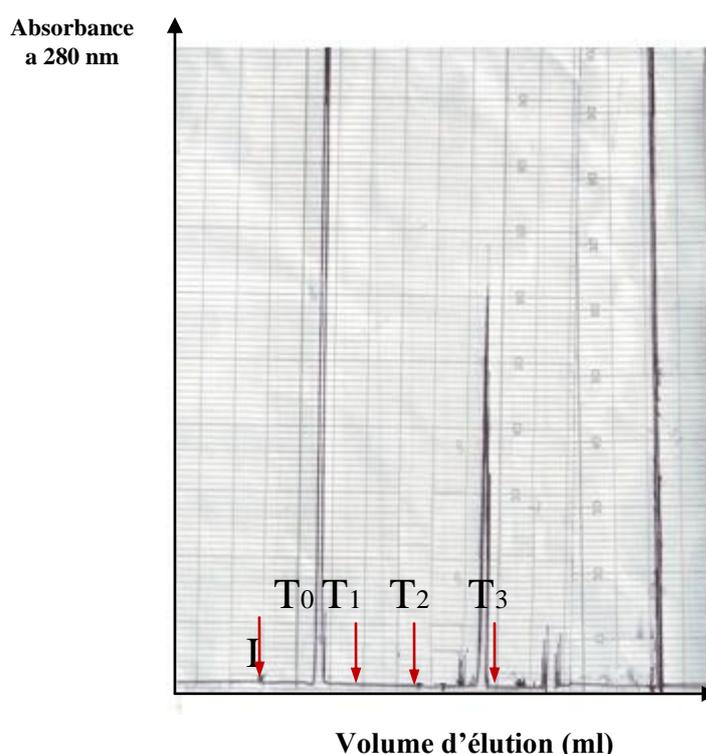


Figure V. 34 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'élué de la HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésol. I(Injection), T0 (Acétate de Sodium 0,05M, pH 4,2), T1 (Tris-HCl 0,1M, NaCl 1M, pH 8, 2), T2 (Tris-HCl, 0,5M, CNNaS 1M, pH 8, 2), T3 (Tris- HCl 0,05M, CNNaS 0,5M, pH 8, 2).

En fin, l'adsorption de l'albumine sur le PS-PBC dans un tampon de molarité élevée (Acétate de Sodium 0,1M, pH 4, 2) a donné lieu de la même manière que les essais précédents à deux fractions (Figure 34 et 35), dont l'une est récupérée lors de lavage de la résine et l'autre lors de l'application des tampons d'élué T1 (le Tris-HCl 0,1M, pH 8, 2) et T2 (le Tris-HCl 0,05M-Sodium Thiocyanate 0,5M, pH 8, 2) (Tableau 8). Au regard de la teneur de l'albumine non

adsorbée par rapport à l'albumine injectée, il ressort que la force ionique du tampon exerce un effet défavorable sur son adsorption sur le PS-PBC. En effet dans ces conditions l'adsorption de l'albumine à l'interface a diminuée presque d'environ 40 % par rapport à une force ionique faible (tableau5).

Tableau V. 9 : Capacité d'adsorption de l'albumine humaine vis à vis du **PS-PBC** en présence d'Acétate de Sodium 0,1M, pH 4,2.

HSA	Fraction de HSA non adsorbée	Fraction de HSA adsorbée	Fraction de HSA éluée par le tampon T1	Fraction de HSA éluée par le tampon T2
Quantité en mg	6,31	3,69	1,5	2,03
Rendement %	-	36,9%	40 %	55%

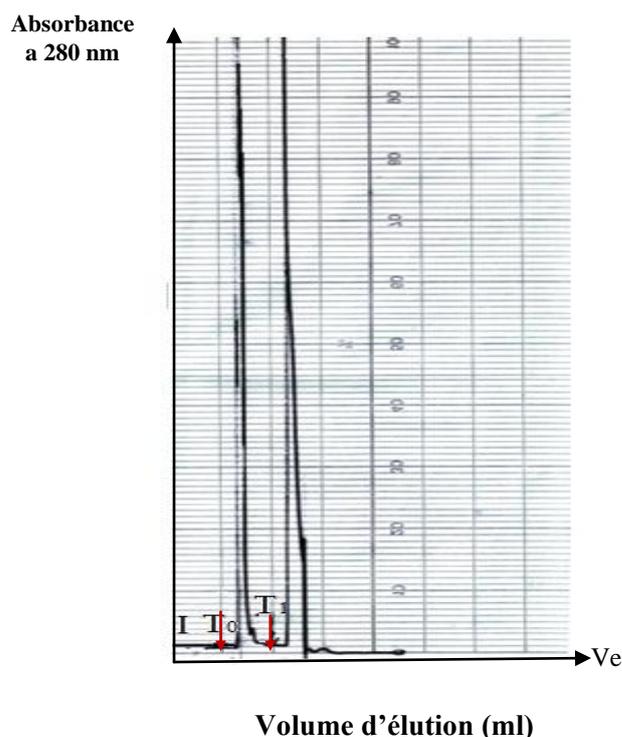


Figure V. 35 : Profile Chromatographique d'adsorption et d'éluion de la HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésolé. I(Injection), T₀ (Acétate de sodium 0.1M a pH4,2), T1 (Tris-HCl 0,1M, pH8,2).

L'analyse spectrophotométrique des deux fractions de l'albumine (adsorbée et non adsorbée) récupérées sur le support PS-PBC préparé au niveau du laboratoire de biochimie appliqué par la méthode de Bradford a permis d'établir les meilleures conditions d'adsorption et désorption.

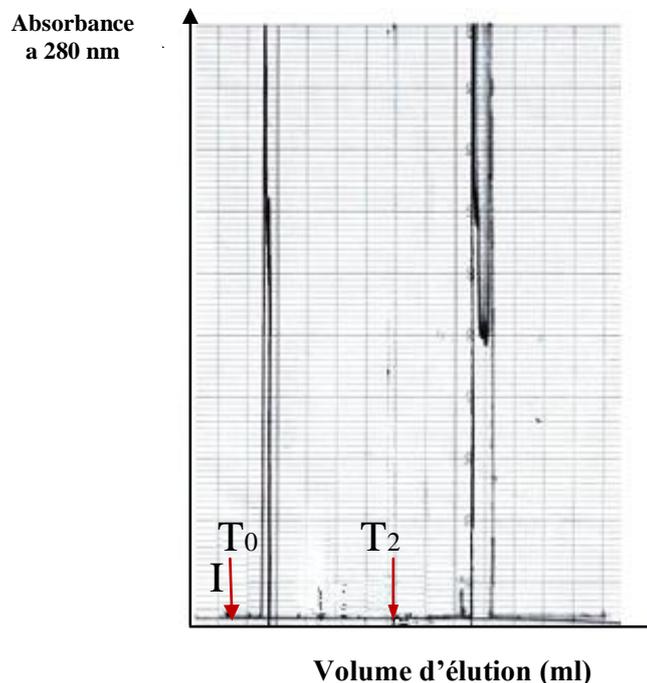


Figure V. 36 : Profile chromatographique d'adsorption et d'élution de HSA sur le polystyrène fonctionnalisé par le violet de bromocrésolé. I(Injection), V_e (Volume d'élution), T0 (Acétate de sodium 0.1M a pH 4, 2), T2 (Tris-HCl 0,05M, Sodium Thiocyanate 0,5 M, pH 8, 2).

Les résultats obtenus à l'étape d'adsorption, ont montré que le contenu de la HSA adsorbée sur le PS-PBS varie entre 45, 4 % et 56, 9 % à 0, 05 M et 0 ,025 M respectivement. A force ionique élevée de 0,1 M seulement 36,9 % ont été adsorbées. L'élution avec différents tampons a permis de récupérer la totalité de l'albumine adsorbée par le Tris-HCl 0,05 M, Sodium Thiocyanate 0,5 M, pH 8, 2.

Ces résultats sont proches des études précédentes effectuées par plusieurs auteurs (Evrin Banu Altinta., Adil Denizli, 2006) qui ont démontré à travers leurs études que la capacité d'adsorption est inversement proportionnelle à la force ionique [163].

A la lumière de ces résultats, il ressort que la force ionique joue un rôle important dans l'adsorption de l'albumine et doit être ajustée de telle manière à améliorer plus les performances de ce système (pH, F_i , concentration initiale).

Les méthodes chromatographiques restent toujours les procédés les plus efficaces dans le domaine de fractionnement des protéines ; elles sont considérées comme des méthodes de séparation performante et d'un intérêt aussi bien à l'échelle préparative qu'analytique et qui donne des substances de grande pureté avec un haut rendement.

Dans notre étude nous avons essayé d'améliorer se fractionnement et trouver les meilleures conditions de séparation et de purification d'albumine sur le polystyrène-violet de bromocrésol en effectuant une variation du pH d'une part et de la force ionique d'autre part.

Les résultats obtenus lors de l'étape d'adsorption, ont montrés que le contenu de HSA adsorbée sur le PS-PBS varie entre 45, 4 % et 56, 9 % à 0, 05 M et 0, 025 M respectivement et seulement 36, 9% a été adsorbé à 0,1 M. l'élution de la l'albumine par différents tampons a montrée que la totalité de l'albumine adsorbée a été récupérée par le Tris-HCl 0,05 M -Sodium Thiocyanate 0,5 M, pH 8, 2.

Donc on a pu constater que la capacité d'adsorption varie en fonction de la force ionique (plus la force ionique est forte plus l'adsorption est faible).

Au regard des résultats obtenues, on peut dire que la chromatographie d'affinité sur colorant immobilisé est acceptable comme un procédé de purification.

V. 6. 3. Chromatographie d'affinité de l'albumine sérique humaine (HSA) sur PS-SO₃H

V. 6. 3. 1. Détermination de la concentration de l'albumine

Le contenu de l'albumine dans les différentes fractions recueillie au niveau du détecteur a été déterminé à 280nm.

L'Adsorption d'affinité de l'albumine sérique humaine (HSA) pour le poly (styrène de sodium sulfonate) de gel de perles a été réalisée par chromatographie sur colonne en utilisant du phosphate différent systèmes tampons à différents pH (Na₂HPO₄, 20 mM - Acide citrique à pH allant de 4,6 à 5,2 et 20 mM Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ 20 mM de pH entre 7,4 et 8,2). Tout d'abord, le gel perles en suspension dans un tampon dégazé départ à un pH donné a été emballé pour LKB 2136 la colonne (4 x 1,14 cm I.D.) pour atteindre l'équilibre.

Toutes les étapes chromatographiques ont été effectuées à température ambiante sous un débit de 15,0 ml/h avec un système automatisé LKB Système de chromatographie en phase liquide (pompe péristaltique, détecteur UV, le mélangeur de gradient et collecteur). Ensuite, un millilitre de sérum-albumine humaine à 1mg/ml en suspension dans le tampon phosphate à un pH d'équilibre proposée a été appliquée dans la colonne qui a été lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm d'effluents atteint à la ligne de base. L'élution HSA a été atteint au même débit en utilisant un gradient de pH en continu (20 mM d'acide citrique, pH 4,6 et Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,2). Des fractions de 3 ml ont été collectée, concentrée et soumise à une analyse quantitative à l'aide du Coomassie brillant bleu 'G'. Après chaque expérience, la colonne a été régénérée par plusieurs lavages jusqu'à ce que l'absorbance atteigne zéro et rééquilibrée en la mémoire tampon suivante de départ à un pH donné.

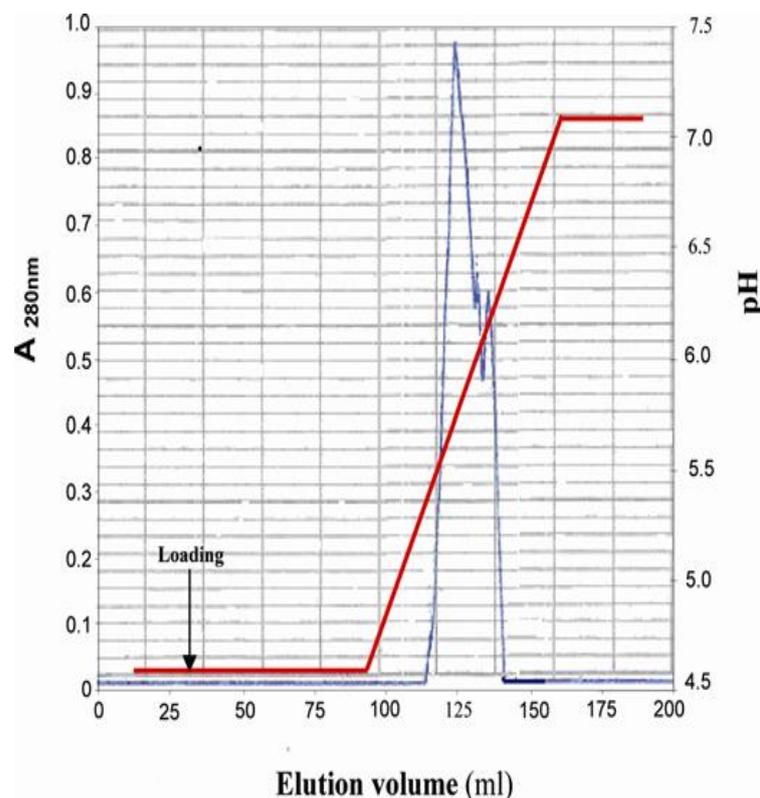


Figure V. 37 : Profile chromatographique d'adsorption et d'élution de la HSA sur le Polystyrène sulfonate de sodium **PS-SO₃Na**.

V. 6. 3. 2. Résultats et discussion

Chromatographie d'affinité de l'albumine sur un adsorbant 'Dye-like'

La première étape de la chromatographie d'affinité consiste à immobiliser sur un support chromatographique un des groupes fonctionnels appropriés, qui possèdent une forte affinité envers la macromolécule biologiques correspondante. Dans cette étude, le polystyrène sulfonate insoluble sur lequel groupes, le groupe chimique des colorants principal a été mis en place afin de lui conférer une dyelike propriété vers l'albumine a été étudiée. En outre, le pH d'adsorption était choisi de manière à éviter le phénomène de l'échange ionique entre le positif net charge de l'albumine et de la charge négative de groupe sulfonique ($-\text{SO}_3^-$) fixé de manière covalente sur le réseau de polystyrène.

Les résultats obtenus ont montré que l'albumine a été fortement adsorbée sur le les billes de gel de (*polystyrène sulfonate de sodium*) sous forme de phase stationnaire dans des conditions isocratiques (Figure 4). À un pH compris entre 4,6 et 5,2, la presque plein d'adsorption de l'albumine était observée et l'augmentation du pH de la phase mobile à partir de la valeur neutre permet éluant 70% de la teneur initiale en albumine, calculée à partir d'une courbe d'étalonnage.

Albumine à ces pH correspondant au point isoélectrique existe la plupart du temps sous forme de zwitterions et d'adsorption de albumine à l'interface est probablement due à des interactions électrostatiques entre environ 100 protoné amino, guanidino et groupes latéraux imidazole (-NH_3^+) de l'albumine et de l'des groupes acide sulfonique (-SO_3^-) des billes de gel du support.

D'autre part, les interactions hydrophobes contribuent aussi au phénomène d'adsorption entre le noyau aromatique et les chaînes alkyles des billes de *polystyrène sulfonate de sodium* et les sites acides gras de l'albumine [164]. Ce résultat est en accord avec concluion générale que l'ASH est plus fortement adsorbé à son point isoélectrique sur les surfaces hydrophobes [165, 166].

Dans la gamme de pH basique à un pH de 8,2 en particulier la capacité d'adsorption de l'albumine humaine est élevée de façon significative à l'interface et on a obtien plus de 80% en teneur de la charge éluée. L'adsorption de HSA à ce pH a été très probablement régie par desb modifications structurelles des molécules de protéines.

Le (*polystyrène sulfonate de sodium*) est un gel dont des billes sphériques sont préparées par polymérisation radicalaire en suspension présentant une grande capacité d'adsorption de l'albumine humaine en solution et constitue ainssi un moyen efficace comme adsorbant 'dye-like' pour sa purification à partir de sources différentes soit après précipitation avec du sel ou de l'alcool ou en combinaison avec un échangeur anionique au lieu du 'Bleue Trisacryl-M'.

En fait, l'albumine est bien adsorbé sur la colonne du polymère fonctionnel et on élue juste par ajustement du pH de l'éluant, qui joue un rôle important dans le phénomène d'adsorption en favorisant les interactions hydrophiles ou hydrophobes impliquées en interfaces. D'autre part, ces résultats confirment la réversibilité des interactions et refléter l'importance du substituant sulfonâtes greffés sur un support *polystyrène sulfonate de sodium*.

Ces billes de polymères fonctionnalisées par des groupes sulfonâtes lui confèrent des propriétés et une adsorption similaire à celle de certains colorants, d'acides aminés, chélateurs d'ions métalliques immobilisés. Un autre avantages et qu'il peut être utilisée de manière efficace dans une chromatographie d'affinité en tant que phase stationnaire dans le procédé de purification de l'albumine provenant de sources différentes.

Chapitre VI :

SYNTHÈSE DU POLYSTYRÈNE MODIFIÉ PAR LE BROMOCRESOLE POURPRE ET PORTANT UN BRAS ESPACEUR « EDA »

VI. 1. Introduction :

Nous avons envisagé que l'adsorption de la protéine au support solide (PS-PBC) préparé dans la première partie de ce mémoire pouvait être limitée par l'encombrement stérique. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une diamine comme bras espaceur pour une meilleure sélection et plus forte adsorption. Cela nous permettrait de fixer beaucoup plus de protéines et afin de vérifier si les sélections fonctionnaient.

Afin de compléter cette étude comparative du point de vue chromatographique, l'introduction d'un bras espaceur s'avère critique pour la fixation correcte du ligand PBC sur le support et ainsi l'adsorption de la protéine à purifier la HSA.

Cette partie se rapporte donc à l'introduction d'un bras espaceur (ou agent de pontage) possédant 2 atomes de carbone et deux amines libres à l'extrémité qui permettent sa fixation sur le support d'un côté et le greffage des molécules de colorant de l'autre côté, à son procédé de fixation au support solide, ainsi qu'à l'utilisation de ce bras espaceur pour la fixation de molécules de colorant, et enfin nous examinerons l'influence du bras espaceur sur la rétention et la sélectivité de la HSA.

En s'inspirant des travaux précédents [167-171] nous avons mis en place une stratégie de synthèse de supports aminés, par l'introduction de bras espaceur portant une fonction amine selon deux différentes voies selon la nature des groupes fonctionnels portés par le polystyrène :

. le support solide **PS-SO₂Cl** dont nous avons précédemment mis au point l'élaboration [172], et

. le support solide **PS-CH₂Cl** : du type résine de MERRIFIELD (marque déposée),

commercialisée par la société ALDRICH, le produit obtenu est physiologiquement inerte.

Dans les deux cas, l'étape de greffage laisse sur le support la fonction amine primaire libre, qu'il est possible d'exploiter par la suite dans la réaction de greffage des molécules du colorant 'PBC'.

Avec ce support solide, nous avons cherché à immobiliser la molécule de PBC avec le minimum de variations structurales ou fonctionnelles. D'après ces résultats, il semble que le PS ainsi modifié, et plus particulièrement le PS-SO₂Cl qui permet d'obtenir les meilleurs résultats en termes de rendement et d'accès.

Comme indiqué précédemment, les particules de départ se présentent sous la forme de billes ayant un diamètre de 200 µm environ à l'état sec, le taux de réticulation du polystyrène par du divinylbenzène est de 2 %. Ce support présente une meilleure résistance aux pressions

internes [168]. En effet l'utilisation de polystyrène présentant un taux de réticulation inférieur à 2% (de l'ordre de 1%) aboutit à des résines instables. L'utilisation de polystyrène présentant un taux de réticulation supérieur à 5% aboutit à des résines difficiles à fonctionnaliser. L'activation devient difficile car l'accès au cœur de la bille est entravé par la densité du squelette.

Les billes utilisées pour réaliser cette opération sont composées d'un PS type gel (Fluka) sur lequel on a fixé de façon covalente les différentes molécules objet des différentes étapes de cette synthèse. Avec un tel support, il semble possible de substituer environ 90% des groupes fonctionnels. Toujours dans le même but, il a également été proposé de coupler le PS à une diamine partant d'un PS chlorométhylé gel **Merfield®**.

Nous avons donc, en effet mis au point un nouveau procédé de préparation (synthèse et conditionnement) de résines de polystyrène fonctionnalisées contenant jusqu'à 65% de fonctions sulfamide. Ces résines sont capables d'adsorber spécifiquement la HSA permettant ainsi leur utilisation comme adsorbants pour la fabrication de colonnes d'épuration. Ainsi, cet espaceur est avantageusement compatible avec nos objectifs.

VI. 2. SYNTHÈSE DE RÉSINES PORTANT UN BRAS ESPACEUR AMINE

Afin de lier le colorant **B_{CP}** au support par liaisons covalentes, on fait apparaître sur le support des fonctions chimiques réactives. Ces fonctions ont été créées afin de greffer un composé bifonctionnel (bras espaceur) qui comporte une fonction capable de former une liaison covalente avec les fonctions portées par le colorant. Ce composé permet de fixer le colorant à une certaine distance du support et d'avoir une meilleure accessibilité de la protéine au substrat.

Afin d'établir de telles liaisons covalentes comme mentionner ci-dessus, entre le ligand et le bras espaceur, deux types de réactions sont mises au point en fonction de la nature du substrat de départ qui est le PS.

Le solvant lors de cette réaction joue un rôle primordial. En effet, celui-ci doit donner un taux de gonflement de la résine maximum pour permettre la meilleure diffusion possible dans la matrice polymérique et une accessibilité accrue aux fonctions réactives présentes sur le polymère (PS et PS chlorométhylé pour la résine Merrifield). Des études sur ce sujet [173] ont démontré que les solvants tels que le dichlorométhane, dioxane étaient les mieux adaptés car ils donnaient un facteur de gonflement meilleur pour les résines de types polystyrène-DVB.

La voie de synthèse (greffage du ligand PBC sur le support fonctionnel) que nous avons explorée a été le greffage par une réaction à partir d'un groupement fonctionnel contenant un

atome de chlore labile : CH_2Cl ou SO_2Cl , pour produire le support fonctionnalisé sur lequel on souhaiterait greffer d'une façon covalente le bras espaceur qui est l'Ethylènediamine 'EDA'.

Enfin, l'immobilisation du ligand, impliquant la réaction du PS porteur du bras espaceur terminé par une fonction amine avec l'atome de Brome porté par la molécule de colorant 'PBC'.

L'immobilisation s'effectue alors en trois étapes distinctes :

- une première étape de fonctionnalisation des supports qui consiste en une modification chimique de leur surface par des molécules actives (agents de couplage) qui vont assurer la fixation du bras espaceur sur le support
- une deuxième étape d'immobilisation consistant à établir une liaison covalente entre ces molécules et le ligand. En faisant réagir la molécule bifonctionnelle de l'EDA sur la surface ainsi activée.
- et enfin le couplage de la molécule du colorant via une réaction des groupes NH_2 avec l'atome de Brome dans la molécule de colorant.

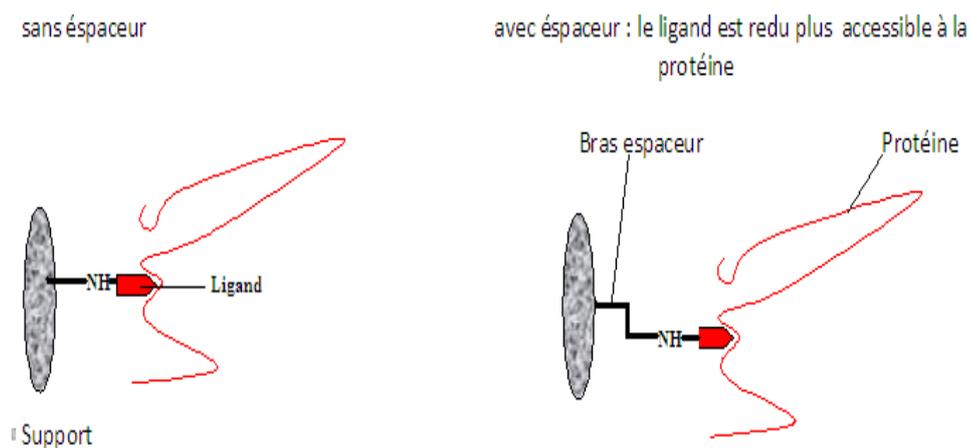


Figure VI. 38 ; Schéma de la réaction d'attachement de EDA au support PS.

La « chaîne espaceur » désignée [EDA] dans les composés de formules (I et II) a pour fonction d'éloigner physiquement le colorant (molécule volumineuse) de la surface du support solide et de permettre une mobilité relative par rapport à la surface du support solide sur lequel il peut être immobilisé. La chaîne espaceur limite ou évite que des encombrements stériques, dus à une trop grande proximité du support solide, gênent les événements de liaison entre ligand et la protéine plasmatiques susceptibles d'être mises en contact avec celui-ci. Deux voies sont donc exploiter.

VI. 2. 1. RESINE AMMINE DERIVEE DU PS-CHLORIOSULFONIQUE (voie A)

Dans cette partie du travail, l'activation des billes de PS (Fluka) par chlorosulfonation, dans une méthode simple [171], qui permet la préparation de polystyrène (PS) réticulé au DVB activés par des groupes chlorosulfonyles est décrite et leur surface analysée. A cet effet, les analyses FTIR, de microscopie et de thermogravimétrie ont été utilisés afin d'analyser quantitativement les modifications apportées.

Il est montré [172], que la substitution aromatique électrophile du polystyrène pur dans de l'acide chlorosulfonique est extrêmement rapide avec une conversion presque complète des surfaces par des groupes chlorosulfoniques obtenus après seulement un temps de réaction de 10 minutes à -5°C . Il est en outre démontré que la réaction est très sélective en surface et que, même après des temps de réaction aussi longtemps que 3 heures, la modification est limitée à une couche d'une épaisseur de moins d'un micron.

Les billes de PS ainsi activées sont encore traitées, dans une deuxième réaction avec le PCl_5 [172], après cette réaction les groupes sulfoniques sont quantitativement convertis en groupes chlorosulfonyles. Après chlorosulfonation les surfaces activées peuvent être quantitativement converti en solution hétérogène à température ambiante en groupes sulfamide par réaction avec une amine aliphatique bifonctionnelle l'éthylènediamine ($\text{H}_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$) par formation de liaisons sulfamides.

1. Description

Les billes $200\ \mu\text{m}$ (Fluka) utilisées pour réaliser cette opération sont composées d'un PS de type gel sur lequel on a fixés de façon covalente les différentes molécules outil des étapes successives de cette synthèse. Avec un tel support, il semble possible de substituer environ 96 à 98% des cycles aromatiques. Récemment, il a également été proposé, un procédé de préparation de supports à base de polystyrène fonctionnalisés par des fonctions sulfonâtes ($\text{PS}\cdot\text{SO}_3\text{H}$), et sulfamide ($\text{PS}\cdot\text{SO}_2\text{AA}$).

C'est ainsi que dans l'article de C. Boisson-Vidal *et al.* J. Mat. Sc., 1991, 2, 193-196, il est proposé des résines à base de polystyrène, substituées avec la cystéine. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la résine constituée par du polystyrène modifié à de l'acide.

2. Preparation :

Les billes de polystyrène non fonctionnalisés sont des billes de polystyrène réticulé par du divinylbenzène. Elles sont préalablement mises à gonfler dans un milieu de solvation du

polystyrène qui est le dichlorométhane. Le gonflement des billes de polystyrène dans le milieu de solvataion permet d'augmenter la surface accessible afin que le réactif puisse pénétrer totalement les billes de façon à avoir un rendement important.

La préparation des résines de formule (I) se fait en deux étapes principales : la chlorosulfonation qui permet d'introduire des fonctions chlorosulfonyles sur les noyaux aromatiques du polystyrène, puis la fixation des groupes NH_2 libres de l'éthylènediamine par l'intermédiaire des groupes chlorosulfonyles.

Les résines de polystyrène réticulé à 2 % et sont fonctionnalisées par des groupements sulfonates et sulfamide, répondent à la formule (I) suivante :

Cette de synthèse peut être représenté, par le schéma général I ci-après,

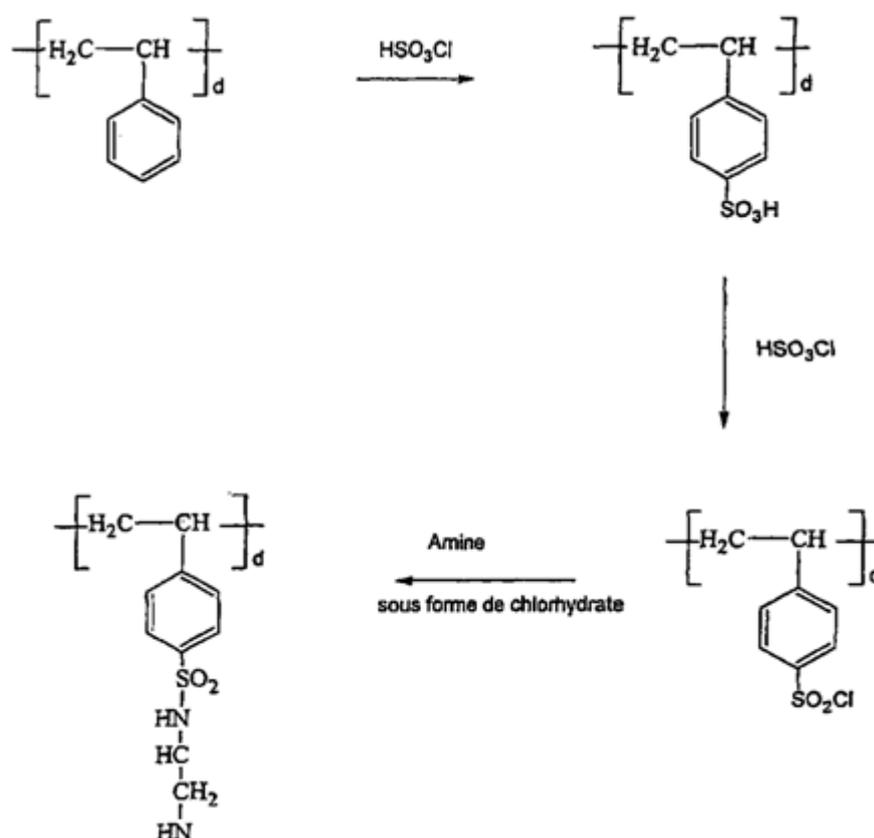


Figure VI. 39 : Schéma de la réaction de synthèse de la résine PS modifiées, voie (I).

Dans une première étape on effectue une réaction de chlorosulfonation consistant à faire réagir de l'acide monochlorosulfonique (HSO_3Cl) (en excès) sur des billes de polystyrène natives (PS, Flukka) réticulé à 2%, dans un rapport molaire $\text{HSO}_3\text{Cl}/\text{PS}$ légèrement supérieur à 2, pour obtenir un polystyrène portant des fonctions parachlorosulfonyles (PS-SO₂Cl) avec des taux très

élevés jusqu'à 96%. Une réaction successive avec le PCl_5 comme agent de chloration dans laquelle les groupements sulfoniques sont également convertit en groupements chlorosulfoniques afin d'améliorer le rendement des réactions jusqu'à 99%. Puis dans une deuxième étape, greffage du bras espaceur, qui consiste à aminer les fonctions parachlorosulfoniques (SO_2Cl) du polystyrène $\text{PS-SO}_2\text{Cl}$ ainsi obtenu, par l'éthylenediamine (EDA) sous la forme de chlorhydrate préalablement dissout dans un milieu solvant organique DCE en présence d'une diamine l'EDA, le rapport molaire SO_2Cl /amine (R) étant 0,5, pour obtenir une résine de formule (I) telle que définie ci-dessus.

À la fin les résines se présentent généralement sous la forme de billes ayant un diamètre compris entre 200 et 250 μm .

Cette synthèse peut être représentée, de façon simplifiée, par le schéma général ci-après, voie (I).

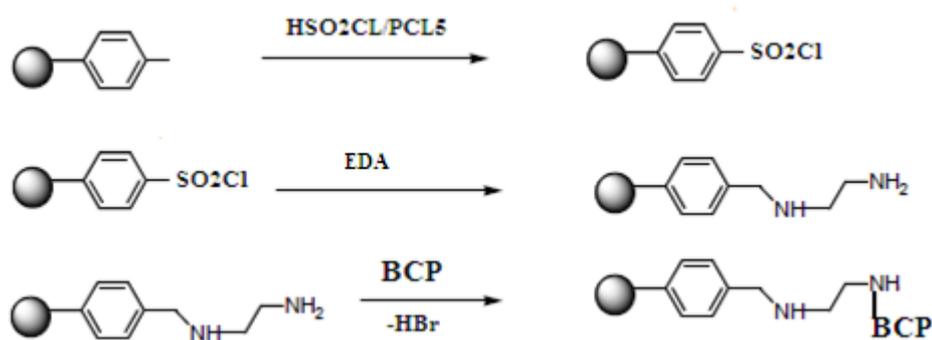


Figure VI. 40 : Schéma de la réaction de fixation du PBC sur résine PS modifiées, voie (I).

La réaction de chlorosulfonation de la première étape s'effectue, après gonflement du PS dans du dichlorométhane, en deux sous-étapes :

. l'acide chlorosulfonique réagit sur le polystyrène non fonctionnalisé et conduit à la formation d'un intermédiaire le poly(sulfonique)styrène, et ensuite à la formation du poly(parachlorosulfonyl)styrène.

La réaction de chlorosulfonation se fait à une température de 50°C , pendant 4 heures environ, ceci dans le but d'augmenter la vitesse de la réaction et sous agitation douce de façon à éviter le broyage des billes de polystyrène. Ces conditions ont permis d'obtenir des rendements de l'ordre de 99%. Et des rendements en billes sphériques de l'ordre de 80 à 90%.

A la fin de la première étape, la résine de $\text{PS-SO}_2\text{Cl}$ est lavée d'une part avec du dichlorométhane afin d'éliminer l'acide en excès et d'autre part avec de l'acétone afin d'éliminer

toutes traces d'acide restant dans le milieu et de faciliter le séchage de la résine. Avant d'effectuer la deuxième étape, les billes de PS-SO₂Cl sont séchées puis mises à gonfler dans le même milieu de solvation tel que ceux utilisés lors de la première étape, de façon à augmenter la surface accessible au réactif utilisé lors de la deuxième étape.

Au cours de cette deuxième étape, la fixation de l'amine se fait par condensation de la forme chlorhydrate de ce dernier sur le PS-SO₂Cl dans un solvant anhydre, en présence d'une amine tertiaire la triméthylamine (NEt₃). L'amine tertiaire transforme le chlorhydrate en amine libre qui réagit ensuite avec le polystyrène chlorosulfonique. La solution d'amine est mise en contact avec la résine PSSO₂Cl préalablement mise à gonfler. L'acide chlorhydrique généré au cours de la réaction est neutralisé par addition d'amine tertiaire telle que la NEt₃ dans le milieu réactionnel.

La détermination de la quantité de réactifs (amine) à utiliser dépend du taux de fonctions SO₂Cl fixées lors de la première étape qui est déterminé par dosage argentimétrique. Ce taux, exprimé en milliéquivalents par gramme de résine (**meq/g**), sert de base de calcul pour déterminer les quantités de réactif à utiliser.

Lors de la première étape, le rendement de chlorosulfonation est égal à au moins 96%, soit entre 4,5 et 5 meq de chlore par gramme de résine ou entre 4,5 et 5 mmol de fonctions SO₂Cl par gramme de résine.

Les quantités d'amine à utiliser sont calculées à partir des rapports molaires suivants :

- $R = \text{DEA} / \text{PSSO}_2\text{Cl} = 0,5$;
- $R' = \text{PBC} / \text{DEA} = 2$

Lorsque la synthèse est terminée, la résine ainsi obtenue est filtrée, lavée abondamment à l'eau ensuite avec un alcool tel que l'éthanol, puis séchée sous vide à une température 60 °C.

Il est également souhaitable d'éliminer toute trace de chlore de façon à ce qu'il soit le plus faible possible et de préférence égal à 0%. Pour ce faire, la résine est lavée avec une solution de soude apte à hydrolyser les fonctions parachlorosulfonyles résiduelles. Au bout d'une dizaine de lavages, le taux de chlore résiduel devient négligeable. Entre chacun de ces lavages, les résines sont abondamment lavées à l'eau distillée.

Le taux de chlore des résines est également déterminé par dosage argentimétrique des ions chlorure libérés après hydrolyse d'un échantillon de la résine en suspension dans une solution aqueuse de soude.

Le taux d'amine peut également être déterminé par dosage acidimétrique de la fonction sulfonique libérée par hydrolyse préalable par une solution aqueuse de soude.

3) Caractérisation des résine préparées :

Le taux réel de EDA greffé sur la résine a été estimée par deux méthodes, l'une sur la base du nombre de moles de l'ion chlorure libéré, l'autre basée sur la base de l'estimation des groupes amine libres par quantification IR (voir figure **VI. 47**).

a) Caractérisation de la résine PSSO₂Cl

Des échantillons de la résine PS-SO₂Cl obtenue sont prélevés afin de déterminer le taux de chlore de cette résine. Cette analyse est effectuée par dosage argentimétrique, comme suit : 100 mg de résine PS-SO₂Cl sont hydrolysés à l'aide de 50 ml d'une solution de soude 2 M. Le mélange est maintenu sous agitation douce pendant 4 heures au reflux, à une température comprise entre 90 et 100°C. La résine PS-SO₂Cl ainsi hydrolysée est filtrée et rincée avec de l'eau distillée. Le filtrat est ensuite acidifié à un pH compris entre 3 et 4 par addition d'acide nitrique 1 M. La solution est ensuite dosée par une solution de nitrate d'argent 0,1 M de façon à déterminer le taux de chlore.

Les résultats de l'analyse montrent que environ 86% des substituant sont des groupes chlorosulfonyles (SO₂Cl) le reste 14% sont des groupes sulfonyles (1,2 meq/g SO₃H). La réaction de chlorination, de la deuxième étape, consiste à convertir tout les groupes SO₃H en SO₂Cl (Fig. IX. 38). Plus de 99,5% en groupes chlorosulfonyles sont obtenu (5,4 meq/g) et le reste 0,5% en groupes sulfonyl (0,03 meq/g).

Une analyse microscopique des billes de PS-SO₂Cl et une analyse élémentaire sont également effectuées.

b) caractérisation de la résine aminée

200 mg de résine obtenue ci-dessus à l'étape 2 sont hydrolysés avec 100 ml d'une solution de soude 2 M, à 50°C pendant 24 heures. La résine est ensuite filtrée, lavée à l'eau distillée et séchée à l'étuve. 190 mg de résine ainsi hydrolysée sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée et dosés par une solution titrante de soude à 0,1 M.

Table VI 10: Analyses des résines *MR* and *MR* modifiées. La résine présente les caractéristiques suivantes

Méthodes	Résultats					
Observation microscopique	Les billes présentaient une forme sphérique et une distribution de taille hétérogène légèrement supérieure à celles des billes d'origine.					
Dosage acidimétrique	SO ₃ H (meq/g)			PS	SO ₃ Na	
	5,4			0,1%	0,4%	
Analyse du Cl ⁻ , NH ₂	Cl	NH ₂	PBC	PSSO ₂ Cl	NH ₂	PBC
	5,4meq/g	1,8	1,6	99,5%	30,5%	30%

VI. 2. 2. RESINE AMINE DERIVEE DU PS-CHLOROMETHYLE (voie B)

Dans cette partie, nous décrivons une deuxième procédure (voie B) de fixation du bras espaceur aminé sur les billes de PS chlorométhylé Merrifield (*MR*) permettant ainsi l'immobilisation de molécules du ligand 'PBC' sur support solide.

L'utilisation de résines à base de polystyrène réticulées *MR* en tant que support solides, est de plus en plus important en raison de leur stabilité, leur compatibilité élevée et de bonnes caractéristiques de gonflement avec un large éventail de solvants non polaire. Ces résines, cependant, ne parviennent pas à accomplir tout les objectifs notamment lorsque des solvants polaires sont nécessaires en raison de l'accessibilité entravée les sites réactifs. La modification des surfaces solides des résines *M.R* avec des molécules polaires et solubles tels que le les amines a été rapportée dans la littérature. TentaGel et ArgoGel avec l'acide Aspartique fixé à du polystyrène réticulé a 2 % sont largement utilisés dans des préparations d'échantillons, la synthèse organique, la technologie des capteurs et comme supports chromatographique. Ce travail a également pour objet de décrire un procédé de préparation des résines de polystyrène fonctionnalisé de formule (II). Ce procédé de synthèse peut être représenté, par le schéma II ci-après,



Figure VI. 41 : Schéma de la réaction de synthèse de la résine PS modifiées, voie (II).

La Synthèse à l'aide d'une méthode classique avec EDA [174-176], d'une résine fonctionnalisée portant un bras espaceur à l'une de ses extrémités une fonction amine primaire, dont nous rapportons ici une procédure pratique et rapide de préparation utilisant une résine Merrifield disponible dans le commerce, suivie par l'immobilisation finale par de la molécule de BCP (voie B).

Pour les mêmes raisons que précédemment, les billes de polystyrène Merrifield (polystyrène chloro- méthylés réticulé par du divinylbenzène), sont préalablement mises à gonfler dans un milieu de solvation approprié qui est le dioxanne. Le gonflement des billes de polystyrène dans le milieu de solvation permet d'augmenter la surface accessible afin que le réactif puisse pénétrer totalement les billes de façon à avoir un rendement important.

1. Description

Les billes 200 μm PS (Merrifield **MR**) utilisées pour réaliser cette synthèse sont composées d'un PS de type gel sur lequel sont fixés au préalable et de façon covalente les groupes chlorométhylène qui serviront dans l'étape ultérieure de cette synthèse. Il est possible de substituer environ 25 à 30% des cycles aromatiques avec ce support.

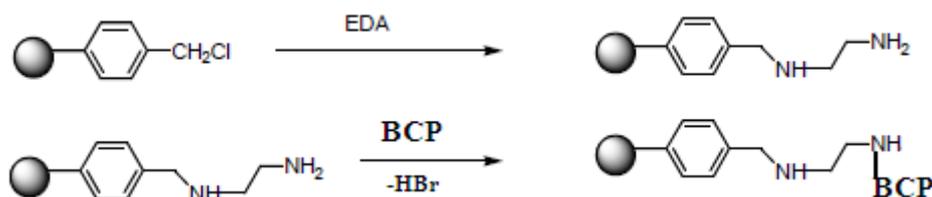
2. Preparation : La synthèse comporte les étapes suivantes :

a) préparation de la résine : Les billes de polystyrène chlorométhylées **MR** sont des billes de polystyrène réticulé elles sont donc préalablement mises à gonfler dans un milieu de solvation du polystyrène qui est le dioxanne. Le gonflement des billes de polystyrène dans le milieu de solvation permet d'accroître la surface accessible afin que le réactif puisse pénétrer complètement les billes de façon à avoir une efficacité plus significative.

b) la préparation d'un support solide fonctionnalisé comportant des fonctions amine terminales par le greffage d'un bras espaceur diaminé 'EDA'. La résine Merrifield contenant préalablement les groupes chlorométhylés subit dans ce cas une substitution nucléophile biomoléculaire (SN2) [177, 178].

Procédé de préparation de résines de polystyrène fonctionnalisé de formule (II), telles que schématiser ci-dessous, caractérisé par le fait que dans une première étape on effectue une réaction de fonctionnalisation consistant à faire réagir l'amine de l'Éthylènediamine (EDA) sur des billes de polystyrène chlorométhylé (PS-CH₂) réticulé à 2%, dans un rapport molaire NH₂/CH₂Cl supérieur à 2, préalablement gonflées dans un milieu solvant organique 'Dioxanne' en présence d'une amine tertiaire NEt₃, la réaction est effectuée à une température de 60°C.

Pour obtenir enfin un polystyrène portant des fonctions amines libres (-NH₂), qui serviront par la suite à la fixation des molécules du ligand le colorant. Cette synthèse peut être représentée, de façon simplifiée, par le schéma général ci-après, voie (II).



* **MR** : Merrifield

Figure VI. 42 : Schéma de la réaction de fixation du PBC sur résine MR modifiées, voie (II).

3. Synthèse d'une résine Merrifield (MR) modifiée par une diamine:

Pour déterminer les conditions optimales de synthèse : l'effet de la réticulation, le pourcentage de chlorure dans *MR*, ainsi que les conditions de synthèse, sur le rendement du polymère ont été revues. Les données fournies montrent que l'utilisation du PS ayant un taux de réticulation plus élevé et une résine *MR* avec un nombre élevé de sites réactifs conduit à une amélioration des rendements en % de polymère modifié. Une synthèse efficace (76,5% des sites modifiés) a été obtenue par l'utilisation de l'EDA et de la résine Merrifield ayant 2% réticuler avec une moyenne de 1,25 mmol Cl/g (voir le tableau **VI. 11**).

C'est sur la base du nombre des meq de chlorure de la résine Merrifield de départ (1,25 meq/g), basé sur les meq d'ions chlorure libérés après la réaction; déterminés à partir de l'analyse argentimétrique [179] entre la résine de départ et le produit après réaction donc de la perte de chlorure.

Les données du tableau ci-après indiquent que 0,45 meq DEA (sur la base de l'ion chlorure libérer) ont été incorporé dans la résine MR (meq/g).

Synthèse : 1g de PS est mit en suspension dans 20 ml de DCE pendant deux heures à T_a, cette opération est destinée à assurer un gonflement du polymère, puis 10 ml de DEA sont lentement ajoutés, la suspension est agitée pendant 3heures à T= 60°C. La résine est filtrée, lavée dans un mélange dioxane/HCl 3N. La résine est alors soumise à une suite de lavages-filtration qui seront effectuer pour tous les polymères synthétisés, à l'aide de mélanges eau/dioxane puis eau/méthanol et enfin avec du MeOH pur et du DCE. La résine est alors séchée à 60°C.

VI. 2. 3. CARACTERISATION DES RESINES PREPAREES :

Le taux réel de EDA greffé sur la résine *MR* a été estimée par les deux méthodes précédentes, l'une sur la base du nombre de moles de l'ion chlorure libéré (tableau VI. 11), l'autre basée sur la base de l'estimation des groupes amines libres par quantification IR (figure VI. 47).

VI. 2. 3. 1. Caractérisation de la résine PSCH₂Cl

Des échantillons de la résine PS-CH₂Cl obtenue sont prélevés afin de déterminer le taux de chlore de cette résine. Cette analyse est effectuée par dosage argentimétrique, comme suit : 100 mg de résine PS-CH₂Cl sont hydrolysés à l'aide de 50ml d'une solution de soude 2 M. Le mélange est maintenu sous agitation douce pendant 4 heures à reflux, à une température comprise entre 90 et 100°C. La résine PS-CH₂Cl ainsi hydrolysée est filtrée et rincée avec de l'eau distillée. Le filtrat est ensuite acidifié à un pH compris entre 3 et 4 par addition d'acide nitrique 1 M. La solution est ensuite dosée par une solution de nitrate d'argent 0,1 M de façon à déterminer le taux de chlore. Une analyse microscopique des billes de PSCH₂Cl et une analyse IR sont également effectuées.

VI. 2. 3. 2. Caractérisation de la résine aminée

200 mg de résine obtenue ci-dessus à l'étape précédente sont hydrolysés avec 100 ml d'une solution de soude 2 M, à 50°C pendant 24 heures. La résine est ensuite filtrée, lavée à l'eau distillée et séchée à l'étuve.

100 mg de résine ainsi hydrolysée sont mis en suspension dans 50 ml d'eau distillée et dosés par une solution titrante de soude à 0,1 M. Une analyse microscopique et une analyse IR sont également réalisées.

Table VI. 11 : Analyses des résines *MR* et *MR* modifiées :

Méthodes	Résultats					
Observation microscopique	Les billes présentaient une forme sphérique et une distribution de taille hétérogène légèrement supérieure à celles des billes d'origine.					
Dosage acidimétrique				PS		PBC
						0,47
Analyse du Cl ⁻ , NH ₂	Cl	NH ₂	PBC	PSSO ₂ Cl	NH ₂	PBC
	1,25meq/g	0,45	0,6	23,5%	11,1%	9,5%

VI. 3. PRÉPARATION DES RÉSINES FINALES (PS-EDA-BCP) :

Greffage du ligand

Les supports de type gel comme ceux utilisés dans ce cas (répertoriés dans les tableaux VI. 11 et 12) sont des plus importants. Ces supports présentent généralement une très bonne résistance mécanique et chimique et peuvent ainsi être régénérées. En revanche, leur réactivité est fortement dépendante du solvant de la réaction. Ceci est dû au fait que l'accès aux groupements fonctionnels dépend du taux de gonflement de la matrice dans un solvant donné.

Ainsi, en ce qui concerne la fixation du ligand, la réaction avec la surface du support solide (porteur du bras espaceur aminé) fait intervenir des fonctions amines libres. La fixation en surface de telles fonctions est assurée principalement par des liaisons de type sulfamides ou amine.

Immobilisation des molécules de colorant 'BCP':

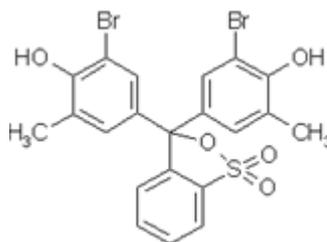
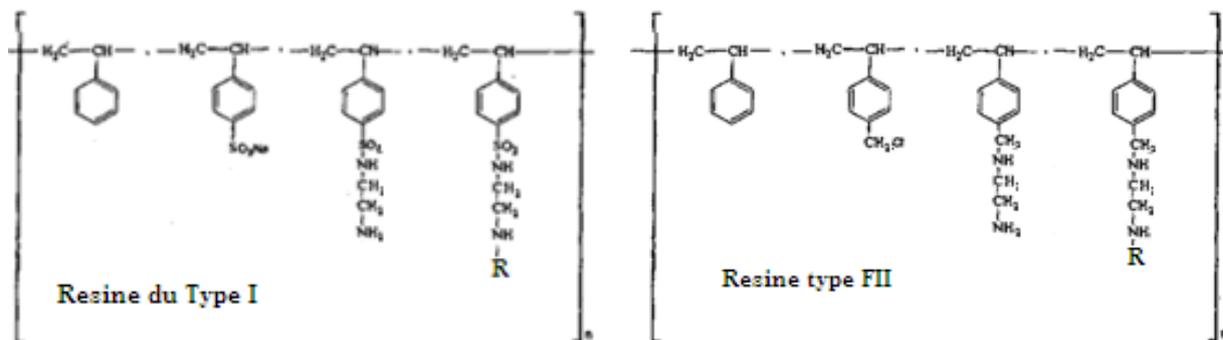


Figure VI. 43 : Structure du Violet de Bromocrésol 'BCP'.

Le BromoCresole Purple ou Pourpre de Bromocrésol utilisé comme ligand spécifique de la protéine plasmatique d'intérêt présente de nombreux avantages. De par sa nature le PBC possède une faible immunogénicité et une résistance importante à des conditions physico-chimiques stringentes (présence d'acide, d'un pH très acides ou très basique, utilisation de solvants organiques ou de température élevée) permettant des stratégies variées dans le cadre d'un usage en tant que ligand d'affinité des protéines. De plus sa sélectivité très importante.

L'atome d'azote de l'amine dans cette forme est suffisamment nucléophile pour déplacer le fluor du BCP (5',5''-dibromo-o-crésolsulfonephthaléine) figure VI. 44 et donner le polymère de structure finale. Les résines mixtes de polystyrène portant le ligand BCP ainsi que des groupements sulfonâtes et sulfamines, pour FI et des groupements chlorométhylés et aminés pour FII répondent aux formules suivantes :



dans lequel l'indice **n** est le nombre d'unités répétitives
 R = la molécule de Pourpre de Bromocrésol

Figure VI. 44 : Structure des deux résines préparées.

La réaction s'effectue en milieu hétérogène, composé de plusieurs phases peu compatibles, le polymère insoluble, le solvant organique et les réactifs hydrosolubles. Cette hétérogénéité ne permet pas d'obtenir un taux de substitution quantitative.

Pour essayer d'accélérer la réaction de substitution, un mélange d'eau/dioxane a été utilisé comme milieu réactionnel, l'eau très polaire et le dioxane peu polaire.

Les résines (porteurs d'un bras espaceur fonctionnalisé par une fonction amine (C-NH₂), sont suspendues dans un mélange constituant du tampon phosphate PBS (Phosphate-Buffered Saline) de pH 8, composé de 2 parts d'eau et de dioxane 1 part. Des billes 1g sont recouvertes de 50 ml de solution du colorant. Après réaction lente du tampon PBS à une température de 40°C toute une nuit.

Lavages des billes : Pour finir, les surfaces sont lavées dans des bains successifs de plus en plus stringents : eau pure pendant 40 minutes, puis SDS à 10 % à 80°C pendant 40 minutes, et enfin SDS à 10 % sous agitation pendant environ 20 minutes.

Après chaque étape de synthèse, les résines sont soumises à une série de caractérisations physico-chimiques. En particulier, l'observation microscopique des résines permet d'avoir des informations sur la forme et la distribution de taille des particules avant et après chaque étape de synthèse.

La détermination du taux de substitution de chaque résine est effectuée par analyse des groupes constitutifs de la résine.

En fin de synthèse, les fines particules provenant des cassures éventuelles des billes de polystyrène lors des différentes étapes de la synthèse sont éliminées. Cette élimination est réalisée par une série de lavages et de centrifugations successifs des résines en solution tampon

jusqu'à clarification totale du surnageant. Ces dernières sont équilibrées dans un tampon phosphate au pH physiologique (7,4). Une analyse microscopique et une analyse chimique sont également réalisées.

Les principales caractéristiques structurales des résines de formule (I) et (II) Ainsi préparées ont été étudiées et sont représentées dans la table (VI.1) ci-après :

Tableau VI. 12 : Les résines **FI** et **FII** obtenues ci-dessus à l'étape IV présentent les caractéristiques suivantes :

Résine	Diamètre des billes	Taux de substitution PBC (meq/g)		Densité da dg		taux de Gonf
FI: PSSO₂- EDA-BCP	200-230 µm <i>Valeur estimative</i>	30%	1,6	0,74	0,6	70%
FII: PS- EDA-BCP		9,5%	0,6	0,5	0,85	60%

Rem : Avant son utilisation, la résine est conditionnée par une succession de lavages et de centrifugations afin d'éliminer toute trace d'impuretés qui pourraient interagir avec les protéines plasmatiques.

VI. 4. CONDITIONNEMENT

Le conditionnement (ou reconditionnement) de la résine est généralement réalisé en mettant en contact ladite résine- avec une solution tampon acétate de sodium pH 4,7 ; cette mise en contact avec la solution tampon peut être éventuellement précédée et/ou suivie d'un rinçage de la résine avec le solvant majoritaire du liquide à traiter, par exemple avec de l'eau distillée.

Remarque : Toutes les résines utilisées dans cette étude sont à l'état de particules sphériques, les éventuels fragments résultant de la synthèse et du conditionnement sont éliminés par des centrifugations successives. Avant toute étude des interactions des résines avec la protéine, les résines sont lavées successivement avec une solution 1,5M de chlorure de sodium, une solution 1M de citrate de sodium puis la solution tampon utilisé dans l'étude.

VI. 5. CARACTERISATION

Les billes seront caractérisées aux différents stades de traitement par microscopie optique. Ceci devrait permettre de mieux comprendre les modifications de surface accompagnant les deux étapes réactionnelles de liaison du bras espaceur au support puis de l'albumine au bras espaceur. La caractérisation des résines synthétisées a été effectuée à l'aide de 4 méthodes : argentimétrie, spectroscopie Infrarouge dosage acidimétrique et nous présentons aussi des photos de microscopie optique effectués sur les échantillons de résine sèches.

1. Methodes :

a. Acidimétrie : Les résines possédant des propriétés acide-base peuvent être caractérisées par acidimétrie ; les dosages sont effectués en phase hétérogène aqueuse.

Des difficultés peuvent apparaître durant ces dosages elles sont liées principalement à la difficulté des échanges entre les phases, à la mouillabilité réduite de certaines résines, etc.

Cette méthode d'analyse permet de déterminer la quantité de groupements acides fixés sur le support. Les résines seront donc préalablement hydrolysées dans une solution de soude 2M à 50°C et lavées avant d'être analysées. Les résines étant insolubles le dosage se fait en phase hétérogène. L'analyse donne directement la quantité en meq/g des fonctions acides.

b. Argentimétrie : L'argentimétrie permet le dosage du chlore des résines de polystyrène chlorométhylées et chlorosulfonées ; il est effectué après hydrolyse par la soude ; les ions chlorures libérés sont titrés après acidification, par une solution de nitrate d'argent en présence d'un indicateur coloré.

c. Analyse FTIR : L'analyse spectres infrarouges permet une identification rapide des fonctions présentes dans les différents polymères. Après chaque étape de synthèse la disparition complète de l'adsorption caractéristique de la fonction à substituer, et l'absence de produits intermédiaires permet, de conclure à une substitution totale.

Les spectres infrarouges des résines à l'état sec ont été enregistrés sur un spectrophotomètre type PERKIN ELMER sur des pastilles d'environ 100mg obtenues par compression d'une poudre de polymère dispersée à 2% dans du KBr anhydre.

d. Propriétés de gonflement des résines Préparées : Des études de gonflement sur les résines ainsi préparées : Formules **I** et **II** ont été effectuées sur un volume de 1 ml de gradué de la résine (~ 200 mg) a été mis en suspension dans 10 ml de tampon et laisser reposer à température

ambiante pendant 30 min. A la fin de ce temps, le dernier volume de la résine gonflée a été enregistré.

Taux de gonflement : Une détermination approchée du taux de gonflement et de la densité a été faite pour chaque échantillon de résine. Pour cela, un poids P_s connu de résine native sèche, est placée dans du tampon. La méthode consiste à peser à l'état gonflé et de comparer son poids P_g au poids initiale à l'état sec P_s . Le taux de gonflement Γ est alors défini par la relation suivante :

$$\Gamma = \frac{P_g - P_s}{P_s}$$

La densité apparente des résines à l'état sec a été déterminée en utilisant la relation suivante :

$$d = \frac{P_s}{0,6P_s}$$

On constate que le taux de gonflement varie d'un échantillon à l'autre. Cette variation est quasi fonction de la nature des substituant.

Taux de gonflement de résines : De plus, on remarque qu'entre la résine polystyrène-DVB non fonctionnalisée et la résine polystyrène-DVB fonctionnalisée, leurs taux de gonflement restent sensiblement identiques.

Nous avons donc choisi de greffer nos ligands sur la résine de Merrifield en utilisant ces solvants.

Cependant, on remarque que les résines ainsi préparées sont devenues très hydrophiles et se comportent comme des hydrogels.

e. Analyse au Microscope optique : L'analyse des observations effectuées par MO, des modifications topographiques de la surface des billes a été réalisée au laboratoire des Polymères dept GP, université Sétif. Des photos Microscope Optique des supports FI et FII ont été réalisés (fig. III-10). Ces clichés mettent en évidence les différents dommages subits par ces billes.

Etat des billes :

Un contrôles qualitatif et quantitatif au microscope optique nous a permet de vérifier que l'échantillon n'est pas grossièrement détruit; puisque, on ne peut, localiser que quelques fragments de grains de dimension très différentes. Les rendements en billes sphériques étant de **80-90%**. On obtient en fin (après éclatement des billes) des fragments de taille et de morphologie très variables, ainsi que le révèle les clichés photographiques reproduits dans la figure IX.43.

Les figures II-5 a et b représentent respectivement les photos de billes traitées et non traitées. La comparaison des photos a et b souligne que la morphologie grossière des billes n'a pas été modifiée de façon remarquable, même si l'on croît discerner une légère augmentation de la rugosité. Pour essayer de préciser l'observation par Microscopie Optique, nous avons aussi

effectué une analyse par microscopie afin de visualiser l'état de surface et d'éventuellement mettre en évidence une évolution de la granulométrie (Figure II.6). Les images ont été effectuées par un appareil NT-MDT (Smena Head, Solver electronics) équipé d'un appareil photographique.

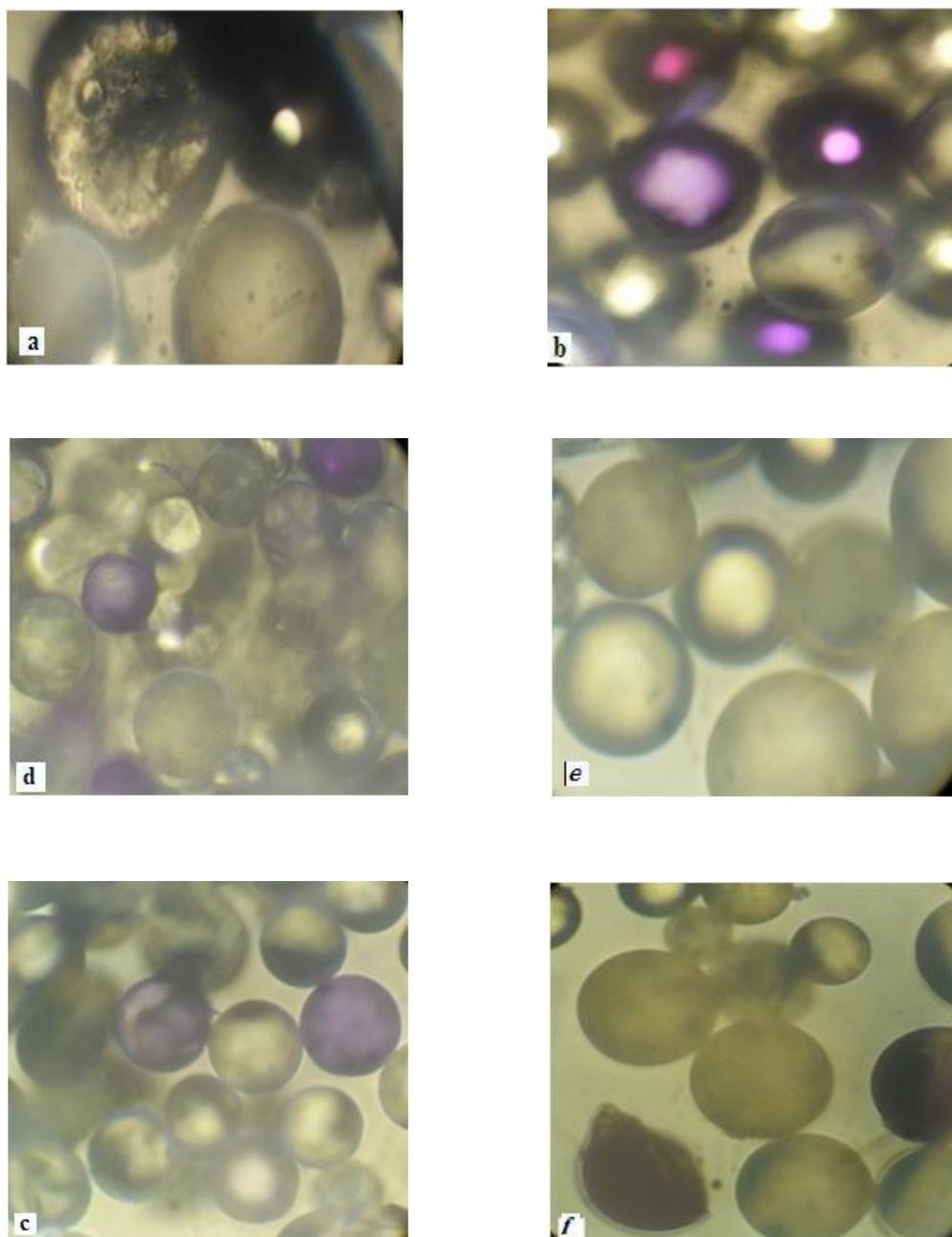


Figure VI. 45 : Photos au Microscope Optique, agrandissement 100x; Observations : Modification de l'aspect externe des billes. a) PS-SO₂Cl, b) PS-SO₂-EDA, c) billes de FI, d) PS-CH₂-Cl, e) billes de FII, f) illustrant l'état des billes ayant éclatées.

Granulométrie : Cette méthode nous a permis de mesurer les dimensions moyennes des particules à l'état sec. Elle nous a permis d'établir pour chaque population des différentes résines le taux de particules en fonction de leur état

L'analyse qualitative au microscope optique des résines natives révèle essentiellement la présence de fragments de billes de démentions et de morphologie variable qui ont été possible de quantifier.

Elle montre que si les particules ne sont pas rigoureusement identiques en diamètre elles sont en revanche assez semblables; en outre l'observation permet d'apprécier la morphologie de ces résines, et les détériorations qu'elles subissent en cours de synthèse (figure IX 46). Il semble que la résine **FI** a subi les dégâts les plus importants probablement du aux réactions successives qu'elle a subi durant la synthèse notamment l'emploi de l'acide chlorosulfonique. Par ailleurs, les tensions osmotiques dues à des forces de gonflement très élevées, ne peuvent plus être absorbées par l'élasticité du squelette et font éclater la bille.

VI. 6. RESULTATS ET DISCUSSION

L'obtention effective des fonctions chimiques désirées sur les chaînes de PS. Les diverses substitutions, dont certaines n'avaient jusqu'alors jamais été réalisées ont conduit à disposer de polymères dérivés du PS réticulé comportant à des taux importants, les constituants chimiques souhaités.

Dans les intermédiaires de synthèse, les polymères du PS-CH₂-Cl et PS-SO₂Cl contiennent du chlore en quantités importantes. Dans ce cas, les dosages du chlore ont été effectués par la méthode argentométrique (méthode de **Mohre**) et acidimétrique. Les résultats obtenus sont concordants.

Il apparaît ainsi que le taux de substitution du PS par des groupements NH₂ peut atteindre 80% des noyaux aromatiques. La spectroscopie infrarouge indique en outre que la substitution s'effectue principalement en position para, conformément aux observations antérieures [170, 172]. Dans le cas du PS-SO₂Cl, plus de 98% des noyaux sont porteurs d'une fonction chlorosulfonyle.

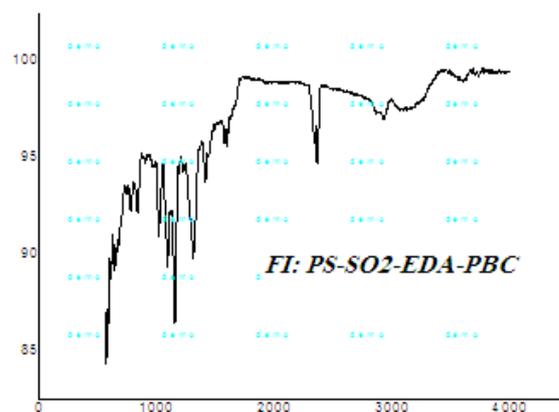
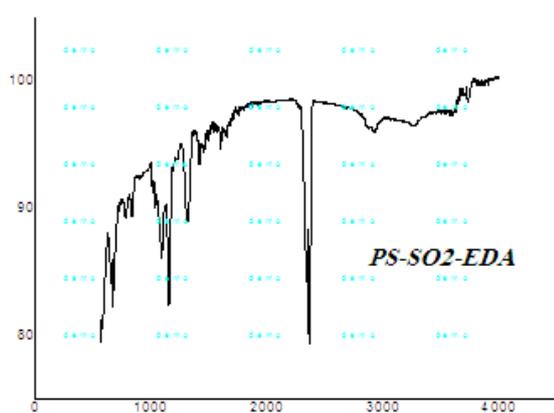
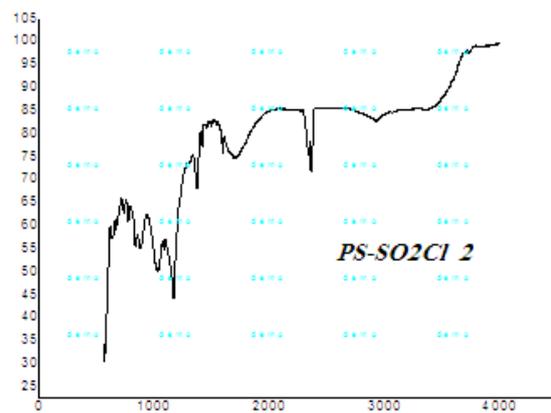
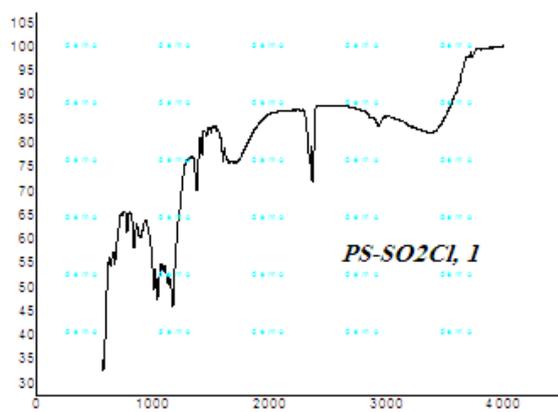
VI. 6. 1. Spectroscopie infrarouge

. Les résines aminées dérivées du PS-SO₂Cl :

Le spectre IR de ces différentes résines permettent de constater par la présence des fonctions amines la substitution effective du groupement chlorosulfonyle par des amines. La comparaison des spectres IR des polymères aminés avec celui de leurs précurseurs chlorosulfonyles indique que la réduction est presque totale.

L'analyse permet de confirmer les taux de substitution très importants réalisés qui sont supérieurs à 4 meq/g (75 à 80% des motifs styrène) ; il est à noter cependant que ces taux sont légèrement surestimés en raison de la présence de groupes formés au cours des étapes antérieures. Pour déterminer la composition des produits de décomposition, une analyse IR a été effectuée (Figure 26).

L'analyse chimique des surfaces modifiées a été effectuée par spectroscopie IR, une série de spectres d'échantillon de PS exposée aux différentes modifications effectuées. Le spectre du PS non modifié (figure 1a) montre principalement trois bandes significatives: deux à 1600 1490 cm⁻¹ correspondant aux cycles aromatiques, et l'autre à 1450 cm⁻¹ instance due à la déformation d'allyle CH de la chaîne polymérique principale;



FI

FII

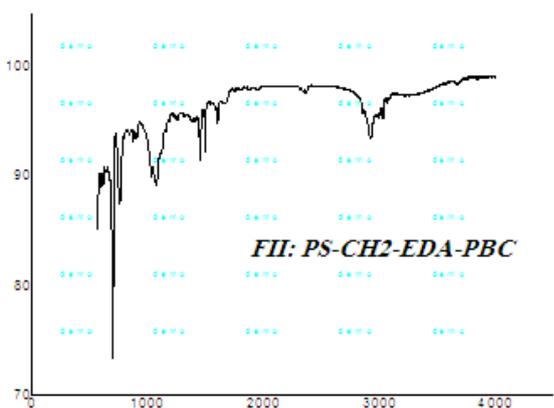
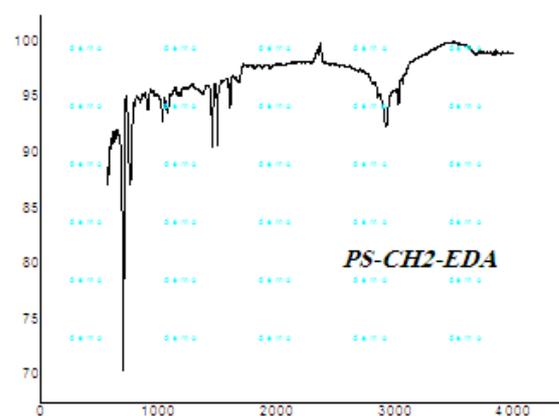
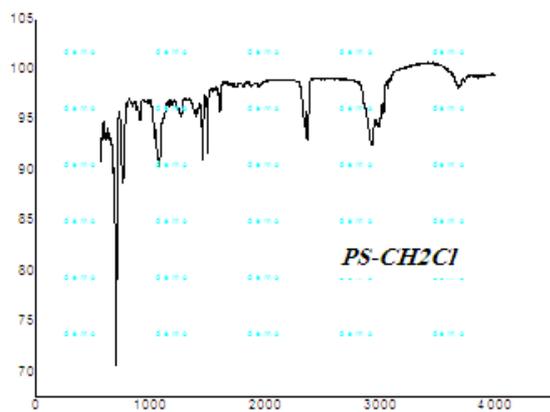


Figure VI. 47 : Spectres IR des résines préparées :
 Rem :1= Avec l'Acide chlorosulfonique
 2= Avec le PCL₅

Polystyrène chorosulfonyle : Lors de chlorosulfonation, le spectre IR est considérablement modifié et de nouvelles bandes fortes dues aux symétrique à 1370 cm^{-1} et asymétrique O=S=O liaisons de valence à 1170 cm^{-1} dans le groupe chlorosulfonyle peut être observée. En outre, une nouvelle bande apparaît à 830 cm^{-1} en raison de la formation de cycles aromatiques para-substitués.

Sur la figure **VI. 47**, le changement du Spectre FTIR du PS chorosulfonyle s'affiche lorsque il réagit avec la solution de la diamine aliphatique (éthylènediamine) : la bande symétrique due aux O=S=O à 1370 cm^{-1} disparaît complètement et apparaît à 1315 cm^{-1} des groupes sulfonamide; la bande asymétrique O=S=O à 1170 cm^{-1} est légèrement décalé vers 1152 cm^{-1} .

En outre de nouvelles bandes apparaissent à 1094 cm^{-1} dues a la liaison de valence C-N et les bandes à 3368 et 3279 cm^{-1} qui dues à la liaison de valence N-H associés et non associés, respectivement.

Pour déterminer quantitativement le degré relatif de modification des billes fonctionnalisées les intensités des bandes à 1450 cm^{-1} qui correspondent aux chaînes principales du PS non affecté par la réaction de modification et les intensités des bandes à 1370 cm^{-1} , qui sont dues à la liaison de valence O=S=O des groupes SO_2Cl à, sont utilisées

Polystyrene Chlorométhylé : Le Polystyrène modifié en raison de la présence d'un groupe chlorométhylène entraîne l'apparition d'une bande caractéristique à environ 1267 cm^{-1} et une augmentation de l'intensité de la bande à 840 cm^{-1} correspondants aux vibrations de tension due à la somme des groupes ($\text{CH}_2\text{Cl} + -\text{CH}_2-$). La différence d'intensité de la bande est directement liée au degré de fonctionnalisation atteint confirmant ainsi la réaction par la méthode employée. Les bands du PS chlorométhylé à 1267 cm^{-1} et 840 cm^{-1} de CH_2Cl et $\text{CH}_2\text{Cl} + \text{CH}_2$ sont éliminées dans la réaction avec l'amine portée par notre bras espaceur. De nouveaux signaux apparaissent pour le group amine secondaire à 1718 cm^{-1} , bande tension de 1391 cm^{-1} à 1346 cm^{-1} pour C-N-C amine primaire.

Les spectres infrarouges de la résine Merrifield modifié montrent une différence significative relativement au polymère d'origine, tels que la réduction de la bande $-\text{CH}_2\text{Cl}$ à 1262 cm^{-1} et l'apparition de nouvelles bandes dues à la présence de groupes NH_2 à 1630 et 1115 cm^{-1} . De même la bande affectée au groupe C--Cl disparaît dans cette modification. Une bande intense N-H apparaît à 3400 cm^{-1} et une bande faible N-H₂ apparaît entre 1650 cm^{-1} et 1640 cm^{-1} . La bande due à CH hors-plan aromatiques augmente en raison de la substitution. Une bande à 1383 cm^{-1} est obtenue due à la liaison CN, indiquant l'amination du polystyrène (Figure 3b).

Tableau VI. 13 : Bande des spectres infrarouges de la résine Merrifield modifié.

C– Br	Valence	600 – 750	F
	Élongation	650-500	mF
C-Cl	stretch	600-800	S
C_{sp^2} -H (aromatique) 1, 2, 3- trisubstitué	Déformation hors du plan	685 – 720	m
		770- 800	F
C_{sp^2} -H (aromatique) p-disubstitué	Déformation hors du plan	800 - 860	F
C_{sp^3} -H (CH_3)	Déformation	1365 - 1385	F

La spectroscopie infrarouge constitue une méthode de choix pour l'identification des structures azotées. Les amines primaires et secondaires peuvent en général être distinguées car elles possèdent des spectres assez caractéristiques.

Amines primaires

σ (cm^{-1})	3500 - 3400	1650 - 1550	1350 - 1250
Vibration	élongation N–H (doublet)	déformation N–H	élongation C–N

La fréquence d'absorption de la liaison C–N de l'amine apparaît vers σ (C–N) = 1300 cm^{-1} ce qui traduit un renforcement de la liaison dû à la participation à la résonance du doublet de l'azote. On observe un doublet chez les amines primaires qui est dû au couplage entre les deux vibrateurs N–H. Les vibrations peuvent être *symétriques* ou *non symétriques*.

Amines secondaires

σ (cm^{-1})	3400–3300	1600–1490	1350–1250
Vibration	élongation N–H (simple)	déformation N–H	élongation C–N

VI. 6. 2. Caractérisation thermique des résines préparées

En fonction des méthodes utilisées, l'étude du comportement thermique des polymères peut nous renseigner sur leur stabilité thermique et nous permettre de connaître leur température de transition vitreuse (T_g). Les techniques analytiques que nous avons utilisées sont l'analyse thermogravimétrique (ATG) pour déterminer la dégradation thermique des polymères et l'analyse calorimétrique différentielle (ATD) pour déterminer la température de transition vitreuse (T_g) de chaque polymère.

La stabilité thermique des fonctions ammonium a été testée en réalisant une ATG sur le polymère PS-PBC dans un domaine de température compris entre la température ambiante et 300°C. L'analyse thermo gravimétrique révèle 3 domaines de perte de masse. (Figure VI. 47).

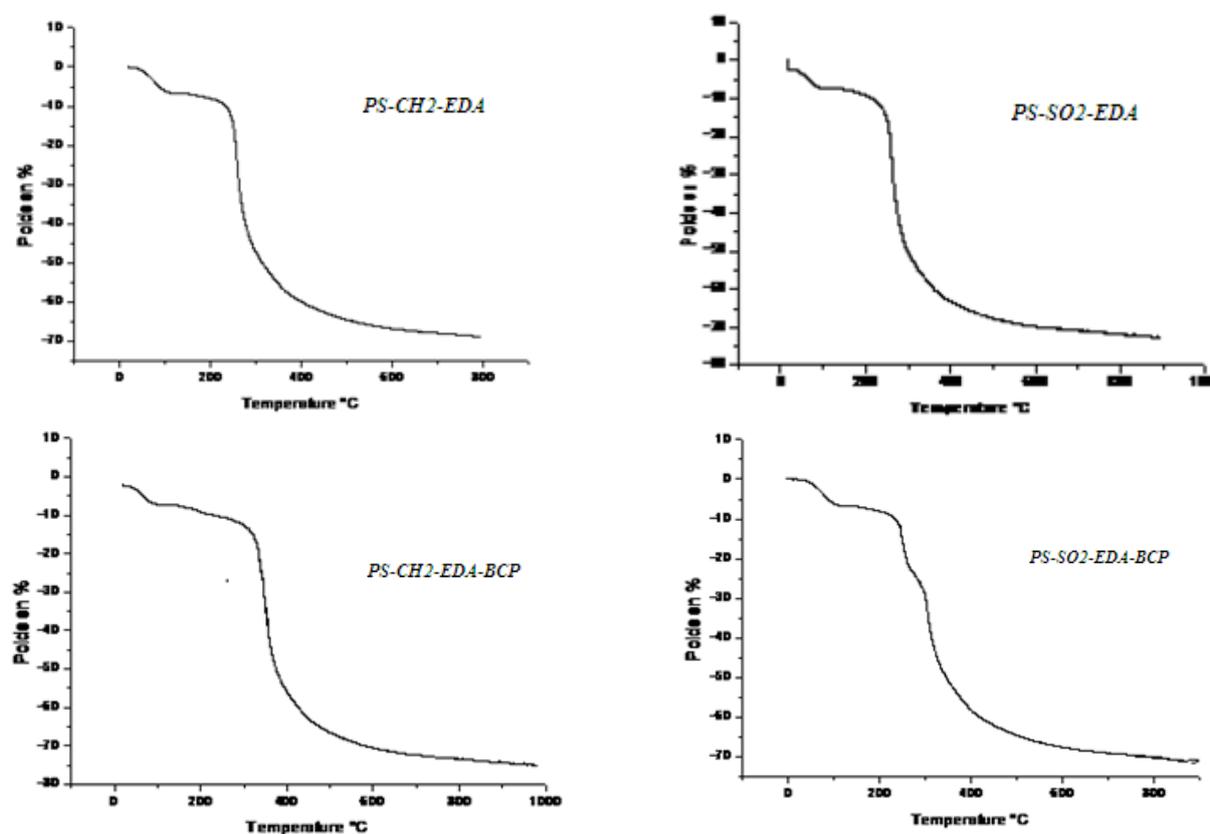


Figure VI. 47 : Spectre ATG des résines préparées, vitesse de chauffage 10°C/min.

VI. 6. 3. Discussion

Les différentes méthodes d'analyses appliquées à tous les polymères nous ont permis de les caractériser du point de vue de leur composition chimique moyenne. Il apparaît ainsi que nous avons pu synthétiser en phase hétérogène, une gamme de résines porteuses de groupements fonctionnels différents avec des taux de substitution variables. Il est à souligner que les synthèses finales sont originales, les produits correspondants n'ayant jamais été décrits.

- Si la diffusion est rapide et la cinétique de la réaction chimique est lente, la distribution des groupes chimiques dans la masse des billes est homogène
- si au contraire, la réaction est contrôlée par la diffusion des réactifs, la distribution est essentiellement hétérogène, la surface est alors constituée de molécules totalement substituées et cœur totalement vierge de toute fonctionnalisation entre les deux régions une zone dans laquelle le taux de substitution varie rapidement. Selon ces deux modèles, les résines obtenues ont des propriétés très différentes.

VI. 6. 4. Conclusion

La synthèse de différents résine de type gel contenant dans leur structure un motif diméthylamine-PBC fixé directement ou indirectement sur un noyau aromatique a été réalisée selon différents schémas réactionnels.

Parmi ces composés, le PS-CH₂-EDA-BCP '**FII**' et le PSSO₂-EDA-BCP '**FI**', composés originaux ont pu être obtenus avec une pureté suffisante pour être utilisés comme phase stationnaire en chromatographie de pseudo-affinité. Ces polymères présentent des capacités relativement hautes pour ce type d'application. Si la conversion des fonctions éthylènediamine en groupes PBC greffés sur les chaînes de polymères a été effectuée avec succès par une simple réaction d'élimination, il a été observé que la stabilité thermique de ces groupes était assez forte pour considérer ces polymères potentiellement intéressants pour élaborer des résines de susceptibles de fonctionner dans colonnes de chromatographie.

VI. 7. ESSAIS D'ADSORPTION DE LA HSA SUR LES RESINES PREPAREES

Une fois les composés synthétisée et caractérisée, il était nécessaire de les évaluer lors des tests biologiques de la HSA en solution pure et ensuite avec du plasma humain. L'albumine est en fait capable de se lier spécifiquement sur le support solide par l'intermédiaire de liaisons faibles non covalentes, y compris des liaisons hydrogènes, des forces électrostatiques ou des forces de Van der Waals.

Dans le but de vérifier l'impact des différentes modifications de surfaces sur l'adsorption protéique, Le paramètre-clé réside alors dans les propriétés physico-chimiques du support qui doit pouvoir être compatible avec une utilisation en milieu biologique.

Les isothermes d'adsorption de la HSA ont été donc déterminées pour chacun des deux supports préparés. Une expérience a également été réalisée en milieu compétitif avec un plasma humain.

VI. 7. 1. Isothermes d'adsorption de la HSA

VI. 7. 1. 1. Détermination des Isothermes d'adsorption

Dans cette partie, nous avons intentionnellement choisi de travailler dans un système purifié, c'est à dire dépourvu de toute autre protéine plasmatique que celle qui nous intéresse, à savoir l'Albumine humaine.

Nous avons donc essayé de tester l'affinité de cette protéine vis à vis des résines préparées. Les phénomènes d'adsorption se décrivent au moyen des isothermes d'échange reliant la concentration de la substance en solution (mg/mL) et la quantité adsorbée sur la phase solide (mg/g). Nous avons alors ressortis les différents paramètres qui expriment ce phénomène.

La solution de HSA à différentes concentrations, est mise à incuber à 25°C, avec une concentration donnée de résine pendant 20 mn après décantation de la résine, le surnageant est prélevé et sa concentration mesurée. Les isothermes d'adsorption sont établies en partant la concentration de HSA adsorbée en fonction de la concentration de HSA initialement introduite. Les concentrations sont lues sur une courbe d'étalonnage figure IX. 49.

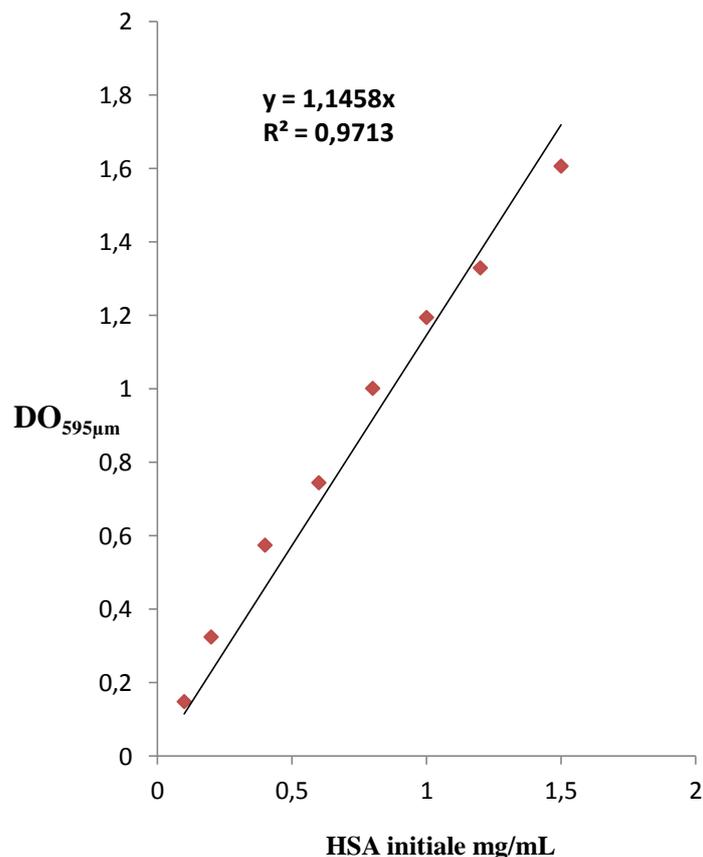


Figure VI. 48: Courbe d'étalonnage de la HSA

La figure (49) montre les isothermes d'adsorption des deux résines on constate que la concentration de HSA adsorbée sur les deux résines, augmente pour atteindre un plateau de saturation aux fortes concentrations. Dans l'hypothèse d'une adsorption de la HSA sur la résine, cette concentration au plateau de saturation représente la capacité d'adsorption limite de la résine pour l'albumine, les sites étant alors saturés.

Afin d'estimer l'adsorption de la HSA sur la résine préparées, des quantités de protéine sont incubées en présence d'une masse constante de polymère a Ta pendant 20 minutes à différentes dilutions Les concentrations choisies sont comprises entre 0,1 et 2mg/L. Les concentrations d'albumine en solution sont mesurées par spectroscopie UV-visible selon la méthode de Macart-Bradford [180]. Le taux de protéine dans le surnageant, permet de calculer la quantité de protéine adsorbée sur la résine ; celle-ci sont exprimées en taux de protéine par gramme de résine.

L'établissement des isothermes d'adsorption est effectué en portant la quantité de protéine HSA adsorbée par gramme de résine en fonction de la concentration initiale de la protéine à différentes dilutions.

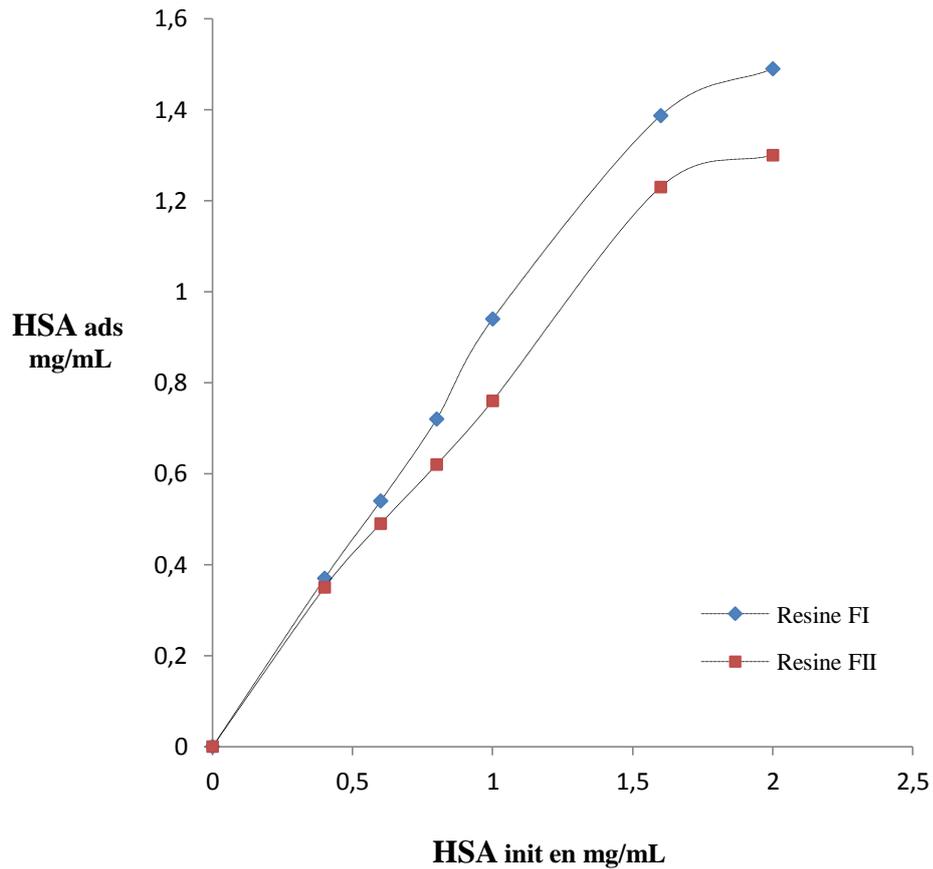


Figure VI. 49 : Isotherme d'adsorption de la HSA sur les résines FI et FII : ($T=25^{\circ}\text{C}$).
 variation de M , concentration interfaciale, en fonction de C , concentration de la solution d'albumine.

Isothermes d'adsorption de l'albumine.

Des courbes typiques sont obtenues avec l'interface **FI** : **PS.SO₂-EDA-BCP** et **FII** : **PS.CH₂-EDA-BCP** traduisant les variations de la concentration interraciale Γ avec la concentration de la solution d'équilibre est présentée sur la figure (VI. 47). On remarque :

(i) une croissance rapide de Γ aux faibles concentrations.

(u) L'existence d'un plateau de saturation aux fortes concentrations (valeur notée Γ_{∞}) qui est pratiquement atteint a une concentration de l'ordre de **1,5 g/ml** et **1,3 g/m** pour les résines FI et FII respectivement. Dans l'hypothèse d'une adsorption de la HSA sur ces résine, cette concentration au plateau de saturation représente la capacité d'adsorption limite de la résine pour l'albumine, les sites a la surface alors saturés.

Partant de ces simples observations qualitatives on conclut que les isothermes étaient du type **Langmuir** pareille assertion peut être vérifiée de manière quantitative, comme nous allons le montrer.

(i) dans le cas des billes de résine FI nous obtenons une surface spécifique supérieure à celle correspondant aux billes de résine FII.

(ii). Cet ordre paraît tout à fait compatible avec les observations au microscope où les billes comprenant des dérivés de la résine FII paraissent être les plus clivées.

(iii) enfin, on note une bonne corrélation entre surface spécifique et le temps caractéristique de mise à l'équilibre; le temps de mise à l'équilibre d'adsorption est plus long sur les billes à forte porosité, la diffusion dans des pores étroits non exposés au flux hydrodynamique limitant alors la cinétique.

Détermination des Constantes d'affinité de la HSA pour les résines :

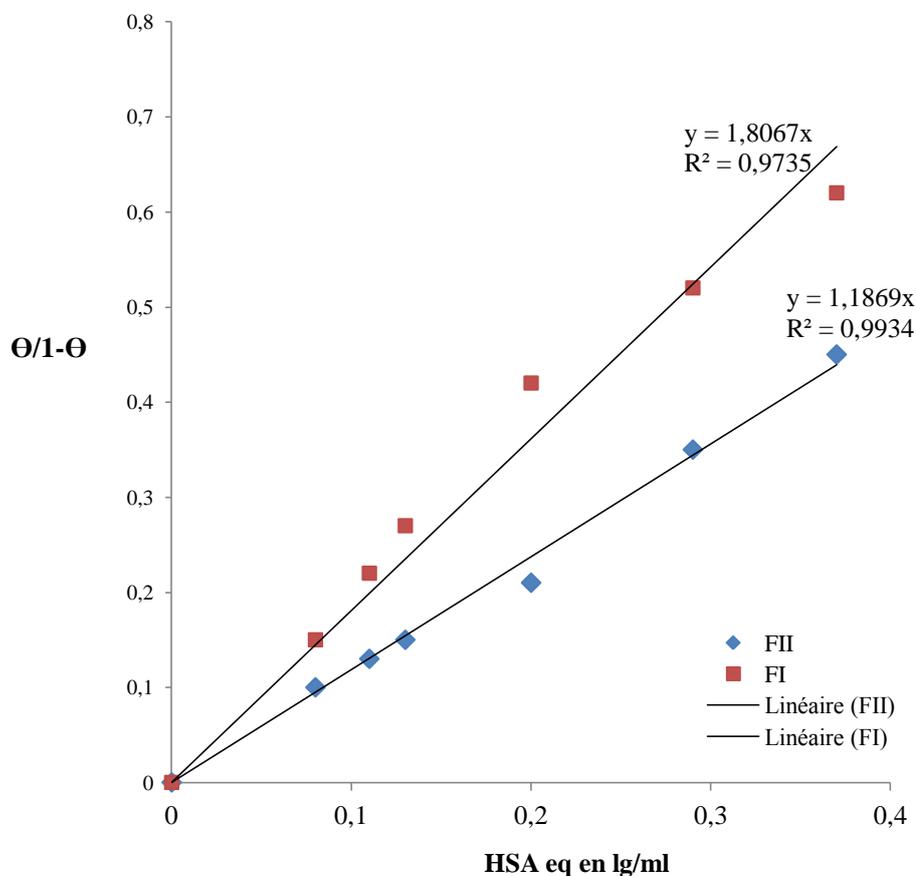


Figure VI. 50. Isotherme d'adsorption à 25 °C de l'albumine sur différents supports préparés.

A partir des courbes expérimentales précédemment établies nous avons pu calculer les constantes d'affinité pour les différentes résines préparées ; pour cela nous avons assimilé la quantité d'albumine à saturation au nombre totale de sites de polymères accessibles à la protéine (isotherme de Langmuir). Ainsi que nous l'avons décrit nous avons déterminé le rapport $\theta/1-\theta$ en fonction de la concentration en protéine libre. Après avoir décrit les différentes méthodes utilisées, nous reporterons les résultats obtenus qui seront exprimés en termes de constante d'affinité de la HSA pour les résines préparées ;

Le tableau (VI. 14) résume les données qui peuvent être obtenues, à savoir l'adoption correspondant aux plateaux Γ_∞ et les constantes d'affinité k (à partir de la pente).

Tableau VI. 14 : Paramètres des isothermes d'adsorption à 25 °C de l'albumine, sur les différents supports.

Résine type	$\Gamma_\infty \mu\text{g} / \text{g}$	$k 10^{-6} (\text{L} / \text{M})$	surface spécifique cm^2 / g .
FI	$1,9 \cdot 10^5$	≈ 9	$9,75 \cdot 10^5$
FII	$2,8 \cdot 10^4$	≈ 2	$1,4 \cdot 10^5$

Le coefficient d'activité des résines FI et FII.

L'activité de la résine dépend du taux de groupe SO_2^- et CH_2 , nous donc déterminer le coefficient de la résine exprimé par l'équation :

$$\mathbf{a} = [\text{C}_{\text{SO}_2} + \text{C}_{\text{Col}}] / \text{C}_{\text{SO}_2} = \mathbf{0,30}$$

$$\mathbf{a} = [\text{C}_{\text{CH}_2} + \text{C}_{\text{Col}}] / \text{C}_{\text{CH}_2} = \mathbf{0,48}$$

Où C_{SO_2} , C_{CH_2} et C_{Col} sont, pour la résine choisie, les taux respectifs de groupes chlorés et de groupes colorant liés au polystyrène.

Tableau VI. 15 : Des enthalpies libres standards pour **FI** et **FII**.

Adsorbant	$[-\Delta G/RT]_{\text{Alb}}$
PS-SO₂-NH-PBC (FI)	~ 4,6
PS-CH₂-NH-PBC (FII)	~ 0,34

Observations :

Trois observations s'imposent ;

- Pour les deux types de supports, ces énergies ne sont pas très élevées, si l'on tient compte du fait qu'elles constituent la somme de nombreuses énergies de liaisons de la protéine avec l'interface. Il s'agit d'adsorption ne faisant pas intervenir de liaisons quasi-chimiques: dG^a résulte d'interactions de type Van der Waals ou de type hydrogène.

- L'affinité de la HSA pour l'interface **PS-SO₂-EDA-BCP** est supérieure à celle de **PS-CH₂-EDA-BCP**, mais les différences ne sont pas spectaculaires.

Il a été montré lors de l'étude d'adsorption que la présence du **NH** support pouvait jouer un rôle légèrement défavorable pour l'adsorption de composés organiques neutres en solution à pH \approx 4,2. Dans cette hypothèse, ils seraient exposés, à des répulsions électrostatiques exercées par les supports contenant des groupes d'hétéroatome.

La forte affinité pour les résines est sans doute à attribuer à un effet coopératif :

. présence des molécules de colorants ligand spécifique,
. présence de groupes sulfamides dont l'affinité vis-à-vis de la HSA a été démontrée ; en plus
. la molécule de colorant se comporte de manière neutre a pH acide et la protéine qui; à pH 4,2 est largement au-dessus de son pI (pas d'effet répulsif).

- il est enfin utile de comparer, pour les deux supports, les quantités d'albumine correspondant au plateau de saturation.

VI. 7. 1. 2. Modèles des isothermes d'adsorption

Afin de compléter cette étude comparative des différents matériaux pour l'adsorption de l'albumine, la modélisation de Langmuir a été effectuée pour chacun de ces médias. Pour mémoire, le modèle de Langmuir relie la vitesse initiale de dégradation à la concentration initiale par l'équation suivante :

$$q = \frac{qmKaC}{1+KaqmC}$$

Avec :

K : constante d'adsorption sur le support (L/mg)

k : constante cinétique (mg/L/min/g)

q_m = capacité maximale d'adsorption monocouche

q_e = capacité d'adsorption à l'équilibre,

C_e = concentration en soluté à l'équilibre dans la phase liquide,

B = constante d'équilibre adsorption/désorption (constante d'affinité)

Le coefficient b dépend de la nature du couple adsorbant-adsorbât, il est fonction de l'énergie d'interaction entre les molécules de soluté et le matériau, sous l'effet de la température.

L'isotherme de Langmuir repose sur les hypothèses suivantes :

1. il existe plusieurs sites d'adsorption à la surface de l'adsorbant,
2. chacun des sites peut adsorber une seule molécule,
3. chaque site a la même affinité pour les solutés,
4. l'activité à un site donné n'affecte pas l'activité aux sites adjacents.

A partir des vitesses initiales de dégradation mesurées pour différentes concentrations initiales en protéine, les paramètres du modèle de Langmuir ont été calculés pour chacun des matériaux. Les valeurs de ces paramètres sont indiquées dans le Tableau 4.

Pour un couple adsorbant-adsorbât, la quantité adsorbée dépend de la température et de la concentration, et les isothermes d'adsorption sont représentées en portant la quantité adsorbée à l'équilibre en fonction de la concentration à une température constante.

Capacité d'adsorption

La capacité d'adsorption d'un adsorbant définit la quantité d'adsorbat que le matériau peut adsorber pour des conditions opératoires déterminées. Elle est le principal paramètre retenu en vue d'estimer le pouvoir sorbant d'un adsorbant. Elle est exprimée en milligramme (mg) ou en millimole (mmol) adsorbés par gramme (g) de matériau sec.

L'évaluation de la capacité d'adsorption d'un matériau, passe par la description des réactions d'équilibre produites entre l'adsorbant et l'adsorbât, au terme d'un temps de contact. Cette description est réalisée au moyen d'isothermes d'adsorption. Les isothermes sont des courbes mettant en relation la quantité de polluants adsorbée par unité de masse de matériau (q_e) et la concentration de polluants restant en solution (C_e), à partir d'essais effectués à température constante.

Le calcul de la capacité maximale d'adsorption est effectué à partir de modèles mathématiques élaborés par Langmuir, Freundlich, Dubinin-Redushkevich (D-R), Temkin, Frumkin, Harkins-Jura, Halsey-Henderson et Brunauer-Emmett-Teller (BET), rapportés dans la littérature. (q_m) est le paramètre retenu par Langmuir en vue de quantifier la capacité maximale d'adsorption d'un matériau. Compte tenu que le modèle de Langmuir est l'un des plus utilisés, (q_m) a été retenu dans cette étude entant que paramètre indicateur de la performance épuratoire des biosorbants et des charbons actifs. Sur cette base, le matériau le plus performant est celui qui présente la plus forte capacité maximale d'adsorption.

Méthode de calcul de q ,

La valeur du paramètre q , est une valeur théorique calculée à partir de l'isotherme expérimentale. Elle est réalisée à partir des données obtenues lors des essais. Le niveau d'ajustement des résultats expérimentaux par le modèle théorique est vérifié par le biais du coefficient de détermination r^2 , calculée à partir de la méthode des moindres carrés. Le calcul de q_m est réalisé à partir du coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine. La linéarisation de l'isotherme expérimentale permet de calculer la valeur de q , qui n'est autre que l'inverse de l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue.

La capacité d'adsorption maximale correspond au recouvrement monocouche de la surface de l'adsorbant, qui est supposée homogène en termes d'énergie. Elle détermine la quantité maximale de solutés retenue par gramme de matériau sec, en supposant que tous les sites du matériau participent efficacement à l'adsorption. Elle diffère de la capacité d'adsorption à l'équilibre (q_e) qui détermine la quantité de solutés retenus par gramme de l'adsorbant sec.

Nous observons que les isotherme d'adsorption on la même allure, la quantité adsorbées augmente plus au moins rapidement pour de faibles concentrations, puis s'atténue pour atteindre un plateau de saturation correspondant à une saturation des sites d'adsorption et traduisant une adsorption en monocouche. L'isotherme obtenu est de type I selon la classification de BET.

Pour la modélisation de l'isotherme d'adsorption obtenue, nous avons choisi deux modèles, celui de Langmuir et de Freundlich, caractérisant la formation d'une monocouche. Cette modélisation nous permet de déterminer la capacité maximale d'adsorption. Les valeurs des paramètres caractéristiques de ces deux modèles seront calculées pour chaque matériau.

a) Modèle de Langmuir :

Adsorption, isothermes de Langmuir

Le modèle de Langmuir repose sur l'hypothèse que l'adsorption a lieu aux emplacements homogènes spécifiques dans l'adsorbant. L'équation linéaire de Langmuir est : $C_e/q_e = f(C_e)$
Soit :

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{K_a q_m C}$$

à partir des mesures expérimentales, le tracé de $[1/(x/m)]$ vs $[1/C_e]$ permet la détermination des paramètres a et K .

Les résultats de l'essai de modélisation de l'isotherme d'adsorption selon le modèle de Freundlich sont montrés sur la Figure 1 et le tableau 13.

La linéarisation des isothermes d'adsorption de la protéine par les deux supports est satisfaisante avec de bons coefficients de corrélation. Les valeurs de q_m confirment l'affinité d'adsorption de la protéine sur le colorant. Ainsi un graphe de $1/q$ en fonction de $1/C$ aura une pente de $1/K_a q_m$ et un intercepte de $1/q_m$

Tableau 13. Les paramètres du modèle de Langmuir : $q_m(\text{mg/g})$, $b(\text{L/mg})$, R_2

b) Modèle de Freundlich

L'isotherme d'adsorption de Freundlich est donnée par les équations:

$$\frac{x}{m} = K.c^{1/n}$$

ou

x = masse de l'adsorbat

m = masse de l'adsorbant

c = concentration à l'équilibre de l'adsorbat en solution.

K et n sont des constantes qui dépendent de la nature de l'adsorbat, de l'adsorbant et de la température T .

Le modèle de Freundlich est une équation empirique utilisée pour décrire les systèmes hétérogènes. La forme linéaire de l'équation est :

$$\ln(q_e) = f(\ln C_e)$$

Les résultats de l'essai de modélisation de l'isotherme d'adsorption selon le modèle de Langmuir et de Freundlich sont montrés sur la Figure VI. 51 et le tableau VI. 15.

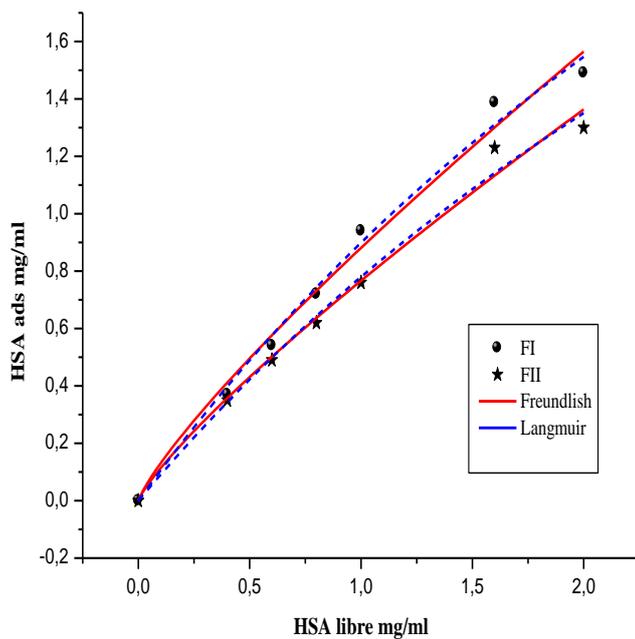


Figure. VI. 51 : Modélisation de Langmuir et de Freundlich des isothermes d'adsorption de la HSA sur les résines préparées

Tableau VI. 16 : Calculs des paramètres de Langmuir et de Freundlich

Langmuir	K_L	Q_e	R^2
FI	0,194	5,529	0,991
FII	0,183	5,039	0,987
Freundlich	K_F	n	R^2
FI	0,881	0,829	0,986
FII	0,766	0,831	0,987

Modélisation des isothermes d'adsorption :

L'isotherme obtenue est du type L correspondant à une adsorption d'une couche monomoléculaire, d'où la possibilité d'appliquer aussi bien la loi de LANGMUIR que celle de FREUNDLICH.

D'après les coefficients de corrélation, dans les deux cas on peut dire que le modèle de FREUNDLICH est aussi adéquat mais 'a (un degré moindre) pour modéliser l'isotherme dans ce domaine de concentration.

En observant les deux tableaux : **Tableau V. 6** et **Tableau VI. 16**.

Model de Langmuir :

D'après le paramètre d'équilibre K_L , on trouve $0 < K_L < 1$, donc on peut dire que l'isotherme de Langmuir est favorable pour l'adsorption de la HSA sur les différents adsorbants.

Model de Freundlich :

On note que le paramètre de Freundlich $1/n$ est compris entre 0 et 1, les valeurs varient d'un échantillon à l'autre. En comparant ces valeurs nous constatons qu'elles dépendent du couple adsorbat-adsorbant. L'efficacité d'un adsorbant est d'autant plus élevée que le coefficient $1/n$ est petit.

Le paramètre d'intensité, $1/n$, indique la déviation de l'isotherme d'adsorption de la linéarité.

Lorsque $1/n$ tend vers 0, l'adsorption est linéaire, c'est à dire que les sites sont homogènes et qu'il n'y a pas d'interaction entre les espèces adsorbées. Lorsque $1/n < 1$, l'adsorption est favorable, la capacité d'adsorption augmente et de nouveaux sites d'adsorption apparaissent. Lorsque $1/n > 1$, l'adsorption n'est pas favorable, les liaisons d'adsorption deviennent faibles et la capacité d'adsorption diminue.

Donc d'après les résultats obtenus, l'isotherme de Freundlich est aussi favorable pour l'adsorption de la HSA sur les différents adsorbants.

On remarque aussi que les valeurs des coefficients de corrélation sont proches de l'unité, pour les deux modèles; particulièrement, pour celui de Langmuir; ceci montre que les deux modèles de Freundlich et Langmuir sont applicables à l'adsorption sur les différents supports.

VI. 8. MISE EN ÉVIDENCE DE LA SPÉCIFICITÉ DES RESINES vis-à-vis DE LA HSA

Cependant, l'épuration protéine plasmatique au moyen de colonnes conventionnelles n'est pas spécifique et entraîne non seulement une diminution de 90% du taux plasmatique de la HSA totales mais également de celui des IgG et des IgA, affaiblissant ainsi considérablement les rendements. De plus, ce support présent une stabilité insuffisante qui peut conduire, lors de son utilisation, à une désorption progressive de la protéine.

1. Adsorption compétitive de la HSA a partir du sérum

En vue de mettre en évidence une éventuelle interaction spécifique entre les supports synthétisés et la HSA, ainsi que la variation des ces interactions avec la structure des polymères, nous avons déterminé l'adsorption de la HSA en milieu compétitif sur les différentes résines préparées. Pour le faire, nous avons incubé des résines placées en suspension dans un sérum à pH 4,2 à des concentrations différentes et dosé la HSA et les protéines totales dans le sérum humain.

Pour mémoire, le sérum de départ contenant la protéine plasmatique à purifier consiste en un matériel de constitution complexe, dans lequel la protéine d'intérêt est présente en combinaison avec de très nombreuses substances, y compris des protéines, des lipides, des glucides, des acides aminés, des sels minéraux, et des déchets métaboliques.

Le principe de ce dosage est la mesure de l'activité la HSA résiduel après incubation d'un mélange à volume égal, d'un pool de plasmas à tester, pendant 20 minutes à 25°C.

Dans cet essai de fixation de la HSA du sérum humain, on fait réagir des particules de polystyrène, avec un plasma. Plus précisément, on prépare des dilutions de plasma de différentes concentrations et on évalue la concentration de la HSA et de la concentration totale en protéines pour chaque taux de dilution du plasma.

Ces résultats montrent qu'environ 60 - 80 % d'albumine sont retenus sur les deux résines. Chaque résine présente une capacité d'adsorption équivalente, de l'ordre de 65 et 75 mg/g de résine sèche, après 20 mn de contact avec le plasma figure **VI. 52**.

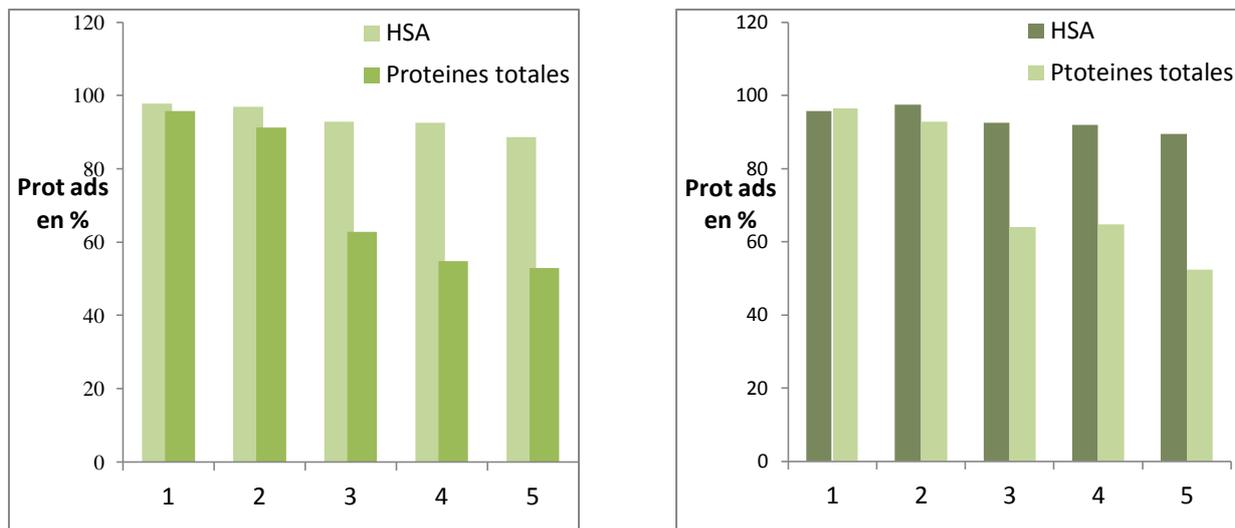


Figure VI. 52 : illustre un profil d'histogrammes obtenu suite à la purification de la HSA à partir d'un plasma humain avec les supports d'affinité préparés a). **FI** b) **FII**.

En conclusion, l'ensemble de tous ces résultats montre que les résines de formule I et II permettent de retenir très efficacement l'albumine du plasma humain.

Ces résines sont aptes à adsorber la HSA, et sont donc destinées à traiter des plasmas ou des sangs totaux de patients dans les procédés extracorporels d'épuration plasmatique et sanguine, lorsque elles sont équilibrées en tampon à pH 4,2.

Ces résultats montrent que l'adsorption de ces différentes résines est très forte sur les deux types de résine et montrent aussi que les pourcentages de HSA adsorbés sur la résine **FI** sont nettement supérieurs aux pourcentages de HSA adsorbés sur la résine **FII**.

Un support d'affinité tel que défini ci-dessus possède une haute capacité d'adsorption de la protéine cible, puisque la mise en contact du support solide avec une solution liquide contenant la protéine plasmatique à purifier permet de saturer au moins 80 pour cent des sites cibles portés par le support solide.

Par contre l'isotherme d'adsorption n'a pas exactement la même allure sur les différents matériaux. Il y a apparition d'un plateau de saturation net sur les résines **FI** alors que l'adsorption sur **FII** dans la gamme de concentrations expérimentales semble être de type multicouche (type II). A faible concentration initiale, la quantité adsorbée à l'équilibre est plus faible sur FI 10% que sur FII. Par contre, à forte concentration, les Q_e mesurées sur FI approchent celles obtenues sur FII, et les dépassent dans le cas de FI 10%.

Il y a d'interaction électrostatique importante à l'adsorption sur FI chargée positivement à pH 4,2, ce qui explique l'adsorption assez importante sur FI. Lorsque tous les sites d'adsorption

sont occupés, ou masqués par les molécules d'acides humiques adsorbées à proximité, il y a apparition d'un plateau de saturation.

Pour expliquer l'adsorption plus faible sur le support FII, trois hypothèses peuvent être émises :

- sites d'adsorption moins accessibles à cause du support
- répulsions électrostatiques ponctuelles entre le support et les molécules HSA chargées positivement
- nature différente du bras espaceur

Le support semblerait jouer un rôle moins favorable sur l'adsorption spécifique à faible concentration. Par contre à haute concentration, il est possible que les molécules déjà adsorbées masquent les charges de surface de la résine, ou deviennent de nouveaux sites d'adsorption facilitant l'adsorption multicouche des biomolécules à partir d'un certain taux de recouvrement. Ceci expliquerait les quantités importantes adsorbées à l'équilibre lors des expériences réalisées à forte concentration (2 mg/g). Quoiqu'il en soit, la nature différente des supports utilisés rend difficile la comparaison entre eux.

VI. 9. DISCUSSIONS :

L'étude de l'adsorption de la HSA sur les différents matériaux a permis de mettre en évidence plusieurs points :

- Les isothermes d'adsorption de la HSA sur les trois peuvent être modélisées de manière satisfaisante par les modèles de Langmuir dans la gamme de concentration étudiée. Dans notre cas nous a permis de conclure qu'il s'agissait d'une adsorption monocouche (*Langmuir*). Les courbes des modélisations de Langmuir et Freundlich sont représentées sur les graphiques suivants (Figures VI. 51)
- La quantité de HSA adsorbée est globalement forte et reste du même ordre de grandeur sur les trois matériaux.

i. Influence du bras espaceur sur la rétention :

Nous avons d'abord pu constater que l'introduction de groupes Sulfamide dans le cas des résines **FI** modifiait le comportement des résines. La présence de ces groupes a tendance à augmenter la quantité adsorbée. Mais cet effet semble en réalité être lié à une adsorption directe à la surface des supports, qui jouent alors le rôle de complexant naturel. Les quantités adsorbées à l'équilibre lors des différentes expériences sont fournies par le Tableau 16.

Environ 5 à 6% est adsorbé à la surface des résines. Un phénomène de ce type avait été rapporté par Enriquez et al.¹⁷³ avec les acides humiques et la quinoline, mais d'ampleur moins importante : environ 1,5 % de la quinoline s'adsorbait à la surface des acides humiques, dans des gammes de concentration initiale en quinoline et acides humiques comparables à celles choisies lors de ce travail.

Cette famille de supports PS-PBC est donc nettement plus sélective pour l'albumine du sérum humain comme l'illustre les graphes figure. VI. 51 et figure VI. 51.

La différence entre les résines FI et FII (baisse de sélectivité de la séparation des protéines du sérum s'explique par la différence dans la nature des groupements intermédiaires introduits et du taux de greffage (respectivement égal à 1,6 équivalents pour FI et 0,6 équivalents pour FII, toutes choses étant relativement égales par ailleurs. Une augmentation du taux de greffage de l'amine dans le polymère semble nuire à la sélectivité.

Par comparaison des deux supports, on note que le greffage du PBC via un bras espaceur induit une augmentation de la capacité de rétention. Les dosages élémentaires mettent en évidence que le facteur de rétention augmente avec la présence de l'élément soufre contenu dans la résine. L'accroissement du nombre de sites d'interactions implique un accroissement du taux de rétention des deux résines.

Cependant une augmentation de la quantité d'agent de couplage devrait logiquement s'accompagner d'une augmentation du taux en carbone CH_2 ou en soufre SO_2 . On remarque que l'immobilisation par le CH_2 s'accompagne d'une chute du facteur de rétention (tab.III-7) bien que le taux en carbone et en amine de la FI immobilisée soit supérieur à celui de son analogue. Il apparaît donc que l'immobilisation du polymère bouche l'accès à la porosité, le nombre total de FII sites accessibles diminue et le facteur de rétention décroît.

L'influence de l'immobilisation des bras espaceur sur la rétention dépend de la nature du support et de la proportion en bras espaceur. Sur les supports, pour une proportion en bras espaceur modérée (inférieure à 3 eq.), l'immobilisation implique une chute de la surface accessible (l'accès à la porosité interne est bloqué par le gel polymère) et par suite une diminution de la rétention de la PSC.

ii. Influence du bras espaceur sur la sélectivité

L'adsorption compétitive des protéines du sérum a été effectuée sur les différents supports étudiés. Il a été montré que les quantités adsorbées à l'équilibre sur FI étaient la plus importantes.

Les IgG pourraient donc empêcher l'adsorption de la HSA en occupant les sites d'adsorption. Cette compétition d'adsorption pourrait masquer la surface à la molécule cibles.

La comparaison des PS « FI » aux PS « FII » met en évidence que l'immobilisation du polymère par modification avec le CH_2 s'accompagne d'une baisse de sélectivité. L'absence de séparation de la HSA indique que l'immobilisation du bras espaceur sur le polymère par le Soufre convient le mieux.

Une augmentation de la proportion en agent de pontage s'accompagne d'une baisse de sélectivité dans le cas de des résines FII. A contrario, l'immobilisation par le DDT et le DAT ne s'accompagne pas nécessairement d'une baisse de la sélectivité de la warfarine, lorsque la proportion en DAT est inférieure ou égale à trois « équivalents », la sélectivité semble influencée par la proportion en DAT, au-delà par contre la rétention ne permet plus d'éluer le racémate.

Ceci est probablement lié à la modification du polymère d'une part et à une rigidification croissante de la phase stationnaire avec le taux de greffage, qui rend les microcavités chirales moins accessibles au soluté et conduit donc à une diminution des interactions entre l'énantiomère et les cavités chirales du polymère.

En conclusion, cette partie du travail de thèse a porté sur l'élaboration de supports insolubles sur les quels on a introduit un bras espaceur. Cette nouvelle voie devrait permettre d'accéder aux sites fonctionnels avec un meilleur rendement permettant alors une utilisation optimale de ces supports.

La synthèse a permis d'obtenir des composés aminés pouvant présenter une grande souplesse fonctionnelle en vue d'une adaptation sur support solide en utilisant un groupement d'ancrage comprenant un atome de Chlore labile.

En revanche, les résines du type **FII**, probablement en raison d'interactions site-site défavorables lors de l'adsorption sur le support montre une adsorption réduite. En effet, ce support présente une fonction amine secondaire, chacune pouvant interagir avec.

La fonctionnalité amine est introduite dans une étape de post-fonctionnalisation, ce qui permet un meilleur contrôle des propriétés physicochimiques du support en général, et de sa capacité en sites fonctionnels en particulier.

Pour mener à bien cette étude, dans un premier temps, une méthode original de synthèse du polymère portant le groupe chloré et ensuite amines a tout d'abord été mise au point.

Les supports de type gel sous la forme de billes insolubles (figure **VI. 43**), ont été analysés par spectroscopie infrarouge afin de contrôler la présence de la fonctionnalité dans le support. Des mesures de tailles, de taux de gonflement, ainsi que d'accessibilité des sites immobilisés ont complété la description de ces supports fonctionnels. Face aux processus complexes mis en jeu, la méthodologie des plans d'expériences a permis de développer une approche logique de l'expérimentation.

Elle a également conduit à une meilleure compréhension du comportement de ce polymère supports sous forme de billes.

Nous sommes parvenus ainsi à élaborer des supports sous forme de billes étroitement disperses d'environ 200 à 230 μm . Leur capacité totale en sites est de 1,57 mmol/g et ces sites immobilisés sont accessibles à 80%. Leur taux de gonflement dans l'eau, comparable à celui des supports commerciaux, est de 60-70%. Ce matériau a pu être utilisé en tant que support d'adsorption de l'albumine dans un procédé en batch.

On a également montré que les molécules de la protéine plasmatique qui sont fixées spécifiquement sur les molécules de colorant, peuvent ensuite être éluées du support d'affinité avec un bon rendement, d'au moins 75 pour cent, on utilisant un tampon.

Notamment, on a montré que le support d'affinité de l'invention peut être « régénéré », par élimination des protéines restées fixées sur le support après élution, de très nombreuses fois sans altération significative de sa capacité d'absorption de la protéine plasmatique cible,

- Dans ce cas et dans la gamme de concentration étudiée, l'adsorption peut être modélisée de manière satisfaisante par les modèles de Langmuir et a un degré moindre les modèles de Freundlich. La modélisation de l'adsorption par ces modèles est possible dans ce cas.

Les isothermes d'adsorption à 25°C de l'albumine sur les matériaux adsorbants préparés sont de type Langmuir: La seule interaction entre molécules adsorbées est l'interaction de surface exclue.

Les surfaces spécifiques calculées sont en bonne corrélation avec l'état des surfaces observées au microscope.

Pour la HSA, les valeurs des énergies libres standards apparentes d'adsorption ont pu être calculées et indiquent que:

(I) les liaisons avec l'interface ne seraient pas de type quasi-chimique, mais de type Van Der Waals ou hydrophobes.

(u) l'affinité de la HSA vis à vis du PS-SO₂-EDA-BCP est supérieure à celle du PS-CH₂-EDA-BCP.

Cette fixation est initiée grâce aux interactions de types coulombiennes entre les groupements sulfonique de la résine et les groupements NH₃⁺ des résidus aminoacides de la protéine (lotter, coll, 1983).

La fixation semble être stabilisée par la suite par les forces de Van Der Waals, par des liaisons hydrogène et peut être des interactions de type hydrophobe (Scopes, 1987)

- Dans ce cas et dans la gamme de concentration étudiée, l'adsorption peut être modélisée de manière satisfaisante par les modèles de Langmuir et a un degré moindre Freundlich. La modélisation de l'adsorption par ces modèles est possible dans ce cas.

La valeur de ΔG_0 est négative le changement de l'ordre moléculaire de la protéine favorisant l'augmentation de l'entropie ; le mécanisme d'adsorption dépend en fait beaucoup de la nature des interfaces protéine/solvant, protéine/surface solide et solvant/surface solide.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif que nous nous étions assigné était de sélectionner une procédure pour préparer des résines permettant de purifier une protéine issue du plasma humain, l'Albumine.

Ayant choisi comme phases stationnaires des résines de polystyrène réticulé fonctionnalisées à la fois par des fonctions sulfonâtes, sulfamines et portant des molécules de colorant PBC, notre travail a eu aussi pour but de préciser le mécanisme des interactions qui se développent entre la protéine et les résines.

A l'issue du travail de synthèse, nous avons préparé plusieurs types de résines fonctionnelles que nous avons caractérisées par leur taux en groupements fonctionnels, leur capacité d'adsorption et par leurs constantes d'affinité.

De tous ces résultats, il résulte que pour préparer un polymère dont l'affinité vis-à-vis de la HSA est forte et spécifique, il est nécessaire, selon la stratégie développée dans l'introduction de ce mémoire, d'imiter, au moins partiellement la structure de colorants, en substituant le polymère avec des molécules de colorant ou avec des groupements sulfonates ; ces matériaux présentant une excellente compatibilité avec le milieu sanguin.

Enfin, les propriétés, particulières des résines permettent d'envisager leur utilisation potentielle pour purifier la H.S.A par chromatographie d'affinité (sur colonne), et de confirmer l'hypothèse selon laquelle il est possible de réaliser des résines à affinités brospécifiques utilisables à des fins d'épuration plasmatique.

L'ensemble de ces résultats montre que la fixation sur du polystyrène, de substituant dans lequel un colorant est fixé à la chaîne macromoléculaire par un pont sulfamine confère aux résines une affinité supérieure à celles qu'il est possible d'observer sur des résines PS-SO₃.

Nous avons décrit la préparation de matériaux insolubles dérivés du polystyrène par fixation d'acides-aminés. Ces matériaux ont été caractérisés par dosage acidimétrique en phase aqueuse hétérogène des différents groupements acides, IR.....

On a pu montrer que le support sur lequel sont immobilisés des molécules de colorant spécifiques de la protéine plasmatique d'intérêt, ligand dont la spécificité pour la protéine cible a été démontrée, peuvent être utilisés avec succès dans des procédés d'obtention de cette protéines plasmatiques.

On a aussi montré que le support d'affinité permet de purifier la protéine à partir de milieux de départ de composition complexe, comme une composition plasmatique.

On a également montré que le support d'affinité permet une immobilisation efficace et sélective la protéine à partir d'un milieu de départ.

Notamment, on a montré que le support d'affinité peut être « régénéré », par élimination des protéines restées fixées sur le support après élution, de très nombreuses fois sans altération significative de (i) sa capacité d'absorption de la protéine plasmatique cible, sa spécificité vis-à-vis de ladite protéine cible.

En absence de relargage des molécules de colorant immobilisé sur le matériau support solide. De plus, la régénération du support d'affinité de l'invention peut être réalisée selon des techniques connues et avec des agents de régénération connus, telle que l'urée.

Les supports synthétiques utilisés comme ligands de la protéine plasmatique d'intérêt présentent de nombreux avantages. De par leur nature possèdent une faible immunogénicité et une résistance importante à des conditions physico-chimiques stringentes (présence d'urée, d'un pH très acides ou très basique, utilisation de solvants organiques ou de température élevée) permettant des stratégies variées de contrôle de la sécurité sanitaire. De plus leur sélectivité est importante. Enfin, comme déjà mentionné, leur production implique des coûts relativement limités. Ainsi, la combinaison de caractéristiques ci-dessus du support d'affinité de l'invention matérialisent l'aptitude dudit support d'affinité à être utilisé comme moyen pour la purification d'une protéine du plasma sanguin, puisque

- l'éventuel détachement de molécules ligand,
- la fixation, puis l'élution de la protéine plasmatique d'intérêt sur le support d'affinité,
- le support d'affinité est peu onéreux à fabriquer, notamment en raison des coûts réduits de la production, et de plus, comme cela a été déjà mentionné, le support d'affinité de l'invention est apte à fixer sélectivement, de manière réversible, la protéine plasmatique cible, avec un bon rendement et une bonne spécificité, dans des procédés de purification à partir de milieux de constitution complexe, en particulier à partir de milieux classiquement utilisés à l'échelle industrielle, tels que le plasma humain ou des milieux de culture ou des fluides biologiques contenant ladite protéine d'intérêt.

Par « fixation sélective », on entend : liaison spécifique de manière non covalente de la protéine plasmatique d'intérêt aux molécules immobilisés constitutifs du support d'affinité, et qui est réversible par mise en contact du support d'affinité sur lequel se sont formés des complexes non covalents avec la protéine d'intérêt avec une solution de constitution adaptée, qui peut être appelée aussi solution d'élution.

On a décrit un mode original de réalisation d'un support d'affinité comprenant un matériau support sur lequel sont greffées des molécules de colorants. De tels matériaux supports solides de 'PS' vierge sont facilement disponibles dans le commerce.

PERSPECTIVES DE TRAVAIL

Suite à ces résultats nous envisageons d'une part de préparer des résines modifiées par des acides gras, des colorants et des substituant qui ne portent pas de charge.

D'autre part, d'améliorer le taux de substitution des résines afin d'optimiser l'adsorption spécifique de la HSA.

Par ailleurs, l'introduction de bras espaceurs entre la matrice de polystyrène et le substituant aminé de dimensions différentes peut augmenter, l'affinité de la résine vis à vis de la HSA, le site d'interaction devient ainsi plus accessible à la protéine étudiée.

Enfin, les meilleurs résines seront testées en milieu plasmatique c'est à dire en présence d'autres protéines telles que, les IgG qui rentrent en compétition avec la HSA dans le mécanisme d'adsorption. Les propriétés remarquables de ces polymères permettent d'envisager leur utilisation dans un grand nombre d'applications telles que par exemple :

- La synthèse de composés anticoagulants solubles susceptibles d'être employés en thérapeutique.
- La réalisation de cathéters, de poches à sang ou de composants d'appareils de circulation, extracorporelle dont l'usage ne nécessiterait l'emploi d'aucun anticoagulant soluble.
- La réalisation de prothèses cardiovasculaires implantables.

Le greffage des polymères bioactifs porteurs de groupements sulfonates, groupements sulfamides, groupements amines, etc... Constitue une solution prometteuse dans le but d'immobiliser des molécules bioactives (agents anticoagulants, antiprolifératifs, antimitotiques, antibiotiques, matrice de protéines extracellulaires, et facteurs de croissance...).

Les molécules bioactives seront fixées de manière irréversible sur le support (par liaisons covalentes) en utilisant un 'espaceur' possédant des fonctions chimiques adéquates pour réagir avec la surface, d'une part, et le ligand d'autre part.

Par ces traitements, ces supports deviennent des supports hautement intéressants pour des applications dans les domaines de la thérapie.

En effet, des études montrent que l'adsorption des protéines est défavorisée par une surface hydrophile, fonctionnalisée par des groupements chimiques tels que les amines, les hydroxyles ou les carboxyles ce qui influence l'activation du système immunitaire et la biocompatibilité du biomatériau. Une surface est ainsi considérée comme hydrophobe si son angle de contact avec l'eau est supérieur à 100°.

Ces applications sont l'objet d'une proposition pour un projet de recherche. La fonction de ces matériaux est alors réalisée soit en ajustant ses propriétés physicochimiques soit en associant une composante biologique.

ANNEXE 1 : PRODUITS ET REACTIFS

- Sérum-albumine humaine (A1653) a été obtenue auprès de Sigma-Aldrich (Royaume-Uni).

- Coomassie brillant bleu G 250 a été acheté chez Merck (Darmstadt, Allemagne).

- Acide chlorhydrique	37%	d = 1,19
- Acide acétique	99-100%	d = 1,05
- Acide sulfurique	95-98%	d = 1,84
- Acide nitrique	53%	d = 1,33
- Dioxane-1,4	98%	d = 1,03
- METHANOL	98,5%	d = 0,8
- POLYSTYRÈNE 98% DVB 2 %	200-400 MESH	
- HYDROXYDE DE SODIUM	40G/MOL	
- POURPRE DE BROMOCRESOL	pH= 5,2-6,8	YELLOW-VIOLET

ANNEXE 2 : Préparations

I. Préparation des solutions

I.1. PREPARATION DES L'ACIDE CHLORHYDRIQUE (HCL) 50ML, 0.1M

H Cl disponible est : 37%

donc , prendre 0.4 ml HCL 37% continuer avec l'eau distillée à 50 ml.

Préparation d'une solution de dioxane a 10%

Prendre 25,5 ml de dioxane 98%, ajouter l'eau distillée jusqu'à à 250 ml.

I.2. Réactif de MACART et GERBAUT [27]

1-produits utilisés:

-Bleu de coomassie G250	100 mg
-Méthanol	40 ml
-Acide phosphorique pur (85%)	100 ml
-Eau distillée	800 ml
-S.D.S	30 mg
-Eau distillée	q.s.p 1l

2-Mode de préparation:

Mélanger le bleu de coomacie et l'éthanol et agiter pendant deux heures jusqu'à la dissolution totale du bleu de coomacie. Ajouter ensuite et successivement l'acide sulfurique et 3/4 d'eau distillée. Agiter et vérifier que le pH est

égal à 0,8. additionner le SDS et compléter au volume d'un litre avec l'eau distillée. Agiter et conserver à l'abri de la lumière

I.3. Préparation des Tampons

Tableau1: Tampon phosphate pH= 7,35

composition	Concentration (mol/l)	Volume (ml)
Na ₂ HPO ₄	0,2	38,25
NaH ₂ PO ₄	0,2	11,75

♦ Les deux volumes sont dilués dans 100 ml d'eau

II. Préparation des résines

Préparation des résines PS-SO₃H, Sulfonation du PS/DVB

4 g de polystyrène avec 10 ml de dichlorométhane (CH₂Cl₂), pendant un demi heur sous agitation douce, pour le gonflement, est alors ajouté 40 ml d'acide sulfurique H₂SO₄ avec précaution car la réaction est exothermique. Le mélange est maintenu à 80°C pendant 6 heures sous agitation. Après réaction, le produit final est filtré et lavé abondamment avec du l'eau distillé et du dioxane, puis séché sous vide à 40°C.

Fixation du colorant :

A température ambiante, 3 gr de colorant sont mise en solution dans 250 ml d'un mélange eau/dioxane 1/6, on ajoute ensuite 1.5gr de résine PS-SO₃H, précédemment préparés.

Le pH du milieu réactionnel est maintenu a sa valeur initiale d'environ 8.5 par addition progressive de soude 0.1M durant tout le temps de la réaction.

La réaction terminé quand le pH reste stable. On peut poursuivre l'avancement de la réaction en notant le volume totale de soude versé.

Préparation des pastilles pour Analyse Infrarouge

Pour faire l'analyse de l'infrarouge d'un échantillon, il faut préparer des pastilles de 5% échantillon et 95% KBr par la méthode suivant :

- * peser 5mg de l'échantillon.
- * Peser 95mg de KBr déjà tassé à l'aide d'un mortier à des fines particules (mêmes dimensions que les grains de l'échantillon).
- * Bien mélanger les deux pour réaliser l'homogénéité.
- * Tasser les deux ensembles.
- * Prendre des pincés de mélange avec une spatule.
- * Faire distribuer la quantité sur la surface de la moule d'une manière que la surface bien recouverte.

- * Fermer le moule et maître sous le pression de 20KN.
- * Après presque une minute, récupérer la spa tille.
- * Maître la spa tille dans le porte échantillon.
- * Faire l'analyse.

ANNEXE 3 : Les Dosages

Dosage des groupements SO₃H

Dans un erlenmeyer contenant 20 ml de HCl (0.1 N), On introduit environ de 0.2g de la résine sous forme d'hydroxyde puis ajouté 1g NaCl . Cette solution est ensuite agitée durant 2 heures, à température 80°C.

A la fin, 10ml du surnageant sont dosés avec une solution 0.1N de NaOH, en présence d'un indicateur coloré (phénol phtaléine).

La capacité d'échange en (meq/g) est donné par :

$$C_p = [(20 \leq 0.1) - (V \leq 0.1)] \leq D/W$$

Ou : W: masse de résine en grs.

V : volume de NAOH ml.

D : facteur de masse sèche, D représente le rapport de la masse d'un échantillon sur sa masse après séchage de 4 heures à 40°C.

Dosage du colorant dans la résine.

Mise en solution du colorant fixé sur la résine par dissolution dans une solution d'acide nitrique concentrée. La résine contenant du colorant est mise à incuber pendant 90 min dans une 100 ml d'acide nitrique après séparation la concentration du colorant dans la solution surnageant est déduite par lecture dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595.

Dosage de l'albumine

L'albumine qui se trouve initialement sous forme de particules solides, obtenue de la compagnie de chimie **SIGMA** et qui est du type (A-1653), est dissoute dans une solution phosphatée qui constitue la solution tampon et qui sert à équilibrer l'albumine dans un pH physiologique de 7,3.

Pour lire la densité optique (D.O), on a utilisé un spectrophotomètre visible de type (SPECTRONIC 77) et deux cuvettes en verre.

On prépare des solutions constituées de 200 µl de la solution d'albumine et de 4 ml du réactif de Macart, dans la cuvette de référence la solution d'albumine est remplacée par la solution tampon.

Après un temps d'incubation de 5 min, on lit la densité optique correspondante à la concentration de la protéine à une longueur d'onde fixée à 595 nm. La courbe d'étalonnage ainsi obtenue est représentée sur la figure (VI.16).

Détermination des isothermes d'adsorption :

La solution de HSA à différentes concentrations, est mise à incuber à 37°C, avec une concentration donnée de résine pendant 20 mn après centrifugation et décantation de la résine, le surnageant est prélevé et sa concentration mesurée. Les isothermes d'adsorption sont établies en portant la concentration de HSA adsorbée en fonction de la concentration de HSA initial. Les concentrations sont lues sur la courbe d'étalonnage.

Caractérisation de l'adsorbant préparé

La teneur en groupes chlorosulfonyle (SO_2Cl) a été estimée par la méthode argentimétrique. D'une part, 0,2 g de gel de copolymère chlorosulfoné a été traité avec un excès d'une solution aqueuse 2N de NaOH, puis le chlore libéré dans le surnageant a été titré avec une solution étalon de nitrate d'argent 0,01 N comme titrant. D'autre part, les groupes sulfonyle (SO_3H) contenu a été déterminé par acidimétrie. Une fraction de pesée environ 0,2 g de gel a été traité avec une solution diluée de solution de NaCl 0,1 N, l'acide libre dans le surnageant est ensuite titré avec une solution standard de NaOH 0,1 N en présence de méthyle-orange comme indicateur. Enfin, la caractérisation qualitative des principaux groupes de la poly (styrène de sodium sulfonate) des particules a été déterminée par spectroscopie infrarouge. Le spectre infrarouge de l'échantillon (quelques mg) a été enregistré sur un spectrophotomètre Shimadzu en utilisant KBr anhydre (2%) de granules.

Isotherme d'adsorption de l'albumine

L'isotherme d'adsorption du sérum albumine humain (HSA) sur le gel de poly (styrène sodium sulfonate) (PSSO₃Na) ont été réalisées par la procédure en batch décrit ci-après : 100µl de chaque suspension de polymère à un contenu donné (1mg/ml) conditionnés dans des Tampon phosphate 0,2 M à pH 7,3 ont été incubées avec un volume égal d'eau purifiée HSA solution à différentes concentrations (0-2mg/ml) pendant 20 minutes à 37 ° C. À la fin du processus d'adsorption, le mélange a été centrifugé et la teneur résiduelle en HSA dans le surnageant a été déterminée à l'aide du bleu de Coomassie tinctoriale selon l' méthode colorimétrique de Macart et Gerbaut (33) décrit ci-dessus. Le montant de l'HSA adsorbé sur les suspensions ont été déduite en soustrayant la HSA résiduelle dans test à partir de la teneur initiale en commande (tampon a été utilisé à la place du gel de polymère suspension), qui sont déterminées par une courbe d'étalonnage obtenue précédemment. L'isotherme d'adsorption a été créée en traçant la quantité de HSA adsorbé contre la concentration initiale. Ceci nous permettra d'évaluer la constante d'affinité, puis estimer la sélectivité des groupes sulfonâtes greffés sur le gel adsorbant.

Annexes 4 : Tableaux des résultats

Tableau 2: Résultats de l'adsorption des surnageant HSA (courbe d'étalonnage)

Concentration initiale (mg/ml)	0	0,1	0,2	0,35	0,45	0,6	0,75	0,8	1
Densité optique (μm)	0	0.009	0.016	0.026	0.042	0.054	0.08	0.108	0.328

Tableau 3: Résultats des isothermes d'adsorption

C (in)	0	0,1	0,2	0,35	0,45	0,6	0,75	0,8	1
C abs colorant	0	0,09	0,18	0,32	0,41	0,56	0,69	0,71	0,73
C abs sulfonaté	0	0,08	0,16	0,31	0,40	0,54	0,64	0,67	0,71

Tableau 4 : Détermination de la constante d'affinité (k_a).

C (in)	0	0,08	0,11	0,13	0,2	0,25	0,29	0,37
$\Theta/1-\Theta$ Sulfonaté	0	0,06	0,12	0,14	0,21	0,29	0,35	0,49
$\Theta/1-\Theta$ colorant	0	0,04	0,1	0,12	0,18	0,25	0,30	0,35

Résultats Adsorption de la **HSA** sur les résines **FI** et **FII**

Tableau 6: Courbe d'étalonnage (**DO** en fonction [**HSA**]_i)

Concentration de HSA	DO ₅₉₅
0	0
0,1	0,149
0,2	0,325
0,4	0,575
0,6	0,745
0,8	1,002
1	1,195
1,2	1,33
1,5	1,607

Tableau 7: Adsorption de la HSA sur les résines FI et FII

Colonne1	Colonne2	Colonne3	Colonne4	Colonne5	Colonne6
HSA int		HSA ads mg/mL		HSA ads mg/mL	
		FI		FII	
0		0		0	
0,4		0,37		0,35	
0,6		0,54		0,49	
0,8		0,72		0,62	
1		0,94		0,76	
1,6		1,387		1,23	
2		1,49		1,3	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - C. Branden, J. Tooze, Introduction to protein structure, second edition, Garland Publishing, New-York, 1999.
- 2 - C. Yu, M. Xu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem., 40, 755, 2002.
- 3 - N.L. Anderson, N.G. Anderson, Mol. Cell. Proteomics 1 (2002) 845.
- 4 - Protein glycation and endothelium dysfunction, Nicolas Grossin et Jean-Luc Wautier, Journal de la Société de Biologie, 201 (2), 175-184, 2007.
- 5 - Circulating Biomarkers of Collagen Metabolism in Cardiac Diseases. Begoña López, Arantxa González, Javier Díez, Circulation; 121, 1645-1654, 2010.
- 6 - Proteomic analysis: benefit and perspective in clinical biology, B. Baudin, A. Bruneau, Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, Volume 19, Issue 6, 2004, pp 313–322.
- 7 - Characterization of lacrimal proline-rich protein 4 (PRR4) in human tear proteome, Natarajan Perumal, Sebastian Funke, Norbert Pfeiffer and Franz H. Grus, Proteomics, Volume 14, Issue 13-14, pages 1698-1709, July 2014.
- 8 - Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre JP. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. Gut 2005; 54: 237-41.
- 9 - Wolters FL, Russel MG, Stockbrugger RW. Systematic review: has disease outcome in Crohn's disease changed during the last four decades? Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 483-96.
- 10 - D. C. Carter and J. X. Ho, "Structure of serum albumin". In Advance in Protein chem., V. N. Schumaker, Ed. Academic Press, New York, Vol. 45, pp. 153-203, (1994).
- 11 - T. Peters, "Serum albumin". Jr. In Advances in Protein Chemistry, Vol. 37, pp. 161-245, C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, and F. Richards, Ed. Academic Press, New York, (1985).
- 12 - T. Peters, All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, San Diego, pp. 14-32, (1995).
- 13 - S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda and K. Kobayashi, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. Protein engineering, Vol. 12, pp. 439-446, (1999).
- 14 - D.C. Carter, X. M. He, S. H. Munson, P. D. Twigg, K. M. Gernert, M. B. Broom, and T. Y. Miller, Three-dimensional structure of human serum albumin Science, Vol. 244, pp. 1195-1198, (1989).
- 15 - J. R. Simard, P. A. Zunszain, J. A. Hamilton, and S. Curry, "Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis". Vol. 361, pp. 336-351, (2006).
- 16 - I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. East and S. Curry, "Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I". Biol. Chem., Vol. 276, pp. 22804-22809, (2001).
- 17 - J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri and S. Curry, "Structural Basis of the drug-binding specificity of human Serum Albumin". J. Mol. Biol., pp. 38-52, Vol. 353, (2005).
- 18 - J. Figge, T. H. Rossing, and V. Fencl, The role of serum-proteins in acid-base equilibria. J. Lab. Clin. Med., Vol. 117, pp. 453-467, (1991).

- 19 - H. Olsen, A. Andersen, A. Nordbø, U. E. Kongsgaard and O. P. Børmer, Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro". *BMC Clinical Pharmacology*, (2004).
- 20 - E. Kochva, "The origin of snakes and evolution of the venom apparatus". *Toxicon*, Vol. 25, pp. 65-106, (1987).
- 21 - W. C. Clark and H. K. Voris, "Venom neutralization by rattlesnake Serum albumin". *Science*, Vol. 164, pp. 1402-1404, (1969).
- 22 - J.M. Gutteridge, Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, Vol. 19, pp.141-158, (1993).
- 23 - B. Halliwell, Oxydant and human disease: some new concepts. *Faseb J* 1 pp. 358-364, (1987).
- 24 - B. Halliwell, "Albumin-an important extracellular antioxidant"?, *Biochem pharmacol*, Vol. 37, pp. 569-571, (1988).
- 25 - J. M. Brown, C. J. Beehler, E. M. Berger, M. A. Grosso, G. Whitman, L. S. Terada, J. A. Leff, A. H. Harken and J. E. Repine, "Albumin decreases hydrogen peroxide and reperfusion injury in isolated rat hearts", inflammation, pp. 583-589, (1989).
- 26 - J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri, and J. Loscalzo, "Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin, (S-nitrosothiols/endothelium-derived relaxing factor)", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 89, pp. 7674-7677, (1992).
- 27 - J. P. Wallis, "Nitric oxide and blood, *Transfusion Medicine*", Vol. 15, pp. 1-11, (2005).
- 28 - A. A. Bhattacharya, S. Curry, and N. P. Franks, Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. Vol. 275 (49), pp. 38731-38738, (2000).
- 29 - R. G. Reed and C. M. Burrington, The Albumin receptor effect may be due to a surface-induced conformational change in albumin. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, (17), pp. 9867-9872, (1989).
- 30 - P. Altmayer, U. Buch, and H. P. Buch, "Propofol binding to human blood proteins". *Arzneim Forsch Drug Res.*, Vol. 45, pp. 1053-1056, (1995).
- 31 - R. Liu, Q. Meng, J. Xi, J. Yang, Chung-Eun Ha, N. V. Bhagavan and R. G. Eckenhoff, Comparative binding character of two general anaesthetics for sites on human serum albumin. *Biochem. J.*, Vol. 380, pp. 147-152, (2004)
- 32 - Fukuzaki S, Urano H, Nagata K: Adsorption of Protein Onto Stainless-Steel Surfaces. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 80: 6-11.
- 33 - Norde W, Lyklema J: Adsorption of Human-Plasma Albumin and Bovine Pancreas Ribonuclease at Negatively Charged Polystyrene Surfaces.1. Adsorption Isotherms. Effects of Charge, Ionic-Strength, and Temperature.*Journal of Colloid and Interface Science* 1978, 66: 257-265.
- 34 - Norde W, Macritchie F, Nowicka G, Lyklema J: Protein Adsorption at Solid Liquid Interfaces -Reversibility and Conformation Aspects. *Journal of Colloid and Interface Science* 1986, 112: 447-456.
- 35 - Omanovic S, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel. *Langmuir* 1999, 15: 8315-8321.
- 36 - Jackson DR, Omanovic S, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Serum Proteins on Titanium.*Langmuir*, 2000, 16: 5449-5457.
- 37 - Rouhana R, Budge SM, MacDonald SM, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Interfacial Behaviour of Alpha-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin.*Food Research International* 1997, 30: 13-20.

- 38 - Cosman NP, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (EQCN) Studies of Protein Interfacial Behavior at Pt. *Langmuir* 2004, 20: 1711-1720.
- 39 - Cosman NP, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance to Detect Solvent Displacement by PH-Induced Conformational Changes of Proteins at Pt. *Analytical Chemistry* 2004, 76: 5945-5952.
- 40 - Brosseau CL, Maurice MS, Bearne SL, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (EQCN) Studies of the Adsorption Behaviour of An Enzyme, Mandelate Racemase, and Its Substrate, Mandelic Acid, on Pt. *Electrochimica Acta* 2005, 50: 1289-1297.
- 41 - Omanovic S, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel. *Langmuir* 1999, 15: 8315-8321.
- 42 - Jackson DR, Omanovic S, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Serum Proteins on Titanium. *Langmuir* 2000, 16: 5449-5457.
- 43 - Rouhana R, Budge SM, MacDonald SM, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Interfacial Behaviour of Alpha-Lactalbumin and Bovine Serum Albumin. *Food Research International* 1997, 30: 13-20.
- 44 - Cabilio NR, Omanovic S, Roscoe SG: Electrochemical Studies of the Effect of Temperature and pH on the Adsorption of Alpha-Lactalbumin at Pt. *Langmuir* 2000, 16: 8480-8488.
- 45 - Cosman NP, Fatih K, Roscoe SG: Electrochemical Impedance Spectroscopy Study of the Adsorption Behaviour of Alpha-Lactalbumin and Beta-Casein at Stainless Steel. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2005, 574: 261-271.
- 46 - Omanovic S, Roscoe SG: Interactive Adsorption Behavior of Beta-Lactoglobulin and Linoleate at A 316L Stainless Steel Surface. *Electrochemical and Solid State Letters* 2005, 8: E12-E15.
- 47 - Omanovic S, Roscoe SG: Interfacial Behavior of Beta-Lactoglobulin at A Stainless Steel Surface: An Electrochemical Impedance Spectroscopy Study. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000, 227: 452-460.
- 48 - Roscoe SG, Fuller KL, Robitaille G: An Electrochemical Study of the Effect of Temperature on the Adsorption Behavior of Beta-Lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science* 1993, 160: 243-251.
- 49 - Roscoe SG, Fuller KL: Interfacial Behavior of Globular-Proteins at a Platinum-Electrode. *Journal of Colloid and Interface Science* 1992, 152: 429-441.
- 50 - Brosseau CL, Roscoe SG: Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance and Chronocoulometry Studies of Phenylalanine Adsorption on Au. *Electrochimica Acta* 2006, 51: 2145-2152.
- 51 - C. Aharoni, M. Ungarish, Kinetics of activated chemisorption. Part 2. Theoretical models, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 73 (1977) 456-464.
- 52 - A. Gunay, E. Arslankaya, I. Tosun, Lead removal from aqueous solution by natural and pretreated clinoptilolite: adsorption equilibrium and kinetics, *J. Hazard. Mater.* 146 (2007) 362-371.
- 53 - The Constitution And Fundamental Properties Of Solids And Liquids. Part I: Solids. Irving Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, 38 (11), pp 2221-2295.
- 54 - Gettens RTT, Bai ZJ, Gilbert JL: Quantification of the Kinetics and Thermodynamics of Protein Adsorption Using Atomic Force Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2005, 72A: 246-257.

- 55 - Klinger A, Steinberg D, Kohavi D, Sela MN: Mechanism of Adsorption of Human Albumin to Titanium in Vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997, 36: 387-392.
- 56 - Brash JL, Tenhove P: Protein Adsorption Studies on Standard Polymeric Materials. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 1993, 4: 591-599.
- 57 - Bajpai AK, Mishra DD: Adsorption of Fibrinogen Onto Macroporous, Biocompatible Sponges Based on Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate). *Journal of Applied Polymer Science* 2006, 102: 1341 -1355.
- 58 - Sakiyama T, Tanino K, Urakawa M, Imamura K, Takahashi T, Nagai T et al.: Adsorption Characteristics of Tryptic Fragments of Bovine Beta-Lactoglobulin on a Stainless Steel Surface. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999, 88: 536-541.
- 59 - Batch Sorption Experiments: Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the Adsorption of Textile Metal Ions onto Teff Straw (*Eragrostis tef*) Agricultural Waste; Mulu Berhe Desta ; *Journal of Thermodynamics*, Volume 2013 (2013), p6 .
- 60 - M.I. Tempkin, V. Pyzhev, Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalyst, *Acta Phys. Chim. USSR* 12 (1940), 327–356.
- 61 - Lee Rg, Kim, S. W., *J. Biomed. Mater., Res*, 8, 251 – 259, (1974).
- 62 - Schmitt, A., Varoqui, R., Uniyal, S., Brash, J.L. Pusineri, C., *J. Colloid. Int. Sci.*, 92, 25-34, (1983)
- 63 - Brash, J.L., Brophy , J.M ., Feuerstein , I.A, *J. Biomed . Mater. Res. ,* 10, 429-443, (1976).
- 64 - Boffa, G.A, Lucien, N.Y., Faure, A., Boffa, M.C, Jozefonvicz, J. Szubarga , A. , Mandon P. Larrieu , M.J., *J. Biomed . Mater. Res.*, 11, 317-337, (1977).
- 65 - Brash, J.L, Uniyal, S, Samak, Q., *Trans. Amer. Soc, Artif, Int. Org.*, 20 , 69-76, 1974.
- 66 - Brash, J.L., Uniyal, S., *J. Polym . Sci., C* 66, 377-389, (1979).
- 67 - Soderquist, M.E., Walton, A.G., *J. Colloid. Int. Sci.*, 75, 386-397, (1980).
- 68 - Packham, M.A., Evans, G, Glynn, M.F., Mustard, J.F., *J. Lab. Clin. Med.*, 73, 686-697, (1969).
- 69 – Mizutani, T., *J. of Pharm . Sci .*, 69 , 279-282 , (1980).
- 70 - Baier, R. E, Dutton, R.C., *J. Biomed Mater. Res.*, 3, 191-206, (1969)
- 71 - Nyilas , E., Chiu , T .H ., Herzlinger , G.A., *Trans ; Amer ; Soc . Artif. Intern. Organs. ,* 20, 480-490, (1974).
- 72 - Norde , W., Lyklema , J.J ., *Colloid . Interface Sci.*, 66, 295-302, (1978).
- 73 – Macritchie, F., *Adv, Protein, Chem.*, 32, 283 – 326, (1978).
- 74 - Brash , J.L., Brophy , J.M ., Feuerstein , I.A, *J. Biomed . Mater. Res.*, 10, 429-443, (1976).
- 75 - Andrade, J., *Adv. Chem. Sen.*, 199, 351-356, (1982).
- 76 - Chan, B.A.C., Brach, J.L., *J. Of colloid and interface science*, 82, 217-225 , (1981).
- 77 - Ochoa , J.L ., *Biochem .*, 60, 1-15 (1978)

- 78 - Jennissen, H.P., Inserm . Editions. J.M Egly, Editor , 86 , 253 -264 , (1979).
- 79 – Brash, J.L., Annals of the N.Y. Academic of Sciences. 283, 356-371, (1977).
- 80 - Brash, J.L , Uniyal , S , Samak , Q., Trans. Amer . Soc , Artif, Int. Org ., 20 , 69-76, (1974) .
- 81 - Physical Biochemistry: Principles and Applications, Second Edition, David Sheehan, 2009 John Wiley & Sons, Ltd.
- 82 - Doonan, S. (ed.) (1996) Protein Purification Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol.59, Humana Press, Totowa, NJ, USA. An introduction to protein chromatography and purification.
- 83 - Dorsey, J.G., Cooper, W.T., Siles, B.A. et al. (1996) Liquid chromatography: Theory and methodology. Analytical Chemistry, 68, R515–68. A comprehensive review of liquid chromatography.
- 84 - Shi, Y., Xiang, R., Horvath, C. and Wilkins, J.A. (2004). The role of liquid chromatography in proteomics. Journal of Chromatography A, 1053, 27–36. A review on aspects of L C relevant to proteomics.
- 85 - Multi-dimensional Liquid Chromatography in Proteomics, Xiang Zhang, Aiqin Fang, Catherine P. Riley, Mu Wang, Fred E. Regnier, and Charles Buck. Anal Chim Acta, 2010; 664(2): 101–113.
- 86 - Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological And Technological Aspects, Yuliya V. Karpievitch, Ashoka D. Polpitiya, Gordon A. Anderson, Richard D. Smith And Alan R. Dabney, The Annals Of Applied Statistics, 2010, Vol. 4, No. 4, 1797–1823
- 87 - Winzor, D.J. (2003) Exclusion chromatography. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 56, 15–52. A review of the origin and uses of size exclusion (gel filtration) chromatography.
- 88 - Lienqueo, M.E. and Mahn, A. (2005). Predicting protein retention time in hydrophobic interaction chromatography. Chemical Engineering and Technology, 28, 1326–34. A review on hydrophobic interaction chromatography.
- 89 - Sheehan, D. (2008) Ion exchange chromatography, in Molecular Biomethods Handbook (eds J. Walker and R. Rapley), 2nd edn, Humana Press, Totowa, NJ, USA. Description of protein ion exchange chromatography.
- 90 - Gallant, S.R., Vunnum, S. and Cramer, S.M. (1996) Optimization of preparative ion-exchange chromatography of proteins: Linear gradient separations. Journal of Chromatography A, 725, 295–314. A review of prediction of chromatographic performance during protein chromatography.
- 91 - Jungbauer, A. (2005) Chromatographic media for bioseparation. Journal of Chromatography A, 1065, 3–12. A review of chromatography packings.
- 92 - Mondal, K. and Gupta, M.N. (2006) The affinity concept in bioseparation: Evolving paradigms and expanding range of applications. Biomolecular Engineering, 23, 59–76. A thought-provoking review on the affinity concept in bioseparation including precipitation and chromatography
- 93 - Dye-Ligand Affinity Chromatography, Anne F. McGettrick, D. Margaret Worrall, Protein Purification Protocols , Methods in Molecular Biology Volume 244, 2004, pp 151-157.
- 94 - Dye-Ligand Affinity Chromatography for Protein Separation and Purification, Nikolaos E. Labrou, Affinity Chromatography: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume: 147, 2000, 129-139.

- 95 - Chaga, S. (2001) Twenty five years of immobilized metal ion affinity chromatography: Past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 313-34. A review of IMAC chromatography.
- 96 - Leloup, V.M., Colonna, P., Ring, S.G. (1991). Alpha-amylase adsorption on starch crystallites. *Biotechnology and Bioengineering*, 38 (2), 127-134.
- 97 - Immobilized metal ion affinity chromatography, Jerker Porath, *Protein Expression and Purification*, Volume 3, Issue 4, August 1992, Pages 263–281.
- 98 - Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods, Marjeta Urh, Dan Simpson, Kate Zhao, *Methods in Enzymology*, Volume 463, 2009, Pages 417–438.
- 99 - Biomimetic dyes as affinity chromatography tools in enzyme purification, Y.D Clonis, N.E Labrou, V.Ph Kotsira, C Mazitsos, S Melissis, G Gogolas, *Journal of Chromatography A*, Volume 891, Issue 1, 1 September 2000, Pages 33–44
- 100 - Strategies for enzyme isolation using dye-ligand and related adsorbents, Scopes RK, *J Chromatogr.* 11;376:131-140, 1986.
- 101 - Affinity Chromatography: Principles and Applications; Sameh Magdeldin and Annette Moser,
- 102 - P-Toluenesulfonyl Chloride as an Activating Agent of Agarose for the Preparation of Immobilized Affinity Ligands and Proteins; Nilsson, K., Mosbach, K., *European Journal Of Biochemistry* 112: 397-402. (1980).
- 103 - Nucleotide Pyrophosphatase of Rat: Liver A Comparative Study on the Enzymes Solubilized and Purified from Plasma Membrane and Endoplasmic Reticulum; Erwin Bischoff, Thuy-Anh, Tran-Thi, And Karl F. A. Decker, *Eur. J. Biochem.* 51,353-361 (1975)
- 104 - Strakensteine, Spacer Arms In Affinity Chromatography: The Need for a More Regorous Approach *Biochem.* 2, 24, 210, (1910).
- 105 - M.-C. Hennion, *J. Chromatogr., A* 856 (1999) 3.[86] A. Aresta, C.D. Calvano, F. almisano, C.G. Zambonin, A. Monaco, S. Tommasi, B. Pilato, A.Paradiso, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 157.
- 106 - Q.C. Ji, E.M. Gage, R. Rodila, M.S. Chang, T.A. El-Shourbagy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17(2003) 794.
- 107 - Q.C. Ji, R. Rodila, T.A. El-Shourbagy, *J. Chromatogr., B* 847 (2007) 133.
- 108 - M. Rauh, M. Groschl, W. Rascher, *Clin Chem* 53 (2007) 902.
- 109 - S. Dai, H. Song, G. Dou, X. Qian, Y. Zhang, Y. Cai, X. Liu, Z. Tang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1273.
- 110 - P. Nanni, D. Parisi, G. Roda, M. Casale, A. Belluzzi, E. Roda, L. Mayer, A. Roda, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4142.
- 111 - A. Navare, M. Zhou, J. McDonald, F.G. Noriega, M.C. Sullards, F.M. Fernandez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 997.
- 112 - Z. Du, Y.-L. Yu, X.-W. Chen, J.-H. Wang, *Chemistry - A European Journal* 13 (2007) 9679.
- 113 - C.D. Calvano, C.G. Zambonin, O.N. Jensen, *Journal of Proteomics* 71 (2008) 304.

- 114 - P. Häggglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O.N. Jensen, P. Roepstorff, J. Proteome Res. 3 (2004) 556.
- 115 - E.F. Petricoin, C. Belluco, R.P. Araujo, L.A. Liotta, Nat. Rev. Cancer 6 (2006) 961.
- 116 - K. Racaityte, E.S.M. Lutz, K.K. Unger, D. Lubda, K.S. Boos, J. Chromato., A 890 (2000) 135.
- 117 - C. Grimm, K. Boos, C. Apel, K. Unger, P. Önnarfjord, L. Heintz, L. Edholm, G. Marko-Varga, Chromatographia 52 (2000) 703.
- 118 - K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K.K. Unger, Anal. Chem. 74 (2002) 809.
- 119 - E. Machtejevas, H. John, K. Wagner, L. Ständker, G. Marko-Varga, W.-G. Forssmann, R. Bischoff, K.K. Unger, J. Chromatogr., B 803 (2004) 121.
- 120 - W.-C. Lee, K.H. Lee, Anal. Biochem. 324 (2004) 1.
- 121 - W. Zhou, B.A. Merrick, M.G. Khaledi, K.B. Tomer, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 273.
- 122 - M.C. Posewitz, P. Tempst, Anal. Chem. 71 (1999) 2883.
- 123 - S. Feng, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, X. Jiang, H. Zou, B. Gong, Mol Cell Proteomics 6 (2007) 1656.
- 124 - R. Pieper, Q. Su, C.L. Gatlin, S.T. Huang, N.L. Anderson, S. Steiner, Proteomics 3 (2003) 422.
- 125 - J. Brand, T. Haslberger, W. Zolg, G. Pestlin, S. Palme, Proteomics 6 (2006) 3236.
- 125 - R.S. Tirumalai, K.C. Chan, D.A. Prieto, H.J. Issaq, T.P. Conrads, T.D. Veenstra, Mol Cell Proteomics 2 (2003) 1096.
- 127 - A.K. Yocum, K. Yu, T. Oe, I.A. Blair, J. Proteome Res. 4 (2005) 1722.
- 128 - P.G. Righetti, E. Boschetti, L. Lomas, A. Citterio, Proteomics 6 (2006) 3980.
- 129 - V. Thulasiraman, S. Lin, L. Gheorghiu, J. Lathrop, L. Lomas, D. Hammond, E. Boschetti, Electrophoresis 26 (2005) 3561.
- 130 - Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads, N., Belattar, T., Mekhalif, Materials Science and Engineering: C, Volume 24, Issue 4, 1 June 2004, Pages 507–511
- 131 - Synthesis Of Highly Porous Styrene-Divinylbenzene Copolymers Prepared In The Presence Of 2,2,4-Trimethylpentane, Abderrahim Djahièreche, Idir Rabia And André Revillon, Die Angewandte Makromolekulare Chemie, Volume 222, Issue 1, Pages 89–102, 1994.
- 132 - Stanley R Sandler et Wolf KaroRobert, Polymer syntheses, Gulf Professional Publishing, 1992, 332 p.
- 133 - Andrew J. Peacock et Allison R. CalhounSandlerWolf, Polymer chemistry: properties and applications, Hanser Verlag, 2006, 397 p.
- 134 - Size Control of Polystyrene Beads by Multistage Seeded Emulsion Polymerization, Sang-En Shim, Yoon-Jong Cha, Jae-Man Byun, Soonja Choe, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 71, 2259–2269 (1999).

- 135 - La synthèse des polymères dans l'eau, une réponse ancienne pour une nouvelle éco-conception, Thierry Hamaide, Clara Bourdelet, Jean Lager, Hervé Schaal et Jean Baptiste Thibaut, L'Actualité Chimique, Mai 2014, n°385.
- 136 - Christopher D. Anderson et Eric S Daniels, Emulsion Polymerisation and Latex Applications, Smithers Rapra Publishing, 2003, 160 p.
- 137 - George Odian, La polymérisation, Principes et applications [« Principales of polymérisation »], Paris, Polytechnica, 1994, 823 p.
- 138 - Adsorption Property and Chromatographic Affinity of Dye-Like Poly (Styrene Sodium Sulfonate) Sorbent toward Human Serum Albumin, Noureddine Belattar & Tahar Mekhalif, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials Vol 62, Issue 9, 2013.
- 139 - D. Dorfner, Ion exchange, Ed. W de Gruyter, 237-241, (1991), New York.
- 140 - Afeyan NB, Fulton SP, Regnier FE. J Chromatogr 1991; 544: 267-79.
- 141 - Fulton SP, Afeyan NB, Gordon NF, Regnier FE. J Chromatogr A 1991; 54:452-6.
- 142 - McCoy M, Kalghatgi K, Regnier FE, Afeyan NB. J Chromatogr A 1996; 743(1):221-9.
- 143 - Whitney D, McCoy M, Gordon N, Afeyan NB. J Chromatogr A 1998; 807(2):165-84.
- 144 - Liu AL, Zhu BF. Chin Biotechnol 2002;12(4):24-5.
- 145 - Xiong BH, Wang JD. Chin J Chromatogr 1997;15(6):486-9.
- 146 - Highly Crosslinked Poly(styrene-co -divinylbenzene) Microspheres Prepared by Precipitation Polymerization: Effects of the Polymerization Parameters on the Characteristics of the Particles, Hengli Cui, Hou Chen, Rongjun Qu, Chunhua Wang, Changmei Sun, Wenying Zhou, Mengmeng Yu, Hongyan Jiang. Journal of Applied Polymer Science, Vol. 111, Issue 6, p 3144–3149, 2009.
- 147 - Solid phase Synthesis of Aryl Amine, A., Wiloughby and Kevin T. Chapman, tetrahebron, 37, 40, 7181-7184, 1996.
- 148 - Nitration of Polystyrene Part-I Effect of Molecular Weight of Polymer on Nitration, I. Bajaj and S. R. Chatterjee, DEF. SCI. J., 1967 VOL. 17, 45-48.
- 149 - The nitration of polystyrene, Phillipides A.; Budd P. M.; Price C.; Cuncliffe A. V.; Polymer(Guildford) 34:1616, 3509-3513, Elsevier, 1993.
- 150 - Synthesis, Characterization and Thermal Study of Polyimides Derived from Polystyrene; Abdulsalam A. Shyaa, J. of university of anbar for pure science : Vol.6:NO.1: 2012
- 151 - Solid phase extraction of trace elements, V. Camel, Spectrochimica Acta Part B, 58 (2003), 1177-1233.
- 152 - Solide phase synthesis of aryl amine, A., Wiloughby and Kevin T chapman ; tetrahebron; 37,40,7181 - 7184 , 1996
- 153 - Adsorption of Human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads, Belattar N. Mekhalif T., Materials Science And Engineering: C, Volume 24, Issue 4, 2004, Pages 507-511.

- 154 - Chlorosulfonyl Styrene-Divinylbenzene Copolymer Characteristics as a Function Of Chlorosulfonation And Chlorination Reaction Parameters; Idir Rabia, Jamel E. Zerouk And Salim Mekhalif; *Polymers For Advanced Technologies*, Volume 9, Issue 2, Pages 107–112, February 1998.
- 155 - Synthesis and main properties of uniformly chlorosulfonyl-substituted styrene-divinylbenzene resins, Romuald Bogoczek, Elżbieta Kociolek-Balawejder, *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, Volume 4, Issue 4, November 1986, Pages 311–316
- 156 - *Infrared Microspectroscopy*, Marcel Dekker, Messerschmidt et Hantchcock 1988.
- 157 - Quantitative surface studies of protein adsorption by infrared spectroscopy: II. Quantification of adsorbed and bulk proteins, David J. Fink, Tim B. Hutson, Krishnan K. Chittur, R. Michael Gendreau, *Analytical Biochemistry*, Volume 165, Issue 1, 15 August 1987, Pages 147–154.
- 158 - *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Griffiths, P.; de Hasseth, J.A. (2007). (2nd Ed.). Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey.
- 159 - Biomaterial and method for obtaining it. J.L. Dewez, J.B. Lhoest, E. Detrait, P.G. Rouxhet, P. Bertrand, Ph. Van den Bosch de Aguilar, European Patent Application n° 95937734.2, (14/11/1995).
- 160 - MACART M. et GERBAULT L, *Clinical Chemistry Acta*, 122, 93-101, (1982).
- 161 - Determination of total protein, Gary L. Peterson, *Methods in Enzymology*, Vol. 91, 1983, p 95–119, *Enzyme Structure Part I*.
- 162 - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Marion M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, Issues 1–2, 1976, pp. 248–254.
- 163 - Efficient removal of albumin from human serum by monosize dye-affinity beads, Evrim Banu Altıntaş, Adil Denizli *Journal of Chromatography B*, Vol. 832, Issue 2, 7 March 2006, Pages 216–223.
- 164 - Systematic Investigation of the Thermodynamics of HSA Adsorption to N-iso-Propylacrylamide/N-tert-Butylacrylamide Copolymer Nanoparticles. Effects of Particle Size and Hydrophobicity, Stina Lindman, Iseult Lynch, Eva Thulin, Hanna Nilsson, Kenneth A. Dawson, and Sara Linse, *Nano Lett.*, 2007, 7 (4), pp 914–920.
- 165 - *Surface deposit theory and practice*, Mc Monnies CW. *J Brit Contact Lens Assoc.* 991;14:179–182.
- 166 - Adsorption behavior of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption, C. Freij-Larsson, T. Nylander, P. Jannasch, B. Wesslén, *Biomaterials*, Vol. 17, Issue 22, p 2199–2207, 1996.
- 167 - Adsorption of human serum albumin on to synthesized dye-like polystyrene gel beads, N., Belattar, T., Mekhalif, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 24, Issue 4, 1 June 2004, Pages 507–511
- 168 - D. DORFNER, *Ion exchange*, Ed. W de GRUYTER, 237-241, (1991), New York.
- 169 - Affinity adsorption of human vitamin K-dependent coagulation factor IX onto heparin-like poly (styrene sodium sulfonate) adsorbent, Nouredine Belattar, *Materials Science and Engineering C* 27 (2007) 849–854
- 170 - Adsorption Property and Chromatographic Affinity of Dye-Like Poly (Styrene Sodium Sulfonate) Sorbent Towards Human Serum Albumin, Nouredine Belattar, Tahar Mekhalif, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2013.
- 171 - Copper patterned polystyrene panels by reducing of surface bound Cu (II)-sulfonyl hydrazide complex, Niyazi Bicak, Bunyamin Karagoz. *Surface & Coatings Technology* 202 (2008) 1581–1587.

172- Chlorosulfonyl Styrene –Divinylbenzene Copolymer Characteristics as a Function of Chlorosulfonation And Chlorination Reaction Parameters, Idir Rabia , Jamel, E.Zerouk And Salim Mekhalif , Polymers of Advanced Technologies, Volume9 ,issue 2, Pages 107-112 , February 1998.

173 - Santini, R.; Griffith, M. C.; Qi, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39,. 8951–8954. 20.

174 - Comparative Efficacy of Polyamine-based Scavenger resins, Krishnarao sandhya, Bhagavathula Ravindranath..International j. of Org. Chem., 2012, 2, 71-74.

175 - Covalently immobilized porphyrins as photooxidation catalysts, Sonia M. Ribeiro, Armenio C. Serra and A. M. d'A. Rocha Gonsalves, Tetrahedron 63 (2007) 7885–7891.

176 - Poly (styrene sulfonamides) with EDTA-Like Chelating Groups for Removal of Transition Metal Ions, Niyazi Bic, Ak, Bahire Filiz Senkal, Demet Melekaslan, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 77, 2749–2755 (2000).

177 - Anslyn, Eric et Dennis Dougherty, Modern Physical Organic Chemistry, 2006, 1098 pp.

178 - Clayden, Greeves, Warren and Wothers, "Organic Chemistry", 2000, 1536 pp page 439

179 - O. Schales and S. S. Schales, "A Simple and Accurate Method for the Determination of Chloride in Biological Fluids," Journal of Biological Chemistry, Vol. 141, No. 3, 1941, pp. 879-884.

180 - MACART M. et GERBAULT L, Clinical Chemistry Acta, 122, 93-101, (1982).

Summary

We have studied the parameters which determine the purification of a protein affinity chromatography. Follows, we have made projection of this study on copolymers that we use in the preparation of a stationary phase. The purpose of this work was therefore the development of selective media for the analysis of a target protein that is HSA. In this context, we undertook the synthesis of insoluble functional polymers that can interact specifically with the HSA and, therefore, useful for its purification. The synthesis leading to the production of materials derived from crosslinked polymers with excellent properties, which can be used as stationary phases in affinity chromatography to the analytic stage. Parallel to this study helps to elucidate the mechanism governing the interactions between HSA and the polymer surface. For each step, we studied the influence of certain parameters in order to highlight their role and optimized in order to prepare resins with specific properties. The various methods of characterization have established in the different stages of synthesis, finding the desired functions: $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$ and $-\text{COL-NH-}$, on crosslinked polystyrene molecules and $-\text{AA}$, on crosslinked agarose molecules. The groups are mainly rooted in the para position on the aromatic rings and are uniformly distributed throughout the mass of the copolymer. The intermediate step after the hydrolysis step the nitration has obtained rate of substitution groups active high. This leads to improved rate of dye groups and amino acids. Quantitative analysis confirmed these rates. It should be noted however that these rates are overstated because of the presence of parasitic groups formed during the earlier stages. We get after the reaction a mixed resins.

ملخص

درسنا الوسائط التي تتحكم في تنقية بروتين بكميات جرافيا التجاذب. وبعد ذلك، قمنا بتطبيق هذه الدراسة على بوليميرات مشتركة نستعملها في تحضير الأطوار الثابتة. هدف هذا العمل كان إذا تطوير حوامل انتقائية لتحليل بروتين محدد ألا وهو ألبومين المصل الانساني (HSA). في هذا السياق، قمنا بتحضير بوليميرات وظيفية غير قابلة للذوبان ولها المقدرة على التفاعل انتقائيا مع ألبومين المصل الانساني، وبالتالي استعمالهم لتنقيته. تحضيرها أدى الى الحصول على حوامل مشتقة من بوليميرات متفرعة تمتلك خصائص مميزة بالإمكان استعمالها كأطوار ثابتة في كروماتوغرافيا التجاذب اثناء مرحلة التحليل. موازاة مع هذا، الدراسة تساهم في فهم آلية التفاعلات المتبادلة بين الألبومين و سطح البوليمر. في كل مرحلة درسنا تأثير بعض الوسائط لتحديد دورها و قيمها المثلى بهدف تحضير بوليميرات لهم خصائص محددة. الطرق المختلفة لتحديد الوظائف بينوا، في مختلف مراحل التحضير، الحصول على الوظائف المرغوبة: $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NO}_2$, NH_2 ، $-\text{COL-NH-}$ على جزيئات البوليستيران المتفرعة و جزيئات الأحماض الأمينية على جزيئات الأروغوز المتفرعة أيضا. الوظائف في أغلبها مثبتة في وضع بارا على الانوية الاروماتية وهي غير منتظمة التوزيع خلال كل كتلة البوليمر المشترك. بإمكاننا أن نقول أيضا بأن الألبومين أظهر جاذبية حسنة تجاه البوليميرات المشتركة، لكن هذه الجاذبية تختلف من سطح لآخر. الامتزازات عند 37°C للألبومين على المواد المحضرة هم من نمط لنغمير.

Résumé

Nous avons étudié les paramètres qui conditionnent la purification d'une protéine en chromatographie d'affinité. Par la suite, nous avons effectué la projection de cette étude sur des copolymères que nous utilisons dans la préparation de phases stationnaires. L'objet de ce travail était donc le développement des supports sélectifs pour l'analyse d'une protéine cible qui est la HSA.

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de polymères fonctionnels insolubles susceptibles d'interagir spécifiquement avec la HSA et, de ce fait, utilisables pour sa purification. La synthèse ayant conduit à l'obtention de supports dérivés de polymères réticulés, doté d'excellentes propriétés, pouvant être utilisés comme phases stationnaires en chromatographie d'affinité au stade analytique.

Parallèlement à cela l'étude contribue à élucider le mécanisme régissant les interactions entre la HSA et la surface du polymère. Pour chaque étape, nous avons étudié l'influence de certains paramètres afin de mettre en évidence leur rôle et de les optimiser dans le but de préparer des résines ayant des propriétés déterminées.

Les différentes méthodes de caractérisation ont permis d'établir, dans les différentes étapes de synthèse, l'obtention des fonctions désirées : $-SO_3H$, $-NO_2$, $-NH_2$ et $--COL-NH-$, sur les molécules de polystyrène réticulé et des molécules d'acides aminés sur les molécules d'agarose réticulé également. Les groupements sont majoritairement greffés en position para sur les noyaux aromatiques et sont uniformément répartis à travers toute la masse du copolymère.

L'étape intermédiaire d'hydrolyse qui suit l'étape de nitration a permis l'obtention de taux de substitution en groupements actifs élevés. Ce qui conduit à des taux améliorés en groupements colorant et acides aminés. Les analyses quantitatives ont confirmé ces taux. Il est à noter cependant que ces taux sont surestimés en raison de la présence parasite de groupements formés durant les étapes antérieures. Nous obtenons en fin de réaction des résines mixtes.

Nous pouvons ainsi dire que l'Albumine présente une bonne affinité vis à vis des résines préparées, mais cette affinité diffère d'une surface à une autre. Les isothermes d'adsorption à $37^\circ C$ de l'albumine sur les matériaux à propriétés adsorbantes sont de type Langmuir. Ces résultats suggèrent que l'adsorption est due à la présence de sites actifs caractérisés par la nature des fonctions qui les constituent.