

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

Ecole doctorale Science Technologie Santé

ANNEE 2010

N°

THESE

présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Pharmacognosie

Par

Leslie BOUDESOCQUE

Le 09/12/2010

NOUVELLES METHODOLOGIES DE PURIFICATION DE PEPTIDES PAR
CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE:
APPLICATION A L'ISOLEMENT ET A LA PURIFICATION DE PEPTIDES BIOACTIFS

Sous la direction du : Pr. J.H. Renault (UMR CNRS 6229)

Dr. G. Bellon (UMR CNRS 6237)

JURY :

Pr Laurent BAZINET	Université Laval (Québec)	Rapporteur
Dr Alain FOUCAULT	Université de Nantes	Rapporteur
Dr Frédéric MUYARD	Université de Franche Comté	Examineur
Dr John Mc GARRITY	Société Lonza (Suisse)	Examineur
Dr William HORNEBECK	Université de Reims Champagne-Ardenne	Examineur
Pr J.H. RENAULT	Université de Reims Champagne-Ardenne	Directeur de thèse
Dr Georges BELLON	Université de Reims Champagne-Ardenne	Directeur de thèse

Remerciements

En tout premier lieu je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de leur présence.

Je remercie le Professeur Laurent Bazinet de l'Université Laval au Québec d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également de Docteur Alain Foucault du GEPÉA de Saint Nazaire pour avoir accepté la charge de rapporteur, ainsi que pour ces remarques très pertinentes qui ont su rendre beaucoup plus distrayantes certaines sessions du congrès CCC 2010.

Je remercie le Docteur Frédéric Muyard d'avoir accepté d'assister à cette soutenance.

Je remercie le Docteur John Mc Garrity de la société Lonza ainsi que le Dr Matthieu Giraud, qui n'a malheureusement pas pu être là aujourd'hui, pour les discussions fructueuses sur les projets sur lesquels nous avons été amenés à collaborer. J'ai particulièrement apprécié cette collaboration qui m'a permis d'entrevoir le monde industriel et ces nombreuses contraintes.

Je remercie très chaleureusement le Dr William Hornebeck pour m'avoir si gentiment aidée lors de mes débâtes enzymatiques et pour tous les conseils très judicieux qu'il m'a prodigué si généreusement tout au long de ce projet.

Je remercie le Docteur Georges Bellon pour ces trois années de travail commun durant lesquelles ces conseils avisés ont su m'aider à progresser dans un domaine qui en pratique m'était inconnu : la biologie.

Enfin, Jean-Hugues je te remercie pour ces trois années de thèse (plus quelques mois de stages... 9 en tout je crois) que j'ai passées sous ta direction. J'ai réellement apprécié notre collaboration tant sur le plan scientifique, où pour reprendre une de tes expressions je te considère un peu comme mon "papa scientifique", que sur le plan humain avec tes nombreuses qualités et tes très légers défauts. Je te remercie pour tous les conseils, discussions et débats que nous avons pu avoir et j'espère sincèrement qu'il en sera encore longtemps ainsi.

Je remercie mes parents et ma famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté tout au long de ces longues années d'études.

Pierre-Olivier, je te remercie pour ton affection et surtout ta patience qui m'ont permis de mener ce projet à bien.

Je remercie toute l'équipe Isolement et Structure au sein de laquelle ce fut un réel plaisir de travailler chaque jour tant l'ambiance y est conviviale. En particulier je tiens à remercier le Professeur Catherine Lavaud, directrice de l'équipe, de m'avoir permis de travailler dans des conditions aussi idéales que possibles.

Agathe, Charlotte, Nico, Mahmoud, Nassima, Dima et tous les autres encore merci pour votre bonne humeur, et pour tous les pots du labo.

Un merci tout spécial à Jean-Marc, Pedro et Bertrand pour leur patience et leur pédagogie lors des nombreuses discussions sur le projet DCSY, et lors de la prise en main de Topspin et xwinplot....

Je remercie le Dr Romain Kapel de Nancy avec qui j'ai eu plaisir à travailler sur le projet VW.

Un grand merci à Martine Decarme à qui j'ai fait passer les pires derniers mois de carrière et qui malgré tout a su faire preuve d'une très grande gentillesse.

A tous les membres de l'équipe MEDyC, sur le site médecine et sciences, je vous remercie pour votre accueil chaleureux. Un grand merci à Laurent Duca, Hervé Sartelet et Padawan pour m'avoir supportée avec mes extraits indosables.

Aux doctorants du bâtiment 18, merci pour toutes les soirées, beach volley et autres laser game que nous avons passé ensemble. Aux anciens, Jeannot Antoine Nico Probst..., merci de m'avoir accueillie si gentiment moi une non chimiste (ah ah). A la promo 2007, Saskia Clacker Tom-Tom Sylvain et les autres, ce fut trois années fort sympathiques avec beaucoup d'activités (surtout avec la SCF...) Je vous souhaite à tous bon courage et j'espère qu'on restera en contact. Aux petits nouveaux, Anne Bernard Mahmoud Nassima Bertrand et ceux que j'oublie, bon courage (c'est vrai que sans la promo 2007 ça sera moins drôle on était les meilleurs....).

Sommaire

<i>Table des Abréviations</i>	11
Introduction générale.....	17
Partie I Notions générales sur les peptides et la Chromatographie de Partage Centrifuge.....	23
I.1 Peptides : définition, propriétés et intérêts	23
I.1.1 Définition générale	23
I.1.2 Structures et propriétés.....	23
I.1.2.1 Structure primaire des peptides.....	23
I.1.2.2 Structure secondaire	24
I.1.2.3 Structure tertiaire	26
I.1.3 Modes de production des peptides.....	27
I.1.3.1 La synthèse peptidique.....	27
I.1.3.2 Les biotechnologies	27
I.1.3.3 L'extraction à partir de matière première d'origine naturelle	27
I.1.4 Activités biologiques et intérêts	28
I.2 Méthodes d'isolement et de purification de peptides	30
I.2.1 Principe général et problématique.....	30
I.2.1.1 Capture ou pré-purification.....	30
I.2.1.2 Purification intermédiaire.....	31
I.2.1.3 Polissage	31
I.2.2 Méthodes de purification des peptides.....	32
I.2.2.1 La précipitation.....	32
I.2.2.2 La chromatographie par échange d'ions	33
I.3 La Chromatographie de Partage Centrifuge	35
I.3.1 La chromatographie liquide/liquide : évolution des technologies.....	35
I.3.2 La CPC : définition et concepts	38
I.3.2.1 Définition	38
I.3.2.2 Nature des phases stationnaires et mobiles	38
I.3.2.3 Paramètres chromatographiques.....	40

I.3.2.4	Mode de pompage	44
I.3.2.5	Appareillage utilisé au laboratoire	44
I.3.2.6	Intérêt de la CPC	46
I.3.3	Modes de développement existants et leurs applications à la purification de peptides et de protéines	46
I.3.3.1	Le mode élution	47
I.3.3.2	Le mode frontal : TMB séquentiel	53
I.4	La CPC en mode déplacement et ses applications à la purification de peptides.....	55
I.4.1	Historique	55
I.4.2	Le mode déplacement en chromatographie liquide/liquide.....	56
I.4.2.1	Principe général	56
I.4.2.2	Les acteurs mis en jeu.....	58
I.4.2.3	Le train isotachique	60
I.4.3	Le pH-zone refining.....	62
I.4.3.1	Introduction.....	62
I.4.3.2	Domaine d'application.....	63
I.4.3.3	Principe général	64
I.4.3.4	Mise en œuvre du pHZR en CPC.....	70
I.4.3.5	Exemples d'application du pHZR	70
I.4.3.6	Application à la purification de peptides.....	74
I.4.4	Le mode échange d'ions	76
I.4.4.1	Introduction.....	77
I.4.4.2	Divergences avec le pHZR.....	77
I.4.4.3	Principe général	78
I.4.4.4	Echange d'ions faible	81
I.4.4.5	Echange d'ions fort	84
I.4.4.6	Influence de l'échangeur sur le système biphasique de solvants	86
I.4.4.7	Mise en œuvre en CPC.....	87

I.4.4.8	Champ d'application du mode échange d'ions	88
	<i>Références bibliographiques</i>	90
Partie II	Développement d'une nouvelle méthodologie de purification de peptides par CPC .	103
II.1	Application du mode échange d'ions à la purification d'un mélange synthétique de dipeptides.....	103
II.1.1	Introduction	103
II.1.1.1	Finalité de l'étude	103
II.1.1.2	Choix du mélange de peptides	104
II.1.1.3	Choix du mode de développement	105
II.1.2	Choix des acteurs en mode échange d'ions.....	107
II.1.2.1	Tandem système biphasique de solvants/échangeur	107
II.1.2.2	Choix initial du déplaceur	109
II.1.2.3	Etude de la robustesse du système	109
II.1.2.4	Détermination de la composition des phases du système.....	110
II.1.3	Détermination des paramètres expérimentaux optimaux.....	111
II.1.3.1	Détermination du ratio échangeur/déplaceur	112
II.1.3.2	Ratio échangeur/peptides	116
II.1.3.3	Recherche d'un autre déplaceur	122
II.1.3.4	L'échange d'ions mixte (MIXCPC)	125
II.1.3.5	Impact de la quantité de TEA introduite dans le système.....	128
II.1.3.6	Segmentation de la phase stationnaire.....	134
II.1.3.7	Convergence des deux approches d'optimisation.....	137
II.1.4	Etudes des interactions échangeur/peptides mises en jeu.....	141
II.1.4.1	Introduction	141
II.1.4.2	RMN DOSY ^1H et ^{31}P	145
II.1.4.3	Obtention de valeurs de diffusion de référence	147
II.1.4.4	Etude du comportement diffusionnel du DEHPA et de son sel sodique	149
II.1.4.5	Détermination de la taille des entités formées.....	154
II.1.4.6	Etude des interactions DEHPA/peptides	160

II.1.4.7	Conclusion sur l'étude RMN DOSY	162
II.1.5	Conclusion	162
II.2	Application du procédé par échange d'ions mixte	163
II.2.1	En mode capture : application au fractionnement d'extraits de luzerne.....	163
II.2.1.1	Introduction sur la luzerne <i>Medicago sativa</i>	164
II.2.1.2	Application à l'hydrolysate de protéines blanches de luzerne.....	165
II.2.1.3	Application à des extraits issus du procédé luzernier de déshydratation.....	173
II.2.1.4	Conclusion sur l'application du procédé par MIXCPC à l'étape de capture	182
II.2.2	Application du mode échange d'ions en tant que méthode de polissage : application à une problématique industrielle.....	183
II.2.2.1	Le dirucotide ou SF328	183
II.2.2.2	Application du procédé par échange d'ions en CPC.....	186
II.2.3	Conclusion sur les applications du procédé par échange d'ions en CPC.....	193
II.3	Purification d'un composé de nature peptidique et d'intérêt industriel en mode élution .	194
II.3.1	Purification d'une ciclosporine modifiée : le DB-003	194
II.3.1.1	Le DB-003 : propriétés et objectifs du projet	195
II.3.1.2	Mise au point du procédé de purification par CPC.....	197
II.3.1.3	Etude du problème de pulsation	206
II.3.1.4	Application du mode co-courant.....	211
II.3.1.5	Conclusion sur le projet DB-003	211
II.4	Conclusion générale sur la seconde partie	212
	<i>Références bibliographiques</i>	214
Partie III	Valorisation des extraits de luzerne en physiopathologie cutanée	223
III.1	Matrice extracellulaire, métalloprotéinases matricielles et vieillissement cutané.....	223
III.1.1	La peau.....	223
III.1.1.1	La peau : définition	223
III.1.1.2	Composition du tissu cutané	224
III.1.2	La matrice extracellulaire (MEC).....	226
III.1.2.1	Définition de la MEC.....	226

III.1.2.2	Composition de la MEC.....	227
III.1.2.3	Implication de la MEC en physiopathologie cutanée	233
III.1.3	Les métalloprotéinases matricielles	233
III.1.3.1	Définition	233
III.1.3.2	Classification des MMPs	234
III.1.3.3	Structure générale des MMPs	237
III.1.3.4	Mécanismes d'activation des proMMPs	238
III.1.3.5	Les inhibiteurs endogènes des MMPs	240
III.1.3.6	Implication des MMPs en physiopathologie cutanée	242
III.1.4	Le vieillissement cutané : mécanisme et acteurs	243
III.1.4.1	Définition	243
III.1.4.2	Cascades protéolytiques mises en jeu.....	245
III.1.4.3	Moyen de lutte contre le vieillissement cutané	249
III.2	Evaluation des fractions issues du sérum de luzerne	251
III.2.1	Rappel sur le matériel à tester	251
III.2.1.1	Les bruts de sérum	251
III.2.1.2	Les fractions après MIXCPC	252
III.2.2	Evaluation du potentiel antioxydant	252
III.2.2.1	Introduction.....	252
III.2.2.2	Test de capture du DPPH	253
III.2.2.3	Conclusion	256
III.2.3	Evaluation du potentiel en tant inhibiteur enzymatique	256
III.2.3.1	Protocole d'évaluation.....	256
III.2.3.2	Criblage des bruts	260
III.2.3.3	Etude du brut F 3s.....	261
III.2.3.4	Etude préliminaire des fractions de F 3s	261
III.2.3.5	Cas de la fraction 132-154	264
III.2.3.6	Cas de la fraction 68-95	266

III.2.4 Conclusion	270
III.3 Evaluation de l'hydrolysate de protéine blanche	270
III.3.1 Rappel sur le matériel à tester	271
III.3.2 Evaluation des activités biologiques.....	271
III.3.2.1 Evaluation du potentiel antioxydant	271
III.3.2.2 Evaluation du potentiel en tant qu'inhibiteur enzymatique	272
III.3.3 Conclusion	273
III.4 L'hydrolysate de PX.....	273
III.5 Conclusion.....	274
<i>Références bibliographiques</i>	275
Conclusion générale	281
<i>Annexes</i> 285	

Table des Abréviations

A

AA	Acide Aminé
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AcOEt	Acétate d'Ethyle
AcOH	Acide acétique
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AgNO ₃	Nitrate d'argent
Al336	Aliquat 336
AOT	bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate sodique
AP	Activator Protein
APMA	Acétate (4-AminoPhényl)Mercurique
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATPS	Aqueous Two Phases System
AY	AlanylTrosine

B

BPPLIED	Bipolar Pulse Pair Longitudinal-Eddy-current Delay
BnzCl	Chlorure de benzalkonium
BrAcT ₃	BromoAcétylThyronine tri iodée

C

CaCl ₂	Chlorure de calcium
CCC	Chromatographie à Contre Courant
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH ₃ CN	acétonitrile
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIPP	Capture Intermediate Purification Polishing
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPC	Chromatographie de Partage Centrifuge
CRH	Corticotropin Releasing Hormon

COSY **CO**rrelation **S**pectroscop**Y**

CuSO₄ Sulfate de cuivre

D

D ₂ O	Eau deutérée
DEHPA	Acide Di(2-Ethylhexyl)Phosphorique
DMF	DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DMSO-D ₆	DiMéthylSulfOxyde deutéré
Dnp	Dinitrophényl-diaminopropionyl
DNP	DiNitroPhényl
DOSY	Diffusion Ordered SpectroscopY
DPA	N-Dodecanoyl-L-Proline-3,5-Diméthylanilide
Dplc	Déplaceur
DPPH	DiPhénylPicriHydrazyl

E

EC ₅₀	Concentration Efficace 50
EECCC	Elution Extrusion CounterCurrent Chromatography
EFL	Extrait Foliaire de Luzerne
EGF	Epidermal Growth Factor
EMEA	Agence Européenne du Médicament
EPC	Extracteur de Partage Centrifuge
ESI	ElectroSpray Ionization

F

FCPC	Fast Centrifugal Partition Chromatograph
FDA	Food and Drug Administration
FeCl ₃	Chlorure ferrique
FRET	Transfert d'Energie de Fluorescence par Résonance

G

GAG	GlycoAminoGlycane
GG	GlycylGlycine
GPI	GlycosylPhosphatidylInositol
GUESS	Generally Useful Estimation of Solvent System
GY	GlycyltYrosine

H

HBPM	Héparines de Bas Poids Moléculaire
HCl	Acide Chlorhydrique
HLE	Human Leucocyte Elastase
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOD	Résiduel protoné de l'eau deutérée
HSCCC	High Speed CounterCurrent Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation

I

IC ₅₀	Concentration Inhibitrice 50
IL	InterLeukine

K

KGF	Keratinocyte Growth Factor
-----	-----------------------------------

L

LA2	N-Lauryl-N-trialkylméthylAmine
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
LDL-RP	Low Density Lipoprotein Related Protein
LV	LeucylValine
LY	LeucyltYrosine

M

MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAP	Mitogen Activated Protein
Mca	7-Méthoxycoumarine-4-acétyl
MCSGP	Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification

MDM	MultiDual Mode
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MeOH	méthanol
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MiBK	MétylisoButyl cétone
MIXCPC	Mix Ion eXchange Centrifugal Partition Chromatography
MM	Masse Molaire
MMP	Matrix MetalloProtease
MnCl ₂	Chlorure de manganèse
MP	Phase Mobile
MSA	Acide MéthaneSulfonique
MtBE	Méthyl-ter-Butyl Ether
MT-MMP	Membrane-Type Matrix MetalloProtease

N

NaCl	Chlorure de sodium
NaDEHP	Di(2-EthylHexyl)Phosphate sodique
NaOH	Hydroxyde de sodium
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i>-Butanol
NH ₃ (aq)	Ammoniaque

P

PEG	PolyEthylène Glycol
pHZR	pH Zone Refining
pl	Point Isoélectrique
PX	concentré de Protéines Xanthophylles

Q

Q-TOF	Quadrupole Time-Of-Flight
-------	----------------------------------

R

Rf	R apport F rontal
RMN	R ésonnance M agnétique N ucléaire
ROS	R eactiv O xxygen S pecies
RRT	T emps de R étention R elatif
RuBisCO	R ibulose-1,5- B isphosphate C arboxylase- O xygénase

S

SDS	S odium D odécyl S ulfate
SEP	S clérose E n P laques
SMB	S imulated M oving B ed
SOD	S uper O xxyde D ismutase
SP	P hase S tationnaire

T

TEA	T ri E thyl A mine
TFA	acide T ri F luoro A cétique
TGF	T ransforming G rowth F actor
TIMP	T issue I nhibitor of M etallo P roteases
TMB	T rue M oving B ed
TNF	T umor N ecrosis F actor
TOF	T ime- O f- F light

U

uPA **U**rokinase type **P**lasminogen **A**ctivator

UV **U**ltra**V**iolet

V

VW **V**alyl**T**ryptophane

Z

ZnCl₂ **C**hlorure de zinc

| Introduction générale

Introduction générale

Les peptides occupent une place importante et en constante expansion dans les domaines de hautes valeurs ajoutées que sont la dermo-cosmétique ou l'industrie pharmaceutique. Ainsi certains peptides sont devenus des produits phares de ces marchés tels que les peptides issus de la protéolyse partielle des composants de la matrice extracellulaire ou matrikine comme les peptides d'élastine, certains anticancéreux comme la pentostatine (Nipent[®]), les anti-hypertenseurs inhibiteurs de l'enzyme de conversion comme le lisinopril (Zestril[®]), ou encore l'immunosuppresseur ciclosporine (Néoral[®]).

Néanmoins, la production de peptides bioactifs à l'échelle industrielle, en particulier leur purification, demeure encore à ce jour un facteur limitant à leur développement, et ce qu'ils soient issus de la synthèse organique, des biotechnologies ou encore d'extraits végétaux.

Le projet qui m'a été confié se situe à l'interface des thématiques de recherche de deux équipes appartenant à l'IFR 53 Cellules MicroEnvironnement :

- l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR) UMR CNRS 6229, et plus particulièrement l'équipe Isolement & Structure, qui s'intéresse, entre autres, au développement de nouvelles méthodologies de purification de produits bioactifs issus de plantes, de la biomasse ou encore des biotechnologies ;
- l'unité Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) UMR CNRS 6237, et plus particulièrement l'équipe Régulation de la Protéolyse et Signalisation cellulaire qui s'intéresse à la dégradation de la matrice extracellulaire par des enzymes spécifiques : les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs).

Ce projet s'inscrit également dans l'optique de valorisation des coproduits issus de la filière agricole, chère à la région Champagne Ardenne, puisqu'il a également comme objectif la valorisation du pool peptidique de la Luzerne (*Medicago sativa*) dans les domaines de la cosmétique ou du pharmaceutique.

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties distinctes.

La première situe le sujet avec un bref rappel général sur les peptides et les méthodes de purifications existantes, pour continuer avec des notions générales sur la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), pour conclure par une description beaucoup plus détaillée d'un mode particulier utilisé en CPC : le mode déplacement, mode qui trouvera des développements originaux dans le cadre de ce travail de thèse.

La seconde partie présente la mise au point d'une méthodologie originale de purification de peptides par CPC, utilisant un mélange synthétique de dipeptides. Ce procédé met en jeu le mode échange d'ions relevant du mode de développement par déplacement dans un schéma particulier : l'échange d'ions mixte avec une phase stationnaire qui peut être homogène ou segmentée. L'étude fondamentale des paramètres physico-chimiques régissant ce procédé, ainsi que celles des interactions mises en jeu lors des échanges sont également abordées. Une étude du comportement diffusional des entités impliquées dans l'extraction des peptides a ainsi été réalisée en collaboration avec les docteurs Pedro Lameiras et Jean-Marc Nuzillard (UMR 6229, Equipe Isolement & Structure).

Le procédé développé au cours de ces travaux a ensuite été confronté à divers problèmes de purification rencontrés lors de la production de peptides. Un procédé de purification de peptides se découpe en trois stades distincts se résumant par l'acronyme CIPP: l'étape de Capture ou pré-fractionnement, l'étape de Purification Intermédiaire et enfin l'étape de Polissage. La méthodologie mise au point a été appliquée avec succès aussi bien à la capture de peptides au sein d'extraits complexes qu'au polissage d'un peptide d'intérêt pharmaceutique.

L'application de ce procédé au fractionnement de divers extraits issus de la luzerne est ensuite décrite. La collaboration avec le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) UPR CNRS 6811 (Dr Ivan Marc) nous a donné l'opportunité de confronter notre procédé à la capture d'un dipeptide bioactif clairement identifié au sein d'un hydrolysate complexe de protéines blanches de luzerne.

Puis le fractionnement du sérum de luzerne, coproduit de la filière luzernière de déshydratation, dans l'optique d'une valorisation en dermo-cosmétique est décrit. Un second hydrolysate protéique a également été étudié : un hydrolysate de concentré Protéines Xanthophylles (PX), obtenu tout comme le sérum dans le cadre d'une collaboration avec la société ARD (Pomacle).

La fin de ce paragraphe concerne l'application de la méthodologie par échange d'ions en CPC au polissage d'un peptide d'intérêt pharmaceutique, le dirucotide, projet réalisé dans le cadre d'une collaboration avec la société Lonza (Suisse).

Enfin le dernier paragraphe de cette partie est également consacré à un projet mené dans le cadre de la collaboration avec la société Lonza : la purification d'un cyclopeptide entièrement protégé, pour lequel une collaboration avec l'équipe de Génie des Procédés Environnement et Agroalimentaire (GEPEA) UMR CNRS 6144 (Dr Alain Foucault) a été nécessaire pour la compréhension et la visualisation des phénomènes hydrodynamiques intervenant dans la séparation.

La troisième partie situe dans un premier temps le contexte dans lequel les extraits de luzerne fractionnés par CPC ont été testés. Après un rappel sur la peau, la matrice extracellulaire (MEC) et les MMPs, les mécanismes du vieillissement cutané et les moyens de lutte existant contre ce phénomène sont détaillés. La valorisation des extraits (sérum, hydrolysate de PX, hydrolysate de

protéines blanches) en tant qu'agents anti-âge potentiels est ensuite décrite. Pour ce faire, leur potentiel antioxydant et anti-protéasique, vis-à-vis des MMPs ou de certaines sérine protéases impliquées dans le vieillissement cutané, ont été évalués.

Ces travaux ont eu pour conséquence positive directe la mise en place d'une collaboration industrielle pérenne avec la société Lonza, se traduisant par le dépôt conjoint d'un brevet européen. Egaleme nt, ils ont ouvert la voie à de possibles valorisations d'extraits de luzerne jusque là oubliés : une en tant qu'agent phytosanitaire permettant une mise sur le marché à moyen terme, et l'autre comme source possible d'agent de lutte contre le vieillissement cutané qui nécessitera un temps de développement plus conséquent.

Partie I : Notions générales sur les peptides et la Chromatographie de Partage Centrifuge

Partie I Notions générales sur les peptides et la Chromatographie de Partage Centrifuge

I.1 Peptides : définition, propriétés et intérêts

I.1.1 Définition générale

Les peptides appartiennent à la catégorie des biopolymères : ils sont constitués d'un enchaînement d'acides aminés, appelés résidus, liés par des liaisons amides (ou liaison peptidique).

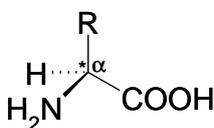


Figure 1: Formule générale d'un acide aminé.

Les peptides naturels, codés par l'ADN, peuvent être formés à partir de 20 acides aminés naturels différents (Annexe 1).¹

Ces acides aminés possèdent un carbone asymétrique (carbone α , C_{α}) (Figure 1), et la chaîne latérale R peut être de nature variée : aliphatique, aromatique, acide, basique etc.

Classiquement, les peptides sont classés en fonction du nombre d'acides aminés qu'ils contiennent :

- les oligopeptides, contenant moins de 10 acides aminés ;
- les polypeptides, contenant entre 10 et 50 acides aminés ;
- les protéines, contenant plus de 50 acides aminés.¹

I.1.2 Structures et propriétés

La structure des peptides et protéines peut être décrite selon 4 niveaux d'organisation différents. De ces structures vont découler les propriétés des peptides.

I.1.2.1 Structure primaire des peptides

On désigne par structure primaire, la séquence d'acides aminés dont est composé le peptide. Cette séquence est propre à chaque peptide et dépend, pour les peptides naturels, de la séquence en nucléotides du gène codant ce peptide.

On considère dans ce cas que les acides aminés sont liés uniquement par liaison peptidique, représentée Figure 2.

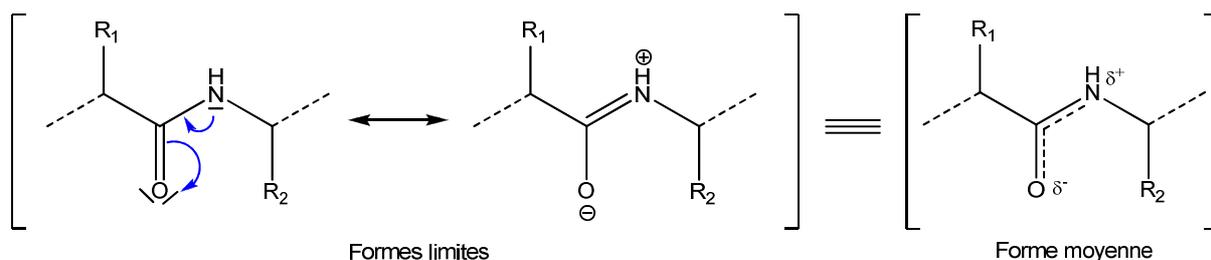


Figure 2: La liaison peptidique.

Les peptides sont des molécules potentiellement chargées. Les acides aminés possèdent, comme leur nom l'indique, des groupements amine et acide carboxylique. Ces fonctions peuvent être porteuses de charges lorsqu'elles sont situées aux extrémités de la chaîne principale mais elles ne sont pas les seules impliquées. En effet, les chaînes latérales peuvent être également porteuses de groupements potentiellement chargés (OH, SH, NH₂ etc.) selon le pH du milieu.¹

Il en résulte que, suivant sa séquence en acides aminés, un peptide sera ou non porteur d'une charge nette déterminée à un pH donné, ce qui bien entendu aura des implications fortes lors de sa purification.

Ainsi le point isoélectrique ou pH isoélectrique d'un peptide (pI ou pHi) est défini comme étant le pH où la charge globale du peptide est nulle (forme zwitterionique). Le pI est un paramètre propre à chaque peptide.

Du pI va dépendre la solubilité du peptide en milieu aqueux (Figure 3):

- au pI le peptide précipite ;
- à pH inférieur au point isoélectrique, la charge globale est positive ;
- à pH supérieur au point isoélectrique, la charge globale est négative.

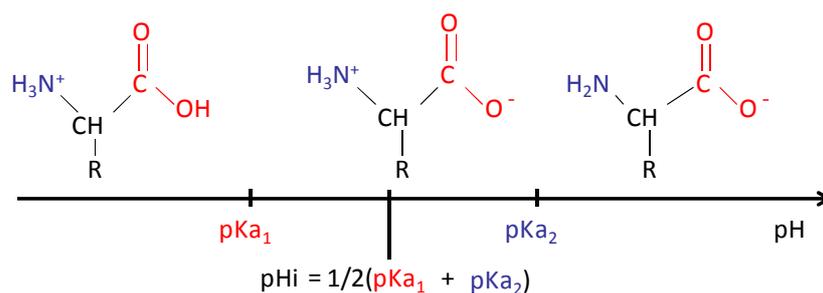


Figure 3 : Répartition des espèces en fonction du pH.

1.1.2.2 Structure secondaire

Cette structure décrit l'arrangement tridimensionnel local et est organisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires. Ces arrangements n'apparaissent en général que pour des séquences peptidiques comptant au moins trois à cinq résidus acides aminés.

Il existe différentes sous structures :

1.1.2.2.1 L'hélice α :

Comme son nom l'indique, cette sous structure est stabilisée sous forme hélicoïdale par des ponts hydrogène formés entre le groupement NH d'un AA_i (acide aminé i) et le groupement CO de l'AA_{i+4} (acide aminé i+4) (Figure 4).²

Tous les ponts hydrogène pointent dans la même direction, et ainsi les dipôles des liaisons peptidiques interagissent favorablement de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale. C'est pourquoi l'hélice α possède un moment dipolaire élevé, les charges portées par les extrémités étant éloignées dans l'espace.²

Les chaînes latérales vont être situées à l'extérieur de l'hélice et la nature de ces chaînes va influencer sur le caractère hydrophile des peptides.

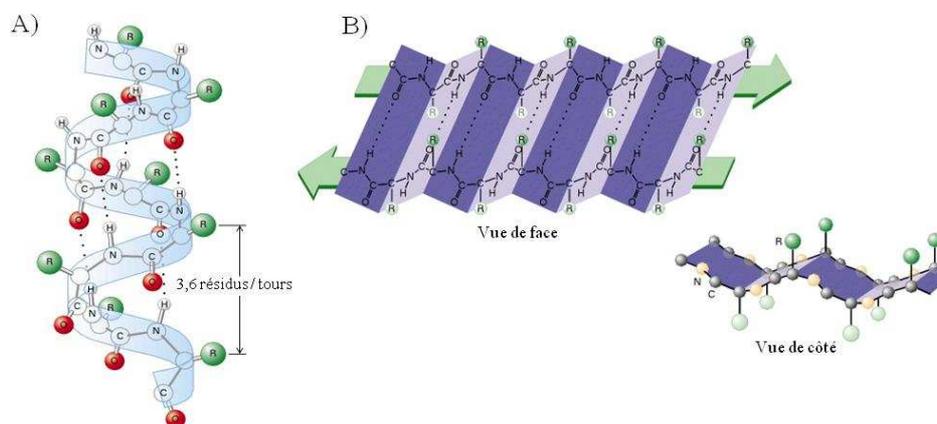


Figure 4: A) Schéma d'une hélice α ; B) Représentation d'un feuillet β .

1.1.2.2.2 Le feuillet β :

Les feuillets β sont des structures plus planes que les hélices α . Un feuillet β se forme lorsqu'une chaîne polypeptidique se replie sur elle-même en formant une structure proche d'un accordéon par formation de liaisons hydrogène intrachaînes (Figure 4). Il existe deux types de feuillets β : parallèles et antiparallèles (Figure 5).^{1, 2} Les seconds sont les plus fréquemment rencontrés. Ils sont dits antiparallèles car dans cette structure les acides aminés sont rangés alternativement dans le sens conventionnel (de N-terminal vers C-terminal) puis dans le sens opposé (de C-terminal vers N-terminal).

Dans les feuillets β , les chaînes latérales se retrouvent alternativement au-dessus et en dessous du plan.

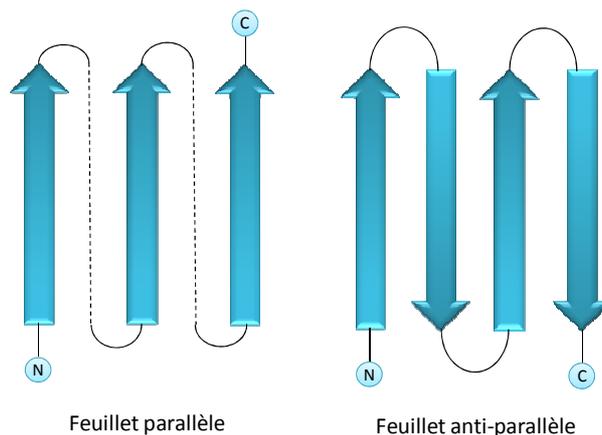


Figure 5 : Schématisation d'un feuillet β parallèle et antiparallèle.

Il existe d'autres structures secondaires, telles que les boucles (*loop*) ou les coudes (*turn*) qui bien que minoritaires sont souvent responsables de l'activité biologique des peptides et des protéines.

I.1.2.3 Structure tertiaire

La structure tertiaire est le repliement global de la chaîne peptidique : c'est une combinaison des éléments de structure secondaire reliés par des coudes ou des boucles. Sa stabilité est sous la dépendance d'interactions faibles et des ponts disulfure.

Il existe trois grands types d'interactions faibles :

- *la liaison hydrogène* : intermédiaire entre une liaison covalente et une interaction ionique au regard de l'énergie de liaison. Les groupements NH sont de bons donneurs de liaisons hydrogène et les groupements CO de bons accepteurs ;
- *l'interaction ionique* : entre deux groupements de charges opposées. Les groupements acides et basiques ionisés à pH physiologique permettent ces interactions ;
- *l'interaction hydrophobe ou forces de Van der Waals* : ces interactions sont de type électrostatique. Elles interviennent préférentiellement entre les résidus à chaîne aliphatique (Leu, Ile etc.), ou aromatique (Phe, Tyr etc.).²

Les ponts disulfures sont des liaisons covalentes formées entre deux résidus cystéine oxydés. Ces ponts peuvent être intra ou intermoléculaires.

Cette structure tertiaire aboutit à la forme globulaire des polypeptides où les groupements hydrophobes se retrouvent à l'intérieur de la structure, mais elle n'apparaît que pour des peptides possédant une vingtaine d'acides aminés.

Cette structure détermine également l'activité biologique d'un peptide.

Il existe un dernier niveau d'organisation : la structure quaternaire. C'est un assemblage de plusieurs monomères polypeptidiques. Cette structure n'apparaît que pour des chaînes contenant plus de 200 acides aminés, elle n'entre donc pas dans notre sujet et nous ne la détaillerons pas.

En résumé donc, un peptide possède des caractéristiques et des propriétés qui le différencient des autres, qui sont :

- sa séquence en acides aminés ;
- sa taille et sa forme ;
- son caractère hydrophobe ;
- sa solubilité, dépendante de son point isoélectrique (pI) ;
- son activité biologique.¹

Le mode de production des peptides peut également différer comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

I.1.3 Modes de production des peptides

Trois modes de production des peptides coexistent actuellement :

I.1.3.1 La synthèse peptidique

La synthèse permet d'accéder à des peptides "non naturels", ou peptidomimétiques ainsi qu'à des peptides naturels. Il existe différentes stratégies de synthèse peptidique (convergente, divergente), ainsi que des modes différents (en phase liquide, ou sur support solide).

I.1.3.2 Les biotechnologies

Dans ce cas, les peptides sont produits *via* l'utilisation de cultures cellulaires eucaryotes (cellules CHO (cellules ovarienne de hamster),...), des microorganismes, bactéries ou moisissures, ou encore par des cellules végétales génétiquement modifiées.

Les biotechnologies facilitent l'accès à des séquences peptidiques de grande taille, naturelles ou modifiées comme l'insuline glargine (Lantus[®]),¹ ou la somatostatine.¹

I.1.3.3 L'extraction à partir de matière première d'origine naturelle

L'extraction permet l'obtention de peptides non encore connus ou non accessibles par les voies de synthèse. Quelques exemples de peptides d'intérêt d'origine naturelle : défensine à visée

antimicrobienne extraite de l'huître américaine *Crassostrea virginica*,¹ pseudostéllarine B d'une herbe *Pseudostellaria heterophylla* (Figure 6).³

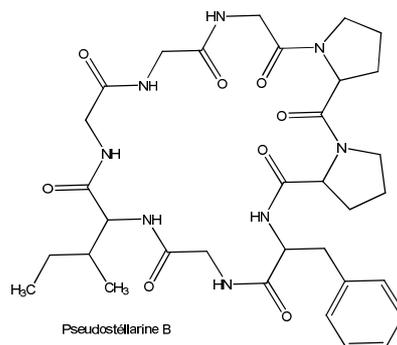


Figure 6 : Structure de la Pseudostéllarine B.

Si cette voie est largement employée à l'échelle des laboratoires de recherche afin d'exploiter au maximum la biodiversité, elle est très peu utilisée à l'échelle industrielle, en raison principalement de la grande complexité des mélanges obtenus et du coût de production.

Il nous faut également mentionner l'hydrolyse enzymatique qui est un mode de production très répandu d'hydrolysat peptidique à base de protéines naturelles.

Les différents modes de production vont avoir néanmoins une exigence en commun : la préservation de l'activité biologique des peptides, qui peut être de nature très variée.

I.1.4 Activités biologiques et intérêts

Un nombre important de fonctions physiologiques et biochimiques (humaines, animales, végétales) est sous l'influence de peptides. Ces peptides jouent le rôle de neurotransmetteurs, neuromédiateurs ou encore d'hormones intervenant dans la transduction de signaux récepteurs dépendants.

Ainsi plus de cent peptides intervenant au niveau du système nerveux central ou périphérique, du système immunitaire, cardiovasculaire ou digestif sont actuellement connus, parmi lesquels :

- CRH (Corticotropin-releasing hormone) : intervenant dans la régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes ;
- somatotrophine (GH Growth hormone) : hormone de croissance sécrétée par l'hypophyse ;
- glucagon : peptide hyperglycémiant ;
- immunoglobulines ;
- insuline ;
- enképhalines : opioïdes naturels, etc.¹

Tous ces peptides interviennent dans la communication cellule à cellule et sont impliqués dans de nombreux processus tels que la douleur, la reproduction, la régénération cellulaire, etc. D'où ces dix dernières années l'intérêt croissant porté aux peptides dans les domaines thérapeutique et cosmétique.

S'il existe déjà sur le marché des médicaments dont le principe actif est un peptide : insuline, ciclosporine Sandimmun[®], buséréline Suprefact[®] (Figure 7) etc. Leur proportion relative ne cesse d'augmenter avec les avancées dans le domaine des biotechnologies rouges et l'émergence de l'analyse protéomique. Mais tous ces peptides, ou presque, sont constitués de plus d'une trentaine d'acides aminés.

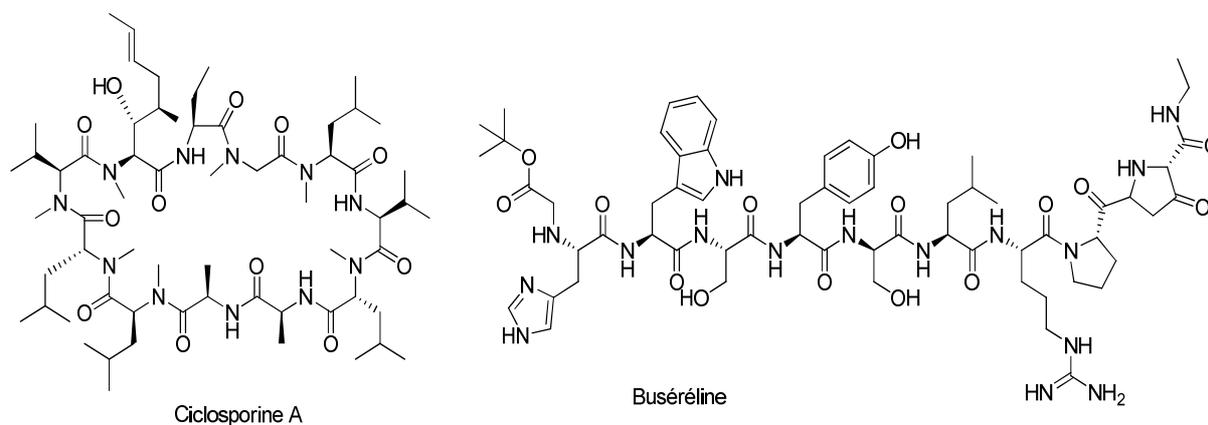


Figure 7 : Structures de la ciclosporine A et de la buséréline.

Depuis quelques années, les peptides de plus petite taille ont focalisé l'attention de nombreuses équipes de recherche. La raison principale de cet engouement est la recherche de petits fragments protéiques conservant l'activité biologique sans présenter la majeure partie des inconvénients inhérents à la structure protéique, notamment en termes de dénaturation potentiellement occasionnée par les procédés séparatifs.

Pour une utilisation en thérapeutique, les peptides doivent être obtenus avec une pureté élevée et une activité constante. Les milieux de cultures cellulaires, les milieux réactionnels de synthèse ainsi que les sources naturelles de peptides sont de composition complexe où le peptide d'intérêt est souvent minoritaire. L'isolement et la purification de peptides constituent donc souvent une étape centrale et un verrou technologique important lors de la production de peptides.

I.2 Méthodes d'isolement et de purification de peptides

I.2.1 Principe général et problématique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'isolement et la purification de peptides sont des étapes cruciales et potentiellement limitantes pour leur utilisation en thérapeutique, ou en cosmétique.

En effet les procédures de purification existantes mettent en œuvre de nombreuses techniques qui sont très coûteuses en temps et en matériel. De plus la multiplication des étapes entraîne une perte importante de produits.

Une procédure de purification de peptide se conçoit généralement en 3 phases dont les rôles sont bien définis:

- la capture ou pré-purification ;
- la purification intermédiaire ;
- le polissage.

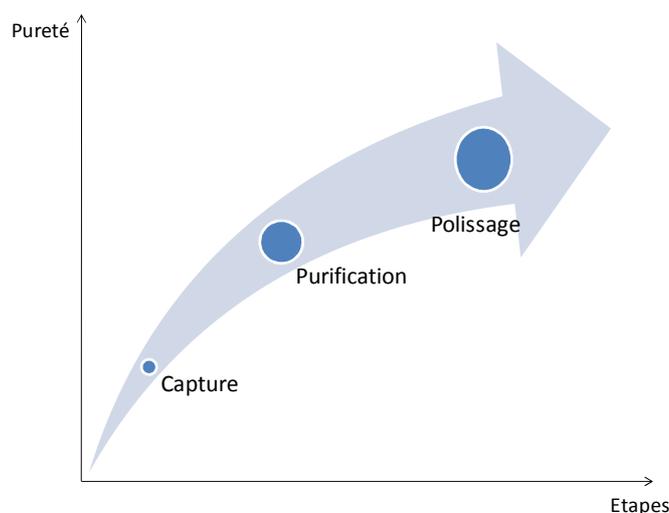


Figure 8: Stratégie générale de purification de peptides en trois étapes.

I.2.1.1 Capture ou pré-purification

Cette phase se définit comme la purification initiale du ou des peptides d'intérêt à partir d'extraits bruts ou clarifiés.

Dans cette phase, le but est d'isoler, de concentrer et de stabiliser le produit d'intérêt. Pour ce faire, des techniques rapides à mettre en œuvre, possédant des rendements importants et aboutissant à la diminution du volume de l'échantillon sont utilisées.

Après capture, le produit doit être concentré et transféré dans un milieu qui préserve son activité biologique. Idéalement, les contaminants les plus critiques ont également été éliminés.

Dans ce cas, la capacité et la rapidité de mise en œuvre sont privilégiées aux dépens de la résolution. Une des techniques les plus utilisées en pré-purification est la précipitation des peptides en milieu hyper salé ou encore la chromatographie sur résine échangeuse d'ions en mode élution isocratique.

1.2.1.2 Purification intermédiaire

Les techniques utilisées dans la seconde phase ont pour but d'éliminer la majeure partie des impuretés comme d'autres peptides ou protéines, des acides nucléiques, virus, endotoxines etc.

La résolution des techniques employées doit cette fois être un critère de choix. Elle dépend d'une part de la nature de l'échantillon après la pré-purification et d'autre part de la pureté requise pour le produit fini (médicament, cosmétique...). Néanmoins la productivité reste un critère important, et il faut donc trouver un équilibre entre sélectivité et capacité.⁴ La chromatographie sur résine échangeuse d'ions est par exemple une technique de choix.

1.2.1.3 Polissage

Le but de cette phase est d'obtenir des peptides de grande pureté en éliminant toutes les traces résiduelles d'impuretés et de produits de proche parenté structurale.

Ici les techniques employées sont choisies pour leur résolution très élevée, pour assurer une sélectivité élevée. Pour atteindre cette résolution, il est parfois nécessaire de réduire la capacité de la méthode voire même sa productivité.

Pourtant, la récupération du produit pur avec un rendement élevé est une condition critique et les techniques utilisées doivent garantir un rendement le plus élevé possible. En effet, toute perte de produit purifié à ce niveau entraîne des pertes financières plus importantes. Ainsi à ce stade, les méthodes chromatographiques sont privilégiées comme la chromatographie liquide haute performance avec une colonne de silice à polarité de phase inversée ou encore la chromatographie d'affinité.

Bien entendu la conception de schémas de purification en trois phases n'impose pas que tous les procédés comportent trois étapes de purification distinctes. La pré-purification et la purification intermédiaire peuvent être réalisées en une seule étape, de même pour la purification intermédiaire et le polissage.

I.2.2 Méthodes de purification des peptides

Les méthodes utilisées pour la purification de peptides mettent à profit certaines propriétés des peptides comme la taille, le point isoélectrique, l'hydrophobicité, l'activité biologique etc.

Ces techniques sont de natures variées et peuvent intervenir à des niveaux différents (Tableau 1). Généralement sont distinguées :

- les méthodes "classiques" : précipitation, échanges en milieu tamponné (dialyse, osmose inverse) ;¹
- les méthodes chromatographiques solide/liquide : chromatographie d'affinité, d'exclusion stérique, d'échange d'ions ;^{1,5,6}
- les méthodes liquide/liquide : extraction par des solvants, systèmes aqueux/aqueux (Aqueous Two Phases System ATPS) etc.⁷

Tableau 1: Tableau récapitulatif des méthodes de purification de peptides les plus courantes

Technique	Propriétés du peptide exploitées	Capture	Purification	Polissage
Précipitation	Point isoélectrique	+++	++	
Dialyse, osmose inverse, ultrafiltration	Taille, forme		+	++
Chromatographie d'affinité	Activité biologique, forme	+	+++	++
Chromatographie d'exclusion stérique	Taille, forme		++	+++
Chromatographie sur résine échangeuse d'ions	Point isoélectrique, charge	+++	+++	+++
Extraction par des solvants	Solubilité/Partage	++	++	
Systèmes aqueux/aqueux	Solubilité/Partage	++	++	+
Extraction par micelles inverses	Point isoélectrique, hydrophobicité	++	++	

Dans la suite du chapitre seront détaillés deux exemples de méthodes employées couramment pour la purification de peptides : une méthode classique, la précipitation et une méthode chromatographique, la chromatographie sur résines échangeuses d'ions. Les méthodes reposant sur le phénomène de partage liquide/liquide seront abordées plus tard dans le manuscrit.

I.2.2.1 La précipitation

La précipitation est basée sur le fait que les peptides, généralement hydrosolubles, tendent à précipiter à un pH correspondant à leur pI dans des solutions aqueuses de force ionique très élevée.

Ainsi, par addition de sels, comme le sulfate d'ammonium ou de sodium, les peptides et protéines précipitent. Le précipité est ensuite récupéré par centrifugation et filtration.

Les conditions opératoires employées sont en général douces : le plus souvent à froid ce qui permet d'éviter la dénaturation des peptides.¹

La précipitation est une bonne méthode de pré-purification et elle est couramment utilisée dans les laboratoires de recherche et en industrie.⁸

Une autre technique de précipitation utilisée pour la purification de peptides est l'addition d'un "anti-solvant" comme l'acétone, dans une proportion de 80% (v/v) par rapport au volume d'échantillon à précipiter. Ce procédé entraîne en revanche généralement une dénaturation des protéines.

Le principal avantage de la précipitation en milieu aqueux est qu'il s'agit d'une technique rapide, simple et douce, qui préserve l'intégrité des peptides et donc leur activité.

Par contre, l'échantillon obtenu après précipitation est très concentré en sels, ce qui nécessite un traitement, en général par dialyse, avant la poursuite de la purification proprement dite. De plus, cette méthode est peu adaptée aux stades de purification intermédiaire ou de polissage.

Les techniques de précipitations sont par ailleurs affectées par la température, le pH et la concentration de l'échantillon, ces paramètres doivent être ainsi totalement maîtrisés pour garantir la reproductibilité des manipulations.⁸

1.2.2.2 La chromatographie par échange d'ions

Les méthodes chromatographiques sont les plus couramment utilisées pour la purification de peptides. Ce sont en effet des techniques robustes et très reproductibles, ce qui est un critère important pour la production de médicaments, entre autres. Les agences réglementaires exigent de plus en plus des schémas de purification qu'ils contiennent au moins une méthode chromatographique.

La chromatographie sur résine échangeuse d'ions exploite la propriété des peptides de porter une charge variable selon le pH du milieu. Cette technique est à l'heure actuelle une des méthodes de purification et de concentration des peptides et protéines la plus usitée industriellement.^{2, 6, 9}

La séparation s'effectue en fonction de la charge des analytes. Une résine échangeuse d'ions est constituée d'un polymère inerte, généralement poreux, sur lequel est greffé de façon covalente un groupement chimique ionisé ou ionisable.^{6, 9}

Cette partie chargée peut interagir fortement avec des ions présents dans l'extrait à purifier. Ainsi, des molécules chargées peuvent s'adsorber de façon réversible sur l'échangeur d'ions, et être ensuite relarguées de la résine, en modifiant la composition ionique du solvant par exemple.⁹

L'expérience est, classiquement, conduite en trois temps (Figure 9):

- dépôt sur la colonne ;
- élution des molécules généralement en augmentant de façon graduelle la force ionique du solvant d'élution ;
- régénération de l'échangeur d'ions (par exemple par lavage avec une solution de pH permettant de ramener les charges à leur valeur initiale).⁹

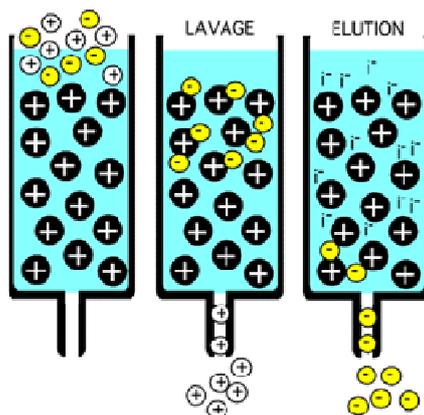


Figure 9 : Principe de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

"L'élution" peut en fait être réalisée de deux façons : en faisant varier le pH de l'éluant, ou en utilisant un contre ion (ajout d'un sel à concentration croissante).

La plupart des peptides sont chargés négativement au pH physiologique (pH 6-8), et sont dénaturés dans les zones de pH extrêmes. C'est pourquoi la grande majorité des purifications se fait à un pH proche de la neutralité et utilise des résines échangeuses d'anions.^{2, 5, 6, 9}

L'atout majeur de cette technique est sa faculté à générer une résolution assez élevée tout en étant très capacitive.

Une seule étape de purification par ce procédé ne suffit généralement pas. Il faut alors répéter l'opération ce qui est un inconvénient non négligeable. Par ailleurs, la résine doit être régénérée après chaque séparation, ce qui, de fait, interdit la mise en place de procédés continus. Néanmoins cette technique demeure, avec la Chromatographie Liquide Haute Performance, une méthode de référence pour la production de peptides en milieu industriel, du fait de sa rapidité de mise en œuvre et de son adaptabilité à toutes les étapes du procédé de purification.⁹

Comme nous l'avons mentionné en début de ce chapitre, il existe également des protocoles de purification de peptides mettant en jeu des techniques liquide/liquide. Ces méthodes possèdent de nombreux atouts : elles sont bien connues, souvent peu coûteuses et surtout la montée en échelle est relativement aisée, car souvent linéaire. Il n'y a, de plus, aucun problème d'adsorption irréversible sur un support. Les applications industrielles sont nombreuses et avec l'avancée des biotechnologies, la nécessité de disposer de procédés extractifs efficaces s'est accrue.

Dans le chapitre qui va suivre, nous détaillerons une technique chromatographique liquide/liquide encore peu développée industriellement : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).

I.3 La Chromatographie de Partage Centrifuge

I.3.1 La chromatographie liquide/liquide : évolution des technologies

A l'origine, les techniques de purification liquide/liquide mettaient en jeu une extraction liquide/liquide simple à un seul plateau théorique : en ampoule à décanter, ou dans des extracteurs type mélangeur/décanteur.⁷ L'extraction simple peut être réalisée à l'aide de systèmes de solvants, ou encore par paire d'ions, et s'avère parfois performante dans l'étape de pré-purification. Bien entendu, l'innocuité des solvants mis en œuvre vis-à-vis des solutés d'intérêts doit être préalablement contrôlée. Néanmoins, pour les étapes de purification exigeantes, ce procédé a très vite montré ses limites : un manque de résolution.

Pour palier cette lacune, de nouvelles technologies utilisant des systèmes liquide/liquide sans support solide ont été développées. Ces nouveaux appareillages ont permis d'élever le nombre de plateaux théoriques et donc d'améliorer la résolution : ce sont de véritables méthodes chromatographiques dites à contre courant (CCC), même si elles n'ont de contre courant que le nom. Elles utilisent des systèmes biphasiques de solvants avec une phase liquide maintenue stationnaire, par la gravité ou un champ de forces centrifuge, et une phase mobile.⁷ Ces techniques appartiennent à la catégorie des techniques chromatographiques dites de partage définies par Martin et Synge en 1939.

Le premier appareillage de CCC mis au point est l'appareil de Craig en 1944. Cet appareil utilise la force de gravité comme "moteur" et fait appel à un processus d'extraction impliquant des étapes discrètes et successives d'équilibration/décantation-transfert.

L'appareil de Craig est constitué d'unités de partage en verre montées en série et connectées les unes aux autres le long d'un axe. Ces unités sont remplies par des systèmes liquides biphasiques ; le transfert d'une phase, la phase mobile, dans l'unité suivante intervenant par rotation autour de l'axe.

Le processus de purification se déroule ainsi en trois phases : mélange des deux phases par brassage intensif (étape d'extraction), suivi d'une décantation puis du transfert d'une phase dans l'unité suivante.¹⁰

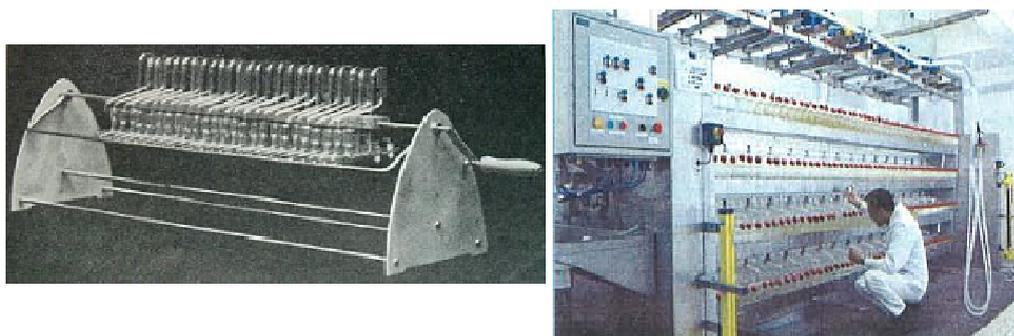


Figure 10 : Premier appareil de Craig à gauche, appareil utilisé par la société Bachem à droite.

Le temps d'expérience est très long pour obtenir une purification correcte mais cette méthode demeure très performante. Ainsi, un des leaders mondiaux de la production de peptides, la société Bachem (Suisse), utilise des appareils de Craig (commercialisés par sa filiale Labortech) pour la purification de lots techniques de peptides.

D'autres équipes ont menés des travaux pour améliorer le système mis au point par Craig. Ces recherches ont abouti à la mise au point d'appareils faisant appel à un champ de forces centrifuge pour aider à la décantation des systèmes. Deux catégories d'appareils de CCC modernes coexistent :

- appareils à colonne tubulaire, avec deux axes de rotation (rotation planétaire), qualifiés d'hydrodynamiques : c'est le cas du High Speed Counter Current Chromatography (HSCCC) ;
- appareils à colonnes "cellulaires", mono axe, qualifiés d'hydrostatiques : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).¹⁰

L'HSCCC fut mise au point par Y. Ito dans les années 80 au National Institute of Health à Bethesda (USA). L'appareil contient une ou plusieurs bobines de tubes enroulées de façon hélicoïdale qui vont tourner autour de leur axe. Ces bobines sont arrangées dans l'appareil de façon à ce qu'elles tournent en plus autour d'un axe central : elles sont alors animées d'un mouvement planétaire (Figure 11).¹⁰



Midi High Performance Counter Current Chromatography (Dynamic Extraction Ltd)

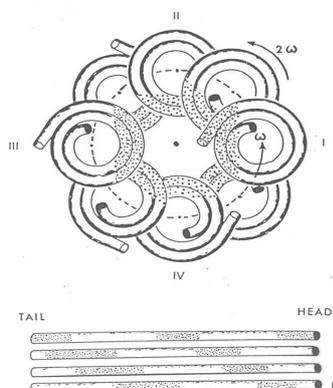


Figure 11 : Photographie d'un appareil d'HSCCC à deux bobines de la société Dynamic Extraction (Uxbridge, Angleterre) à gauche, schématisation de la colonne à l'équilibre à droite.

Ce mouvement entraîne l'apparition d'un champ hydrodynamique oscillant permettant le mélange puis la décantation des deux phases non miscibles du système de solvants choisi et donc l'extraction. Également, du fait de ce champ de forces, les phases de densités différentes vont se "déplacer" vers les extrémités opposées de la colonne : c'est ce seul phénomène qui assure le maintien d'une des deux phases stationnaire dans le tube (Figure 11).¹¹ L'avantage de l'HSCCC est que les expériences se déroulent à basse pression ce qui autorise des débits de phase mobile importants et donc des temps de séparation assez courts. Néanmoins, la rétention de phase stationnaire est généralement limitée en HSCCC surtout pour les systèmes visqueux (à base de butanol par exemple) ($\leq 50\%$), ce qui diminue la qualité des séparations.^{10, 12} Une des dernières évolutions de l'HSCCC est l'utilisation d'un disque dit spirale dans lequel est gravé le "tube", en remplacement des bobines précédemment utilisées.¹³

Nunogaki inventa en 1982 un nouvel appareil: le chromatographe de partage centrifuge, père des appareils dits hydrostatiques. Dans ce cas, la "colonne" est constituée par un rotor tournant autour d'un axe unique et fixe par opposition au mouvement planétaire utilisé dans les techniques hydrodynamiques.^{10, 14} Une vingtaine de cartouches, dans lesquelles les conduits et "cellules" de partage sont gravés, sont insérées dans rotor (Figure 12). Ce premier appareil commercial nommé CPC LLN fut commercialisé à la fin des années 80.

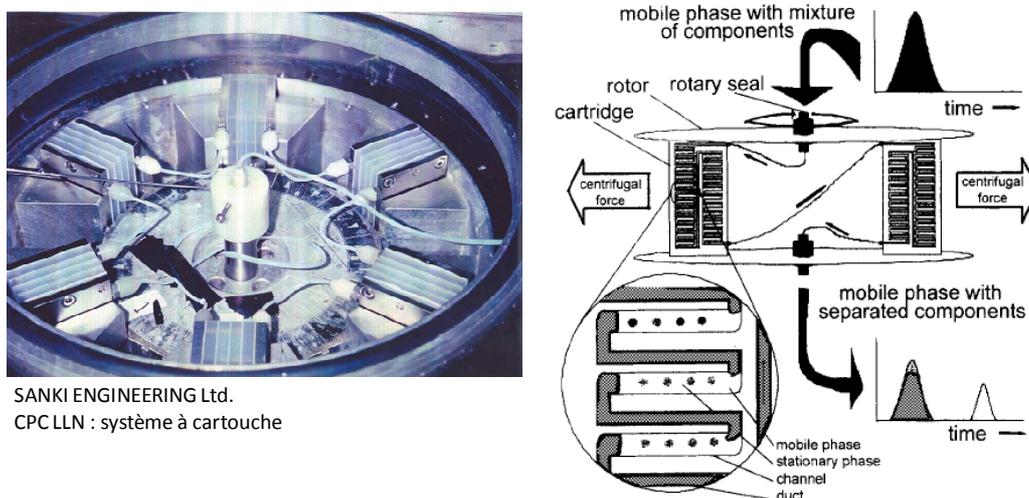


Figure 12 : Photographie et schéma explicatif de l'appareil de CPC LLN.¹⁵

Les appareils ont ensuite évolués de façon très importante. Les rotors sont désormais constitués par la superposition de disques de partage dans lesquels sont gravées les cellules de partage interconnectées par des conduits de section inférieure, séparés par des feuilles de Téflon®. Ce type de colonne est appelé colonne de type "sandwich" et est à l'heure actuelle le plus courant sur le marché (Kromaton, Armen Instruments, Sanki), même si la géométrie des cellules a beaucoup évolué depuis. Il existe également des appareils à colonne dite monobloc (Partitron®) où le rotor est constitué par un bloc de titane dans lequel sont percées les cellules et les conduits.

I.3.2 La CPC : définition et concepts

I.3.2.1 Définition

La CPC est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système biphasique de solvants, comme toutes les autres techniques de chromatographie liquide/liquide sans support solide. Une phase liquide, appelée phase stationnaire, est maintenue dans la colonne par un champ de forces centrifuge issu de la mise en rotation de la colonne chromatographique. L'autre phase liquide, *i.e.* la phase mobile, est alors pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se partagent entre les deux phases en fonction de leurs constantes de distribution respectives.^{10, 12, 16}

I.3.2.2 Nature des phases stationnaires et mobiles

Comme nous l'avons mentionné dans la définition, les phases utilisées en CPC sont construites par mélanges de deux ou trois (voire plus) solvants et/ou solutions, pour former un système biphasique. Les deux phases d'un même système de solvants sont en équilibre thermodynamique l'une par rapport à l'autre.¹⁷

Le cas le plus simple est le mélange de deux solvants non miscibles tel que le système chloroforme/eau, mais ce type de système binaire est limité en termes d'application. La différence de polarité entre les deux phases étant très importante, il est souvent difficile d'obtenir une solubilité satisfaisante et/ou une constante de distribution autour de l'unité. C'est la raison pour laquelle, des mélanges utilisant trois ou quatre solvants sont le plus souvent décrits.¹⁶⁻¹⁸ Les solvants venant en compléments sont choisis pour leur miscibilité totale ou partielle aux deux autres et jouent ainsi le rôle de solvant pont.

Dans le cas de ces mélanges ternaires, les propriétés des systèmes peuvent être décrites par des diagrammes ternaires, comme nous allons le voir.

I.3.2.2.1 Notion de diagramme ternaire

Les diagrammes ternaires vont fournir différentes informations utiles à la mise en œuvre d'un procédé en chromatographie liquide/liquide en général et en CPC en particulier, telle que la composition de chacune des phases du système.

Un diagramme ternaire est représenté sous la forme d'un triangle équilatéral (représentation usuelle) ou d'un triangle rectangle (représentation dite orthogonale) où les proportions de chaque solvant sont exprimées en rapport molaire ou en pourcentage volumique (Figure 13).

Dans ce triangle, la courbe isotherme binodale délimite la zone biphasique du système, située sous ou à l'intérieur de la courbe.

A l'intérieur de la zone biphasique, il existe des lignes de conjugaison constituées par les points correspondant aux différents mélanges aboutissant, à terme, à une composition des phases identique. L'inclinaison des courbes renseigne également sur le partage du solvant pont entre les deux phases (Figure 13).

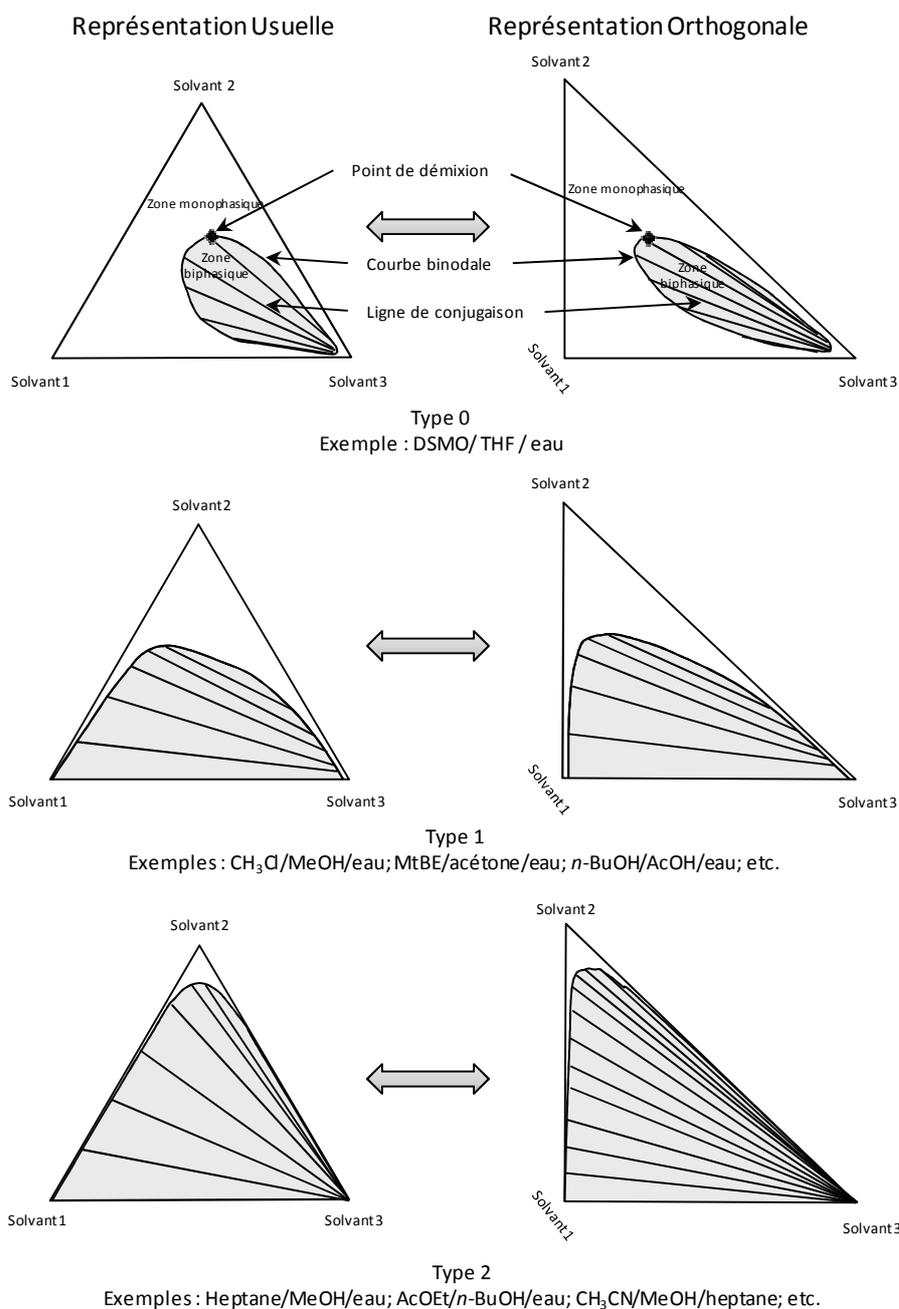


Figure 13: Représentations usuelle et orthogonale de diagrammes ternaires de différents types.

Selon la miscibilité des solvants entre eux, il va exister plusieurs types de diagramme ternaire. Le diagramme est dit de type 0, lorsque tous les solvants sont miscibles entre eux et qu'une zone

biphasique n'apparaît que dans certaines proportions. Le diagramme de type 1 est observé quand une paire de solvants est non miscible. Si deux paires de solvants sont non miscibles le diagramme est alors de type 2.

Il existe également des diagrammes de type 3 lorsque tous les solvants utilisés sont partiellement miscibles entre eux.

Pour les systèmes préparés à base de quatre solvants, il existe pareillement des diagrammes quaternaires mais ces derniers ne sont que très peu utilisés. La plupart des systèmes quaternaires appartiennent à des gammes de solvants donnant les proportions à utiliser de chaque solvants et ce pour toute la gamme de polarité. La modulation des systèmes se fait alors plus facilement en mélangeant les proportions de deux systèmes.

1.3.2.3 Paramètres chromatographiques

Du fait de la nature liquide des phases stationnaire et mobile, la CPC comporte une terminologie propre avec des paramètres physicochimiques spécifiques, comme le taux de rétention de phase stationnaire. Néanmoins certains paramètres chromatographiques classiques (sélectivité, résolution) s'appliquent également à ce procédé.

1.3.2.3.1 La constante de distribution K_D

La constante de distribution K_D est une constante physique caractéristique d'une substance chimique dans un état donné (ionisé, neutre, complexé...) au sein d'un système biphasique de solvants donné. A l'équilibre, cette constante est régie par la loi de Nernst (1891): une substance chimique dissoute se répartit à l'équilibre entre deux phases liquides non miscibles selon un ratio constant et reproductible. Elle peut ainsi se définir par le rapport des concentrations d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile d'un système biphasique.^{11, 16, 19}

$$K_D = \frac{C_{stat}}{C_{mob}} \quad (\text{Équation 1})$$

Avec K_D : constante de distribution du soluté dans le système de solvants

C_{stat} : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_{mob} : concentration du soluté dans la phase mobile

En pratique, pour que ce paramètre demeure constant quelque soit le mode de pompage choisi (voir paragraphe 1.3.2.4), cette constante est plus généralement définie par le rapport des concentrations de l'analyte dans la phase supérieure du système biphasique de solvants (organique à

l'exception des systèmes contenant des solvants chlorés) et dans la phase inférieure (aqueuse à l'exception des systèmes contenant des solvants chlorés), soit

$$K_D = \frac{C_{sup}}{C_{inf}} \quad (\text{Équation 2})$$

Avec K_D : constante de distribution du soluté dans le système de solvants

C_{sup} : concentration du soluté dans la phase supérieure

C_{inf} : concentration du soluté dans la phase inférieure

C'est cette définition que nous conserverons pour la suite du manuscrit.

La constante de distribution est à distinguer du rapport de distribution D , qui représente le partage d'un soluté, sous toutes ses formes physicochimiques, entre deux phases non miscibles. Ainsi pour un soluté A , nous aurons :

$$K_D = \frac{[A]_{stat}}{[A]_{mob}} \quad \text{et} \quad D = \frac{[A]_{stat}^{Tot}}{[A]_{mob}^{Tot}} \quad (\text{Équation 3})$$

Avec $[A]_{stat}$ et $[A]_{mob}$ les concentrations en analyte A sous une forme chimique donnée dans la phase stationnaire et mobile respectivement

$[A]_{stat}^{Tot}$ et $[A]_{mob}^{Tot}$ les concentrations en analyte A sous toutes ces formes chimique dans la phase stationnaire et mobile respectivement

La valeur du rapport de distribution peut changer en fonction du pH, ou de l'ajout d'un agent complexant, par exemple.

1.3.2.3.2 Volume de rétention V_r

Le volume de rétention V_r est un paramètre important pour les techniques chromatographiques liquide/liquide. Il s'apparente au temps de rétention utilisé en chromatographie solide/liquide.

Les analytes émergent de la colonne avec un volume de rétention V_r propre, tel que:

$$V_r = V_{mob} + K_D V_{stat} \quad (\text{mode descendant}) \quad \text{ou} \quad V_r = V_{mob} + \frac{1}{K_D} V_{stat} \quad (\text{mode ascendant}) \quad (\text{Équation 4})$$

Avec V_r : volume de rétention du soluté

V_{mob} : volume de phase mobile

V_{stat} : volume de phase stationnaire

Le volume de phase stationnaire étant donné par la relation:

$$V_{stat} = V_{col} - V_{mob} \quad (\text{Équation 5})$$

Avec V_{col} : volume total de la colonne

Lors d'un développement en mode élution simple, ce paramètre est facilement lisible sur le chromatogramme. En combinant les données fournies directement par le chromatogramme avec l'équation 4, on accède ainsi très facilement à la constante de distribution du soluté.

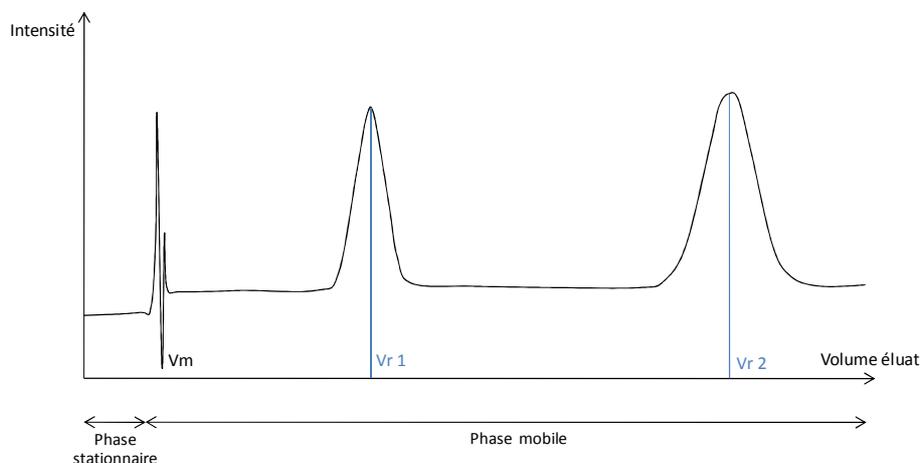


Figure 14: Détermination des V_r sur un chromatogramme en mode élution.

Berthod *et al.* ont décrit une méthode très simple de détermination des constantes de distribution de solutés utilisant la CCC.²⁰ En effet, le volume de rétention d'un analyte A donné dans un système donné dépend uniquement de son rapport de distribution D_A .

$$D_A = \frac{[A]_{\text{stat}}^{\text{Tot}}}{[A]_{\text{mob}}^{\text{Tot}}} = \frac{V_r - V_{\text{mob}}}{V_{\text{stat}}} = \frac{V_r - V_{\text{mob}}}{V_{\text{col}} - V_{\text{mob}}} \quad (\text{Équation 6})$$

Si l'analyte A ne subit aucune réaction d'ionisation, de complexation etc. dans les phases liquides alors son rapport de distribution est égal à sa constante de distribution. Il faut tenir compte de certains paramètres pour que la mesure soit valable : les volumes extra-colonne doivent être pris en compte, le V_r doit être supérieur au volume mort d'un volume défini en fonction de l'appareil utilisé etc.²⁰ Cette technique est très utile pour déterminer le coefficient de partage de molécules dans le système octanol/eau, qui correspond au Log P, renseignant sur la biodisponibilité de ces molécules.

1.3.2.3.3 Taux de rétention de phase stationnaire

Le taux de rétention de phase stationnaire S_f est un paramètre caractéristique des techniques chromatographiques à contre courant. Il représente le volume de phase stationnaire restant dans la colonne une fois l'état d'équilibre atteint.

Pour atteindre cet état, la phase mobile est pompée, dans le mode sélectionné ascendant ou descendant pour les techniques hydrostatiques, au travers de la colonne remplie avec la phase stationnaire et mise en rotation, jusqu'à atteindre un état stable. Le remplissage partiel de la colonne qui en découle peut être décrit comme suit:

$$S_f = \frac{V_{stat}}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Équation 7})$$

Avec S_f : taux de rétention de la phase stationnaire

V_{stat} : volume de phase stationnaire

V_{col} : volume total de la colonne

Le taux de rétention de phase stationnaire conditionne en grande partie la qualité de la séparation des analytes, *i.e.* la résolution. En effet, le nombre et la qualité des transferts des analytes entre les phases mobile et stationnaire sont sous la dépendance du ratio entre le volume de ces deux phases, ce qui est parfaitement illustré par la Figure 15 et se traduit par l'équation ci-dessous :¹¹

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{K_{D2} - K_{D1}}{\left(\frac{V_{stat}}{V_{mob}}\right)^{-1} + \frac{K_{D2} + K_{D1}}{2}} \quad (\text{Équation 8})$$

Avec R_s résolution

N : nombre de plateaux théoriques

K_{D1} et K_{D2} : constantes de distribution des analytes 1 et 2 voisins l'un de l'autre

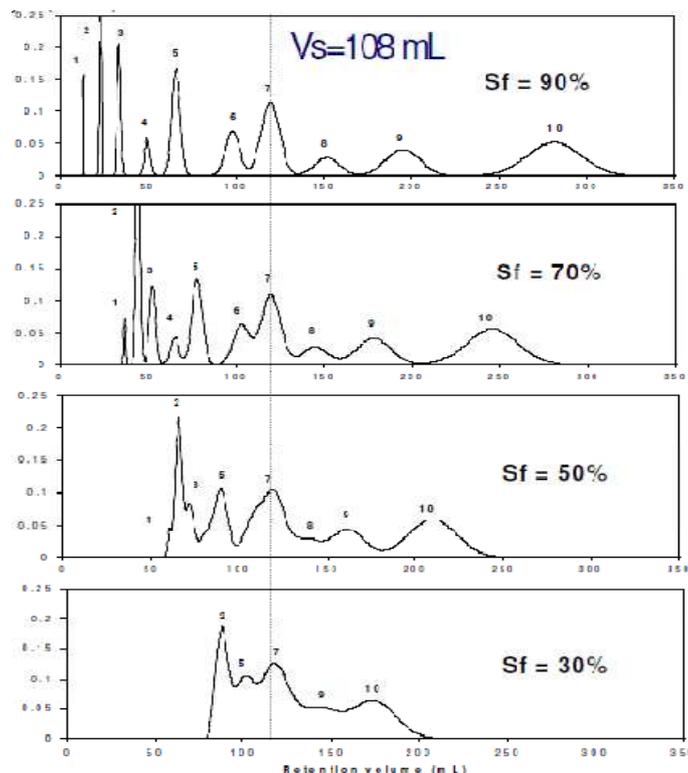


Figure 15 : Comparaison de chromatogrammes CCC obtenus avec un appareil HSCCC, un système biphasique et un injectat identique mais avec un taux de rétention de phase stationnaire différent.²¹

Un des atouts majeurs de la CPC, par rapport à ses homologues hydrodynamiques, est un taux de rétention de phase stationnaire très élevé, en général autour de 70 %, en particulier pour les systèmes de solvants très visqueux comme le système AcOEt/*n*-BuOH/eau.^{12, 16}

Comme mentionné précédemment, il est bien sûr évident que les paramètres chromatographiques classiques s'appliquent également à la CPC. Le facteur de sélectivité α , décrivant la capacité à discriminer deux composés, est ainsi un point fort de la CPC, du fait de la très grande adaptabilité des phases liquides.^{16, 19}

1.3.2.4 Mode de pompage

La nature liquide des phases mobile et stationnaire autorise deux modes de pompage différents, suivant la nature de la phase stationnaire retenue (Figure 16).

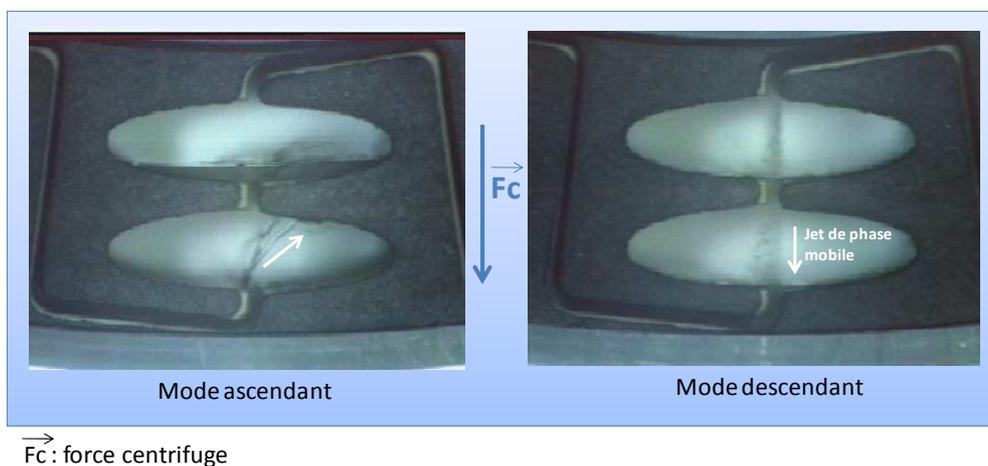


Figure 16: Illustration des modes de pompages utilisables en CPC.

La phase mobile est pompée en mode ascendant lorsque la phase stationnaire est la phase la plus dense du système biphasique. Le jet de phase mobile progresse alors dans le sens contraire du champ de force centrifuge.

A l'inverse, le mode descendant est employé lorsque la phase la plus dense est mobile, ainsi le jet de phase mobile progresse dans le même sens que la force centrifuge.^{10, 16, 22}

1.3.2.5 Appareillage utilisé au laboratoire

Le Chromatographe de Partage Centrifuge utilisé au laboratoire est un FCPC de chez Kromaton Technologies® (Angers, France) (à gauche Figure 17). Il s'agit d'un appareil mono axe de capacité volumique de 200 ml environ, comportant un rotor issu de l'empilement de 20 disques en Acier inox 316 L dans lesquels sont gravés 1320 cellules de partage (66 cellules/disque). Les principales caractéristiques de ce chromatographe sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Caractéristiques du FCPC Kromaton utilisé au laboratoire

Caractéristiques	FCPC Kromaton®
Capacité de la colonne	205 ml
Volume mort	32,3 ml
Matériau du rotor	Acier Inox téflonné
Nombre de disques de Partition	20
Nombre de cellules	1320
Volume d'une cellule	0,13 ml
Pression maximum	60 bars
Masse totale	90 kg
Dimensions (L x P x H cm)	58 x 36 x 61

Les cellules de partage sont de géométrie rectangulaire, et légèrement inclinées par rapport au rayon du disque. Cette géométrie permet de tenir compte de l'effet de la force de Coriolis, dont l'existence en chromatographie liquide/liquide a été décrite pour la première fois par Marchal *et al.*²⁴ et étudiée également par Ito.²³ Les travaux de Marchal *et al.* ont ainsi montré que le jet de phase mobile dans la phase stationnaire n'est pas, comme attendu, parallèle à la force centrifuge, mais légèrement incurvé ce qui entraîne l'adhésion de ce jet à la paroi des cellules orientées radialement par rapport à l'axe de rotation de la colonne. Le jet se collant à la paroi des cellules, la dispersion de la phase mobile à l'intérieur de celles-ci est alors non optimale et ne permet pas d'assurer le meilleur transfert de matière possible. En inclinant les cellules par rapport à l'axe de rotation (cellules dites en Z) (A/ Figure 17), le jet de phase mobile se casse alors directement sur la paroi des cellules, ce qui améliore de façon significative les transferts de matière. De nouvelles générations de cellules, les *Twin-cells*® (B/ Figure 17) symétriques et asymétriques, permettent de limiter de façon plus significative les effets néfastes de ce phénomène.²⁵

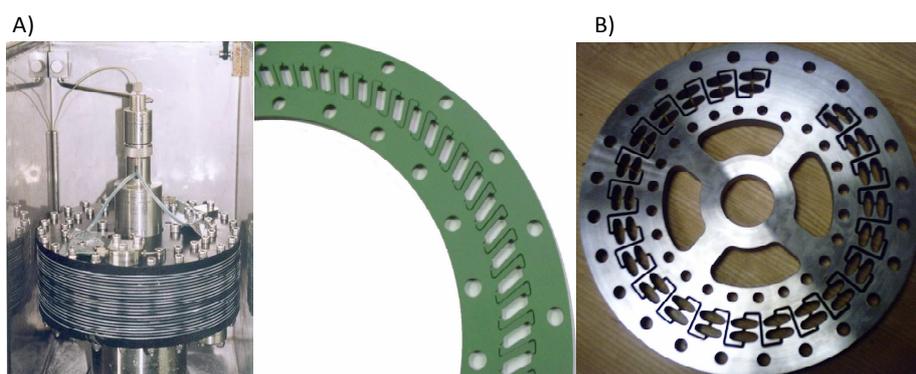


Figure 17: A) Rotor du FCPC utilisé au laboratoire, photo d'un disque de partage ; B) photo d'un disque équipant une colonne Armen Instrument dotée de *Twin-cells* symétriques.

Foucault *et al.* ont aussi montré l'influence positive de la vitesse de rotation de la colonne et du débit sur la dispersion du jet de phase mobile en relation directe avec la force de Coriolis.²⁴ Néanmoins cette constatation ne s'applique qu'aux molécules ayant une cinétique rapide de

transfert de phase. Dans le cas d'analytes possédant une cinétique de transfert plus lente, l'augmentation du débit va certes entraîner une augmentation de la surface d'échange entre les deux phases mais ne permettra pas un transfert de matière optimal.

La chaîne chromatographique du laboratoire est de plus constituée des éléments classiquement retrouvés dans toutes les chaînes chromatographiques :

- une pompe gradient haute pression quatre voies P580HPG Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ;
- une valve d'injection "Dual mode" préparative PEEK 3125 Rheodyne (Rohnert Park, CA, USA) ;
- un détecteur UV-visible Dionex, équipé avec une cellule préparative ;
- un collecteur de fractions Pharmacia Superfrac (Uppsala, Sweden).

I.3.2.6 Intérêt de la CPC

Les avantages de la CPC sont nombreux et d'autant plus flagrants si on les considère d'un point de vue préparatif.^{10, 12, 16, 19, 25-27} Les principaux avantages sont cités ci-après.

- L'absence de support solide permet de s'affranchir des phénomènes d'adsorption irréversible ou de dégradation des analytes. Le choix des phases quasi illimité permet d'adapter très finement le système à un produit donné.
- Les rendements globaux sont en général excellents avec des colonnes de capacités très élevées, ce qui est d'autant plus flagrant en mode déplacement.^{16, 19}
- Le faible coût de la phase stationnaire, par rapport aux phases classiquement utilisées en Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP), ainsi que la consommation de solvants diminuée (toujours par rapport à la CLHP), suscitent de plus en plus l'intérêt de nombreux industriels.
- L'automatisation est possible pour toutes les opérations, comme c'est le cas avec les chaînes complètes commercialisées par la société Armen Instruments (Vannes, France).
- Un autre point en faveur de l'utilisation de la CPC au niveau industriel, est la linéarité de la transposition d'échelle, qui rend celle-ci beaucoup plus simple à mettre en œuvre.^{16, 25}

I.3.3 Modes de développement existants et leurs applications à la purification de peptides et de protéines

Comme nous venons de le voir, la CPC peut se concevoir comme une boîte vide que l'on peut remplir à façon avec la phase stationnaire de son choix en fonction du problème chromatographique à résoudre. En plus de cette grande adaptabilité des systèmes biphasiques utilisables, il existe

différents modes de développement à la disposition des opérateurs.^{10,16} Le mode le plus classique, le mode élution, se décline en plusieurs variantes : isocratique, gradient, multi dual-mode, élution extrusion... Le second mode, le mode déplacement, peut également se scinder en deux branches: le *pH-Zone Refining* (pHZR) et l'échange d'ions. Enfin un troisième mode, le mode frontal, ne sera abordé qu'au travers d'une nouvelle application : le True Moving Bed (TMB) séquentiel.

1.3.3.1 Le mode élution

1.3.3.1.1 Principe

Dans le mode élution, la force motrice est la force éluante de la phase mobile. Cette force est régie par de nombreux paramètres propres aux solutés, ainsi qu'au système de solvants sélectionné, comme la polarité, la constante diélectrique etc. Dans ce cas, c'est l'action de "lavage" exercée par la phase mobile sur les solutés retenus dans la phase stationnaire qui est à l'origine de leur mobilité et donc de leur élution. Chaque molécule de soluté va alors progresser dans la colonne à une vitesse qui lui est propre, appelée *vélocité*.^{10,12,16}

Le profil chromatographique type obtenu lors d'un développement en mode élution se compose de pics chromatographiques de type Gaussien (Figure 18), lorsque les conditions expérimentales correspondent à la zone linéaire de l'isotherme de partage des solutés.^{16,19}

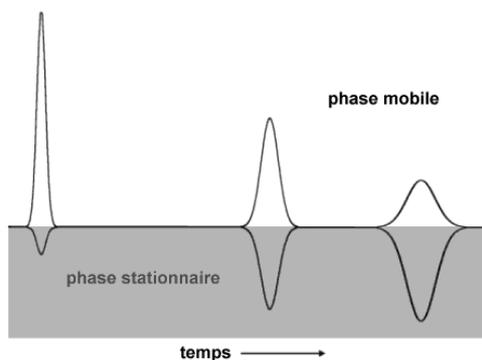


Figure 18: Modélisation d'un chromatogramme d'élution en chromatographie de partage.

Lors d'un développement en mode élution, le système biphasique de solvant est choisi pour que les analytes se partagent idéalement de façon équivalente entre les deux phases du système biphasique considéré, ce qui correspond à l'obtention d'une constante de distribution proche de l'unité. De façon pratique, il est considéré qu'une constante de distribution comprise entre 0,5 et 2 correspond à une zone d'élution idéale appelée le *sweet-spot*.²⁷

Une constante de distribution proche de l'unité traduit en chromatographie liquide/liquide sans support solide, un facteur de capacité k' égal à 1. Le facteur de capacité k' se définit comme le rapport des quantités d'analyte présentes dans la phase stationnaire et mobile. En chromatographie

préparative, les conditions opératoires sont choisies pour que $k' = 1$, ce qui implique un temps de développement assez court pour conserver une bonne productivité et assez long pour que les analytes soient séparés. En CLHP à polarité de phase inversée, un facteur de capacité de 1 équivaut à une constante de distribution de 15, du fait du rapport des phases. En chromatographie liquide/liquide sans support solide, le rapport des phases à l'intérieur de la colonne étant proche de 1, un facteur de capacité de 1 équivaut alors à une constante de distribution de 1.

Le mode élution peut être mis en œuvre de différentes façons :

1.3.3.1.2 Elution isocratique et en gradient

L'élution est dite isocratique lorsque la composition de la phase mobile demeure inchangée tout au long de l'expérience. A l'inverse, si la composition de la phase varie graduellement au cours du procédé, on parle alors de gradient d'élution.^{16, 17}

Chaque analyte présente un équilibre d'interactions propre entre la phase mobile et la phase stationnaire. Cet équilibre est constant lors de l'élution isocratique et varie au cours d'une élution utilisant un gradient.

Le choix du système biphasique de solvants à utiliser peut apparaître comme particulièrement ardu pour les néophytes, et c'est encore une des causes majeures freinant l'utilisation de la CPC.²⁷ Pourtant de nombreux progrès ont été réalisés pour simplifier cette étape. Des gammes de solvants préconstruites et couvrant une très large gamme de polarité existent : comme la gamme Arizona (ou HEMWat) à base d'heptane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'eau, la gamme OKA, ou encore la gamme acétone.^{16, 17, 27, 28}

Une autre avancée notable pour la simplification du choix du système biphasique de solvant est la méthode GUESS développée par Pauli *et al.*²⁷ Cette méthode permet de cribler les différents systèmes de solvants envisagés par simple analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) sur silice. Le mélange de produits à séparer est déposé en CCM puis la plaque est développée en utilisant la phase organique du système biphasique envisagé comme éluant. Si le rapport frontal (R_f) du produit d'intérêt est de 0,5 en CCM, la constante de distribution de cet analyte sera proche de 1 en CPC, les phénomènes physicochimiques mis en jeu étant différents : adsorption en CCM et partage en CPC.²⁷

Il est toutefois important de noter que tous les systèmes de solvants ne sont pas utilisables pour la réalisation d'un gradient d'élution. Contrairement aux techniques présentant un support solide, en CPC les phases stationnaire et mobile sont en équilibre thermodynamique l'une par rapport à l'autre. Changer la composition de l'une revient à profondément modifier dans certains cas la composition de l'autre.¹⁷ Seuls certains systèmes de type 2 présentant des lignes de conjugaisons convergentes au

niveau de leur diagramme de phases sont ainsi adaptés. C'est le cas par exemple du système AcOEt/*n*-BuOH/eau.^{17, 28}

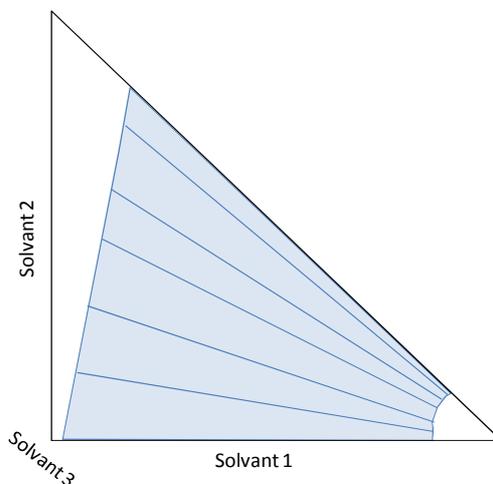


Figure 19 : Allure générale du diagramme de phases d'un système biphasique de solvants utilisable pour la réalisation de gradients d'élution.

Des travaux récents ont montré que la réalisation de gradients avec la gamme Arizona était possible. Ainsi Oliveira *et al.* ont purifié des triterpènes à partir d'un extrait chloroformique de *Cecropia lyratiloba* en HSCCC en utilisant ce type de gradient.²⁹ Audo *et al.* ont quant à eux appliqué un gradient utilisant la gamme Arizona pour la purification d'un mélange synthétique complexe.³⁰

I.3.3.1.2.1 Applications à la purification de peptides et de protéines

La purification de peptides et de protéines est soumise à des contraintes supplémentaires liées à l'arrangement structural de ces composés. En effet l'activité biologique des polypeptides et des protéines est majoritairement liée aux structures tertiaires et quaternaires qui sont régies par des interactions faibles. L'action dénaturante de certains solvants, capables par exemple de rompre des liaisons hydrogène, est primordiale à prendre en compte.^{1, 7}

La plupart des peptides étant préférentiellement solubles en phase aqueuse, il faut adapter différents paramètres pour faciliter leur passage en phase organique : le pH, la charge etc. ; à l'inverse certains peptides entièrement protégés, c'est-à-dire dont les fonctions ionisables ont été bloquées, peuvent s'avérer particulièrement hydrophobes.^{7, 31-33}

Néanmoins, la majorité des systèmes de solvants utilisés pour la purification de peptides sont caractérisés par une polarité élevée. Ils se composent en général d'un alcool (*n*-BuOH), d'eau en grande proportion, additionnée d'un acide ou d'une base pour tamponner le milieu. Ainsi Knight *et al.* ont réussi à purifier différents peptides par HSCCC en utilisant le système MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau acidifiée par l'acide trifluoroacétique (TFA), ou encore le système *n*-BuOH/pyridine/AcOH/eau.³²⁻³⁴

Également, Han *et al.* ont purifié la pseudostéllarine B, peptide cyclique (Figure 6), par HSCCC en utilisant cette fois un système *n*-BuOH/AcOEt/eau et ont obtenu un produit de pureté environ 96% à partir d'un extrait de plante traditionnelle chinoise *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax.³

Pourtant l'utilisation de solvants classiques n'exclut jamais la possibilité d'une dénaturation, ceci est d'autant plus vrai si l'on considère le cas des protéines.

L'utilisation de systèmes aqueux/aqueux (ATPS) constitue une alternative à l'extraction/purification par les systèmes solvants organiques/eau. Cette technique utilise un système aqueux rendu biphasique par l'addition de différents polymères hydrosolubles (Polyéthylène Glycol PEG, dextran) ou de sels comme le phosphate de potassium à des concentrations données.

Les ATPS possèdent ainsi une teneur très élevée en eau (>70%), qui leurs confèrent une très grande biocompatibilité avec les biomolécules et les protéines en particulier. Il n'y a dans ce cas aucun risque de dénaturation due aux solvants organiques.^{7, 35, 36}

Les systèmes les plus utilisés sont les systèmes utilisant deux polymères (Dextran/PEG), ainsi que ceux associant un polymère, en général un PEG, avec un sel (phosphate de potassium par exemple).^{7, 35}

De nombreux paramètres influent sur le partage des analytes, comme entre autres :

- la masse moléculaire des polymères employés ;
- la concentration en sel, et la force ionique du milieu ;
- la température de travail : en baissant la température, les systèmes deviennent biphasiques pour des concentrations en polymères plus faibles ;
- le type d'appareil utilisé etc.^{7, 37}

Les systèmes ATPS permettent de conserver l'activité biologique des protéines en évitant leur dénaturation : ils sont déjà utilisés dans l'industrie pour la purification d'enzymes dans des mélangeurs/décanteurs. Ces techniques ont comme avantage également d'être approuvées par la plupart des Pharmacopées et ne font de plus intervenir que des produits non toxiques.

En employant ces systèmes, Shibusawa *et al.* ont purifié la lactate déshydrogénase à partir d'un broyat de cœur de bœuf par HSCCC.^{38, 39} Platis *et al.* ont quant à eux appliqué ces systèmes à la purification de protéines issues du tabac.⁴⁰ De nombreuses études de purification de diverses protéines modèles ont été réalisées également au sein du groupe de Sutherland.^{37, 41, 42}

Si l'éluion isocratique ou utilisant des gradients a démontré son efficacité pour la purification de peptides, il s'agit le plus souvent de peptides hydrophobes, ou portant un ou plusieurs groupements protecteurs. Les ATPS constituent une alternative séduisante mais à notre connaissance il n'existe que des applications aux protéines et non aux peptides.

Les autres modes d'utilisation du mode élution seront abordés plus succinctement, car peu d'applications, voire aucune, ne sont décrites concernant les peptides et protéines.

1.3.3.1.3 Dual Mode et Multi Dual Mode (MDM)

Le dual mode est un mode d'utilisation particulier de la CPC tirant pleinement parti de la nature liquide des phases stationnaire et mobile. Le principe du Dual Mode consiste en l'inversion du rôle des phases stationnaire et mobile à un instant t donné de l'expérience : en pratique on bascule du mode ascendant au mode descendant (ou inversement), tout en inversant le rôle des phases stationnaire et mobile.¹⁶

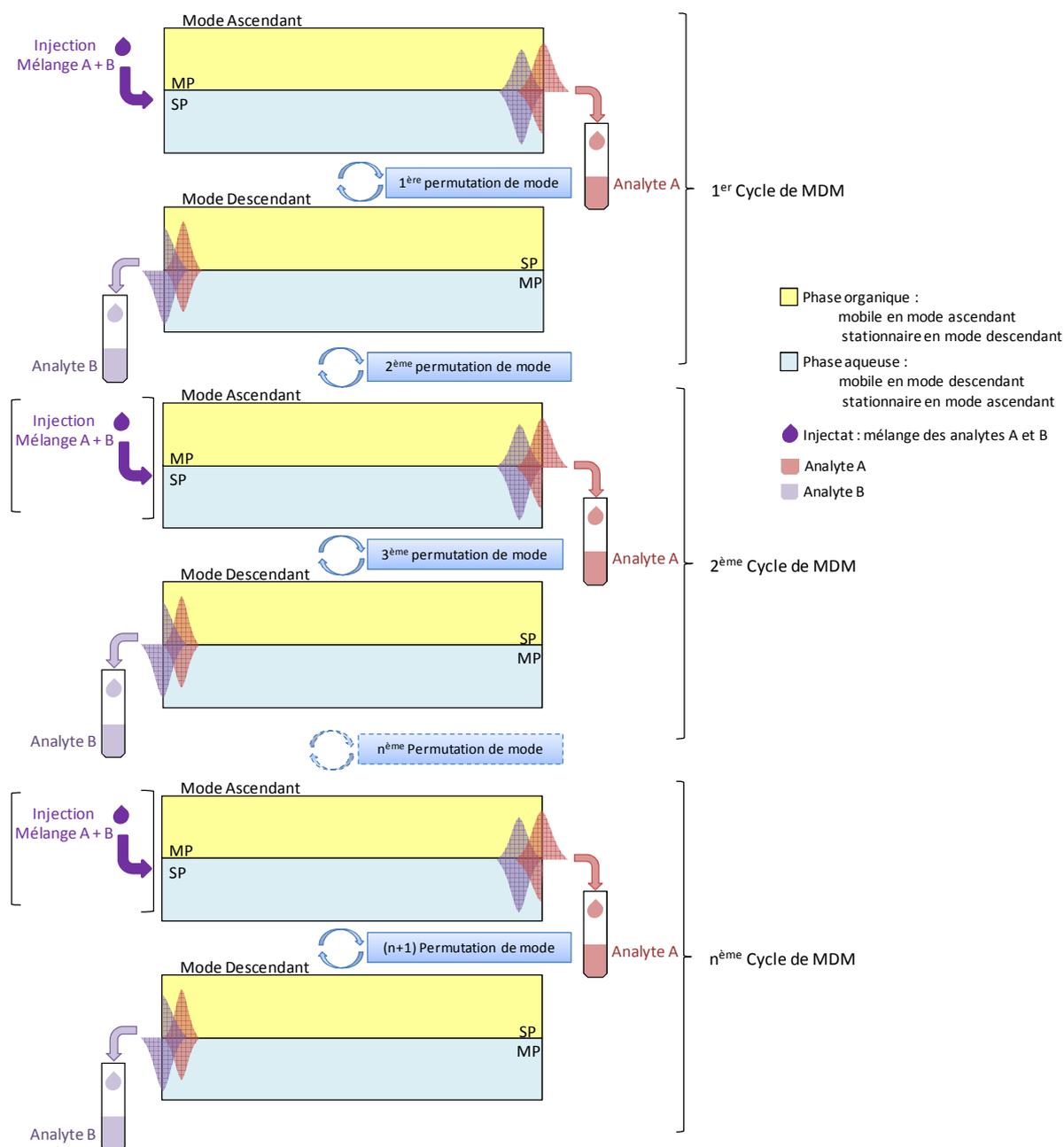


Figure 20: Illustration du procédé Multi Dual Mode en CPC.

Cette permutation permet d'éluer des composés trop fortement retenus dans le premier mode de pompage choisi. Le Dual Mode peut également servir à la résolution de mélanges binaire de composés partiellement co-élus en inversant le mode de pompage au moment où la zone de mélange des deux analytes commence à émerger. Mais dans ce cas la proportion de produit restant en mélange est conséquente, une évolution du procédé permet de résoudre ce problème : le MultiDual Mode ou MDM (Figure 20).

Le MDM permet d'allonger artificiellement la longueur effective de la colonne. Ce procédé fut développé au sein de notre laboratoire par le Dr Eldra Delannay.⁴³ Il a été récemment adapté aux séparations chirales en CCC par Rubio *et al.*⁴⁴, et également à la purification d'une mycosporine par Boustie *et al.*⁴⁵

Dans le cadre du MDM, les cycles de dual mode sont répétés autant de fois que nécessaire pour réaliser la purification. Il est important de noter qu'entre chaque cycle de MDM, une réinjection du brut à purifier est possible, ce procédé peut être ainsi considéré comme semi continu.

1.3.3.1.4 Elution Extrusion

Le protocole d'élution extrusion (EECCC) est une autre variante de développement du mode élution permettant de réduire le temps d'expérience.

Ce procédé se déroule en deux étapes. La première est une étape d'élution classique durant laquelle les analytes se répartissent dans la colonne et sont élués en fonction de leur K_D (Phase I, Figure 21). Puis après avoir passé un volume déterminé de phase mobile, la phase pompée est alors échangée par la phase qui était stationnaire, sans changer le mode de pompage, contrairement au dual mode.⁴⁶⁻⁴⁸

Les analytes ayant un K_D très élevé, restés en tête de colonne, sont alors poussés, extrudés, hors de la colonne tout en restant organisés comme avant l'interversion des phases.^{47, 48}

Plus récemment, il est apparu qu'il existait une étape intermédiaire entre l'élution classique et l'extrusion pure, appelée "sweep elution" (Phase II, Figure 21), intervenant juste après le début de pompage de la phase "stationnaire" (SP). Durant cette phase, un front de phase stationnaire apparaît et progresse dans la colonne à une vitesse supérieure à la vitesse de tous les analytes encore présents. Ce front pousse le reste de phase mobile encore présente dans la colonne hors de celle-ci, si bien qu'au niveau de la sortie de la colonne seule la phase mobile apparaît. Il est primordial de noter que la transition entre la "sweep elution" et l'extrusion pure n'intervient pas au même temps pour tous les analytes.⁴⁶

L'EECCC permet de limiter l'élargissement des pics, constaté pour les analytes ayant des K_D très importants, et également de réduire le temps d'expérience nécessaire pour la séparation des

produits. Un autre avantage est qu'à la fin du procédé la colonne est déjà remplie avec la phase stationnaire et est donc conditionnée pour une nouvelle injection.^{27, 46-48}

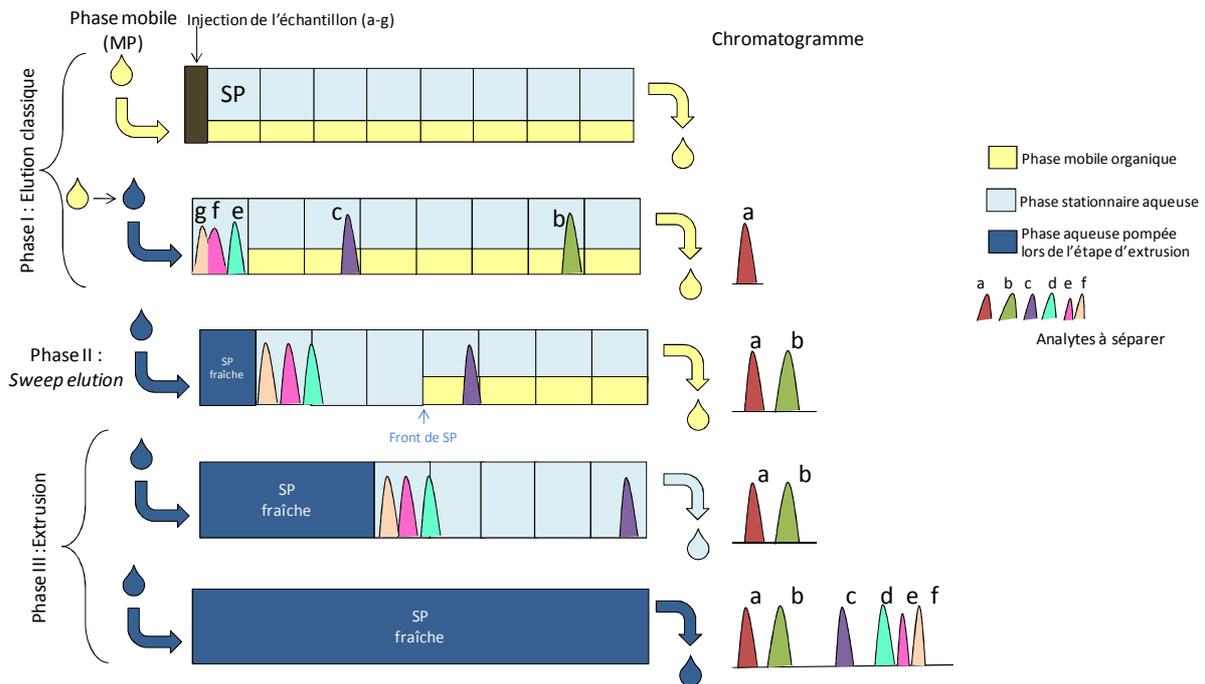


Figure 21 : Description du procédé par élution extrusion.

L'EECC présente un intérêt certain pour l'étude d'extraits végétaux complexes, comme ceux travaillés lors d'études métabolomiques, puisqu'il permet de séparer en une seule étape des composés couvrant une gamme de polarité extrêmement vaste, tout en conservant un temps d'expérience acceptable. De plus la colonne étant totalement "vidangée", aucun analyte ne peut subsister dans l'appareil et être perdu.^{27, 46}

L'utilisation du procédé par élution-extrusion pourrait être envisagée pour préfractionner des hydrolysats protéiques, l'EECC permettrait ainsi de réaliser un premier tri des peptides en fonction de leur polarité par exemple.

En conclusion, le mode élution est particulièrement adaptable aux différents problèmes de purification, ou de fractionnement, rencontrés en chimie des substances naturelles. Ce mode est de plus en constante évolution, d'autres avancées telles que le procédé dit de Dual Flow⁴⁹ utilisant deux colonnes mises en série ; ou encore le co-courant, procédé dans lequel la phase stationnaire et la phase mobile sont mobiles, ont ainsi été récemment décrit.⁵⁰

1.3.3.2 Le mode frontal : TMB séquentiel

Le mode de développement dit frontal est caractérisé par une injection continue du matériel à purifier au sein de la colonne.⁵¹ Les analytes vont alors saturer progressivement la colonne. L'analyte le moins retenu, qui va donc saturer le plus rapidement la phase stationnaire, sera obtenu ainsi pur

les autres étant obtenus sous forme de mélanges. Ce mode de développement fut principalement utilisé dans une optique d'analyse de la composition de mélange, ou pour la détermination d'isotherme de partage ou d'adsorption. Ce mode présente néanmoins un intérêt très important pour les procédés à visée industrielle, car il permet la mise en place de procédés continus.

Peu de procédés chromatographiques continus sont décrits à l'heure actuelle, nous pouvons citer le lit mobile simulé (SMB pour Simulated Moving Bed),⁵² le MCSGP (Multicolumn Countercurrent Solvent Gradient Purification)⁵³ entre autres. Ces deux procédés mettent en œuvre plusieurs colonnes chromatographiques avec support solide disposées en série, mais répondent à des problèmes de séparation différents. Le SMB permet essentiellement de résoudre des problèmes de mélanges binaires, et le MCSGP s'adresse aux mélanges "ternaires" : impuretés moins retenues/produit d'intérêt/impuretés plus retenues.

En chromatographie liquide/liquide sans support solide, un procédé continu a été récemment développé par la société Armen Instrument (Vannes, France) et le GEPEA UMR CNRS 6144 (Saint Nazaire, France): le TMB séquentiel (True Moving Bed).⁵⁴

Le TMB tire parti de la nature liquide de la phase stationnaire en CPC. Dans ce cas, deux rotors de CPC sont montés en série et l'injection du mélange à séparer se fait entre les deux colonnes (Figure 22).

La séparation des analytes intervient en inversant de façon séquentielle le rôle des phases supérieures et inférieures : dual-mode.

En prenant le cas d'un mélange binaire d'analytes A et B, où A est à une constante de distribution plus en faveur de la phase inférieure que B et inversement B possède une constante de distribution plus en faveur de la phase supérieure. Dans ce cas de figure, l'analyte A sera élué pur lors du développement en mode descendant et l'analyte B sera obtenu pur lors du mode ascendant.

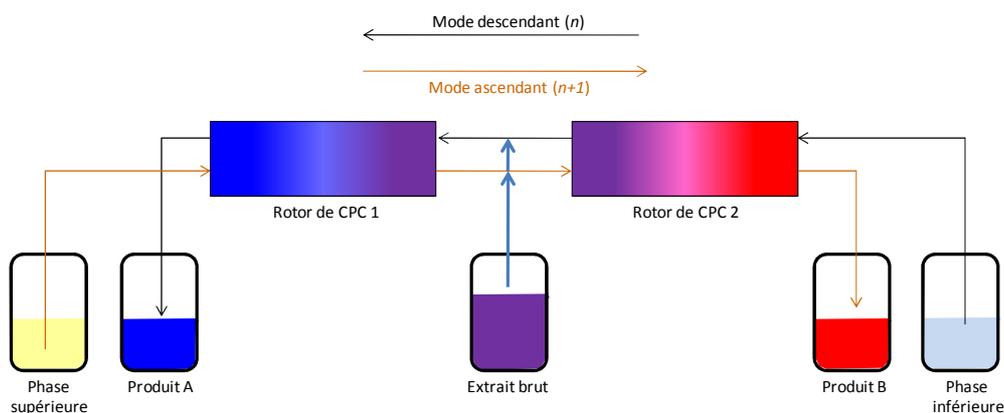


Figure 22 : Illustration du procédé TMB séquentiel en CPC.

Le TMB séquentiel en CPC permet la résolution de divers problèmes de séparation, allant de la purification de diastéréoisomères, à l'enrichissement de fractions en un composé d'intérêt. La purification de protéines modèles a été réalisée en utilisant ce type de procédé.⁵⁵

Si de nombreux exemples de purification de peptides utilisant le mode élution sont décrits dans la littérature, ils s'appliquent dans la majorité des cas à des peptides non naturels le plus souvent hydrophobes.³²⁻³⁴ C'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers un troisième mode de développement : le mode déplacement.

I.4 La CPC en mode déplacement et ses applications à la purification de peptides

La chromatographie en mode déplacement ne s'aborde pas comme une technique analytique mais plutôt comme un procédé à but préparatif. Dans ce contexte, ni la résolution ni la rapidité, critères habituellement retenus pour l'évaluation d'un procédé chromatographique, ne sont pertinents seuls pour déterminer la performance d'un procédé en mode déplacement. La productivité du procédé entre autres sera un critère de choix.

Dans ce chapitre, nous verrons dans un premier temps un bref historique concernant la chromatographie en mode déplacement en général, avec et sans support solide. Le principe général de ce mode en chromatographie liquide/liquide sera ensuite abordé avant de nous intéresser plus particulièrement au procédé dit de *pH-zone refining* et au mode échange d'ions en survolant leur champ d'application général et en particulier la purification de peptides et protéines.

I.4.1 Historique

Les premiers phénomènes chromatographiques liés à un développement par déplacement furent décrits par Tswett (1906) et Tiselius (1943).⁵⁶ Ils avaient observé qu'une surcharge massive en échantillon de leur colonne générait l'apparition de processus de compétition entre les différents analytes présents dans l'injectat.

Il fallut attendre les années 80 et les travaux de Horváth *et al.* sur la chromatographie préparative pour que ce mode soit étudié et réhabilité.⁵⁷ Horváth a ainsi démontré l'intérêt que présentait l'application du mode déplacement pour la purification de biomolécules et particulièrement pour les peptides et protéines.⁵⁷

En chromatographie liquide/liquide sans support solide, le premier procédé par déplacement fut développé par Ito et son équipe dans les années 90.^{11, 58-60} Il s'agit du procédé dit de *pH-zone refining*. Ce procédé a constitué une avancée majeure pour la purification de molécules d'intérêts telles que les alcaloïdes,⁶¹⁻⁶³ ou encore, comme nous le verrons, pour les peptides et protéines.^{31, 64, 65}

Une autre avancée est constituée par le développement du mode par échange d'ions fort ou faible.^{28, 56} Ce mode fut appliqué avec succès à la purification de nombreuses classes de molécules d'intérêt, anthocyanes, héparines de bas poids moléculaires (HBPM), glucosinolates...⁶⁶⁻⁶⁸

I.4.2 Le mode déplacement en chromatographie liquide/liquide

I.4.2.1 Principe général

Le mode par déplacement est basé sur la mise en compétition des solutés impliqués dans un processus chromatographique. Cette compétition génère des interactions entre les analytes qui sont à l'origine d'un facteur de séparation s'ajoutant aux interactions entre les analytes et la phase stationnaire. Ce phénomène de compétition n'apparaît que lorsque deux conditions expérimentales sont remplies.^{28, 69}

La première est que le procédé se déroule selon un régime non linéaire, ce qui est sous la dépendance des conditions expérimentales choisies en termes de concentrations injectées entre autres.

La seconde est que la phase mobile seule ne doit pas permettre de mobiliser les analytes. En d'autres termes, l'interaction entre la phase mobile "pure" et les analytes doit être faible comparativement à l'ensemble des interactions mises en jeu dans le procédé ; ces interactions reposant sur le choix des espèces et des phases.^{57, 69}

Avant de poursuivre, la notion de linéarité et de non linéarité en chromatographie vont être rappelées avant de voir les différents acteurs impliqués dans le mode par déplacement.

I.4.2.1.1 Notion de linéarité et de non linéarité

Un processus chromatographique se déroule selon un régime linéaire si là encore deux conditions sont remplies :^{57, 69}

- il existe pour chaque analyte une proportionnalité entre la quantité injectée et le signal observé en fin de colonne ;
- l'injection d'un échantillon comprenant différents analytes aboutit après développement à un chromatogramme qui correspond à la somme des réponses obtenues après l'injection de chaque analyte seul.⁵⁷

Les analytes évoluent alors dans la colonne à des vitesses différentes, aboutissant à un développement par élution. Lorsque les conditions de chromatographie sont idéales, ce régime linéaire s'observe quelles que soient les concentrations en analytes. On entend par conditions idéales les conditions suivantes :

- la colonne possède une capacité infinie ;
- il n'existe pas d'interactions entre les analytes ;
- il n'y a pas de surcharge en échantillon ;
- le débit et l'écoulement sont uniformes ;
- les analytes sont parfaitement solubles dans les phases ;
- il n'existe pas d'effet de bord.

Ces conditions sont les plus recherchées pour la chromatographie analytique. En pratique elles ne sont jamais toutes réunies. Les colonnes ont de fait une capacité limitée, et la linéarité ne va donc s'observer que dans certaines conditions de concentrations.

De façon paradoxale, le mode par déplacement tire avantage du caractère non-idéal de la chromatographie. Dans le cas d'une injection de fortes concentrations en analytes, ceux-ci vont entrer en compétition pour la phase stationnaire : la colonne ayant une capacité limitée, pour un segment de colonne donné il y a plus d'analytes que de sites d'interactions disponibles. Dans le cas de la chromatographie liquide/liquide sans support solide en mode échange d'ions par exemple, la capacité de la colonne est définie essentiellement par la quantité d'échangeur (voir 1.4.2.2.2) introduit en phase organique. Pour un mélange binaire, le type d'analyte présentant la plus grande affinité (ou constante d'association) avec la phase stationnaire sera préférentiellement retenu, repoussant les autres plus en aval dans la colonne : les analytes ont ainsi une influence les uns sur les autres.

Ce phénomène va perturber le rapport de linéarité existant entre l'échantillon injecté et le profil des analytes dans la colonne : on est alors dans un régime non linéaire.

Cette transition d'un régime linéaire à un régime non linéaire est donc essentiellement liée à la surcharge de la phase stationnaire. Pour représenter cette transition, il existe les isothermes de partage (ou d'adsorption) en chromatographie de partage (ou d'adsorption).

1.4.2.1.2 Les isothermes de partage

Une isotherme de partage représente la proportion de soluté présent dans la phase stationnaire (ou à sa surface dans le cas d'une technique d'adsorption) en fonction de la proportion de soluté

présente dans la phase mobile. Comme son nom l'indique, ces isothermes dépendent de la température.

En chromatographie de partage, les isothermes observées peuvent être de différentes formes (concave, convexe, linéaire...). Néanmoins, une isotherme de type Langmuir permet généralement de décrire la majorité des procédés.

Cette isotherme se décrit comme suit :

$$C_{\text{stat}} = \frac{a C_{\text{mob}}}{1 + b C_{\text{mob}}} \quad (\text{Équation 9})$$

Avec C_{stat} : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_{mob} : concentration du soluté dans la phase mobile

a et b : constantes

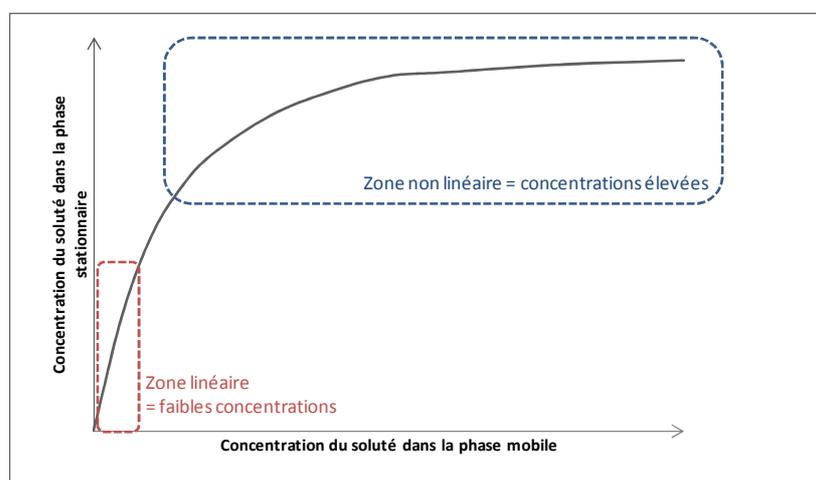


Figure 23 : Schéma d'une isotherme de type Langmuir.

Différents analytes présentent généralement des isothermes de partage distinctes : l'analyte présentant la constante d'association la plus élevée avec la phase stationnaire aura l'isotherme la plus haute.

1.4.2.2 Les acteurs mis en jeu

Il est important de garder à l'esprit que la transposition du mode déplacement en chromatographie liquide/liquide sans support solide, a dû tenir compte des particularités liées à la nature liquide de la phase stationnaire. Dans ce cas, c'est le volume entier de phase stationnaire qu'il faut prendre en compte et non sa surface seule. La surcharge indispensable à la mise en œuvre du déplacement ne peut donc intervenir que pour des concentrations très importantes.

Or la surcharge d'une phase liquide en un analyte conduit le plus souvent à la précipitation de ce dernier, phénomène qu'il est impératif d'éviter en CPC. Il devient alors évident que le mode

déplacement par partage simple ne peut être utilisé : les phases doivent être modifiées. Cette modification doit ainsi conférer à la phase stationnaire une capacité d'échange limitée et contrôlable.

Ainsi plusieurs acteurs vont intervenir dans le processus chromatographique avec chacun un rôle bien précis.

1.4.2.2.1 Le système biphasique de solvants

Contrairement au mode élution, le système biphasique est choisi ici pour que les solutés ne se partagent pas entre les deux phases du système de solvants pures. En effet, avant addition de l'échangeur (voir définition ci-après), les solutés restent exclusivement en phase mobile. Cette dernière a comme particularité de ne pouvoir seule mobiliser les analytes en présence d'échangeur dans la phase stationnaire, qui ne progresseront dans la colonne qu'après l'introduction du déplaceur en phase mobile.^{28, 56}

1.4.2.2.2 L'échangeur

L'échangeur est une espèce chimique additionnée au système biphasique de solvants. Il sert de sites d'échange ou de molécules échangées par les autres espèces présentes dans le système.

En *pH-zone refining*, les espèces ainsi échangées sont des protons alors qu'en échange d'ions c'est un échangeur ionique ou ionisable qui fait office de site d'échange.⁵⁶

1.4.2.2.3 Le reteneur

Le reteneur a pour rôle le maintien des analytes en phase stationnaire. Il s'agit du contre-ion initial de la fonction ionisée (ou ionique) de l'échangeur en mode échange d'ions. En *pH-zone refining*, il s'agit d'un acide fort ou tout du moins plus fort que les analytes (ou d'une base forte) si la phase mobile est basique (ou acide).

1.4.2.2.4 Le déplaceur

Le déplaceur va "déplacer" les analytes de la phase stationnaire vers la phase mobile. Il s'agit en général d'un ion d'affinité supérieure aux analytes pour l'échangeur, dans le cas de l'échange d'ions. En *pH-zone refining*, il s'agira d'une base plus forte que les analytes, dans le cas d'une phase stationnaire contenant un reteneur acide, ou inversement.

1.4.2.2.5 Les analytes

Enfin, les analytes interagissent avec l'échangeur et sont retenus par celui-ci en phase stationnaire. Dans tous les cas il s'agit d'espèces ionisables ou ionisées.

La plupart des notions tout justes abordées ici seront redétaillées dans la suite du manuscrit. Les acteurs étant en place nous pouvons alors nous intéresser à la mise en œuvre du mode déplacement en CPC.

1.4.2.3 Le train isotachique

Nous verrons tout d'abord la formation initiale de ce train d'analytes, avant de poursuivre par sa progression dans la colonne.

1.4.2.3.1 Formation du train isotachique

Ce train s'organise dès l'injection des analytes dans la colonne. Comme nous l'avons déjà mentionné, ces derniers vont être retenus en fonction de leurs constantes d'association respectives avec l'échangeur. Le reteneur ayant une constante d'association inférieure à celles de tous les analytes, il est déplacé par ces derniers et progresse dans la colonne pour former la première "bande". Les analytes sont ensuite extraits en phase stationnaire par ordre d'affinité décroissante pour l'échangeur, le plus affin restant ainsi en tête de colonne.

L'ordre dans lequel les analytes vont être organisés est prédictible par étude de leurs isothermes de partage respectives (Figure 24).⁵⁷

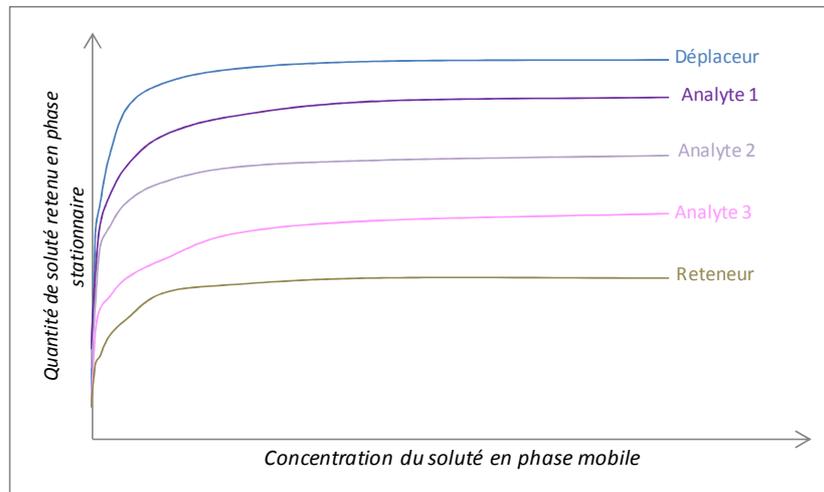


Figure 24 : Représentation des isothermes de partage des analytes (1, 2, 3) d'un mélange en comparaison avec celles du déplaceur et du reteneur.

L'introduction du déplaceur, par définition le plus affin pour l'échangeur, va déclencher la mise en route du train, et sa progression le long de la colonne.⁵⁷

1.4.2.3.2 Déplacement isotachique du train d'analytes

Par définition, une espèce ne peut progresser dans la colonne que si elle est déplacée en phase mobile, c'est-à-dire si elle est en compétition avec une espèce de plus forte affinité qu'elle pour

l'échangeur. Cette espèce va alors entrer en compétition avec une espèce de plus faible affinité qu'elle, et entraîner à son tour son déplacement en phase mobile en se fixant dans la phase stationnaire.

Ainsi l'analyte ayant la plus faible affinité, ici le reteneur, va progresser le plus rapidement dans la colonne. Il est important de noter qu'aucun analyte ne peut progresser plus vite que le reteneur.

A l'inverse, le déplaceur, d'affinité maximale pour l'échangeur, va lui progresser le plus lentement. De fait aucun analyte n'ira plus lentement que lui. Les solutés seront alors bloqués entre le front de reteneur d'une part, et celui du déplaceur d'autre part.

On peut ainsi généraliser cette constatation à toutes les espèces présentes dans la colonne. Une espèce donnée progressera dans la colonne "coincée" entre un soluté d'affinité inférieure et un d'affinité supérieure. Le système tend alors vers un équilibre dynamique où, pour une zone donnée de la colonne, le phénomène de compétition entre les espèces présentes est réduit au minimum. Cette zone de compétition minimale est appelée zone de front ou "*Shock layer*".

Chaque espèce ne pouvant ni doubler le soluté la précédant, ni être doublée par celle qui lui fait suite, les analytes vont ainsi progresser, une fois le train organisé, à la même vitesse : celle du déplaceur. C'est la raison pour laquelle ce train est dit isotachique.

D'après Horváth, la détermination de la concentration de chacune des espèces dans l'éluat est possible.⁵⁷ Le train d'analyte étant isotachique, la vitesse V_i de chaque analyte déplacé est, nous venons de le voir, équivalente à celle du déplaceur. Il en découle la relation suivante :

$$V_1 = V_2 = \dots = V_i = V_{\text{déplaceur}} \quad (\text{Équation 10})$$

où

$$V_i = \frac{u}{1 + F \left(\frac{q_i}{C_i} \right)} \quad (\text{Équation 11})$$

avec F : rapport volumique des phases

u : vitesse de la phase mobile

q_i : concentration de i dans la phase stationnaire

C_i : concentration de i dans la phase mobile

En combinant les équations ci-dessus, on obtient la relation :

$$\frac{q_1}{C_1} = \frac{q_2}{C_2} = \dots = \frac{q_i}{C_i} = \frac{q_{\text{dépl}}}{C_{\text{dépl}}} \quad (\text{Équation 12})$$

Cette relation montre que la proportion de soluté dans la phase stationnaire et mobile est donc la même pour tous les analytes, lorsque le train isotachique est mis en place. Ainsi, la vitesse des analytes sera uniquement sous contrôle de la concentration en déplaceur choisie, et ce indépendamment du débit de phase mobile. Il est important de préciser que le déplaceur se déplace

à une vitesse inférieure au débit de phase mobile choisi, ce qui a une importance décisive pour la compréhension du mécanisme de séparation.¹¹

En chromatographie liquide/liquide, le mode déplacement peut être mis en œuvre selon deux variantes :

- en faisant varier drastiquement la constante de distribution des analytes en jouant sur leur état d'ionisation par modification du pH : *pH-zone refining* ;
- en utilisant des échangeurs pour procéder directement par échange d'ions.

I.4.3 Le pH-zone refining

I.4.3.1 Introduction

Le *pH-zone refining* fut découvert fortuitement par Ito *et al.* au début des années 90. Lors d'essais de purification de la bromoacetylthyrone tri iodée (BrAcT₃) par HSCCC en mode élution, ils ont observé sur le chromatogramme un pic très étroit et d'intensité très élevée, différent de ceux habituellement observés lors d'un développement par élution. En calculant le nombre de plateaux théoriques correspondant, ils ont obtenu une valeur dépassant les 2000 plateaux, sur une colonne n'excédant pas les 500 plateaux.⁷⁰

Pour comprendre quels phénomènes étaient à l'origine de ce pic, ils ont cherché à modifier le système biphasique de solvants à base d'hexane, d'acétate d'éthyle, de méthanol et d'un tampon acétate d'ammonium à pH 4. Ils se sont ainsi aperçus après différentes expériences que le pic n'était pas lié à la nature du produit injecté mais plutôt à un autre élément présent dans l'échantillon injecté.⁶⁰ La cause fut finalement identifiée lorsqu'ils ont réalisé un suivi pHmétrique des fractions. Sur la Figure 25, on peut voir que le pH décroît progressivement au cours de l'expérience jusqu'à l'émergence du pic où un saut de pH brutal a lieu.

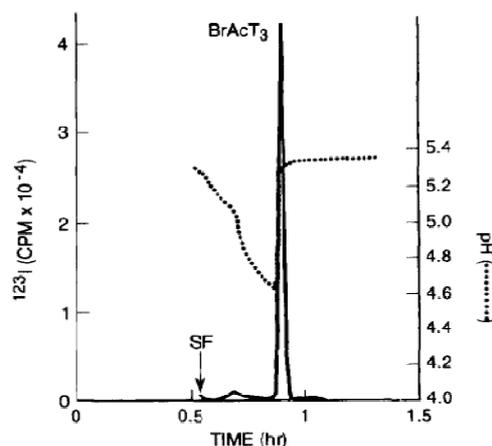


Figure 25 : Suivi pHmétrique de la purification de BrAcT₃ par HSCCC.⁶⁰

Après analyse de l'échantillon par spectrométrie de masse, il s'est avéré qu'il subsistait une quantité non négligeable d'acide bromoacétique, qui est un coproduit de synthèse de la BrAct₃.⁶⁰ Cet acide fut ainsi le premier reteneur décrit en CCC.

D'autres acides organiques ont ensuite été utilisés, tels que l'acide trifluoroacétique (TFA) ou propionique. Ils ont baptisé ce procédé *pH-zone refining* en référence au procédé de *refining* existant en métallurgie.

1.4.3.2 Domaine d'application

Avant de décrire plus précisément les mécanismes régissant ce procédé, il est important de préciser que son domaine d'application peut paraître restreint. En effet, le *pH-zone refining* s'applique aux molécules ionisables, c'est-à-dire existant sous forme ionisée ou neutre en fonction du pH du milieu. Ces deux formes, neutre et ionisée, doivent de plus présenter une différence de polarité importante. De cette différence de polarité va découler une différence de K_D conséquente entre les formes neutre et ionisée pour un système biphasique de solvants donné.⁶⁰ Le nombre de molécules répondant à cette définition est en réalité très élevé. Ces molécules peuvent être basiques ou acides, avoir une masse molaire faible ou au contraire élevée.

Aussi dans le règne végétal, un certain nombre de métabolites secondaires répondent à cette définition, comme les alcaloïdes ou certains acides organiques.^{62, 63, 71}

Le mode classique de purification des alcaloïdes est basé sur une succession d'extractions acido-basiques à un seul plateau théorique, utilisant un mélange solvant apolaire (chloroforme par exemple) et eau comme milieu d'extraction. En effet, sous forme neutre *i.e.* en milieu basique, les alcaloïdes sont solubles en phase apolaire, les composés hydrophiles de l'extrait végétal sont alors éliminés en phase aqueuse. En protonant les alcaloïdes par addition d'acide, ces derniers sont solubilisés sous forme de sels en phase aqueuse ce qui permet l'élimination des impuretés lipophiles cette fois. En répétant ces extractions acido-basiques, les impuretés sont ainsi progressivement éliminées et un *totum* alcaloïdique est obtenu. La société Omnicem utilise un procédé d'extraction des alcaloïdes dérivés de l'indole (Figure 26) à partir de la pervenche *Catharanthus roseus* basé sur une série d'extraction acido/basique.

La particularité de ce procédé tient dans l'utilisation d'acides de force croissante pour fractionner sélectivement les alcaloïdes présents dans l'extrait. Ainsi trois blocs alcaloïdiques sont obtenus : un extrait contenant environ 20 % de vindoline, un second extrait enrichi en catharantine et enfin la vinblastine technique sous forme cristallisée.

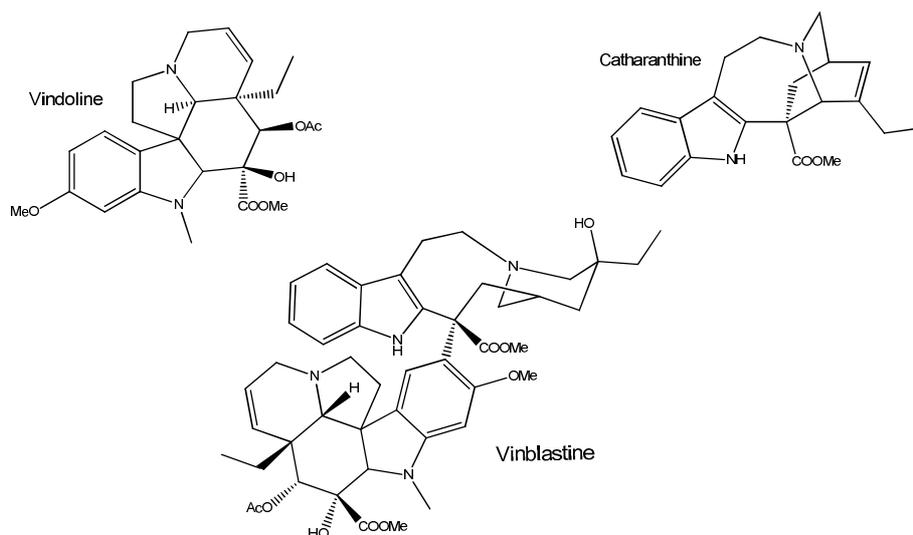


Figure 26 : Alcaloïdes extraits de la pervenche *Catharanthus roseus*.

La mise en œuvre de ce protocole en chromatographie liquide/liquide peut se voir comme la transposition de l'extraction discrète à un seul étage à plusieurs étages en cascade dans le cas de l'appareil de Craig ; ou à un procédé continu dans le cas de la CPC.

1.4.3.3 Principe général

Le *pH-zone refining* (pHZR), bien que considéré comme un mode de développement par déplacement, comporte certaines particularités qui le font différer de la chromatographie par déplacement classique. En effet, il n'y a pas en pHZR d'échangeur au sens propre comme on peut l'entendre en chromatographie par échange d'ions, solubilisé dans la phase stationnaire. La force motrice ici est le changement d'état d'ionisation des analytes, les protons échangés jouant le rôle d'échangeur, qui va engendrer un changement de comportement. C'est sur cette variation de comportement qu'est basée la sélectivité.

Avant de voir la formation du train isotachique en pHZR et le modèle mathématique associé, nous allons redéfinir les notions de reteneur et de déplaceur dans ce contexte précis.

1.4.3.3.1 Reteneur et déplaceur en pHZR

En pHZR, le reteneur est une espèce présente dans la phase stationnaire dont le rôle est de maintenir l'analyte en phase stationnaire en jouant sur son état d'ionisation. Le reteneur est une espèce de caractère acido-basique identique à celui des analytes à séparer, présentant de plus la différence de pKa la plus élevée avec le déplaceur (voir définition ci-dessous). Ito et ses collaborateurs ont montré que le reteneur peut être introduit préalablement dans la phase stationnaire ou bien directement dans l'injectat.⁶⁰

Le déplaceur est une espèce solubilisée dans la phase mobile, capable de mobiliser les analytes en phase mobile, toujours en faisant varier leur état d'ionisation. Nous l'avons vu précédemment (paragraphe 1.4.2.3), c'est la concentration de ce déplaceur qui va fixer la vitesse des analytes dans la colonne.

Selon que les analytes à purifier sont acides ou basiques, la mise en œuvre du procédé sera différente comme nous pouvons le voir Tableau 3.

Tableau 3 : Mise en œuvre du pHZR en fonction de la nature des analytes à séparer

Nature des analytes	Mode de pompage*	Nature des reteneurs et déplaceurs
Analytes basiques	Mode descendant	Déplaceur dans la phase mobile aqueuse : acide fort hydrosoluble
		Reteneur dans la phase stationnaire organique : base forte liposoluble
	Mode ascendant	Déplaceur dans la phase mobile organique : base forte liposoluble
		Reteneur dans la phase stationnaire aqueuse : acide fort hydrosoluble
Analytes acides	Mode descendant	Déplaceur dans la phase mobile aqueuse : base forte hydrosoluble
		Reteneur dans la phase stationnaire organique : acide fort liposoluble
	Mode ascendant	Déplaceur dans la phase mobile organique : acide fort liposoluble
		Reteneur dans la phase stationnaire aqueuse : base forte hydrosoluble

* solvants chlorés exclus

Dans le cas de la purification d'alkaloïdes basiques, en considérant la phase organique comme stationnaire (mode descendant), le reteneur sera une base forte liposoluble, typiquement la triéthylamine (TEA), qui va maintenir les alcaloïdes en phase stationnaire en augmentant leur K_D . Le déplaceur est alors un acide fort hydrosoluble, typiquement l'acide chlorhydrique (HCl), qui va ioniser progressivement les sels pour déplacer leur K_D en faveur cette fois de la phase mobile.

Les acides et bases peuvent jouer indifféremment le rôle de reteneur ou de déplaceur en fonction de la nature des analytes à séparer et du mode de pompage choisi. Néanmoins, leur caractère lipo- ou hydrosoluble doit être adapté à la phase dans laquelle ils se trouvent.

Un certain nombre de bases et d'acides sont classiquement utilisés en pHZR :

- bases fortes hydrophiles : bases minérales comme l'ammoniaque ($\text{NH}_3 \text{aq.}$) ;
- bases fortes liposolubles : bases organiques comme la TEA ;
- acides forts hydrophiles : acides minéraux comme l'HCl, ou organiques comme l'acide méthane sulfonique (MSA) ;
- acides forts liposolubles : acides organiques, l'acide trifluoroacétique (TFA).

Le mode de pompage doit être choisi en tenant compte de la stabilité des analytes sous forme neutre ou salifiée, mais également du traitement des fractions obtenues. En utilisant le mode

ascendant, les fractions sont obtenues en solution dans la phase organique facilement évaporable. Dans le cas des alcaloïdes, si la forme salifiée est la plus stable, c'est le mode descendant qui sera privilégié.

I.4.3.3.2 Formation du train isotachique

I.4.3.3.2.1 Cas d'un seul analyte

Pour comprendre la formation du train isotachique en pHZR, prenons l'exemple d'un analyte basique faible. La Figure 27 illustre les interactions intervenant dans la formation du train isotachique.

Au début du procédé, l'analyte se trouve en phase stationnaire organique sous forme neutre (position 1 sur la figure) maintenu par le reteneur, ici une base liposoluble. Lors de l'addition du déplaceur, un acide hydrosoluble, le reteneur ayant la plus grande différence de pKa avec le déplaceur, il est neutralisé en premier. Du fait de son isotherme de partage non linéaire convexe, le reteneur va alors former un front neutre au sein de la colonne.

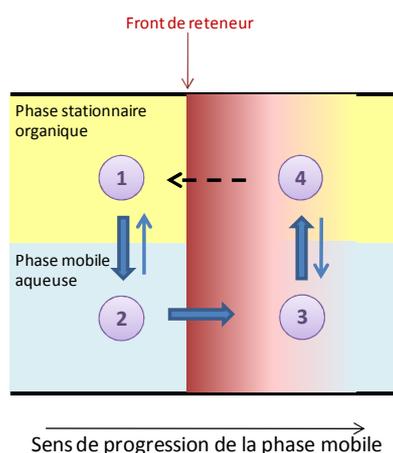


Figure 27 : Illustration des processus mis en jeu lors de la formation du train isotachique en pHZR, les analytes sont représentés par les numéros cerclés

Une fois ce front formé, les analytes vont à leur tour être mobilisés en phase mobile (position 2) par le déplaceur qui les salifie. Les analytes progressent alors dans la colonne à la même vitesse que la phase mobile, vitesse qui est supérieure à celle du train isotachique.

Les analytes vont alors "passer" le front de reteneur et arriver ainsi dans une portion de colonne non neutralisée (position 3). Ils vont être alors neutralisés par le reteneur, et réextraits en phase stationnaire (position 4).⁶⁰

Le front va alors progresser dans la colonne, doubler les analytes (position 1) qui vont de nouveau entrer en contact avec le déplaceur et passer en phase mobile (position 2) etc.

Le front de reteneur peut être assimilé au front "actif" des phases stationnaire et mobile : la phase stationnaire contient du reteneur non neutralisé en aval de ce front et la phase mobile du

déplaceur "actif" en amont de cette limite. Ce front actif va progresser dans la colonne à une vitesse inférieure au débit de phase mobile, elle est en effet uniquement sous la dépendance du ratio stœchiométrique déplaceur/reteneur.

1.4.3.3.2.2 Cas de plusieurs analytes

Prenons maintenant le cas de plusieurs analytes toujours basiques, ici 3 alcaloïdes (Alc 1, Alc 2, Alc 3) avec $pK_{a1} > pK_{a2} > pK_{a3}$.

Les interactions précédemment décrites pour un analyte avec le couple reteneur/déplaceur sont également valables. Ainsi chaque analyte va jouer le rôle de reteneur pour l'analyte qui le suit, et de déplaceur pour celui qui le précède, les analytes étant ordonnés en fonction de leurs constantes d'acidité respectives et de leur hydrophobicité, qui vont intervenir dans la sélectivité du procédé.

1.4.3.3.2.2.1 Notion de constante d'acidité apparente

En pHZR, la sélectivité va prendre en compte à la fois la constante de distribution K_D des analytes et leur pK_a .^{58,60} Pour comprendre ce phénomène, il faut considérer le comportement d'un analyte ionisable dans un système biphasique, moyennant quelques approximations.

Dans le cas d'un analyte basique B, soumis à l'équilibre acido-basique suivant en milieu biphasique :



On pose comme postulat que la forme neutre se partage majoritairement en phase organique et que la forme sel se partage majoritairement en phase aqueuse. La constante de distribution et d'acidité peuvent alors s'écrire :

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{[BH^+]} \quad K_D = \frac{[\overline{B}]}{[B]} \quad (\text{Équation 14})$$

Avec $[\overline{B}]$: concentration en analyte B en phase stationnaire (ici organique)

La loi de conservation de masse appliquée à un volume défini, par exemple une cellule de colonne, comprenant de la phase stationnaire et de la phase mobile, peut alors s'écrire :

$$n = V_{org}[\overline{B}] + V_{aq}([B] + [BH^+]) \quad (\text{Équation 15})$$

Avec V_{org} : volume de phase organique

V_{aq} : volume de phase aqueuse

En posant $\frac{V_{org}}{V_{aq}} = v$, et $c = \frac{n}{V_{aq}}$, on peut alors écrire :

$$c = v\overline{[B]} + ([B] + [BH^+]) \quad (\text{Équation 16})$$

$$c = vK_D[B] + [B] + [BH^+] \quad (\text{Équation 17})$$

$$c = [B](1 + vK_D) + [BH^+] \quad (\text{Équation 18})$$

$$c = [BH^+] \left(1 + (1 + vK_D) \frac{K_a}{[H^+]} \right) \quad (\text{Équation 19})$$

Dans l'équation 20, on peut remarquer que la valeur de K_a peut être ramenée à une constante d'acidité apparente K_a' ayant pour valeur $K_a(1 + vK_D)$.

Dans le cas du pHZR, le système est choisi pour que $K_D \gg 1$ et on peut également faire l'approximation que $v \approx 1$, ainsi on obtient:

$$K_a' = K_a K_D \quad (\text{Équation 20})$$

En pHZR, l'ordre d'éluion des analytes va être sous la dépendance de cette constante d'acidité apparente. Lors de la chromatographie, des paliers de pH vont être observés, chacun correspondant aux constantes d'acidité du reteneur et du déplaceur et aux constantes d'acidité apparentes de chacun des analytes.

1.4.3.3.2.2 Organisation du train isotachique

Dans le cas de la séparation de nos 3 alcaloïdes, avec $pK_{a1} > pK_{a2} > pK_{a3}$, en mode descendant (phase mobile aqueuse), différents cas de figure se présentent selon les constantes de distribution des alcaloïdes :

- $K_{a1}K_{D1} < K_{a2}K_{D2} < K_{a3}K_{D3}$:

C'est le cas le plus fréquemment rencontré, quand les K_D sont voisins et les K_a différents ($K_{a1} < K_{a2} < K_{a3}$), ou quand les alcaloïdes les plus acides (Alc 2 et 3) sont aussi les plus lipophiles ($K_{D1} < K_{D2} < K_{D3}$). Les deux composantes du K_a' vont alors dans le même sens, l'alcaloïde 1, le plus basique et le plus hydrophile, est ainsi élué en premier, suivi de l'alcaloïde 2 et puis de l'alcaloïde 3. Ce cas est illustré Figure 28. Les alcaloïdes sont alors élués dans l'ordre croissant des pKa dans un éluat de pH décroissant.

- $K_{a1}K_{D1} = K_{a2}K_{D2} = K_{a3}K_{D3}$:

Ce cas de figure se produit quand les différences entre les constantes d'acidités sont compensées par les différences de partages des analytes. Dans ce cas, tous les alcaloïdes sont co-élués et aucune sélectivité n'est obtenue. Il est évident que cette configuration est à éviter dans le cadre d'une purification.

- $K_{a1}K_{D1} > K_{a2}K_{D2} > K_{a3}K_{D3}$:

Dans certains cas, les alcaloïdes 2 et 3 peuvent présenter une hydrophilie supérieure à celle de l'alcaloïde 1 et 2 respectivement, dans une proportion telle que l'ordre des K_a ' s'en retrouve inversé. Ainsi, les alcaloïdes sont élués dans l'ordre décroissant des pK_a dans un éluat de pH décroissant.

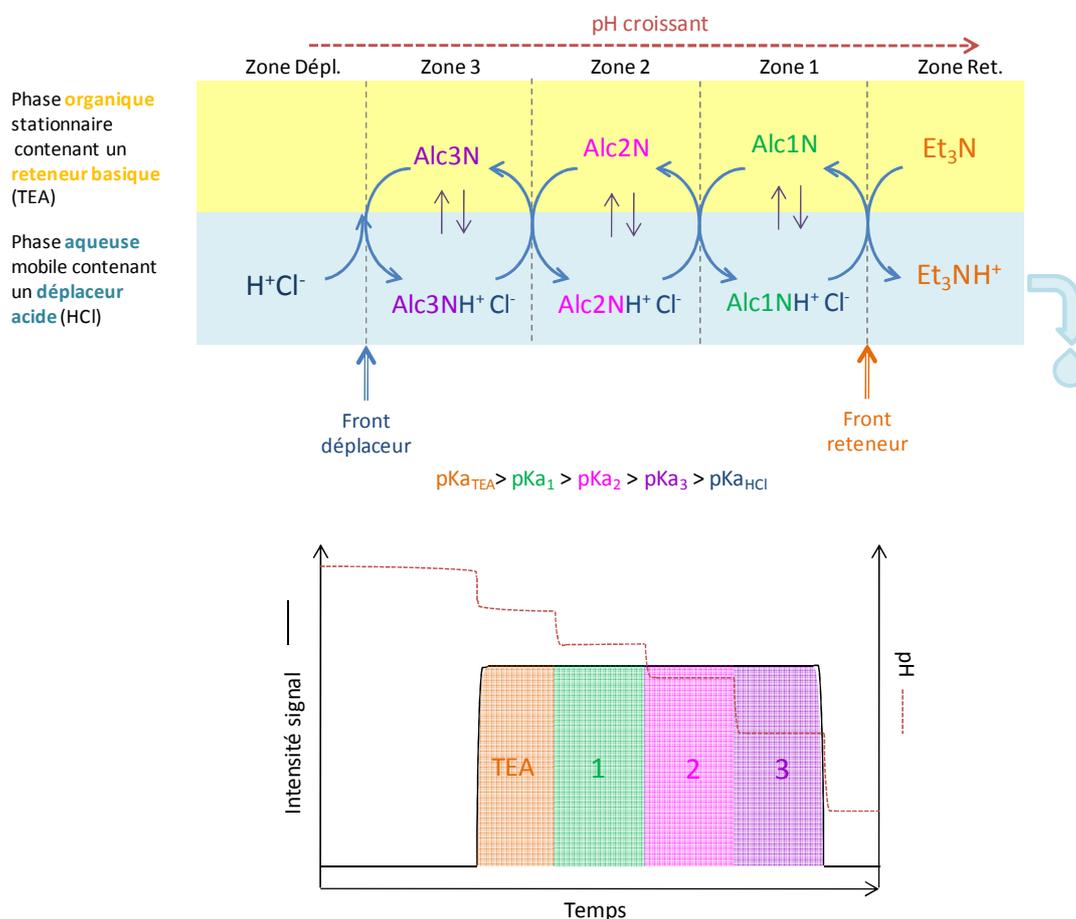


Figure 28 : Illustration du train isotachique au sein d'une colonne, lors de la séparation de 3 alcaloïdes en pHZR en mode descendant ; et allure du chromatogramme et pH de l'éluat associé

1.4.3.3.2.2.3 Rôle du système biphasique de solvants

Il apparaît dans le paragraphe précédent que la constante de distribution des analytes influe ainsi grandement sur la formation du train isotachique, et sur l'ordre d'émergence des composés. Ceci est d'autant plus important dans le cas où les différences de K_a ' sont nulles entre les différents analytes.

Dans ce cas de figure, les analytes sont, nous l'avons vu, co-élus et aucune résolution n'est obtenue. Pour corriger ce problème, la seule option possible est de modifier les constantes de distribution des analytes et donc de jouer sur le système biphasique de solvants.^{28, 72}

Une stratégie de sélection d'un système de solvants adapté a ainsi été développée par le Dr. Maciuk.²⁸ Il s'agit de trouver un système de solvants permettant d'obtenir un K_D de 1 pour les analytes concernés, et de diminuer de façon radicale la proportion de solvant pont pour obtenir un système adapté au pHZR.

Cette stratégie a été utilisée avec succès pour la purification de galanthamine à partir d'un extrait de *Leucojum aestivum*, en employant un système de la gamme acétone avec une proportion très faible en acétone (gamme pauvre en acétone).²⁸ Toribio *et al.* ont également utilisé cette stratégie pour la purification des huperzines A et B, en modifiant cette fois un système issu de la gamme Arizona. Ils ont ainsi remplacé le MeOH du système par du propanol, en en diminuant les proportions utilisées, tout en augmentant les volumes de solvants apolaires (heptane et acétate d'éthyle).⁷²

1.4.3.4 Mise en œuvre du pHZR en CPC

La colonne est dans un premier temps remplie avec la phase stationnaire contenant le reteneur à la concentration sélectionnée. Les analytes sont alors introduits dans la colonne dans l'état d'ionisation adapté, l'injectat étant composé majoritairement de phase stationnaire remise en équilibre hydrodynamique par un petit volume de phase mobile pure. Parallèlement à l'entrée des analytes dans la colonne, la phase mobile contenant le déplaceur commence à être pompée, sans phase de lavage préalable avec de la phase mobile pure. La mise en place du front actif et l'organisation du train isotachique laissent en général un temps suffisant pour réaliser ce lavage directement avec la phase mobile contenant le déplaceur.

Après avoir abordé les phénomènes régissant le pHZR, nous allons maintenant passer en revue un éventail d'exemples d'applications générales avant de nous intéresser plus particulièrement à l'application à la purification de peptides.

1.4.3.5 Exemples d'application du pHZR

Le pHZR a déjà été appliqué avec succès à la purification de nombreuses classes de molécules d'intérêt.

1.4.3.5.1 Application à la purification d'alcaloïdes

Les exemples de purifications d'alcaloïdes sont nombreux. Ito *et al.* furent les premiers à décrire une purification d'alcaloïdes utilisant le pHZR. Ils ont ainsi purifié les alcaloïdes isoquinoléiques, powelline (Figure 29) et crinamidine, issus du lys du Natal (*Crinum moorei*, *Amaryllidaceae*), en

utilisant un système binaire à base de méthyl-*ter*-butyléther et d'eau.⁶¹ Peu de temps après, Yang *et al.* ont isolé, dans les mêmes conditions, la matrine (Figure 29) et la sophocarpine, alcaloïdes quinolizidiques, d'un extrait de racines de *Sophora flavescens* Ait, qui est une plante appartenant à la pharmacopée chinoise à visée antihelminthique.⁷³

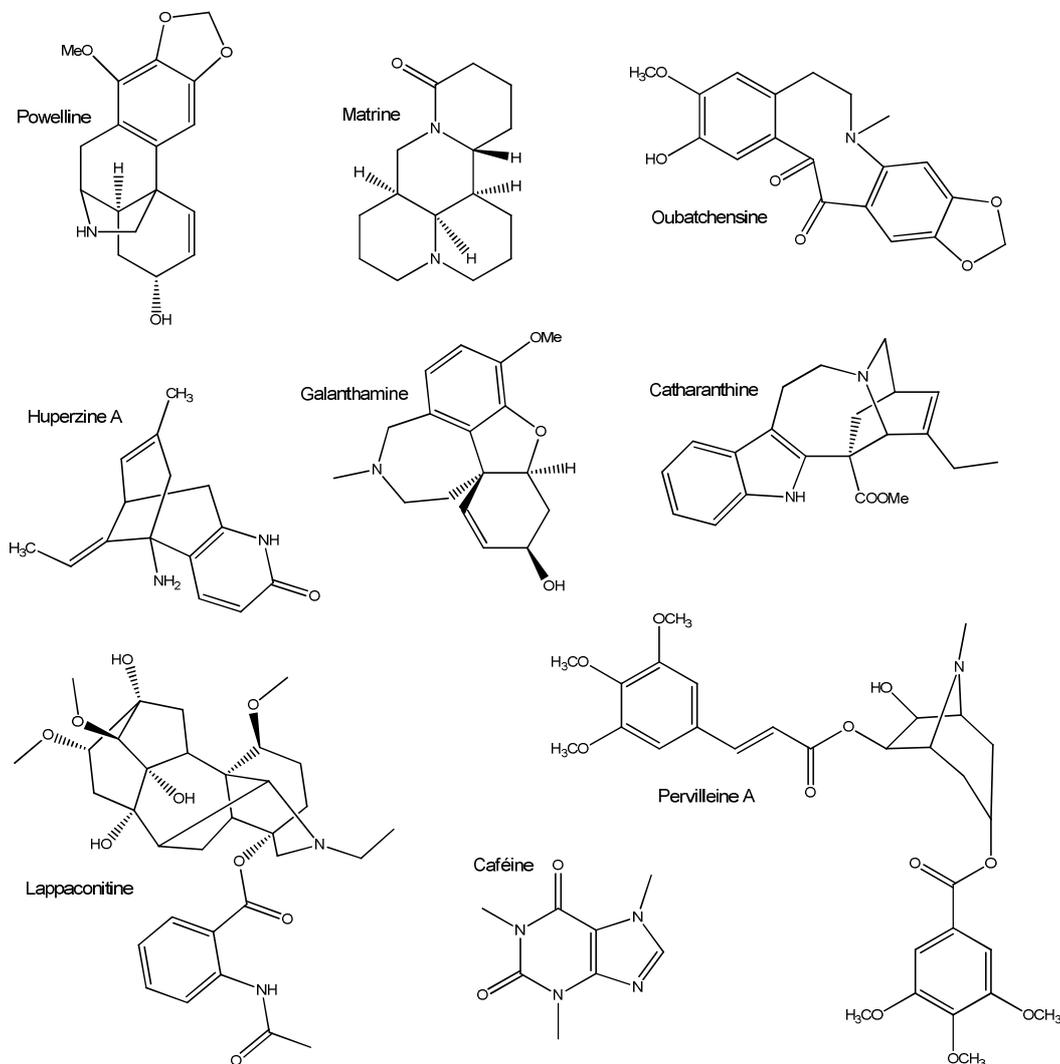


Figure 29 : Structures de différents alcaloïdes purifiés par pHZR

Si ces deux premiers exemples concernent des alcaloïdes de structures relativement proches, le pHZR a été appliqué avec succès à de nombreuses familles d'alcaloïdes : alcaloïdes à noyau tropane (Pervilleine A, B...) issus d'écorces d'*Erythroxylum pervillei* (Figure 29);⁷⁴ bases puriques (caféine et théine) du thé vert (Figure 29);⁷⁵ alcaloïdes indolo-monoterpénique à activité antipaludique (picraline, akuamigine...) issus de *Picralima nitida* (Figure 29);⁷⁶ ou encore des alcaloïdes terpéniques comme la lappaconitine extraite de *Aconitum sinomontanum* Nakai (diterpénoïdes) (Figure 29)^{77, 78} ou des alcaloïdes sesqui-terpéniques à activité anti cholinestérase extraits d'une mousse chinoise *Huperzia serrata* (Figure 29).⁷² Plus récemment, Maurya *et al.* ont isolé des glyco-alcaloïdes stéroïdiques d'une

plante appartenant à la famille des Solanacées,⁷¹ ou encore des composés de type clavine d'*Ipomoea muricata*.⁷⁹

Le pHZR a également permis la découverte de nouvelles molécules, comme ce fut le cas pour l'oubatchensine (Figure 29), nouvel alcaloïde seco-dibenzopyrrocoline issu de *Cryptocarya oubatchensis*.⁸⁰

Certains alcaloïdes d'intérêt thérapeutique furent également purifiés en utilisant ce procédé, on peut ainsi citer les alcaloïdes indoliques (vinblastine, cathranthine...) à visée anti cancéreuse issus de la pervenche de Madagascar (*Catharantus roseus*) ;⁶² mais également la galanthamine, alcaloïde isoquinoléique issu de *Leucojum aestivum*, qui a montré une activité anti-cholinestérase marquée et fut ainsi un des premiers chefs de file dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer.⁸¹

1.4.3.5.2 Application à la purification d'analytes acides

La première séparation d'analytes acides utilisant le pHZR a été rapportée par Denekamp *et al.* Ils ont ainsi purifié deux stéréoisomères de l'acide 1-méthyl-4-méthoxycyclohexancarboxylique en utilisant les différences de pKa existant entre ces isomères.⁸²

L'attention s'est ensuite focalisée sur la purification de colorants alimentaires de synthèse de type hydroxyxanthène présentant un caractère acide comme l'Orange N°5 (Figure 30), le Rouge N°22 etc.⁵⁹ Cette technique s'est avérée si performante qu'elle sert à la préparation de substances témoins utilisées par la Food and Drug Administration (FDA) pour le contrôle de lots de colorants alimentaires.

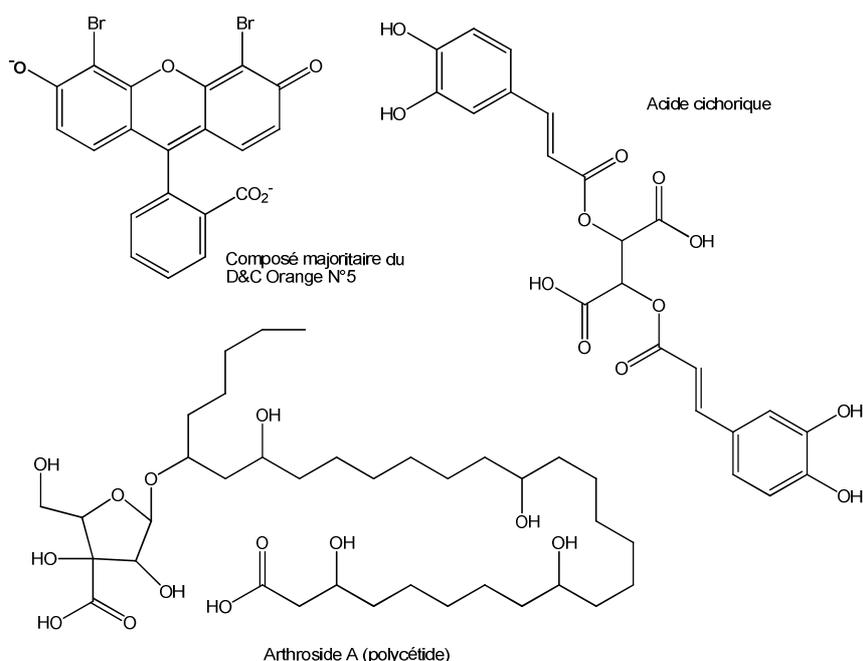


Figure 30 : Exemples de structures de composés acides purifiés par pHZR

Des exemples de purification de molécules issues de sources végétales, ou de milieux fermentaires ont également été rapportés. Ainsi, l'acide cichorique (Figure 30), un dérivé de l'acide caféique, a été isolé à partir d'un extrait préfractionné d'*Echinacea Purpurea* en utilisant un système à base de MtBE, d'acétonitrile (CH_3CN) et d'eau.⁸³ Des isomères d'acide caféoylquinique ont également été séparés et isolés à partir d'un extrait brut de *Flos Ionicerae*.⁸⁴

Harris et Dai ont réalisé la purification d'analogues de macrolides et de saphorines à visée antifongique à partir de milieux de fermentation d'*Arthisinium sp.* Ils ont ainsi isolé trois nouveaux polycétides glycosylés qui ont démontrés un potentiel antifongique intéressant (Figure 30).⁸⁵

Des composés de types anthraquinones ont également été isolés à partir d'un extrait de *Rheum palmatum L.*, plante appartenant à la pharmacopée chinoise.⁸⁶

Récemment, Weiz *et al.* ont réalisé la purification d'un mélange synthétique d'acides dicarboxyliques *cis* et *trans*, de nature variée (cyclohexanique fumarique etc.). Les acides sont élués dans un ordre dépendant de leurs acidités relatives, néanmoins les mécanismes générant la sélectivité semblent basés en plus sur la formation d'homo- ou d'hétérodimères au sein de la phase stationnaire. Ces dimères d'acides ont une stabilité supérieure au monomère en solution dans la phase stationnaire. Le déplaceur va entraîner la rupture du dimère et le passage en phase mobile des monomères, ce qui se visualise sur la figure ci-dessous.

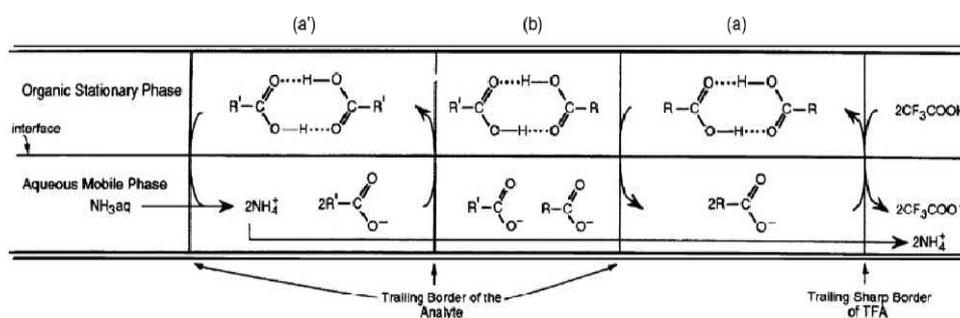


Figure 31 : Schématisation du train isotachique formé lors de la purification d'acides dicarboxyliques par pHZR.⁸⁷

Dans ce cas la quantité de reteneur introduite joue un rôle prépondérant dans la séparation. En effet, lorsque la concentration de ce dernier est trop basse des zones de mélanges correspondant à la formation d'hétérodimères entre deux diacides voisins apparaissent. Ces hétérodimères sont dissociés par le déplaceur, chaque diacide rejoignant ensuite la zone de déplacement qui lui est propre. Si la concentration en reteneur est insuffisante, le temps de séjour des diacides dans la colonne est insuffisant pour permettre la dissociation et la répartition des diacides dans leur zone respective, et ainsi des zones de mélanges émergent de la colonne.⁸⁷ Cette découverte ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension du procédé.

1.4.3.5.3 Application du pHZR aux séparations chirales

Dans certains cas, des sélecteurs chiraux présentant un caractère acide ou basique ont été utilisés comme "reteneur" pour réaliser la séparation d'énantiomères.

Ito *et al.* ont été, là encore, les premiers à décrire ce procédé. Pour séparer des mélanges racémiques d'acides aminés dinitrobenzylés (DNP), ils ont utilisé comme reteneur le *N*-dodecanoyl-*L*-proline-3,5-diméthylanilide (DPA) (Figure 32) qui a été additionné à la phase stationnaire en plus d'un reteneur classique, le TFA.^{26, 88} Plusieurs grammes de mélanges ont pu être ainsi traités en un seul passage.

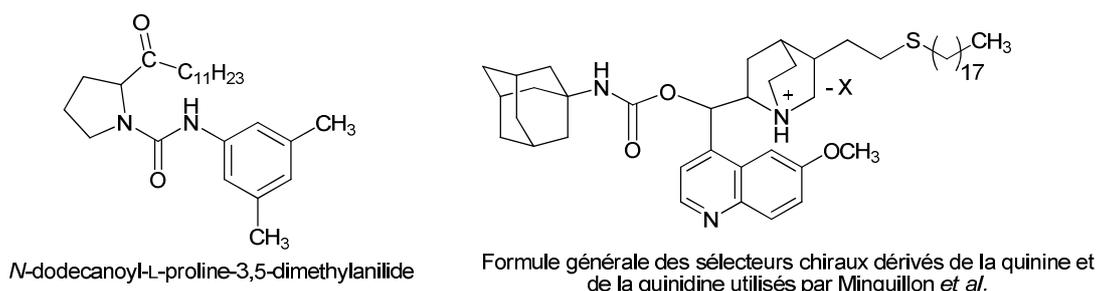


Figure 32 : Structure du DPA et des sélecteurs chiraux dérivés de la quinidine et de la quinine.

Minguillon *et al.* ont utilisé un sélecteur chiral dérivant d'alkaloïdes de type quinine ou quinidine (Figure 32), là encore pour séparer des mélanges racémiques d'acides aminés DNP-protégés.⁸⁹

Le pHZR a démontré son efficacité dans des domaines variés, que ce soit la chimie de synthèse, la préparation de colorants, ou encore l'isolement et la purification de nouvelles molécules issues de ressources naturelles. Il s'est montré aussi particulièrement performant pour la purification d'acides aminés et de peptides.

1.4.3.6 Application à la purification de peptides

Dans ce paragraphe nous verrons dans un premier temps l'application du procédé classique de pHZR à la purification de peptides avant de voir l'utilisation d'un procédé modifié, qualifié de chromatographie d'affinité (à ne pas assimiler à la chromatographie d'affinité utilisant un support solide greffé avec un antigène ou un anticorps).

1.4.3.6.1 Application du pHZR classique

De nombreuses publications traitent de la purification de peptides par pHZR.^{31, 64, 65} Ito *et al.* ont développé différents systèmes utilisables pour la purification de peptides de tailles variables. Ces systèmes sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Systèmes biphasiques développés par Ito pour la purification de peptides protégés par pHZR

Peptides injectés ^a	Système biphasique de solvants	Reteneur	Déplaceur
Z-dipeptides	MtBE/CH ₃ CN/eau (2:2:3, v/v)	TFA	NH ₃ aq.
Z-tripeptides	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau (2:2:1:5, v/v)	TFA	NH ₃ aq.
Dipeptides-βNA	MtBE/CH ₃ CN/eau (2:2:3, v/v)	TEA	HCl

^a Z : Benzyloxycarbonyl ; βNA : beta naphtylamide

Ces systèmes de pHZR classiques ne sont applicables qu'aux peptides dont une des deux extrémités a été protégée par un groupement protecteur. Les peptides libres sont de nature amphotère, c'est-à-dire qu'ils vont être porteurs d'une charge positive ou négative à pH basique et à pH acide, ce qui implique que leur caractère hydrophile sera toujours trop élevé pour permettre leur passage en phase organique. En bloquant une des extrémités terminales par un groupement protecteur, le caractère amphotère des peptides est masqué, et ces derniers se comportent alors comme de simples espèces ionisables. Dans la majorité des cas c'est l'extrémité N-terminale qui est protégée.

Le pHZR classique ne peut donc s'appliquer qu'à des peptides non naturels issus de la synthèse, et laisse donc vacant le champ d'application concernant les peptides naturels. Pour pallier cet état de fait, Ito et ses collaborateurs ont développé un procédé de pHZR modifié qu'ils ont baptisé chromatographie d'affinité.⁹⁰

1.4.3.6.2 La chromatographie d'affinité

Ce procédé est une version modifiée du protocole classique de pHZR, qui s'adresse aux molécules ionisables particulièrement hydrophiles, ou aux composés hydrophiles et amphotères *i.e.* les peptides libres.

Du fait de leur hydrophilie prononcée, ces composés se partagent très mal dans les systèmes biphasiques, même les plus polaires, avec une très nette tendance à rester uniquement en phase aqueuse. Pour corriger ce problème, un ligand lipophile porteur d'une charge est introduit dans le système. Ce ligand peut être un acide aminé modifié (*N*-dodecanoyl-*L*-proline-3,5-diméthylanilide ou DPA) ou encore un acide organique (acide bis-(2-éthylhexyl)phosphorique ou DEHPA).

Ce ligand est solubilisé en phase stationnaire en plus du reteneur acide ou basique. Les analytes sont ensuite introduits dans la colonne sous forme ionisée, le pH étant choisi pour que ces derniers portent une charge opposée à celle portée par le ligand. Les analytes vont alors former une paire d'ions avec le ligand et ainsi être extraits en phase stationnaire.⁹⁰

Les phénomènes régissant le déplacement des analytes en phase mobile restent néanmoins obscurs. Le déplaceur va rompre la paire d'ions formée en modifiant l'état d'ionisation du ligand qui passe alors sous forme neutre et/ou des analytes qui sont alors chargés de façon identique au ligand.

Dans les deux cas, les analytes vont alors repasser en phase mobile aqueuse du fait de leur très grande hydrophilie et/ou par effet d'une répulsion électronique.

Comme dans le pHZR classique, les analytes vont émerger de la colonne en fonction de leur acidité relative.⁹⁰

Ce procédé fut appliqué à différents types d'analytes comme certaines catécholamines,⁹⁰ des dérivés sulfatés de colorants,⁹¹ et surtout à des peptides naturels.^{31, 90}

Les peptides purifiés par ce procédé sont de taille variable allant de simples dipeptides à l'insuline bovine constituée d'une cinquantaine d'acides aminés.³¹

Tableau 5 : Conditions opératoires utilisées pour la purification de peptides en chromatographie d'affinité.

Echantillon	Système biphasique de solvants	Reteneur	Déplaceur	Ligand
Dipeptides	Phase organique du système MtBE/CH ₃ CN/HCl 50mM (4:1:5, v/v) (SP)	TEA (20 mM)	HCl (20 mM)	DEHPA
	Phase aqueuse du système MtBE/CH ₃ CN/eau (4:1:5, v/v) (MP)			
Dipeptides	Phase organique du système MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/50mM HCl (2:2:1:5, v/v) (SP)	TEA (20 mM)	HCl (20 mM)	DEHPA
	Phase aqueuse du système MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau (2:2:1:5, v/v) (MP)			
Bacitracine	Phase organique du système MtBE/CH ₃ CN/HCl 50 mM (4:1:5, v/v) (SP)	TEA (20 mM)	HCl (20 mM)	DEHPA
	Phase aqueuse du système MtBE/CH ₃ CN/eau (4:1:5, v/v) (MP)			
Insuline	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau (2:2:1:5, v/v)	TEA (20 mM)	HCl (20 mM)	DEHPA
11-mer	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/10 mM HCl (2:2:1:5, v/v)	CH ₃ O ₂ NH ₄ ⁺ (0,45%)	HCl (10 mM)	DEHPA
25-mer	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/10 mM HCl (2:2:1:5, v/v)	CH ₃ O ₂ NH ₄ ⁺ (0,45%)	HCl (10 mM)	DEHPA

SP : phase stationnaire ; MP : phase mobile; CH₃O₂NH₄⁺ : acétate d'ammonium

La mise en œuvre du procédé est parfois fastidieuse, avec l'utilisation de deux systèmes biphasiques différents pour la préparation des phases stationnaire et mobile dans le cas des dipeptides.

Cette chromatographie dite "d'affinité" est également parfois qualifiée de pHZR par paire d'ions et constitue un protocole hybride entre le pHZR et le procédé que nous allons voir maintenant : le mode échange d'ions.

I.4.4 Le mode échange d'ions

Le pHZR peut s'appréhender comme un procédé mettant en jeu l'échange d'espèces ioniques mais sans échangeur proprement dit. Le mode de développement que nous allons voir maintenant est un procédé classique d'échange d'ions.

1.4.4.1 Introduction

Ce procédé d'échange d'ions en milieu liquide/liquide et en particulier en CPC, est relativement récent. Le premier exemple décrit date de 1998. Chevlot *et al.* ont réalisé la purification de polysaccharides sulfatés (des fucanes) en utilisant une amine lipophile (la LA2) protonnée en milieu acide.^{92, 93}

Notre laboratoire a également largement contribué au développement de cette technique. En particulier, l'échange d'ions fort fut mis au point au sein de notre équipe.^{28, 94}

A l'origine, ce procédé découle de l'observation de deux procédés existants : la catalyse par transfert de phases et l'extraction liquide/liquide par paires d'ions. Dans les deux cas des paires d'ions sont utilisées pour réaliser le transfert d'analytes d'une phase aqueuse vers une phase organique (ou inversement), et ce en ne mettant en jeu qu'un seul plateau théorique (en réacteur ou en ampoule à décanter).

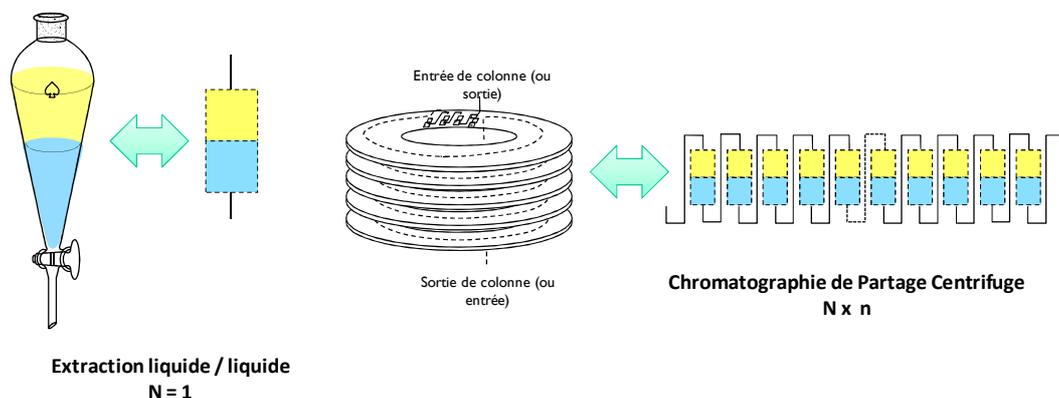


Figure 33 : Comparaison de l'extraction liquide/liquide en ampoule à décanter et du procédé en CPC en termes de plateaux théoriques.

Une colonne de CPC, nous l'avons déjà mentionné, peut se voir comme la mise en série d'un millier d'ampoules à décanter, gravées dans des disques. Finalement la transposition en CPC s'apparente à la mise en récurrence d'un procédé d'extraction par paire d'ions. C'est cette mise en récurrence qui va engendrer une augmentation du nombre de transferts et donc le passage d'un procédé d'extraction discret à un procédé chromatographique véritable.

1.4.4.2 Divergences avec le pHZR

La différence fondamentale entre le pHZR et l'échange d'ions proprement dit réside dans le fait qu'en échange d'ions l'état d'ionisation des analytes ne varie pas au cours du processus chromatographique. L'échange d'ions s'applique donc aux molécules ionisables, même amphotères, et surtout aux molécules ioniques. Les constantes d'acidité des analytes n'interviennent pas dans le procédé. Le champ d'application est donc plus vaste en comparaison à celui du pHZR classique.

Deux pré-requis sont néanmoins nécessaires à l'utilisation du mode échange d'ions : les analytes doivent présenter une fonction ionisée et être extractibles par l'échangeur choisi. La première condition peut être facilement remplie en ajustant le pH des phases utilisées. L'extractibilité des analytes par l'échangeur est essentiellement sous la dépendance du système biphasique de solvants et de l'extractant choisis. Le choix de systèmes étant quasiment illimité, ce pré-requis n'est donc pas limitant.

Une autre différence de taille est que ce n'est plus la nature des analytes à purifier qui conditionne le choix du mode de pompage mais la nature de l'échangeur utilisé. Ce dernier étant généralement liposoluble, le mode descendant sera utilisé de façon prépondérante, si l'on exclut les solvants chlorés.

1.4.4.3 Principe général

Le principe de la chromatographie de déplacement par échange d'ions est basé sur les affinités relatives des espèces pour l'échangeur et/ou la stabilité relative des paires d'ions formées ainsi que sur la balance hydrophobe/hydrophile (K_D) des espèces.

1.4.4.3.1 Espèces mises en jeu

Le développement par échange d'ions en chromatographie fait intervenir différentes espèces : une espèce échangeuse d'ion en phase stationnaire, un reteneur, un ou des déplaceurs en phase mobile et bien évidemment des analytes.

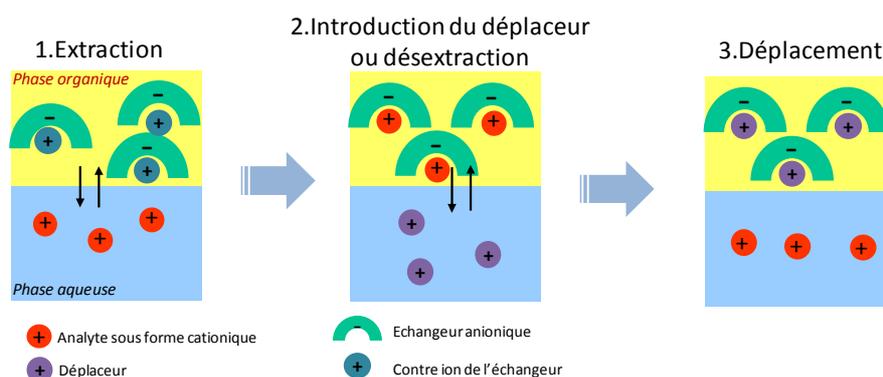


Figure 34 : Schéma général du procédé par échange d'ions : espèces mises en jeu et étapes principales.

1.4.4.3.1.1 L'échangeur

Un échangeur est une espèce lipophile qui comme le reteneur, le déplaceur et les analytes va être porteuse d'une fonction ionisée ou ionisable.

Contrairement à la chromatographie par échange d'ions sur support solide, le nombre de molécules utilisables comme échangeur d'ions est limité de façon drastique par les propriétés

physico-chimiques requises en chromatographie liquide/liquide : en plus de porter une charge, ils doivent présenter un caractère lipophile important, permettant leur solubilisation dans une phase organique non-miscible à l'eau, propriétés le plus souvent incompatibles.

Ces propriétés sont celles qui sont généralement recherchées pour les tensioactifs anioniques ou cationiques, ainsi que pour la plupart des catalyseurs de transfert de phase. Les échangeurs seront donc choisis parmi ces familles de molécules. Néanmoins, la nature tensio-active de ces échangeurs n'est pas anodine pour le procédé, et dans certaines conditions de concentration, de débit... de véritables émulsions peuvent être générées nuisant ainsi au procédé chromatographique.

Une distinction supplémentaire sera faite entre les échangeurs qui seront neutralisés durant le procédé, échangeurs dit faibles et ceux demeurant ionique, échangeur dits forts. Nous verrons par la suite que cette différence de nature influe considérablement sur les mécanismes mis en jeu lors des séparations.

I.4.4.3.1.2 Le reteneur

Le reteneur est ici le contre ion du déplaceur qui assure l'électroneutralité au sein de la phase stationnaire. Cet ion doit avoir l'affinité la plus faible pour l'échangeur pour être facilement remplacé par les analytes. Il est donc évident que le reteneur portera une charge de même nature, anionique ou cationique, que les composés à purifier.

I.4.4.3.1.3 Le déplaceur

Le déplaceur est une espèce ionique introduite cette fois dans la phase mobile. C'est en général un ion de petite taille présentant parfois un caractère lipophile, comme les iodures par exemple. Le déplaceur présente l'affinité la plus forte pour l'échangeur, et doit former avec ce dernier une paire d'ions la plus stable et la plus hydrophobe possible. La nature du déplaceur sera différente selon que l'échangeur est fort ou faible (voir paragraphes suivants).

Le déplaceur est introduit sous forme de paire d'ions avec un contre ion qui assure l'électroneutralité de la phase mobile. Ce contre ion neutralisera les analytes lors de leur relargage en phase aqueuse. Il peut donc être choisi pour que les analytes sortent sous la forme d'un sel donné: chlorhydrate, fumarate, citrate, sodique, potassique etc.

I.4.4.3.1.4 Les analytes

Les analytes sont donc des espèces ioniques ou ionisées qui vont être introduites dans la colonne en phase mobile. Les analytes vont présenter des affinités intermédiaires pour l'échangeur, c'est-à-dire supérieures à celle du reteneur mais inférieures à celle du déplaceur. En effet, la paire

d'ions formée entre les analytes et l'échangeur ne doit pas être trop stable, sous peine de ne pouvoir les mobiliser en phase aqueuse avec le déplaceur.

La réussite du procédé va donc reposer sur le choix d'un trio de partenaires : l'échangeur, les analytes et le déplaceur.

1.4.4.3.2 Formation du train isotachique

Le procédé repose, comme tout procédé chromatographique en mode déplacement, sur la compétition des espèces entre elles. Ici les analytes vont entrer en concurrence pour l'échangeur, introduit en quantité fixée dans la phase stationnaire.

Pour illustrer le procédé, prenons l'exemple de trois analytes (analyte 1, analyte 2, analyte 3) ayant des affinités pour l'échangeur suivant l'ordre Aff. 1>Aff. 2>Aff. 3 (Figure 35).

L'analyte 1, présentant l'affinité la plus forte, sera extrait en premier pour former une paire d'ions avec l'échangeur, repoussant ainsi les autres analytes en phase mobile qui vont alors progresser dans la colonne jusqu'à arriver dans une portion de colonne où l'échangeur est en paire d'ions avec le reteneur. L'analyte 2 va alors être extrait et à son tour repousser l'analyte 3 en phase mobile qui va alors progresser dans la colonne etc. (étape 1 Figure 35).

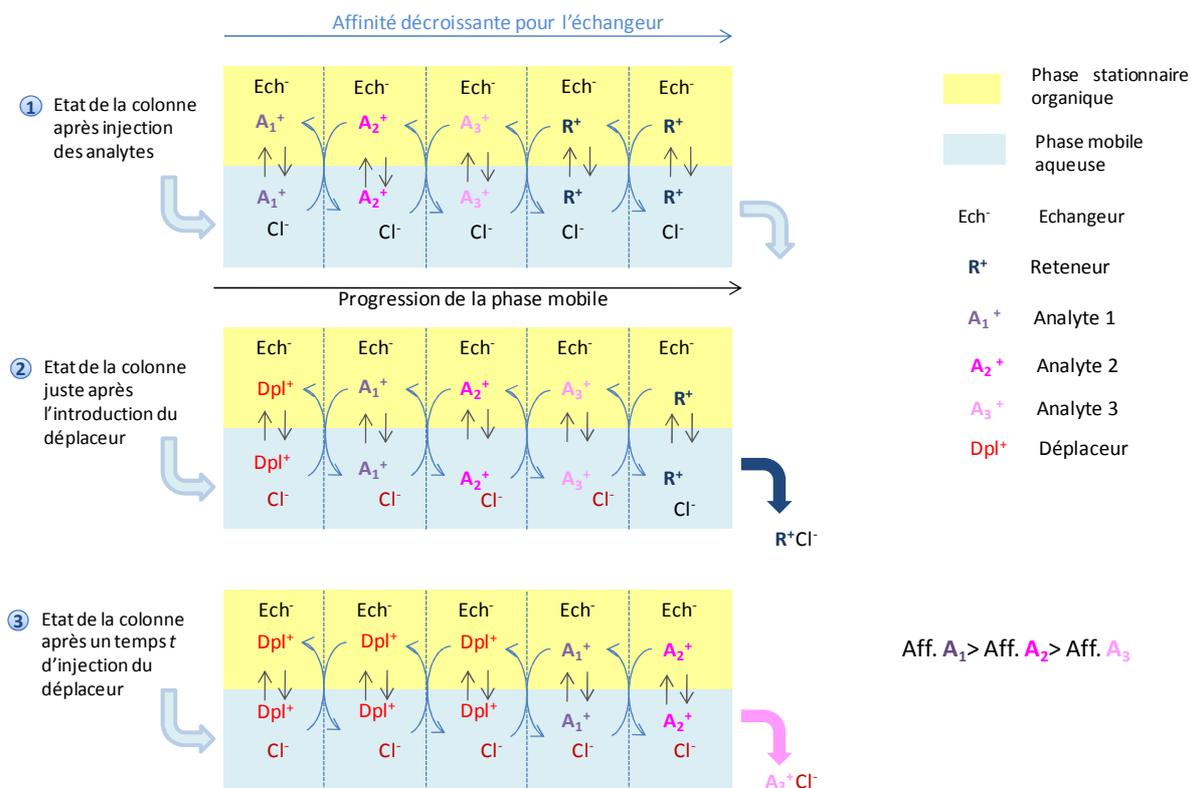


Figure 35: Illustration du principe général du mode échange d'ions utilisé pour la séparation d'analytes cationiques.

Il en résulte une pré-organisation des analytes dans la colonne dès leur introduction, selon leur affinité relative pour l'échangeur, le plus affin restant en tête de colonne. Bien entendu le caractère lipophile de la paire d'ions formée est également à prendre en compte. Pour pouvoir accéder à l'échangeur, les analytes doivent de plus présenter une lipophilie suffisante pour permettre leur passage en phase stationnaire organique. Ainsi les analytes ayant une hydrophilie trop prononcée seront difficilement extraits par l'échangeur.

Le déplaceur, présentant l'affinité la plus forte pour l'échangeur, va alors prendre la place de l'analyte 1, qui est alors déplacé en phase mobile. En progressant dans la colonne, ce dernier arrive dans une portion de colonne contenant une paire d'ions échangeur/analyte 2 moins affin, qui est alors déplacé en phase aqueuse par l'analyte 1. En progressant, l'analyte 2 va déplacer l'analyte 3, qui va progresser dans la colonne, arriver dans une zone contenant la paire échangeur/reteneur et alors repasser en phase organique (étape 2 Figure 35).

En apportant en continu le déplaceur, c'est-à-dire en continuant de pomper la phase mobile, ces étapes d'extraction/déplacement vont se répéter et aboutir ainsi à l'élution des analytes de la colonne (étape 3 Figure 35). Ces derniers seront élués dans l'ordre croissant des affinités pour l'échangeur.

En réalité, les phénomènes mis en jeu vont différer selon la nature de l'échangeur utilisé. On distingue alors deux types de procédés : l'échange d'ions faible et l'échange d'ions fort.

1.4.4.4 Echange d'ions faible

Le mode échange d'ions faible se rapproche du procédé de pHZR modifié décrit par Ito.⁹⁰ L'entité échangeuse d'ions est ici ionisable et c'est sur cette propriété que le procédé va jouer.

1.4.4.4.1 Nature des échangeurs utilisés

L'échangeur d'ions est un échangeur ionisable, c'est-à-dire dont l'état de charge dépend du pH des phases. Il sera donc important d'ajuster et de contrôler le pH de celles-ci tout au long du processus chromatographique.

Parmi les échangeurs faibles déjà utilisés, nous pouvons citer :

- l'Amberlite LA2® (N-lauryl-N-trialkylméthylamine) : échangeur cationique faible.
C'est une amine secondaire lipophile, qui fut utilisée pour la séparation des fucanes⁹² mais aussi de certaines héparines.⁶⁸ La forme échangeuse est la forme ammonium quaternaire.
- le DEHPA (acide bis-(2-éthylhexyl)phosphorique) : échangeur anionique faible.

C'est un acide phosphorique organique classiquement utilisé pour la purification de lanthanides et de métaux alcalins.⁹⁵⁻⁹⁷ Il fut également utilisé pour la purification de peptides comme ligand dans une variante du pHZR.³¹ La forme échangeuse est ici la forme phosphate.

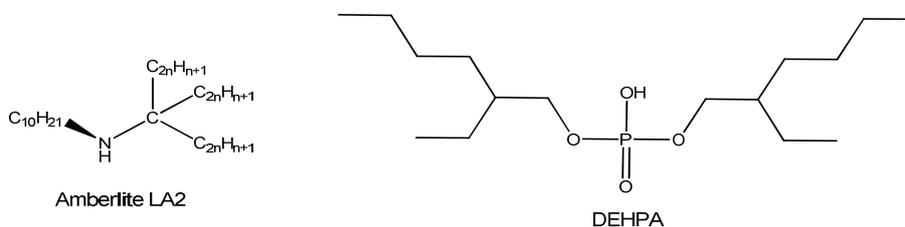


Figure 36 : Structures des échangeurs faibles les plus couramment utilisés.

1.4.4.4.2 Mécanismes de séparation mis en jeu

Dans le cas d'un développement en mode échange d'ions faible, l'échangeur est, comme nous venons de le mentionner, une espèce ionisable. Cet échangeur est introduit en phase stationnaire sous sa forme active *i.e.* ionisée. Les analytes à séparer sont alors introduits en phase mobile aqueuse, également sous forme ionisée. Ces derniers sont alors extraits en phase stationnaire par formation de paires d'ions avec l'échangeur.

Une phase mobile contenant le déplaceur est ensuite introduite dans la colonne. Le déplaceur est ici une espèce capable de neutraliser l'échangeur, c'est-à-dire une base ou un acide en fonction du caractère acide ou basique de l'échangeur.

L'échangeur passant sous forme neutre, il est "désactivé" et les analytes repassent alors en phase mobile aqueuse du fait de leur caractère fortement hydrophile. Ils vont ainsi progresser dans la colonne jusqu'à un segment où l'échangeur n'a pas encore été neutralisé, entrer en compétition les uns avec les autres pour l'échangeur et être extraits en phase stationnaire etc.

On peut ainsi en conclure qu'en échange d'ions faible, la force motrice est donc la neutralisation *i.e.* la désactivation de l'échangeur. Pour expliciter ce phénomène, prenons le cas de l'acide phosphorique organique DEHPA (DEHPH), et d'un analyte cationique (Analyte⁺). Le déplacement de l'analyte peut se décrire selon l'équation suivante, les espèces barrées étant celles présentes en phase stationnaire :



avec AH : espèce acide neutralisant l'échangeur

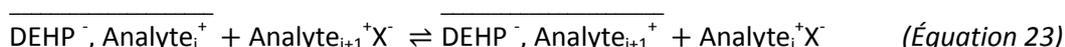
La paire d'ions échangeur/analyte peut dans ce cas être assimilée à une base faible neutralisée par un acide fort.

Tout comme nous l'avons décrit pour le pHZR, il existe là aussi un front de reteneur marquant la limite active des phases stationnaire et mobile. Le segment situé juste en amont du front de reteneur va être le lieu où analyte et reteneur, le contre-ion initial de l'échangeur, par exemple l'ion sodium (Na^+), vont entrer en compétition pour l'échangeur. Ceci peut se traduire par l'équilibre :



avec X^- contre-ion de l'analyte

De la même manière, il va exister entre chaque analyte un équilibre d'association de chacun d'eux avec l'échangeur, tel que :



Une constante d'équilibre peut être décrite pour chaque paire d'analytes voisins (ou analyte/reteneur):

$$K_i^{i+1} = \frac{[\overline{\text{DEHP}^- , \text{Analyte}_{i+1}^+}][\text{Analyte}_i^+]}{[\overline{\text{DEHP}^- , \text{Analyte}_i^+}][\text{Analyte}_{i+1}^+]} \quad (\text{Équation 24})$$

Les différences existant entre ces constantes d'équilibre vont être à l'origine de la sélectivité du procédé chromatographique.

Nous l'avons mentionné précédemment, l'échangeur ionisé peut être considéré comme une base faible. En présence d'un analyte, la constante d'acidité de l'échangeur est déduite de l'équilibre:



Nous pouvons ainsi en déduire une "constante d'acidité" apparente de la paire d'ions :

$$K'_a = \frac{[\overline{\text{DEHP}^- , \text{Analyte}^+}][\text{H}^+]}{[\overline{\text{DEHPH}}][\text{Analyte}^+]} \quad (\text{Équation 26})$$

Cette constante d'acidité apparente peut aussi se concevoir comme une constante exprimant la stabilité de la paire d'ions, puisqu'une constante d'acidité reflète la facilité de dissociation de l'espèce neutre. La paire d'ion la plus stable sera celle qui sera rompue en dernier par le déplaceur.

I.4.4.5 Echange d'ions fort

Ce mode particulier a été développé au sein de notre laboratoire au début des années 2000, et a d'ores et déjà montré son efficacité pour la purification de métabolites secondaires de natures variées, que ce soit à l'échelle du laboratoire comme à l'échelle pilote.

I.4.4.5.1 Echangeurs utilisés

L'échangeur est ici une molécule ionique. Il sera maintenu sous cette forme tout au long du processus chromatographique. Les mécanismes décrits pour l'échange d'ions faible ne s'appliquent donc pas.

Parmi les échangeurs forts précédemment utilisés, nous pouvons distinguer :

- le chlorure de benzalkonium : échangeur cationique fort.

C'est un mélange de molécules homologues de chaînes de longueur comprise entre C_8 et C_{18} , porteur d'un groupement ammonium quaternaire. Il fut utilisé pour le développement du procédé validé par la séparation d'acides hydroxycinnamiques,⁹⁴ mais également pour la purification de l'acide rosmarinique.⁹⁸

- l'Aliquat 336® (chlorure de trioctylammonium) : échangeur cationique fort.

C'est également un ammonium quaternaire lipophile classiquement utilisé en catalyse par transfert de phase. Il fut également utilisé pour la purification de glucosinolates, à l'échelle de laboratoire et à l'échelle pilote.^{67, 99}

- l'AOT (sel sodique de bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate) : échangeur anionique fort.

Il s'agit d'un tensio-actif porteur d'une fonction sulfate. L'AOT est classiquement utilisé dans l'extraction par formation de micelles inverses.⁷ Il fut également utilisé en échange d'ions pour la purification d'anthocyanes.⁶⁶

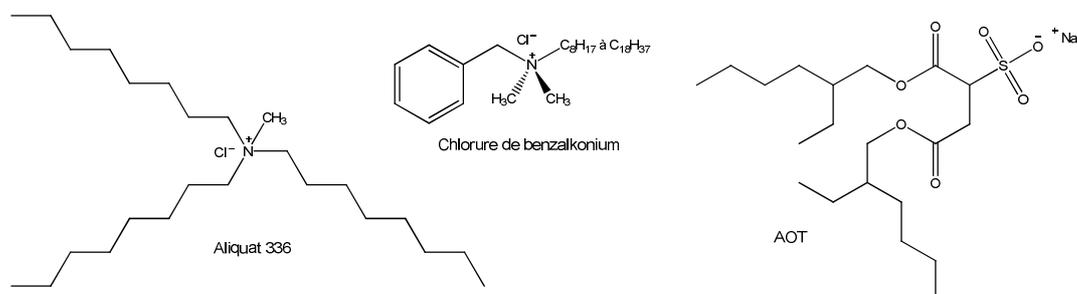
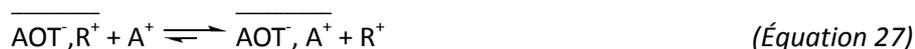


Figure 37: Structure des différents échangeurs forts cités.

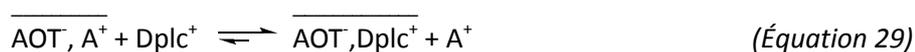
I.4.4.5.2 Mécanismes de séparation mis en jeu

Dans le cas de l'échange d'ions fort, l'échangeur étant en permanence ionisé, la force motrice du procédé sera cette fois liée directement à l'appariement de l'analyte avec l'échangeur.

La sélectivité du procédé dépendra uniquement de l'affinité relative des analytes pour l'échangeur. Pour illustrer les équilibres mis en jeu, prenons là encore le cas d'un échangeur anionique ici l'AOT, noté AOT^- , et d'analytes cationiques (A_i^+), avec un reteneur noté R^+ et un déplaceur noté Dplc^+ . Les équilibres entre un analyte et le reteneur d'une part, et analyte et déplaceur d'autre part, peuvent être décrits comme suit :



avec comme constante d'équilibre : $K_{\text{A}^+/\text{R}^+} = \frac{[\overline{\text{AOT}^-, \text{A}^+}][\text{R}^+]}{[\overline{\text{AOT}^-, \text{R}^+}][\text{A}^+]}$ (Équation 28)



avec la constante d'équilibre associée : $K_{\text{Dplc}^+/\text{A}^+} = \frac{[\overline{\text{AOT}^-, \text{Dplc}^+}][\text{A}^+]}{[\overline{\text{AOT}^-, \text{A}^+}][\text{Dplc}^+]}$ (Équation 30)

Ces constantes d'équilibre peuvent s'appréhender comme des constantes de sélectivité, si le déplaceur est défini comme référence.

Ainsi, échangeur, reteneur et analytes sont choisis tels que $K_{\text{Dplc}^+/\text{R}^+} < K_{\text{Dplc}^+/\text{A}^+} < K_{\text{Dplc}^+/\text{Dplc}^+}$, c'est-à-dire pour que l'ordre de stabilité des paires d'ions soit le suivant : $\overline{\text{AOT}^-, \text{R}^+} < \overline{\text{AOT}^-, \text{A}^+} < \overline{\text{AOT}^-, \text{Dplc}^+}$.

Si plusieurs analytes sont présents, ceux-ci vont entrer en compétition pour l'échangeur et ainsi l'analyte formant la paire d'ions la plus stable sera retenu en phase stationnaire en premier.

Les mécanismes mis en jeu sont en réalité beaucoup plus complexes, et le modèle décrit précédemment prend en compte certaines simplifications :

- l'échangeur et les paires d'ions formées sont considérés comme présents en phase stationnaire uniquement ;
- le reteneur ainsi que le contre ion des analytes sont considérés comme ions spectateurs ;
- les analytes libres ne sont présents qu'en phase mobile.

Un logiciel de simulation du procédé, CpcSim, a été développé au sein de notre équipe avec le Dr Jean-Marc Nuzillard, lors des travaux de doctorat d'Alexandre Maciuk, en collaboration avec le Dr Trébuchet (INRIA).²⁸ Le modèle mathématique développé dans cette application est complexe et a comme particularité de combiner deux approches différentes pour la résolution de systèmes

d'équations polynomiales : l'approche itérative, qui permet de trouver un ensemble de solutions après application d'approximations successives et l'approche polynômiale, qui consiste en la résolution algébrique du système d'équations. Ce logiciel permet la visualisation graphique du déroulement et *in fine* du résultat d'une séparation se déroulant dans les conditions expérimentales choisies par l'opérateur.

En conclusion, la distinction entre les procédés par échange d'ions fort et faible réside essentiellement dans la nature de l'échangeur qui va influencer sur les mécanismes de déplacement mis en jeu. Néanmoins, les derniers travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'envisager cette distinction selon un autre angle : un échangeur *a priori* classé faible, peut être impliqué dans des mécanismes d'échanges d'ions fort si le déplaceur utilisé est un ion et non pas une espèce acido-basique. La distinction entre échange fort et faible serait alors fonction cette fois-ci de la nature du déplaceur et non plus la nature de l'échangeur.

1.4.4.6 Influence de l'échangeur sur le système biphasique de solvants

Le mode échange d'ions, nous l'avons vu, présente comme particularité de nécessiter l'ajout d'une espèce échangeuse d'ions au sein de la phase stationnaire, c'est-à-dire au sein du système biphasique de solvants. Nous l'avons vu précédemment, dans ces systèmes, les deux phases sont en équilibre thermodynamique. L'addition d'un composé externe, *i.e.* l'échangeur, en quantité parfois très importante va générer des modifications de cet état d'équilibre. L'étude de l'influence de l'échangeur sur le système biphasique de solvants est donc un pré-requis au développement d'une méthodologie utilisant le mode échange d'ions.

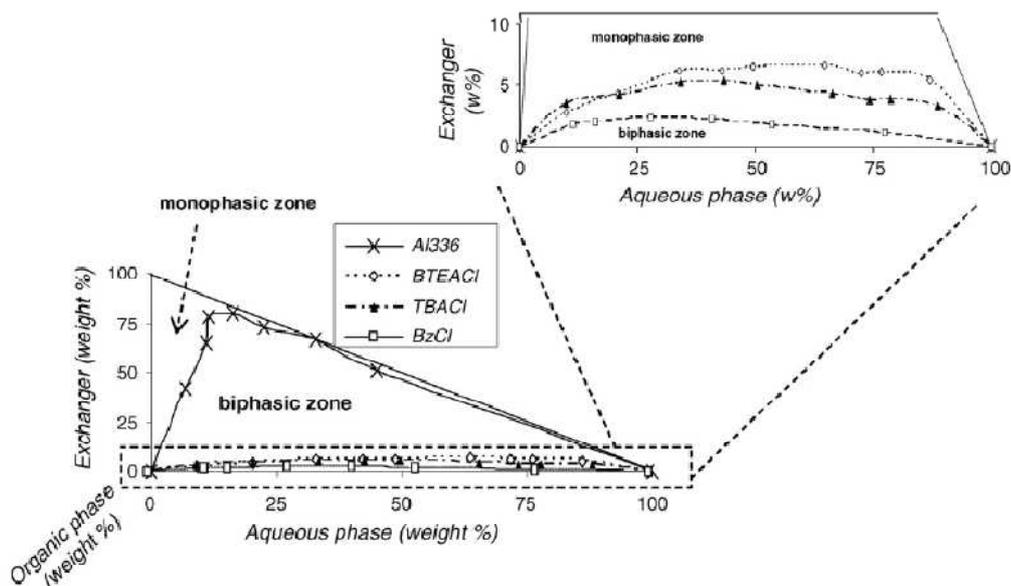


Figure 38 : Pseudodiagrammes ternaires échangeur/phase organique/phase aqueuse du système AcOEt/*n*-BuOH/eau (4:1:5, v/v) avec divers échangeurs : l'Aliquat 336 (Al336), chlorure de benzyltriéthylammonium (BTEACl), chlorure de tétrabutylammonium (BTACl), chlorure de benzalkonium (BzCl).⁶⁷

L'influence de l'échangeur sur la stabilité du système biphasique peut s'apprécier par la construction d'un pseudodiagramme ternaire (échangeur/phase organique/phase aqueuse), par analogie avec les diagrammes ternaires utilisés pour décrire les systèmes de solvants.⁵⁶ Un échangeur sera considéré comme peu déstabilisant si la zone biphasique du système (échangeur/phase organique/phase aqueuse) est conséquente, ce qui est primordial pour réaliser une transposition d'échelle positive. L'effet peu déstabilisant de l'échangeur va autoriser de plus l'introduction de quantités plus importantes de ce dernier, et ainsi augmenter la capacité du procédé.

Des travaux menés antérieurement au laboratoire ont montré que l'effet déstabilisant de l'échangeur peut être très important et abaisser drastiquement la zone biphasique du système. Il a ainsi été démontré que l'impact de l'ajout de divers échangeurs sur la stabilité du système acétate d'éthyle/*n*-BuOH/eau était très variable d'un échangeur à un autre. Après essais de différents échangeurs, il s'est avéré que l'Aliquat 336® avait l'impact minimal sur la stabilité du système de solvants. Ce dernier a donc été sélectionné pour réaliser la purification des glucosinolates.⁶⁷

1.4.4.7 Mise en œuvre en CPC

La colonne est dans un premier temps remplie de phase stationnaire liquide contenant l'échangeur à une concentration donnée, en équilibre avec le reteneur. La phase mobile "pure" est alors pompée au travers de cette phase stationnaire, parallèlement à l'injection de l'échantillon. Les analytes à séparer vont alors progresser dans la colonne et interagir avec les molécules d'échangeur et de reteneur, et ainsi être extraits en phase organique en fonction de leur constante d'association avec l'échangeur. C'est durant cette étape que s'organise le train isotachique : les analytes sont pré-organisés dans la phase stationnaire en fonction de leur affinité relative pour l'échangeur. Ceci est parfaitement illustré par la Figure 39.

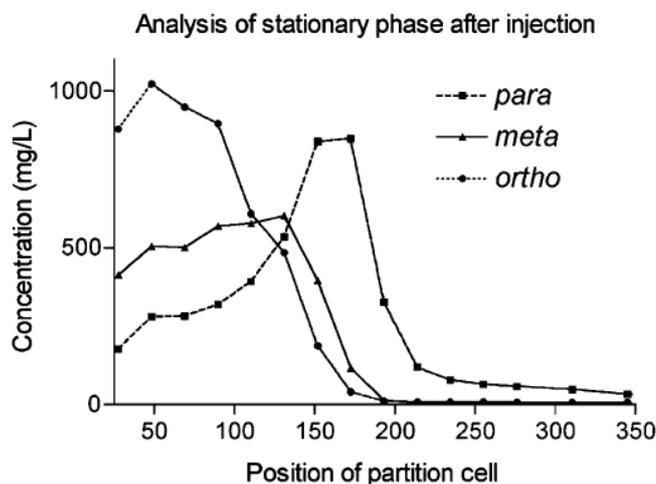


Figure 39 : Teneur en analytes des cellules après l'injection d'un échantillon de 3×25 mg des isomères de l'acide hydroxycinnamique (ortho, méta, para). La concentration maximale (2460 g/ml) correspondant à la concentration en échangeur est mentionnée par une ligne pointillée.⁹⁴

Après une phase de lavage permettant l'élimination des composés non retenus (*i.e.* impuretés), durant laquelle est pompée de la phase mobile sans déplaceur, intervient la phase de déplacement proprement dite. La phase mobile contenant le déplaceur est alors introduite dans la colonne. Les analytes vont alors être progressivement déplacés en phase mobile et "élués". L'ordre d'émergence des analytes est essentiellement fonction de leurs constantes d'association respectives avec l'échangeur.

1.4.4.8 Champ d'application du mode échange d'ions

Ce mode de développement en CPC étant relativement récent, un nombre restreint de publications est disponible au jour d'aujourd'hui, par rapport au nombre de références décrivant des séparations utilisant le pHZR.

La plupart des travaux décrits utilisent un échangeur cationique faible (LA2) ou fort (chlorure de benzalkonium, Aliquat 336) (Tableau 6). La première purification utilisant le mode échange d'ions faible en chromatographie liquide/liquide fut décrite par Chevolot *et al.* Il s'agissait de fractionner un extrait complexe résultant de la dépolymérisation partielle de fucanes. Les fucanes sont des polymères de fucose porteurs de groupements sulfatés, et donc anioniques. La séparation des différents composés présents a été réalisée en utilisant un système binaire à base de MéthylisoButylCétone (MiBK) et d'eau avec la résine échangeuse LA2.^{92,93}

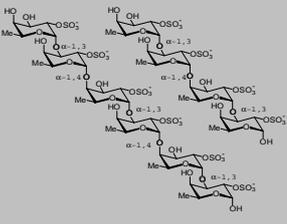
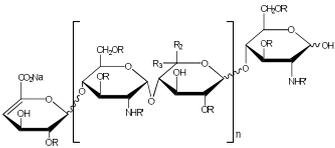
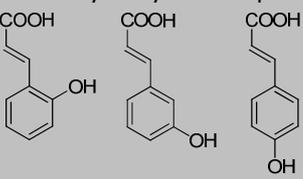
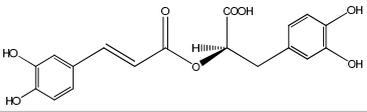
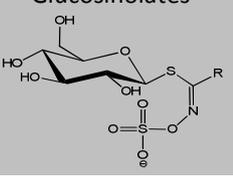
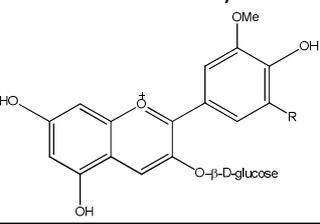
Intes *et al.* ont quant à eux utilisé le même échangeur pour réaliser la purification d'autres polymères de sucres sulfatés : des héparines de bas poids moléculaire (HBPM).⁶⁸

Maciuk *et al.* ont décrit pour la première fois l'utilisation d'un échangeur fort : le chlorure de benzalkonium.⁹⁴ Ces travaux ont porté sur la mise au point du procédé en étudiant un mélange modèle d'acides hydroxycinnamique (ortho, para, méta) (Tableau 6). Ce procédé, une fois mis au point, a été appliqué à la purification de l'acide rosmarinique (Tableau 6) à partir de surnageant de cultures cellulaires de lavande *Lavandula vera*.⁹⁸ Là encore l'échangeur utilisé était le chlorure de benzalkonium (BnzCl). Au cours de ces travaux est apparue pour la première fois la notion de pseudodiagramme ternaire pour l'étude du potentiel déstabilisant de l'échangeur.⁹⁸

D'autres métabolites secondaires, les glucosinolates, ont été purifiés à partir de divers extraits de graines de plantes appartenant à l'ordre des Brassicales, comme la moutarde blanche, le chou fleur ou encore la papaye, par Toribio *et al.*^{67,100} L'échangeur utilisé dans ce cas est l'Aliquat 336 avec un système biphasique à base d'acétate d'éthyle, de butanol et d'eau. La transposition à l'échelle pilote du procédé fut réalisée avec succès sur un appareil CPC pilote dont la colonne a une capacité volumique de 5 litres, soit 25 fois plus que la colonne utilisée pour la mise au point du procédé. Ainsi,

à partir d'un extrait titrant environ 15% en glucosinolate, 60 grammes de sinalbine ont été isolés en trois heures.⁹⁹

Tableau 6 : Récapitulatif des différentes molécules purifiées par échange d'ions en CPC.

Molécules purifiées	Système de solvants	Echangeur	Déplaceur	Référence
<p>Fucanes</p> 	MiBK/eau (1:1,v/v)	LA2	NaOH	92, 93
<p>HBPM</p> 	MiBK/eau (1:1,v/v)	LA2	NaOH	68
<p>Acides hydroxycinnamiques</p> 	CHCl ₃ / <i>n</i> -BuOH/eau (4,5: 1: 4,5, v/v)	BnzCl	Nal	94
<p>Acide rosmarinique</p> 	CHCl ₃ / <i>n</i> -BuOH/eau (4,5: 1: 4,5, v/v)	BnzCl	Nal	98
<p>Glucosinolates</p> 	AcOEt/ <i>n</i> -BuOH/eau (3:2:5, v/v)	Al336	Nal	67, 99
<p>Anthocyanes</p>  <p>R = OMe Malvidin 3-glucosyl R = OH peonidin 3-glucosyl</p>	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/Eau 0,1% TFA (2,5: 2,5: 5, v/v)	AOT	TBASH	66

Un seul exemple d'utilisation d'un échangeur anionique fort a été rapporté jusqu'à ce jour. Toribio *et al.* ont réalisé la purification de pigments végétaux, les anthocyanes, en utilisant cette fois l'AOT comme échangeur et l'hydrogénosulfate de tétrabutylammonium (TBASH) comme déplaceur.⁶⁶

Ce mode de développement est encore sous utilisé, il peut en effet s'appliquer à de nombreuses classes de molécules d'intérêts, telles que les peptides comme nous allons le voir dans la partie suivante

Références bibliographiques

1. Sewald, N.; Jakubke, H.-D., *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH: Weinheim, **2002**.
2. Creighton, T. E., *Proteins: structures and molecular properties*. W.H. Freeman and Company: New York, **1984**.
3. Han, C.; Chen, J.; Liu, J.; Lee, F. S.-C.; Wang, X., Isolation and purification of Pseudostellarin B (cyclic peptide) from *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax by high-speed counter-current chromatography. *Talanta* **2007**, *71* (2), 801-805.
4. Crimmins, D. L., Strong cation-exchange high-performance liquid chromatography as a versatile tool for the characterization and purification of peptides. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *352* (1-3), 21-30.
5. Bouhallab, S.; Henry, G.; Boschetti, E., Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A* **1996**, *724* (1-2), 137-145.
6. *Ion exchange chromatography: Principles and methods*. AA ed.; Amersham Biosciences: **2001**.
7. Gu, T., Liquid Liquid Partitioning Methods for Bioseparations. In *Handbook of Bioseparations*, Academic Press: New York, **2000**; Vol. 2, pp 329-364.
8. Yu, H.; Ito, Y., Preparative Separation of Proteins Using Centrifugal Precipitation Chromatography Based on Solubility in Ammonium Sulfate Solution. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* **2004**, *34*, 1-12.
9. Dardel de, F., Echange d'ions : Principes de Base. *Techniques de l'ingénieur* **1998**.
10. Ito, Y.; Wilson, I. D., Countercurrent Liquid Chromatography. In *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press: Oxford, **2000**; pp 573-583.
11. Ito, Y., Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1065* (2), 145-168.
12. Foucault, A. P.; Chevolut, L., Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A* **1998**, *808* (1-2), 3-22.

13. Cao, X.; Hu, G.; Huo, L.; Zhu, X.; Li, T.; Powell, J.; Ito, Y., Stationary phase retention and preliminary application of a spiral disk assembly designed for high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1188* (2), 164-170.
14. Foucault, A. P., Chapter 4 Centrifugal partition chromatography: the story of a company. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Berthod, A., Ed. Elsevier: **2002**; Vol. 38, pp 85-113.
15. van Buel, M. J.; van Halsema, F. E. D.; van der Wielen, L. A. M.; Luyben, K. C. A. M., Flow regimes in centrifugal partition chromatography. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: **1998**; Vol. 44, pp 1356-1362.
16. Foucault, A. J. P., *Centrifugal Partition Chromatography*. Marcel Dekker: New York, **1995**; Vol. 68.
17. Renault, J.-H.; Nuzillard, J.-M.; Intes, O.; Maciuk, A.; Berthod, A., Chapter 3 Solvent systems. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2002**; Vol. 38, pp 49-83.
18. Conway, W. D., *Countercurrent Chromatography. Apparatus. Theory & Applications*. VCH Publishers: Weinheim, **1990**.
19. Berthod, A., Chapter 1 Fundamentals of countercurrent chromatography. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2002**; Vol. 38, pp 1-20.
20. Berthod, A.; Carda-Broch, S., Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1037* (1-2), 3-14.
21. Sutherland, I. A.; Berthod, A., Chapter 6 Liquid stationary phase retention and resolution in hydrodynamic CCC. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2002**; Vol. Volume 38, pp 159-176.
22. Berthod, A.; Brown, L.; Leitão, G. G.; Leitão, S. G., Chapter 2 Operating a countercurrent chromatography machine. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier: **2002**; Vol. 38, pp 21-47.
23. Ito, Y.; Ma, Y., Effects of Coriolis Force on Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **1998**, *21* (1), 1 - 17.
24. Marchal, L.; Foucault, A.; Patisier, G.; Rosant, J. M.; Legrand, J., Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *869* (1-2), 339-352.

25. Sutherland, I. A., Recent progress on the industrial scale-up of counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151* (1-2), 6-13.
26. Ma, Y.; Ito, Y.; Foucault, A., Resolution of gram quantities of racemates by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, *704* (1), 75-81.
27. Pauli, G. F.; Pro, S. M.; Friesen, J. B., Countercurrent Separation of Natural Products. *Journal of Natural Products* **2008**, *71* (8), 1489-1508.
28. Maciuk, A. Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : Application à l'isolement de substances naturelles. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, **2005**.
29. Oliveira, R. R.; Leitao, G. G.; Moraes, M. C. C.; Kaplan, M. A. C.; Lopes, D.; Carauta, J. P. P., Gradient Elution for Triterpene Separation from *Cecropia lyratiloba* Miquel by HSCCC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *28* (12), 1985 - 1992.
30. Audo, G.; Couillard, F.; Sumner, N.; Crowther, M.; Fernandes, K., Purification d'un mélange synthétique par CPC en mode gradient. Comparaison avec la CLHP préparative. *Spectra Analyse* **2009**, *267*, 33-36.
31. Ma, Y.; Ito, Y., Recent advances in peptide separation by countercurrent chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *352* (1-3), 411-427.
32. Knight, M.; Fagarasan, M. O.; Takahashi, K.; Geblaoui, A. Z.; Ma, Y.; Ito, Y., Separation and purification of peptides by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, *702* (1-2), 207-214.
33. Knight, M., Separations of hydrophobic synthetic peptides in counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151* (1-2), 148-152.
34. Knight, M.; Ito, Y.; Finn, T. M., Separation of Peptides by Spiral Countercurrent Chromatography. In *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Taylor & Francis Ltd: **2008**; Vol. 31, pp 471-481.
35. Bensch, M.; Selbach, B.; Hubbuch, J., High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science* **2007**, *62* (7), 2011-2021.

36. Shinomiya, K.; Yanagidaira, K.; Ito, Y., New small-scale cross-axis coil planet centrifuge: The design of the apparatus and its application to counter-current chromatographic separation of proteins with aqueous-aqueous polymer phase systems. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1104* (1-2), 245-255.
37. Guan, Y. H.; Bourton, E. C.; Hewitson, P.; Sutherland, I. A.; Fisher, D., The importance of column design for protein separation using aqueous two-phase systems on J-type countercurrent chromatography. *Separation and Purification Technology* **2009**, *65* (1), 79-85.
38. Shibusawa, Y.; Misu, N.; Shindo, H.; Ito, Y., Purification of lactic acid dehydrogenase from crude bovine heart extract by pH-peak focusing counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B* **2002**, *776* (2), 183-189.
39. Shibusawa, Y.; Eriguchi, Y.; Ito, Y., Purification of lactic acid dehydrogenase from bovine heart crude extract by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1997**, *696* (1), 25-31.
40. Platis, D.; Labrou, N. E., Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128* (1-2), 114-124.
41. Sutherland, I. A.; Audo, G.; Bourton, E.; Couillard, F.; Fisher, D.; Garrard, I.; Hewitson, P.; Intes, O., Rapid linear scale-up of a protein separation by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1190* (1-2), 57-62.
42. Guan, Y. H.; Fisher, D.; Sutherland, I. A., Protein separation using toroidal columns by type-J synchronous counter-current chromatography towards preparative separation. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (21), 3525-3530.
43. Delannay, E.; Toribio, A.; Boudesocque, L.; Nuzillard, J.-M.; Zèches-Hanrot, M.; Dardennes, E.; Le Dour, G.; Sapi, J.; Renault, J.-H., Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1127* (1-2), 45-51.
44. Rubio, N.; Ignatova, S.; Minguillón, C.; Sutherland, I. A., Multiple dual-mode countercurrent chromatography applied to chiral separations using a (S)-naproxen derivative as chiral selector. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (48), 8505-8511.

45. Roullier, C.; Chollet-Krugler, M.; Bernard, A.; Boustie, J., Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography as an efficient method for the purification of a mycosporine from a crude methanolic extract of *Lichina pygmaea*. *Journal of Chromatography B* **2009**, *877* (22), 2067-2073.
46. Berthod, A.; Friesen, J. B.; Inui, T.; Pauli, G. F., Elution-Extrusion Countercurrent Chromatography: Theory and Concepts in Metabolic Analysis. *Analytical Chemistry* **2007**, *79* (9), 3371-3382.
47. Berthod, A.; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S., Elution-Extrusion Countercurrent Chromatography. Use of the Liquid Nature of the Stationary Phase To Extend the Hydrophobicity Window. *Analytical Chemistry* **2003**, *75* (21), 5886-5894.
48. Berthod, A.; Hassoun, M.; Harris, G., Using the Liquid Nature of the Stationary Phase: The Elution-Extrusion Method. In *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Taylor & Francis Ltd: **2005**; Vol. 28, pp 1851-1866.
49. König, C. S.; Sutherland, I. A., Numerical model for the investigation of dual-flow in a spiral counter-current chromatography column. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151* (1-2), 131-135.
50. Berthod, A.; Hassoun, M., Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography: IV. The cocurrent CCC method. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116* (1-2), 143-148.
51. Sajonz, P., Frontal Chromatography. *Encyclopedia of Chromatography: Second Edition* **2005**, 671 - 673.
52. Szepesy, L.; Sebestyén, Z.; Fehér, I.; Nagy, Z., Continuous liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1975**, *108* (2), 285-297.
53. Ströhlein, G.; Aumann, L.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., A continuous, counter-current multi-column chromatographic process incorporating modifier gradients for ternary separations. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1126* (1-2), 338-346.
54. Couillard, F.; Foucault, A.; Durand, D. Separating components of a charge in liquid solution comprises entraining components at different speeds by lighter and heavier solvent, using chromatography column. **2005**.

55. van den Heuvel, R.; Mathews, B.; Dubant, S.; Sutherland, I., Continuous counter-current extraction on an industrial sample using dual-flow counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (19), 4147-4153.
56. Toribio, A. Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, **2007**.
57. Guiochon, G., Csaba Horváth and preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1079* (1-2), 7-23.
58. Ito, Y.; Ma, Y., pH-Zone-refining counter-current chromatography: a displacement mode applied to separation of dinitrophenyl amino acids. *Journal of Chromatography A* **1994**, *672* (1-2), 101-108.
59. Weisz, A.; Scher, A. L.; Shinomiya, K.; Fales, H. M.; Ito, Y., A New Preparative-Scale Purification Technique: pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 704-708.
60. Ito, Y.; Ma, Y., pH-zone-refining countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A* **1996**, *753* (1), 1-36.
61. Ma, Y.; Ito, Y.; Sokolosky, E.; Fales, H. M., Separation of alkaloids by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, *685* (2), 259-262.
62. Renault, J.-H.; Nuzillard, J.-M.; Le Crouérou, G.; Thépenier, P.; Zèches-Hanrot, M.; Le Men-Olivier, L., Isolation of indole alkaloids from *Catharanthus roseus* by centrifugal partition chromatography in the pH-zone refining mode. *Journal of Chromatography A* **1999**, *849* (2), 421-431.
63. Chadwick, L.; Wu, C.; Kinghorn, A., Isolation of Alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis Canadensis* Rhizomes) using pH-Zone Refining Countercurrent Chromatography. In *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Taylor & Francis Ltd: 2001; Vol. 24, p 2445.
64. Ma, Y.; Ito, Y., Separation of peptide derivatives by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, *702* (1-2), 197-206.
65. Ma, Y.; Ito, Y., Peptide separation by pH-zone-refining countercurrent chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, *771* (1-2), 81-88.

66. Toribio, A.; Delannay, E.; Nuzillard, J.-M.; Zèches-Hanrot, M.; Richard, B.; Waffo-Téguo, P.; Renault, J.-H., Large-Scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. In *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine*, Jeandet, P.; Clément, C.; Conreux, Alexandra, Eds. Editions Tec et Doc: Paris, 2007; pp 247-252.
67. Toribio, A.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1170* (1-2), 44-51.
68. Intes, O.; Renault, J.-H.; Siquin, C.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M., Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode. *Journal of Chromatography A* **2001**, *918* (1), 47-57.
69. Cramer, S. M.; Subramanian, G., Recent Advances in the Theory and Practice of Displacement Chromatography. *Separation and Purification Methods* **1990**, *19* (1), 31 - 91.
70. Cahnmann, H. J.; Goncalves, E.; Ito, Y.; Fales, H. M.; Sokoloski, E. A., Synthesis and characterization of N-bromoacetyl-3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Journal of Chromatography A* **1991**, *538* (1), 165-175.
71. Maurya, A.; Gupta, S.; Negi, S.; Srivastava, S. K., pH-Zone-refining centrifugal partition chromatography for preparative isolation and purification of steroidal glycoalkaloids from *Solanum xanthocarpum*. *Journal of Separation Science* **2009**, *32* (18), 3126-3132.
72. Toribio, A.; Delannay, E.; Richard, B.; Plé, K.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Preparative isolation of huperzines A and B from *Huperzia serrata* by displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1140* (1-2), 101-106.
73. Yang, F.; Quan, J.; Zhang, T.; Ito, Y., Preparative separation of alkaloids from the root of *Sophora flavescens* Ait by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1998**, *822* (2), 316-320.
74. Chin, Y.-W.; Jones, W. P.; Waybright, T. J.; McCloud, T. G.; Rasoanaivo, P.; Cragg, G. M.; Cassady, J. M.; Kinghorn, A. D., Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-collection of *Erythroxylum pervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar. *Journal of Natural Products* **2006**, *69* (3), 414-417.

75. Yuan, L. M.; Chen, X. X.; Ai, P.; Qi, S. H.; Li, B. F.; Wang, D.; Miao, L. X.; Liu, Z. F., Preparative Separation of Alkaloids from Green Tea by pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *27* (2), 365 - 369.
76. Okunji, C. O.; Iwu, M. M.; Ito, Y.; Smith, P. L., Preparative Separation of Indole Alkaloids from the Rind of *Picralima nitida* (Stapf) T. Durand & H. Durand by pH-Zone-Refining Countercurrent Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *28* (5), 775 - 783.
77. Yang, F.; Ito, Y., pH-Zone-refining counter-current chromatography of lappaconitine from *Aconitum sinomontanum* Nakai: I. Separation of prepurified extract. *Journal of Chromatography A* **2001**, *923* (1-2), 281-285.
78. Yang, F.; Ito, Y., Preparative separation of lappaconitine, ranaconitine, N-deacetyllappaconitine and N-deacetylranaconitine from crude alkaloids of sample *Aconitum sinomontanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, *943* (2), 219-225.
79. Maurya, A.; Srivastava, S. K., Large-scale separation of clavine alkaloids from *Ipomoea muricata* by pH-zone-refining centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B* **2009**, *877* (18-19), 1732-1736.
80. Toribio, A.; Bonfils, A. I.; Delannay, E.; Prost, E.; Harakat, D.; Henon, E.; Richard, B.; Litaudon, M.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Novel seco-Dibenzopyrrocoline Alkaloid from *Cryptocarya oubatchensis*. *Organic Letters* **2006**, *8* (17), 3825-3828.
81. Renault, J.-H.; Nuzillard, J.-M.; Maciuk, A.; Zèches-Hanrot, M. Use of Centrifugal Partition Chromatography for purifying galanthamine. WO/2006/064105, **2006**.
82. Denekamp, C.; Mandelbaum, A.; Weisz, A.; Ito, Y., Preparative separation of stereoisomeric 1-methyl-4-methoxymethylcyclohexanecarboxylic acids by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, *685* (2), 253-257.
83. Wang, X.; Geng, Y.; Li, F.; Gao, Q.; Shi, X., Preparative separation of cichoric acid from *Echinacea Purpurea* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1103* (1), 166-169.

84. Tong, S.; Yan, J.; Guan, Y.-X., Preparative separation of isomeric caffeoylquinic acids from *Flos Lonicerae* by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1212* (1-2), 48-53.
85. Harris, G.; Dai, P., Application of pH-Zone-Refining CCC to the Isolation of Antifungal Fermentation Products. In *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Taylor & Francis Ltd: **2001**; Vol. 24, p 1775.
86. Tong, S.; Yan, J., Large-scale separation of hydroxyanthraquinones from *Rheum palmatum* L. by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1176* (1-2), 163-168.
87. Weisz, A.; Idina, A.; Ben-Ari, J.; Karni, M.; Mandelbaum, A.; Ito, Y., Preparative separation of isomeric and stereoisomeric dicarboxylic acids by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1151* (1-2), 82-90.
88. Oliveros, L.; Puertolas, P. F.; Minguillon, C.; Camacho-Frias, E.; Foucault, A.; Goffic, F. L., Donor-Acceptor Chiral Centrifugal Partition Chromatography: Complete Resolution of Two Pairs of Amino-Acid Derivatives with a Chiral II Donor Selector. *Journal of Liquid Chromatography* **1994**, *17* (11), 2301 - 2318.
89. Franco, P.; Blanc, J.; Oberleitner, W. R.; Maier, N. M.; Lindner, W.; Minguillon, C., Enantiomer Separation by Countercurrent Chromatography Using Cinchona Alkaloid Derivatives as Chiral Selectors. *Analytical Chemistry* **2002**, *74* (16), 4175-4183.
90. Ma, Y.; Ito, Y., Affinity Countercurrent Chromatography Using a Ligand in the Stationary Phase. *Analytical Chemistry* **1996**, *68* (7), 1207-1211.
91. Weisz, A.; Mazzola, E. P.; Ito, Y., Preparative separation of di- and trisulfonated components of Quinoline Yellow using affinity-ligand pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (19), 4161-4168.
92. Chevolot, L.; Collic-Jouault, S.; Foucault, A.; Ratiskol, J.; Siquin, C., Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1998**, *706* (1), 43-54.

93. Chevolut, L.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S.; Ratiskol, J.; Sinquin, C., Improvement purification of sulfated oligofucan by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *869* (1-2), 353-361.
94. Maciuk, A.; Renault, J.-H.; Margraff, R.; Trebuchet, P.; Zeches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M., Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography. *Analytical Chemistry* **2004**, *76* (21), 6179-6186.
95. Levin, I. S.; Shatalova, A. A.; Azarenko, T. G.; Vorsina, I. A.; Burtovaya-Balakireva, N. A.; Rodina, T. F., Concentration and separation of indium, gallium, thallium, antimony and bismuth by extraction with alkylphosphoric acids. *Talanta* **1967**, *14* (7), 801-808.
96. Wang, T.; Nagaosa, Y., Separation of Calcium (II), Magnesium (II), Strontium (II), and Barium (II) by High Performance Centrifugal Partition Chromatography with Some Organophosphorus Compounds. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2003**, *26* (4), 629 - 640.
97. Haghshenas Fatmehsari, D.; Darvishi, D.; Etemadi, S.; Eivazi Hollagh, A. R.; Keshavarz Alamdari, E.; Salardini, A. A., Interaction between TBP and D2EHPA during Zn, Cd, Mn, Cu, Co and Ni solvent extraction: A thermodynamic and empirical approach. *Hydrometallurgy* **2009**, *98* (1-2), 143-147.
98. Maciuk, A.; Toribio, A.; Zeches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H.; Georgiev, M. I.; Ilieva, M. P., Purification of Rosmarinic Acid by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *28* (12/13), 1947-1957.
99. Toribio, A.; Nuzillard, J.-M.; Pinel, B.; Boudesocque, L.; Lafosse, M.; De La Poype, F.; Renault, J.-H., Pilot-scale ion-exchange centrifugal partition chromatography: Purification of sinalbin from white mustard seeds. *Journal of Separation Science* **2009**, *32* (11), 1801-1807.
100. Toribio, A.; Boudesocque, L.; Richard, B.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Preparative Isolation of Glucosinolates from Various Edible Plants by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *accepted*.

Partie II : Développement d'une nouvelle méthodologie de purification de peptides par CPC

Partie II Développement d'une nouvelle méthodologie de purification de peptides par CPC

Le projet de thèse qui m'a été confié a pour but le développement de nouvelles méthodologies de purification de peptides naturels ou synthétiques utilisant la chromatographie de partage centrifuge, en vue de leur valorisation sur le plan cosmétique et/ou pharmaceutique.

La première partie de ce travail a consisté en la mise au point du procédé en utilisant un mélange modèle de peptides, avant l'application de celui-ci à des matières premières plus complexes, tels que des extraits végétaux ou des milieux réactionnels.

II.1 Application du mode échange d'ions à la purification d'un mélange synthétique de dipeptides

II.1.1 Introduction

II.1.1.1 Finalité de l'étude

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, il existe peu de procédés de purification, utilisant la chromatographie liquide/liquide sans support solide, applicables aux peptides non dérivatisés, à l'exception de certains systèmes de solvants utilisables pour des peptides hydrophobes¹ ou encore du procédé de chromatographie dit d'affinité décrit par Ito *et al.*²

Le but de ces travaux est d'apporter une solution innovante au problème de purification de peptides libres, *i.e.* non protégés, existants. La CPC est, nous l'avons vu précédemment, une technique chromatographique plutôt à visée préparative se distinguant par sa très grande modularité. L'exploration de cette technique pour la purification de peptides apparaît alors comme un choix naturel.

Nous espérons ainsi mettre au point un procédé de purification applicable à des matières premières complexes, tels que des hydrolysats protéiques et/ou présentant des produits de proche parenté structurale, comme les milieux réactionnels issus de la synthèse peptidique. Dans l'absolu, l'idéal serait également que ce procédé puisse répondre à des problématiques très différentes que sont d'un côté la capture d'un peptide identifié au sein d'une matrice complexe, et de l'autre côté le polissage d'un peptide d'intérêt.

II.1.1.2 Choix du mélange de peptides

Pour entreprendre la mise au point du procédé de purification, un mélange modèle de cinq dipeptides a été sélectionné: GlycylGlycine (GG), GlycylTyrosine (GY), AlanylTyrosine (AY), LeucylValine (LV) et LeucylTyrosine (LY).

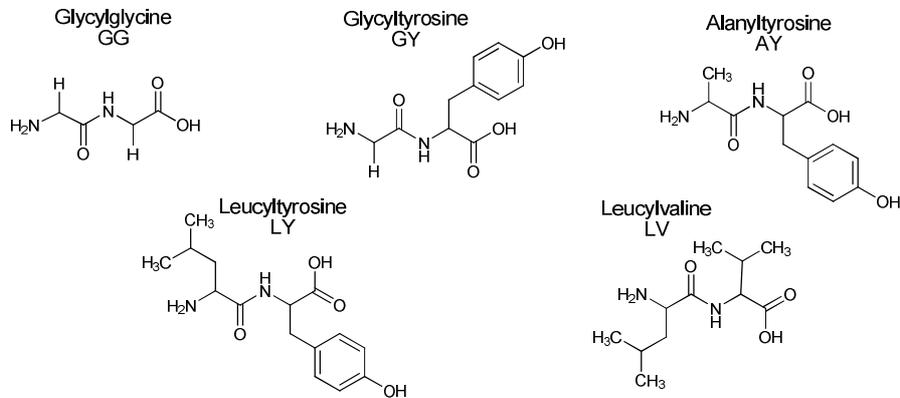


Figure 40 : Structures des dipeptides GG, GY, AY, LY et LV.

L'avantage majeur de l'emploi de ces dipeptides est la connaissance et donc la maîtrise aisée des paramètres physico-chimiques de ces molécules qui vont intervenir dans la mise au point du procédé, comme par exemple l'état d'ionisation.

Il n'existe aucun groupement potentiellement chargé présent sur les chaînes latérales des acides aminés des peptides sélectionnés. Ainsi, seules les extrémités N et C-terminales seront impliquées dans l'état d'ionisation -chargé ou neutre- des peptides. Ces peptides sous leur forme ionisée ne seront porteurs ainsi que d'une seule charge à la fois.

Les cinq dipeptides présentent également comme particularité de posséder des points isoélectriques très proches (entre 6 et 6,1 d'après le logiciel de calcul EMBOSS). Ceci implique que les cinq dipeptides seront dans le même état de charge pour un pH donné, c'est-à-dire chargés positivement à pH inférieur à 6 et négativement à pH supérieur. Ce paramètre est primordial à maîtriser dans le cadre d'un développement en mode déplacement.

En plus de ce point commun, ces dipeptides permettent également de couvrir une large gamme de polarité : GG est un peptide très polaire, la chaîne latérale de la glycine étant en fait un simple proton ; GY et AY possèdent un caractère hydrophobe plus prononcé du fait de la présence du résidu aromatique tyrosine et d'un résidu de type alkyle (Ala) ; enfin LV et LY sont des peptides présentant un caractère plutôt apolaire, les résidus les composants étant de type alkyle à chaîne de taille moyenne et aromatique (Tyr). Ainsi la sélectivité du procédé en fonction de la polarité des analytes pourra être mise en évidence.

Enfin, ces peptides présentant pour certains une forte parenté structurale, comme GY et AY qui ne diffèrent que par un groupement méthyle, la capacité de discrimination (*i.e.* la sélectivité) du procédé pourra ainsi être explorée.

II.1.1.3 Choix du mode de développement

La CPC présente deux modes de développement principaux, le mode élution et le mode déplacement. Le mode de développement par déplacement est celui que nous souhaitons mettre en œuvre ici, en particulier le mode échange d'ions. Néanmoins, le mode élution a été également exploré dans un but de comparaison.

II.1.1.3.1 Essais en mode élution

Des systèmes classiquement utilisés pour la purification de peptides ont été testés, tels que le système acide acétique (AcOH)/*n*-BuOH/eau.³

Dans un premier temps, les constantes de distribution des peptides dans les systèmes de solvants ont été évaluées par la méthode des tests en pilulier.

Protocole test en pilulier

Une quantité aliquote de chaque dipeptide a été ajoutée à 1 ml de chaque phase du système biphasique de solvants testé. Le système a été alors agité vigoureusement, puis laissé à décanter jusqu'à l'obtention de deux phases limpides.

10 µl de chaque phase ont été alors déposés sur plaque de silice. La quantité de peptides présents dans chaque phase a été alors évaluée visuellement après migration puis révélation.

Protocole d'analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)

*Toutes les fractions CPC, ainsi que les tests en piluliers, ont été analysés par CCM sur plaques de gel de silice (Merck 60 F254) développée avec le mélange *n*-BuOH/AcOH/eau (55:15:30, v/v), en utilisant la ninhydrine à 1% dans la pyridine/acide acétique glacial (5:1, v/v) en tant que réactif de pulvérisation. Ce réactif a été préparé comme suit: une quantité de ninhydrine a été dissoute dans un volume approprié de pyridine pour obtenir une concentration finale de 1% (m/v). Ensuite, l'acide acétique glacial a été ajouté à cette solution dans la proportion décrite ci-dessus.*

Pour un développement en mode élution, une constante de distribution idéalement proche de 1 est requise (I.3.3.1). Les systèmes ayant permis l'obtention de constantes de distribution de cet ordre de grandeur, ont ensuite été testés en CPC.

Les conditions expérimentales sont regroupées dans le tableau ci-après.

Tableau 7 : Conditions expérimentales testées en mode élution en CPC.

Essai	Système de solvants	Masse peptides (mg)	Mode	Débit ml/min	Rotation (rpm)	Rétention phase stationnaire
1	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/AcOH/eau (1:4,5:1,5:6, v/v)	103,8	Descendant	4	1000	60 %
2	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau 1% TFA (2:2:1:5, v/v)	100,2	Descendant	3	1000	65 %
3	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau 1% TFA (2:2:1:5, v/v)	114,2	Dual mode : Descendant puis ascendant	3	1000	65 %
4	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau 1% TFA (3:1:1:5, v/v)	108,3		3	1000	65 %
5	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau 1% TFA (2:2:1:5, v/v)	107,2	Descendant	3	900	65 %
6	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau 1% TFA (3:1:1:5, v/v) Puis phase aqueuse	100,3	Descendant Step-gradient	3	1000	66 %

Dans toutes les conditions testées, la sélectivité obtenue est très insuffisante. Il y a formation en général de 3 blocs de peptides : GG seul ou mélangé en partie avec GY, GY en mélange avec AY, et enfin LV en mélange avec VL. Sur la figure ci-dessous sont représentés les fractogrammes CCM obtenus dans les conditions des essais 3 et 4 (Tableau 7), où un dual mode a été réalisé (I.3.3.1.3).

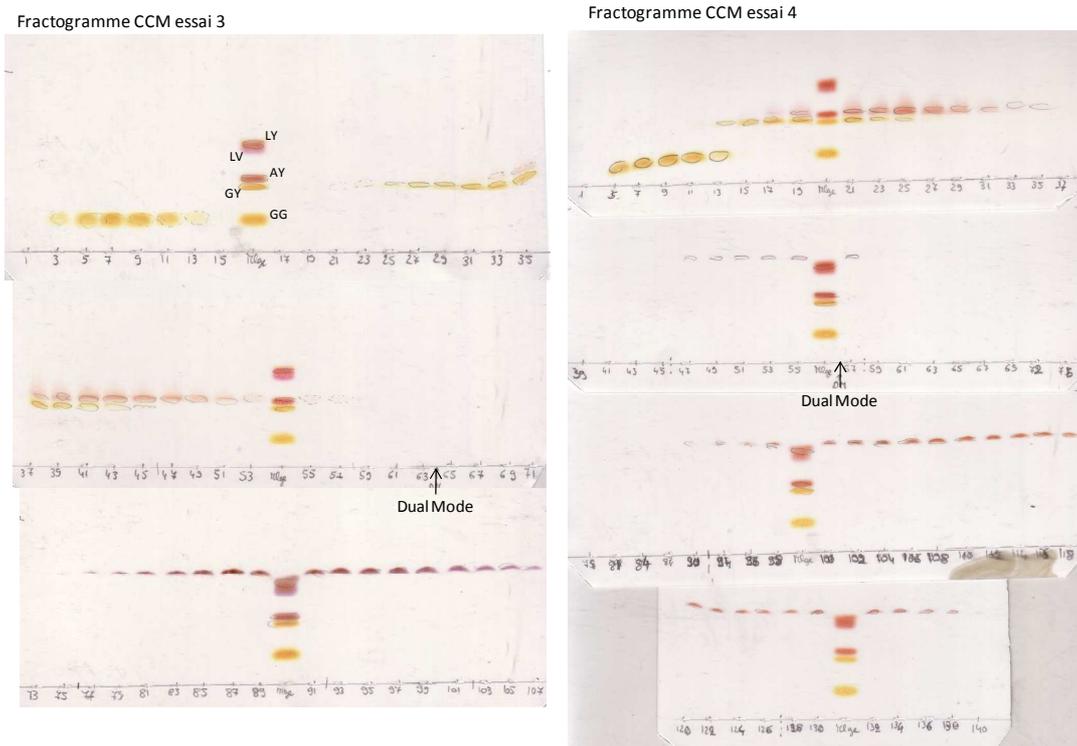


Figure 41 : Fractogrammes CCM des essais 3 et 4 en CPC mode élution. Plaque de silice normale, éluant *n*-BuOH/AcOH/eau (55:15:30, v/v), révélateur ninhydrine 1% dans un mélange AcOH glacial/pyridine (1:5, v/v).

Nous pouvons remarquer que dans les conditions de ces essais, nous avons réussi à obtenir une séparation du peptide GG qui est très peu retenu et émerge directement après obtention du front de

solvant. Il y a également un début de séparation des peptides GY et AY mais la zone de mélange demeure importante. Les peptides les plus apolaires LV et LY ne sont quant à eux pas séparés.

Le manque de sélectivité, commun à toutes les conditions en mode élution testées, montre l'intérêt d'investiguer les potentialités du mode déplacement.

II.1.1.3.2 Essais en mode déplacement

Quelques essais en mode pHZR ont été réalisés mais comme il fallait s'y attendre, les dipeptides demeurent en phase aqueuse quelque soit le pH ou le système de solvants testé. Nos peptides étant des peptides libres, *i.e.* non protégés, à pH acide ils sont porteurs d'une charge positive du fait de l'ionisation de la fonction amine terminale. Inversement à pH alcalin, ils sont porteurs d'une charge négative du fait de l'ionisation de la fonction acide carboxylique terminale cette fois. Ainsi dans les deux cas, les peptides étant sous forme ionisée, ils sont hydrosolubles et demeurent donc en phase aqueuse. Le pHZR a été ainsi très rapidement écarté.

Le mode échange d'ions a donc été envisagé, ce mode étant particulièrement adapté à la purification de molécules ioniques ou ionisées. Le mode échange d'ions n'implique de plus que des variations mineures du pH du milieu chromatographique, les peptides demeureront ainsi sous une seule forme chimique. Pour la mise au point d'un procédé en mode échange d'ions, nous avons dû sélectionner un trio d'acteurs : le système biphasique de solvant, l'échangeur et enfin le déplaceur.

II.1.2 Choix des acteurs en mode échange d'ions

Pour sélectionner le trio d'acteur optimal, il nous a fallu procéder dans un premier temps à un criblage rapide de différents couples système de solvants/échangeurs.

II.1.2.1 Tandem système biphasique de solvants/échangeur

Ce choix s'est fait là encore après test en pilulier selon un protocole propre à l'échange d'ions.

Protocole de test en pilulier en mode échange d'ions

Une quantité aliquote de chaque peptide a été ajoutée à 2 ml de système biphasique de solvants à tester (1 ml de chaque phase). Après agitation et décantation, 10 µl de chaque phase ont été déposés sur plaque de silice. Une quantité appropriée d'échangeur a été alors solubilisée en phase organique. Après agitation et décantation, 10 µl de chaque phase ont été déposés sur plaque de silice.

Enfin une quantité appropriée de déplaceur est ensuite ajoutée au système. Après agitation et décantation, 10 µl de chaque phase ont été déposés sur plaque de silice.

Le protocole de migration/révélation de la plaque est le même que celui décrit précédemment. Les quantités de peptides présents dans chaque phase ont été appréciées visuellement.

Un système est jugé satisfaisant si les peptides sont majoritairement présents en phase aqueuse (phase mobile) avant ajout de l'échangeur ou après ajout du déplaceur ($K_D \ll 1$), et majoritairement en phase organique (phase stationnaire) après ajout de l'échangeur ($K_D \gg 1$).

Les peptides naturels étant des composés amphotères, des échangeurs cationiques ou anioniques peuvent être *a priori* indifféremment utilisés. Ma *et al.* ont utilisé pour réaliser la purification de leurs peptides naturels un échangeur faible anionique : le DEHPA (acide bis-(2-éthylhexyl)phosphorique).⁴ Nous avons donc commencé par tester des échangeurs anioniques, et en premier lieu le DEHPA. Un autre échangeur anionique, fort cette fois, fut également testé : l'AOT ou bis(2-éthylhexyl)sulfosuccinate sodique qui présente une analogie structurale avec le DEHPA.

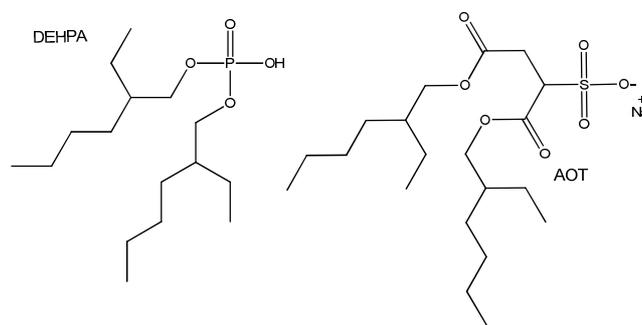


Figure 42 : Structures des échangeurs DEHPA et AOT.

Les échangeurs étant de nature anionique, les peptides doivent se trouver sous forme cationique pour pouvoir interagir avec ces derniers. Le DEHPA étant un acide phosphorique, son addition entraîne une diminution de pH suffisante pour que l'ensemble des peptides se trouvent sous forme cationique. Pour l'utilisation de l'AOT, l'addition d'une petite quantité d'acide au système de solvants est nécessaire pour amener les peptides sous la forme ionique souhaitée.

Plusieurs tandems système biphasique de solvants/échangeur furent alors testés.

L'extraction en phase organique stationnaire des peptides de polarité intermédiaire, GY et AY, ainsi que des peptides les plus apolaires, LV et LY, est obtenue de façon très satisfaisante avec le DEHPA et ce dans tous les systèmes biphasiques testés. Le système biphasique de solvants utilisé dans le cas des dipeptides par Ma *et al.*⁴, le système MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau dans les proportions (2:1:2:5, v/v), a montré en plus d'une extraction correcte des dipeptides, des propriétés hydrodynamiques optimales pour une utilisation en CPC, notamment un temps de décantation très court de l'ordre de quelques secondes lors des tests.

L'AOT, bien que très proche d'un point de vue structural du DEHPA, nécessite l'ajout d'un très large excès pour permettre l'extraction des peptides, et ce quelque soit le système de solvants.

Dans tous les cas de figure, le peptide GG montre un caractère hydrophile trop prononcé pour interagir correctement avec l'échangeur, son passage en phase organique est ainsi extrêmement limité.

Les conditions semblant les plus intéressantes sont en définitive celles employées par Ma et al. en chromatographie dite d'affinité, à savoir le système quaternaire MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau dans les proportions (2:1:2:5, v/v) avec le DEHPA. Ces deux acteurs choisis, le déplaceur reste à sélectionner.

II.1.2.2 Choix initial du déplaceur

L'échangeur choisi, le DEHPA, appartient à la famille des échangeurs dits faibles. Ce dernier doit être activé sous forme anionique pour exprimer ses capacités échangeuses, à l'aide d'une base organique comme la TEA. Le déplacement des analytes lors d'un développement par échange d'ions faible, est mis en œuvre par désactivation de l'échangeur, c'est-à-dire sa neutralisation.⁵

Dans le cas du DEHPA, le déplaceur sera donc un acide fort hydrosoluble, typiquement l'acide chlorhydrique (HCl).

II.1.2.3 Etude de la robustesse du système

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie (I.4.4.6), lors d'un développement en mode échange d'ions, il est important d'étudier l'influence de l'échangeur sur la stabilité du système biphasique de solvants.

Pour cela, nous avons construit le pseudodiagramme ternaire DEHPA/phase organique/phase aqueuse du système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:1:2:5, v/v).

Construction des pseudo-diagrammes ternaires

Les isothermes de solubilité (ou courbes binodales) de l'échangeur de cations DEHPA avec différentes quantités de TEA (0 et 2,15 % (moles/moles DEHPA)) dans le système biphasique de solvants MtBE/CH₃CN/n-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v) ont été déterminées à la température ambiante (22 ± 2 °C). Les densités des deux phases du système biphasique de solvants ont été mesurées. Des rapports prédéfinis (m/m) phase aqueuse/phase organique ont été successivement ajoutés à 2 g de DEHPA jusqu'à l'apparition de la phase conjuguée. Les coordonnées des points obtenus ont été tracées pour obtenir un diagramme ternaire qui a été représenté en pourcentage du poids et dans le format orthogonal.

Comme nous pouvons le voir Figure 43, le DEHPA a un effet déstabilisant très limité sur le système biphasique de solvants, quelque soit la quantité de TEA ajoutée. En effet, la zone biphasique

est très importante sur le pseudodiagramme. Ce système DEHPA/(MtBE/CH₃CN/*n*-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v)) peut ainsi être qualifié de robuste.

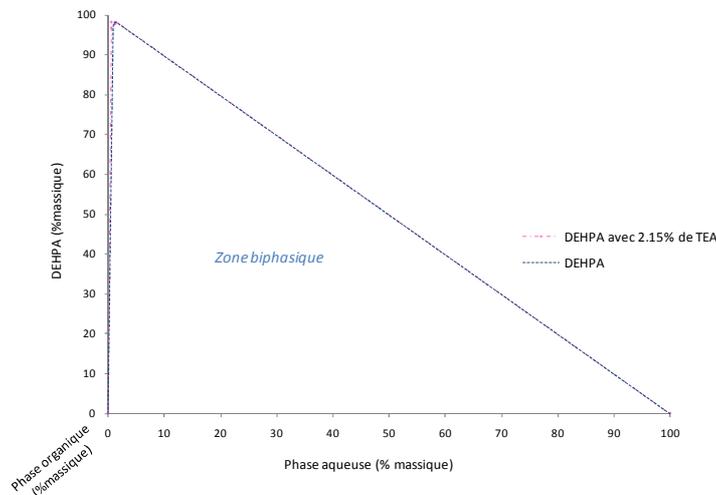


Figure 43 : Pseudodiagramme ternaire du DEHPA (% massique) dans le système MtBE/CH₃CN/*n*-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v) seul ou en présence de 2,15 % (moles/moles) de TEA.

Il sera donc possible d'ajouter de grandes quantités d'échangeur dans notre système biphasique sans entraîner la déstabilisation de ce dernier. La capacité de la colonne étant entièrement sous la dépendance de la quantité d'échangeur introduite dans la phase stationnaire, ce système autorisera ainsi l'utilisation de colonnes de capacité très importante. Le système sélectionné présente donc un intérêt certain pour l'utilisation à l'échelle industrielle.

II.1.2.4 Détermination de la composition des phases du système

Le système biphasique de solvants choisi est un système quaternaire, or à l'inverse des systèmes ternaires, il existe peu de diagrammes quaternaires permettant de décrire la composition de chaque phase conjuguée. Cette donnée est pourtant capitale à obtenir dans l'optique d'un développement industriel. En effet, la connaissance de la composition de chaque phase permet la préparation indépendante des deux phases, ce qui permet de limiter considérablement la consommation inutile en solvants du procédé.

Dans le cadre de notre étude, la composition des phases du système quaternaire MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (2:1:2:5, v/v) a été déterminée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton.

Détermination de la composition des phases par RMN ¹H

Les expériences de RMN ¹H ont été menées sur un spectromètre Brüker Advance DRX 500 (¹H à 500 MHz), à 298 K, nombre de scans (NS) de 8, délai d1 de 15 s et sans lock deutérium dans ce cas précis.

10 ml de système biphasique ont été préparés en mélangeant les volumes appropriés de solvants. Un volume de phase organique, et de phase aqueuse sont ensuite analysés dans les conditions citées ci-dessus.

Par intégration des pics des signaux de solvants (ramenée à un proton), un ratio molaire des différents solvants a été obtenu, qui après correction par la masse molaire et la densité de chaque mélange A permis l'obtention de la composition de chaque phase en rapport volumique.

La composition de chacune des phases est ainsi obtenue:

- phase organique : MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (38 : 37 : 11 : 14, v/v) ;
- phase aqueuse : MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (2 : 3 : 9 : 86, v/v).

En étudiant la composition des deux phases conjuguées, il apparaît de prime abord que l'acétonitrile joue bien le rôle de solvant pont, il est en effet présent en quantités équivalentes dans les deux phases.

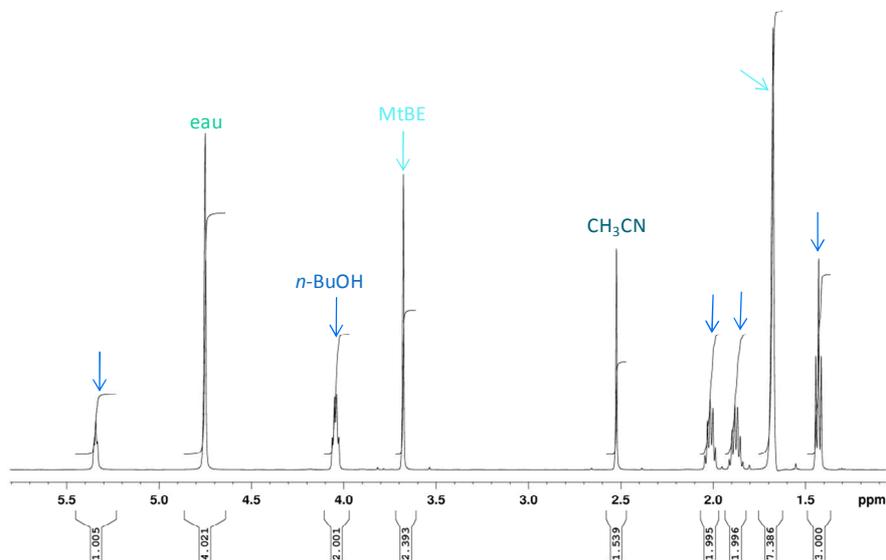


Figure 44: Spectre RMN ¹H de la phase organique du système MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v).

La phase organique contient également une proportion d'eau non négligeable, 14 % environ, ce qui lui confère une polarité assez élevée.

II.1.3 Détermination des paramètres expérimentaux optimaux

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les acteurs semblant les plus prometteurs sont ceux utilisés par Ma *et al.* pour la purification de peptides naturels par chromatographie dite d'affinité : le système quaternaire MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (2:1:2:5, v/v), le DEHPA comme échangeur, l'HCl comme déplaceur.^{2,4} Cette chromatographie dite d'affinité est une variante du pHZR utilisant un ligand, comme le DEHPA, portant une fonction ionisée comme agent d'extraction. Il a

pour but de faciliter le passage des analytes en phase stationnaire organique. Le reteneur utilisé est une base organique, la TEA, et le déplaceur un acide fort hydrophile, l'HCl. Les mécanismes physico-chimiques permettant le déplacement des analytes en phase mobile sont peu discutés dans ces publications. En étudiant plus attentivement les conditions utilisées, ce procédé s'apparente très fortement à un développement par échange d'ions. Le DEHPA est un échangeur faible qui doit être activé sous forme phosphate pour acquérir une capacité échangeuse. La TEA est une base qui va pouvoir déprotoner le DEHPA, elle peut donc se voir comme un activateur d'échangeur plutôt que comme reteneur. De même, le déplaceur HCl ne va pas jouer sur l'état d'ionisation des peptides, le pH restant toujours dans des conditions acides. En revanche, l'acide chlorhydrique va neutraliser ou désactiver le DEHPA, qui va alors laisser les peptides repasser en phase mobile aqueuse. Ce procédé dit de chromatographie d'affinité peut donc se voir comme le premier exemple décrit d'échange d'ions faible en chromatographie liquide/liquide.

Partant de ce postulat, nous avons décidé d'utiliser ces conditions comme point de départ pour la mise au point de notre procédé.

La mise au point d'un protocole de développement par échange d'ions en CPC repose sur la détermination de certains paramètres clés comme le ratio échangeur/analyte, ou échangeur/déplaceur. C'est par ce dernier point que nous avons commencé notre étude.

II.1.3.1 Détermination du ratio échangeur/déplaceur

Nous avons donc sélectionné comme point de départ les conditions utilisées par Ito et ses collaborateurs : ratio DEHPA/peptides égal à 16,6, avec une concentration en "reteneur" TEA équivalente à 2,15% de la quantité en moles de DEHPA introduite ; ratio reteneur (TEA)/déplaceur (HCl) égal à 1 qui correspond à un ratio DEHPA/HCl de 46,5 (Exp.1 Tableau 8).⁴

Pour obtenir le ratio DEHPA/HCl optimal, nous avons fixé dans un premier temps la concentration en DEHPA et fait varier celle en déplaceur, les différentes conditions testées sont regroupées dans le Tableau 8 , et le protocole utilisé est décrit ci-dessous.

Protocole CPC en mode échange d'ions

La colonne de CPC a été tout d'abord conditionnée par passage de 2 volumes de colonne d'un mélange méthanol (MeOH)/eau (50:50, v/v). La colonne a été ensuite remplie par 2 volumes de colonne de phase stationnaire organique contenant l'échangeur.

Les paramètres chromatographiques utilisés sont les suivants : mode descendant ; vitesse de rotation de la colonne 1200 rpm ; débit de phase mobile 2 ml/min ; collecte des fractions toutes les minutes.

1,5 litre de système biphasique de solvants ont été préparés par mélange des quantités appropriées de chaque solvant. Après décantation, les deux phases du système ont été récupérées séparément. Un volume

adapté de phase organique a été additionné d'une quantité définie d'échangeur (DEHPA) puis de TEA. Un volume adapté de phase mobile aqueuse a été additionnée d'une quantité fixée de déplaceur (HCl).

L'injectat contient environ 0,1 mmole (entre 0,1 et 0,07) de chaque dipeptide solubilisés dans 10 ml d'un mélange phase organique/phase stationnaire fraîches (sans échangeur ni déplaceur) : environ 7,5 ml de phase mobile aqueuse et quelques ml de phase organique pour resaturer le système. L'injectat a été introduit dans la colonne à $t=0$.

Le ou les déplaceur(s) ont été introduits à un moment t déterminé par l'opérateur.

Le suivi de la séparation se fait par détection UV aux longueurs d'onde 215 nm, 254 nm et 280 nm ; ainsi que par analyse en CCM dans les conditions décrites précédemment.

Tableau 8 : Conditions opératoires des expériences d'ajustement de la concentration en déplaceur.

Expérience	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Masse de peptides injectés	100,8 mg	101,2 mg	104,5 mg	101,6 mg
Concentration en DEHPA	46,5 mM, Additionné de 2,15% de TEA soit 1 mM			
Ratio DEHPA/Peptides	16,6			
Concentration en HCl	1 mM	5 mM	10 mM	20 mM
Ratio DEHPA/HCl	46,5	9,3	4,65	2,32
Temps ajout HCl	10 min après l'obtention du front de solvants			
Rétention phase stationnaire	74 %	75 %	75 %	75 %
Perte de charge	34 bars	34 bars	33 bars	35 bars

Les conditions initiales (expérience 1) utilisées par Ma *et al.* n'ont pas permis l'obtention d'une séparation optimale. Les dipeptides les plus apolaires (LV et LY) n'ont pas été élués de la colonne malgré un temps d'expérience excédant les 4 h. Le peptide GG émerge de la colonne directement après le front de phase mobile, il n'est donc pas extrait en phase organique ce qui est en accord avec les observations faites en tests en pilulier.

Comme nous pouvons le voir sur le fractogramme CCM (Figure 45) et sur le chromatogramme en violet Figure 46, les peptides GY et AY sont en revanche parfaitement séparés. Il est toutefois important de noter que le profil chromatographique d'émergence des produits s'apparente à des pics de type Gaussien, caractéristiques d'un développement par élution et non par déplacement.

Dans le cadre d'un développement par déplacement, les peptides émergeant sous forme de blocs avec des fronts très compressifs, en CCM le profil montre une brusque apparition des analytes directement très concentrés et une diminution également brutale de la concentration à la fin de l'émergence. Pour confirmer le mode de développement par élution, nous avons alors calculé le nombre de plateaux théoriques correspondants aux pics obtenus, en appliquant la méthode de calcul classique pour les pics Gaussien.

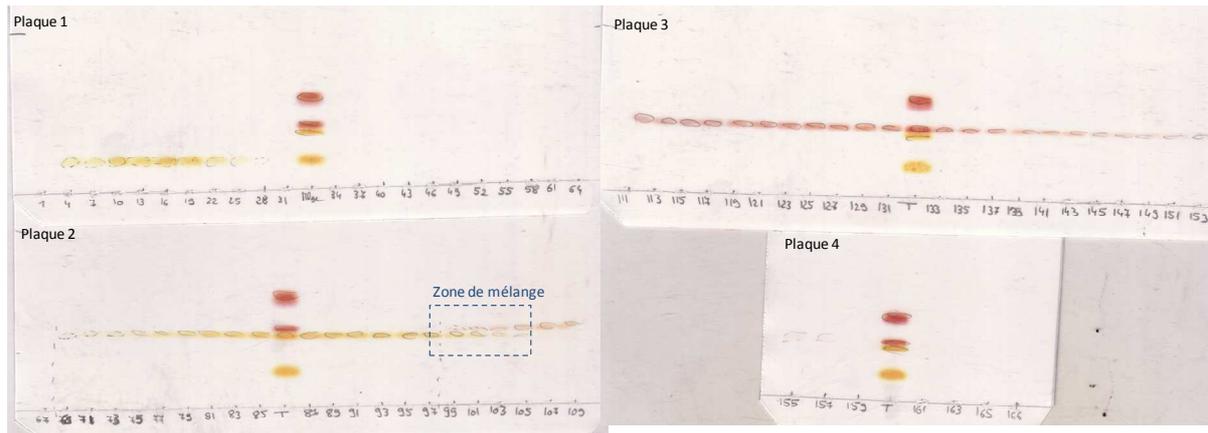


Figure 45 : Fractogramme CCM obtenu dans les conditions utilisé par Ma pour la séparation de peptides. Plaque de silice normale, éluant *n*-BuOH/AcOH/eau (55:15:30, v/v), révélateur ninhydrine 1% dans un mélange AcOH glacial/pyridine (1:5, v/v).

En CPC, les pics obtenus sont de type gaussien pour le mode élution, ou présentent un profil rectangulaire avec des fronts compressifs pour le mode déplacement. Pour ce dernier cas, le nombre de plateaux théoriques proprement dit ne peut donc être calculé par cette méthode. Ainsi en assimilant les pics de CPC à des pics Gaussiens et utilisant les formules classiques, nous obtenons ainsi une valeur de "plateaux théoriques" qui vont nous renseigner sur le mode chromatographique mis en jeu. Lors d'un développement par élution, ce nombre sera inférieur en général au nombre de cellules de partage présentes dans la colonne, dans notre cas classiquement entre 300 et 500.

Lors d'un développement par échange d'ions, le calcul du nombre de plateaux théoriques fournira des valeurs extrêmement élevées (supérieures au millier de plateaux) aberrantes pour notre colonne, preuve que les interactions mises en jeu lors de la séparation ne dépendent pas uniquement du phénomène de partage des solutés. Dans les conditions employées par Ma, le nombre de plateaux théoriques pour les pics de GY et AY obtenus par ce calcul est d'environ 100 plateaux, ce qui est cohérent avec un développement en mode élution.

Le ratio échangeur/déplaceur utilisé est particulièrement élevé par rapport à ceux classiquement décrits dans la littérature, en général inférieur à 10^{6-10} . Nous avons alors diminué le ratio utilisé pour le ramener dans une fourchette comprise entre 2 et 10^{11} . Les chromatogrammes obtenus sont représentés Figure 46.

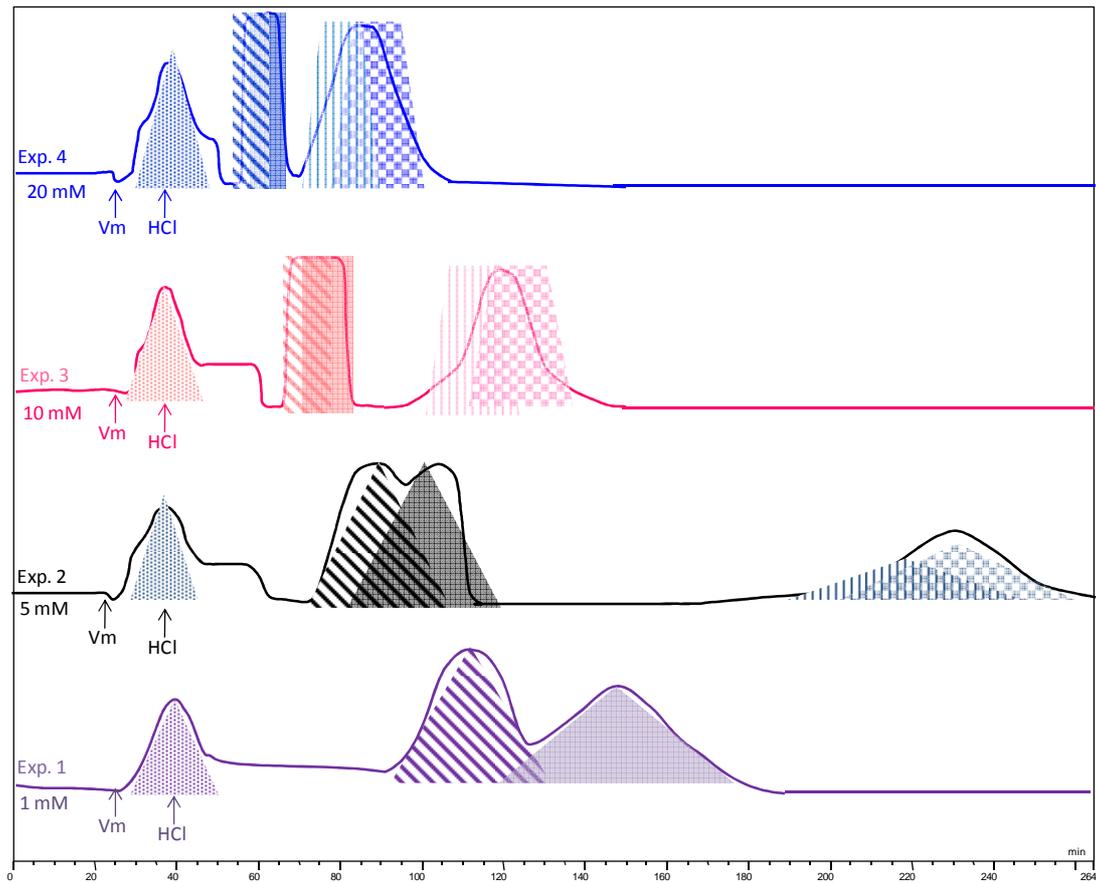


Figure 46 : Chromatogrammes CPC obtenus dans les conditions des expériences 1, 2, 3 et 4 (Tableau 8), chaque peptide étant représenté par une forme : GG (triangle pointillé), GY (triangle puis rectangle hachuré), AY (triangle puis rectangle plein), LV (triangle hachuré) et LY (triangle à carreaux).

L'augmentation de la concentration en déplaceur (HCl) d'un facteur 5, de 1 mM à 5 mM (Exp.2 Tableau 8), a permis l'élution de tous les peptides en 5 heures. Les peptides GY et AY sont élués 50 min environ après l'addition du déplaceur, sous forme de deux pics d'allure pseudo-gaussienne, avec une zone de recouvrement importante. Pour les peptides apolaires, LV et LY, leur profil chromatographique est typiquement gaussien, avec des zones de produits purs très réduites. La concentration en déplaceur est encore trop faible ce qui a pour conséquence un manque de compressivité des zones de fronts entre les différents analytes : la composante élution est encore dans ces conditions prépondérante.

L'augmentation à nouveau d'un facteur 2 (10 mM) de la concentration en déplaceur a modifié profondément l'allure du chromatogramme, en particulier pour les peptides GY et AY. Ces peptides émergent cette fois de la colonne sous forme de blocs avec des fronts très compressifs, caractéristiques d'une composante déplacement majoritaire pour ces deux peptides. Les zones de produits purs sont par ailleurs augmentées même si une zone de recouvrement non négligeable subsiste.

Le temps de développement du chromatogramme est divisé par un facteur 2, pour un doublement de la concentration en déplaceur (expériences 2 et 3), la concentration de ce dernier fixant la vitesse de progression du train isotachique. Ceci montre également que la composante déplacement est d'ores et déjà présente pour ces conditions expérimentales.

Le délai observé entre la fin du pic AY et l'émergence des peptides LV et LY est drastiquement diminué passant de 70 min à 10 min. L'organisation des analytes se rapproche du train isotachique théorique attendu dans le cas d'un processus par déplacement pur. Néanmoins, le profil de ces deux peptides demeure plus proche d'un pic gaussien avec là encore des zones de produits purs peu importantes.

Pour aller jusqu'au bout de l'étude, la concentration en déplaceur fut à nouveau doublée. Dans ce cas, les limites du système ont été atteintes. Les peptides GY et AY émergent toujours sous forme d'un bloc, mais l'analyse des fractions montre que cette fois la zone de recouvrement des pics est prépondérante. Ce phénomène a été décrit lors de travaux précédents, une augmentation trop importante de la concentration en déplaceur conduit à un rapprochement des zones de recouvrement des pics, les zones de produits purs étant alors fortement réduites : le pic est alors composé uniquement d'une succession de zones de front ou *shock layer*.¹¹ Le temps de développement n'est cette fois plus divisé d'un facteur 2, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'au delà d'un seuil de concentration propre au système, les relations reliant la vitesse des analytes à la concentration en déplaceur n'évoluent plus de façon linéaire.

Le ratio échangeur/déplaceur (DEHPA/HCl) nous ayant donné les meilleurs résultats est donc d'environ 5, ce qui correspond à une concentration en HCl de 10 mM. Néanmoins, la séparation des peptides n'est pas optimale, la variation du ratio DEHPA/HCl seul ne permettant ni de diminuer à son plus strict minimum la zone de recouvrement entre les peptides GY et AY, ni d'obtenir une ébauche de séparation entre les peptides LV et LY.

II.1.3.2 Ratio échangeur/peptides

Les modifications réalisées sur la concentration en déplaceur ont conduit à une amélioration de la séparation des peptides de polarité intermédiaire, les plus apolaires restant co-élus quelque soit la concentration en HCl utilisée.

Nous avons donc étudié un second paramètre clé, le ratio échangeur/peptide, en fixant la concentration en HCl à 10 mM pour conserver la même vitesse de nos analytes dans la colonne.

Le protocole utilisé est le même que décrit au paragraphe précédent, les différentes conditions opératoires étant regroupées dans le Tableau 9. La concentration des peptides injectés est calculée avec une masse molaire moyenne de $236,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tableau 9 : Conditions opératoires testées pour l'étude du ratio DEHPA/peptides.

Expérience	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9	Exp. 10
[peptides]	2,89 mM	2,87 mM	2,79 mM	2,89 mM	2,97 mM	2,90 mM
[DEHPA]	30 mM	20 mM	15 mM	10 mM	5 mM	2 mM
[TEA]	0,64 mM	0,43 mM	0,32 mM	0,21 mM	0,11 mM	0,04 mM
Ratio DEHPA/Peptides	10,4	7,0	5,4	3,5	1,7	0,69
[HCl]	10 mM					
Ratio DEHPA/HCl	3	2	1,5	1	0,5	0,2
Temps ajout HCl	10 min après l'obtention du front de solvants					
Rétention phase stationnaire	75 %	76 %	74%	74 %	73 %	73 %
Perte de charge	33 bars	33 bars	34 bars	35 bars	36 bars	35 bars

Dans ce cas, le paramètre suivi est la largeur des zones de recouvrement au sein des blocs de déplacement. De façon inattendue au premier abord, une amélioration de la séparation est observée lorsque la concentration en échangeur est diminuée. Des travaux menés précédemment au laboratoire par le Dr Maciuk ont montré qu'il existait une concentration seuil en échangeur, correspondant à la capacité minimale nécessaire. Si la quantité en échangeur introduite dépasse de façon importante cette concentration seuil, l'impact sur la qualité de la séparation est défavorable.¹¹ Nous l'avons vu (I.4.2 p.56), le développement par déplacement est basé sur la mise en compétition des analytes entre eux pour les sites d'échange, *i.e.* l'échangeur. Si la quantité d'échangeur introduite est trop élevée, ces conditions de stress disparaissent, chaque analyte ayant à sa disposition plus de sites d'échange que nécessaire. La perte de cet état de stress entraîne ainsi une dégradation du processus chromatographique.

Dans les conditions de concentrations utilisées par Ma, il semblerait ainsi que nous étions au-delà de la capacité minimale nécessaire de la colonne dans une proportion assez importante ce qui explique l'amélioration de la séparation observée lors de la diminution de la quantité d'échangeur introduite.

Nous pouvons également noter que le temps de développement est d'autant plus réduit que la concentration en échangeur diminue, ce qui s'explique tout simplement par le fait que le ratio échangeur/HCl diminue, la concentration en HCl étant fixée à 10 mM.

La durée du plateau correspondant aux peptides GY et AY demeure sensiblement la même quelque soit le ratio DEHPA/peptides utilisé. Ceci confirme le fait que pour ces peptides le développement est bien le mode déplacement. Si la durée du plateau demeure identique, la zone de front est d'autant plus diminuée que le ratio DEHPA/peptides diminue avec un optimum situé aux environs de 5 (5,4) (Expérience 7).

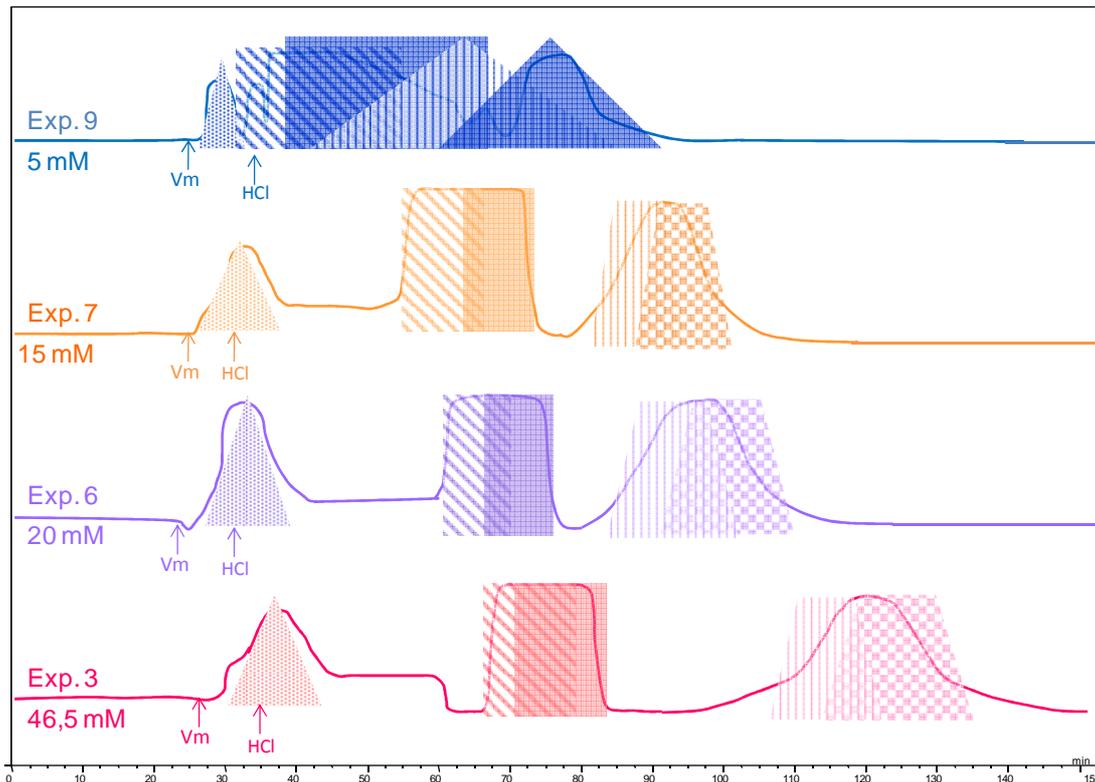


Figure 47 : Chromatogrammes CPC obtenus dans les conditions des expériences 4, 6, 7 et 9 (Tableau 8 et Tableau 9), chaque peptide étant représenté par une forme : GG (triangle pointillé), GY (rectangle hachuré), AY (rectangle plein), LV (triangle hachuré) et LY (triangle à carreaux).

En diminuant encore la quantité de DEHPA introduite (5 mM), le chromatogramme se dégrade complètement. Dans ce cas la quantité d'échangeur présente est insuffisante pour retenir les analytes, qui sont alors élués dès le front de solvant.

Pour les peptides les plus apolaires LV et LY, la durée d'émergence varie de façon non négligeable entre le ratio DEHPA/peptides égal à 16,6 (DEHPA 46,5 mM) et celui égal à 7 (DEHPA 20 mM), preuve qu'il existe encore une composante élution dans le comportement de ces deux peptides. Dès le ratio de 7, le profil d'émergence des peptides LV et LY s'apparente plus à un bloc de déplacement. Un autre argument en faveur de la prépondérance de la composante déplacement est qu'entre les concentrations en DEHPA de 20 et 15 mM, la durée des plateaux reste sensiblement la même. Néanmoins, la zone de recouvrement des pics, si elle est diminuée, reste très importante. Est-ce une conséquence de la diminution du ratio DEHPA/HCl découlant de la diminution de la concentration en DEHPA vis-à-vis de la concentration en HCl fixe, ou bien directement lié à au comportement des peptides dans le système? Ces deux hypothèses ont été alors explorées.

Le ratio optimum DEHPA/peptides se situe ainsi aux environs de 5,5 (5,4 exactement) ce qui correspond dans nos conditions à une concentration en DEHPA de 15 mM.

Nous avons donc obtenu les ratios optimisés suivants : DEHPA/HCl égal à 4,65 (II.1.3.1) et DEHPA/peptide de 5,4. En appliquant ces deux ratios (DEHPA 15 mM et HCl 10 mM) le profil de séparation suivant est obtenu.

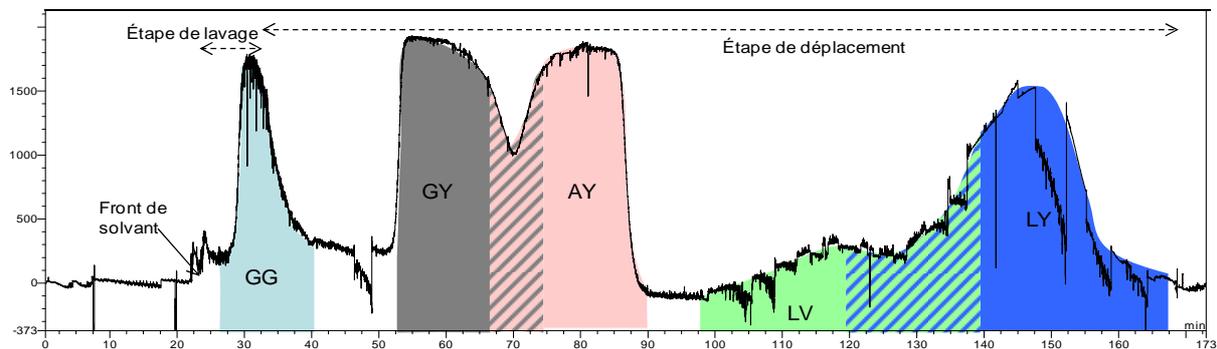


Figure 48 : Chromatogramme CPC de la séparation des dipeptides. Conditions opératoires: système de solvants MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), DEHPA dans la phase stationnaire organique 15 mM avec 0,32 mM de TEA, HCl dans la phase mobile aqueuse 3,22 mM ; mode descendant, débit 2 ml/min, vitesse de rotation 1200 rpm, perte de charge 35 bars, rétention de la phase stationnaire 77%, détection UV à 215 nm.

Pour les peptides GY et AY, la quantité de déplaceur introduite est trop faible pour conserver le bloc de déplacement, une composante élution intervient comme le montre l'infléchissement entre les deux plateaux. Le ratio DEHPA/HCl utilisé précédemment de 1,5 était dans ce cas plus adapté.

L'utilisation du ratio DEHPA/HCl à 4,65 permet une meilleure séparation des peptides LV et LY. Deux pics distincts sont alors observés, la différence d'intensité du pic LV s'expliquant simplement par l'absence de chromophore aromatique. Le profil n'est cependant pas typique de la chromatographie de déplacement et la zone de recouvrement résiduelle demeure importante.

L'utilisation d'un gradient de concentration en HCl pourrait être envisagée si les peptides les moins retenus ne requerraient pas la concentration la plus élevée en déplaceur. Une autre solution envisageable est l'utilisation d'un déplaceur différent. Avant d'explorer cette option, nous avons dans un premier temps le comportement des peptides vis-à-vis du DEHPA.

Pour étudier l'influence de la quantité d'échangeur introduite sur le comportement des peptides, *i.e.* sur leur extraction en phase organique, il est courant de tracer les isothermes de répartition des espèces dans le système biphasique. Ces isothermes permettent d'obtenir la quantité d'échangeur à introduire dans le système pour obtenir une extraction optimale de chaque espèce. La construction de ces isothermes nous permettra de déterminer si la mauvaise déconvolution des pics de LV et LY est sous la dépendance de la quantité de DEHPA introduite.

Protocole utilisé pour la construction des isothermes de partage

Les isothermes de partage de chaque dipeptide dans le système MtBE/CH₃CN/n-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v) ont été déterminées pour différentes concentrations de DEHPA, à température ambiante (22 ± 2 °C). Les solutions mères de chaque peptide ont été préparées par dissolution d'une quantité appropriée de peptide dans

la phase aqueuse du système biphasique de solvants de sorte que la concentration obtenue soit de 5 mM. De façon analogue, une solution mère de DEHPA a été préparée en ajoutant une quantité appropriée d'échangeur dans la phase organique pour obtenir une concentration de 200 mM. 0,5 ml de solution-mère de peptide ont été mélangés avec 0,5 ml de phase organique contenant différentes concentrations de DEHPA (0 ; 1,56 ; 3,12 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mM) obtenues par dilution de la solution mère de DEHPA. Les phases ont été laissées à décanter jusqu'à l'obtention de phases limpides. Puis 250 μ l de chaque phase ont été mélangés avec 250 μ l de la phase conjuguée fraîche (sans peptide ou DEHPA) et 250 μ l de MeOH pour rendre le système monophasique. La concentration en peptide dans chaque phase a été déterminée par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).

Protocole CLHP utilisé

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex Summit HPLC (Dionex, USA), équipée d'une pompe P580, d'un injecteur automatique ASI-100, d'un four à colonne STH et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD340S. La colonne utilisée est une colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 μ m) équipée d'une pré-colonne SecurityGuard analytique KJ0-4282 avec des cartouches (4 x 3,0 mm C12) (Phenomenex, Le Pecq, France). Les éluants utilisés sont de l'eau contenant 0,1% TFA et de l'acétonitrile contenant 0,09% TFA. Le gradient utilisé est le suivant. Le point de départ est une phase 100% aqueuse. La quantité d'acétonitrile est portée à 25% (v/v) en 15 min, puis à 50% (v/v) en 30 minutes et maintenue à 50 % (v/v) pendant 5 min. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,5 ml par minute. La détection UV a été fixée à $\lambda = 215$ nm et la température du four a été réglée à 25 °C. Le volume d'injection est de 40 μ l pour des solutions concentrées à 5 mg/ml. La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

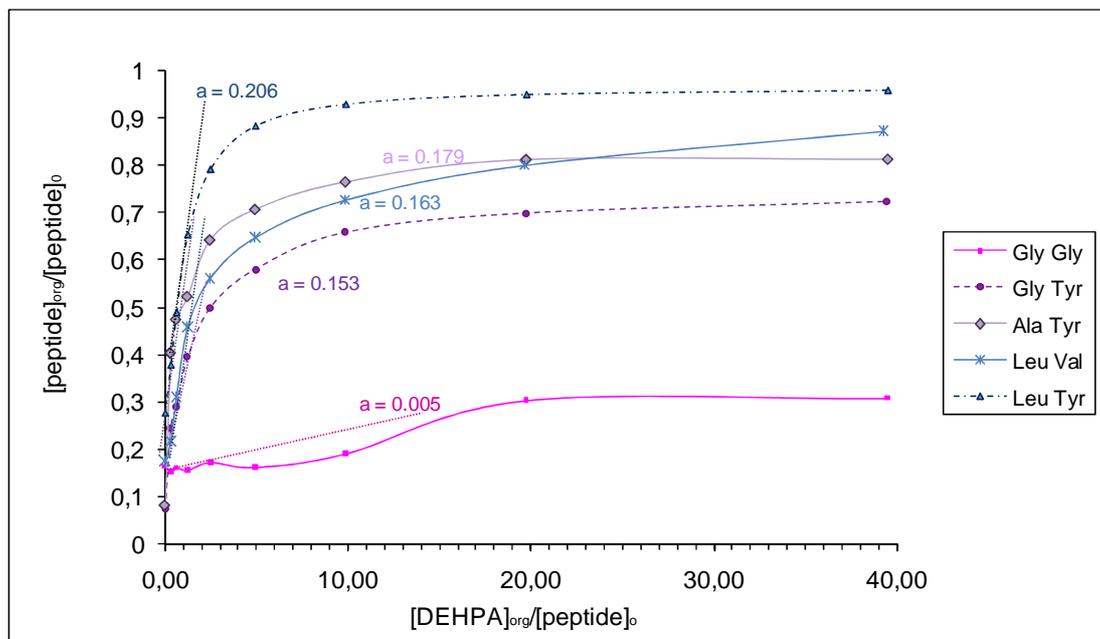


Figure 49 : Isothermes de partage des peptides GG, GY, AY, LV et LY dans le système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v) représentant leur concentration molaire dans la phase organique par unité de concentration initialement dissoute dans la phase aqueuse en fonction de la concentration molaire de DEHPA ajouté dans la phase organique par unité de concentration de peptide initialement contenue dans la phase aqueuse ; avec a pente de la zone linéaire de l'isotherme, $a = \Delta[\text{Peptide}]_{\text{org}}/\Delta[\text{DEHPA}]_{\text{org}}$.

Les courbes Figure 49 représentent l'extraction de chaque peptide en fonction de la quantité d'échangeur introduit dans le système.

Comme nous l'avons déjà vu, les analytes présentant les isothermes les plus hautes sont ceux montrant le plus d'affinité pour la phase stationnaire, ici pour l'échangeur, et donc ceux qui émergeront en dernier de la colonne. En effet, l'ordre est ici respecté. Nous pouvons de plus en déduire les constantes de sélectivités ainsi que leur ordre :

$$Ka'_{GG} = \frac{[DEHP^-, GG^+][H^+]}{[DEHPH][GG^+]} \approx 0 \quad (\text{Équation 31})$$

$$Ka'_{GY} = \frac{[DEHP^-, GY^+][H^+]}{[DEHPH][GY^+]} \quad (\text{Équation 32})$$

$$Ka'_{AY} = \frac{[DEHP^-, AY^+][H^+]}{[DEHPH][AY^+]} \quad (\text{Équation 33})$$

$$Ka'_{LV} = \frac{[DEHP^-, LV^+][H^+]}{[DEHPH][LV^+]} \quad (\text{Équation 34})$$

$$Ka'_{LY} = \frac{[DEHP^-, LY^+][H^+]}{[DEHPH][LY^+]} \quad (\text{Équation 35})$$

$$\text{avec } Ka'_{GG} < Ka'_{GY} < Ka'_{AY} \leq Ka'_{LV} < Ka'_{LY}$$

Sur la Figure 49, nous pouvons noter que la différence entre les isothermes des peptides LV et AY est minime. Pourtant la différence de comportement des deux peptides est importante. Nous pouvons alors supposer que la polarité des peptides joue un rôle prépondérant dans leur comportement vis-à-vis du DEHPA, le peptide LV étant plus apolaire que le peptide AY.

Nous pouvons également remarquer que la différence entre les isothermes des peptides LV et LY est suffisante pour assurer une bonne sélectivité lors de l'étape d'extraction.

La pente de la partie linéaire de l'isotherme (notée a) renseigne sur les interactions mises en jeu lors de l'extraction :

- si $a = 0$, l'analyte n'interagit pas avec l'échangeur, et ne sera donc pas extrait en phase organique ;
- si $a = 1$, une mole d'échangeur est nécessaire pour extraire une mole d'analyte, les entités impliquées dans ce cas sont de véritables paires d'ions ;
- si $0 < a < 1$: plusieurs moles d'échangeur sont nécessaires à l'extraction des analytes, les entités mises en jeu sont alors de type agrégats ou micelles inverses.

Conformément à ce qui avait été observé expérimentalement, le peptide GG avec une pente de 0,005 n'interagit pour ainsi dire pas avec l'échangeur et n'est donc pas retenu.

Les autres peptides présentent tous une pente comprise entre 0 et 1. Il faut donc un excès de DEHPA pour extraire ces peptides. L'inverse de la pente obtenue nous donne le nombre de molécules de DEHPA nécessaires à l'extraction du peptide.

Tableau 10 : Ratios DEHPA/peptide optimaux obtenus par les isothermes de partage.

Peptide	Ratio DEHPA/peptide optimal
GY	6,53
AY	5,59
LV	6,13
LY	4,85

Nous pouvons remarquer Tableau 10 que l'optimum d'extraction des peptides est atteint pour un ratio DEHPA/peptide dont la médiane est proche de 5,5, confirmant là encore les observations expérimentales.

Le problème de déconvolution rencontré pour les peptides les plus apolaires, LV et LY, n'est donc pas lié à un problème de sélectivité lors de l'étape d'extraction, leurs isothermes de partage étant suffisamment éloignées. Le problème se situe donc probablement à l'étape de dés extraction, *i.e.* de déplacement. Les conditions optimisées obtenues à ce stade sont un ratio DEHPA/peptide d'environ 5,5 et un ratio DEHPA/HCl de 1,5.

Pour résoudre ce problème, deux stratégies sont envisageables pour essayer d'apporter plus de sélectivité: jouer sur le déplaceur HCl, ou jouer sur l'échangeur. Agir sur l'échangeur n'est possible que dans la mesure où le DEHPA est un échangeur ionisable, faible, son état d'activation pouvant être ainsi modulé.

Ces deux voies ont été explorées en parallèle et ont conduit chacune à des développements propres.

II.1.3.3 Recherche d'un autre déplaceur

Un bref retour sur l'échangeur et sur ces utilisations est nécessaire pour identifier un déplaceur potentiellement utilisable.

II.1.3.3.1 Introduction sur le DEHPA

Dans la littérature, le DEHPA est rapporté comme un excellent agent extractant de divers métaux, comme l'uranium,¹² des lanthanides,^{13, 14} l'indium, l'antimoine,¹⁵ des alcalino-terreux,¹⁶ etc. Il est particulièrement utilisé en hydrométallurgie,¹⁷ mais également pour le recyclage de certains métaux comme le nickel.¹⁸

Dans les années 70, une première application en chromatographie liquide/liquide fut publiée pour la purification de terres rares.¹⁹ Au début des années 2000, Wang et *al.* ont décrit une méthode de séparation des ions Calcium (II), Zinc (II), Magnésium (II), Strontium (II) et Baryum (II) en CPC utilisant des acides phosphoriques organiques, dont le DEHPA, comme extractants.¹⁶ Ils ont utilisé pour cela un système binaire heptane/eau, la désextraction des métaux étant assurée par l'ajout d'acide chloroacétique dans la phase mobile.

Nous avons donc envisagé d'utiliser des cations métalliques en tant que déplaceur, le DEHPA semblant montrer une affinité particulière pour ces espèces. Parmi les exemples cités, les alcalino-terreux, les métaux alcalins ainsi que certains métaux de transition semblent de bons candidats, au regard de leur coût et de leur innocuité.

II.1.3.3.2 Sélection d'ions métalliques en tant que déplaceurs

Nous avons sélectionné une dizaine de sels de cations métalliques à tester en tant que déplaceur : chlorure de sodium (NaCl) ; chlorure de potassium (KCl) ; chlorure de calcium (CaCl₂) ; chlorure de zinc (ZnCl₂) ; sulfate de cuivre (CuSO₄) ; chlorure de magnésium (MgCl₂) ; chlorure de manganèse (MnCl₂) ; chlorure ferrique (FeCl₃) ; nitrate d'argent (AgNO₃)...

Criblage des déplaceurs cationiques

Pour réaliser ces tests en piluliers, 40 ml de système biphasique MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v) ont été préparés en mélangeant des quantités appropriées de chaque solvants.

Dans 10 ml de phase organique a été solubilisée une quantité adaptée de DEHPA de manière à obtenir une concentration en échangeur de 20 mM. 10 ml de phase aqueuse contenant une quantité définie du mélange des cinq dipeptides ont ensuite été additionnés aux 10 ml de phase organique contenant l'échangeur. Après agitation, le système a été laissé jusqu'à décantation totale, ce système sera ensuite appelé système A.

Dans des piluliers ont été introduits des quantités aliquotes des différents déplaceurs à tester (1/pilulier) solubilisés dans 1 ml de phase aqueuse fraîche (sans peptides) du système biphasique. 1 ml de phase organique du système A (DEHPA + peptides) a ensuite été ajouté dans chaque pilulier. Après agitation et décantation, 10 µl de chaque phase ont été déposés sur plaque de silice pour analyse, en comparaison avec un témoin contenant du HCl comme déplaceur.

Tous les cations métalliques testés semblent déplacer la totalité des peptides dans une proportion plus ou moins importante. En se fixant comme critère de sélection un coût peu élevé et une grande innocuité, nous avons décidé d'utiliser de chlorure de calcium comme déplaceur. Des tests de déplacement en CPC ont été ainsi réalisés.

Tableau 11 : Conditions opératoires utilisées pour la sélection d'un déplaceur cationique.

Expérience	Exp. 11
[DEHPA]	15 mM avec 0,32 mM de TEA
Ratio DEHPA/peptides	5,4
[CaCl ₂]	1,44 mM
Ratio DEHPA/CaCl ₂	10,4
Temps addition CaCl ₂	Front de solvants + 10 min
[HCl]	10 mM
Mode	Descendant
Débit	2 ml/min
Rotation	1200 rpm
Rétention de phase stationnaire	72 %
Perte de charge	35 bars

L'emploi du CaCl₂ a permis une meilleure séparation des peptides GY et AY, avec une diminution significative de la zone de recouvrement des pics et ce même à une concentration relativement faible (1,44 mM). Les peptides LV et LY ne sont en revanche pas mobilisés par le nouveau déplaceur. Pour les faire émerger de la colonne, l'ajout d'HCl (déplaceur initial) a été nécessaire.

L'utilisation de cations métalliques en tant que déplaceur fait basculer le procédé de l'échange d'ions faible à l'échange d'ions fort, en considérant uniquement les peptides GY et AY. En effet le DEHPA demeure ionisé durant toute la durée du déplacement par les ions calcium (I.4.4.3). La classification du procédé en échange d'ions faible ou fort va donc dépendre cette fois de la nature du déplaceur utilisé.

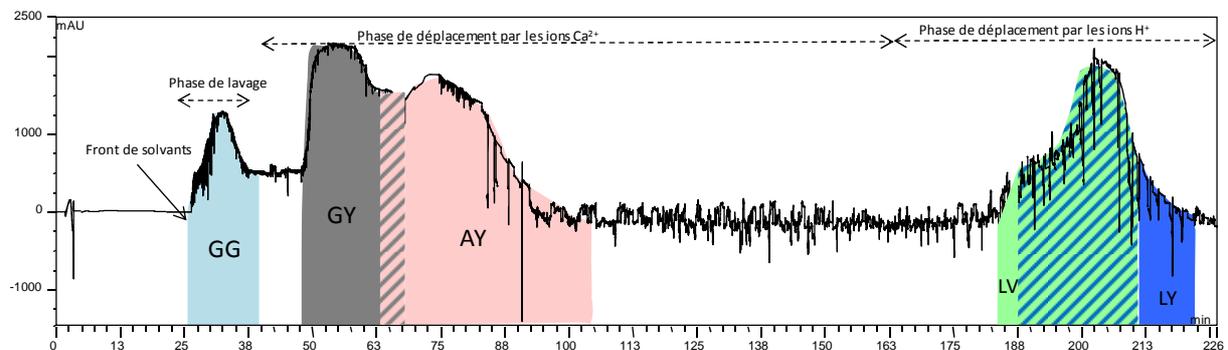


Figure 50 : Chromatogramme CPC de l'expérience 11 (Tableau 11).

Ainsi, les peptides de polarité intermédiaire étant déplacés sélectivement par les ions calcium, et les peptides les plus apolaires nécessitant l'ajout d'acide chlorhydrique pour être mobilisés, l'utilisation d'une paire de déplaceurs fort/faible a été envisagée pour apporter de la sélectivité et de la modularité au procédé. Le procédé d'échange d'ions ne sera ainsi ni fort ni faible mais mixte.

II.1.3.4 L'échange d'ions mixte (MIXCPC)

II.1.3.4.1 Concept

Ce concept original repose sur l'utilisation d'une paire de déplaceurs, l'un fort et l'autre faible, durant la même expérience chromatographique. Ce développement n'est bien entendu utilisable uniquement avec des échangeurs dits faibles, comme le DEHPA.

L'échange d'ion mixte permet de contrôler totalement la mobilisation des analytes selon leur affinité avec l'échangeur. Dans notre cas, le déplacement des peptides apolaires n'est déclenché que lorsque le second déplaceur (HCl) est introduit dans la colonne. Lors du fractionnement d'un hydrolysate peptidique par exemple, les peptides présentant un caractère apolaire pourront être ainsi facilement séparés des autres.

II.1.3.4.2 Mise au point du procédé

Il nous a fallu ajuster différents paramètres, tels que le moment d'introduction du second déplaceur dans la colonne, ainsi que le ratio DEHPA/HCl. En effet, l'HCl ne mobilisant plus que deux peptides et les ions calcium, la concentration nécessaire pour un déplacement optimal peut être différente.

Nous sommes repartis des conditions expérimentales de l'expérience 11 : concentration en HCl de 10 mM, introduction de ce dernier 60 min après la fin des pics de GY et AY. Nous nous sommes attachés dans un premier temps à l'optimisation du délai d'introduction du second déplaceur dans la colonne.

Tableau 12 : Conditions opératoires utilisées pour l'ajustement des paramètres expérimentaux en MIXCPC.

Expérience	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14
[DEHPA]	15 mM avec 0,32 mM de TEA			
Ratio DEHPA/peptides	5,4			
[CaCl ₂]	1,44 mM			
Ratio DEHPA/CaCl ₂	10,4			
Temps addition CaCl ₂	35 min	36 min	33 min	32 min
[HCl]	10 mM	10 mM	10 mM	2,5 mM
Ratio DEHPA/HCl	1,5	1,5	1,5	6
Temps addition HCl	60 min après fin du pic AY	dès fin pic AY	30 min après début pic GY	
Mode	Descendant			
Débit	2 ml/min			
Rotation	1200 rpm			
Rétention de phase stationnaire	72 %	73 %	74 %	77 %
Perte de charge	35 bars	36 bars	35 bars	33 bars

Sur la Figure 51, nous pouvons remarquer, que l'addition du HCl avant la fin du plateau GY-AY (exp 13 et 14) ne perturbe pas la qualité de la séparation, mais entraîne une déformation du profil chromatographique d'AY qui a tendance à "traîner" un peu plus.

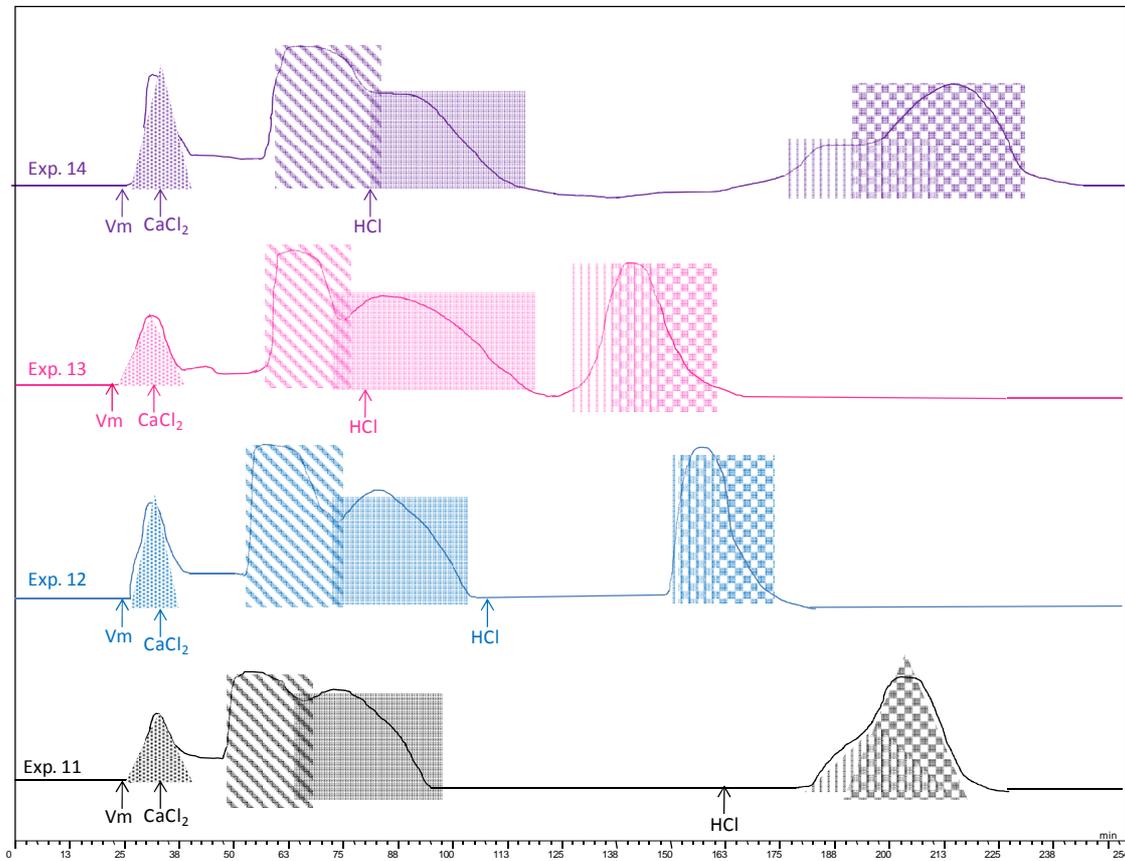


Figure 51 : Chromatogrammes CPC obtenus dans les conditions des expériences 11, 12, 13 et 14 (Tableau 12), chaque peptide étant représenté par une forme : GG (triangle pointillé), GY (rectangle hachuré), AY (rectangle plein), LV (triangle puis rectangle à rayures verticales) et LY (triangle puis rectangle à carreaux).

Dans les expériences 12 et 13, les peptides LV et LY sont très peu séparés. En analysant le fractogramme CCM de ces expériences (Figure 52), ces deux peptides émergent sur un temps très court avec des fronts très compressifs.

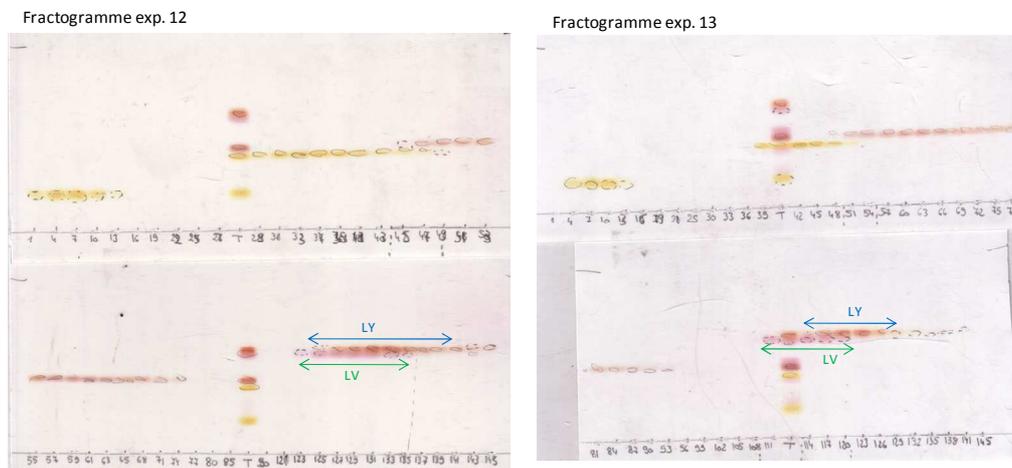


Figure 52 : Fractogrammes CCM des expériences 12 et 13.

Ces peptides semblent alors émerger de la colonne sous forme d'un bloc très compressif formé vraisemblablement par une succession de zones de front trop rapprochées. Une solution consiste en la diminution de la concentration du second déplaceur, l'HCl.

Pour l'expérience 14, la quantité d'HCl introduite a été ainsi diminuée (2,5 mM) pour conduire à un ratio DEHPA/HCl égal à 6. Ces conditions permettent d'obtenir un début de déconvolution des pics des peptides LY et LV. Néanmoins la zone de mélange demeure importante. Les conditions ne sont donc toujours pas optimales pour la séparation de ces deux dipeptides.

Entre la fin des pics des peptides déplacés par les ions calcium, et l'apparition de ceux déplacés par l'HCl, une zone de latence est observée. Cette zone transparente aux UV correspond au déplacement des ions calcium par l'HCl. Dans les travaux de Wang *et al.* la désorption des ions calcium extraits est mise en œuvre par l'addition d'un acide fort, l'acide chloroacétique. L'HCl étant lui-même un acide fort, il va déplacer les ions calcium présents dans la colonne après le déplacement des peptides GY et AY. Ceci s'explique tout simplement par le fait que l'HCl va neutraliser, et donc désactiver le DEHPA, qui va ainsi perdre sa capacité échangeuse. Le mécanisme de déplacement le plus "puissant" est donc celui qualifié de faible. Il apparaît ainsi clairement que la notion d'échange d'ions fort et faible ne préjuge en rien de la force des interactions échangeur/déplaceur.

Nous pouvons alors définir des constantes de sélectivité qui vont évoluer dans l'ordre suivant :

$$K_{Ca^{2+}/GG^{+}} > K_{Ca^{2+}/GY^{+}} > K_{Ca^{2+}/AY^{+}} > K_{H^{+}/Ca^{2+}} > K_{H^{+}/LV^{+}} > K_{H^{+}/LY^{+}} \quad (\text{Équation 36})$$

Une contamination par le chlorure de calcium de la fraction contenant le peptide AY a également été observée. Dès l'introduction de l'HCl dans la colonne, les ions calcium commencent à être mobilisés. La présence de chlorure de calcium en quantité non négligeable en fin de plateau du peptide AY semble indiquer que le train isotachique mobilisé par l'HCl se déplace à une vitesse supérieure à celle du train engendré par les ions calcium. Nous l'avons vu la vitesse d'un train isotachique est sous la dépendance exclusive de la concentration en déplaceur introduite. Or la concentration en HCl utilisée pour les expériences 11 à 13 est environ 2 fois supérieure à celle du chlorure de calcium, la différence de vitesse observée est donc logique. Le front d'ions calcium va ainsi rattraper la fin de celui du peptide AY et commencer à émerger de la colonne conjointement avec ce dernier. Il n'y a donc pas un mais deux trains isotachiques indépendants générés au cours d'un développement par d'échange d'ions mixte.

L'introduction du mode échange d'ions mixte, avec l'utilisation du chlorure de calcium (1,44 mM), a conduit à une optimisation de la séparation des peptides de polarité intermédiaire GY et AY, tout en introduisant une certaine modularité dans le procédé. Une augmentation du ratio DEHPA/HCl à 6 a permis quant à elle d'obtenir une déconvolution partielle des peptides apolaires LV et LY.

Le problème de sélectivité entre les deux peptides apolaires n'a été que partiellement résolu, le déplacteur assurant leur mobilisation étant toujours l'HCl. Un paramètre est pour le moment demeuré inchangé au cours de cette étude: la quantité de TEA introduite dans le système. Nous allons alors étudier l'impact de ce dernier facteur sur la séparation des peptides.

II.1.3.5 Impact de la quantité de TEA introduite dans le système

La seconde voie d'optimisation, jouer sur l'échangeur, est ici décrite. La TEA joue ici le rôle de reteneur mais également d'agent d'activation pour le DEHPA en favorisant son passage sous la forme phosphate anionique. Cette étude a été réalisée parallèlement à la mise au point du procédé par échange d'ions mixte, c'est la raison pour laquelle le ratio DEHPA/HCl de 1,5 a été utilisé dans les expériences qui vont suivre.

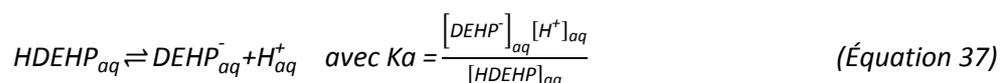
Il nous a fallu déterminer dans un premier temps quelle était la proportion de DEHPA sous forme phosphate "active" dans notre système biphasique de solvants, sans ajout de TEA.

II.1.3.5.1 Détermination du pKa apparent du DEHPA

Le DEHPA est un acide considéré comme fort avec un pKa théorique estimé de 1,45.¹⁴ Notre système biphasique présente un pH apparent (mesuré dans la phase aqueuse) de 5,3. L'addition du DEHPA dans les proportions utilisées pour le dosage entraîne une diminution de ce pH à 3,3, preuve du caractère acide de l'échangeur. Au pH du système, en considérant le pKa théorique du DEHPA, ce dernier devrait être totalement sous forme anionique.

Pour connaître l'état d'ionisation du DEHPA dans notre système biphasique, il est nécessaire de déterminer son pKa apparent dans ce système biphasique, vu de la phase aqueuse.

En effet, le comportement d'une espèce acide (ou basique) en milieu biphasique va induire une modulation de sa constante d'acidité ce qui conduit ainsi à la notion de pKa apparent. Le partage de l'échangeur préférentiellement dans une des deux phases (la phase organique) va entraîner un déplacement des équilibres acido-basiques classiques, et ainsi modifier les constantes d'acidité théoriques de ces espèces. Le pH de la phase aqueuse va en d'autres termes être conditionné par le rapport des coefficients de distribution des formes déprotonée et neutre. On peut alors décrire l'équilibre acido-basique suivant en phase aqueuse:



avec HDEHP échangeur DEHPA sous forme acide

DEHP⁻ échangeur sous forme phosphate

En considérant les équilibres de partage, on obtient :

$$K_{D\ HDEHP} = \frac{[HDEHP]_{org}}{[HDEHP]_{aq}} \quad \text{et} \quad K_{D\ DEHP^-} = \frac{[DEHP^-]_{org}}{[DEHP^-]_{aq}} \quad (\text{Équation 38})$$

d'où:

$$K_a = [H^+]_{aq} \times \frac{[DEHP^-]_{org}}{[HDEHP]_{org}} \times \frac{K_{D\ HDEHP}}{K_{D\ DEHP^-}} \quad (\text{Équation 39})$$

et
$$pK_a = pH - \log\left(\frac{[DEHP^-]_{org}}{[HDEHP]_{org}}\right) - \log\left(\frac{K_{D\ HDEHP}}{K_{D\ DEHP^-}}\right) \quad (\text{Équation 40})$$

d'où
$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[DEHP^-]_{org}}{[HDEHP]_{org}}\right) + \log\left(\frac{K_{D\ HDEHP}}{K_{D\ DEHP^-}}\right) \quad (\text{Équation 41})$$

Le pKa apparent dans la phase aqueuse est alors obtenu par la relation suivante:

$$pK_a^{app} = pK_a + \log\left(\frac{K_{D\ HDEHP}}{K_{D\ DEHP^-}}\right) \quad \text{avec} \quad \log\left(\frac{K_{D\ HDEHP}}{K_{D\ DEHP^-}}\right) > 0 \quad (\text{Équation 42})$$

Le pKa mesuré sera donc supérieur à celui classiquement attendu pour un acide phosphorique.

Protocole de titrage du DEHPA

100 ml de système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v) ont été préparés en mélangeant les proportions adéquates de chaque solvants.

Une solution de DEHPA titrant 0,12 M a été préparée en additionnant une quantité adaptée de DEHPA dans 50 ml de phase organique. A cette solution, 50 ml de phase conjuguée aqueuse ont été ajoutés pour obtenir un volume final de 100 ml. Le DEHPA sous forme acide (HDEHP) a été titré par une solution de soude NaOH titrée à 0,988 M. Le suivi pHmétrique de la phase aqueuse a été réalisé à l'aide d'un pH-mètre MettlerLab pHM240 équipé d'une électrode Cole-Parmer EW-5990-30.

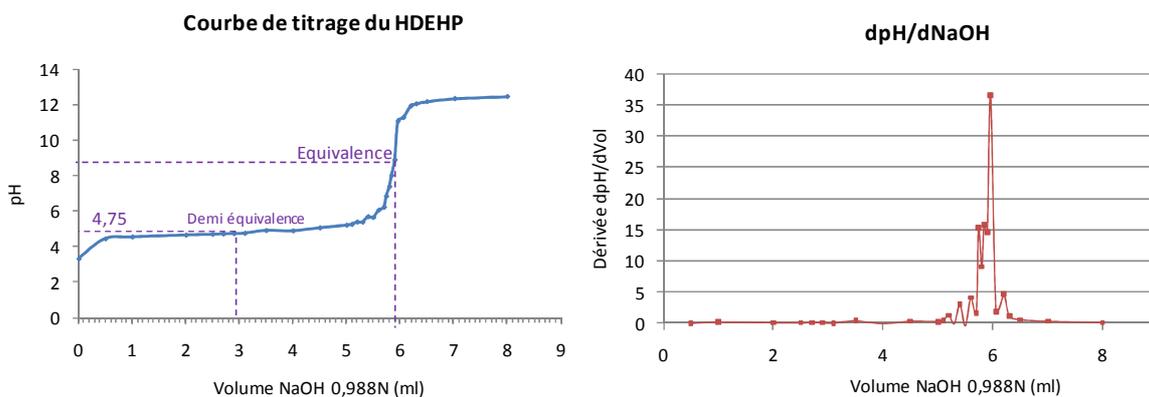


Figure 53 : Courbe de titrage du DEHPA dans le système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v) par la soude à 0,988 M (en haut) ; dérivée dpH/dNaOH de la courbe de titrage (en bas).

Le pKa apparent du DEHPA est obtenu directement par la lecture de la valeur du pH à la demi-équivalence sur la courbe de titrage. On obtient ainsi :

$$pK_{a_{\text{HDEHP}}}^{\text{app}} = -\log K_{a_{\text{HDEHP}}}^{\text{app}} = 4,75 \quad (\text{Équation 43})$$

$$\text{avec} \quad K_{a_{\text{HDEHP}}}^{\text{app}} = \frac{[\text{DEHP}^-]_{\text{aq}} [\text{H}^+]}{[\text{HDEHP}]_{\text{aq}}} = 10^{-4,75} \quad (\text{Équation 44})$$

Au pH du système, la proportion de forme anionique active est obtenue par la relation suivante:

$$pH = -\log[\text{H}^+] = 3,3 \quad \text{soit} \quad [\text{H}^+] = 10^{-3,3} \quad (\text{Équation 45})$$

En remplaçant cette valeur dans l'équation 45, on obtient :

$$\frac{[\text{DEHP}^-]_{\text{aq}} 10^{-3,3}}{[\text{HDEHP}]_{\text{aq}}} = 10^{-4,75} \quad \text{soit} \quad \frac{[\text{DEHP}^-]_{\text{aq}}}{[\text{HDEHP}]_{\text{aq}}} = 10^{-1,45} = 0,035 \quad (\text{Équation 46})$$

Dans le système initial, seulement 3,5% de l'échangeur est sous forme anionique active. En ajoutant une base organique au système, cette proportion va augmenter et théoriquement le potentiel échangeur également. L'étude de l'impact de la quantité de base TEA introduite dans le système sur l'extraction des peptides va donc être importante.

II.1.3.5.2 Impact de la quantité de TEA introduite en phase stationnaire

Pour étudier cet impact, nous avons évalué la proportion de peptides extraits en phase organique en fonction de la quantité de TEA introduite.

Protocole d'étude de l'impact de la quantité de TEA introduite

200 ml de système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v) ont été préparés en mélangeant les proportions adéquates de chaque solvants.

Des solutions des peptides GG, GY et VL ont été préparées en additionnant des quantités appropriées de chaque dipeptides dans 10 ml de phase aqueuse, pour obtenir une concentration finale de 30 mM.

Des solutions de DEHPA contenant différentes quantités de TEA ont été préparées en additionnant une quantité adéquate de DEHPA telle que la concentration obtenue soit de 162 mM (5,4 fois celle des peptides). Un volume approprié de TEA a été ensuite ajouté pour obtenir les quantités présentes suivantes : 2,15 ; 5 ; 10 ; 15 ; 30 % en TEA (pourcentage calculé par rapport au nombre de moles de DEHPA présentes dans la solution).

Dans des piluliers, 1 ml de phase aqueuse contenant un peptide a été additionné d'1 ml de phase organique contenant du DEHPA avec différentes quantités de TEA. Après agitation et décantation, 200 µl de chaque phase ont été mélangés avec 200 µl de la phase conjuguée fraîche (sans peptide ou DEHPA) et 200 µl de MeOH pour rendre le système monophasique. La concentration en peptide dans chaque phase a été déterminée par CLHP.

Protocole CLHP utilisé

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex Summit HPLC (Dionex, USA), équipée d'une pompe P580, d'un injecteur automatique ASI-100, d'un four à colonne STH et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD340S. La colonne utilisée est une colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 μ m) équipée d'une pré-colonne SecurityGuard analytique KJO-4282 avec des cartouches (4 x 3,0 mm C12) (Phenomenex, Le Pecq, France). Les éluants utilisés sont de l'eau contenant 0,1% TFA et de l'acétonitrile contenant 0,09% TFA. Le gradient utilisé est le suivant. Le point de départ est une phase 100% aqueuse. La quantité d'acétonitrile est portée à 25% (v/v) en 15 min, puis à 50% (v/v) en 30 minutes et maintenue à 50 % (v/v) pendant 5 min. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,5 ml par minute. La détection UV a été fixée à $\lambda = 215$ nm et la température du four a été réglée à 25 °C. Le volume d'injection est de 40 μ l pour des solutions concentrées à 5 mg/ml. La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

Nous avons obtenus ainsi les courbes suivantes :

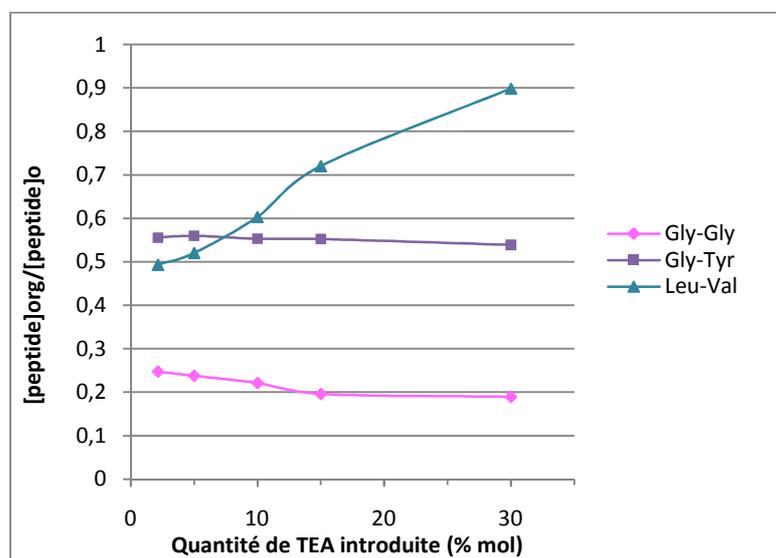


Figure 54 : Courbes représentant la proportion de peptides extraits en phase organique en fonction de la quantité de TEA introduite dans le système.

L'impact de la quantité de TEA introduite dans le système sur l'extraction des peptides polaires et de polarité intermédiaire semble quasiment nul voire négatif. En revanche, les peptides à caractère apolaire, représentés ici par LV, ont montré une extraction grandement améliorée en présence d'une quantité de TEA. Le pourcentage de peptide présent en phase organique passe de 60 % pour une quantité de TEA égale à 10 % du nombre de moles de DEHPA introduit, à 90 % lorsque ce taux de TEA atteint 30 %.

Cet impact non négligeable pourrait expliquer le profil imparfait des peptides LV et LY dans les conditions précédemment testées où la quantité de TEA présente était fixée à 2,15 % (moles/moles DEHPA). L'impact sur l'extraction des autres catégories de peptides semblant négligeable, nous avons

donc menés des essais de purification du mélange de 5 dipeptides en utilisant une phase stationnaire contenant 30 % (moles/moles DEHPA) de TEA.

Préalablement, nous nous sommes assuré que l'ajout de TEA en quantité importante dans le système, n'entraînait pas une déstabilisation de ce dernier. Nous avons ainsi construit le pseudodiagramme ternaire correspondant.

Construction des pseudo-diagrammes ternaires

Les isothermes de solubilité (ou courbes binodales) de l'échangeur de cations DEHPA avec différentes quantités de TEA (2,15 et 30%(moles/moles DEHPA)) dans le système biphasique de solvants MtBE/CH₃CN/n-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v) ont été déterminées à la température ambiante (22 ± 2 °C). Les densités des deux phases du système biphasique de solvants ont été mesurées. Des rapports prédéfinis (m/m) phase aqueuse/phase organique ont été successivement ajoutés à 2 g de DEHPA jusqu'à l'apparition de la phase conjuguée. Les coordonnées de points obtenus ont été tracées pour obtenir un diagramme ternaire qui a été représenté en pourcentage du poids et dans le format orthogonal.

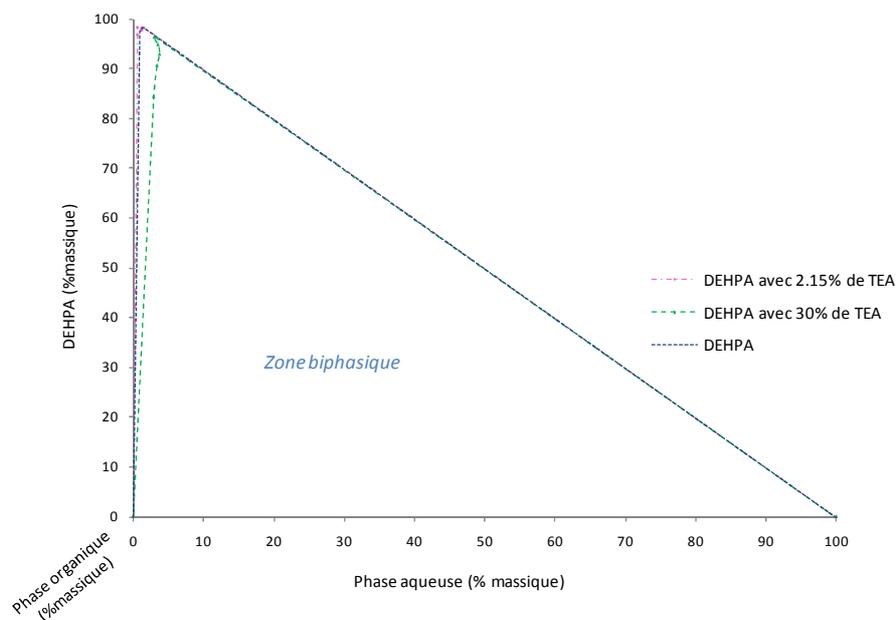


Figure 55 : Pseudodiagramme ternaire du DEHPA (% massique) dans le système MtBE/CH₃CN/n-BuOH/eau (2:1:2:5, v/v) en présence de différentes quantités de TEA.

La zone biphasique du pseudodiagramme demeurant sensiblement la même en présence de 30 % de TEA, le système est considéré comme robuste.

La stabilité du système étant assurée même avec taux de TEA atteignant les 30%, nous avons donc essayé des séparations du mélange de nos cinq dipeptides utilisant une phase stationnaire contenant 30 %(moles/moles DEHPA) de TEA.

Tableau 13 : Conditions opératoires CPC avec 30 % de TEA dans la phase stationnaire.

Expérience	Exp. 15	Exp. 16
[DEHPA]	15 mM avec 4,5 mM de TEA	
Ratio DEHPA/peptides	5,4	
[CaCl ₂]	1,44 mM	
Ratio DEHPA/CaCl ₂	10,4	
Temps addition CaCl ₂	Front de solvants + 10 min	10 min après pic GG
[HCl]	10 mM	
Ratio DEHPA/HCl	1,5	
Temps addition d'HCl	30 min après début plateau GY	
Mode	Descendant	
Débit	2 ml/min	
Rotation	1200 rpm	
Rétention de phase stationnaire	75 %	75 %
Perte de charge	33 bars	32 bars

Les peptides LV et LY présentent enfin un profil typique de déplacement en bloc (Figure 56), même si la zone de recouvrement demeure un peu élevée. L'augmentation de la proportion de TEA a permis comme cela était attendu de faciliter les étapes d'extraction/déplacement de ces deux peptides apolaires.

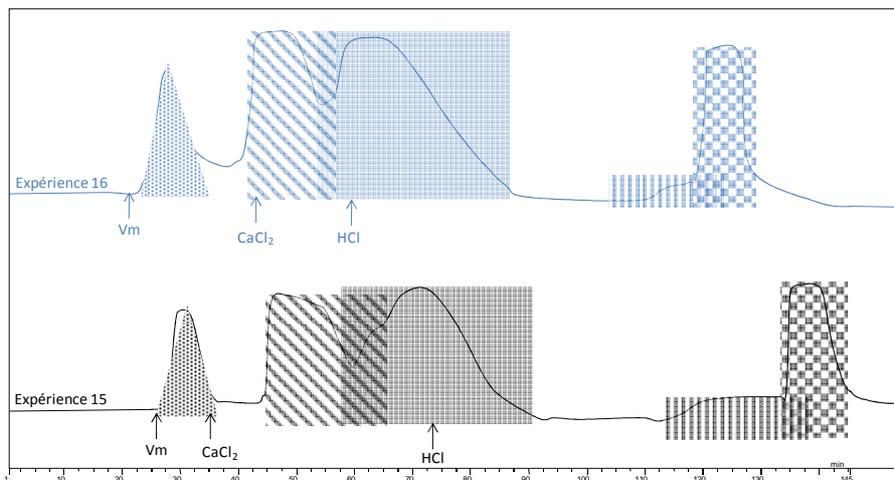


Figure 56 : Chromatogrammes CPC des expériences 15 et 16 (Tableau 13) chaque peptide étant représenté par une forme : GG (triangle pointillé), GY (rectangle hachuré), AY (rectangle plein), LV (rectangle à rayures verticales) et LY (rectangle à carreaux).

En revanche, les peptides GY et AY ne sont plus retenus par la phase stationnaire, et émergent même avant l'addition du déplaceur durant l'expérience 16. Bien que l'effet de l'augmentation de la proportion de TEA sur l'extraction des peptides de polarité intermédiaire semble inexistant de prime abord, ceux-ci n'interagissent plus suffisamment avec l'échangeur pour être retenus. Ce que nous avons gagné d'un côté, nous l'avons ainsi perdu de l'autre.

L'augmentation de la quantité de TEA introduite à 30% a permis d'obtenir un profil de déplacement pour les peptides LV et LY, mais a conduit à une détérioration de la rétention des peptides GY et AY, qui n'interagissent plus suffisamment avec le DEHPA.

En échange d'ions classique (sur résine), des colonnes présentant différentes résines comme phases stationnaires ont été décrites. En mélangeant les supports de façon judicieuse, les avantages de chaque résine sont cumulés tout en compensant en partie leurs désavantages respectifs. La nature liquide de la phase stationnaire en CPC autorise bien entendu ce genre de phase stationnaire. Nous pouvons ainsi imaginer l'utilisation d'une phase stationnaire contenant deux taux de TEA différents : une avec 30 % (moles/moles DEHPA) de TEA et l'autre avec 2,15 % (moles/moles DEHPA).

II.1.3.6 Segmentation de la phase stationnaire

La phase stationnaire contenant 2,15 % (moles/moles DEHPA) de TEA a permis l'obtention de conditions de séparations optimales pour les peptides de polarité intermédiaire, et celle contenant 30 % (moles/moles DEHPA) de TEA a en revanche amélioré de façon significative le comportement des peptides apolaires. En tirant avantage de la nature liquide de la phase stationnaire, nous pouvons non seulement imaginer l'emploi d'une phase stationnaire contenant deux quantités différentes de TEA, mais également d'adapter la proportion relative de ces deux phases. Un nouveau concept est alors introduit en chromatographie liquide/liquide par échange d'ions : l'utilisation d'une phase stationnaire inhomogène segmentée.

Segmentation de la phase stationnaire

La colonne de CPC a été tout d'abord conditionnée par passage de 2 volumes de colonne d'un mélange méthanol (MeOH)/eau (50 : 50, v/v).

Les paramètres chromatographiques utilisés sont les suivants : mode descendant ; vitesse de rotation de la colonne 1200 rpm ; débit de phase mobile 2 ml/min ; collecte des fractions toutes les minutes.

1,5 litre de système biphasique de solvants ont été préparés par mélange des quantités appropriées de chaque solvant. Après décantation, les deux phases du système ont été récupérées séparément. Un volume adapté de phase organique a été additionné d'une quantité définie d'échangeur (DEHPA) puis de TEA à un taux de 2,15 %, un second volume de phase stationnaire a été préparé dans les mêmes conditions avec une teneur en TEA de 30 %. Un volume adapté de phase mobile aqueuse a été additionnée d'une quantité fixée de déplaceurs (CaCl₂ puis HCl). La colonne a été remplie par 2 volumes de colonne de phase stationnaire organique contenant l'échangeur avec une quantité définie de TEA. Puis la seconde phase stationnaire a ensuite été introduite dans la colonne jusqu'à remplir un segment de la colonne de longueur définie.

L'injectat contient environ 0,1 mmole (entre 0,1 et 0,07) de chaque dipeptide solubilisés dans 10 ml d'un mélange phase mobile/phase stationnaire fraîches (sans échangeur ni déplaceur) dans un rapport (1:3, v/v).

L'injectat a été introduit dans la colonne à $t=0$. Le ou les déplaceur(s) ont été introduits à un moment t déterminé par l'opérateur.

Le suivi de la séparation se fait par détection UV aux longueurs d'onde 215 nm, 254 nm et 280 nm ; ainsi que par analyse en CCM dans les conditions décrites précédemment.

Tableau 14 : Conditions opératoires utilisées lors de la segmentation de la phase stationnaire.

Expérience	Exp. 17
[DEHPA]	15 mM
Ratio DEHPA/peptides	5,4
Composition phase stationnaire	25 % à 30 % TEA puis 75 % à 2,15 % de TEA
[CaCl ₂]	1,44 mM
Ratio DEHPA/CaCl ₂	10,4
Temps addition CaCl ₂	Front de solvants +10 min
[HCl]	10 mM
Ratio DEHPA/HCl	1,5
Temps addition HCl	30 min après début du plateau GY
Mode	descendant
Débit	2 ml/min
Rotation	1200 rpm
Rétention de phase stationnaire	75 %
Perte de charge	34 bars

En se penchant sur les qualités des phases stationnaires que nous souhaitions cumuler, une composition de colonne s'est imposée. De la phase contenant 2,15% (moles/moles DEHPA) TEA, nous voulions conserver sa propension à retenir les peptides GY et AY tout en assurant une séparation optimale de ces composés. De la phase à 30 % (moles/moles DEHPA) de TEA, nous souhaitions conserver la bonne organisation du train isotachique des peptides LV et LY. Nous l'avons vu précédemment (I.4.4.3.2), le train isotachique s'organise dès l'entrée des analytes dans la colonne. La phase contenant 30 % de TEA devrait être ainsi située directement à l'entrée de la colonne pour assurer la bonne mise en place du train pour les peptides LV et LY. Les peptides GY et AY peu retenus par cette phase vont alors progresser rapidement dans ce segment de colonne et devront être ensuite "ralentis" par la phase stationnaire contenant 2,15 % (moles/moles DEHPA) de TEA. Il convient donc de conserver un segment de phase à 2,15% suffisamment long pour freiner les peptides GY et AY et assurer leur séparation.

La composition de la phase stationnaire de la colonne ainsi obtenue est schématisée ci-après :

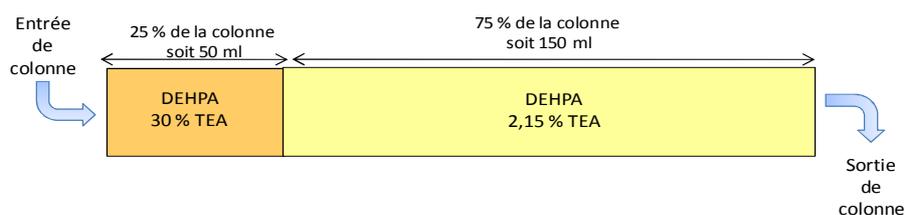


Figure 57 : Schématisation de la composition de la phase stationnaire segmentée.

Nous avons alors testé ces conditions (expérience 17 et Figure 58). Comme nous l'attendions, les peptides GY et AY sont cette fois bien retenus et séparés.

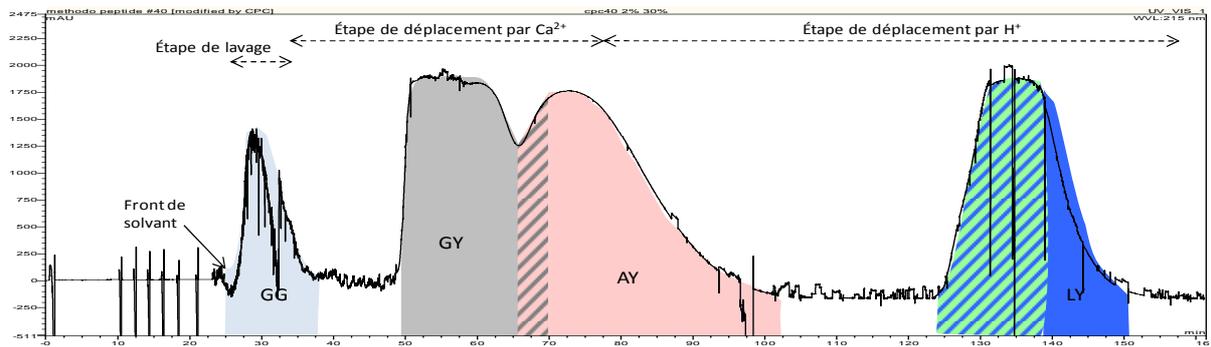


Figure 58: Chromatogramme CPC de la séparation des dipeptides. Conditions opératoires: système de solvants MtBE/ n-BuOH/ CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), DEHPA dans la phase stationnaire organique 15 mM avec 4,5 mM et 0,32 mM de TEA, dans les proportions 25% et 75% respectivement ; CaCl₂ 1,44 mM et HCl 3,22 mM dans la phase mobile aqueuse ; mode descendant, débit 2 ml/min, vitesse de rotation 1200 rpm, perte de charge 35 bars, rétention de la phase stationnaire 75%, détection UV à 215 nm.

Pour les peptides LV et LY, le profil obtenu est un bloc de déplacement vrai, qui lorsqu'il est analysé par CCM semble composé d'une succession de *shock layer*.

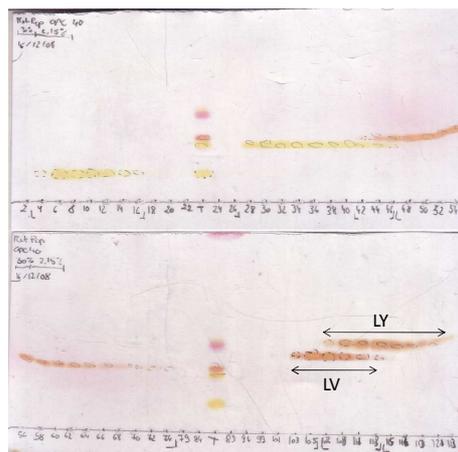


Figure 59 : Fractogramme CCM de l'expérience 17.

La segmentation de la phase stationnaire, selon le schéma 25% de phase stationnaire contenant 30% (moles/moles DEHPA) puis 75% de phase stationnaire contenant 2,15% de TEA (moles/moles DEHPA), a permis d'obtenir enfin un profil typique de déplacement pour les peptides LV et LY tout en permettant de conserver une séparation optimale pour les peptides GY et AY.

L'émergence des peptides apolaires sous forme d'une succession de *shock layer* a été observée lors de l'optimisation du déplaceur. Nous allons alors faire converger les différentes solutions apportées par les deux voies d'optimisation explorées.

II.1.3.7 Convergence des deux approches d'optimisation

La première approche d'optimisation consistait en une substitution du déplaceur initial HCl par un cation métallique, le calcium. Cette étude a abouti à la mise au point d'un procédé employant en fait le tandem $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ comme déplaceurs, les ions calcium déplaçant les peptides de polarité intermédiaire et les protons les peptides apolaires. Un procédé par échange d'ions mixte a ainsi pour la première fois été décrit. Egalement au cours de cette étude, l'émergence des peptides LV et LY sous forme d'une succession de shock layer a été pour la première fois constatée. Une déconvolution partielle des peptides avait été obtenue en amenant le ratio DEHPA/HCl de 1,5 à 6.

La seconde approche avait pour but une modulation de l'état d'activation de l'échangeur DEHPA, en jouant sur la quantité de reteneur (TEA) introduite. Nous avons ainsi montré qu'une augmentation de la quantité de TEA introduite en phase stationnaire à 30% (moles/moles DEHPA) permettait une meilleure extraction des peptides apolaires. L'emploi d'une phase stationnaire contenant 30% de TEA a néanmoins été écarté, du fait de la perte de rétention des peptides de polarité intermédiaire. Ces travaux ont ainsi conduit à la segmentation de la phase stationnaire en deux parties contenant des quantités de TEA différentes : 30% (moles/moles DEHPA) puis 2,15% (moles/moles DEHPA). Cette segmentation a permis l'obtention d'un profil de déplacement vrai pour les peptides apolaires, qui émergeaient néanmoins sous forme d'une succession de *shock layer*.

En combinant les avancées obtenues dans chacune des deux voies, nous obtenons les conditions optimales suivantes : une phase stationnaire segmentée avec l'utilisation du tandem de déplaceur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ avec les ratios DEHPA/ CaCl_2 égal à 10 environ et DEHPA/HCl égal à 6.

Tableau 15: Conditions opératoires mises en œuvre lors de la convergence des approches d'optimisation.

Expérience	Exp. 18
[DEHPA]	15 mM
Ratio DEHPA/peptides	5,4
Composition phase stationnaire	25% à 30 % TEA puis 75 % à 2,15 % de TEA
[CaCl_2]	1,44 mM
Ratio DEHPA/ CaCl_2	10,4
Temps addition CaCl_2	Front de solvants +10 min
[HCl]	2,5 mM
Ratio DEHPA/HCl	6
Temps addition HCl	30 min après début du plateau GY
Mode	descendant
Débit	2 ml/min
Rotation	1200 rpm
Rétention de phase stationnaire	76 %
Perte de charge	33 bars

Le chromatogramme ainsi que le fractogramme CCM obtenus sont représentés Figure 60.

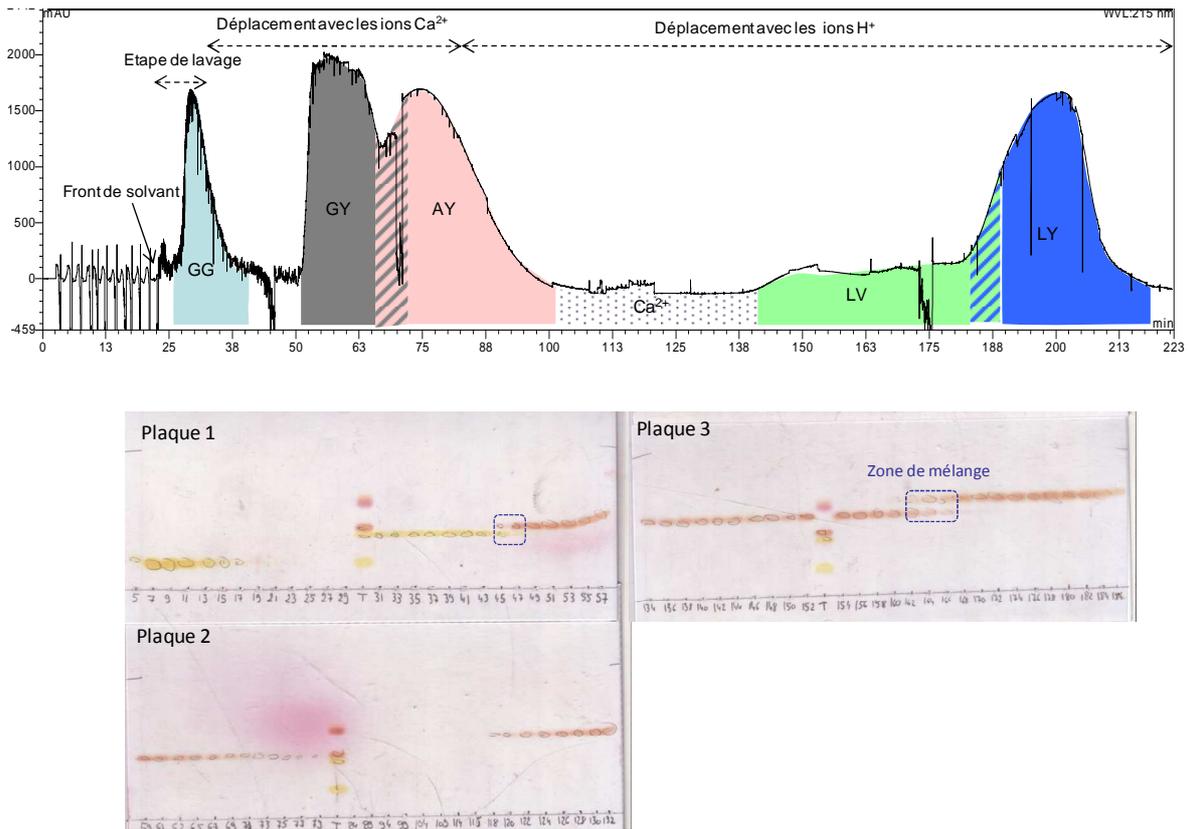


Figure 60 : Chromatogramme CPC et fractogramme CCM obtenus lors de l'expérience 18 (Tableau 15).

Dans ce cas, le rendement pour chaque dipeptide est situé aux environs de 95%.

Les conditions optimales sont donc :

- un ratio DEHPA/peptides de 5,4 ;
- une phase stationnaire segmentée avec une portion contenant un ratio TEA/DEHPA de 30% et représentant 25% (v/v) de la phase stationnaire initiale, suivi d'une portion contenant un ratio TEA/DEHPA de 2,15% ;
- un couple de déplaceurs, le CaCl_2 et l' HCl avec des ratios DEHPA/Dplc. de 10,4 et 6 respectivement.

Une fois ces conditions établies, nous avons réalisé une montée en échelle de ce procédé en multipliant les quantités de peptides injectées d'un facteur cinq (Figure 61).

Les conditions de séparations demeurent satisfaisantes. Comme classiquement décrit en chromatographie de déplacement, le profil d'émergence des peptides s'apparente d'autant plus à des blocs que la quantité injectée est augmentée, la proportion relative des zones de recouvrement diminuant par rapport à celle de produits purs.

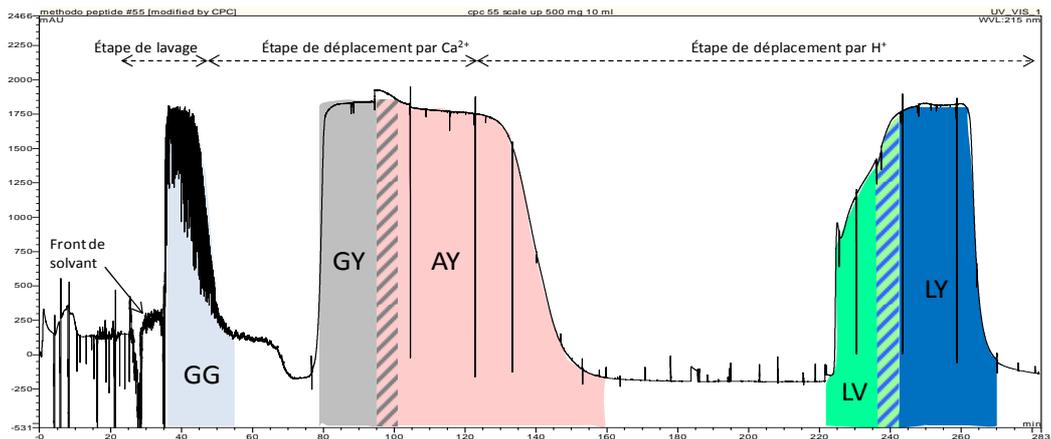


Figure 61 : Chromatogramme CPC obtenu après injection de 0,5 à 0,35 mM de chaque peptide (13,9 mM total). Conditions opératoires: système de solvants MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), DEHPA dans la phase stationnaire organique 75 mM avec 22,5 mM et 1,6 mM de TEA, dans les proportions 25% et 75% respectivement ; CaCl₂ 7,2 mM et HCl 12,5 mM dans la phase mobile aqueuse ; mode descendant, débit 2 ml/min, vitesse de rotation 1200 rpm, perte de charge 33 bars, rétention de la phase stationnaire 74% , détection UV à 215 nm.

Dans les faits, nous verrons plus tard dans le manuscrit que le ratio DEHPA/peptide optimal n'est pas fixe. L'application du procédé à la purification d'un peptide industriel de 17 acides aminés (II.2.2) a ainsi nécessité un excès d'échangeur équivalent à 100 fois la quantité de peptide introduit. Ce ratio peut alors s'envisager comme un ratio DEHPA/acide aminé lorsque la séquence du peptide n'est pas connue, ou comme un ratio DEHPA/charge positive si la séquence est connue.

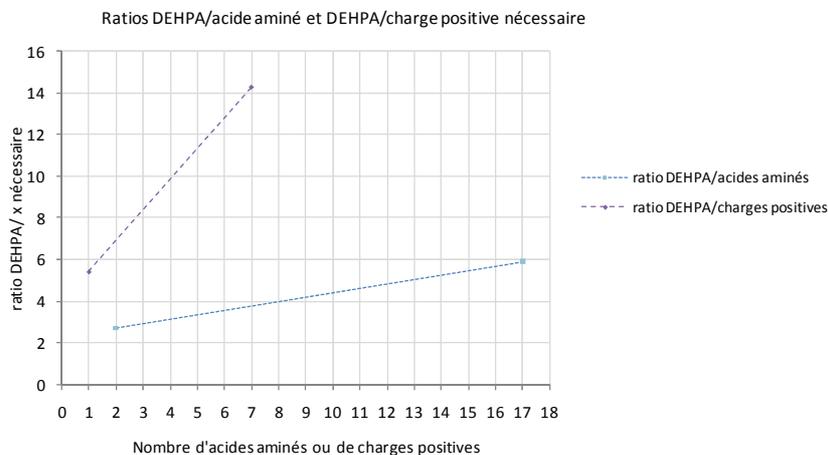


Figure 62 : Représentation graphique des ratios DEHPA/acides aminés et DEHPA/charges positives à utiliser en fonction de la longueur de la séquence du peptide ou du nombre de charges positives portées par ce dernier.

Bien entendu, n'ayant à notre disposition que deux valeurs différentes, les droites tracées n'ont qu'une valeur indicative. Néanmoins, la tendance dégagée a servi de point de départ sur lequel s'appuyer pour le travail d'autres sources, en particulier pour les extraits de luzerne, sérum et hydrolysats de concentré protéines/xanthophylles.

La procédure générale d'optimisation du procédé de purification de peptides par CPC en mode échange d'ions mixte est résumée Figure 63.

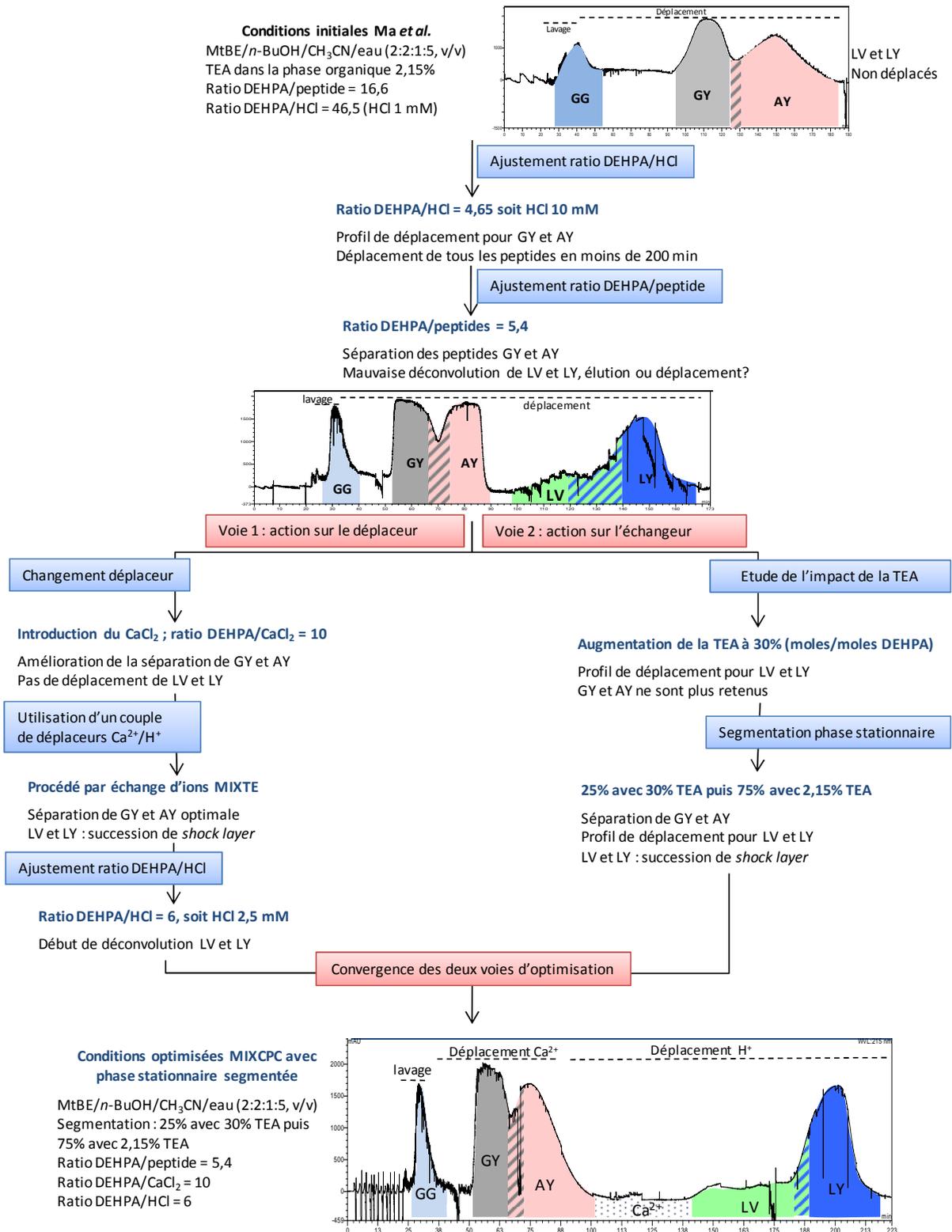


Figure 63 : Procédure d'optimisation du procédé de purification de peptides par échange d'ions en CPC.

Nous avons vu qu'un excès d'échangeur était nécessaire à l'extraction correcte de nos peptides. Cette constatation avait déjà été faite lors de précédents développements par échange d'ions faible ou fort au laboratoire. Cet excès soulève la question des espèces échangeur/analytes mises réellement en jeu lors du procédé par échange d'ions.

II.1.4 Etudes des interactions échangeur/peptides mises en jeu

Cette étude a été réalisée conjointement avec les docteurs Jean-Marc Nuzillard et Pedro Lameiras, tous deux appartenant à notre groupe de recherche Isolement & Structure (UMR 6229).

II.1.4.1 Introduction

II.1.4.1.1 Finalité de l'étude

Le développement par échange d'ions en CPC est basé sur la formation de paires d'ions entre l'échangeur sélectionné et les analytes dans un état d'ionisation adapté. Pourtant, au cours de la mise au point des différentes applications du procédé, il est apparu qu'un excès d'échangeur était nécessaire à l'extraction complète des analytes.^{7, 9} Cet excès pouvant aller jusqu'à trente fois la quantité d'analyte introduit.^{6, 10} Au cours de la mise au point du procédé par échange d'ions pour le polissage d'un peptide de 17 acides aminés (voir II.2.2), il est apparu qu'un excès en DEHPA 100 fois équivalent à la quantité de peptide introduit était nécessaire à l'extraction optimale de ce peptide.

La majorité des échangeurs utilisés sont des agents tensio-actifs potentiels : têtes hydrophiles avec des chaînes alkyles hydrophobes, pouvant présenter une tendance à l'agrégation. L'AOT, par exemple, est connu dans la littérature pour former de façon très aisée des micelles inverses (Figure 64) dans un milieu organique apolaire en présence d'eau.²⁰⁻²² Cet échangeur est par ailleurs utilisé pour l'extraction de biomolécules telles que des protéines et des peptides par le biais de micelles inverses.^{23, 24}

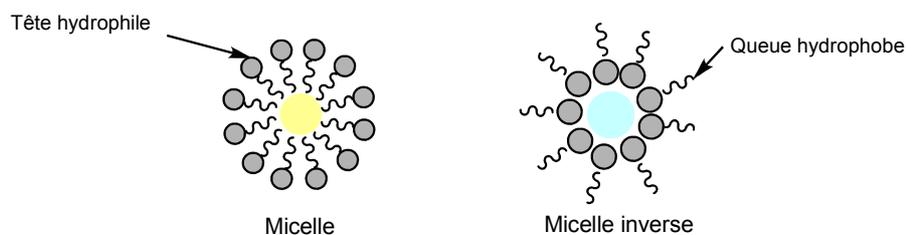


Figure 64 : Représentation d'une micelle avec un cœur organique (en jaune) et d'une micelle inverse avec un cœur aqueux (en bleu)

Le DEHPA, de structure très proche de l'AOT, ainsi que certains de ses sels (de sodium, de nickel, etc.) sont connus pour former des agrégats de tailles et de géométrie différentes, en particulier des micelles inverses, en phase organique apolaire en présence d'une quantité définie d'eau.^{14, 22, 25, 26}

En corrélant ces différentes données, nous nous sommes interrogés sur la vraisemblance de la formation de micelles inverses dans le cas du développement par échange d'ions en CPC.

Pour caractériser les interactions mises en jeu (type d'agrégation...), nous avons mis en œuvre une technique qui permet l'analyse du comportement diffusif de molécules en solution : la RMN DOSY.

II.1.4.1.2 La RMN DOSY

II.1.4.1.2.1 Principe

En solution, les molécules se déplacent selon un mouvement aléatoire connu sous le nom de mouvement brownien, à l'origine du processus de diffusion. La diffusion d'une molécule en solution est sous la dépendance de nombreux paramètres physiques propres à la molécule comme la taille ou la forme, mais également liés à la solution, comme sa température ou encore sa viscosité.

En assimilant la molécule à une sphère, le coefficient de diffusion D peut être décrit par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s} \quad (\text{Équation 47})$$

avec k la constante de Boltzmann,

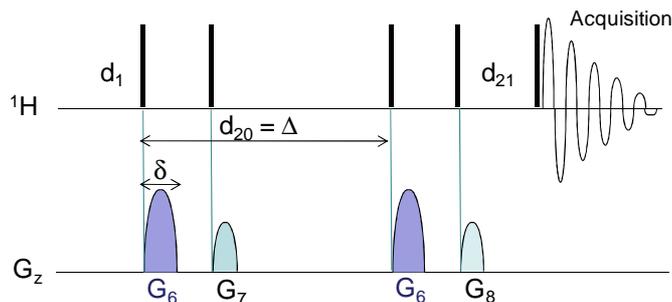
T la température,

η la viscosité de la solution,

r_s le rayon hydrodynamique de la molécule.

Cette diffusion moléculaire peut être mesurée par RMN haute résolution, ce qui nous permet d'accéder au comportement physique des molécules en solution. Cette technique relie l'ensemble des déplacements chimiques d'une molécule avec son coefficient de diffusion moléculaire (D). Chaque molécule ou agrégat moléculaire est ainsi caractérisé par ses déplacements chimiques et son coefficient de diffusion (D).

L'expérience permettant ces mesures de diffusion est une expérience de RMN bidimensionnelle appelée DOSY pour Diffusion Ordered Spectroscopy. Un spectre DOSY corréle les déplacements chimiques des molécules, représentés dans la dimension d'acquisition, avec les coefficients de diffusion moléculaire, représentés dans la dimension indirecte.²⁷⁻³⁰ Cette technique utilise des impulsions de gradient de champ magnétique, une séquence DOSY simplifiée est ainsi représentée Figure 65.



G_z intensité du gradient selon l'axe z
 $G_{6,7,8}$ impulsions de gradient de champ magnétique
 d_1 délai de relaxation
 $d_{20} = \Delta$ délai de diffusion
 d_{21} délai d'atténuation des courants de Foucault
 δ durée de l'impulsion de gradient

Figure 65: Séquence d'impulsions simplifiée de l'expérience DOSY : ledgp2s.³¹

Une première impulsion de gradient de champ magnétique (notée G_6) réalise l'encodage de la position de la molécule selon l'axe de tube de RMN. Si cette molécule se déplace selon un mouvement translationnel pendant le temps de diffusion Δ fixé, sa nouvelle position sera alors décodée de manière différente par une seconde impulsion de gradient identique à la première (G_6). Il en découle une atténuation du signal RMN qui va dépendre du temps de diffusion Δ , ainsi que de paramètres propres à l'impulsion de gradient (g et δ).

L'atténuation de l'intensité est alors donnée par la relation suivante :

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)} \quad (\text{Équation 48})$$

avec I l'intensité du signal observé,

I_0 l'intensité maximale du signal,

D le coefficient de diffusion,

γ le rapport gyromagnétique du noyau observé,

g l'intensité de l'impulsion de gradient (G_6),

δ la durée de l'impulsion de gradient (incluant une correction de forme),

Δ le temps de diffusion.

La présence de G_7 et G_8 (Figure 65) réduit la longueur des cycles de phases nécessaires à l'élimination d'artefacts.

II.1.4.1.2.2 Mise en œuvre expérimentale

En pratique, un spectre DOSY est construit en regroupant l'ensemble des transformées de Fourier des n FID analysées colonne par colonne. Les paramètres Δ et δ sont fixes et g varie entre des valeurs minimale et maximale (g_{\max}). Trois paramètres sont donc utilisés : Δ , δ et g_{\max} .

Les expériences de type DOSY requièrent le respect absolu de certaines conditions instrumentales et expérimentales. La sonde de mesure et l'amplificateur doivent délivrer des impulsions de gradient d'intensité parfaitement reproductibles, ainsi que produire des variations linéaires de champs magnétiques à travers le volume de l'échantillon.

La température d'acquisition doit également être finement réglée et demeurer constante tout au long de l'acquisition. Nous l'avons déjà mentionné, ce paramètre va influencer le comportement diffusionnel des molécules. En effet, selon la température et la viscosité du solvant de travail, des mouvements de convections peuvent apparaître dans le tube RMN et le comportement diffusionnel observé pour la molécule sera biaisé par les mouvements générés par ce phénomène de convection. De plus, les déplacements chimiques observés varient avec la température.

La difficulté majeure dans la réalisation de l'expérience DOSY réside dans l'optimisation des paramètres expérimentaux. Les trois paramètres, Δ , δ et g_{\max} , doivent être généralement choisis de telle façon que l'atténuation du signal RMN varie avec l'augmentation de l'intensité des impulsions gradients selon la Figure 66 c). C'est-à-dire que la gamme de valeur de I/I_0 est explorée de manière la plus exhaustive.

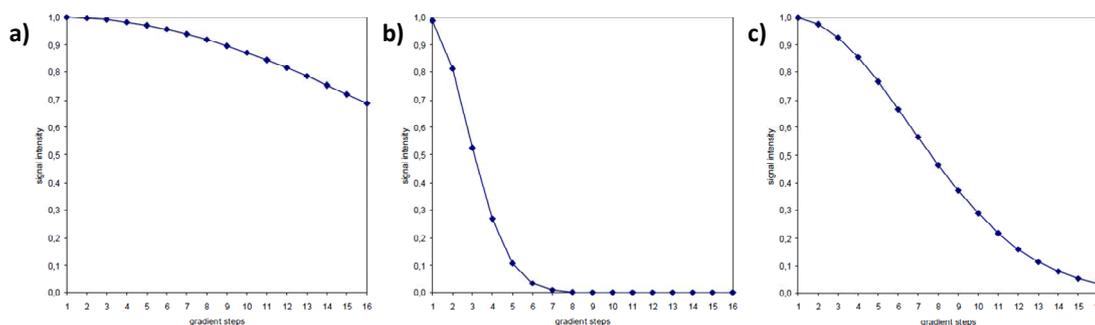


Figure 66. Courbes théoriques de l'intensité (I/I_0) du signal RMN en fonction de l'intensité des gradients (de 2 à 95% sur 16 pas) pour différentes valeurs de Δ et δ , a) trop faibles, b) trop grandes et c) appropriées.³¹

À titre d'exemple, le spectre DOSY d'un mélange de SDS (sodium dodécylsulfate) de masse molaire 288 g.mol^{-1} , d'ATP (adénosine triphosphate) de masse molaire 507 g.mol^{-1} et de glucose de masse molaire 180 g.mol^{-1} , en solution aqueuse est représenté Figure 67.

Les molécules de SDS forment spontanément des micelles lorsqu'elles sont introduites en solution aqueuse, formant ainsi des amas moléculaires très conséquents. C'est la raison pour laquelle ces molécules diffusent plus lentement que celle d'ATP, pourtant de masse molaire supérieure, avec des valeurs de diffusion avoisinant 100 et $350 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ respectivement. En raison de leur petite taille, les molécules de HOD, résiduel protoné de l'eau deutérée, diffusent plus rapidement que les molécules de glucose, respectivement avec des coefficients de diffusion d'environ 2000 et $650 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

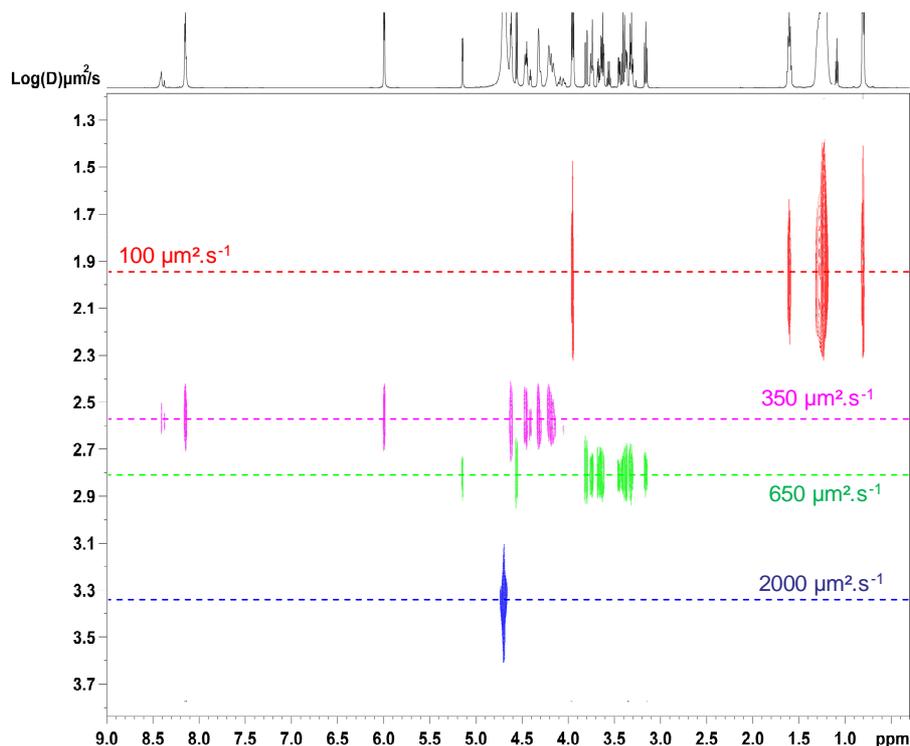


Figure 67 Spectre DOSY d'un mélange des composés SDS (rouge), ATP (rose) et glucose (vert) dissous dans l'eau (bleu) effectué à 298 K. Les paramètres de diffusion δ et Δ sont respectivement de 1,5 ms et 100 ms pour 32 valeurs d'incrément de la force des impulsions gradients.³¹

En utilisant cette technique, nous avons pu ainsi accéder aux types d'entités mises en jeu lors de l'extraction des peptides : les entités de type paire d'ions étant de taille inférieure aux micelles inverses, les valeurs de diffusion correspondantes sont par conséquent dissemblables. Pour pouvoir mener à bien cette étude, la matrice de travail a été la phase organique de notre système biphasique de solvants MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/D₂O (2:2:1:5, v/v), que nous appellerons Mélange A dans la suite de l'étude pour faciliter la lecture. Le mélange A est un milieu complexe, quasiment non deutéré, pour les analyses de type RMN : les signaux intenses de RMN du ¹H générés par les différents solvants, prépondérants par rapport au nombre de moles d'échangeur introduites, vont alors masquer les signaux ¹H du dit échangeur. La première partie de ce travail a alors consisté au contournement de cette difficulté en utilisant les propriétés du noyau phosphore ³¹P.

II.1.4.2 RMN DOSY ¹H et ³¹P

La molécule de notre échangeur, le DEHPA, contient un atome de phosphore dans sa structure. C'est un noyau susceptible de générer un signal pour les études par RMN. Nous avons alors optimisé des protocoles DOSY adaptés à l'analyse du noyau ³¹P.

Conditions expérimentales utilisées pour les expériences 2D-DOSY ^1H et ^{31}P

Toutes les expériences RMN ont été réalisées à 298 K sur un spectromètre Brüker Avance AVIII500 équipé avec une sonde BBFO-PLUS 5 mm. Les impulsions de gradient de champ magnétique ont été générées par un amplificateur de 10 A maximum qui produit, dans la sonde, un gradient nominal de $0,535 \text{ T.m}^{-1}$.

L'acquisition des données a été réalisée en utilisant la séquence d'impulsion (R)F BPPLED (Bipolar Pulse Pair Longitudinal-Eddy-current Delay).³²

Pour les expériences 2D-DOSY du ^1H , le temps de diffusion (Δ) a été fixé à 90 et 100 ms, avec une durée d'impulsion de gradient (δ) de 2 et 2,5 ms respectivement dans le DMSO- D_6 et le Mélange A. Pour les expériences 2D-DOSY du ^{31}P , Δ et δ ont été fixés à 150 et 3 ms respectivement.

32 valeurs différentes de gradient de champ ont été utilisées et l'intensité maximale du gradient utilisée a été fixée à $5,35 \text{ G.cm}^{-1}$. Les données d'une expérience DOSY vont contenir 32 spectres réalisés à différentes valeurs de gradients régulièrement espacées, chaque spectre étant lui-même constitué de 8192 points. Les spectres DOSY ont été enregistrés et traités par le programme TOPSPIN Brüker (Rheinstetten, Allemagne).

Les tubes ont été préparés par solubilisation d'une quantité appropriée de DEHPA dans un volume défini de solvant DMSO- D_6 ou de Mélange A pour obtenir une concentration de 15 mM.

Dans le DMSO- D_6 , les coefficients de diffusion obtenus avec les signaux ^1H et ^{31}P de l'échangeur sont de 263 et $266 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ respectivement (Figure 68). Ces valeurs sont considérées comme égales dans la limite des erreurs expérimentales. Des expériences de DOSY ^{31}P pourront donc être utilisées par la suite pour s'affranchir des signaux intenses ^1H des solvants non deutérés présents dans la phase organique (Mélange A).

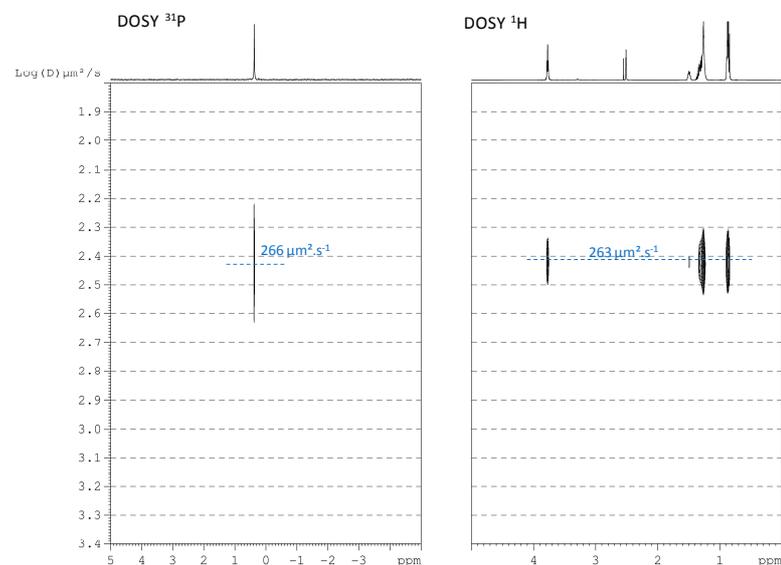


Figure 68 : Spectres RMN DOSY ^{31}P (à gauche) et ^1H (à droite) du DEHPA dans le DMSO- D_6 .

Ces valeurs de diffusion sont assez élevées pour un agrégat moléculaire de type micelle inverse, mais en revanche assez basses pour une molécule de DEHPA sous forme de monomère.

Nous avons également vérifié la bonne corrélation entre les données DOSY ^1H et ^{31}P dans le mélange A. Là encore, les coefficients de diffusion ^1H et ^{31}P concordent.

Les coefficients de diffusion obtenus en RMN du ^1H et du ^{31}P montrent qu'il est pertinent de poursuivre l'étude en utilisant la RMN du ^{31}P pour mesurer la mobilité de l'échangeur. Nous avons pu alors amorcer l'étude du comportement diffusif du DEHPA.

II.1.4.3 Obtention de valeurs de diffusion de référence

Si beaucoup d'études de comportement diffusif ont été réalisées avec des micelles par RMN DOSY, très peu sont décrites pour l'étude de micelles inverses. Il est admis que les micelles sont des amas moléculaires conséquents, mettant en jeu généralement plusieurs dizaines de monomères, alors pour les micelles inverses cinq monomères peuvent suffire.²⁰ Les valeurs de diffusion utilisées pour décrire des micelles ne peuvent donc s'appliquer à la description de micelles inverses.

Nous avons donc cherché dans un premier temps à obtenir des valeurs de diffusion de référence pour des micelles inverses.

L'AOT est une molécule structurellement très proche de notre échangeur, qui nous l'avons vu, est connue pour former très facilement des micelles inverses en solution dans un solvant organique en présence d'eau. Li *et al.* ont réalisé l'analyse et la comparaison de la structure de micelles inverses d'AOT dans un système heptane/eau et ce par spectrométrie infrarouge.²¹ Nous avons utilisé le protocole décrit dans cette publication pour obtenir avec certitude des micelles inverses qui nous serviront alors de référence.

Protocole d'analyse DOSY utilisé pour l'obtention de valeurs de référence

Les tubes ont été préparés par dissolution d'une quantité adaptée d'AOT dans de l'heptane, telle que la concentration finale obtenue soit de 1M. Une quantité appropriée de D_2O a ensuite été additionnée à cette solution pour obtenir un rapport molaire $\text{D}_2\text{O}/\text{AOT}$ (noté W_o) déterminé. Deux échantillons ont été préparés avec $W_o = 20$ et $W_o = 10$.

Le protocole d'analyse RMN est le même que celui décrit précédemment. Pour les expériences 2D-DOSY du ^1H , le temps de diffusion (Δ) a été fixé à 330 et 575 ms pour les W_o égal à 20 et 10 respectivement, avec une durée d'impulsion de gradient (δ) de 3 ms dans les deux cas.

Sur le spectre DOSY (Figure 69), quatre systèmes de diffusion différents sont observés. Le coefficient de diffusion de l'AOT obtenu pour le rapport W_o (rapport molaire $\text{D}_2\text{O}/\text{AOT}$) égal à 20 a pour valeur $21 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur de diffusion particulièrement basse correspond à des micelles inverses de taille conséquente.

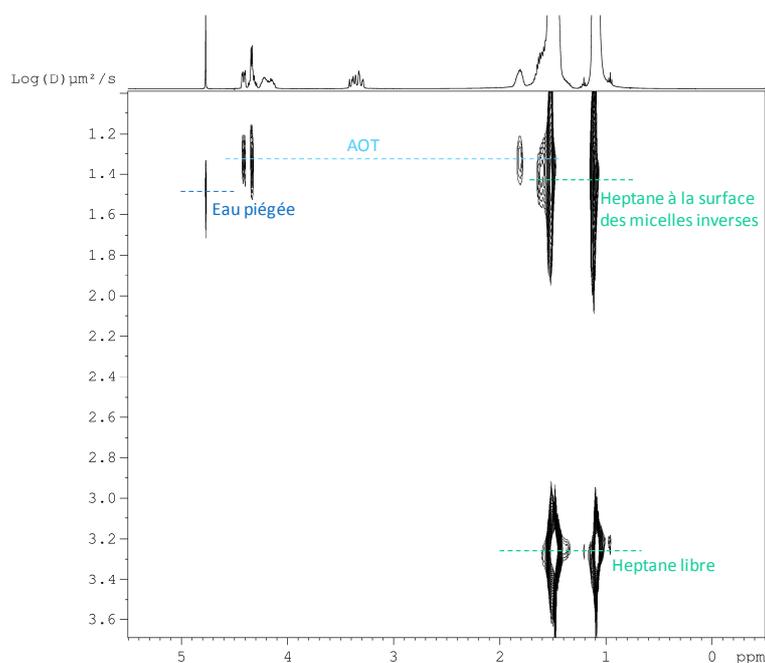


Figure 69 : Spectre RMN DOSY du ^1H de l'AOT 1M dans l'heptane avec $W_o = 20$.

L'heptane libre diffuse très rapidement, avec un coefficient de diffusion proche de $2000 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Il existe une deuxième valeur de diffusion pour les signaux correspondant aux protons de l'heptane, très proche de la valeur de diffusion des molécules d'AOT. Vraisemblablement, il s'agit de molécules d'heptane en interaction avec la surface des micelles inverses.

Le dernier système est l'eau qui diffuse avec un coefficient de diffusion très proche de celui des molécules d'AOT. Le coefficient de diffusion de l'eau libre est en général de l'ordre de $2000 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, ici l'eau diffusant de façon similaire à l'AOT est donc piégée. La présence de cette eau piégée est une preuve supplémentaire de la formation de micelles inverses. Ces dernières permettent en effet la "solubilisation" d'une quantité plus ou moins importante d'eau dans des solvants particulièrement apolaires, tel que l'heptane. Lors de la préparation de la solution à analyser, l'eau deutérée ajoutée a été complètement solubilisée dans l'heptane : la solution résultante présentait une seule et unique phase. Cette observation était cohérente avec la formation de micelles inverses.

Dans la littérature, il est décrit que l'ajout d'une quantité d'eau plus importante a pour effet une augmentation de la taille des micelles inverses d'AOT.^{21, 33} A l'inverse donc une diminution de la quantité d'eau introduite dans le système va entraîner une diminution de la taille des micelles inverses. Nous avons donc diminué le rapport W_o , *i.e.* la quantité d'eau introduite, et nous avons en effet observé une augmentation du coefficient de diffusion des molécules d'AOT à $32 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, en accord avec une diminution de la taille des micelles inverses.

Nous avons ainsi obtenu des valeurs de coefficient de diffusion de référence indiquant la formation de micelles inverses d'AOT, située aux alentours de $25 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Ces valeurs nous donnant un ordre de grandeur des valeurs à attendre pour le coefficient de diffusion correspondant à une micelle inverse, nous nous sommes alors penchés sur l'étude de notre échangeur, le DEHPA.

II.1.4.4 Etude du comportement diffusionnel du DEHPA et de son sel sodique

Le DEHPA est mentionné dans la littérature comme formant facilement des agrégats, voire des micelles inverses en solution dans des solvants apolaires.¹⁴ Pourtant la structure des micelles inverses formées par le DEHPA n'est pratiquement jamais décrite. Nous n'avons donc aucun élément de comparaison utilisable pour faciliter l'analyse de nos spectres DOSY, comme la taille des micelles inverses couramment observées.

En revanche, le sel sodique de cet acide phosphorique, le NaDEHP, est connu également pour former des micelles inverses, qui -elles- sont non seulement décrites mais de plus particulièrement étudiées.^{22, 25, 34-36} Il s'agirait de micelles géantes tubulaires, ayant de ce fait des coefficients de diffusion très faibles.²⁵ Dans leurs travaux, Li *et al.* ont étudié parallèlement à l'AOT, le comportement des micelles de NaDEHP.^{21, 22} Nous avons donc débuté notre étude par le NaDEHP pour travailler en comparaison avec l'échangeur non sodique.

Préparation du NaDEHP

*Le NaDEHP a été préparé selon le protocole décrit par Li *et al.*²¹ avec quelques modifications.*

A 100 ml de NaOH à 32% ont été ajoutés 5 ml de DEHPA. Le mélange est mis sous agitation pendant 1h environ. Puis 30 ml de MtBE ont été ajoutés au système, pour éviter la prise en masse du NaDEHP formé. Le système biphasique résultant est laissé sous agitation magnétique toute la nuit. La phase inférieure est ensuite lavée 3 fois au MtBE, puis lavée par de l'eau acidifiée par un peu d'acide acétique (pour neutraliser l'excès de NaOH). Lors des lavages, un système triphasique est obtenu, le NaDEHP se trouvant en majorité dans la phase du milieu (phase micelle inverse). Cette phase est ensuite extraite 3 fois par de l'heptane, puis lavée à l'eau. De même, un système triphasique est obtenu, le NaDEHP se trouvant en majorité dans la phase du milieu.

Cette phase a été isolée et mise à sec. Le solide ainsi obtenu a ensuite été mis à l'étuve à 40°C pendant une nuit.

II.1.4.4.1 En milieu non polaire

Pour obtenir des valeurs comparables à celles obtenues pour l'AOT, nous avons travaillé dans un premier temps dans la même matrice, à savoir l'heptane. En effet, selon la nature des solvants utilisés, la viscosité du milieu est différente et par conséquent la diffusion varie également.

Protocole d'analyse DOSY

Les tubes ont été préparés par dissolution d'une quantité adaptée de NaDEHP ou de DEHPA dans de l'heptane, ou le mélange A, telle que la concentration finale obtenue soit de 1 M. Une quantité appropriée de D₂O, ou de phase aqueuse, a ensuite été additionnée à cette solution pour obtenir un rapport molaire D₂O/NaDEHP ou DEHPA (noté Wo) déterminé. Deux échantillons ont été préparés avec Wo= 20 et Wo=10.

Le protocole d'analyse RMN est le même que celui décrit précédemment.

Les paramètres Δ et δ utilisés sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16 : Paramètres expérimentaux utilisés pour les expériences DOSY en milieu apolaire

Paramètres	¹ H		³¹ P	
	Δ	δ	Δ	δ
NaDEHP Wo =20	170 ms	3 ms	85 ms	2 ms
DEHPA 30% TEA Wo = 20	700 ms	3,5 ms	90 ms	3 ms

Nous retrouvons là encore les quatre systèmes de diffusion (Figure 70). Tout d'abord le NaDEHP qui a un coefficient de diffusion de 61 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, qui est une valeur révélatrice de la présence de micelles inverses. Puis nous retrouvons les deux valeurs de diffusion pour les molécules d'heptane : une première partie libre diffusant très rapidement (2000 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), et la seconde en interaction avec le NaDEHP diffusant à la même vitesse que ce dernier. Il existe également une quantité d'eau piégée au cœur des micelles diffusant à 63 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$.

Le coefficient de diffusion de ces micelles indique que ces dernières sont de taille inférieure à celles formées avec l'AOT, dans les mêmes conditions.

Le sel sodique forme donc des micelles inverses en solution dans l'heptane, de taille inférieure à celle de l'AOT. Cependant, la RMN DOSY ne nous renseigne pas sur la géométrie de ces micelles, nous ne pouvons donc conclure si celles-ci sont de forme tubulaire.

L'étude diffusionnelle de notre échangeur DEHPA, sous forme non sodique, dans les mêmes conditions s'est révélée impossible à mettre en œuvre. La quantité d'eau deutérée solubilisée dans la phase heptane est trop infime pour pouvoir réaliser l'analyse RMN, en raison de l'incapacité à stabiliser le champ magnétique. Ce défaut en D₂O dans la phase organique traduit nettement l'absence de micelles inverses. Nous pouvons donc conclure que l'échangeur seul ne forme pas de micelles dans la phase heptane.

Dans notre procédé, nous utilisons l'échangeur avec une quantité de TEA pouvant atteindre 30% (moles/moles DEHPA), ce qui augmente la proportion de DEHPA sous forme anionique, et pourrait favoriser la formation de micelles inverses. Nous avons alors étudié le comportement du DEHPA dans l'heptane en présence de 30 % de TEA.

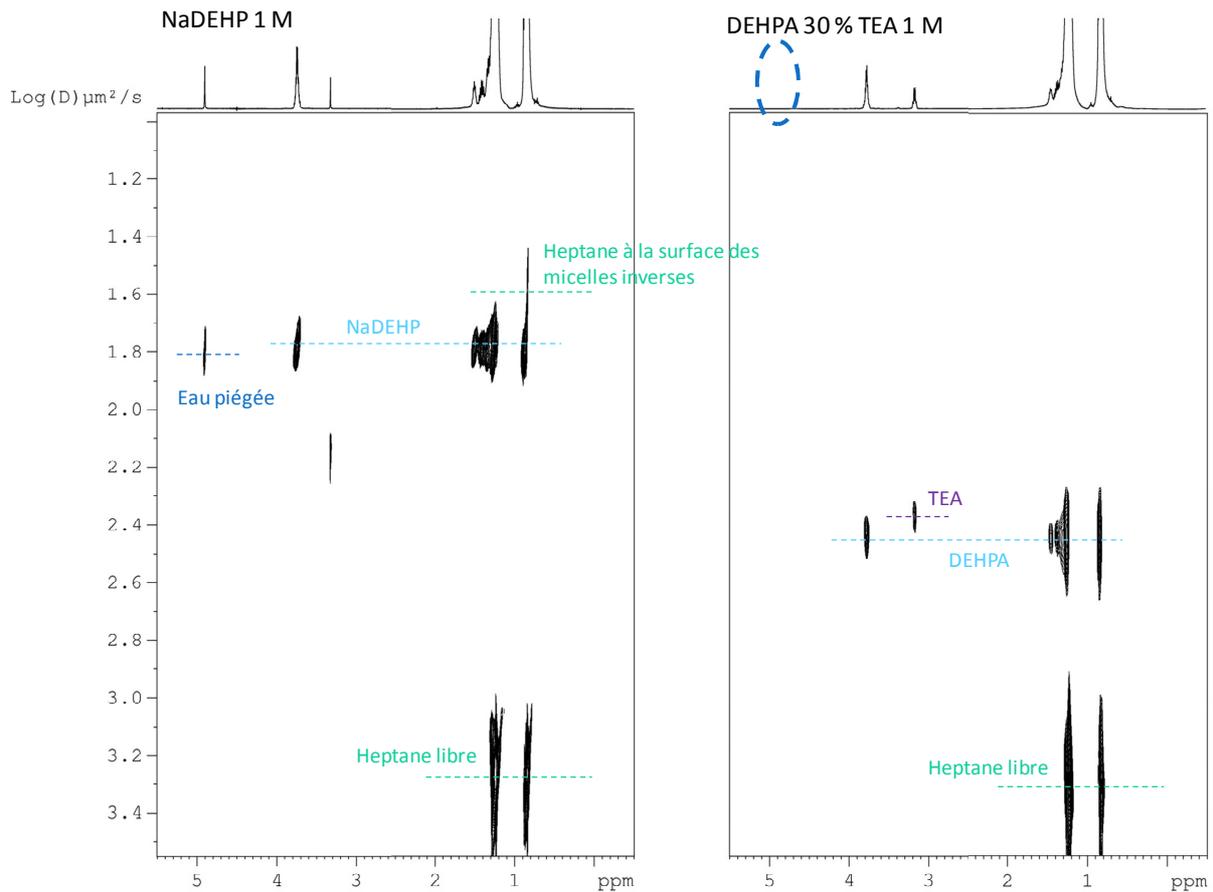


Figure 70 : Spectres RMN DOSY 1H du NaDEHP 1 M dans l'heptane avec $Wo = 20$ (à gauche), et du DEHPA 30 % TEA 1 M dans l'heptane avec $Wo = 20$ (à droite).

Dans ce cadre, la quantité de D_2O incorporée a permis de réaliser l'analyse diffusionnelle. Après calcul, le coefficient de diffusion obtenu est de $278 \mu m^2.s^{-1}$, valeur trop élevée pour une micelle inverse. De plus, il n'existe plus de signal d'eau piégée signe qu'il n'y a pas de cœur aqueux (Figure 70).

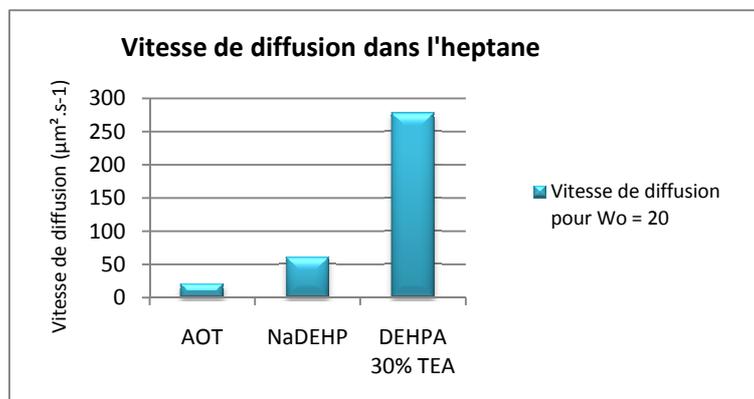


Figure 71 : Récapitulatif des coefficients de diffusion des différents échangeurs testés à 1 M dans l'heptane pour $Wo = 20$. Les valeurs comparées sont celles de DOSY 1H .

Dans un milieu apolaire, le NaDEHP forme des micelles inverses de taille moyenne alors que le DEHPA seul ou avec TEA ne forme pas de tels agrégats (Tableau 15), son coefficient de diffusion étant beaucoup plus élevé (Figure 71).

La matrice dans laquelle ces expériences ont été réalisées, l'heptane, est très éloignée de celle employée lors de nos séparations. Or cette matrice peut influencer sur la formation des micelles inverses, ou autres agrégats. C'est la raison pour laquelle nous avons poursuivi notre étude dans le mélange A.

II.1.4.4.2 Dans la phase organique du système MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v)

Nous avons testés le DEHPA et son sel sodique dans la phase organique du système biphasique employé en CPC en remplaçant l'eau par du D₂O (mélange A). Les conditions testées ainsi que les paramètres expérimentaux utilisés sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Conditions opératoires testées en RMN DOSY dans le mélange A.

Conditions	1	2	3	4	5	6	7
Echangeur	NaDEHP			DEHPA		DEHPA TEA 30 %	
[échangeur]	1 M	1 M	30 mM	1 M	30 mM	1 M	30 mM
Wo	20	10	234	20	234	20	234
$\Delta (^1\text{H})(\text{ms})$	80	80	50	100	65	85	50
$\delta (^1\text{H})(\text{ms})$	3	3	2,5	2	2	2,5	2,5
$\Delta (^{31}\text{P})(\text{ms})$	150	160	100	130	130	200	100
$\delta (^{31}\text{P})(\text{ms})$	3	3	3	3	3	3	38
$D (^1\text{H}) \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$	127	118	330	214	405	183	346
$D (^{31}\text{P}) \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$	138	119	320	220	446	186	348

En utilisant le mélange A, il y a toujours formation d'agrégats de type micelles inverses avec le NaDEHP, tant que le Wo employé reste dans les limites du raisonnable (Tableau 17). Des études ont montré que l'eau, loin d'améliorer la formation des micelles inverses de NaDEHP, jouait le rôle plutôt d'un agent de "démicellisation" : contrairement à l'AOT, la taille des micelles inverses a tendance à diminuer plus la quantité d'eau augmente.³³ Nous avons alors fixé le ratio Wo à une valeur égale à 10. Comme attendu, le coefficient de diffusion des molécules de NaDEHP est diminué passant de 127 à 118 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, traduisant bien une augmentation de la taille des micelles inverses. Si la différence observée est minime, cela correspond à une variation de Wo de faible amplitude. Dans la littérature ce rapport varie de 20 à 1 pour observer une modification notable de la taille des micelles inverses. Dans notre cas, en raison de la quantité importante d'eau déjà présente dans la phase organique (14 % environ), un Wo de l'ordre de 1 n'était pas possible à atteindre.

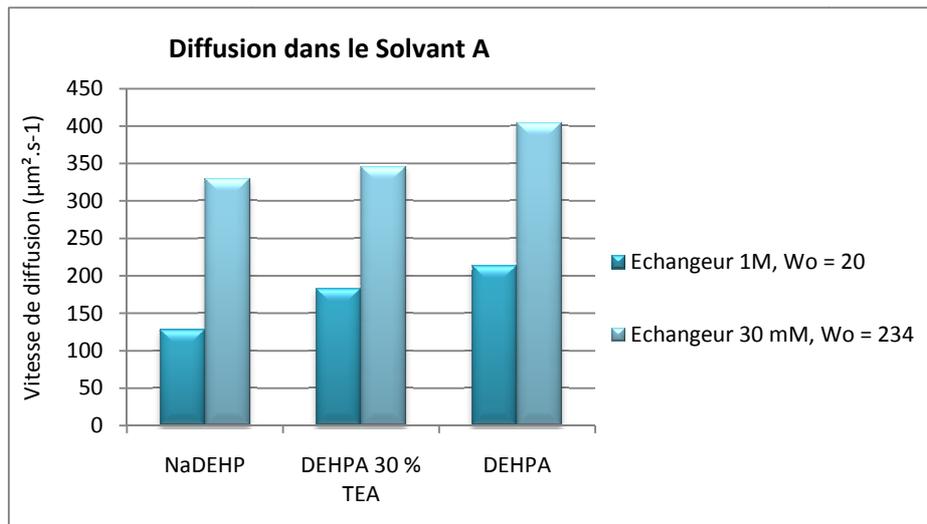


Figure 72 : Récapitulatif des coefficients de diffusion mesurés en DOSY 1H dans le mélange A aux concentrations de 1 M et 30 mM.

Pour une valeur de Wo de 234, soit une concentration en NaDEHP de 30 mM, plus proche de celles utilisées lors des fractionnements par CPC, le coefficient de diffusion obtenu est alors d'environ $325 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, valeur de diffusion beaucoup trop élevée pour des micelles inverses. Ainsi, pour une concentration en NaDEHP située dans la gamme de concentrations utilisées lors des essais de séparation, le Wo est trop grand pour permettre la formation de micelles inverses (Figure 72).

Pour le DEHPA seul ou en présence de TEA, quelles que soient les Wo testés, il ne semble pas y avoir de formation de micelles inverses. Entre les deux valeurs de Wo , le coefficient de diffusion diminue avec l'augmentation de la concentration en DEHPA, passant d'environ 400 à $200 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Ceci peut être la conséquence de deux phénomènes distincts :

- l'augmentation de la concentration en DEHPA va favoriser la formation d'interactions intermoléculaires (liaison hydrogène etc.), tout simplement par effet de concentration ;
- l'augmentation de la viscosité du milieu avec l'augmentation de la quantité de DEHPA est grande. La viscosité de milieu influant de façon importante sur la diffusion des molécules, la différence de comportement diffusionnel observée pourrait tout simplement être liée à ce phénomène.

Nous pouvons également remarquer que la présence de TEA ne semble pas avoir d'impact sur le comportement grégaire du DEHPA (Figure 72). Il existe un décalage des valeurs de diffusion à concentration équivalente entre le DEHPA seul et avec 30 % de TEA : en présence de TEA le DEHPA diffuse plus lentement d'environ 30 à $40 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Néanmoins les valeurs de diffusion sont dans les deux cas trop élevées pour indiquer la présence de micelles inverses. La nature du contre ion, sodium ou TEA sous forme ammonium, influe donc significativement sur la morphologie des agrégats formés. Dans la littérature, plusieurs types de micelles inverses de différents sels de DEHPA ont été

décrits. Selon le contre ion utilisé la morphologie des micelles inverses peut être très différente : géante tubulaire pour les contre-ions sodium,²⁵ avec des canaux aqueux ouverts avec des contre-ions de type nickel,³⁷ etc.²⁶

Les entités responsables de l'extraction des peptides en phase organique ne sont donc pas des micelles inverses piégeant les peptides, mais plutôt des entités proches des paires d'ions DEHPA/peptides. Pour déterminer la nature et la taille de ces entités, nous avons alors procédé à un étalonnage par RMN DOSY des mesures de coefficient de diffusion obtenues.

II.1.4.5 Détermination de la taille des entités formées

Kagan *et al.* ont décrit un protocole permettant de corréler le coefficient de diffusion mesuré par RMN DOSY ³¹P avec la masse molaire de l'entité diffusante. Pour cela, ils utilisent des étalons internes de structures proches de l'entité à caractériser mais de masse molaire variable.³⁸ Ils ont en particulier réalisé l'étude d'un mélange de phosphines par DOSY du ³¹P.

Nous avons transposé ce protocole à l'étude de notre échangeur DEHPA, en utilisant des étalons de nature très proche.

Etalonnage DOSY RMN ³¹P et ¹H : expériences dites de D-FW (Diffusion-Formula Weight)

Quatre trialkylphosphines ont été utilisées comme étalons internes : la diméthylphénylphosphine (MM = 138,15 g.mol⁻¹) ; la méthyl-diphénylphosphine (MM=200,22 g.mol⁻¹) ; la triphénylphosphine (MM = 262,29 g.mol⁻¹) et la tri-1-naphtylphosphine (MM = 412,46 g.mol⁻¹). Ces étalons sont solubilisés en quantités équimolaires, pour obtenir une concentration de 30 mM, dans du toluène deutéré, dans l'heptane/toluène-D₈, et enfin le mélange A.

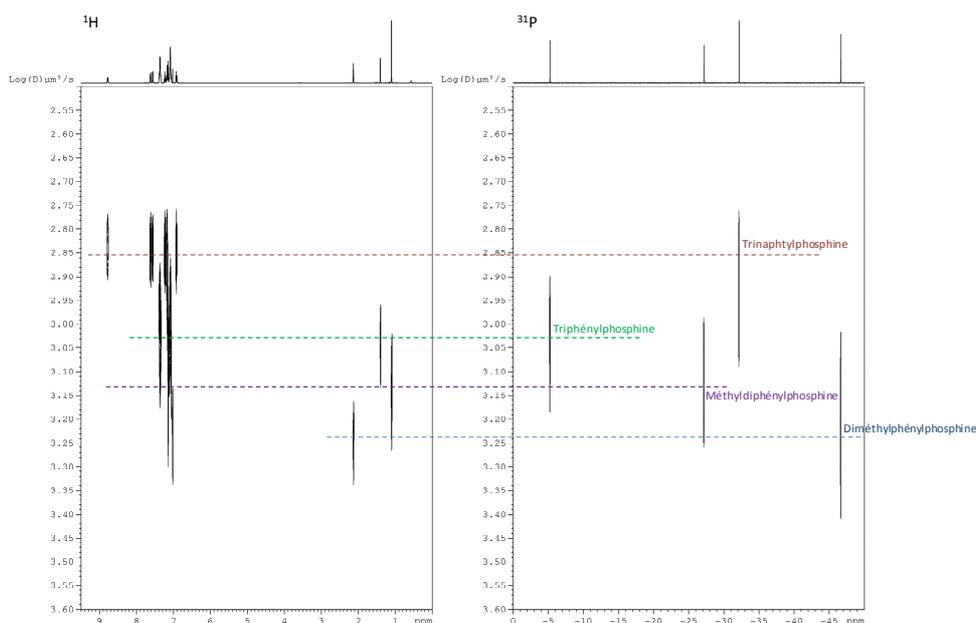
Dans l'heptane et le mélange A, la trinaphtylphosphine n'est pas soluble et a donc été remplacée par l'oxyde de tri-n-octylphosphine (386,63 g.mol⁻¹).

L'échangeur (322,4 g.mol⁻¹) est ensuite ajouté en quantité appropriée pour atteindre une concentration équivalente à celle des étalons, à l'exception des expériences dans l'heptane contenant 5 % de toluène-D₈ où un étalonnage externe avec le DEHPA seul a été réalisé.

Les conditions expérimentales utilisées sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Conditions expérimentales utilisées lors de l'étalonnage par RMN DOSY.

Conditions	1	2	3	4	5	6
Solvant	Toluène D ₈	Heptane 10 % toluène D ₈		Mélange A		
Echangeur	/	DEHPA	/	DEHPA	/	DEHPA
Concentration	/	30 mM	/	30 mM	/	30 mM
Δ (¹ H) (ms)	50	50	55	90	50	80
δ (¹ H) (ms)	1,4	1,5	1	1	1,7	1,7
Δ (³¹ P) (ms)	100	100	150	210	230	240
δ (³¹ P) (ms)	2	2	1,3	1,2	2	2,2

Figure 73 : Spectre DOSY RMN des étalons dans le toluène-D₈.

Dans le toluène-D₈, les coefficients de diffusion mesurés (Tableau 19) pour les étalons en RMN du ³¹P ou du ¹H concordent, comme nous pouvons le voir sur la Figure 73. Les droites d'étalonnage obtenues ont un coefficient de corrélation supérieur à 99 %, ce qui est cohérent avec les mesures réalisés par Kagan *et al.*

Tableau 19 : Valeurs de diffusion obtenues pour les étalons et le DEHPA dans le toluène-D₈.

Analyte	D (μm ² .s ⁻¹)	LogD	MM	LogMM	δ(³¹ P) (ppm)
Tri-1-naphtylphosphine	835,1	2,922	412,46	2,615	-32,17
Triphénylphosphine	1086	3,036	262,29	2,419	-5,26
Méthyldiphénylphosphine	1330	3,124	200,22	2,302	-27,16
Diméthylphénylphosphine	1648	3,217	138,15	2,140	-46,64
DEHPA	725,2	2,860	512,48	2,110	7,25

Après ajout de notre échangeur, dans le toluène-D₈, le coefficient de diffusion du DEHPA mesuré est de 725 μm².s⁻¹ environ, ce qui correspond à une masse molaire de 512 g.mol⁻¹. Le dimère théorique de DEHPA correspond à une masse molaire de 644 g.mol⁻¹ (représenté en vert Figure 74), la mesure réalisée expérimentalement se rapproche très fortement de ce type d'agrégat.

Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le DEHPA est sous forme de dimère en solution dans le toluène-D₈. La constatation est la même pour l'heptane, avec des valeurs de coefficients de diffusion quasiment identiques.

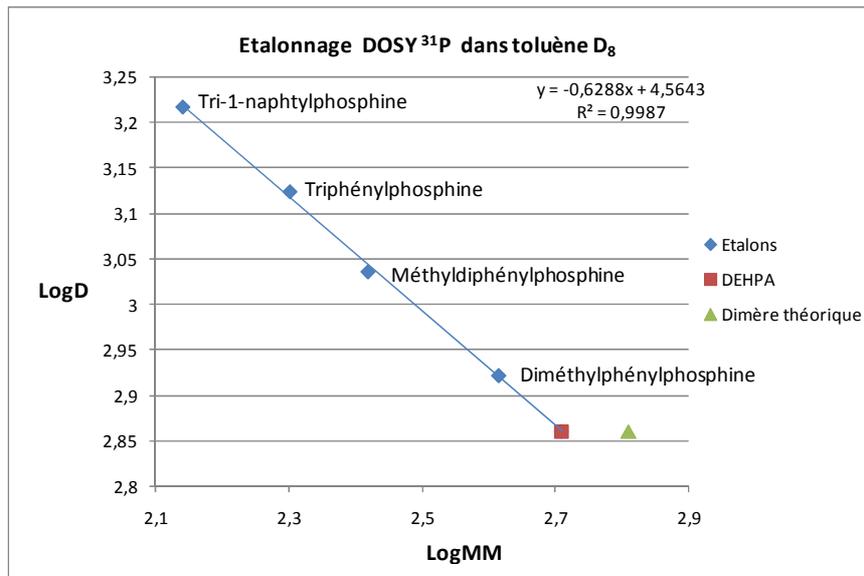


Figure 74 : Droite d'étalonnage obtenue en RMN DOSY du ^{31}P dans le toluène- D_8 .

Le DEHPA est rapporté dans la littérature comme formant spontanément des dimères en milieu apolaire comme le toluène et l'heptane.¹⁴ Nous pouvons supposer que cette association se fait par le biais de liaisons hydrogène entre les têtes acides de deux molécules de DEHPA pour masquer l'hydrophilie de ces dernières vis-à-vis de cet environnement très hydrophobe.

Dans le mélange A, le coefficient de diffusion du DEHPA avoisine $411 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est celle que nous avons classiquement observée pour une concentration en DEHPA de 30 mM en présence ou non de TEA (Tableau 17).

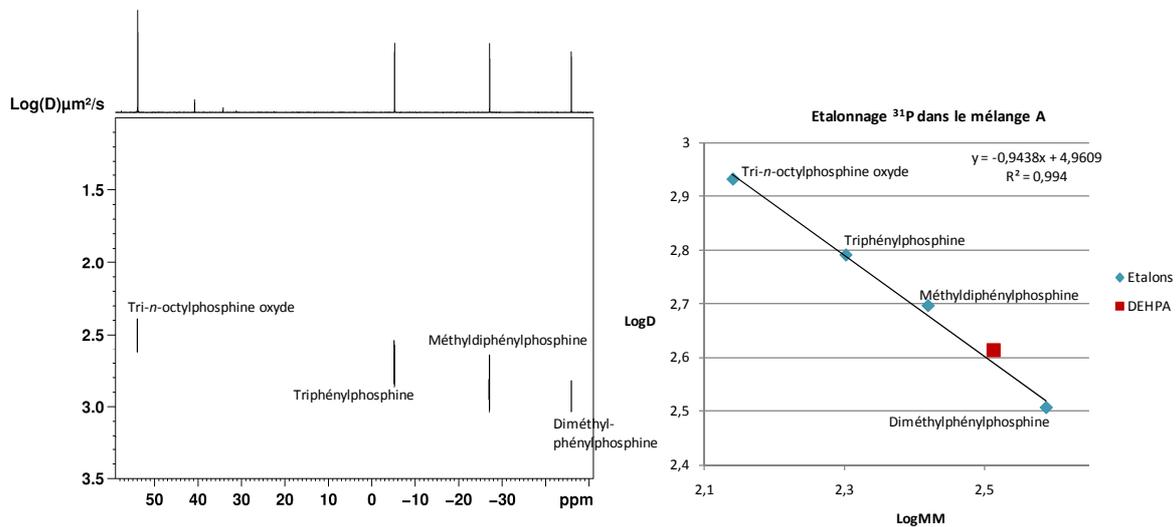


Figure 75 : Spectre DOSY RMN du ^{31}P des étalons dans le mélange A (à gauche) et droite d'étalonnage obtenue (à droite).

En reportant cette valeur de D sur la courbe d'étalonnage, la diffusion correspond à une espèce de masse molaire d'environ $328 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, soit l'échangeur sous forme de monomère. Il n'y a donc pas formation d'agrégat dimérique à cette concentration dans notre système biphasique. Ce système

étant particulièrement polaire, les têtes acides du DEHPA n'ont pas besoin de s'associer pour cacher leur caractère hydrophile, c'est une des explications possibles à ce phénomène.

Une autre explication plausible est que la concentration en DEHPA employée est trop faible pour permettre l'agrégation des molécules de DEHPA. Si nous regardons les valeurs de diffusion obtenues pour les solutions de DEHPA à 1 M avec et sans TEA (Tableau 17), en reportant ces dernières sur la courbe d'étalonnage les valeurs de masses molaires correspondent dans ce cas à la formation probable de dimères d'échangeur. Nous avons alors réalisé des mesures à des valeurs de concentrations intermédiaires 240 et 500 mM afin d'apporter des éléments permettant d'affiner nos hypothèses (Tableau 20 et Figure 76).

Tableau 20 : Valeurs de diffusion obtenues pour le DEHPA avec et sans TEA dans le mélange A.

DEHPA	D ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (mesuré)	LogD	LogMM	MM ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) (calculée)
30 mM	395	2,5966	2,5051	320
240 mM	300	2,4771	2,6317	428
500 mM	268	2,4281	2,6836	483
1 M	214	2,3304	2,7871	612
30 mM + 30% TEA	357	2,5527	2,5516	356
240 mM + 30% TEA	286	2,4564	2,6537	450
500 mM + 30% TEA	232	2,3658	2,7500	562
1 M + 30% TEA	186	2,2718	2,8492	707

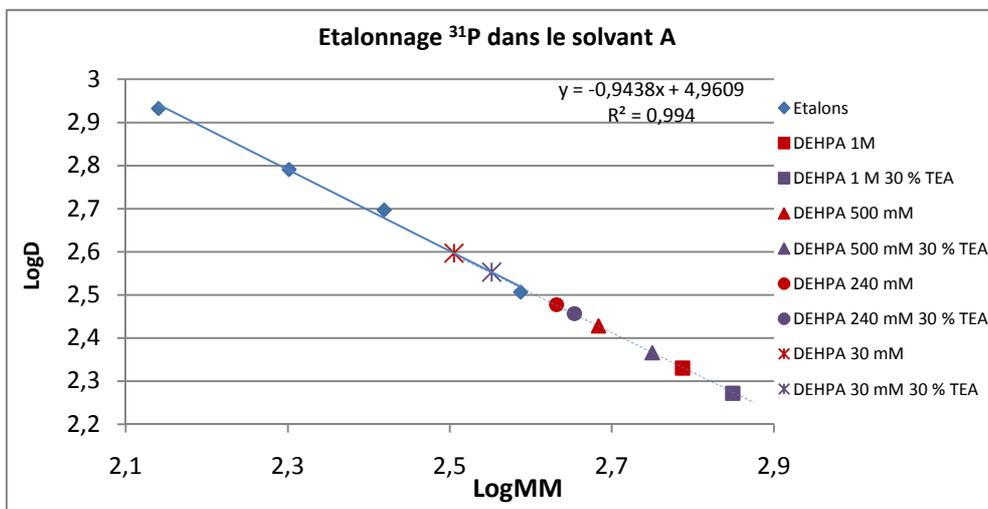


Figure 76 : Droite d'étalonnage et coefficients de diffusion obtenus pour des concentrations en DEHPA allant de 30 mM à 1M avec ou sans TEA dans le mélange A.

Il apparaît lors de l'analyse de ces expériences (Figure 76), que le coefficient de diffusion du DEHPA diminue linéairement au fur et à mesure de l'augmentation de sa concentration, et que l'écart déjà observé en présence de TEA demeure constant. En s'intéressant plus particulièrement aux signaux des solvants, nous avons également constaté une diminution des coefficients de diffusion de ces derniers, parallèle à la diminution de diffusion du DEHPA.

Tableau 21 : Coefficients de diffusion des solvants en présence de différentes concentration de DEHPA avec ou sans TEA.

[DEHPA]	Coefficients de diffusion ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) des solvants							
	Mélange A				Mélange A en présence de TEA			
	MtBE	CH ₃ CN	<i>n</i> -BuOH	eau	MtBE	CH ₃ CN	<i>n</i> -BuOH	eau
30 mM	1112	1783	873	1033	982	1626	783	938
240 mM	895	1334	650	724	873	1417	659	793
500 mM	832	1309	594	709	770	1290	573	662
1 M	706	1185	509	553	735	1128	497	566

Ainsi Figure 77 sont représentés les spectres RMN DOSY du ^1H et ^{31}P obtenus pour différentes concentrations du DEHPA en présence ou non de TEA, calibrés sur le signal de l'eau.

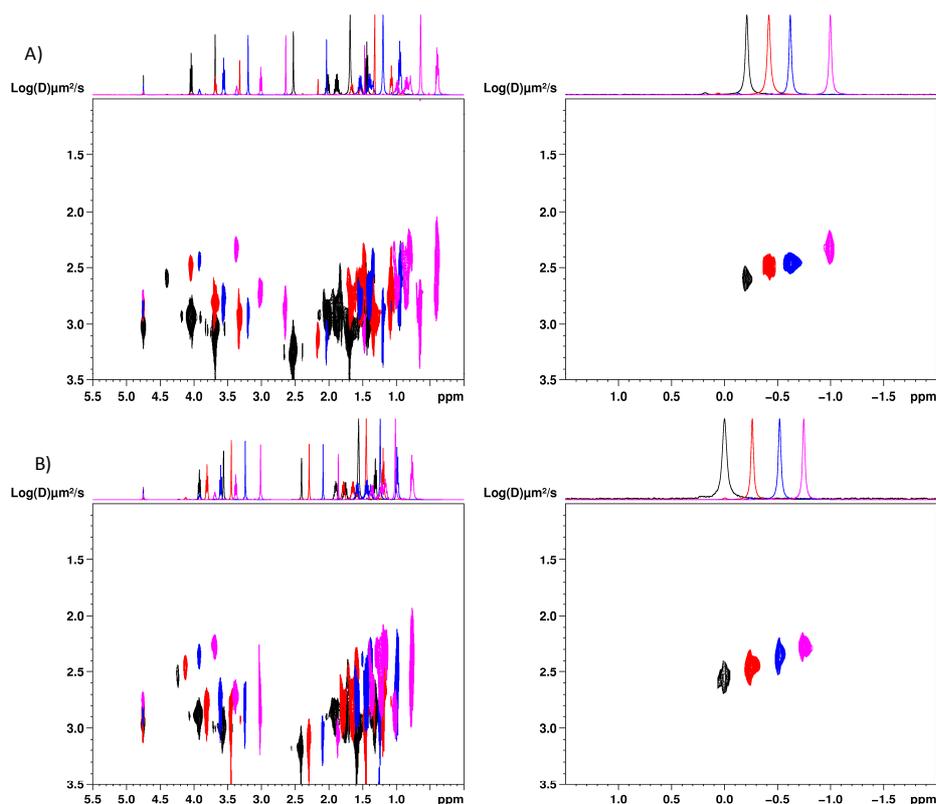


Figure 77 : Spectres RMN DOSY ^1H (à gauche) et ^{31}P (à droite) du DEHPA dans le Mélange A (A) et du DEHPA avec 30 % de TEA dans le même solvant (B). Avec en noir DEHPA 30 mM, en rouge DEHPA 240 mM, en bleu DEHPA 500 mM et en rose DEHPA 1 M.

Il apparaît nettement Figure 77 que le coefficient de diffusion des solvants évolue de façon similaire à celui du DEHPA. Nous observons donc une diminution de la valeur de diffusion de l'ensemble de système. Cette diminution constatée pour le DEHPA n'est vraisemblablement pas le fait de la formation de dimère, mais plutôt d'une augmentation de la viscosité de la matrice dans sa globalité. Cette augmentation de viscosité peut être la conséquence directe de l'effet de concentration, ou bien de la formation d'un réseau d'interactions (liaisons hydrogènes...) DEHPA/solvants.

La présence de TEA entraîne une diminution supplémentaire du coefficient de diffusion de l'ensemble du système. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la TEA, en favorisant la forme anionique du DEHPA, va favoriser les interactions échangeur/solvants, ce qui contribue à une élévation de viscosité plus importante.

Pour s'affranchir du biais introduit par la diminution des coefficients de diffusion des solvants sur la mesure de la diffusion du DEHPA, les rapports coefficient de diffusion du DEHPA/coefficient de diffusion des solvants ont été calculés (Tableau 22).

Tableau 22 : Rapports coefficient de diffusion du DEHPA (D_{DEHPA})/coefficient de diffusion du solvant ($D_{solvant}$) en présence de différentes concentrations en DEHPA avec ou sans TEA.

[DEHPA]	Ratio $D_{DEHPA}/D_{solvant}$							
	Mélange A				Mélange A en présence de TEA			
	MtBE	CH ₃ CN	n-BuOH	eau	MtBE	CH ₃ CN	n-BuOH	eau
30 mM	0,359	0,224	0,243	0,386	0,359	0,217	0,451	0,376
240 mM	0,337	0,226	0,326	0,417	0,322	0,198	0,426	0,354
500 mM	0,319	0,202	0,357	0,374	0,297	0,178	0,400	0,346
1 M	0,300	0,179	0,417	0,383	0,253	0,165	0,374	0,329

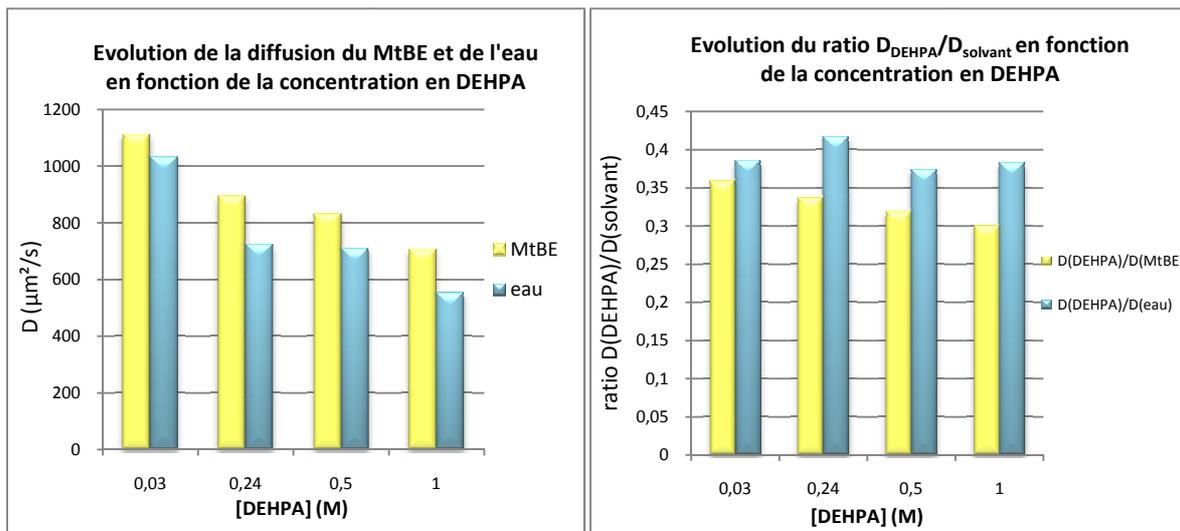


Figure 78 : Evolution des coefficients de diffusion du MtBE et de l'eau en fonction de la concentration en DEHPA, comparée à l'évolution du ratio $D_{DEHPA}/D_{solvant}$ correspondant.

Nous avons ainsi constaté que le ratio $D_{DEHPA}/D_{solvant}$ évolue très peu entre les différentes concentrations en DEHPA utilisées, et ce avec ou sans TEA (Figure 78). Si la diminution du coefficient de diffusion constatée pour le DEHPA était la conséquence de la formation d'agrégats, ce ratio devrait évoluer de façon beaucoup plus notable. Cette constance du ratio $D_{DEHPA}/D_{solvant}$ traduit ainsi plutôt une évolution de l'ensemble du système dans le même sens, comme évoqué ci-dessus.

Le DEHPA seul ou en présence de TEA ne forme donc pas de micelles inverses, ni d'autres types d'agrégats au sein de la phase organique de notre système biphasique de solvants, dans les conditions de concentration que nous avons utilisées. Il est donc peu probable que ce type d'entités soit impliqué dans l'extraction des peptides en phase organique.

Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure si rapidement sur la nature des entités peptide/DEHPA formées. En effet, les peptides sous forme cationique vont jouer le rôle de contre ion pour le DEHPA, et la nature du contre ion influe de façon déterminante sur le comportement du sel de DEHPA, comme nous avons pu le remarquer avec le NaDEHP. Nous avons donc procédé à une étude en présence de peptides.

II.1.4.6 Etude des interactions DEHPA/peptides

Pour finaliser notre étude, c'est-à-dire comprendre si en présence des peptides des agrégats se forment, nous avons réalisé des études du comportement diffusionnel du DEHPA, en présence de peptides.

Protocole de préparation des échantillons

10 ml de système biphasique MtBE/n-BuOH/CH₃CN/D₂O (2:2:1:5, v/v) ont été préparés en mélangeant des volumes appropriés de chaque solvant.

Une solution concentrée contenant environ 1,4 mM de chaque peptide GY, AY, LV et LY, a été préparée par dissolution d'une quantité donnée de chaque dipeptide dans un volume défini de phase aqueuse.

Une solution concentrée de dirucotide, peptide de 17 acides aminés, titrant à 1,8 mM a été préparée en solubilisant une quantité appropriée de dirucotide dans un volume défini de phase aqueuse.

Une solution de DEHPA à 30 mM dans le cas des dipeptides ou à 15 mM dans le cas du dirucotide a été préparée par dissolution d'une quantité appropriée de DEHPA dans un volume défini de phase organique.

Une première mesure de diffusion a été réalisée sur 600 µl de solution de DEHPA seul, puis 50 µl de la solution de peptides ont été ajoutés dans le tube RMN. Après agitation et décantation, une seconde mesure de diffusion a été réalisée.

Les paramètres expérimentaux utilisés sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 23 : Paramètres expérimentaux utilisés en RMN DOSY lors des expériences avec les peptides.

Paramètres	¹ H		³¹ P	
	Δ	δ	Δ	δ
DEHPA 30 mM Dipeptides 5,56 mM	150 ms	1,3 ms	250 ms	3 ms
DEHPA 30 mM TEA 30% Dipeptides 5,56 mM	150 ms	1,3 ms	245 ms	2 ms
DEHPA 15 mM Dirucotide 1,8 mM	150 ms	1,4 ms	250 ms	3 ms

Le DEHPA libre a un comportement diffusionnel similaire à celui observé précédemment (Tableau 20) avec un coefficient de diffusion de $390 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, qui correspond au DEHPA sous forme de monomère.

L'intensité des signaux générés par les protons des solvants non deutérés masque les signaux des peptides introduits en concentration relativement faible, à l'exception des signaux correspondants aux protons aromatiques des résidus tyrosine (Y) (Figure 79).

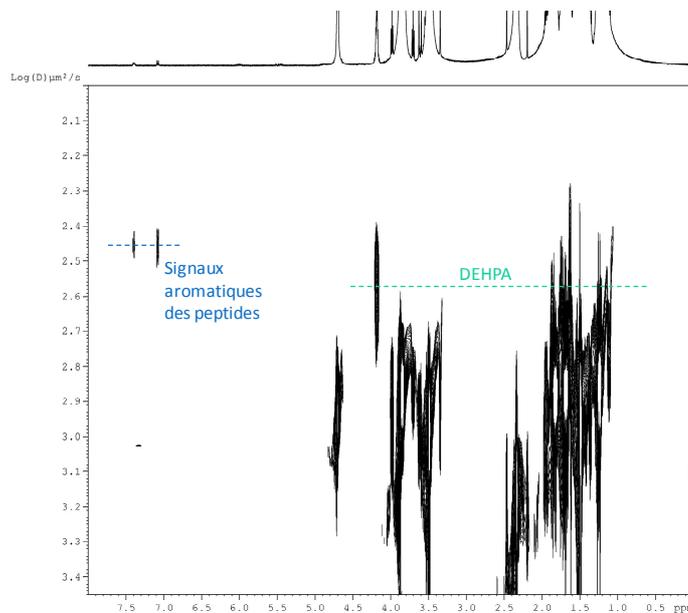


Figure 79 : Spectre DOSY RMN 1H du DEHPA 30 mM dans le Mélange A en présence des peptides GY, AY, LV et LY (concentration globale en peptide = 5,56 mM).

En mesurant le coefficient de diffusion correspondant à ces signaux de protons aromatiques, nous obtenons la valeur de $280 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Les dipeptides étant des molécules plus petites que notre échangeur, ces derniers devraient au contraire diffuser plus rapidement. En reportant sur la droite d'étalonnage la valeur de diffusion obtenue, celle-ci correspond à une entité de masse molaire de 450 g.mol^{-1} . Cette valeur peut traduire la formation possible d'une paire d'ion DEHPA ($322,4 \text{ g.mol}^{-1}$)/dipeptide (236 g.mol^{-1} masse molaire moyenne), même si la droite d'étalonnage n'est significative que pour le DEHPA seul. La constatation est la même dans les conditions avec TEA, avec une diffusion du DEHPA de $370 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et des peptides de $271 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans les conditions d'analyse DOSY, il y a vraisemblablement interaction entre notre échangeur et les peptides, mais celle-ci ne se fait pas *via* la formation de micelles inverses. La notion de paire d'ions se trouve ainsi confortée.

De même avec le peptide de 17 acides aminés (II.2.2 p.183), aucune micelle inverse ne semble se former ($D_{\text{DEHPA}} = 373 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). En reportant cette valeur de coefficient de diffusion sur la droite d'étalonnage obtenue dans la phase organique du système biphasique de solvants, il apparaît que l'échangeur est là encore sous forme de monomère. L'excès de 100 fois nécessaire au processus

d'extraction est donc bien à corrélérer au ratio échangeur/position cationique, comme supposé précédemment (II.1.3.7 p137).

II.1.4.7 Conclusion sur l'étude RMN DOSY

L'étude par RMN DOSY réalisée nous a permis d'appréhender un peu plus finement les mécanismes mis en jeu lors de l'extraction de nos peptides durant les expériences chromatographiques. Nous avons ainsi pu confirmer l'hypothèse du mécanisme d'extraction par paires d'ions dans nos conditions de concentration et avec le DEHPA.

L'analyse du comportement diffusionnel des entités mises en jeu apparaît ainsi comme une technique prometteuse pour la compréhension des mécanismes chromatographiques dans le cas de développement par échange d'ions en CPC. Il serait par ailleurs intéressant de réaliser ce type d'étude avec d'autres échangeurs déjà utilisés tels que l'Aliquat 336® ou l'AOT.

II.1.5 Conclusion

Ces travaux ont ainsi abouti au développement d'un procédé innovant de purification de peptides non protégés, utilisant la CPC en mode échange d'ions.

Les conditions utilisées par Ma *et al.* en chromatographie dite d'affinité ont servi de point de départ à cette étude.² Si les acteurs en eux mêmes, le système biphasique de solvants MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), l'échangeur DEHPA, le "reteneur" TEA et le déplaceur HCl, ont été conservés, la plupart des paramètres ont été ajustés pour permettre la séparation des cinq dipeptides (GG, GY, AY, LV, LY).

L'ajustement du ratio **DEHPA/peptides à 5,5** a permis la mise en place d'un processus de déplacement vrai. Après une première modification de la concentration en HCl (10 mM), la séparation quasi-parfaite des peptides de polarité intermédiaire, GY et AY, a été réalisée.

La déconvolution des peptides les plus apolaire, LV et LY, a nécessité plusieurs modifications des conditions opératoires.

Le chlorure de calcium a ainsi été introduit comme déplaceur dans l'optique de remplacer l'HCl. L'emploi des ions calcium a permis l'optimisation de la séparation des peptides GY et AY, sans toutefois permettre la mobilisation des peptides LV et LY. Ainsi pour la première fois, **deux déplaceurs ont été utilisés successivement au cours d'un même processus chromatographique : les ions calcium pour déplacer les peptides GY et AY, puis l'HCl pour mobiliser les peptides LV et LY.** Les ions calcium étant des déplaceurs de type fort et l'HCl un déplaceur de type faible, ce procédé a été baptisé **échange d'ions mixte (MIXCPC).**

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la quantité de TEA introduite en phase organique, modulant l'état d'activation de l'échangeur. Ainsi nous avons constaté qu'un taux de TEA de 30% (moles/moles DEHPA) améliorerait le comportement des peptides LV et LY, tout en détériorant celui de GY et AY. Nous avons donc utilisé une **phase stationnaire divisée en deux zones avec des teneurs en TEA différentes : à l'entrée de la colonne 25% de phase stationnaire contenant 30% de TEA, suivi de 75% de phase stationnaire contenant 2,15% de TEA.**

Enfin, l'ajustement du **ratio DEHPA/HCl à 6** a permis une séparation parfaite des peptides LV et LY. Une montée en échelle du procédé a été réalisée avec succès.

L'excès en DEHPA nécessaire à l'extraction des peptides nous a amené à nous intéresser à la nature des entités échangeur/analytes formées. Pour cela, une étude du comportement diffusiel du DEHPA au sein de différentes matrices, dont notre phase organique, a été réalisée par RMN DOSY.

Après obtention de valeurs de référence et étalonnage des mesures, il est apparu que dans nos conditions de solvants et de concentration, le **DEHPA est présent sous forme de monomère** et non sous forme d'agrégat de type micelle inverse. **Ces mesures nous ont permis de confirmer le postulat selon lequel les peptides sont extraits en phase organique via la formation de paires d'ions.**

Notre procédé a ensuite été confronté à des problèmes de purification de deux natures : capture de composés bioactifs au sein de mélange très complexes et purification d'un peptide d'intérêt dans une optique de polissage.

II.2 Application du procédé par échange d'ions mixte

Lors de la mise au point d'un procédé chromatographique, les critères retenus pour évaluer sa pertinence et son efficacité vont différer selon l'utilisation envisagée du procédé. Un procédé de purification de peptide, comme nous l'avons vu paragraphe I.2.1, se divise généralement en trois étapes (capture, purification intermédiaire et polissage) qui ont des exigences et des critères de satisfaction différents. Au cours de ces travaux, nous avons eu l'occasion de confronter notre procédé par échange d'ions mixte en CPC aux étapes extrêmes d'un procédé : la capture et le polissage.

II.2.1 En mode capture : application au fractionnement d'extraits de luzerne

Le projet de thèse porte essentiellement sur la valorisation du peptidome de luzerne en tant qu'agent cosmétique potentiel. Après une description de la plante, nous verrons les différents extraits que nous avons eu à travailler et l'application du procédé par MIXCPC à ces extraits.

II.2.1.1 Introduction sur la luzerne *Medicago sativa*

II.2.1.1.1 Historique

La luzerne, *Medicago sp.*, est apparue il y a environ 9000 ans dans les hauts plateaux du Caucase, en Iran et en Turquie. Elle fut introduite en Europe vers 470 avant JC pendant les guerres médiques : les cavaliers arabes nourrissaient leurs chevaux d'une herbe appelée alfalfa ou de son nom latin *Medica herba* "herbe de Médie".³⁹

À l'heure actuelle, la luzerne est la plante fourragère la plus cultivée au monde, très répandue dans les régions tempérées, chaudes, subtropicales et en altitude.^{39, 40}

II.2.1.1.2 Description botanique

La luzerne appartient à la famille des *Fabaceae*, ordre des Rosales. Cette famille regroupe des espèces tropicales et méditerranéennes plutôt ligneuses comme l'acacia (*Acacia sp.*) ou le mimosa (*Mimosa sp.*). Dans les régions tempérées, sont plutôt retrouvées des légumineuses de type herbacé à valeur alimentaire : le pois ou le haricot ; ou fourragère : la luzerne ou le trèfle.³⁹

La luzerne *Medicago sativa* (Figure 80) est une plante pluriannuelle. Les feuilles sont de type trifolié, pubescentes sur la face interne, glabres sur la face externe, et grossièrement dentées. Les folioles sont oblongues, dentées à l'extrémité et glabres à la face supérieure.



Figure 80 : Planche botanique de *Medicago sativa* (à gauche), photographies d'une luzernière (champ de luzerne) et d'une fleur de luzerne cultivée (à droite).

Les fleurs sont zygomorphes avec un calice velu. Les neuf étamines ont leurs filets soudés en un tube entourant le pistil, la dixième restant libre. L'inflorescence est une grappe longuement pédonculée comprenant entre quinze et trente fleurs.

Les fruits sont des gousses noires indéhiscentes, enroulées en une à trois spirales, contenant des graines réniformes de couleur brun jaune.

Les racines sont porteuses de nodosités, lieu de l'existence de la symbiose de la plante avec un microorganisme du genre *Rhizobium*. Cette symbiose procure une particularité aux plantes de la famille des *Fabaceae* et à la luzerne en particulier : une très grande richesse en matières azotées. En effet, au sein des nodosités vont se former des entités capables d'assimiler l'azote atmosphérique pour le transformer en acides aminés métabolisables par la plante.

L'existence de cette symbiose permet l'enrichissement du sol en azote, par assimilation excédentaire d'azote atmosphérique et lors de la décomposition des organismes fixateurs. L'enrichissement du sol dû à la symbiose avec le *Rhizobium* peut être de l'ordre de 150 à 400 kg d'azote par hectare et par an. Dans le cas de la luzerne, l'enrichissement atteint environ 300 kg /ha/an.³⁹

Les qualités nutritionnelles procurées par cette symbiose ont fait de la luzerne un produit largement utilisé dans le domaine de l'alimentation animale. De plus, du fait de la composition particulière en acides aminés essentiels, les extraits de luzerne sont supérieurs en qualité aux tourteaux de soja, qui sont également largement utilisés pour l'alimentation du bétail.^{39, 40}

Au cours de ces travaux, nous avons travaillé différents extraits de luzerne :

- un hydrolysate de concentré de protéines blanches de luzerne, provenant d'un procédé industriel ;
- deux fractions issues du procédé luzernier de déshydratation : le sérum et un hydrolysate de concentré protéines xanthophylles (PX).

Nous allons voir, dans un premier temps, l'application du procédé par échange d'ions mixte à l'hydrolysate de concentré de protéines blanches de luzerne.

II.2.1.2 Application à l'hydrolysate de protéines blanches de luzerne

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec les docteurs Romain Kapel et Ivan Marc du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) UPR CNRS 6811 de Nancy.

II.2.1.2.1 La RuBisCO

Le concentré de protéines blanches de luzerne est obtenu après pressage des plants de luzerne, élimination par thermocoagulation des protéines lipophiles dites vertes (par injection de vapeur à 59°C), puis précipitation acide des protéines blanches hydrophiles. Ce concentré contient de façon prépondérante une protéine appelée RuBisCO.⁴¹

La RuBisCO ou Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (EC 4.1.1.39) est appelée également protéine blanche de luzerne par abus de langage. Cette enzyme est responsable de l'assimilation du CO₂ par les végétaux chlorophylliens durant le cycle de Calvin.^{42, 43} Cette protéine est présente de façon abondante dans les feuilles des végétaux supérieurs (50% du pool protéique des feuilles) ce qui en fait la protéine la plus abondante sur Terre.

Chez les végétaux supérieurs, la RuBisCO est une protéine composée de 16 sous-unités, qui sont de deux types différents.^{42, 44} Huit sous unités lourdes d'environ 55kDa, sur lesquelles sont situés les sites de liaison pour le substrat, et huit sous-unités légères d'environ 12kDa, sont ainsi assemblées pour former un édifice moléculaire d'environ 550 kDa. Chez les végétaux supérieurs, la structure quaternaire de cette protéine varie d'une plante à une autre.

Ces dernières années, les acteurs du secteur luzernier se sont particulièrement intéressés à cette enzyme. D'un point de vue nutritionnel, la RuBisCO est une protéine d'un intérêt majeur, du fait de sa richesse en acides aminés essentiels. Ces qualités nutritionnelles sont en effet équivalentes à celle des protéines laitières, ce qui fait de cette protéine et donc de la luzerne un produit de choix pour la lutte contre la dénutrition.

Plusieurs équipes se sont penchées sur la production et la valorisation de concentrés de protéines blanches de luzerne, dont le composé majoritaire est la RuBisCO. Nous avons été amenés à travailler un hydrolysate d'un de ces concentrés de protéines blanches de luzerne.

II.2.1.2.2 L'hydrolysate de protéines blanches fourni

L'hydrolysate de protéines blanches de luzerne a été fourni par le LSGC (Nancy). Il est préparé selon le protocole développé par la société Viridis et décrit dans les publications de Kapel *et al.*^{41, 45}

Le concentré de protéines blanches de luzerne subit une hydrolyse contrôlée par la Delvolase®, un mélange de protéases ayant pour origine *Bacillus licheniformis* qui a une activité de type subtilisine. L'hydrolysate ainsi obtenu présente une teneur en matière sèche de 95 % environ et contient 90 % de peptides, de masse molaire moyenne 600 g.mol⁻¹.

Cet hydrolysate a montré une activité de type opioïde intéressante, et de plus parmi tous les peptides présents, un dipeptide en particulier est doué de propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de l'angiotensine : le dipeptide ValylTryptophane (VW).⁴⁵ L'enzyme de conversion de l'angiotensine est une cible pour le traitement de l'hypertension artérielle, l'utilisation de cet extrait en tant que nutraceutique permettrait de bénéficier d'un effet antihypertenseur préventif. Cet emploi serait une valorisation intéressante pour cet hydrolysate, à condition d'augmenter sa teneur en VW.

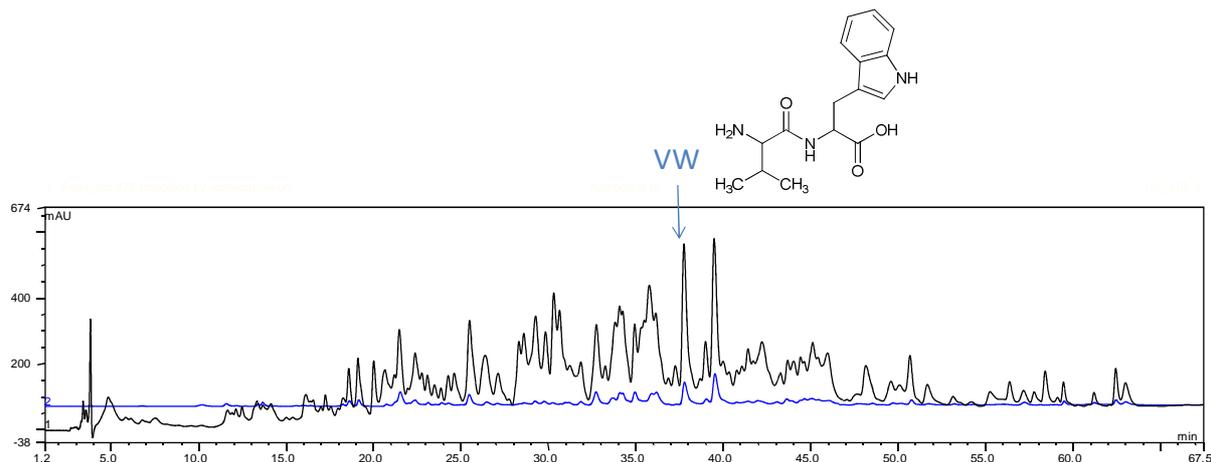


Figure 81 : Chromatogramme CLHP de l'hydrolysât de protéines blanches de luzerne. Colonne Luna C18 (250 x 4,6 id, 5 μ m) Phenomenex, Eluants : A : eau 0,1% TFA ; B : acétonitrile 0,09% TFA. Gradient : 100 % A jusque 28% B en 50 min, puis 47% B en 20 min, et enfin 100% B. Débit : à 1 ml/min. Détection UV à $\lambda = 215$ nm (en noir), et à 280 nm (en bleu)

L'hydrolysât ne contient à l'origine que 0,3% du dipeptide VW (Figure 81), ce qui est trop peu pour son utilisation directe en tant que nutraceutique à effet antihypertenseur. Pour augmenter la teneur en VW de cet hydrolysât tout en restant dans une fourchette de coûts de production rentable, il faut minimiser le nombre d'étapes nécessaires et utiliser des techniques permettant d'obtenir un enrichissement conséquent en VW tout en conservant une bonne productivité. Dans ce contexte, la CPC en mode déplacement est apparue comme une technique de choix à tester.

II.2.1.2.3 Optimisation du procédé par échange d'ions mixte

Ainsi, le but de ce projet est la capture du peptide VW d'intérêt au sein de l'hydrolysât de concentré de protéines blanches. Le protocole par échange d'ions mixte en CPC a ainsi été confronté à cette problématique.

II.2.1.2.3.1 Dosage de la teneur en VW des fractions

Le dosage du peptide cible (VW) a été réalisé par CLHP en phase inverse couplée à une analyse SM, selon un protocole mis au point par le Dr. R. Kapel. Le choix s'est porté sur ce type de technique analytique en raison de la faible concentration en peptide cible dans les mélanges et de la complexité de l'hydrolysât (composé de plus d'une centaine de peptides), nécessitant un dosage particulièrement sensible et spécifique. L'emploi de la LC-MS se justifie également par le fait que le pic UV relatif au peptide VW correspond à plusieurs composés peptidiques co-élus durant le protocole CLHP (Figure 82) : le peptide VW et un peptide de masse molaire égale à 205 g.mol⁻¹.

Le dosage utilise un étalon interne : le peptide GWG qui a comme propriétés d'avoir une polarité assez proche de celle de VW, et donc des temps de rétention proches pour les deux peptides. Mais

également, le peptide GWG possède un coefficient d'extinction molaire proche du VW, l'intensité des signaux UV obtenus pour les deux peptides seront ainsi sensiblement similaires pour une concentration identique.

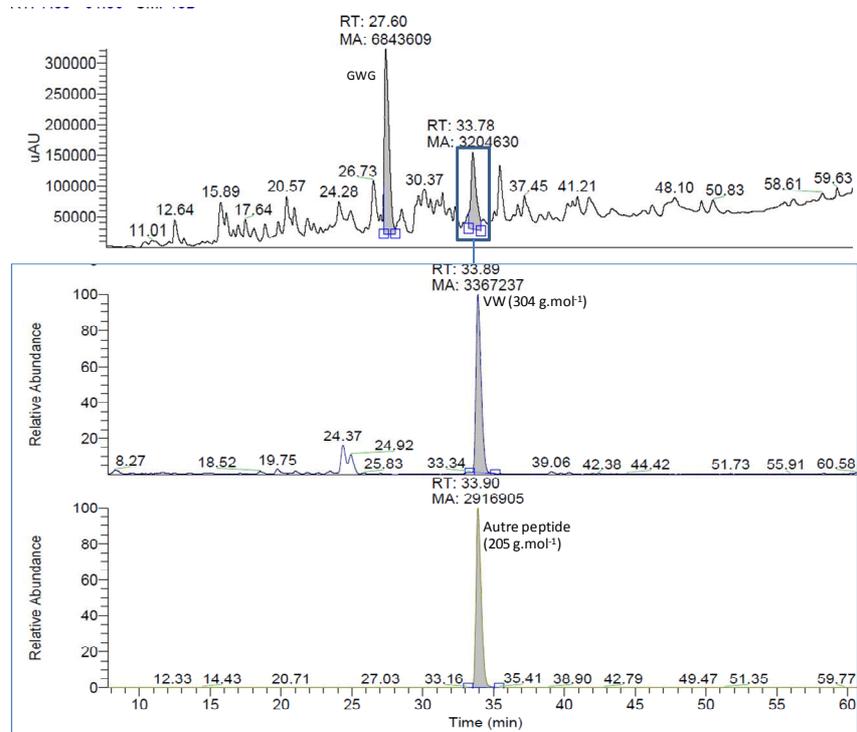


Figure 82 : Chromatogramme CLHP de l'hydrolysats en haut, "chromatogrammes" pour le signal SM de 303,5 à 304,5 g.mol⁻¹ (au centre), et pour 204,4 à 205,5 g.mol⁻¹ (en bas).

Protocole d'analyse LC-MS

Pour chaque analyse, 10 µl d'échantillon (hydrolysats ou fraction de CPC lyophilisée) sont injectés sur une colonne de phase inverse C18 (2,1 mm x 250 mm, billes de 5 µm de diamètre, Prospher) connectée à un système de CLHP (Surveyor LC-MS pump, Thermoelectron corporation). L'élution est réalisée par un gradient d'acétonitrile à deux phases en utilisant un mélange A (eau/TFA 99.9:0.1, v/v) et un solvant B (acétonitrile/TFA, 99.9:0.1, v/v). La première phase est un gradient de 100 à 72 % de mélange A (0 % à 28 % de solvant B) pendant 50 minutes. La seconde phase est un gradient de 72 % à 60 % de mélange A (28 à 40 % de solvant B) en 20 minutes. A l'issue de ce gradient, la colonne est lavée avec 100 % de solvant B puis rééquilibrée par 100 % de mélange A. L'éluant est analysé en ligne par (i) un détecteur UV à barrette de diode (réglé à une longueur d'onde de 226 nm) et (ii) un spectromètre de masse electrospray à trappe ionique en mode d'ionisation positif (LTQ, Thermoelectron corporation). Les chromatogrammes (UV) et spectres (SM) sont générés par le logiciel Xcalibur 2 (Thermoelectron corporation), utilisé également pour l'analyse des signaux du peptide cible.

Les échantillons sont repris dans 5 ml du tampon A d'élution, puis si nécessaire dilués au demi pour obtenir une solution de concentration environ 20 mg/l.

Cette solution échantillon est ensuite diluée au demi avec une solution d'étalon interne GWG titrant à 50 mg/l. La concentration finale en GWG ainsi obtenue est 25 mg/l.

Le ratio des aires sous la courbe des pics du peptide VW (m/z 304) sur le pic de l'étalon GWG (m/z 319) est ensuite reporté sur une droite d'étalonnage, qui donne alors la concentration en VW.

Cette droite a été réalisée avec une gamme de concentration en VW de 1,5 à 25 mg/l.

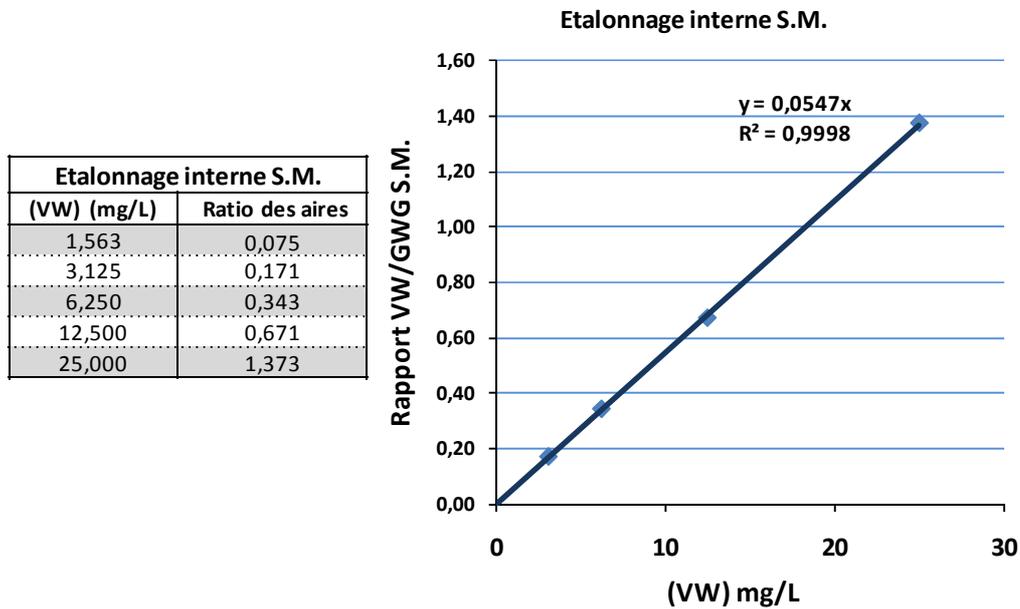


Figure 83 : Droite d'étalonnage de la teneur en VW.

L'hydrolysats de départ contient ainsi 2,66 mg de VW par gramme d'hydrolysats soit environ 0,3%.

II.2.1.2.3.2 Ratio DEHPA/peptides optimal

Dans un premier temps, il nous a fallu adapter le ratio DEHPA/peptide pour obtenir un compromis entre l'extraction optimale de tous les peptides, et l'enrichissement optimal en VW.

Protocole d'analyse CLHP des fractions

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex Summit HPLC (Dionex, USA), équipée d'une pompe P580, d'un injecteur automatique ASI-100, d'un four à colonne STH et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD340S. La colonne utilisée est une colonne Luna C18 (250 x 4,6 id, 5 µm) équipée d'une pré-colonne SecurityGuard analytique KJ0-4282 avec des cartouches (4 x 3,0 mm C12) (Phenomenex, Le Pecq, France). Les éluants utilisés sont de l'eau contenant 0,1% TFA et de l'acétonitrile contenant 0,09% TFA. Le gradient utilisé est le suivant. Le point de départ est une phase 100% aqueuse. La quantité d'acétonitrile est portée à 28% (v/v) en 50 min, puis à 47% (v/v) en 20 minutes et enfin à 100% en une minute et maintenue pendant 15 min. Le débit de phase mobile a été fixé à 1 ml/min. La détection UV a été fixée à $\lambda = 215, 280$ nm et la température du four a été réglée à 25 °C. Le volume d'injection est de 40 µl pour des solutions concentrées à 10 mg/ml. La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

Différents ratios DEHPA/peptides ont été testés selon le protocole de test en piluliers décrit précédemment et analysés par CCM et CLHP. Deux approches ont été réalisées et comparées : la

première a consisté en une extraction de la quasi totalité des peptides présents dans cet hydrolysate, la sélectivité étant apportée par le déplaceur ; la seconde a consisté en la tentative d'extraction plus sélective du dipeptide VW pour éliminer un maximum de peptides non retenus par élution durant l'étape de lavage.

Dans la première approche, nous avons donc testé des excès de DEHPA de 21, 42 et 63 fois. Le ratio égal à 42 a été retenu et transposé en CPC (Exp.1 Tableau 24).

Pour la seconde approche, nous avons vu que la quantité optimale d'échangeur à utiliser est sous la dépendance du nombre d'acides aminés composant les peptides à extraire (Figure 62 p. 139). Sur cette figure nous pouvons ainsi remarquer que le ratio nécessaire pour extraire des peptides de 6 AA est d'environ 21 (3,5 par AA) alors que celui optimal pour l'extraction de dipeptide est de 5,4 (2,7 par AA). Nous pouvons raisonnablement penser qu'en utilisant le ratio optimal pour les dipeptides, les peptides de tailles supérieures ne seront pas retenus. Nous avons ainsi testé le ratio DEHPA/peptides égal à 5 (exp.2).

Tableau 24 : Conditions opératoires utilisées pour la capture de VW

Expérience	Exp.1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Masse injectée	254,9 mg	254,6 mg	252,9 mg	1,07 g
[DEHPA]	95 mM	11,2 mM	33,6 mM	135 mM
Ratio DEHPA/peptides	42	5	15	15
Composition phase stationnaire	25% à 30 % TEA puis 75 % à 2,15 % de TEA			
[CaCl ₂]	9 mM	1,06 mM	3,18 mM	12,8 mM
Temps addition CaCl ₂	80 min	35 min	35 min	37 min
[HCl]	30,7 mM	2 mM	7,5 mM	30,1 mM
Temps addition HCl	210 min	126 min	150 min	250 min
Mode	descendant			
Débit	2 ml/min			
Rotation	1200 rpm			1100 rpm
Rétention de phase stationnaire	73 %	75 %	75 %	72 %
Perte de charge	30 bars	32 bars	33 bars	25 bars
Teneur en VW de la fraction	66 mg/g d'hydrolysate	27 mg/g d'hydrolysate	110 mg/g d'hydrolysate	109 mg/g d'hydrolysate
Facteur d'enrichissement	24,8	10,2	41,3	41,0
Rendement	96 %	97 %	97 %	97 %

Le peptide VW est déplacé uniquement par le second déplaceur, l'acide chlorhydrique. Ce fait était prévisible du fait de l'hydrophobie importante du dipeptide par rapport à sa taille. Le déplacement déclenché seulement par l'HCl est un avantage certain dans une étape de capture, la majorité des peptides pouvant être élués ou déplacés avant l'introduction du second déplaceur. La fraction enrichie ainsi obtenue pour le ratio DEHPA/peptides de 42 contient environ 6,6 % de VW soit un facteur d'enrichissement de près de 25 (données LC-MS), ce qui est correct.

La seconde stratégie, utilisant un ratio DEHPA/peptides de 5, a engendré une moins bonne rétention du peptide VW qui est alors pollué par des ions calcium. Néanmoins, une plus grande proportion de peptides est éliminée avant introduction de l'HCl, nous avons donc choisi de continuer selon cette approche.

En augmentant le ratio à 15, la sélectivité recherchée est obtenue tout en conservant une bonne rétention du peptide VW. Le peptide VW étant déplacé uniquement après introduction de l'HCl, le chlorure de calcium est introduit dans la colonne 10 min environ après l'obtention du front de solvants, et ce pour diminuer la durée expérimentale.

Système MtBE/CH₃CN/*n*-BuOH/eau (2:2:1:5, v/v), mode descendant, DEHPA 33,6 mM TEA 30 % puis 2,15 %, CaCl₂ 3,18 mM, HCl 7,5 mM, débit 2 ml/min, 1200 rpm, UV 215 nm

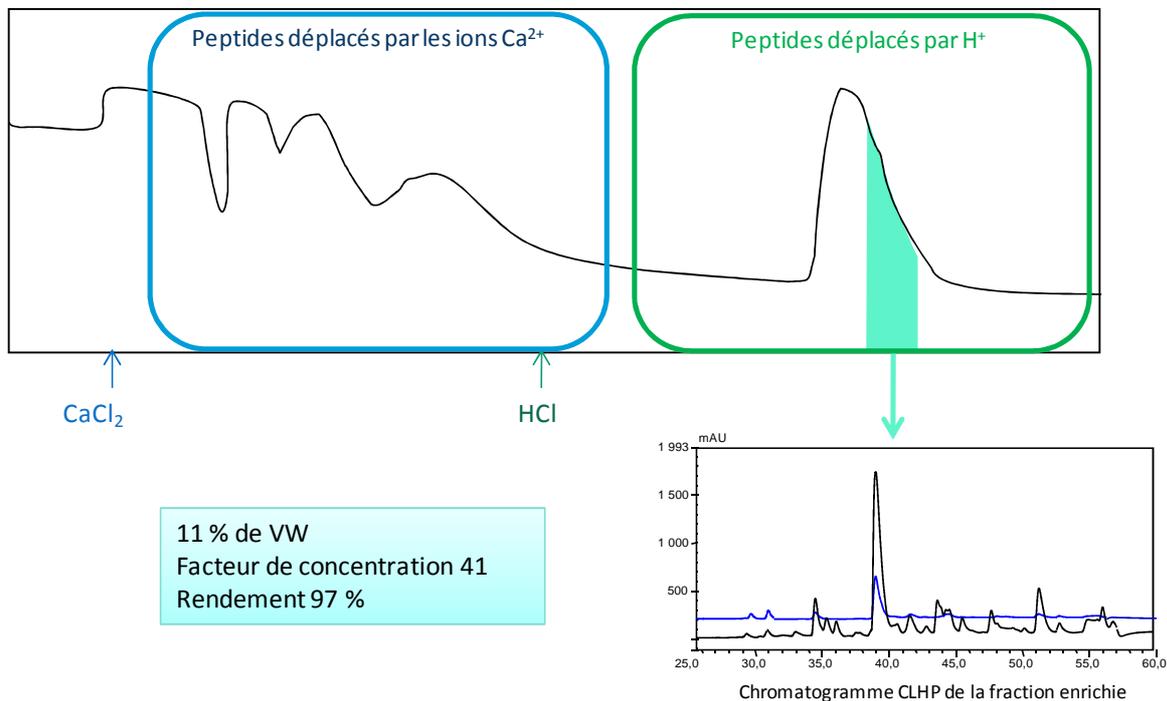


Figure 84 : Chromatogramme CPC du fractionnement de l'hydrolysate dans les conditions de l'expérience 3 (en haut) et chromatogramme CLHP de la fraction enrichie obtenue (en bas)

L'HCl est introduit dans la colonne lorsque le signal UV revient à la ligne de base. Ainsi sur la Figure 84, sont représentées deux zones différentes correspondant au déplacement par les ions calcium puis par l'acide.

La fraction enrichie ainsi obtenue contient environ 11 % de VW soit un facteur d'enrichissement de 41, ce qui est conséquent pour un procédé en une seule étape (Figure 84).

Après avoir optimisé les conditions opératoires, nous avons réalisé une montée en échelle du procédé.

II.2.1.2.3.3 Montée en échelle

Les conditions opératoires utilisées sont mentionnées Tableau 24. Un gramme d'hydrolysat a été introduit dans la colonne, les quantités d'échangeur et des déplaceurs utilisées étant adaptées pour conserver des ratios identiques et donc un temps d'expérience relativement proche.

Le chromatogramme CPC obtenu est représenté Figure 85. Nous pouvons remarquer d'emblée que le temps d'expérience est considérablement augmenté, de près de 150 min. Ceci peut s'expliquer facilement par le fait que l'introduction des déplaceurs est retardée, conséquence directe de l'augmentation de la teneur en composés non retenus. L'augmentation de durée d'expérience constatée est donc normale, mais diminue la productivité du procédé.

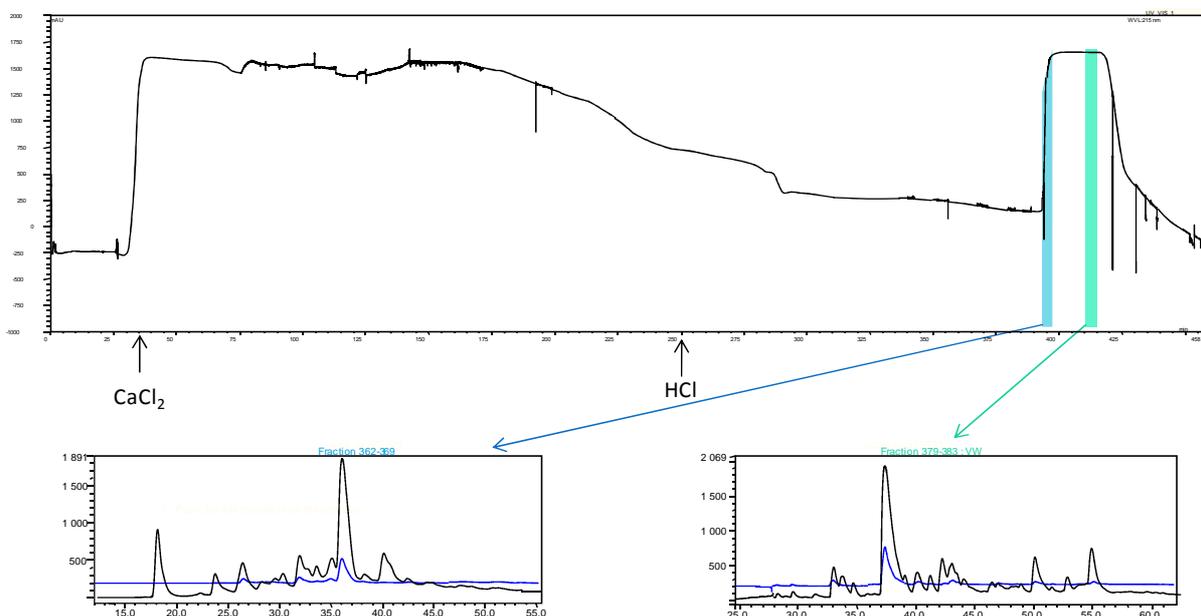


Figure 85 : Chromatogramme CPC obtenu après injection d'1 g d'hydrolysat de protéines blanches de luzerne (en haut). Conditions opératoires: système de solvants MtBE/n-BuOH/CH₃CN/eau (2:2:1:5, v/v), DEHPA dans la phase stationnaire organique 135 mM avec 40,5 mM et 2,9 mM de TEA, dans les proportions 25% et 75% respectivement ; CaCl₂ 12,8 mM et HCl 30,1 mM dans la phase mobile aqueuse ; mode descendant, débit 2 ml/min, vitesse de rotation 1100 rpm, perte de charge 33 bars, rétention de la phase stationnaire 74%, détection UV à 215 nm ; Chromatogramme CLHP d'analyse des fractions 362-369(en bleu) contenant un tétrapeptide et 379-383 contenant le peptide VW (en vert) en bas.

La fraction enrichie en VW, notée 379-383, contient environ 10,9 % du peptide d'intérêt VW. Ceci est un point très positif, la sélectivité du procédé n'étant quasiment pas affectée par la montée en échelle. Cette fraction sera par la suite évaluée en tant qu'agent antioxydant potentiel, ainsi qu'en tant qu'inhibiteur d'enzyme. Une seconde fraction, notée 363-369, est enrichie en un peptide de masse molaire 495 g.mol⁻¹, et sera également testée biologiquement. La séquence de ce tétrapeptide est actuellement en cours d'analyse.

En conclusion, le procédé par MIXCPC s'est avéré très performant pour la capture d'un peptide bioactif clairement identifié, au sein d'un mélange complexe de peptides. Il a ainsi permis l'enrichissement conséquent en VW, d'un facteur 41, en une seule étape.

Le point faible de ce protocole est la durée d'expérience conséquente qui grève la productivité d'une étape de capture. Une perspective envisagée est la transposition du procédé sur l'extracteur de partage centrifuge (EPC). Cet extracteur présente une colonne avec des cellules de taille supérieure, permettant l'emploi de débits de travail beaucoup plus importants, jusqu'à $300 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ sur une colonne de 350 ml. En utilisant cet extracteur, la productivité sera considérablement augmentée, ce qui rendra le procédé plus rentable dans une optique de valorisation industrielle. De plus, la fraction enrichie obtenue après capture par échange d'ions mixte avec l'EPC, pourra si besoin être purifiée par MIXCPC et ainsi encore enrichie.

Cette problématique de capture d'un composé identifié est un exemple d'application idéal pour tester le procédé par échange d'ions mixte, qui demeure relativement facile à mettre en œuvre. Dans le cas des deux prochaines sources de peptides issues du procédé luzernier, la problématique est tout autre : nous ne disposons que de très peu de données sur la nature des peptides présents, ni même sur le taux de peptides réels. Egalement, toutes les molécules sont considérées comme potentiellement intéressantes pour le screening biologique que nous allons réaliser.

II.2.1.3 Application à des extraits issus du procédé luzernier de déshydratation

II.2.1.3.1 Le procédé industriel de déshydratation de la luzerne

Ce procédé consiste à sécher artificiellement la luzerne aussitôt sa récolte puis à la conserver sous atmosphère inerte pour protéger les éléments les plus oxydables, comme les pigments ou les vitamines. En plus de permettre la préservation des qualités nutritionnelles, ce procédé permet l'approvisionnement de l'industrie de l'alimentation du bétail tout au long de l'année.^{39, 40}

Dans le but d'accroître encore le potentiel nutritionnel de la luzerne en alimentation animale, l'union de coopératives champenoises France Luzerne a eu l'idée en 1970 de faire précéder la déshydratation d'un processus d'extraction par pressage de la luzerne.^{39, 40}

Ce procédé se déroule en cinq étapes différentes et aboutit à de nombreux produits dérivés. Il est résumé Figure 86.

La luzerne est broyée puis pressée immédiatement après récolte, et ce pour séparer une grande majorité des éléments nutritifs des fibres non digestibles.

Les éléments nutritionnels sont alors recueillis dans le jus de pressage ou jus vert. Ce sont essentiellement des protéines chloroplastiques et cytoplasmiques, des pigments (xanthophylles, chlorophylles) et des vitamines.⁴⁰

La majeure partie des protéines est ensuite coagulée par injection de vapeur. Les protéines entraînent avec elles les pigments, les vitamines liposolubles, les lipides et les minéraux. Le coagulum est ensuite séparé par centrifugation du reste de la solution, ou sérum brun. Le coagulum ou concentré protéique contient plus de 50 % de matières azotées totales dont 80 % de protéines pures accompagnées de quelques peptides et acides aminés.^{39, 40}

Pour la consommation animale, le concentré protéique est baptisé PX pour protéines xanthophylles. Pour l'alimentation humaine, le produit est appelé extrait foliaire (EFL). La protéine la plus abondante au sein de cet extrait est là encore la RuBisCO.^{39, 40}

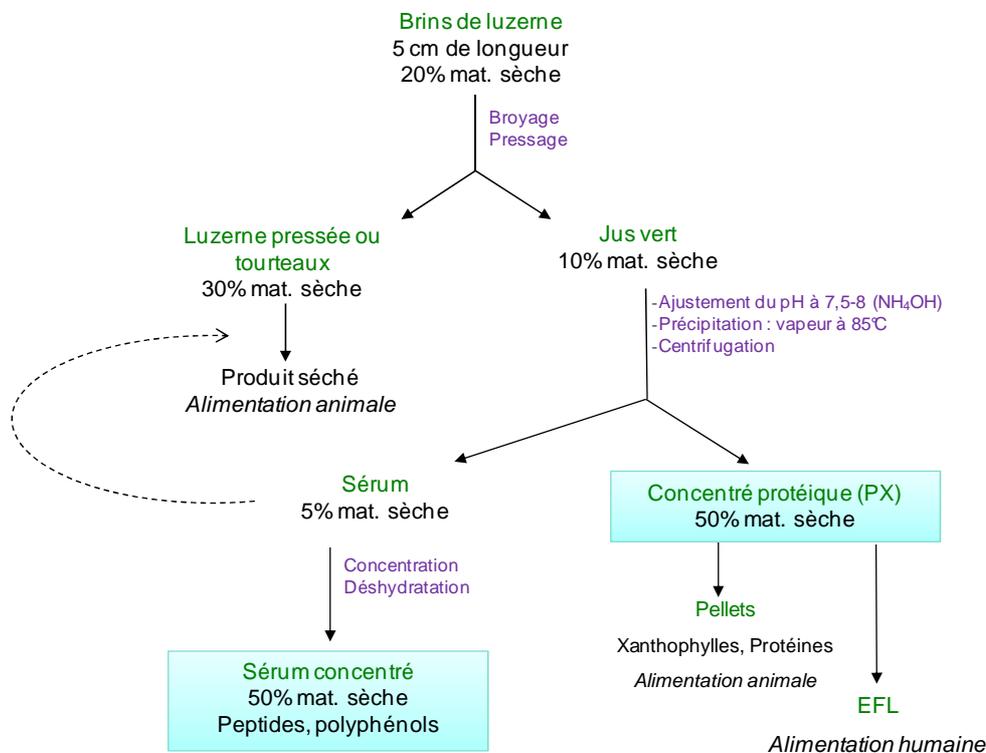


Figure 86 : Procédé industriel schématique d'extraction/déshydratation de la luzerne.

Les difficultés économiques de la filière luzerne ont conduit les acteurs de ce secteur à chercher de nouvelles voies de valorisation pour les produits issus du procédé industriel d'extraction/déshydratation. Les secteurs à très haute valeur ajoutée, comme la cosmétique, la thérapeutique et le nutraceutique, ont été ainsi explorés.

Une application dans le domaine du nutraceutique existe déjà : l'utilisation des EFL commercialisés par la société Prolivim (Reims, France) pour le "traitement" de la malnutrition carencielle.^{39, 40}

II.2.1.3.2 Le sérum de luzerne

Le sérum de luzerne nous a été fourni gracieusement par la société ARD (Pomacle, France). Il est directement issu du procédé luzernier décrit Figure 86. Nous allons dans un premiers temps voir la composition de ce sérum.

II.2.1.3.2.1 Composition du sérum de luzerne

Les données analytiques que nous avons à notre disposition sont résumées Tableau 25 (Annexe 2 et Annexe 3).

Tableau 25 : Caractéristiques physico-chimiques du sérum de luzerne fourni.

Caractéristique du sérum	Valeur
Matière sèche (MS) %	> 93 %
Matière azotée totale (N x 6,25) %MS	20 % ± 2
Matière minérale %MS	26 % ± 2
Sucres totaux %MS	13% ± 1
Fibres totales %MS	< 5%
Acides organiques libres %MS	8 % ±2
pH (solution à 10%)	5,8 ± 0,2

La distribution massique des peptides se situe majoritairement entre 350 et 1150 Da soit des séquences comprises entre 3 et 11 acides aminés.

Il est également reporté que le sérum peut contenir une proportion non négligeable de composés de type polyphénols. Nous avons donc commencé par réaliser une analyse rapide de ce sérum par CCM et CLHP.

Protocole d'analyse CLHP des fractions de sérum de luzerne

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex Summit HPLC (Dionex, USA), équipée d'une pompe P580, d'un injecteur automatique ASI-100, d'un four à colonne STH et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD340S. La colonne utilisée est une colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 µm) équipée d'une pré-colonne SecurityGuard analytique KJ0-4282 avec des cartouches (4 x 3,0 mm C12) (Phenomenex, Le Pecq, France). Les éluants utilisés sont de l'eau contenant 0,1% TFA et de l'acétonitrile contenant 0,09% TFA. Le gradient utilisé est le suivant. Le point de départ est une phase 100% aqueuse. La quantité d'acétonitrile est portée à 50% (v/v) en 60 min et maintenue à 50% (v/v) pendant 10 min. Le débit de phase mobile a été fixé à 0,5 ml par minute. La détection UV a été fixée à $\lambda = 215, 280$ et 325 nm et la température du four a été réglée à 25 ° C. Le volume d'injection est de 40 µl pour des solutions concentrées à 5 mg/ml. La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

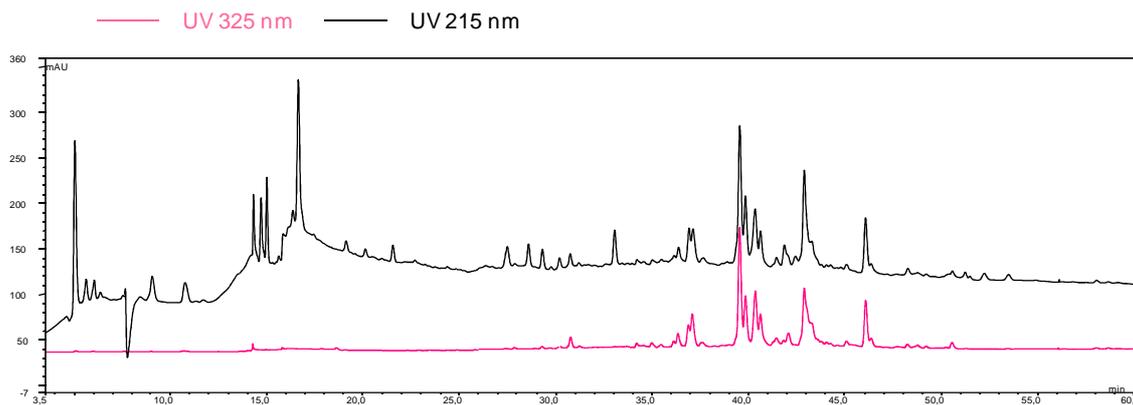


Figure 87 : Chromatogramme CLHP du sérum de luzerne. Colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 μ m) . Gradient eau 0,1% TFA jusqu'au 0,1% TFA/CH₃CN 0.09% TFA (50:50, v/v) en 60 min. Détection 215 nm (noir) et 325 nm (rose).

A 215 nm, les peptides sont détectés mais de façon non spécifique. Le sérum étant également très riche en polyphénols, nous détectons ces derniers à la longueur d'onde de 325 nm, ce qui nous permet alors de situer les pics correspondant aux peptides (Figure 87).

Les polyphénols sont de puissants inhibiteurs non spécifiques de nombreux systèmes enzymatiques, ainsi que de puissants antioxydants. Le screening biologique envisagé consécutivement au fractionnement par MIXCPC ne pourra être significatif que si les polyphénols ont été éliminés. Pour cela un pré-conditionnement du sérum a été réalisé.

II.2.1.3.2.2 Pré-conditionnement du sérum

Ce pré-conditionnement a consisté en deux étapes : l'élimination des polyphénols et l'enrichissement du contenu en peptides.

Pour éliminer les polyphénols de notre sérum, nous nous sommes basés sur les travaux de Prévost d'Alvise *et al.*⁴⁶ qui ont ainsi passé en revue un certain nombre de résines aromatiques, et anioniques pour l'élimination de polyphénols d'un hydrolysat de concentré de protéines de luzerne. Après différents essais, nous avons retenu la résine polyaromatique Amberlite XAD 16.

Protocole d'élimination des polyphénols

La résine XAD 16 a été achetée chez Sigma-Aldrich.

La résine est conditionnée sous MeOH pendant une nuit. La colonne est ensuite montée, et la résine est lavée extensivement avec de l'eau osmosée pour la conditionner.

45 g de sérum ont été solubilisés dans un volume approprié d'eau et déposés en tête de colonne. Le gradient d'élution suivant a été utilisé : 100 % eau ; eau/MeOH (95:5, v/v) ; eau/MeOH (90:10, v/v) ; eau/MeOH (80:20, v/v) ; eau/MeOH (50:50, v/v) ; MeOH 100 %.

Le changement d'éluant est opéré lorsque l'éluant redevient limpide et incolore. Lors de l'élution par l'eau, plusieurs fractions ont été formées en changeant de fraction tous les 300 ml.

Les différentes fractions obtenues ont été ensuite analysées par CCM et par CLHP avant d'être regroupées pour certaines.

Après analyse CLHP et CCM des fractions, les peptides sont répartis de la fraction 1_1 à la fraction 3 (Tableau 26). Les polyphénols sont quant à eux majoritairement présents dans les fractions 5 et 6. Les fractions 4 à 6 ne contenant que très peu de peptides, le dosage de leur teneur en composés azotés n'a pas été réalisé.

Tableau 26 : Bilan des fractions obtenues après pré-conditionnement du sérum

Fraction	Masse (g)	Teneur en composés azotés (N x 6,25)	Masse du surnageant (g)	Teneur en composés azotés (N x 6,25)*
Fr 1_1	22,08	14	6,54	16
Fr 1_2	9,06	16	5,13	24
Fr 1_3/4	2,47	34	1,36	29
Fr 1_5/6/7	0,82	37	0,48	41
Fr 2	0,69	33	0,32	35
Fr 3	0,78	40	0,41	42
Fr 4	2,24	/	/	/
Fr 5	2,34	/	/	/
Fr 6	2,34	/	/	/

* dosage micro-Kjeldahl réalisé à Nancy (UPR 6811)

Un screening phytochimique du sérum a été réalisé, et a montré que ce dernier contenait également une quantité non négligeable de saponosides. Pour tenter d'éliminer ces composés, il est classique de les faire précipiter en utilisant l'effet anti-solvant de l'acétone. Cette technique de précipitation est également utilisée pour purifier certains polypeptides en les faisant précipiter. Néanmoins, les peptides contenus dans le sérum étant de petite taille, nous pouvons penser que ces derniers ne précipiteront pas lors de l'ajout d'acétone.

Protocole de précipitation des fractions à l'acétone

La fraction de sérum est dissoute dans un minimum d'eau. Un volume d'acétone correspondant à 5 fois le volume d'eau introduit pour la solubilisation de la fraction est ajouté à la solution aqueuse, puis le système est laissé sous agitation magnétique pendant 15 min.

Le surnageant est alors filtré sur papier filtre, ce dernier étant ensuite lavé 3 fois à l'acétone. Le précipité est redissout dans un volume d'eau, puis à nouveau précipité par un excès d'acétone. Cette opération est répétée 3 fois.

Les surnageants (notés s) et précipités (notés p) (Figure 88) obtenus sont concentrés sur évaporateur rotatifs puis lyophilisés.

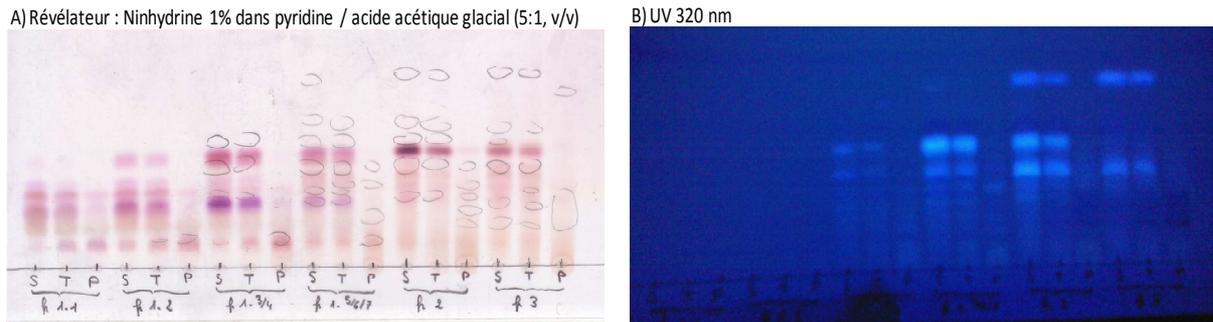


Figure 88 : Plaques CCM récapitulatives des différents surnageants et précipités obtenus: éluant *n*-BuOH/acide acétique/eau (55:15:30, v/v), plaque Si normale Merck F254, notation S surnageant, P précipité, T témoin avant précipitation.

La première constatation est que les peptides sont majoritairement présents dans le surnageant, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle ces peptides seraient de petite taille. Nous nous sommes donc focalisés sur le fractionnement de ces surnageants.

Nous pouvons également noter, que les produits visibles sous UV à 320 nm, vraisemblablement des composés polyphénoliques, sont également majoritairement présents dans les surnageants des fractions 1_3/4 à 3 (Figure 88). Néanmoins, d'après l'analyse CLHP, les composés de type polyphénols sont en fait très minoritaires même si l'intensité des spots semble élevée sous UV.

Les différents surnageants Fr 1_1s, Fr 1_2s, Fr 1_3/4s, Fr 1_5/6/7s, Fr 2s et Fr 3s ont été testés comme antioxydants et inhibiteurs d'enzymes, comme nous le verrons dans la partie suivante.

II.2.1.3.2.3 Fractionnement par MIXCPC

Les surnageants ont été fractionnés par MIXCPC en adaptant les conditions expérimentales. Pour ce faire, nous avons considéré que la taille moyenne des peptides était de 8 acides aminés soit une masse molaire moyenne évaluée à 800 g.mol^{-1} , et que la teneur en peptides était de 55 % (données estimées par la société ARD). Nous avons donc employé un ratio théorique DEHPA/peptide de 32 (selon les données du graphique Figure 62 p.139), ce qui correspond à une concentration en DEHPA de 36 mM et ce pour tous les extraits.

Les ratios DEHPA/peptides apparaissant Tableau 27 ont ainsi été recalculés *a posteriori*, à la lumière des résultats du dosage d'azote total.

Chaque surnageant a été fractionné en utilisant le procédé par échange d'ions mixte, avec une phase stationnaire segmentée, et l'utilisation des deux déplaceurs.

Tableau 27 : Conditions opératoires utilisées pour le fractionnement des surnageants par MIXCPC.

Surnageant	Fr 1_1 s	Fr 1_2 s	Fr 1_3/4 s	Fr 1_5/6/7 s	Fr 2 s	Fr 3 s
Masse injectée	244,8 mg	251,4 mg	255,7 mg	250,6 mg	251 mg	254,3 mg
[DEHPA]	36 mM					
Ratio DEHPA/peptides	110	70	54	42	40	40
Composition phase stationnaire	25% à 30 % TEA puis 75 % à 2,15 % de TEA					
[CaCl ₂]	3,45 mM					
Temps addition (CaCl ₂)	37 min	43 min	60 min	69 min	85 min	92 min
[HCl]	5,99 mM					
Temps addition (HCl)	73 min	80 min	110 min	105 min	150 min	180 min
Mode	descendant					
Débit	2 ml/min					
Rotation	1200 rpm					
Rétention de phase stationnaire	75 %	73 %	70 %	75 %	64 %	75 %
Perte de charge	34 bars	26 bars	25 bars	22 bars	22 bars	33
Volume d'injection	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	20 ml	10 ml
Détection	215, 280 et 325 nm					

Lors de chaque fractionnement, nous avons obtenus une dizaine de fractions chimiquement simplifiées. Est détaillé ci-après uniquement le cas du surnageant issu de la fraction Fr 3 (Tableau 28): Fr 3s, ce surnageant étant le seul à avoir montré une activité biologique prometteuse (III.2).

Tableau 28 : Bilan massique du fractionnement du Fr 3s.

Fraction	Masse (mg)
3-7	35,7
8-18	57,8
19-26	24,3
27-49	22,6
50-67	17,0
68-95	23,1
96-101	2,8
102-118	29,3
119-131	25,2
132-154	26,7

Les quatre premières fractions contiennent des produits qui n'ont pas été déplacés mais simplement élués. La cinquième fraction 68-95 est une fraction de transition entre l'éluion et le début du déplacement par les ions calcium. Les dernières fractions sont quant à elles déplacées par les ions calcium. Aucun composé n'a été déplacé par l'acide chlorhydrique.

Les composés de type polyphénoliques n'ont pas été retenus, ces derniers étant présents uniquement dans les trois premières fractions. Cette constatation est un point très positif, le procédé par MIXCPC permet donc de séparer les polyphénols des peptides retenus en phase stationnaire par l'échangeur.

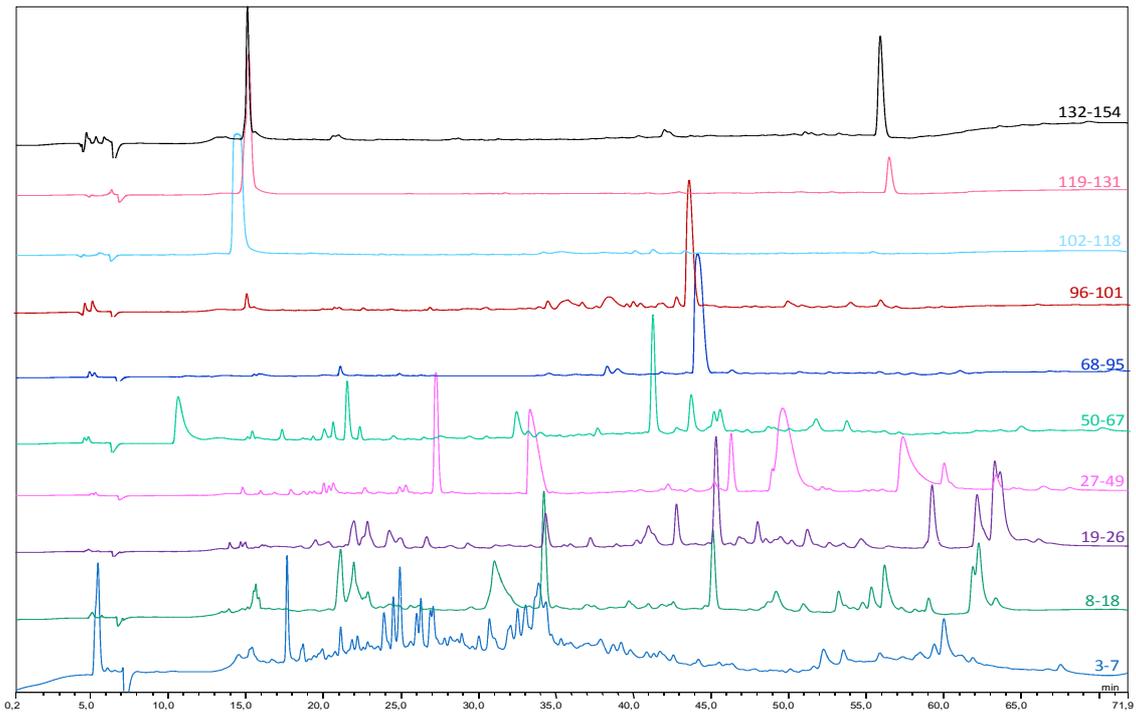


Figure 89 : Chromatogrammes CLHP des différentes fractions obtenues par fractionnement de F 3s.

L'ensemble de ces fractions ont été testées sur les cibles biologiques, et celles montrant un potentiel intéressant ont ensuite été purifiées et analysées.

Le fractionnement obtenu, réalisé sur la base du fractogramme CCM, dans ces conditions est un des fractionnements possibles mais nous ne pouvons en aucune façon conclure sur la pertinence de ce dernier. Les produits n'étant pas caractérisés, nous n'avons aucun recul quant à l'intérêt de ces composés d'un point de vue chimique et/ou biologique.

II.2.1.3.3 Application à l'hydrolysat de concentré de PX

L'hydrolysat de concentré de protéines et xanthophylles (PX) nous a été fourni gracieusement par la société ARD (Pomacle, France).

II.2.1.3.3.1 Données sur l'hydrolysat de PX

Le concentré de PX est un produit issu du procédé luzernier de déshydratation. Comme son nom le laisse présager, il est relativement riche en protéines (50 à 60 %) et en pigments de type xanthophylle (10 %), comme la lutéine (Figure 90). Il contient également une proportion non négligeable de sucres (6 %).³⁹

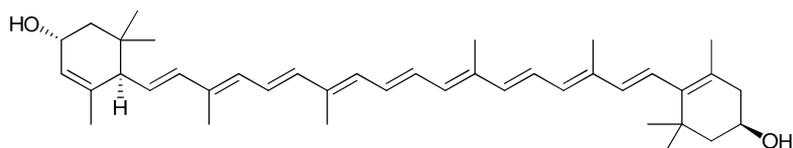


Figure 90 : Structure de la lutéine.

Ce concentré a été hydrolysé par une thermolysine à 50 °C à pH 8, puis centrifugé et enfin séché par atomisation pour obtenir l'hydrolysat de PX mis à notre disposition. La composition de cet hydrolysat est résumée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 29 : Composition de l'hydrolysat de PX.

Composition	Teneur (%)
Matière sèche	99
Composé azotés	61,1
Distribution majoritaire des peptides (MM)	200 - 1500 Da
Polyphénols	1,9
Cendres	21,5

II.2.1.3.3.2 Fractionnement par MIXCPC

Ici encore, nous ne disposons que de peu d'informations sur la nature exacte des peptides présents dans cet hydrolysat. Nous avons donc fixé un ratio DEHPA/peptides sur la base des données que nous possédions : une teneur en peptide de 60 % avec une longueur de chaîne moyenne de 8 acides aminés. Le ratio DEHPA/peptides que nous avons appliqué est ainsi de 32.

Les conditions opératoires employées sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 30: Conditions opératoires du fractionnement de l'hydrolysat de PX par MIXCPC.

Conditions expérimentales	
Masse injectée	251,8 mg
[DEHPA]	36 mM
Ratio DEHPA/peptides	32
Composition phase stationnaire	25% à 30 % TEA puis 75 % à 2,15 % de TEA
[CaCl ₂]	3,45 mM
Temps addition CaCl ₂	90 min
[HCl]	5,99 mM
Temps addition HCl	170 min
Mode	descendant
Débit	2 ml/min
Rotation	1200 rpm
Rétention de phase stationnaire	75 %
Perte de charge	32 bars
Volume d'injection	10 ml
Détection	215, 280 et 325 nm

Quatorze fractions chimiquement simplifiées ont été obtenues par ce procédé. Cette fois trois groupes de fractions peuvent être formés : un de composés élués et non déplacés, un de composés déplacés par les ions calcium et enfin un de composés déplacés par l'acide chlorhydrique.

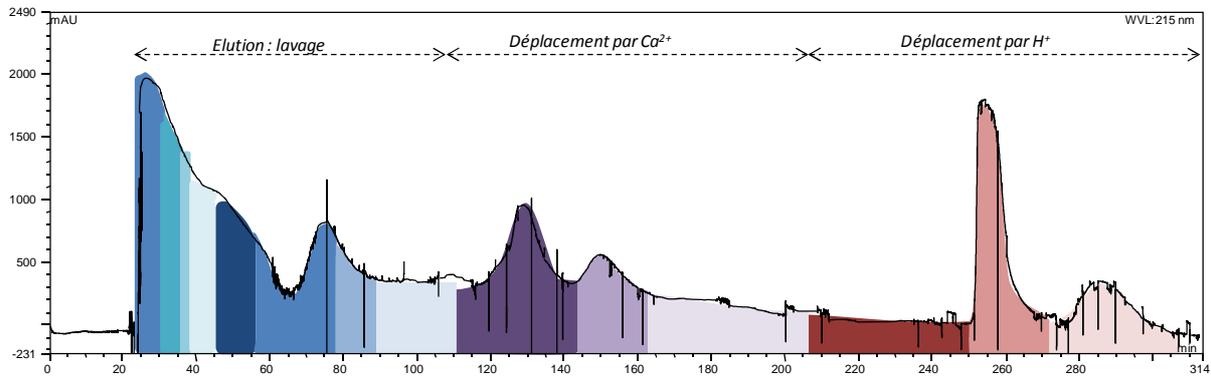


Figure 91 : Chromatogramme CPC obtenu lors du fractionnement de l'hydrolysate de PX par MIXCPC (Tableau 30), UV 215 nm.

Le bilan massique du fractionnement est mentionné dans le tableau ci-dessous. La masse des fractions 140-181 et 182-228 ne sont pas prise en compte lors du calcul du bilan massique, ces fractions étant composées quasi-exclusivement du CaCl₂ en excès (fraction 140-181) ou déplacé par l'HCl (fraction 182-228).

Tableau 31 : Bilan massique du fractionnement de l'hydrolysate de PX par MIXCPC

Fraction	Masse (mg)
1-4	19,5
5-9	20,0
10-12	7,6
13-19	14,4
20-29	15,4
30-53	41,2
54-68	13,8
69-90	12,0
91-122	45,3
123-138	21,5
140-181	39,7 *
182-228	34,9 *
229-256	19,1
257-290	1

* CaCl₂ élué conjointement

Cette fois encore la pertinence du fractionnement est non évaluable *a posteriori* pour les mêmes raisons que précédemment.

II.2.1.4 Conclusion sur l'application du procédé par MIXCPC à l'étape de capture

Le procédé par MXCPC s'est avéré particulièrement adapté pour une étape de capture, étape amont d'un procédé de production de peptides.

La capture du peptide bioactif VW au sein de l'hydrolysat de protéines blanches de luzerne, a été réalisée avec succès. Le facteur d'enrichissement résultant, 41 en une seule étape, illustre la très grande sélectivité du procédé. Une fraction enrichie contenant environ 11 % de VW a ainsi été obtenue à partir de l'hydrolysat contenant au maximum 0,3% de ce peptide. Les premiers tests de montée en échelle ont montré de plus la robustesse du procédé, le facteur d'enrichissement n'étant pas affecté.

En plus de la fraction enrichie en VW, une seconde fraction enrichie en un tétrapeptide de masse molaire 495 g.mol^{-1} a également été obtenue. Ces deux fractions ont fait l'objet de tests biologiques (III.3) pour étudier leur potentiel en tant qu'agent anti-âge.

Le fractionnement des extraits de luzerne issu du procédé industriel de déshydratation de la luzerne, sérum et hydrolysat de PX, a été réalisé. L'utilisation du procédé par MIXCPC a permis d'obtenir dans les deux cas des fractions chimiquement très simplifiées, et dissemblables. Si nous ne pouvons pas conclure quant à la pertinence des fractionnements réalisés, le procédé a permis une discrimination importante des polyphénols résiduels, élués dans les premières fractions, et des peptides, déplacés, dans le cas du sérum, montrant là encore la sélectivité du procédé.

L'ensemble des bruts de sérum ainsi que les fractions issues de l'extrait F 3s ont été évalué biologiquement, toujours en tant qu'agent anti-âge potentiel.

II.2.2 Application du mode échange d'ions en tant que méthode de polissage : application à une problématique industrielle

Au cours de cette thèse, nous avons eu l'occasion de participer à différents projets de purifications de produits de nature peptidique d'intérêt industriel, en collaboration avec la société Lonza, avec les Drs J. Mc Garrity, M. Giraud (Viège, Suisse) et L. Forni (Braine, Belgique) en particulier. L'un des projets réalisés dans le cadre de cette collaboration est le polissage d'un peptide d'intérêt : le dirucotide.

II.2.2.1 Le dirucotide ou SF328

Le dirucotide est une molécule testée pour le traitement de la sclérose en plaque. La sclérose en plaques ou SEP est une maladie neurodégénérative, caractérisée par la destruction de la gaine de myéline responsable l'accélération de la conduction des influx nerveux et protégeant les axones des neurones. La SEP est une pathologie inflammatoire chronique qui évolue par poussées. Les premiers signes apparaissent généralement chez des jeunes adultes aux alentours de la vingtaine d'années.

Différents traitements existent et sont regroupés dans deux stratégies thérapeutiques : traitement symptomatique de soulagement des crises à l'aide d'anti-inflammatoires, comme les corticoïdes ; ou traitement de fond pour les formes rapidement évolutives à base d'immunomodulateurs (interféron beta, anticorps monoclonaux) ou d'immunosuppresseurs (methotrexate).

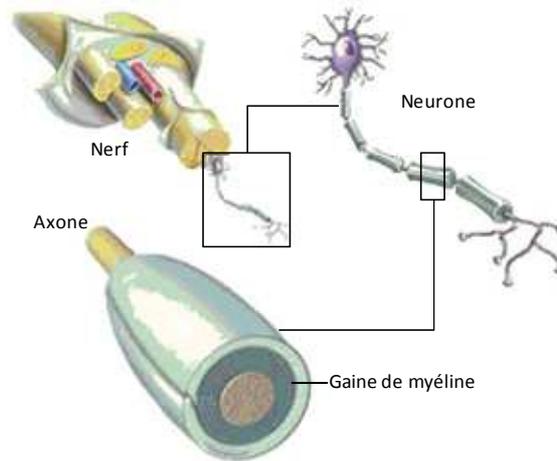


Figure 92 : Représentation en coupe d'un nerf, d'un neurone et de la gaine de myéline.⁴⁷

La SEP est une affection auto-immune, déclenchée vraisemblablement par des facteurs environnementaux chez les sujets présentant un terrain génétique particulier. Les lymphocytes T et B vont reconnaître la protéine basique de myéline comme étrangère, et vont alors déclencher une réponse immunitaire à son encontre, *via* la production d'anticorps anti-myéline entre autres. Ceci se traduit par la destruction de la gaine de myéline entourant les nerfs. Les signes cliniques en découlant sont des troubles de la motricité, de la sensibilité, voire une perte visuelle ou de mémoire selon les nerfs touchés.⁴⁸

Dans ce contexte, le dirucotide a représenté un réel espoir dans le traitement de cette pathologie. C'est un peptide correspondant au fragment 82-98 de la protéine basique de myéline. Cette séquence est celle reconnue à la fois par les lymphocytes B et T.⁴⁹ Ce peptide a entraîné un ralentissement de la progression de la maladie lors d'essais clinique de phase II. Des essais cliniques de phase III ont été alors autorisés par la FDA fin 2008.⁴⁸ Malheureusement, à l'été 2009, les résultats obtenus avec le traitement par le dirucotide, sur des sujets porteurs de SEP, ont été en deçà des attentes, avec une différence non significative par rapport au groupe traité par le placebo. Les essais ont alors été abandonnés par les sociétés propriétaires : Eli Lilly and Compagny et BioMS Medical Corporation.⁵⁰

Des études sont en cours pour tenter d'améliorer le potentiel de cette molécule, et ainsi plusieurs industriels se sont penchés sur la production de ce peptide comme la société Lonza (Viège, Suisse).

II.2.2.1.1 Propriétés physico-chimiques

Le dirucotide est un peptide de 17 acides aminés (Figure 93), dont la séquence est la suivante :

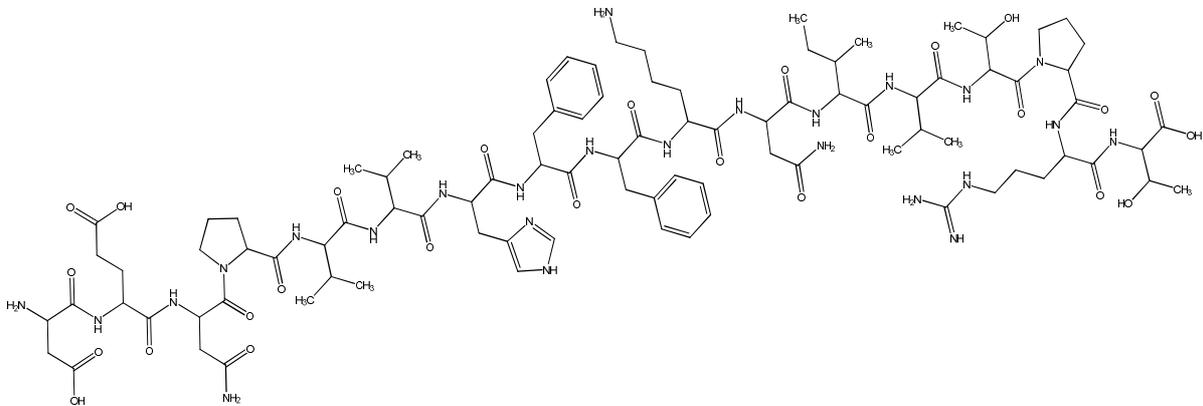


Figure 93 : Structure du dirucotide.

Ce peptide a un point isoélectrique situé à pH 7,5 (EMBOSS), et sa masse molaire est de 2012 g.mol⁻¹.

II.2.2.1.2 Information sur la matière première fournie et objectifs du projet

La matière première qui nous a été fournie contient 84,2 % de dirucotide nommé sous le code SF328. L'objectif premier est l'obtention d'une fraction pure de SF328 à 95 % *a minima*. Les impuretés présentant un temps de rétention très proche de celui du SF328 en CLHP, doivent être éliminées dans la mesure du possible (Figure 94).

Protocole d'analyse CLHP

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex Summit HPLC (Dionex, USA), équipée d'une pompe P580, d'un injecteur automatique ASI-100, d'un four à colonne STH et d'un détecteur à barrettes de diodes UVD340S. La colonne utilisée est une colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 μm) équipée d'une pré-colonne SecurityGuard analytique KJ0-4282 avec des cartouches (4 x 3,0 mm C12) (Phenomenex, Le Pecq, France). Les éluants utilisés sont de l'eau contenant 0,1% TFA et de l'acétonitrile contenant 0,09% TFA. Le gradient utilisé est le suivant. Le point de départ est un mélange eau/acétonitrile (85:15, v/v). La quantité d'acétonitrile est portée à 45 % (v/v) en 30 min. Le débit de phase mobile a été fixé à 1 ml/min. La détection UV a été fixée à λ = 220 nm et la température du four a été réglée à 40 °C. Le volume d'injection est de 40 μl pour des solutions concentrées à 2,5 mg/ml, préparés dans un mélange eau/acide acétique (50: 50, v/v). La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

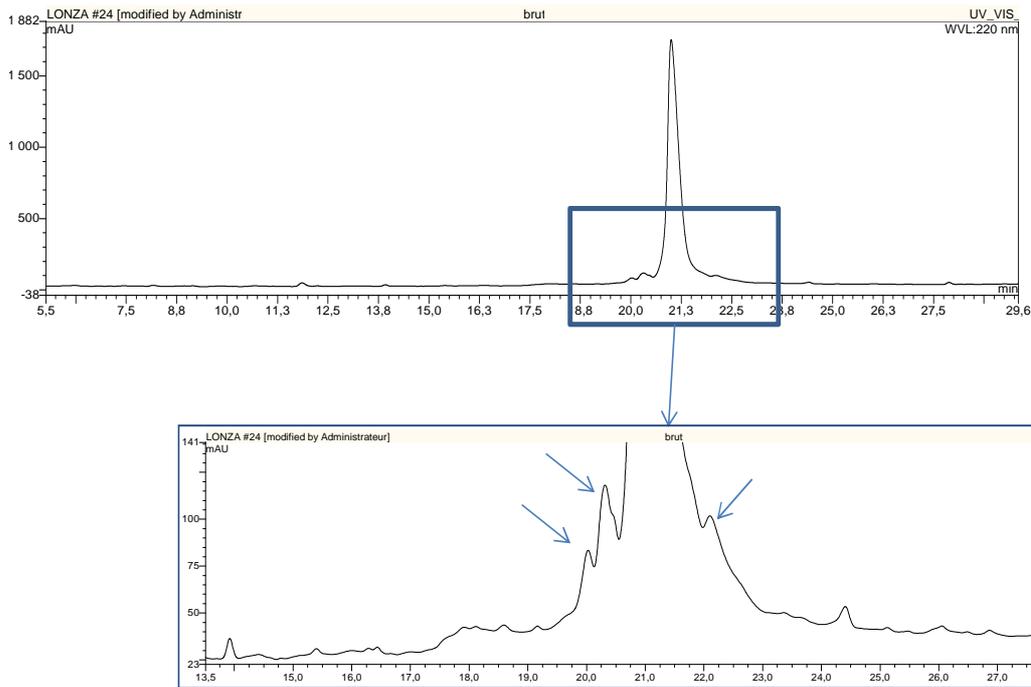


Figure 94 : Chromatogramme CLHP de la matière première contenant le SF328 (en haut) ; agrandissement de la zone contenant les impuretés critiques (pointées par des flèches) (en bas), UV 220 nm.

Le SF328 est caractérisé par un temps de rétention en CLHP de 21 min environ, les impuretés critiques sont celles présentant des temps de rétention de 20, 20,5 et 23 min (Figure 94).

La philosophie avec laquelle ce projet a été abordé est très différente de celle d'un fractionnement ou d'une capture. Dans une étape de polissage, l'objectif est d'éliminer les derniers reliquats d'impuretés restant encore dans l'échantillon. Le procédé choisi doit donc apporter une sélectivité très importante, tout en conservant une productivité et un rendement optimaux. Toute perte trop importante de produit se chiffre dans ce cas très rapidement en milliers d'euros.

II.2.2.2 Application du procédé par échange d'ions en CPC

Les impuretés pointées par une flèche sur la Figure 94 n'ont pu être éliminées par les méthodes de purification classiquement employées, telle que la CLHP à polarité de phase inversée. Ce projet nous a été alors soumis pour évaluer si la CPC ne pourrait pas apporter une réponse originale à ce problème de purification.

Nous avons ainsi commencé notre étude par le choix du mode de développement en CPC.

II.2.2.2.1 Choix du mode de développement en CPC

Nous avons exploré dans un premier temps le mode élution, avec des systèmes classiquement utilisés pour la purification de ce type de peptides. Ce sont des systèmes à base d'acide acétique, de

n-butanol et d'eau, ou de MtBE, d'acétonitrile, de *n*-butanol et d'eau acidifiée par l'ajout de 1 % de TFA.

Pour un développement par élution, un système est choisi s'il permet l'obtention d'une constante de distribution de l'ordre de 1. Ce fut le cas seulement pour le système MtBE/*n*-BuOH/CH₃CN/Eau 1% TFA dans les proportions (2:2:1:5, v/v). Mais lors de la transposition en CPC, le peptide est dégradé, ce qui est visualisé sur le chromatogramme CLHP (Figure 95), par l'apparition d'un second pic d'intensité importante. Un dédoublement des pics, non expliqué, apparaît également sur le chromatogramme.

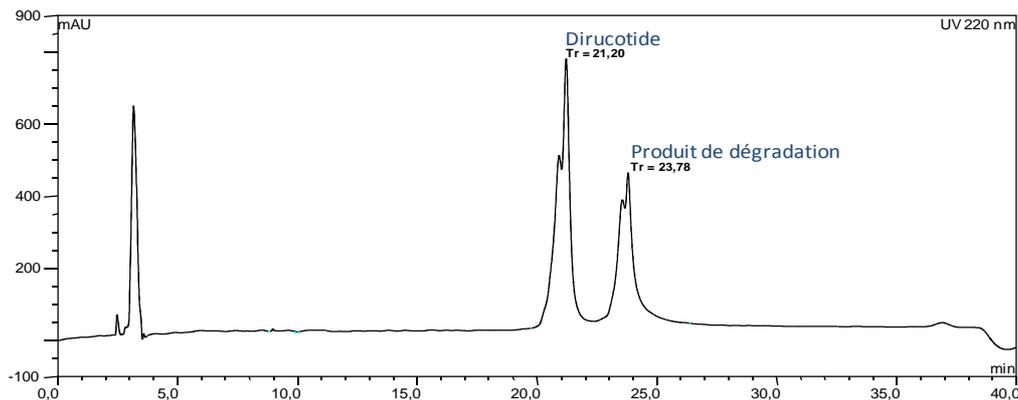


Figure 95 : Chromatogramme CLHP de la fraction contenant le dirucotide après "purification" par CPC en mode élution.

Devant cet échec et suite aux résultats prometteurs obtenus lors des travaux de développement méthodologique concernant l'application du mode échange d'ions en CPC à la purification de peptides, nous avons envisagé d'appliquer la méthodologie développée à cette problématique. Il est en effet intéressant de confronter le procédé par échange d'ions mis au point sur un mélange synthétique de dipeptides à un peptide de taille beaucoup plus conséquente, 17 acides aminés, dans une optique de polissage avec les contraintes en terme de pureté qui y sont rattachées. Des essais préliminaires en piluliers ont montrés la faisabilité du procédé, nous avons donc poursuivi dans cette voie.

II.2.2.2.2 Optimisation des conditions expérimentales

Comme signalé précédemment, le dirucotide présente un point isoélectrique aux environs de 7,5. A un pH acide, typiquement celui du système biphasique de solvants additionné du DEHPA, 7 groupements cationiques sont générés : l'extrémité N-terminale libre, les chaînes latérales des résidus asparaginylyl, histidyl, arginylyl et lysinylyl. Ces groupements vont permettre au dirucotide d'interagir avec l'échangeur anionique déjà utilisé : le DEHPA.

Les différentes conditions expérimentales testées sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 32 : Conditions expérimentales utilisées lors de la mise au point des paramètres expérimentaux

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4
Système de solvants	MtBE/ <i>n</i> -BuOH/CH ₃ CN/eau (2:2:1:5, v/v)			
Masse injectée (mg)	104,4	101,4	99,8	98,2
Concentration en DEHPA	1,51 mM	15,1 mM	30 mM	30 mM
Composition phase stationnaire	Homogène DEHPA avec 2,15 % de TEA			
Ratio DEHPA/dirucotide	5	50	100	100
Concentration CaCl ₂	0,14 mM	1,4 mM	2,88 mM	2,88 mM
Addition du déplaceur	/	/	40 min	27 min
Mode de pompage	Descendant			
Vitesse de rotation	1200 rpm			
Débit	2 ml.min ⁻¹			
Dirucotide (rendement, pureté)	19 mg (22%, 85%)	30 mg (35%, 91%)	30 mg (36%, 94%)	27 mg (34%, 97%)
Productivité (mg/h)	12,6	20	15	13,5

Nous avons utilisé dans un premier temps le ratio DEHPA/peptides utilisé lors de la mise au point du procédé par échange d'ions mixte. Le SF328 dans ce cas est élué avant l'addition du déplaceur. En multipliant ce ratio par dix (Exp. 2 Tableau 32), seulement la moitié du SF328 est retenue, l'autre moitié étant là encore éluée avant l'addition du chlorure de calcium. Le ratio a donc été une nouvelle fois augmenté pour atteindre la valeur de 100 (Exp.3 Tableau 32). Cette fois le peptide est retenu par l'échangeur puis déplacé par les ions calcium. La pureté obtenue est cette fois proche des objectifs à atteindre.

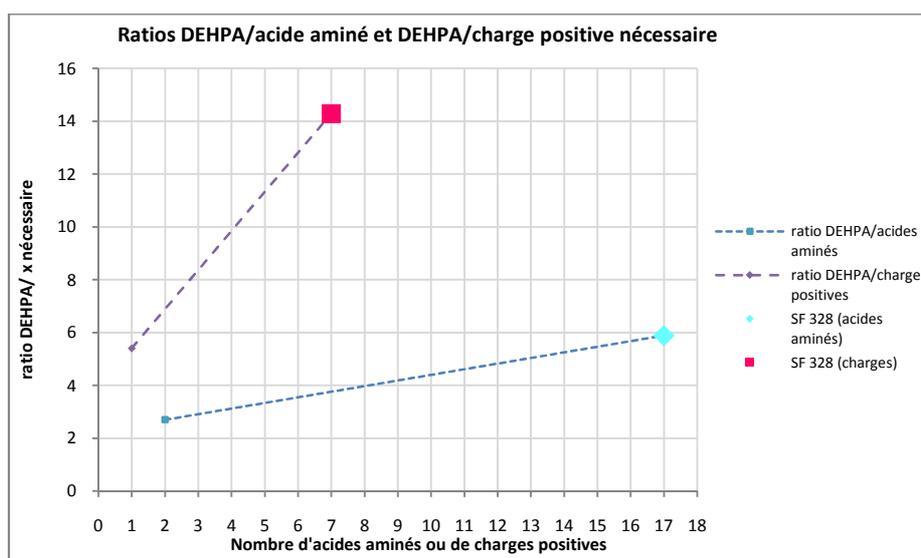


Figure 96 : Graphique représentant le ratio DEHPA/acidés aminés et DEHPA/charges positives portées, mettant en avant les points du SF 328.

Le ratio DEHPA/SF328 de 100, employé dans les expériences 3 et 4 (Tableau 32), paraît de prime abord très élevé en comparaison des ratios habituellement employés (entre 5 et 30).^{6, 9} En

considérant ce ratio d'un point de vue différent que celui de rapport DEHPA/peptide, nous obtenons alors un ratio échangeur/acide aminé de 6, ou encore à un ratio échangeur/charge positive de 14. Ces valeurs sont elles comprises dans la fourchette classique de ratio échangeur/ analytes (Figure 96).

Les impuretés les plus critiques sont éluées avec des temps de rétention très proches de celui du SF328, la phase de lavage n'a quasiment aucune utilité. Pour réduire le temps d'expérience, nous avons donc procédé à l'addition du déplaceur, 10 min seulement après l'équilibration de la colonne et l'apparition de la phase mobile (Exp.4 Tableau 32). La pureté de la fraction correspond aux attentes de notre partenaire industriel (97 %), le rendement (34 %) néanmoins est encore à optimiser. En analysant le fractogramme CLHP obtenu, une première explication est mise en évidence (Figure 97).

Construction des fractogrammes CLHP

Pour la construction des fractogrammes, un volume fixe d'un nombre défini de tubes de collecte de chaque expérience sont analysés par CLHP, selon le protocole décrit précédemment.

Pour chaque échantillon, l'aire sous la courbe de chaque pic est mesurée. L'évolution des aires sous la courbe de chaque produit est représentée sous forme d'un graphique en fonction du temps.

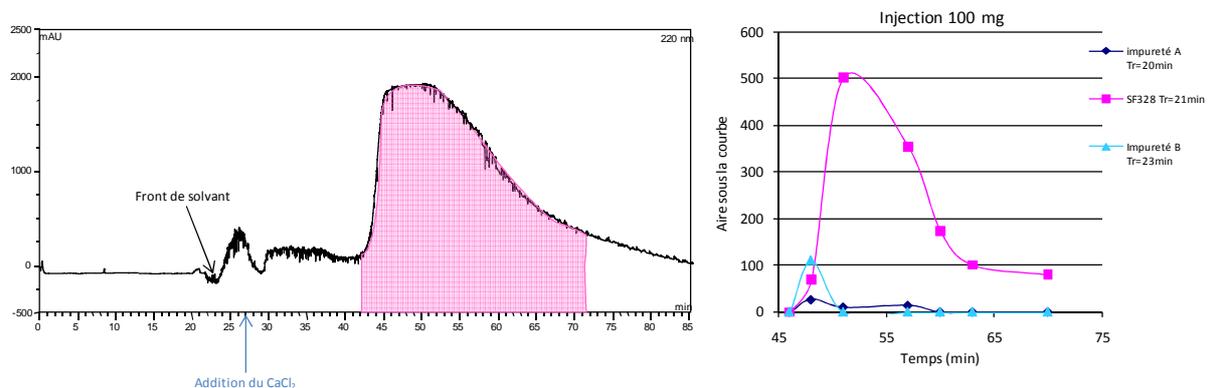


Figure 97 : Chromatogramme CPC et fractogramme CLHP de l'exp.4 (Tableau 32).

Sur le fractogramme, il semble que le train isotachique ne s'est pas organisé ou n'a pas eu le temps de s'organiser. Ceci peut s'expliquer par la faible quantité d'injectat introduite d'une part, et par un excès de déplaceur d'autre part. En effet, il est possible que le train isotachique ne soit constitué que d'une succession de *shock layer* avec des zones de produits purs très réduites. Un autre fait à prendre en compte est qu'il existe des pertes incompressibles de produit lors des manipulations (préparation de l'injectat, perte dans la boucle d'injection etc.). Sur une masse totale introduite de 100 mg, la perte d'une petite quantité de produit se traduit très rapidement en une diminution importante du rendement. L'ensemble de ces problèmes seront vraisemblablement résolus lors de la montée en échelle du procédé.

II.2.2.2.3 Etude de la montée en échelle

Le procédé étant potentiellement destiné à être industrialisé, nous avons réalisé une étude de montée en échelle : de 100 mg injecté jusqu'à un gramme (ce qui très élevé pour une matière première à très haute valeur ajoutée comme le dirucotide) (Tableau 33).

Tableau 33 : Conditions expérimentales utilisées lors de la montée en échelle du procédé.

	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7
Système de solvants	MtBE / <i>n</i> -BuOH / CH ₃ CN / eau (2:2:1: 5, v/v)		
Masse injectée (mg)	197,5	402,5	1004,3
Concentration en DEHPA	60 mM	120 mM	300 mM
Composition phase stationnaire	Homogène DEHPA avec 2,15 % de TEA		
Ratio DEHPA/dirucotide	100		
Concentration CaCl ₂	5,76 mM	11,5 mM	28,8 mM
Addition du déplaceur	26 min	27 min	29 min
Mode de pompage	Descendant		
Vitesse de rotation	1200 rpm		
Débit	2 ml.min ⁻¹		
Dirucotide (rendement, pureté)	80 mg (48%, 98%)	204,1 mg (60%, 97%)	586,9 mg (69%, 98%)
Productivité (mg/h)	44	113,4	352,1

Sur la figure suivante (Figure 98) est représenté le chromatogramme CLHP de la fraction la plus pure obtenue après l'injection de 200 mg d'extrait brut.

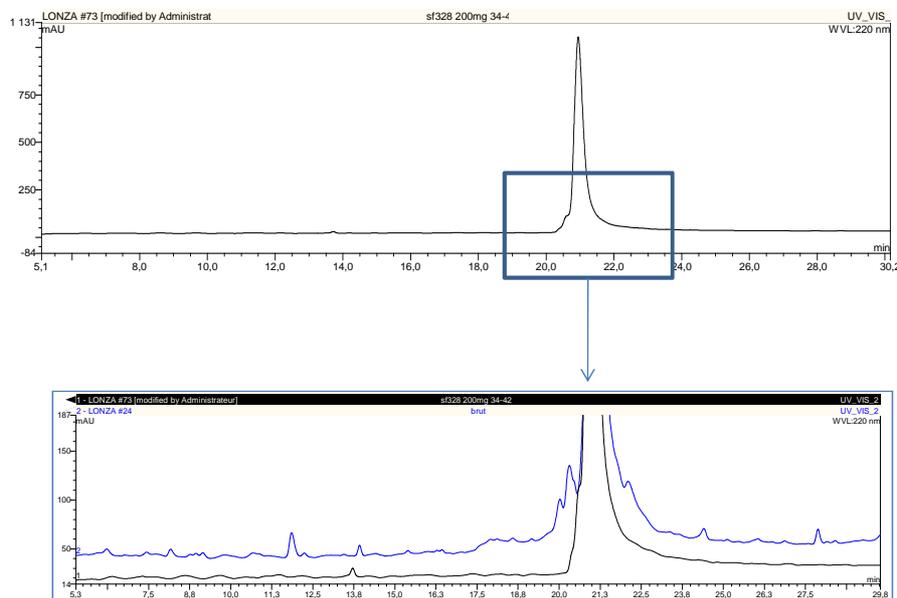


Figure 98 : Chromatogramme CLHP de la fraction la plus pure obtenue après injection de 200 mg (en haut) ; agrandissement de la zone du chromatogramme contenant les impuretés les plus critiques avec en noir la fraction et en bleu la matière première (en bas) ; UV 220 nm

Nous pouvons remarquer sur le chromatogramme que les impuretés les plus critiques ont été quasiment éliminées lors de ce procédé, ce qui est un point très positif. La pureté des fractions

obtenues ainsi que l'intégrité du SF328 ont été également confirmés par analyse RMN (Annexe 4 et Annexe 5).

Sur la Figure 99, nous pouvons remarquer que dès l'injection de 200 mg de produit, la pureté se stabilise à 97 %. Par contre, le rendement est, comme nous l'attendions,¹¹ amélioré au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité injectée : de 34 % pour 100 mg injecté il passe à 69 % lorsque l'injectat est de 1 g.

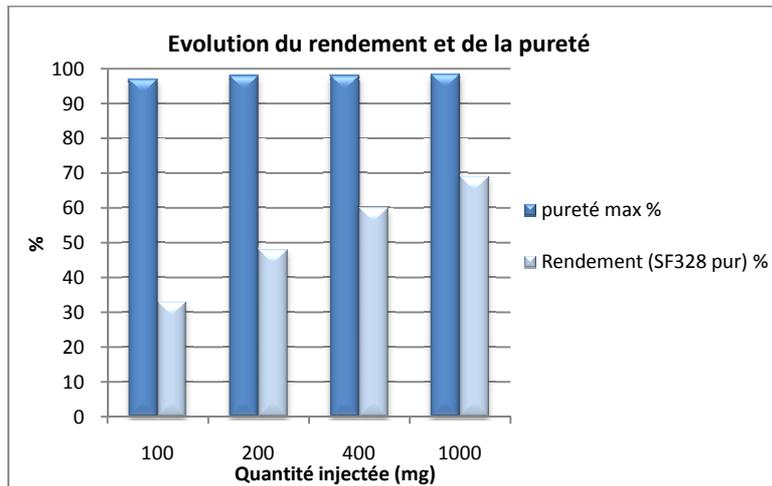


Figure 99 : Graphique représentant l'évolution du rendement et de la pureté des fractions lors de la montée en échelle du procédé.

Ce phénomène se visualise également sur le fractogramme CLHP de chaque expérience (Figure 100).

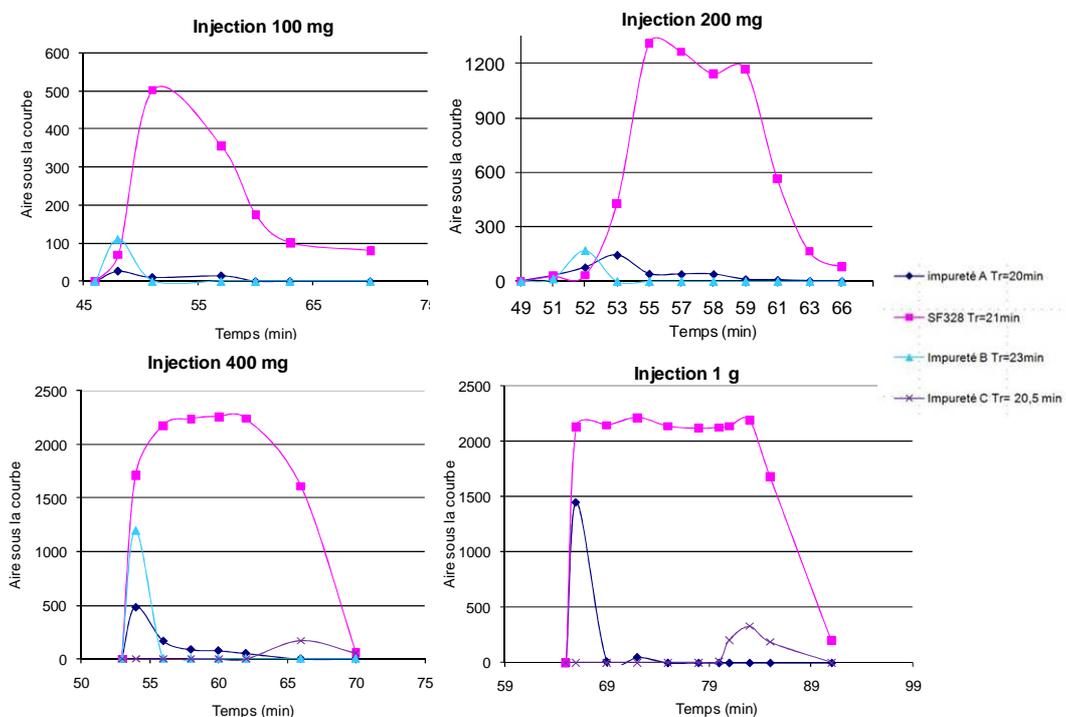


Figure 100 : Fractogrammes CLHP des différentes expériences CPC réalisées lors de l'étude de montée en échelle du procédé par échange d'ions.

La différence de profils d'impuretés observé entre les expériences avec une injection à 100 et 200 mg, et celles suivantes s'explique par le fait que l'injection à 1 g provient d'un lot de matière première différent et que celle de 400 mg résulte du mélange de ces deux lots.

Il apparaît nettement sur ces fractogrammes, comme classiquement rapporté dans les exemples de purification par déplacement, que le train isotachique s'organise d'autant mieux lorsque la quantité d'analytes injectée augmente. Ceci se traduit par une modification de l'allure du pic qui devient beaucoup plus rectangulaire au fur et à mesure de l'augmentation de la masse injectée. La zone correspondant au SF328 pur augmente également, expliquant ainsi l'augmentation du rendement constatée.

Comme nous pouvons le visualiser sur la Figure 101, la *shock layer* d'entrée du pic est beaucoup plus compressive que celle de sortie. Ce phénomène avait déjà été observé lors du développement du procédé, mais se visualise particulièrement bien lors des injections de 400 mg et 1 g de SF328. Ceci pourrait s'expliquer par une différence de constante d'association trop faible entre les paires d'ions DEHPA/peptides et DEHPA/Ca²⁺, nuisant ainsi à la compressivité des fronts.

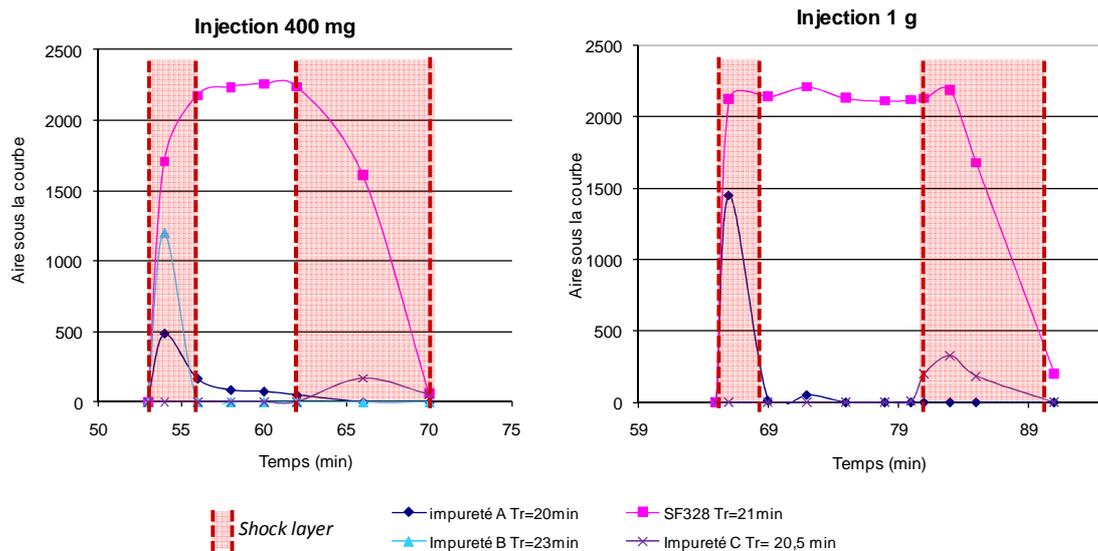


Figure 101 : Fractogrammes CLHP des injections de 400 et 1000 mg montrant les shock layer.

Nous pouvons également noter que les impuretés sont concentrées dans les *shock layer*. Entre l'injection de 400 mg et celle de 1 g, la taille de ces *shock layer* reste la même, alors que la zone de produit pur augmente, ce qui est caractéristique d'un développement en mode déplacement. La concentration des impuretés au niveau des *shock layer* ne traduit pas un manque de sélectivité du procédé. La teneur en impuretés est tout simplement trop faible pour permettre la mise en place de zones propres aux impuretés dans le train isotachique.

Les objectifs qui nous avaient été fixés ont ainsi été atteints. Le procédé par échange d'ions mis au point permet d'obtenir une fraction de pureté de 98 % avec une productivité d'environ 350 mg/h. Il est possible d'envisager que lors de la transposition à l'échelle pilote le rendement et la productivité seront là encore améliorés, faisant de ce protocole un procédé compétitif pour la production d'actif à visée pharmaceutique dans les étapes de polissage. Ce projet, ainsi que les développements méthodologiques précédemment présentés, ont débouché sur le dépôt d'un brevet européen avec extension USA en partenariat avec la société Lonza.

II.2.3 Conclusion sur les applications du procédé par échange d'ions en CPC

Le procédé de purification de peptides libres par échange d'ions mixte en CPC s'avère ainsi un procédé particulièrement performant.

Ainsi, nous avons pu montrer que **les paramètres d'ajustements permis** par cette technique (système de solvants, échangeur et son état d'activation, nature et nombre de déplaceurs) la rendait **très modulable et applicable à de nombreux types de peptides non protégés**. Il sera à présent très intéressant de tester ce type d'approche pour la mise au point de procédés de purification d'autres métabolites secondaires cationiques, comme certains ammoniums quaternaires (alcaloïdes) ou anthocyanosides.

Les **mécanismes d'extraction** des peptides ont été investigués et **élucidés** : il s'agit véritablement de **paires d'ions** dans notre cas. Les postulats émis lors de la conception du procédé et qui ont permis le développement d'un outil de simulation (CPCSim) sont ainsi confortés.

Enfin, **l'efficacité du procédé**, que ce soit dans les étapes amont d'un procédé (**capture**) ou dans les dernières étapes de celui-ci (**polissage**), a également été **démontrée**, confortant ainsi l'aspect modularité.

L'intérêt du choix de la CPC en mode échange d'ions a ainsi pu être confirmé, que ce soit pour la **grande sélectivité** du procédé ou sa très **grande capacité**. Néanmoins, il reste à présent à valider l'étape déterminante pour l'avenir de cette technique : sa mise en place pour la production d'un actif pharmaceutique ou d'un de ses intermédiaires de synthèse. Les contraintes inhérentes à l'industrie pharmaceutique (pureté, impuretés critiques, solvants/échangeur résiduels,...) combinées à celle de la production en général devront être prises en compte (productivité, rentabilité).

Pour ce qui est de l'aspect productivité, il apparaît clairement que les débits applicables restent faibles, ce en raison du caractère tensioactif de l'échangeur. Néanmoins, des développements récents au laboratoire laissent entrevoir une solution technologique qui, en diminuant le nombre de cellules de partage et en augmentant le diamètre des conduits, permet d'accéder à des débits

supérieurs à 10 ml/min (pour une colonne d'une capacité de 200-300 ml/min) (thèse de Mahmoud Hamzaoui en cours).

Bien entendu, des questions plus générales, liées à la technique de CPC elle-même, tels que les problèmes de "nettoyabilité", de pulsations de phase mobile (évoquées dans le chapitre suivant) ou d'automatisation sont autant de verrous technologiques qu'il conviendra d'étudier et de résoudre avant toute implantation industrielle de la technique.

II.3 Purification d'un composé de nature peptidique et d'intérêt industriel en mode élution

Le développement méthodologique du mode échange d'ions en CPC et son amélioration sous la forme du MIXCPC, ont découlés des difficultés parfois rencontrées lors de la purification de composés ioniques ou ionisés, comme les peptides libres.

La collaboration avec la société Lonza, dont un des cœurs de métiers est la purification de peptides, nous a amené à considérer une autre problématique : la purification de peptides entièrement "protégés", pour lesquels le mode échange d'ions mis au point n'est, bien entendu, pas adapté. Pour cette classe de composés, la CLHP préparative à polarité de phase normale ou inversée, technique de purification de référence dans le monde industriel, ne fournit pas toujours les résultats escomptés.

Ce chapitre traite d'un projet de purification d'une ciclosporine modifiée à visée anti-VIH. Comme nous le verrons, l'application du mode élution ainsi que les premières études de montée en échelle ont conduit à des verrous technologiques différents de ceux rencontrés précédemment en mode échange d'ions. La levée de ces obstacles a nécessité une étude des perturbations hydrodynamiques de la colonne. Ceci a donné lieu à une collaboration avec les docteurs Alain Foucault et Luc Marchal du GEPEA UMR CNRS 6144 (Saint Nazaire).

II.3.1 Purification d'une ciclosporine modifiée : le DB-003

Le dernier projet que nous avons réalisé pour la société Lonza portait sur la purification d'un médicament à visée anti-VIH, le DB-003.

10 µl pour des solutions concentrées à 1 mg/ml. La gestion des données chromatographiques a été assurée par le logiciel Chromeleon version 6.0.1 (Dionex).

Gradient :

Temps (min)	% A	% B
0	50	50
30	35	65
35	5	95
45	5	95
45,1	50	50
55	50	50

Le chromatogramme CLHP obtenu du DB-003 fourni par Lonza est représenté Figure 103 avec un agrandissement sur la zone correspondant aux impuretés à éliminer.

Ce brut titre à 98,3% de DB-003 et l'objectif à atteindre est une pureté supérieure à 99 % et si possible d'au moins 99,5 %.

Le DB-003 a comme propriétés physico-chimiques une très faible solubilité dans l'eau, ainsi que dans certains solvants apolaires (comme l'heptane). Il présente à l'inverse une très bonne solubilité dans le toluène et l'acétone. Il faut également mentionner que le DB-003 présente des propriétés tensio-actives très prononcées.

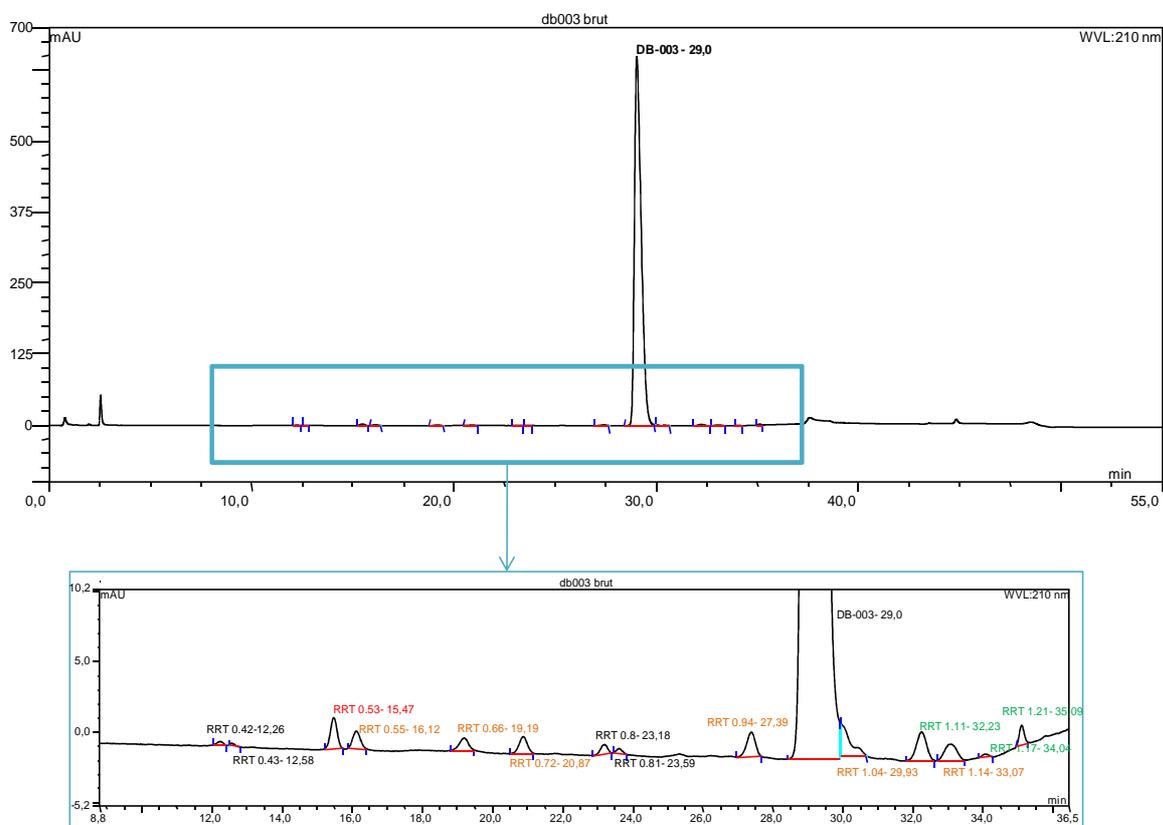


Figure 103 : Chromatogramme CLHP du brut de DB-003 fourni en haut, agrandissement en bas de la zone d'élution des impuretés avec en rouge l'impureté critique à éliminer, en orange celles dont l'élimination est nécessaire et en vert celles dont l'élimination est facultative.

Ces propriétés tensio-actives peuvent entraîner diverses conséquences, en particulier :

- Une perturbation, lors de l'injection d'une quantité importante de DB-003, de l'équilibre thermodynamique des deux phases (mobile et stationnaire), nécessaire à un bon fonctionnement d'une expérience en CPC ;
- Une modification du comportement hydrodynamique de la phase mobile lors de son passage à travers la phase stationnaire.

Ces paramètres seront donc à surveiller étroitement.

II.3.1.2 Mise au point du procédé de purification par CPC

Comme nous pouvons le remarquer sur la Figure 102 et comme nous l'avons déjà mentionné, les positions ionisables du DB-003 sont bloquées. Le mode déplacement n'a donc aucun avenir pour la purification de ce produit. Nous nous sommes donc focalisé sur le mode élution.

II.3.1.2.1 Sélection du système de solvants

Pour sélectionner les systèmes de solvants à tester, nous avons appliqué l'approche dite du "bon solvant". Nous avons ainsi choisi des systèmes biphasiques contenant un solvant dans lequel le produit à purifier, ici le DB-003, est particulièrement soluble. Dans notre cas, les bons solvants du DB-003 sont l'acétone, le toluène et l'acétate d'éthyle entre autres. Nous avons donc porté notre choix sur les systèmes de la gamme acétone, contenant à la fois de l'acétone et du toluène ; et sur la gamme Arizona, contenant de l'acétate d'éthyle.^{11, 51}

Un système sera considéré comme potentiellement intéressant à appliquer en CPC s'il conduit à un K_D proche de 1 pour le composé d'intérêt à purifier et si la solubilité de ce dernier ne pose pas de problème. L'ensemble des systèmes testés en première intention ainsi qu'une analyse qualitative des résultats sont présentés dans le Tableau 35.

Le DB-003 a un comportement particulièrement difficile à gérer : sa solubilité dans le toluène est tellement importante que si la proportion de ce solvant dépasse les 5 % dans un système de solvants, le DB-003 demeure uniquement dans la phase contenant le toluène, *i.e.* la phase organique. A l'inverse, le DB-003 se solubilise très peu dans l'heptane. Ainsi dans les systèmes de la gamme Arizona contenant une proportion prépondérante de ce solvant (systèmes Q à Z), le DB-003 se partage en faveur de la phase aqueuse exclusivement.

Ainsi, en observant le Tableau 35, nous pouvons remarquer que seuls deux systèmes semblent adaptés pour une utilisation en CPC : le système 2 de la gamme acétone et le système P de la gamme Arizona.

Tableau 35 : Systèmes de solvants testés en pilulier et K_D obtenus.

N°	Système biphasique de solvants				K_D du DB003		Evaluation
					Phase sup.	Phase inf.	K_D
<i>Gamme Acétone</i>							
	Heptane /	Toluène /	Acétone /	Eau			
1	35	0	50	15	+	+++	-
2	30	4	50	16	++	++	++
3	26	5	50	19	+++	++	+/-
4	17,5	10	50	22,5	+++	+	-
5	9	15	50	26	++	-	-
7	0	20	50	30	++	-	-
<i>Gamme Arizona</i>							
	Heptane /	AcOEt /	MeOH /	Eau			
A	0	1	0	1	+++	-	-
H	1	3	1	3	+++	-	-
N	1	1	1	1	+++	+	+/-
P	6	5	6	5	+++	++	++
Q	3	2	3	2	+	+++	+/-
R	2	1	2	1	+	++++	-
S	5	2	5	2	+	++++	-
T	3	1	3	1	-	+++	-
Z	1	0	1	0	-	+++	-

Le DB-003 se solubilise assez difficilement dans le système P. Nous avons alors procédé à une modification de ce système afin d'améliorer ce paramètre, en remplaçant un volume d'acétate d'éthyle et de méthanol par deux volumes d'acétone. Nous obtenons ainsi le système dit P-acétone de composition Heptane/AcOEt/Acétone/MeOH/Eau (6:4:2:5:5, v/v). La constante de distribution reste idéalement proche de 1 et la solubilisation du DB-003 est améliorée.

Nous avons également modifié le système N de la gamme Arizona, pour obtenir le système dit "N modifié" avec une composition Heptane/AcOEt/Acétone/MeOH/Eau (1:2:2:1:2, v/v). Ce système permet une bonne solubilisation du produit tout en conduisant à un K_D de 1 pour le DB-003.

Nous avons ainsi obtenu un "éventail" de trois systèmes permettant une bonne solubilisation du DB-003 tout en permettant d'obtenir un K_D de 1 :

- le système 2 de composition Heptane/Toluène/Acétone/Eau (30:4:50:16, v/v) ;
- le système P-acétone de composition Heptane/AcOEt/Acétone/MeOH/Eau (6:4:2:5:5, v/v) ;
- le système N-modifié de composition Heptane/AcOEt/Acétone/MeOH/Eau (1:2:2:1:2, v/v).

II.3.1.2.2 Test des différents systèmes en CPC

Les différents systèmes (système 2 de la gamme acétone, P-acétone et N-modifié) ont été testés en CPC et comparés.

Mise en œuvre en CPC

La colonne de CPC a été tout d'abord conditionnée par passage de 2 volumes de colonne d'un mélange MeOH/eau (50 : 50, v/v). La colonne a été ensuite remplie par 2 volumes de colonne de phase stationnaire.

2 litres de système biphasique de solvants ont été préparés par mélange des quantités appropriées de chaque solvant. Après décantation, les deux phases du système ont été récupérées séparément.

La colonne est dans ce cas pré-équilibrée avant injection de l'échantillon.

Le suivi de la séparation se fait par détection UV aux longueurs d'onde 210 nm ainsi que par analyse CLHP dans les conditions décrites précédemment.

Traitement des fractions obtenues par CPC

Les fractions sont concentrées sur évaporateur rotatif avec une température fixée à 45°C.

Si les fractions sont recueillies en phase aqueuse, ces dernières sont concentrées jusqu'à précipitation du DB-003. Elles sont alors placées plusieurs heures à 4°C, puis centrifugées à 4000 tours/min. Le précipité est lavé à l'eau puis lyophilisé.

Si les fractions sont recueillies en phase organique, elles sont mises à sec puis redissoutes dans un volume minimal d'acétone avant d'être précipitée par un large excès d'eau. La suite du traitement est la même que pour les fractions aqueuses.

Les conditions expérimentales utilisées pour la comparaison des différents systèmes sont regroupées dans le tableau ci-après. L'injection est effectuée à un débit inférieur (2 ml/min) au débit appliqué pour l'élution (6 ml/min).

Tableau 36 : Conditions expérimentales CPC utilisées lors de la sélection du système de solvants.

	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Exp. 4
Système de solvants	Gamme acétone n° 2	Système P-acétone		Système N-modifié
Masse injectée	497,9 mg	499,9 mg	502 mg	503,1 mg
Mode	Ascendant	Descendant	Ascendant	Descendant
Vitesse de rotation	1000 rpm	1200 rpm	1200 rpm	1200 rpm
Débit	6 ml/min	6 ml/min	6 ml/min	6 ml/min
DB003 (rendement, pureté)	440,4 mg (90%, 99,5%)	271,4 mg (56%, 99,5%)	349,7 mg (71%, 99,7%)	331,5 mg (67%, 99,7%)
Perte de charge	19 bars	42 bars	41 bars	23 bars

Plusieurs conclusions ont été tirées de ces essais :

❶ Le système 2 de la gamme acétone a été rapidement écarté. Ce système conduit à des pulsations importantes de la phase mobile en sortie de colonne, entraînant ainsi une perte de charge élevée.

❷ Concernant le système P-acétone, la constante de distribution du DB-003 effectivement observée lors de l'expérience en CPC s'est révélée être trop en faveur de la phase aqueuse. En effet, lorsque le mode d'élution choisi est le mode descendant, *i.e.* la phase mobile aqueuse, le temps de

réétention du DB-003 est très court. Le produit est élué moins de 15 min après l'obtention du front de solvants, ce qui ne permet pas d'atteindre les spécifications demandées pour la pureté de la fraction notamment pour l'impureté présentant un RRT de 0,95.

A l'inverse, nous avons testé ce même système dans le mode ascendant, et dans ces conditions comme nous pouvions nous y attendre, le temps de rétention du DB-003 est cette fois très élevé, de l'ordre de 80 min après l'obtention du front de solvants.

Or, pour qu'un développement chromatographique soit compétitif d'un point de vue industriel, il est préférable que le "run" au complet (remplissage de la colonne, expérience chromatographique, reconditionnement de la colonne) ne soit pas trop éloigné de 60 min. Dans notre cas, les spécifications exigées sont atteintes, mais le temps de développement un peu long est un désavantage de ce système P-acétone en mode descendant.

③ Avec le système N-modifié, le temps de rétention du DB-003 est acceptable, de l'ordre d'une cinquantaine de minutes après obtention du front de solvant. Les spécifications sont respectées pour toutes les impuretés. Néanmoins, certaines d'entre elles semblent en partie co-éluées avec le DB-003. Ceci est d'ailleurs confirmé par la construction du fractogramme correspondant à cette expérience (Figure 104).

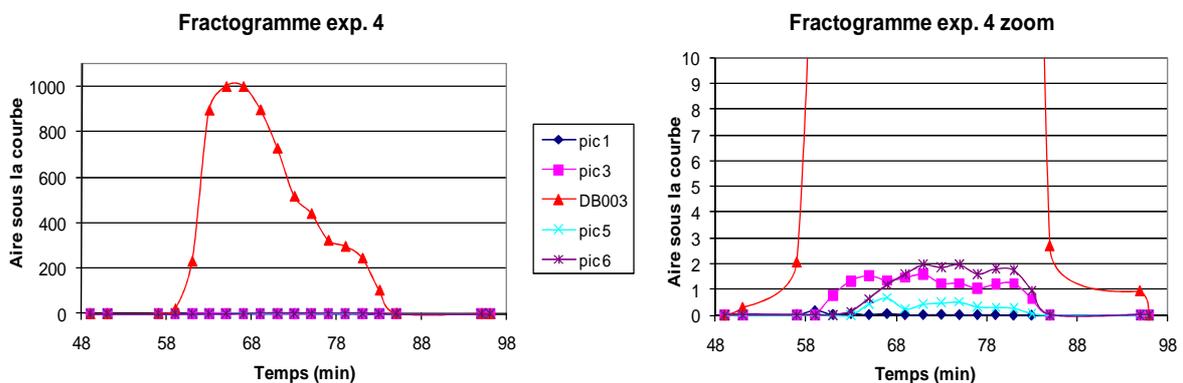


Figure 104 : Fractogramme correspondant à l'expérience 4 (Tableau 36).

Cette co-élution est constatée pour tous les systèmes que nous avons utilisés. Pour le moment, ce phénomène n'empêche pas d'atteindre les spécifications exigées.

Le système N-modifié semblant le plus adapté, nous avons poursuivi notre étude avec ces conditions. La faisabilité étant à présent démontrée, des travaux préliminaires d'industrialisation du procédé ont été entrepris.

II.3.1.2.3 Montée en échelle du procédé

Nous avons procédé à une montée en échelle du procédé, dans les conditions mentionnées dans le tableau ci-après.

Tableau 37 : Conditions expérimentales utilisées lors de la montée en échelle avec le système N-modifié.

	Exp.4	Exp.5	Exp.6	Exp.7
Système de solvants	Système N-modifié			
Masse injectée	503,1 mg	1,013 g	2,0321 g	2,0917 g
Mode	Descendant			
Vitesse de rotation	1200 rpm	1200 rpm	1100 rpm	1100 rpm
Débit	6 ml/min	6 ml/min	6 ml/min	6 ml/min
DB003	331,5 mg	545,6 mg	1,0824 g	1,7308 g
(rendement, pureté)	(67%, 99,7%)	(55%, 99,5%)	(54%, 99,4%)	(84%, 99,3%)
Perte de charge	23 bars	27 bars	24 bars	22 bars

En doublant la quantité de produit injectée (1 g), des pulsations importantes sont générées dans la colonne environ 10 min après l'injection du DB-003. La colonne est rapidement stabilisée par une diminution de sa vitesse de rotation. Néanmoins, il existe une perte importante de phase stationnaire en début d'expérience. Comme nous l'avons précisé dans la partie de ce manuscrit traitant de la CPC en général (paragraphe I.3.2.3.3), cette perte de phase stationnaire conduit à une diminution de la résolution, dommageable à la séparation des produits.

Ce phénomène, mentionné dans certains travaux sous l'expression "coups de bélier",⁵² est bien connu et se trouve actuellement considéré par les "CPCistes" impliqués dans le développement industriel de la technique comme un des principaux verrous technologiques à son développement en tant qu'outil de production.

Ces pulsations consistent en la propagation, dans la colonne de liquide constituée par la phase stationnaire, d'un phénomène ondulatoire prenant la forme d'une dépression (baisse de perte de charge). La dépression engendrée conduit transitoirement à l'arrêt du débit en sortie de colonne, qui va être ensuite compensé par une augmentation brutale du débit. Ainsi, le débit moyen finalement observé est équivalent à celui fixé par la consigne sur la pompe. L'augmentation transitoire du débit conduit à une perte de phase stationnaire par entrainement physique. La diminution du taux de rétention de phase stationnaire, associée au nouvel équilibre imposé par un débit plus élevé, se traduit par une dégradation de la séparation.

Si le phénomène de pulsations est gérable à l'échelle du laboratoire, il prend des proportions telles sur des appareils industriels qu'il conduit à l'arrêt immédiat de l'expérience. L'apparition de ces "coups de bélier" a probablement des causes multiples. A priori, nous pouvons citer :

- la mise "hors équilibre" d'une partie de la colonne, plus particulièrement lors de l'injection ;

- l'influence sur l'équilibre thermodynamique d'un composé injecté qui peut se manifester après l'injection, lorsque le-dit produit commence à se purifier et se trouve seul et concentré dans une zone de la colonne ;
- l'influence de propriétés physico-chimiques particulières de certains solvants (tension de vapeur, compressibilité,...).

Cet aspect mérite à lui seul d'être étudié lors d'un travail de thèse. Les travaux présentés ici ont pour but d'apporter des solutions concrètes, sur la base des hypothèses mentionnées ci-dessus et dans nos conditions de travail, sans s'attacher à la compréhension du phénomène.

Le premier aspect étudié a ainsi été le protocole d'injection, facteur de déstabilisation important du système.

II.3.1.2.3.1 Modification du protocole d'injection

Ces "bonnes pratiques d'injection" ont été définies pour certaines lors des expériences acquises au laboratoire et pour d'autres par le Docteur Alain Foucault, suite à une étude menée à l'UMR 6144 en partenariat avec la société Pierre Fabre et un laboratoire de l'ENSIACET (Toulouse). Elles sont particulièrement adaptées lorsque la cause de l'apparition des "coups de bélier" est liée à la nature de l'injectat.

Dans un premier temps, la colonne est pré-équilibrée en utilisant un débit de phase mobile supérieur au débit de travail pour "sur-équilibrer" la colonne, et introduire ainsi dans la colonne une quantité de phase mobile supérieure à celle fournie par l'équilibre au débit d'élution (exp 6, Tableau 37). Malgré cette modification du protocole d'injection, en doublant à nouveau la quantité d'injectat (2 g), les pulsations constatées précédemment ont une intensité beaucoup plus importante, et leur stabilisation est très difficile. En fin d'expérience, la perte de phase stationnaire est d'une ampleur si importante que la perte de charge de la colonne n'est plus que de 8 bars.

Ces pulsations apparaissant seulement après l'injection du produit dans la colonne, nous avons alors suspecté une mise hors équilibre des solvants dans le volume d'injection. Ceci nous a alors conduits à étudier l'influence de DB-003 sur le système biphasique étudié.

Nous nous sommes intéressés à la robustesse de notre système N-modifié en présence du DB-003. Ce produit, nous l'avons déjà mentionné, présente des propriétés tensio-actives marquées, tout comme les échangeurs utilisés en mode échange d'ions. Dans le cas de l'échange d'ions, il est nécessaire d'évaluer l'impact de l'échangeur sur la robustesse du système biphasique de solvants utilisé (I.4.4.6) au travers de la construction de pseudodiagrammes ternaires. Dans le cas du DB-003, nous avons ainsi construit le pseudodiagramme DB-003/phase organique/phase stationnaire du système N-modifié, selon le protocole décrit paragraphe II.1.3.5.2 page 130.

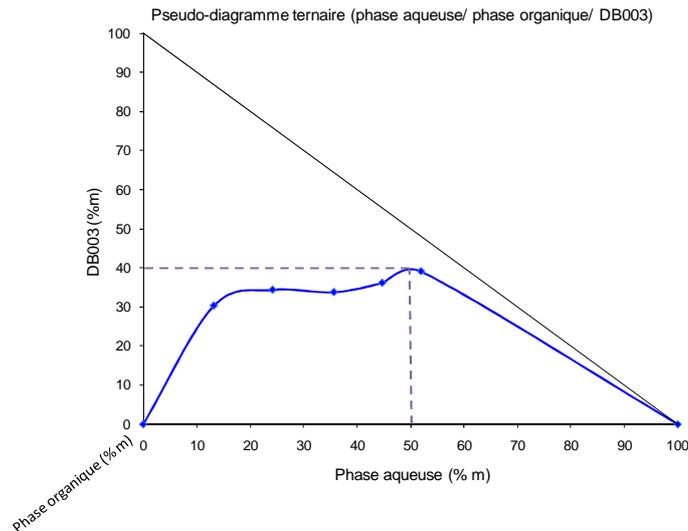


Figure 105 : Pseudodiagramme ternaire DB-003/phase aqueuse/phase organique du système N-modifié.

Nous pouvons voir que le DB-003 a un effet assez déstabilisant sur le système N-modifié, comme nous nous y attendions. Pour un rapport phase organique/phase aqueuse de 1, le mélange le plus favorable pour une surcharge massique, la quantité maximale de DB-003 qui peut être solubilisée tout en conservant le biphasisme du système est inférieure à 40 %. Ceci correspond, pour une injection de 20 ml, à une masse de DB-003 injectée d'environ 7 g. Ainsi, le mélange phase organique/phase aqueuse utilisé pour l'expérience 6 (25:75, v/v) n'était pas le plus adapté et les expériences (exp 7 et suivantes Tableau 38) suivantes ont été réalisées dans un mélange (50:50, v/v) des deux phases.

Lors de l'expérience 7, les pulsations, si elles existent toujours, ont pu être stabilisées plus rapidement. Ceci a pour effet direct d'avoir augmenté le rendement en DB-003. Néanmoins la perte de phase stationnaire demeure très élevée, de l'ordre de 70%, et la perte de résolution occasionnée ne permet plus d'atteindre les spécifications demandées pour les impuretés de RRT 0,95 et 1,15.

Pour tenter de réduire l'apparition des pulsations, nous avons alors tenté d'améliorer à nouveau le protocole d'injection, en appliquant les conditions définies par le Dr. Alain Foucault.

L'échantillon est introduit dans la colonne après équilibration préalable de celle-ci, mais cette fois la colonne est immobile (rotation nulle) pendant l'injection qui se fait à un débit très faible (2 ml/min). Ces conditions ont été précédemment décrites pour résoudre un problème similaire.⁵³ En injectant dans la colonne à rotation nulle, l'injection va extruder les premières cellules de la colonne. Ce sont donc les deux phases qui vont sortir conjointement durant l'injection. La colonne est ensuite remise en rotation et le débit de phase mobile est augmenté graduellement.

Par ailleurs, afin d'évaluer si la quantité injectée de 2 g pouvait être améliorée, nous avons réalisé des injections avec des quantités plus élevées, comme décrit dans le tableau ci-dessous.

Tableau 38: Conditions expérimentales testées pour la surcharge massive en DB-003.

	Exp. 8	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11
Système de solvants	Système N-modifié			
Masse injectée	4,99 g	3,027 g	3,009 g	3,37 g
Mode	Descendant		Ascendant	Descendant
Vitesse de rotation	1200 rpm	1200 rpm	1200-1600 rpm	1400-1600 rpm
Débit	4-5 ml/min	5-6 ml/min	5 ml/min	6 ml/min
Conditions d'injection	2 ml/min à 0 rpm			
DB003	1,57 g	2,34 g	2, 59 g	3,21 g
(rendement, pureté)	(31,4 %, 99,2%)	(77%, 99,1 %)	(86%, 98,8%)	(95%, 98,4%)
Perte de charge	20 bars	16 bars	20 bars	20 bars

Cette nouvelle modification du protocole d'injection n'a pas suffi à résoudre le problème de pulsations. Au cours des expériences 8 et 9, il ne subsiste aucune phase stationnaire au sein de la colonne à la fin des expériences. De plus, nous avons constaté une inversion des phases au début de l'injection du DB-003 : la phase éluée est celle normalement considérée comme stationnaire.

Pour vérifier si le phénomène existait également si le rôle des phases était inversé, nous avons réalisé l'exp.10 en mode ascendant. Pareillement, les pulsations sont apparues et la phase stationnaire est complètement évacuée de la colonne. De plus, les impuretés présentant des $RRT < 0,9$ ne sont plus éliminées. Le mode ascendant n'apporte donc pas plus de solutions.

Une dernière tentative de stabilisation de la colonne a consisté en le remplissage de la colonne avec un ratio phase stationnaire/phase mobile de 1 (Exp.11). Là encore les pulsations sont apparues et ont entraîné la perte de la phase stationnaire.

Pour revenir à l'impact du DB-003 sur le système, nous avons constaté un "rééquilibrage" des phases lors de la préparation des injectats. Bien que les volumes respectifs des phases introduites soient identiques, le rapport des phases est largement en faveur de la phase organique après solubilisation du DB-003. Il est clair que le DB-003 influe très significativement sur le système biphasique. Afin de compléter les informations fournies par la construction du pseudodiagramme de phases, et pour tenter d'élucider les phénomènes conduisant à l'inversion des phases constatées lors de ces expériences, nous avons suivi l'évolution de la densité des phases avec ou sans de DB-003.

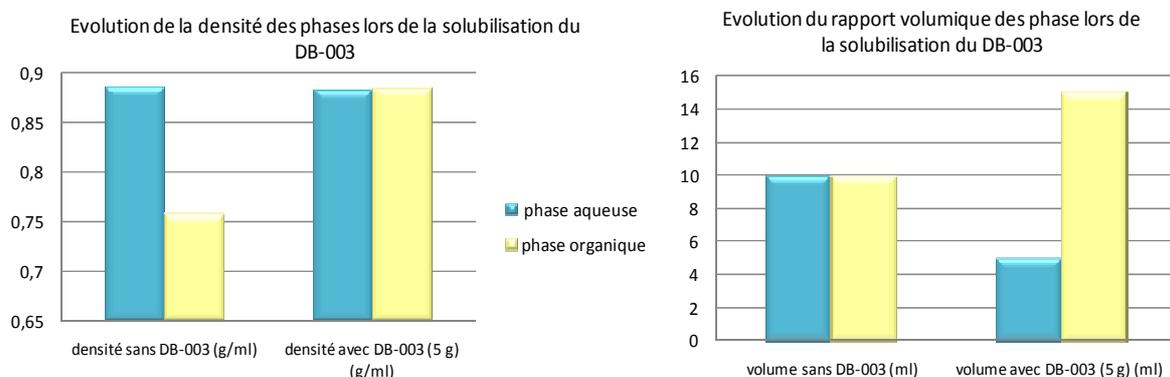


Figure 106 : Graphiques représentant l'évolution de la densité des phases (à gauche) et du rapport volumiques de celles-ci (à droite) lors de la solubilisation de 5 g de DB-003.

Comme le montre la Figure 106, lors de la solubilisation de 5 g de DB-003 dans 20 ml de système biphasique N-modifié (10 ml de chaque phase), la différence de densité des phases est proche de zéro, ce qui peut expliquer les phénomènes d'inversion de phase constaté dans les premières minutes après injection du produit.

Pour contourner ces problèmes, nous avons testés d'autres systèmes basés sur la gamme acétone, tel que le système heptane/toluène/acétone/eau (42:4:40:14, v/v). De façon similaire au système N-modifié, des pulsations apparaissent pendant l'expérience CPC, entraînant là encore la perte totale de la phase stationnaire. De plus, il est important de mentionner qu'avec ce système, l'impureté la plus critique (RRT 0,53) est co-éluée avec le DB-003, alors qu'avec le système N-modifié elle était toujours éliminée très proprement.

A ce stade, le système N-modifié semble donc être le plus approprié pour atteindre les spécifications demandées si toutefois le problème des pulsations ou "coups de bélier" arrivait à être résolu.

La nature tensio-active du DB-003 et son impact aussi bien sur la stabilité du système, que sur le rapport de phases ou de leur densité, nous ont amené à envisager deux types de causes aux "coups de béliers":

- une cause thermodynamique due à une absence d'équilibre entre les phases de l'injectat contenant du DB-003 et les phases mobile et stationnaire "fraîches". Cette mise hors équilibre d'une partie de la colonne (au niveau de l'injection), si elle existe, se traduira par une mauvaise (ou une absence) de "percolation" de la phase mobile à travers la phase stationnaire et pourrait être la cause des pulsations observées ;
- une cause hydrodynamique : le DB-003 entraîne peut être une modification trop importante de l'écoulement de la phase mobile, conduisant à un état d'équilibre correspondant à une proportion moindre de phase stationnaire dans les cellules de partage. Outre cette perte de phase stationnaire, il n'est pas impossible que la création de zones dans la colonne pour lesquelles l'état d'équilibre est différent pourrait également générer des pulsations.

Ces hypothèses ne peuvent être vérifiées que si nous avons accès à une visualisation de l'écoulement à l'intérieur de notre colonne. Pour cela nous avons réalisé une collaboration avec le laboratoire de Génie des Procédés Environnement et Agroalimentaire (GEPEA) UMR CNRS 6144 à Saint Nazaire (France).

II.3.1.3 Etude du problème de pulsation

Nous avons réalisé cette étude en collaboration avec les docteurs Alain Foucault et Luc Marchal. Cette équipe est spécialisée dans le design de cellules pour les appareils de chromatographie de partage centrifuge, ainsi que dans la compréhension des phénomènes d'échange et de partage à l'interface liquide/ liquide.

Ils ont ainsi développé un outil permettant de visualiser les écoulements au sein d'une colonne de CPC : le Visual-CPC.

II.3.1.3.1 Le Visual-CPC

Le visual-CPC est un appareil de CPC conçu pour visualiser l'écoulement et le comportement hydrodynamique des phases liquides au sein d'une colonne CPC.

Description de l'appareil Visual-CPC

Cet appareil est composé d'un bâti en acier, avec un moteur asynchrone électrique sur variateur (Leroy Somer, Angoulême, France) et d'un axe horizontal servant de support au rotor de CPC. La partie supérieure du rotor est transparente, en verre de qualité optique (Ediver. Rebais., France). Les cellules et les conduits capillaires de la colonne de CPC sont gravés par perce au jet d'eau dans une couronne de PTFE de 6,75 mm d'épaisseur maintenue entre une plaque d'acier et une couronne de verre. L'étanchéité du montage est assurée par une feuille de Téflon chargé carbone de 1,75 mm d'épaisseur (AngstPfister, Roissy-Charles de Gaulle, France) fixée de chaque côté de l'anneau gravé.

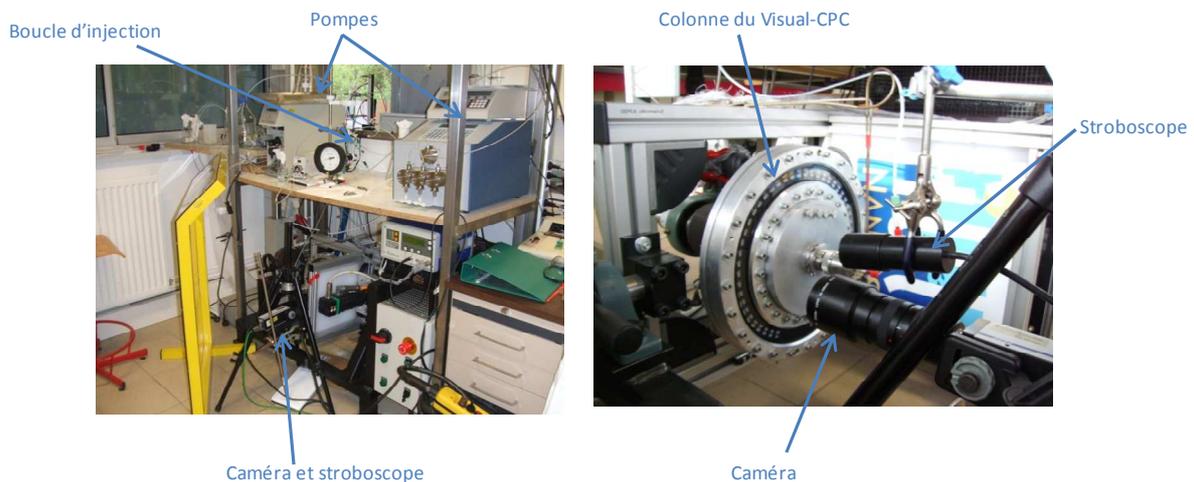


Figure 107 : Photographie de la chaîne chromatographique du Visual-CPC (à gauche), et de la colonne CPC proprement dite (à droite).

L'anneau gravé contient 50 cellules de géométrie Twin-cells® asymétriques (Brevet FR2923398) de 11 mm de hauteur, 8,5 mm de largeur ; le diamètre moyen du rotor est de 236 mm. Les canaux ont une largeur de 0,5 mm. Le volume correspondant à l'ensemble des cellules et canaux est de 28,5 ml.

Le rotor est connecté au reste de la chaîne chromatographique par des lignes de fluide en Peek de section 1/16, et par deux joints tournants (Tecmecca, Epernay, France). La vitesse de rotation de l'appareil varie de 0 à 3000 rpm.

Les images sont capturées à l'aide d'une caméra asynchrone et d'un stroboscope. Il s'agit d'un système Videostrobe (Sysmat Industrie, St Thibault des Vignes, France) légèrement modifié : une caméra couleur digitale TMC-9700 CCD avec un obturateur asynchrone (Pulnix, Sunnyvale, CA, USA) ; deux stroboscopes Phylec (Sysmat) et un capteur de vitesse optique VLST7T (Compact, Bolton, UK) qui contrôle à la fois la caméra et les stroboscopes. La caméra est équipée d'une lentille 2.5 TV Zoom 18-108 mm et est connectée à un convertisseur multisystème CDM-810 (World Advanced Technologies, Toulouse, France) permettant une conversion NTSC/PAL/SECAM et 60/50 Hz. L'acquisition des images est réalisée par une carte vidéo Pinnacle (Studio Movie Board Plus).

II.3.1.3.2 Etude du système N-modifié avec le DB-003

Il faut mentionner que la géométrie des cellules employées sur le Visual-CPC, des Twin-cells, est très différente de celle des cellules présentes dans notre colonne CPC Kromaton, cellules dites en Z (Figure 108).

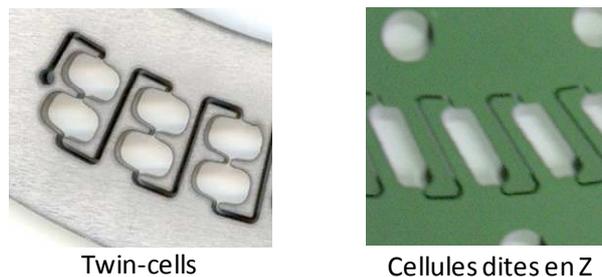


Figure 108 : Représentation de la géométrie des cellules de type Twin-cells, et en Z.

II.3.1.3.2.1 Etude du système N-modifié seul

Nous avons dans un premier temps procédé à une étude du système seul, ce qui nous fournira un point de comparaison pour la suite des études.

Ainsi, différentes expériences ont été menées pour vérifier que le problème de pulsations ne venait pas du système en lui-même.

Le système N-modifié a un comportement habituel, avec des rétentions de phase stationnaire très favorables dès 1000 rpm et avec un débit de 12 ml/min. Ces conditions (263 g et $6,67 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$) se rapprochent le plus de celles que nous utilisons lors de nos séparations.

Le système N-modifié seul est donc parfaitement stable.

Tableau 39: Conditions expérimentales utilisées sur le Visual-CPC avec le système N-modifié sans DB-003.

	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9
Volume de colonne	28,5 ml								
Débit	12 ml/min			24 ml/min			48 ml/min		
Rotation (rpm)	765	1000	1400	765	1000	1400	765	1000	1400
Force centrifuge relative	154 g	263 g	517 g	154 g	263 g	517 g	154 g	263 g	517 g
Vélocité (cm.s ⁻¹)	6,67	6,67	6,67	13,3	13,3	13,3	26,7	26,7	26,7
Rétention de phase stationnaire	60%	84%	84%	60%	55%	65%	35%	35%	37%

Comme attendu habituellement, une augmentation du débit à 24 puis 48 ml/min conduit à une diminution de rétention de phase stationnaire.

Le problème ne semblant pas venir du système de solvants seul, nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact du DB-003 sur le système.

II.3.1.3.2.2 Etude en présence de DB-003

Les conditions expérimentales utilisées sont regroupées dans le tableau ci-après.

Tableau 40: Conditions expérimentales testées sur le Visual-CPC en présence de DB-003.

	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13
Volume de colonne	28,5 ml			
Concentration de l'injectat en DB-003	5 g/20 ml soit 250 g/l			
Débit	20 ml/min		10 ml/min	
Rotation (rpm)	750	1000	1400	1000
Volume fraction	5 ml			
Phase stationnaire perdue dans les fractions	9,4 ml	8,3 ml	11,3 ml	6,2 ml
Phase stationnaire restant dans la colonne	7 ml	7 ml	5 ml	14,8 ml
Rétention de phase stationnaire finale	25%	30%	18%	52%
Force centrifuge relative	148 g	263 g	517 g	263 g
Vélocité	11 cm.s ⁻¹	11 cm.s ⁻¹	11 cm.s ⁻¹	5,6 cm.s ⁻¹

En observant les résultats dans le tableau ci-dessus, nous pouvons tout d'abord remarquer que les conditions permettant la meilleure rétention de phase stationnaire (1000 rpm, 10 ml/min), sont là encore celles se rapprochant le plus des conditions utilisées au cours de nos expériences.

Afin de tenter de corréliser la perte de phase stationnaire à la présence du DB-003 dans la colonne, nous avons mesuré cette perte dans les différentes fractions collectées en sortie du Visual CPC.

Le graphique de la Figure 109 représente l'évolution de la perte de phase stationnaire en fonction du temps.

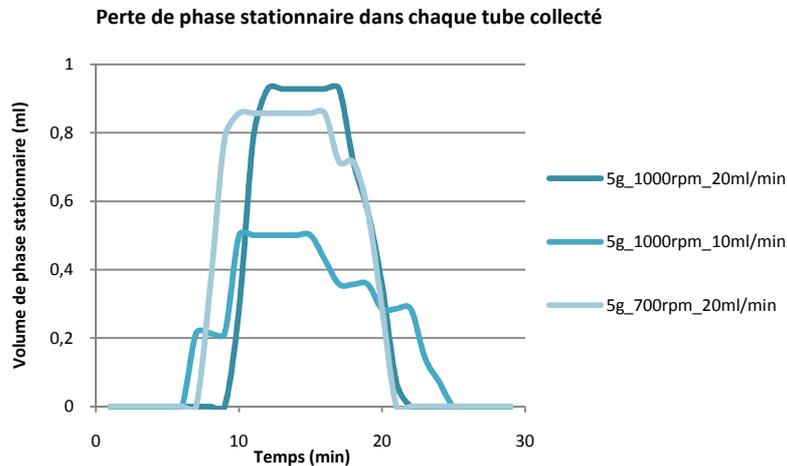


Figure 109: Représentation graphique de la perte de phase stationnaire en fonction du temps

Après analyse CCM des différentes fractions, il apparaît très nettement que le volume de phase stationnaire expulsée est parfaitement superposable au profil d'élution du DB-003. C'est donc bien le DB-003 qui "entraîne" la phase stationnaire lors de son évolution dans la colonne.

Une autre constatation que nous avons faite est que lors de ces expériences sur le Visual-CPC, le phénomène de pulsations n'a pas été observé. Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses :

- soit la géométrie des cellules en *Twin-cells* permet de limiter la formation de tels coups de bélier ;
- soit la colonne du Visual-CPC, qui ne comporte qu'un seul disque chromatographique, conduit à un volume de colonne (et donc à une perte de charge générée) trop faible pour que le phénomène de pulsations soit généré, amplifié et donc visualisable.

Les expériences réalisées dans le cadre de la thèse de Nassima Amarouche (BDI CNRS/Lonza) ont été mises en œuvre sur un CPC équipé de *Twin-cells*. Le phénomène de "coups de bélier" apparaît de la même façon démontrant ainsi que ce phénomène n'est pas corrélé à la forme des cellules.

L'analyse des films réalisés nous a permis de confirmer que la perte de phase stationnaire observée était probablement due aux propriétés tensio-actives du DB-003.

Sur la Figure 110 est représenté un montage de capture d'images du film pris lors de l'expérience 13.

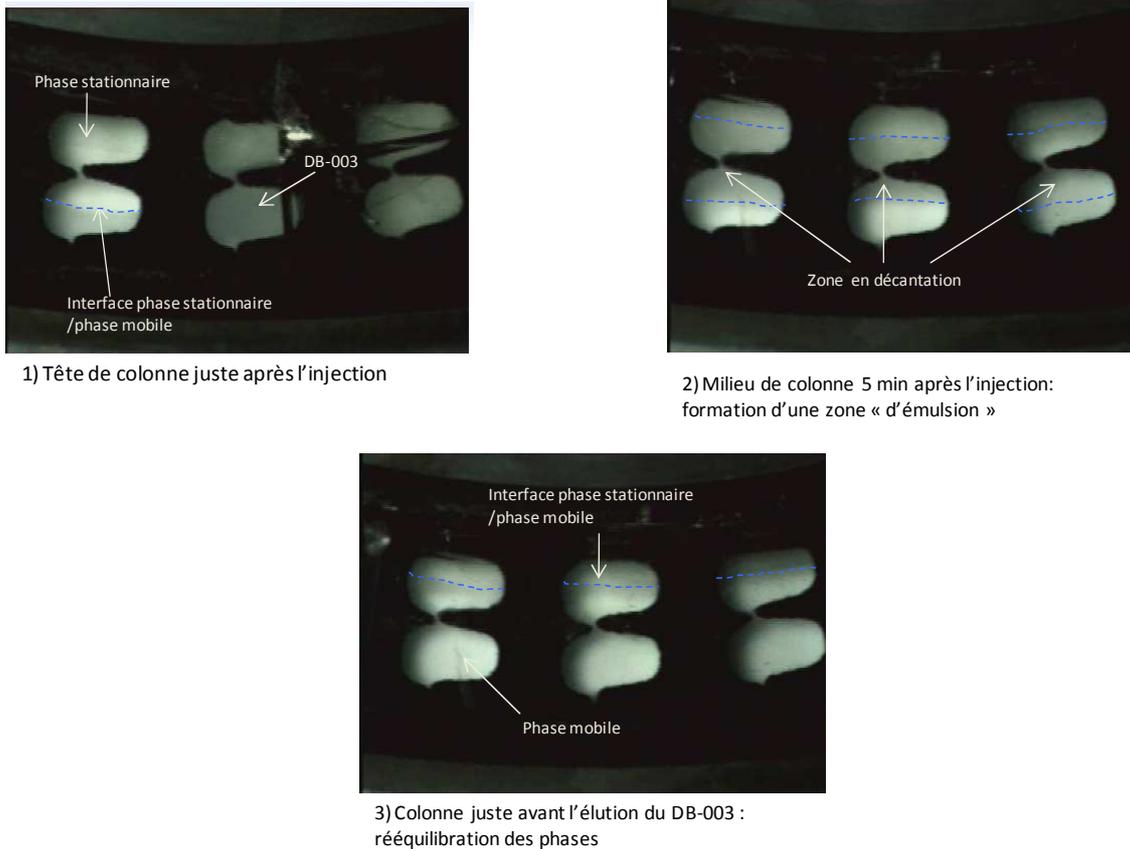


Figure 110: Montage de capture d'images prises à partir du film réalisé au cours de l'exp.13.

La rétention de phase stationnaire est satisfaisante avant injection du DB-003 (environ 65-70 %) (cellule la plus à gauche, 1) Figure 110). Dès l'injection de celui-ci, le film montre que la phase mobile traverse correctement l'injectat : les phases avec et sans DB-003 sont en équilibre. Puis le "train" d'injection progresse le long de la colonne, de cellules en cellules, en semblant chasser la phase stationnaire présente. A l'arrière de ce train, la colonne se rééquilibre progressivement, avec l'apparition de zones de coalescence importantes dans les cellules (2) Figure 110). Après décantation, le rapport des phases mobile et stationnaire est complètement inversé dans les cellules et la phase stationnaire ne représente plus qu'environ 25 % (3) Figure 110). Le DB-003 entraîne donc avec lui une partie de la phase stationnaire.

L'amélioration de nos séparations passera nécessairement par une compensation de la perte de phase stationnaire, qu'elle soit due aux pulsations de phase mobile ou à un entrainement par le DB-003. Cette compensation peut se faire par le biais d'un mode développement original qui tire partie de la nature liquide des deux phases : le co-courant.

Ce dernier a été précédemment décrit par l'équipe du Dr. Alain Berthod⁵⁴ (UMR 5180, Université Claude Bernard, Lyon) et est développé actuellement par les Drs Alain Foucault et Luc Marchal dans le cadre de l'Extraction de Partage Centrifuge (thèse de Mariem Mojaat Guemir).

II.3.1.4 Application du mode co-courant

Le mode co-courant est mis en œuvre en pompant conjointement à la phase mobile une faible proportion de phase stationnaire.⁵⁴ Dans notre cas, cet apport permet de compenser en partie la perte de phase stationnaire liée au DB-003, et donc, en maintenant la quantité de phase stationnaire dans la colonne de gagner en résolution et potentiellement en efficacité si l'écoulement de la phase mobile est amélioré.

Nous avons choisi de réaliser un pourcentage de co-courant de 5 %, c'est-à-dire que nous allons pomper un mélange phase mobile/phase stationnaire (95:5, v/v). Afin de tenter de diminuer la perturbation au moment de l'injection, nous avons également procédé à une dilution de notre injection, les 5 g de produits étant dorénavant injectés dans 30 ml et non plus 20 ml.

Tableau 41: Conditions expérimentales des expériences en co-courant.

	Exp. 1'	Exp.2'
Système de solvants	Système N-modifié	
Masse injectée	3,21 g	5,39 g
Mode	Descendant	
Co-courant	5 % (v/v)	
Vitesse de rotation	1100 rpm	1200 rpm
Débit	5 ml/min	5-6 ml/min
DB003 (rendement, pureté)	2,8 g (89 %, 99,3%)	4,62 g (87%, 99,3 %)
Commentaire	Nette diminution des pulsations	
Perte de charge	23 bars	16 bars
Phase stationnaire restante	50 ml	50 ml

La lecture du Tableau 41 est sans appel : l'apport du co-courant de phase stationnaire a considérablement amélioré le comportement du système. Les pulsations sont stabilisées très rapidement et la quantité de phase stationnaire présente, si elle est diminuée par rapport à la quantité présente avant l'injection, demeure cette fois acceptable (50 ml).

Les fractions sont de plus conformes aux spécifications souhaitées par notre partenaire et le rendement en DB-003 est compatible avec un développement industriel.

II.3.1.5 Conclusion sur le projet DB-003

L'application de la CPC à la problématique de purification de peptides totalement protégés s'est soldée par un succès.

Ainsi, la sélection du **système N-modifié** adapté au DB-003, en termes de solubilité et de partage, a permis d'obtenir aisément, avec un **développement par élution**, des fractions répondant aux exigences de pureté de notre partenaire.

L'apparition de **perturbations hydrodynamiques** lors des premiers essais de montée en échelle, matérialisées sous forme de pulsations de type "**coup de bélier**", a entraîné une étude de l'impact du DB-003 sur le système biphasique de solvant.

Nous avons ainsi montré que le DB-003, du fait probablement de ces propriétés tensio-actives, entraîne une **déstabilisation et un rééquilibrage en faveur de la phase organique** du système biphasique de solvants.

Le protocole d'injection a ainsi été modifié pour palier ces modifications : injection dans un **rapport (50:50, v/v) phase organique/phase aqueuse**, avec une **rotation de colonne nulle**, dans une **colonne sur-équilibrée**.

La persistance des pulsations nous a amené à solliciter l'aide de l'équipe du GEPEA (Saint Nazaire) pour visualiser l'écoulement à l'intérieur de la colonne. Ces expériences ont permis de mettre hors de cause le système biphasique de solvants. La parfaite **superposition des profils d'élution de DB-003 et de "fuite" de phase stationnaire** nous a amené à la conclusion que le DB-003 entraînait une partie de la phase stationnaire lors de son émergence de la colonne.

Pour tenter de corriger cette perte, une **méthodologie par co-courant** a été appliquée qui a permis d'obtenir, avec des injections de **l'ordre de 5 g**, des fractions **répondant aux exigences en termes de pureté et de productivité**.

Néanmoins, le problème récurrent des pulsations ou coups de bélier rencontré lors de développement de procédés par CPC devra être impérativement résolu pour pouvoir envisager une utilisation industrielle de la technique.

Pour cela, il faudra se pencher sur la genèse de ces coups de bélier au sein de la colonne, ainsi que sur l'identification des paramètres physico-chimiques à l'origine du phénomène, pour pouvoir proposer des solutions soit en termes d'appareillage ou de solvants.

II.4 Conclusion générale sur la seconde partie

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont abouti ainsi au développement de nouveaux procédés de purifications par CPC de produits de nature peptidique.

Un nouveau procédé utilisant le mode échange d'ions d'une manière innovante a ainsi vu le jour: **l'échange d'ions mixte** avec l'utilisation pour la première fois d'une **phase stationnaire qui peut être divisée en deux zones distinctes**, rendant ainsi le procédé particulièrement modulable.

L'étude des **interactions peptides/échangeur**, via l'analyse par **RMN DOSY**, a permis de faire la lumière sur les interactions ou le type d'entité mises en jeu. Il s'agit bien dans notre cas de la **formation de paires d'ions** et non de micelles inverses.

Si ce procédé a démontré son efficacité sur le mélange synthétique de cinq dipeptides qui a servi à son développement, il a également **été transposé avec succès à des problèmes de purification concrets**, tel que la capture d'un peptide bioactif ou le polissage d'un peptide d'intérêt pharmaceutique.

L'application du MIXCPC à la **capture du peptide VW** à partir de l'hydrolysat de protéines blanches de luzerne, a permis un **enrichissement de la fraction d'un facteur supérieur à 40**, ce qui est considérable pour un procédé en **une seule étape**. Le **polissage du SF-328** a permis là encore d'illustrer la très **grande sélectivité** du procédé par échange d'ions.

Le fractionnement des autres extraits de luzerne, **sérum et hydrolysat de PX**, a généré plusieurs fractions qui comme nous allons le voir dans la partie suivante ont été **évaluées biologiquement** comme futurs agents anti-âge pour la peau.

Enfin, l'implication dans le projet de purification d'une ciclosporine modifiée, le DB-003, en collaboration avec la société Lonza, a permis d'aborder à une problématique différente : la **purification de peptides entièrement protégés**.

Ce projet a ainsi soulevé un problème récurrent en chromatographie liquide/liquide sans support solide : la **gestion de phénomènes délétères** que sont les **coups de bélier**. Les travaux qui ont été réalisés sur ces projets ne sont que les prémices de ceux engagés actuellement au laboratoire au cours d'une thèse cofinancée par la société Lonza.

Références bibliographiques

1. Knight, M.; Ito, Y.; Finn, T. M., Separation of Peptides by Spiral Countercurrent Chromatography. In *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Taylor & Francis Ltd: **2008**; Vol. 31, pp 471-481.
2. Ma, Y.; Ito, Y., Affinity Countercurrent Chromatography Using a Ligand in the Stationary Phase. *Analytical Chemistry* **1996**, 68 (7), 1207-1211.
3. Knight, M.; Fagarasan, M. O.; Takahashi, K.; Gebblaoui, A. Z.; Ma, Y.; Ito, Y., Separation and purification of peptides by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, 702 (1-2), 207-214.
4. Ma, Y.; Ito, Y., Recent advances in peptide separation by countercurrent chromatography. *Analytica Chimica Acta* **1997**, 352 (1-3), 411-427.
5. Chevolut, L.; Collic-Jouault, S.; Foucault, A.; Ratiskol, J.; Siquin, C., Preliminary report on fractionation of fucans by ion-exchange displacement centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1998**, 706 (1), 43-54.
6. Maciuk, A.; Toribio, A.; Zeches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H.; Georgiev, M. I.; Ilieva, M. P., Purification of Rosmarinic Acid by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, 28 (12/13), 1947-1957.
7. Maciuk, A.; Renault, J.-H.; Margraff, R.; Trebuchet, P.; Zeches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M., Anion-Exchange Displacement Centrifugal Partition Chromatography. *Analytical Chemistry* **2004**, 76 (21), 6179-6186.
8. Toribio, A.; Delannay, E.; Nuzillard, J.-M.; Zèches-Hanrot, M.; Richard, B.; Waffo-Téguo, P.; Renault, J.-H., Large-Scale Isolation of Anthocyanins from Grapevine by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. In *Macromolecules and Secondary Metabolites of Grapevine and Wine*, Jeandet, P.; Clément, C.; Conreux, Alexandra, Eds. Editions Tec et Doc: Paris, **2007**; pp 247-252.

9. Toribio, A.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1170 (1-2), 44-51.
10. Toribio, A.; Boudesocque, L.; Richard, B.; Nuzillard, J.-M.; Renault, J.-H., Preparative Isolation of Glucosinolates from Various Edible Plants by Strong Ion-Exchange Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *accepté*.
11. Maciuk, A. Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : Application à l'isolement de substances naturelles. *Thèse de doctorat*, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, **2005**.
12. Sato, T., The extraction of uranium (VI) from nitric acid solutions by di-(2-ethylhexyl)-phosphoric acid. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1963**, 25 (1), 109-115.
13. Yoon, S. J.; Lee, J. G.; Tajima, H.; Yamasaki, A.; Kiyono, F.; Nakazato, T.; Tao, H., Extraction of lanthanide ions from aqueous solution by bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid with room-temperature ionic liquids. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **2010**, 16 (3), 350-354.
14. Berthod, A.; Xiang, J.; Alex, S.; Gonnet-Collet, C., Chromatographie à contre courant et micelles inverses pour la séparation et l'extractions de cations métalliques. *Canadian Journal of Chemistry* **1996**, 74, 277-286.
15. Levin, I. S.; Shatalova, A. A.; Azarenko, T. G.; Vorsina, I. A.; Burtovaya-Balakireva, N. A.; Rodina, T. F., Concentration and separation of indium, gallium, thallium, antimony and bismuth by extraction with alkylphosphoric acids. *Talanta* **1967**, 14 (7), 801-808.
16. Wang, T.; Nagaosa, Y., Separation of Calcium (II), Magnesium (II), Strontium (II), and Barium (II) by High Performance Centrifugal Partition Chromatography with Some Organophosphorus Compounds. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2003**, 26 (4), 629 - 640.
17. Flett, D. S., Solvent extraction in hydrometallurgy: the role of organophosphorus extractants. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690 (10), 2426-2438.
18. Kul, M.; Cetinkaya, U., Recovery of Nickel by Solvent Extraction from Electroplating Rinse Bath Solution. *Solvent Extraction and Ion Exchange* **2010**, 28 (2), 225 - 243.

19. Gordon; Brown; Clifford Use of bis(2-ethylhexyl)phosphoric acid in the separation of rare earths by countercurrent liquid-liquid extraction. *DE1956694 (A1)* **1970**.
20. Gu, T., Liquid Liquid Partitioning Methods for Bioseparations. In *Handbook of Bioseparations*, Academic Press: New York, **2000**; Vol. 2, pp 329-364.
21. Li, Q.; Weng, S.; Wu, J.; Zhou, N., Comparative Study on Structure of Solubilized Eau in Reversed Micelles. 1. FT-IR Spectroscopic Evidence of Eau/AOT/n-Heptane and Eau/NaDEHP/n-Heptane Systems. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, 102 (17), 3168-3174.
22. Li, Q.; Li, T.; Wu, J.; Zhou, N., Comparative Study on the Structure of Eau in Reverse Micelles Stabilized with Sodium Bis(2-ethylhexyl) Sulfosuccinate or Sodium Bis(2-ethylhexyl) Phosphate in n-Heptane. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 229 (1), 298-302.
23. Shen, C.-W.; Yu, T., Protein separation and enrichment by counter-current chromatography using reverse micelle solvent systems. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1151 (1-2), 164-168.
24. Kishi, K.; Furusaki, S., Effect of Amino Acid Sequence on Reversed Micellar Extraction of Dipeptides. *Journal of Chemical engineering of Japan* **1995**, 28 (5), 612-613.
25. Yu, Z.-J.; Neuman, R. D., Giant Rodlike Reversed Micelles Formed by Sodium Bis(2-ethylhexyl) Phosphate in n-Heptane. *Langmuir* **1994**, 10 (8), 2553-2558.
26. Ibrahim, T. H.; Neuman, R. D., Molecular modeling study of the aggregation behavior of nickel(II), cobalt(II), lead(II) and zinc(II) bis(2-ethylhexyl) phosphate complexes. *Journal of Colloid and Interface Science* **2006**, 294 (2), 321-327.
27. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114 (8), 3139-3141.
28. Morris, K. F.; Johnson, C. S., Resolution of discrete and continuous molecular size distributions by means of diffusion-ordered 2D NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (10), 4291-4299.
29. Johnson, C. S., Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, 34, 203-256.

30. Antalek, B., Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results. *Concepts Magn. Reson.* **2002**, 14 (4), 225-258.
31. Lameiras, P. Etude de la relation structure activité de peptides μ -opioïdes par RMN, modélisation moléculaire et docking : endomorphine-2/morphiceptine et leurs analogues. *Thèse de doctorat*, Université de Rouen, Rouen, **2008**.
32. Wu, D. H.; Chen, A. D.; Johnson, C. S., An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, 115 (2), 260-264.
33. Yu, Z. J.; Zhou, N. F.; Neuman, R. D., On the role of eau in the formation of reversed micelles: an antimicellization agent. *Langmuir* **1992**, 8 (8), 1885-1888.
34. Faure, A.; Tistchenko, A. M.; Zemb, T.; Chachaty, C., Aggregation and dynamical behavior in sodium diethylhexyl phosphate/eau/benzene inverted micelles. *The Journal of Physical Chemistry* **1985**, 89 (15), 3373-3378.
35. Faure, A.; Ahlnas, T.; Tistchenko, A. M.; Chachaty, C., Surfactant conformation and solvent penetration in sodium di-2-ethylhexyl phosphate reversed micelles. A multinuclear relaxation study. *The Journal of Physical Chemistry* **1987**, 91 (7), 1827-1834.
36. Yu, Z.-J.; Neuman, R. D., Reversed Micellar Solution-to-Bicontinuous Microemulsion Transition in Sodium Bis(2-Ethylhexyl) Phosphate/n-Heptane/Eau System. *Langmuir* **1995**, 11 (4), 1081-1086.
37. Ibrahim, T. H.; Neuman, R. D., Nanostructure of Open Eau-Channel Reversed Micelles. I. ^1H NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Langmuir* **2004**, 20 (8), 3114-3122.
38. Kagan, G.; Li, W.; Hopson, R.; Williard, P. G., Internally Referenced Diffusion Coefficient-Formula Weight (D-FW) Analysis of ^{31}P Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy (DOSY). *Organic Letters* **2009**, 11 (21), 4818-4821.
39. Zanin, V. Un nouveau concept nutritionnel pour l'Homme : l'extrait foliaire de luzerne.; *Association pour la promotion des extraits foliaires en nutrition (APEF): Paris*, **1998**.

40. Schoutteten, F. Fiche Technique Agroindustrie : La Luzerne; *CCI Agroindustries*: Reims, **2004**.
41. Kapel, R.; Bigand, M.; Dhulster, P., Amélioration d'un procédé de production d'un concentré de protéines blanches de luzerne industriel : optimisation du rendement d'extraction en protéines par plan d'expériences *Récents Progrès en Génie des Procédés* **2007**, 96, 1-8.
42. Rutner, A. C.; Daniel Lane, M., Nonidentical subunits of ribulose diphosphate carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, 28 (4), 531-537.
43. Siegel, M. I.; Wishnick, M.; Lane, M. D.; Paul, D. B., 5 Ribulose-1,5-Diphosphate Carboxylase. In *The Enzymes*, Academic Press: **1972**; Vol. Volume 6, pp 169-192.
44. Rutner, A. C., Estimation of the molecular weight of ribulose diphosphate carboxylase subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1970**, 39 (5), 923-929.
45. Kapel, R.; Chabeau, A.; Lesage, J.; Riviere, G.; Ravallec-Ple, R.; Lecouturier, D.; Wartelle, M.; Guillochon, D.; Dhulster, P., Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. *Food Chemistry* **2006**, 98 (1), 120-126.
46. D'Alvise, N.; Lesueur-Lambert, C.; Fertin, B.; Dhulster, P.; Guillochon, D., Removal of Polyphenols and Recovery of Proteins from Alfalfa White Protein Concentrate by Ultrafiltration and Adsorbent Resin Separations. *Separation Science and Technology* **2000**, 35 (15), 2453 - 2472.
47. Fondation_sur_les_leucodystrophies En savoir plus sur les leucodystrophies. <http://www.leucofondation.com/faq.html> (accessed 04/08/2010).
48. Warren, K. G.; Catz, I.; Ferenczi, L. Z.; Krantz, M. J., Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. *European Journal of Neurology* **2006**, 13 (8), 887-895.
49. Weiner, H.; Hafler, D.; Miller, A.; Al-Sabbagh, A. Suppression of T-cell proliferation using peptide fragments of myelin basic protein; *WO 93/21222*, **1993**.

50. Communication Médicale. *Société Canadienne de la Sclérose en Plaques*: Toronto, **2009**.
51. Renault, J.-H.; Nuzillard, J.-M.; Intes, O.; Maciuk, A.; Berthod, A., Chapter 3 Solvent systems. In *Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier*: **2002**; Vol. 38, pp 49-83.
52. Couillard, F.; Foucault, A.; Durand, D. Separating components of a charge in liquid solution comprises entraining components at different speeds by lighter and heavier solvent, using chromatography column. **2005**.
53. Intes, O.; Renault, J.-H.; Siquin, C.; Zèches-Hanrot, M.; Nuzillard, J.-M., Fractionation of low-molecular-mass heparin by centrifugal partition chromatography in the ion-exchange displacement mode. *Journal of Chromatography A* **2001**, 918 (1), 47-57.
54. Berthod, A.; Hassoun, M., Using the liquid nature of the stationary phase in countercurrent chromatography: IV. The cocurrent CCC method. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1116 (1-2), 143-148.

Partie III : Valorisation des extraits de luzerne en physiopathologie cutanée

Partie III Valorisation des extraits de luzerne en physiopathologie cutanée

Cette partie regroupe l'ensemble des évaluations biologiques réalisées sur les extraits de luzerne précédemment décrits : sérum de luzerne, l'hydrolysate de concentré Protéine-Xanthophylle (PX) et l'hydrolysate de protéines blanches de luzerne. Le potentiel des peptides contenus dans ces extraits en tant qu'agents anti-âge cutané a été ainsi exploré.

Le vieillissement cutané est majoritairement dû à l'altération fonctionnelle et/ou structurelle de certaines protéines présentes au niveau de la matrice extracellulaire de la peau : les collagènes et l'élastine. L'altération de ces protéines est sous la dépendance d'une classe particulière d'enzymes : les métalloprotéinases matricielles ou MMPs.

Avant d'aborder la partie portant sur l'évaluation des propriétés biologiques des extraits proprement dit, nous allons tout d'abord procéder à un rappel sur la peau, la matrice extracellulaire, les MMPs et les mécanismes responsables du vieillissement cutané.

III.1 Matrice extracellulaire, métalloprotéinases matricielles et vieillissement cutané

III.1.1 La peau

III.1.1.1 La peau : définition

La peau est un organe assurant de multiples fonctions essentielles pour le corps humain. C'est une barrière physique qui protège l'organisme contre les agressions environnementales, biotiques ou abiotiques ; c'est également le lieu d'échanges thermiques et hydriques indispensables pour le maintien de l'homéostasie ; c'est un organe sensoriel important, il existe en effet de nombreux capteurs sensoriels au niveau de la peau qui informent le cerveau en permanence.

La surface de la peau chez l'adulte est comprise entre 1,5 et 2 mètres carrés, et son poids total atteint en moyenne 2 à 3 kg. Ces données font de la peau un des organes les plus importants, en volume, du corps humain. L'épaisseur de la peau est très variable selon la région du corps considérée: de 0,5 mm au niveau des paupières jusqu'à 5 mm au niveau du haut du dos.¹

III.1.1.2 Composition du tissu cutané

La peau est en fait la réunion de trois tissus distincts : l'épiderme en surface, juste en dessous le derme puis l'hypoderme ou tissu sous-cutané.

Ces tissus ont des compositions et donc des rôles très différents les uns des autres.

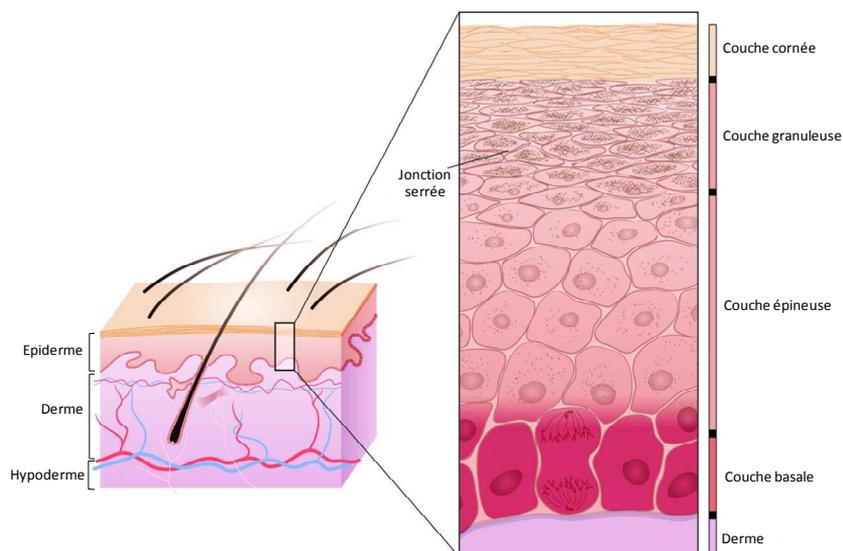


Figure 111 : Coupe transversale de la peau et de l'épiderme.

III.1.1.2.1 L'épiderme

L'épiderme constitue la véritable barrière de la peau, comme nous l'avons mentionné, c'est une barrière triple : environnementale (kératinocytes), solaire (mélanocyte) et immunitaire (cellules de Langerhans). L'épiderme est constitué de plusieurs couches distinctes, avec dans l'ordre de la plus profonde à celle la plus proche de la surface : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée.¹

III.1.1.2.1.1 La couche basale

Cette couche est située à la jonction dermo-épidermique et est constituée d'une membrane basale sur laquelle reposent les kératinocytes. C'est une couche active où ont lieu les divisions cellulaires.

Au sein de cette couche se trouvent également les mélanocytes, cellules responsables de la production de mélanine, agent principal de la protection contre les rayonnements UV.

Les kératinocytes, cellules à l'origine de la barrière imperméable de la peau, sont les cellules majoritaires de l'épiderme (95%). Elles se divisent au niveau de la partie germinative de cette lame basale. Ces kératinocytes sont liés les uns aux autres par le biais de structures particulières : les desmosomes formant des jonctions dites serrées. Les kératinocytes vont ensuite se détacher de la

couche basale pour entamer leur migration vers les couches supérieures de l'épiderme. Au cours de cette migration, les kératinocytes vont faire l'objet d'une différenciation.^{1,2}

III.1.1.2.1.2 La couche épineuse

Cette couche appelée également couche de Malpighi est constituée de kératinocytes de taille importante. Ces derniers bien que capables encore de se diviser, sont étroitement fixés les uns aux autres par le biais des jonctions serrées. Ces jonctions confèrent alors aux kératinocytes un aspect épineux, d'où le nom de couche épineuse.

III.1.1.2.1.3 La couche granuleuse

Cette couche est le lieu majeur de la production de kératine au sein des kératinocytes. La kératine est une protéine à l'origine de structures très résistantes : les tonofilaments. Ces tonofilaments sont responsables de la liaison de la membrane cellulaire à la membrane nucléaire. Au sein de la couche granuleuse, les filaments de kératines s'agrègent progressivement pour former des grains intracellulaires : les grains de kératoyaline. Ces grains sont visibles au microscope et sont à l'origine du nom de la couche dite granuleuse.¹

III.1.1.2.1.4 La couche cornée

Cette couche est celle directement en contact avec l'environnement.

La couche cornée est le lieu de la différenciation terminale des kératinocytes. Ces derniers arrivent de la couche granuleuse, contenant de nombreux grains de kératoyaline. Lors de la dernière étape de différenciation, l'ADN du noyau des kératinocytes est fragmenté par des mécanismes proches de l'apoptose, la membrane cellulaire s'épaissit et devient très hydrophobe, les grains de kératoyaline fusionnent. Le kératinocyte devient alors une cellule pavimenteuse appelée cornéocyte.

Au sein des kératinocytes, il existe également des granules lipidiques riches en céramides : les corps d'Odland. Lors de la transformation en cornéocytes, ces corps déversent leur contenu pour former un ciment hydrophobe assurant la cohésion entre les différents cornéocytes.

Il semblerait également que les corps d'Odland contiendraient les enzymes responsables de la desquamation, *i.e.* de l'élimination des cornéocytes.¹

De la division cellulaire du kératinocyte au détachement du cornéocyte de la couche cornée, il s'écoule un laps de temps d'environ 4 semaines. C'est le temps nécessaire pour le renouvellement de l'épiderme.

III.1.1.2.2 Le derme

Le derme nourrit et soutient l'épiderme. C'est un tissu conjonctif environ quatre fois plus épais que l'épiderme, qui est responsable de la résistance et de la souplesse de la peau.¹

Comme tout tissu conjonctif, le derme est composé majoritairement de matrice extracellulaire et plus particulièrement de fibres de collagène et d'élastine. Ces structures seront détaillées plus tard dans le manuscrit.

Le derme est le siège des phénomènes d'altérations les plus importants au cours du vieillissement cutané.³

III.1.1.2.3 L'hypoderme

L'hypoderme est parfois considéré comme n'appartenant pas à la peau proprement dite. Il est situé immédiatement après le derme, c'est une couche adipeuse très fortement vascularisée et responsable de l'amortissement des chocs reçus par la peau. En effet, l'hypoderme forme un coussin qui va protéger et séparer la peau des membranes fibreuses entourant les organes profonds, les muscles et les os.¹

Cette couche est constituée majoritairement d'un type cellulaire spécialisé : l'adipocyte dérivant de fibroblastes.

A côté de ces couches cellulaires, la peau comporte également d'autres structures appelées annexes : les poils, les glandes sudoripares, les glandes sébacées.

La peau, au travers du derme notamment, est un tissu très riche en une matrice particulière : la matrice extracellulaire ou MEC. Cette MEC est un environnement très complexe qui intervient dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques.

Les composants de cette MEC sont ceux qui sont les plus touchés lors du vieillissement cutané, ils constituent donc des cibles potentielles pour nos extraits de luzerne.

III.1.2 La matrice extracellulaire (MEC)

III.1.2.1 Définition de la MEC

Le milieu extracellulaire est comblé par un enchevêtrement complexe de macromolécules constituant la matrice extracellulaire (MEC). Les tissus riches en MEC sont anciennement appelés tissus conjonctifs. Il s'agit du derme, du tissu musculaire, de l'os, du cartilage ou encore du sang ("tissu conjonctif liquide").⁴

Les différents composants de la MEC sont synthétisés par des cellules spécialisées de types variés comme les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses etc.

III.1.2.2 Composition de la MEC

La matrice extracellulaire est constituée d'un ensemble de polysaccharides et de protéines qui s'assemblent en un réseau organisé autour des cellules des tissus conjonctifs. Les principales classes de macromolécules entrant dans la composition de la MEC sont les suivantes :

- les protéines fibrillaires, collagènes et élastine, formant un réseau tridimensionnel fibreux ;
- les glycoprotéines de structure, comme la fibronectine, assurant la cohésion entre cellules et tissus ;
- les protéoglycannes et glycosaminoglycannes (GAG) formant la substance fondamentale.⁴

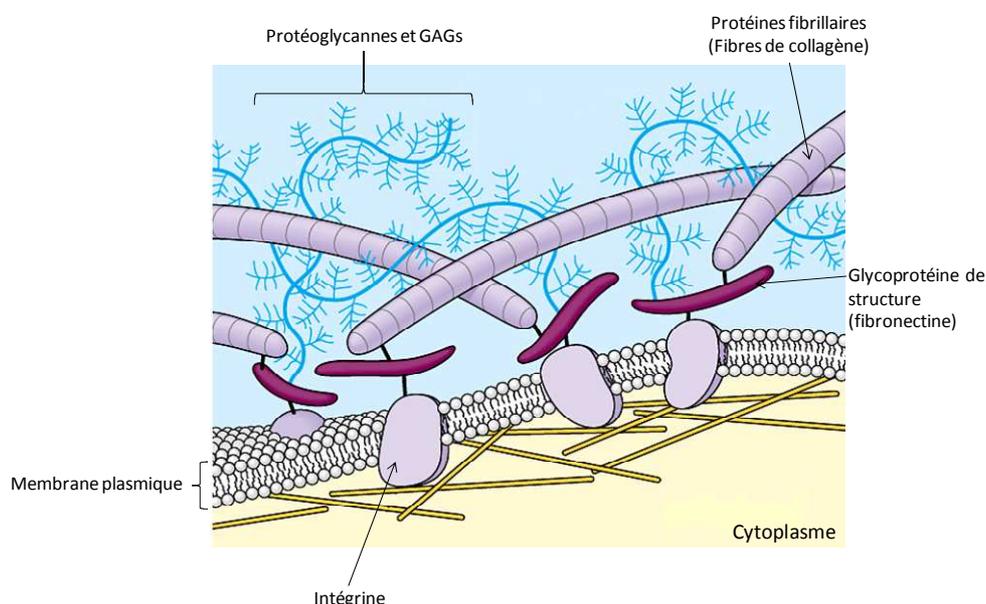


Figure 112 : Schéma représentant les composants de la matrice extracellulaire.

Ces molécules exercent, en plus de leur rôle physique de soutien tissulaire, un rôle biologique de régulation du phénotype cellulaire (migration, prolifération, différenciation, apoptose).

Nous ne détaillerons par la suite que les composants prépondérants au niveau du derme, fibres de collagène et d'élastine, nous contentant de décrire brièvement les autres composants.

III.1.2.2.1 Les protéines fibrillaires

Les protéines fibrillaires, élastine et collagènes, forment un réseau tridimensionnel fibreux sur lequel vont pouvoir s'accrocher les autres molécules constitutives de la MEC, en particulier les glycoprotéines.

Ces protéines jouent donc un rôle structural au sein de la MEC mais, nous allons le voir, leurs fonctions sont bien plus nombreuses et complexes.

III.1.2.2.1.1 L'élastine

L'élastine est une protéine présente dans de nombreux organes du corps humain. C'est en effet un composant essentiel pour les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques comme la peau, les poumons, les artères ou encore les ligaments.

Elle joue un rôle primordial dans les modifications dynamiques de ces tissus puisqu'elle entre dans la composition des fibres élastiques.⁵

III.1.2.2.1.1.1 Structure moléculaire

Longtemps considérée comme une protéine amorphe, l'élastine est en fait très structurée. Elle est synthétisée par les formes différenciées de fibroblastes sous forme d'un précurseur soluble : la tropoélastine.⁵

Ce précurseur est formé d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 800 acides aminés. Il existe différentes séquences répétitives au sein de cette chaîne telles que les séquences VPGVG et VGVAPG, qui interviennent dans la formation de structure de type coude β . Par répétition des ces coudes β , une β -spirale se forme. Cette structure, propre à l'élastine, intervient dans la formation des fibres élastiques.⁵

Les molécules de tropoélastine s'associent, dans un premier temps, à des glycoprotéines de structures fibrillaires (comme la fibriline) appartenant à une fibre élastique en formation. Puis la désamination oxydative de résidus lysine ainsi que leur condensation par l'enzyme lysine oxydase aboutit à la formation d'acides aminés de pontage interchaînes : desmosine et isodesmosine (Figure 113).

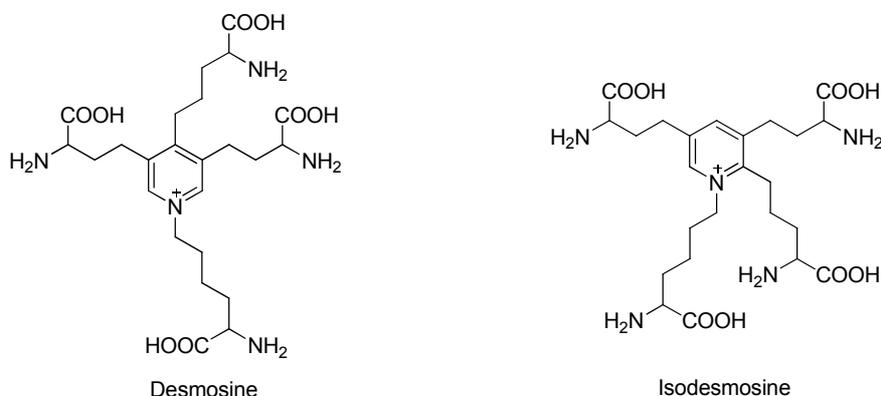


Figure 113 : Structure de la desmosine et de l'isodesmosine.

Desmosine et isodesmosine relient deux chaînes polypeptidiques de tropoélastine en formant des liaisons dites croisées, ou intercaténares. La tropoélastine soluble est ainsi transformée en élastine quasiment insoluble.⁶

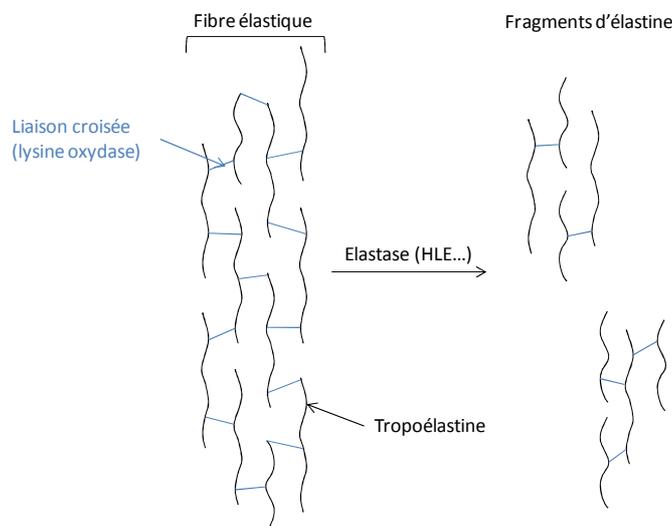


Figure 114 : Schématisation de la structure d'une fibre élastique et des fragments générés lors de sa dégradation par une élastase.

Il existe certaines particularités relatives à la composition de l'élastine :

- une prépondérance d'acides aminés apolaires (Pro, Ala), les acides aminés polaires (Asp, Glu, Lys, Arg) ne représentant que 5% de la protéine ;
- l'existence de deux hétérocycles azotés dérivant de résidus lysine par condensation : la desmosine et l'isodesmosine.

La nature hydrophobe et son pourcentage élevé en liaisons croisées font de l'élastine un polymère résistant à la plupart des protéolyse enzymatiques. Il est toutefois important de noter que l'élastine se renouvelle très peu dans les tissus sains.⁵

Résistante aux attaques enzymatiques, elle ne peut être dégradée que par des protéinases spécifiques comme les élastases, en particulier l'élastase leucocytaire (HLE), certaines métalloprotéinases matricielles, certaines cathepsines ou par quelques protéinases bactériennes.⁶

III.1.2.2.1.2 Modifications physiopathologiques

L'élastine est produite pendant la gestation avec un pic durant la période proche de la naissance et la période néo-natale. La production d'élastine chute ensuite de façon rapide et est quasiment inhibée à l'âge adulte.

Au cours du vieillissement, les fibres élastiques sont progressivement remplacées dans les tissus par des fibres de collagènes, non extensibles, ce qui induit une perte d'élasticité des tissus. Un exemple typique est la formation de vergetures.⁶

III.1.2.2.1.2 Les collagènes

Les fibres de collagène sont les fibres principales de la matrice extracellulaire. Les collagènes sont des protéines structurales particulièrement abondantes, ils représentent en effet un tiers des protéines de l'organisme humain.⁴

III.1.2.2.1.2.1 Structure moléculaire

Une molécule typique de collagène se caractérise par une structure longue, rigide, hélicoïdale à 3 brins, chaînes α polypeptidiques, enroulés en super hélice.

Les collagènes sont caractérisés par la présence d'acides aminés modifiés : l'hydroxyproline et l'hydroxylysine, ainsi que par leur grande richesse en glycine (Gly) et proline (Pro).

Les chaînes α enroulées en triple hélice présentent un résidu Gly tous les trois acides aminés et sont composées en fait de succession de séquences Gly-X-Y où X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé. En réalité, X et Y sont très fréquemment des résidus proline et hydroxyproline respectivement. Cette abondance en résidus Pro et Gly permet la formation et la stabilisation de la triple hélice.⁷

Il existe plusieurs variétés de chaînes α différentes, codées le plus souvent par des gènes différents. Ainsi le collagène de type IV possède six variants de gènes distincts codant les chaînes α .⁴

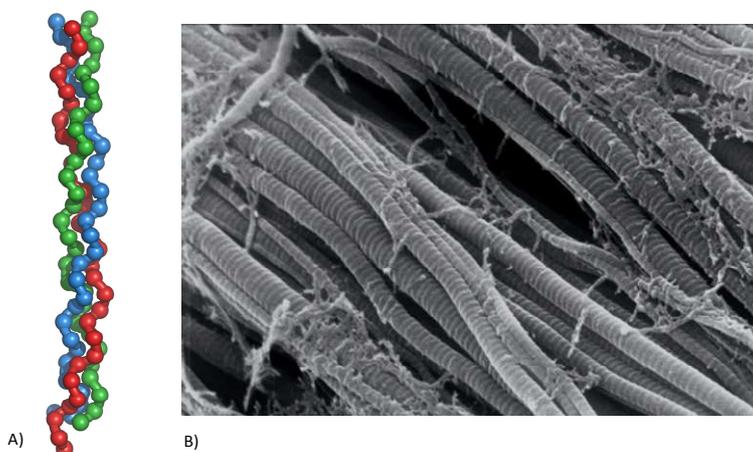


Figure 115 : Structure d'une triple hélice de tropocollagène modélisée à gauche et photographie de fibres de collagène en microscopie électronique à balayage à droite.

La plupart des collagènes portent à leur extrémité C-terminale un domaine non collagénique de type 1, noté NC1, constitué d'une protéine globulaire.

Il existe 21 types de collagènes décrits chez l'Homme de composition et de distribution différentes au sein des tissus et organes. Ces collagènes sont classés en fonction de leur structure primaire et/ou de leur organisation supramoléculaire. Ainsi nous pouvons distinguer les collagènes

fibrillaires (collagène de type I, II, III ...), les collagènes en réseau (collagène de type IV), les collagènes associés aux fibrilles (collagène de type VI) et les collagènes transmembranaires (collagène de type XIII).⁷

Le collagène de type I représente à lui seul environ 70% des collagènes totaux. Il est le composant principal de différents tissus et notamment de la peau. Ce collagène fibrillaire a comme fonction primaire le maintien de la structure des tissus.⁷

Tableau 42 : Caractéristiques de quelques collagènes

Type de collagène	Structure	Localisation	Principales cellules productrices
I	Fibrillaire	Derme, tendon, os, paroi vasculaire etc.	Fibroblastes, kératinocytes, ostéoblastes
II	Fibrillaire	Cartilage, corps vitré de l'œil	Chondrocytes, hyalocytes
III	Fibrillaire	Derme, paroi vasculaire	Cellules musculaires lisses, fibroblastes
IV	Réseau	Lame basale	Cellules endothéliales
V	Fibrillaire	Péricellulaire, muscles, placenta	Cellules musculaires
VI	Associé aux fibrilles	Paroi vasculaire, placenta	Cellules musculaires lisses
VIII	Réseau	Sous endothélium vasculaire	Cellules endothéliales

Plusieurs types cellulaires sont capables de synthétiser des collagènes : les fibroblastes, les chondrocytes du cartilage, les cellules musculaires lisses des parois vasculaires, les cellules endothéliales, les kératinocytes de la cornée et les ostéoblastes.

La formation des fibres de collagène diffère légèrement d'un type de collagène à un autre. Dans le cas général, un précurseur appelé tropocollagène, association de trois chaînes α , est produit par les cellules. Sous l'action d'enzymes spécifiques, comme la lysyloxidase, des liaisons intercaténares vont se former entre des molécules de tropocollagène voisines. Ces différents pontages aboutissent à la formation d'une fibrille de collagène.⁷

III.1.2.2.1.2.2 Modifications physiopathologiques

Les collagènes sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques (cicatrisation entre autres) et pathologiques (scorbut, maladies héréditaires).

Au cours du vieillissement, certains tissus s'enrichissent en fibres de collagène ce qui aboutit à des fibroses et sclérose : artériosclérose en particulier.

III.1.2.2.2 Les glycoprotéines de structure

Les glycoprotéines de structure sont parmi les derniers composants de la matrice extracellulaire à avoir été identifiés du fait de leur difficulté d'isolement et de l'absence de structure spécifique. La première glycoprotéine de structure a été isolée à partir du stroma de la cornée, en 1960, par

Robert : c'est la kératonectine. Ces protéines ne sont pas exclusivement propres à la MEC et sont également présentes à l'intérieur des cellules ainsi qu'à leur surface.⁴

Contrairement aux protéines fibrillaires, les glycoprotéines possèdent des structures très proches. Comme leur nom l'indique, ce sont des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles : diverses glycosylations, en particulier des N-glycosylations.

Les oses qui sont le plus fréquemment retrouvés sont l'acide sialique, le galactose, le mannose, la N-acétylglucosamine. Parfois des résidus fucose ou glucose sont également présents.

Les glycoprotéines de structure les plus décrites sont la fibronectine et la laminine. Mais il en existe d'autres plus récemment découvertes comme la thrombospondine, ou la protéine SPARC (également appelée ostéonectine ou BM-40).⁸

III.1.2.2.3 Les protéoglycannes

Les protéoglycannes, anciennement appelés mucopolysaccharides acides, se distinguent des glycoprotéines par leur forte teneur en polysaccharides ainsi que par la taille importante de leurs substituants polysaccharidiques. Les glucides peuvent représenter jusque 95% en poids de la molécule, qui doit comporter au moins une chaîne glycosaminoglycane (GAG).

Ces molécules sont composées d'une protéine porteuse sur laquelle sont greffés des résidus polysaccharidiques, généralement des GAG.⁴

Les GAG résultent de la polymérisation d'unités répétitives composées d'une molécule d'hexosamine : N-acétylgalactosamine ou N-acétylglucosamine ; et d'une molécule d'acide uronique: acide glucuronique ou acide iduronique. Ces chaînes sont hautement sulfatées et la présence de ces groupements sulfate, ainsi que les fonctions carboxyliques, confèrent aux GAG une forte charge négative dans les milieux physiologiques.

L'acide hyaluronique (non sulfaté), la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate sont les GAG les plus connus.

La protéine porteuse est caractérisée par sa composition particulière : elle est riche en proline, glycine, sérine et thréonine et pour certaines en leucine.⁴

Les chaînes GAG sont fixées sur cette protéine porteuse par O-glycosylation sur un résidu sérine ou thréonine par l'intermédiaire d'un trisaccharide disposé après le dernier résidu acide uronique. Ce trisaccharide est en général une séquence xylose-galactose-galactose.

Plusieurs chaînes GAG de natures différentes peuvent se lier à une même protéine pour former des complexes macromoléculaires en forme "d'écouvillon". Ces unités protéoglycannes se fixent à leur tour sur une chaîne d'acide hyaluronique pour former des pseudopolymères pouvant atteindre de très grandes masses moléculaires.

III.1.2.3 Implication de la MEC en physiopathologie cutanée

La MEC a longtemps été considérée à tort comme un support structural plus ou moins inerte pour les cellules des tissus conjonctifs. Il est en effet apparu au fur et à mesure de l'avancée des connaissances qu'elle intervenait de façon active et complexe dans la régulation de l'activité des cellules qui sont à son contact. Elle influe ainsi sur le développement, la migration, la prolifération, la forme et le métabolisme de ces cellules. Son rôle est également primordial pour le guidage, la différenciation des cellules des tissus conjonctifs et la communication cellules-environnement.

La MEC est le composant le plus abondant du derme. Nous l'avons vu, elle confère au derme sa résistance à l'étirement, son élasticité et sa compressibilité.

Le derme est composé majoritairement de fibres de collagènes de type I (80 %) et III.^{3,9} Le collagène est également très abondant au niveau de la jonction dermo-épidermique où il assure la cohésion de cette jonction. Les fibres d'élastine sont présentes en quantité importante au sein du derme, elles confèrent son élasticité et sa déformabilité à la peau. Ces fibres sont englobées dans une matrice de protéoglycannes et d'acide hyaluronique qui assure la rigidité du derme et un bon coulissage des fibres les unes par rapport aux autres. L'autre rôle de ce gel de protéoglycannes est de constituer la réserve en eau de la peau. En effet les protéoglycannes peuvent capter jusqu'à mille fois leur poids en eau.

La MEC intervient également dans les processus physiologiques de cicatrisation et de régénération cutanée. Lors du processus de vieillissement cutané la MEC subit les modifications les plus importantes. Ces modifications sont en grande partie sous la dépendance d'une classe particulière d'enzymes : les métalloprotéinases matricielle ou MMPs.

III.1.3 Les métalloprotéinases matricielles

Comme nous venons de le voir, le remodelage de la MEC est en partie dépendant de l'activité d'un groupe d'enzymes particulières : les Métalloprotéinases Matricielles (MMPs) appelées également matrixines.

III.1.3.1 Définition

Les métalloprotéinases, enzymes présentes dans de nombreux organismes, sont des endopeptidases présentant un site actif contenant un atome de zinc (Zn). Ces enzymes sont divisées en familles ou classes en fonction de la structure de leur site catalytique entre autres.

Les MMPs appartiennent à la sous-famille des metzincines, métalloprotéinases caractérisées par l'existence d'un motif 3-histidine liant l'atome de zinc et par la conservation d'un coude dû à la

présence d'une méthionine à la périphérie du site actif. Les MMPs sont sécrétées, pour la grande majorité, sous forme d'un précurseur inactif, ou zymogène.^{10,11}

Les MMPs ont comme fonction principale la dégradation des macromolécules de la MEC et de la membrane basale. Leur expression est régulée par l'intermédiaire d'effecteurs plus ou moins spécifiques, comme des hormones, des facteurs de croissance, des cytokines etc. Les inhibiteurs spécifiques de leur activité les plus connus sont les TIMPs: Inhibiteurs Tissulaires des MétalloProtéinases.^{10,11}

Les MMPs existent également dans certaines plantes (*Arabidopsis thaliana*), certains nématodes (*Caenorhabditis elegans*), insectes (*Drosophila melanogaster*) etc.¹²

III.1.3.2 Classification des MMPs

La classification la plus répandue est celle basée sur la structure primaire des MMPs, la spécificité de substrat et la localisation cellulaire. Selon ces critères, les MMPs sont divisées en cinq classes principales : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs liées à la membrane plasmique. Néanmoins certaines MMPs découvertes plus récemment, comme la MMP-12 ou la MMP-19 par exemple, n'entrent dans aucune des ces classes.

III.1.3.2.1 Les collagénases

La classe des collagénases compte trois membres différents : la collagénase interstitielle (MMP-1), la collagénase des polynucléaires neutrophiles (MMP-8) et la collagénase-3 (MMP-13).^{10,11,13}

Ces enzymes, comme leur nom l'indique, dégradent les collagènes fibrillaires interstitiels : collagène de type I, II et III, collagènes prépondérants au niveau de la peau. Il est toutefois important de noter que ces enzymes peuvent également dégrader d'autres macromolécules de la MEC mais également certaines protéines solubles. En revanche, le collagène fibrillaire ne peut être dégradé que par ces seules enzymes.^{10,11}

Les MMP-2 et 14 possèdent également une activité de type collagénase, mais elles sont classées dans un groupe différent, du fait de leur composition en acides aminés et de leur structure.

III.1.3.2.2 Les gélatinases

Les gélatinases A et B, respectivement MMP-2 et MMP-9, dégradent la gélatine, produit protéique issu de la dénaturation du collagène. La gélatine est présente dans la peau, les os, les cartilages, les ligaments, etc.

Les gélatinases peuvent dégrader de nombreuses macromolécules de la MEC, comme les collagènes de type IV, V et XI, l'élastine au sein de la membrane basale, la laminine, ou la protéine centrale de l'agrécane.^{10, 11}

III.1.3.2.3 Les stromélysines

Cette sous-classe regroupe les MMP-3, MMP-10 et MMP-11. Ces enzymes possèdent le même arrangement de domaines que les collagénases, mais sont incapables de dégrader les collagènes interstitiels. Les MMP-3 et MMP-10 sont très proches tant d'un point de vue structural que de leur faible spécificité de substrat. La MMP-11 quant à elle se différencie par une spécificité de substrat plus élevée, en particulier pour les glycoprotéines. En effet, les MMP-3 et 10 dégradent un nombre important de macromolécules de la MEC et interviennent dans l'activation de proMMPs, alors que la MMP-11 au contraire montre une activité protéolytique très faible vis-à-vis de ces mêmes macromolécules.¹⁰

III.1.3.2.4 Les matrilysines

Les matrilysines, MMP-7 et -26, possèdent une structure particulière comme nous le verrons par la suite. La MMP-7 est responsable du clivage de nombreuses macromolécules de la MEC mais également de molécules situées à la surface des cellules, comme la cadhérine E, ou le proTNF α (Tumor Necrosis Factor).¹⁰ La MMP-26 est, quant à elle, exprimée dans certaines cellules normales à l'état basal, comme les cellules de l'endomètre, mais également dans les cellules de certains carcinomes. Cette enzyme digère certaines macromolécules de la MEC et contrairement à la plupart des autres MMPs, elle est stockée de façon importante au niveau intracellulaire.¹⁰

III.1.3.2.5 Les MMPs de type membranaire : MT-MMP

Ce groupe englobe chez les mammifères quatre protéines transmembranaires de type I : MMP-14, MMP-15, MMP-16 et la MMP-24 ; et deux protéines ancrées sur un résidu glycosylphosphatidylinositol : MMP-17 et MMP-25.^{10, 11} Toutes ces MMPs, exception faite de la MT4-MMP (MMP-17), peuvent activer la proMMP-2. La MT1-MMP ou MMP-14 possède quant à elle une activité de type collagénase vis-à-vis des collagènes de type I, II et III.

III.1.3.2.6 Les autres MMPs

Sept autres MMPs n'appartiennent à aucune catégorie citée précédemment. Ces enzymes possèdent des structures et/ou des activités différentes des catégories classiques, bien que les MMP-12, -20 et -27 possèdent une structure similaire à celle des stromélysines.

Dans le tableau ci-après sont regroupées les données générales sur les différentes MMPs.

Tableau 43 : MMPs présentes physiologiquement chez l'Homme ainsi que leurs substrats respectifs.

Enzyme	MMP	Substrats
Collagénases		
Collagénase 1, ou collagénase interstitielle	MMP-1	Collagènes de type I, II, III, VIII et X ; gélatines ; agrécanne ; α_2 -macroglobuline ; proMMP-2 et 9 entactine ...
Collagénase 2, ou collagénase des neutrophiles	MMP-8	Collagènes I, II, III, VII, X ; agrécanne ; gélatine
Collagénase 3	MMP-13	Collagènes I, II et III ; agrécanne ; gélatines
Gélatinases		
Gélatinase A	MMP-2	Gélatines ; collagènes de type I, IV, V, VII, X, XI ; fibronectine ; laminine ; agrécanne ; élastine ...
Gélatinase B	MMP-9	Gélatines ; collagènes de type III, IV, V, XIV ; agrécanne ; proMMP-9 ; élastine ; entactine
Stromélysines		
Stromélysine 1	MMP-3	Protéoglycannes ; gélatines ; fibronectine ; laminine ; collagènes de type III, IV, V, IX, X ; proMMP-9, 8 et 13
Stromélysine 2	MMP-10	Protéoglycannes ; gélatines ; fibronectine ; laminine ; collagènes de type III, IV, V
Stromélysine 3	MMP-11	Fibronectine ; laminine ; gélatine ; agrécanne ; α_2 -macroglobuline
Matrilysines		
Matrilysine 1	MMP-7	Protéoglycannes ; gélatines ; fibronectine ; laminine ; collagène de type II, III, IV, IX, X, XI ; élastine ; proMMP-1, 7, 8 et 9
Matrilysine 2	MMP-26	Fibronectine ; collagène de type IV ; gélatines
MMP de type membranaire		
<i>Transmembranaire</i>		
MT1-MMP	MMP-14	Laminine ; dermatane sulfate ; collagènes de type I, II, III ; fibronectine ; proMMP-2
MT2-MMP	MMP-15	proMMP-2 ; gélatine ; fibronectine ; laminine
MT3-MMP	MMP-16	proMMP-2
MT5-MMP	MMP-24	proMMP-2
<i>Ancrée sur phosphatidylinositol</i>		
MT4-MMP	MMP-17	Inconnu
MT6-MMP	MMP-25	Gélatines
Autres MMPs		
Élastase des macrophages	MMP-12	Élastine
RASI-1	MMP-19	Macromolécules de la membrane basale
Énamélysine	MMP-20	Amélogénine et autres protéines de la même famille
	MMP-21	Gélatines
CA-MMP	MMP-23	Inconnu
	MMP-27	Gélatines ; caséine
Épilyisine	MMP-28	Inconnu

III.1.3.3 Structure générale des MMPs

Comme nous l'avons mentionné dans la définition, les MMPs sont classées dans les métalloprotéases à zinc.

Une molécule typique de MMP est composée de quatre domaines distincts, qui sont : un pro-peptide N-terminal de 80 résidus acides aminés, le domaine catalytique métalloprotéinase d'environ 170 acides aminés, un peptide de liaison ou région charnière riche en proline et de longueur variable, et enfin un domaine hémapexine à l'extrémité C-terminale d'environ 200 acides aminés.^{10, 12, 13}

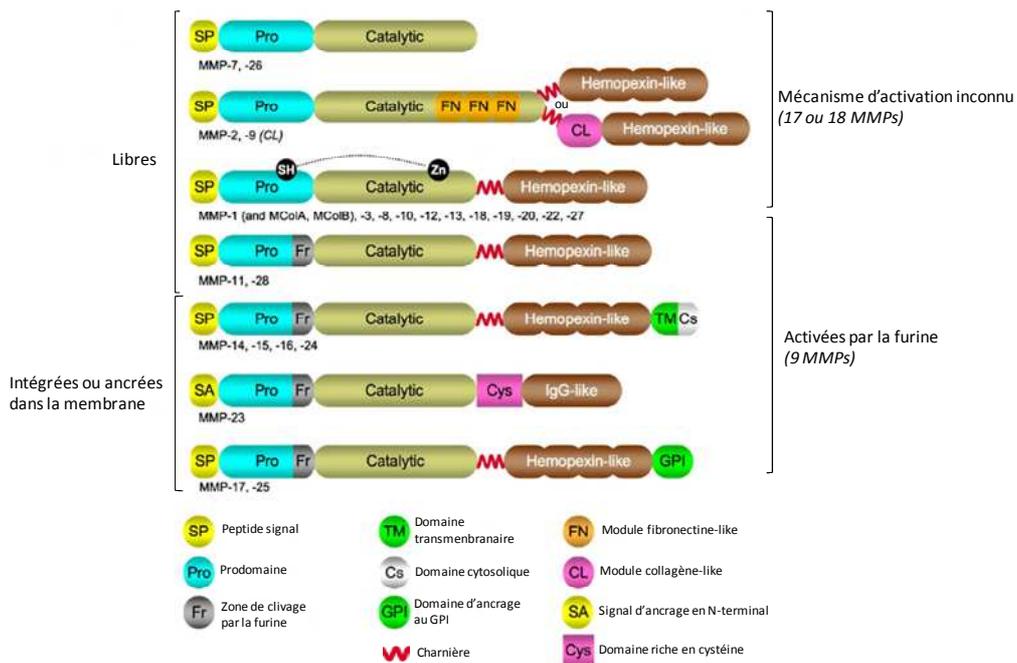


Figure 116 : Structures générales des MMPs.

Les MMP-2 et -9 possèdent trois répétitions d'un module fibronectine de type II dans le domaine catalytique. Ces motifs permettent la liaison à la gélatine.

Les MT-MMPs présentent un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique, pour les MT-MMPs transmembranaires, ou un domaine d'ancrage à une molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour les autres.¹⁰

Le site catalytique est de même structure pour toutes les MMPs. Il existe un motif commun liant le zinc présentant de façon constante trois résidus histidine de séquence générale HEXXHXXGXXH, ainsi qu'un motif appelé "cystein-switch" de séquence PRGXPD dans le propeptide. Ces deux motifs constituent les signatures structurales d'une MMP.¹²

L'atome de zinc (Zn^{2+}) se coordine au niveau du site actif, avec les trois résidus histidine cités précédemment ainsi qu'avec le résidu cystéine (Cys) du motif "cystein-switch". Cette liaison de coordination Cys- Zn^{2+} maintient les MMPs sous leur forme zymogène ou proMMP, en empêchant la

liaison d'une molécule d'eau à l'atome de zinc, cette liaison étant indispensable à l'activité catalytique.^{10, 14}

Le domaine catalytique contient également un résidu méthionine formant un coude ou "Met-turn" huit acides aminés après le motif assurant la liaison à l'atome de Zn. Ce "Met-turn" forme une base de soutien de la structure autour de l'atome de zinc.

Également, la présence au sein de ce domaine catalytique d'un autre atome de zinc, non catalytique, et de deux ou trois atomes de calcium a été démontrée. Ces atomes ont un rôle structural dans le maintien de la conformation des MMPs.¹⁴

III.1.3.4 Mécanismes d'activation des proMMPs

Les MMPs sont synthétisées sous forme zymogène dépourvues d'activité catalytique. Ces proenzymes sont activées *in vivo* par des protéases. Durant l'activation, le pro-domaine en N-terminal est clivé, rompant ainsi la liaison Cys-Zn²⁺ qui maintenait la MMP sous sa forme latente.¹⁴

L'activation des proMMPs est une étape prépondérante de la régulation de l'activité catalytique des MMPs.

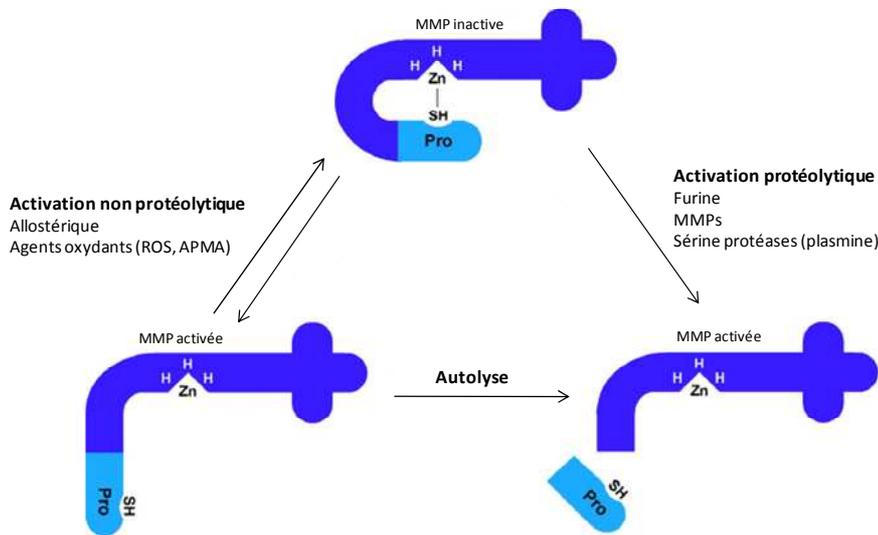


Figure 117: Schématisation des différents mécanismes d'activation des MMPs.

De nombreux mécanismes différents aboutissent à l'activation de ces proMMPs *in vivo*, et tous ne sont pas encore élucidés. Néanmoins six mécanismes sont connus *in vitro* à l'heure actuelle : activation *via* le "cystein switch" ; activation allostérique ; activation par des MMPs ; activation par la furine ; activation par la plasmine et autres sérine protéases et enfin le contrôle oxydatif.¹⁴

III.1.3.4.1 Le "cystein switch"

Comme nous l'avons déjà mentionné, les proMMPs sont maintenues dans leur conformation inactive *via* l'interaction entre le groupement thiol du résidu cystéine contenu dans le prodomaine, et l'ion Zn^{2+} responsable de l'activité catalytique. Pour qu'une MMP devienne active cette interaction doit être rompue. Cette rupture est une étape indispensable et fondamentale pour l'activation de toutes les MMPs et est appelée "cystein switch" ou interrupteur cystéine.¹⁴

L'interaction thiol- Zn^{2+} peut être rompue pour l'essentiel selon trois mécanismes : le clivage direct par une autre protéinase ; l'oxydation du groupement thiol par des oxydants ou des réactifs non physiologiques comme les métaux lourds (organomercurique comme l'APMA) ou des agents alkylant ; ou enfin par des modifications allostériques du zymogène. L'oxydation de la fonction thiol, ainsi que les réarrangements allostériques sont généralement suivis d'une étape de clivage autolytique du prodomaine.

Il est toutefois important de noter que dans ce phénomène de "cystein switch", le prodomaine n'est pas nécessairement clivé pour que le zymogène devienne actif, seule la rupture de l'interaction thiol- Zn^{2+} est indispensable.¹⁴

III.1.3.4.2 Activation allostérique

Les proMMPs peuvent interagir avec des macromolécules qui ne sont pas leurs substrats, ou encore subir des modifications post-traductionnelles. Ces phénomènes engendrent alors des modifications conformationnelles des proMMPs, favorisant leur passage à l'état activé.

Cette rupture allostérique de la liaison thiol- Zn^{2+} constitue un état de transition "activé", qui permet le clivage autolytique du prodomaine.^{14, 15}

III.1.3.4.3 Activation par la furine

Comme pour la plupart des pro-protéines, la protéolyse directe est considérée comme la principale voie d'activation des MMPs, et comme l'étape ultime du mécanisme d'activation des proMMPs *in vivo*.

Environ un tiers des MMPs, dont toutes les MT-MMPs, possèdent une séquence RXKR entre le prodomaine et le domaine catalytique. Ces séquences constituent un site de reconnaissance pour les pro-protéines convertases ou furines.

La furine est une sérine-protéase présente au niveau du réseau trans-golgien. Les MMPs possédant un site de clivage par la furine, sont donc activées au niveau intracellulaire puis sécrétées sous forme active.¹⁴

Le mécanisme d'activation *in vivo* de la plupart des MMPs non clivées par la furine est plus présumé que prouvé à l'heure actuelle, et ce bien que d'autres mécanismes soient déjà bien connus *in vitro*.

III.1.3.4.4 Activation des proMMPs par les MMPs

In vitro, de nombreuses MMPs sous forme active sont capables de cliver le prodomaine d'autres proMMPs et ainsi de conduire à leur activation. Il fut alors suggéré que ces MMPs permettaient la protéolyse finale, *i.e.* la coupure du prodomaine, conduisant à l'acquisition de l'activité catalytique. Le clivage initial, c'est-à-dire la rupture de la liaison Cys-Zn²⁺, pouvant quant à lui être sous l'influence d'une sérine-protéase ou d'une MMP. Mais ces données sont à prendre avec beaucoup de précautions : l'existence de ce mécanisme d'activation est très controversée *in vivo*.¹⁴

III.1.3.4.5 Activation par la plasmine et autres sérines protéases

De nombreuses études ont émis l'hypothèse que les sérine-protéases, en particulier la plasmine, seraient les véritables activateurs *in vivo* des proMMPs, y compris de celles possédant un site de reconnaissance pour la furine.

Le rôle de la plasmine dans l'activation des MMPs est largement accepté même si les preuves de ce mécanisme *in vivo* demeurent indirectes.¹⁴

III.1.3.4.6 Contrôle oxydatif de l'activité des MMPs

Les oxydants naturels produits par les leucocytes ou d'autres types cellulaires peuvent favoriser l'activation des proMMPs, en oxydant la fonction thiol du prodomaine et en entraînant le clivage autolytique. Egalement, ces agents oxydants peuvent conduire à l'inactivation des MMPs en modifiant certains acides aminés critiques pour l'activité catalytique. Les oxydants peuvent ainsi permettre le contrôle d'une éventuelle explosion de l'activité protéolytique.

In vitro, de nombreuses proMMPs peuvent être activées par des espèces réactives de l'oxygène, ou ROS, qui modifient l'état du groupement thiol et permettent le clivage autolytique. Par exemple, l'acide hypochloreux ou certains radicaux hydroxyles sont capables d'activer les proMMP-1, -7 et -9. Néanmoins, le rôle d'activateur *in vivo* de ces espèces oxydantes n'a pas encore été démontré.¹⁴

III.1.3.5 Les inhibiteurs endogènes des MMPs

In vivo, l'activité des MMPs est contrôlée par deux grands types d'inhibiteurs endogènes : l' α_2 -macroglobuline et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles ou TIMPs.

Plusieurs autres protéines ont été décrites comme des inhibiteurs de certaines MMPs. C'est le cas par exemple de la protéine précurseur du β -amyloïde sous sa forme sécrétée qui inhibe la MMP-2, ou de la protéine RECK, une glycoprotéine ancrée sur un glycosylinoitol, qui inhibe les MMP-2, -14 et -9. Néanmoins, le mécanisme d'action de ces protéines reste totalement inconnu.

III.1.3.5.1 L' α_2 -macroglobuline

L' α_2 -macroglobuline humaine est une glycoprotéine plasmatique de 725 kDa. Cette protéine est constituée de quatre sous-unités de 180 kDa chacune. Elle inhibe l'activité de la plupart des protéinases en les piégeant au sein de ses quatre sous-unités. Le complexe formé est ensuite rapidement éliminé par fixation sur le récepteur LDL-RP (Low Density Lipoprotein Related Protein), puis endocytose et enfin dégradation.¹⁰

L'activité des MMPs est régulée dans les fluides en priorité par l' α_2 -macroglobuline ou des protéines de proche parenté.^{10, 12}

III.1.3.5.2 Les TIMPs

Quatre inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (TIMP) sont connus à l'heure actuelle. Ce sont des assemblages de 184 à 194 acides aminés environ possédant des caractéristiques structurales communes.^{10, 12}

Ainsi, la partie constante des TIMPs présente douze résidus cystéine formant six ponts disulfure. Le domaine N-terminal de tous les TIMPs, porteur de l'activité inhibitrice, contient une séquence consensus : VIRAK.^{11, 12}

Les TIMPs inhibent toutes les MMPs, toutefois le TIMP-1 n'exerce qu'une faible activité vis-à-vis de la MT1-MMP (MMP-14), la MT3-MMP, la MT5-MMP et la MMP-19. Certains TIMPs présentent également une activité inhibitrice vis-à-vis d'autres enzymes comme les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase), qui sont également des métalloprotéinases.^{10, 12}

Les TIMPs interagissent avec la partie constante des MMPs, mais il existe également des interactions avec d'autres séquences notamment lors de l'inactivation des MMP-2 et -9. La complexation entre les TIMPs et les MMPs se fait via des liaisons non covalentes. Ainsi par dissociation le TIMP et l'enzyme intacte sont libérés.¹⁰

Les mécanismes d'interaction entre les TIMPs et les MMPs sont complexes et pour la plupart encore inconnus. Un mécanisme bien décrit est celui de l'inhibition de la MMP-9 par le TIMP-1. Le TIMP-1 interagit avec la proMMP-9 pour former un complexe bimoléculaire. Différentes études ont montré que la séquence GCEEC située entre les deux ponts disulfure en N-terminal du TIMP-1 était indispensable à cette interaction. Le complexe TIMP-1/proMMP-9 formé peut à son tour inhiber

l'activité d'autres MMPs et ce par formation d'un complexe trimoléculaire plus stable : proMMP-9 / TIMP-1 / MMP.^{10, 11}

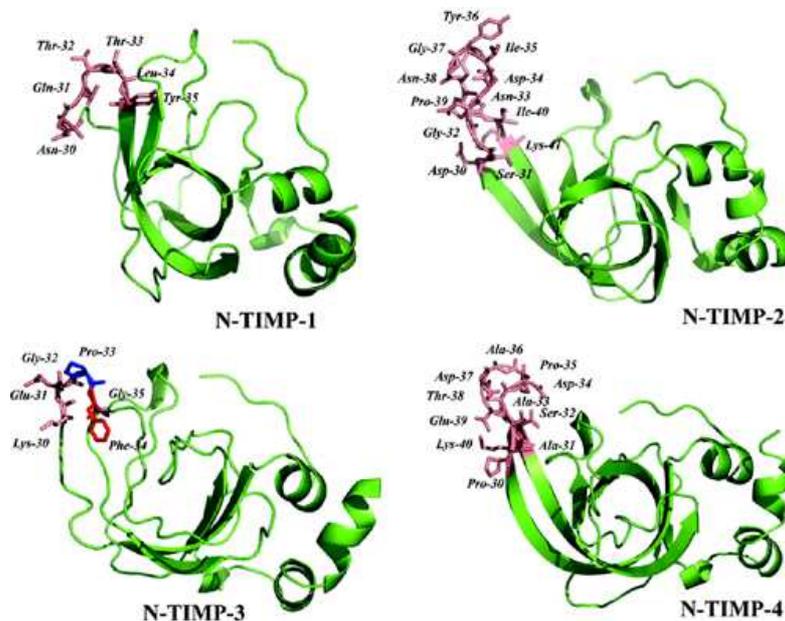


Figure 118 : Structures modélisées des différents TIMPs.¹⁶

Chaque TIMP possède des caractéristiques qui lui sont propres. Par exemple, les TIMP-1 et -2 existent sous forme soluble, alors que le TIMP-3 lui est insoluble et n'est rencontré que lié à la MEC. De même, la synthèse du TIMP-1 est sous l'influence de nombreux stimuli comme des facteurs de croissance ou des cytokines, alors que le TIMP-2 est présente de manière constitutive dans l'organisme.^{10, 16}

Le TIMP-2 possède une activité activatrice de la proMMP-2, cette activité n'est pas retrouvée chez le TIMP-1.

III.1.3.6 Implication des MMPs en physiopathologie cutanée

Les MMPs sont impliquées dans différentes fonctions physiologiques, comme l'embryogenèse, la croissance osseuse ou encore la cicatrisation. Mais ces enzymes interviennent également dans de nombreux processus pathologiques touchant des sphères vitales de l'organisme, comme le système cardiovasculaire, le système respiratoire ou encore la peau.

Au niveau du tissu cutané, les MMPs sont bien connues pour intervenir dans de nombreux processus physiologiques, comme l'angiogenèse, la morphogénèse, la réparation tissulaire etc.^{9, 10}

La réparation tissulaire consécutive à une plaie fait intervenir différentes MMPs. En particulier, la MMP-3 intervient dans le remodelage du derme pendant l'élimination du tissu granuleux et cicatriciel. Les collagénases quant à elles facilitent la migration des kératinocytes en détruisant le collagène.

Les MMPs interviennent également dans de nombreuses pathologies touchant la peau tels les processus inflammatoires, les pathologies bulleuses auto-immunes, la sclérodermie ou encore les cancers de la peau (mélanome, carcinome).¹⁰

Dans un registre de gravité différent, les MMPs sont également fortement impliquées dans les phénomènes moléculaires régissant le vieillissement cutané, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

III.1.4 Le vieillissement cutané : mécanisme et acteurs

Le vieillissement cutané, ou plutôt les vieillissements, font l'objet de nombreuses études de par le monde pour tenter de comprendre les mécanismes moléculaires régissant ces phénomènes ou encore les éléments déclencheurs. Si le vieillissement en lui-même n'est pas une pathologie, certains mécanismes générés durant ce processus peuvent conduire à certaines pathologies très graves telles que les cancers de la peau.

III.1.4.1 Définition

Deux types de vieillissement cutané sont classiquement distingués : le vieillissement intrinsèque et le vieillissement extrinsèque. Ces deux types ont des causes et des mécanismes très différents, et leur impact sur la peau diffère également.

III.1.4.1.1 Le vieillissement intrinsèque

Il s'agit du vieillissement normal, physiologique, de la peau déterminé majoritairement par le génome. Le vieillissement intrinsèque est un processus inévitable, lent, progressif, spontané et cumulatif touchant principalement les fibres élastiques.

Ce processus n'apporte que peu de modification au niveau histologique : le peau demeure lisse à l'exception de rides d'expression plus profondes apparaissant tardivement.^{3,17}

Le derme et l'épiderme sont amincis dans la peau âgée. En particulier, la MEC présente au niveau du derme subit des modifications importantes entraînant de plus un aplanissement de la jonction dermo-épidermique. Ces modifications sont la conséquence de différents facteurs :

- une diminution de la capacité proliférative des cellules de la peau ;
- une augmentation du taux de MMPs présentes dans la peau : dégradation accélérée des protéines fibrillaires ;
- une diminution de la synthèse de la MEC au niveau du derme.³

La diminution de la capacité de prolifération des cellules de sujets âgés a été largement constatée dans de nombreuses études. Ce phénomène, appelé sénescence cellulaire, se traduit par

une diminution du nombre de divisions cellulaires possible au cours de la vie de la cellule. Cette sénescence conduit à un temps de renouvellement des cellules allongé mais également à un délai de cicatrisation plus élevé que chez les sujets jeunes.

Les cellules sénescents demeurent bloquées en phase G1 du cycle cellulaire et n'entre donc plus dans la phase S, phase de mitose (division cellulaire). Ce phénomène peut être expliqué en partie par la répression sélective de certains gènes intervenant dans la régulation de la croissance cellulaire. Nous pouvons citer pour les fibroblastes, cellules à l'origine des kératinocytes, le proto-oncogène *c-Fos* par exemple. En plus de ces phénomènes, une élévation de taux de facteurs de régulation négative du cycle cellulaire a été également constatée.^{3,17}

Parallèlement à ce blocage de la croissance cellulaire, les cellules sénescents développent une résistance aux mécanismes de mort cellulaire par apoptose et montrent de plus une altération de la fonction de différenciation. L'ensemble de ces phénomènes aboutirait ainsi à l'accumulation de cellules non-divisées présentant un génome altéré avec le phénotype associé. Ces processus sont une explication proposée à la perte de l'intégrité et de la fonction des tissus.¹⁷

L'élévation du taux de MMPs et de leur activité au sein de la peau contribue très largement à la diminution constatée des fibres de collagènes de type I essentiellement, ainsi qu'à la désorganisation des fibres de collagène encore présentes. Les cascades protéolytiques mises en jeu seront discutées plus tard dans le manuscrit.^{3,17}

Une théorie alternative à la sénescence des cellules serait l'intervention du stress oxydatif dans le vieillissement intrinsèque. Si le stress oxydant joue un rôle très important dans le vieillissement extrinsèque, son impact dans le processus de vieillissement intrinsèque reste sujet à polémique.¹⁷

III.1.4.1.2 Le vieillissement extrinsèque

Le vieillissement extrinsèque est directement causé par l'exposition à des facteurs environnementaux dommageables, tels que le tabac, le stress, la consommation excessive d'alcool et l'exposition solaire. Ce vieillissement est un vieillissement prématuré de la peau par rapport au vieillissement physiologique normal.

L'exposition solaire, et donc aux rayonnements UV, est de loin la première cause de vieillissement extrinsèque de la peau. Ainsi, près de 80 % des signes de vieillissement de la peau seraient dus exclusivement à des mécanismes photoinduits.^{2,3}

D'un point de vue clinique, le vieillissement photoinduit se traduit par une augmentation de l'irrégularité de la texture de la peau, une pigmentation irrégulière et l'apparition de rides plus nombreuses et plus profondes. Ces signes cliniques sont le reflet de profonds dommages causés par l'exposition aux UV à l'épiderme et au derme, en particulier à la MEC contenue dans ces tissus.

L'exposition aux UV va engendrer une augmentation de la production de certaines MMPs : la collagénase (MMP-1), les gélatinases (MMP-2 et-9) et de la stromélysine1 (MMP-3). Ces MMPs vont être responsables des modifications subies par la MEC.^{3,17}

Après exposition aux UV une accumulation de structure amorphe d'élastine est constatée, phénomène appelé "élastose solaire". Ces structures résultent de la désorganisation des fibres d'élastine, conséquence directe de la dégradation des fibres existantes et de la dérégulation de la production d'élastine et de fibriline. La réponse inflammatoire générée par l'exposition aux rayonnements UV, va entraîner une infiltration importante de polynucléaires neutrophiles. Ces polynucléaires vont alors produire de façon abondante une enzyme capable de digérer l'élastine : l'élastase leucocytaire ou HLE (Human Leucocyte Elastase). L'augmentation de l'activité de l'HLE, couplée à une activité accrue de la MMP-9, contribue à la dégradation des fibres d'élastine existantes.^{3,17}

L'impact sur les fibres de collagènes est différent : il y a une régulation négative de la production de collagène, qui peut diminuer de plus de 30 % dans certains cas. Les MMPs sont là encore les médiateurs clés de cette diminution des fibres de collagène.

L'exposition aux UV est également responsable d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les ROS sont des radicaux oxygénés qui vont être responsables de dommages sur l'ADN des cellules. Le stress oxydant induit contribue lui aussi aux modifications de la MEC.³

III.1.4.2 Cascades protéolytiques mises en jeu

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le vieillissement extrinsèque de la peau, le seul contre lequel la lutte est possible sans intervention au niveau du génome, sont résumés dans la Figure 119.

Deux étapes majeures peuvent être distinguées : la génération de ROS par l'exposition aux UV ou à d'autres stimuli, suivie de l'entrée en scène des MMPs.

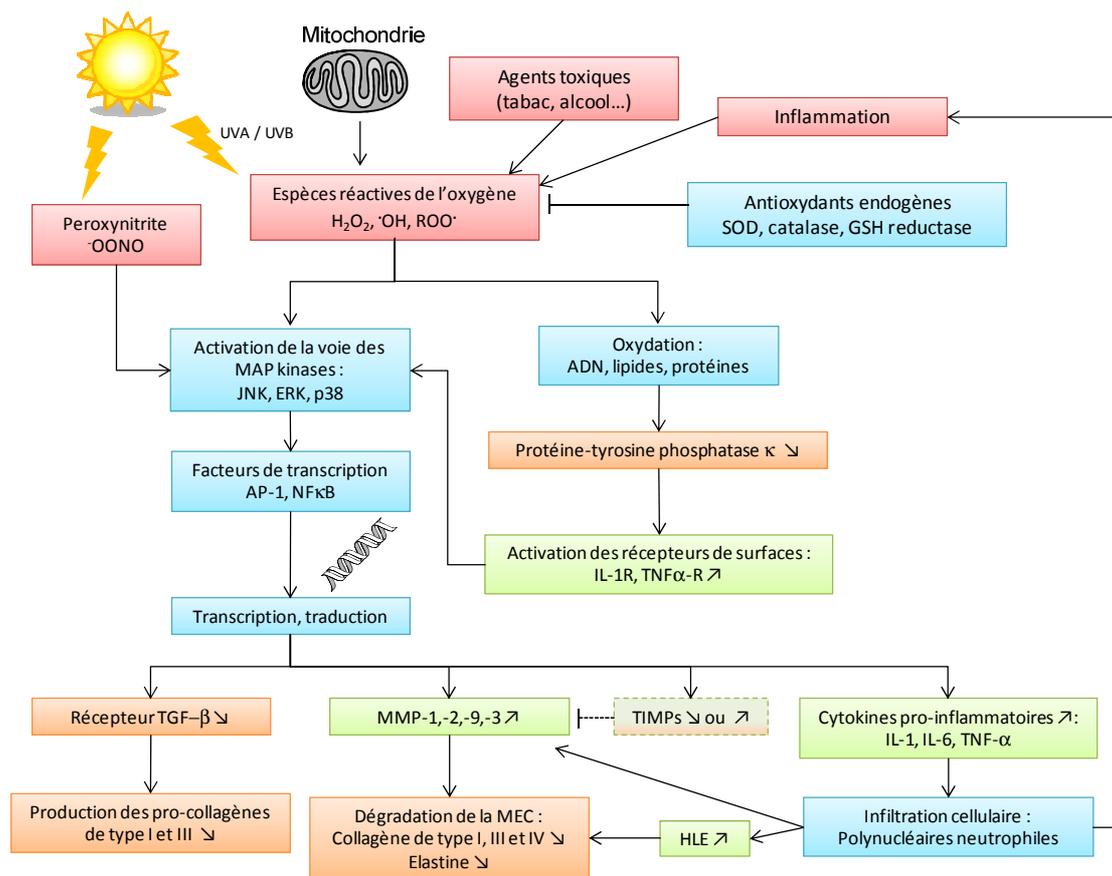


Figure 119 : Résumé des différentes voies mises en jeu lors du vieillissement extrinsèque de la peau.

III.1.4.2.1 Rôles des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites de façon physiologique par le métabolisme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce sont des espèces radicalaires particulièrement instables et toxiques, telles que l'oxygène singulet ou l'anion superoxyde.^{2,9} Cette production endogène basale est très faible en intensité et peut être très facilement contrôlée par les antioxydants physiologique, telle que l'enzyme SuperOxyde Dismutase (SOD).

L'exposition aux UV en général, et aux UVA en particulier, entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène en quantité beaucoup plus importante.

Les UVA peuvent pénétrer dans la peau jusqu'au niveau du derme, et vont donc être responsables des dommages causés par les ROS à ce niveau. Les altérations les plus importantes causées par les ROS touchent l'ADN, mais également les lipides membranaires ainsi que les protéines qui subissent alors des réactions de peroxydation.^{2,9}

Les ROS produits par les UVA vont également activer la voie de signalisation des MAP kinases (Mitogen Activated Protein), qui va stimuler à terme la production de certaines MMPs.

Les produits de peroxydation des lipides et protéines vont entraîner l'inhibition de la protéine-tyrosine phosphatase κ. Cette enzyme est responsable du maintien sous forme inactive de certains

récepteurs cellulaires. L'inhibition de cette phosphatase conjointement à l'activation directe des MAP kinases vont contribuer à l'activation de certains récepteurs situés à la surface de types cellulaires particuliers : récepteur pour l'EGF (Epidermal Growth Factor), récepteur du KGF (Keratinocyte Growth Factor), récepteur pour l'interleukine 1 (IL-1) ou encore le récepteur pour le TNF- α (Tumor Necrosis Factor).⁹

L'activation de ces récepteurs contribue à l'activation de voies de signalisation complexes appartenant aux MAP kinases comme la voie ERK, JNK ou p38 entre autres.

L'activation des différentes voies des MAP kinases a pour effet l'activation de la production de certains facteurs de transcription : NF κ B, c-Jun et c-Fos. Ces deux dernières protéines fusionnent pour former le complexe nucléaire de transcription AP-1 (Activator Protein), qui va stimuler la production de certaines MMPs.⁹ L'augmentation du taux d'AP-1 va également contribuer indirectement à la diminution de la production des pro-collagènes I et III par inhibition des récepteurs au TGF- β de type II.

Le facteur NF κ B va stimuler l'expression de certaines MMPS, ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoire, comme IL-1 ou IL-6. Ces cytokines vont entraîner alors l'infiltration de cellules inflammatoires, en majorité des polynucléaires neutrophiles. Ces derniers vont contribuer activement à la dégradation des fibres d'élastine *via* la production d'HLE.

L'exposition aux UV va également stimuler les mécanismes de protection endogène : mécanismes antioxydants physiologiques, TIMPs. Les TIMPs sont les inhibiteurs physiologiques des MMPs. L'effet des rayonnements UV sur les TIMPs demeure controversé : s'il existe *in vitro* une forte inhibition de la production des TIMP-1 et -2 lors d'une exposition des cellules aux UV, *in vivo* une augmentation du TIMP-1 a été constatée à plusieurs reprises. Dans tous les cas, l'augmentation constatée reste très minoritaire par rapport à la stimulation des MMPs induite par ce même rayonnement.^{2,3,9}

Les MMPs sont donc les enzymes clés responsables de la dégradation de la MEC lors des phénomènes de vieillissement. Nous allons maintenant voir plus en détail leur rôle dans le vieillissement de la peau.

III.1.4.2.2 Rôles des MMPs

Comme nous l'avons déjà évoqué, les MMPs sont les principaux acteurs du vieillissement cutané intrinsèque et extrinsèque.

L'activation de la voie des MAP kinases conduit *via* les mécanismes précédemment décrits à la production de certaines MMPs. Les quatre MMPs les plus abondamment produites sont la MMP-1, MMP-9, MMP-3 et MMP-8.

L'infiltration des polynucléaires neutrophiles contribue également à une augmentation du taux de MMPs dans le milieu extracellulaire. En effet, les MMPs sont présentes dans les polynucléaires neutrophiles stockées sous forme active dans des granules de sécrétion.

Les fibres de collagènes de la MEC dermique vont dans un premier temps être dégradées par la MMP-1. La MMP-1 est en effet une des seules enzymes capables de cliver les brins de collagène natifs, *i.e.* en triple hélice. La MMP-1 va ainsi ouvrir la triple hélice pour former des brins de collagène dénaturés. Ces brins dénaturés peuvent ensuite être clivés par la MMP-1 mais également par les MMP-3 et -9.^{3,17} Les fibres d'élastine vont pouvoir être dégradées par les MMP-9 et -3 également, en plus de la HLE.

Les principales enzymes responsables de la fragmentation de la MEC lors du vieillissement de la peau sont donc les MMP-1, -2, -9, -3 et l'HLE. Ces enzymes constituent ainsi des cibles potentielles pour la recherche d'un agent anti-âge.

La majorité des enzymes précédemment citées sont impliquées dans la même cascade protéolytique d'activation mettant en jeu la plasmine. Cette cascade joue un rôle prépondérant dans les phénomènes de vieillissement et constitue ainsi la cible principale de nos futurs tests biologiques.

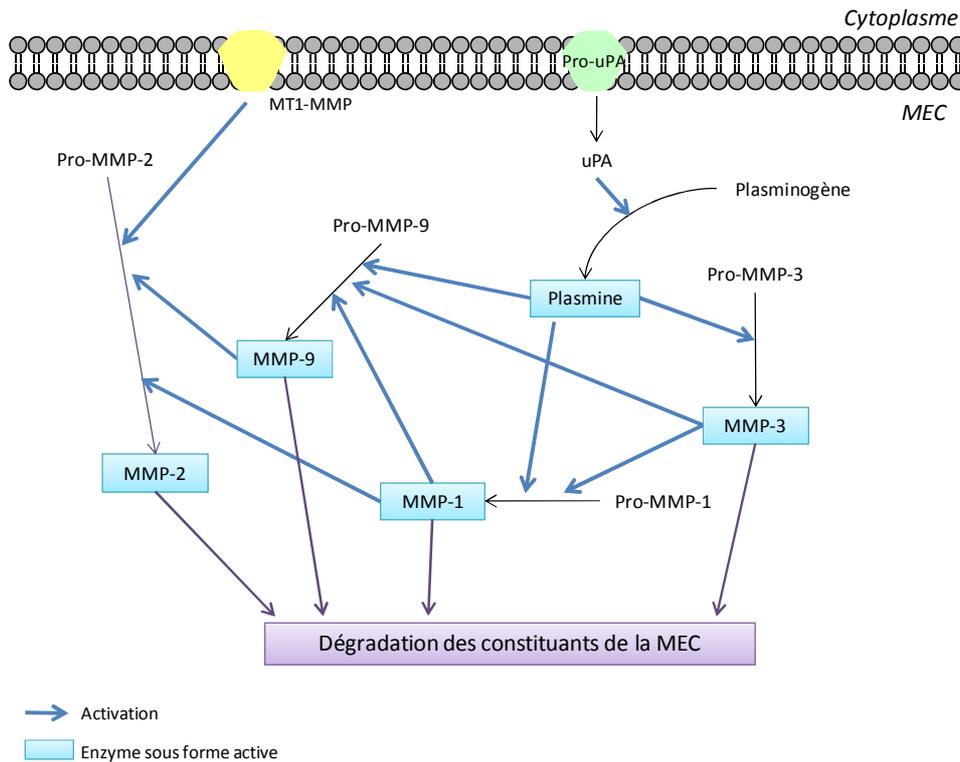


Figure 120 : Cascade protéolytique d'activation par la plasmine, la MMP-1 et la MMP-3.

La première étape est la conversion du plasminogène inactif en plasmine par l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA).

La plasmine est une sérine-protéase intervenant dans divers processus biologiques comme l'hémostase, plus particulièrement dans la lyse des caillots de fibrine, ou encore la dégradation de la MEC, comme cela est représenté Figure 120. La plasmine est ainsi située tout en début de cascade protéolytique conduisant à l'activation des MMP-3, -1, -9 et -2, fortement impliquées dans la dégradation des constituants de la MEC au cours du vieillissement.

La MMP-3 joue également un rôle clé puisqu'elle stimule l'activation de la quasi-totalité des autres MMPs impliquées dans cette cascade.

III.1.4.3 Moyen de lutte contre le vieillissement cutané

Les rayons cosmétiques des commerces débordent de produits portant des allégations anti-âge. Les différents facteurs impliqués dans les phénomènes de vieillissement cutané étant connus, il devient concevable d'imaginer différentes stratégies de lutte contre ce phénomène.³

La meilleure option est encore la prévention du déclenchement des mécanismes de vieillissement avec en premier lieu une limitation de l'exposition solaire ou tout du moins une exposition raisonnée respectant les différentes consignes données par les dermatologues : pas d'exposition entre 12 et 16h, utilisation d'une protection solaire avec un indice adapté, port de chapeau, lunettes de soleil...³

Néanmoins, la peau même non exposée vieillit selon les mêmes processus moléculaires, mais à une vitesse moindre. Il existe de fait deux stratégies complémentaires pour retarder l'apparition des signes cliniques de vieillissement cutané : la lutte contre les ROS *via* l'utilisation d'antioxydants, et l'inhibition des enzymes responsables de la dégradation de la MEC.³

III.1.4.3.1 Utilisation d'antioxydants

Les antioxydants sont des molécules qui ont comme propriété de s'oxyder très facilement pour capter les radicaux présents dans le milieu (antioxydant dit primaire) ou bien d'assurer la régénération des molécules et enzymes capables de capter ces radicaux (antioxydant dit secondaire).

Certains antioxydants sont présents physiologiquement comme la SuperOxyde Dismutase (SOD), la glutathion réductase (GSH réductase) etc. D'autres sont apportés par notre alimentation : vitamines E et C en particulier.¹⁸

De nombreuses préparations cosmétiques contiennent des agents antioxydants. Même si la pénétration de ces actifs ne leur permet pas d'accéder au derme, ils peuvent néanmoins bloquer les radicaux formés au niveau de l'épiderme. En revanche, de nombreuses études ont démontré l'intérêt d'une alimentation riche en antioxydants dans la prévention de pathologies dégénératives ou le

vieillessement. Ainsi la recherche de nouveaux antioxydants est un domaine particulièrement actif actuellement.^{3, 18}

Récemment, il a été rapporté des activités antioxydantes intéressantes de certains hydrolysats peptidiques végétaux.^{19, 20} En particulier, cette activité a été retrouvée dans un hydrolysate de concentré d'EFL, obtenu par digestion enzymatique avec une alcalase.²¹

Les extraits de luzerne que nous avons à notre disposition seront donc testés pour évaluer leur potentiel antioxydant.

III.1.4.3.2 Inhibition des enzymes responsables de la dégradation de la MEC

L'inhibition des enzymes responsables de la dégradation des fibres de collagène et d'élastine est une stratégie semblant plus que prometteuse. En prévenant la dégradation de la MEC, la peau montrerait moins de signes cliniques de vieillissement.

Les MMPs ont une spécificité de substrat propre à la famille enzymatique. Les MMPs clivent une liaison peptidique située avant un résidu, appelé résidu P₁' , portant une chaîne alkyle comme la Leu, Ile ...¹² Les résidus de type hydrophobes entrent parfaitement dans la poche S₁' du site catalytique des MMPs. Ces caractéristiques sont communes à la quasi-totalité des MMPs, l'analogie de séquence et donc de structure avec le site catalytique de la MMP-1 étant un des critères permettant de classer les métalloprotéases dans la classe des MMPs.

Il existe également des sous-sites qui vont participer de façon très active à la spécificité de substrat tel que le résidu Pro souvent retrouvé en P₃, c'est-à-dire 3 acides aminés avant la liaison peptidique clivée.

L'activité enzymatique des MMPs peut être modulée par différentes classes de molécules endogènes (TIMPs, matrikines...) mais également synthétiques.

Certains inhibiteurs de MMPs ont été testés en clinique sur des pathologies cancéreuses, mais tous ces essais se sont soldés par des échecs. Les inhibiteurs sont spécifiques des MMPs, mais la spécificité entre les différentes MMPs est difficile à obtenir. De plus, les MMPs vont montrer une efficacité dans les premiers stades de la maladie, en préventif, plutôt que pour le traitement de pathologies déjà avancées. Parmi ces inhibiteurs nous pouvons citer des inhibiteurs porteurs de groupements hydroxycinnamate, tétracycline, thiol, barbiturique ou phosphinate qui sont pour les 3 derniers des analogues de l'état de transition des MMPs.

Il existe peu de données sur les inhibiteurs de MMPs, ou d'HLE et de plasmine utilisés en cosmétique. De telles molécules existent, par exemple certains glycolipides issus de l'huile de gluten de blé ont montré une activité importante dans la prévention du vieillissement par inhibition de certaines MMPs, en particulier de la MMP-1.²² D'autres extraits végétaux ont également montré un

potentiel intéressant en tant qu'inhibiteur de MMPs et d'HLE pour une utilisation en dermocosmétique.²³

Il existe une classe de molécules endogènes capables de réguler l'activité des MMPs : les matrikines. Les matrikines sont des petits fragments peptidiques résultant de la protéolyse des macromolécules de la MEC par les MMPs, telle que la séquence VGVAPG issue de l'élastine. Ces matrikines vont alors pouvoir exercer le rôle de cytokine, régulant différents processus tels que la prolifération cellulaire, mais également modulant l'activité des MMPs.^{8,24}

La présence de certains analogues de séquence de type matrikine a déjà été prouvée chez différents végétaux tels que le petit pois ou le riz. L'existence de séquences peptidiques inhibitrices de MMPs dans nos fractions de luzerne est donc envisageable, le petit pois appartenant à la même famille botanique.^{25,26}

Nous avons ainsi exploré le potentiel de nos différents extraits de luzerne en tant qu'agent antioxydant ou comme inhibiteur de MMPs.

III.2 Evaluation des fractions issues du sérum de luzerne

III.2.1 Rappel sur le matériel à tester

Les fractions issues du sérum de luzerne sont de deux types : les bruts obtenus après élimination des polyphénols et des saponosides ; et les fractions issues du fractionnement par MIXCPC.

III.2.1.1 Les bruts de sérum

Sont désignés par le terme brut, les fractions de sérum obtenues après élimination des polyphénols par passage sur une colonne de résine XAD-16, puis précipitation des saponosides à l'acétone (II.2.1.3.2.2). Les caractéristiques des différents surnageants obtenus sont rappelées dans le tableau ci-après.

Tableau 44 : Rappel sur les surnageants bruts issus du sérum de luzerne.

Fraction	Masse (g)	Teneur en composés azotés (N x6,25)
Fr 1_1s	6,54	16
Fr 1_2s	5,13	24
Fr 1_3/4s	1,36	29
Fr 1_5/6/7s	0,48	41
Fr 2s	0,32	35
Fr 3s	0,41	42

III.2.1.2 Les fractions après MIXCPC

Les fractions obtenues après fractionnement par MIXCPC du brut F 3s sont décrites. Paragraphe II.2.1.3.2.3. Dans le tableau ci-après sont rappelés leurs noms et masses respectifs.

Tableau 45 : Rappel des noms et masses des fractions issus de F 3s.

Fraction	Masse (mg)
3-7	35,7
8-18	57,8
19-26	24,3
27-49	22,6
50-67	17,0
68-95	23,1
96-101	2,8
102-118	29,3
119-131	25,2
132-154	26,7

III.2.2 Evaluation du potentiel antioxydant

L'évaluation du potentiel antioxydant des fractions issues du sérum de luzerne nous renseigne sur l'activité antioxydante de ces produits tout en nous permettant de contrôler l'absence de polyphénols résiduels, ces derniers ayant comme caractéristique de présenter des potentiels antioxydants très élevés.

III.2.2.1 Introduction

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un produit peut se réaliser selon divers protocoles physico-chimique, mettant en jeu des mécanismes différents.¹⁸

Les méthodes les plus rapides à mettre en œuvre sont celles basées sur l'utilisation de radicaux stabilisés, tels que le diphénylpicrilhydrazyl (DPPH), pour ne citer que le plus courant.^{18, 19}

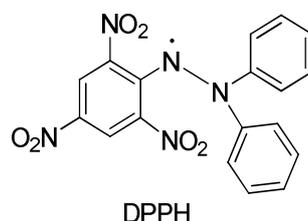


Figure 121 : Structure du DPPH.

Ces tests ne donnent qu'une évaluation rapide du potentiel de capture de radicaux présenté par les échantillons et ne renseignent pas sur leur activité antioxydante *in vivo*. Néanmoins ce sont ceux

les plus employés du fait de la simplicité de leur mise en œuvre, et de la possibilité de réaliser un criblage en plaque 96-puits.¹⁸

Le DPPH est un radical stable présentant une coloration violette intense qui vire à l'incolore lorsque le radical est capté par une molécule antioxydante. L'évaluation se fait alors par simple mesure d'absorbance UV.

Tous ces atouts ont contribué au choix du test de capture du DPPH comme méthode d'évaluation du potentiel antioxydant de nos fractions.

III.2.2.2 Test de capture du DPPH

III.2.2.2.1 Protocole suivi

Le protocole que nous avons appliqué pour l'évaluation du potentiel antioxydant de nos différentes fractions est une adaptation du protocole décrit par Pezzuto *et al.*²⁷

Les tests ont été réalisés sur un lecteur de plaques FLUOstar Omega (BMG Labtech, Offenburg), dans des plaques 96-puits Microlon® F-Bottom Med. binding (Greiner BioOne).

Une solution mère de DPPH à 316 μ M est préparée par solubilisation d'une quantité appropriée de DPPH dans un volume d'éthanol à 99% défini. Cette solution se conserve environ un mois à l'abri de la lumière à 4°C.

La solution test de DPPH est préparée extemporanément par dilution au demi de la solution mère avec de l'eau distillée, pour obtenir une solution dans l'éthanol à 50% environ. La concentration en DPPH ainsi obtenue dans les puits est de 150 μ M.

Les solutions échantillons sont préparées par dissolution de la quantité appropriée d'échantillon dans du DMSO. Le volume de solution échantillon introduit dans un puits est de 5 μ l pour 95 μ l de solution de DPPH.

Le témoin positif est une solution d'acide ascorbique à 5 μ g/ml dans le DMSO, ce qui correspond à une activité antioxydante d'environ 50 % dans ces conditions.

La lecture des plaques se fait à 37°C à la longueur d'onde de 515 nm. Toutes les mesures sont réalisées en triplicate.

III.2.2.2.2 Criblage préliminaire des bruts

Nous avons commencé nos évaluations par le criblage des bruts de sérum. Nous avons réalisé un premier criblage rapide en utilisant une concentration en bruts de 500 μ g/ml, ce qui est le double de la concentration fixée comme limite pour une activité antioxydante intéressante par Pezzuto *et al.*²⁷ Les résultats obtenus sont regroupés Tableau 46.

Tableau 46 : Résultats du criblage des bruts à 500 µg/ml.

Brut testé	Concentration	DPPH restant après 30 min
F 1_1s	500 µg/ml	81 %
F 1-2s		76 %
F 1_3/4s		20 %
F 1_5/6/7s		14 %
F 2s		13 %
F 3s		11 %

Les deux premiers bruts F 1_1s et 1_2s ne montrent aucune activité antioxydante intéressante. Pour les quatre bruts restant nous avons réalisé une seconde mesure à 200 µg/ml, pour identifier les bruts potentiellement intéressants. En effet, il est admis que si la concentration permettant d'obtenir 50 % de capture du radical (EC_{50}) est supérieure à 200 µg/ml, le brut concerné présente peu d'intérêt pour la recherche de nouveaux composés antioxydants.

Pour les bruts de F 1_3/4s à F 3s, l'activité antioxydante obtenue à 500 µg/ml étant prometteuse nous les avons testés à la concentration de 200 µg/ml (Figure 122).

Aucuns des bruts ne présentant une activité antioxydante très marquée, nous pouvons en déduire que la quasi-totalité des polyphénols ont été éliminés.

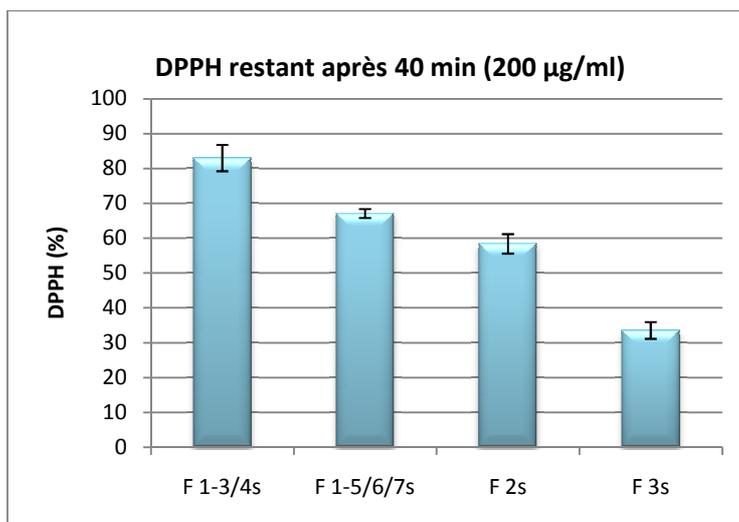


Figure 122 : Représentation graphique des quantités de DPPH restantes après 40 min d'incubation avec les bruts à une concentration de 200 µg/ml.

Nous pouvons remarquer sur le graphique ci-dessus que seul le brut F 3s présente une capture du DPPH supérieure à 50 % à la concentration de 200 µg/ml. Nous avons donc poursuivi nos investigations uniquement avec ce brut.

Nous avons ainsi déterminé l' EC_{50} du brut F 3s qui s'avère être de 125 µg/ml. Cette valeur traduit une activité antioxydante assez faible, mais néanmoins existante.

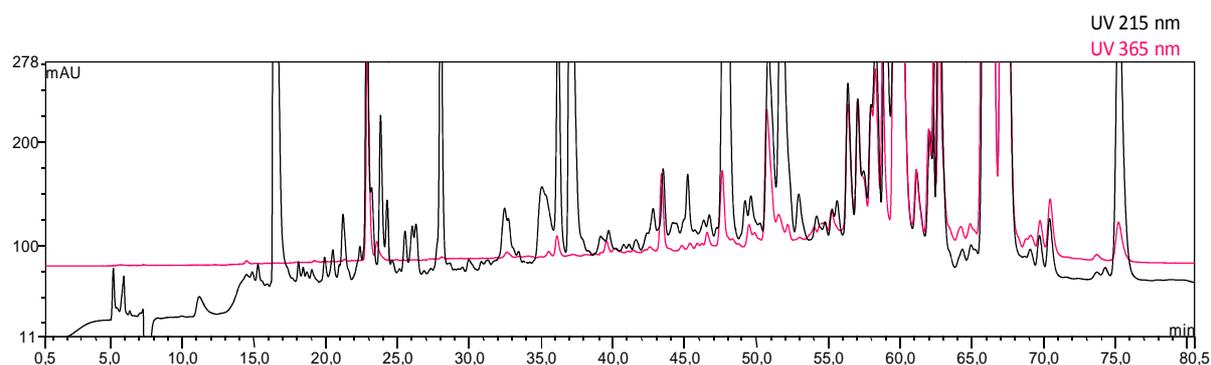


Figure 123 : Chromatogramme CLHP du brut F 3s. Colonne Jupiter Proteo (250 x 4,6 id, 4 μ m). Gradient eau 0,1% TFA jusque Eau 0,1% TFA/MeOH 0.09% TFA (50:50, v/v) en 80 min. Concentration de l'échantillon 5 mg/ml. Détection 215 nm (noir) et 325 nm (rose).

Sur le chromatogramme CLHP du brut F 3s, nous pouvons remarquer la subsistance de quelques polyphénols résiduels. L'activité antioxydante du brut pourrait ainsi provenir de ces aliquotes de polyphénols présents. Pour résoudre cette question les fractions du fractionnement par MIXCPC ont été à leur tour testées, pour vérifier si l'activité ne se concentrait pas uniquement dans quelques fractions.

III.2.2.2.3 Criblage des fractions de F3s

Les fractions issues du fractionnement par MIXCPC ont été testées à différentes concentrations : 375 μ g/ml correspondant à trois fois l' EC_{50} du brut et pour certaines 187,5 μ g/ml.

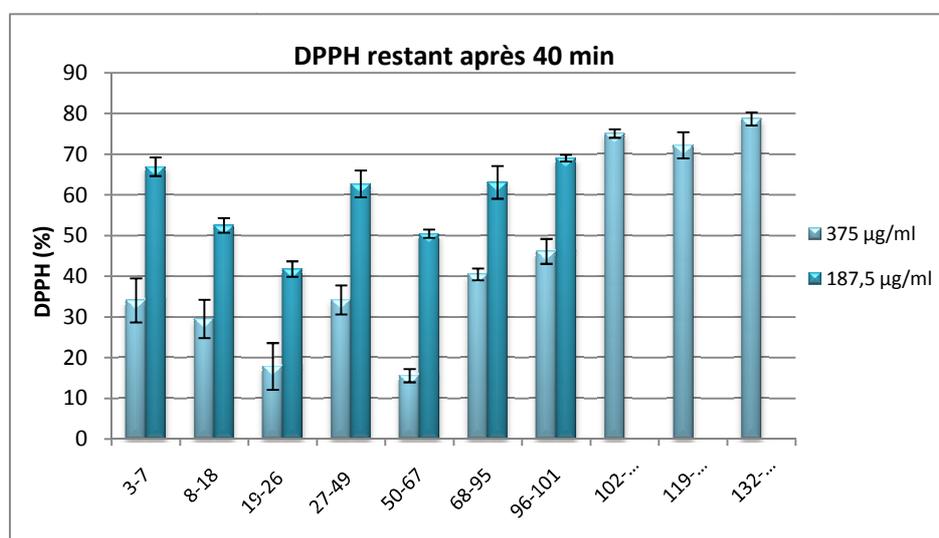


Figure 124 : Activité antioxydante des fractions de F 3s à 375 et 187,5 μ g/ml.

Comme nous pouvons le voir sur le graphique ci-dessus, aucune fraction ne présente une activité beaucoup plus marquée que celle du brut F 3s lui-même. Les fractions présentant une activité plus marquée ont un EC_{50} proche de 187,5 μ g/ml, supérieur celui du brut. L'activité de ce dernier est donc due à la somme des activités des composés, avec probablement un effet synergique,

et non à la présence prépondérante d'un composé présentant des propriétés antioxydantes marquées, *i.e.* polyphénols.

III.2.2.3 Conclusion

Les composés présents dans les bruts de sérum testés ne présentent **pas un potentiel antioxydant très marqué**. Néanmoins cette constatation nous permet d'envisager plus sereinement les tests d'inhibition d'enzyme. En effet, ce peu d'activité antioxydante vient **confirmer l'élimination des polyphénols** qui sont des inhibiteurs non spécifiques de nombreux systèmes enzymatiques et donc sources de faux positifs.

III.2.3 Evaluation du potentiel en tant inhibiteur enzymatique

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les cibles enzymatiques que nous cherchons à cibler sont celles impliquées dans la dégradation de la MEC au niveau du derme : certaines MMPs, ainsi que des sérine-protéases (plasmine, HLE...).

III.2.3.1 Protocole d'évaluation

L'évaluation du potentiel inhibiteur des fractions se fait là encore en plaque 96-puits. Les extraits sont évalués en comparaison avec un témoin positif sans inhibiteur.

III.2.3.1.1 Principe général

La mesure de l'activité enzymatique de certaines MMPs est basée sur le principe du transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) ou encore principe d'extinction de fluorescence intramoléculaire. Les substrats utilisés pour ces tests sont généralement des oligopeptides portant un fluorophore ainsi qu'un groupement éteignant qui va capter cette fluorescence.

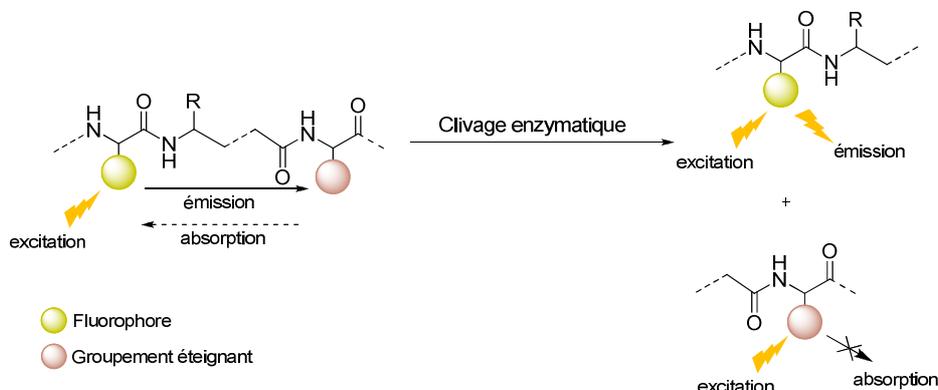


Figure 125 : Principe du test de mesure de l'activité enzymatique basé sur le FRET.

Lorsque que le substrat est hydrolysé par l'enzyme, le groupement éteignant est clivé et ainsi la fluorescence du substrat peu s'exprimer.

Un des couples fluorophore/éteignant les plus utilisés est le couple Mca (7-méthoxycoumarine-4-acétyl) /Dnp (dinitrophényl-diaminopropionyl).

D'autres tests sont basés sur des phénomènes d'absorption UV-visible. Le substrat employé est incolore, et un groupement chromophore est généré lors du clivage enzymatique.

III.2.3.1.1 Exploitation des résultats

Une enzyme (ϵ) est une protéine capable de catalyser spécifiquement la transformation d'un ou deux substrat (S) en un produit (P) défini. En prenant un modèle simplifié de réaction enzymatique : $S \xrightarrow{\epsilon} P$, la vitesse de réaction s'écrit :

$$v = \frac{d(P)}{dt} = - \frac{d(S)}{dt} \quad (\text{Équation 49})$$

Pour tracer une courbe $P = f(t)$, l'enzyme ϵ agit sur le substrat S ; le temps zéro correspond au déclenchement de la réaction. L'apparition du produit P est mesurée en fonction du temps.

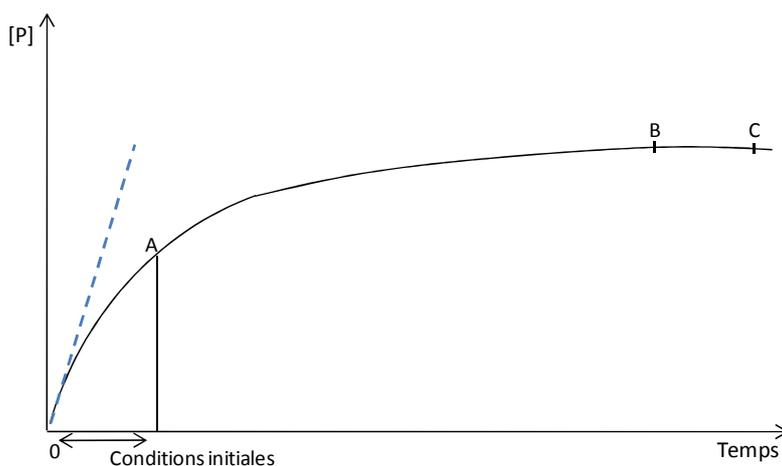


Figure 126 : Courbe d'apparition du produit en fonction du temps : $[P] = f(t)$.

La vitesse de réaction v est constante pendant les conditions initiales (partie de courbe 0-A). Pour cette portion de courbe, la tangente à l'origine se confond avec la courbe : la vitesse, pente de la tangente 0-A, est appelée vitesse initiale. Puis la vitesse diminue (portion de courbe A-B) et s'annule (portion B-C). La vitesse s'annule lorsque l'un des substrats est consommé ou lorsqu'il s'établit un équilibre.

Lorsque la vitesse d'une réaction enzymatique est déterminée, c'est toujours la vitesse initiale qui est calculée. Les mesures de vitesse sont donc faites dans les conditions initiales où moins de 10 % de la quantité de substrat est hydrolysé. Tant que $[S] \gg [\epsilon]$, la vitesse initiale est proportionnelle à

la concentration de l'enzyme : elle traduit donc l'activité d'une préparation de l'enzyme exprimée en unités enzymatiques.

L'unité internationale (UI ou U) représente la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute.

III.2.3.1.2 Conditions utilisées

III.2.3.1.2.1 Activation des proMMPs

Certaines MMPs doivent être activées avant utilisation : la MMP-1, MMP-9, MMP-2 et MMP-13. Les proMMPs sont activées par un agent oxydant : l'acétate (4-aminophényl)mercurique ou APMA). Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe III.1.3.4.1), l'APMA va oxyder la fonction thiol présente au niveau du site actif de la proMMP, et entraîner ainsi la rupture de la liaison cystéine-zinc.

Pour l'activation des proMMP-1 et-13, une solution à 10 mM d'APMA est utilisée, alors que pour les proMMP-2 et-9 la solution d'APMA titre à 20 mM. Ces solutions d'APMA sont préparées par solubilisation d'une quantité adaptée d'APMA dans un volume défini de soude à 0,1 M. Dans tous les cas, 1 µl de la solution mère de proMMP est activé par 0,8 µl de solution d'APMA, additionnés de 6,2 µl de tampon adéquat. Ce mélange est ensuite laissé au bain-marie à 37°C pendant une heure.

Les autres enzymes sont commercialisées sous leur forme active, et pour certaines comme la MMP-3, seul le domaine catalytique de l'enzyme est fourni : MMP-3 cat.

III.2.3.1.2.2 Conditions des tests en plaques

Les tests ont été effectués sur un lecteur de plaques Spectrofluorimètre HTS 7000+ (Perkin Elmer, Whathalm USA). Les lectures ont été réalisées dans des plaques noires Cliniplate (ThermoFisher) pour les lectures en FRET. Ces plaques ont été recouvertes avec de l'albumine sérique bovine avant utilisation. Cette opération permet de saturer les sites de liaisons aspécifiques des protéines, et donc des enzymes, existants dans les puits. Pour cela, les puits sont remplis avec une solution à 1% de sérum albumine bovine, et laissés en contact avec cette solution pendant une heure. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec de l'eau distillée, et séchés.

Pour les lectures en absorbance, les plaques transparentes à fond plat (Greiner BioOne) prétraitées pour éviter la fixation aspécifique des protéines ont été utilisées.

Les conditions utilisées sont regroupées dans le tableau ci-dessous. Tous les tests sont réalisés en triplicatas.

Tableau 47 : Conditions expérimentales utilisées lors des tests d'inhibition d'enzymes.

Enzymes	T°C	Excit. (nm)	Emiss. (nm)	Gain	[enz] puits	Substrat	[substrat] puits	Tampon
<i>Fluorométrie</i>								
MMP-1	TA	360	465	140	1 nM	MMP1/MMP9	10 µM	Tritest
MMP-2	TA	326	465	180	0,9 nM	M 1895	2 µM	Tritest
MMP-3 cat	37°C	360	465	100	5 nM	MS 2300	1 µM	TCZ
MMP-7	TA	326	465	180	3,6 nM	MMP2/MMP7	2 µM	Tritest
MMP-9	TA	360	465	140	1 nM	MMP1/MMP9	10 µM	Tritest
MMP-13	TA	326	465	180	0,6 nM	M 1895	2 µM	Tritest
MT1-MMP	TA	326	465	180	3 nM	M 1895	2 µM	Tritest
<i>Absorbance</i>								
Plasmine	TA	/	405	/	12 nM	S 2251	0,3 mM	Tris HCl
HLE	TA	/	405	/	8 nM	Elastase substrate I	1 mM	Tris-NaCl
u-PA	TA	/	405	/	7,5 nM	S 2444	0,3 mM	Tris HCl

TA : température ambiante ; Excit. : longueur d'excitation ; Emiss. : longueur d'onde d'émission

Les substrats utilisés sont :

- M 1895 (Bachem) : Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ avec Dap N-3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionyl ;
- M 2300 (Bachem) : 6-(7-nitro-benzo[2,1,3]oxadiazol-4-ylamino)-hexanoyl-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-Lys(7-diméthylaminocoumarin-4-yl)-NH₂ avec Nva norValine ;
- MMP-1/MMP-9 (Calbiochem) : Dnp-Pro-Cha-Gly-Cys(Me)-His-Ala-Lys(N-Me-Abz)-NH₂ avec Cha b-cyclohexylalanine et Abz 2-aminobenzoyl(anthraniloyl) ;
- MMP-2/MMP-7 (Calbiochem) : Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap-Ala-Arg-NH₂ ;
- Elastase substrate I (Calbiochem) : MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA avec pNA paranitroaniline ;
- S 2251(Chromogenic substrates): H-D-Val-Leu-Lys-pNA.

Les compositions des différents tampons utilisés sont décrites ci-après :

- Tampon Tritest : Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM en solution dans de l'eau distillée, pH ajusté à 7,5 avec du HCl ;
- Tampon TCZ : Tris 50 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 5 mM en solution dans de l'eau distillé, pH ajusté à 7,5 avec du HCl ;
- Tampon Tris HCl : Tris 100 mM en solution dans de l'eau distillée, pH ajusté à 7,8 avec du HCl ;
- Tampon Tris NaCl : Tris 50 mM, NaCl 150 mM en solution dans de l'eau distillée, pH ajusté à 8 avec du HCl.

Les solutions échantillons sont préparées par dissolution d'une quantité adaptée d'échantillon dans du DMSO.

III.2.3.2 Criblage des bruts

Nous avons procédé à un premier criblage rapide de l'ensemble des bruts en sélectionnant quatre enzymes : plasmine, MMP-3, MMP-1 situées en début de cascade, et l'HLE. La MMP-1 étant l'enzyme centrale de la dégradation du collagène au niveau de la peau, elle constitue la cible principale de nos investigations. Nous avons testé une gamme de concentration allant de 0,0022 µg/ml à 22 µg/ml de chaque brut. Ces concentrations peuvent apparaître relativement basses, mais 22 µg/ml est la limite maximale pour que la coloration des échantillons ne perturbe pas la mesure en fluorométrie et en colorimétrie.

Tableau 48 : Résultats des tests d'inhibition obtenus lors du criblage préliminaire des bruts.

Brut	% inhibition pour la concentration de 22 µg/ml		
	MMP-1	MMP-3 cat	HLE
F 1_1s	0	12,7	0
F 1_2s	0	48,8	0
F 1_3/4s	0	47,3	0
F 1_5/6/7s	0	52,3	0
F 2s	12,2	94,2	0
F 3s	58,0	96,3	25,9

L'ensemble des bruts n'ont présenté aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la plasmine. En considérant la MMP-1, notre cible principale, le brut F 3s présente l'activité la plus marquée avec environ 58% d'inhibition à une concentration de 22 µg/ml. Ce même brut présente de plus une activité inhibitrice légère vis-à-vis de l'HLE.

Nous pouvons également noter que l'ensemble des bruts montrent une activité inhibitrice plus ou moins importante sur la MMP-3. En particulier les bruts F 2s et F 3s semblent très actifs avec des inhibitions >90%. Les concentrations permettant d'obtenir 50% d'inhibition (IC₅₀) ont été déterminées pour les bruts F 2s et F 3s. Elles s'élèvent à 0,22 µg/ml pour le brut F 2s et à 0,026 µg/ml pour le brut F 3s. Ces IC₅₀ sont relativement basses pour des extraits végétaux, l'activité de ces bruts est donc à explorer. Il faut toutefois mentionner que l'activité vis-à-vis de la MMP-3 catalytique, qui représente uniquement le site catalytique de la MMP-3, ne garantit pas obligatoirement une activité sur la MMP-3 native. Des problèmes relatifs à l'activité de l'enzyme MMP-3 cat. étant survenus au cours de nos investigations, les mesures d'activités anti-protéasique sur cette enzyme n'ont pu être réalisées qu'une seule fois, et sont donc à interpréter avec précaution.

En conclusion sur le screening préliminaire des bruts de luzerne, le brut F 3s semble présenter le plus d'intérêts. Son activité vis-à-vis de la MMP-1 intervient pour une concentration relativement basse pour un extrait végétal, de même que pour son potentiel inhibiteur vis-à-vis de la MMP-3 cat. Nous avons donc poursuivi notre étude en nous concentrant sur cet extrait brut.

III.2.3.3 Etude du brut F 3s

Nous avons poursuivi notre étude du potentiel du brut F 3s sur une variété plus vaste de MMPs et sérine-protéases : MMP-9, MMP-7, MMP-13, MT1-MMP, uPA, MMP-2, afin d'investiguer la sélectivité d'action de l'extrait.

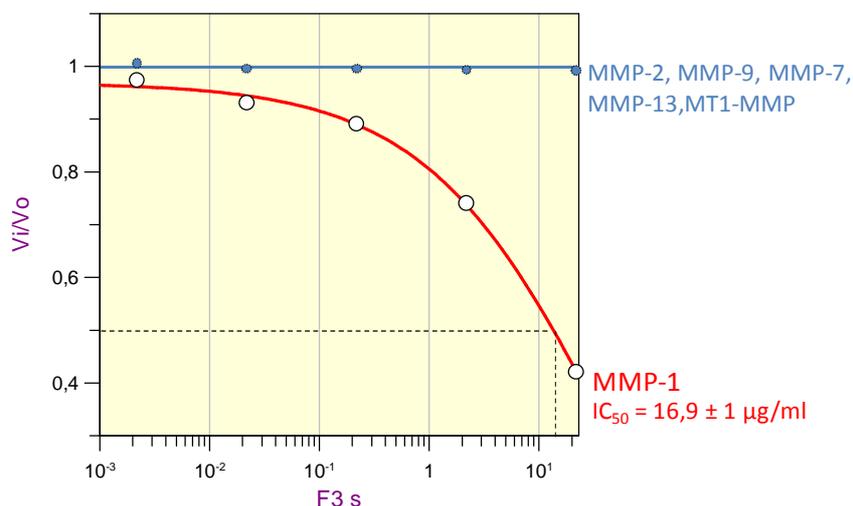


Figure 127 : Courbe d'inhibition obtenue par action du brut F 3s différentes MMPs pour la gamme de concentrations de 0,0022 µg/ml à 22 µg/ml.

La concentration de F 3s permettant d'obtenir 50 % d'inhibition de l'activité (IC_{50}) de la MMP-1 est d'environ 17 µg/ml. Un début d'activité a également été constaté sur l'HLE (26 % d'inhibition à 22 µg/ml) et sur l'urokinase (uPA) (5 % d'inhibition à 22 µg/ml). L' IC_{50} obtenu sur la MMP-3 cat. est de 0,026 µg/ml, valeur qui si elle est confirmée est très intéressante.

En revanche, aucune activité anti-protéasique n'a été constatée à l'encontre des MMP-2, -7, -9, 13 et de la MT1-MMP.

Le spectre d'activité de cet extrait est donc réduit, démontrant une spécificité d'action intéressante. Les enzymes principalement inhibées sont la MMP-1 ($IC_{50} = 17 \mu\text{g/ml}$), notre cible principale, ainsi que la MMP-3 catalytique. En prenant également en compte le pouvoir antioxydant du brut F 3s ($EC_{50} = 125 \mu\text{g/ml}$), cet extrait présente un intérêt certain pour l'usage en tant qu'agent anti-âge potentiel.

Nous nous sommes alors penchés sur l'étude des fractions obtenues après fractionnement du brut F 3s par MIXCPC.

III.2.3.4 Etude préliminaire des fractions de F 3s

Les tests préliminaires sur les fractions du brut F 3s issues du procédé par MIXCPC ont été réalisés sur la MMP-1, la MMP-3 cat. et l'HLE.

III.2.3.4.1 *Activité sur la MMP-1*

Dans le cas de la MMP-1, la concentration testée est de 9 µg/ml. L'IC₅₀ du brut F 3s sur la MMP-1 avait été dans un premier temps évaluée de façon erronée à 3 µg/ml environ. Il est donc naturel de constater des inhibitions assez faibles pour cette concentration.

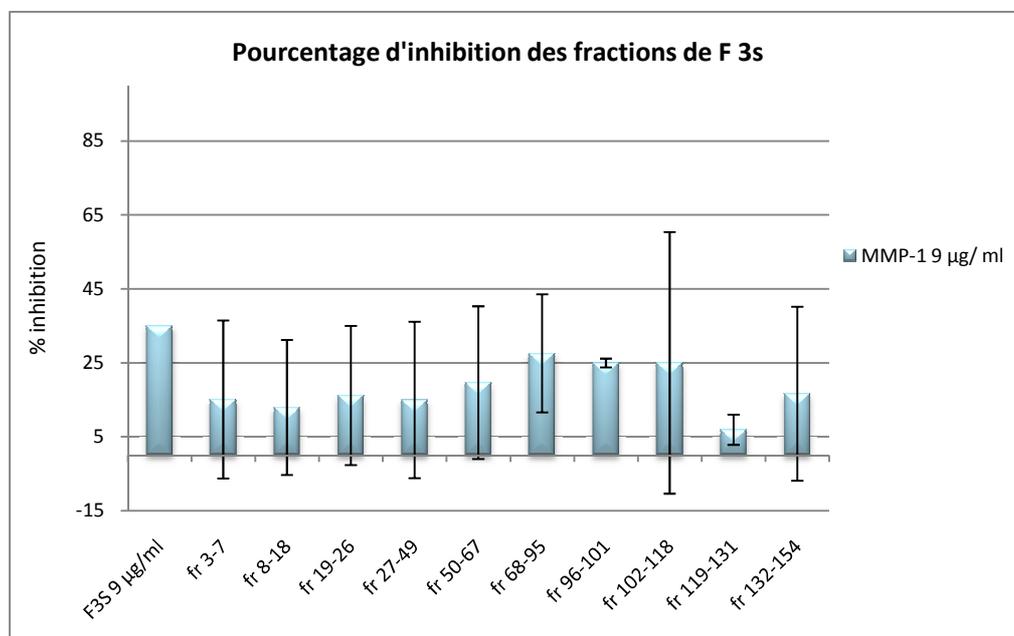


Figure 128 : *Activité anti-protéasique vis-à-vis de la MMP-1 des fractions issues du brut F 3s à 9 µg/ml.*

Les résultats présentés ici sont les moyennes des résultats obtenus après répétition des essais, et pour le brut F 3s une estimation de l'inhibition qui serait obtenue à une concentration de 9 µg/ml. Nous pouvons constater l'ensemble des fractions présentent une activité vis-à-vis de la MMP-1 inférieure à celle obtenue avec l'extrait brut. Il est de plus important de noter que l'activité est répartie sur l'ensemble des fractions et non présente uniquement dans quelques unes.

Il serait donc plus intéressant d'utiliser directement le brut F 3s pour obtenir un effet antiMMP-1, plutôt qu'une des fractions.

Ces fractions ont également été testées en tant qu'inhibiteurs de l'HLE et de la MMP-3 cat.

III.2.3.4.2 *Activités vis-à-vis de l'HLE et de la MMP-3 cat.*

Les concentrations utilisées pour réaliser ces tests sont environ 3 fois supérieures à l'IC₅₀ du F 3s ou à la concentration maximale testée pour ce dernier, soit des concentrations de 1,3 µg/ml pour MMP-3 cat., de 75 µg/ml pour les tests sur l'HLE.

Les activités anti-protéasiques constatées sont regroupées dans le graphique ci-dessous.

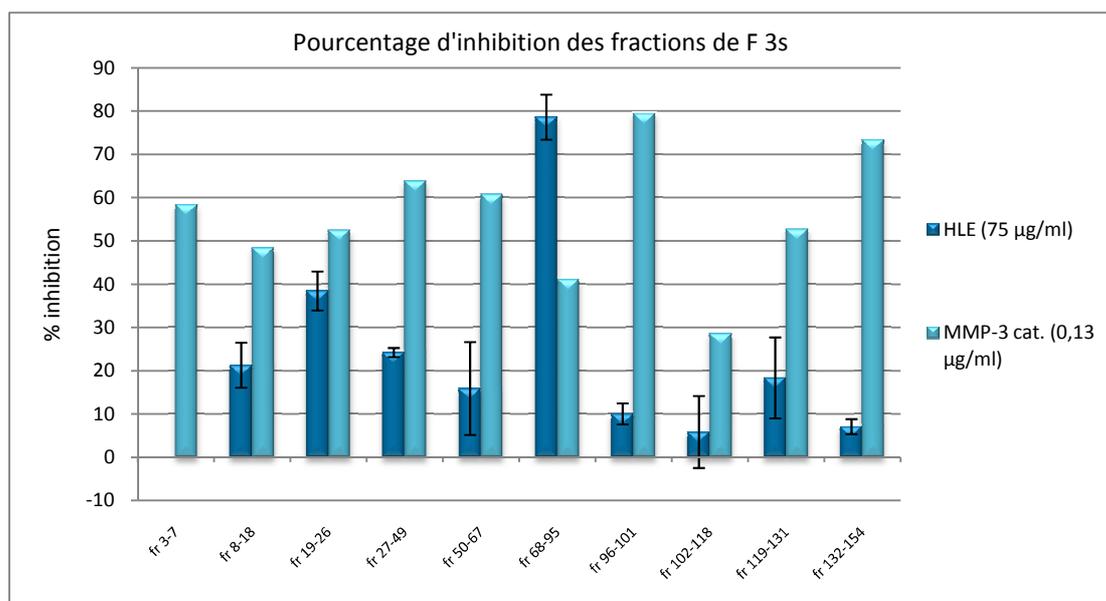


Figure 129 : Activités anti-protéasiques des fractions issues de F 3s vis-à-vis de l'HLE et la MMP-3 cat.

Vis-à-vis de l'HLE, seule la fraction 68-95 montre une forte activité inhibitrice, les autres étant relativement peu actives. Nous pouvons également noter que cette fraction semble montrer une spécificité d'activité, avec une activité inhibitrice moins marquée sur les MMP-1 et -3.

Concernant la MMP-3 cat., la plupart des fractions montrent une activité inhibitrice. Néanmoins deux fractions, les fractions 96-101 et 132-154, montrent une activité très importante, qui semble de plus très sélective. En effet les inhibitions constatées pour l'HLE et la MMP-1 sont très réduites en comparaison. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude de ces deux fractions. La fraction 96-101 n'a été obtenue qu'en très faible quantité (environ 2 mg), l'étude de son spectre d'activité n'a donc pas pu être réalisée.

En comparant les activités anti-protéasiques des fractions (Figure 128 et Figure 129) avec leur potentiel antioxydant (Figure 124), nous pouvons remarquer que les fractions semblant les plus actives (fr 96-101 et 132-154) ont un potentiel antioxydant assez faible : l'activité inhibitrice n'est donc vraisemblablement pas le fait de la présence de polyphénols.

Comme pour la MMP-1, le constat est que l'extrait semble plus actif que ses fractions. Pour une utilisation en dermo-cosmétique, le brut F 3s pourra donc être utilisé directement.

En revanche, la sélectivité constatée pour les fractions 132-154 (vis-à-vis de la MMP-3 cat.) et 68-95 (vis-à-vis de l'HLE) présente un intérêt important pour la recherche d'inhibiteur sélectif de ces enzymes. Nous avons donc poursuivi notre étude en nous focalisant sur ces deux fractions, et sur l'analyse de leur composition.

III.2.3.5 Cas de la fraction 132-154

Cette fraction présente une activité inhibitrice très marquée vis-à-vis de la MMP-3 cat. Avant d'aller plus avant dans l'investigation biologique de cette fraction, nous allons faire un rappel sur les données analytiques qui sont en notre possession.

III.2.3.5.1 Données sur la fraction

La fraction 132-154 est composée majoritairement de deux analytes, comme cela peut être visualisé sur le chromatogramme CLHP ci-dessous.

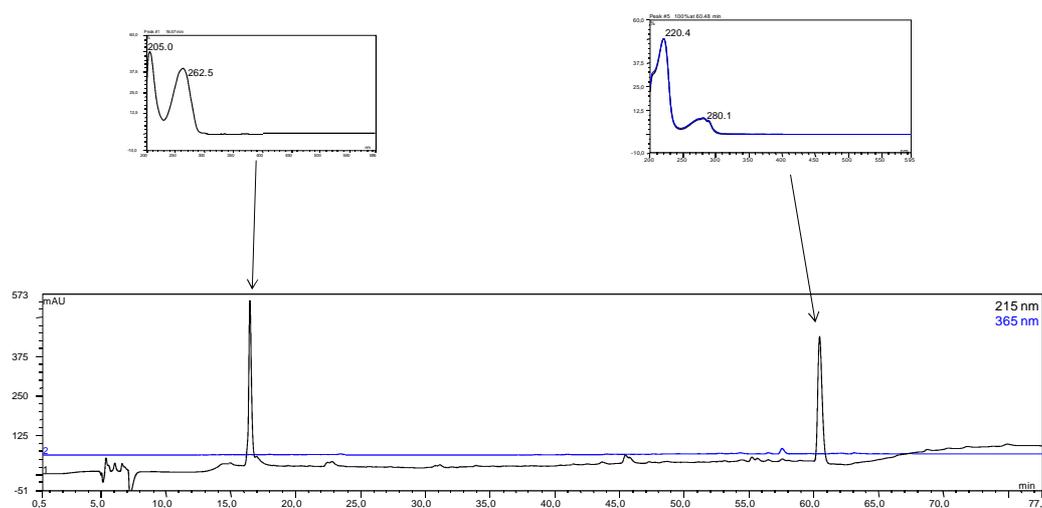


Figure 130 : Chromatogramme CLHP de la fraction 132-154. Colonne Jupiter Proteo(250 x 4,6 id, 4 μ m). Gradient eau 0,1% TFA jusque Eau 0,1% TFA/MeOH 0,09% TFA (50:50, v/v) en 60 min. Concentration de l'échantillon 5 mg/ml. Détection 215 nm (noir) 365 nm (bleu). Spectres d'absorption UV des différents analytes prépondérant (encadrés).

Nous avons obtenus environ 20 mg de cette fraction 132-154. Sur le chromatogramme, nous pouvons remarquer qu'il n'y a aucun composé de type polyphénolique dans cette fraction, le profil chromatographique à 365 nm demeurant complètement plat. Si l'on s'intéresse aux spectres d'absorption UV des deux analytes présents, le premier possède un spectre UV non caractéristique d'une substance peptidique, ce qui est naturel puisque l'extrait brut F 3s ne comporte qu'environ 40% de matières azotées. Cet analyte doit néanmoins comporter une fonction cationique ionisable, puisqu'il est déplacé avec les ions calcium lors du procédé par échange d'ions.

Le second analyte présente un spectre UV plus typique d'un noyau indolique, et donc pour un peptide typique d'un substitut de type tryptophane. L'activité biologique est présumée due plutôt à ce second analyte. En effet, l'analyte 1 est présent de manière beaucoup plus abondante dans la fraction précédente, fraction 119-131. Comme nous pouvons le voir Figure 128, cette fraction inhibe de façon beaucoup moins importante la MMP-3 cat. L'analyte 2 est également présent dans cette fraction, mais en proportion très faible. L'activité inhibitrice vis-à-vis de la MMP-3 croît parallèlement

à l'augmentation de la proportion de l'analyte 2, c'est la raison pour laquelle nous avons émis l'hypothèse que ce composé était le porteur de l'activité biologique.

Nous trouvant dans l'impossibilité de poursuivre les tests sur la MMP-3 cat. pour les raisons précédemment citées, nous avons alors réalisé le polissage de cette fraction par CLHP semi-préparative.

III.2.3.5.2 Polissage de la fraction

III.2.3.5.2.1 Conditions expérimentales

Le polissage a été réalisé sur une colonne Jupiter Protéo 90 Å (250 x 10 mm id, 4 µm) (Phenomenex). Les éluants utilisés sont : éluant A : eau 0,1 % de TFA ; éluant B : MeOH 0,09 %. Le gradient suivi est indiqué ci-après:

Temps (min)	Eluant A (%)	Eluant B (%)
0	88	12
10	88	12
11	50	50
26	50	50
27	88	12
37	88	12

Le débit a été fixé à 2,5 ml, et la longueur d'onde de suivi à 215 nm.

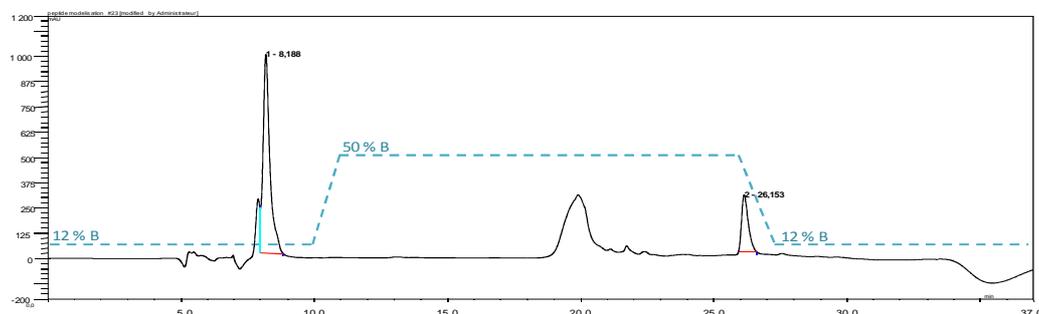


Figure 131 : Chromatogramme CLHP du gradient utilisé pour le polissage des analytes 1 et 2, avec en noir UV 215 nm et en pointillés bleus le gradient utilisé.

III.2.3.5.2.2 Polissage proprement dit

Les fractions 119-131 et 132-154 possédant des chromatogrammes CLHP superposables, elles ont été rassemblées pour former la matière première du polissage, qui ainsi regroupée correspond à une masse de 40 mg.

Après passage sur la colonne CLHP, nous avons ainsi obtenu 14,3 mg de l'analyte 1 et 0,5 mg de l'analyte 2. Les masses obtenues étant très faibles et des tests biologiques devant être menés, nous n'avons pas réalisé l'analyse structurale par RMN de ces composés.

En revanche, le reliquat de fraction mère a été envoyé en analyse par LC-MS/MS. Nous espérons ainsi obtenir un début d'information sur la masse moléculaire des analytes majoritaires, ainsi qu'un début d'éléments sur la structure de ces composés.

Avant de débiter un panel de tests enzymatiques très large, nous souhaiterions déjà confirmer l'activité d'un ou de ces composés vis-à-vis de la MMP-3 cat. Ce projet sera entrepris dès que nous aurons résolu le problème relatif à l'activité de la MMP-3 cat.

III.2.3.6 Cas de la fraction 68-95

Cette fraction a comme particularité de présenter un profil d'inhibition très différent des autres fractions, caractérisé par une activité inhibitrice marquée sur l'HLE.

III.2.3.6.1 Données sur la fraction

Les données que nous avons à notre disposition étaient là encore les données CLHP et UV.

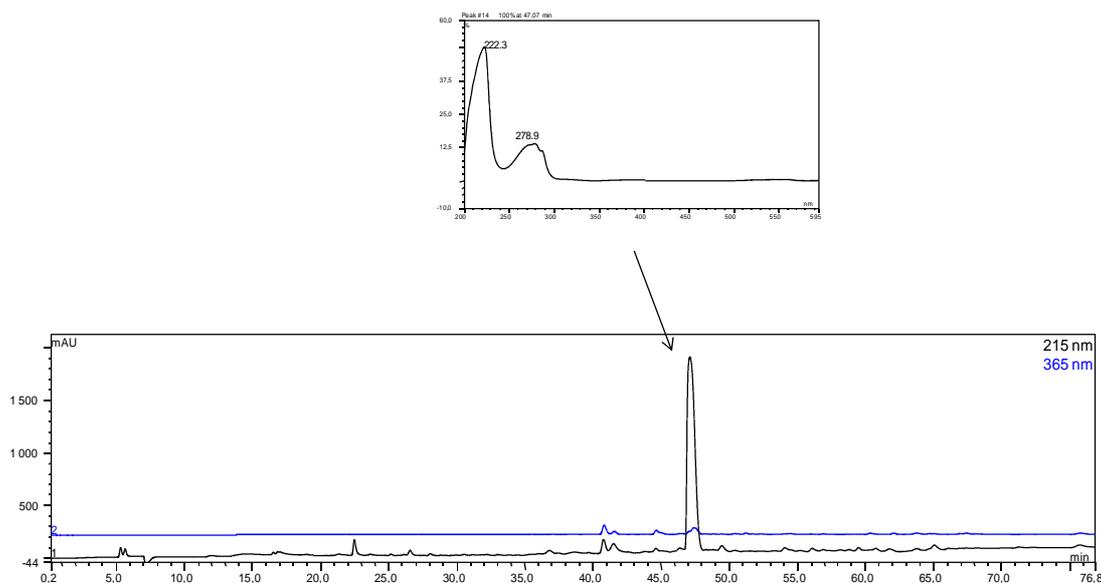


Figure 132 : Chromatogramme CLHP de la fraction 68-95, avec le spectre d'absorption UV du pic majoritaire en encadré. Colonne Jupiter Proteo(250 x 4,6 id, 4 μ m). Gradient eau 0,1% TFA jusque Eau 0,1% TFA/MeOH 0,09% TFA (50:50, v/v) en 60 min. Concentration de l'échantillon 5 mg/ml. Détection 215 nm (noir) 365 nm (bleu).

Cette fraction semble quasiment propre en CLHP, et est donc d'autant plus intéressante, l'activité biologique pouvant ainsi être attribuée plus facilement. Le spectre UV du pic correspond là encore à un signal typique d'un noyau indolique. Et nous pouvons également noter que le pic majoritaire ne correspond là encore pas à un composé polyphénolique.

III.2.3.6.2 Spectre d'activité

Le spectre d'activité de cette fraction a donc été investigué sur un certains nombre d'enzymes.

Tableau 49 : Bilan des activités en tant qu'inhibiteur de la fraction 68-95.

Enzyme testée	Activité inhibitrice
MMP-1	37,4 ± 1,5 µg/ml
HLE	19,43 ± 0,9 µg/ml
MMP-9	3 % inhibition à 37,5 µg/ml
MMP-13	26 % inhibition à 37,5 µg/ml
MMP-2	37,5 ± 1,0 µg/ml
MMP-7	14,1 ± 0,8 µg/ml

Les courbes d'inhibition d'enzyme obtenues sont regroupées dans la figure ci-dessous.

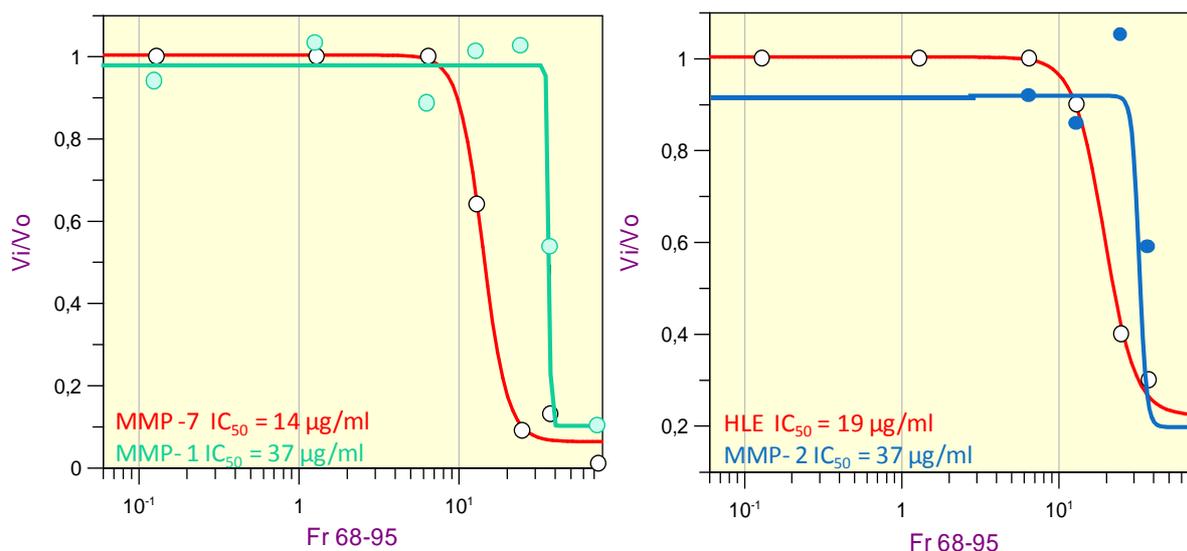


Figure 133 : Courbes d'inhibition obtenues avec la fraction 68-95 sur les MMP-1, -2, -7 et l'HLE.

L'activité inhibitrice est surtout dirigée contre l'HLE et la MMP-7. Néanmoins les activités constatées vis-à-vis des MMP-2 et -1 sont également notables.

Le spectre d'activité anti-protéasique de cette fraction n'est pas très étendu, ce qui en fait un inhibiteur de MMPs d'intérêt. Pour pouvoir estimer les IC₅₀ obtenus en concentrations molaires et relier l'activité à une structure, nous avons procédé à des analyses complémentaires de la fraction 68-95.

III.2.3.6.3 Analyses structurales de la fraction 68-95

Nous avons réalisé une analyse par RMN de la fraction dans un mélange H₂O 5% D₂O, ce qui nous permet de conserver les signaux des NH des liaisons peptidiques. Ainsi que des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF (utilisant une matrice d'acide 2,5-dihydrobenzoïque).

Il s'est avéré que cette fraction était largement polluée par une paire d'ions DEHPA/TEA, visible en RMN (Annexe 6) et en masse (pic moléculaire à 322,4 g.mol⁻¹). Cette paire d'ions est totalement soluble dans l'eau et transparente aux UV, c'est la raison pour laquelle nous n'avons pas suspecté une telle pollution.

III.2.3.6.3.1 Origine de la pollution par la paire d'ions DEHPA/TEA

Il nous faut comprendre d'où provient cette pollution et surtout quels sont les mécanismes qui y conduisent. En réalisant un mélange DEHPA/eau, un système biphasique est obtenu. En ajoutant des quantités croissantes de TEA, le système devient monophasique, c'est-à-dire que la paire d'ions DEHPA/TEA se solubilise dans l'eau. Il doit donc exister au sein de notre colonne CPC une bande de TEA qui lorsqu'elle atteint une certaine concentration critique entraîne la solubilisation d'une quantité de DEHPA.

En analysant l'expérience de MIXCPC ayant servi au fractionnement du F 3s nous remarquons que la fraction 68-95 émerge dès l'ajout du premier déplaceur (chlorure de calcium) et s'étend jusque 30 minutes après cet ajout. Nous pouvons alors penser que le calcium introduit dans la colonne va déplacer la TEA répartie dans l'ensemble de la colonne pour former une bande de déplacement contenant la TEA, et aboutissant à l'augmentation de la concentration de celle-ci. Ce phénomène est d'autant plus important qu'une partie de la colonne contient jusque 30 % de TEA.

La formation de la bande de déplacement de la TEA va entraîner ainsi la solubilisation d'une partie de l'échangeur en phase mobile et donc la pollution de la fraction faisant directement suite à l'introduction du premier déplaceur.

Il sera donc important de garder à l'esprit l'existence de ce phénomène lors de la mise au point d'un procédé de purification ou de capture utilisant l'échange d'ions mixte avec une phase stationnaire segmentée. Néanmoins, lorsque le produit d'intérêt à capturer ou purifier est clairement identifié, ce genre de pollution de la fraction d'intérêt a très peu de chance de se produire. En effet, la fraction polluée ici est celle correspondant à la fin de la phase de lavage, hors lorsqu'un procédé par échange d'ions est développé pour un produit donné, ce produit est retenu en phase stationnaire et sera donc déplacé après la TEA et donc après la pollution. Ce fut d'ailleurs le cas pour les fractions enrichies en VW et celles de dirucotide où les analyses RMN n'ont pas révélées de telles pollutions.

Le seul cas de figure où une pollution serait envisageable est que le produit d'intérêt forme une paire d'ions d'affinité inférieure à celle formée par la TEA avec le DEHPA, c'est-à-dire très faible.

Néanmoins, cette pollution de notre fraction soulève la question de l'activité biologique, qui peut être potentiellement attribuée à la pollution.

Pour vérifier cette hypothèse, il nous a fallu dans un premier temps dépolluer la fraction 68-95.

III.2.3.6.3.2 Dépollution de la fraction 68-95

Protocole de dépollution

La fraction 68-95 est solubilisée dans un volume d'environ 10 ml d'eau. Le pH de cette solution est ajusté à 2 par addition d'un volume adéquat d'HCl. Cette solution est ensuite extraite 3 fois par un volume de MtBE équivalent.

La phase aqueuse obtenue est ensuite ajustée à pH 9 par addition d'une quantité appropriée de NaOH, puis mise à sec et tirée sous vide pendant 20 min.

Pour dissocier la paire d'ions DEHPA/TEA, la solution aqueuse obtenue par solubilisation de la fraction 68-95 dans de l'eau est acidifiée avec de l'HCl. L'échangeur repasse alors sous forme acide et redevient ainsi très peu miscible à l'eau, ce qui se traduit par l'apparition d'un trouble important de la solution. Après les extractions successives par le MtBE, la solution redevient limpide. Après analyse RMN de la phase aqueuse, la quasi-totalité du DEHPA a été ainsi éliminé, reste la TEA en quantité importante (Annexe 7).

La TEA est présente sous forme de sels de chlorure dans cette solution. La TEA base est une base organique volatile. Ainsi pour éliminer la TEA, le pH de la solution aqueuse de la fraction 68-95 sans DEHPA est ajusté à 9 pour régénérer la TEA sous forme base, puis séchée et tirée sous vide pour éliminer la TEA volatile. Après analyse RMN et par spectrométrie de masse, la totalité de la TEA a été éliminée de la fraction (Annexe 8).

La nouvelle fraction 68-95 dépolluée est alors testée avec une solution de DEHPA en paire d'ion avec la TEA comme contrôle.

III.2.3.6.4 Test après dépollution

Nous avons testé l'activité de la fraction dépolluée sur l'HLE et la MMP-7, enzymes pour lesquelles la fraction polluée avait l'activité inhibitrice la plus marquée. Pour avoir des résultats très marqués, la concentration test de la fraction test est fixée à 50 µg/ml, de même pour la solution témoin de DEHPA/TEA. Ces tests ont été réalisés avec la solution de la fraction 68-95 polluée comme témoin.

Tableau 50 : Contrôle de l'activité de la fraction 68-95 dépolluée.

Enzyme	Activité inhibitrice		
	Fr 68-95 polluée 13 µg/ml	DEHPA/TEA 50 µg/ml	Fr 69-95 dépolluée 50 µg/ml
HLE	80 %	65 %	44 %
MMP-7	55 %	85 %	43 %

Si la fraction 68-95 en elle-même est active, nous devrions observer une augmentation très nette de l'activité inhibitrice, les composés présents dans la fraction étant beaucoup plus concentrés.

Nous pouvons remarquer dans le tableau ci-dessus que ce n'est malheureusement pas le cas. Dans les deux cas, le DEHPA en paire d'ions avec la TEA présente une activité inhibitrice élevée sur les cibles, ceci est d'autant plus marqué pour la MMP-7.

Parallèlement, la fraction dépolluée présente une activité inférieure, dans une proportion certes variable, par rapport à la fraction polluée alors que la concentration testée de cette dernière est cinq fois inférieure.

L'activité inhibitrice est donc majoritairement le fait de la pollution par le DEHPA en paire d'ions avec la TEA. Ceci n'est pas surprenant puisque plusieurs études ont montré une activité inhibitrice de composés porteurs d'une chaîne lipidique vis-à-vis de ces mêmes enzymes. Ainsi Suzuki *et al.* ont montré qu'un traitement par l'acide oléique était à l'origine d'une diminution de l'activité des MMP-2 et -9 lors de la progression métastatique du cancer du poumon,²⁸ Berton *et al.* ont également montré une inhibition de ces mêmes MMPs par des acides gras insaturés,²⁹ enfin Cauchard *et al.* ont montré l'activité inhibitrice de glycolipides issus du gluten de blé vis-à-vis des diverses MMPs impliquées dans le vieillissement cutané.²²

III.2.4 Conclusion

Après investigations du potentiel antioxydant et de l'activité antiprotéasique, nous avons isolé un **extrait brut d'intérêt : le brut F 3s**. Cet extrait présente un **potentiel antioxydant** qui, s'il n'est pas très puissant, est néanmoins non négligeable avec une **EC₅₀ = 125 µg/ml**. **L'activité inhibitrice vis-à-vis de la MMP-1**, cible majeure des agents anti-âge, est importante avec une **IC₅₀ inférieure à 20 µg/ml**, ce qui est plutôt élevé pour un extrait brut. Également **l'activité du F 3s vis-à-vis de la MMP-3 cat.** si elle est confirmée sera particulièrement à étudier avec une **IC₅₀ inférieure au microgramme**.

Le brut F 3s constitue ainsi un **"agent" dermo-cosmétique potentiel** présentant un **spectre d'activité anti-protéasique restreint**.

Des fractions issues de ce brut, seule la **fraction 132-154** semble se distinguer. Sa très grande sélectivité ainsi que son activité anti-MMP-3 restent à confirmer dès que les problèmes d'activités rencontrés avec la MMP-3 cat. seront réglés.

III.3 Evaluation de l'hydrolysate de protéine blanche

L'hydrolysate que nous avons à notre disposition contient, nous l'avons vu précédemment, un dipeptide VW présentant une activité inhibitrice importante vis-à-vis de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ou ACE, avec un IC₅₀ de 1,1 µM.³⁰ L'ACE est également une métalloprotéase à Zinc tout comme les MMPs. Une activité de ce peptide sur les MMPs est donc à envisager, nous avons

donc testé l'hydrolysate et les fractions enrichies en VW et en un tétrapeptide comme inhibiteurs de MMPs potentiel.

Nous avons également réalisé en parallèle l'étude du potentiel antioxydant de ces fractions, certains hydrolysats de protéines blanches de luzerne ayant montré des activités antioxydantes très importantes.²¹

III.3.1 Rappel sur le matériel à tester

Nous avons testé l'hydrolysate seul, et certaines fractions issues de la capture par MIXCPC (II.2.1.3.3).

L'hydrolysate de protéines blanches est obtenu par digestion enzymatique par une Delvolase. Il est composé de 90 % de peptides de masse moléculaire moyenne 600 g.mol⁻¹.

Les fractions testées sont celles issues de la montée en échelle du procédé de capture, leurs caractéristiques sont rappelées dans le tableau suivant.

Tableau 51: Récapitulatif des fractions de l'hydrolysate de protéine blanche testées biologiquement.

Fraction	Masse (mg)	Information
379-383	25,1 mg	Contient le VW (11 %)
362-369	68,8 mg	Contient le peptide de 495 g.mol ⁻¹

III.3.2 Evaluation des activités biologiques

III.3.2.1 Evaluation du potentiel antioxydant

L'évaluation du potentiel antioxydant de l'hydrolysate et des fractions a été réalisé selon le protocole décrit paragraphe III.2.2.2.1.

L'hydrolysate, tout comme les fractions enrichies, ont été testés dans une gamme de concentration allant de 62,5 µg/ml à 1 mg/ml. Même à la concentration de 1 mg/ml, la proportion de DPPH capté était tout au plus de 15 % pour l'hydrolysate et les fractions.

Ces résultats ont confirmé les données déjà disponibles sur le potentiel antioxydant de cet hydrolysate particulier.³⁰

Ces extraits ne présentent donc aucune activité antioxydante notable. La différence avec les hydrolysats de protéine blanche décrits comme antioxydant dans la littérature réside dans le protocole d'hydrolyse, et notamment dans l'enzyme ou le mélange enzymatique utilisé.

III.3.2.2 Evaluation du potentiel en tant qu'inhibiteur enzymatique

Le peptide VW est un inhibiteur puissant de l'ACE avec un $IC_{50} = 1 \mu M$, ce qui est déjà bas pour un peptide naturel. L'ACE nous l'avons déjà mentionné est une métalloprotéase à zinc tout comme les MMPs. Les inhibiteurs de l'ACE commercialisés comme médicaments antihypertenseur sont pour la plupart des dipeptides modifiés, comme l'énalapril ou le lisinopril. Au niveau du site de clivage de l'ACE, le résidu tryptophane (W) est retrouvé en P2' surtout et la valine est peu fréquente (données MEROPS).

Nous avons donc testé l'hydrolysate et les deux fractions 379-383 et 362-369 sur différentes enzymes impliquées dans le vieillissement cutané : plasmine, MMP-1 et MMP-3.

Trois concentrations ont été testées pour l'hydrolysate 10 $\mu g/ml$, 100 $\mu g/ml$ et 1 mg/ml .

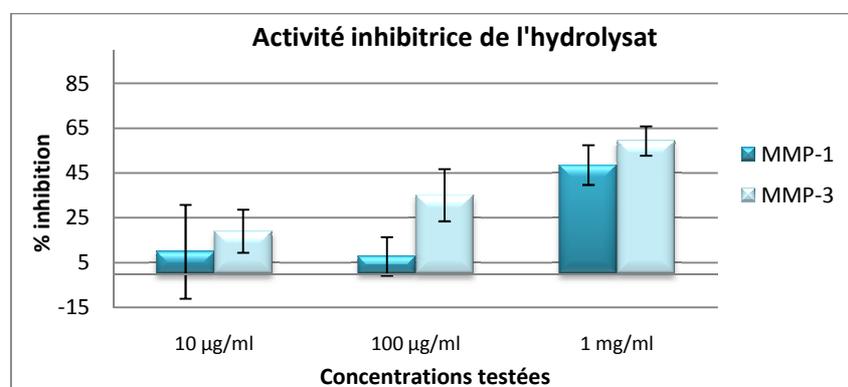


Figure 134 : Activité inhibitrice de l'hydrolysate de protéines blanche de luzerne sur la MMP-1 et la MMP-3 cat.

L'hydrolysate n'a aucun effet inhibiteur vis-à-vis de la plasmine, même à la concentration de 1 mg/ml . Sur les MMP-1 et -3 catalytique, il existe un effet inhibiteur de l'hydrolysate avec pour les deux enzymes des IC_{50} proches de 1 mg/ml . L'activité inhibitrice de l'hydrolysate est donc peu marquée.

Nous avons alors testées les fractions enrichies sur les MMP-1 et la MMP-3 catalytique et également sur la MMP-2, enzyme dont la structure de la poche du site actif est la plus proche de celle de l'ACE. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 52 : Activités inhibitrices des fractions 362-369 et 379-383 vis-à-vis des MMP-1 et -3 cat.

Fraction testée	Activité inhibitrice		
	MMP-1	MMP-3 cat.	MMP-2
fr 362-369	15 % d'inhibition à 495 $\mu g/ml$	$IC_{50} = 4,4 \mu g/ml$	13 % d'inhibition à 495 $\mu g/ml$
fr 379-383	$IC_{50} = 302 \mu g/ml$	$IC_{50} = 208 \mu g/ml$	19 % d'inhibition à 675 $\mu g/ml$

La fraction 362-369 présente une activité intéressante vis-à-vis de la MMP-3 catalytique avec un IC_{50} inférieur à 5 $\mu g/ml$. Nous n'avons pas pu confirmer l'activité de cette fraction sur la MMP-3 catalytique pour les mêmes raisons que précédemment. Nous pouvons quand même noter que cette

fraction semble avoir une plus grande spécificité d'action, l'activité sur la MMP-1 et sur la MMP-2 étant quasiment inexistantes. Il nous faudra donc là encore confirmer les résultats obtenus sur la MMP-3 catalytique avant de tester un panel de MMPs, et enfin de passer aux tests sur cellules.

La fraction enrichie en peptide VW (fr 379-383) montre une activité inhibitrice peu prononcée sur les deux MMP-1 et -3, avec des IC_{50} proches de 300 et 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Cette fraction ne contenant néanmoins que 11 % du peptide VW bioactif, nous ne pouvons pas conclure quant à l'activité du peptide VW en lui-même. Il serait intéressant de tester le peptide VW pur pour comparer son activité avec celle de la fraction, ce que par manque de temps nous n'avons pu réaliser.

III.3.3 Conclusion

Les fractions issues de l'hydrolysat de protéines blanches de luzerne ont montré des activités variées. Une **absence totale d'activité antioxydante** a été constatée pour l'ensemble des fractions testées.

La **fraction 362-369** a montré une **activité inhibitrice prometteuse vis-à-vis de la MMP-3**, qui nécessitera d'être confirmée avant de poursuivre plus avant les tests.

III.4 L'hydrolysat de PX

L'investigation de l'activité biologique de l'hydrolysat de concentré de protéine-xanthophylle (PX) en tant qu'agent anti-âge potentiel a tourné très vite court :

- l'hydrolysat de PX ainsi que toutes ces fractions ne présentent aucune activité antioxydante même pour des concentrations atteignant 1 mg/ml ;
- l'hydrolysat ne présente aucune activité inhibitrice vis-à-vis de la plasmine, de la MMP-1 et de la MMP-3 pour de concentrations allant jusque 250 $\mu\text{g/ml}$.

L'hydrolysat de PX ne présente donc aucun intérêt flagrant pour une valorisation dans le domaine dermo-cosmétique.

Une autre voie de valorisation de cet hydrolysat est en cours d'exploration par l'équipe Stress, Défenses et Reproduction des Plantes - EA 2069 (Pr Baillieul) : utilisation en tant qu'agent phytosanitaire vert à visée antifongique. La viticulture est en effet la pratique agricole la plus consommatrice en agents phytosanitaires. La mise en place d'une viticulture raisonnée passe donc par la recherche de traitements plus respectueux de l'environnement. Ainsi l'équipe du Pr Clément se sont spécialisés dans la recherche de molécules vertes à activité de type élicitrice, c'est-à-dire stimulant les défenses naturelles des plantes. Dans ce cadre, l'hydrolysat de PX a été testé et les premiers résultats obtenus se sont avérés très positifs.

III.5 Conclusion

Les extraits de luzerne ont montré pour certains un intérêt potentiel en tant qu'agent anti-âge.

Le **brut F 3s issu du sérum de luzerne** présente un intérêt certain de par son **potentiel antioxydant et ses activités antiprotéasiques** vis-à-vis notamment de la MMP-1. Il est en effet tout à fait envisageable d'utiliser un extrait complexe en cosmétique même si la tendance actuelle tend vers l'identification de toutes les substances actives introduites dans les formulations dermo-cosmétique.

La **fraction 132-154** a montré un **début d'activité prometteur sur la MMP-3**, qui doit être confirmé avant de tester les produits purs issus du polissage de la fraction. Cette fraction présente une activité antioxydante beaucoup plus faible que le brut.

En ce qui concerne les fractions issues du fractionnement de l'hydrolysate de protéines blanches, en particulier la **fraction 362-369** contenant le **peptide de masse moléculaire 495 g.mol⁻¹** a montré une **activité particulièrement sélective vis-à-vis de la MMP-3, avec un IC₅₀ de l'ordre de quelques µg/ml**. Là encore la spécificité d'action montrée est porteuse d'un intérêt certain, mais les résultats doivent être confirmés sur la MMP-3 avant de poursuivre plus avant nos investigations, notamment le fractionnement de cette fraction.

La valorisation d'une partie du pool peptidique de luzerne en tant qu'agent cosmétique potentiel a ainsi été amorcée et serait déjà plus avancée sans les soucis techniques rencontrés. Néanmoins ce travail a permis d'ouvrir de nouvelles voies d'exploration possibles pour les peptides de luzerne.

Nous pouvons également mentionner la valorisation de l'hydrolysate de PX en tant qu'agent phytosanitaire potentiel pour le traitement des vignes de Champagne.

Références bibliographiques

1. Dubertret, L., La peau. In *Encyclopedia Universalis*, **2005**.
2. Makrantonaki, E.; Zouboulis, C. C., Molecular Mechanisms of Skin Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2007**, *1119* (Molecular Mechanisms and Models of Aging), 40-50.
3. Baumann, L., Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology* **2007**, *211* (2), 241-251.
4. Labat-Robert, J.; Robert, L., La matrice extracellulaire. In *Encyclopedia universalis*, **2005**.
5. Duca, L.; Floquet, N.; Alix, A. J. P.; Haye, B.; Debelle, L., Elastin as a matrikine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2004**, *49* (3), 235-244.
6. Robert, L.; Hornebeck, W., L'élastine. In *Encyclopedia Universalis*, **2005**.
7. Robert, L., Le collagène. In *Encyclopedia Universalis*, **2005**.
8. Maquart, F. X.; Bellon, G.; Pasco, S.; Monboisse, J. C., Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **2005**, *87* (3-4), 353-360.
9. Sardy, M., Role of Matrix Metalloproteinases in Skin Ageing. *Connective Tissue Research* **2009**, *50* (2), 132-138.
10. Nagase, H.; Visse, R.; Murphy, G., Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* **2006**, *69* (3), 562-573.
11. Khasigov, P. Z.; Podobed, O. V.; Ktsoeva, S. A.; Gatagonova, T. M.; Grachev, S. V.; Shishkin, S. S.; Berezov, T. T., Matrix Metalloproteinases of Normal Human Tissues. *Biochemistry (Moscow)* **2001**, *66* (2), 130-140.
12. Murphy, G.; Nagase, H., Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine* **2008**, *29* (5), 290-308.
13. Borkakoti, N., Structural studies of matrix metalloproteinases. *Journal of Molecular Medicine* **2000**, *78* (5), 261-268.
14. Ra, H.-J.; Parks, W. C., Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology* **2007**, *26* (8), 587-596.

15. Sela-Passwell, N.; Rosenblum, G.; Shoham, T.; Sagi, I., Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: Can it pave the path for selective inhibition? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2010**, *1803* (1), 29-38.
16. Murphy, G. Regulation of Proteinase Function at the Cell Surface. http://www-medchem.ch.cam.ac.uk/lab_rotations/murphy.php (accessed 16/08/2010).
17. Jenkins, G., Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **2002**, *123* (7), 801-810.
18. Liu, Z.-Q., Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (10), pp 5675–5691.
19. Vercruyssen, L.; Smagghe, G.; Beckers, T.; Camp, J. V., Antioxidative and ACE inhibitory activities in enzymatic hydrolysates of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *Food Chemistry* **2009**, *114* (1), 38-43.
20. Tang, X.; He, Z.; Dai, Y.; Xiong, Y. L.; Xie, M.; Chen, J., Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *58* (1), 587-593.
21. Xie, Z.; Huang, J.; Xu, X.; Jin, Z., Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry* **2008**, *111* (2), 370-376.
22. Zèches-Hanrot, M.; Hornebeck, W.; Renault, J.-H.; Cauchard, J.-H.; Delannay, E.; Martel, F. Nouvelles utilisations de dérivés de glycérol, notamment dans le domaine cosmétique, FR2886846 (A1) **2006**.
23. Behr, S.; Duret, P.; Gendron, N.; Guay, J.; Lavalley, B.; Page, B. Plant extracts having matrix metalloproteinase inhibiting activity and dermatological uses thereof, WO 2006/053415 A1. **2006**.
24. Maquart, F.-X.; Pasco, S.; Ramont, L.; Hornebeck, W.; Monboisse, J.-C., An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity: Implication in tumor invasion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2004**, *49* (3), 199-202.
25. Jimenez, F.; Mitts, T. F.; Hinek, A. Plant-Derived Elastin Binding Protein Ligands And Methods of Using The Same, Brevet WO 2006/113681 A2. **2006**.

26. Pellenc, D.; Schmitt, E.; Gallet, O., Purification of a plant cell wall fibronectin-like adhesion protein involved in plant response to salt stress. *Protein Expression and Purification* **2004**, 34 (2), 208-214.
27. Lee, S. K.; Mbwambo, Z.; Chung, H.; Luyengi, L.; Gamez, E.; Metha, R.; Douglas, K.; Pezzuto, J., Evaluation of the Antioxidant Potential of Natural Products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **1998**, 1, 35-46.
28. Suzuki, I.; Iigo, M.; Ishikawa, C.; Kuhara, T.; Asamoto, M.; Kunimoto, T.; Moore, M. A.; Yazawa, K.; Araki, E.; Tsuda, H., Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: **1997**; Vol. 73, pp 607-612.
29. Berton, A.; Rigot, V. r.; Huet, E.; Decarme, M.; Eeckhout, Y.; Patthy, L. s.; Godeau, G.; Hornebeck, W.; Bellon, G.; Emonard, H., Involvement of Fibronectin Type II Repeats in the Efficient Inhibition of Gelatinases A and B by Long-chain Unsaturated Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (23), 20458-20465.
30. Kapel, R.; Chabeau, A.; Lesage, J.; Riviere, G.; Ravallec-Ple, R.; Lecouturier, D.; Wartelle, M.; Guillochon, D.; Dhulster, P., Production, in continuous enzymatic membrane reactor, of an anti-hypertensive hydrolysate from an industrial alfalfa white protein concentrate exhibiting ACE inhibitory and opioid activities. *Food Chemistry* **2006**, 98 (1), 120-126.

| Conclusion générale

Conclusion générale

Ce projet de valorisation de pool peptidique de la luzerne, thématique initiale de ce travail, a conduit, au fil de l'avancement des études menées, à des développements allant au-delà de ceux imaginés dans un premier temps, notamment pour ce qui est du volet chimie de séparation. Ainsi, deux grandes parties se sont dégagées :

- la **mise au point d'une nouvelle méthodologie** de purification de peptides utilisant la CPC en mode échange d'ions, associée à des développements méthodologiques et des applications industrielles, d'une part;
- l'**évaluation biologique** des extraits et fractions en tant qu'agent anti-âge potentiel d'autre part.

Le volet "chimique" du projet de thèse a abouti à la mise au point d'un procédé innovant d'isolement et de purification de peptides : **la CPC en mode échange d'ions mixte (MIXCPC)** utilisant une **phase stationnaire homogène ou segmentée**. Le concept d'échange d'ions mixte a ainsi été pour la première fois mis en œuvre en CPC, apportant ainsi de la **modularité** au procédé par échange d'ions classique, en permettant de l'adapter au mieux au problème de purification proposé (capture, polissage, peptides polaires ou apolaires, de taille variées etc.).

Les **interactions échangeur/peptides mises en jeu** au cours du procédé chromatographique ont été étudiées par une étude de leur **comportement diffusionnel par RMN DOSY**. Nous avons ainsi pu confirmer le postulat selon lequel **des paires d'ions étaient à l'origine de l'extraction des peptides** en phases organique. Cette étude constitue un point de départ qui pourra être appliqué ensuite aux autres couples échangeurs/analytes déjà décrits.

Le procédé par échange d'ions développé a ensuite été appliqué à différentes problématiques de purification de peptides :

- la **capture d'un peptide bioactif VW** au sein d'un hydrolysate complexe, avec un **facteur d'enrichissement d'environ 40** en une seule étape, démontrant ainsi le potentiel en termes de **sélectivité** de la technique ;
- le **polissage d'un peptide d'intérêt pharmaceutique**, le dirucotide, en collaboration avec la société Lonza, permettant ainsi de montrer l'intérêt du mode échange d'ions en CPC pour **l'élimination d'impuretés critiques**, qui en CLHP étaient partiellement co-éluées avec le produit d'intérêt, et ce en conservant une **productivité** compatible avec l'exploitation industrielle;
- le **fractionnement d'extraits** issus du procédé industriel de luzerne : le sérum et l'hydrolysate de PX.

La productivité sera néanmoins à améliorer dans le cas de l'échange d'ions, les débits de travail étant particulièrement faibles. Des travaux réalisés au laboratoire sur l'Extracteur de Partage Centrifuge ont d'ores et déjà montré que l'augmentation des débits jusqu'à 50 ml/min est possible sur un appareil au design adapté.

Un autre type de peptide a également été étudié : il s'agit d'un **peptide entièrement protégé**, de type ciclosporine modifiée. Ce projet a permis la mise en évidence du verrou technologique majeur constitué par les **phénomènes de pulsations** au sein de la colonne de CPC. Une **solution palliative** a été trouvée dans notre cas : l'application d'un **co-courant** de phase stationnaire permettant la compensation de la perte de phase stationnaire induite par les pulsations tout en réduisant significativement ces dernières. Néanmoins la compréhension du phénomène sera indispensable avant toute industrialisation de la technologie CPC.

Le développement du mode échange d'ions en CPC, pour la purification de peptides, a été initiateur d'une collaboration importante et fructueuse avec la société Lonza (Viège, Suisse).

Le volet "évaluation biologique" a consisté en un **criblage du potentiel antioxydant et de l'activité antiprotéasique** des extraits de luzerne et des fractions obtenues par MIXCPC : extraits de sérum, hydrolysats de protéines blanches, hydrolysats de PX.

L'extrait nommé **brut F 3s**, issu d'un **pré-conditionnement du sérum** de luzerne, s'est ainsi révélé un **agent anti-âge prometteur**. Cet extrait présente un **potentiel antioxydant** notable (**EC₅₀ 125 µg/ml**) associé à une activité **antiprotéasique** dirigée essentiellement contre la **MMP-1 (IC₅₀ = 17 µg/ml)**, cible majeure dans la lutte contre le vieillissement cutané. Il possède également une activité inhibitrice vis-à-vis de la **MMP-3 cat. (IC₅₀ = 0,026 µg/ml)** qui devra faire l'objet d'une confirmation.

La **fraction 132-154**, issue du fractionnement par MIXCPC du brut F 3s, a quant à elle montré une **spécificité d'action sur la MMP-3 cat.**, qui devra également être confirmée.

L'hydrolysats de protéines blanches ainsi que la fraction enrichie en VW n'ont pas présenté d'activité susceptible de nous intéresser dans le cadre d'un développement en dermo-cosmétique. En revanche, la **fraction enrichie en un peptide de masse molaire 495 g.mol⁻¹** a montré une activité inhibitrice marquée (**IC₅₀ = 4,4 µg/ml**) là encore vis-à-vis de la **MMP-3 cat.**

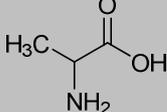
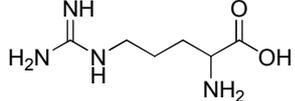
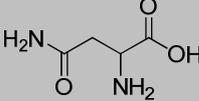
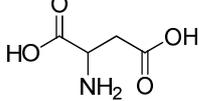
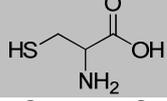
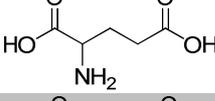
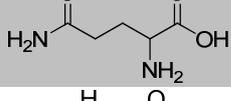
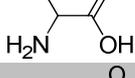
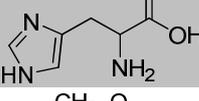
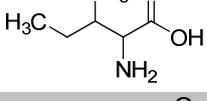
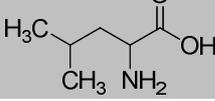
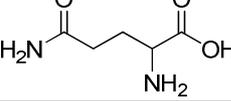
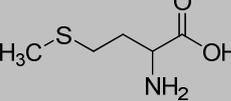
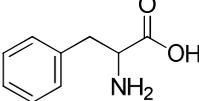
Enfin l'**hydrolysats de PX**, s'il n'a pas présenté d'activité notable lors de nos criblages, a été testé comme **agent phytosanitaire vert** (Equipe SDRP Pr Baillieux) pour le traitement de la vigne. Les premiers résultats sur le **mildiou** notamment ont été très positifs.

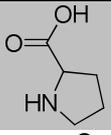
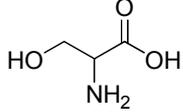
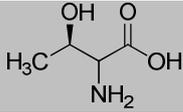
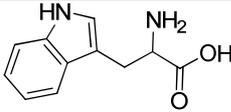
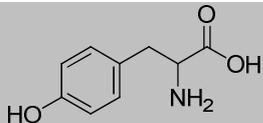
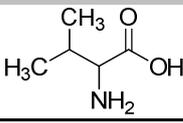
Ainsi des voies de valorisation potentielles des extraits peptidiques de luzerne ont commencé à se dessiner : agent cosmétique anti-âge pour le sérum et agent phytosanitaire vert pour l'hydrolysats de PX.

| Annexes

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des acides aminés standards.

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	pI	Formule
Alanine	A	Ala	89,1	6,1	
Arginine	R	Arg	174,2	10,7	
Asparagine	N	Asn	132,1	5,4	
Aspartate	D	Asp	133,1	2,8	
Cystéine	C	Cys	121,2	5,0	
Glutamate	E	Glu	147,1	3,1	
Glutamine	Q	Gln	146,1	5,6	
Glycine	G	Gly	75,1	6,1	
Histidine	H	His	155,2	7,6	
Isoleucine	I	Ile	131,2	6,0	
Leucine	L	Leu	131,2	6,0	
Lysine	K	Lys	146,2	9,6	
Méthionine	M	Met	149,2	5,7	
Phénylalanine	F	Phe	165,2	5,5	

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	pI	Formule
Proline	P	Pro	115,1	6,3	
Sérine	S	Ser	105,1	5,7	
Thréonine	T	Thr	119,1	5,6	
Tryptophane	W	Trp	204,2	5,9	
Tyrosine	Y	Tyr	181,2	5,6	
Valine	V	Val	117,1	6,0	

Annexe 2 : Fiche technique du sérum fourni

FICHE TECHNIQUE**PEP15**
Source azotée issue de la luzerne

VIRIDIS S.A.
Aulnay aux Planches
51130 VAL DES MARAIS
Tél : (33) 03 26 52 98 10
Fax : (33) 03 26 59 39 91
E-mail : viridis.fermentation@wanadoo.fr

Définition :

Le PEP15 est obtenu par séparation solide-liquide de la luzerne.

Description :

Poudre fine de couleur ocre contenant un ensemble de peptides, de sucres et de vitamines.

Caractéristiques physico-chimiques :

MS	(%)	:	>93%
Matière azotée totale (N×6,25)	(% MS)	:	20% ± 2
Matière minérale	(% MS)	:	26% ± 2
Sucres totaux (Type saccharose)	(% MS)	:	13% ± 1
Fibres totales	(% MS)	:	<5%
Acides organiques libres (équivalent acide lactique)	(% MS)	:	8% ± 2
Rapport C/N		:	11 ± 1
pH	(solution à 10%)	:	5.8 ± 0.2

Microbiologie

Germes aérobies totaux	≤ 10 000 /g
Coliformes totaux	< 10 /g
<i>Escherichia coli</i>	< 10 /g
Staphylocoques coagulase positive	< 10 /g
Anaérobie Sulfito Réducteur	< 10 /g
Levures et moisissures	< 10 /g
<i>Salmonella</i>	Absence / 25g

Conditionnement et stockage :

Conditionnement en sacs avec doublure polyéthylène de 25kg net.

Stockage à température ambiante, à l'abri de la chaleur et de l'humidité.

Bien refermer après chaque utilisation.

Produit hygroscopique.

Précautions d'emploi :

Poudre pulvérulente.

Limiter l'inhalation.

Les informations contenues dans ce document sont conformes à nos connaissances actuelles (Données à titre indicatif). Les utilisateurs ont la responsabilité de conduire leurs propres tests pour déterminer les conditions d'utilisation selon leurs usages spécifiques.

Les méthodes d'analyse sont accessibles sur demande.

Annexe 3 : Information sur la composition en peptides du sérum

INFORMATIONS SPECIFIQUES

PEP15

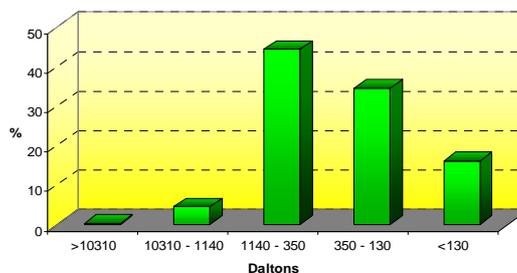
Source azotée issue de la luzerne

Définition et utilisation :

Le PEP15 est issu du fractionnement de la luzerne en voie humide et constitue un apport en azote organique et en facteurs de croissance recommandé pour les milieux de culture destinés aux industries de la fermentation.

Distribution peptidique (%)

> 10310 daltons	0.3
1140 – 10300 daltons	4.5
350 – 1140 daltons	44.5
130 – 350 daltons	34.6
< 130 daltons	16.1

**Aminogramme : Totaux (g/16g N)**

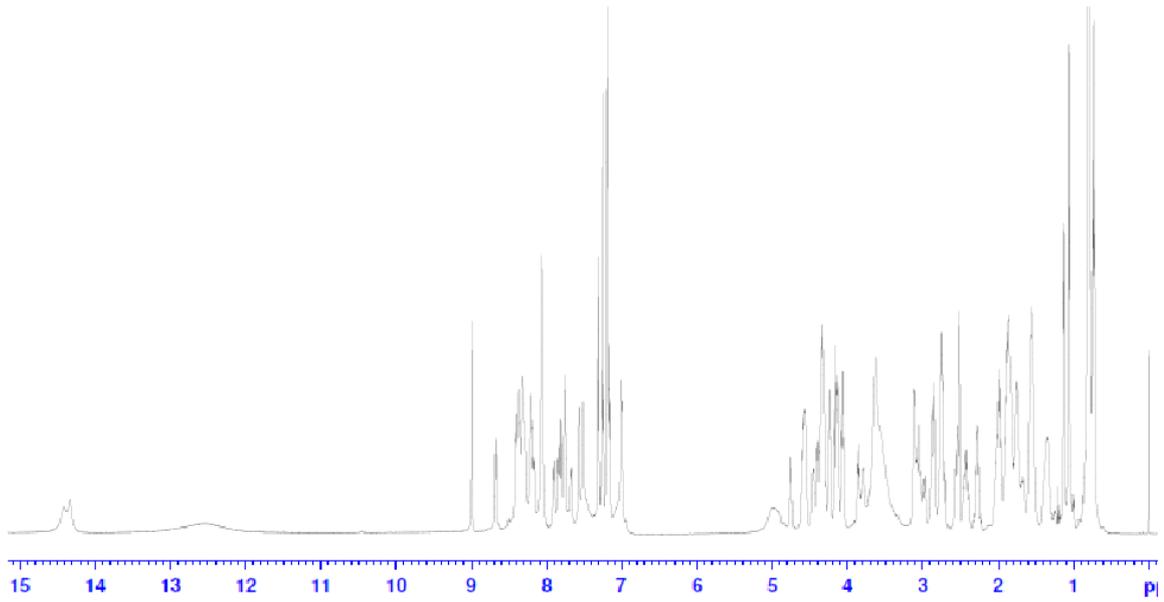
Alanine	3.58
Arginine	1.77
Acide aspartique	12.07
Cystine	0.95
Acide glutamique	5.82
Glycine	2.34
Histidine	0.95
Isoleucine	1.81
Leucine	2.82
Lysine	2.48
Méthionine	0.38
Phénylalanine	2.00
Proline	2.96
Sérine	2.82
Thréonine	2.53
Tryptophane	0.86
Tyrosine	1.53
Valine	2.39

Les informations contenues dans ce document sont conformes à nos connaissances actuelles (Données à titre indicatif). Les utilisateurs ont la responsabilité de conduire leurs propres tests pour déterminer les conditions d'utilisation selon leurs usages spécifiques.

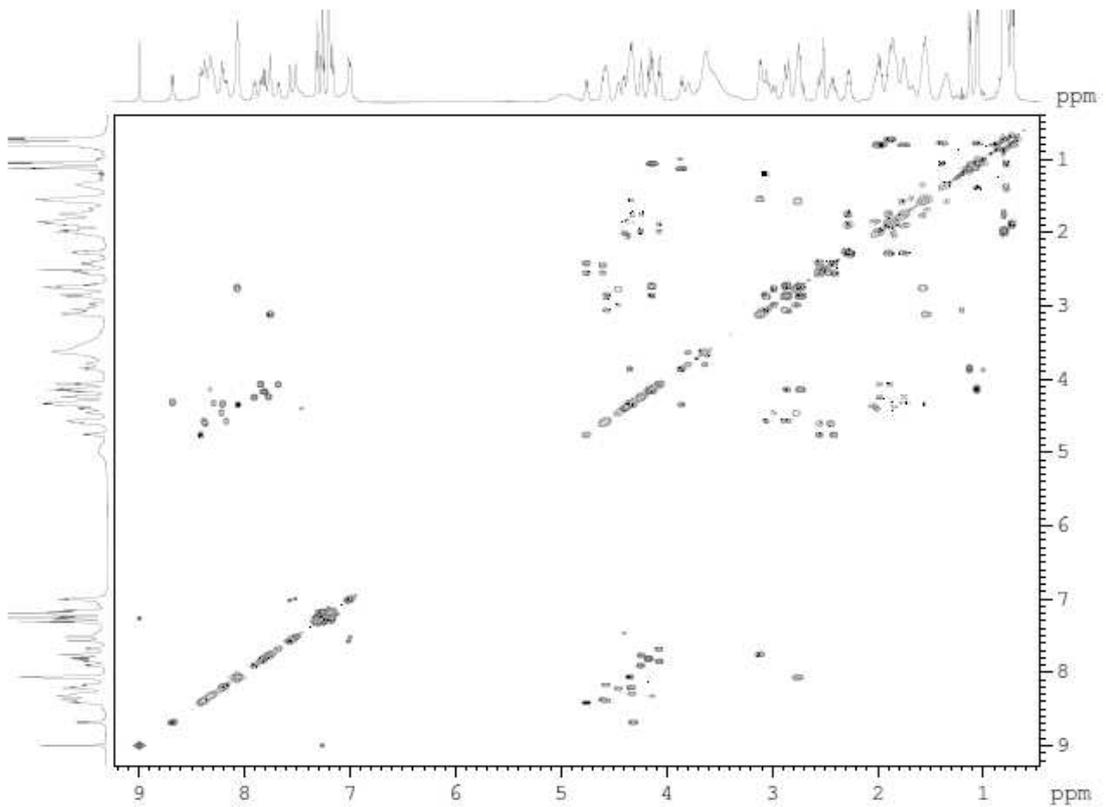


VIRIDIS S.A.
Aulnay aux Planches
51130 VAL DES MARAIS
Tél : (33) 03 26 52 98 10
Fax : (33) 03 26 59 39 91
E-mail : viridis.fermentation@wanadoo.fr

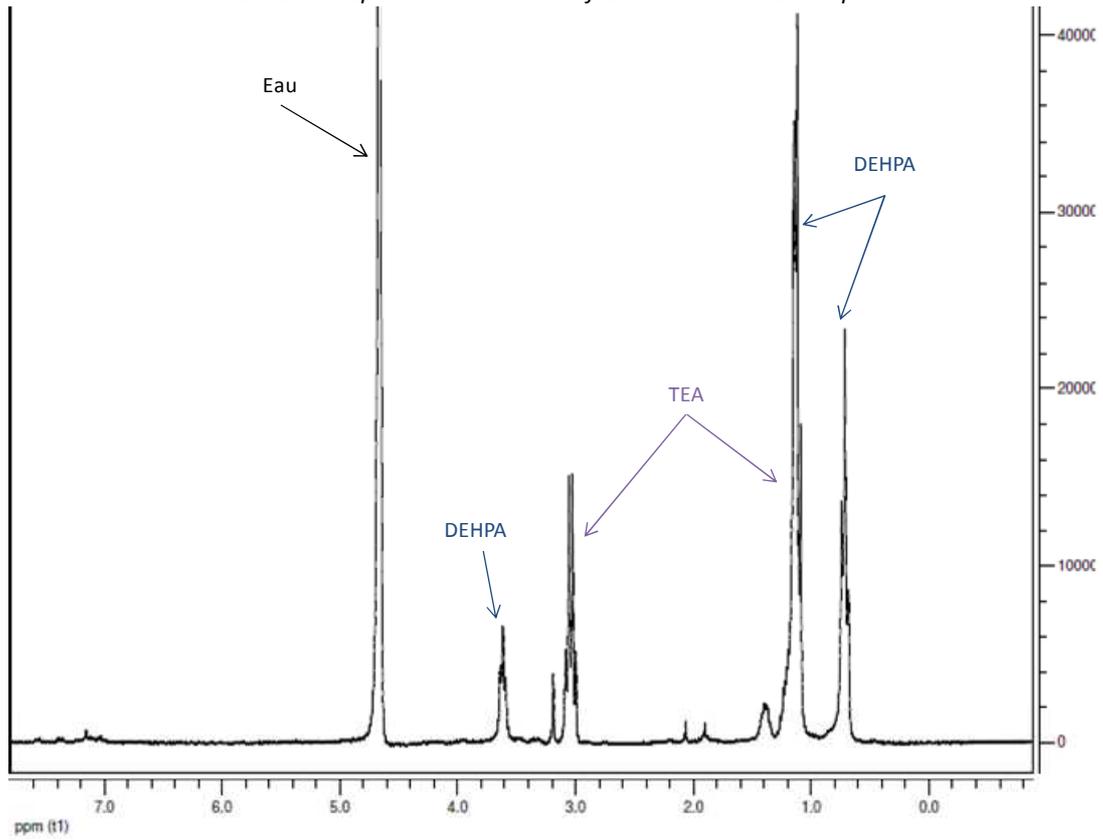
Annexe 4 : Spectre RMN ^1H du peptide SF 328 ou dirucotide.



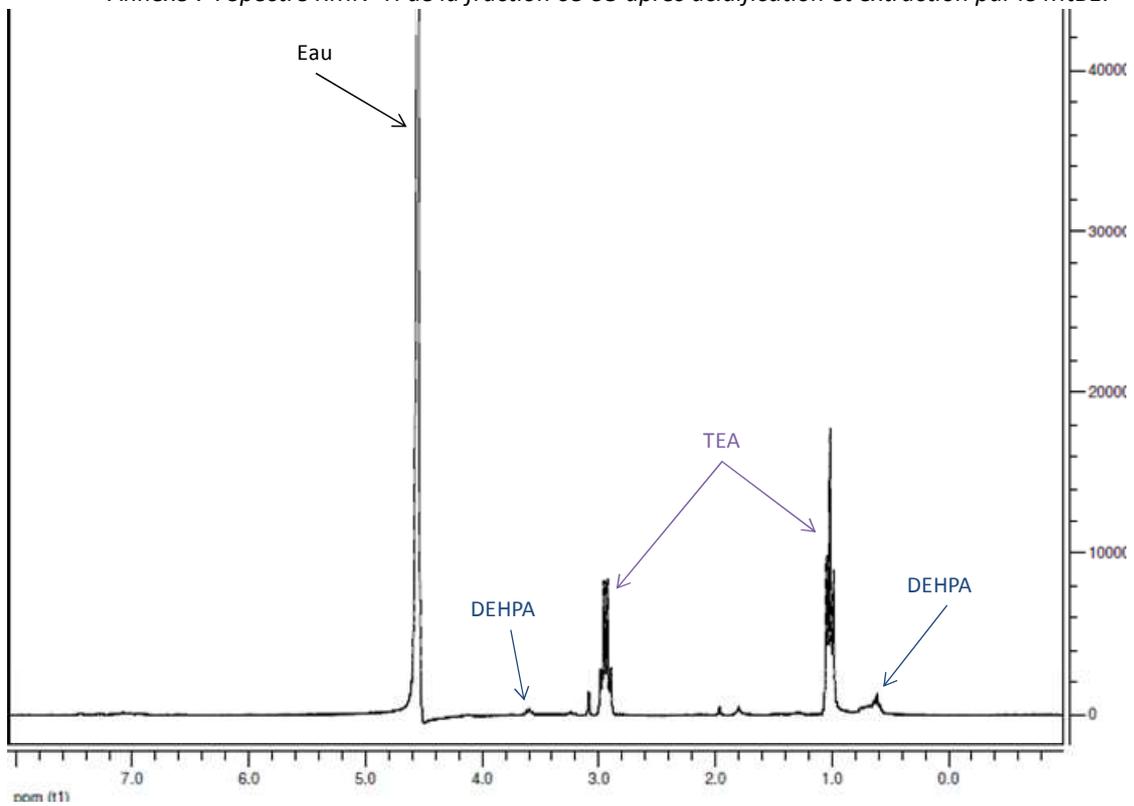
Annexe 5 : Spectre RMN COSY du peptide SF 328.



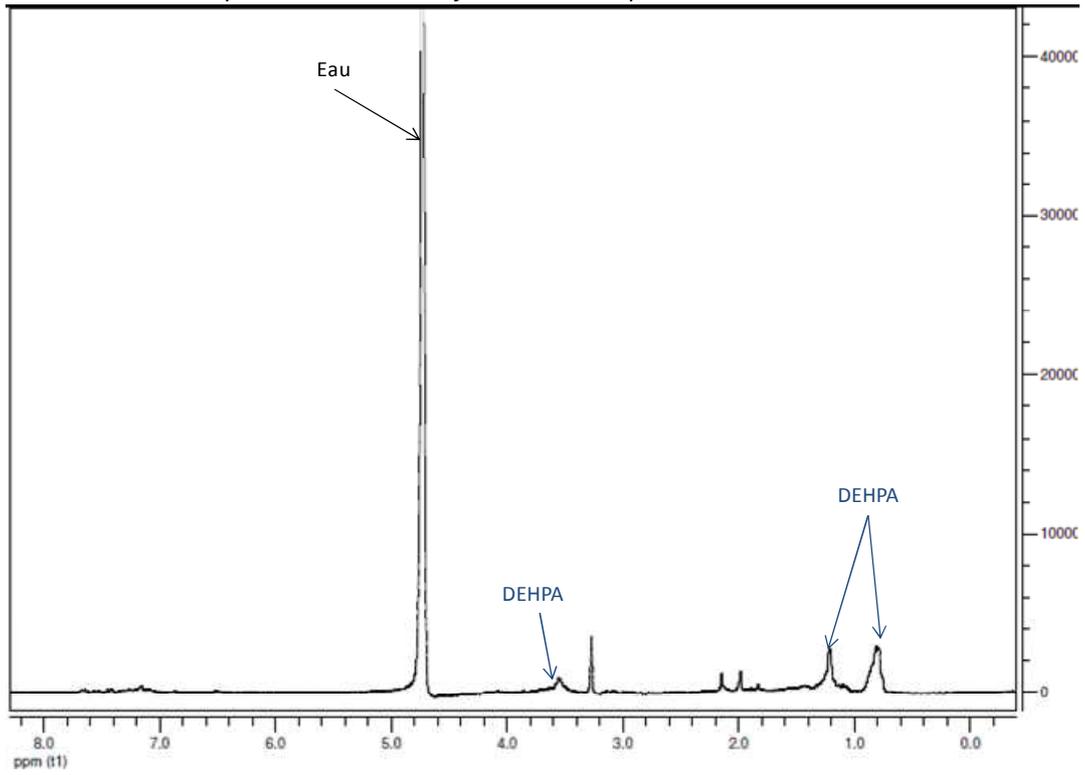
Annexe 6 : Spectre RMN ^1H de la fraction 68-95 avant dépollution.



Annexe 7 : Spectre RMN ^1H de la fraction 68-95 après acidification et extraction par le MtBE.



Annexe 8 : Spectre RMN 1H de la fraction 68-95 après neutralisation et mise à sec.



Nouvelles Méthodologies de Purification de peptides par Chromatographie de Partage Centrifuge : application à l'isolement et à la purification de peptides bio-actifs.

Résumé

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans une optique de valorisation non alimentaire d'une agrossource régionale : la luzerne (*Medicago sativa*) et plus particulièrement de son *pool* peptidique.

La première partie des travaux a consisté à développer une méthodologie de purification de peptides utilisant la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) dans un mode de développement particulier, le mode échange d'ions. Une méthodologie de purification par échange d'ions mixte a ainsi mise au point, mettant en jeu deux déplaceurs de façon séquentielle. Par ailleurs, la nature de la phase stationnaire est modulable : homogène ou divisée en deux segments correspondant à un état d'activation différent de l'échangeur. Une étude fondamentale du comportement diffusif de l'échangeur dans le système de solvants par RMN DOSY a permis de conforter l'hypothèse de la formation de paires d'ions. L'application du procédé par échange d'ions mixte, que ce soit pour la capture d'un peptide bioactif au sein d'une matrice complexe, ou pour le polissage d'un peptide d'intérêt pharmaceutique, a été réalisée avec succès. Le fractionnement de co-produits issu de la filière industrielle de déshydratation de luzerne a généré des fractions qui ont ensuite été évaluées biologiquement en tant qu'agent anti-âge potentiel. La purification d'une ciclosporine modifiée à visée anti-VIH est également présentée dans ces travaux.

La seconde partie des travaux a porté sur l'évaluation du potentiel des extraits de luzerne comme agent anti-âge cutané, à visée dermo-cosmétique. Le vieillissement cutané est sous la dépendance de nombreux phénomènes moléculaires initiés en partie par des radicaux libres, et amplifiés par l'activation d'une classe particulière d'enzymes : les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Le potentiel antioxydant ainsi que l'activité inhibitrice vis-à-vis des MMPs ont été alors évalués. Un extrait brut s'est alors démarqué par son activité antioxydante non-négligeable et une activité inhibitrice prometteuse vis-à-vis d'enzymes clés du vieillissement cutané : les MMP-1 et -3.

Mots Clés : Chromatographie de Partage Centrifuge ; peptide ; échange d'ions ; luzerne ; MMP ; vieillissement

Abstract

This work presented in this manuscript deal with the valorization of alfalfa (*Medicago sativa*) peptide pool.

In the first part of the work, the development of a new methodology for peptide purification using Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is described. This process uses the ion exchange mode. A versatile methodology for peptide purification using a new mixed ion exchange mode was developed. A homogeneous or divided, with different exchanger activation rates, stationary phase can also be used. A fundamental study of the diffusion behavior of the exchanger in the solvent system, by NMR DOSY, confirmed the hypothesis of the ion pairs. The application of the mixed ion exchange process, whether for the capture of a bioactive peptide within a complex matrix, or for polishing a peptide of pharmaceutical interest, was successful. Fractionation of alfalfa's extracts generated fractions which were then biologically evaluated as an anti-ageing agent. The purification of an anti-HIV modified cyclosporine is also presented in this work.

The second part of the work focused on alfalfa extracts screening as anti-ageing agent. Skin ageing is dependent on many molecular events initiated in part by free radicals, and amplified by activation of a particular class of enzymes: the Matrix Metalloproteases (MMPs). The potential antioxidant and inhibitory activity towards MMPs were then evaluated. A crude extract demonstrates significant antioxidant activity and inhibitory activity towards key enzymes of skin ageing: the MMP-1 and -3.

Keywords : Centrifugal Partition Chromatography; peptides; ion exchange; alfalfa; MMP; skin ageing
