

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master type stage
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

Méthodes de fractionnement des composés du
sang

Travail réalisé par :

M^{elle} KABEN Fathia

M^r DAHLEB Massinissa

Présenté le : 27/09/2017

Devant le jury :

Président : M^{me} GHEZALLI-SENOUSSI Nassima

Maitre assistante classe A

Promoteur : M^{me} BEDOUHENE FENANE Samia

Maitre assistante classe A

Examineur : M^{me} OULARBI- SENANI Nassima

Maitre assistante classe A

Mme TAZDAIT R

Maitre de conférences

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Avant tout, nous remercions le Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens à fins de pouvoir accomplir ce travail.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice Mme BEDOUHENE-FENANE Samia, maître assistante à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, qu'elle nous soit permise de la remercier vivement, et lui exprimer notre profonde gratitude pour l'aide précieuse et les conseils qu'elle nous sans cesse prodigué afin de mener à terme ce travail.

On tient également à remercier :

La présidente Mme SENOUSSI-GHEZALI Chahra pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Nous s'insère remerciement vont également aux autres membres de pour avoir accepté d'examiner ce travail :

- Mme TAZDAIT R*
- Mme OULARBI-SENANI Nassima*

Nous tenons à remercier aussi, les personnes grâce à qui ce mémoire a pu voir le jour.



Dédicaces

Je dédie ce travail à :

*A mes chers parents, et ma profonde gratitude, pour leur aide,
soutien et encouragement*

Que Dieu les gardes et les protèges et leur accorde une longue vie ;

A mes sœurs : la charmante Siham, et la petite Hakima;

A mon unique frère: Slimane ;

A tout ma famille,

A mon binôme : Massinissa;

A mes amies : Cherifa; Zohra ; Zaida

A tout la promotion de II Biochimie appliquée

Fathia

Dédicaces

*Avec un grand plaisir que je dédie ce travail à mestres chers
parents qui m'on souvent encouragé*

A mon frère et ma sœur

A mes amis(es) : Hamid, Kouceila et Mohamed

A toute la promotion Biochimique appliquée

Massinissa

Avant propos

Le mémoire de master ainsi présenté a consisté en un stage pratique bloqué réalisé au laboratoire de Biochimie de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO, pour lesquels les responsables des formations suivantes :

- Master de Biochimie Appliquée ;
- Master de Biochimie de la nutrition.

En concertation avec les responsables du département de Biochimie-Microbiologie de la faculté, ont arrêté des dispositions communes quant à la présentation finale du mémoire, tenant compte des objectifs attendus pour sa réalisation, tant les volets liés à la recherche bibliographique et à la rédaction de synthèse appropriées ainsi qu'aux diverses manipulations pratiques qui ont été centrés sur le contrôle et l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

De ce fait, ce mémoire comporte deux parts égales :

- Une synthèse des données bibliographiques sur le thème suivant :

Les méthodes de fractionnement du sang.

- Une partie pratique liée au contrôle et à l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

Liste des abréviations

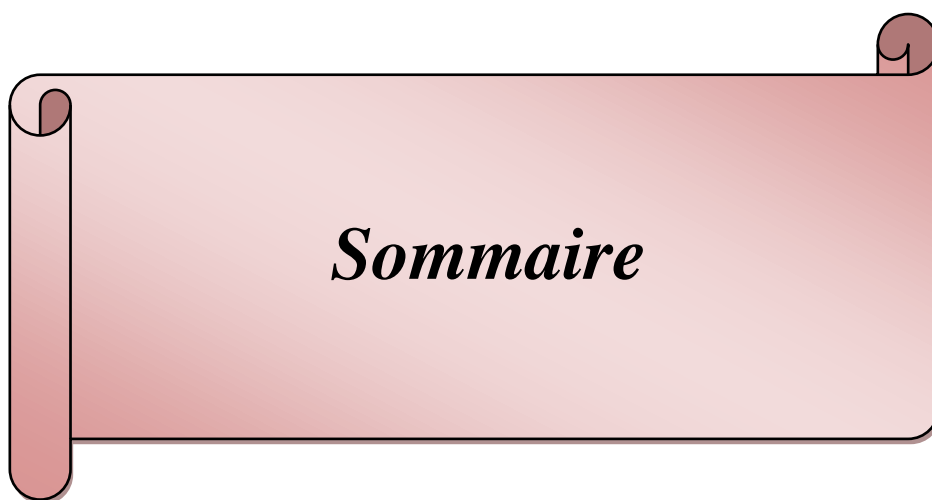
BSA	Sérum Albumine Bovin
Cm	Centimètre
DO	Densité Optique
DNS	l'acide 3,5 dinitrosalicylique
DCPIP	2,6 dichlorophenolindophenol
CN α S1/ α S2	Caséine α S1/ α S2
CN β	Caséine β
CN k	Caséine k
°C	Degré Celsius
F VIII	Facteur VIII
F	Fraction
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Stimulating Factor
GR	Globule Rouge
GB	Globule Blanc
HCL	Chlore d'hydrogène
Igs	Immunoglobulines
L	Litre
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
B-Lg	B-lactoglobuline
A-La	A-lactalbumine
M	Molaire
MDS	Médicament Dérivé du Sang
Min	Minute
Max	Maximum
Mg	Milligramme
Mm	Millimètre
mA	Milliampère
μm	Micromètre
μl	Microlitre
N°	Numéro
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PLT	Plaquette
PSL	Produit Sanguin Labile
PAGE	Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide
pH	Potentiel d'hydrogène
P /V	Poids/Volume
SDS	sodium Dodécyl Sulfate
TEMED	N, N, N, N-tétraméthyl-éthylène diamine
TRIS	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
TN	Témoin Négatif
TCA	Acide trichloracétique
UV	Ultra violet
V	Volt
V/V	Volume/Volume
V/V/V	Volume/Volume/Volume

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Pages
I	Tableau de synthèse sur les divers composants du plasma humain	04
II	Volumes et densité des composants sanguins.	10
III	Mode de purifications des principaux produits plasmatique.	19
IV	Appareillage et verrerie utilisé durant le stage.	22
V	Produits et réactifs utilisés pour les différentes analyses physicochimiques.	23
VI	La teneur en protéines dans les différents échantillons du lait analysés par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).	38
VII	Teneur en glucide réducteurs dans les échantillons du lait analysés par la méthode utilisant le DNS	39
VIII	Teneur en vitamine C dans les échantillons du lait analysés	40

Listes des figures

N°	Intitulé	Page
01	Frottis sanguin vus au microscope électronique à balayage ; et une figure montrant l'aspect d'un échantillon du sang après centrifugation.	03
02	Image de globule rouge humain par microscopie électronique.	06
03	Les différents types de leucocytes.	07
04	Frottis sanguin montrant les plaquettes et mégacaryocyte	08
05	Isolement positive et déplétion de cellules cibles par l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées.	12
06	Principe du fractionnement plasmatique par cryoprécipitation.	15
07	Schéma du fractionnement à l'éthanol selon Cohn (procédé modifié par Kistler- Nitschman).	17
08	Schéma réactionnel de la méthode de Lowry et al (1951).	24
09	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode LOWRY et al (1951).	25
10	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode LOWRY et al (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence.	26
11	Structure chimique du lactose.	26
12	Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs	27
13	Structure chimique de la vitamine C.	28
14	Réaction de l'oxydation de la vitamine C.	29
15	Etapas d'isolement des caséines et des protéines sériques du lait bovin.	31
16	Mécanisme d'action de la trypsine	29
17	Etapas suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine.	33
18	Schéma du tamisage moléculaire.	34
19	Réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide.	35
20	Structure du dodécyl sulfate de sodium (SDS).	37
21	Profil d'élution des protéines sériques du lait de vache en chromatographie de perméation sur Séphacryl S100.	41
22	Contrôle électrophorétique en PAGE-native des fractions éluées en chromatographie de perméation sur Séphacryl S100.	43
23	Profil électrophorétique des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache en PADE-SDS.	45
24	Profil électrophorétique en PAGE-SDS des caséines bovines après traitement enzymatique par la trypsine.	46



Sommaire

Sommaire

Pages

Résumé

Introduction générale..... 01

1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Définition 02

1.2. Composition du sang 02

1.2.1. Le plasma 03

1.2.2. Les éléments figurés du sang 05

1.2.2.1. Les érythrocytes 05

1.2.2.2. Les leucocytes 06

1.2.2.3. Les plaquettes 07

1.3. Les produits sanguins labiles..... 08

1.3.1. Méthodes de fractionnement de sang 09

1.3.1.1. L'aphérèse 09

1.3.1.2. La centrifugation 09

1.3.1.2. La lyse sélective 11

1.3.1.4. Les billes magnétiques fonctionnalisées 12

1.4. Les produits sanguins stables 11

1.3.1. Fractionnement plasmatique industriel 13

1.3.1.1. Méthodes de fractionnement plasmatique..... 14

1.3.1.1.1. Cryoprécipitation..... 14

1.3.1.1.2. Précipitation par l'alcool (méthode de Cohn) 16

1.3.1.1.3. Méthodes chromatographiques 18

1.3.1.1.4. L'ultrafiltration..... 20

Conclusion..... 21

2. Stage pratique

2.1. Matériels et méthodes 22

2.1.1. Matériels.....	22
2.1.1.1. Appareillage et verrerie.....	22
2.1.1.2. Produits chimiques et réactifs	23
2.1.2. Méthodes expérimentales.....	23
2.1.2.1. Méthodes physicochimiques	23
2.1.2.1.1. Dosage des protéines par la méthode de Lowry <i>et al</i> (1951).....	23
2.1.2.1.2. Dosage des glucides (sucres réducteurs) par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)	25
2.1.2.1.3. Dosage de la vitamine C.....	27
2.1.2.2. Séparation des caséines et des protéines sériques du lait bovin	29
2.1.2.2.1. Ecrémage du lait.....	29
2.1.2.2.2. Séparation des caséines et des protéines sériques par l'acide chlorhydrique	
2.1.2.2.3. La dialyse des caséines et des protéines sériques du lait bovin	29
2.1.2.2.4. Congélation et lyophilisation	30
2.1.2.3. Méthodes enzymatiques	32
2.1.2.3.1 Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine.....	32
2.1.2.4. Méthodes chromatographiques	33
2.1.2.4.1. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100.....	33
2.1.2.5. Méthodes électrophorétiques.....	34
2.1.2.5.1. Principe générale.....	34
2.1.2.5.2. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) ..	36
2.1.2.5.3. Electrophorèse en condition dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS).....	36
2.1.2.5.4. Révélation des bandes de migration électrophorétique.....	37
2.2. Résultats et discussion.....	38
2.2.1. Qualité physicochimique du lait.....	38
2.2.1.1. Teneur en protéines	38

2.2.1.2. Teneur en glucide	39
2.2.1.3. Teneur en vitamine C	39
2.2.2. Séparation des protéines sérique du lait par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S100 dénaturantes	41
2.2.3. Caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en native (PAGE-native).....	42
2.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques par la trypsine et caractérisation électrophorétiques (PAGE-SDS).....	43
2.2.5. Hydrolyse enzymatique des caséines par la trypsine et caractérisation électrophorétiques (PAGE-SDS) des hydrolysats obtenus	44
Conclusion.....	47
Références bibliographiques	48

Résumé

Le sang est une suspension biologique de composition complexe constitué d'une phase liquide appelé le plasma, et une phase solide, composée de cellules dont les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes.

L'analyse du sang nécessite forcément un passage par une étape de séparation des différents composés à savoir le sérum et les cellules. La centrifugation est la méthode classique utilisée pour cette effet, mais l'avancée technologique a permis la mise en œuvre de techniques plus performante telles l'aphérèse, la lyse sélective et par les billes magnétiques.

Le plasma peut être fractionné par des méthodes physico chimiques permettant de séparer les différentes protéines qui le constituent. Les méthodes de fractionnement utilisé de nos jours s'inspirent du procédé historique combinant la cryoprécipitation et les précipitations éthanoïque. L'avancement des méthodes de séparation des composée biologique à conduit à l'application des procédés chromatographiques permettant l'élaboration de nouveaux produits purifiés.

Mots clés : le sang, fractionnement du sang, fractionnement plasmatique.



Introduction

Introduction générale

Le sang est un liquide biologique vital qui circule continuellement dans les vaisseaux sanguins et le cœur, notamment grâce à la pompe cardiaque. Il est composé d'un fluide aqueux, le plasma, et de milliards de cellules, principalement les globules rouges, qui lui donnent sa couleur.

Le sang a pour fonctions principales le transporte le dioxygène (O₂) et les éléments nutritifs nécessaires aux processus vitaux de tous les tissus du corps, ainsi que les déchets, tels que le dioxyde de carbone (CO₂) ou les déchets azotés, vers les sites d'évacuation. Il permet également d'acheminer les cellules et les molécules du système immunitaire vers les tissus, et de diffuser les hormones dans tout l'organisme.

La complexité des cette suspension biologique rend son intégration dans un automate d'analyse une étape difficile, d'ou la nécessité d'une étape de préparation de l'échantillon, c'est-a-dire d'en séparer les constituants, de plus de l'intérêt thérapeutique que ceux-ci suscitent pour les patients atteint de troubles lié un déficit d'un de ces éléments

Le but donc ce travail est donc de développer une technique simple et rapide pour séparer les différents éléments du sang de façon continue et efficace,

La présente étude est composée de 3 étapes structurées comme suit :

La première partie rassemble les généralités sur le sang ainsi que sa composition et les fonctions de ces composants. La deuxième partie est consacré aux méthodes d'obtention de produit sanguins labiles par fractionnement du sang totale, comme celle la centrifugation, l'aphérèse la lyse sélective et les billes magnétiques fonctionnalisés. La troisième partie porte sur les méthodes de fractionnement du plasma afin d'obtenir des produits sanguin stable tel la cryoprecipitation, la précipitation par l'alcool et les méthodes chromatographiques.



Synthèse bibliographique

1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Définition

Les cellules de notre organisme baignent dans un liquide qui remplit les espaces intercellulaires. Ce liquide constitue un véritable milieu intérieur, qui est en relation étroite avec le système vasculaire de l'organisme, dans lequel circule le sang.

Le sang occupe un volume total de 5 à 6 litres chez un homme, 3 litres chez un enfant et environ 250 ml chez un nouveau né (SOLLIER, 2009).

Le sang est un liquide rouge et visqueux qui circule dans les vaisseaux pour irriguer les tissus de l'organisme et joue plusieurs fonctions biologique.

La fonction première du sang est le transport, il assure les échanges gazeux notamment le dioxygène et le dioxyde de carbone grâce à l'hémoglobine contenue dans les hématies. Il achemine également les cellules et les molécules du système immunitaire vers les tissus, notamment les globules blancs les anticorps (GHANSSIA, 1998).

1.2. Composition du sang

Le sang est un tissu complexe constitué de cellules variées et de divers éléments en suspensions qui baignent dans un liquide jaunâtre qui est le plasma (BEROAUD *et al.*, 2001).

La phase liquide, qui est le plasma représente environ 55% du volume sanguin, tandis que la phase solide, qui est composée de cellules constitue environ 45%. Les deux phases sont visibles lorsqu'on centrifuge un tube de sang (Figure1).

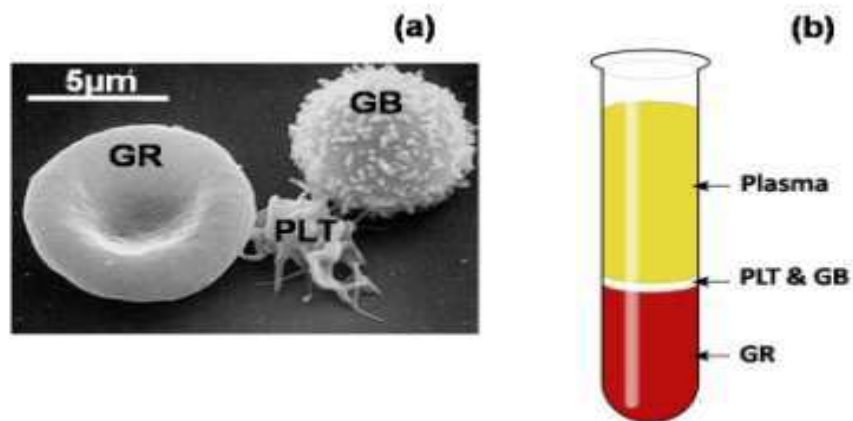


Figure 01 : Frottis sanguin vus au microscope électronique à balayage ; et une figure montrant l'aspect d'un échantillon du sang après centrifugation : globule rouge et globule blanc et visualisation des différents composants ; plasma, plaquette et globule rouge.

D'après www.common.wikimedia.org.

La phase surnageant est constituée du plasma, de couleur jaunâtre, tandis que les différentes cellules forment la partie inférieure avec un anneau central constituée des globules blancs et des plaquettes.

La phase solide du sang comprennent les cellules et des fragments cellulaires. Ils sont repartis en trois groupes : les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes.

1.2.1. Le plasma

Le plasma sanguin est la partie liquide du sang, de couleur jaunâtre, dans laquelle baignent les cellules. Le plasma constitue environ 55% du volume sanguin totale et 5% environ du volume des liquides de l'organisme humain (SOLLIER, 2009).

L'eau est une composante majoritaire du plasma, avec un pourcentage d'environ (90%), le reste étant un mélange de protéines impliqués dans de nombreux processus physiologiques et aussi des ions, des sels, des vitamines, des hormones et des lipides (Tableau I) (CAMPBELLE and REECE, 2004).

Les protéines qui composent le plasma sont l'albumine, les immunoglobulines, la transferrine, l'antitrypsine, ainsi que les protéines impliqués dans le processus de la coagulation sanguine telle que le fibrinogène (PELMONT, 1996).

Tableau I : Tableau de synthèse sur les divers composants du plasma humain (www.musibiol.net/biologie/cours/sang).

Composant		Concentration	
Solvant	Eau	910 g/L	
Solutés minéraux	Cations	Na ⁺	140 mmol/L
		Ca ⁺	2.3 mmol/L
		K ⁺	4.8 mmol/L
Mg ⁺		0.8 mmol//	
Solutés minéraux	Anions	Cl ⁻	105 mmol/L
		PO ₄ ³⁻	4 mmol/L
		SO ₄ ²⁻	0.2 mmol/L
Solutés minéraux	Oligoéléments	Fer	[Fe]-8 à 180 mg / 100 Ml
		Iode	
		Zinc	
		Cuivre	
		Fluor	
Solutés organiques	Protéines		60 à 80 g/L
	Substances azotés non protéiques		0.3 g/L
	Glucose		1 g/L
	Lipides	Triglycérides	3 g/L
		Cholestérol	2 g/L
	Hormones		< 0.002 g/L
	Vitamines		< 0.0025g/L
Gaz respiratoires	O ₂	2 ml/L	
	CO ₂	20 ml/L	

1.2.2. Les éléments figurés du sang

Trois types d'éléments figurés sont présents dans le sang : les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes. Chaque cellule se différencie des autres par sa morphologie, sa fonction, et son cycle de vie

Les cellules sanguines naissent et sont régénérées dans la moelle osseuse au cours d'un processus appelé hématopoïèse. Les cellules sanguines sont produites à partir d'une cellule souche totipotente. Ces cellules souches se différencient sous l'effet du GM-CSF en lignées cellulaires pour engendrer, après différents processus, des cellules sanguines matures. Seules les cellules matures et fonctionnelles passent dans le sang.

1.2.2.1. Les érythrocytes

Les érythrocytes, appelés aussi globules rouges ou hématies sont des cellules discoïdes, biconcaves de 6 à 8 μm de diamètre, et de 1 à 3 μm d'épaisseur (TOUAHMI *et al.*, 2002). Ils ne contiennent ni noyau, ni organelle (Figure 2). L'absence de noyau les rend incapable de se diviser et qui doivent être renouvelées en permanence.

La membrane viscoélastique des hématies enveloppe une solution d'hémoglobine qui permet de transporter l'oxygène, le fer et le dioxyde de carbone. La forme discoïdale confère une élasticité au globule lui permettant de remplir son rôle de transporteur d'oxygène à travers certains capillaires étroits. Il en existe environ 5 millions de cellules par millimètre cube de sang. Chez l'homme, leur durée de vie peut atteindre 120 jours.



Figure 02 : Image de globule rouge humain vu au microscope électronique (Delaunay et Boivin, 1990).

1.2.2.2. Les leucocytes

Les leucocytes, ou globules blancs, représentent un ensemble de cellules impliquées dans la réponse immunitaire. On les trouve à une concentration de 5000 à 10000 cellules par μl .

Il existe 3 classes de leucocytes, classés en fonction de leur taille, la forme de leur noyau et de l'aspect des granules présents dans le cytoplasme (Figure 3).

- **Les lymphocytes**, dont le diamètre varie entre 8 et 17 μm , possèdent un noyau arrondi et un cytoplasme pauvre en organites. Ils représentent environ 22 % des globules blancs. Ils sont impliqués dans l'immunité humorale liée à la production d'anticorps (LB) et dans l'immunité cellulaire (LT) liée à la prolifération des cellules effectrices (LT cytotoxiques).

- **Les monocytes** sont les leucocytes les plus volumineux avec un diamètre de 15 à 25 μm . Ils présentent un noyau courbé et un cytoplasme riche en organites. Ils constituent 10 % des leucocytes. Les monocytes ont un rôle dans la phagocytose.

- **Les granulocytes**, ou polynucléaires sont des globules blancs de diamètre qui varie entre 15 à 18 μm , qualifiés de non spécifique car ils ne sont pas dirigés contre un seule antigène. Ils sont classés en fonction du type de colorant qu'ils fixent en trois groupes : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les neutrophiles constituent environ 60 % des globules blancs alors que les basophiles et les éosinophiles sont plus rarement représentés uniquement 2 % et 1 % respectivement. Ils sont impliqués dans la réponse aux infections et aux allergies.

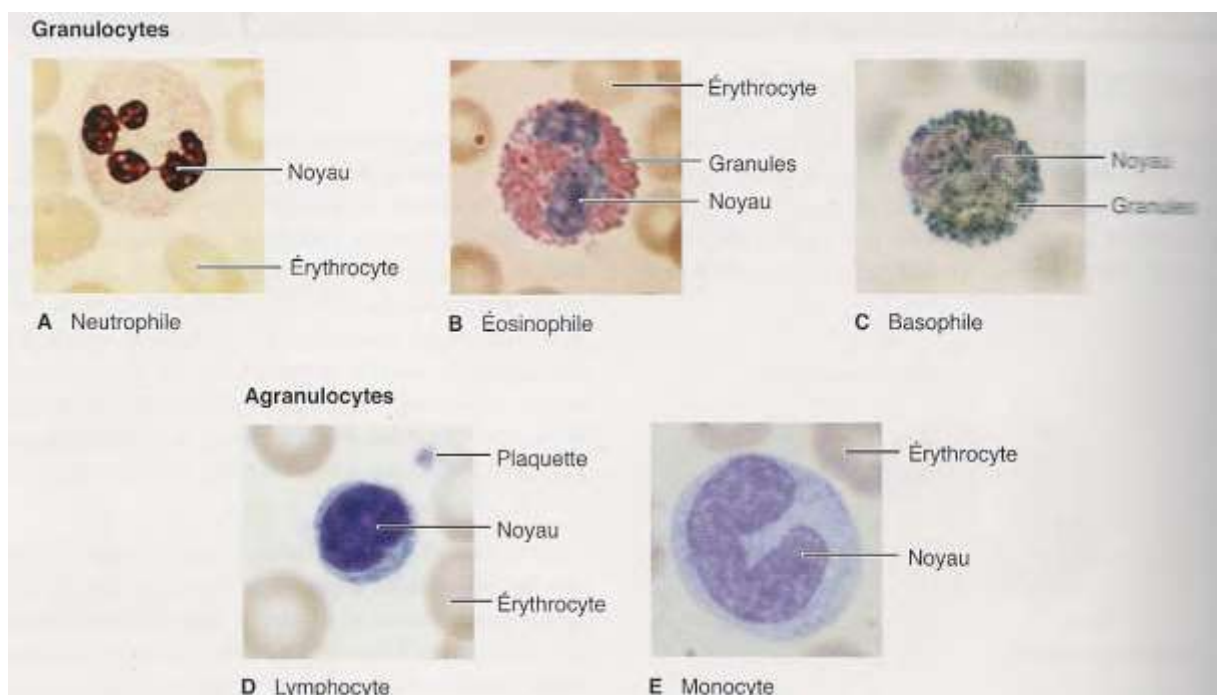


Figure 03 : Les différents types de leucocytes.

1.2.2.3. Les plaquettes

Les plaquettes sanguines, ou thrombocytes sont des petites cellules anucléées qui se forment dans la moelle osseuse par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes (Figure 04). Chaque mégacaryocyte produit environ un millier de plaquettes.

A l'état de repos, les plaquettes se présentent sous la forme de disques de 2 à 4 μm de diamètre et de volume de 6 à 8 μm^3 (BLACHE et al., 1992 ; BLOCKMANS *et al.*, 1995; GEORGE, 2000). Elles jouent un rôle important dans la coagulation sanguine.

Chez l'homme, on trouve environ 150000 et 450000 de plaquette par mm^3 et leur durée de vie dans la circulation sanguine est de 8 à 10 jours.

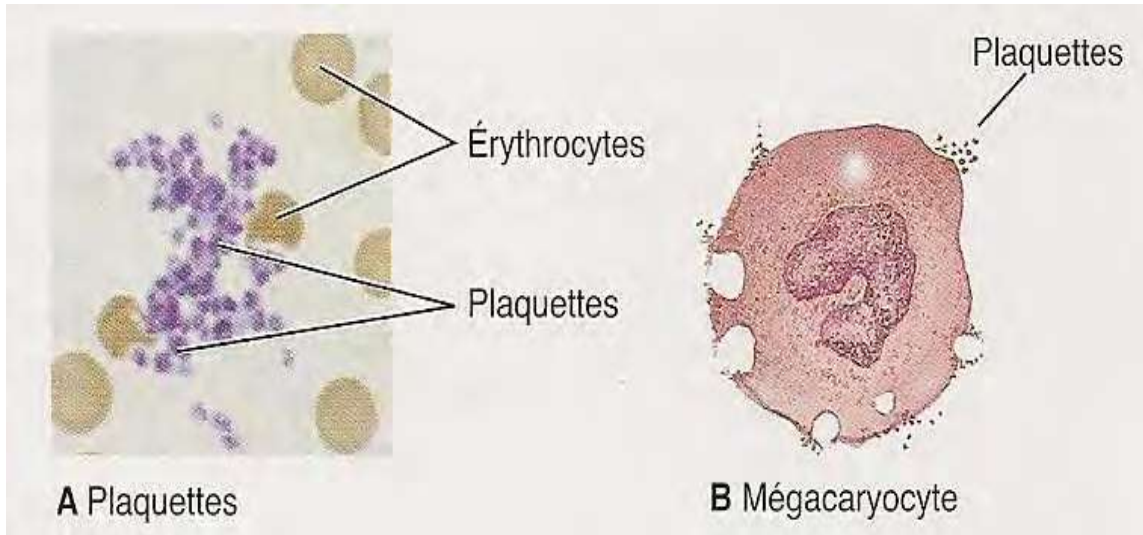


Figure 04 : Frottis sanguin montrant les plaquettes et mégacaryocyte.

A : Aspect des plaquettes.

B : Mégacaryocyte : produisant des plaquettes.

1.3. Les produits sanguins labiles

Le sang total est un sang vineux prélevé aseptiquement chez un donneur. Il est recueilli dans un récipient autorisé, contenant un volume approprié de solution anticoagulante et de conservation stérile et apyrogène.

Le sang total est un produit qui a été majoritairement utilisé, mais dont les indications sont très limitées, pour des raisons liées à sa qualité et à sa disponibilité.

Au cours de la conservation du sang total, il ya des altérations qui touche aux globules rouge et aux plaquettes, alors que la conservation des concentrates de globules rouges, plaquette ainsi que le plasma pressentent moins de risque de détérioration. Les produits sanguins préparés à partir du sang, sont qualifiés de produits sanguins labiles. Le terme de produit sanguin labile regroupe toute substance à usage thérapeutique. Ces produits sanguins labiles sont obtenus par

la séparation primaire du sang en ses différents éléments : concentrés de globules rouges, concentrés de plaquettes, plasma frais congelés.

Ces produits ont une durée de conservation courte : 5 jours maximum pour les plaquettes, 42 jours maximum pour les globules rouges et un an pour le plasma congelé.

1.3.1. Méthodes de fractionnement du sang

A partir du sang total, il est possible de préparer différents composants sanguins (plasma, plaquette, globules rouges).

Le sang total, représente le sang avec tous ses constituants. Les composants sanguins peuvent être préparés au cours du prélèvement par technique d'aphérèse ou obtenus à partir de la séparation du sang total, à savoir le plasma, les plaquette et les globules rouges.

1.3.1.1. L'aphérèse

L'aphérèse est une technique médicale extracorporelle où le sang circule dans une machine, le but étant de prélever un ou plusieurs composants sanguins. Il existe plusieurs types d'aphérèse, selon l'élément sanguin extrait :

- **La plasmaphérèse** sert pour l'extraction du plasma
- **La cytaphérèse** sert pour l'extraction des cellules.

L'aphérèse se fait lors du don de sang, ou pour certains constituants du sang des donneur est récupérés pour être réinjecté chez un autre patient. L'aphérèse se fait également dans un but thérapeutique, quand il est nécessaire de supprimer un composant sanguin responsable d'une maladie (SOLLIER, 2009).

1.3.1.2. La centrifugation

La centrifugation reste le moyen le plus répandu et le plus efficaces pour la séparation des différents éléments du sang.

Le principe de la centrifugation repose sur la sédimentation des cellules sanguines qui ce fait en fonction de leur taille et de leur densité entre elle (Tableau II). Elle dépende également

de la déformabilité de cellules et de la viscosité du liquide environnant, sachant que la température intervient aussi dans ce type de séparation.

Tableau II : Volumes et densité des composants sanguins (MERCIER, 2011).

	Densité moyenne (g/ml)	Volume moyen ($10^{-15}l$)
Plasma	1026	
Plaquettes	1058	9
Monocytes	1062	470
Lymphocytes	1070	230
Neutrophiles	1082	450
Globules rouges	1100	87

Après centrifugation, les plaquettes se concentrent dans la partie supérieure qui représente le plasma acellulaire, et le culot globulaire dans la partie inférieure renferme les globules rouges. Les leucocytes s'accumulent entre les deux phases.

La vitesse et la durée de la centrifugation varient en fonction des composants qu'on veut récupérer. Par exemple, si l'on veut obtenir un plasma riche en plaquettes, il faut arrêter la centrifugation avant que les plaquettes ne sédimentent. Par contre, si l'on cherche à obtenir un plasma acellulaire, la centrifugation doit s'effectuer à une vitesse plus élevée et à durée suffisante.

Pour les globules blancs, leur extraction est beaucoup plus complexe. Les globules blancs sont moins nombreux que les globules rouges. Ils forment un anneau hétérogène entre le plasma et les globules rouges. Cette fine couche est difficile à extraire telle quelle.

1.3.1.3. La lyse sélective

La lyse sélective est une technique utilisée pour l'extraction des globules blancs. La lyse est la réponse des cellules à un choc osmotique : quand la pression osmotique extérieure diminue, la cellule gonfle jusqu'à la limite de son élasticité. Les globules rouges sont très fragiles au choc osmotique alors que les globules blancs un peu moins (SOLLIER, 2009).

Pour récupérer les globules blancs, il faut contrôler l'osmolarité du tampon et son temps de contact avec les cellules, afin de lyser sélectivement les globules rouge avec moins de perturbations possibles sur les globules blancs (SOLLIER, 2009).

Cette lyse peut se faire directement avec de l'eau, mais il existe des tampons de lyse commerciaux. Ces tampons assurent une lyse plus douce en permettant une stabilisation des globules blancs. Ils garantissent ainsi une lyse optimale des globules rouge tout en gardant intact les globules blancs (SOLLIER, 2009).

1.3.1.4. Les billes magnétiques fonctionnalisées

La fonctionnalisation des billes magnétiques avec des anticorps dirigés contre les protéines de surface des cellules ciblées est très efficace, rapide et de plus en plus utilisés. Cette technique est caractérisée par une forte spécificité.

Les billes magnétiques ciblent l'ensemble des cellules sanguines. Dans le cas par exemples des globules blancs, leurs isolement se fait sur des billes fonctionnalisées anti-CD45. Le principe de fonctionnement est décrit comme suit (Figure5).

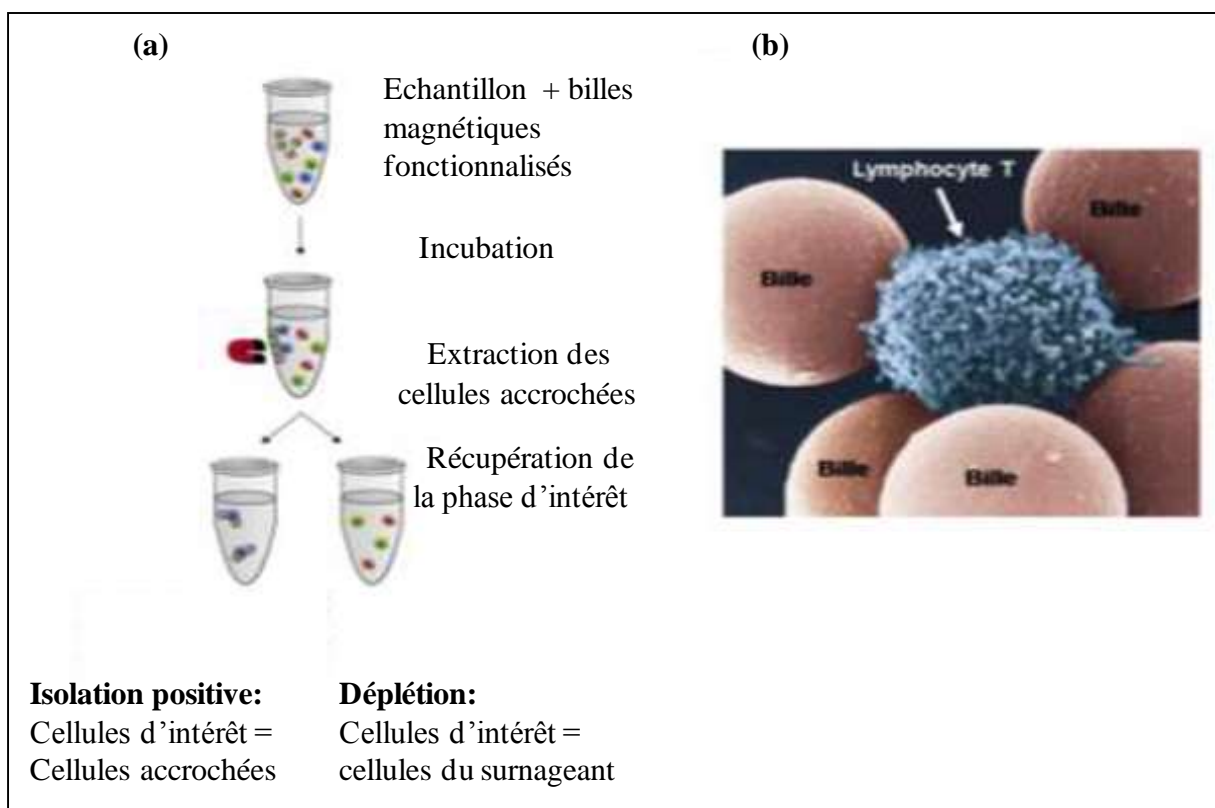


Figure 05: Isolement positive et déplétion de cellules cibles par l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées, d'après www.dynal.com. (a) Modification d'un schéma de principe Dynabeads. (b) Exemple d'isolation positive d'un lymphocyte T accrochés sur des billes Dynabeads de 4,5 μ m de diamètre.

1.4. Les produits sanguins stables

Ce sont des dérivés du sang, issus du fractionnement industriel du plasma. Ils sont considérés comme des médicaments et leur caractéristique commune est la conservation longue.

Le traitement que subissent ces produits au cours de leur préparation en ont fait des produits sécurisés vis-à-vis des risques de transmission des maladies virales.

Les produits sanguins stables sont utilisés en particulier pour la correction des troubles de la coagulation liés à des déficits de certains facteurs de la coagulation (hémophilie...) ou pour le traitement préventif ou curatif de certains états infectieux (déficit en immunoglobulines).

1.4.1. Fractionnement plasmatique industriel

Dans le plasma, il existe de nombreuses protéines qui sont extraites par le processus de fractionnement plasmatique industriel et utilisés comme médicament. Les médicaments dérivés du sang (MDS) sont utilisés soit pour compenser des déficits héréditaires ou acquis en protéines plasmatiques, soit dans certains photologies ou des cas chirurgicaux.

L'estimation annuelle au monde de plasma fractionné est de 22 à 25 millions de litres par environ 70 fractionneurs privés ou publics.

Par ailleurs, une quinzaine de pays applique déjà le fractionnement de façon assurer leur approvisionnement en produits fractionnés notamment la France qui est un fournisseur principale.

La collecte de plasma pour fractionnement fait partie intégrante de la chaîne de production des dérivés plasmatiques et doit répondre aux règles strictes qui prévalent à la fabrication des médicaments.

L'OMS a publié des recommandations qui couvrent les aspects relatifs aux critères de sélection des donneurs, contrôles épidémiologiques de la population, tests de dépistage, les donneurs sont soumis à un questionnaire relatif à leur l'âge, le tabagisme, leur voyage et leur antécédents médicaux. Des critères d'acceptabilité du plasma pour fractionnement sont définis par les autorités sanitaires concernant la préparation, la congélation et le stockage du plasma selon des procédures respectant les bonnes pratiques de fabrication.

1.3.1.1. Méthodes de fractionnement plasmatique

Le fractionnement du plasma est une méthode physico chimique permettant de séparer les différentes protéines qui le constituent.

La séparation des protéines repose sur le fait que les protéines ont une solubilité variable en fonction des paramètres tels que la température, la concentration d'alcool ou d'agent précipitant, la force ionique, le PH du milieu. La taille des protéines, leurs poids moléculaires ou leur affinité permettent également de les séparer.

La méthodologie de fractionnement utilisée de nos jours s'inspire du procédé historique combinant la cryoprécipitation et les précipitations éthanolique développé au milieu du siècle dernier par Cohn aux Etats- Unis, puis Kistler et Nitschman en Europe. L'évolution des dernières années a conduit à l'intégration des procédés chromatographiques permettant l'élaboration de nouveau produit purifiés à partir des fractions intermédiaires.

1.3.1.1.1. Cryoprécipitation

La cryoprécipitation a été décrite par Pool en 1964, elle est fondé sur une congélation du plasma à une température inférieure ou égale à -20°C , suivie d'une étape de décongélation à une température comprise entre 2 et 4°C ; il en résulte un cryosurnageant et cryoprécipité qui seront séparé par centrifugation (Figure 6).

Cette technique permet l'isolement d'un cryoprécipité utilisé pour extraire le FVIII, le facteur willebrand, et le fibrinogène, et d'un cryosurnageant, à partir duquel sont obtenues les autres protéines d'intérêt thérapeutique notamment le Complexe prothrombique, antithrombine III, immunoglobulines, l'albumine.

Ce mode de production est limité de par sa faible spécificité et le risque de dénaturation qu'il engendre.

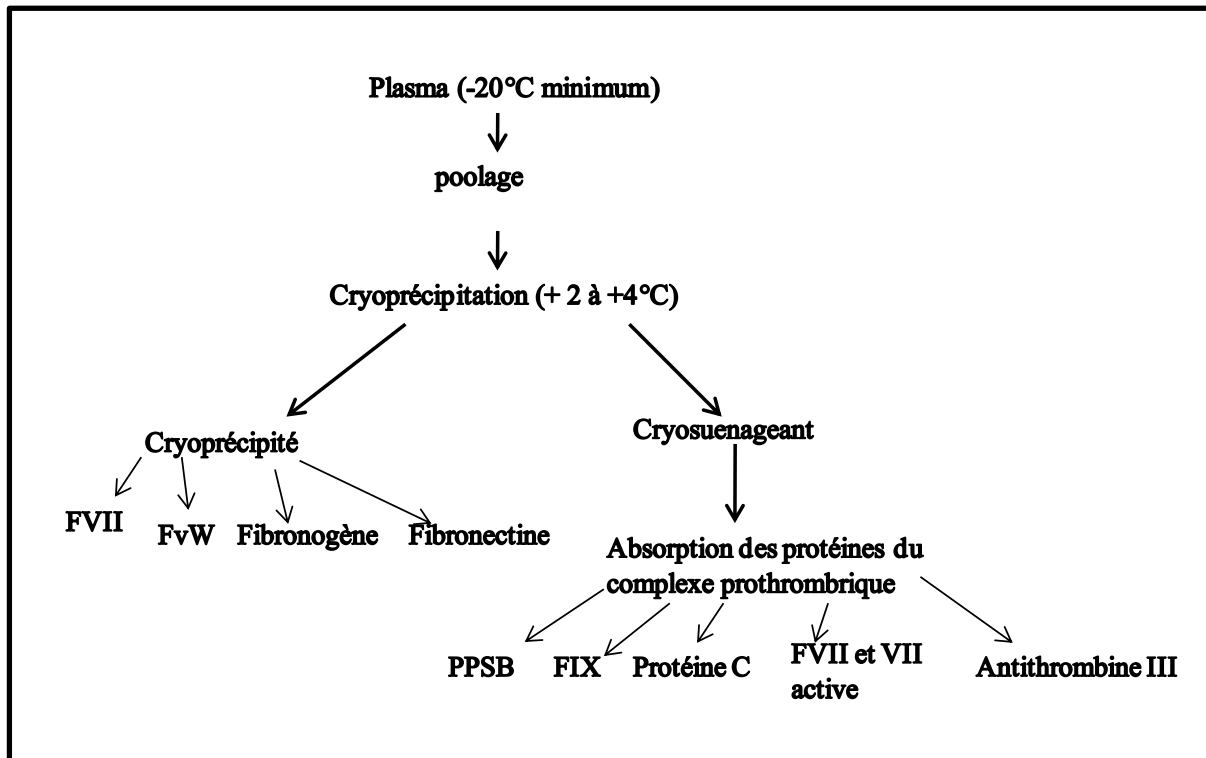


Figure 06 : Principe du fractionnement plasmatique par cryoprécipitation.

1.3.1.1.2. Précipitation par l'alcool (méthode de Cohn)

Cette méthode est apparue dans les années 40 aux États-Unis par E.J.Cohn. La méthode de Cohn repose sur une succession d'étapes de précipitation par l'éthanol à froid. Il existe des méthodes dérivées (COHN-ONCLEY, KISTLER-NITSCHMANN).

La technique de Kistler-Nitschmann (Figure 7), adaptée de la méthode de Cohn, met en jeu cinq variables permettant de séparer les protéines par leur solubilité différentielle dans les solutions éthanoïques. Chaque précipitation est suivie d'une étape de séparation, par centrifugation ou filtration, isolant le précipité du surnageant. La remise en solution du précipité permet de poursuivre la purification de cette même fraction.

Les paramètres pris en compte sont la concentration d'éthanol, le pH, la concentration protéique, la force ionique et la température.

La méthode de fractionnement à l'éthanol présente des avantages, en plus d'être pratique (disponible), elle présente une faible toxicité.

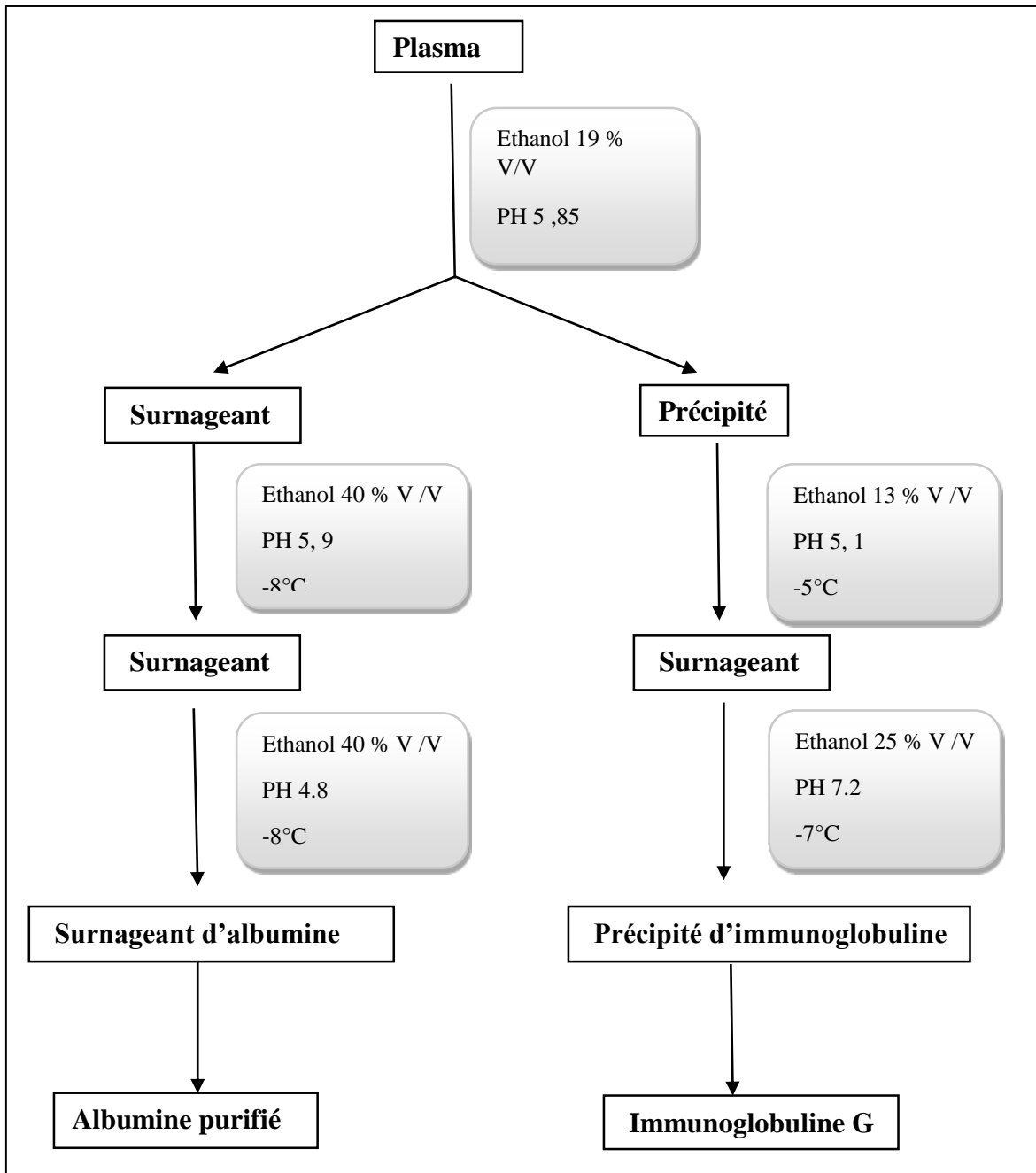


Figure 07: Schéma du fractionnement à l'éthanol selon Cohn (procédé modifié par Kistler- Nitschman).

1.3.1.1.3. Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques utilisés dans le fractionnement plasmatique permettent une sélection fine et une purification des différentes protéines, ceci est obtenu par le choix du support chromatographique et des caractéristiques des tampons d'éluion utilisés. Les principales méthodes chromatographiques utilisés ainsi que les fractions de départ sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau II)

Tableau II: Mode de purifications des principaux produits plasmatique.

Produits	Fraction de départ	Procédés de purification
Facteur VIII	- Cryoprécipité	- Chromatographie d'échange d'anions - Immunoaffinité
Facteur IX	- Surnageant de cryoprécipité	- Chromatographie d'échange d'anions et d'affinité (héparine ; cuivre) - Immunoaffinité
Antithrombine	- Surnageant de cryoprécipité - Surnageant de PPSB	- Chromatographie d'affinité (héparine) - Chromatographie d'échange d'ions
Alpha 1-antitrypsine	- Surnageant II + III - Précipité IV	- Chromatographies d'échange d'anions - Chromatographie d'exclusion stérique
Immunoglobulines G	- Précipité II + III - Précipité II	- Chromatographies d'échange d'ions – -Précipitations
Albumine	- Précipité IV	- Chromatographies d'échange d'ions

1.3.1.1.4. L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de filtration qui permet la concentration des solutions protéiques et leur purification tout en éliminant les composants de faible poids moléculaire comme les sels. Ce procédé a été adapté au début des années 80 pour la concentration de l'albumine, et est utilisé pour l'obtention d'autres protéines.

Conclusion

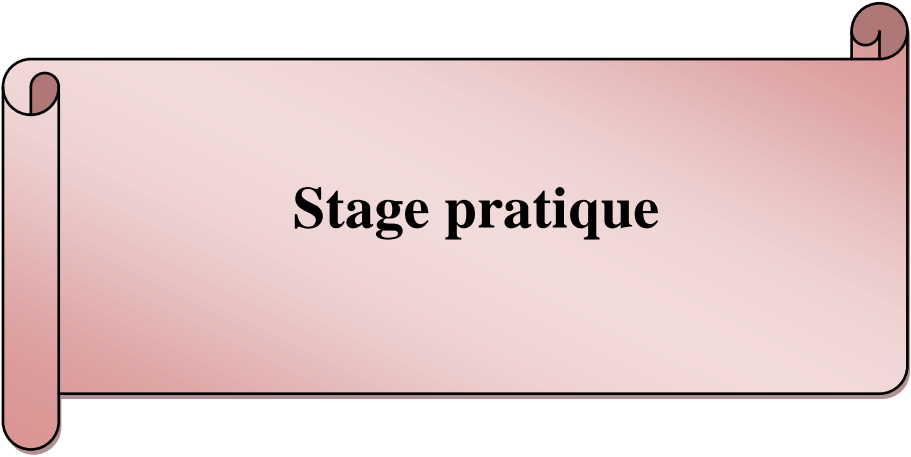
La plupart des techniques de fractionnement du sang se font en laboratoires spécialisés, à l'aide d'automates de taille importante et d'un environnement médical important et qualifié.

Le fractionnement du sang par centrifugation reste le procédé le plus utilisé et le plus efficace. En comparaison avec d'autres techniques telles l'extraction de GB par la lyse sélective des GR, qui est apparue comme une étape complexe, périlleuse et comporte des risques de perte d'échantillon. Ainsi que la séparation par fonctionnalisation de billes magnétiques qui s'avère très efficace, rapide et de plus en plus utilisé. Cependant il reste coûteux et est complexe à mettre en œuvre.

Les différents constituants récupérés sont essentiellement utilisés pour soigner diverses maladies et cas chirurgicaux. Les globules rouges sont généralement utilisés pour traiter les anémies ou les hémorragies, les leucocytes sont utilisés pour soigner les leucopénies en particulier les neutropénies et lymphopénie, les plaquettes pour soigner les thrombopénies.

Le fractionnement du plasma peut se faire par cryoprécipitation en congelant le plasma. Cette technique est limitée par sa faible spécificité et son risque de dénaturation contrairement à la technique de précipitation par l'alcool qui est très avantageuse par sa disponibilité et sa faible toxicité, mais qui reste tout de même moins spécifique que les procédés chromatographiques, qui permettent une sélection fine et une purification des différentes protéines plasmatiques.

Ces protéines ont un fort intérêt thérapeutique, essentiellement l'albumine qui restaure et maintient le volume sanguin, Les immunoglobulines pour traiter les patients atteints de déficit immunitaire ainsi que les maladies auto-immunes, Les facteurs de coagulation permettant de traiter des maladies hémorragiques comme l'hémophilie.



Stage pratique

2. Stage pratique

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi-ouzou. Durant le stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique de quatre échantillons de lait commercialisés par dosage de leurs paramètres physicochimiques.

2.1. Matériels et méthodes

2.1.1. Matériels

2.1.1.1. Appareillage et verrerie

Le tableau IV regroupe l'ensemble des appareils et de verrerie utilisés durant la période de stage.

Tableau IV: Appareillage et verrerie utilisé durant le stage.

Verrerie	Appareillage
<ul style="list-style-type: none"> -Tubes à essai ; -Béchers (50, 100, 250, 500 et 1000ml) ; -pipettes graduées (1 ml, 5ml et 10ml) ; -Fioles à jauger (10, 25, 50, 100, 250 et 500ml) ; -Éprouvettes (50 et 250 ml), burettes (100ml) ; -Seringue d'Hamilton ; -Colonne de chromatographie (20X1Cm) ; -Plaque en verre d'électrophorèse (10 X 8 X 0,75 Cm, 12 X 8 X 0,75 Cm). 	<ul style="list-style-type: none"> -Unité d'électrophorèse ; -Générateur de courant ; -Plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm) ; -Des espaceurs, peigne ; -Unité de chromatographie liquide basse pression comprenant : une colonne chromatographique contenant le gel (dimension 1.6 x 30 cm) ; - Un détecteur UV, une pompe péristaltique ; - Un collecteur et un enregistreur graphique ; -Centrifugeuse réfrigérée, max 2000 x g (SIGMA) ; -Agitateurs variés (de tubes, à plateau, à barreaux magnétiques)

Les analyses réalisées ont nécessité aussi l'utilisation de matériel complémentaire indispensable dont les gants, les spatules, les coupelles, les pissettes, les cuves, les barreaux magnétiques, les poires, les portoirs, les micropipettes (20-200µl; 100-1000µl), et des pinces.

2.1.1.2. Produits chimiques et réactifs

Le tableau V regroupe l'ensemble de produits et réactifs spécifiques utilisés pour chaque dosage.

Tableau V : produits et réactifs utilisés pour les différentes analyses physicochimiques.

Analyses	Produits et réactifs
Dosage des protéines	Na ₂ CO ₃ anhydre 2% dans NaOH, 0,1 M ; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,5% ; tartrate de Na et K, 1% ; BSA (Albumine Sérique Bovine), réactif de Folin – Ciocalteu.
Dosage des glucides	Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).
Dosage de la vitamine C	2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP), bicarbonate de sodium (Na ₂ CO ₃), acide ascorbique, acide acétique glacial.
Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100	Gel de séphacryl S100, tampon tris-HCl 0,02M, pH 8,4, bleu de dextrane ;
L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine	Tampon tris- HCl 0,5 M, pH 6,4, la trypsine.

2.1.2. Méthodes expérimentales

2.1.2.1. Méthodes physicochimiques

2.1.2.1.1. Dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951)

Le lait constitue un aliment important et une source majeure de protéines de part sa qualité nutritionnelle et sa richesse en acides aminés essentiels. Les protéines du lait possèdent de remarquables propriétés physicochimiques ayant un rôle dans sa stabilité, il en existe deux catégories : les caséines et les protéines sériques (MATHIEU, 1998). Dans le cadre du stage pratique, on s'intéresse à la quantification des protéines totales dans le lait.

La détermination de la teneur en protéines totales dans le lait se fait par un dosage colorimétrique selon la méthode établie par LOWRY (1951).

Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée (Figure 08), suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin, puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane (GUILLOU *et al.*, 1986).

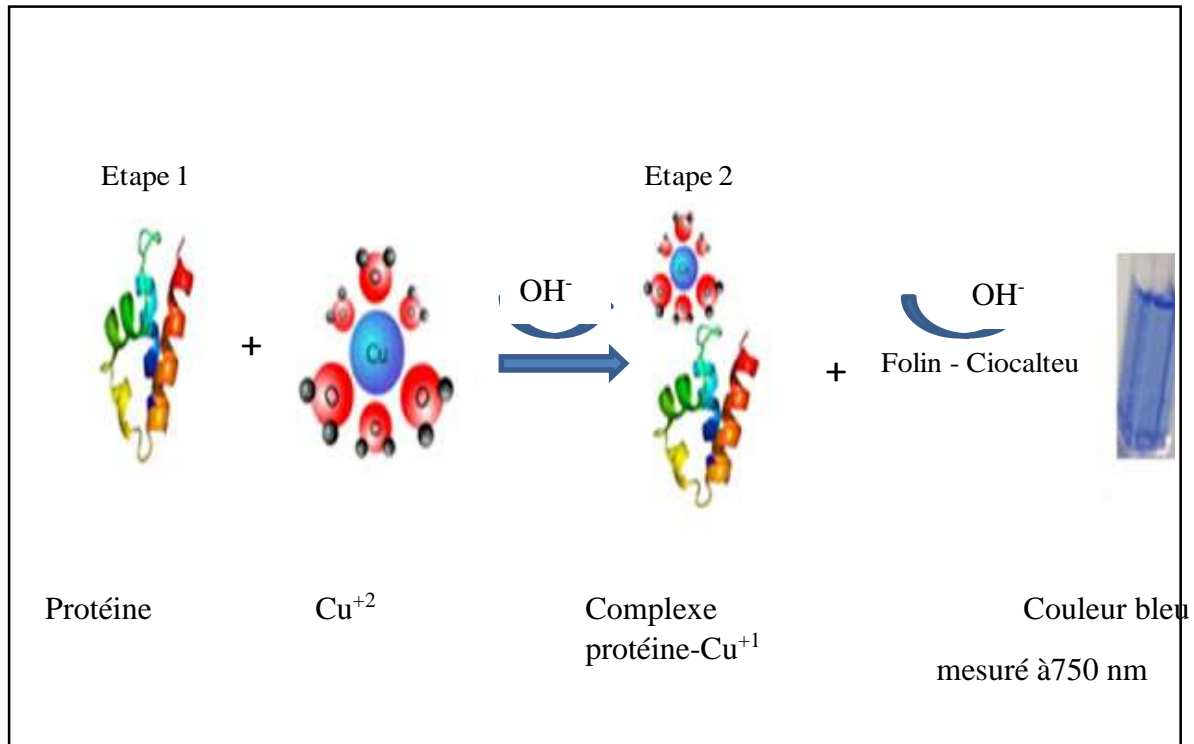
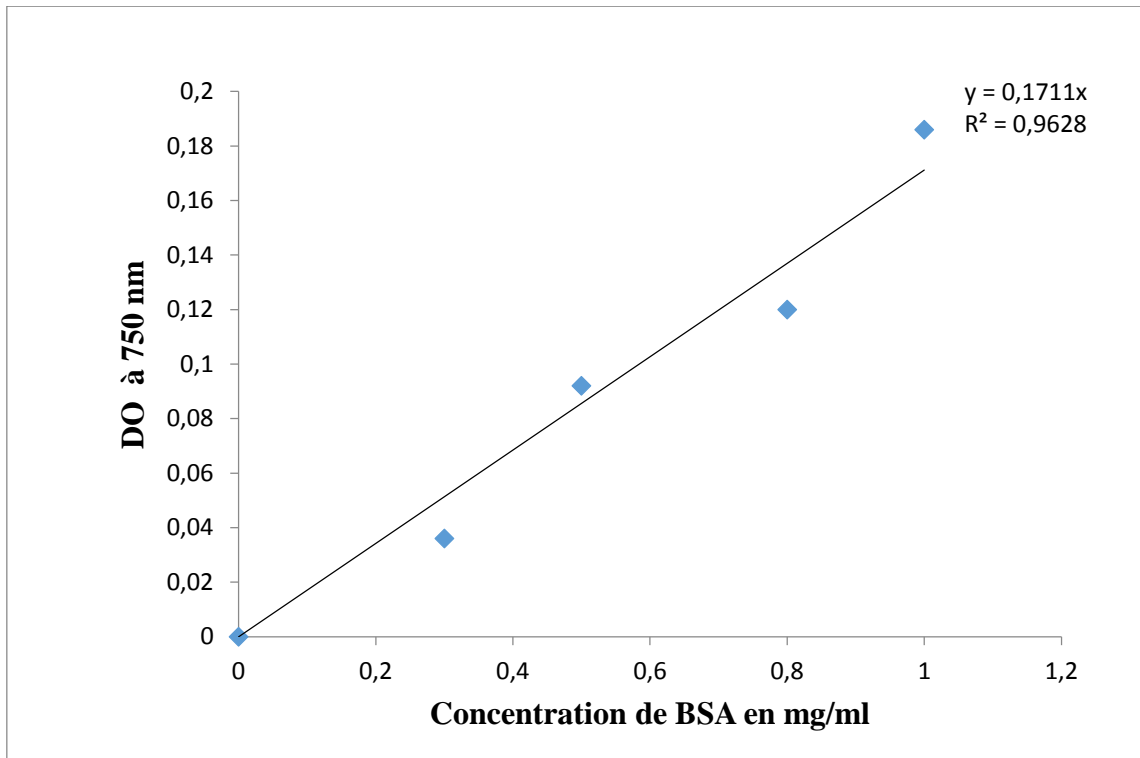


Figure 08 : Schéma réactionnel de la méthode de Lowry (1951).

La densité des composés réduits est mesurée au spectrophotomètre UV à la longueur d'onde 750 nm.

La concentration en protéines des échantillons analysés est déterminée en employant une courbe d'étalonnage $\text{DO} = f(\text{C})$ (Figure 09), établie en employant de l'albumine sérique bovine (BSA).



**Figure 09: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode Lowry (1951).
L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence.**

Cette méthode est caractérisée par sa sensibilité et surtout par sa précision (50 à 100 µg de protéines). Il est ainsi possible de réaliser des mesures dans des solutions relativement diluées.

Cependant, cette méthode n'est pas totalement fiable, car elle prend un certain temps pour sa mise en œuvre et nécessite beaucoup de produits dans pour la préparation des protéines telles que les détergents, le glycérol, l'EDTA qui interfèrent avec cette méthode et forment des précipités.

2.1.2.1.2.2. Dosage des glucides par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)

Selon (MATHIEU, 1998), le lait contient des glucides représentés essentiellement par le lactose, son constituant le plus abondant après l'eau. D'autres glucides peuvent être présents mais en faibles quantités tel que le glucose et le galactose qui proviendraient de l'hydrolyse du lactose ou certains glucides peuvent se combiner aux protéines (MONTREUIL, 1971).

Le lactose, de formule brute $C_{12}H_{22}O_{11}$, est un disaccharide réducteur, constitué par l'union d'une molécule de β -galactose en position 1 et d'une molécule de β -glucose en position 4 (Figure 10). Le caractère réducteur est donné par le groupement OH porté par le carbone en position 1 du glucose.

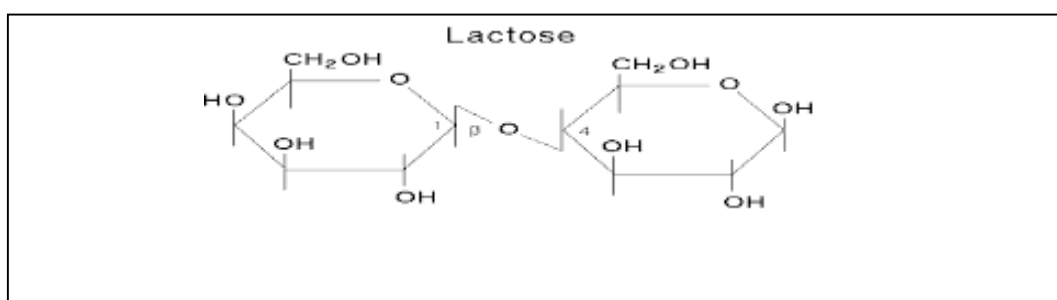


Figure 10 : Structure chimique du lactose

Le lactose joue un rôle important dans les transformations technologiques du lait, car il constitue le substrat de fermentation pour de nombreuses bactéries, qui est à l'origine de la fermentation lactique (ANONYME, 1981 ; MIETTON *et al.*, 1994).

La détermination de la teneur en lactose se fait par un dosage colorimétrique, par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS). Le DNS réagit avec les sucres réducteurs pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur rouge orangé (Figure 11) qui absorbe la lumière à 530 nm.

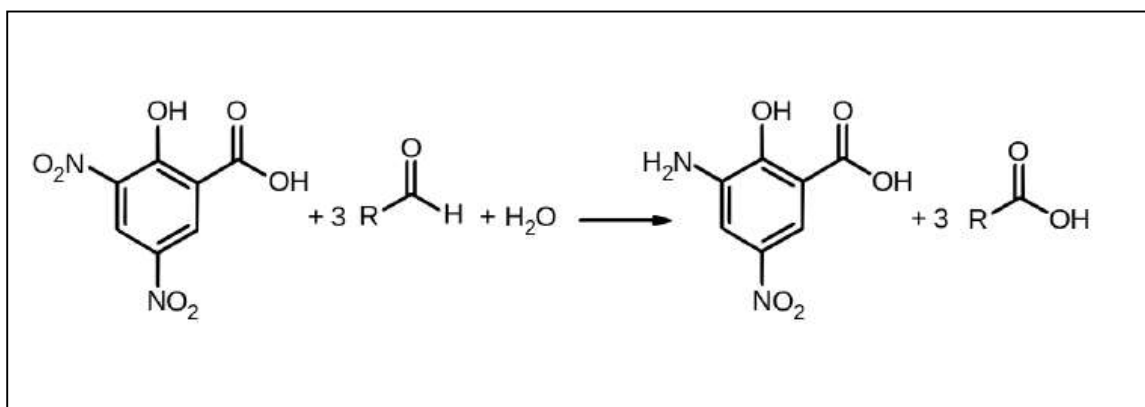


Figure11 : Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (Audigie *et al.*, 1978).

Dans notre étude nous avons utilisé les propriétés réductrices du lactose. A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide dinitrosalicylique (DNS) qui joue le rôle d'oxydant, le lactose étant le réducteur. La couleur de la solution passe du jaune au rouge orangé qui absorbe la lumière à 530nm.

Les densités optiques (DO) obtenues permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalon $DO = f(C)$ (Figure 12).

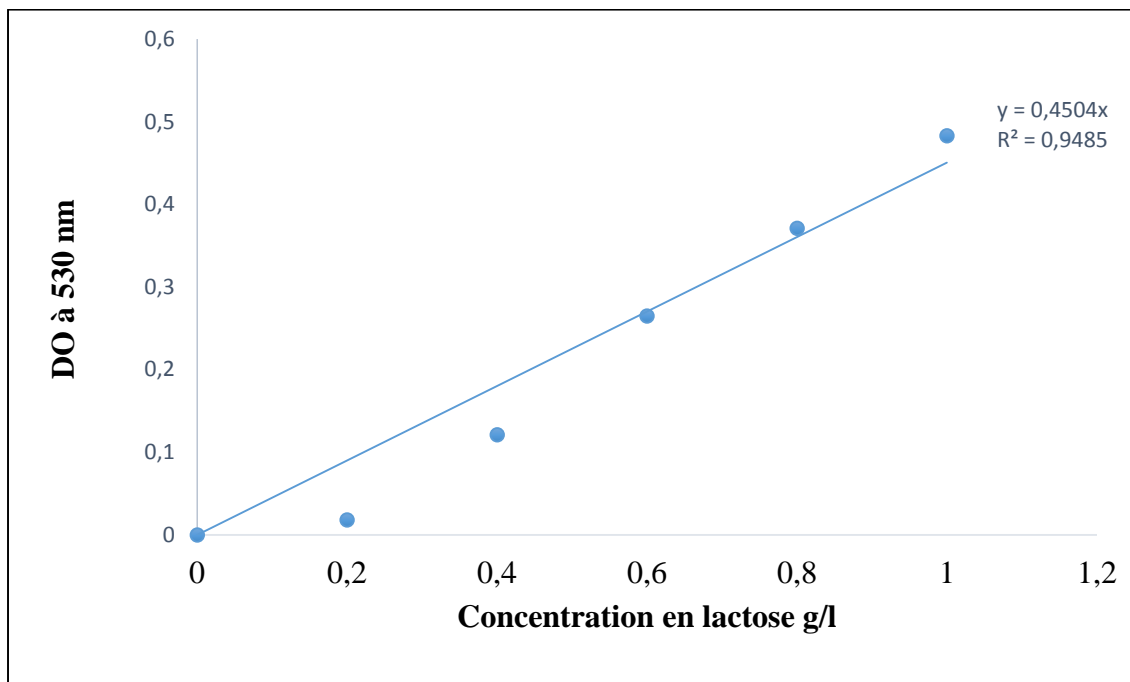


Figure 12: Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec une solution de lactose comme référence.

Cette méthode n'est pas applicable au dosage d'un mélange complexe de glucides réducteurs.

2.1.2.1.3. Dosage de la vitamine C

Les vitamines sont des substances biologiquement indispensables à l'homme qui doivent être apportées quotidiennement, car l'organisme est incapable de les synthétiser. Elles participent comme cofacteurs dans les réactions enzymatiques et dans les échanges à l'échelle

des membranes cellulaires. Le lait représente une source de plusieurs vitamines hydrosolubles notamment la vitamine C.

La vitamine C, appelée également acide ascorbique (Figure13), de formule brute $C_6H_8O_6$, et sa masse molaire est de 176 g/mol.

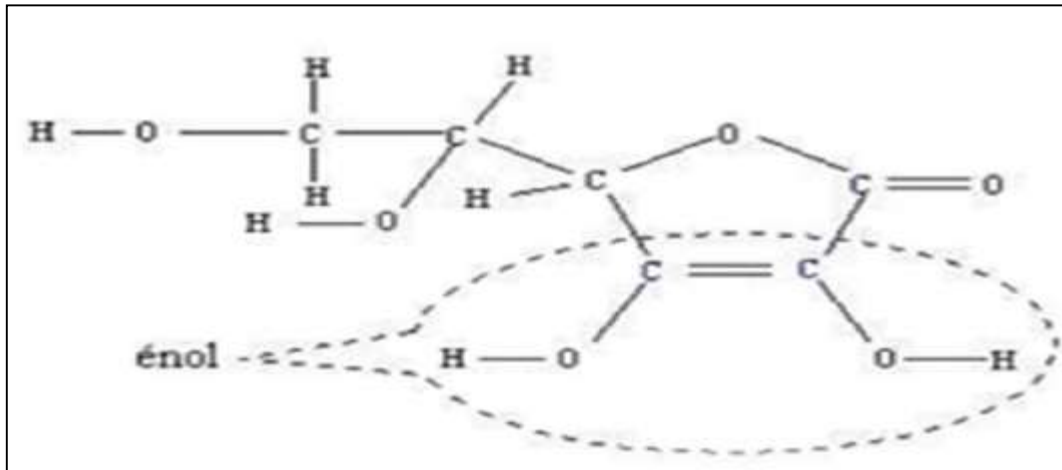


Figure 13 : Structure chimique de la vitamine C

Le dosage de la vitamine C est effectué par la méthode basale de titrimétrie. Le principe repose sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2,6-dichlorophenolindophenol (2,6-DCPIP). La solution de DCPIP est étalonnée avec une solution de vitamine C de concentration connue. La réaction d'oxydation de la vitamine C est décrite dans la figure ci-dessous (Figure14).

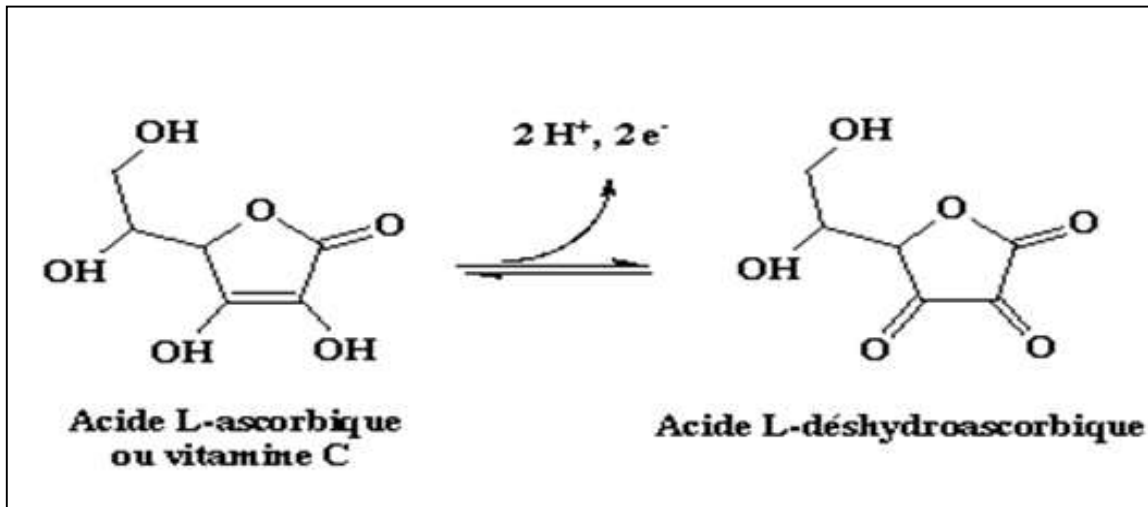


Figure 14 : Réaction de l'oxydation de la vitamine C (JASPARD, 2005)

1.2.2.2. Séparation des caséines et des protéines sériques du lait bovin

1.2.2.2.1. Ecrémage du lait

Cette étape permet de débarrasser les échantillons de la matière grasse. L'écémage est réalisé par centrifugation du lait à $3500 \times g$ pendant 20 minutes à 20°C . La centrifugation se fait à 4°C , elle permet de solidifier la matière grasse qui se retrouve en surface ainsi de la séparer et de la peser pour avoir une idée sur sa masse (SIBOUKEUR, 2007). Le lait est ensuite filtré à travers de la Laine de verre.

1.2.2.2.2. Séparation des caséines et des protéines sériques par l'acide chlorhydrique

La séparation entre les caséines et les protéines sériques est obtenue par précipitation à leur point isoélectrique ($\text{pH} = 4.6$) en ajoutant goutte à goutte de l'acide chlorhydrique 4N, suivi d'une centrifugation à $4000 \times g$ pendant 20 minutes.

1.2.2.2.3. La dialyse des caséines et des protéines sériques du lait bovin

Les échantillons de caséines et des protéines sériques sont dialysés contre l'eau distillée pendant 24 heures sous agitation douce à 4°C , en utilisant des membranes de dialyse. L'eau de dialyse est changée 3 fois par jour.

1.2.2.2.4. Congélation et lyophilisation

Après l'étape de dialyse, les solutions de protéines sont étalées en fine couche dans des coupelles, congelées à -18 °C pendant 72 heures, puis lyophilisées. Les protéines sont ensuite récupérées sous forme de poudre et conservés sous cette forme jusqu'à leur utilisation.

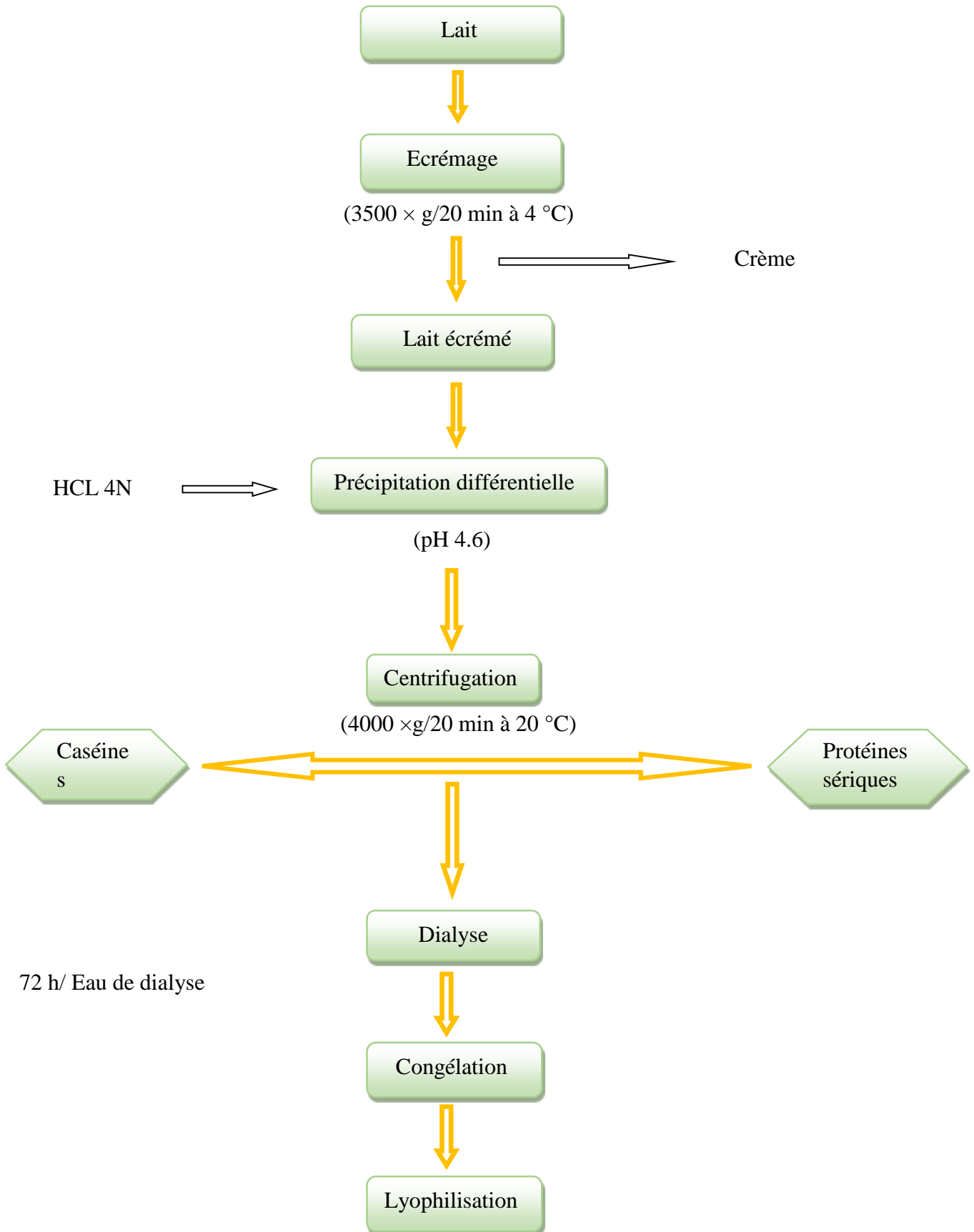


Figure 15 : Diagramme résumant les étapes d'isolement des caséines et des protéines sériques du lait bovin.

2.1.2.3. Méthodes enzymatiques

2.1.2.3.1 Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine

La trypsine est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. Son poids moléculaire est de 24000 Da. La trypsine agit sur les liaisons peptidiques (Figure16) dont le groupement carboxyle provient de lysine ou l'arginine (SZMOLA *et al.*, 2003).

Au cours de notre stage, on nous avons effectué une étude sur la sensibilité des protéines sériques vis-à-vis de la trypsine.

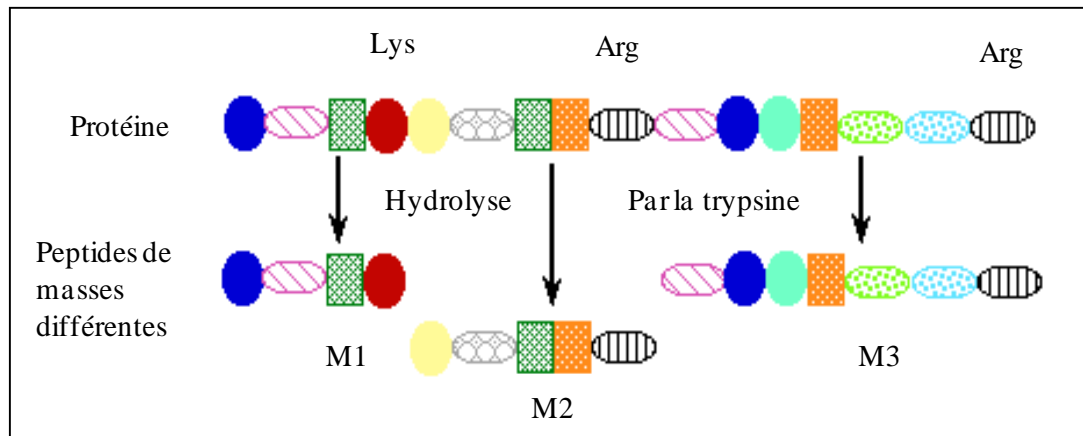


Figure 16 : mécanisme d'action de la trypsine (JASPARD, 2008)

Dans le but de tester la sensibilité des protéines sérique du lait de vache à la trypsine, ces dernière ont été isolées, lyophilisées et soumise à l'action de la trypsine dans les conditions expérimentales représentées par le schéma ci- dessous (Figure 17).

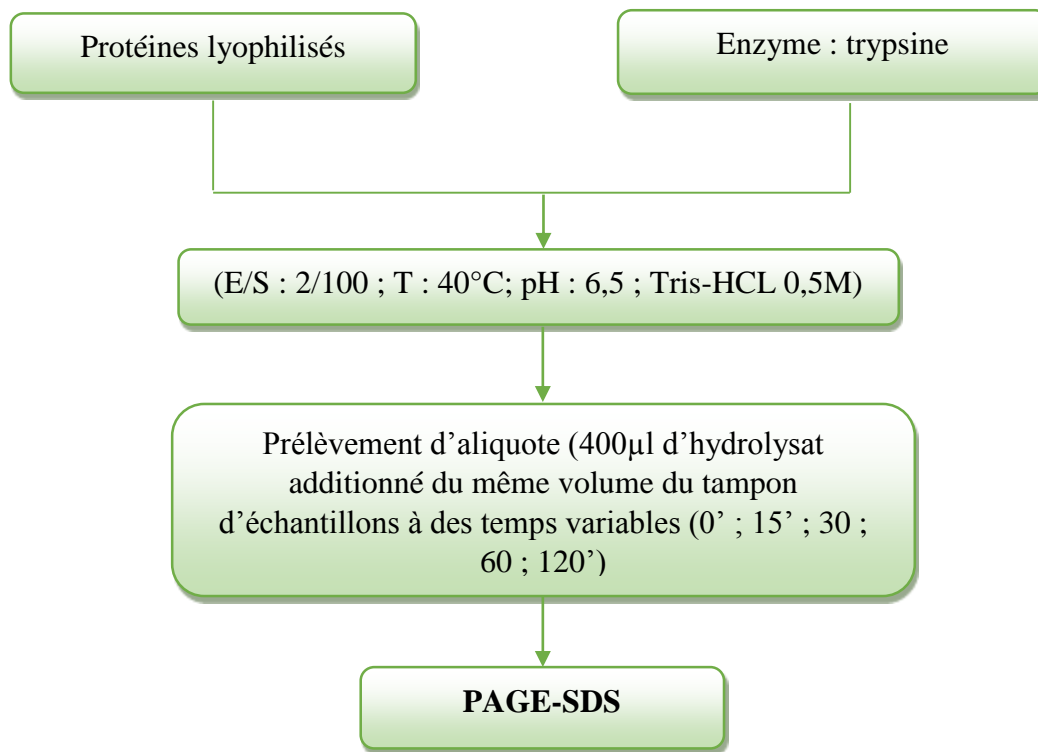


Figure 17: Etapes suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine

2.1.2.4. Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode d'analyse permettant la séparation et l'identification des différentes espèces chimiques constituant un mélange. Dans notre expérimentation, nous avons eu recours à la chromatographie de perméation sur gel pour séparer les protéines sériques du lait de vache.

2.1.2.4.1. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100

La chromatographie d'exclusion ou de perméation sur gel permet de séparer et de purifier les molécules selon leur taille leur forme moléculaire à travers une phase stationnaire qui permet d'éluer les entités protéiques dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaires (Figure 18).

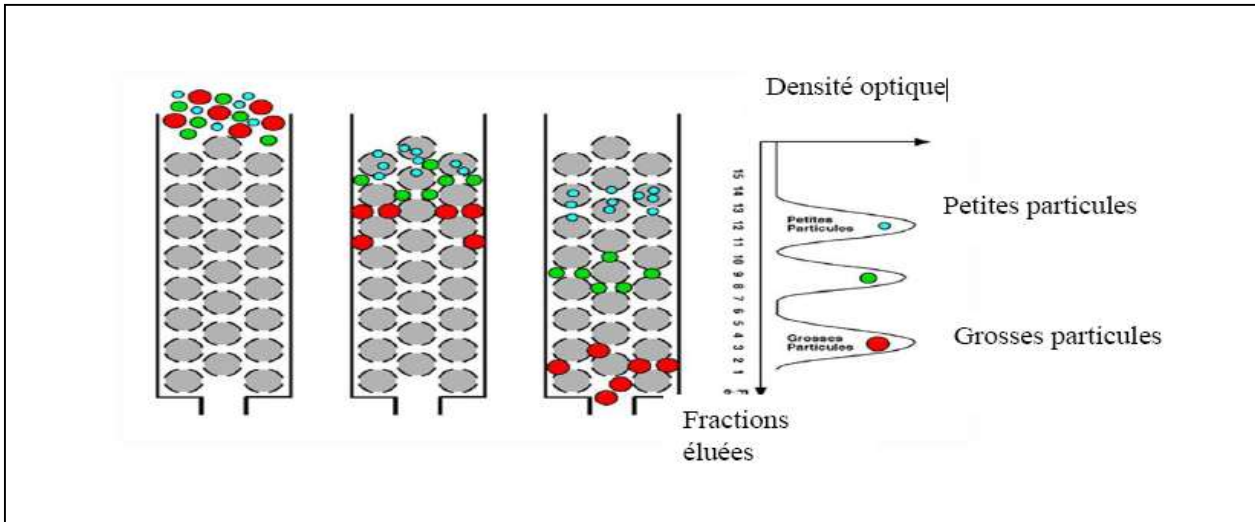


Figure 18 : schéma du tamisage moléculaire

Les protéines sériques du lait bovin sont fractionnées selon la masse moléculaire en utilisant une phase stationnaire constituée de sephacryl S100 qui est un gel préparée par réticulation covalente d'un allyle de dextrane avec du N, N méthylène bisacylamide. Ce gel ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2.5.10^5$ Da.

Le gel de sephacryl S100 prêt à l'emploi, est mis en contact du tampon (Tris-HCL 0.02 M, pH 8.4) pendant 30 min. Il est ensuite coulé dans la colonne (20×1 cm). Après stabilisation par l'éluant, à un débit de 0.46 ml/min, le volume mort de la colonne (V_0) est déterminé par injection de bleu dextrane à la concentration de 1 mg/ml.

Les protéines sériques lyophilisées sont solubilisée dans le tapon Tris-HCL (0.02 M pH 8.4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à débit constant. des fractions de 1 ml sont recueillies pour les besoin de leur identification.

2.1.2.5. Méthodes électrophorétiques

2.1.2.5.1. Principe générale

L'électrophorèse est une méthode d'analyse dont le principe repose sur migration de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique.

Les protéines, du fait de leur caractère amorphe peuvent se déplacer dans un champ électrique en fonction de leur charge, leur taille et des conditions du milieu. En fonction de

différents paramètres (charge, masse, forme, condition physico-chimique), la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différents molécules.

La séparation des protéines du lait a été réalisée en procédant à différents types d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) : en condition native, en présence d'agent dissociant et dénaturant.

Les séparations électrophorétiques ont été réalisés sur gel de polyacrylamide, qui est le produit de polymérisation de monomère d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et un agent de pontage qui est le N, N' méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), en présence de persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) et de N, N, N, N-tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) comme catalyseurs de la réaction (Figure19).

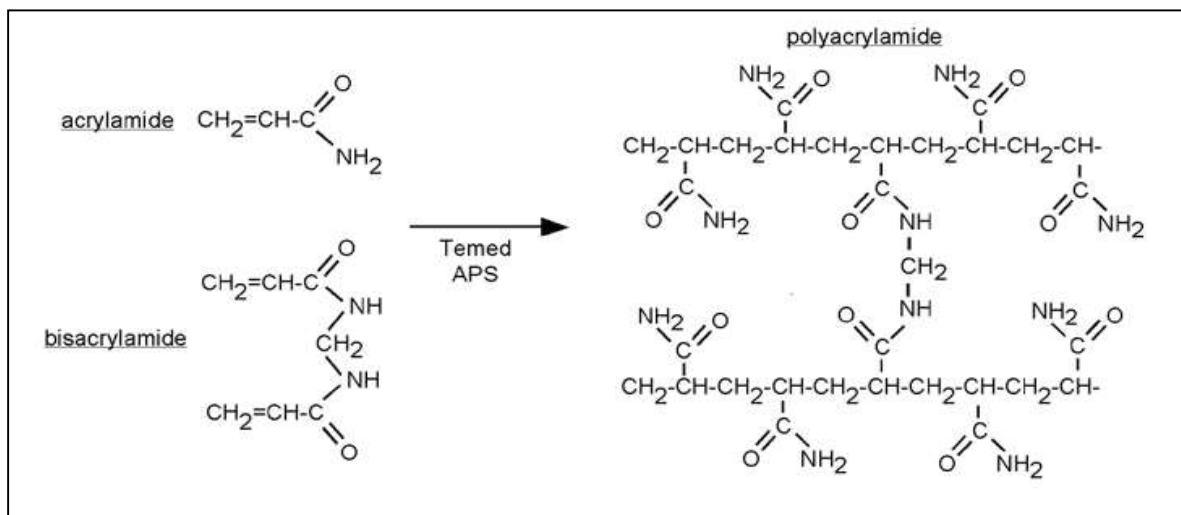


Figure 19: réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide

La porosité du gel est contrôlée par la concentration en acrylamide et de bisacrylamides. La structure de gel est définie par les indices T qui signifie la taille des pores et C la concentration du gel :

- $T(\%) = (a+b/v) \times 100$
- $C(\%) = (b/a+b) \times 100$
- a = quantité d'acrylamide (g)
- b = quantité d'N, N' méthylène-bisacrylamide (g)

➤ v = volume de tampon (ml)

2.1.2.5.2. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native) est bien adaptée pour la séparation des protéines sériques du lait. Celles-ci migrent dans ce cas selon leur charge et leur poids moléculaire.

Pour cela, nous avons utilisés la méthode de Hiller (1976) avec un gel de polyacrylamide à T=12% et C=2.7%.

Le tampon de gel est composé de Tris, 0.75M, pH 8.9. Le tampon d'électrode est constitué de Tris, 5mM ; glycine, 77mM ; pH 8.3. Les échantillons protéiques sont dissous dans le tampon d'échantillon composé de du tampon de gel (1/10 v/v), de l'eau distillée (7/10 v/v) et du glycérol 10% (v/v). Les échantillons sont déposés à raison de 20 μ l dans chaque puits, à l'aide d'une seringue Hamilton après avoir monté l'unité électrophorétique et rempli les cuves supérieures et inférieures de tampon d'électrode.

2.1.2.5.3. Electrophorèse en condition dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Ce type de séparation est basé sur un système biphasique, comprenant deux types de gels : un gel de concentration (T=4% et C=2.7%) en tampon TRIS-HCL, pH 6.8, faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend à concentrer les échantillons et un gel de séparation (T=17% et C=2.7%) en tampon TRIS-HCL, pH8.8, à travers lequel les protéines migrent selon leur poids moléculaire (Laemmli et Favre, 1973).

Ce type d'électrophorèse est utilisé pour faire séparer les protéines d'un mélange selon leur taille et forme moléculaire.

Pour cela, un échantillon protéique est chauffé à 100 °C pendant 5 minutes, en présence d'un détergent anionique, le Dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Figure 20), qui est utilisé pour conférer aux protéines une charge globale négative et d'un agent réducteur chargé de rompre des ponts disulfures, qui est le 2-mercaptoéthanol.

Dans ce cas la plupart des polypeptides sont dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

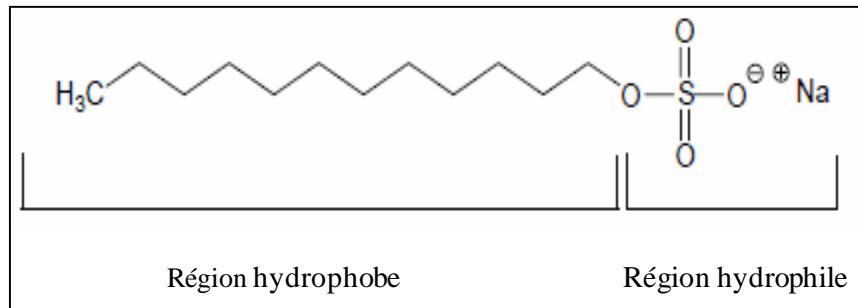


Figure 20 : Structure du dodécyl sulfate de sodium (SDS).

2.1.2.5.4. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration le gel est démoulé pour subir les opérations suivantes :

Fixation : réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (P/V) pendant 45min ;

Coloration : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de comassie 0.2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (P/V) ;

Décoloration : réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3.12/1.5/0.37 (V/V/V).

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Qualité physicochimique du lait

2.2.1.1. Teneur en protéines

Les résultats concernant la teneur en protéines des échantillons des laits analysés: lait de vache, lait reconstitué et lait UHT, sont rassemblés dans le tableau VI.

Tableau VI : La teneur en protéines dans les différents échantillons du lait analysés par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

Echantillons	Lait de vache	Lait reconstitué	Lait UHT
Protéines totales (g/l)	32.16	26.90	20.40

Selon les résultats obtenus, en utilisant la méthode de LOWRY *et al* (1951). La teneur en protéine totale concernant le lait de vache est de l'ordre de 32.16 g/l. Cette concentration est comparable avec celle rapportées par JEANET *et al.*, (2007) qui est de 32-34 g/L.

D'après les résultats figurant dans le tableau 6, les teneurs en protéines ne présentent pas une grande différence entre le lait reconstitué qui de 26.90g/l et le lait UHT qui est de 20.40 g/l.

On note également que la teneur en protéine révèle une grande différence entre les laits commercialisés (26.90 g/l pour le lait reconstitué et 20.40 g/l pour le lait UHT) avec celle obtenue pour le lait de vache (32.16 g/l). Cela peut être expliqué par la dénaturation des protéines lors de traitement thermiques.

La teneur en protéine varie en fonction de l'espèce, mais aussi au sein d'une même espèce, des facteurs environnementaux tels que la nutrition et la saison. Cette variabilité peut aussi dépendre du stade de lactation, et de l'âge (POUGHEON *et* GOURSAUD, 2001).

Concernant les méthodes, Il en existe d'autres pour doser les protéines, on peut citer par exemple la méthode de BRAFORD, de biuret et de KJELDAHL.

La méthode de KJELDAHL est la méthode de référence pour la détermination de l'azote contenu dans un produit, mais très peu utilisée en raison sa complexité . Elle s'effectue en 3 étapes : la minéralisation, la distillation et le titrage.

2.2.1.2. Teneur en glucides

La teneur en lactose du lait de vache est de 49.33g/l. Cette teneur répond bien à la norme requise 48-50 g/l (Hoden et COULON, 1991).

L'analyse des résultats figurant dans le tableau VII, montre que les teneurs en lactose ne présentent pas une grande différence entre le lait reconstitué (42.22g/l) et le lait UHT (38.88g/l).

Ainsi, la teneur en lactose de lait pasteurisé et de lait reconstitué semble légèrement inférieures par rapport au lait de vache.

Tableau VII: Teneur en glucides dans les échantillons du lait analysés par la méthode de DNS

Echantillons	Lait de vache	Lait reconstitué	Lait UHT
Lactose (g/l)	49.33	42.22	38.88

2.2.1.3. Teneur en vitamine C

ADRIAN *et al*, (1981), définissaient l'acide ascorbique comme étant la lactone de l'acide L-gluconique, sa formule brute est $C_6H_8O_6$, et son poids moléculaire est de 176 g. mol^{-1} . C'est une vitamine hydrosoluble incolore qui tend à jaunir en vieillissant, surtout en atmosphère humide.

La propriété essentielle de l'acide ascorbique est sa facilité à l'oxydabilité, la chaleur augmente sa vitesse d'oxydation. En milieu acide, la vitesse d'oxydation est diminuée. Il est très sensible aux bases, ce qui augmente sa vitesse d'oxydation en milieu alcalin.

La vitamine C est nécessaire à l'élaboration du collagène, elle contribue à la santé des dents et des gencives. Elle favorise l'absorption du fer alimentaire, elle est également nécessaire à la synthèse des acides biliaires.

La vitamine C est présente naturellement dans de nombreux et principalement dans tous les fruits et les légumes. En comparaison des fruits ou légumes qui en fournissent jusqu'à 100 fois plus, le lait ne représente pas une bonne source de vitamine C.

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie, l'acide ascorbique s'oxyde avec le DCPIP qui est étalonné à l'aide d'une solution d'acide ascorbique. Le tableau VIII résume les résultats obtenus.

Tableau VIII : Teneur en vitamine C dans les échantillons du lait analysés

Echantillons	Lait de vache	Lait pasteurisé	Lait UHT
Vitamine C (mg/l)	16.07	11.25	7.7

La teneur en vitamine C de lait de vache est estimée de 16.07mg/l. Cette valeur ne présente pas une grande différence comparativement avec celle rapporté par (LUQUET, 1986) qui est de 10 à 20 mg/l.

L'analyse des résultats figurant dans le tableau 7, montre que les teneurs en vitamines C ne présentent pas une grande différence entre le lait pasteurisé (11.25mg/l) et le lait UHT (7.5mg/l).

Ainsi, la teneur en vitamine C de lait pasteurisé et de lait reconstitué semble légèrement inférieures par rapport au lait de vache. Cela peut être expliqué par la perte de la vitamine C. En effet, la vitamine C est très fragile, sensible à l'air, à la lumière et au chauffage (perte de 10% en pasteurisation). Le stockage et l'agitation du lait en tanks réfrigérés (2 à 4°C) pendant 36 heures détruit plus de la moitié de l'acide ascorbique.

D'autre méthode titrimétrique peuvent être utilisée pour le dosage de la vitamine C en utilisant différents réactifs tels que l'iode (RAO et PRASAD, 1976), le dihaloïde de potassium (SKURIDIN, 1980), le nitrate ou sulfate de cuivre (SHAHINE, 1980), le nitrate double de cérium et d'ammonium (VERMA *et al.*, 1980), le chloranile (VERMA *et al.*, 1984) et les sels de thallium (VERMA *et al.*, 1983).

2.2.2. Séparation des protéines sérique du lait par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S100

Vu le grand intérêt que représentent les protéines du lactosérum sur le plan fonctionnel et biologique, la mise en œuvre de méthode facile et peu couteuse et surtout peu dénaturante est toujours un objectif analytique.

Dans ce cadre, nous avons fractionné les protéines sériques du lait de vache, en utilisant la chromatographie de perméation sur gel. Après plusieurs étapes d'optimisation des paramètres de séparation, les protéines ont été éluées comme indiqué dans le profil chromatographique (Figure 21), qui se caractérise par l'existence de six fractions nommées F1, F2, F3, F4, F5. Ces fractions sont ensuite analysées par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes et non dissociantes.

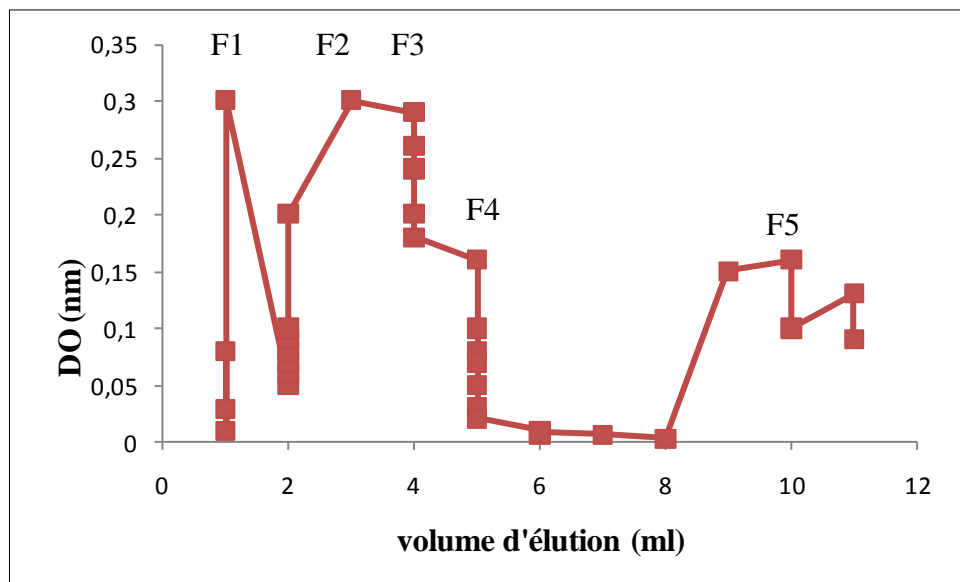


Figure 21 : Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur Séphacryl S100 ; F1, F2, F3, F4, F5 : Fraction éluées

2.2.3. Caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en native (PAGE-native).

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition non dissociante et non dénaturante (PAGE-native) est résolutive et bien adapté pour la séparation des protéines sériques du lait, car elle permet de garder les protéines dans leurs états natifs.

En page native, la mobilité des fractions protéiques dépend à la fois de leur charge et de leur PM.

Cette technique est appliquée aux fractions protéiques obtenues par chromatographie de perméation sur gel. L'électrophorèse présente un profil de migration (Figure 22) caractérisé par la variabilité des bandes selon leur intensité et leur focalisation.

Dans le cas du lait bovin, les protéines sériques migrent en cinq bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétique aux immunoglobulines (Igs), le sérum albumine bovine (BSA), l'alpha-lactalbumine (α -La) et à la fin de migration la bêta-lactoglobuline (β -Lg). (KINGSBURY et GAUNT, 1967 ; EGITO *et al*, 2001 ; ERIKSEN *et al.*, 2010).

Le profil électrophorétique en figure (22) contient l'échantillon de control qui referme des protéines sériques bovines ; et les cinq fractions issues de la chromatographie de perméation sur gel : F1, F2, F3, F4, F5.

Pour l'échantillon de control, nous n'avons pas eu une bonne séparation. Nous avons pu identifier uniquement la bêta lactoglobuline (β -La), cela peut être est dû à la faible concentration en protéine.

La fraction F2 récupérés à révélé quatre bandes de protéines correspondant à l'albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines, l'alpha-lactalbumine (α -La) et la bêta-lactoglobuline (β -La). La fraction F3 a révélé que la migration d'une bande fine qui correspond à et la bêta- lactoglobuline (β -La).

En ce qui concerne les fractions F4 et F5 récupérés lors de l'élution, le profil électrophrétique n'a donné aucune bande, cela pourrait être d à la faible concentration en protéines ou bien on a récupéré des impuretés.

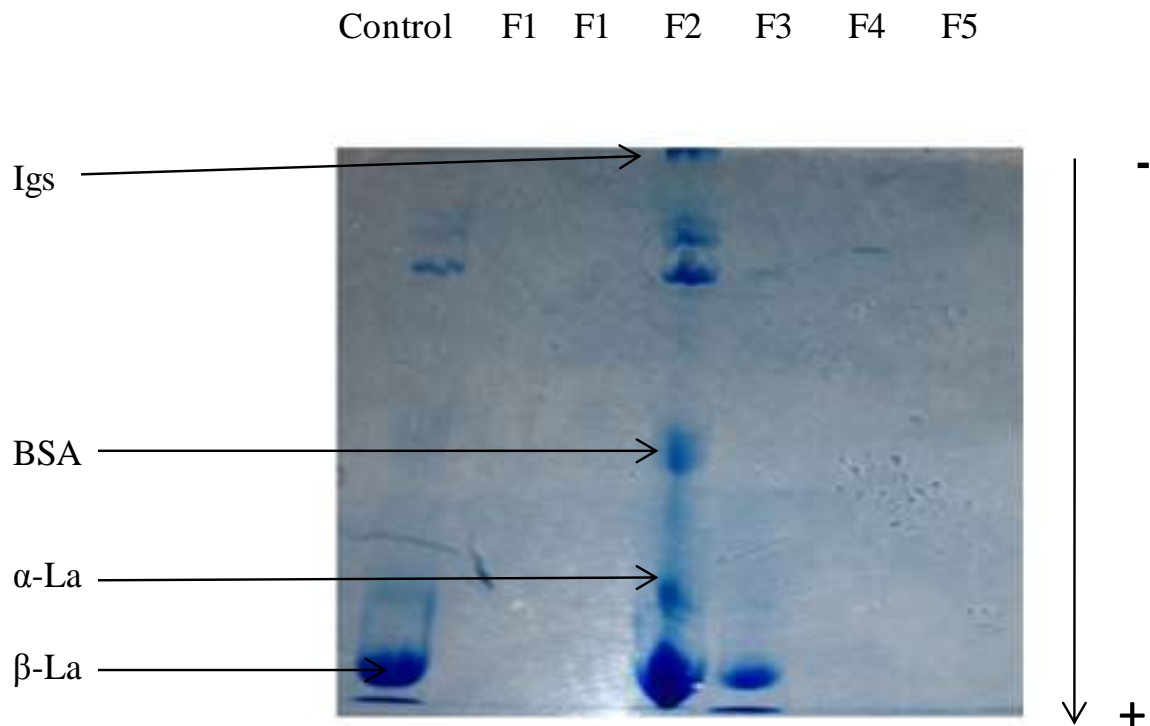


Figure 22 : Contrôle électrophorétique en PAGE-native des fractions éluées F1,F2, F3, F4 et F5 issues de la chromatographie de perméation des protéines sériques bovines sur Séphacryl S100, tampon Tris-HCL 0,02 M ; pH 8,4 ; T = 12 %, C = 2,7 %.

2.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques par la trypsine et caractérisation électrophorétiques (PAGE-SDS) des hydrolysats obtenus.

Il a été possible de séparer les protéines sériques par l'emploi de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence d'un détergent anionique qui est SDS et d'un agent réducteur qui le 2-mercaptoéthanol. Ces deux composants agissent en dénaturant les molécules protéiques par destruction de leurs structures tridimensionnelles natives en rompant les liaisons hydrogènes et les ponts disulfures.

La trypsine est une protéase à sérine, elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. Son poids moléculaire est de 24000 Da. La trypsine agit sur les liaisons peptidiques dont le groupement carboxyle provient de lysine ou l'arginine.

Pour ce qui est de notre manipulation, nous avons essayé de faire un suivi de la cinétique de cette enzyme par électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS). Nous avons obtenus des hydrolysats à différents temps d'incubation (T0, T15, T30, T60, T120), constitués de produits d'hydrolyse de la trypsine à savoir des peptides et des acides aminés.

Le profil électrophorétique en figure (23) contient les protéines sériques (control) ainsi que les échantillons prélevés à des temps T, T2, T3, T4 et T5 correspondant 0 mn, 15 mn, 30 mn, 60 mn, 120 mn.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS (figure 23) pour les protéines sériques a révélé l'existence des bandes intenses au niveau de l'échantillon de control correspondant à l'albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines (Igs), la β -lactoglobuline (β -La) et l' α -lactalbumine (α -La).

Le profil électrophorétique révèle l'existence des bandes serrées et d'une intensité maximale au niveau de l'échantillon correspondant à T'0, ainsi que au niveau de la bande correspondant à la simulation.

Concernant l'échantillon T15, des bandes claires bien séparées sont révélées, traduisant l'hydrolyse enzymatique des protéines. En ce qui concerne les échantillons T30, T60, les bandes sont encore plus claires. Pour l'échantillon T 120, il y a eu quelques bandes très fines et séparées, ce qui signifie la dégradation enzymatique des protéines sériques.

L' α -lactalbumine semble être résistante à l'action de la trypsine même après 120 minutes d'incubation, puisque la bande correspondante reste de la même intensité. Ceci pourrait être dû à la structure globulaire compacte de la protéine qui rend le site de coupure de la trypsine inaccessible. La β -lactoglobuline est plus sensible par rapport à α -La, du fait de sa structure globulaire moins compacte (LUNG *et al.*, 1991).

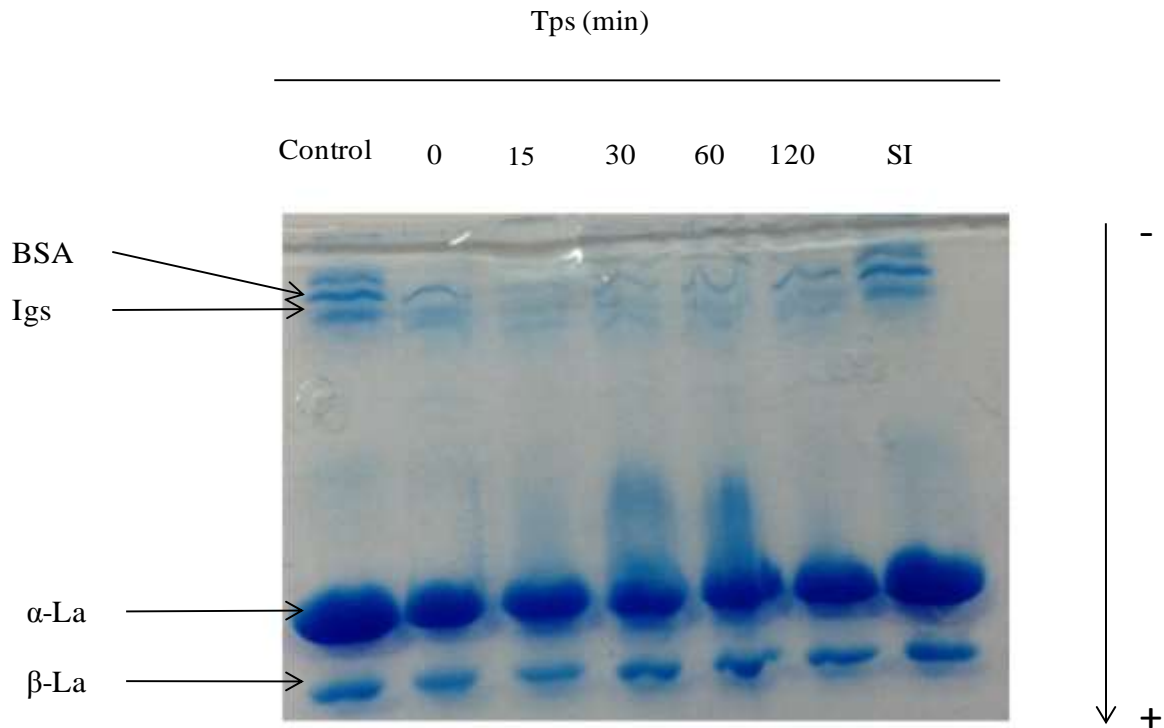


Figure 23 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS des protéines sériques bovines après traitement enzymatique par la trypsine; Gel de concentration (T= 4% et C= 2.7%), gel de séparation (T= 17% et C= 2.7%).

2.2.5. Hydrolyse enzymatique des caséines par la trypsine et caractérisation électrophorétiques (PAGE-SDS) des hydrolysats obtenus.

Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphore, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phosphocaseinate de calcium. En présence de calcium, elles forment des unités qui agrègent plusieurs milliers de molécules, constituant les micelles de caséine dispersés dans la phase hydrique du lait. Cette configuration spatiale permet aux enzymes hydrolytiques une digestion plus aisée notamment à la trypsine.

Le profil électrophorétique en figure (24) contient les caséines (control) ainsi que les échantillons prélevés à des temps T, T2, T3, T4 et T5 correspondant 0 mn, 15 mn, 30 mn, 60 mn, 120 mn.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS (Figure 24) pour les caséines à révélé l'existence des bandes intense correspondant aux caséines au niveau de l'échantillon de control, ainsi que au niveau de l'échantillon n'ayant subit un traitement enzymatique (SI).

On note également la disparition des bandes juste après le traitement des caséines par la trypsine (0 min) et qui persiste jusqu'à pendant la duré d'incubation (120 min). La disparition rapide des caséines est due à l'hydrolyse totale par la trypsine.

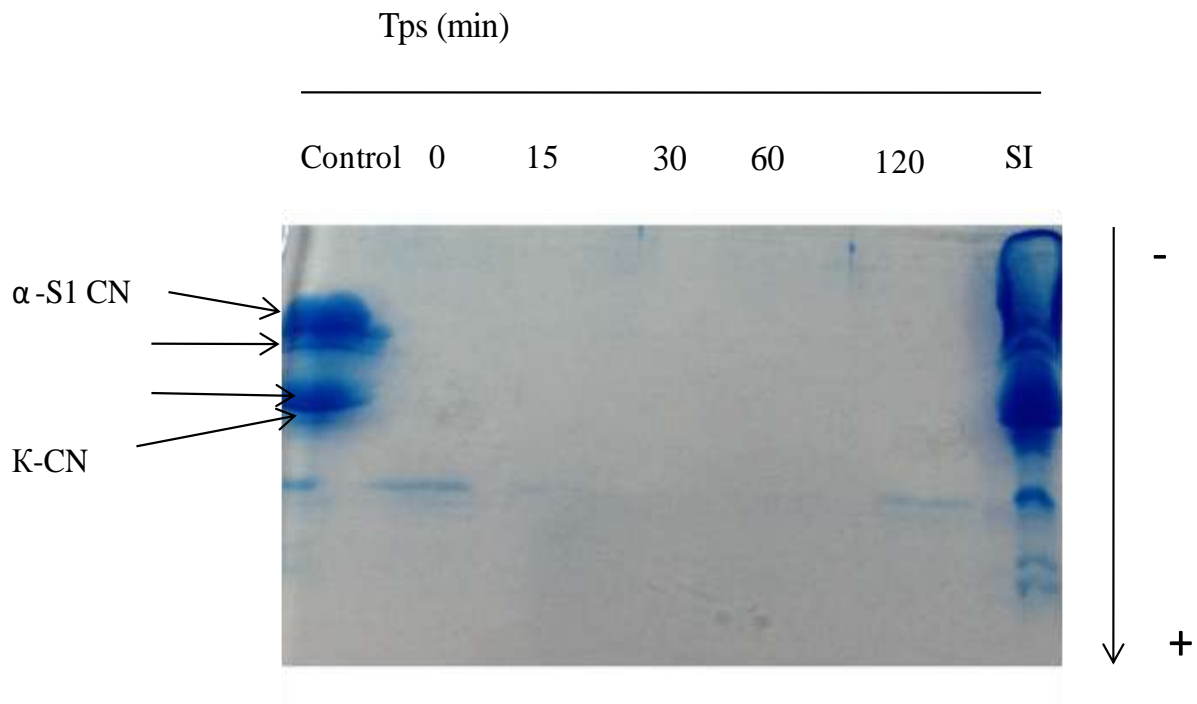


Figure 24 : Profil électrophorétique en PAGE-SDS des caséines bovines après traitement enzymatique par la trypsine; Gel de concentration (T= 4% et C= 2.7%), gel de séparation (T= 17% et C= 2.7%).

Conclusion

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. Les méthodes d'analyse classiques permettent de définir la composition d'un produit alimentaire pour élaborer une stratégie d'analyse et de contrôle appropriée selon le produit en question.

A côté des dosages physicochimiques qui figurent parmi les méthodes classiquement utilisées telles que le dosage de la vitamine C, dosage des glucides et dosage des protéines, il y a des méthodes plus pointues car elles fournissent des données plus précises. Dans ce contexte, les méthodes chromatographiques et électrophorétiques constituent un moyen stratégique pour le contrôle la qualité des aliments.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

ANONYMOUS. Human plasma for fractionation. European Pharmacopeia Council of Europe, EDQM; **2007**

ARRETE DU MINISTRE DE LA SANTE PUBLIQUE n° 176-96 du 17 ramadan 1416 (7 février 1996), fixant la liste des dérivés stables issus du fractionnement physico-chimique du sang.

DANIC. D, A. BEUPLLET. A. La collecte de sang en France : organisation et difficultés. Hématologie mini revue **2003**; Numéro 3, 9 : 231-40

BOLTON-MAGGS PHB, Factor XI deficiency and its management. Haemophilia **2000**; 6 : 100-9.

B. ROUSSEL, J. DIVERAL, N. GUILLAUME, J-J. LEFRERE. Le point sur les médicaments d'origine plasmatique dans le traitement des maladies hémorragiques et des maladies thrombotiques. Hématologie **2005**; Numéro 3, 11: 189-200.

BURNOUF T. plasma fractionation in the world: current status. transfus clin Biol **2007**; **14** : 41-50.

BURNOUF T, PADILLA A. Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives. Transfus Clin Biol **2006**; 13 : 320-8.

BURNOUF T, RADOSEVITCH M. La prévention des risques infectieux des dérivés plasmatiques. Hématologie **2000**; 6 : 289-99.

CHETHOUNA F. (2011). Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologique du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Mémoire en de Magister. Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algerie.

CHUMP. Guideline on requirements for plasma master file (PMF) certification. CPMP/BWP/4663/03. **2004**

COHN E, STRONG L, HUGHES W, et al. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J Am Chem Soc **1946**; 68 : 459-75.

COHEN BJ, TAYLOR JJ. Structure et fonctions du corps humain. Anatomie et physiologie. Paris: Maloine; 2008.

DERBY, GERARD. Lait, Nutrition et santé. Paris : Tec et doc, 2001, 566p.

FLAN B. Filtration 15 nm : sécurité biologique. *Sang Thromb Vaiss* **1998**; 10 : 29.

GHAOUES Souheila. (2010). Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de Cinq marques de lait reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est algérien. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences alimentaires. Université Mentouri, Constantine.

GUIDE POUR LA PREPARATION, l'utilisation et l'assurance de qualité des composants sanguins 12^{ème} édition, édition du conseil de l'Europe, 2004, 284p.

JANUEL, CAROLINE. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète. Thèse de doctorat en Biochimie. Lyon : Université de Lyon I, 2003, 200p.

KILSTLER P., NITSCHMAN H. Large-scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. *Vox Sang* **1962**; 7 : 414-24.

LENORMAND G (2001). Elasticité du squelette du globe rouge humain. Thèse de doctorat. Université Paris VI, Paris.

MAALEM D., OUAHOUN T. (2013). Evaluation des caractéristiques physico-chimique et organoleptiques et étude de la stabilité de la vitamine C de la boisson fruit «Tchina» de Cojeck. Diplôme d'ingénieur d'état .Université Mouloud Mammeri, Tizi- ouzou.

MATHIEU, JACQUES. Initiation a la physicochimie du lait. Paris : Tec et doc, 1998, 220p.

MERCIER V. (2011). Stimulation de la cicatrisation du tissu gingival et du tissu osseux par l'utilisation de concentrés plaquettaires. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy.

PASCALE Poullin., PATRICE Lefevre., Médicaments dérivés du plasma Anesthésie-Réanimation **2002**; [36-730-A-20].

RAHMOUNI N. (2009). Les médicaments dérivés du sang et produits recombinants. Thèse de doctorat. Université Mohammed V, Rabat.

RIVALIN N. (2009). Sur un procédé hautes pression de sécurisation du plasma sanguin humain. Thèse de doctorat. Université de Bordeaux 1, Bordeaux.

Robert C, Vincent P. Biologie et physiologie humaines. Paris: Vuibert; 1997.

SID AHMED ZENNIA S. (2015). Isolement et séparation des protéines sériques du lait de chamelle : mise en évidence de phénomène de désamination de l' α -lactalbumine ; conséquence sur la stabilité structural. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, Algérie.

SOLLIER E. (2009). Microsystèmes pour la préparation d'échantillons sanguins. Thèse de doctorat. Grenoble : Université Joseph Fourier, Grenoble.

T.SCHNEIDER.T, O. FONTAINE, J.J. HUART. Éthiques, motivations des donateurs d'aphérèse plasmatique. Transfusion Clinique et Biologique **2004**; 11 : 146-152