



**HAL**  
open science

## Compression osmotique de protéines globulaires

Sophie Rigault

► **To cite this version:**

| Sophie Rigault. Compression osmotique de protéines globulaires. 2011, pp.1-34. <hal-01454140>

**HAL Id: hal-01454140**

**<https://hal.science/hal-01454140v1>**

Submitted on 6 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Sophie Rigault  
Génie des Procédés



Rapport de stage TN09

# Compression osmotique de protéines globulaires

Stage assistant ingénieur

Du 01 septembre 2010 au 17 février 2011

*Tuteurs de stage : M. Stéphane Pezennec  
M. Antoine Bouchoux  
Suiveur UTC : M. Jérémie Castello*



**Institut National De La Recherche Agronomique - Agro Campus Ouest**

SCIENCE ET TECHNOLOGIE DU LAIT ET DE L'OEUF UMR 1253  
65 RUE DE ST BRIEUC  
35042 RENNES  
FRANCE

## Remerciements

Tout d'abord, je remercie toutes les personnes de l'UMR STLO. Elles font régner une ambiance de travail très agréable. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Sylvie Lortal, directrice de l'UMR, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Je tiens tout particulièrement à remercier Stéphane Pezennec, encadrant du stage et Antoine Bouchoux, co-encadrant pour leur pédagogie, leur disponibilité, leur bonne humeur et leur gentillesse. Merci de m'avoir aidée à m'approprier le sujet. Les discussions sur les résultats d'expériences étaient vraiment passionnantes. Merci d'avoir fait de ce stage une expérience très enrichissante. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous.

Je tiens à remercier M. Jeremie Castello, suiveur UTC, pour sa visite fin janvier. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon stage.

Je remercie Estelle Robert, de l'Institut de Physique de Rennes, pour son aide lors des premiers jours de stage. Merci à Michel Piot pour son aide pour la lyophilisation et ses explications techniques sur cette méthode. Merci à Claire Prioul et Maryvonne Pasco pour leur aide précieuse sur les chromatographies liquides haute performance. Je remercie Peng Qu pour son savoir faire sur les compressions, les extraits secs et l'osmomètre à membrane. Merci à Gwénoélé Gernigon pour le temps consacré à m'aider sur le DVS.

Je remercie également l'équipe ISFPL (interactions, structures, fonctionnalités des protéines et lipides) et Said Bouhallab de m'avoir intégrée et appris beaucoup lors des réunions d'équipe.

Un grand merci à mes supers collègues de bureau : Michele, Ousmane, Ana, Taous, et Mathilde. Quel bonheur d'arriver le matin et de retrouver des personnes si positives et chaleureuses. Merci pour votre soutien et vos petites attentions.

## Sommaire

|   |    |
|---|----|
| I. Introduction.....  | 5  |
| I.1. L'INRA, organisme de recherche finalisée.....          | 5  |
| I.1.1. L'INRA, institut national.....                       | 5  |
| I.1.2. UMR Science et technologie du lait et de l'œuf ..... | 5  |
| I.1.3. Equipe ISFPL .....                                   | 6  |
| I.2. Le stage: contexte et intérêt.....                     | 7  |
| I.2.1. Contexte et études antérieures .....                 | 7  |
| I.2.2. Sujet et objectifs .....                             | 8  |
| II. Généralités .....                                       | 9  |
| II.1. L'œuf de poule.....                                   | 9  |
| II.1.1. Sa composition .....                                | 9  |
| II.1.2. Les protéines du blanc d'œuf .....                  | 9  |
| II.2. Pression osmotique des solutions.....                 | 10 |
| II.2.1. L'osmose et pression osmotique .....                | 10 |
| II.2.2. Modèles .....                                       | 10 |
| III. Matériels et méthodes.....                             | 12 |
| III.1. Les protéines.....                                   | 12 |
| III.1.1. Lysozyme .....                                     | 12 |
| III.1.2. Préparation de l'ovalbumine .....                  | 12 |
| III.1.3. Analyses et dosages .....                          | 16 |
| III.2. Compression osmotique.....                           | 18 |
| III.2.1. Dialyse à l'équilibre .....                        | 18 |
| III.2.2. Détermination de la concentration .....            | 20 |
| III.3. Osmométrie à membrane .....                          | 21 |
| III.4. <i>Dynamic Vapor Sorption (DVS)</i> .....            | 21 |
| IV. Résultats et discussion.....                            | 22 |
| IV.1. Morphologie .....                                     | 22 |
| IV.2. Profil de pression osmotique .....                    | 25 |
| IV.3. Modèles & discussion.....                             | 26 |
| IV.3.1. Equation de Van't Hoff : Régime dilué .....         | 26 |
| IV.3.2. Modèle des sphères dures de Carnahan-Starling ..... | 27 |
| IV.3.3 Confrontation aux données de la littérature .....    | 29 |
| IV.4. Conclusion.....                                       | 32 |
| IV.5. Perspectives .....                                    | 32 |
| V. Conclusion générale .....                                | 34 |
|   | 3  |

## Résumé

Les protéines du blanc d'œuf sont souvent utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et pharmaceutique comme agents texturants. Elles ont, en particulier, d'excellentes propriétés interfaciales. Après l'adsorption des protéines, des concentrations très élevées, de l'ordre de plusieurs centaines de grammes par litre, ont été mises en évidence à l'interface air-solution.

Afin de mieux comprendre la contribution de cette surconcentration aux propriétés interfaciales, nous avons compressé par dialyse à l'équilibre des solutions d'ovalbumine et de lysozyme, choisies pour leurs comportements différents à l'interface, sur une gamme de pressions osmotiques allant jusqu'à 50 bar pour établir l'équation d'état liant la concentration à la pression osmotique. Des différences entre ces protéines sont mises en évidence. Elles vont dans le même sens que celles observées à l'interface, mais sont inattendues par rapport à la biochimie. Il y a donc des vraies différences au niveau de la nature des protéines, et leur confinement, indépendamment du contact avec l'interface hydrophobe, joue sur leurs propriétés interfaciales.

## I. Introduction

### I.1. L'INRA, organisme de recherche finalisée

#### I.1.1. L'INRA, institut national

L'Institut national de la recherche agronomique (INRA) est un organisme de recherche scientifique publique finalisée, placé sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche. Il a le statut d'établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST).

Ses recherches concernent les questions liées à l'agriculture, à l'alimentation et à la sécurité des aliments, et à l'environnement, avec une perspective de développement durable.

L'INRA a été fondé en 1946, il est aujourd'hui le premier institut européen de recherche agronomique (deuxième dans le monde) en terme de publications.

L'INRA est divisé en 14 départements scientifiques, et 20 centres de recherche régionaux, 208 unités de recherche dont 137 unités mixtes de recherche (UMR) associant l'INRA à d'autres organismes de recherche ou d'enseignement supérieur.

#### I.1.2. UMR Science et technologie du lait et de l'œuf

Implantée à Rennes, l'Unité Mixte de Recherche «Science et Technologie du Lait et de l'œuf» (UMR STLO) dépend des départements scientifiques Microbiologie et chaîne alimentaire (MICA), et Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture (CEPIA). Au sein de cette unité travaillent 74 permanents, 25 doctorants et environ 10 masters. Le STLO est une Unité mixte de recherche INRA / Agrocampus Ouest.

##### I.1.2.a. Une implantation stratégique

La France est le 2<sup>e</sup> principal producteur de lait de l'UE, 47 % des 23 millions de tonnes de lait produites en France sont collectés et transformés dans la région Bretagne.

De plus, la France est le 1<sup>er</sup> producteur européen d'œufs, 65 % des 15 milliards d'œufs produits en France sont collectés dans la région Bretagne et 70 % des œufs produits en France sont transformés dans la région Bretagne en ovoproduits (*données Cniel et Itavi*).

La plupart des problématiques scientifiques, tant au niveau de la production qu'au niveau de la transformation de ces deux matières premières, sont communes aux filières lait et œuf.

##### I.1.2.b. Thèmes de recherche principaux

- Connaissance approfondie des matières premières du lait et de l'œuf, de leurs fonctionnalités technologiques et biologiques
- Maîtrise de la qualité des matrices laitières et sécurité alimentaire
- Maîtrise des procédés de séparation sur membranes et de séchage par atomisation (*spray-drying*)

### I.1.2.c. Dispositifs d'expérimentation

L'UMR STLO dispose d'une plateforme technologique de 800 m<sup>2</sup> équipée de matériel destiné au traitement du lait (écrémage, épuration, pasteurisation, UHT, homogénéisation, concentration, fractionnement...) et à la fabrication de fromage. Elle est certifiée ISO9001.

La tour de séchage par atomisation BIONOV, permet aux équipes de l'unité de tester en direct de nouveaux paramètres de déshydratation.

### I.1.2.d. Partenariat industriel

L'UMR STLO a de nombreux partenariats avec l'industrie française principalement l'industrie laitière, et plus récemment avec l'industrie des ovoproduits.

Des cellules R&D de sociétés privées sont installées à demeure (16 personnes) au sein de l'UMR : Herbignac Cheese ingredients (HCI), united pharmaceuticals, agrobio, SODIAAL, les fromageries occitanes, Standa, Isigny Sainte mère.

### I.1.2.e. Six équipes thématiques pour des approches pluridisciplinaires

- TIPIL : transferts et interactions procédés-produits dans l'industrie laitière
- D2R : Dynamique diffusionnelle et réactionnelle au sein des matrices laitières
- BLON : Bio-activité des composants du lait et de l'œuf et nutrition de l'homme
- ISFPL : interactions, structures, fonctionnalités des protéines et lipides
- B2ISI : Biodiversité bactérienne et interactions in situ
- MICOV : Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits

### I.1.2.f. Principales collaborations en recherche

- Partenariat scientifique : 30% des publications sont co-signées avec des laboratoires étrangers ; 60% avec des partenaires français dans le cadre de collaborations (ANR, appels d'offre régionaux...)
- Contrats de recherche avec des entreprises françaises ou étrangères
- Participation à des cours internationaux (Espagne, Chine, Italie, Canada...)

## I.1.3. Equipe ISFPL

Les protéines et les lipides sont les composés principaux qui affectent les propriétés des produits formulés. Les champs d'intérêt sont d'explorer les principaux mécanismes moléculaires derrière le comportement macroscopique des protéines et lipides. Le thème de la recherche est de comprendre comment les interactions moléculaires et les modifications structurales affectent les propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines et des lipides.

Le but de l'équipe ISFPL est d'évaluer le rôle exact des protéines et lipides alimentaires dans les produits formulés et transformés et de découvrir de nouvelles propriétés potentielles comme ingrédients fonctionnels. Elle travaille principalement sur les thèmes suivants:

- Caractérisation structurale de protéines à l'interface air-eau et leurs propriétés moussantes
- Explication des interactions protéine / protéine et des auto-assemblages pour générer de nouvelles structures supramoléculaires
- Comprendre le rôle des assemblages protéiques induits par la chaleur lors de la gélification acide du lait
- Explorer les propriétés des lipides du lait, les mécanismes de l'hydrolyse enzymatique, la digestibilité des globules gras du lait et leurs changements structurels au cours de la transformation laitière.

## I.2. Le stage: contexte et intérêt

### I.2.1. Contexte et études antérieures

Les systèmes de protéines très concentrées sont au carrefour de plusieurs disciplines. On les retrouve dans l'industrie alimentaire, où les protéines confèrent des propriétés texturantes aux produits formulés, dans l'étude de l'interface air-solution, sans oublier l'enjeu générique qu'ils constituent, lié à la compréhension des systèmes colloïdaux concentrés. Les systèmes très concentrés de protéines créent des difficultés, notamment dans la filtration, en diminuant l'efficacité du procédé, ou dans l'industrie pharmaceutique où les protéines s'agrègent dans certaines formules.

L'agrégation des protéines est un problème fréquent rencontré lors de fabrication de produits bio-thérapeutiques. Pour les protéines thérapeutiques, la présence d'agrégats est généralement indésirable car les agrégats peuvent conduire à une réaction immunogène (petits agrégats) ou peuvent causer des effets indésirables à l'administration (particules) (Cromwell M et coll.). C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées sur l'agrégation de ces protéines. Par exemple, Bee JS. et coll. (2009) ont étudié le cisaillement de solutions concentrées d'immunoglobuline-G1 (concentrations supérieures à 100 g/L) en cours de production biopharmaceutique commerciale, le cisaillement pouvant être à l'origine du dépliement des protéines ou de l'agrégation.

Le fractionnement du lait, notamment par les techniques de filtration membranaire, permet un usage optimal des composants du lait (matière grasse, micelle de caséines, protéines sériques). Cependant, le problème de l'encrassement des membranes est un facteur limitant important dans la filtration du lait. (Brans G. et coll., 2004)

Bouchoux et coll. (2009) ont étudié des dispersions de micelles de caséines du lait à des fractions volumiques très élevées en utilisant la méthode de compression osmotique. Les résultats sont applicables aux opérations industrielles où des dispersions de caséines sont très concentrées par filtration ou séchage.

L'adsorption des protéines à l'interface air--solution donne lieu, localement, au voisinage immédiat de l'interface, à des concentrations très élevées de protéines, de l'ordre de plusieurs centaines de grammes par litre. À de telles concentrations, les interactions intermoléculaires (protéine-protéine, protéine-eau, protéines-ions) contribuent de manière prépondérante aux propriétés du film interfacial. Le Floch-Fouéré et coll. (2010) ont mis en évidence des comportements très différents à l'interface entre deux protéines du blanc d'œuf : L'ovalbumine et le lysozyme. Elles ont des cinétiques d'adsorption propres. L'ovalbumine forme des monocouches et confère à l'interface des propriétés essentiellement élastiques, alors

que le lysozyme s'adsorbe en couches multiples, présente une tensio-activité moindre et donne une interface aux propriétés visco-élastique (Le Floch-Fouéré et coll., 2009).

### I.2.2. Sujet et objectifs

La compréhension des systèmes colloïdaux concentrés, dans le cas où les colloïdes sont des protéines, macromolécules amphiphiles, est donc un sujet transversal à plusieurs disciplines. L'étude de l'influence de la nature d'une protéine, de sa charge (du pH), et de la force ionique du milieu sur l'intensité et le type d'interactions présentes en régime concentré peut nous aider à mieux comprendre ces systèmes.

Durant ce stage, nous avons compressé par dialyse à l'équilibre des solutions d'ovalbumine et de lysozyme, choisies pour leurs comportements différents à l'interface, sur une gamme de pressions osmotiques allant jusqu'à 50 bar, dans le but de mieux comprendre la contribution des interactions intermoléculaires et de la surconcentration des protéines aux propriétés interfaciales.

Une fois l'équilibre des potentiels chimiques de l'eau atteint, on mesure la quantité d'eau restante dans la dispersion (liquide, gel, solide). On fait cette mesure pour plusieurs pressions osmotiques, on a ainsi une relation entre la pression osmotique et la concentration de protéines. Cette équation d'état nous permet de mettre en évidence les interactions entre les protéines, puis de les relier aux caractéristiques des protéines (charge, structure, stabilité) et à l'environnement physico-chimique. L'observation des états des dispersions (liquide, gel, solide) nous donne des informations complémentaires sur ces interactions.

L'objectif était donc de préparer des solutions très concentrées (plusieurs centaines de grammes par litre) et d'établir, pour chaque protéine, l'équation d'état liant la concentration à la pression osmotique.

## II. Généralités

### II.1. L'œuf de poule

#### II.1.1. Sa composition

Le poids moyen d'un œuf de poule est de 55-65 g. Les différents constituants peuvent varier en fonction de l'âge de la poule, l'origine génétique, l'alimentation, le mode d'élevage...

Les principales parties de l'œuf sont le jaune ou vitellus (29%), le blanc ou albumen (61%), les membranes coquillères et la coquille (10%).

Le blanc et le jaune représentent plus de 90% de son poids et renferment 74% d'eau.

Le blanc d'œuf est une solution aqueuse de protéines, de sucres et de sels minéraux. Il est quasiment dépourvu de lipides (traces). Son pH est d'environ 7,4 à la ponte et augmente à 9,3 après quelques jours de stockage, ce qui est peu favorable à la croissance bactérienne.

#### II.1.2. Les protéines du blanc d'œuf

**L'ovalbumine** est la protéine majeure du blanc d'œuf, elle représente 54 % des protéines totales. Cette protéine, présente sous forme de monomère, est phosphorylée et glycosylée. Son poids moléculaire est de 44400 Da, et son pH isoélectrique de 4,5. La protéine comporte 385 acides aminés, dont la moitié est hydrophobe. Elle contient 6 acides aminés cystéyls dont deux impliqués dans un pont disulfure. Elle a donc 4 autres groupements SH libres et un pont disulfure (S-S). Sous l'influence de plusieurs facteurs (la conservation, la température ...) on peut observer des réarrangements entre les groupements SH libres et le pont disulfure. Elle joue un rôle prépondérant dans les propriétés moussantes du blanc d'œuf.

**Le lysozyme** est la première protéine séquencée (Jolles, 1963). Le lysozyme est une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés et a une masse moléculaire de 14300 Da. Cette protéine a un pH isoélectrique très élevé de 10,7. La stabilité de cette protéine est liée à la présence de 4 ponts disulfures. C'est une enzyme ayant la même activité dans le blanc liquide que dans le blanc épais. Elle est capable d'hydrolyser une liaison entre des molécules des mucopolysaccharides qui constituent les parois des bactéries gram<sup>+</sup> (parois normalement résistance à la pression osmotique) et permet à l'eau d'y rentrer, la paroi de la bactérie se rompt sous l'effet de la pression osmotique intracellulaire.

La préparation du lysozyme se fait à partir du blanc d'œuf de poule par précipitation à pH 9,5 en présence de 5% de chlorure de sodium ou par chromatographie d'échange d'ions. Le dosage du lysozyme peut se faire en mesurant son activité biologique ou par chromatographie liquide haute performance. Le lysozyme est utilisé pour ses propriétés bactériolytiques en agro-alimentaire et en pharmacie.

Les autres protéines présentes dans le blanc d'œuf sont : l'ovotransferrine (13% des protéines du blanc d'œuf) possède la particularité de fixer des ions métalliques et a donc une action bactériostatique en privant les bactéries de fer, l'ovomucoïde (10% des protéines du blanc d'œuf) a un rôle antitrypsique, l'ovomucine (3 % des protéines de blanc d'œuf), en partie responsable de la haute viscosité du blanc et connue pour son action inhibitrice de l'hémagglutination d'origine virale, les ovoglobulines (4 %) qui sont d'excellents agents moussants, et la flavoprotéine et l'avidine, fixatrices de vitamines. (Thapon J.-L., 1994).

## II.2. Pression osmotique des solutions

### II.2.1. L'osmose et pression osmotique

L'osmose est un phénomène connu et utilisé depuis des milliers d'années. On peut donner un exemple très commun avec la conservation de la confiture par le sucre qui préserve de la prolifération bactérienne. La membrane des bactéries étant perméable à l'eau, l'eau entre et sort de la bactérie lorsqu'elle est dans un milieu aqueux. Cependant, si ce milieu aqueux est sucré, l'eau de la bactérie va diffuser à travers la membrane pour que l'eau soit équitablement mélangée avec toutes les autres molécules, selon le second principe de la thermodynamique. Ainsi la bactérie est déshydratée et meurt.

L'osmose est une manifestation du second principe de la thermodynamique : la situation la plus probable est celle du mélange maximal, c'est à dire d'entropie maximale. La condition d'équilibre de l'eau entre deux milieux séparés par une membrane qui lui est perméable est l'uniformité de son potentiel chimique. (Cabane B. et Hénon S, 2003)

Quand on sépare par une membrane semi-perméable une solution et le solvant pur (l'eau par exemple), l'osmose va provoquer le passage du solvant pur vers la solution, c'est-à-dire où son potentiel chimique était le plus faible. La surpression qu'il faudrait appliquer à la solution pour empêcher le passage du solvant est appelée pression osmotique de la solution  $\pi$ . Elle permet d'égaliser les valeurs du potentiel chimique du solvant de chaque côté de la membrane.

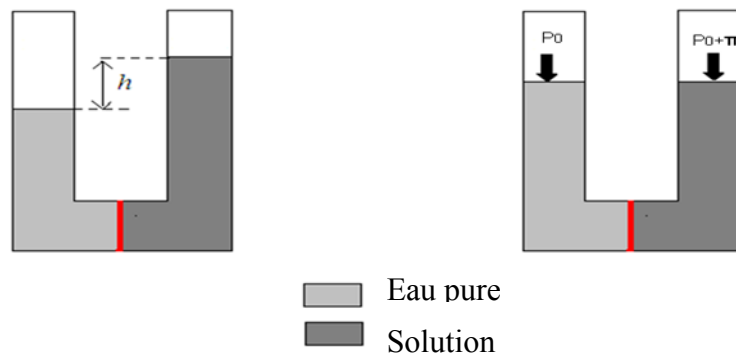


Figure 1. Schéma de la pression osmotique

### II.2.2. Modèles

#### II.2.2.a. Pression osmotique des solutions diluées

La pression osmotique  $\pi$  d'une solution diluée suit la loi de Van't Hoff :

$$\pi = RT \sum_j c_j$$

où  $c_j$  est la concentration d'une espèce de la solution, R est la constante des gaz parfaits et T la température absolue.

On remarque qu'elle s'apparente à la loi des gaz parfaits. La pression osmotique des solutions diluées varie donc de façon analogue à la pression des gaz parfaits: les molécules ont une même réalité dans les deux états. En régime dilué, c'est le nombre d'objets en solution qui impose une pression osmotique, pas leurs masses ni leurs tailles.

Par exemple, la pression imposée par 1g de lysozyme en solution (14300 Da) est plus importante que celle imposée par 1g d'ovalbumine (44400 Da) car le lysozyme est environ 3 fois plus petit que l'ovalbumine : la solution contient donc 3 fois plus de molécules. À concentration massique égale les petites molécules « exercent » une pression osmotique supérieure à celle exercée par les grosses molécules.

### II.2.2.b. Pression osmotique des sphères dures

En régime concentré, la fraction volumique occupée par les solutés n'est plus négligeable. Il existe ensuite différents modèles pour décrire la pression osmotique de solutions concentrées comme le modèle de sphères dures de Carnahan-Starling (1969) :

$$\frac{\pi}{nkT} = \frac{1 + \varphi + \varphi^2 - \varphi^3}{(1 - \varphi)^3}$$

Avec  $n$  la densité de nombre de sphères par unité de volume,  $\varphi$  leur fraction volumique et  $k$  la constante de Boltzmann.

Le modèle de Carnahan-Starling suppose que la pression est créée par l'agitation thermique des sphères dures, l'encombrement. L'augmentation de la pression osmotique avec l'augmentation de la fraction volumique est liée à la diminution du nombre de configurations disponibles.

De plus, Khoshkbarchi et Vera (1997) ont comblé la lacune associée à la plupart des équations d'état de sphères dures proposées dans la littérature, en proposant un modèle qui satisfait la limite de l'empilement compact ( $\varphi = 0.74$ ). L'empilement compact est la manière d'agencer des sphères dans l'espace afin d'avoir la plus grande densité de sphères, sans que celles-ci ne se recouvrent.

$$Z = \frac{1 - \frac{1}{25}\varepsilon - \frac{2}{5}\varepsilon^2 - \frac{5}{4}\varepsilon^3 + \frac{9}{50}\varepsilon^5 + \frac{71}{50}\varepsilon^{12}}{(1-\varepsilon)^3} \quad \varepsilon = \frac{V_0}{V} = \frac{\rho\sigma^3}{\sqrt{2}}$$

Où  $Z$  est le facteur de compressibilité,  $V$  est le volume total,  $V_0$  le volume du système à l'empilement compact des sphères,  $\rho$  la densité de nombre et  $\sigma$  le diamètre des sphères dures. Le terme  $(1 - \varepsilon)$  dans le dénominateur de l'équation garantit que, à l'état d'empilement compact, où  $\varepsilon = 1$ , le facteur de compressibilité tend vers l'infini.

Enfin, d'autres auteurs (Lin et coll., 2001 ; Gögelein et coll., 2008) essaient de modéliser des équations d'état prenant en compte les interactions attractives et répulsives des sphères dures, ce qu'omet le modèle de Carnahan-Starling.

Nous confronterons nos données avec le modèle de sphères dures de Carnahan-Starling, car c'est un modèle classique, encore beaucoup utilisé et cité, et fait souvent office de référence pour les comparaisons avec d'autres modèles.

## III. Matériels et méthodes

Dans cette partie seront décrites les tâches effectuées pendant le stage, de la préparation du matériel à la méthode de compression osmotique, protocole principal du sujet.

### III.1. Les protéines

#### III.1.1. Lysozyme

Le lysozyme est présent dans le commerce à des taux de pureté très élevés, donc nous utilisons le lysozyme (sous forme chlorhydrate) qui provient de la société LIOT (Annezin (62), France). On l'aliquote en piluliers de 5g qu'on conserve en chambre à  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### III.1.2. Préparation de l'ovalbumine

##### III.1.2.a. Préparation du blanc d'œuf démuçiné

Le principe est de séparer les protéines selon leurs propriétés de charge électrique par chromatographie d'échange d'ions. Pour la séparation de protéines sur colonne de chromatographie, il nous faut une solution de blanc d'œuf fluide et claire pour ne pas colmater la colonne : il est nécessaire d'éliminer une fraction insoluble. Pour ce faire, on a utilisé le protocole de Croguennec *et coll.* (2000).

On casse 10 œufs frais du commerce en séparant le blanc du jaune. On mesure dans une éprouvette le volume de blanc d'œuf obtenu (en moyenne 330mL pour 10 blancs d'œuf) et on y ajoute 2 volumes d'eau milliQ purifiée et déionisée. On abaisse ensuite le pH de la solution à pH 6 avec du HCl environ 1 M. L'ajout d'eau et la diminution du pH à 6 font précipiter l'ovomucine. On place la solution sous agitation et en chambre froide à  $4^{\circ}\text{C}$  toute la nuit. Au matin, un précipité blanc gélatineux d'ovomucine s'est formé. On ré-ajuste la solution de blanc d'œuf à pH 6 car le pouvoir tampon du blanc d'œuf fait remonter le pH d'une demie-unité environ.

On effectue une première centrifugation à 3000 tr/min pendant 3 min pour enlever grossièrement le précipité. On recueille les surnageants dans un bécher et on ajuste le pH à 8.2 avec du NaOH 1M. On effectue alors une seconde centrifugation à 2500g pendant 20 min pour éliminer le matériel insoluble.

##### III.1.2.b. Chromatographie préparative

Pour extraire l'ovalbumine de notre solution de blanc d'œuf démuçiné, nous pratiquons la chromatographie échangeuse d'anions.

Le principe de la chromatographie échangeuse d'ions (CEI) est de charger un échantillon sur une colonne de chromatographie remplie de résine chargée qui va retenir ou non certains composants de l'échantillon suivant leurs charges. La chromatographie d'échange d'ions comprend deux étapes : la fixation des protéines aux charges fixes et l'élution ou le déplacement des protéines de ces charges fixes. Le maintien implique des interactions électrostatiques entre la charge fixe et celle de la protéine, l'élution implique la substitution de la protéine sur la charge fixe par un nouvel ion avec une plus grande affinité pour la charge fixe que la protéine.

L'interaction entre les protéines et l'échangeur d'ions dépend de plusieurs facteurs: la charge nette, la distribution de la charge à la surface de la protéine, la force ionique et la nature des ions du solvant, le pH.

Dans le cas d'une chromatographie par échange d'anions, les espèces chargées négativement sont retenues sur la colonne.

Le pH est un des paramètres les plus importants qui détermine la fixation de la protéine car il détermine la charge effective de la protéine et de l'échangeur d'ion. À un pH loin de leur point isoélectrique pI (le pI correspond au pH auquel la charge nette de la protéine est nulle), les protéines s'attachent fortement et ne sont pas désorbées à des forces ioniques faibles, mais à un pH au voisinage de leur pI, la charge nette des protéines est moindre et elles sont plus faiblement retenues.

La fixation des protéines à des groupes chargés de la phase stationnaire est en compétition avec la fixation d'autres ions du solvant. À de faibles concentrations de ces ions compétitifs, la fixation des protéines se fait entre plusieurs groupes chargés de la protéine et les charges des échangeurs d'ions. À des plus hautes concentrations en ions du solvant, les protéines seront déplacées de la matrice car leur force de fixation sera moins forte.

Même si les forces coulombiennes sont les principales responsables de l'attachement des protéines à la résine, d'autres interactions peuvent aussi apparaître, comme les interactions hydrophobes entre les échangeurs d'ions à base de résine et des groupes hydrophobes des protéines. (Janson J.-C. et Rydén L., 1989)

Un autre problème est la nature amphiphile des protéines. Elles contiennent des charges positives et négatives, et pour chaque protéine un seul point isoélectrique a été défini. On remarque parfois que les protéines peuvent se fixer à une variété de valeurs de pH car l'ampleur de charge dans différentes régions de la protéine peut varier.

L'élution des protéines de la colonne de chromatographie d'échange d'ions peut être suivie en enregistrant l'absorbance de l'éluant à 280 nm. La plupart des protéines contiennent des acides aminés aromatiques (comme la tyrosine et le tryptophane) qui ont une absorbance maximale vers 280 nm. En l'absence d'acides aminés aromatiques, comme la protéine collagène, il est possible de suivre l'éluant à 210-230 nm, la zone d'absorption des liaisons peptidiques.

Pour purifier l'ovalbumine, on a procédé à une chromatographie par déplacement. La quantité d'échantillon injectée dans la colonne est très supérieure à celle injectée dans le cas d'une élution par gradient « classique » : les espèces les plus chargées « déplacent » les moins chargées qui se fixent plus en aval sur la colonne. À partir d'une certaine quantité injectée, la colonne sera saturée par les espèces les plus retenues (les plus chargées négativement en chromatographie d'échange d'anions). Il suffira donc de tout éluer avec une solution d'ions de force ionique élevée (ici on ne joue pas sur une évolution du pH). Dans le cas des protéines du blanc d'œuf, l'ovalbumine est une des protéines les plus retenues (de point isoélectrique le plus bas) et ce protocole peut donc être utilisé. Les composants de la solution pour l'élution sont le tampon, le sel utilisé pour éluer la protéine, et d'autres composants nécessaires pour la stabilité et la solubilité.

**Méthode :** Pour purifier l'ovalbumine, nous avons suivi le protocole de Croguennec *et al.* (2000). A pH 8.2 de la solution de blanc d'œuf, l'ovalbumine est chargée négativement étant donné son pHi égal à 4.5. A ce pH, seules le lysozyme et l'avidine sont positives et donc non retenues sur la résine.

La résine utilisée est le Q-Sépharose fast flow (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) dans une colonne de dimensions 50 × 200 mm. Le groupe échangeur d'ions est un groupe amine quaternaire.

La colonne est adaptée sur le système Biopilot (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suède) équipé d'un détecteur d'absorption dans l'ultraviolet.

La colonne a été équilibrée avec du NaCl 0,5 M, puis rincée à l'eau. Le contre-ion échangeable est donc Cl<sup>-</sup>. On charge 900mL de solution de blanc d'œuf démuçiné sur la colonne de volume 300mL.

Après l'injection du blanc d'œuf, 2 volumes d'eau sont chargés pour éliminer les espèces non retenues, et ainsi l'absorbance rejoint la ligne de base. L'élution est effectuée par palier. Un premier palier à 3,5% de NaCl 1M permettra d'éluer l'ovotransferrine (pI 6,5). Le deuxième palier à 14% de NaCl 1M décrochera l'ovalbumine de la colonne. On récupère la protéine quand l'absorbance est entre 15 et 5 à 280nm.

Enfin, environ 3 volumes de colonne de NaCl 1M sont injectés pour décrocher toutes les protéines encore liées (la flavoprotéine de pHi 4.2, qui fixe la riboflavine, bien visible de par sa couleur jaune), c'est la régénération de la colonne. Toutes les étapes de chargement, de lavage et d'élution sont effectuées à un débit de 30 mL·min<sup>-1</sup>. Pour être stockée, la colonne doit être équilibrée dans un tampon contenant 20% d'éthanol pour prévenir la croissance bactérienne.

### III.1.2.c. Précipitation au sulfate d'ammonium

Pour concentrer et conserver l'ovalbumine, nous avons décidé de la précipiter au sulfate d'ammonium.

Les protéines peuvent être précipitées en causant des perturbations dans le solvant par rapport au pH, à la force ionique, et à la température. Les propriétés du solvant peuvent être aussi modifiées en ajoutant de fortes concentrations en certains sels ou des solvants organiques miscibles.

Les sels présents en très haute concentrations avec des forces ioniques beaucoup plus forte que le milieu causeront la précipitation de beaucoup de protéines. La précipitation se produit par neutralisation de la charge de la surface par le sel, en réduisant l'activité chimique de la protéine et en diminuant la concentration effective de l'eau. C'est le relargage des protéines (*salting out*).

Le sulfate d'ammonium est le précipitant le plus utilisé pour le relargage des protéines. Ses avantages majeurs sont :

- à la saturation, il a une molarité assez haute pour causer la précipitation de la plupart des protéines
- Son enthalpie de dissolution n'est pas trop élevée, donc la chaleur générée est dissipée facilement
- ses solutions concentrées préviennent et limitent la croissance bactérienne
- En solution, il protège la plupart des protéines de la dénaturation

La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour faire précipiter une protéine peut être obtenue grâce à des tables. (Deutscher M. P., 1990).

**Méthode** : Après chaque purification par chromatographie, nous avons ajouté une quantité de sulfate d'ammonium proportionnelle au volume de solution d'ovalbumine récolté en sortie de colonne et pour être à 75% de la saturation (suffisant pour précipiter toutes les protéines). Ceci est effectué sous agitation et à 0°C. Le sulfate d'ammonium rentre ainsi en compétition pour les molécules d'eau avec l'ovalbumine, qui précipitera.

#### III.1.2.d. Remise en solution des précipités

On centrifuge nos précipités à 11000 xRPM pendant 25 min à 4°C. On récupère les culots et on les resolubilise avec de l'eau milliQ.

On répartit notre solution dans des piluliers de 40mL et on les met dans le tunnel de surgélation (-25°C) pour congeler rapidement et éviter de former des cristaux de glace qui abimeraient les protéines

#### III.1.2.e. Dialyse du sel / sulfate d'ammonium

On a environ 3,5L de solution d'ovalbumine. Pour éliminer le sulfate d'ammonium encore présent en quantité importante, on a procédé à une dialyse.

On choisit des sacs de dialyse en cellulose calibrés en fonction du poids moléculaire des molécules (seuil de coupure 6-8 kDa) de 8cm de diamètre, à 20 mL/cm, il nous en faudra 1,75 m. On remplit 7 boudins qu'on met dans un seau d'eau osmosée de 30L, placée en chambre froide à 4°C, sous agitation. Le sel de la solution dans les sacs de dialyse va passer dans l'eau osmosée par diffusion à travers la membrane poreuse pour rétablir l'équilibre ionique. On a changé l'eau 6 fois en 4 jours. On récupère 4 L de solution (de l'eau est aussi rentrée dans les boudins pour rétablir l'équilibre avec le sel) et on centrifuge pendant 50min à 11000xRPM.

Le pH après la dialyse est de 6,5. Théoriquement, après une dialyse parfaite, le pH est au pHi de la protéine, c'est-à-dire 4,5 car les ions H<sup>+</sup> viennent annuler les charges négatives de la protéine, les ions OH<sup>-</sup> libérés font augmenter le pH de l'eau.

Enfin, on a dosé la solution récupérée, et on obtient une concentration de 23.48 g/L, soit environ 94g de protéines dans nos 4L de solution finale.

La masse théorique est de 220g. (11 purifications \* 10 œufs\* 37g de blanc d'œufs \*0.10 \* 0.54). On a un rendement de 42.7%.

#### III.1.2.f. Congélation en aliquot et lyophilisation

La lyophilisation est un procédé de conservation par élimination d'eau, dont le principe repose sur la sublimation de la glace d'un produit préalablement congelé. L'eau du produit passe donc directement de l'état solide à l'état de vapeur.

Le cycle de séchage se déroule en deux phases, la congélation du produit en couche mince et la lyophilisation :

- la sublimation (ou dessiccation primaire) qui élimine plus de 90 % d'eau,
- la désorption (ou dessiccation secondaire) qui élimine une grande partie de l'eau résiduelle (dont l'eau «liée») et permet d'aboutir à un produit contenant 2 % d'humidité ; cette phase consiste en une vaporisation sous vide à température positive.

On décide d'aliquoter en boîte d'environ 10g de protéines, donc on les remplit de 426 mL de notre solution à 23,48 g/L. On place les boîtes dans le tunnel de congélation pour une congélation rapide puis dans la chambre de congélation à -18°C. On lyophilise alors les 9

boites pendant un week-end. On récupère les boites qu'on ferme hermétiquement dans un plastique pour que le lyophilisat ne prenne pas l'humidité et on les conserve en chambre à -18°C pour éviter le moindre risque de dégradation s'il reste de l'eau.

### III.1.3. Analyses et dosages

Après un mois de purification d'ovalbumine, à raison de 3 purifications par semaine, nous avons analysé ces purifications par chromatographies liquide haute performance (HPLC) échangeuse d'ions (EI) et en phase inverse (RP). L'objectif est notamment d'examiner l'homogénéité de l'ensemble des lots d'ovalbumine purifiée, pour décider de leur rassemblement éventuel. Nous avons également déterminé la concentration de chaque solution de purification par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

#### III.1.3.a. HPLC d'échange d'anions

La chromatographie HPLC est performante car la taille des particules de la résine est très fine ce qui améliore l'adsorption et la désorption et diminue l'étalement des bandes le long de la colonne, et les colonnes résistent à une vitesse de phase mobile très élevée. Le système fonctionne sous une haute pression pour forcer le liquide jusqu'à une vitesse importante dans la colonne et les tubulures fins.

La chromatographie par échange d'ions sépare les protéines sur la base de leurs charges de surface et leurs interactions électrostatiques avec la résine (voir plus haut).

**Méthode** : les composés sont élués grâce à l'augmentation progressive de la force ionique de l'éluant. Pour cela, on utilise un gradient d'éluant. Les tampons utilisés sont du Tris-HCl à 50mM à pH8 et du Tris-HCl à 50mM et 0.5M de NaCl à pH8. On les filtre avant utilisation. La détection s'effectue à 280 nm. Le taux de pureté de l'ovalbumine est donné à partir de l'intégration du chromatogramme.

#### III.1.3.b. HPLC de partage en phase inverse

En chromatographie en phase inverse, les solutés sont élués dans l'ordre décroissant des polarités. Les interactions hydrophobes sont importantes dans la détermination de la hiérarchie structurale tertiaire et quaternaire des protéines et aussi de la dynamique des mouvements de protéines en solution. La plupart des protéines dans leur forme native et fonctionnelle possèdent des régions hydrophobes sur leur surface (Janson J.-C. et Rydén L., 1989).

**Méthode** : La colonne est composée de billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes carbonées linéaires de 4 carbones. Les composés sont élués en fonction de leur hydrophobie croissante. Pour cela, on utilise un gradient d'éluant en diminuant la polarité de l'éluant selon Croguennec et al. (2000). L'éluant utilisé est de l'acétonitrile contenant 0,025% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'ajout de TFA permet de travailler à un pH acide pour lequel l'ovalbumine est chargée positivement et est très hydrophobe. La détection s'effectue à 214 nm. Le taux de pureté de l'ovalbumine est donné à partir de l'intégration du chromatogramme. (annexe 2)

### III.1.3.c. Spectrophotométrie dans l'ultraviolet

Après chaque purification d'ovalbumine, un échantillon de 1 mL de solution purifiée est prélevé pour être dosé par spectrophotométrie.

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière. Lorsqu'une lumière d'intensité  $I_0$  passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité  $I$  de la lumière transmise est donc inférieure à  $I_0$ . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible.

La relation de Beer-Lambert décrit que, à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante :

$$A_\lambda = C \times l \times \varepsilon_\lambda$$

$A_\lambda$  est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$  ;  $C$  (en mol.L<sup>-1</sup>) est la concentration de l'espèce absorbante ;  $l$  (en cm) est la longueur du trajet optique ;  $\varepsilon_\lambda$  (en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde  $\lambda$ .

Les protéines absorbent activement la lumière dans la région des ultra-violets avec 2 maxima : 280nm (cycle aromatique) et 214 nm (liaison peptidique). Les acides aminés contenant des cycles aromatiques sont la phénylalanine, le tryptophane, l'histidine, et la tyrosine. A cause du large nombre de liaisons peptidiques dans les protéines, une détection à 214nm est trop sensible et moins précise.

**Méthode :** On règle l'appareil en balayage spectral entre 230nm et 350nm, ainsi on peut chercher le maximum d'adsorption et voir l'allure du signal. On a dilué 50 fois les solutions d'ovalbumine à doser, en mettant 20µL de solution de protéines dans 980µL d'eau osmosée.

On fait d'abord une mesure témoin sur l'eau, qui sera soustraite aux autres mesures. On laisse ensuite une cuve de référence remplie d'eau et on remplit la deuxième avec l'échantillon à doser. Avant chaque mesure on effectue un autozéro pour remettre l'absorbance à 0 et on prend soin de laver la cuve et la sécher pour ne pas diluer l'échantillon. On analyse 3 échantillons pour chaque purification.

Dans la liste des valeurs du balayage spectral, on repère et on note le maximum d'absorbance et sa longueur d'ondes, toujours à 279 nm dans nos mesures.

Enfin, on applique sur les résultats la relation de Beer-Lambert. On a  $C = \frac{A}{\varepsilon_\lambda \times l}$  en mol/L.

On prend le coefficient d'extinction molaire de l'ovalbumine égal à 2,93.10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (Batra P. et coll, 1990). En multipliant par la masse molaire de l'ovalbumine (44400 g/mol) et par la dilution de l'échantillon (50), on obtient la concentration « réelle » des purifications en g/L.

On peut également calculer un rendement de purification approximatif: quantité d'ovalbumine obtenue rapportée à la quantité théorique (dans 10 blancs d'œuf).

Nous avons 10 blancs d'œuf par purification, 37g de blancs d'œuf environ par œuf, 10% de protéines dans un blanc d'œuf et 54% d'ovalbumine dans ces protéines.

Les dosages au spectrophotomètre indiquent une quantité moyenne de 10g d'ovalbumine par purification. (Annexe 1)

Quantité théorique =  $10 * 37 * 0.10 * 0.54 = 20$  g d'ovalbumine par purification

Rendement approximatif =  $10/20 = 50\%$

On prend le coefficient d'extinction molaire du lysozyme égal à  $2.64 \text{ L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . (Nigen et coll, 2010).

## III.2. Compression osmotique

Cette deuxième partie est consacrée à la description des techniques expérimentales pour construire une équation d'état de la pression osmotique d'une solution en fonction de la concentration en protéine sur une gamme de pression étendue.

### III.2.1. Dialyse à l'équilibre

La technique de compression osmotique est basée sur la diffusion d'eau entre l'échantillon (une dispersion colloïdale) et une solution de polymère stresser de pression osmotique connue. L'échantillon est placé dans un sac de dialyse immergé dans la solution de polymère stresser dont la relation entre la pression osmotique et la concentration est connue. On choisit un seuil de coupure qui retiendra les protéines de l'échantillon à l'intérieur du sac et le polymère à l'extérieur. Seuls l'eau, les ions, et les petites molécules pourront passer librement à travers la membrane. (voir figure 2).

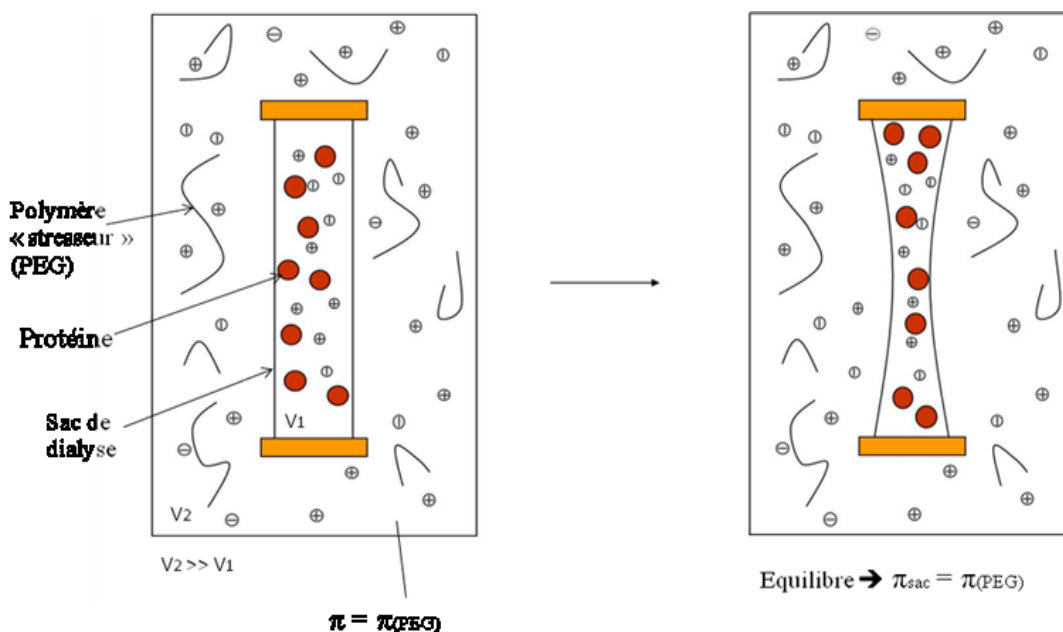


Figure 2. Schéma du principe de compression osmotique

Nous avons travaillé sur deux séries de compressions : l'ovalbumine et le lysozyme, à pH7. Le polymère stresser utilisé est le poly(éthylène glycol) de masse molaire 20 000 Da (sigma aldrich).

Nous avons utilisé l'équation de Parsegian pour lier une concentration de PEG à une pression osmotique.

$$\text{Log}(\pi) = a + b \times (\text{wt}\%)^c$$

Avec  $a = 1.57$ ,  $b = 2.75$  and  $c = 0.21$  et  $\pi$  en Dynes.cm<sup>-2</sup>

L'équation peut être appliquée seulement dans la gamme de pression mesurée par Parsegian (de 3890 Pa à 5 MPa environ) et à la température de mesure de 20°C. Toutes les manipulations seront effectuées dans une pièce climatisée à 20°C.

Nous avons donc choisi de faire 11 points par série, espacés régulièrement en échelle logarithmique. Nous avons fixé les pressions puis calculé les concentrations de PEG correspondantes (% w/w) (figure 3).

On effectuera des compressions osmotiques d'ovalbumine et lysozyme à pH 7, dans du tampon bis-tris-propane-HCL 11,3 mM, contenant de l'azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) à 1 g/L (15mM) et du thiomersal à 0,2 g/L, pH 7 (force ionique totale : environ 35mM). A ce pH, l'ovalbumine sera chargée négativement (pI 4,5) et le lysozyme positivement (pI 10,7).

Pour les pressions osmotiques supérieures à 0,1 bar, on remplira les sacs de dialyse avec des solutions de protéines à 50g/L. Pour les pressions inférieures, on préparera des solutions à 10g/L ou 25g/L. Les solutions de PEG ont été préparées en dissolvant le polymère dans le même tampon que celui décrit précédemment.

En fin d'expérience, nous avons préparé une solution de lysozyme pour en vérifier le pH. Malgré le tampon à pH7, le lysozyme sous forme chlorhydrate a fait dévier le pH jusqu'à 4,8. Cependant, dans les sacs de compression, on met de petites quantités de solution de lysozyme (1 à 2mL). Ces petites quantités sont à rapporter au volume des flacons dans lesquels est effectuée la dialyse (480mL), et la solution de dialyse est renouvelée en fin d'expérience, pour atteindre l'équilibre (voir ci-dessous). On considère donc que l'acide apporté par le lysozyme ne fausse pas nos résultats, même si un soin particulier devra être porté au pH des solutions de lysozyme à l'avenir.

On a utilisé des sacs de dialyse en cellulose régénérée Spectra/Por® (Spectrum Laboratories), avec un seuil de coupure de 6000-8000 daltons. Ce seuil permettra le passage de l'eau, des ions et petites molécules mais pas celui de l'ovalbumine (44400 Da), du lysozyme (14300 Da), et du PEG (20000 Da).

| P (Pa)  | P(bar) | wt%     |
|---------|--------|---------|
| 4000    | 0,04   | 1,5919  |
| 7000    | 0,07   | 2,2982  |
| 13000   | 0,13   | 3,3461  |
| 25000   | 0,25   | 4,8301  |
| 50000   | 0,5    | 6,9265  |
| 100000  | 1      | 9,6839  |
| 230000  | 2,3    | 14,0727 |
| 500000  | 5      | 19,4551 |
| 1000000 | 10     | 25,5262 |
| 2500000 | 25     | 35,7478 |
| 5000000 | 50     | 45,4363 |

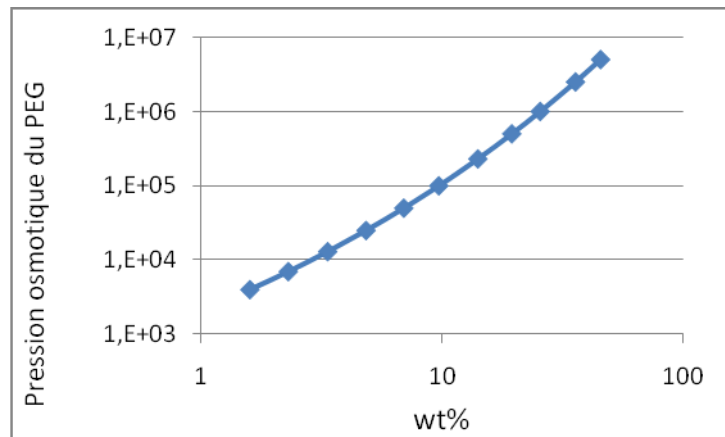


Figure 3. Pressions osmotiques choisies pour l'expérience et concentrations en masse de PEG correspondantes

Avant les expériences, les sacs ont été lavés et trempés dans de l'eau déionisée pendant plusieurs heures. Puis on les remplit de solution de protéines en essayant de bien tendre le sac, et on les immerge dans les flacons de solution de PEG à la pression osmotique voulue. On met deux sacs par flacon la répétition d'expérience.

Les sacs aux pressions supérieures à 1 bar ont d'abord été comprimés à un palier à 1 bar pendant 1 semaine, et ensuite ils ont été mis dans leur bain de compression à pression supérieure. Ils ont alors besoin d'être remplis 2 fois par jour pendant une semaine environ, puis 1 fois par jour au cours de la semaine suivante pour obtenir une quantité suffisante de matière.

L'eau des sacs qui diffuse dans la solution de PEG change la concentration de cette solution. Ainsi, la pression d'origine a diminué. Alors, lorsque les sacs paraissent à l'équilibre et ne s'écrasent plus, on les plonge dans une nouvelle solution de PEG avec une concentration exacte et on laisse équilibrer une semaine de plus.

Nous avons également voulu tester la réversibilité des compressions osmotiques. Pour cela, des sacs de dialyse comprimés à des pressions de 1, 5, 10 ou 50 bar ont été à nouveau dialysés contre des solutions de PEG à 0.5 bar de pression osmotique.

### III.2.2. Détermination de la concentration

À l'équilibre de dialyse, on détermine la concentration dans les sacs par mesure d'extraits secs sur chacun des sacs à 102,5°C pendant 15h. À partir de la valeur de l'extrait sec, on calculera une concentration en g/L.

Dans les sacs des décompressions du lysozyme, on observe des précipités qui sédimentent. Avant de mesurer les extraits secs des dispersions, nous avons mesuré la concentration de lysozyme soluble par spectrophotométrie dans l'ultraviolet (voir III.1.3.c), après élimination du précipité par centrifugation à 15000 RPM.

### III.3. Osmométrie à membrane

L'osmomètre à membrane est composé d'une cellule osmotique, intégrée à un thermostat de cellule. La cellule osmotique est divisée en deux parties par une membrane semi-perméable. Un capteur de pression est intégré à la moitié inférieure de la cellule de mesure, laquelle est hermétiquement isolée de l'environnement extérieur et remplie de solvant pur. La moitié supérieure de la cellule de mesure est composée d'un système en serpentin couvrant une large surface de la membrane semi-perméable. Un entonnoir et un robinet permettent de rincer la cellule de mesure et de la remplir de solvant et de solutions dont on veut mesurer la pression osmotique.

En raison de la différence de pression osmotique entre le solvant et la solution, une dépression se produit dans la moitié inférieure de la cellule de mesure, qui est représentative de la concentration des particules dissoutes, et nous donne la pression osmotique.

Pour compléter la gamme de pression étudiée en compression osmotique, nous avons utilisé l'osmomètre à membrane (Osmomat 090, Gonotec) pour les deux protéines, avec une membrane de seuil de coupure environ 6-8 kDa, dans une gamme de pressions allant de 400 Pa à 3000 Pa (le capteur de pression ne permet de mesurer des pressions supérieures).

Nous avons calibré l'appareil avec le tampon bis-tris-propane à 20mM de force ionique, azoture de sodium (NaN<sub>3</sub>) à 0,1% (w/w) et thiomersal à 0,02% (w/w), ajusté à pH 7 avec du HCl, force ionique totale de 35mM, avec lequel les solutions de protéines ont été préparées.

On mesure les solutions de la plus faible concentration à la plus forte pour ne pas perturber les solutions diluées avec les concentrées. On procède à plusieurs injections de la solution, jusqu'à ce que la pression atteigne un palier, signifiant que la cellule est uniformément remplie de la solution. On laisse alors équilibrer 15min.

### III.4. *Dynamic Vapor Sorption (DVS)*

Le *Dynamic Vapor Sorption (DVS)* est une technique gravimétrique qui peut mesurer la quantité de solvant échangée entre un échantillon et une atmosphère où la pression partielle de solvant est connue. Dans le cas où le solvant est l'eau, on fait varier l'humidité relative de l'air autour de l'échantillon par un système de bullage d'eau par l'azote et on mesure la variation de la masse. On peut ainsi établir des isothermes de sorption de vapeur d'eau sur des poudres ou des solutions. On peut également l'utiliser pour faire de la désorption, c'est-à-dire en séchant une goutte de solution en diminuant l'humidité relative de l'air, et donc l'activité de l'eau.

C'est ce que nous avons entrepris sur une solution d'ovalbumine et une solution de lysozyme à 50g/L, dans le but d'atteindre des pressions osmotiques supérieures à 50 bar

Nous avons déposé une masse de solution avoisinant les 35 mg et nous avons programmé 3 paliers d'humidité relative (égale à l'activité de l'eau) à 90%, 60% et 5%. Avec les valeurs d'activité de l'eau, on peut calculer la pression correspondante grâce à la formule de l'humidité relative :

$$\Pi = - \frac{RT}{v_A} \ln a_w$$

Avec la variation de la masse, on peut remonter à une concentration à chaque palier d'humidité relative donc à chaque pression.

## IV. Résultats et discussion

### IV.1. Morphologie

Les solutions d'ovalbumine et de lysozyme sous compression osmotique ont montré des évolutions de turbidité, d'opacité, de viscosité, de texture et de comportements mécaniques.

La figure 4 montre les évolutions des solutions d'ovalbumine à partir de 2,3 bar à 50 bar.

A 2,3 bar, la solution paraît un peu plus visqueuse que l'eau, mais elle est toujours limpide. A 5 bar, la solution est opalescente, homogène, et plus visqueuse. A 10 bar, la solution est également opalescente, homogène, mais devient beaucoup plus visqueuse, comme un gel élastique. A 25 et 50 bar, on obtient des solides opaques, qui collent aux sacs de dialyse quand on veut les extraire, et le solide à 50 bar est fissuré. La photo (f) de la figure 4 montre bien la différence entre les sacs à 25 et 50 bar après le premier jour de compression.

Les solutions des sacs aux pressions inférieures à 2,3 bar étaient limpides, transparentes, et peu visqueuses.

Les évolutions des solutions de lysozyme sous compression osmotique en termes de turbidité, d'opacité, de viscosité et de comportements mécaniques sont très différentes par rapport aux solutions d'ovalbumine.

La figure 5 montre ces évolutions de 1 bar à 50 bar à l'équilibre.

A 1 bar, la solution est transparente, mais il y a un précipité qui a sédimenté au bas du sac.

A 2,3 bar, le précipité ou les agrégats remplissent tout le sac, il est très dur au toucher et on doit trancher le sac pour extraire le solide.

A 5 bar et 10 bar, la solution est entièrement blanche, coule encore, mais est à la limite du gel.

A 25 et 50 bar, on obtient des solides entièrement blancs et déformable, on a pu les sortir d'un bloc des sacs de dialyse.

Les solutions des sacs aux pressions inférieures à 1 bar étaient transparentes, mais toujours avec un très léger précipité au bas des sacs.



(a) 2,3 bar



(b) 5 bar



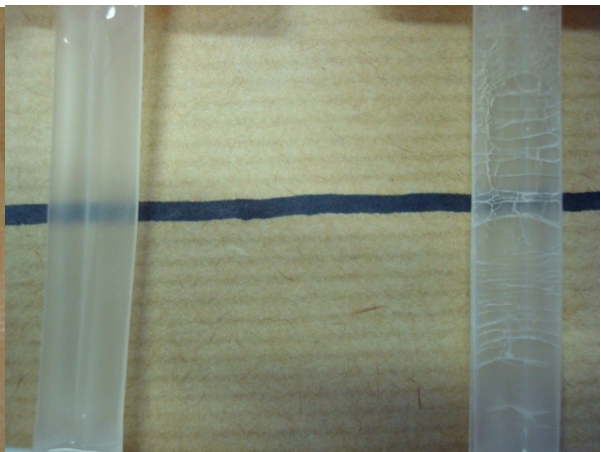
(c) 10 bar



(d) 25 bar



(e) 50 bar



(f) 25 et 50 bar (jour 1 de compression)

Figure 4. Photographies des sacs de dialyse des solutions d'ovalbumine en fin d'expérience (a,b,c,d,e) et au premier jour de compression (f)



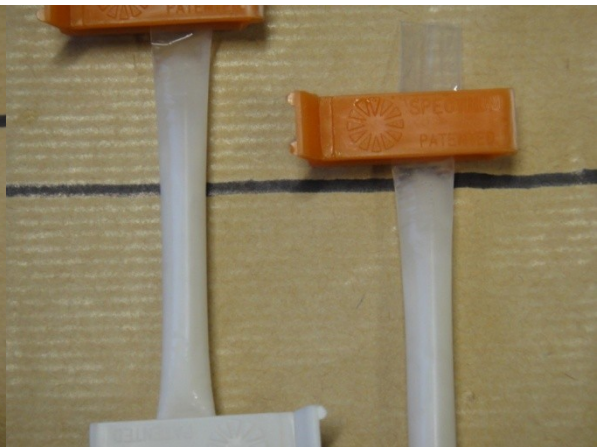
(a) 1 bar



(b) 2,3 bar



(c) 5 bar



(d) 10 bar



(e) 25 bar



(f) 50 bar

Figure 5. Photographies des sacs de dialyse des solutions de lysozyme en fin d'expérience.

## IV.2. Profil de pression osmotique

La figure 6 représente les valeurs de pressions osmotiques appliquées aux échantillons de protéines par compression osmotique en fonction de la concentration finale de ces échantillons. Les pressions s'étendent de 0,04 bar à 50 bar. Les concentrations d'ovalbumine vont de 37 g.L<sup>-1</sup> à 727 g.L<sup>-1</sup>, celles du lysozyme de 11 g.L<sup>-1</sup> à 750 g.L<sup>-1</sup>.

La figure 6 représente également les résultats obtenus par osmomètre à membrane, et par DVS. On y voit également les résultats de décompressions.

Pour le lysozyme, nous avons mesuré à l'osmomètre la pression de solutions à 5, 10, 15, 20 g/L, qui selon Van't Hoff, auraient des pressions inférieures à 4000 Pa (limite inférieure de nos mesures par compression). Pour l'ovalbumine, nous avons préparé des solutions à 10, 20, 30, 40 g/L selon le même critère. Les décompressions correspondent à des sacs compressés à 50, 10, 5 et 1 bar (après un palier à 1 bar) et ensuite décompressés à 0,5 bar.

On peut distinguer deux régimes sur le profil de l'ovalbumine de la figure 6 (a) :

- Un régime dilué où on concentre très facilement les solutions, qui sont liquides.
- Un régime concentré où la pression osmotique augmente beaucoup plus vite que la concentration. Le début de ce régime est marqué par une transition liquide-gel, et ensuite gel-solide.

La fraction volumique de l'ovalbumine atteinte à 50 bar de pression osmotique est de 0,53. Elle est encore éloignée de la fraction volumique de l'empilement compact qui est 0,74 pour des objets sphériques de taille homogène.

Aux décompressions, on revient à une dispersion homogène de concentration très proche du point de compression à 0,5 bar. Même les solides créés aux hautes pressions sont totalement remis en solution. Les compressions d'ovalbumine sont donc entièrement réversibles. Nous avons également observé un phénomène transitoire, dans le sac qui était comprimé à 50 bar, lors de la décompression à 0,5 bar : une séparation de phase entre deux phases liquides limpides. La nature et les propriétés de ces deux phases restent à déterminer.

La remarque principale sur le profil de pression osmotique du lysozyme (figure 6 (b)) est cette singularité observée entre 1 et 10 bar (rectangle sur la figure). Comme décrit précédemment (IV.1.), le lysozyme sous pression osmotique s'agrège. A partir de 2,3 bar, les sacs sont uniformément remplis de ces « agrégats » et sont complètement opaques. Le virage entre 1 bar et 10 bar pourrait être la marque d'une « agrégation ».

La fraction volumique atteinte à 50 bar de pression osmotique est de 0,55.

Dans les sacs soumis à une décompression, on revient à une dispersion non homogène (« précipité » aux fonds des sacs). Les concentrations en extraits secs sont très proches du point de compression à 0,5 bar. Cependant, nous avons prélevé un échantillon de chaque sac et après centrifugation, on a dosé le surnageant au spectrophotomètre. On trouve des concentrations inférieures aux extraits secs pour les sacs compressés à 10 et 50 bar avant la décompression. Les concentrations sont un peu plus faibles, et d'autant plus faibles que la dispersion a été fortement comprimée.

De plus les points de décompressions auparavant compressées à 10 et 50 bar semblent avoir plus de précipité résiduel qu'à 0.5 bar en compression, contrairement aux décompressions à partir de 1 et 5 bar qui semblent avoir autant de précipité qu'à 0.5 bar en compression.

Cependant, d'après les concentrations totales des extraits secs, les compressions de lysozyme sont réversibles.

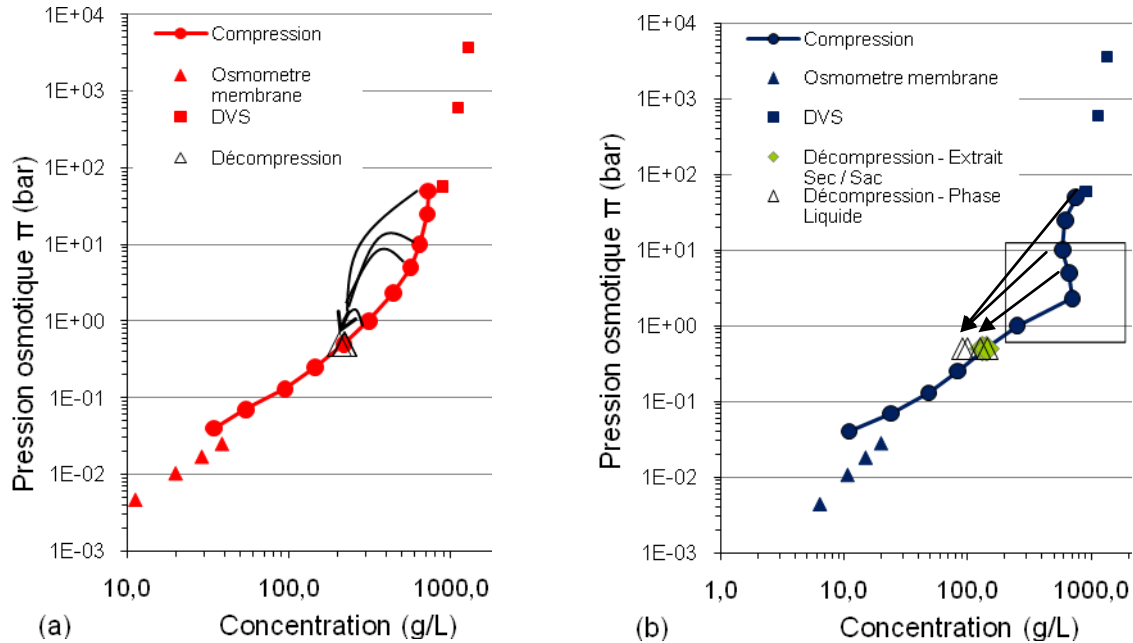


Figure 6. Pressions osmotiques de solutions d'ovalbumine (a) et de lysozyme (b) déterminées par compression osmotique, par osmomètre à membrane, et par DVS en échelle logarithmique. Les triangles vides représentent les points de décompression à 0,5 bar, et les flèches représentent le trajet des décompressions à 0,5 bar (à partir de 50, 10, 5, et 1 bar). On considère les écarts types comme faibles donc on ne représente que la valeur moyenne des duplicats.

## IV.3. Modèles & discussion

### IV.3.1. Equation de Van't Hoff : Régime dilué

La figure 7 compare les points de compression osmotique de l'ovalbumine et du lysozyme et les points calculés avec l'équation de Van't Hoff. Le modèle décrivant la pression osmotique de solutions diluées ne rend pas compte de nos données expérimentales.

Les pressions atteintes lors des compressions de l'ovalbumine (figure 7 (a)) sont largement supérieures à celles prédites par la loi de Van't Hoff, qui suppose que la pression d'une solution diluée ne varie qu'avec le nombre de particules en solution.

Une explication possible de l'écart visible sur la figure 7 (a) aurait pu être la présence de petites molécules qui, en raison de leur faible masse moléculaire, ne modifieraient que peu la concentration massique totale, mais exerceraient en raison de leur nombre une pression osmotique non négligeable. Mais en simulant la présence de ces petites molécules, on n'arrive pas à faire coïncider le modèle sauf si on ajoute au moins 50% de peptides de 5000 Da. La

pureté de l'ovalbumine ayant été vérifiée par HPLC d'échanges d'ions et en phase inverse, l'hypothèse de la présence d'espèces de petites masses est éliminée.

Nous avons également émis l'hypothèse de la dégradation de l'ovalbumine, étant donné les longues durées des compressions. Nous avons passé à l'osmomètre à membrane une solution préparée plusieurs semaines auparavant et une solution préparée très récemment. Aucune différence significative a été mise en évidence. L'ovalbumine n'est pas dégradée.

On voit cependant une nette différence entre les points de compressions osmotiques et les points d'osmomètre (proches de l'équation de Van't Hoff). On peut proposer que les pores du sac de dialyse sont en partie bouchés. Cela entrainerait un « non-équilibre » ou un équilibre beaucoup plus lent, et on aurait donc sous-estimé la concentration dans les sacs. Il n'y a pas de transfert à travers la membrane de l'osmomètre. Cela pourrait expliquer l'écart entre les points.

L'écart observé entre le modèle et les données expérimentales peut enfin être attribué à l'interaction entre les protéines. À ce pH, la charge pourrait être trop élevée pour que les interactions électrostatiques puissent être négligées, même en régime dilué.

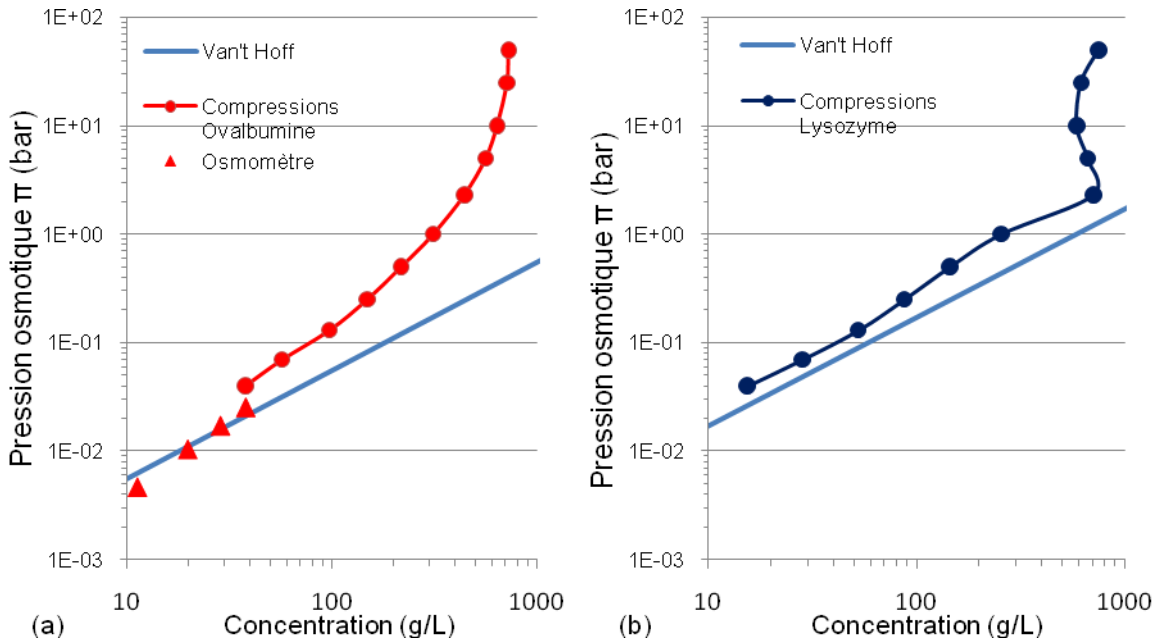


Figure 7. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine (a) et du lysozyme (b) et des données calculées à partir du modèle de l'équation de Van't Hoff.

L'écart faible observé entre le modèle et les données expérimentales du lysozyme (figure 7 (b)) peut être expliqué par l'interaction répulsive entre les protéines.

### IV.3.2. Modèle des sphères dures de Carnahan-Starling

La figure 8 (a) présente les données de compression de l'ovalbumine confrontées au modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. On a un écart important entre les points expérimentaux et les points du modèle sphères dures. Nos pressions sont environ 2 fois supérieures aux pressions des sphères dures, dans toute la gamme de concentration.

Nous avons mis en doute le PEG, qui aurait pu ne pas correspondre au modèle de Parsegian et nous aurions mal exprimé nos pressions. Nous avons utilisé l'osmomètre à membrane pour vérifier quelques pressions imposées par le PEG. Pour cela, nous avons préparé des solutions de concentrations précises, donc de pressions osmotiques connues grâce à l'expression de Parsegian. Les pressions mesurées correspondent à celles prédites par le modèle de Parsegian. Cette hypothèse est donc rejetée.

L'hypothèse d'un équilibre des pressions osmotiques non atteint pourrait être émise. Mais nous avons pris assez de précautions (nouvelle solution de PEG à pression exacte connue pour laisser équilibrer une semaine de plus) pour ne pas croire à cette hypothèse.

Il semble donc que de fortes interactions répulsives entre les protéines (dues à sa charge élevée de  $z=-11e$ ) aient une part importante dans l'écart entre nos points de compressions et le modèle des sphères dures.

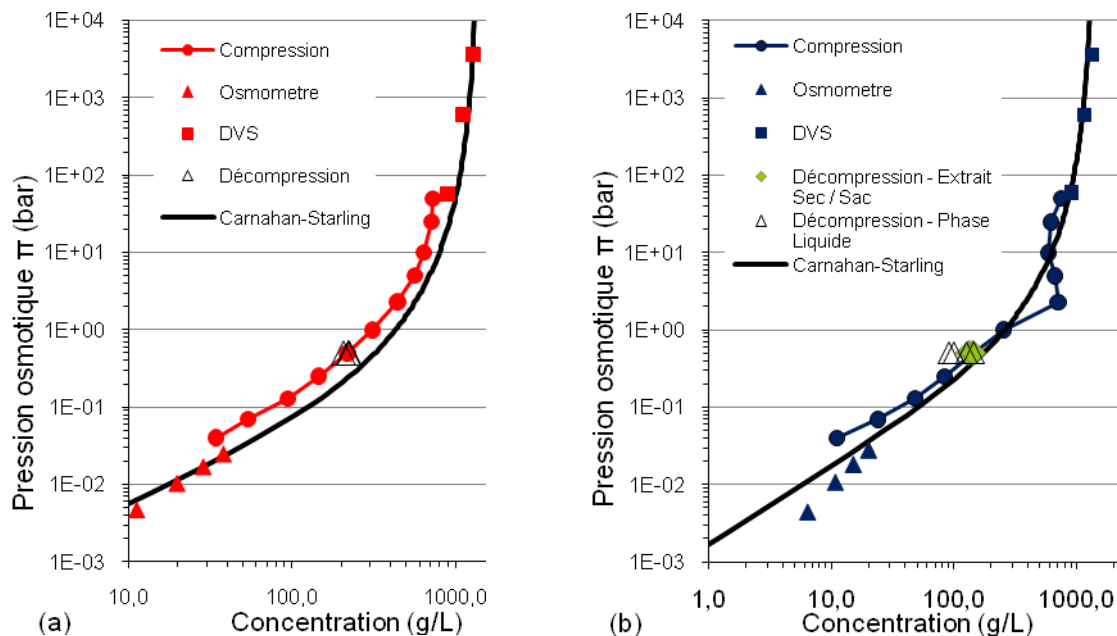


Figure 8. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine (a) et du lysozyme (b) et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling.

La figure 8 (b) présente les données de compression du lysozyme confrontées au modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. Aux faibles pressions, nos points de compressions sont assez proches du modèle. La charge du lysozyme à ce pH peut être suffisante pour expliquer un léger décalage.

Le virage entre 1 et 10 bar reste le point le plus important et intrigant. Cela semble être la marque d'une « agrégation ». En effet, en fin de compression, à 1 bar, il y a un petit « précipité » blanc au fond du sac. A partir de 2.3 bar, les sacs sont uniformément remplis de ces « agrégats » et sont complètement opaques.

A 2.3 bar, on a une concentration plus élevée qu'attendu selon la théorie, et comparable à celle obtenue à 50 bar. On en déduit que les « agrégats » ne participent pas à la pression. Entre 10 et 50 bar, les points de compression remontent au dessus de la courbe des sphères dures. Une hypothèse de travail est que les compressions à 10, 25 et 50 bar seraient bloquées dans un état

métastable et la protéine n'aurait pas eu le temps de se réorganiser en agrégats. Ainsi elle participerait encore à la pression. L'aspect cinétique et le chemin qu'on empreinte pour les compressions semblent très importants.

Les points de décompression du lysozyme semblent difficiles à interpréter. Les concentrations totales obtenues par extrait sec indiquent une réversibilité totale puisqu'ils sont placés très proches du point de compression à 0.5 bar. Cependant, les concentrations de surnageant mesurées par spectrophotomètre ne tombent pas sur ce même point. Pour placer les points de spectrophotomètre à la même pression que les points obtenus par extrait sec (soit 0.5 bar), on a fait l'hypothèse que les agrégats ne participent pas à la pression. On trouve des concentrations inférieures à celle mesurées par extraits secs pour les sacs compressés à 10 et 50 bar avant la décompression (50g/L de moins). Les concentrations sont plus faibles, et d'autant plus faibles que la dispersion a été fortement comprimée. Sans expérimentation complémentaire, nous pouvons difficilement interpréter ces résultats.

Initialement, nous nous attendions à former des objets irréversibles aux hautes pressions (supérieures à 1 bar) et tomber à des concentrations d'extrait sec plus grosses que le point de compression à 0.5 bar et en phase liquide à tomber sur le point de compression à 0.5 bar. Ce n'est pas le cas. Les compressions sont réversibles. Cependant, les sacs décomprimés n'étaient pas remplis autant que les sacs de compression: par exemple, le sac comprimé à 50 bar avant d'être décomprimé à 0.5 bar était aplati, dur, et la dispersion était solide, comme une plaque de verre. Alors que le sac de compression à 50 bar était complètement blanc et épais car rempli plusieurs fois de solution.

Sur la figure 8 (a) et (b), on observe un écart compression/osmomètre mais aussi un écart compression/DVS. Pour l'ovalbumine, l'hypothèse des pores bouchés des sacs de compression est applicable. Lors des mesures de pressions osmotiques du lysozyme effectuées à l'osmomètre à membrane, on a remarqué une fuite, c'est-à-dire que le lysozyme passait à travers la membrane et la pression détectée diminuait au lieu de faire un palier. Le seuil de coupure n'était pas assez petit. Il est important de noter qu'avec le DVS on concentre aussi les petites molécules et les sels (contrairement à la compression osmotique), donc on peut « écranter » les répulsions électrostatiques. Cela peut expliquer l'écart entre les points de compression et les points de DVS. De plus nous avons été confrontés à une panne du capteur d'humidité relative du DVS, mettant en doute les résultats obtenus préalablement.

### IV.3.3 Confrontation aux données de la littérature

Comme nous l'avons vu précédemment, nos résultats sont très éloignés des valeurs prédites par le modèle de Carnahan-Starling, sur toute la gamme de concentration.

Les sels écrantent les interactions électrostatiques. On peut se demander si les forces de répulsions sont encore importantes à 35 mM de force ionique.

Les mesures de Yousef et coll. (2001) de pression osmotique de solutions d'ovalbumine à des forces ioniques de NaCl de 0,01M, 0,15M et 0,5M sont représentés en figure 9. Les mesures de Yousef et coll. ont été mesurée à l'aide d'un osmomètre mis au point pour l'expérience, à pH7.

On voit que nos points de compression (à 0,035M de force ionique) sont encadrés par les mesures de Yousef et coll. Nos points sont cohérents avec ces mesures à des forces ioniques plus faibles et plus fortes. Les forces de répulsions semblent donc encore importantes à 35mM de force ionique.

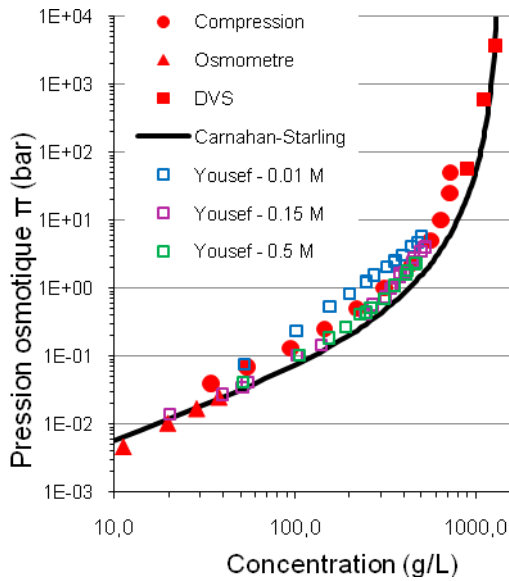


Figure 9. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine, des données expérimentales de Yousef et coll. et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling.

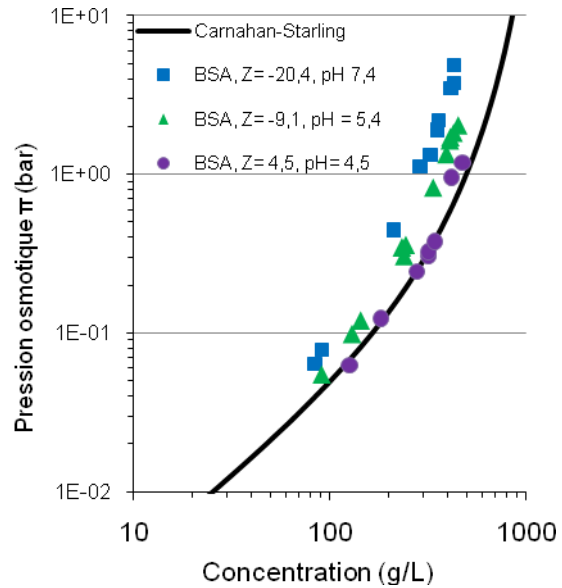


Figure 10. Confrontation des données de Vilker et coll. sur la BSA et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Satrling pour la BSA.

La figure 10 présente les résultats de Vilker et coll. (1980) sur la sérum-albumine bovine (BSA). Les mesures effectuées à l'osmomètre, ont été faites à pH 7.4, pH 5.4, et pH 4.5 à 150mM de NaCl. La BSA a un point isoélectrique de 4,7. Les charges (respectivement au pH) sont  $Z = -20.4$ ,  $Z = -9.1$ ,  $Z = 4.5$ .

On voit clairement l'influence du pH et donc de la charge sur les interactions électrostatiques. A pH 4.5, et à  $Z = 4.5$  (charge nette la plus faible de l'expérience), les points sont très proches des sphères dures.

On peut également noter l'écart important entre les points à charge électrostatique importante ( $Z = -9.1$  et  $Z = -20.4$ ) et le modèle sphères dures.

Avec l'ovalbumine, nous nous plaçons à  $Z = -11$  environ. L'écart que nous avons entre nos données expérimentales et le modèle sphère dures est comparable à celui entre les données de Vilker et le modèle. Nos données sont cohérentes avec celles de Vilker et coll.

Des données de Yousef et Vilker, on peut tirer cette conclusion : la charge électrostatique exerce une forte influence sur les interactions intermoléculaires, même à force ionique élevée. Dans l'expérience de Yousef, même à très forte force ionique (0,5M), les points sont loin des valeurs prédites pour des sphères dures, alors que dans l'expérience de Vilker, en diminuant la charge nette, les résultats correspondent au modèle des sphères dures.

Peu de données sont disponibles sur les pressions osmotiques de lysozyme dans une gamme d'étude aussi large que la nôtre (0.04 bar à 50 bar). Cependant, Rickard et coll. ont étudié l'hydratation du lysozyme : en utilisant une nouvelle technique de micro-pipette, des microbilles sphériques, comme du verre, ont pu être créées et ont permis de déterminer l'hydratation de la protéine en fonction de l'activité de l'eau, dans un milieu déshydratant

(décanol). En ajustant l'activité de l'eau du milieu déshydratant, la concentration finale de protéines dans la microbille est contrôlée.

Les données de Rickard et coll. sont représentées sur la figure 11. Elles sont dans la continuité des nôtres.

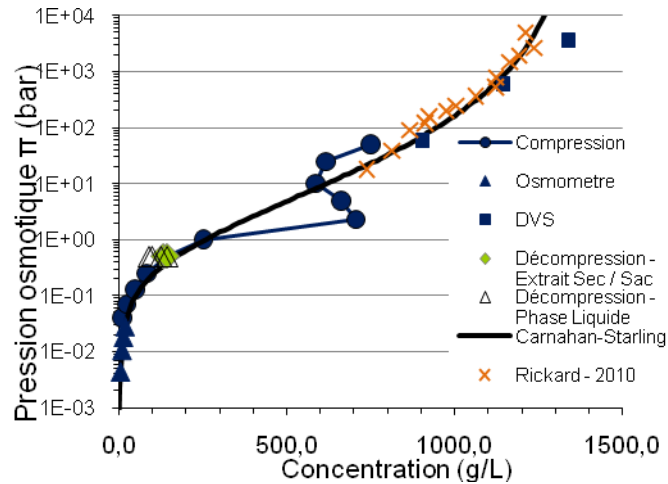


Figure 11. Confrontation des données de compression osmotique du lysozyme, des données expérimentales de Rickard et coll. et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling.

Plusieurs auteurs (Stradner et coll., 2004 et 2006 ; Barhoum et coll., 2010 ; Liu et coll., 2010) ont étudié la formation d'*equilibrium clusters* (agrégats dynamiques) dans des solutions concentrées de lysozyme.

Stradner et coll. ont étudié, par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et diffusion des neutrons aux petits angles (SANS), des solutions de lysozyme concentrées à des forces ioniques faibles, où les répulsions électrostatiques, s'exerçant sur de longues distances, sont faiblement écrantées. L'équilibre entre les attractions à courtes distances et les répulsions à longues distances provoque la formation d'*equilibrium clusters*. Cette formation est totalement réversible. Cela conduit à la stabilisation des structures d'*equilibrium clusters*, qui dépendent de la concentration, du pH, de la concentration en sels et de la température.

Barhoum et coll. ont utilisé la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) à gradient de champ pulsé pour caractériser des solutions de lysozyme concentrées et d'obtenir des preuves de l'existence d'une phase d'*equilibrium clusters* qui contient des monomères de lysozyme et des *clusters* (agrégats). Il y a des échanges rapides entre les monomères et les clusters, à l'échelle de temps de la RMN.

Une possibilité qui est compatible avec les expériences de Barhoum et coll. et avec l'image d'une phase d'*equilibrium clusters* régie par la concurrence entre les attractions à courte portée et les répulsions à longue distance (comme suggéré par Stradner et al.) est que les *clusters* ne sont pas étroitement liés, mais forment des réseaux lâches à haute densité, qui coexistent, et échangent avec des monomères à faible densité.

## IV.4. Conclusion

Des interactions autres que de type « volume exclu » (exclusion au recouvrement) sont à prendre en compte, même aux basses pressions.

Les données de l'ovalbumine sont en accord avec les données d'autres auteurs à des forces ioniques plus ou moins fortes et à des charges différentes. Avec de la BSA, Vilker et coll trouvent des points très éloignés des sphères dures dans des conditions de pH où la BSA porte 9 charges (un peu moins que l'ovalbumine dans notre expérience), alors que la force ionique utilisée par ces auteurs est 5 fois supérieure à celle que nous avons utilisée. Les phénomènes de répulsion électrostatique semblent plus sensibles à la charge nette de la protéine qu'à la force ionique du milieu.

On n'a pas d'agrégation à la compression et on observe une réversibilité totale. Cependant, la modélisation semble encore difficile.

Pour le lysozyme, aux pressions inférieures à 0.5 bar, on observe de légères interactions autres que de type "volume exclu", et aux pressions supérieures à 0.5 bar, la présence d' « agrégation » ou de *clustering* est visible sur la courbe et dans les sacs. La singularité (le virage de la courbe) entre 1 et 10 bar peut être un phénomène lié à la cinétique d'agrégation.

La réversibilité des compressions semble totale si on se base sur les concentrations d'extrait sec des décompressions qui retombent sur le point de compression à 0,5 bar. Les compressions de lysozyme, dont la charge est pourtant de +8e, sont proches des sphères dures aux faibles concentrations, contrairement à l'ovalbumine (-11e). Les *equilibrium clusters* sont peut-être une explication à cette différence. La charge nette ne fait pas tout, les effets de signe de la charge pourraient avoir une importance.

De vraies différences entre ces protéines sont mises en évidence. Elles vont dans le même sens que celles observées à l'interface. La protéine qui est classiquement considérée comme la plus stable (le lysozyme), s'agrège ou forme des *clusters dynamiques*, tandis que l'ovalbumine, classiquement considérée comme peu stable et flexible ne produirait pas de structures irréversibles. Le lysozyme a un comportement singulier, comme à l'interface.

Ces résultats mettent en valeur plusieurs questions.

## IV.5. Perspectives

À plus long terme, l'étude des systèmes de protéines à haute concentration apportera des informations cruciales pour la compréhension de leur comportement lors de nombreux procédés de transformation ou de certaines de leurs aptitudes technologiques.

Plusieurs expériences sont nécessaires pour confirmer et compléter ces résultats, par exemple :

- faire les compressions d'ovalbumine à des charges différentes (pH différents) et des forces ioniques différentes pour confirmer le poids des interactions électrostatiques répulsives ;
- compresser le lysozyme par un autre chemin semble indispensable : faire un palier de compression à 2.3 bar puis comprimer à une pression osmotique égale ou supérieure à 10 bar, de manière à déterminer s'il est possible d'obtenir un même état final (même concentration) à des pressions osmotiques différentes. Egalement, on peut décompresser des sacs venant des hautes pressions à 2,3 bar.

Egalement, on pourrait compresser le lysozyme à des forces ioniques plus fortes pour écranter les interactions à longues distances et observer l'effet sur l'agrégation.

Des expériences complémentaires pourraient inclure un changement de matériels : faire les compressions dans des bains de PEG 35000 Da, utiliser des sacs de dialyse de composants différents.

Enfin, il faudrait trouver un modèle qui à partir de la charge et de la taille de chaque objet puisse bien décrire l'ensemble de nos données :

- ovalbumine: charge forte (-11), pression osmotique loin des sphères dures, pas d'agrégation
- lysozyme: charge moyenne (+8), pression osmotique proche des sphères dures, agrégation ou *clustering*.

## V. Conclusion générale

Ce stage de 6 mois au sein de l'UMR STLO a été très enrichissant. Stéphane Pezennec et Antoine Bouchoux m'ont permis de m'intégrer dans un projet et de m'approprier un sujet de recherche.

Pendant ce stage j'ai découvert la vie d'un laboratoire, le plaisir du travail en équipe, l'échange et le partage de connaissances qui sont indispensables pour faire de la recherche. Lors de séminaires j'ai pu m'intéresser à de nombreux sujets qui n'étaient pas dans le domaine de mes compétences et cela m'a permis de m'ouvrir sur d'autres thématiques.

Pendant ces 6 mois j'ai abordé les métiers de la recherche et j'ai constaté que la profession de chercheur demande de la persévérance, de la curiosité et beaucoup de motivation. Elle vise à produire et construire des connaissances, des savoirs, et savoirs-faire en s'appuyant sur des connaissances antérieures.

Le monde de la recherche est actuellement difficile car il existe une compétition entre de nombreux laboratoires nationaux et internationaux, qui travaillent parfois sur les mêmes sujets et qui n'ont pas tous les mêmes moyens.

Les résultats obtenus lors de ce stage ouvrent la voie vers plusieurs travaux et donneront très probablement lieu à de nouveaux sujets de stage ou de thèse. J'espère avoir la possibilité de suivre les futurs résultats et avancées.

## Bibliographie

- Barhoum Suliman and Yethiraj Anand (2010). NMR Detection of an Equilibrium Phase Consisting of Monomers and Clusters in Concentrated Lysozyme Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 114, 17062–17067
- Batra, P. P.; Roebuck, M. A.; Uetrecht, D. (1990). Effect of lysine modification on the secondary structure of ovalbumin. *Journal of Protein Chemistry.*, 9, 37-44.
- Bee JS, Stevenson JL, Mehta B, Svitel J, Pollastrini J, Platz R, Freund E, Carpenter JF, Randolph TW. (2009). Response of a concentrated monoclonal antibody formulation to high shear. *Biotechnol Bioeng* ; 103(5): 936-43.
- Bouchoux A, Cayemitte PE, Jardin J, Gésan-Guiziou G, Cabane B. (2009). Casein micelle dispersions under osmotic stress. *Biophys J.* 96(2): 693-706.
- Brans G., Schroen C. G. P. H., Van Der Sman R. G. M., and Boom R. M. (2004). Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. *J. Membr. Sci.* 243:263–272.
- Cabane B. et Hénon S. (2003). Liquides : solutions, dispersions, émulsions, gels. *Edition Belin*
- Carnahan, N. F., and Starling K. E. (1969). Equation of state for nonattracting rigid spheres. *J. Chem. Phys.* 51:635–636
- Croguennec Thomas, Nau Françoise, Pezennec Stéphane, and Brule Gérard (2000). Simple Rapid Procedure for Preparation of Large Quantities of Ovalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (10), pp 4883–4889
- Cromwell Mary E. M., Hilario Eric and Jacobson Fred (2006). Protein Aggregation and Bioprocessing. *AAPS Journal.*; 8(3): E572-E579.
- Deutscher M. P. (1990). Guide to protein purification. Methods in enzymology volume 182. *Academic Press, Inc.*
- Gögelein Christoph, Nägele Gerhard, Tuinier Remco, Gibaud Thomas, Stradner Anna, and Schurtenberger Peter (2008). A simple patchy colloid model for the phase behavior of lysozyme dispersions. *the journal of chemical physics* 129, 085102
- Janson J.-C. et Rydén L. (1989) Protein purification : Principles, high resolution methods, and applications. *VCH Publishers.*
- Khoshkbarchi Mohammad K., Vera Juan H. (1997). A simplified hard-sphere equation of state meeting the high and low density limits. *Fluid Phase Equilibria.* 130: 189-194

- Lin Yang-Zheng, Li Yi-Gui and Lu Jiu-Fang. (2001). Correlation and Prediction of Osmotic Pressures for Aqueous Bovine Serum Albumin–NaCl Solutions Based on Two Yukawa Potentials. *Journal of Colloid and Interface Science* 239, 58–63
- Liu Yun, Porcar Lionel, Chen Jinhong, Chen Wei-Ren, Falus Peter, Faraone Antonio, Fratini Emiliano, Hong Kunlun, and Baglioni Piero (2010). Lysozyme Protein Solution with an Intermediate Range Order Structure. *J. Phys. Chem. B*. DOI: 10.1021/jp109333c
- Nigen M., Gaillard C., Croguennec T., Madec M.-N., Bouhallab S. (2010). Dynamic and supramolecular organisation of  $\alpha$ -lactalbumin/lysozyme microspheres: A microscopic study. *Biophysical Chemistry* 146 30–35.
- Parsegian, Laboratory of Physical and Structural Biology (<http://lpsb.nichd.nih.gov/peg20000.htm>)
- Rickard Deborah L., Duncan P. Brent, and Needham David (2010). Hydration Potential of Lysozyme: Protein Dehydration Using a Single Microparticle Technique. *Biophysical Journal* Volume 98 March 2010 1075–1084
- Stradner A.; Sedgwick H.; Cardinaux F.; Poon W. C. K.; Egelhaaf S. U.; Schurtenberger P. (2004), Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* 432, 492–495.
- Stradner A.; Cardinaux F.; Schurtenberger P. (2006). A Small-Angle Scattering Study on Equilibrium Clusters in Lysozyme Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 110, 21222–21231.
- Thapon J.-L. et Bourgeois C.-M. (1994) L'œuf et les ovoproduits. *Collection sciences et techniques agro-alimentaires, Technique et Documentation (Lavoisier)*.
- Vilker Vincent L., Colton Clark K. and Smith Kenneth A. (1981). The osmotic pressure of concentrated protein solutions: Effect of concentration and ph in saline solutions of bovine serum albumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 79, Issue 2, February, Pages 548-566
- Yousef M. A., Datta R., and Rodgers V. G. J. (2001). Confirmation of Free Solvent Model Assumptions in Predicting the Osmotic Pressure of Concentrated Globular Proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* 243, 321–325

Table des figures

Figure 1. Schéma de la pression osmotique ..... 10

Figure 2. Schéma du principe de compression osmotique ..... 18

Figure 3. Pressions osmotiques choisies pour l'expérience et concentrations en masse de PEG correspondantes ..... 20

Figure 4. Photographies des sacs de dialyse des solutions d'ovalbumine en fin d'expérience (a,b,c,d,e) et au premier jour de compression (f) ..... 23

Figure 5. Photographies des sacs de dialyse des solutions de lysozyme en fin d'expérience.. 24

Figure 6. Pressions osmotiques de solutions d'ovalbumine (a) et de lysozyme (b) déterminées par compression osmotique, par osmomètre à membrane, et par DVS en échelle logarithmique. Les triangles vides représentent les points de décompression à 0,5 bar, et les flèches représentent le trajet des décompressions à 0,5 bar ( à partir de 50, 10, 5, et 1 bar)...26

Figure 7. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine (a) et du lysozyme (b) et des données calculées à partir du modèle de l'équation de Van't Hoff. .... 27

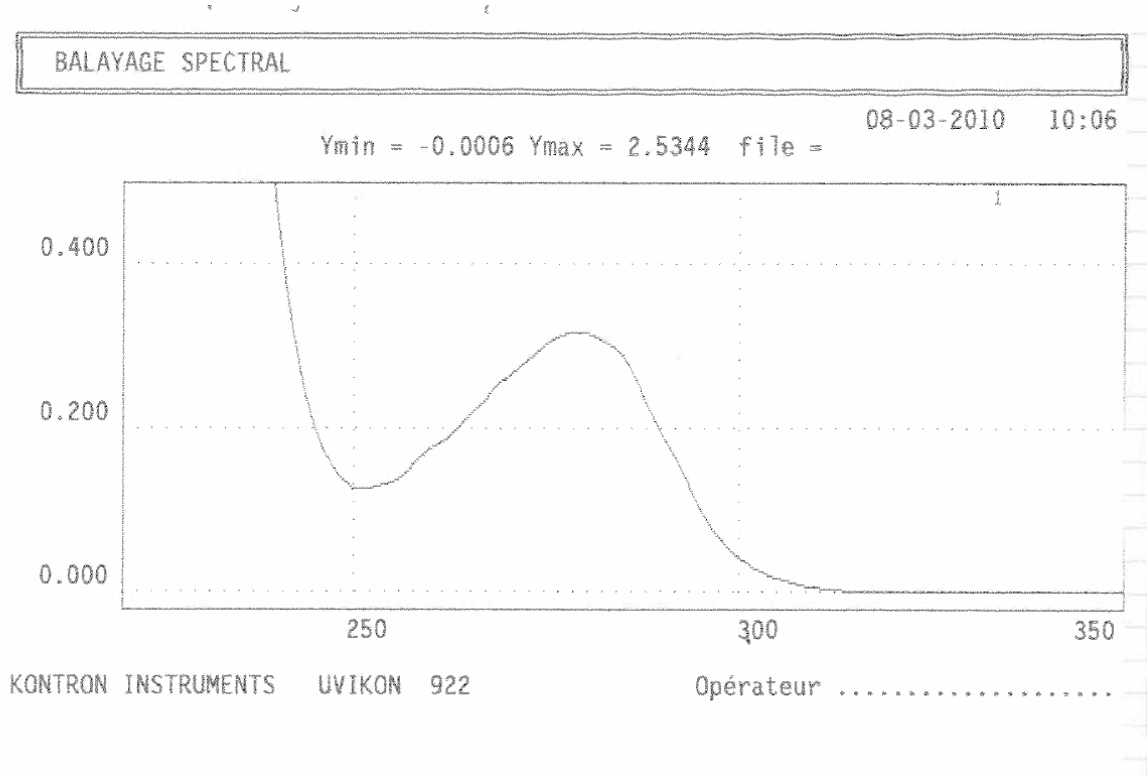
Figure 8. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine (a) et du lysozyme (b) et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. .... 28

Figure 9. Confrontation des données de compression osmotique de l'ovalbumine, des données expérimentales de Yousef et al. et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. .... 30

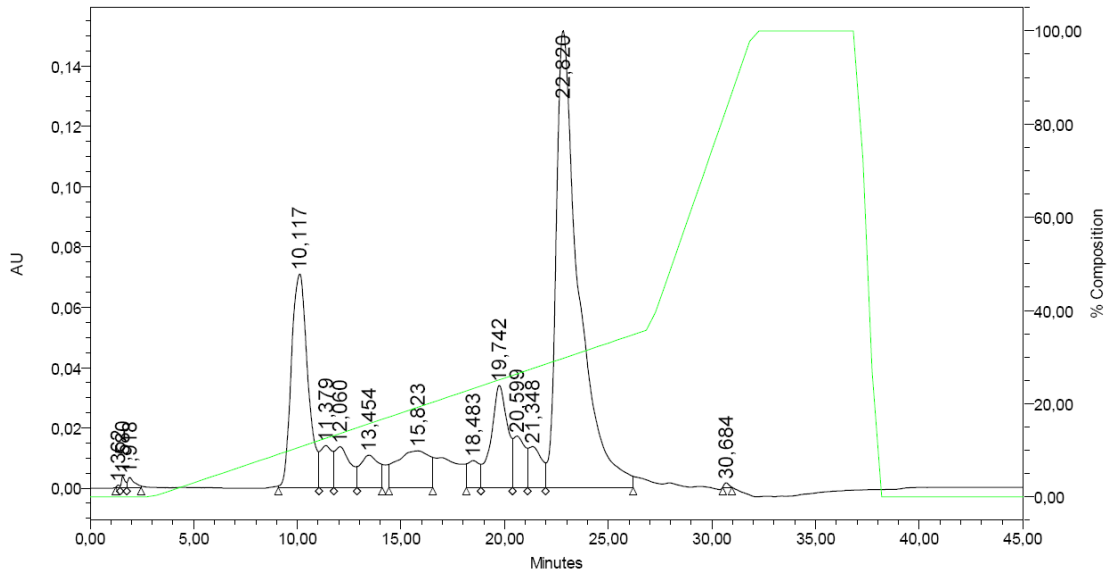
Figure 10. Confrontation des données de Vilker et al. sur la BSA et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Satrling pour la BSA. .... 30

Figure 11. Confrontation des données de compression osmotique du lysozyme, des données expérimentales de Rickard et al. et des données calculées à partir du modèle de sphères dures de Carnahan-Starling. .... 31

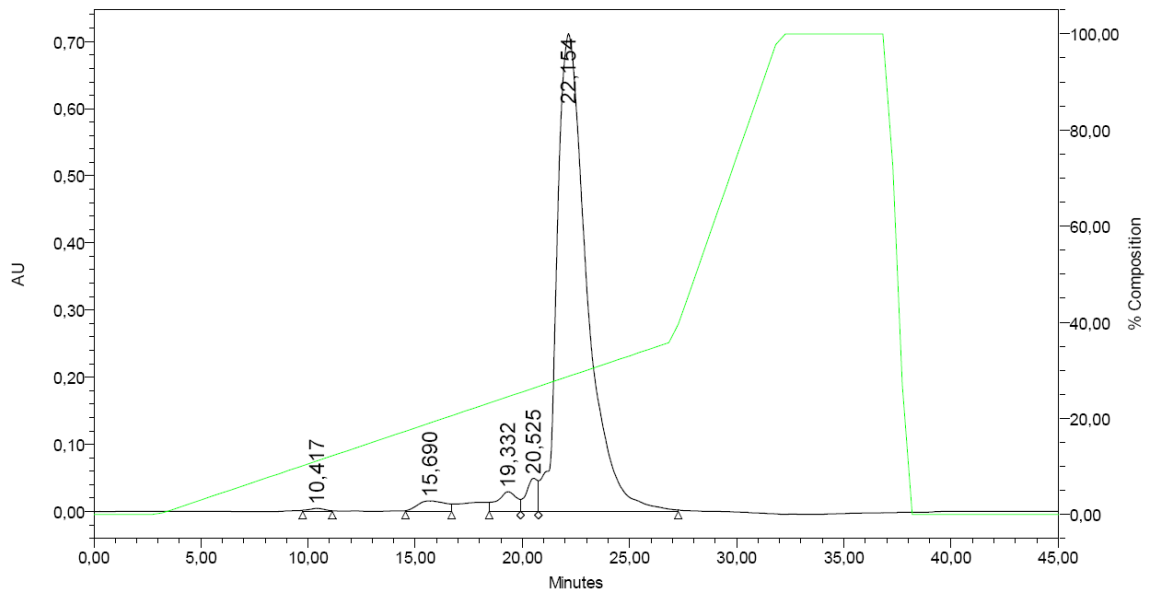
ANNEXES



Annexe 1 : Spectre d'absorption d'une solution d'ovalbumine. A 280nm, maximum d'adsorption de la solution (acides aminés aromatiques), à 214 nm, on voit l'adsorption de la liaison peptidique (DO > à 1, spectre saturé)



(a)



Peak Results

|   | RT     | Area     | Height | % Area |
|---|--------|----------|--------|--------|
| 1 | 10,417 | 237303   | 4556   | 0,32   |
| 2 | 15,690 | 1444191  | 15793  | 1,95   |
| 3 | 19,332 | 1846174  | 29343  | 2,50   |
| 4 | 20,525 | 1812344  | 49185  | 2,45   |
| 5 | 22,154 | 68652504 | 711059 | 92,78  |

(b)

Annexe 2 : Chromatogramme HPLC d'échange d'ions, blanc d'œuf (a) et ovalbumine purifiée (b)