

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présentée par : **MADOUI Soraya**

Pour obtenir le diplôme de **Magister**

Option : Biochimie et physiologie expérimentale

THEME

**Effets des solutions tampons sur les propriétés adsorbantes
d'une résine fonctionnalisée vis-à-vis de l'HSA et de l'IgG
humaines.**

Soutenu publiquement le 08/ 11 /2012

Devant le jury

Président :	Pr. ARRAR Lekhmici	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Rapporteur :	Dr. CHAREF Nouredine	M C A. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examineur :	Pr. BAGHIANI Abderrahmane	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.
Examineur :	Pr. KHENNOUF Seddik	Prof. Université Ferhat Abbas – Sétif.

Année universitaire 2011-2012



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ma famille, notamment:

A mes parents qui m'ont tout donné sans rien en retour et

qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.

A mes frères DJAMEL et ABD EL GHANI, qui ont toujours été présents

pour moi et qui m'ont toujours soutenu et encouragée psychologiquement.

A mes sœurs SONIA, LINDA et SAMIA pour leurs précieux conseils durant

tout mon cycle universitaire.

A mes oncles RAZEK et AZEDINNE qui m'ont toujours soutenus.

*A mes cousins ABDENOUR, IL YESS, SAMI, MASSI, SALIM, YACINE,
NASSIMA, LAMIA, DJEGDJIGA, ZINA et SABRINA.*

*A mon mari YANIS BETTAR, qui a su être là lors des nombreux moments de
doute.*

A mes neveux et nièces: DJAGDJEGA, YOUNA, FARINASE, KAFIA,

TIZIRI et LINA.

A tous mes amies en qui j'ai toujours trouvé le soutien et le réconfort.

A toute la promotion de magister 2009.

Ainsi qu'à toutes les amies qui ont répondu à notre invitation.



Remerciement

Quel que soit la longueur du serpent, il a toujours une tête ! « Proverbe Ivoirien ». La voilà donc dans mon cas, cette ... tête (Mémoire) soutenue après de longues épreuves et de joies partagées avec une équipe, des amis et une famille.

On m'avait prévenue que la réalisation d'un mémoire n'était pas possible sans l'appui de son entourage et je m'en suis vite rendu compte. Alors,

*Je remercie **DIEU** Tout Puissant, Maître des cieux et de terre, qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Une tendre pensée pour **mes parents**, pour leur patience, leur présence à mes cotées pendant toutes mes années d'études, ainsi que pour leur contribution à l'élaboration de ce manuscrit.*

*Tout d'abord, Je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements au **Dr CHAREF**, qui m'a permis de réaliser ce travail sous sa direction, m'a accueilli dans son laboratoire et ma permis de travailler dans les meilleures conditions. Je ne saurai jamais oublier sa disponibilité, son assistance et ses conseils judicieux pour moi. C'est un honneur pour moi d'avoir travaillé avec lui.*

*Nous remercions vivement le **Pr. ARRAR** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Nos remerciements vont aussi à **Pr. BAGHIANNI** et **Pr. KHANNOUF** Pour avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Pr. ARRAR** et **Pr. BAGHIANNI** qui m'ont accueilli dans leurs laboratoire et mon permis d'utilisée leurs produits.*

*Je tiens surtout à adresser mes sincères remerciements à mon oncle **Madoui Azzedine** pour avoir participé activement à la correction de ce manuscrit.*

Je tiens à exprimer ma gratitude à mes frères MADOUÏ DJAMEL et MADOUÏ ABD EL GHANI, qui me soutiennent depuis de nombreuses années et pour leur aide et leur conseil.

Je n'oublierai pas de remercier le chef de service du labo central du CHU de Sétif, Monsieur BENADI RACHIDE, pour me permettre de réaliser mes dosages au sein de son service. Je souhaite évidemment remercier toutes les personnes qui travaillent au labo et qui m'ont offert leur aide.

Mes plus vifs remerciements s'adressent au Dr. BOUSSOUALIM NAWAL, pour tous les efforts fournis. Ses importantes qualités humaines et sa grande disponibilité m'ont été d'une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour " m'avoir tenu la main ".

Et je voudrais adresser plus particulièrement des remerciements pleins de reconnaissance et de gratitude à nos professeurs de département de biologie « PR. GHARZOULI et PR. BENBOUBATRA », qui ont toujours été à la hauteur de leur noble mission d'enseignants assidus, ponctuels, attentifs et généreux. Et pour m'avoir appris l'autonomie, la débrouille et l'autocritique.

En fin, Je voudrais exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont soutenu de près ou de loin au cours de la réalisation de ce modeste travail: MADOUÏ SAMIA, BENMAAMAR ZINA, BOUHADDA AMINA, AOUACHRIA SANA, BENBRINIS SOUMIA et BENSLAMA ABDERRAHIM.

Je sais que j'oublie des gens. Mais un fait est certain: bien que je demeure le principal artisan de ce manuscrit. Je les remercie toutes et je souhaite que la lecture qui s'offre à leur curiosité leur procure la satisfaction qu'elles espéraient.

Résumé

Les médicaments dérivés du plasma représentent un secteur particulier du domaine pharmaceutique. Ils sont produits par fractionnement de la matière première, le plasma humain, qui permet d'isoler la protéine recherchée. Ces protéines hautement caractérisées sont indispensables à soigner des pathologies et sauver des vies. Le fractionnement plasmatique consiste à préparer ces produits thérapeutiques en s'appuyant sur des techniques fines et performantes aboutissant à un meilleur rendement tant sur le point quantitatif que qualitatif. Parmi ces techniques, nous avons tentés d'intégrer la méthode de la chromatographie d'affinité, IMAC. Un nouvel adsorbant fonctionnalisé chromatographique [N,N-bis(salicylidenepropylenetriamine)-aminométhyl polystyrène] a été utilisé et qui peut fixer des différents métaux tels que le Cu(II). Le but de cette étude est de trouver les conditions les plus adéquates à l'adsorption et la désorption des protéines spécifique sur la résine. La pureté des éluant obtenus a été contrôlée par SDS-PAGE. Les résultats montrent que la résine-Cu(II) était capable de purifier une quantité d'HSA pure en utilisant le tampon d'élution (5 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl) ainsi que le tampon (10 mM tampon phosphate, 35 mM NaCl et 5 mM imidazole). En plus, on a récupéré une quantité d'IgG pure à partir du plasma humain, en ajoutant une faible concentration de l'imidazole (5 ou 10 mM) au tampon d'élution (10 mM tampon phosphate et 5 mM MOPS). En conclusion, cette résine est une bonne matrice chelatrice de métaux bivalents et peut être utilisée pour la purification des IgG et des HSA du plasma humain à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques.

Mots clé: HSA, immunoglobulines G, fractionnement plasmatique, chromatographie d'affinité IMAC.

الملخص

تمثل الأدوية المشتقة من البلازما فرعا خاصا في المجال الصيدلاني. يتم إنتاج هذه الأدوية عن طريق تجزئة البلازما، حيث تسمح بالحصول على البروتينات المرغوب فيها وبالتالي استعمالها في علاج العديد من الأمراض. تنص هذه التجزئة على إنتاج هذه المركبات اعتمادا على مجموعة من التقنيات الدقيقة والفعالة، والتي تعطي أفضل مردود كمياً و نوعاً. تم ، في هذا العمل، دراسة إحدى هذه التقنيات و المتمثلة في كروماتوغرافيا الشراة IMAC، حيث تم استعمال مركب إدمصاص خاص هو [N,N-bis(salicylidenepropylene)tri-aminomethyl polystyrène] ، قادر على تثبيت مختلف المعادن مثل ايونات النحاس Cu(II). تهدف هذه الدراسة للحصول على شروط أكثر ملائمة لإدمصاص و تحرير البروتينات النوعية على دعامة résine. تم التأكد من درجة نقاوة العينات المتحصل عليها بإستعمال SDS-PAGE. وقد أظهرت النتائج أن résine-Cu(II) قادر على فصل HSA بإستعمال المحلول المنظم (5 ميلي مولر Tris-HCl و 10 ميلي مولر إيميدازول و 10 ميلي مولر MOPS و 35 ميلي مولر كلوريد الصوديوم) وأيضا المحلول المنظم (10 ميلي مولر محلول فوسفات و 35 ميلي مولر كلوريد الصوديوم و 5 ميلي مولر إيميدازول). بينما تم الحصول على IgG بإضافة تركيز ضعيف من إيميدازول (5 او 10 ميلي مولر) إلى المحلول المنظم (10 ميلي مولر محلول فوسفات و 5 ميلي مولر MOPS). بينت الدراسة أن هذه الدعامة résine ملتقط جيد للمعادن ثنائية التكافؤ كما يمكن استعمالها لفصل IgG و HSA من البلازما لأغراض تشخيصية و/أو علاجية.

كلمات مفاتيح: HSA ، غلوبولينات IgG، تجزئة البلازما، كروماتوغرافيا الشراة IMAC.

Summary

Medicaments derived from plasma represent a particular sector of pharmaceutical field. They are produced by fractionation of crude material, human plasma, allowing the isolation of proteins of interest. These proteins highly characterized are indispensable to treat several pathologies and thus save lives. Plasmatic fractionation consists to prepare these therapeutic products using precise and performant techniques leading to the best yield both on quantity and quality. Among these techniques, we attempted to integrate the affinity chromatography method, IMAC. A new functionalized chromatographic adsorbant is used [N,N-bis(salicylidenepropylenetriamine)-aminomethyl polystyrène] and which can fix different metals as Cu(II). The aim of this study is to find the most adequate conditions for the adsorption and desorption of specific proteins on resin. The purity of obtained effluent was controlled using SDS-PAGE. Results showed that the resin-Cu (II) was capable to purify a quantity of pure HSA using the elution buffer (5 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS and 35 mM NaCl) and also the buffer (10 mM buffer phosphate, 35 mM NaCl and 5 mM imidazole). Moreover, a quantity of pure IgG was recuperated adding a low concentration of imidazole (5 or 10 mM) to the elution buffer (10 mM buffer phosphate and 5 mM MOPS). In conclusion, this resin is a good chelator matrix of bivalent metals and may be used to purify IgG and HAS from human plasma for the diagnostic and/or therapeutic purposes.

Key words: HSA, Immunoglobulines G, plasmatic fractionation, affinity chromatography IMAC.

Liste des abréviations

ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps.
Asn	Asparagine.
BiP	Protéine de liaison d'immunoglobuline.
BSA	Albumine du Sérum bovin.
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément.
CDR	Régions déterminant la complémentarité.
Cys	Cystéine.
Domaine CH	Domaine constant de la chaîne lourde d'un anticorps.
Domaine CL	Domaine constant de la chaîne légère d'un anticorps.
Domaine VH	Domaine variable de la chaîne lourde d'un anticorps.
Domaine VL	Domaine variable de la chaîne légère d'un anticorps.
EDTA	Ethylène diamine tetraacetate.
Fab	Fragment de liaison de l'antigène
Fc	Fragment cristallisable.
FcR	Récepteur du Fc
GlcNAc	N-acetylglucosamine.
Ig	Immunoglobuline.
IgG	Immunoglobuline G.
IMAC	Chromatographie d'affinité par ions métalliques immobilisés.
KDa	Kilo Dalton
MOPS	Acide 3-N-morpholinopropanesulfonique.
NaCl	Chlorure de sodium.
NO	Monoxyde d'azote.
PEG	Polyéthylène glycol.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamid Gel Electrophorèse.
Tris	Hydroxyméthylaminométhane.

Liste des figures

Fig. 1. Présentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines du plasma humain.....	3
Fig. 2. La structure tridimensionnelle de HSA avec les sous-domaines.....	5
Fig. 3. La structure tridimensionnelle de HSA par l'apparition des résidus de cystéine-34, Lysine et l'arginine. Les sites I et II situés dans différents domaines.....	6
Fig.4. la structure d'albumine humaine complexées avec cinq molécules de l'acide myristique.....	7
Fig.5. Les produits issus de l'oxydation de Cys-34 de l'albumine.....	9
Fig. 6. Structure d'une molécule d'immunoglobuline.....	16
Fig.7. Présentation des régions hypervariables des anticorps.....	16
Fig. 8. (A) L'apparition de site de glycosylation dans la molécule d'IgG humain. (B) La structures d'oligosaccharidiques des IgG.....	17
Fig. 9. Les liaisons de coordinations des protéines sur le support d'ion métallique.....	27
Fig. 10. La structure des variant ligands chélateur.....	28
Fig. 11. Présentation schématique des groupements chélateurs communément utilisés complexés avec différents métaux de transition.....	29
Fig. 12. La formation de la résine à partir de polystyrène et de base de Schif.....	32
Fig. 13. L'appareillage de la chromatographie IMAC.....	33
Fig. 14. La formation de la résine-Cu(II) saturée en ions métalliques bivalent.....	34
Fig. 15. Régénération de la résine.....	40
Fig. 16. L'élution par hautes concentrations du Tris-HCl.....	43
Fig. 17. L'élution par faibles concentration du Tris-HCl.....	44
Fig. 18. L'élution par variation du PH.....	45
Fig. 19. L'élution par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl à 500 mM.....	46
Fig. 20. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM.....	47
Fig. 21. L'élution par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle de l'imidazole à 200 mM.....	49
Fig. 22. L'élution par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM.....	49
Fig. 23. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM et de l'imidazole à 10 mM.....	50
Fig. 24. L'élution par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl à 35 mM et de l'imidazole à 10 mM.....	52
Fig. 25. L'élution par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM et du NaCl à 35 mM.....	53
Fig. 26. L'effet de l'EDTA.....	54

Fig. 27. Détection de cuivre à 280 nm.....	55
Fig. 28. L'effet du MOPS pour l'élution de BSA.....	55
Fig. 29. Chromatographie à faible concentration de BSA sur la résine- Cu(II).....	56
Fig. 30. Chromatographie à faible concentration d'IgG sur la résine- Cu(II).....	57
Fig. 31. L'élution du mélange (BSA-IgG) sur la résine-Cu(II).....	57
Fig. 32. Electrophorèse (SDS-PAGE) du mélange (BSA-IgG).....	58
Fig. 33. L'effet des produits sur la résine sans l'injection du plasma.....	59
Fig. 34. L'élution du plasma humain sur la résine-Cu(II) par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle des 3 autres variant.....	60
Fig. 35. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration du NaCl.....	61
Fig. 36. L'élution du plasma humain sur résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle des 3 autres variant.....	62
Fig. 37. L'élution par variation de la concentration du tampon phosphate.....	63
Fig. 38. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du tampon phosphate à 30 mM.....	64
Fig. 39. L'élution de BSA.....	65
Fig. 40. L'élution d'IgG.....	66
Fig. 41. L'élution du mélange (BSA-IgG) sur la résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole.....	66
Fig. 42. Electrophorèse (SDS-PAGE) du mélange (BSA-IgG).....	67
Fig. 43. L'élution du plasma humain sur résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate à 30 mM.....	68
Fig. 44. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration de l'imidazole.....	68
Fig. 45. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration	69
Fig. 46. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle de l'imidazole et du tampon phosphate.....	70
Fig. 47. L'influence de la concentration de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques en ajoutant du MOPS (5 mM).....	71
Fig. 48. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de la concentration du MOPS et du tampon phosphate.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1. Propriétés (poids moléculaires, localisation et rôles) des différentes immunoglobulines: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD.....	18
Tableau 2. consommation des médicaments dérivés du sang au niveau du CHU de Sétif durant la période 01/01/2011 jusqu'à 15/04/2012.....	31
Tableau 3. Dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration du NaCl, et fixation de celle du Tris-HCl.....	48
Tableau 4. Dosage de BSA par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl et de l'imidazole.....	51
Tableau 5. Dosage de BAS par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl et de l'imidazole.....	52
Tableau 6. Dosage de BSA par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl et du NaCl.....	53
Tableau 7. Les résultats du dosage des protéines plasmatique par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle des trois autres variant.....	61
Tableau 8. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate.....	69
Tableau 9. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du tampon phosphate et de l'imidazole.....	70
Tableau 10. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate et du MOPS.....	72

Sommaire

Page de titre.....	i
Dédicace	ii
Remerciement.....	iii
Résumé	v
الملخص.....	vi
Summary.....	vi
Liste des abréviations	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux	xi
Sommaire.....	xii
Introduction	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITER I. LES PROTEINES DU PLASMA SANGUIN

1. Généralités.....	3
2. Le fractionnement du plasma	4
3. Les constituants plasmatiques utilisés en thérapie	4
3.1. Albumine.....	4
3.1. 1. Caractéristiques biochimiques de l'albumine	5
3.1. 2. Synthèse et catabolisme de l'albumine	6
3.1. 3. Propriétés de l'albumine	7
3.1.4. Aspect pathologique.....	11
3.1.5. Applications thérapeutiques	13
3.2. Les immunoglobulines ou anticorps	14
3.2.1. Structure générale des immunoglobulines	14
3.2.2. Classes et sous-classes des immunoglobulines	18
3.2.3. Synthèse des anticorps	18
3.2.5. Aspect pathologique.....	21
3.2.6. Applications thérapeutiques des anticorps monoclonaux recombinants.....	23

CHAPITER II. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE SUE DES IONS METALLIQUES IMMOBILISES

1. Généralités.....	25
2. Chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisé.....	25
2.1. Historique.....	25
2.2 Principe de l'IMAC.....	26
2.3. Les éléments d'activité de l'IMAC	27
2.3.1. Type des ions métalliques	27
2.3.2. Les supports application de l'IMAC	27
2.3.3. Activation des supports	28

2.4. Base de développement d'un protocole IMAC	29
2.5. Régénération du système	29
2.6. Applications du système IMAC	30
2.6.1. Purification à grande échelle des protéines thérapeutiques.....	30
2.6.2. Quelques autres applications de l'IMAC.....	30

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPTER III. MATERIEL ET METHODES

1. Enquête clinique au niveau du CHU de Sétif	31
2. Matériel.....	32
2.1. Matériel Biologique	32
2.2. Réactifs chimiques	32
2.2.1. Polymère utilisé.....	32
2.2.2. Produits chimiques	32
2.3. Instrumentation	33
3. METHODES	33
3.1. Préparation de l'échantillon	33
3.1.1. Préparation du plasma humain	33
3.1.2. Préparation de BSA et IgG.....	34
3.2. Préparation de la phase stationnaire.....	34
3.3. Chromatographie.....	34
3.4. Phase mobile et les modifications portées sur la colonne.....	35
3.4.1. Effet de la concentration de Tris-HCl sur la désorption des protéines plasmatiques	35
3.4.2. Effet de concentration de l'échantillon	35
3.4.3. Effet du pH sur la désorption des protéines plasmatiques	35
3.4.4. Effet du Tris-HCl avec le NaCl sur la désorption des protéines plasmatiques	35
3.4.5. Effet du Tris-HCl avec de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques	36
3.4.6. Effet du complexe (Tris-HCl, NaCl et l'imidazole) sur la désorption de BSA	36
3.4.7. Effet de l'EDTA avec le complexe sur la désorption de BSA	37
3.4.8. Effet du MOPS avec le complexe sur la désorption de BSA et l'IgG	37
3.4.9. Effet du tampon (complexe-MOPS) sur la désorption des protéines plasmatiques	38
3.4.10. Effet des produits sur la résine	38
3.4.11. Effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA	38
3.4.12. Effet du tampon phosphate avec le NaCl sur la désorption de BSA.....	38
3.4.13. Effet du tampon phosphate avec de l'imidazole sur la désorption de BSA et l'IgG	39
3.4.14. Effet du tampon d'élution (Tampon phosphate-imidazole) sur la désorption des protéines plasmatiques	39
3.5. Collection des fractions.....	40
3.6. Régénération de la résine	40
3.7. Dialyse	40
3.8. Dosage des protéines.....	41

3.9. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS	41
3.9.1. Préparation des solutions.....	41
3.9.2. Protocole expérimental.....	42

Chapitre IV. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Tampon Tris	43
1.1. Effet de la concentration du Tris-HCl sur la désorption des protéines plasmatiques	43
1.2. Effet de la concentration de l'échantillon	45
1.3. Effet du pH sur la désorption des protéines plasmatique.....	45
1.4. Effet du Tris-HCl avec du NaCl sur la désorption des protéines plasm-atiques	46
1.4.1. Variation du Tris-HCl et fixation du NaCl	46
1.4.2. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl	47
1.5. Effet de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques	48
1.5.1. Variation du Tris-HCl avec fixation de l'imidazole	48
1.5.2. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl	49
1.6. Effet du complexe (Tris-HCl, NaCl, imidazole) sur la désorption de BSA	50
1.6.1. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl et de l'imidazole	50
1.6.2. Variation du Tris-HCl avec fixation du NaCl et de l'imidazole	51
1.6.3. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl et du NaCl	53
1.7. Effet de l'EDTA sur la désorption de BSA	54
1.8. Effet du MOPS avec le complexe	55
1.8.1. Injection de BSA (5 mg/ml et 2mg/ml).....	55
1.8.2. Injection d'IgG (2 mg/ml).....	56
1.8.3. Injection du mélange (BSA-IgG)	57
1.9. Effet des produits sur la résine	58
1.10. Effet du tampon (complexe-MOPS) sur la désorption des protéines plasmatiques.....	59
2. Tampon phosphate.....	62
2.1. Effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA.....	62
2.2. Effet du NaCl avec le tampon phosphate sur la désorption de BSA	63
2.3. Effet de l'imidazole avec le tampon phosphate	64
2.3.1. Injection BSA (2 mg/ml).....	64
2.3.2. Injection d'IgG (2 mg/ml).....	65
2.3.3. Injection du mélange (BSA-IgG)	66
2.4. Effet de tampon d'élution (Tampon phosphate-imidazole) à la désorp-tion des protéines plasmatiques.....	67
2.4.1. Influence du NaCl	69
2.4.2. Influence du MOPS	71
Discussion générale	73
References bibliographies.....	77

Introduction

Depuis une vingtaine d'années, le marché des médicaments connaît une évolution fondamentale. Dans les années 80, seuls 2 % des médicaments étaient issus des biotechnologies, ce chiffre s'élevait à 30 % en 2003 et plus de la moitié des médicaments en développement sont des protéines thérapeutiques en 2011. Parmi ces molécules, la première utilisée à des fins thérapeutiques était l'insuline, rejointe aujourd'hui par de nombreuses protéines ciblant majoritairement le cancer et l'inflammation.

Les protéines sont présentes dans les fluides biologiques, les membranes, les tissus et les muscles. Cependant, le plasma a été décrit comme étant le plus représentatif de l'ensemble des protéines présentes dans le corps en tant que milieu d'échange, entre les organes, de nutriments, de métabolites et d'hormones. Le plasma est pour ces raisons, le liquide le plus étudié pour identifier les protéines, les quantifier, ou encore mettre au point des méthodes analytiques. Il est collecté en très grandes quantités pour le fractionnement et la préparation des protéines thérapeutiques.

Le fractionnement du plasma humain joue un rôle essentiel dans l'isolement d'une grande diversité de produits biologiques (albumine, immunoglobulines, facteurs de coagulation, inhibiteurs de protéases, etc.) indispensables en thérapeutique humaine. Au cours de ces dernières années, des efforts importants de recherche et de développement ont permis la mise au point de procédés industriels de séparation chromatographique conduisant à l'obtention d'une gamme de dérivés plasmatiques de haute pureté. En effet, des traitements qui étaient considérés comme impossibles il y a quelques années, sont devenus possibles aujourd'hui grâce aux anticorps monoclonaux recombinants.

En Algérie, les technologies de fractionnement sont inexistantes et, par conséquent, l'approvisionnement en produits plasmatiques demeure problématique car en effet, il y'a une dépendance totale vis à vis de l'étranger.

Le système de la chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (IMAC) est employé dans le secteur biomédical pour la purification de diverses macromolécules spécifiques telles que des anticorps, des messagers cellulaires (Interférons) ou toutes autres biomolécules d'intérêts telles que les protéines et les enzymes. Les avantages de l'IMAC résident dans la stabilité d'IMAC-ligand à haute valeur protéique, les conditions d'élution non-dénaturantes, la régénération simple, la sélectivité et le coût bas à une grande échelle pour des applications industrielles. À ce jour, la chromatographie reste la méthode la

plus souvent utilisée pour la purification des protéines, car elle permet des séparations rapides, efficaces et reproductibles.

L'objectif de cette étude est la mise au point de procédés de purification des protéines plasmatiques par un polymère fonctionnalisé [N,N-bis(salicylidenepropylene-triamine)-aminomethyl polystyrène], afin d'exploiter des protéines thérapeutiques spécifiques dans le domaine industriel qui ne seront pas onéreux, faciles à fabriquer et qui servent à obtenir des médicaments efficaces et peu coûteux pour le malade.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITER I

LES PROTÉINES DU PLASMA

SANGUIN

1. Généralités

Le sang est un moyen de transport et d'échange de nombreuses substances (nutriments, métabolites, hormones...) vers les cellules et dans tous les organes. En terme de volume, 45 % du sang est constitué de 99 % de globules rouges, 0,2 % de globules blancs et de 0,6 à 1 % de plaquettes. Les 55 % restants représentent la partie liquide du sang, le plasma sanguin. Ce dernier est constitué de 90 % d'eau et de 10 % de solutés tels que des substances nutritives, des hormones ainsi que des déchets métaboliques (Schaller *et al.*, 2008).

Le plasma est extrêmement riche en protéines si bien qu'il constitue le milieu le plus étudié pour leurs analyses. La protéine la plus abondante dans le plasma est l'albumine qui joue un rôle essentiel dans le transport. Les protéines de coagulation (fibrinogène) et les immunoglobulines qui protègent l'organisme vis-à-vis des agressions externes, sont également présentes en fortes concentrations (Wu et Tsai, 2008). En outre, le plasma contient des protéines messagères pour réguler le métabolisme. D'autres protéines peuvent être anormalement présentes dans le plasma (Branden et Tooze, 1999).

Plus de 300 protéines ont déjà été répertoriées comme protéines du plasma et elles sont représentées sur une très large gamme dynamique de concentrations (Wu et Tsai, 2008). L'albumine représente à elle seule plus de la moitié de la totalité des protéines du plasma et les 10 protéines majoritaires correspondant à 90 % de la totalité des protéines du plasma (**Fig. 1**). Il s'agit par exemple des immunoglobulines, de la transferrine, de l'haptoglobuline, des lipoprotéines, etc. Si on prend en compte toutes les protéines majoritaires et moyennement majoritaires, il apparaît au final que 22 protéines correspondent à 99 % de la masse totale des protéines du plasma (Anderson et Anderson, 2002; Issaq *et al.*, 2007).

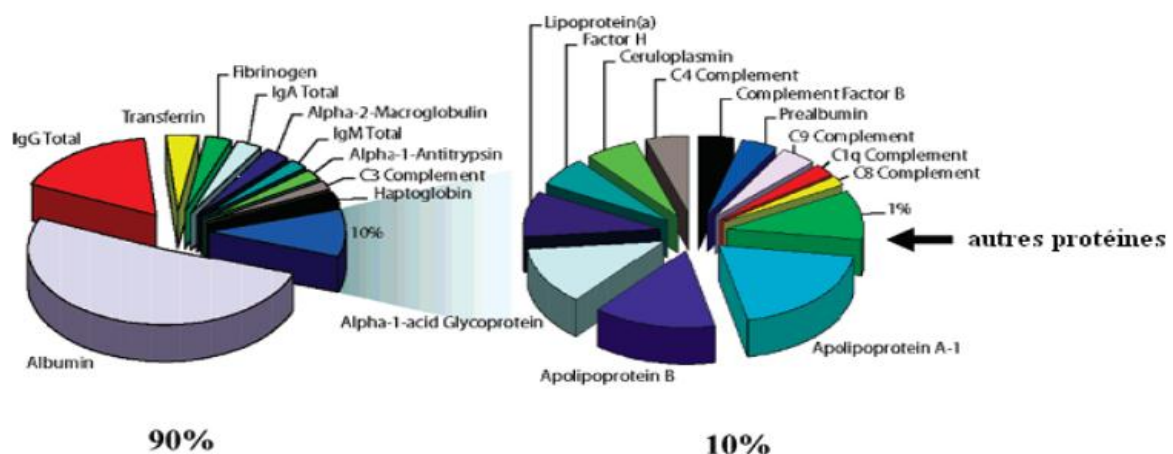


Fig. 1. Représentation de la gamme dynamique de concentrations des protéines du plasma humain (Issaq *et al.*, 2007).

2. Le fractionnement du plasma

La difficulté de transporter de grandes quantités de sang à apparu pendant la guerre. C'est ce qui a motivé les recherches pour développer le fractionnement des produits sanguins. En 1940, Edwin Cohn met au point le fractionnement du plasma par addition successive d'éthanol, en modifiant à chaque étape certaines conditions (concentration de sels, température, pH). Il prépare ainsi plusieurs fractions de plasma: la fraction I contenant principalement le fibrinogène, les fractions II et III renfermant les immunoglobulines, et la fraction IV constituée d'albumine. Ensuite, les propriétés osmotiques de l'albumine ont permis à Isodor Ravdin de soigner de nombreuses victimes de Pearl Harbor en décembre 1941 (Langman et Cohn, 1993; Giangrande, 2000).

Le développement des produits sanguins stables a aussi mené à l'amélioration des conditions de vie des hémophiles, notamment dès 1961, quand les premiers concentrés de facteurs anti-hémophiliques dérivés du plasma (facteurs de coagulation VIII et IX) ont été préparés (Langman et Cohn, 1993). En 1964, le problème de disponibilité de tels produits a été en partie résolu grâce à Judith Pool qui a démontré que la fraction restant insoluble après décongélation à 4°C de plasma congelé contenait du facteur VIII en grande quantité (Judith *et al.*, 1985). Au début des années 1970, il était possible de fabriquer des anticorps monoclonaux (Giangrande, 2000).

3. Les constituants plasmatiques utilisés en thérapie

A l'exception de l'eau, les protéines constituent la majeure partie du plasma sanguin. En effet, ce dernier contient plus d'une centaine de protéines qui peuvent être classées en trois principales catégories: l'albumine, les globulines et les fibrinogènes. Le plasma est la principale source de préparation de divers produits thérapeutiques tels que l'albumine et les immunoglobulines G. Leur fractionnement par différents procédés constitue une des premières étapes de leur préparation avant leur arrivée au chevet du malade (Quinlan *et al.*, 2005).

3.1. Albumine

L'albumine humaine constituant la partie majeure des protéines du plasma sanguin. La valeur physiologique d'albumine sérique se situe entre 35 et 50 g/l, ce qui correspond à environ 60 % des protéines plasmatiques. La valeur sérique d'albumine est légèrement

inférieure chez la femme que chez l'homme, et diminue modérément avec l'âge (Kang *et al.*, 1999).

3.1. 1. Caractéristiques biochimiques de l'albumine

L'albumine est constituée d'un groupe de protéines simples formées de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote et d'un petit pourcentage de soufre. C'est une holoprotéine monocaténaire de poids moléculaire 66 kDa et qui comporte 585 acides aminés. Son encombrement stérique important lui permet de diffuser à travers les membranes capillaires (Quinlan *et al.*, 2005). Sa structure primaire est repliée en une structure tridimensionnelle compacte de forme ovoïde, avec 35 résidus cystéines formant pour la plupart des ponts disulfures (17 au total). Sa structure tertiaire est un enchainement polypeptidique de neuf boucles regroupées en trois domaines homologues (I–III), chacun contenant deux sous-domaines (A et B) composés respectivement de quatre et six hélices alpha (**Fig. 2**) (Sugio *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004). L'albumine est caractérisée par un point isoélectrique bas (4.8) qui lui confère une migration anodique rapide lors d'une électrophorèse des protéines sériques en tampon alcalin (Sugio *et al.*, 1999).

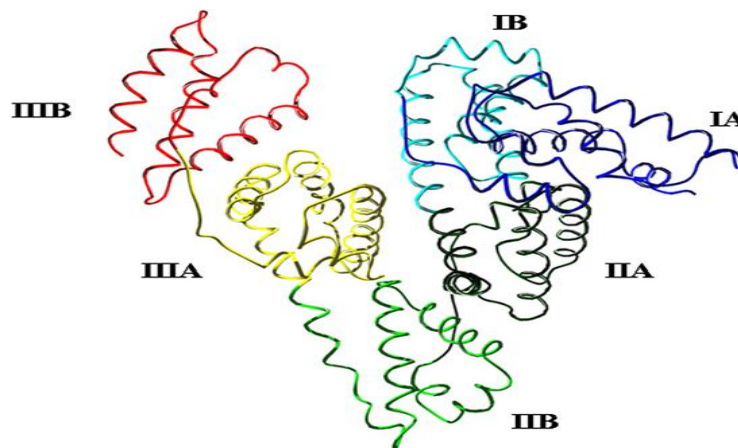


Fig. 2. La structure tridimensionnelle de HSA avec les sous-domaines en différents rendus couleurs, domaine IA en bleu, domaine IB en cyan, domaine IIA, en vert foncé, domaine IIB en vert claire, domaine IIIA en jaune, domaine IIIB en rouge (Sugio *et al.*, 1999).

L'albumine est riche en certains acides aminés: Glu (10 % des AA), Asp, Val, Leu, Lys et Arg (**Fig. 3**), et donc constitue une réserve mobile d'acides aminés (Guex et Peitsch, 1997). Elle ne contient pas d'asparagine, site habituel de glycosylation enzymatique des protéines du plasma, mais peut subir une faible glycosylation non enzymatique sur d'autres groupements, en particulier celui de la lysine 525 (Fasano *et al.*, 2005). D'après Roche et ses collaborateurs (2008), les sites I et II situés dans différents domaines (**Fig. 3**) sont impliqués

dans la fixation de multiples substances physiologiques (acides gras, bilirubine, métaux, etc.) et pharmacologiques (aspirine, ibuprofène, furosémide et de très nombreux médicaments circulants sous forme ionisée).

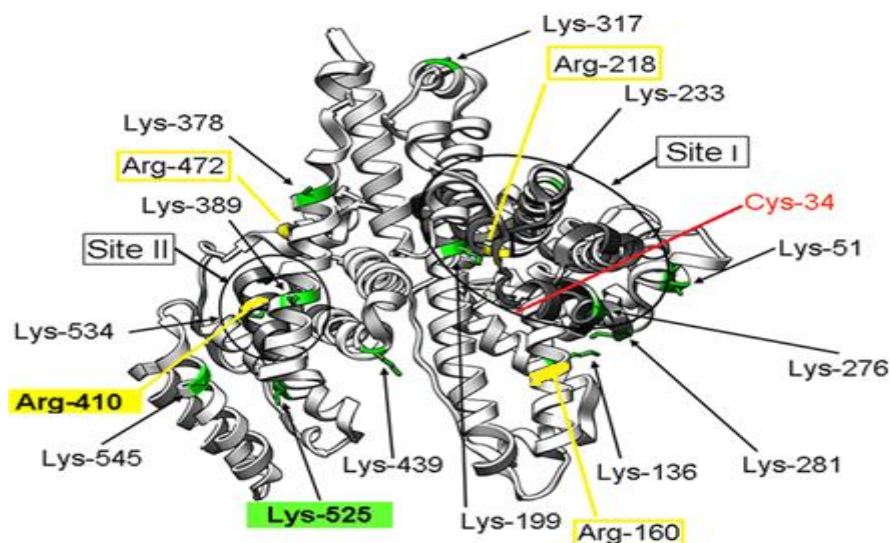


Fig. 3. La structure tridimensionnelle de HSA par l'apparition des résidus de cystéine-34, Lysine et l'arginine. Les sites I et II situés dans différents domaines (Rondeau et Bourdon, 2011).

En dehors de ces actions dépendantes de son hydrophobicité et de ses différents sites de fixation, l'albumine contient dans sa forme dite réduite, 17 ponts disulfures et un groupement thiol (SH) au niveau de sa cystéine-34 (Cys-34) qui lui confère 70 à 80 % de son activité thiol plasmatique (**Fig. 3**). Le groupement thiol de la Cys-34 permet la capture des espèces radicalaires de l'oxygène (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle) et du nitrogène (monoxyde d'azote et peroxynitrite) (Guex et Peitsch, 1997; Rondeau et Bourdon, 2011). Physiologiquement, l'albumine existe avant tout dans sa forme réduite, c'est-à-dire avec son groupement thiol libre (SH), connue également sous le nom de mercaptoalbumine (Oetl et Stauber, 2007).

3.1. 2. Synthèse et catabolisme de l'albumine

Dans les conditions physiologiques, l'albumine est synthétisée de façon constante et régulière uniquement au niveau des hépatocytes (10-15 g/j), elle représente environ 10 % de la synthèse protéique hépatique totale. Son espace distributeur est représenté par l'espace plasmatique (30 à 40 % de l'albumine synthétisée) et l'espace extravasculaire. Moins de 2 g sont stockés au niveau hépatique, la majorité se situant dans l'espace vasculaire. Le reste du pool se trouve au niveau des tissus tels que les muscles et la peau (Rondeau et Bourdon, 2011). L'albumine quitte le plasma à un rythme de 5 g/h et retourne dans le compartiment

vasculaire via le système lymphatique (Horowitz et Tai, 2007). Sa synthèse est régulée essentiellement au niveau de la transcription grâce à des protéines régulatrices au niveau de son promoteur. De nombreux facteurs, parmi lesquels sont l'insuline et les glucocorticoïdes, interviennent dans cette régulation (Oetl et Stauber, 2007). Néanmoins, le taux plasmatique d'albumine et la pression oncotique sont les éléments majeurs de la régulation de son expression (Horowitz et Tai, 2007).

3.1. 3. Propriétés de l'albumine

a. Propriétés de transporteur

L'albumine possède la capacité de se lier avec de nombreux composés endogènes ou exogènes tels que les acides gras libres, les ions métalliques, de nombreux médicaments et leurs métabolites jouant ainsi un rôle clé dans la pharmacologie et la détoxification (Rondeau et Bourdon, 2011). Il existe plusieurs sites de fixation reconnus. Les sites I et II situés dans différents domaines (**Fig. 3**) sont impliqués dans la fixation de multiples substances. Le site I lie de nombreux composés exogènes et endogènes comme la bilirubine, les acides gras polyinsaturés (**Fig. 4**) et les porphyrines (Roche *et al.*, 2008; Elsadek et Kratz, 2012). Le site II est plus petit et moins conforme (**Fig. 3**). Il existe également d'autres sites de fixation non conformes aux sites I et II. Ainsi, la Cys-34 permet la fixation de substances exogènes comme la cisplatine, la N-acétylcystéine et la D-pénicillamine (Rondeau et Bourdon, 2011). Le monoxyde d'azote (NO) est également présent dans le plasma sous la forme de groupements liés à l'albumine: la S-nitroso-albumine qui est partiellement responsable de l'activité du NO, bien que cela semble remis en cause dans des conditions pathologiques (Wang *et al.*, 2004).

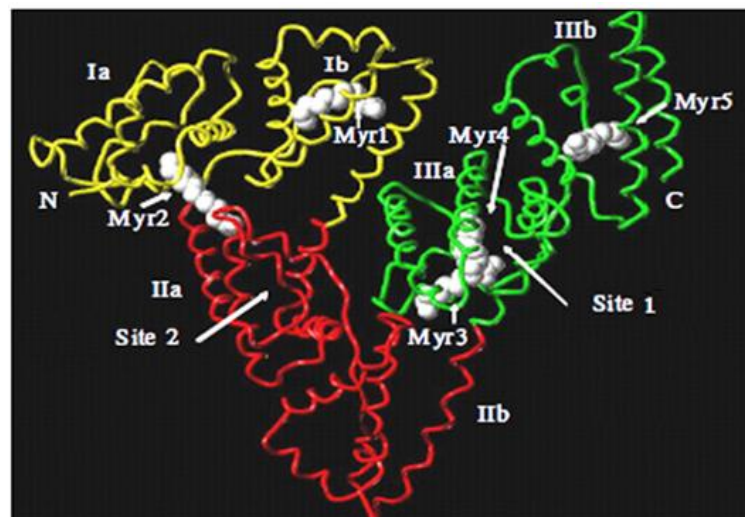


Fig.4. la structure d'albumine humaine complexée avec cinq molécules de l'acide myristique (Elsadek et Kratz, 2012).

b. Propriétés antioxydantes

Il existe un équilibre permanent entre une production radicalaire faible ou limitée et des propriétés antioxydantes assurées en partie par les protéines captrices de faible réactivité permettant l'équilibre redox (Block *et al.*, 2002). Quand cet équilibre est rompu, soit par une majoration accrue des espèces radicalaires, soit par une baisse de l'activité antioxydante, un stress oxydant s'installe (Candiano *et al.*, 2009). Ce stress oxydant provoque de nombreux dommages cellulaires (ciblant principalement les lipides, protéines et acides nucléiques), puis tissulaires. Ce mécanisme est observé dans de nombreuses circonstances pathologiques comme les maladies dégénératives, le cancer, le vieillissement, les maladies auto-immunes, le diabète, l'athérosclérose, l'ischémie-réperfusion et les états septiques (Hussain *et al.*, 2003; Klaunig et Kamendulis, 2004; Hopps *et al.*, 2010). L'albumine participe largement au maintien de cet équilibre redox endogène, et ce rôle pourrait lui donner une place particulière dans les conditions où l'équilibre redox est rompu (Wang *et al.*, 2004; Roche *et al.*, 2008).

❖ Fixation des espèces radicalaires

Cette propriété est principalement assurée par le groupement thiol situé sur le résidu cystéine en position 34 et représente plus de 80 % de l'activité thiol plasmatique (Carballal *et al.*, 2003). Les espèces radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite oxydent la Cys-34, produisant un acide sulfénique (Alb-SOH), la modification de 34Cys à alb-SO₃H (**Fig.5**) est la principale cause de modification de structure à un gonflement et déroulement de molécule de SAH (Carballal *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004, Torres *et al.*, 2012). Ces dernières appartiennent au cycle redox de l'albumine, permettant de restaurer sa capacité antioxydante (Kim *et al.*, 2000). Quinlan et ses collaborateurs (1998) ont montré qu'une administration d'albumine chez des patients septiques permet une majoration significative du taux de thiols plasmatiques. Plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que la supplémentation en albumine majore la protection antioxydante thiol-dépendante avec une diminution significative des biomarqueurs du stress oxydant (Quinlan *et al.*, 2004). L'albumine peut jouer un rôle antioxydant *in vivo* par sa capacité de fixer (site I) et de transporter des substances comme la bilirubine qui possèdent des capacités antioxydantes propres (Candiano *et al.*, 2009; Turell *et al.*, 2009).

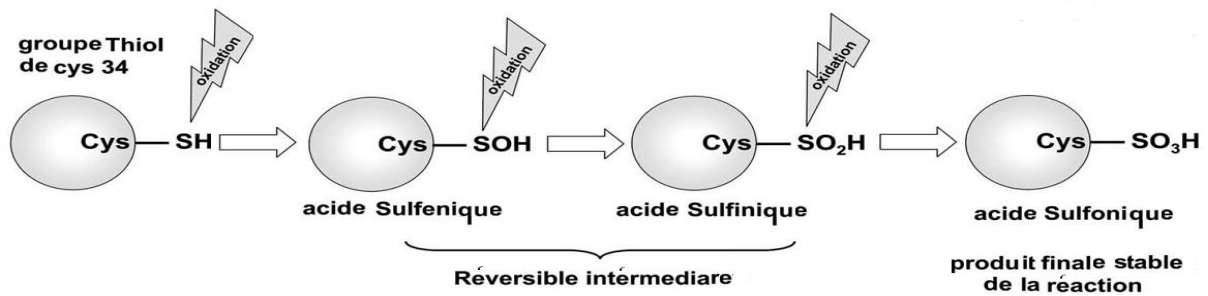


Fig.5. Les produits issus de l'oxydation de Cys-34 de l'albumine. Les deux résidus d'acide soit sulfénique et sulfinique, sont réversibles intermédiaires tandis que le dérivé d'acide sulfonique est le point final stable de la réaction (Candiano *et al.*, 2009).

❖ Fixation des ions métalliques

De nombreux métaux de faible masse moléculaire sont directement des puissants oxydants et ont la capacité de catalyser la formation d'espèces radicalaires agressives et délétères. Sur sa partie N-terminale (N-Asp-Ala-His-Lys), l'albumine possède une forte affinité pour les métaux Cu, Fe, Ni, Zn et Co et la fixation de ces derniers sur l'albumine permet d'en limiter les effets délétères (Wu et Tsai, 2008). Les principaux métaux impliqués dans ces réactions d'oxydation sont le fer et le cuivre (Bal *et al.*, 1998). Au cours du choc septique, il existe une oxydation des catécholamines endogènes et exogènes en dérivés de type adrénochrome qui non seulement font perdre à ces dernières leur action vasoactive mais les rendent cardiotoxiques (Roberts *et al.*, 2003). Ce mécanisme est sous la dépendance du cuivre libre libéré par la céruloplasmine au cours de l'acidose et l'ischémie tissulaire. L'albumine bloque l'oxydation de l'adrénaline en fixant le cuivre libre et limite ainsi la formation des dérivés cardiotoxiques (Bal *et al.*, 1998; Sokołowska *et al.*, 2009).

c. Propriétés anti-inflammatoires

L'équilibre redox intervient dans la régulation de la réponse inflammatoire (Poole *et al.*, 2004). Dans un modèle expérimental de choc hémorragique ressuscité, l'albumine hyperoncotique à 25 % permet de contrôler l'infiltration des neutrophiles dans le lavage bronchopulmonaire et de limiter la survenue des lésions pulmonaires (Powers *et al.*, 2005). Cette action démontre à la fois l'effet antioxydant de l'albumine par la présence de son groupement thiol et l'effet anti-inflammatoire par son action sur l'activité du facteur nucléaire NF-κB (Cantin *et al.*, 2007). L'albumine influence de ce fait la transcription de gènes dits pro-inflammatoires en modulant l'expression du facteur NF-κB (Alam *et al.*, 2004; Cantin *et al.*, 2007).

d. Propriétés pro-oxydantes

L'albumine peut engendrer des effets pro-oxydants, notamment par la fixation d'ions métallique comme le fer et le cuivre. Récemment, il a été observé que le cuivre lié à l'albumine devient pro-oxydant après fixation et oxydation de la Cys-34 (Gryzunov *et al.*, 2003). L'administration de l'albumine a été impliquée dans la diminution de la protection antioxydante dépendante de l'oxydation propre du fer chez des patients en détresse respiratoire aigüe (Soejima *et al.*, 2002).

e. Propriétés oncotiques et d'expansion volémique

Entre 60 et 80 % de la pression oncotique plasmatique dépend de la concentration d'albumine plasmatique influant sur les mouvements liquidiens entre les différents secteurs. La charge électrique globale résultant de la présence d'acides aminés chargés à la surface de la molécule lui assure un caractère hydrophile très élevée: un gramme d'albumine retient environ 18 ml d'eau (Soni et Margaron, 2004). Cela explique l'importance de l'expansion volémique prolongée (six à huit heures) obtenue après l'administration d'albumine (Finfer *et al.*, 2004). Pendant des années, de nombreuses méta-analyses ont alimenté les conflits entre risque et bénéfice de l'albumine chez le patient septique, comme en 1998 lorsque le groupe Cochrane concluait une surmortalité dans le groupe albumine (Cochrane *et al.*, 1998). Il a fallu attendre les résultats de l'étude australienne SAFE incluant 7000 patients pour démontrer l'absence de surmortalité liée à l'utilisation de l'albumine pour le remplissage vasculaire chez des patients en réanimation par rapport à l'utilisation de sérum salé (Wilkes *et al.*, 2001; Finfer *et al.*, 2004). Néanmoins, l'utilisation de l'albumine comme soluté d'expansion volémique nécessite actuellement la précision au mieux des populations en réanimation pour lesquelles elle apporte un bénéfice (Boldt *et al.*, 2007; Dellinger *et al.*, 2008).

f. Propriétés endothéliales

Les propriétés spécifiques antioxydantes et anti-inflammatoires de l'albumine ont été impliquées dans son effet bénéfique sur la dysfonction endothéliale. Dans un travail expérimental endotoxinique, les auteurs ont montré un effet bénéfique de l'albumine sur la dysfonction endothéliale. Cet effet était associé à une modulation de l'expression de l'activité du NF-kB et de l'expression de la NO synthase inductible (iNOS) et par conséquent à une diminution de la production de peroxy-nitrite (Lum *et al.*, 1991; Ramirez-Vick et Vargas, 1993; Mezzani *et al.*, 2007).

g. Propriétés sur l'hémostase

L'albumine n'a aucun effet spécifique sur l'hémostase, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, en dehors de ceux liés à l'hémodilution (Mulvihill *et al.*, 1990). L'albumine peut être considérée comme sans conséquence sur l'hémostase, mais au-delà de 50 % d'hémodilution, les effets sur l'hémostase deviennent notables (Uriz *et al.*, 2000). Les données récentes de la littérature tendent à montrer que tous les autres colloïdes sont susceptibles d'entraîner des effets plus ou moins marqués sur l'hémostase dès un niveau d'hémodilution dépassant 20 % avec une diminution significative de la concentration du facteur Willebrand pouvant induire un syndrome de Willebrand acquis. De ce fait, seuls les cristalloïdes et l'albumine peuvent être utilisés chez les patients ayant une maladie de Willebrand ou une hémophilie (Mulvihill *et al.*, 1990; Uriz *et al.*, 2000).

h. Propriétés sur la fonction rénale

L'albumine est un élément majeur dans la prise en charge de la dysfonction rénale au cours du syndrome hépatorénal, les données sont cependant bien différentes dans la dysfonction rénale du patient en septicité (Christiansen *et al.*, 2010). Une étude récente a comparé le remplissage vasculaire avec des solutions hyperoncotiques dont l'albumine versus des solutions iso-oncotiques chez des patients en septicité. Les résultats montrent un effet délétère de l'utilisation des solutés de remplissage vasculaire hyperoncotiques comme l'albumine à 20 % sur la fonction rénale, avec une surmortalité (Willinger *et al.*, 1995). Ces données récentes imposent une prescription raisonnée et réfléchie de l'albumine hyperoncotique comme soluté de remplissage vasculaire en présence d'une dysfonction rénale chez le patient septique. Ces résultats soulignent parallèlement l'intérêt de définir les populations en réanimation pouvant bénéficier au mieux de l'albumine comme soluté volémique (Schortgen *et al.*, 2008; Christiansen *et al.*, 2010; Donadio *et al.*, 2012).

3.1.4. Aspect pathologique

L'albumine peut présenter des variations physiologiques ou pathologiques, quantitatives ou qualitatives, regroupées sous le terme de dysalbuminémie.

a. Hyper-albuminémies

Sous le terme de variations quantitatives sont regroupées certaines hyperalbuminémies, d'une prévalence rare de 1/1000, caractérisées par une concentration supérieure à 54 g/l et qui ne sont pas associées à une pathologie mais qui sont dues généralement à une hemoconcentration, ou suite à des pertes liquidiennes ou encore à un diabète insipide

(Feldman *et al.*, 2005). Les perfusions d'albumine dans certaines indications (hypoalbuminémie sévère, prise en charge des grands brûlés, hypovolémie...) peuvent également entraîner une augmentation significative de sa concentration (Bach-Nogohou *et al.*, 2005).

b. Hhypo-albuminémies

La présence d'une hypo-albuminémie (taux d'albumine < 34 g/l) chez plus de 21 % des patients hospitalisés. Dans les états infectieux sévères, il existe de façon quasi constante une hypo-albuminémie dont les mécanismes d'apparition sont multiples et complexes. Compte tenu de la demi-vie de l'albumine, la diminution de sa synthèse ne permet pas à elle seule d'expliquer la baisse rapide et majeure de sa concentration dans les premières heures des états septiques (Ballmer, 2001; Feldman *et al.*, 2005). De nombreuses publications rapportent soit une dégradation protéolytique de l'albumine par différentes enzymes, soit une majoration importante de l'échappement transcapillaire sous la dépendance des médiateurs de l'inflammation (Ballmer, 2001; Holland *et al.*, 2001). En dehors de cette baisse dite quantitative de l'albumine démontrée précédemment, il existe des données plus récentes sur des modifications structurelles de la protéine circulante qui la rendent moins effective sur le plan antioxydant, qualifiant cette hypo-albuminémie de qualitative (Ballmer, 2001). Des modifications de sa structure tertiaire pourraient lui donner un caractère non plus antioxydant, mais pro-oxydant, perdant même ces capacités de liaisons avec des ligands naturels plasmatiques (Feldman *et al.*, 2005). Enfin, des phénomènes de glycosylation pourraient induire des modifications structurelles de la molécule et lui faire perdre également ses caractéristiques antioxydantes (Musante *et al.*, 2006). Ce phénomène a été particulièrement observé chez le patient diabétique où l'on observe un attachement non enzymatique du glucose à l'albumine (Faure *et al.*, 2008). La glycosylation de l'albumine diminue ses capacités antioxydantes vis-à-vis de certains métaux comme l'oxydation des lipoprotéines par le cuivre. Certains ligands naturels comme la bilirubine ont la capacité de protéger l'albumine de ces attaques radicalaires et pourraient ainsi limiter les modifications qualitatives liées à son oxydation ou à sa glycosylation (Sakata *et al.*, 2002).

Les hypo-albuminémies acquises sont fréquentes et peuvent résulter d'un défaut de synthèse (insuffisance hépatocellulaire des cirrhoses décompensées ou des carcinomes hépatocellulaires), d'une augmentation des pertes d'origine rénale (syndrome néphrotique), digestive (entéropathies exsudatives) ou cutanée (brûlures étendues, escarres) (Prinsen *et al.*, 2002). Elles peuvent également résulter de syndromes inflammatoires (maladies auto-

immunes, vascularites, maladies infectieuses, cancers) ou au cours des gammopathies monoclonales malignes telles que le myélome et la maladie de Waldenström (Tincani *et al.*, 2002).

Les hypo-albuminémies induites par une malnutrition résultent d'une carence d'apport protéique qualitatif ou quantitatif et peuvent aussi être liées à une malabsorption intestinale (maladies intestinales, insuffisance pancréatique exocrine), à un cancer (dysphagie), à une malnutrition (carence d'apport qualitatif et quantitatif) ou encore à une anorexie mentale (Mangialardi *et al.*, 2000; Prinsen *et al.*, 2002).

c. Analbuminémie

L'albuminémie est une autre forme d'anomalie quantitative exceptionnelle (1/1million) caractérisée par une absence ou une diminution majeure de la concentration plasmatique de l'albumine liée à des désordres métaboliques qui peuvent être extrêmement sévères durant la période fœtale ou la petite enfance. C'est une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive pour laquelle la consanguinité des parents a été établie (Bach-Nogohou *et al.*, 2005; Zemlin *et al.*, 2009).

3.1.5. Applications thérapeutiques

Les propriétés de l'albumine ont conduit à étudier sa place non plus comme soluté de remplissage vasculaire mais comme une véritable thérapeutique ou « médicament » des états infectieux. L'albumine inhibe la peroxydation des membranes lipidiques érythrocytaires (Soejima *et al.*, 1999). Dans un modèle expérimental de choc endotoxinique (libération massive de lipopolysaccharides), les auteurs ont mis en évidence une amélioration de la contractilité et de l'oxygénation tissulaire myocardique par l'administration exogène d'albumine (Crook, 2009). Les travaux de Paubel et ses collaborateurs (1999) ont largement démontré le rôle de l'albumine dans l'intégrité de la barrière endothéliale, lié à son interaction avec le glycocalyx. Lors du choc septique, il existe une diminution du taux plasmatique d'albumine avec une diminution parallèle de la concentration des thiols. Cette baisse de la concentration plasmatique des thiols est corrélée à une diminution du pouvoir antioxydant du plasma (Quinlan *et al.*, 1998). Dans des conditions marquées par une augmentation de la perméabilité vasculaire, l'administration exogène d'albumine s'associe à une augmentation de la concentration des thiols plasmatiques, avec une diminution parallèle de la concentration des carbonyles, marqueurs plasmatiques du stress oxydant (Moran *et al.*, 2001; Crook, 2009).

L'administration de solution d'albumine représente ainsi le remède le plus efficace et donne des effets plus rapides dans le traitement des diverses formes de chocs (post-

hémorragique, traumatique, péritonéal, brulures...) et représente un remède irremplaçable dans l'œdème cérébral, dans l'insuffisance hépatique aigue et dans les états de cirrhose ascitique et les néphroses (Crook, 2009; Arques, 2011). L'albumine est utilisée en thérapeutique sous forme de solutions iso-oncotiques à 4 % (concentration identique au plasma) ou sous forme concentrée à 20 % (Soni et Margaron, 2004). Le choix entre les différentes concentrations et présentations d'albumine sera en fonction de l'étiologie et du degré de l'hypovolémie, de l'état d'hydratation et de la natrémie du patient ainsi que de ses antécédents médicaux (Paubel *et al.*, 1999; Vincent *et al.*, 2003; Soni et Margaron, 2004).

3.2. Les immunoglobulines ou anticorps

Un anticorps ou immunoglobuline (Ig) est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes appelés antigènes tels que les bactéries et les virus (Saphire *et al.*, 2002). Les immunoglobulines sont circulantes dans le plasma mais aussi dans les liquides biologiques de l'organisme. Les anticorps sont des glycoprotéines exprimées à la surface des lymphocytes B. Il existe cinq classes d'immunoglobulines: IgA, IgD, IgE, IgG et IgM qui sont produites à des périodes différentes lors de la réponse immunitaire (Janeway *et al.*, 2003). La plupart des anticorps présents dans le sang appartiennent à la classe des IgG et représentent 70 à 75 % des Ig présentes. Ces protéines représentent 20 % des protéines plasmatiques, avec une concentration comprise entre 12 et 15 g/l (Janeway *et al.*, 2003; Baty et Chames, 2006).

3.2.1. Structure générale des immunoglobulines

Les anticorps sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes lourdes et deux chaînes légères assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même que les deux chaînes légères (Traggiai *et al.*, 2004).

a. Chaînes lourdes

Les chaînes lourdes varient selon les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines: chaînes lourdes γ , α , μ , δ ou ϵ pour les IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE respectivement. Chaque chaîne lourde comporte une séquence d'environ 450 acides aminés (poids moléculaire 50 kDa). Elles sont reliées entre elles par une ou plusieurs liaisons covalentes (ponts disulfures) localisés au niveau des acides aminés 226 et 229 situés entre les domaines CH1 et CH2 dans la région charnière. Cette dernière est une zone flexible de la chaîne lourde située à mi-distance environ des extrémités de la chaîne lourde, elle est riche en résidus proline et

cystéine formant une région flexible dans les deux plans de l'espace (Martsev *et al.*, 1995; Saphire *et al.*, 2002). Cette zone charnière confère à la chaîne lourde une grande flexibilité, facilitant ainsi son interaction avec l'antigène. En raison de la mobilité de la région charnière, la molécule peut prendre la forme d'un Y (Saphire *et al.*, 2002; Janeway *et al.*, 2003).

b. Chaînes légères

Dans une molécule d'immunoglobuline donnée, les chaînes légères sont identiques, soit de type κ , soit de type λ . Ceci est dû au fait qu'un lymphocyte B donné produit soit des chaînes κ , soit des chaînes λ , mais pas les deux à la fois (Krapp *et al.*, 2003). Les chaînes légères sont composées d'environ 220 acides aminés (poids moléculaire 25 kDa). Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Environ les 2/3 des immunoglobulines ont deux chaînes légères κ et 1/3 ont deux chaînes légères λ (Abraham *et al.*, 2002).

c. Domaines

Outre les ponts disulfures qui unissent les chaînes lourdes entre elles et les chaînes légères aux chaînes lourdes, il existe des ponts disulfures sur chaque chaîne lourde et sur chaque chaîne légère. Ces ponts créent des régions d'environ 110 acides aminés appelées domaines (Krapp *et al.*, 2003). Chaque chaîne lourde présente 4 domaines: trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) et un domaine variable (VH), sauf les IgM qui en ont 5, chaque chaîne légère présente 2 domaines: VL, CL (**Fig. 6**). Les chaînes d'anticorps sont variables dans leur domaine amino-terminal (N-terminal) et presque identiques dans la région carboxy-terminal (Poul *et al.*, 1995). Une partie de la région constante des chaînes lourdes qui constitue la base du Y forme la région (Fc) qui détermine les propriétés biologiques des anticorps. Ainsi, Fc est la fonction effectrice de l'anticorps grâce à laquelle se fixent d'autres protéines (récepteurs) en présence d'antigènes pour induire la réponse immunitaire (Saphire *et al.*, 2002). Les régions variables de la chaîne légère et de la chaîne lourde (Fab) s'associent pour former le site de fixation de l'antigène. C'est l'hétérogénéité des régions variables qui fournit les bases structurales de l'ensemble des sites utilisés par l'animal pour développer une réponse immunitaire efficace (Krapp *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2005).

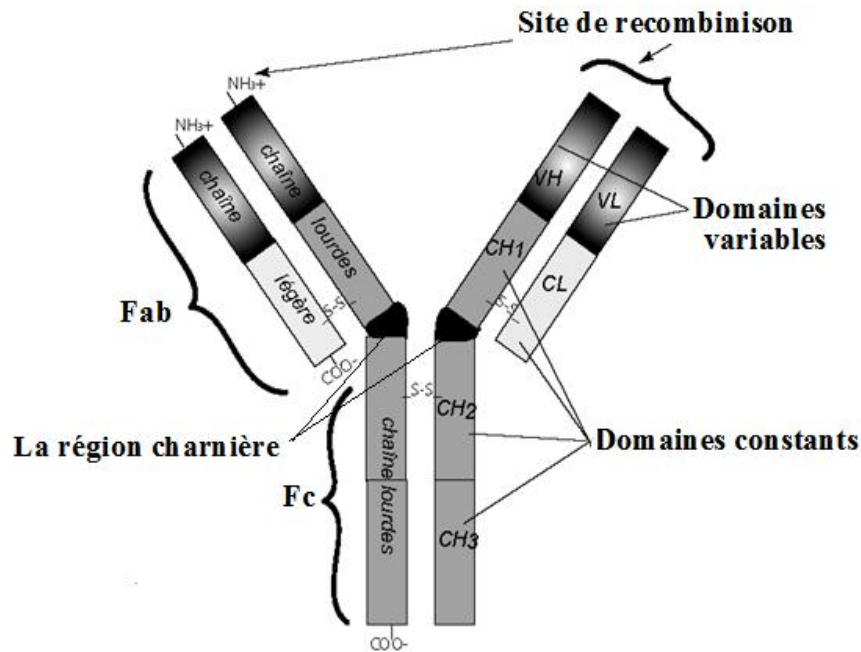


Fig. 6. Structure d'une molécule d'immunoglobuline. Structure polypeptidique des quatre chaînes: deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (Chothia et Jones, 1997).

L'hétérogénéité de séquence n'est pas disséminée au hasard dans les régions variables mais concentrée dans les régions entrant en contact direct avec l'antigène (épitope). Donc la variabilité la plus forte est trouvée dans trois régions de la chaîne légère et de la chaîne lourde dites régions hypervariables (Chothia et Jones, 1997). Ces régions forment le site réel de fixation de l'antigène et sont appelées régions déterminant la complémentarité (CDR) (**Fig.7**). Elles se caractérisent par une très grande variabilité en acides aminés d'un anticorps à l'autre (5 à 10 acides aminés par CDR). Ces régions constituant le site de combinaison antigénique représentent 5 % de la partie variable et sont adjacentes à des zones présentant moins de variabilité et constituant l'armature du segment variable (Morrison et Shin, 1995; Omidfar *et al.*, 2005).

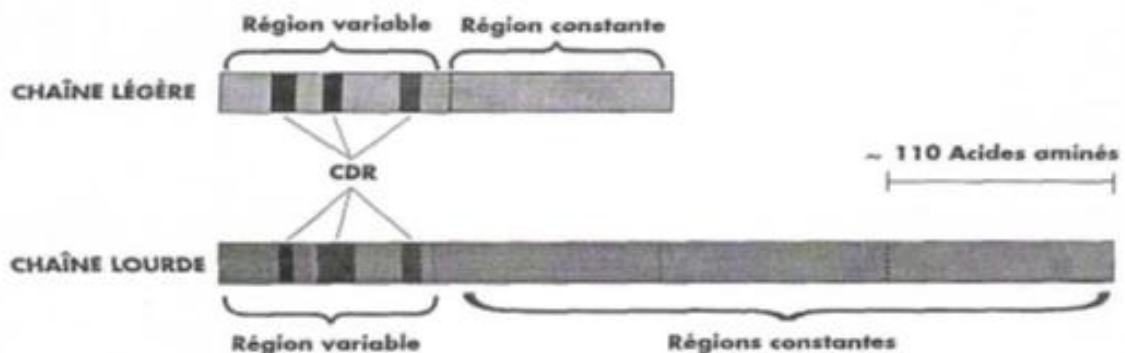


Fig.7. Présentation des régions hypervariables des anticorps (Morrison et Shin, 1995).

L'interaction entre l'antigène et les acides aminés des CDR des anticorps se fait par des liaisons non covalentes de type liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, interactions électrostatiques et hydrophobes (Morrison et Shin, 1995). Pour que les forces d'interactions soient efficaces, l'antigène et l'anticorps doivent non seulement pouvoir développer des interactions attractives entre eux, mais la forme du site de reconnaissance de l'anticorps doit aussi être adaptée à celle de l'antigène. Aussi, toute modification de la structure tridimensionnelle des molécules impliquées entraîne une baisse globale de l'énergie d'interaction (Muller *et al.*, 1998; Janeway *et al.*, 2003).

d. La glycosylation de l'anticorps

Toutes les molécules d'IgG possèdent un site de *N*-glycosylation situé sur l'asparagine 297 du domaine CH2 de la chaîne lourde (**Fig. 8**) et 20 % d'entre elles possèdent un site potentiel de *N*-glycosylation sur la région variable (Niwa *et al.*, 2005). Les oligosaccharides ne comptent que pour 2-3 % du poids moléculaire d'IgG, ils sont indispensables à l'expression des fonctions effectrices. L'analyse des différentes structures oligosaccharidiques rencontrées sur l'IgG humain, nous révèle la présence d'une structure biantennée de type complexe GlcNAc 2 Man 3 GlcNAc 2 présentant ou non des résidus galactose terminaux et fucose lié au noyau (**Fig. 8**), additionnée parfois d'acide sialique (Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004; Jefferis, 2009).

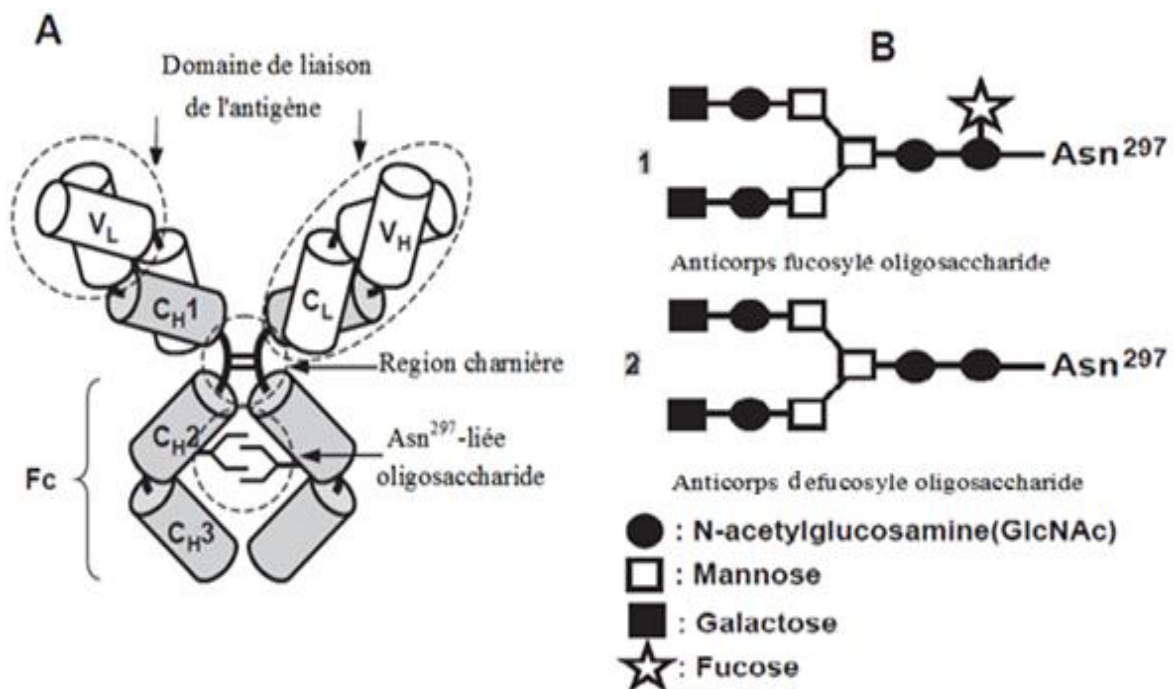


Fig. 8. (A) L'apparition de site de glycosylation dans la molécule d'IgG humaine. (B) La structure d'oligosaccharidique des IgG, 1: sous la forme d'anticorps fucosylé oligosaccharide, 2: sous la forme d'anticorps defucosylé oligosaccharide (Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004).

3.2.2. Classes et sous-classes des immunoglobulines

La nature des chaînes lourdes détermine la classe des immunoglobulines: IgG, IgA, IgM, IgD et IgE (**Tableau 1**). Au sein d'une même classe d'immunoglobulines, il peut exister des sous-classes correspondant à des variations structurales de la chaîne lourde, il existe 4 sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) caractérisées, respectivement, par les chaînes lourdes $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et $\gamma 4$ et 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) avec des chaînes lourdes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Saphire *et al.*, 2002). Les différences structurales entre ces sous-classes incluent le nombre et la position des ponts disulfure dans la région charnière entre les domaines VH-CH1 et CH2-CH3 et la position des ponts disulfure qui relient les chaînes lourdes et légères (Jefferis, 2009; Daley *et al.*, 2005).

Il est important de noter que chacune de ces sous-classes possède des fonctions effectrices qui lui sont propres. La reconnaissance de l'antigène se fait par une interaction directe entre le site de combinaison de l'anticorps et une très petite portion de l'antigène natif que l'on appelle épitope (Saphire *et al.*, 2002; Shinkawa *et al.*, 2003).

Tableau 1. Propriétés (poids moléculaires, localisation et rôles) des différentes immunoglobulines: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD (Janeway *et al.*, 2003).

	IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Chaîne lourdes	γ	α	μ	ϵ	δ
Sous-classes	IgG1, gG2, IgG3, IgG4	IgA1 IgA2	/	/	/
Poids moléculaires (KDa)	150	160/400	950	190	185
Localisation	Sang	Muqueuses	Lymphocyte B, Sang.	Basophiles Mastocytes	Lymphocytes B
Rôles	Neutralisation des toxines, bactéries et virus	Agglutination Neutralisation des bactéries, virus	Agglutination voie classique du complément	Allergies, neutralisation de parasite	Activation du lymphocyte B

3.2.3. Synthèse des anticorps

Dans les lymphocytes B immatures, les deux chaînes entrent dans le réticulum endoplasmique sous forme de polypeptides non repliés, qui sont ensuite modifiés et assemblés en une molécule complète dans sa conformation finale, prête à être exportée (Schlatter *et al.*, 2005). Plusieurs protéines résidentes du réticulum endoplasmique sont impliquées dans le repliement et l'assemblage des anticorps. Parmi elles on trouve la protéine chaperonne BiP (Protéine de liaison d'immunoglobuline) et PDI (protéine disulfure isomérase) qui ont été

largement étudiées et dont il a été montré qu'elles agissent de façon synergique sur le repliement et l'assemblage des protéines recombinantes, lors de leur production par les cellules eucaryotes (Hoogenboom et Winter, 1992; Vanhove *et al.*, 2001). BiP se fixe de façon non covalente aux domaines hydrophobes des polypeptides partiellement et assiste à leur repliement en inhibant l'agrégation intra- ou intermoléculaire tant que les protéines n'ont pas atteint leur conformation correcte (Hoogenboom et Winter, 1992).

PDI, en association avec BiP, favorise la formation de structures tridimensionnelles correctes en catalysant le réarrangement et la formation de ponts disulfure inter et intrachânes (Vanhove *et al.*, 2001). On considère généralement que le repliement des chaînes et leur assemblage, sont des processus simultanés puisque les sous-unités non repliées sont plus « compétentes » pour l'assemblage que les structures complètement repliées (Lee *et al.*, 1999). Les molécules d'anticorps qui sont assemblées de façon incomplète ou incorrecte restent fixées à BiP et sont potentiellement dirigées vers des voies de dégradation (Kaloff et Haas, 1995; Vanhove *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002).

3.2.4. Fonctions des anticorps

Les anticorps jouent un rôle fondamentale dans la défense de l'organisme contre les agents pathogènes extérieurs, elles détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Elles agissent principalement de trois manières (Hong *et al.*, 2008).

a. Neutralisation par fixation directe

La fonction neutralisante d'un anticorps consiste soit à piéger un ligand, par exemple une toxine ou le ligand spécifique d'un récepteur membranaire pour qu'il n'atteigne pas sa cible tels que les anti-TNF α (Facteur de nécrose tumorale) et anti-VEGF (Facteur croissance endothélium vasculaire), soit un antigène exposé à la surface cellulaire, par exemple à la surface d'une bactérie pathogène ou d'un virus, bloquant ainsi sa fixation sur des récepteurs cellulaires (Peipp *et al.*, 2008). Un anticorps peut aussi se lier à un récepteur membranaire afin de perturber la transduction du signal ou provoquer une internalisation conduisant à une réduction de la densité du récepteur à la surface cellulaire. En thérapeutique, cette fonction est impliquée dans l'efficacité clinique de la majorité des anticorps aujourd'hui commercialisés (Hong *et al.*, 2008; Schmiedel *et al.*, 2008).

b. Activation des protéines du complément par fixation de C1q

L'activation du complément (CDC) est un moyen par lequel les anticorps défendent les organismes contre la plupart des infections bactériennes. Les IgG activent le complément

en se fixant à C1q par une région du domaine CH2 (La présence de sucres sur l'Asparagine 297 est indispensable à la fixation au complément) (Vivanco *et al.*, 1999; Congy-Jolivet *et al.*, 2007). Le complément est constitué d'un groupe de protéines sériques impliquées dans l'inflammation, l'activation des cellules phagocytaires et la lyse cellulaire. Cette activation ne survient que lorsqu'il y a opsonisation des anticorps sur la surface cible (Friedlander *et al.*, 2008).

c. Opsonisation et phagocytose induite par une cellule effectrice du système immunitaire

Une troisième fonction protectrice des anticorps est de provoquer une cytotoxicité à médiation cellulaire (ADCC). L'ADCC est une réaction cytotoxique dans laquelle des cellules tueuses (natural killers, monocytes, macrophages et éosinophiles) porteuses de récepteurs FcγRI, II et III (CD64, CD32 et CD16 respectivement) reconnaissent les cellules cibles recouvertes d'anticorps spécifiques (Sapir *et al.*, 2005). Cette lyse est induite seulement si l'oligosaccharide greffé sur l'asparagine 297 de l'anticorps humain est correctement glycosylé (Wang et Weiner, 2008). Un grand nombre d'études ont montré qu'un anticorps non glycosylé aurait une affinité aux récepteurs FcγR très fortement diminuée (Shinkawa *et al.*, 2003; Wang et Weiner, 2008; Shibata-Koyama *et al.*, 2009). Par contre, la présence d'un résidu *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) intercalaire, catalysé par la *N*-acétylglucosaminyl-transférase III (GNTIII), augmenterait la fixation au récepteur FcγRIII et donc la lyse par ADCC (Jefferis, 2009).

Ces récepteurs présentent une meilleure affinité pour les IgG de type 1 et 3. Cela explique en partie pourquoi les anticorps chimériques ou humanisés destinés à l'immunothérapie sont principalement de type IgG1 (Anolik *et al.*, 2003; Sapir *et al.*, 2005). Il faut cependant souligner que le polymorphisme de ces récepteurs est très important pour l'ADCC. Par exemple, il a été démontré dans le cas du traitement du lymphome non Hodgkinien que l'efficacité du rituximab était supérieure pour des patients ayant le polymorphisme Val/Val à la position 158 du CD16 comparée à celle des patients ayant les polymorphismes de type Val/Phe ou Phe/ Phe (Wu *et al.*, 1997; Shields *et al.*, 2001). Ces différents modes d'action peuvent évidemment être cumulatifs. Cela a été parfaitement démontré *in vitro* pour le rituximab dont le mode d'action implique la CDC (Golay *et al.*, 2000) mais aussi l'ADCC (Shinkawa *et al.*, 2003) bien que l'activité thérapeutique *in vivo* semble essentiellement être due à l'activation de la CDC (Cragg et Glennie, 2004).

3.2.5. Aspect pathologique

a. Diminution des immunoglobulines

Les déficits congénitaux ou acquis de l'immunité humorale se traduisent toujours par une diminution plus ou moins marquée d'une, de deux ou de toutes les immunoglobulines. Ces déficits prédisposent à la survenue d'infections répétées d'origine virale ou bactérienne. Deux types d'anomalies des IgG ont été rapportés. Les hypo- γ -globulinémies sont dites globales lorsque la concentration de toutes les classes d'Ig est diminuée, et sélectives lorsque la diminution ne touche qu'une ou deux classes d'Ig (Rosen et Davis, 2005).

❖ Diminution globale des immunoglobulines

La diminution globale des immunoglobulines peut être congénitale ou acquise. Parmi les déficits congénitaux on peut citer: la maladie exceptionnelle d'agammaglobulinémie liée au sexe (maladie de Bruton) ainsi que l'hypogammaglobulinémie transitoire physiologique du nourrisson (Czernik *et al.*, 2008). Ce sont les déficits acquis qui sont de loin les plus fréquents et en particulier secondaires à une cause iatrogène, un effet secondaire d'une radiothérapie, chimiothérapie ou corticothérapie (au long cours), des immunosuppresseurs, une fuite protéique intestinale des entéropathies exsudatives et une hémopathie lymphoplasmocytaire (Wang et Weiner, 2008).

❖ Diminution sélective des immunoglobulines

Les déficits immunitaires B primitifs sont des anomalies caractérisées par un déficit immunitaire humoral le plus fréquent en classe d'IgA (1/700 sujets) chez l'enfant et en classe d'IgG3 chez l'adulte (Mouthon *et al.*, 2002). Le déficit sélectif en IgM peut être observé dans les maladies athéromateuses, après une splénectomie et dans certaines néoplasies évoluées (Quiroga *et al.*, 1995). Le déficit sélectif en IgG peut se rencontrer dans les néphroses (défaut de commutation des plasmocytes) et certaines néoplasies viscérales (Saphire *et al.*, 2002). Les déficits en IgG2 sont les mieux caractérisés (infections des voies aériennes supérieures à germes encapsulés). Le déficit en IgG4 est le plus souvent associé à un déficit en IgG2 (déficits combinés IgG2-IgG4). Tandis que le déficit sélectif en IgG1 est très rare (Rosen et Davis, 2005; Nisbet *et al.*, 2010).

b. Hyperimmunoglobulinémie

Selon la pathologie en cause, les différentes classes d'immunoglobulines sont plus ou moins affectées. Ainsi, pour être fiable, l'interprétation du profil immunitaire doit être associée au moins à un profil ciblé inflammatoire pour établir la présence éventuelle d'une inflammation (Katchourine et Pradalier, 1998; Lopeza *et al.*, 2009).

❖ Augmentation polyclonale d'une seule classe d'immunoglobuline

L'augmentation d'IgM seul, en cas de primo-infection virale, bactérienne ou parasitaire, l'état d'hyperstimulation antigénique (vaccination, asthme, environnement ...), augmentation secondaire à la prise de certains médicaments (AINS, Sectral...) et maladies auto-immunes (Saulsbury, 2003).

L'augmentation d'IgG seul, au cours des réponses secondaires aux infections bactériennes, infections parasitaires, maladies auto-immunes (anémie hémolytique auto-immune, hépatite chronique active...) et infection HIV (Girón-González *et al.*, 2009; Lopeza *et al.*, 2009).

L'augmentation d'IgA seul, au cours des maladies infectieuses localisées dans les muqueuses respiratoire (sinusite, bronchite ...), génitale ou digestive (gastrite...) ainsi qu'au cours de néphropathie à dépôt d'IgA (maladie de Berger) (Levenson *et al.*, 1996).

❖ Augmentation polyclonale de 2 ou 3 immunoglobulines

Elle s'observe d'emblée ou fait suite à l'augmentation d'une des classes d'immunoglobulines. Cette augmentation peut être associée ou non à un syndrome inflammatoire, ce qui permet d'envisager différentes hypothèses (Stiehm, 1996, Katchourine et Pradalier, 1998; Rosen et Davis, 2005).

- Augmentation des immunoglobulines avec un syndrome inflammatoire, tel que les maladies infectieuses bactériennes, virales, fongiques ou parasitaires. Hémopathies malignes, maladies systémiques, inflammatoires ou auto-immunes.
- Augmentation des immunoglobulines sans syndrome inflammatoire, tel que les affections hépatiques chroniques (cirrhose éthylique, cirrhose biliaire primitive, hépatite chronique active, hépatite granulomateuse, fibrose hépatique). Contexte infectieux: certaines parasitoses, infection HIV (en dehors d'une infection opportuniste).

3.2.6. Applications thérapeutiques des anticorps monoclonaux recombinants

La découverte en 1975 par Kohler et Milstein de la technique des hybridomes a permis de révolutionner le monde de la biologie des anticorps. Cette méthode consiste à fusionner expérimentalement un lymphocyte B (provenant le plus souvent de souris immunisées au préalable avec un antigène donné) et une cellule myélomateuse conférant ainsi au clone issu de la fusion et mis en culture ses deux propriétés principales: la production d'un anticorps monoclonal spécifique et l'immortalité (Kohler et Milstein, 1975). Grâce à cette découverte, il est devenu possible de créer de façon efficace des anticorps monoclonaux pour une très grande variété d'antigènes. Ceci a fait naître de grands espoirs quant à l'utilisation de ces anticorps monoclonaux en immunothérapie (Nechansky *et al.*, 2007). Toutefois, la faible demi-vie de ces anticorps ainsi que les importantes réponses immunitaires (réponse HAMA) développées par les patients recevant des traitements à base d'anticorps monoclonaux de souris dès le début des années 1980, ont mis ces espoirs en péril. Malgré tout, cette technique est encore largement utilisée et fournit à de nombreux laboratoires des anticorps pour des utilisations dans la recherche, l'imagerie et le diagnostic (Humphreys et Glover, 2001).

Le développement de la biologie moléculaire et de l'ingénierie génétique dans les années 1990 a permis de trouver un moyen de pallier ces problèmes d'immunogénicité. Plus de 25 ans après leur découverte, les anticorps monoclonaux sont enfin inclus dans les produits pharmaceutiques qui se développent très rapidement dans des essais cliniques (Roque *et al.*, 2004). Actuellement, la classe des anticorps monoclonaux est la classe de protéines thérapeutiques dont la croissance est la plus forte en raison de son spectre d'efficacité et d'application extrêmement large: cancers, maladies infectieuses, maladies cardiovasculaires, maladies respiratoires, système nerveux central, contrôle de la douleur, maladies neurodégénératives et maladies auto-immunes (Nechansky *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, plus d'une vingtaine d'anticorps, ayant été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) durant les vingt dernières années, sont actuellement utilisés pour traiter diverses pathologies (Humphreys et Glover, 2001; Huang *et al.*, 2008). Parmi ces anticorps, certains sont dits « nus » c'est-à-dire qu'ils ne sont pas couplés à d'autres molécules (Huang *et al.*, 2008). Ils constituent la majorité des anticorps sur le marché actuel et peuvent agir de différentes façons parmi lesquelles sont la fixation aux cellules cancéreuses afin d'orienter la réponse immunitaire pour les détruire (comme le Rituxan® ou le Campath®) ou la fixation et le blocage d'un antigène directement lié à la prolifération ou la survie des cellules cancéreuses (comme l'Herceptin® ou l'Avastin®) (Siberil *et al.*, 2005). Il existe

également des anticorps dits « armés » qui sont conjugués à un isotope radioactif, une toxine, un médicament ou une enzyme. Ils sont alors utilisés comme des vecteurs pour la délivrance ciblée de ces molécules sur leurs sites d'actions (ex: les tumeurs). C'est le cas notamment du Zevalin® et du Bexxar® (Humphreys et Glover, 2001; Lopeza *et al.*, 2009).

Au moins 400 anticorps monoclonaux sont actuellement en phase d'essai clinique, en cancérologie, pour la transplantation d'organes et pour les maladies auto-immunes ou infectieuses (Vançan *et al.*, 2002). De nombreuses stratégies d'ingénierie visant à coupler les anticorps à différents types de molécules, à améliorer l'affinité et la stabilité de ces anticorps sur leurs cibles ou sur les récepteurs Fcγ ainsi qu'à en augmenter la demi-vie et le rendement de leur taux de production sont développées (Huang *et al.*, 2008). Elles devraient réduire leur prix de revient élevé et en faire, dans le futur proche, des outils efficaces et utilisables à grande échelle pour traiter de nombreuses maladies (Akamatsu *et al.*, 2007). Beaucoup d'espoirs sont soulevés dans le traitement de pathologies lourdes pour lesquelles les thérapies conventionnelles ont montré leurs limites. Il faut noter également que de nombreux anticorps sont utilisés, non pas seulement en thérapeutique, mais dans des domaines variés allant de l'agroalimentaire au médical pour des applications comme le diagnostic (test de dépistage, marquage de tumeurs...) et l'imagerie en relais des examens classiques (Roque *et al.*, 2004; Baty et Chames, 2006).

CHAPTER II

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ SUR

DES IONS MÉTALLIQUES IMMOBILISÉS

(IMAC)

1. Généralités

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique qui sépare les constituants d'un mélange par répartition sélective entre une phase mobile et une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère ou silice greffée). Chaque constituant du mélange est soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force de mobilité due à la phase mobile. La classification des méthodes chromatographiques est basée sur la nature des phases stationnaires utilisées ou les phénomènes mis en œuvre dans la séparation (Anspach *et al.*, 1999). Différents facteurs interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases stationnaires et mobiles dont la solubilité du soluté dans un solvant donné, la taille (forme), la polarité, la charge électrique et la présence de groupements fonctionnels (Blumberg, 2011).

2. Chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés

2.1. Historique

La chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (IMAC) a été introduite par Porath et ses collaborateurs (1975). Cette méthode séparative se base sur les travaux effectués par Helfferich (1961), cités par Porath et ses collaborateurs (1975), sur la séparation analytique et préparative de petites molécules par un système d'échange de ligands combinant à la fois l'échange d'ions et la chimie de coordination. Porath et ses collaborateurs (1975) ont montré l'affinité existante entre les protéines et les différents ions métalliques immobilisés sur des dérivés d'agarose ainsi que la possibilité de fractionner les protéines des milieux biologiques. Par la suite, un grand nombre de publications en rapport avec la technique IMAC ont permis le développement de phases stationnaires spécifiques ainsi que l'élargissement du domaine d'application de ce système (Chaga *et al.*, 1999; Todorova-Balvay *et al.*, 2004; Basset *et al.*, 2008). Le système IMAC est employé dans le secteur biomédical pour la purification de diverses macromolécules spécifiques telles que des anticorps, des messagers cellulaires (Interférons) ou toutes autres biomolécules d'intérêts telles que les protéines et les enzymes (Chaga, 2001).

Sulkowski et ses collaborateurs (1982) initièrent une approche systématique impliquant certains résidus de chaînes d'acides aminés dans l'adsorption des protéines sur les ions métalliques chélatés. Par la suite, on postula que la présence d'un seul résidu histidine dans une protéine permet sa rétention sur du Cu^{+2} immobilisé alors que le Ni^{+2} et le Zn^{+2} retiennent

les protéines possédant deux résidus histidine vicinaux (Hochuli *et al.*, 1987). L'utilisation du cobalt (Co^{+2}) montre l'adsorption des protéines possédant deux résidus adjacents d'histidine sur la protéine. Ainsi, plusieurs laboratoires travaillèrent sur le développement des alternatives pour la séparation des macromolécules. La phosphorylation, la présence de groupements carboxylates ou de tyrosines ainsi que le type d'ions métalliques utilisé jouent un rôle important dans la séparation des protéines (Muszynska *et al.*, 1992). Divers sites de liaison de l'ion métallique sont utilisés pour la purification des protéines recombinantes marquées génétiquement avec des chaînes variables de poly-histidines (His-X_n) en position C ou N terminale ou par mutation (Yilmaz *et al.*, 1995; Patwardhan *et al.*, 1997; Chaga *et al.*, 1999). Un grand nombre de techniques préparatives ont été développées pour la purification de protéines recombinantes exprimées dans des cellules procaryotes (Botros *et al.*, 1991; Laboureau *et al.*, 1996). IMAC est devenue un outil incontournable pour la recherche et le développement, mais aussi un outil industriel important pour la production de macromolécules d'intérêt biomédical (Dalziel *et al.*, 2007).

2.2 Principe de l'IMAC

IMAC est une méthode de séparation basée sur la formation de liaisons de coordination entre des ions métalliques et certains acides aminés retrouvés sur les macromolécules (Sulkowski, 1989). Les sites d'affinité aux métaux sont normalement occupés par des molécules d'eau et sont échangés avec certains groupes électro-donneurs de la protéine. Généralement, il s'agit de résidus histidine (non protonés) comme le montre la **figure 9** qui illustre la liaison de la protéine sur un support d'ions métalliques (Gaberc-Porekar et Menart, 2001). Plusieurs autres acides aminés tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, la tyrosine, la cystéine ainsi que les chaînes aromatiques du tryptophane et de phénylalanine contribuent à la rétention des protéines sur les phases IMAC (Ribeiro *et al.*, 2008). Leur participation peut être directe, par implication dans la formation de liaisons de coordination ou indirecte par la création d'un microenvironnement favorable à la liaison des résidus histidine (Sulkowski, 1982; Gaberc-Porekar et Menart, 2001; Ribeiro *et al.*, 2008). Dépendamment de la sensibilité des macromolécules à la présence de résidus d'histidine, du pH et d'autres interactions, l'élution peut se faire par variation du pH ou de la force ionique, par un changement de tampon ou par ajout de compétiteurs tels que l'imidazole, l'histidine, l'EDTA ou l'hydroxyde d'ammonium (Anspach, 1994).

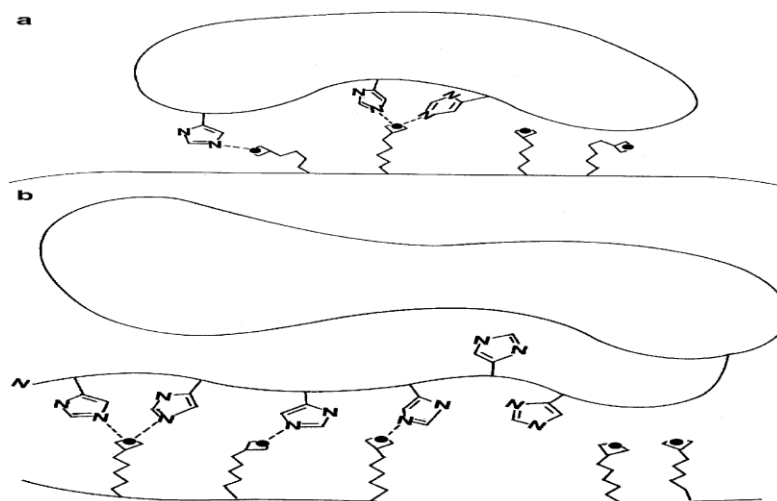


Fig. 9. Les liaisons de coordination des protéines sur le support d'ions métalliques. L'attachement fort des protéines sur la matrice de l'IMAC est réalisé majoritairement par l'attachement multipoint d'histidines à la surface externe. (a) protéine simple, (b) les protéines recombinantes marquées génétiquement avec des chaînes variables de poly-histidines (His-X)_n en position C ou N terminale ou par mutation (Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

2.3. Les éléments d'activité de l'IMAC

Les facteurs primordiaux dans l'utilisation de la technique IMAC sont le mode opératoire, les conditions expérimentales ainsi que la nature de la phase stationnaire. On retrouve ainsi plusieurs spécificités aux supports de type IMAC.

2.3.1. Type des ions métalliques

L'affinité existant entre les métaux et les protéines varie. La classification usuelle dans le domaine de l'IMAC est celle proposée par Pearson (1973). Ce dernier a postulé que les ions métalliques peuvent être divisés en trois catégories basées sur leur réactivité préférentielle avec des atomes nucléophiles (azote, oxygène, soufre). Ainsi, on retrouve le groupe des ions métalliques forts, comme le Fe^{+3} , Ca^{+2} ou Al^{+3} montrant une forte préférence à l'oxygène (Basset *et al.*, 2008), le groupe des métaux de transition dits mous tels que le Cu^{+} , Hg^{+2} , Ag^{+} préférant le soufre (retrouvé dans la cystéine) Ainsi que le groupe des ions de transitions intermédiaires (Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2}) qui sont les plus utilisés car ils font intervenir l'oxygène, l'azote et le soufre dans les liaisons de coordination (Sharapova *et al.*, 2011).

2.3.2. Les supports application de l'IMAC

La technique IMAC peut s'étendre à un grand nombre de supports selon l'application voulue. Ainsi, on retrouve ce système d'affinité sur des membranes de cellulose, sous forme de gels et sous forme de billes. Les phases stationnaires classiques sont à base de gels

polysaccharidiques tels que l'agarose ou le dextrane (Camperi *et al.*, 2000). Les types de support IMAC usuels sont biologiquement compatibles, facilement activés et fonctionnalisés, mais limités par de faibles propriétés mécaniques. Les phases stationnaires sous forme de gels ou de billes réticulées à base de carbohydrate ne permettent leur utilisation qu'à basse pression. Pour pallier cette faiblesse, d'autres supports tels que la silice granulaire ou sphérique et des polymères synthétiques (styrène, méthacrylate) permettent aussi l'obtention de supports de l'IMAC (Anspach, 1994; Ren *et al.*, 2004). Les membranes modifiées de type IMAC montrent une alternative avantageuse pour la purification rapide de protéines d'intérêt dans la recherche ou encore dans l'industrie alimentaire pour la purification de certains jus de fruits par l'extraction d'enzymes protéolytiques (Crawford *et al.*, 1999).

2.3.3. Activation des supports

L'immobilisation du ligand sur la matrice nécessite la création de sites réactionnels qui permettent d'établir des liaisons covalentes. La rétention de l'ion métallique dépend principalement de la structure du bras chélateur retenant l'ion de transition. Ainsi, on retrouve des groupements chélateurs de type iminodiacétate (IDA), carboxyméthylaspartate (CMAsp), tris (carboxyméthyl) éthylènediamine (TED), nitrilotriacétate (NTA) et le Tris (2amino-éthyl)amine (TAE) dont les structures sont présentées dans la **figure 10** (Chaga, 2001).

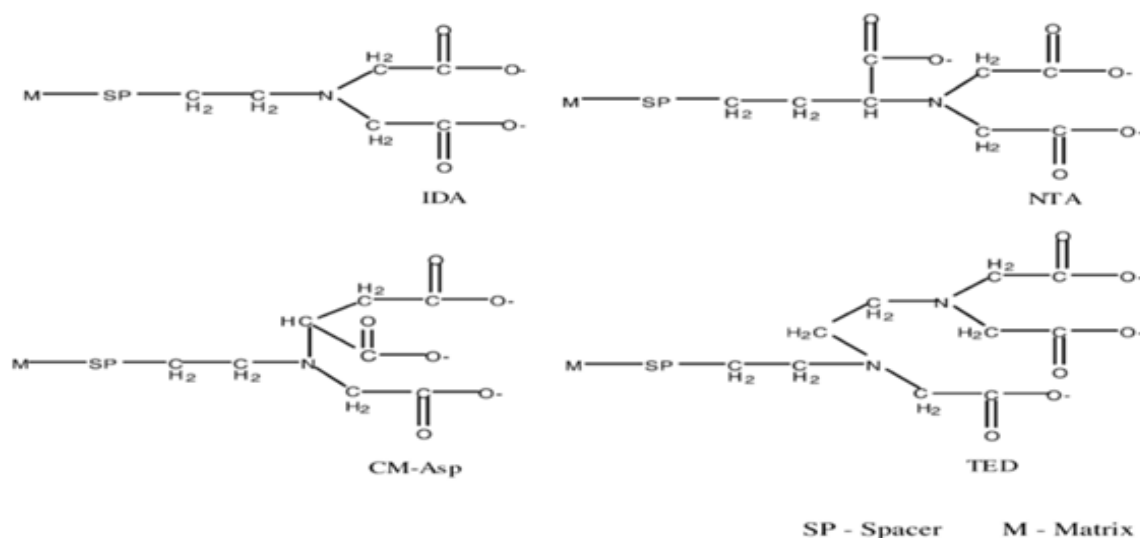


Fig. 10. La structure des variant ligands chélateur (Chaga, 2001).

La longueur du bras reliant la fonction chélatante à la phase stationnaire joue un rôle important dans l'organisation spatiale et stérique du complexe formé (**Fig. 11**). La structure ainsi que la spécificité du complexe formé varient selon le groupe chélateur et l'ion de transition utilisé (Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

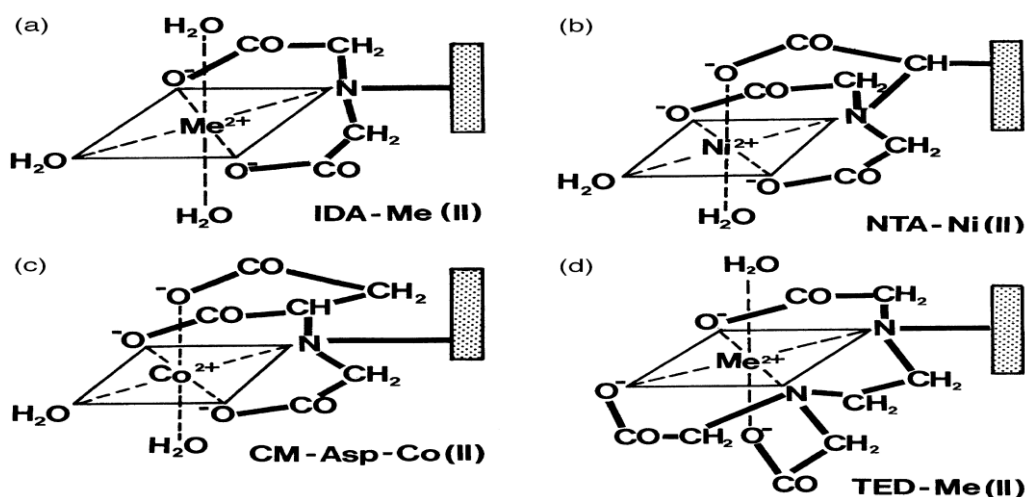


Fig. 11. Présentation schématique des groupements chélateurs communément utilisés complexés avec différents métaux de transition (Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

2.4. Base de développement d'un protocole IMAC

Il n'existe pas de protocole standard pour générer un système IMAC près à l'usage. Ainsi, le chargement en métal peut s'effectuer dans différents milieux tels que des tampons, dans de l'eau nanopure ou en milieu acide, dépendamment de l'expérimentation. L'excès d'ions métalliques est éliminé par lavages à la glycine, au tampon Tris en présence de faibles concentrations d'imidazole (Chaga, 2001). Le système IMAC doit être équilibré du côté pH et force ionique, c'est pourquoi, dépendamment du type de la phase stationnaire IMAC, l'ion immobilisé et les conditions de chargement et d'équilibration doivent être adaptées en fonction de la sélectivité d'adsorption de l'échantillon vis-à-vis des ions de transition (Ribeiro *et al.*, 2008). Plusieurs solutions tampon telles que le phosphate, le Tris et le MOPS sont retrouvées lors de l'utilisation d'ions métalliques intermédiaires (Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

2.5. Régénération du système

Les matrices IMAC montrent d'excellentes possibilités de régénération, il s'agit d'un point important car les ions métalliques séquestrés sont facilement décrochés à l'aide de chélateurs forts et le support peut alors être successivement nettoyé (Dalziel *et al.*, 2007). Il est ainsi possible de régénérer la matrice avec l'EDTA, avec HCl par diminution du pH (acide) et par nettoyage avec l'acide phosphorique, une forte concentration de sels et du NaOH. Ceux-ci permettent l'élimination des métaux et de toutes les substances non désirées restant dans la matrice. On peut alors réutiliser plus d'une centaine de fois la résine chélatante sans perdre la sélectivité, la capacité et la reproductibilité (Chaga, 2001).

2.6. Applications du système IMAC

2.6.1. Purification à grande échelle des protéines thérapeutiques

Plusieurs études basées sur la technique IMAC montrent le fort potentiel d'utilisation pour la purification pharmaceutique et industrielle de matériel biologique tel que des interférons, des vaccins, des anticorps, des enzymes et autres macromolécules bioactives. (Boden *et al.*, 1995; Vançan *et al.*, 2002). Récemment, quelques rapports intéressants sur des techniques IMAC utilisées pour épurer des vaccins sont apparus. Par exemple, une procédure efficace de purification du vaccin de malaria qui consiste à exprimer des protéines de His6-tag dans *Escherichia coli* et la protéine extérieure prédominante Pfs25 avec un His6-tag au terminus carboxylique produite par sécrétion à partir *Saccharomyces cerevisiae* (Hu *et al.*, 1999).

IMAC offre des possibilités de production à grande échelle de différentes macromolécules d'intérêt médicale, les médicaments dérivés du Sang sont dérivés de pools de plasma subissant un fractionnement physico-chimique (Pihusch *et al.*, 2002). Leurs caractéristiques communes sont : conservation longue (un à trois ans), inactivation virale pendant le processus de fabrication telle que les fractions coagulantes (facteur VIII, facteur IX, facteur Willebrand, fibrinogène, complexe prothrombinique (PPSB), facteur VII), albumine, immunoglobulines humaines (immunoglobulines intraveineuses polyvalentes, immunoglobulines intraveineuses spécifiques: anti-D, anti-HBs, immunoglobulines intramusculaires spécifiques: anti-HBs, anti-tétaniques, anti-rabiques) (Huang *et al.*, 2008).

2.6.2. Quelques autres applications de l'IMAC.

L'utilisation du principe d'affinité IMAC peut aussi s'appliquer dans le domaine environnemental. L'IMAC permet l'étude de différents ligands naturels retrouvés dans les environnements aquatiques, ainsi que la dépollution des eaux contaminées par des métaux lourds ou autres macromolécules toxiques retrouvées dans les différentes sources d'eau (Paunovic *et al.*, 2005). Un grand nombre d'études géochimiques portant sur l'analyse des substances humiques (acides fulviques et humiques) retrouvées dans les sols et les eaux ont été effectuées à l'aide d'outils IMAC, cette application permet la mise en place de différents modèles géologiques ainsi qu'un impact des substances organiques sur la fertilité des sols et leur importance dans la formation des complexes naturels avec les ions métalliques (Muszynska *et al.*, 1992; Christi *et al.*, 2000; Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

PARTIE

EXPERIMENTALE

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Enquête clinique au niveau du CHU de Sétif

Les médicaments dérivés du plasma représentent un secteur particulier du domaine pharmaceutique. Ils sont produits par fractionnement de la matière première, le plasma humain, qui permet d'isoler la protéine recherchée. Celle-ci est ensuite purifiée pour fabriquer ainsi un médicament (Folléa et Cazenave, 1997). Ces médicaments hautement caractérisés sont indispensables à la survie de centaines de milliers de patients. Ils sont en effet indiqués pour prendre en charge des pathologies comme exemple certains déficits immunitaires, les maladies auto-immunes, des déficits en facteurs de coagulation ou des situations d'urgence (Fieschi *et al.*, 2006).

Dans le cadre de l'élaboration de cette recherche, nous avons jugé très utile d'engager une enquête clinique au niveau du CHU de Sétif durant la période 01/01/2011 jusqu'à 15/04/2012 et cela pour avoir une idée sur les besoins en médicaments dérivés du sang.

L'objectif de cette enquête est l'information et l'évaluation des quantités moyennes consommées durant cette période au sein des différents services de l'hôpital et bien sûr nous sommes penchés sur l'aspect financier de cette enquête, en relevant le cout d'achats.

Tableau 2. Consommation des médicaments dérivés du sang au niveau de CHU de Sétif durant la période 01/01/2011 jusqu'à 15/04/2012.

Produit	La dose	Consommation de flacon de 100 ml	Prix Unitaire DA	Prix Total DA
Albumine	50cc	3041	2343,09	7125336.69
	100cc	2049	5590,50	11454934.5
Facteur VII	1,2g	58	282879,61	16407017.38
	2.4g	42	565759.22	23761887.24
	4,8g	93	70719,90	6576950.7
Facteur VIII	500UI	2691	13250,58	35657310.78
Facteur IX	500UI	418	1988,53	831205.54
Immunoglobuline humaine intraveineuse polyvalente	3g	306	13794,70	422188.2
	6g	140	27589,40	3862516
	12g	230	55178.8	12691124

Les médicaments sont indispensables à la survie des malades malgré que les sommes dépensées par l'état sont importantes (La richesse d'un pays réside dans la santé de son peuple).

2. Matériel

2.1. Matériel Biologique

Le sang humain provient de donneurs sains.

2.2. Réactifs chimiques

2.2.1. Polymère utilisé

La phase stationnaire utilisée dans cette technique chromatographique (IMAC) est constituée de microbilles de N,N-bis(salicylidenepropylenetriamine)-aminométhyl polystyrène, et est synthétisée par Charef et ses collaborateurs (2010) au laboratoire de biochimie appliquée de Sétif (**Fig. 12**). La détermination de la capacité de rétention des métaux par la phase stationnaire via l'analyse élémentaire ainsi que la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) sont réalisées au laboratoire de chimie organique de l'université Jordanienne (Charef *et al.*, 2010b).

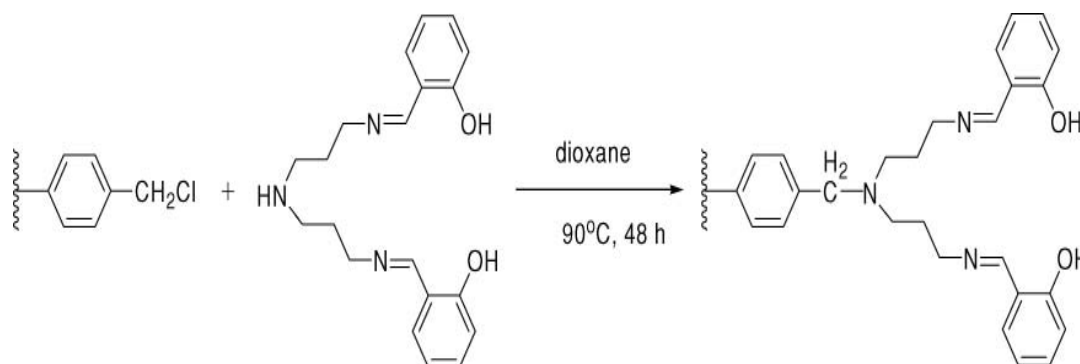


Fig. 12. La formation de la résine à partir de polystyrène et de base de Schiff (Charef *et al.*, 2010b).

2.2.2. Produits chimiques

Les produits chimiques employés ont été obtenus à partir des sources commerciales. Albumine du sérum bovine (BSA), immunoglobuline G (IgG), hydroxyméthyl aminométhane (Tris), chlorure de sodium (NaCl), imidazole, acide 3-N-morpholino-propanesulfonique (MOPS), acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), l'acide chlorhydrique (HCl), méthanol, phosphate de sodium (Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4), acrylamide, bis-acrylamide, glycine, l'hydroxyde de sodium (NaOH), polyéthylène glycole (PEG), glycérol, acide acétique, bleu de bromophénol, le laurylsulfate de sodium ou dodécylsulfate de sodium (SDS), phosphate buffer saline (PBS), persulfate d'ammonium, témoin de poids moléculaire. Tous ces réactifs

proviennent de Sigma sauf l'acétate de cuivre(II) déshydraté (98 %), N,N,N',N' tetramethylene diamine (TEMED) et Bleu de Coomassie G250 qui sont de la marque Fluka.

2.3. Instrumentation

Les appareils utilisés dans la présente étude sont: une centrifugeuse (Sigma) 3K30 C, un pH-mètre (HANA), un spectrophotomètre (TechomP, UV/VIS-8500), l'appareillage d'électro-migration (pharmacia-LKB), automate COBAS INTEGRA 400 PLUS ainsi que l'appareillage de la chromatographie IMAC (le système chromatographique est constitué principalement des éléments représentés dans la **figure 13**).

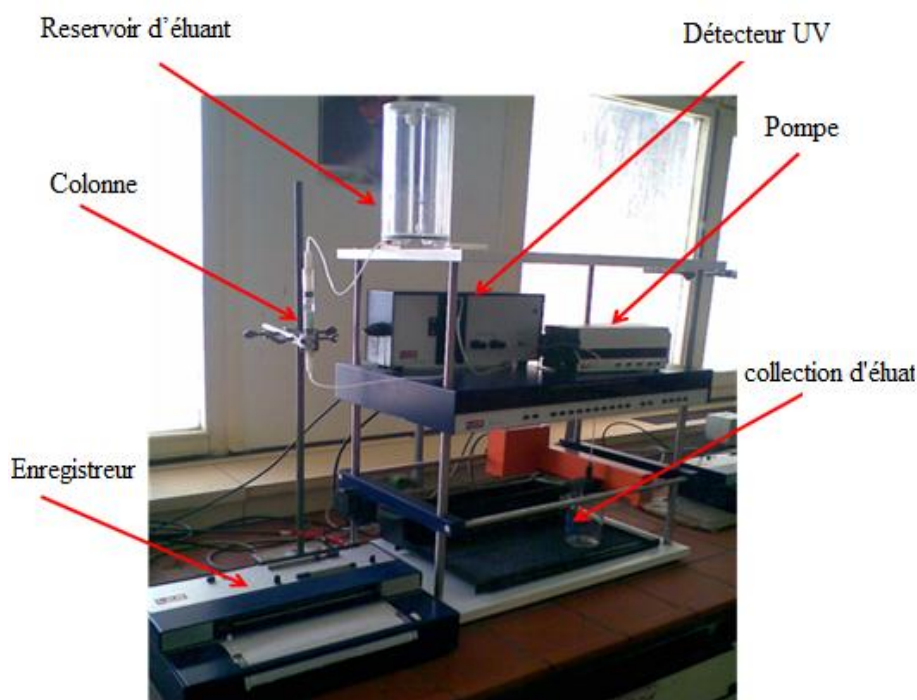


Fig. 13. L'appareillage de la chromatographie IMAC.

3. METHODES

3.1. Préparation de l'échantillon

3.1.1. Préparation du plasma humain

Des échantillons de sang provenant de donneurs sains ont été recueillis et mis dans des tubes contenant l'anticoagulant (129 μ l de citrate sodique/tube). Ils ont été centrifugés pendant 5 min à 3000 t/min à 4°C. Les différentes dilutions du plasma humain préparaient (1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/75 et 1/100) par le tampon Tris-HCl et le tampon phosphate à pH 8.

3.1.2. Préparation de BSA et IgG

BSA et l'IgG ont été dissouts dans le tampon Tris ainsi que dans le tampon phosphate pour avoir des concentrations de 1 à 10 g/l.

3.2. Préparation de la phase stationnaire

La propriété de chélation métallique de la résine a été étudiée par la technique d'équilibre en batch en impliquant 0,5 g/100ml de la résine [N,N-bis (salicylidenepropylene-triamine)-aminomethyl polystyrène] en solution de trihydrate d'acétate de cuivre (**Fig. 14**). Après avoir été agitée à 25°C pendant 6 heures (le temps nécessaire pour que l'adsorption atteigne un plateau de saturation), le lavage de la résine était effectué par l'eau distillée plusieurs fois pour éliminer le Cu(II) qui n'est pas fixé sur la résine.

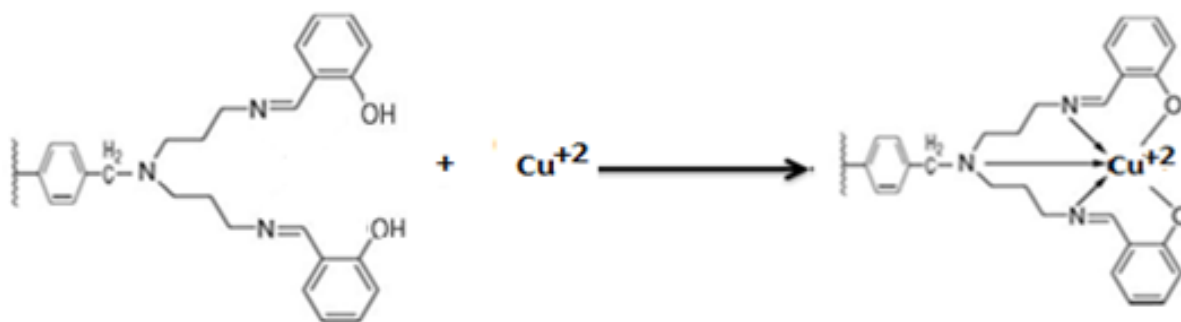


Fig. 14. La formation de la résine-Cu(II) saturée en ions métalliques bivalents (Charef *et al.*, 2010b).

3.3. Chromatographie

La résine saturée en ions métalliques a été introduite à l'intérieure de la colonne (1 cm x 10 cm) et équilibrée avec un tampon d'adsorption [tampon Tris (25 mM) ou tampon phosphate (15 mM), pH 8]. L'agitation est nécessaire afin d'éviter la formation des bulles d'air qui peuvent interférer au cours de la détection (obtention des pics parasites). La phase stationnaire résine-Cu(II) est équilibrée en faisant passer le tampon d'adsorption 5 à 6 fois son volume (jusqu' à l'obtention d'une ligne de base). Après l'équilibration, différentes quantités (0.5 à 1 ml) du plasma avec des dilutions dégressives (1/5, 1/10, 1/25, 1/50 et 1/100) ont été appliquées à la colonne, avec un temps d'incubation de 10 min. BSA et l'IgG ont été aussi injectés comme des échantillons pour savoir les conditions de désorption des protéines.

Après l'injection du plasma dilué, la colonne a été lavée avec le tampon d'adsorption pour l'élimination des protéines non adsorbées à la phase stationnaire, puis l'élution a été réalisée avec des tampons différents (phase mobile). Après l'élution, la colonne est régénérée

par un premier lavage, en utilisant des tampons spécifiques. Comme pour tout support de chromatographie, cette étape peut être réalisée avec des agents comme le NaOH, afin d'éliminer les protéines fortement adsorbées à la résine.

3.4. Phase mobile et les modifications portées sur la colonne

3.4.1. Effet de la concentration de Tris-HCl sur la désorption des protéines plasmatiques

La purification des protéines plasmatiques a été réalisée selon la méthode de Qiu et ses collaborateurs (2007) ainsi que Charef et ses collaborateurs (2010a) avec modifications. L'échantillon du plasma humain à une dilution de 1/5 est préparé par le tampon Tris-HCl (25 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans 25 mM de tampon Tris-HCl, pH 8, l'élution a été réalisée avec un gradient de concentration discontinue de solution Tris-HCl (100, 200, 300 et 400 mM) avec le même pH. Le lavage a été réalisé par 0.5 M NaOH, pH 8 (1^{er} étape).

En deuxième étape, l'échantillon du plasma humain est dilué au 1/5 par le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8), le tampon d'équilibrage et d'adsorption appliqué sur la résine est Tris-HCl de 5 mM, l'élution a été réalisée avec un gradient de concentration discontinue de solution Tris-HCl (10, 25, 45, 60 et 80 mM) avec le même pH. Le lavage a été réalisé avec 200 mM de NaOH, pH 8.

3.4.2. Effet de concentration de l'échantillon

L'échantillon du plasma humain a été dilué d'une façon décroissante (1/10, 1/20, 1/30, 1/50, 1/75 et 1/100), chaque dilution est injectée en différents volumes (0.8, 0.6 et 0.4 ml) dans la colonne.

3.4.3. Effet du pH sur la désorption des protéines plasmatiques

L'effet du pH est réalisé selon la méthode décrite par Boden et ses collaborateurs (1995) et par Paunovic et ses collaborateurs (2005) avec modifications. L'expérience sur l'effet du pH a été effectuée par différentes valeurs de pH allant de 8 à 2, en fixant la concentration du Tris-HCl à 25 mM.

3.4.4. Effet du Tris-HCl avec le NaCl sur la désorption des protéines plasmatiques

a. Variation du Tris-HCl avec fixation du NaCl

Un échantillon de 0.5 ml du plasma humain (1/5) est effectué à l'intérieur de la colonne. Le tampon d'équilibrage et d'adsorption appliqué sur la résine est 5 mM Tris-HCl,

l'élution a été réalisée avec le tampon Tris-HCl aux différentes concentrations (10, 25, 45 et 60 mM) en fixant du NaCl à 500 mM. Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH (Jiang *et al.*, 1999; Prasanna et Vijayalakshmi, 2010).

b. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl

On a appliqué le même procédé mais l'élution a été réalisée en fixant la concentration du Tris-HCl à 10 mM et en variant d'une manière progressive la concentration du NaCl (15, 25, 35, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mM et 1 M).

3.4.5. Effet du Tris-HCl avec de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques

a. Variation du Tris-HCl avec fixation de l'imidazole

L'échantillon de 0.5 ml du plasma humain (1/5) est injecté dans la colonne. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). Suivant la méthode de Gaberc-Porekar et Menart (2001) et de Sharapova et ses collaborateurs (2011) avec modifications, l'élution a été réalisée avec le tampon Tris-HCl aux différentes concentrations (15, 25 et 45 mM) mais de même pH, en fixant la concentration de l'imidazole à 200 mM.

b. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl

L'élution a été réalisé par des tampons qui contiennent la concentration Tris-HCl fixe à 10 mM et c'est la concentration de l'imidazole qui est varié (10, 20, 30, 60 et 100 mM).

3.4.6. Effet du complexe (Tris-HCl, NaCl et l'imidazole) sur la désorption de BSA

a. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl et de l'imidazole

L'échantillon de 0.5 ml de BSA 5 mg/ml est dilué dans 5 mM Tris-HCl, pH 8. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'élution a été réalisée avec des tampons de même pH, mais avec différentes concentrations du NaCl (35, 60, 100, 200, 400, 600 mM et 1 M), tout en fixant la concentration de l'imidazole à 10 mM et Tris-HCl à 10 mM (Kumar *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2009; de Goes *et al.*, 2010). Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH.

b. Variation du Tris-HCl avec fixation du NaCl et de l'imidazole

Appliquant le même procédé précédant. L'élution a été réalisée en fixant la concentration de l'imidazole à 10 mM et du NaCl à 35 mM, tout en variant les concentrations du Tris-HCl (35, 45, 65 et 80 mM).

c. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl et du NaCl

Appliquant le même procédé. L'élution a été réalisée avec des tampons à différentes concentrations de l'imidazole (10, 15, 20, 30 et 40 mM), en fixant la concentration du Tris-HCl à 10 mM et du NaCl à 35 mM.

3.4.7. Effet de l'EDTA avec le complexe sur la désorption de BSA

L'échantillon de 0.5 ml BSA (5 mg/ml) a été dilué dans le Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'élution a été réalisée en ajoutant au tampon (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, 10 mM imidazole) une faible concentration (4 mM) d'EDTA (Hermida *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007).

3.4.8. Effet du MOPS avec le complexe sur la désorption de BSA et l'IgG**a. Injection de BSA (5 mg/ml et 2 mg/ml)**

L'échantillon de 0.5 ml BSA (5 mg/ml) a été dilué dans le Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). D'après Kovac et ses collaborateurs (2008) ainsi que Bresolin et ses collaborateurs (2009) avec modifications, l'élution a été réalisée en ajoutant au tampon (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl et 10 mM imidazole) une faible concentration (10 mM) du MOPS. La même expérience a été refaite avec une concentration de 2 mg/ml de BSA.

b. Injection d'IgG (2 mg/ml)

L'échantillon de 0.5 ml d'IgG (2 mg/ml) est dilué dans le Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été effectués par le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'élution a été réalisée au départ par le tampon 10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS, Le lavage a été réalisé avec le tampon 200 mM NaOH, puis la concentration de l'un des composants a été variée en fixant celles des trois composants restants.

c. Injection du mélange (BSA-IgG)

Un mélange de 4 mg/ml (2 mg BSA et 2 mg IgG) est injecté dans la colonne après l'avoir dilué dans le Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'élution a été réalisée au départ par le tampon 10 mM

Tris-HCl, 35 mM NaCl, 10 mM imidazole et 10 mM MOPS, puis la concentration de l'un des composants a été variée en fixant celles des trois composants restants.

3.4.9. Effet du tampon (complexe-MOPS) sur la désorption des protéines plasmatiques

a. Variation du NaCl

Un échantillon de 0.5 ml de plasma humain a été dilué au 1/5 par le Tris-HCl (5 mM, pH 8) et appliqué sur la résine pendant 10min. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8), puis l'élution a été réalisée avec des tampons du même pH, mais avec différentes concentrations du NaCl (35, 50, 80 et 200 mM), en fixant les concentrations du Tris-HCl à 10 mM, de l'imidazole à 10 mM et du MOPS à 10 mM. Le lavage a été réalisé avec le tampon 200 mM NaOH.

b. Variation de l'imidazole

L'élution de l'échantillon précédant a été réalisée par des tampons aux différentes concentrations de l'imidazole (15, 17, 20 et 25 mM) avec fixation des concentrations du Tris-HCl à 10 mM, du NaCl à 35 mM et du MOPS à 10 mM. Le lavage a été réalisé avec le tampon 200 mM NaOH.

3.4.10. Effet des produits sur la résine

Les différentes concentrations des produits (Tris, NaCl, imidazole et MOPS) utilisés sont testées sur la résine sans l'injection de l'échantillon.

3.4.11. Effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA

L'échantillon de 0.5 ml BSA (2 mg/ml) a été préparé par 10 mM tampon phosphate, pH 8 et appliqué sur la résine pendant 10min. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon phosphate (10 mM, pH 8). L'élution a été réalisée aux différentes concentrations du tampon phosphate (15, 30, 50, 75, 120, 160, 200 et 250 mM) avec le même pH (Hansen et Lindeberg, 1995). Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH.

3.4.12. Effet du tampon phosphate avec le NaCl sur la désorption de BSA

L'échantillon de 0.5 ml BSA (2 mg/ml) a été dilué dans 10 mM tampon phosphate. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon phosphate (10 mM). L'élution a été réalisée au départ par le tampon phosphate fixé à 30 mM en variant la concentration du NaCl (25, 35, 50, 100, 200, 400, 600 et 800 mM). Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH,

pH 8. Par ailleurs, on fixe la concentration du NaCl à 500 mM tout en variant la concentration du tampon phosphate (Ivanov *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2007; Prasanna et Vijayalakshmi, 2010).

3.4.13. Effet du tampon phosphate avec de l'imidazole sur la désorption de BSA et l'IgG

a. Injection de BSA (2 mg/ml)

L'échantillon de 0.5 ml BSA (2 mg/ml) a été dilué dans le tampon phosphate (10 mM). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon phosphate (10 mM). L'élution a été réalisée par le tampon (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole). Le lavage a été réalisé avec le tampon 200 mM NaOH, pH 8 (Gaberc-Porekar et Menart, 2001; Prasanna et Vijayalakshmi, 2010).

b. Injection de l'IgG (2 mg/ml)

L'échantillon de 0.5 ml d'IgG (2 mg/ml) a été dilué dans le tampon phosphate (10 mM, pH 8). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon phosphate (10 mM, pH 8). L'élution a été réalisée par le tampon 30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole.

c. Injection du mélange (BSA-IgG)

Un mélange de 4 mg/ml (2 mg BSA et 2 mg IgG) est injecté dans la colonne après l'avoir dilué dans le tampon phosphate (10 mM). L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans 10 mM du tampon phosphate, pH 8. L'élution a été réalisée par la variation d'imidazole en fixant le tampon phosphate à 30 mM.

3.4.14. Effet du tampon d'élution (Tampon phosphate et imidazole) sur la désorption des protéines plasmatiques

Un échantillon de 0.5 ml de plasma humain a été dilué au 1/5 par le tampon phosphate (10 mM), et appliqué sur la résine pendant 10 min. L'équilibrage et l'adsorption ont été menés dans le tampon phosphate (10 mM, pH 8), puis l'élution a été réalisée avec des tampons aux différentes concentrations de l'imidazole (05, 10, 15, 20 et 25 mM), en fixant la concentration du tampon phosphate à 30 mM. Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH.

a. Influence du NaCl

On a appliqué le même procédé précédant, et on a rajouté, au départ, 35 mM NaCl au tampon d'élution 30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole (Vançan *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2010), puis on a ajouté 60 mM de NaCl.

b. Influence du MOPS

On a appliqué le même procédé, mais cette fois-ci, on a rajouté 5 mM MOPS au tampon d'élution 30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole. Puis on a varié la concentration de l'imidazole (10, 15, 20 et 25 mM) (de Souza *et al.*, 2010).

3.5. Collection des fractions

Les fractions devront être soigneusement notées et préservées dans des tubes de 20 ml bien fermés à température de 4°C pour les analyses ultérieures, afin de déterminer la nature de la protéine et sa concentration.

3.6. Régénération de la résine

Il s'agit d'un point important car les matrices IMAC montrent d'excellentes possibilités de régénération. En fait, il est possible de régénérer la matrice avec 3 M HCl, sous agitation pendant 30 min. Cela permet l'élimination des ions métalliques (**Fig. 15**). Il est alors possible de réutiliser la résine chélatante plus d'une centaine de fois sans perdre la sélectivité, la capacité et la reproductibilité (Chaga, 2001).



Fig. 15. Régénération de la résine

3.7. Dialyse

Les fractions des différents échantillons sont maintenues à l'intérieur des boudins de dialyse, qui ont été émergés par la suite dans une solution de phosphate buffer saline (PBS, équilibré à pH 8 par NaOH), sous agitation magnétique à 4°C pendant une nuit. Pour concentrer les protéines dans les boudins de dialyse, ces derniers sont recouverts de polyéthylène glycol (PEG).

3.8. Dosage des protéines

Les éluât récupérés ont été dosés par l'automate COBAS qui est un analyseur chimique informatisé dont l'utilisation est prévue pour la détermination qualitative et quantitative des analytes. Le principe de mesure est basé sur la photométrie d'absorbance et du turbidimétrie.

3.9. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du SDS

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (Sodium dodecyl sulfate -Polyacrylamide Gel Electrophorèse) ou (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). C'est l'une des techniques les plus utilisées dont le principe consiste à séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaires. En utilisant des standards ayant des poids moléculaires connus, l'électrophorèse permet de déterminer les poids moléculaires des molécules des échantillons en question. Ceci est possible en traçant une droite d'étalonnage $\log PM = f(R_f)$, sachons que:

PM = Poids moléculaire

R_f = Rapport frontal

3.9.1. Préparation des solutions

- ❖ Solution tampon du gel de séparation (solution A): a été préparée par la dissolution de 18.2 g Tris dans 50 ml d'eau distillée. Le pH a été ajusté à 8.8 avec HCl puis le volume est complété à 100 ml par de l'eau distillée.
- ❖ Solution tampon du gel de concentration (solution B): cette solution est constituée de 6 g de Tris et 50 ml de l'eau distillée. Le pH a été ajusté à 6.8 avec HCl puis complété par l'eau distillée à 100 ml.
- ❖ Solution d'acrylamide/bis-acrylamide à 30 % (Solution C): cette solution a été préparée par le mélange de 29.2 g d'acrylamide et 0.8 g de bis-acrylamide dissous dans 100ml d'eau distillée, dans un milieu opaque.
- ❖ Solution D: SDS 10 % (P/V), préparée par dissolution de 5 g de SDS dans 50 ml d'eau distillée.
- ❖ Solution E: bleu de bromophénol 1 mg/ml.
- ❖ Solution d'échantillon (solution F): cette solution a été préparée par le mélange de 4.275 ml de solution B, 4.2 ml de glycérol, 1 ml de solution D et 0.5 ml de solution E.
- ❖ Tampon d'électrophorèse: dissoudre 6 g de Tris, 28.8 g de glycine et de 2 g de SDS 10 % (P/V) dans deux litres d'eau distillée.

- ❖ Solution de coloration: dissoudre 1 g de bleu de Coomassie R250 dans 50 ml d'acide acétique, 225 ml de méthanol et 225 ml d'eau distillée.
- ❖ Solution de décoloration: formée d'acide acétique 7-10 % (V/V) préparée par le mélange de 75 ml d'acide acétique et 925 ml d'eau distillée.

3.9.2. Protocole expérimental

❖ Préparation du gel de séparation (12 %)

Le gel de séparation a été préparé par le mélange de 2.5 ml de la solution A, 4 ml de la solution C, 100 µl de la solution D et 3.4 ml d'eau distillée. Le mélange est polymérisé par l'ajout de 15 µl de TEMED et 100 µl de persulfate d'ammonium.

❖ Préparation du gel de concentration (5 %)

Le gel de concentration a été préparé par le mélange de 2.5 ml de la solution B, 1.7 ml de la solution C, 100 µl de la solution D et 5.7 ml d'eau distillée. Le mélange est polymérisé par l'ajout de 10 µl de TEMED et 100 µl de persulfate d'ammonium. Après coulage du gel de séparation, un espace supérieur d'environ 1 à 1.5 cm a été laissé pour y mettre le gel de concentration. Une quantité (1-2 ml) d'eau distillée a été ajoutée juste après pour que le gel soit horizontal. Après polymérisation du gel, l'eau a été débarrassée par le papier filtre, le gel de concentration a été coulé et une peigne a été appliquée pour former des puits dedans.

❖ Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés par la solution d'échantillon puis chauffés à 100°C pendant 10 minutes.

❖ Electrophorèse

Une pré-électrophorèse a été conduite à 10-15 mA à la température du laboratoire pendant 4 à 5 heures. Après cette pré-électrophorèse, les échantillons ont été déposés dans les puits en terme de 20 µl/puits. La migration a été effectuée par le tampon d'électrophorèse. Au début, un courant électrique de 10 mA a été appliqué pour permettre la pénétration des protéines dans le gel de séparation, l'ampérage a été ensuite augmenté jusqu'à 30 à 60 mA. Une fois la migration achevée, le gel a été démoulé et coloré. Après au moins une heure de coloration, le gel a été décoloré jusqu'à une parfaite transparence.

CHAPITRE IV

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultat et discussion

La colonne chromatographique a été remplie de résine-Cu(II) saturée en ions métalliques bivalents. Un échantillon de 1 ml de plasma humain a été dilué au 1/5 dans le tampon Tris-HCl (25 mM, pH 8) et incubé pendant 10 min. L'élution a été réalisée avec différents tampons. Le lavage a été réalisé avec le NaOH (0.5 M, pH 8).

1. Tampon Tris

Le tampon Tris est largement utilisé en biochimie, particulièrement avec des protéines et l'acide nucléique dans un intervalle de pH entre 6,5 et 9,7. On l'utilise souvent comme tampon destiné à maintenir le pH et en raison de son coût peu élevé.

1.1. Effet de la concentration du Tris-HCl sur la désorption des protéines plasmatiques

L'effet de la concentration du tampon Tris-HCl sur la désorption des protéines a été réalisé par le changement de sa concentration progressive (100, 200, 300 et 400 mM) avec le même pH 8 (Qiu *et al.*, 2007; Charef *et al.*, 2010a). Les résultats de fractionnement du plasma humain sur résine-Cu(II) au débit de 0.5 ml/min sont présentés dans la **figure 16**.

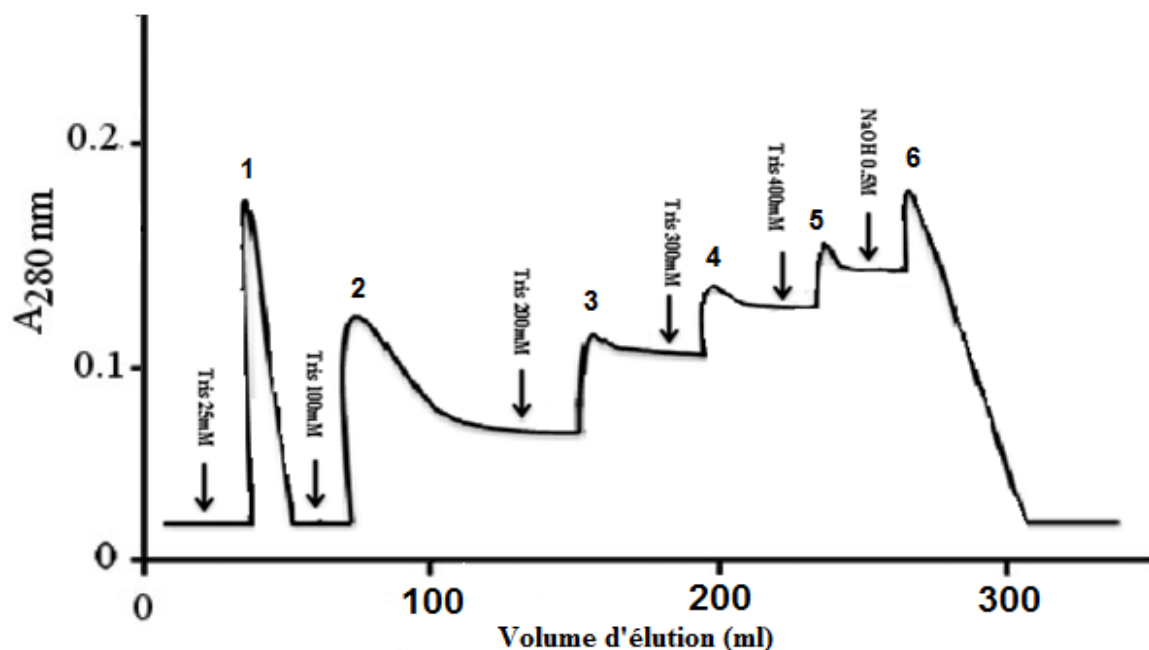


Fig. 16. L'élution par hautes concentrations du Tris-HCl. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (25 mM, pH 8). Pic 2: 100 mM. Pic 3: 200 mM. Pic 4: 300 mM. Pic 5: 400 mM. Pic 6: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu pendant le lavage avec la solution d'adsorption (Tris-HCl 25 mM) représente des protéines non adsorbées. Les pics (2, 3, 4 et 5) obtenus par le lavage avec le Tris-HCl (de 100 jusqu'à 400 mM), montrent que le tampon Tris-HCl est une force capable de désorber les protéines mais ne permet pas le retour à la ligne de bas. Le pic 6 obtenu avec 0.5 M NaOH représente des protéines qui sont fortement adsorbées à la résine. Une couleur bleu a été remarquée dans le tube d'échantillon récupéré par le lavage avec le NaOH.

Selon les résultats précédents, même en augmentant la concentration du Tris-HCl, on n'arrive pas à avoir le retour de la ligne de base. On a décidé donc de diminuer la gamme de concentrations du Tris-HCl à 10, 25, 45, 60 et 80 mM (**Fig. 17**).

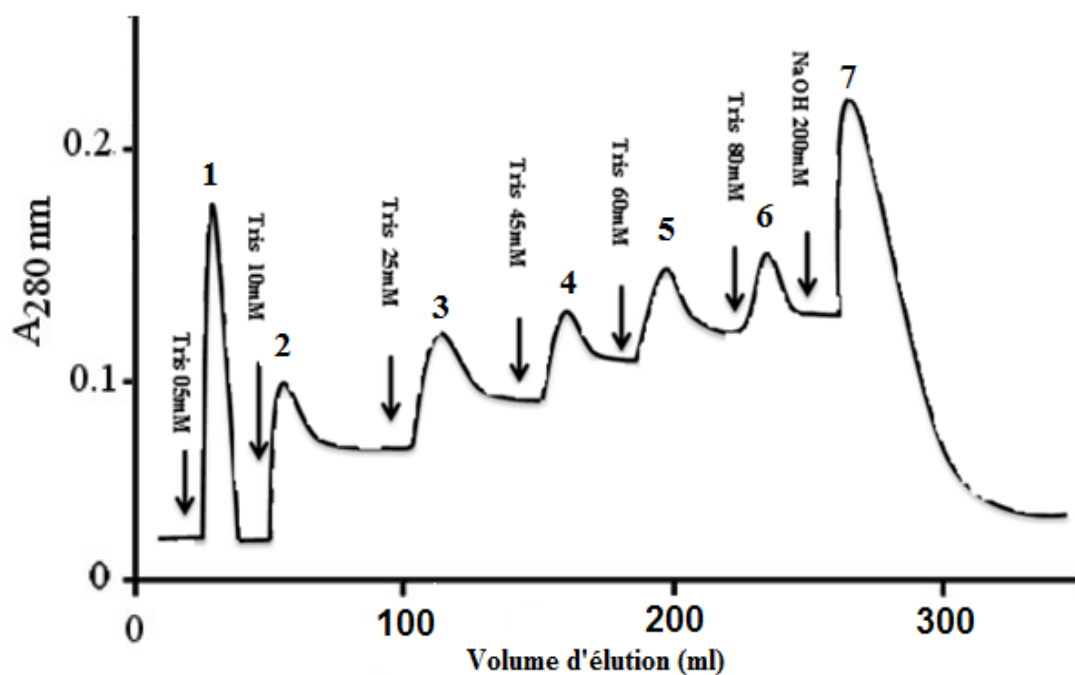


Fig. 17. L'élution par faibles concentrations du Tris-HCl. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM, pH 8). Pic 2: 10 mM. Pic 3: 25 mM. Pic 4: 45 mM. Pic 5: 60 mM. Pic 6: 80 mM. Pic 7: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption 5 mM Tris-HCl représente des protéines non adsorbées. Les pics 2, 3, 4, 5 et 6 sont obtenus par le Tris-HCl (de 10 mM jusqu'à 80 mM). Il a été constaté que dans ces conditions aussi il n'y a pas eu de retour à la ligne de base mais le pic est mieux constaté que dans la **figure 16**. On a supposé que la concentration et la quantité des protéines injectées sont très élevées, Tris seul n'est pas une force suffisante à la désorption des protéines fixées à la résine. Le pic 7 obtenu avec 200 mM NaOH représente des protéines fortement adsorbées dans la phase stationnaire.

1.2. Effet de la concentration de l'échantillon

Pour prouver l'hypothèse de la concentration élevée des protéines, on a varié la concentration des protéines plasmatiques par une dilution successive (1/10, 1/20, 1/30, 1/50, 1/75 et 1/100) ainsi que le volume injecté (0.8, 0.6 et 0.4 ml). Les résultats ont montré que même à très faible concentration du plasma (dilution 1/100), le retour à la ligne de base n'est pas achevé.

1.3. Effet du pH sur la désorption des protéines plasmatique

Le pH est un paramètre qui peut s'avérer important pour la mise en œuvre de certaines réalisations préférentielles du procédé de la purification. En effet, il est possible de modifier le pH du milieu à partir duquel la protéine d'intérêt est isolée, afin de modifier les conditions de solubilité de cette protéine en solution (Boden *et al.*, 1995; Paunovic *et al.*, 2005). On a fixé la concentration du Tris-HCl à 25 mM et on a varié le pH de manière décroissante de 8 à 2 (Fig.18).

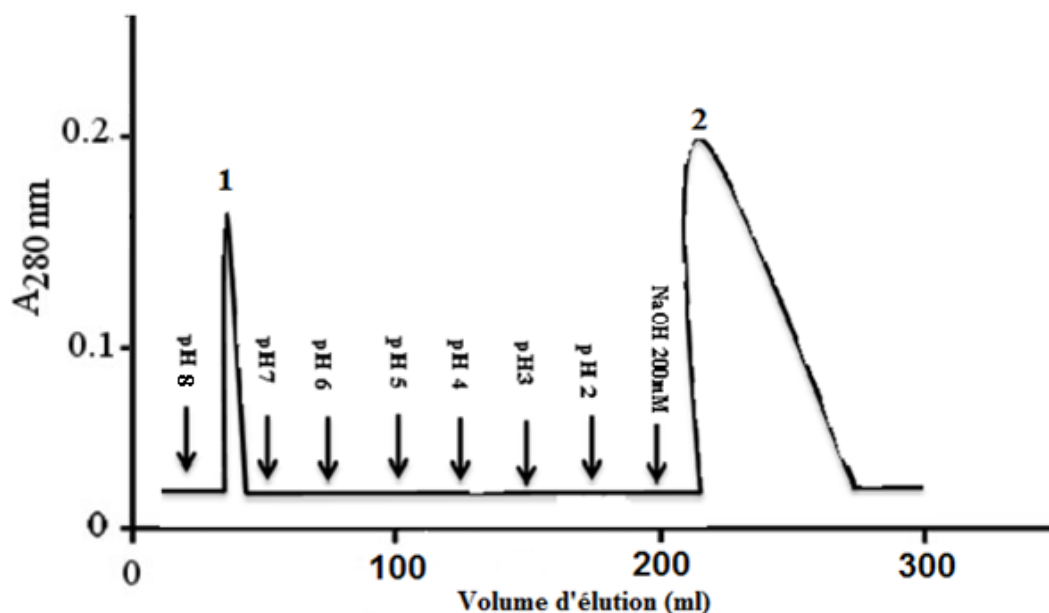


Fig. 18. L'élution par variation du PH. Pic 1: obtenu par tampon d'adsorption Tris-HCl (25 mM, pH 8). Pic 2: 200 mM NaOH.

Il n'y a eu aucune fraction de protéine libérée par variation du pH. Le seul pic qu'on a eu, a été obtenu par la solution d'adsorption pH 8. A partir de ces résultats, on a décidé de travailler à pH 8. Les résultats obtenus étaient similaires à ceux de Vançan et ses collaborateurs (2002).

1.4. Effet du Tris-HCl avec du NaCl sur la désorption des protéines plasm- atiques

Le tampon Tris n'est pas une force suffisante pour avoir le retour à la ligne de base, on va augmenter la force ionique par un autre produit.

1.4.1. Variation du Tris-HCl et fixation du NaCl

Selon Jiang et ses collaborateurs (1999) et Prasanna et Vijayalakshmi (2010) avec modifications, l'échantillon de 0.5 ml de plasma humain (1/5) a été élué avec des tampons aux différentes concentrations du Tris-HCl (10, 25, 45 et 60 mM) tout en fixant la concentration du NaCl à 500 mM (**Fig. 19**).

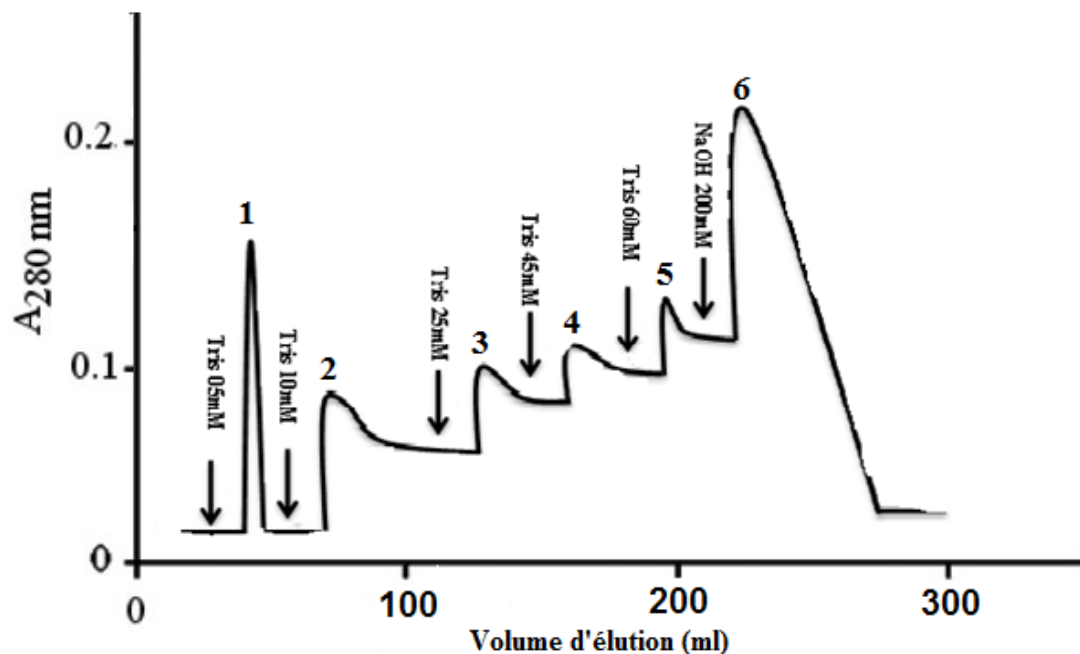


Fig. 19. L'élution par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl à 500 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption 5 mM Tris-HCl. Pic 2: 10 mM. Pic 3: 25 mM. Pic 4: 45 mM. Pic5: 60 mM. Pic 6: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption 5 mM Tris-HCl représente des protéines non adsorbées. Les pics 2, 3, 4 et 5 représentent des protéines éluées par les solutions 10, 25, 45 et 60 mM du Tris-HCl respectivement. En comparant ces résultats avec ceux de la **figure 17** (Tris-HCl seul), une superposition des pics a été remarquée. Le pic 6 obtenu par le 200 mM NaOH représente des protéines fortement adsorbées à la résine.

1.4.2. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl

L'élution est basée sur la variation de la concentration du NaCl (15, 25, 35, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mM et 1 M) en fixant la concentration du Tris-HCl à 10 mM. Le lavage a été réalisé par 200 mM de NaOH (**Fig. 20**).

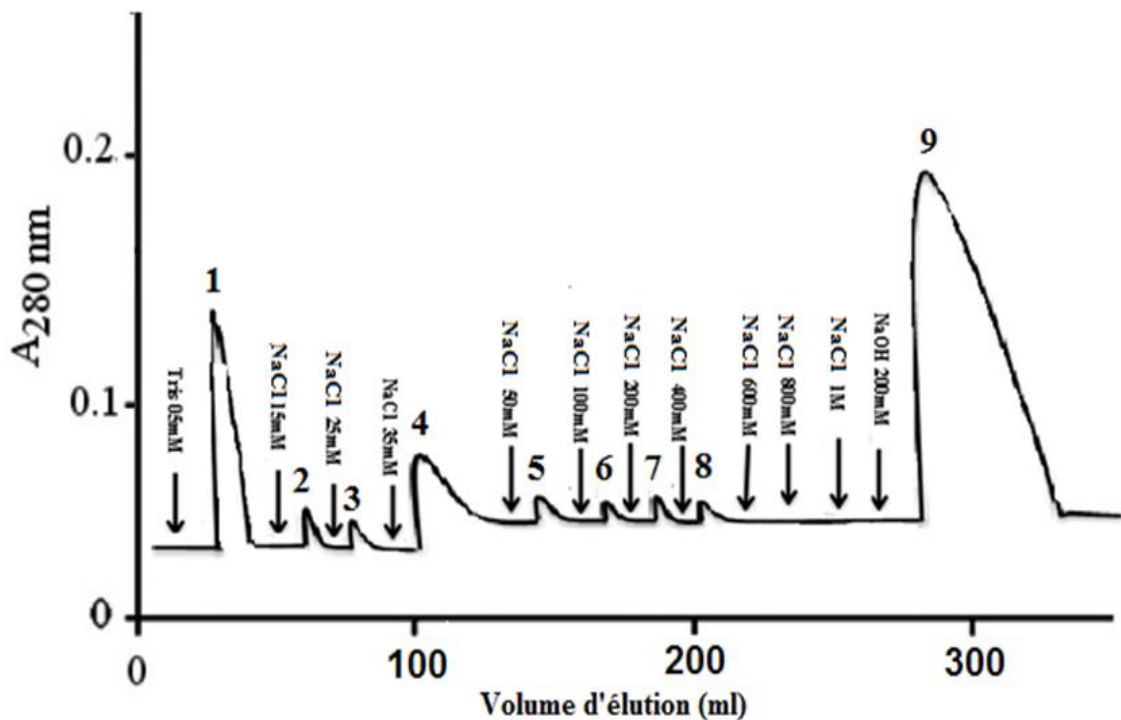


Fig. 20. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM). Pic 2: 15 mM. Pic 3: 25 mM. Pic 4: 35 mM. Pic 5: 50 mM. Pic 6: 100 mM. Pic 7: 200 mM. Pic 8: 400 mM. Pic 9: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM), représente des protéines non adsorbées dont la concentration est égale à 4,379 g/l. L'éluat de la solution 35 mM NaCl (pic 4) contient un taux de 0,531 g/l de protéines. Les pics 2, 3, 5, 6, 7, 8 et même pour les concentrations 600 mM, 800 mM et 1 M représentent des quantités négligeables (**Tableau 3**). Le pic 9 obtenu par 200 mM NaOH représente des protéines fortement liées à la résine avec une concentration de 6,069 g/l.

Tableau 3. Dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl.

Concentration de la substance variante	Concentration de l'échantillon récupéré g/l
Tampon d'adsorption	4,379
15 mM	0,186
25 mM	0,169
35 mM	0,531
50 mM	≤0,160
100 mM	≤0,088
200 mM	≤0,150
400 mM	≤0,098
600 mM	≤0,059
800 mM	≤0,036
1 M	0.00
200 mM NaOH	6,069

Tous ces résultats ont montré que Tris-HCl et NaCl n'ont pas une force suffisante pour la désorption des protéines.

1.5. Effet de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques

La protéine est éluée avec de l'imidazole qui est un analogue structural du noyau imidazole de l'histidine, un acide aminé qui remplit des fonctions importantes dans la structure et la fonction des protéines. Le noyau imidazole de l'histidine dispose d'un atome d'azote pouvant capter un proton, avec un pKa proche de la neutralité ($pK_a \sim 6.8$). L'azote du cycle d'imidazole des histidines peut également former des liaisons de coordination avec des ions métalliques comme Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} et Ni^{2+} (Gaberc-Porekar et Menart, 2001).

1.5.1. Variation du Tris-HCl avec fixation de l'imidazole

Selon Gaberc-Porekar et Menart (2001) et Sharapova et ses collaborateurs (2011) avec modifications, l'élution de l'échantillon a été réalisée avec des tampons de même pH, mais avec différentes concentrations du Tris-HCl (15, 25 et 45 mM) et en fixant la concentration de l'imidazole à 200 mM (**Fig. 21**).

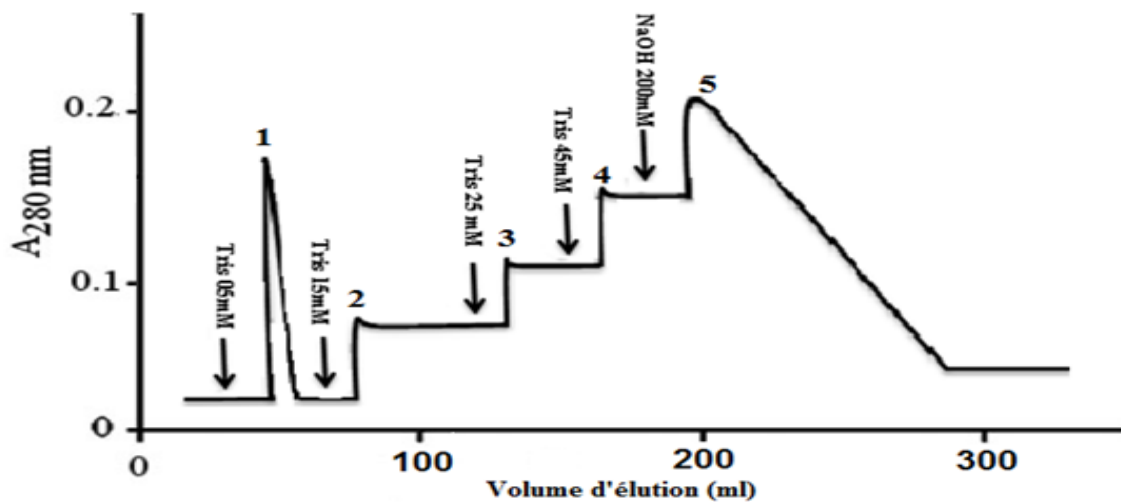


Fig. 21. L'éluion par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle de l'imidazole à 200 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption 5 mM Tris-HCl. Pic 2: 35 mM. Pic 3: 45 mM. Pic 5: 200 mM NaOH.

Le pic 1 obtenu par la solution d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM) représente des protéines non adsorbées. Les pics 2, 3 et 4 correspondants aux 15, 25 et 45 mM Tris-HCl, respectivement, ne montrent pas le retour à la ligne de base. Une augmentation de l'absorbance a été constatée. Le pic 5 obtenu par 200 mM NaOH permet le retour à la ligne de base.

1.5.2. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl

L'éluion a été effectuée par des tampons qui contiennent des concentrations différentes de l'imidazole (10, 20, 30, 60 et 100 mM). La concentration du Tris-HCl a été cependant fixée à 10 mM (**Fig. 22**).

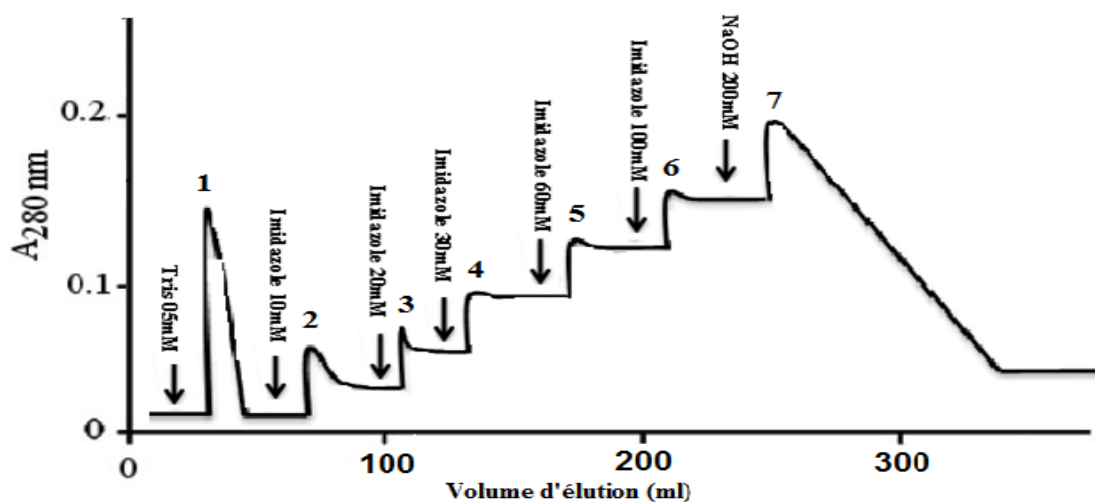


Fig. 22. L'éluion par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption 5 mM Tris-HCl. Pic 2: 10 mM. Pic 3: 20 mM. Pic 4: 30 mM. Pic 5: 60 mM. Pic 6: 100 mM. Pic 7: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par la solution d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM) représente des protéines non adsorbées. Une récupération des protéines a eu lieu lors de l'utilisation de d'imidazole (10 mM, pic 2). Les pics 3, 4, 5 et 6 représentent des protéines mais sans retour à la ligne de base. Le résultat souhaité n'a pas été atteint. Le pic 7 obtenu par 200 mM de NaOH représente des protéines fortement adsorbées à la résine.

1.6. Effet du complexe (Tris-HCl, NaCl, imidazole) sur la désorption de BSA

Le plasma contient des protéines variées dont les plus dominantes, selon notre enquête, sont l'albumine et l'IgG. C'est la raison pour laquelle, ces deux protéines ont été utilisées.

1.6.1. Variation du NaCl avec fixation du Tris-HCl et de l'imidazole

D'après la méthode Kumar et *al.* (2006); de Goes et *al.* (2010) avec modifications, un échantillon de 0.5 ml BSA (5 mg/ml) a été élué avec des tampons au même pH, mais avec différentes concentrations de NaCl (35, 60, 100, 200, 400, 600 mM et 1 M), en fixant la concentration du Tris-HCl à 10 mM et de l'imidazole à 10 mM (d'après les résultats précédents). Les résultats de fractionnement de BSA sont présentés dans la **figure 23**.

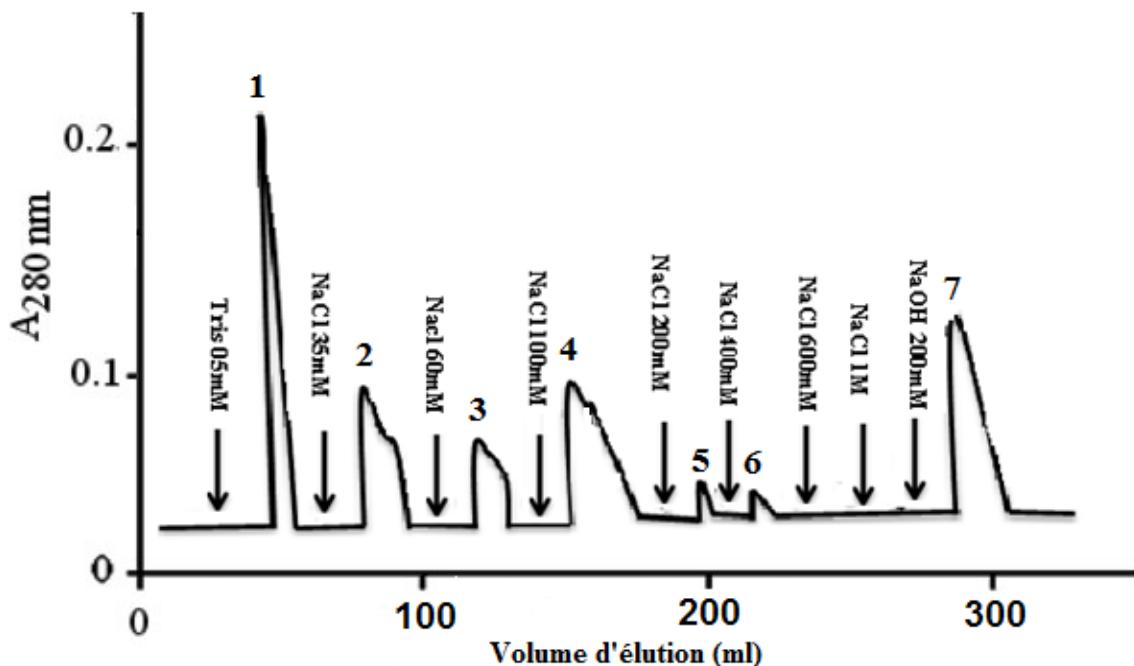


Fig. 23. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM et de l'imidazole à 10 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM). Pic 2: 35 mM. Pic 3: 60 mM. Pic 4: 100 mM. Pic 5: 200 mM. Pic 6: 400 mM. Pic 7: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM), représente la protéine BSA non adsorbée avec une concentration de 0.894 g/l. Au fur et à mesure qu'on augmente la concentration du NaCl, on récupère une concentration de BSA exprimée par les pics 2, 3 et 4. Cependant, en dépassant la concentration de 100 mM, l'élution de BSA commence à diminuer jusqu'à ce qu'elle s'arrête à partir de 600 mM NaCl (**Tableau 4**). Le pic 7 obtenu par 200 mM NaOH représente les protéines fortement adsorbées à la résine, la concentration de cet éluât est de 2.156 g/l.

Tableau 4. Dosage de BSA par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du Tris-HCl et de l'imidazole.

Concentration de la substance variante	Concentration de BSA récupérée (g/l)	Pourcentage %
Tampon d'adsorption	0.894	17.88
35 mM	0.989	19.78
60 mM	0.231	6.42
100 mM	0.459	9.18
200 mM	≤ 0.093	1.86
400 mM	≤ 0.078	1.56
600 mM	0.0	0
1 M	0.0	0
200 mM NaOH	2.156	43.12

D'après ces résultats, on est arrivé à avoir une adsorption et une désorption par ce tampon comme on a eu le retour de la ligne de base. On n'a pas pu libérer la quantité de BSA injectée en une seule fois, mais après avoir utilisé plusieurs concentrations du tampon. On propose donc de refaire cette expérience en variant la concentration du Tris-HCl et de l'imidazole.

1.6.2. Variation du Tris-HCl avec fixation du NaCl et de l'imidazole

L'échantillon précédent est injecté dans la colonne. L'élution a été réalisée avec des tampons aux différentes concentrations de Tris-HCl (35, 45, 65 et 80 mM), en fixant la concentration de l'imidazole à 10 mM et du NaCl à 35 mM (d'après les résultats précédents). Les résultats de fractionnement de BSA sont présentés dans la **figure 24**.

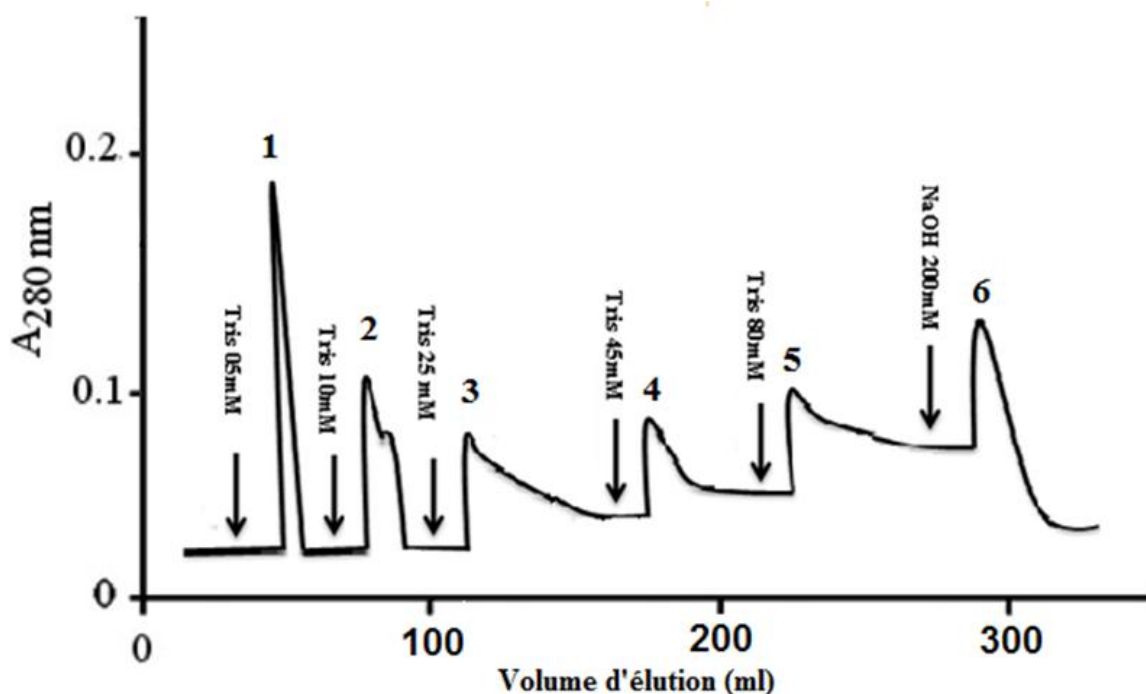


Fig. 24. L'élution par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl à 35 mM et de l'imidazole à 10 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM). Pic 2: 10 mM. Pic 3: 25 mM. Pic 4: 45 mM. Pic 5: 80 mM. Pic 6: 200 mM NaOH.

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM) représente la protéine BSA non adsorbée avec une concentration de 0.918 g/l. Le deuxième pic la représente avec une concentration de 1.003 g/l. Au niveau du troisième pic, le retour à la ligne de base était plus au moins important avec une concentration obtenue de 0.719 g/l. Par ailleurs, plus on augmente la concentration du Tris-HCl, plus on constate que le pic ne revient pas à la ligne de base initiale (pics 4 et 5), ainsi la concentration de la protéine obtenue est faible (**Tableau 5**). Le pic 6 obtenu par 200 mM NaOH représente les protéines que les différentes concentrations du tampon d'élution n'ont pas pu séparer, la concentration de cet éluât est de 1.693 g/l.

Tableau 5. Dosage de BAS par variation de la concentration du Tris-HCl et fixation de celle du NaCl et de l'imidazole.

Concentration de la substance variante	Concentration de BSA récupérée (g/l)	Pourcentage %
Tampon d'adsorption	0.918	18.36
10 mM	1.003	20.06
25 mM	0.719	14.38
45 mM Tris	0.254	5.08
60 mM Tris	0.235	4.70
80 mM Tris	≤0.147	2.94
200 mM NaOH	1.693	33.86

1.6.3. Variation de l'imidazole avec fixation du Tris-HCl et du NaCl

L'élution a été réalisée avec des tampons aux différentes concentrations de l'imidazole (10, 15, 20, 30 et 40 mM), en fixant la concentration du Tris-HCl à 10 mM et du NaCl à 35 mM (**Fig. 25**).

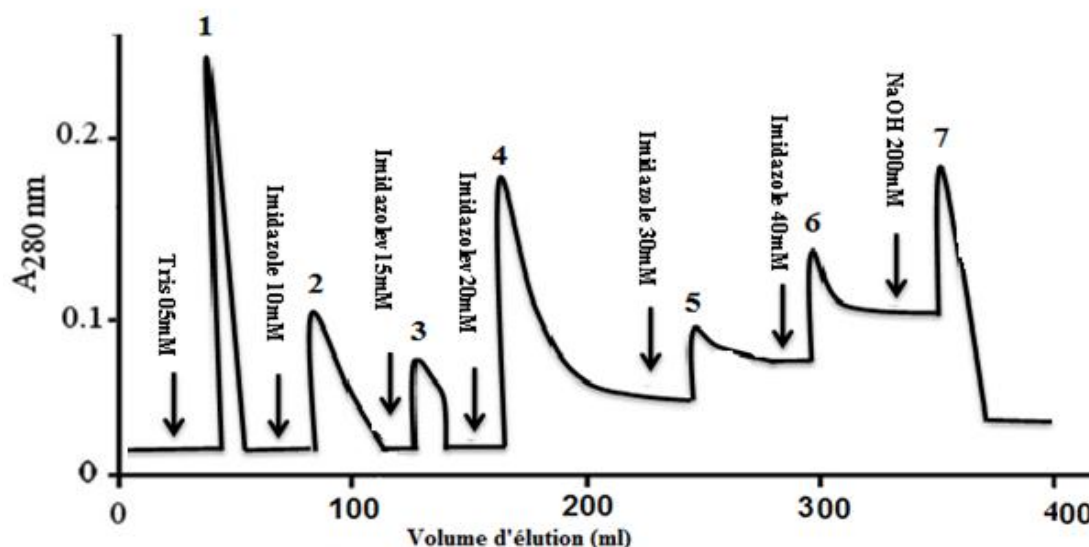


Fig. 25. L'élution par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl à 10 mM et du NaCl à 35 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM). Pic 2: 10 mM. Pic 3: 15 mM. Pic 4: 20 mM. Pic 5: 30 mM. Pic 6: 40 mM. Pic 7: 200 mM NaOH.

Le pic 1 obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5mM) représente BSA non adsorbées avec une concentration de 0.816 g/l. L'élution par 10mM (pic 2) et 15 mM (pic 3) a montré une concentration de 0.971 g/l et 0.340 g/l, respectivement. Dès qu'on augmente la concentration de l'imidazole (les pics 4, 5 et 6), on récupère une quantité faible de BSA (**Tableau 6**). Le pic 7 obtenu par 200mM NaOH désigne les protéines fortement adsorbées à la résine, la concentration de cet éluât est de 2.296 g/l.

Tableau 6. Dosage de BSA par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du Tris-HCl et du NaCl.

Concentration de la substance variante	Concentration de BSA récupérée (g/l)	Pourcentage %
Tampon d'adsorption	0.816	16.32
10 mM	0.971	19.42
15 mM	0.340	6.8
20 mM	0.227	4.54
25 mM	≤0.105	2.1
30 mM	≤0.098	1.96
40 mM	≤0.064	1.28
200 mM NaOH	2.296	45.92

On a constaté que le problème ne provient pas de la concentration, on a omis donc une autre hypothèse: si on ajoute une autre force ionique a ce tampon, quel seront ses effets sur la résine?

1.7. Effet de l'EDTA sur la désorption de BSA

L'EDTA est un chélateur fort qui peut former un complexe extrêmement stable et inerte avec les ions métalliques (Winzerling *et al.*, 1995), caractérisé par des constantes de dissociation inférieures à 10^{-27} , c'est-à-dire que la forme complexée est beaucoup plus stable que la forme dissociée (Sulkowski, 1996).

Le tampon utilisé est fixé à ces concentrations (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl et 10 mM imidazole) parce que c'est le tampon qui a donné le rendement le plus élevé entre 19 à 20 %. Le tampon précédant est additionné d'EDTA à une faible concentration de 4 mM (Hermida *et al.*, 2002; Moss *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2006). Les résultats de fractionnement sont présentés dans la **figure 26**

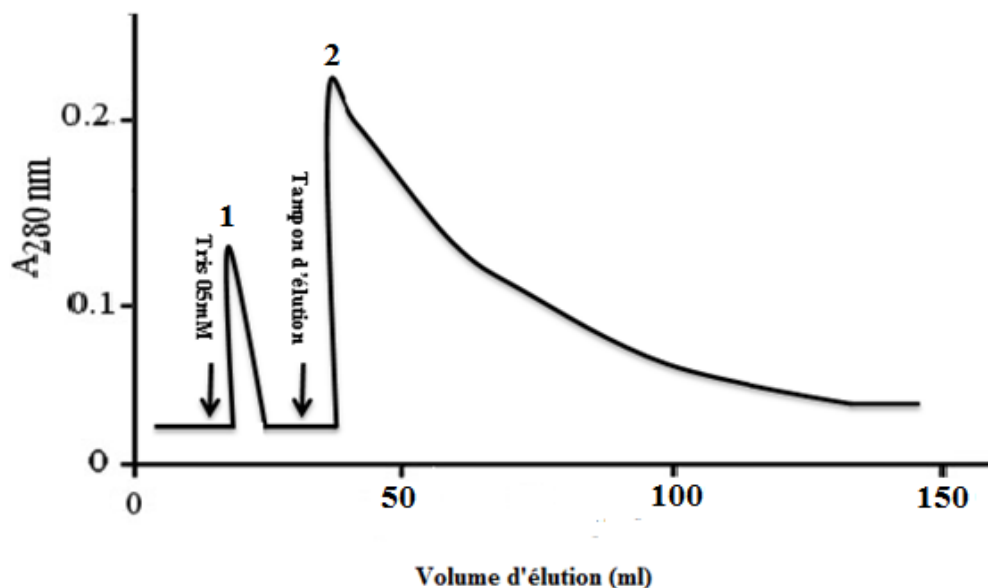


Fig. 26. L'effet de l'EDTA. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM). Pic 2: obtenu par le tampon d'élution (10 mM Tris, 10 mM imidazole, 35 mM NaCl et 4 mM EDTA).

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5mM) représente BSA non adsorbées. Le deuxième pic est très large, et une couleur bleu est apparue dans la solution d'échantillon récupérée. On suppose que le pic contient non seulement BSA, mais peut être des métaux, d'où la nécessité de vérifier est ce que le détecteur à 280 nm peut aussi détecter les métaux. De ce fait, une gamme de solution de cuivre a été préparée et les absorbances sont mesurées en utilisant le spectre UV-VIS (**Fig. 27**).

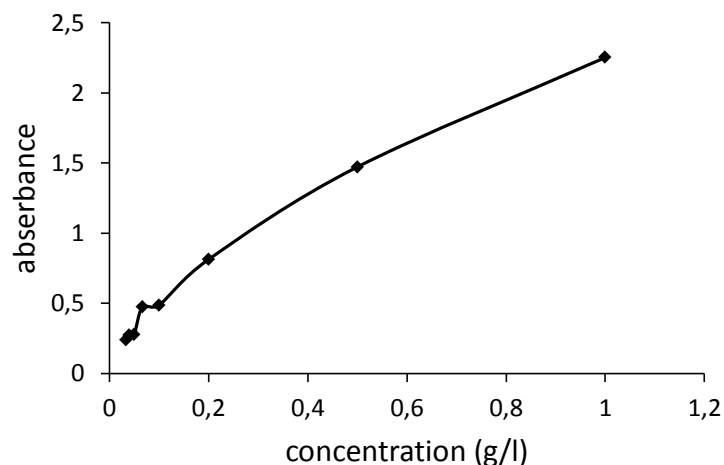


Fig. 27. Détection de cuivre à 280 nm.

Il y a une relation étroite entre la concentration de Cu(II) et l'absorbance, l'absorbance augmente avec l'augmentation de la concentration. On a conclu que l'EDTA n'est pas le produit idéal comme une autre force ionique ajoutée.

1.8. Effet du MOPS avec le complexe

1.8.1. Injection de BSA (5 mg/ml et 2 mg/ml)

Une concentration de 10 mM du MOPS a été ajoutée au tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl et 10 mM imidazole) (Kovac *et al.*, 2008; Bresolin *et al.*, 2009). Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH (**Fig. 28**).

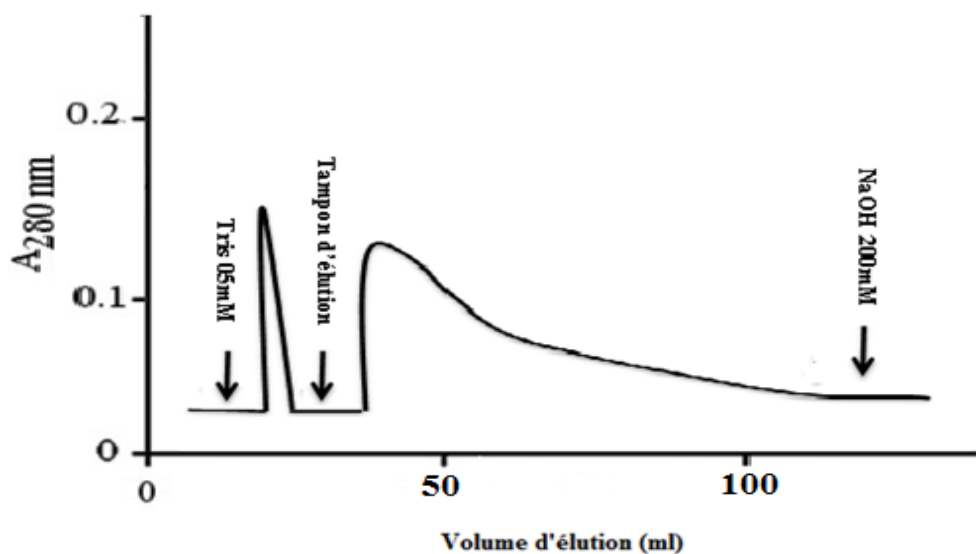


Fig. 28. L'effet du MOPS sur l'élution de BSA. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM). Pic 2: le tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 35 mM NaCl et 10 mM MOPS).

Le premier pic obtenu par le tampon d'adsorption (Tris-HCl, 5 mM) représente BSA non adsorbée avec une concentration de 0.804 mg/ml. Le deuxième pic représente BSA éluée où on a récupéré 4 tubes de 20 ml, contenant chacun 1.04 mg/ml après concentration par PEG, l'échantillon récupéré étant transparent. Aucune concentration n'est obtenue avec le tampon de lavage NaOH (200 mM). En somme, une quantité de 4.964 mg de BSA a été récupérée d'une totalité de 5 mg injectée dans la colonne.

L'injection de 2 mg/ml de BSA n'a pas permis l'obtention du pic des protéines non adsorbées (**Fig. 29**), toute la quantité injectée étant adsorbée par la résine. Le pic obtenu par le tampon d'éluion précédent a permis de récupérer deux tubes de 20 ml chacun, la moyenne obtenue est de 0.962 mg/ml après concentration par PEG. Aucun pic n'est obtenu avec le tampon de lavage.

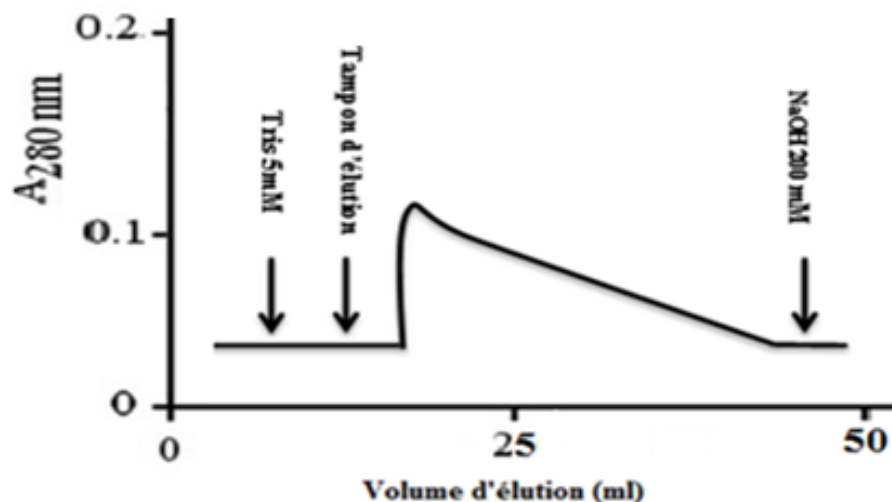


Fig. 29. Chromatographie à faible concentration de BSA sur la résine- Cu(II). Le pic est obtenu par le tampon d'éluion (5 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl).

1.8.2. Injection d'IgG (2 mg/ml)

En appliquant le même tampon précédant qui a permis de libérer BSA avec la même concentration de 2 mg/ml (**Fig. 30**), une superposition de pic a été remarquée en comparant cette résultat avec celle de la **figure 29**, c'est à dire tous les IgG injectés sont aussi adsorbés par la résine. On a récupéré 2 tubes de 20 ml chacun dont la moyenne obtenue est de 0.976 mg/ml après concentration par PEG. Aucun pic n'est obtenu avec le tampon de lavage 200 mM NaOH.

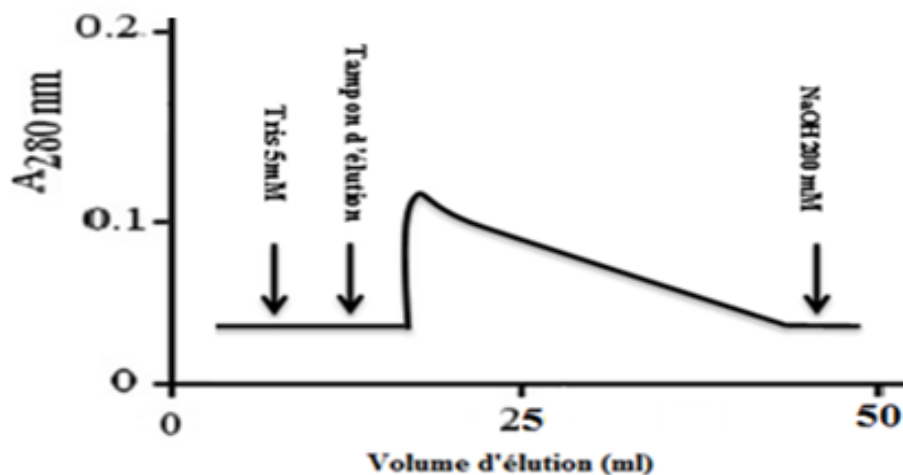


Fig. 30. Chromatographie à faible concentration d'IgG sur la résine- Cu(II). Le pic est obtenu par le tampon d'élution (5 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl).

On a conclu que ce tampon peut éluer les deux protéines (BSA et IgG). Pour connaître les conditions de désorption de chaque protéine, on a mélangé les deux protéines.

1.8.3. Injection du mélange (BSA-IgG)

Le mélange de 4 mg/ml (2 mg BSA et 2 mg IgG) a été injecté dans la colonne. L'élution a été réalisée par le tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, 10 mM MOPS et 10 mM imidazole). Les résultats de fractionnement sont présentés dans la **figure 31**.

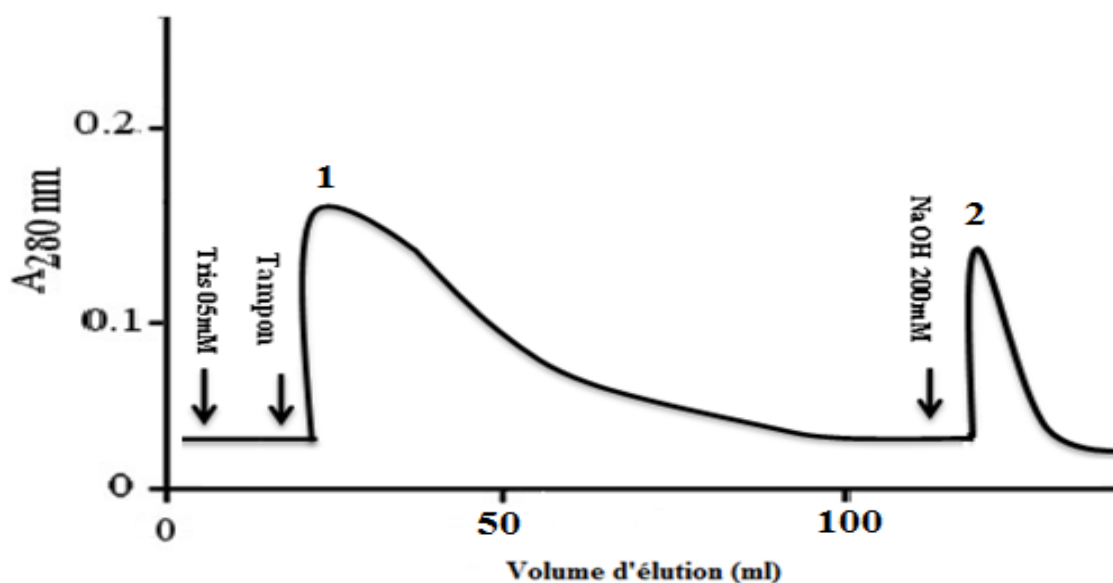


Fig. 31. L'élution du mélange (BSA-IgG) sur la résine-Cu(II). Pic 1: obtenu par le tampon d'élution (5 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl). Pic 2: 200 mM NaOH.

L'injection de 4 mg/ml du mélange n'a pas permis l'obtention du pic des protéines non adsorbées, toute la quantité injectée est adsorbée par la résine. Le pic obtenu par le tampon d'élution contient la quantité adsorbée de BSA élue d'après les traces de l'électrophorèse (**Fig. 32**), avec une concentration qui est répartie en 4 fractions, la moyenne obtenue est de 0.486 mg/ml après concentration par PEG. Le pic 2 représente l'IgG (**Fig. 32**) où le tampon d'élution utilisé n'a pas pu le désorber, mais c'est le tampon de lavage qui a permis sa désorption avec une concentration de 1.904 g/l après concentration par PEG. On a essayé de varier la concentration de l'un des composants et fixer les autres restants. Par conséquence, on n'a arrivé pas à avoir le retour à la ligne de base.

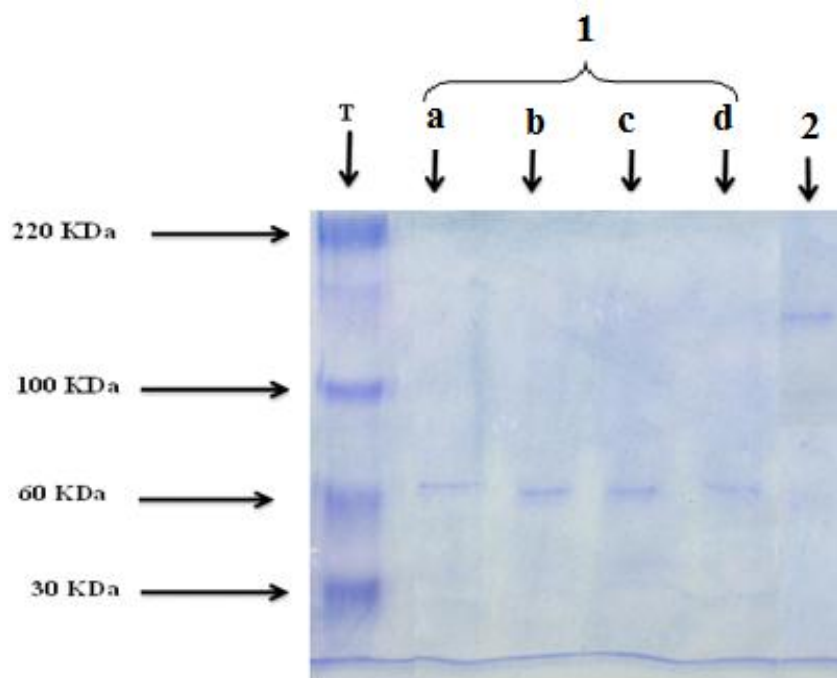


Fig. 32. Electrophorèse (SDS-PAGE) du mélange (BSA-IgG). Puits1: Standards des poids moléculaires. Puits 2, 3, 4 et 5 : les quatre fractions (a, b, c et d) correspondantes au pic 1. Puits 6: lavage par 200 mM NaOH.

D'après ces résultats, on veut vérifier l'effet de ce tampon sur le plasma humain, mais avant de passer au plasma, il faut savoir qu'elle est la concentration qu'il ne faut pas dépasser pour ne pas libérer les métaux.

1.9. Effet des produits sur la résine

Les différentes concentrations des produits utilisés (Tris, NaCl, imidazole et MOPS) ont été passées sur la résine sans l'injection de l'échantillon (**Fig. 33**).

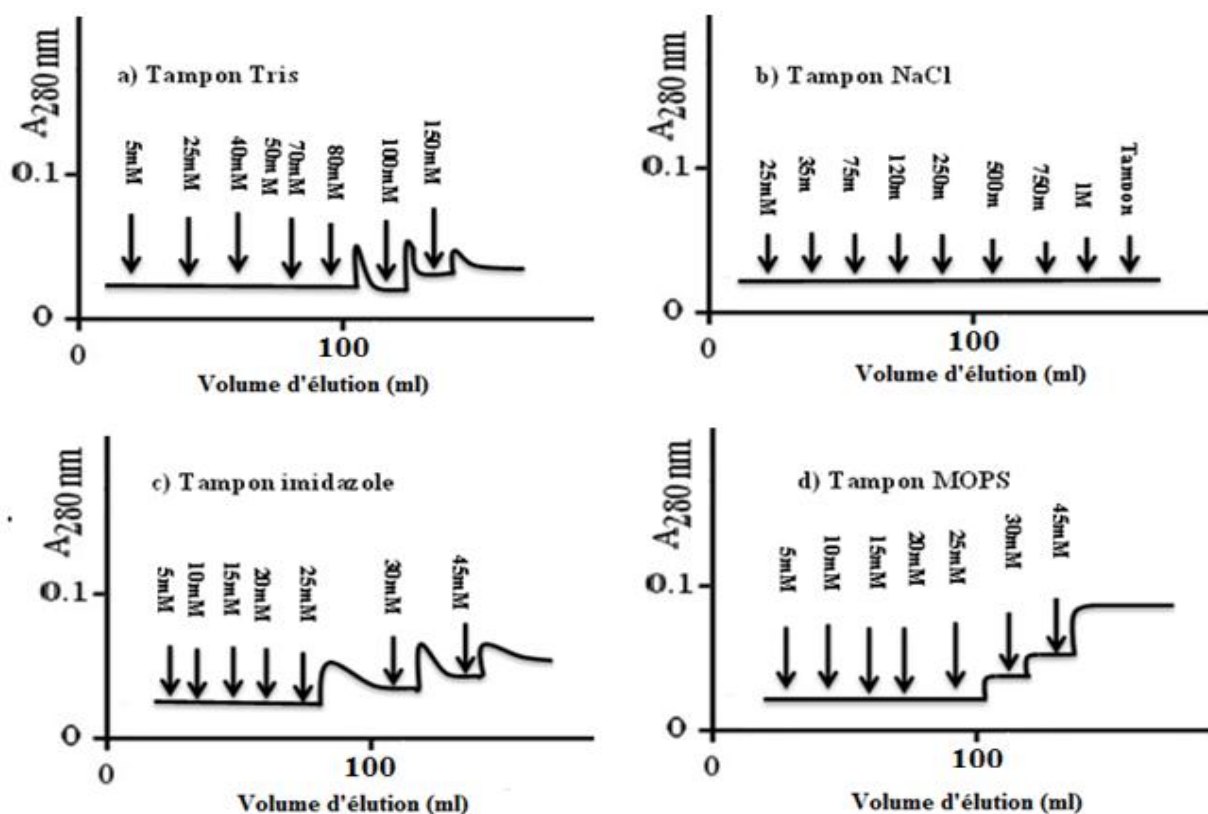


Fig. 33. L'effet des produits sur la résine sans l'injection du plasma. A) Effet de tampon du Tris. b) Effet de tampon du NaCl. c) Effet de tampon de l'imidazole. d) Effet de tampon du MOPS.

Ces résultats ont montré que certains de ces produits agissent sur la résine s'ils dépassent certaines concentrations. En effet, une apparition de petits pics a été constatée lorsqu'on a dépassé 75 mM de Tris et 25 mM de l'imidazole ainsi que du MOPS. Par contre, on a pu varier le NaCl jusqu'à 1 M sans aucun effet. En plus, l'augmentation des concentrations de ces produits est l'un des problèmes qui ne permet pas le retour à la ligne de base dans les tests précédant.

1.10. Effet du tampon (complexe-MOPS) sur la désorption des protéines plasmatiques

Un échantillon de 0.5 ml de plasma humain a été dilué au 1/5 dans le Tris-HCl (5 mM, pH 8). L'adsorption et l'équilibrage ont été menés dans le tampon Tris-HCl (5 mM, pH 8), puis l'élution a été réalisée avec des tampons au même pH, mais avec différentes concentrations de NaCl (35, 50, 100 et 200 mM), en fixant les concentrations du Tris-HCl à 10 mM, de l'imidazole à 10 mM et du MOPS à 10 mM. Le lavage a été réalisé par le NaOH (200 mM, pH 8). Les résultats de fractionnement du plasma humain sur résine-Cu(II) sont présentés dans la **figure 34**.

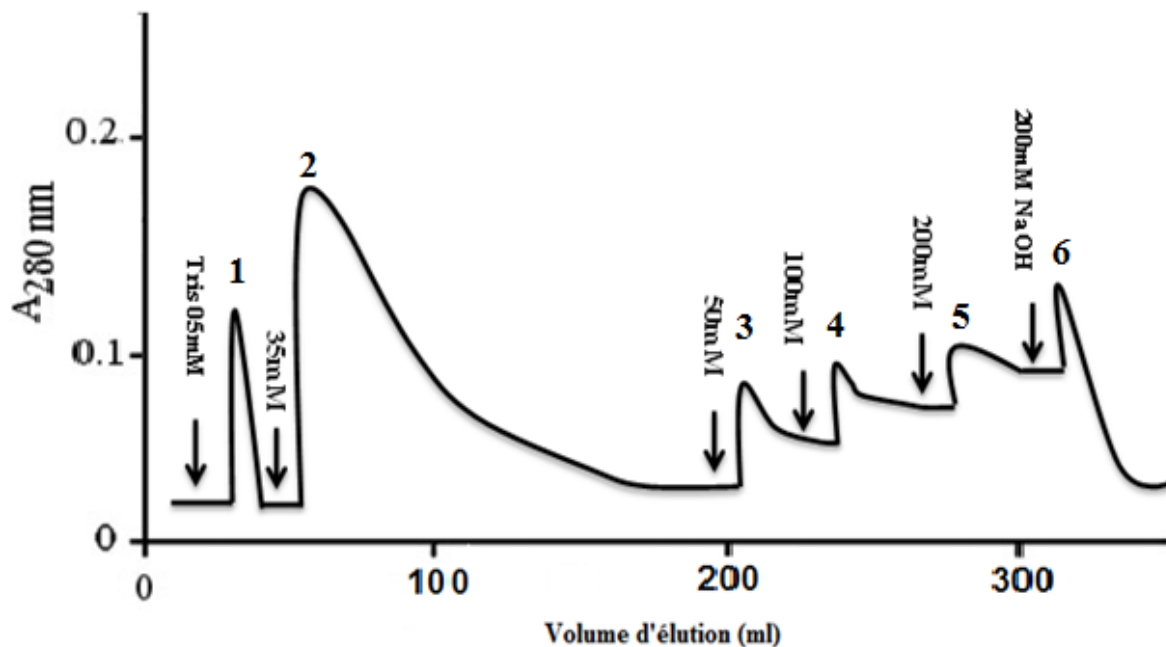


Fig. 34. L'élution du plasma humain sur la résine-Cu(II) par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle des 3 autres variant. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM). Pic 2: 35 mM. Pic 3: 50 mM. Pic 4: 100 mM. Pic 5: 200 mM. Pic 6: 200 mM NaOH.

Le premier pic réalisé par le tampon d'adsorption (Tris-HCl 5 mM) représente des protéines non adsorbées avec une concentration de 5,7 g/l, ainsi que l'électrophorèse qui lui correspond a révélé deux bandes denses et deux bandes claires (puits 3 dans la **figure 35**). Le deuxième pic représente l'albumine humaine pure (correspondante, dans l'électrophorèse, aux bandes des puits 3, 4, 5 et 6) (**Fig. 35**) qui a été récupérée dans 4 tubes de 20 ml chacun. Après concentration par PEG, la moyenne obtenue est de 0.962 g/l. Aucune trace n'est obtenue (puits 7, 8 et 9 de la **figure 35**) par les concentrations 50, 100 et 200 mM, la concentration des protéines étant faible (**Tableau 7**). L'élution avec la solution de lavage 200 mM NaOH représente les protéines que les différentes concentrations du tampon d'élution n'a pas pu désorber, la concentration de cet éluât est de 4.86 g/l, les traces de l'électrophorèse déterminent plusieurs protéines (puits 11). Les puits 1 et 2 sont des tests de migration des protéines plasmatiques et BSA-IgG, respectivement.

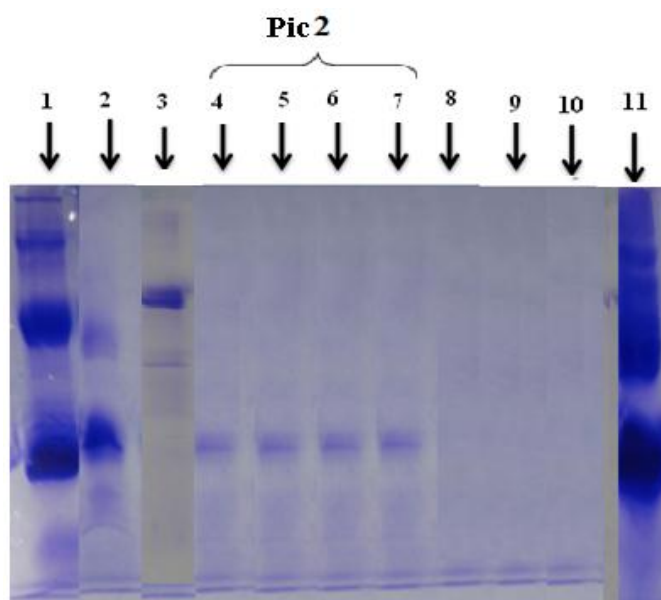


Fig. 35. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration du NaCl. Puits 1: plasma dilué au 1/5. Puits 2: mélange de BSA et IgG. Puits 3: fraction des protéines non adsorbées. Puits 4, 5, 6 et 7 : les quatre fractions correspondantes au pic 2. Puits 8: fraction de 50 mM NaCl. Puits 9: fraction de 100 mM. Puits 10: fraction de 200 mM. Puits 11: fraction de 200 mM NaOH.

Tableau 7. Les résultats de dosage des protéines plasmatique par variation du NaCl et fixation de celle des trois autres variant.

Concentration de la substance variante	Concentration de BSA récupérée (g/l)
Tampon d'adsorption	5.7
25 mM (1)	1.228
25 mM (2)	1.091
25 mM (3)	0.898
25 mM (4)	0.633
50 mM	0.392
100 mM	0.371
200 mM	0.228
200 mM NaOH	4.86

Afin de trouver les conditions d'élution d'IgG et augmenter le rendement de l'albumine humaine récupérée, on a varié les concentrations des différents composants. On n'arrive pas à avoir le retour à la ligne de base dès qu'on a changé les concentrations. Le seul pic qui a permis d'avoir des traces dans l'électrophorèse est obtenu par le tampon (10 mM Tris-HCl, 10 mM MOPS, 35 mM NaCl et 20 mM imidazole), et a permis de déterminer 3 bandes: 2 claires de PM proches (187 et 192 g/mol pour l'IgD et l'IgE respectivement), la troisième est un peu dense de PM 92 g/mol (**Fig. 36**) à une concentration de 1.465 g/l.

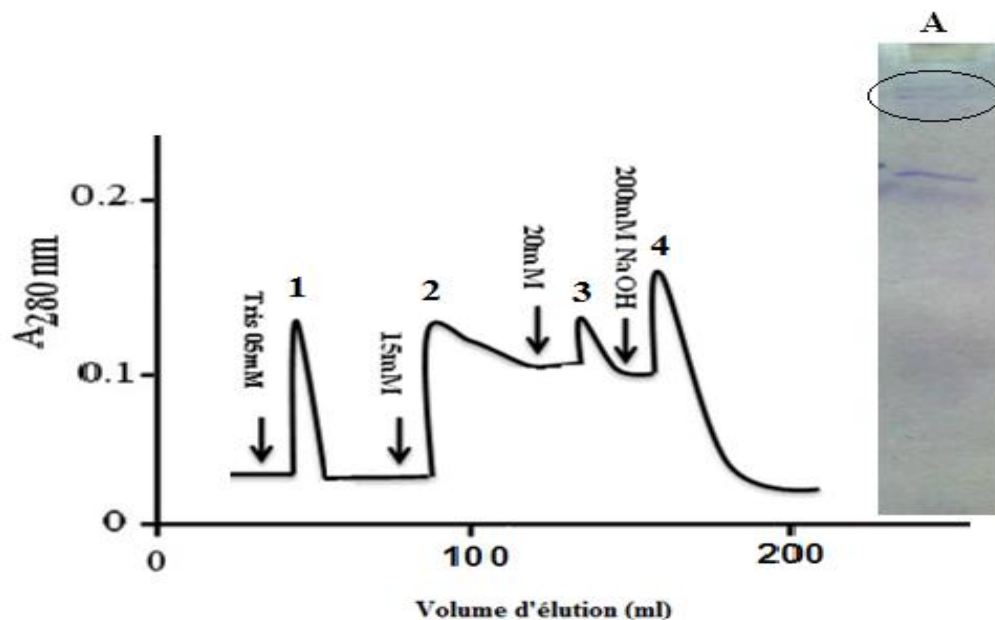


Fig. 36. L'élution du plasma humain sur résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle des 3 autres variant. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption Tris-HCl (5 mM). Pic 2: 15 mM. Pic 3: 20 mM. Pic 4: 200 mM NaOH. A: fraction d'électrophorèse obtenue par 20 mM imidazole.

On a récupéré une quantité de 3.85 g de l'albumine pure à partir du plasma humain par le tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl). Des résultats similaires sont obtenus suite à utilisation d'une résine différente: IDA-Cu(II), ont été rapportés par Konig et Skerra (1998) et par Kovac et ses collaborateurs (2008).

On va changer le tampon Tris-HCl par le tampon phosphate, afin de trouver les conditions de désorption d'IgG et améliorer le rendement d'albumine humaine.

2. Tampon phosphate

2.1. Effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA

L'effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA a été effectué par la variation de sa concentration (15, 30, 50, 75, 120, 160, 200 et 250 mM) avec le même pH 8 (Hansen et Lindeberg, 1995). Les résultats de fractionnement de BSA sur résine-Cu(II) au débit de 0.5 ml/min sont présentés dans la **figure 37**.

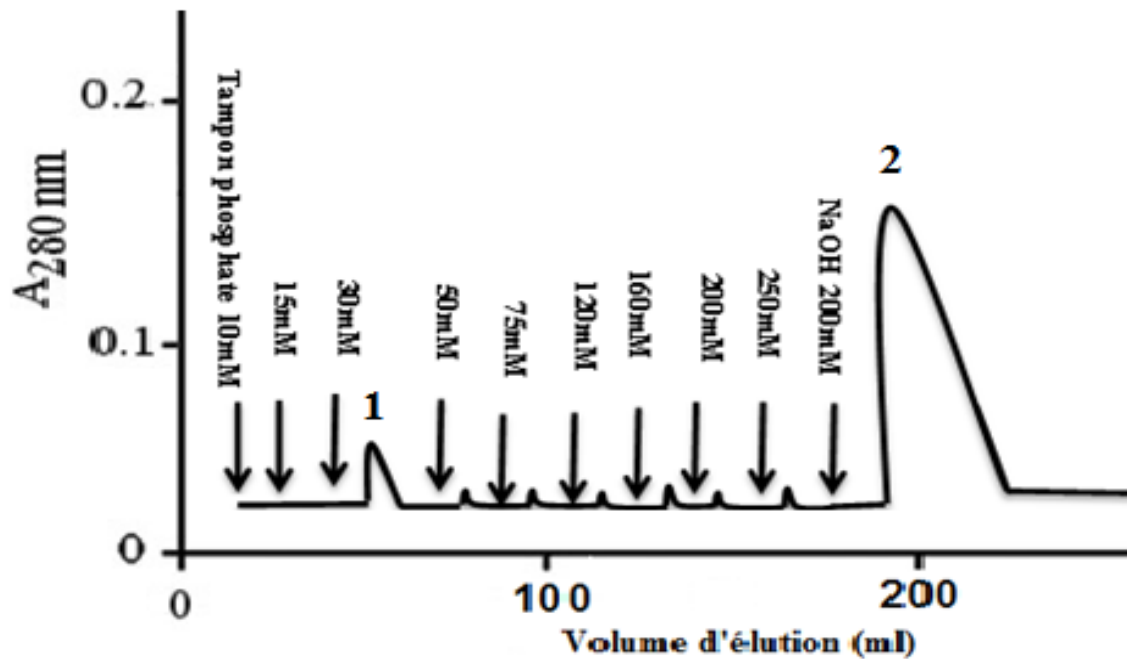


Fig. 37. L'élution par variation de la concentration du tampon phosphate. Pic 1: obtenu par la concentration 30 mM. Pic 2: 200 mM NaOH.

Le résultat de lavage par le tampon d'adsorption (tampon phosphate 10mM) indique que toute la quantité de BSA injectée a été adsorbée par la résine. Les concentrations (15, 50, 75, 120, 160, 200 et 250 mM) ne favorisent pas la désorption du BSA injecté, sauf pour la concentration 30 mM où il y a eu l'apparition d'un petit pic. Le pic 2 obtenu par le tampon de lavage 200 mM NaOH représente des protéines fortement adsorbées à la résine.

Le tampon phosphate seul n'est pas une force suffisante pour avoir une désorption de BSA. On propose d'augmenter la force ionique.

2.2. Effet du NaCl avec le tampon phosphate sur la désorption de BSA

En première étape, la concentration du tampon phosphate a été fixée à 30mM selon les résultats précédents tout en variant la concentration du NaCl (25, 35, 50, 100, 200, 400, 600 et 800 mM). Le lavage a été réalisé avec le tampon 200 mM NaOH (Ivanov *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2007; Prasanna et Vijayalakshmi, 2010). Les résultats de fractionnement de BSA sont présentés dans la **figure 38**.

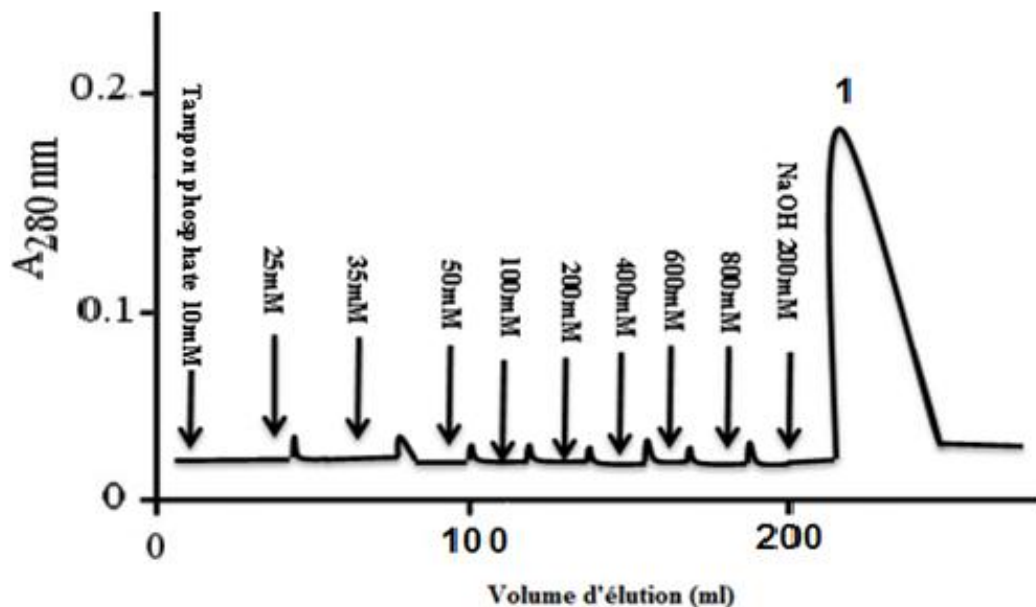


Fig. 38. L'élution par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du tampon phosphate à 30 mM. Pic 1: obtenu par 200 mM NaOH.

Le résultat de lavage par le tampon d'adsorption (tampon phosphate 10 mM) indique que toute la quantité de BSA injectée a été adsorbée par la résine. Les différentes concentrations de NaCl n'ont pas permis l'élution de BSA adsorbée. Le seul pic atteint était obtenu par l'utilisation du tampon de lavage 200 mM NaOH. Pour confirmer ces résultats, on a fixé la concentration du NaCl à 500 mM et on a varié la concentration du tampon phosphate, cependant, on n'a toujours pas eu de résultats. On a conclu que le NaCl avec le tampon phosphate n'agit pas sur la désorption de BSA.

2.3. Effet de l'imidazole avec le tampon phosphate

2.3.1. Injection BSA (2 mg/ml)

Selon Gaberc-Porekar et Menart (2001) ainsi que Prasanna et Vijayalakshmi (2010) avec modifications, l'élution a été réalisée par 30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole. Le lavage a été effectué par le tampon 200 mM NaOH (**Fig. 39**).

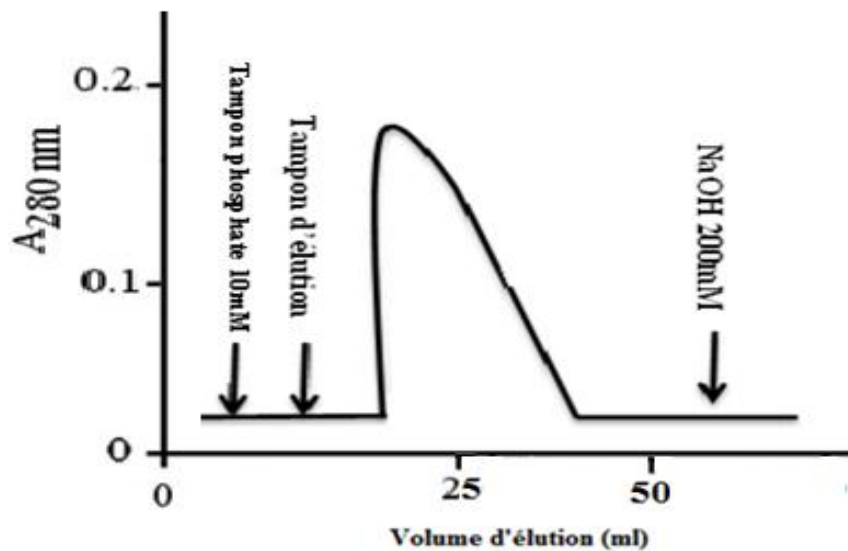


Fig. 39. L'élution de BSA. Pic 1: obtenu par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate, 5 mM imidazole).

Le résultat du lavage par le tampon d'adsorption (tampon phosphate 10 mM) indique que toute la quantité de BSA injectée a été adsorbée par la résine. Le pic a été obtenu par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole). La quantité de BSA a été récupérée dans 2 tubes de 20 ml chacun, et la moyenne obtenue après concentration par PEG est de 0.97 mg/ml. Aucune concentration n'est obtenue avec le tampon de lavage 200 mM NaOH. Une quantité de 1.94 mg de BSA a été récupérée d'une totalité de 2 mg injectée dans la colonne.

2.3.2. Injection d'IgG (2 mg/ml)

En appliquant le même tampon précédant qui a permis de libérer BSA avec la même concentration de 2 mg/ml (**Fig. 40**), une superposition de pic a été remarquée en comparant cette résultat avec celle de la **figure 39**, c'est à dire tous les IgG injectés sont aussi adsorbés sur la résine. On a récupéré 2 tubes de 20 ml chacun dont la moyenne obtenue est de 0.950 mg/ml après concentration par PEG. Aucun pic n'est obtenu avec le tampon de lavage 200 mM NaOH.

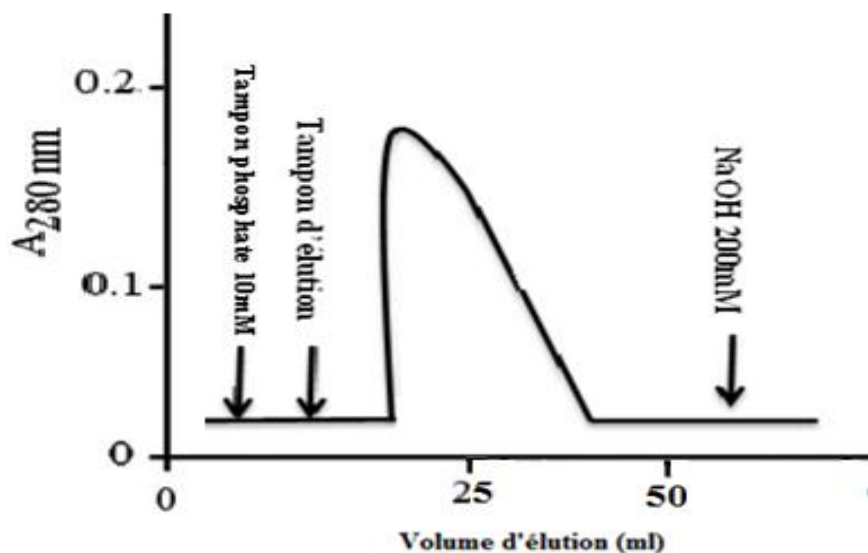


Fig. 40. L'élution d'IgG. Le pic est obtenu par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole).

On a conclu que le tampon de l'élution peut éluer les deux protéines (BSA et IgG). Pour savoir les conditions de désorption de chaque protéine, on a mélangé les deux protéines.

2.3.3. Injection du mélange (BSA-IgG)

Un mélange de 4 mg/ml (2 mg BSA et 2 mg IgG) a été injecté dans la colonne. L'élution a été réalisée au départ par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole) puis en variant la concentration de l'imidazole (**Fig. 41**).

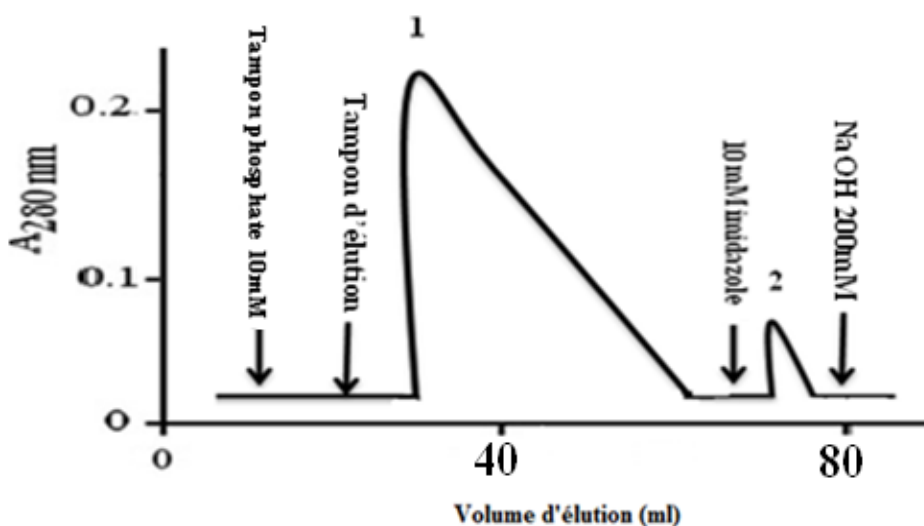


Fig. 41. L'élution du mélange BSA-IgG sur la résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole. Pic 1: fraction du tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole). Pic 2: 10 mM imidazole.

Le résultat du lavage par le tampon d'adsorption (tampon phosphate 10 mM) indique que toute la quantité du mélange BSA-IgG injectée a été adsorbée par la résine. Le pic obtenu par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5mM imidazole) détermine la quantité adsorbée des deux protéines (**Fig. 42**). L'éluat récupéré est réparti en 3 fractions, la moyenne obtenue après concentration par PEG est de 1.08 g/l. L'éluat de la solution tampon (30 mM phosphate et 10 mM imidazole) contient une concentration de 0.725 g/l de BSA seule (**Fig. 42**). Aucun pic n'est obtenu par le tampon de lavage 200 mM NaOH avec une concentration insignifiante de 0.036 g/l.

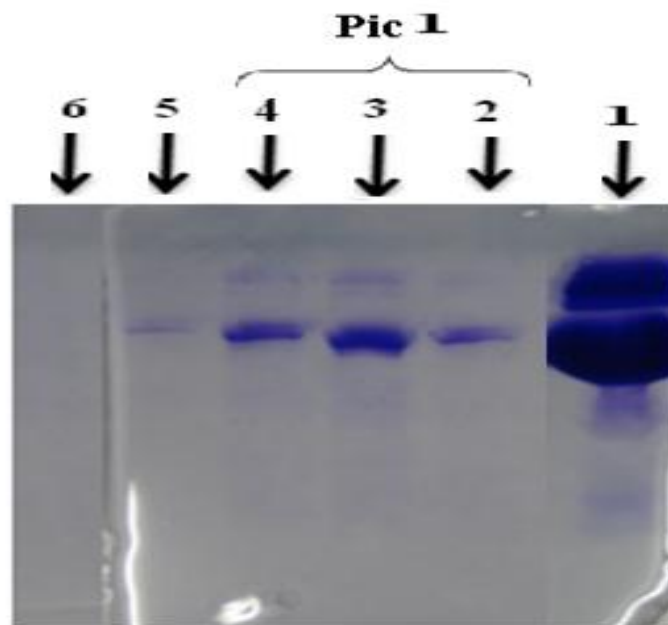


Fig. 42. Electrophorèse (SDS-PAGE) du mélange (BSA-IgG). Puit1: BSA et IgG. Puits 2, 3 et 4 : les trois fractions récupérées correspondantes au pic 1. Puits 5: la fraction de 10 mM imidazole. Puits 6: la fraction de 200 mM NaOH.

Pour connaître les conditions de désorption de chaque protéine, on a décidé de travailler directement sur le plasma.

2.4. Effet de tampon d'élution (Tampon phosphate-imidazole) à la désorption des protéines plasmatiques

Un échantillon de 0.5 ml du plasma humain a été dilué au 1/5 dans le tampon phosphate 10 mM. L'élution a été réalisée avec des tampons aux différentes concentrations de l'imidazole (5 et 10 mM), en fixant la concentration du tampon phosphate à 30 mM. Le lavage a été réalisé par 200 mM NaOH (**Fig. 43**).

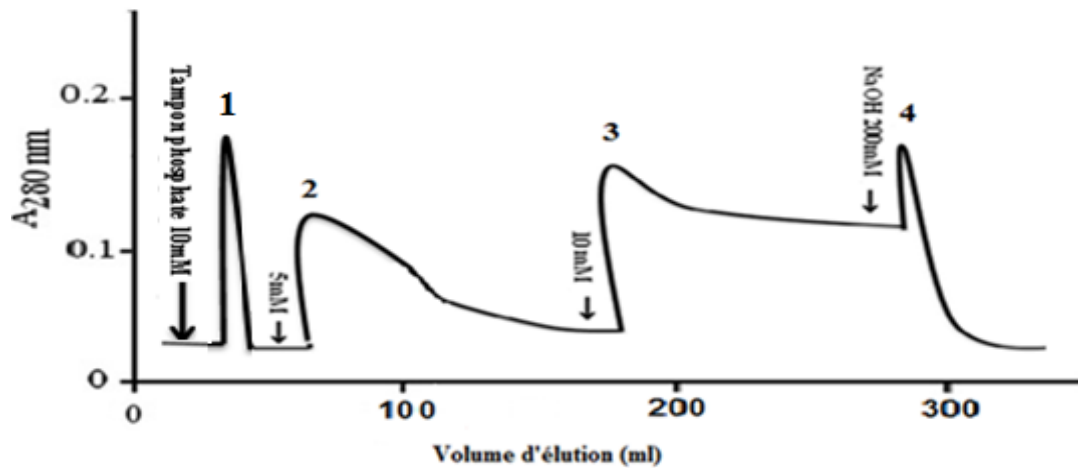


Fig. 43. L'élution du plasma humain sur résine-Cu(II) par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate à 30 mM. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (10 mM tampon phosphate). Pic 2: 5 mM. Pic 3: 10 mM. Pic 4: 200 mM NaOH.

Le pic 1 est obtenu par le tampon d'adsorption (10 mM tampon phosphate), il représente des protéines non adsorbées avec une concentration de 4,81 g/l. Le pic 2 a permis d'obtenir plusieurs fractions, voire 5 tubes de 20 ml chacun, la moyenne récupérée des protéines dans chaque tube, après concentration par PEG, est de 1.265 g/l (**Tableau 8**). D'après les traces de l'électrophorèse, les protéines purifiées sont l'albumine et l'IgG (les puits 1, 2, 3, 4 et 5 de la **figure 44**). Il y a eu l'apparition d'une bande dense d'albumine et une trace très claire d'IgG (puits 6) obtenues par l'imidazole 10 mM (tube 1). Les tubes 2 et 3 obtenus par la concentration 10 mM d'imidazole n'ont montré aucune trace dans l'électrophorèse (puits 7 et 8).

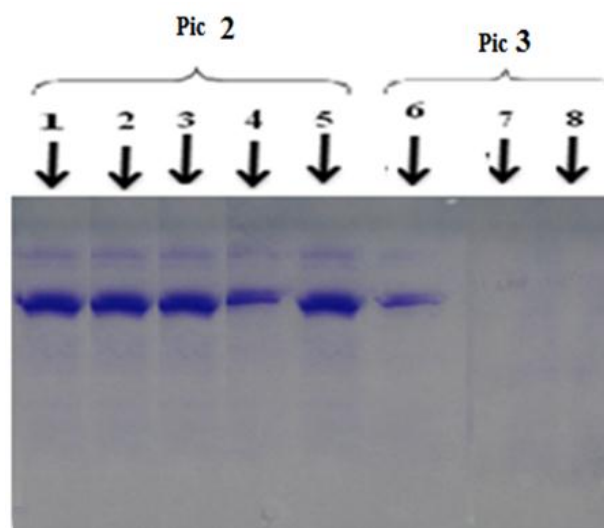


Fig. 44. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration de l'imidazole. Les 5 fractions récupérées par le pic 2 sont présentées dans les puits 1, 2, 3, 4 et 5. Les fractions du pic 3 sont présentées dans les puits 6, 7 et 8.

Tableau 8. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate.

Concentration de la substance variante	Concentration des protéines récupérées (g/l)
Tampon d'adsorption	4.810
5 mM (1)	1.421
5 mM (2)	1.379
5 mM (3)	1.234
5 mM (4)	1.186
5 mM (5)	1.109
10 mM (a)	0.781
10 mM (b)	0.425
10 mM (c)	0.369
200 mM NaOH	2.304

On a essayé de varier la concentration du tampon phosphate et fixé celle de l'imidazole à 5 mM, on a remarqué que dès qu'on varie la concentration on n'arrive pas à avoir un pic, ni le retour à la ligne de base. La concentration n'a pas d'effet sur la désorption de chaque protéine seule (BSA ou IgG), alors on a suggéré d'ajouter un autre produit.

2.4.1. Influence du NaCl

L'élution a été réalisée avec des tampons à différentes concentrations du NaCl (35 et 60 mM), en fixant la concentration du tampon phosphate à 30 mM et de l'imidazole à 5 mM (Vançan *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2010). Les résultats de fractionnement du plasma humain sont présentés dans la **figure 45**.

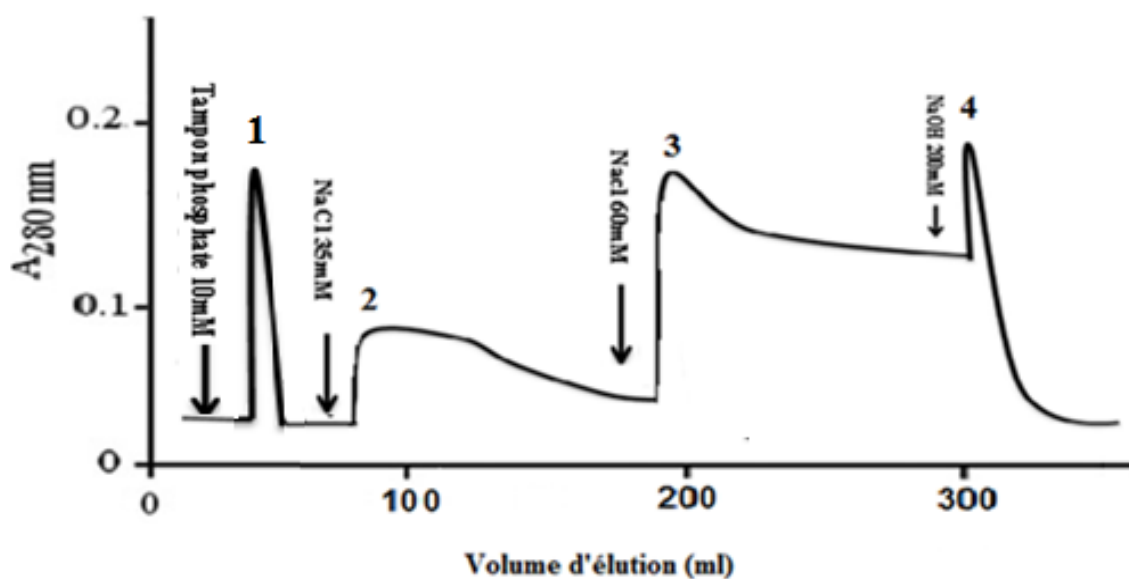


Fig. 45. L'influence de la concentration du NaCl sur la désorption des protéines plasmatiques. Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (10 mM tampon phosphate). Pic 2: 35 mM. Pic3: 60 mM. Pic 4: 200 mM NaOH.

Le pic 1 est obtenu par le tampon d'adsorption (10 mM tampon phosphate) et représente des protéines non adsorbées avec une concentration de 4,390 g/l, d'après leur trace dans l'électrophorèse, on constate 3 bandes denses et 3 bandes claires (**Fig.46**). Le deuxième pic représente l'albumine humaine pure d'après les traces d'électrophorèse (les puits 2, 3 et 4 de la **figure 46**). Elle est récupérée en 3 fractions, chaque tube de 20 ml contient une concentration. Après concentration par PEG, la moyenne d'albumine récupérée dans chaque tube est de 1.083 g/l (**Tableau 9**). Les deux fractions de la concentration 60 mM du NaCl sont représentées par plusieurs bandes de protéines différentes (puits 6 et 7) parmi lesquelles est la bande d'IgG. La concentration des fractions est déterminée dans le **tableau 9**, la désorption par cette concentration n'a pas permis le retour à la ligne de base.

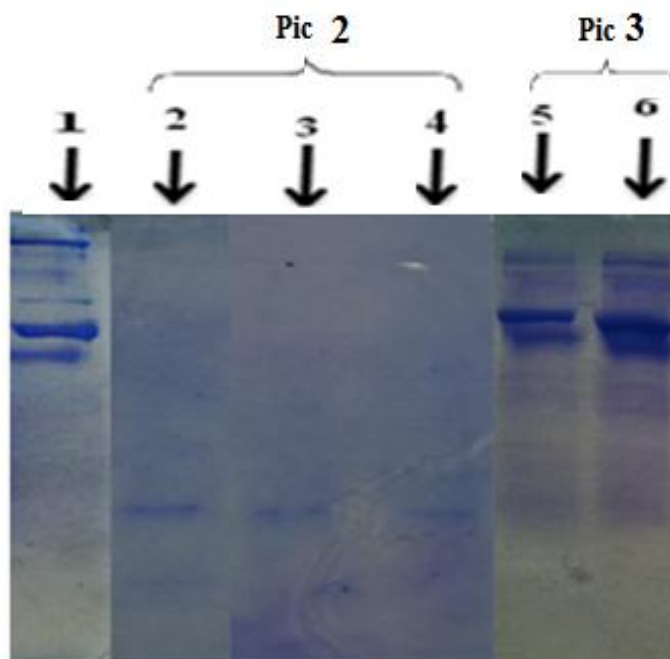


Fig.46. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle de l'imidazole et du tampon phosphate. La fraction du tampon d'adsorption est présentée dans le puits 1. Les fractions du pic 2 sont présentées dans les puits 2, 3 et 4. Les deux fractions du pic 3 sont présentées dans les puits 5 et 6.

Tableau 9. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration du NaCl et fixation de celle du tampon phosphate et de l'imidazole.

Concentration de la substance variante	Concentration des protéines récupérées (g/l)
Tampon d'adsorption	4.390
5 mM (1)	1.386
5 mM (2)	0.955
5 mM (3)	0.909
10 mM (1)	1.871
10 mM (2)	1.665
200 mM NaOH	2.734

On a récupéré une quantité de 3.25 g d'albumine pure à partir du plasma humain par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate, 35 mM NaCl et 5 mM imidazole). Des résultats similaires par l'utilisation des polymères différents: Le gel d'agarose-TREN (Boden *et al.*, 1995), Ni (II)-TRENPEVA (Ribeiro *et al.*, 2008).

2.4.2. Influence du MOPS

L'élution a été réalisée avec des tampons à différentes concentrations de l'imidazole (5, 10, 15 et 20 mM), en fixant la concentration du tampon phosphate à 30 mM et celle du MOPS à 5 mM (de Souza *et al.*, 2010). Les résultats de fractionnement du plasma humain sont présentés dans la **figure 47**.

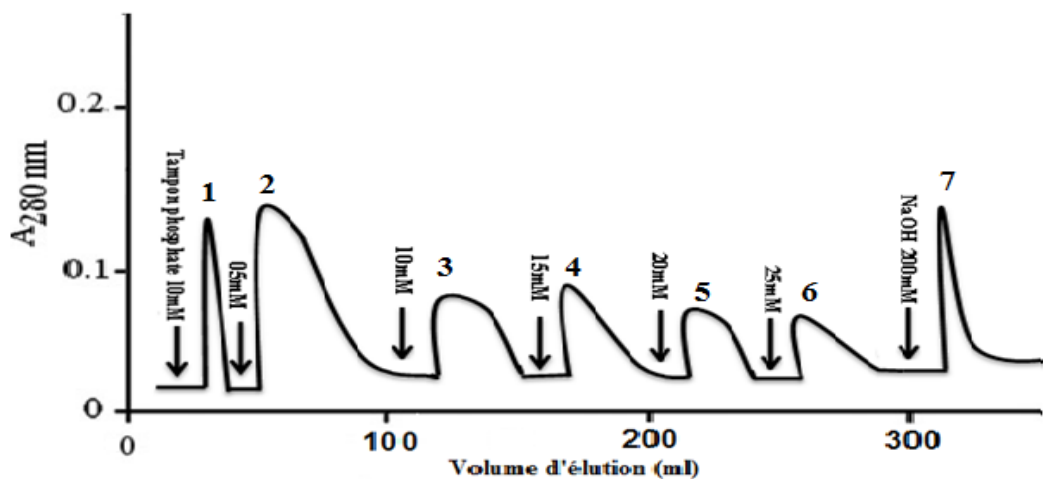


Fig. 47. L'influence de la concentration de l'imidazole sur la désorption des protéines plasmatiques en ajoutant du MOPS (5 mM). Pic 1: obtenu par le tampon d'adsorption (10 mM tampon phosphate). Pic 2: 5 mM. Pic 3: 10 mM. Pic 4: 15 mM. Pic 5: 20 mM. Pic 6: 25 mM. Pic 7: 200 mM NaOH.

Le premier pic est obtenu par le tampon d'adsorption (tampon phosphate 10 mM), il contient des protéines non adsorbées avec une concentration de 4,598 g/l, d'après leurs traces dans l'électrophorèse, on constate 4 bandes denses et 3 bandes claires (**Fig. 48**). Le deuxième et le troisième pic (5 et 10 mM imidazole) présentent une quantité d'IgG pure (les puits 2, 3, 4, 5 et 6 de la **figure 48**) récupérée dans 5 tubes de 20 ml chacun, après concentration par PEG, la moyenne d'IgG récupérée dans chaque tube est de 0.6 g/l (**Tableau 10**). Les concentrations 15, 20 et 25 mM d'imidazole ne permettent pas de purifier une protéine précise, leurs traces dans l'électrophorèse montrent plusieurs bandes de PM différents, la concentration de chaque fraction est présentée dans le **tableau 10**. L'élution avec la solution de lavage 200 mM NaOH représente les protéines fortement liées à la résine, la concentration de cet éluât est de 2.946 g/l.

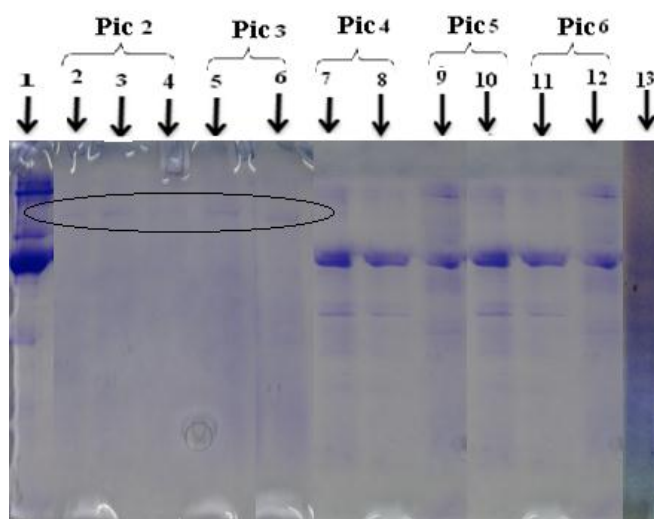


Fig. 48. Electrophorèse (SDS-PAGE) du plasma humain purifié par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du MOPS et du tampon phosphate. La fraction du tampon d'adsorption est présentée dans le puits 1. Les fractions du pic 2 sont présentées dans les puits 2, 3 et 4. Les fractions du pic3 sont présentées dans les puits 5 et 6. Les fractions du pic 4 sont présentées dans les puits 7 et 8. Les fractions du pic 5 sont présentées dans les puits 9 et 10. Les fractions du pic 6 sont présentées dans les puits 11 et 12. Puits 13: fraction du 200 mM NaOH.

Tableau 10. Les résultats du dosage des protéines plasmatiques par variation de la concentration de l'imidazole et fixation de celle du tampon phosphate et du MOPS.

Concentration de la substance variante	Concentration des protéines récupérées (g/l)
Tampon d'adsorption	4.598
5 mM (1)	0.598
5 mM (2)	0.619
5 mM (3)	0.575
10 mM (1)	0.632
10 mM (2)	0.576
15 mM (1)	1.765
15 mM (2)	1.364
20 mM (1)	1.235
20 mM (2)	1.206
25 mM (1)	1.174
25 mM (2)	1.097
200 mM NaOH	2.946

On a récupéré une quantité de 3 g d'IgG pure à partir du plasma humain, en ajoutant au tampon d'élution (10 mM tampon phosphate, 5 mM MOPS) une faible concentration de l'imidazole (5 ou 10 mM). Des résultats similaires par l'utilisation des polymères différents: IDA-Cu(II) (Kumar *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008), TREN-Novarose et Aminohexyl-agarose (Bresolin *et al.*, 2009) et CIM-IDA-Cu(II) (Prasannaa et Vijayalakshmia, 2010).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale

Le système IMAC est employé dans le secteur biomédical pour la purification de diverses macromolécules spécifiques telles que les anticorps, les messagers cellulaires (Interférons) ou tout autre biomolécules d'intérêts (protéines, enzymes). De plus, il présente une certaine diversité quant aux types de supports utilisés : billes, granules, membranes et gels (Kovac *et al.*, 2008). En effet, plusieurs supports de type IMAC sont commercialement disponibles mais souvent à des coûts élevés (Dong *et al.*, 2009). L'événement fondamental menant à l'adsorption de la protéine dans l'IMAC est la liaison de coordination entre les ions métalliques sur la surface chromatographique et les groupes des donneurs d'électrons sur la surface de la protéine. Ainsi, l'attachement implique plusieurs acides aminés notamment l'histidine ainsi que d'autres acides aminés tels que la cystéine, l'arginine, la méthionine, la lysine, la tyrosine et le tryptophane. Les groupes exposés d'imidazole et de thiol des protéines sont les accepteurs les plus importants du cuivre immobilisé (Chaga, 2001; Prasanna et Vijayalakshmi, 2010).

L'objectif de ce travail consiste à vérifier la capacité du support testé dans la présente étude [N,N-bis(salicylidene)propylenetriamine]-aminométhyl polystyrène] de purifier des protéines plasmatiques.

Des expériences avec le plasma humain ont indiqué qu'on peut séparer les protéines du plasma en utilisant l'éluant Tris-HCl (Qiu *et al.*, 2007; Charef *et al.*, 2010). L'effet du tampon Tris-HCl sur la désorption des protéines fixées à la résine a été suivi par le changement de sa concentration progressive et dégressive. Les résultats ont montré que le tampon Tris-HCl est une force capable de désorber les protéines mais qui ne permet pas le retour à la ligne de base, ce qui laisse supposer que soit la quantité et le volume des protéines injectées sont très élevés, soit le Tris-HCl seul n'est pas une force suffisante pour la désorption des protéines fixées à la résine.

Pour prouver que cette hypothèse est valable c.à.d. la concentration élevée des protéines, on a varié la concentration des protéines plasmatiques par une dilution successive, cela a laissé constater que même à une faible dilution du plasma (1/100), il n'y a pas de retour à la ligne de base.

D'autre part, l'effet du pH est détecté en fixant la concentration du Tris-HCl à 25 mM et en variant le pH de manière décroissante de 8 à 2 de façon à isoler la protéine d'intérêt afin de modifier ses conditions de solubilité en solution. Aucune fraction de protéine, en variant le

pH, n'a été désorbée. Le seul résultat a été obtenu par la solution d'adsorption pH 8. Selon ces résultats, il s'est avéré indispensable de travailler à pH 8. Les résultats obtenus étaient similaires à ceux de Vançan et ses collaborateurs (2002).

Afin de prouver la deuxième hypothèse que le tampon Tris-HCl n'est pas une force suffisante pour pouvoir retourner à la ligne de base, la force ionique a été augmentée en ajoutant le NaCl et le retour à ligne de base n'est toujours pas constaté.

Différentes concentrations de l'imidazole ont été ajoutées au tampon Tris-HCl pour augmenter la force ionique, mais le retour à ligne de base n'a pas eu lieu. Après cette constatation on a pensé d'augmenter la force ionique en mélangeant les trois composants précédents (Tris-HCl, NaCl et imidazole).

Le plasma contient des protéines différentes dont les plus dominantes, selon notre enquête, sont la BSA et l'IgG, la raison pour laquelle, ces deux protéines ont été utilisées. L'élution par le complexe (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl et 10 mM imidazole) a permis d'obtenir une adsorption et une désorption de BSA, ainsi que le retour à la ligne de base. On n'a pas pu libérer la quantité de BSA injectée en utilisant une seule concentration mais via plusieurs concentrations du tampon. On a proposé de modifier les concentrations des autres composants pour l'élution totale par un seul tampon. Les résultats obtenus ont permis de constater que le problème ne réside pas dans la concentration des composants du tampon, d'où l'omission d'une autre hypothèse: ajouter une autre force ionique à ce tampon.

L'ajout d'une faible concentration d'EDTA au tampon précédant n'était pas l'idée idéale parce que l'EDTA chélate les métaux fixés à la résine. Donc à sa place, on a ajouté une faible concentration du MOPS. Le tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 35 mM NaCl, 10 mM imidazole et 10 mM MOPS) a permis de récupérer toute la quantité de BSA injectée dans la colonne.

En appliquant le même tampon précédant qui a permis de libérer la BSA avec la même concentration de l'IgG, les mêmes résultats ont été obtenus. On a conclu alors que ce tampon peut éluer les deux protéines (BSA et IgG). Pour déterminer les conditions de désorption de chaque protéine, les deux protéines ont été mélangées. Le pic obtenu par le tampon d'élution représente uniquement la quantité adsorbée de BSA d'après l'électrophorèse, alors que l'IgG a été récupéré par le tampon de lavage 200 mM NaOH. En se basant sur ces résultats, on a appliqué ce tampon sur le plasma humain.

Les résultats de fractionnement du plasma humain obtenus par le tampon d'élution (10 mM Tris-HCl, 10 mM imidazole, 10 mM MOPS et 35 mM NaCl) à pH 8, indiquent que

la résine-Cu(II) était capable de purifier l'albumine d'après (SDS-PAGE). L'éluât a été récupéré dans 4 tubes de 20 ml chacun. Après concentration par PEG, la moyenne obtenue est de 0.962 g/l. Des résultats similaires sont obtenus suite à l'utilisation d'une résine différente: IDA-Cu(II), ont été rapportés par König et Skerra (1998) et par Kovac et ses collaborateurs (2008).

Pour trouver les conditions d'élution de l'IgG et augmenter le rendement de l'albumine humaine récupérée, on a varié les concentrations des différents composants. On a constaté l'absence du retour à la ligne de base. Le seul pic qui a permis d'avoir des traces dans l'électrophorèse est obtenu par le tampon (10 mM Tris-HCl, 10 mM MOPS, 35 mM NaCl et 20 mM imidazole). En plus, l'éluât qui correspond à ce pic a permis de déterminer les protéines IgD et l'IgE, ainsi qu'une autre protéine de PM 92 g/mol par l'électrophorèse (SDS-PAGE).

On a changé le tampon Tris-HCl par le tampon phosphate afin de déterminer les conditions de désorption de l'IgG et ainsi améliorer le rendement de l'albumine humaine.

L'effet de la concentration du tampon phosphate sur la désorption de BSA a été effectué par le changement de sa concentration. Le tampon phosphate seul n'est pas une force suffisante pour avoir une désorption de BSA. L'augmentation de la force ionique par des concentrations différentes du NaCl n'a toujours pas permis la désorption de BSA adsorbée à la résine.

Le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole) a permis de récupérer la totalité de BSA injectée dans la colonne. En appliquant sur la résine le même tampon précédant dont l'échantillon est l'IgG, les mêmes résultats ont été obtenus. On a conclu que le tampon d'élution peut éluer les deux protéines (BSA et IgG). Pour trouver les facteurs permettant la désorption de chaque protéine, les deux protéines ont été mélangées.

L'éluât récupéré par le tampon d'élution (30 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole) détermine la quantité adsorbée des deux protéines. L'éluât de la solution tampon (30 mM phosphate et 10 mM imidazole) représente la BSA pure. Pour déterminer les conditions de désorption de chaque protéine, on a décidé de travailler directement sur le plasma.

Les résultats de l'électrophorèse ont montré que les protéines plasmatiques éluées par le tampon d'élution (10 mM tampon phosphate et 5 mM imidazole) sont l'albumine et l'IgG. La variation de la concentration de l'imidazole et la fixation de celle du tampon phosphate à 30 mM n'a pas permis d'avoir le retour à la ligne de base. La concentration du tampon

phosphate n'a pas d'effet sur la désorption de chaque protéine toute seule, alors on a suggéré d'ajouter un autre produit.

L'élution a été réalisée avec des tampons à différentes concentrations de NaCl, en fixant la concentration du tampon phosphate à 30 mM et de l'imidazole à 5 mM. Le pic obtenu représente de l'albumine pure selon l'électrophorèse. L'éluât a été récupérée en 3 fractions, après concentration par PEG, la moyenne d'albumine récupérée dans chaque tube est de 1.083 g/l. Des résultats similaires par l'utilisation des polymères différents: le gel d'agarose-TREN (Boden *et al.*, 1995) et Ni (II)-TRENPEVA (Ribeiro *et al.*, 2008).

L'élution a été réalisée avec des tampons à différentes concentrations de l'imidazole, avec fixation de la concentration du tampon phosphate à 30 mM et du MOPS à 5 mM. Les deux concentrations d'imidazole 5 et 10 mM permettent de purifier une quantité pure d'IgG. L'éluât a été récupérée dans 5 tubes de 20 ml chacun, après concentration par PEG, la moyenne de l'IgG récupérée dans chaque tube est de 0.6 g/l. Des résultats similaires par l'utilisation des polymères différents: IDA-Cu(II) (Kumar *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008), TREN-Novarose et Aminoethyl-agarose (Bresolin *et al.*, 2009) et CIM-IDA-Cu(II) (Prasanna et Vijayalakshmia, 2010).

En conclusion, la résine est une bonne matrice chélatrice de métaux bivalents et peut être utilisée pour la purification des IgG et des HSA du plasma humain à des fins diagnostiques et/ou thérapeutiques.

Cette technique reste cependant insuffisante pour l'évaluation des dérivés protéiques du plasma à usage médical, comme elle ne permet pas la détermination des groupes latéraux d'acides aminés responsables de cette interaction.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

References bibliographies

- Abraham R.S., Charlesworth M.C., Owen B.A., Benson L.M., Katzmann J.A. and Reeder C.B. (2002). Trimolecular complexes of lambda light chain dimers in serum of a patient with multiple myeloma. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 48, 1805-1811.
- Akamatsu Y., Pakabunto K., Xu Z., Zhang Y. and Tsurushita N. (2007). Whole IgG surface display on mammalian cells: Application to isolation of neutralizing chicken monoclonal anti-IL-12 antibodies. *Journal of Immunological Methods*. 327, 40-52.
- Alam H.B., Stanton K., Koustova E., Burris D., Rich N. and Rhee P. (2004). Effect of different resuscitation strategies on neutrophil activation in a swine model of hemorrhagic. *Shoke. Resuscitation*. 60, 97-99.
- Anderson N.L. and Anderson N.G. (2002). The human plasma proteome: history, character and diagnostic prospects. *Molecular & cellular Proteomics*. 1, 845-867.
- Anolik J.H., Campbell D., Felgar R.E., Young F., Sanz I., Rosenblatt J. and Looney R.J. (2003). The relationship of FcγRIIIa RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*. 48, 455-461.
- Anspach B.F. (1994). Silica-based metal chelate affinity sorbents 1. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques. *Journal of Chromatography A*. 672, 35-49.
- Anspach F.B., Curbelo D., Hartmann R., Garke G. and Deckwer W.D. (1999). Expanded-bed chromatography in primary protein purification. *Journal of Chromatography A*. 865, 129-144.
- Arques S. (2001). Serum albumin and heart failure: Recent advances on a new paradigm. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*. 60, 272-278.
- Bach-Nogohou K., Schmitt D. and Ghirigge P.L. (2005). Les dysalbuminémies. *Annals of Biology*. 63(2), 127-134.
- Bal W., Christodoulou J., Sadler P.J. and Tucker A. (1998). Multi-metal binding site of serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 70, 33-39.
- Ballmer P.E. (2001). Causes and mechanisms of hypoalbuminaemia. *Clinical Nutrition*. 20, 271-273.
- Basset C., Dedieu A., Guérin P., Quéméneur E., Meyer D. and Vidaud C. (2008). Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1185, 233-240.
- Baty D. and Chames P. (2006). Approved antibodies for imaging and therapeutic: an update. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*. 21, 255-263.
- Block G., Dietrich M., Norkus E.P., Morrow J.D., Hudes M. and Caan B. (2002). Factors associated with Oxidative stress in human populations. *American Journal of Epidemiology*. 156, 274-285.
- Blumberg L.M. (2011). Metrics of separation performance in chromatography. Part 1. Definitions and application to static analyses. *Journal of Chromatography A*. 1218, 5375- 5385.
- Boden V., Winzerling J., Vijayalakshmi M. and Porath J. (1995). Rapide one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography. *Journal of Immunological Methods*. 181, 225-232.
- Boldt J., Brosch C., Ducke M., Papsdorf M. and Lehmann A. (2007). Influence of volume therapy patients with compromised renal function: a comparison with human albumin. *Critical Care Medicine*. 35, 2740-2746.

- Botros H.G., Birkenmeier G., Otto A., Kopperschlager G. and Vijayalakshmi M.A. (1991). Immobilized metal ion affinity partitioning of cells in aqueous two phase systems: erythrocytes as a mode. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1074, 69-73.
- Branden C. and Tooze J. (1999). Introduction to protein structure. 2^{ed} ed. *Garl and Publishing New-York*. 157,158.
- Bresolin I.T., Borsoi-Ribeiro M., Caro J.R., Santos F.P., de Castro M.P. and Bueno S.M. (2009). Adsorption of human serum proteins onto TREN-agarose: Purification of human IgG by negative chromatography. *Journal of Chromatography B*. 877, 17-23.
- Camperi S.A., Grasselli M. and Cascone O. (2000). High-speed pectic enzyme fractionation by immobilised metal ion affinity membranes. *Bioseparation*. 9, 173-177.
- Candiano G., Petretto A., Bruschi M., Santucci L., Dimuccio V., Prunotto M., Gusmano R., Urbani A. and Ghiggeri G.M. (2009). The oxido-redox potential of albumin Methodological approach and relevance to human diseases. *Journal of Proteomics*. 73, 188-195.
- Cantin A.M., Paquette B., Richter M. and Larivee P. (2007). Albumin-mediated regulation of cellular glutathione and nuclear factor kappa B activation. *Free Radical Biology & Medicine*. 162, 1539-1546.
- Carballal S., Radi R. and Kirk M.C. (2003). Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*. 42, 9906-9914.
- Chaga G.S. (2001). Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journat of Biochemical and Biophysical Methods*. 49, 313-334.
- Charef N., Arrar L., Lamaaoui A., Boudjellal H., Baghiani A., Hanachi N., Boumerfeg S., Khennouf S. and Mubarak M.S. (2010). Effect of Adsorbed Metal Ions and Buffer Nature on IgG separation from Human Plasma by Column Chromatography Using an Ion Exchange Resin, Amberlite IRC-718. *Journal of Applied Polymer Science*. 115, 324-32.
- Charef N., ARRAR L., Ourari A., Zalloum R.M. and Mubarak M.S. (2010). Synthesis and Chelating Properties of Polystyrene Supported Schiff Base (N,N- disalicyliden epropylenetriamine) Resin Toward Some Divalent Metal Ions. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*. 47, 177-184.
- Chothia C. and Jones E. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annual Review of Biochemistry*. 66, 823-862.
- Christi H., Kogel-Knabner L. and Kretschmar R. (2000). Chemical heterogeneity of humic substance: characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration. *European Journal of Soil Science*. 51, 617-625.
- Christiansen M.S., Hommel E., Friberg L., Molvig J., Magid E. and Rasmussen B. (2010). Increased urinary orosomucoid excretion is not related to impaired renal function in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*. 24(1), 28-36.
- Cochrane I. (1998). Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. *The Annals of Thoracic Surgery*. 317, 235-240.
- Congy-Jolivet N., Probst A., Watier H. and Thibault G. (2007). Recombinant therapeutic monoclonal antibodies: mechanisms of action in relation to structural and functional duality. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 64, 226-233.
- Cragg S.M. and Glennie J.M. (2004). Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood*. 103, 2738-2743.
- Crawford J., Ramakrishnan S., Periera P., Gardner S., Coleman M. and Beitle R. (1999). Immobilized Metal Affinity Membrane Separation: Characteristics of Two Materials of Differing Preparation Chemistries. *Separation Science and Technology*. 34, 2793 -2802.
- Crook M.A. (2009). Hypoalbuminemia: The importance of correct interpretation. *Nutrition*. 25(10), 1004-1005.

- Czernik A., Beutner E.H. and Bystryń J. (2008). Intravenous immunoglobulin selectivity decreases circulating autotibidies in pemphigus. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 58, 796-801.
- Daley L.P., Gagliardo L.F., Duffy M.S., Smith M.C. and Appleton J.A. (2005). Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(3), 380-386.
- Dalziel J.E., Wong S.S., Phung T., Zhang Y.L. and Dunlop J. (2007). Expression of human BK ion channels in Sf 9 cells, their purification using metal affinity chromatography, and functional reconstitution into planar lipid bilayers. *Journal of Chromatography B*. 857, 315-321.
- de Goes L.C., Miranda E.A. and Bueno S.M. (2010). Interaction of histidine-tagged human proinsulin with immobilized nickel ion: Effect of chelating ligand and thermodynamics analysis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 369, 176-185.
- de Souza M.C., Bresolin I.T. and Bueno S.M. (2010). Purification of human IgG by negative chromatography on ω -aminohexyl-agarose. *Journal of Chromatography B*. 878, 557-566.
- Dellinger R.P., Levy M.M. and Carlet J.M. (2008). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine*. 34, 17-60.
- Donadio C., Tognotti D. and Donadio E. (2012). Albumin modification and fragmentation in renal disease. *Clinica Chimica Acta*. 413(4), 391-395.
- Dong X.Y., Chen L.J. and Sun Y. (2009). Refolding and purification of histidine-tagged protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1216, 5207-5213.
- Elsadek B. and Kratz F. (2012). Impact of albumin on drug delivery-New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release*. 157, 4-28.
- Fasano M., Curry S. and Terreno E. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. 57, 787-796.
- Faure P., Wiernsperger N., Polge C., Favier A. and Halimi S. (2008). Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clinical science*. 114, 251-256.
- Feldman M., Soni N. and Dickson B. (2005). Influence of hypoalbuminemia or hyperalbuminemia on the serum anion gap. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 146(6), 317-320.
- Feng G., Hu D., Yang L., Cuic Y., Cui X. and Li H. (2010). Immobilized-metal affinity chromatography adsorbent with paramagnetism and its application in purification of histidine-tagged proteins. *Separation and Purification Technology*. 74, 253-260.
- Fieschi C., Malphettes M., Galicier L. and Oksenhendler E. (2006). Hypogammaglobulinémies primitives découvertes à l'âge adulte. *Presse Medical*. 35, 887-894.
- Finfer S., Bellomo R. and Boyce N. (2004). A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *New England journal of Human Services*. 350, 2247-2256.
- Folléa G. and Cazenave J.P. (1997). Produits dérivés du plasma: des produits biologiques à effet thérapeutique. *Transfusion Clinique et Biologique*. 4, 227-240.
- Friedlander E., Barok M., Szollosi J. and Vereb G. (2008). ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. *Immunology Letters*. 116, 126-140.
- Gaberc-Porekar V. and Menart V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 49, 335-360.
- Giangrande P.L. (2000). The history of blood transfusion. *British Journal of Haematology*. 110, 758-767.

- Girón-González J.A., Baturone R., Soto M.J., Márquez M., Macías I., Oca M., Medina F., Chozas N. and García-Pérez S. (2009). Implications of immunomodulatory interleukins for the hyperimmunoglobulinemia of Sjogren's syndrome. *Cellular Immunology*. 259, 56–60.
- Golay J., Zaffaron L., Vaccari T., Lazzari M., Borleri G.M., Bernasconi S., Tedesco F., Rambaldi A. and Introna M. (2000). Biologic response of B lymphoma cells to anti CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement mediated cell lysis. *Blood*. 95, 3900-3908.
- Gonzalez R., Andrews B.A. and Asenjo J.A. (2002). Kinetic model of BiP and PDI mediated protein folding and assembly. *Journal of Theology for Biology*. 214(4), 529-537.
- Gryzunov Y.A., Arroyo A., Vigne J.L., Zhao Q., Tyurin V.A., Hubel C.A., Gandley R.E., Vladimirov Y.A., Taylor R.N. and Kagan V.E. (2003). Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 413, 53-66.
- Guex N. and Peitsch M.C. (1997). SWISS-MODEL and the swiss-pdb viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 18, 2714-2723.
- Hansen P. and Lindeberg G. (1995). Importance of the α -amino group in the selective purification of synthetic histidine peptides by immobilised metal ion affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 690, 155-159.
- Hermida L., Rodriguez R., Lazo L., Lopez C., Marquez G., Paez R., Suarez C., Espinosa R., Garcia J., Guzman G. and Guillén G. (2002). A recombinant envelope protein from Dengue virus purified by IMAC is bioequivalent with its immune-affinity Chromatography purified counterpart. *Journal of Biotechnology*. 94, 213-216.
- Hochuli E., Doebeli H. and Schacher A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*. 411, 177-184.
- Holland P.C., Hancock S.W., Hodge D., Thompson D., Shires S. and Evans S. (2001). Degradation of albumin in meningococcal sepsis. *The Lancet*. 357, 2102-2104.
- Hong C.H., Lee C.H., Chang L.W., Chiou M.H., Hsieh M., Kao Y. and Yu H. (2008). Anti-endothelial cell IgG from patients with chronic arsenic poisoning induces endothelial proliferation and VEGF-dependent angiogenesis. *Microvascular Research*. 76, 194-201.
- Hoogenboom H. and Winter G. (1992). Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH genes segments rearranged in vitro. *Journal of Molecular Biology*. 277, 381-388.
- Hopps E., Noto D., Caimi G. and Aversa M. (2010). A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 20(1), 72-77.
- Horowitz I.N. and Tai K. (2007). Hypoalbuminemia in critically ill children. *Archives de pediatrie*. 161, 1048-1052.
- Hu Y.C., Bentley W.E., Edwards G.H. and Vakharia V.N. (1999). Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnoogy and Bioengineering*. 63, 721-729.
- Huang X.H., Chen L., Gao W., Zhang W., Chen S.J., Xu L.B. and Zhang S.Q. (2008). Specific IgG activity of bovine immune milk against diarrhea bacteria and its protective effects on pathogen infected intestinal damages. *Vaccine*. 26, 5973-5980.
- Humphreys D.P. and Glover D.J. (2001). Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 4, 172-185.
- Hussain S. P., Hofseth L. J. and Harris C. C. (2003). Radical causes of cancer. *Nature*. 3, 276-285.

- Issaq H.J., Xiao Z. and Veenstra T.D. (2007). Serum and Plasma Proteomics. *Chemical Reviews* 107, 3601-3620.
- Ivanov A.E., Kazakov S.V., Galaev I.Y. and Mattiasson B. (2001). Thermosensitive copolymer of N-vinylcaprolactam and 1-vinylimidazole: molecular characterization and separation by immobilized metal affinity chromatography. *Polymer*. 42, 3373-3381.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. and Shlomchik M. J. (2003). Immunobiologie: le système immunitaire fondamental et pathologique. *De Boeck Université Bruxelles*. 2^{ème} éd. 792, 470-521.
- Jefferis R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibodybased therapeutics. *Nature Reviews Immunology*. 8, 226-234.
- Jiang C., Glorioso J.C. and Atai M. (2006). Presence of imidazole in loading buffer prevents formation of free radical in immobilized metal affinity chromatography and dramatically improves the recovery of herpes simplex virus type 1 gene therapy vectors. *Journal of Chromatography A*. 1121, 40-45.
- Jiang K.Y., Pitiot O., Anissimova M., Adenier H. and Vijayalakshmi M. (1999). Structure-function relationship in glycosylated K-chymotrypsin as probed by IMAC and IMACE. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1433, 198-209.
- Judith P., Travis C. and Chwalow J. (1985). Meta-analysis of the relationship between role ambiguity, role conflict, and job performance. *Journal of Management*. 26, 155-169.
- Kaloff C.R. and Haas I.G. (1995). Coordination of immunoglobulin chain folding and immunoglobulin chain assembly is essential for the formation of functional IgG. *Immunity*. 2(6), 629-637.
- Kang J., Holland M., Jones H. and Kaysen G.A. (1999). Coordinate augmentation in expression of genes encoding transcription factors and liver secretory proteins in hypo-oncotic states. *Kidney International*. 56, 452-460.
- Katchourine I. and Pradalier A. (1998). Hyperimmunoglobulinémies E rares. *Revue de Medecine et d'Hygiene d'Outre-Mer*. 10,185-191.
- Kim S.B., Yang W.S., Min W.K., Lee S.K. and Park J.S. (2000). Reduced oxidative stress in hypoalbuminemic CAPD patients. *Peritoneal Dialysis International*. 20, 290-294.
- Klaunig J. E. and Kamendulis L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Pharmacology and Toxicology*. 44, 239-267.
- Kohler G. and Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256, 495-497.
- Konig T. and Skerra A. (1998). Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *Journal of Immunological Methods*. 218, 73-83.
- Kovac S., Yang X., Huang F., Hixson D. and Josic D. (2008). Proteomics as a tool for optimization of human plasma protein separation. *Journal of Chromatography A*. 1194, 38-47.
- Krapp S., Mimura Y., Jefferis R., Huber R. and Sonderrmann P. (2003). Structural Analysis of Human IgG-Fc Glycoforms Reveals a Correlation Between Glycosylation and Structural Integrity. *Journal of molecular Biology*. 325, 979-989.
- Kumar A., Bansal V., Andersson J., Roychoudhury P.K. and Mattiasson B. (2006). Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*. 1103, 35-42.

- Laboureau E., Capiod L.C., Dessaint C., Prin L. and Vijayalakshmi M.A. (1996). Study of human cord blood lymphocytes by immobilized metal ion affinity partitioning. *Journal of Chromatography B: Biomedical Application*. 680, 189-195.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Langman R.E. and Cohn M.E. (1993). A theory of the ontogeny of the chicken humoral immune system the consequences of diversification by gene hyperconversion and its extension to rabbit. *Research in Immunology*. 144, 422-446.
- Lee Y.K., Brewer J.W., Hellman R. and Hendershot L.M. (1999). BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Molecular Biology of The Cell*. 10(7), 2209-2219.
- Levenson T., Greenberger P.A. and Murphy R. (1996). Peripheral Blood Eosinophilia, Hyperimmunoglobulinemia A and fatigue: possible complications following rupture of silicone breast implants. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 77(2), 119-122.
- Lopez Y., Yero D., Falero-Díaz G., Olivares N., Sarmiento M.E., Sifontes S., Solís R.L., Barrios J.A., Aguilar D., Hernández-Pando R. and Acosta A. (2009). Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against Mycobacterium tuberculosis 16kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. *International Journal of Medical Microbiology*. 299, 447-452.
- Lum H., Siflinger-Birnboim A., Blumenstock F. and Malik A.B. (1991). Serum albumin decreases transendothelial permeability to macromolecules. *Microvascular Research*. 42(1), 91-102.
- Mangialardi R.J., Martin G.S. and Bernard G.R. (2000). Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. Ibuprofen Sepsis Study Group. *Critical Care Medicine*. 28, 3137-3145.
- Martsev S.P., Kravchuk Z.I., Vlasov A.P. and Lyakhovich G.V. (1995). Thermodynamic and functional characterization of a stable IgG conformer obtained by renaturation from a partially structured low pH-induced state. *FEBS Letters*. 36, 173-175.
- Meziani F., Kremer H., Tesse A., Baron-Menguy C., Mathien C., Mostefai H.A., Carusio N., Schneider F., Asfar P. and Andriantsitohaina R. (2007). Human serum albumin improves arterial dysfunction during early resuscitation in mouse endotoxic model via reduced oxidative and nitrosative stresses. *American Journal of Pathology*. 171, 1753-1761.
- Moran L.K., Gutteridge J.M. and Quinlan G.J. (2001). Thiols in cellular redox signalling and control. *Current Medicinal Chemistry*. 8, 763-772.
- Morrison S.L. and Shin S.U. (1995). Genetically engineered antibodies and their application to brain delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 15, 147-175.
- Moss J.A., Coyle A.R., Ahn J.M., Meijler M.M., Offer J. and Janda K.D. (2003). Tandem IMAC-HPLC purification of a cocaine-binding scFv antibody. *Journal of Immunological Methods*. 281, 143-148.
- Mouthon L., Godmer P., Piqueras B., Cohen P., Lortholary O. and Hofmann-Radványi H. (2002). Giardia lamblia infection in a patient with myotonic dystrophy. *Annales Medicinæ Internæ Fenniae*. 153, 540-542.
- Müller Y.A., Chen Y. and Christinger H.W. (1998). VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Strasbourg Medical*. 6, 1153-1167.
- Mulvihill J.N., Faradji A., Oberling F. and Cazenave J.P. (1990). Surface passivation by human albumin of plasmapheresis circuits reduces platelet accumulation and thrombus formation. Experimental and clinical studies. *Journal Biomedical Materials*. 24(2):155-63.

- Musante L., Bruschi M., Candiano G., Petretto A., Dimasi N., Boccio P.D., Urbani A., Rialdi G. and Ghiggeri G.M. (2006). Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 349, 668-673.
- Muszynska G., Dobrowolska G., Medin A., Ekman P. and Porath J.O. (1992). Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. Interaction of immobilized iron (III) ions. With phosphorylated amino acids, peptides and proteins. **Journal of Chromatography**. 604, 19-28.
- Nechansky N., Schuster M., Jost W., Siegl P., Wiederkum S., Gorr G. and Kircheis R. (2007). Compensation of endogenous IgG mediated inhibition of antibody-dependent cellular cytotoxicity by glyco-engineering of therapeutic antibodies. **Molecular Immunology**. 44, 1815-1817.
- Nisbet A.J., Smith S.K., Armstrong S., Meikle L.I., Wildblood L.A., Beynon R.J. and Matthews J.B. (2010). Teladorsagia circumcincta: Activation-associated secreted proteins in excretory/secretory products of fourth stage larvae are targets of early IgA responses in infected sheep. **Experimental Parasitology**. 125, 329-337.
- Niwa R., Natsume A., Uehara A., Wakitani M., Iida S., Uchida K., Satoh M. and Shitara K. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. **Journal of Immunological Methods**. 306, 151-160.
- Oettl K. and Stauber R.E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. **British journal of Pharmacology**. 151, 580-590.
- Omidfar K., Rasaee M.J., Kashanian S., Paknejad M. and Bathaie Z. (2007). Studies of thermostability in Camelus bactrianus (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth factor receptor expressed by Pichia. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 46, 41-49.
- Patwardhan A.V., Goud G.N., Koepsel R.R. and Ataai M.M. (1997). Selection of optimum affinity tags from a phage-displayed peptide library. Application to immobilized copper(II) affinity chromatography. **Journal of Chromatography A**. 787, 91-100.
- Paubel P., Sauvageon-Martre H. and Wallet P. (1999). Les médicaments dérivés du sang. 2^{ème} ed. **Arnette Paris**. 65, 121.
- Paunovic L., Schulin R. and Nowack B. (2005). Evaluation of immobilized metal-ion affinity chromatography for the fractionation of natural Cu complexing ligands. **Journal of Chromatography A**. 1100, 176-184.
- Pearson R.G. (1973). Hard and soft acids and bases. Dowden, **Hutchington & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania**. 53, 59 et 85.
- Peipp M., Dechant M. and Valerius T. (2008). Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. **Current Opinion in Immunology**. 20, 436-443.
- Pihusch R., Rank A., Gohring P., Pihusch M., Hiller E. and Beuers U. (2002). Platelet function rather than plasmatic coagulation explains hypercoagulable state in cholestatic liver disease. **Journal of Hepatology**. 37, 548-555.
- Poole L.B., Karplus P.A. and Claiborne A. (2004). Protein sulfenic acids in redox signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 44, 325-347.
- Porath J., Carlsson A.N., Olsson J. and Belfrage G. (1975). Metal chelate affinity chromatography a new approach to protein fractionation. **Nature**. 258, 598-599.
- Poul M.A. and Lefranc M.P. (1995). Structural correspondences between mouse and human immunoglobulin VH genes: application to the humanization of mouse monoclonal antibodies. **Annali di Medicina navale**. 764, 47-49.

- Powers K.A., Kapus A., Zurawska K. Szaszi D., Khadaroo, M.D., Rotstein M.D. and Khadaroo R.G. (2005). Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock prevents alveolar macrophage activation by preventing systemic oxidative stress due to gut ischemia/Reperfusion. *Surgery*. 137, 66-74.
- Prasanna R.R. and Vijayalakshmi M.A. (2010). Characterization of metal chelate methacrylate monolithic disk for purification of polyclonal and monoclonal immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A*. 1217, 3660-3667.
- Prinsen B.H., Kaysen G.A., Klomp L.W., Boer J., Barrett P.H., Thornalley P.J., Battah S., Berger R., Rabelink T.J. and Velden M.J. (2002). Idiopathic hypoalbuminemia explained by reduced synthesis rate and an increased catabolic rate. *Clinical Biochemistry*. 35(7), 545-553.
- Qiu R., Zhang X. and Regnier F.E. (2007). A method for the identification of glycoproteins from human serum by a combination of lectin affinity chromatography along with anion exchange and Cu-IMAC selection of tryptic peptides. *Journal of Chromatography B*. 845, 143-150.
- Quinlan G.J., Margaron M.P., Mumby S., Evans T.W. and Gutteridge J.M. (1998). Administration of albumin to patients with sepsis syndrome: a possible beneficial role in plasma thiol repletion. *Clinical Science*. 95, 459-465.
- Quinlan G.J., Martin G.S. and Evans T.W. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*. 41, 1211-1219.
- Quinlan G.J., Mumby S. and Martin G.S. (2004). Albumin influences total plasma antioxidant capacity favorably in patients with acute lung injury. *Critical Care Medicine*. 32, 755-759.
- Quiroga J.A., Binsbergen J.V., Wang C.J., Pardo M, Navas S, Trines C., Herrero M. and Carreno V. (1995). Immunoglobulin M antibody to hepatitis C virus core antigen: Correlations with viral replication, histological activity, and liver disease outcome. *Hepatology*. 22(6), 1635-1640.
- Ramirez-Vick J. and Vargas F. (1993). Albumin modulation of paracellular permeability of pig vena caval endothelium shows specificity for pig albumin. *American Journal of Epidemiology*. 264(5), 1382-1387.
- Ren D., Penner N.A., Sientz B. E., Inerowicz H.D., Rybalko M. and Regnier F.E., (2004). Contributions of commercial sorbents to the selectivity in immobilized metal affinity chromatography with Cu(II). *Journal of Chromatography*. 1031, 87-92.
- Ribeiro M.B., Vijayalakshmi M., Todorova-Balvay D. and Bueno S.M. (2008). Effect of IDA and TREN chelating agents and buffer systems on the purification of human IgG with immobilized affinity membranes. *Journal of Chromatography B*. 861, 64-73.
- Roberts A., Bar-Or D., Winkler J.V. and Rael L.T. (2003). Copper-induced oxidation of epinephrine: protective effect of D-DAHK, a synthetic analogue of the high affinity copper binding site of human albumin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 304, 755-757.
- Roche M., Rondeau P., Singh N. R., Tarnus E. and Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*. 582, 1783-1787.
- Rondeau P. and Bourdon E. (2011). The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie*. 93, 645-658.
- Roque A.C., Lowe C.R. and Taipa M.A. (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. *Biotechnology Therapeutics*. 20, 639-654.
- Rosen F.S. and Davis A.E. (2005). Deficiencies of C1 inhibitor. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 19, 251-261.
- Sakata N., Moh A. and Takebayashi S. (2002). Contribution of superoxide to reduced antioxidant activity of glycoxidative serum albumin. *Heart Vessels*. 17, 22-29.

- Saphire E.O, Robyn L., Stanfield M. D., Crispin M., Parren P.W., Rudd P.M., Dwek R.A., Burton D.R. and Wilson I.A. (2002). Contrasting IgG Structures Reveal Extreme Asymmetry and Flexibility. *Journal of molecular Biology*. 319, 9-18.
- Sapir T., Blank M. and Shoenfeld Y. (2005). Immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins as a treatment for autoimmune diseases, cancer, and recurrent pregnancy loss. *Annals of Nuclear Medicine*. 1051, 743-778.
- Saulsbury F.T. (2003). Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) in a child with normal serum IgA but increased serum IgA concentration. *The Journal of Pediatrics*. 143,127-129.
- Schaller J, Gerber S, Kampfer U, Lejon S. and Traschsel C. (2008). Human blood plasma proteins: structure and function. 2^{ème} éd. *John Wiley and Sons*. 56-123.
- Schlatter S., Stansfield S.H., Dinnis D.M., Racher A.J., Birch J. and James D.C. (2005). On the optimal ratio of heavy to light chain genes for efficient recombinant antibody production by CHO cells. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*. 21(1), 122-133.
- Schmiedel J. Blaukat A., Li S., Knochel T. and Ferguson K.M. (2008). Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell*. 13, 365-373.
- Schortgen F., Girou E., Deye N. and Brochard L. (2008). The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock. *Intensive Care Medicine*. 34, 2157-2168.
- Sharapova O.V., Yurkova M.S., Laurinavichyute D.K., Andronova S.M., Fedorov A.N., Severin S.E., Kaneko H., Takebayashi T. and Horiuchi T. (2009). The N-linked oligosaccharide at Fcg RIIIa by on-resin immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218, 5115-5119.
- Shibata-Koyama M., Kadozonoa H., Shibata M., Koyama Y., Inakuma A., Kitazonob E., Kaneko H., Takebayashi T. and Horiuchi T. (2009). The N-linked oligosaccharide at Fcg RIIIa Asn-45: an inhibitory element for high Fcg RIIIa binding affinity to IgG glycoforms lacking core fucosylation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 19, 126-134.
- Shields R.L., Namenuk A.K., Hong K., Meng Y.G., Rae J., Briggs J., Xie D., Lai J., Stadlen A., Li B., Fox J.A. and Presta L.G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcRI, FcRII, FcRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcRn. *Journal of Biomolecular Techniques*. 276, 6591-6595.
- Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N. and Shitara K. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Biomolecular Techniques*. 278, 3466-3478.
- Siberil S., Dutertre C.A., Boix C. and Teillaud J.L. (2005). Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes. *Transactions of the Association of American Physicians*. 12(2), 114-122.
- Soejima A, Matsuzawa N., Miyake N., Kaneda F., Manno S., Kouji H., Nagasawa T., Era S. and Takakuwa Y. (2002). Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 39, 1040-1046.
- Soejima A., Matsuzawa N. and Miyake N. (1999). Hypoalbuminemia accelerates erythrocyte membrane lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clinical Nephrology*. 51, 92-97.
- Sokołowska M., Wszelaka-Rylik M., Poznanski J. and Bal W. (2009). Spectroscopic and thermodynamic determination of three distinct binding sites for Co(II) ions in human serum albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 103, 1005-1013.
- Soni N. and Margaron M. (2004). Albumin. Where are we now? *Current Anaesthesia & Critical Care*. 15, 61-68.

- Stiehm E.R. (1996). Appropriate Therapeutic Use of Immunoglobulin. *Transfusion Medicine Reviews*. 3, 203-221.
- Sugio S., Kashima A., Mochizuki S., Noda M. and Kobayashi K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein expression and purification*. 12, 439-446.
- Sulkowski E., Vastola K., Ilesiek D. and Muenchhausen W. (1982). Surface topography of interferons: a probe by metal chelate chromatography. *ACS symposium Series*. 9, 313-322.
- Tincani E., Mazzali F and Morini L. (2002). Hypoalbuminemia as a risk factor for over anticoagulation. *American journal of medical*. 112, 247-248.
- Todorova-Balvay D., Pitiot O., Bourhim M., Srikrishnan T. and Vijayalakshmi M. (2004). Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *Journal of Chromatography B*. 808, 57-62.
- Torres M.R., Turell L., Botti H., Antmann L., Carballal S., Ferrer-Sueta G., Radi R. and Alvarez B. (2012). Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 521, 102-110.
- Torres M.R., May M.D. and Scharff A. (2005). Casadevall, Variable-region identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype. *Journal of immunotherapy*. 174, 2132-2142.
- Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli L. and Lanzavecchia A. (2004). An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nature cell Biology*. 8, 871-875.
- Turell L., Botti H., Carballal S., Radi R. and Alvarez B. (2009). Sulfenic acid-A key intermediate in albumin thiol oxidation. *Journal of Chromatography B*. 877, 3384-3392.
- Uriz J., Gines P., Cardenas A., Sort P., Jiménez W., Salmeron J.M., Bataller R., Mas A., Navasa A.M., Arroyo V. and Rodés J. (2000). Terlipressin plus albumin infusion: an effective and safe therapy of hepatorenal syndrome. *Journal of Hepatology*. 33, 43-48.
- Vançan S., Miranda E.A. and Bueno S.M. (2002). IMAC of human IgG: studies with IDA-immobilized copper, nickel, zinc, and cobalt ions and different buffer systems. *Process Biochemistry*. 37, 573-579.
- Vanhove M., Usherwood Y.K. and Hendershot L.M. (2001). Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP in vivo but require light chains to trigger their release. *Immunity*. 15(1), 105-114.
- Vincent J.L., Dubois M.J., Navickis R.J. and Wilkes M.M. (2003). Hypoalbuminemia in acute illness: is there a rationale for intervention? A meta-analysis of cohort studies and controlled trials. *Annals of surgery*. 237, 319-334.
- Vivanco F., Munaoz E., Vidarte L. and Pastor C. (1999). The covalent interaction of C3 with IgG immune complexes. *Molecular Immunology*. 36, 843-852.
- Wang X., Tanus-Santos J.E. and Reiter C.D. (2004). Biological activity of nitric oxide in human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein expression and purification*. 12, 439-446.
- Wang, S.Y. and Weiner, G. (2008). Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 8, 759-768.
- Wilkes M.M. and Navickis R.J. (2001). Patient survival after human albumin administration. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of Internal Medicine*. 135, 149-64.
- Willinger C., Moschén I., Kulmer S. and Pfalle W. (1995). The effect of sodium fluoride at prophylactic and toxic doses on renal structure and function in the isolated perfused rat kidney. *Toxicology*. 95 (3), 55-71.

- Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E. and Kimberly R.P. (1997). A novel polymorphism of FcRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *Journal of Clinical Immunology*. 100, 1059-1069.
- Wu Y.W. and Tsai Y.H. (2008). Characterization of and mechanism for copper-induced thioureation of serum albumin. *Biochemical and Molecular Medicine*. 19, 1822-1830.
- Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., Wakitani M., Niwa R., Sakurada M., Uchida K., Shitara K. and Satoh M. (2004). Establishment of FUT8 *Knokno* Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for *producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity*. *Biotechnology and Applied biochemistry*. 87, 614-619.
- Yilmaz S., Widersten M., Emahazion T. and Mannervik B. (1995). Generation of a Ni (II) binding site by introduction of a histidine cluster in the structure of human glutathione transferase A1-1. *Protein Engineering*. 8, 1163-1169.
- Zemlin A.E., Burgess L.J. and Engelbrecht A. (2009). Two cases of severe hypoalbuminemia (≤ 10 g/l). *Nutrition*. 25(10), 1006-1010.

