

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

019

UNIVERSITE DE JIJEL  
FACULTE DES SCIENCES

B.C. 05. 2003



02  
/  
02

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME  
D'ETUDES SUPERIEURES EN BIOLOGIE

OPTION : BIOCHIMIE

THEME



**FRACTIONNEMENT D'UN  
EXTRAIT LIPASIQUE BRUT A PARTIR DU  
FIOE DU RAT PAR CHROMATOGRAPHIE DE  
FILTRATION MOLECULAIRE.**



Les Membres De Jury :

Président : Mr KEBIECHE Mohamed

Examineur : Mr HANDIS Mohamed Essadek

Encadreur : Mr HEMISSI Ahmed

Réalisé Par :

ALIOUA Dalila

MOULAKMIM Lynda

Promotion 2003.

# Remerciements

*Ce travail a été effectué au laboratoire De L'institut De Biologie département biochimie , de l'université de jijel.*

*En premier lieu nous tenons à remercier vivement tous les membres du jury, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous exprimons également notre profonde reconnaissance à notre promoteur :*

***Mr HEMISSI AHMED**, enseignant a l'université de Jijel pour les conseils et les critiques, qu'il n'a cessé de nous prodiguer qui nous ont été précieux tout au cours de la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements vont aussi à M<sup>lle</sup> **SORIA** étudiante en post-graduation ; pour ses aides et encouragements.*

*Nous remercions tous ceux qui ont contribuer à notre formation et la réalisation de ce travail.*

Leila et Lynda



# SOMMAIRE



# Table des matières

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **Chapitre I : les lipases**

I.1-DEFINITION DES LIPASES .....	2
I.2- CLASSIFICATION .....	2
I.2.1- Les Différentes Classes Des Lipases.....	2
I.2.1-1 Lipases Pancréatique.....	3
I.2.1-2 Cholésterole Esterase .....	4
I.2.1-3 Phospholipases .....	4
I.2.1-4 Phosphodiesterase .....	4
I.2.1-5 Phosphomonoestérase .....	5
I.2.1-6 Céramidase .....	5
I.2.1-7 Lipase Commerciale .....	5
I.2.2- Autre Lipases .....	5
I.2.2-1 Lipoproteines lipases (LPL) .....	5
I.2.2-2 Hormone sensible lipases (HSL) .....	5
I.3- PROPRIETES DES LIPASES .....	9
I.4- ACTIVITES DES LIPASES .....	9
I.4.1- Mesure de l' activité lipasique du sérum .....	10
I.4.2- Mesure de l' activité lipoprotéine lipase du sérum .....	10
I.5- MODE D'ACTION .....	10
I.5-1- Diffusion .....	10
I.5-1- Reconnaissance enzyme- substrat et catalyse .....	10
I.5-3- Expulsion des produits .....	11
I.6- APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES LIPASES .....	13

### **Chapitre II : METHODES DE SEPARATION D'ENZYMES**

II.1- EXTRACTION DU MELANGE TOTAL .....	14
II.1-1 Extraction au solvants organiques .....	14
II.1-2 Relargage .....	14
II.1-3 Ultrafiltration .....	14

II.2- SEPARATION DU MELANGE .....	15
II.2-1 Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium .....	15
II.2-2 Méthodes chromatographiques .....	17
II.2-2-1 chromatographie de filtration moléculaire .....	17
II.2-2-2 chromatographie d'affinité .....	21
II.2-2-3 chromatographie sur échangeur d'ions .....	22
II.2-3 Les Méthodes Electrophorétique Et Electrofocalisation .....	22
II.2-3-1 électrophorèse en condition natives .....	23
II.2-3-2 électrophorèse en condition dénaturantes .....	23
II.2-3-3 electrofocalisation .....	23
II.3- PROCESSUS DE CONTROLE DE QUALITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE .....	24

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

I. MATERIELS ET METHODES .....	26
I.1- MATERIELS EXPERIMENTALS .....	26
I.2- MATERIEL BIOLOGIQUE .....	27
I.2-1- Les Rats .....	27
I.2-2- Préparation De L'extrait Biologique brut .....	27
I.3- METHODE DE FRACTIONNEMENT DE L'ENZYME .....	29
I.3-1- Chromatographie De Filtration Moléculaire Sur Séphadex G-100 .....	29
• Principe .....	29
• Préparation Du Gel .....	29
• Remplissage De La Colonne .....	29
• Dépôt De L'échantillon Et Elution Des Protéines .....	29
I.4- DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTEINES TOTALES .....	30
I.4-1- Mode Opérateur .....	30
I.5- DETECTION DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE .....	31
I.5-1- Mode Opérateur .....	31
II. RESULTATS .....	32
III. DISCUSSION .....	37
CONCLUSION .....	40
ANNEXE	
ABRÉVIATIONS	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	



**INTRODUCTION**



## **INTRODUCTION :**

Toutes les réactions biochimiques, font intervenir des biocatalyseurs ou enzymes, qui participent dans les voies métaboliques. Ils entrent dans tous les processus de biosynthèse et de dégradation des biopolymères. Ces derniers sont facilement scindés en oligomères, parfois jusqu'aux monomères constitutifs. [15]

Parmi les macromolécules élaborées par la cellule vivante les lipides ou leur dépolymérisation essentiellement produite par hydrolyse catalysée par des enzymes lipolytiques, c'est le cas de lipase, qui décompose le triglycéride émulsionnant. Ces enzymes ont des fonctions importantes dans les domaines médicaux et thérapeutiques où l'activité lipolytique est importante dans le traitement des anomalies métaboliques affectant les lipides des systèmes circulatoires, et aussi de la nutrition, de la technologie alimentaire, de la chimie des corps-gras. [15]

Toute activité biologique tend à passer par une première démarche, qui est l'isolement de facteur de cette activité, ceci a conduit à la mise au point de nombreuses méthodes de séparation des enzymes. [23]

Actuellement, plusieurs méthodes chromatographiques sont utilisées pour la purification des enzymes exploitant ainsi les différences de leur propriétés physico-chimiques. Parmi ces méthodes, la chromatographie d'exclusion-diffusion reste un outil de travail remarquable occupant une place déterminante dans la purification de milliers d'enzyme, de polysaccharide, d'acide nucléiques, de protéines et d'autres macromolécules biologiques.

Ce travail a pour but d'extraire un mélange de lipase à partir du foie de rat et de procéder à un essai de fractionnement du mélange enzymatique par chromatographie de filtration sur un support de Sephadex commercial G-100.

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



# CHAPITRE I

## **I - LES LIPASES**

### **I - 1 - DEFINITION DE LIPASE :**

La lipase est un enzyme capable de catalyser l'hydrolyse des liaisons esters des triglycérides issues de la combinaison des acides gras saturés ou insaturés avec le glycérol, en acides gras libres et glycérides partiels. [3]

La lipase est une enzyme hydrosoluble, mais son substrat qui est un lipide formé par l'estérification du glycérol par trois acides gras, n'est pas soluble dans l'eau et il se présente généralement sous forme de micelles. [5]

### **I - 2 - CLASSIFICATION:**

#### **I - 2 - 1- Les différentes classes de lipases :**

La classification des enzymes lipolytiques est répertoriée dans le tableau -I- selon les recommandations de la commission sur les enzymes.

Cette classification n'est pas parfaitement satisfaisante et une autre plus logique et cohérente n'est pas encore possible parce que la spécificité de substrat de la plupart des enzymes lipolytiques n'est pas définitivement établie. [17]

**Tableau I : CLASSIFICATION DES PRINCIPALES ENZYMES LIPOLYTIQUES. [17]**

EC: (ENZYME COMMISSION)	NOM SYSTEMATIQUE	NOM COURANT
3.1.1.3	Glycérol – ester -hydrolase	Lipase
3.1.1.13	Stérol – ester -hydrolase	Cholestérol estérase
3.1.1.4	Phosphoglycérade-2- acyl –hydrolase	Phospholipase A <sub>2</sub>
	Phosphoglycérade-1- acyl –hydrolase	Phospholipase A <sub>1</sub>
3.1.1.5	LysoPhosphoglycérade- acyl –hydrolase	Lysophospholipase
3.1.3.4	Phosphatidate phosphohydrolase	Acide phosphatidique phosphatase
3.1.4.3	Phosphoglycérade- diglycérade - hydrolase	Phospholipase c
3.1.4	Sphingomyline –N- acylsphingosine - hydrolase	Sphingomylinase
3.1.4.4	Phosphoglycérade- Phosphatidate – hydrolase	Phospholipase D <sub>2</sub>
3.1.5	N-acylsphingosine acyl –hydrolase	Céramidase

Remarque : 1<sup>ère</sup> chiffre indique la classe .

2<sup>ème</sup> chiffre indique la sous classe.

3<sup>ème</sup> chiffre indique la sous –sous classe.

4<sup>ème</sup> chiffre indique le numéro d'ordre d'enzyme dans la sous–sous classe considéré.

### I – 2 - 1 - 1 - Lipase Pancréatique :

Le suc pancréatique contient une lipase qui hydrolyse les triglycérides en libérant des mono ou diglycérides. Ce sont surtout les acides gras combinés aux alcools primaires, qui sont détachés. Les phospholipides sont également hydrolysés par la phospholipase du suc pancréatique. [13]

Il existe cependant une lipase gastrique différente par les propriétés de la lipase pancréatique, qui intervient aussi dans la digestion des triglycérides. [25]



La lipase pancréatique a une capacité de dégradation de 70 mg de lipides /ml/min . Elle agit seulement sur les micelles de triglycerides. Ainsi, l'hydrolyse des lipides nécessite une émulsification en gouttelettes grâce aux sels biliaires qui sont indispensables a l'action de la lipase pancréatique, ainsi qu'un cofacteur protéique, la colipase. [29] « Fig 1 » .

#### I - 2 - 1-2 - Cholesterol esterase:

C'est une enzyme du suc pancréatique qui effectue la digestion des liaisons esters des stérides, forme sous laquelle se trouve généralement le cholestérol alimentaire. [ 29]

Elle existe sous deux formes une forme active phosphorylée et une forme inactive déphosphosylée. [13] « Fig 2 » .

#### I - 2 - 1- 3 - Phospholipase :PLA,PLC, PLD:

Quatre phospholipases ont été identifiées dans les cellules: les phospholipases A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> dont le mélange est nommé B, la phospholipase C et la phospholipase D. Ces enzymes se distinguent par leurs points d'action sur les phospholipides. [25] « Fig3 ».

- Phospholipase A<sub>1</sub> : hydrolyse l'acide gras en position -1- des glycéro-phospholipides.
- Phospholipase A<sub>2</sub> : hydrolyse l'acide gras en position -2- des glycéro-phospholipides.
- Phospholipase C : hydrolyse La liaison ester entre l'acide phosphorique et le glycérol, libérant ainsi la base azotée phosphorylée. [25]

Il existe en fait trois familles des phospholipases C : les PLC<sub>β</sub> , PLC<sub>γ</sub> et PLC<sub>δ</sub> dont l'activité catalytique dépend de la présence des ions de calcium. [21]

- Phospholipase D : cette enzyme peut scinder la liaison ester entre la base azotée (choline , éthanoleamine, etc.) et l'acide phosphorique, libérant ainsi la base et un acide phosphatidique. [25]

#### I - 2 - 1 - 4 - Phosphodiesterase:

Cette enzyme est localisée dans les membranes cellulaires et dans les cytosoles. Elle peut être inhibée par la théophylline ou la caféine de bases puriques. [13]

C'est une enzyme spécifique agissant sur la glycéryl-phosphorylcholine. Elle agit soit :

- Pour rompre la liaison ester entre l'acide phosphorique et la choline , libérant ainsi la choline et le glycérophosphate.
- Pour rompre la liaison ester entre l'acide phosphorique et le glycérol, libérant ainsi le glycérol et la phosphryl choline. [25] « Fig 4 ».



**I - 2 - 1 - 5 - Phosphomonoesterase ou phosphatase :**

Groupe d'enzymes majeurs agissant sur les substrats organiques ou sur les produits libérés par les phosphodiesterases, en libérant des radicaux phosphatés. C'est le cas de la phosphocholine qui est hydrolysée en acide phosphorique et la choline. [25] « Fig 5 ».

**I - 2 - 1 - 6 - Ceramidase:**

Cette enzyme hydrolyse les liaisons esters des céramides, libérant la sphingosine et l'acide gras. [1] « Fig 6 ».

**I - 2 - 1 - 7- Lipase commerciale:**

La lipase commerciale (EC.3.1.1.3) hydrolyse les triacylglycérol en acides gras et glycérol.

La lipase commerciale est extraite des pannes et des pancréas d'animaux domestiques, ou de culture d'*Aspergillus oryzae*. Elle est utilisée en fromagerie et dans divers industries alimentaires.

[14]

**I - 2 - 2 - Autre lipases:****I - 2 - 2 - 1- Lipoprotéine lipase (LPL) :**

Existe dans l'endothélium des capillaires de toutes les cellules, le foie, le cœur et les muscles. Sa propriété de clarifier le plasma d'un sujet soumis à un repas lipidique, lui a fait donner le nom de facteur clarifiant. l'enzyme hydrolyse les triglycérides liés aux lipoprotéines ou aux chylomicrons (transportant les triglycérides d'origine alimentaire). Les acides gras libérés dits "libres" circulent après liaison avec la sérum-albumine. [19] « Fig 7 ».

**I - 2 - 2 - 2 - Hormone sensible lipase (LHS):**

La lipase hormonosensible est l'enzyme du tissu adipeux qui hydrolyse les triglycérides de réserve (lipolyse périphérique), et libère dans le sang des acides gras libres, qui seront transportés par la sérum albumine pour être utilisés par les cellules dans la lipolyse. [29]

Outre les tissus adipeux, l'enzyme se trouve dans les ovaires, les testicules et les glandes surrénales sous des formes différentes. [21]

Cette enzyme est un dimère, formée de deux sous-unités de 84 KD chacune. Elle est activée par l'AMP<sub>c</sub>. Les récepteur des hormones dites adipocinétiques ( par exemple : adrénaline) augmentent le taux d'AMP<sub>c</sub> dans les cellules des tissus adipeux et activent donc cette lipase. [29] « Fig 8 ».

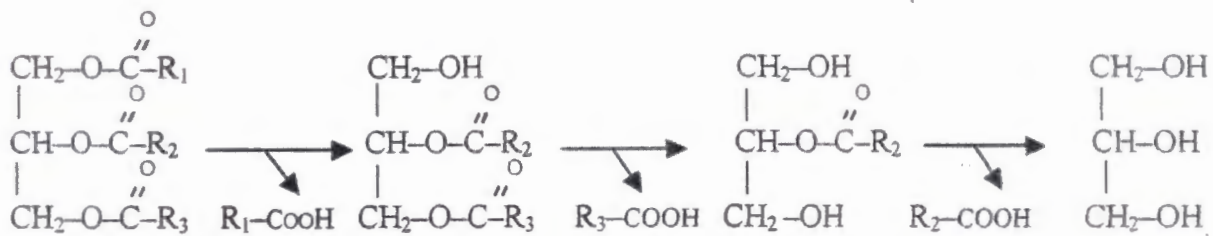


Fig. 1: Structure générale des triglycerides et action de la lipase pancréatique [11]

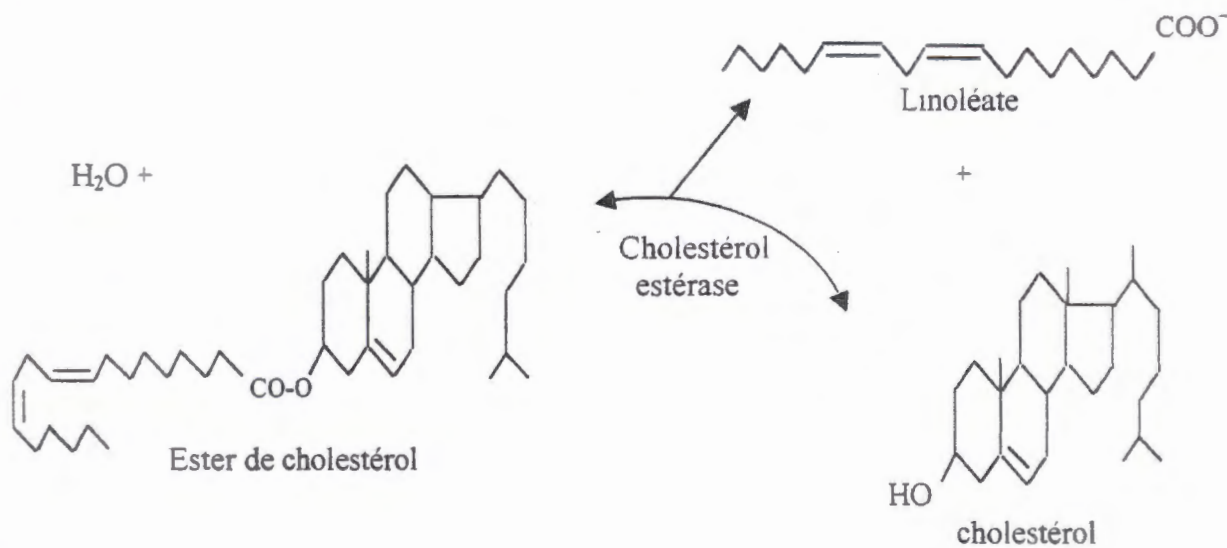


Fig. 2: Action de la cholestérole estérol [3.1.1.13] [28]

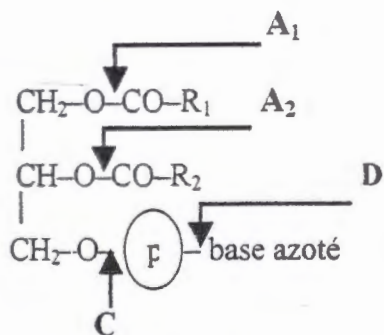


Fig. 3: Action des différents phospholipases :PLA1, PLA2, PLC et PLD [21]

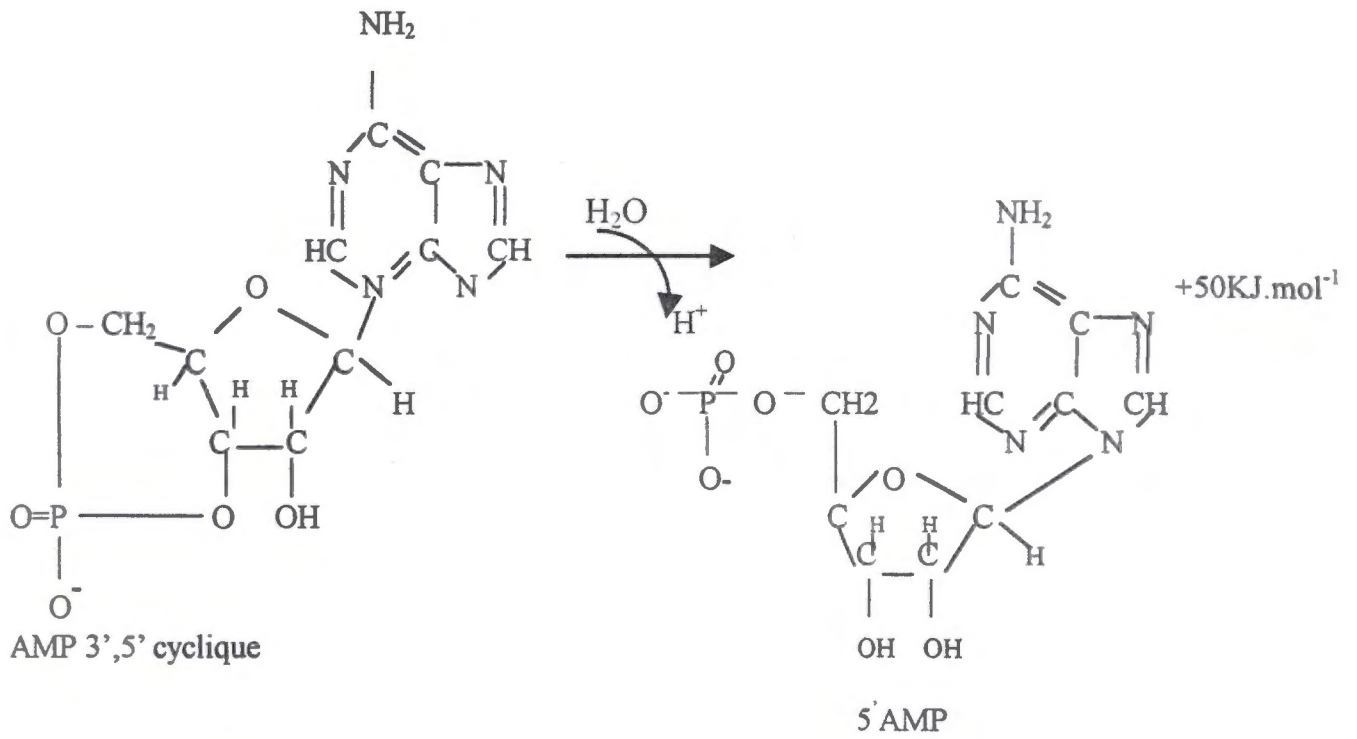


Fig. 4: Action de la phosphodiesterase :[3.1.4.17] [28]

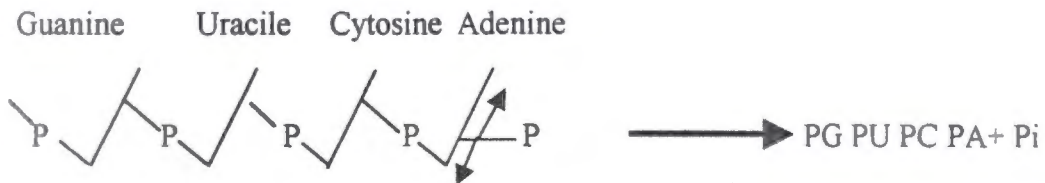


Fig. 5: Action de la phosphatase [25]

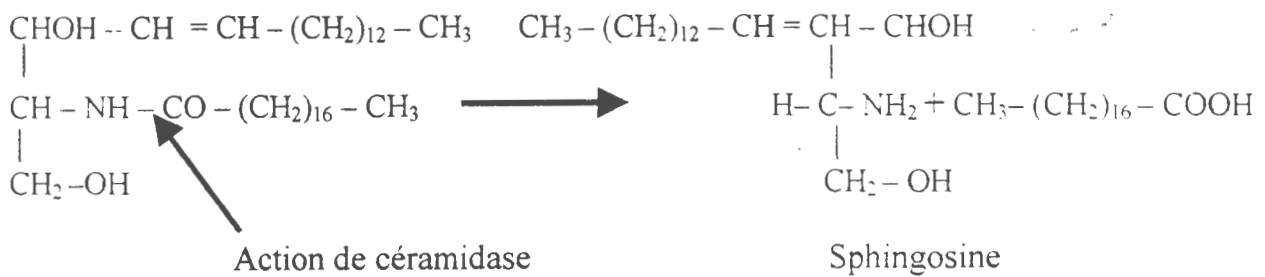


Fig. 6: Structure générale des céramides et liaison hydrolysé par la ceramidase [1]

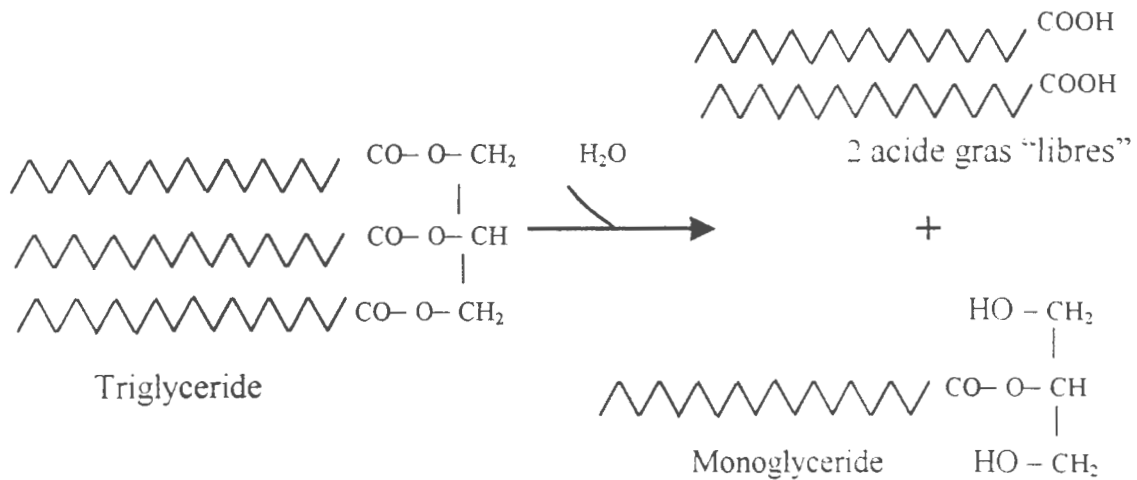


Fig. 7: Action de la lipoprotéine lipase. "APOC-II ,sérum albumine" :[3.1.4.34] [28]

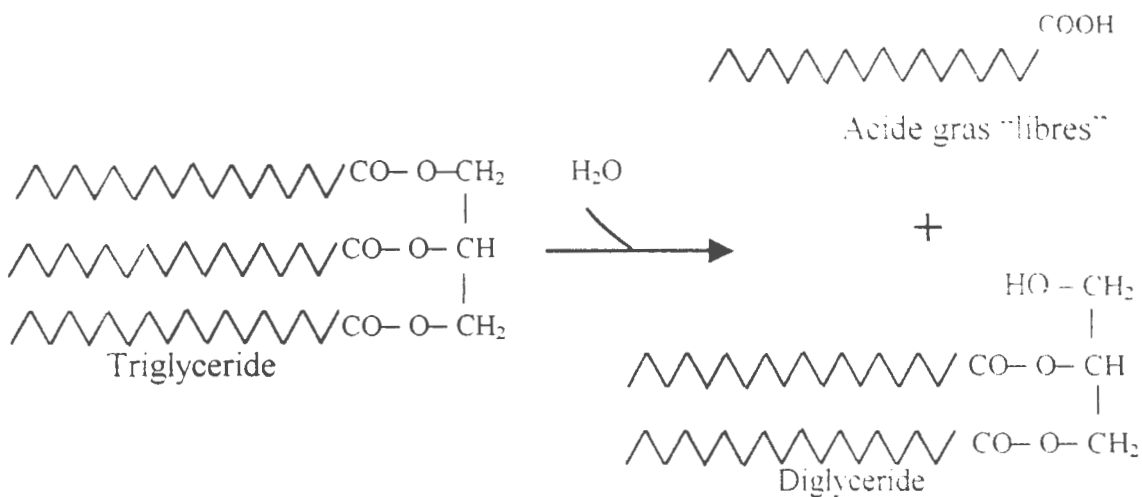


Fig. 8: Action de la lipase hormomosensible(phosphorylée +). :[3.1.1.] [28]



### I - 3 - PROPRIETES DES LIPASES:

Le pH optimum de la lipase varie entre pH 7,00 et 9,00. Il dépend cependant de la nature du substrat et de la présence d'activateurs. [12]

La lipase du sérum est caractérisée par une température d'action optimale proche de 35 à 40 °C, et par une faible thermorésistance. Elle est inactivée par un chauffage à 55 °C pendant 30 minutes ou à 75°C pendant une seconde. [2]

En l'absence de toute contamination bactérienne, l'enzyme est stable pendant une semaine à la température ambiante, ou pendants 03 semaines à + 4°C. [12]

La lipase pancréatique est inactivée quand elle est incubée à pH acide ou à une température de 60 °C. Elle est inhibée après addition, dans le milieu de lipolyse, d'un détergent synthétique (triton x-100) ou d'une protéine (la sérum albumine bovine: SAB). [29]

D'une façon plus générale, les lipases se caractérisent par une activation interfaciale; puisque leurs activités enzymatiques augmentent fortement lorsqu'elles se trouvent à l'interface eau-lipide. Cette activation dépend étroitement de la présence d'effecteur protéique, la colipase qui est un activateur qui facilite l'adsorption et la pénétration de l'enzyme à l'interface eau - lipide, et déplace le pH optimal de l'activité de la lipase vers le pH physiologique, et cette activation nécessite aussi la présence de sels biliaires qui ont une action émulsifiante sur les substrats insolubles dans l'eau, car les lipases n'agissent qu'en présence d'une émulsion ou d'une solution micellaire. La vitesse d'hydrolyse dépend de la surface totale de l'interface eau-lipide, ou du nombre et de taille des gouttelettes. [17]

### I - 4 - ACTIVITES DES LIPASES :

Au cours de l'entreposage et des traitements technologiques de certains produits végétaux, l'intensité de la lipolyse intervient parfois de façon prépondérante sur la valeur d'utilisation de ces produits. La détermination titrimétrique globale de l'acidité du produit peut alors refléter l'activité des lipases et constituer un indice d'altération produite. Elle ne peut cependant être considérée comme une mesure spécifique des acides gras à longue chaînes libérés sous l'action de l'enzyme .L'unité conventionnelle d'activité de la lipase est selon WILLSTATTER la quantité d'enzyme qui provoque l'hydrolyse à 24% de 2,5g d'huile d'olive en une heure à 30°C et à pH 8.9. [18]



**I - 4 - 1 - Mesure de l'activité lipasique du serum :**

L'activité lipasique du sérum s'exerce sur un substrat d'huile d'olive émulsionné à pH 8,5 (pH optimum de l'enzyme). La lipase libère des acides gras que l'on dose par titrimétrie.

L'unité d'activité lipasique est la quantité d'enzyme qui libère 1 micromole d'acide gras /heure / ml de sérum . le taux normale est de 2 à 12 unités par ml. [20]

**I - 4 - 2 - Mesure de l'activité de la lipoprotéine lipase(LPL) du serum :**

La lipoprotéine lipase , n'existe pas à l'état normal dans le sang circulant, mais il se trouve fixer sur les parois des capillaires sanguins.

Elle peut être libérée ensuite par l'injection d'une quantité fixée d'héparine (0,1 mg /kg de poids). On recueille le plasma après 10 minutes, et on estime l'activité enzymatique après l'action de l'enzyme sur une émulsion de triglycérides par dosage titrimétrique des acides gras libérés. [20]

**I - 5 - MODE D'ACTION :**

Quel que soit le type de réaction catalysée , un cycle catalytique enzymatique se déroule en trois étapes successives :

**I - 5 - 1 - Diffusion :**

L'une des caractéristiques principales de la lipase est que sa réaction enzymatique se déroule au niveau de l'interface eau -lipide, et c'est pour cela qu'elle diffuse dans le milieu aqueux pour arriver jusqu' à cette interface où elle s'adsorbe et pénètre après interaction faite entre le site de reconnaissance interfacial de l'enzyme et l'interface eau-lipide. [17]

**I - 5 - 2 - Reconnaissance enzyme – substrat et catalyse :**

La reconnaissance est réalisée à la complémentarité structurale entre l'ester du glycérol-glycéride, et le site actif de la lipase.

La spécificité des lipases est complexe, on les classe en 4 groupes principaux :

- lipase 1-3- spécifique.
- Lipase stéréospécifique, exemple : spécifique à la position 3.
- Lipase typosélective, exemple : des acides gras courts  $c_4 \longrightarrow c_{10}$ .



- Lipase non spécifique. [15]

La lipase s'associe aux glycérides en formant le complexe enzyme-substrat qui est l'équivalent du complexe classique de *Michaelis-Menten*.

La suite des réactions de l'hydrolyse catalysée par une lipase est représenté par la « **Fig 9** ».

Les radicaux  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $R_3$  constituent une même chaîne, ou des différentes chaînes d'acides gras saturés ou insaturés.

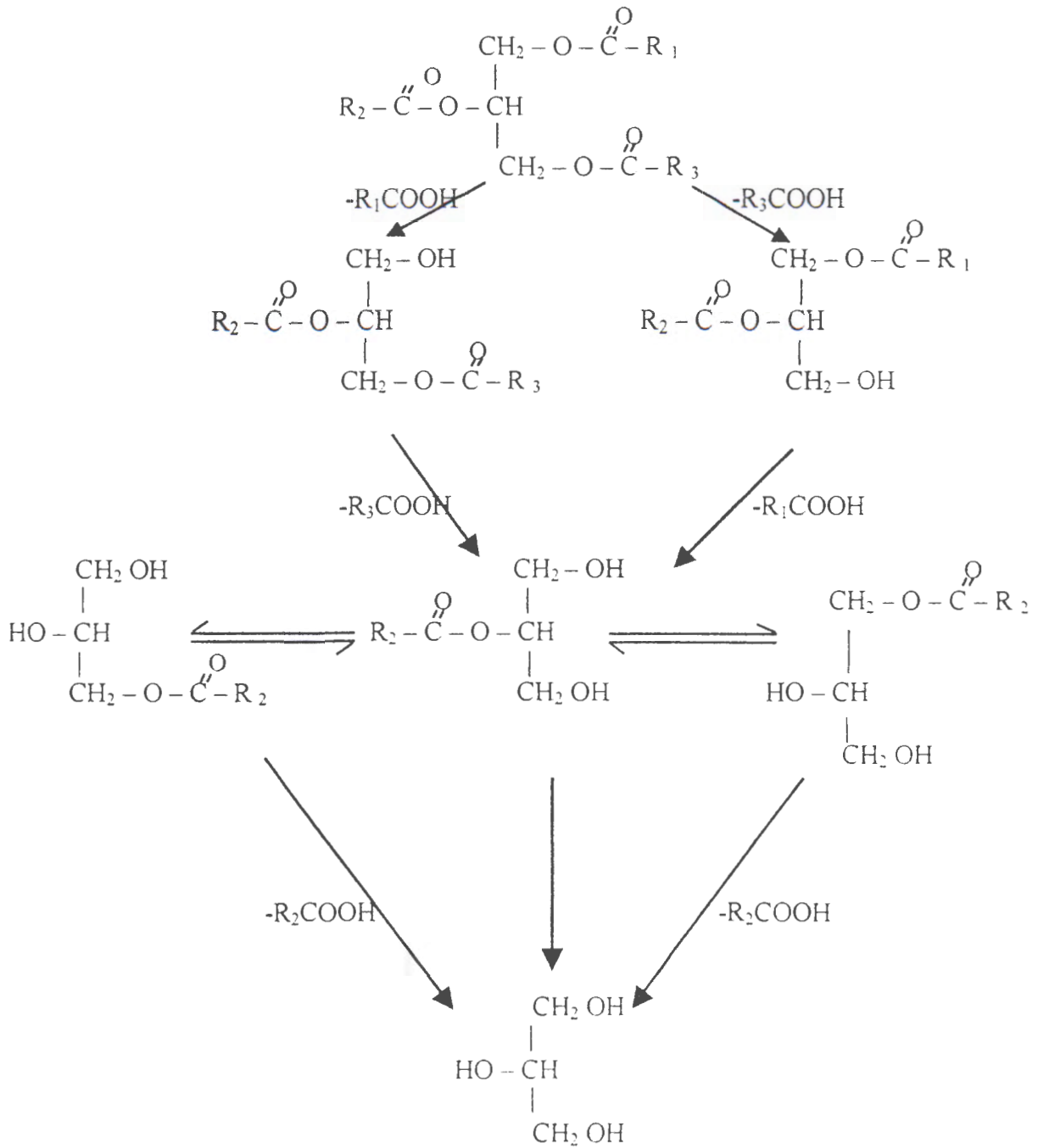
Dans les premières étapes ce sont les liaison esters en position 1 ou 3 qui sont rompues les premières, et le triglycéride se transforme, soit en 2,3 diglycéride, soit en 1,2 diglycéride, ensuite dans les deuxièmes étapes, on obtient 02 monoglycérides

Dans la 3<sup>ème</sup> étape, la liaison en position 2 sera rompue. Cette étape est incomplète car seulement une partie des 2 mono glycérides sont transformés en acide gras et glycérol. [22]

### **I - 5 - 3 - Expulsion des produits :**

Après que la réaction catalytique est effectuée, l'enzyme est régénérée pour commencer un nouveau cycle catalytique .

Finalement, les produits de la réaction acide gras et glycérol sont libérés, mais il faut noter que l'hydrolyse lipasique au niveau du duodénum n'est jamais complète et l'on à affaire a un mélange de tous les intermédiaires entre triglycéride et glycérol plus 3acides gras. [19]



**Fig. 9: Schéma général de l'action de la lipase [8]**



## I - 6 - APPLICATIONS INDUSTRIELLES DES LIPASES :

L'action des lipases intervient dans plusieurs applications. En effet, par exemple, pour donner le goût aux fromages dits " à goût Italien", les lipases se substituent actuellement à la présure (extrait d'enzymes d'organes d'animaux préruminants comme l'agneau, le chevreau). Les différents goûts proviennent de la spécificité des enzymes qui agissent sur les graisses du lait.

Les lessives constituent un autre domaine où l'action des lipases est très utile. En effet, ces enzymes interviennent dans l'élimination des taches de graisses (80% des lessives actuelles contiennent des lipases ).

De nombreuses recherches ont été menées pour découvrir un médicament pour lutter contre l'obésité, sans utilisation de drogues neuroleptiques. Une pilule antilipase ( tétrahydrolipostatine: THL), inhibiteur des lipases digestives, s'avère être un nouveau médicament anti- obésité. [30]

## CHAPITRE II



## II- METHODES DE SEPARATION D'ENZYMES :

### II - 1- EXTRACTION DU MELANGE TOTAL :

#### II - 1-1- Extraction aux solvants organiques :

L'addition de solvants organiques neutres, miscibles à l'eau (acétone, éthanol, etc.) à une solution protéique aqueuse, entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la solubilité des protéines, en déplaçant les molécules d'eau des zones hydratées des protéines, ce qui induit de nouvelles interactions électro-statiques et formation d'un réseau ou agrégats protéiques [ 10 ].

La solubilité différentielle des protéines dans les mélanges de solvants sont à la base d'une technique de fractionnement utile. Ce procédé est en général utilisé à des températures très basses, car à des températures plus élevées, les solvants ont tendance à dénaturer les protéines. [7]

#### II - 1-2- Relargage :

Des enzymes peuvent être extraites par l'addition des sels, de préférence le sulfate d'ammonium  $[(NH_4)_2SO_4]$  en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible effet dénaturant sur les protéines. [4]

Le sulfate d'ammonium utilisé à une saturation de 80 % permet en effet de séparer toutes les protéines enzymatiques. Après centrifugation, on obtient un culot, contenant un mélange de protéines et de sels. Une dialyse contre l'eau distillée permet d'éliminer les sels et de récupérer la préparation enzymatique brute. [4]

#### II - 1- 3 - Ultrafiltration :

C'est une technique de « tamassage » très ancienne, conçue pour la première fois par C.J. Martin en 1896, puis améliorée grâce à l'utilisation de membranes filtrantes (collodions, cellophanes) ou de plaques métalliques. [7]

Elle permet la séparation sélective des substances selon leur taille moléculaire, donc approximativement selon leur poids moléculaire. La filtration est assurée par une force de pression exercée sur le liquide à filtrer.

L'ultrafiltration sur membrane peut avoir de nombreuses applications :

-concentration de protéines.

-Élimination de substances de faibles poids moléculaires (inférieure à la limite d'arrêt de la membrane).

-Étude de la liaison entre macromoléculaires et molécules de faibles poids moléculaires.

[10]

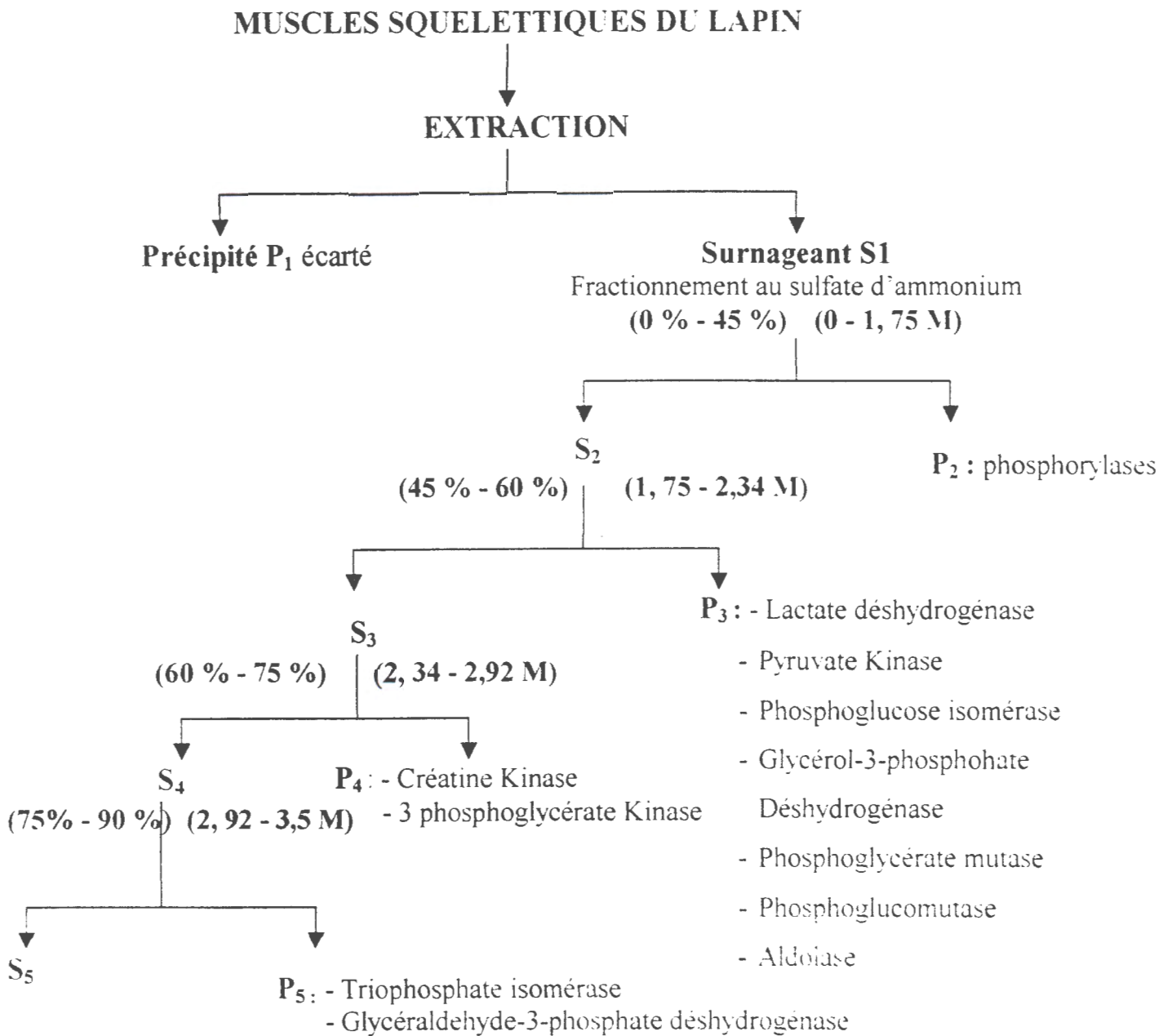
## **II - 2- SEPARATION DU MELANGE :**

Différentes techniques sont destinées à séparer les différents constituants d'un mélange. L'objectif de cette séparation est double : soit pour analyser le mélange, soit pour isoler les constituants qui seront étudiés ultérieurement.

### **II - 2-1- Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium :**

Toutes les protéines n'ont pas la même sensibilité à l'effet de précipitation dû à l'addition des sels neutres : en effet, certaines protéines précipitent dans une solution à demi-saturation en sulfate d'ammonium, d'autres seulement lorsque la solution est à 45 % ou 60 % de saturation. On peut donc, par addition progressive d'un sel, fractionner un mélange de protéines. [4] « *Fig 10* ».





**Fig.10: Fractionnement, par le sulfate d'ammonium, d'un extrait musculaire de lapins. [4]**

## II - 2-2- Méthodes chromatographiques :

Les techniques chromatographiques sont basées sur des interactions physico-chimiques très diverses entre la phase stationnaire (support insoluble) qui possède une grande surface de contact et la phase mobile contenant les molécules à séparer [4]. On distingue alors :

### II - 2-2-1- La chromatographie d'exclusion-diffusion ou chromatographie de filtration moléculaire.

- **Principe :**

Cette méthode est basée sur la séparation des différentes molécules en fonction de leur masse moléculaire par filtration à travers un gel réticulé ; les molécules dont la taille est supérieure aux dimensions des plus gros pores du gel, ne pénètrent pas dans des billes et sont exclues rapidement dans la phase mobile, alors que les petites molécules diffusent à l'intérieur des pores et seront d'autant plus retardées que leur masse est plus faible. Ainsi, les différentes molécules seront éluées dans l'ordre décroissant de leur masse moléculaire. [4]

- **Principaux gels de chromatographie :**

On peut dresser un tableau des principaux gels utilisés en chromatographie (Tableau-II-). Il s'agit, dans tous les cas, de microbilles dont le diamètre est de 10 à 40  $\mu\text{m}$  (fines), de 50 à 150  $\mu\text{m}$  (moyennes, pour dessalage des macromolécules), de 100 à 300  $\mu\text{m}$  (grosses, pour usage préparatif industriel).

La microporosité des billes et la nature des polymères influencent beaucoup le débit des colonnes ainsi que la qualité de résolution chromatographique.[10]

Une structure partielle des gels Séphadex et Sephacryl est représentée dans les « Fig 11 » et « Fig 12 ».

**TABLEAU -II- : Les différentes variétés de gels disponibles**

Natures chimiques	Gels purs					
	dextran	Polyacrylamide		Polymère vinylique	Agarose	
Noms Commerciaux	séphadex	Blogels P	Trisacryl	fractogel	Blogel A	Sépharose et sépharose CL
Fabricant	Pharmacia	Biorad	Sepracor	Merck	Biorad	Pharmacia
Variétés	G- 10 (0- 700) G- 15 (50 - 1500) G- 25 (1000 - 5000) G- 50 (1500 - 30000)  G- 75 (3000 - 70000) G- 100 (4000 - 100000) G- 150 (5000 - 150000) G- 200 (5000 - 250000)	P6 DG (1000 - 6000) P2 (100 - 1800) P4 (800 - 4000)  P6(1000 - 6000) P10 (1500 - 20000)  P 30 (2500 - 40000) P60 (3000 - 60000) P 100 (5000 - 100000)	GF 05 (300 - 2500)          GF 2000 (10000 - 15.10 <sup>6</sup> )	HW 40 (100 - 10000)      HW 50 (500 - 200000)    HW 55 (50000 - 5.10 <sup>6</sup> )   HW 75 (500000 - 50.10 <sup>6</sup> )	NB : m signifie million de daltons et correspondant à la limite d'exclusion de ces gels A 0,5 m (10000 - 500000) A 1,5 m (10000 - 5.10 <sup>6</sup> ) A 5m (10000 - 5.10 <sup>6</sup> ) A 15 m (40000 - 15.10 <sup>6</sup> )  A 50 m (100000 -50.10 <sup>6</sup> )  A 150 m (1.10 <sup>6</sup> - 150.10 <sup>6</sup> )	6 B (51000 - 11.10 <sup>6</sup> ) 4 B (60000 - 20.10 <sup>6</sup> ) 2 B (70000 - 40.10 <sup>6</sup> ) CL 6 B (10000 - 1.10 <sup>6</sup> )  CL 4 B (60000 - 20.10 <sup>6</sup> ) CL 2 B (7000 - 40.10 <sup>6</sup> )

Les chiffres entre parenthèses indiquent les masses moléculaires limites entre lesquelles la séparation de molécules globulaires est réalisable par chaque type de gel. La masse moléculaire supérieure correspondant à l'exclusion hors du gel. [27]

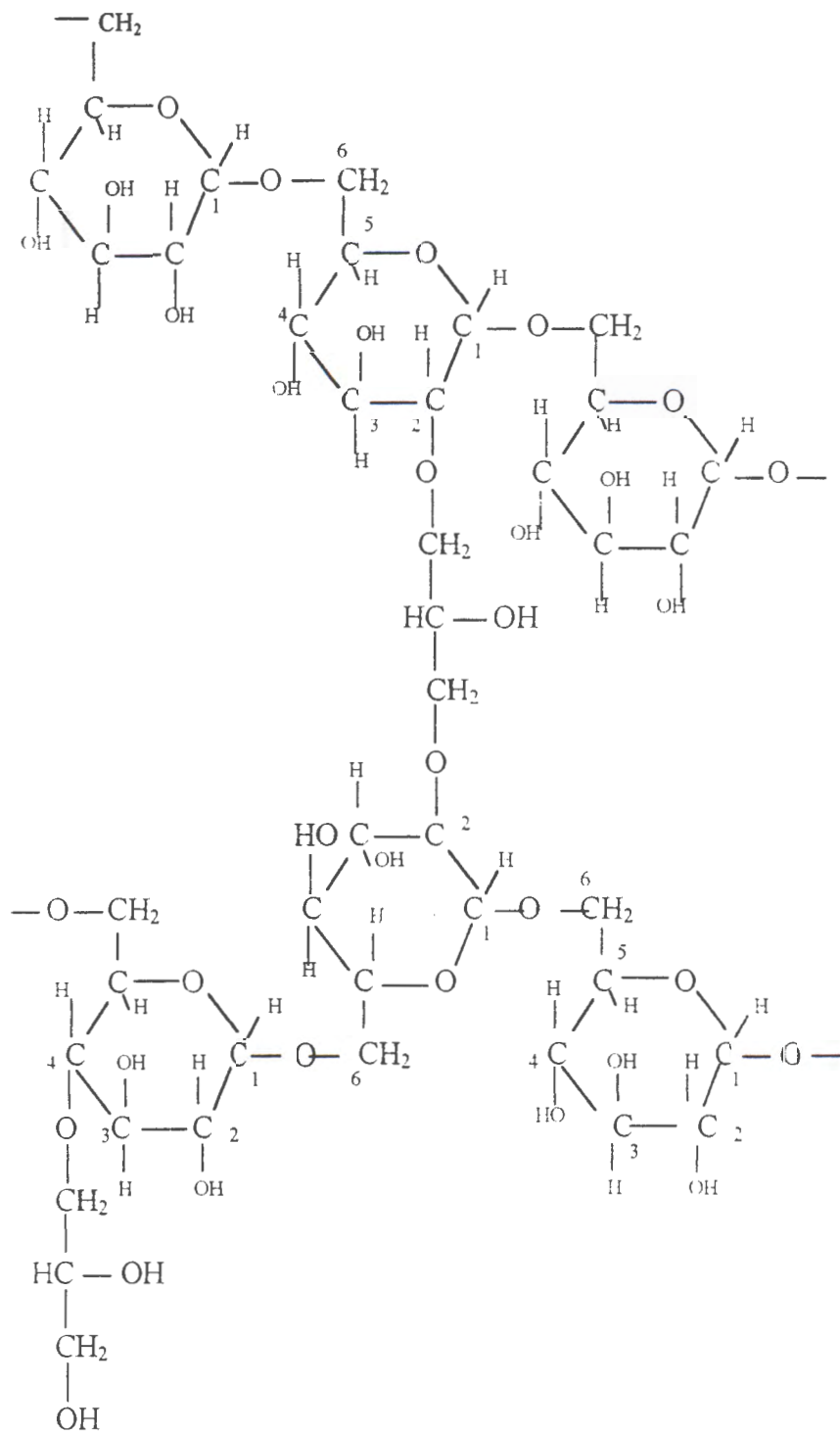


Fig. 11: Structure partielle de séphadex [27]



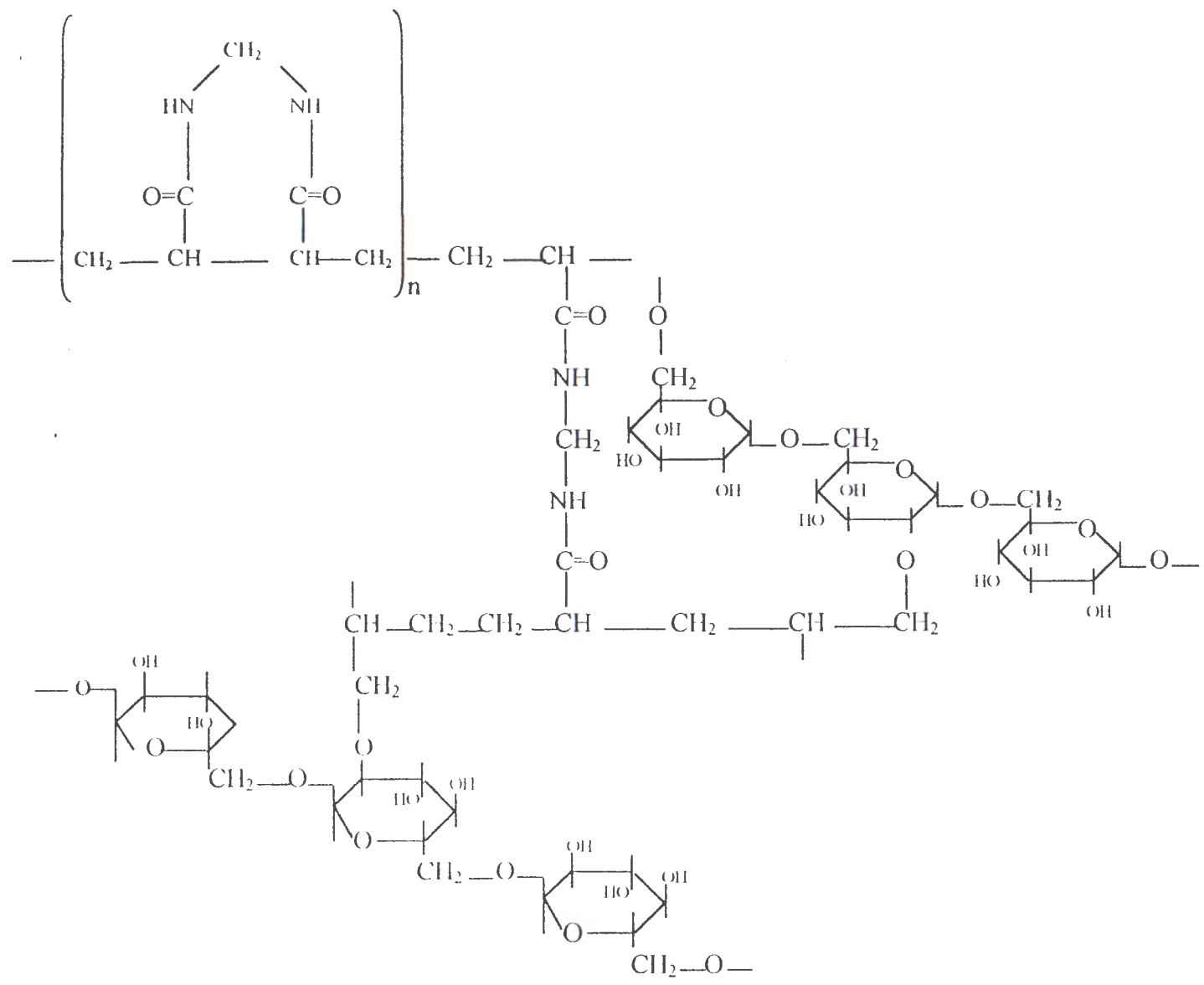


Fig. 12: structure partielle hypothétique de séphacryl [27]

- **Application :**

Les applications de cette technique sont extrêmement variées :

- Séparation de molécules de poids moléculaires différents.
- Détermination de masses moléculaires : il est possible de déterminer le poids moléculaire d'une enzyme en mesurant son volume d'élution grâce à la mesure de son activité dans l'éluat. Un étalonnage préalable de la colonne par une série d'enzymes de poids moléculaires connus permet d'obtenir, avec une bonne précision, le poids moléculaire de l'enzyme étudiée.
- Séparation de complexes immunologique
- Désalage : il est possible de débarasser les protéines des sels contaminantes en utilisant une colonne remplie d'un gel ayant un seuil d'exclusion très bas.
- Concentration d'échantillon : les substances de poids moléculaires élevés peuvent être concentrées par traitement sur séphadex G-25 à l'état sec. [10]

## II - 2 -2-2- Chromatographie d'affinité :

- **Principe :**

La chromatographie d'affinité est une nouvelle technique dont le principe repose sur les interactions spécifiques qu'existent entre les différentes molécules. Elle consiste à mettre en présence un mélange contenant la molécule d'intérêt et la résine sur laquelle est fixée le ligand.

Les molécules n'ayant pas d'affinité pour le ligand ne se fixeront évidemment pas sur la résine et pourront être éluées, tandis que celles ayant une affinité y resteront attachées. Ensuite, quand toutes les molécules sans affinité auront été complètement éliminées, on pourra procéder à la désorption des molécules fixées au ligand en exposant la résine contenant le complexe ligand-molécule d'intérêt à des conditions qui distabilisent l'interaction (modification de pH, de force ionique, etc. ) .[26]

- **Applications :**

Il existe plusieurs systèmes biologiques pour lesquels la chromatographie d'affinité est la plus souvent employée.

Tout composé peut servir de ligand pour purifier les produits qui se fixent à lui :

Enzyme : Analogues de substrat, inhibiteurs, cofacteur

Anticorps : Antigènes, virus, cellules.

Lectine : Polysaccharides, glycoprotéines, récepteurs de surfaces cellulaires

Acides nucléiques : séquences complémentaires de base, histones, protéines de combinaison.

Hormones, vitamines : Récepteurs, protéines porteuses

Cellules : protéines spécifiques de surface cellulaires. [26]

### II - 2 -2-3- Chromatographie sur échangeur d'ions :

- *Principe*

Ce type de chromatographie effectue une séparation de protéines, sur un type d'échangeur donné, en fonction de leur charge à un pH et une force ionique donnée. [16]

Cette méthode utilise le comportement acido-basique des protéines pour leur séparation. En effet, les protéines sont des macromolécules qui possèdent de nombreux groupements fonctionnels chargés électriquement et qui se comportent comme des polyelectrolytes. L'état d'ionisation de ces amphothères varie en fonction de l'environnement (conditions de pH et de force ionique du solvant utilisé). [16]

Un échangeur d'ions est un produit insoluble contenant des groupes chargés, chimiquement liés, et des contre-ions mobiles. Ces contre ions peuvent être échangés réversiblement avec d'autres molécules de même charge (protéines par exemple) sans aucun changement de la matrice insoluble. La présence de groupes chargés est un principe fondamental des échangeurs d'ions.

Il existe deux types de matériaux échangeurs d'ions : des résines et les celluloses. Les résines sont des polymères insolubles contenant des groupes anioniques ( $\text{ROH}^-$ ) ou cationique ( $\text{RH}^+$ ) où R représente la résine. Les celluloses substituées, bien que de capacité inférieure, permettent une élution en conditions plus douces. [16]

### II - 2-3- Les méthodes électrophorétiques et électrofocalisation :

On appelle électrophorèse le déplacement des particules chargées dans un champ électrique continu. Ce déplacement dépend de plusieurs facteurs : Temps de migration, force ionique du tampon, la température, la force de freinage et le pH du tampon.

Les supports les plus utilisés sont :

- le papier d'Acétate de cellulose.
- Le gel d'Agarose
- Le gel de Polyacrylamide. [9]

**II - 2-3-1- Electrophorèse en conditions natives :**

La séparation est basée sur la charge finale de la protéine, sous l'action d'un champ électrique continu. Les fractions séparées migrent comme des zones individuelles qu'on peut les visualiser sous forme de bandes colorées.

L'activité de l'enzyme peut être détectée sur le gel une fois on localise la bande correspondante. [23]

**II - 2-3-2- Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS – PAGE).**

L'électrophorèse en plaques sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS, est la technique la plus couramment utilisée pour caractériser le nombre ou la masse moléculaire des protéines. [6]

Au cours de cette électrophorèse, les protéines à analyser sont préalablement dénaturées à chaud, en présence d'un agent réducteur ( $\beta$ -Mercaptoéthanol, par exemple) qui, en se combinant aux protéines, leur conférant, à toutes, la même charge négative. Ainsi, la migration dépendra uniquement du poids moléculaire [23].

**II - 2-3-3- Electrofocalisation :**

Cette électrophorèse fractionne un mélange de protéines en fonction de leur migration spécifique dans le champ électrique, mais aussi en fonction de leur point isoélectrique. En effet, il est possible d'organiser au sein du milieu liquide d'électrophorèse un gradient continu de pH, de l'anode, grâce à l'utilisation de molécules amphotères. De ce fait, les protéines migreront dans le gradient de pH jusqu'à la zone correspondante à leur point isoélectrique, là sa charge s'annule et sa migration s'arrête, on dit qu'elle focalise.

Cette méthode permet donc de séparer les protéines en fonction de leur  $pH_i$  [7].



### II - 3 - PROCESSUS DE CONTROLE DE QUALITE D'UNE PREPARATION ENZYMATIQUE :

Dans certaines applications pratiques, il est souvent nécessaire d'utiliser des enzymes extrêmement pures. Dans ce cas, la qualité d'une préparation enzymatique dépendra de la pureté, de l'activité et de la stabilité. Un schéma général des divers contrôles à effectuer est représenté dans la « **Fig 13** ».

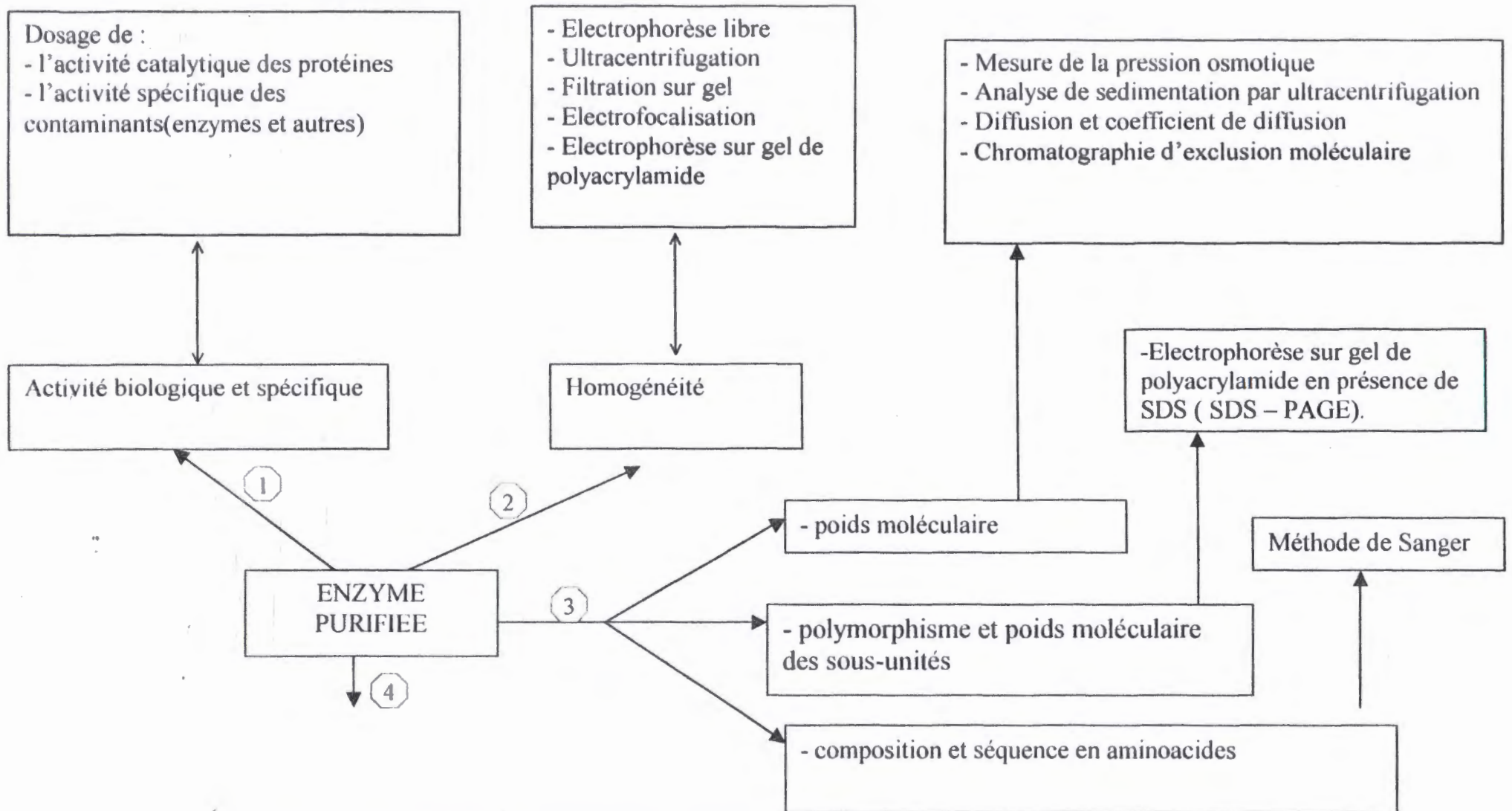
1/ la pureté enzymatique est vérifiée par la mesure de l'activité spécifique de l'enzyme (activité biologique / poids en protéines). Celle-ci doit être constante pendant une période raisonnable et doit être aussi forte que possible. A cela, il faut donner des informations sur les activités des enzymes contaminantes exprimées en % de l'activité spécifique de l'enzyme « pure ».

2/ et 3/ le contrôle de la pureté physicochimique permettra de vérifier l'homogénéité de la préparation, ainsi que certaines de ses propriétés caractéristiques (poids moléculaire, polymorphisme, etc.)

4/ l'étude de la stabilité est primordiale, car plus l'enzyme est pure, plus les risques de dénaturation augmentent. En premier lieu, il faut éliminer toute contamination bactérienne productrice de protéases. Cela se fait par addition de conservateurs qui n'inhibent pas l'enzyme, ainsi que d'agents protecteurs des groupements S-H, de substrats ou analogues de substrat.

La lyophilisation est moins utilisée, car elle peut provoquer la perte d'activité suite aux changements de concentration en sels pendant l'opération.

Enfin, on doit contrôler l'adaptabilité du produit à son utilisation ultérieure. [4]



- Présentation d'utilisation ( enzymes libres ou immobilisées, activité et concentration standardisées).
- Emballage.
- Etude de stabilité.
- Adaptabilité à son utilisation ultérieure.

**Fig 13 : Processus général d'un contrôle de qualité d'une enzyme purifiée. [4]**

**PARTIE EXPERIMENTALE**

## I - MATERIELS ET METHODES :

### I - 1 - MATERIELS EXPERIMENTALS:

- **Petit Matériel:**

- Colonne (1 X45 Cm )
- Tubes à essai
- Tubes en plastique de 5 ml
- Tubes eppendorfs
- Pipettes graduées
- Micro pipettes
- Bechers
- Erlenmeyers
- Eprouvettes
- Pincés
- Cuves en plastique

- **Equipements**

- Balances électrique
- Agitateur magnétique
- pH mètre
- Centrifugeuse normal
- Spectrophotomètre Visible
- Spéctrophotomètre U.V
- Rotavapeur
- Broyeur
- Bain –Marie

- **Solution**

- Eau Physiologique
- Tampon PBS, pH = 7,3 , 0,02 M
- Solution de Biuret
- Solution de caséine
- Ethanol
- Solution tampon, pH = 7 et pH = 10



- Acétone

- **Gel utilisé :**

- séphadex G-100.

## **I - 2 - MATERIEL BIOLOGIQUE:**

### **I - 2 - 1- les rats :**

- **Elevage des rats :**

Les foies de l'expérience sont obtenues à partir des rats Wister de souche Albinos, provenant de l'institut Pasteur d'Alger .

Ces animaux sont élevés dans des cages en plastique, leur alimentation est constituée de croquettes et de l'eau . L'animalerie est maintenue à une température 20 et 25 °C.

- **Dissection des rats et obtention des foies :**

Les rats sont anesthésiés par l'utilisation d'éther. Puis, on les place sur une plaquette de liège, en les fixant à l'aide d'épingles les pattes avant et arrière.

Après, on procède à une incision ventrale et on dégage le plan cutané, musculaire et le péritoine. Lorsque les viscères apparaissent, on doit manipuler des pinces pour les dégager et on récupère le foie.

98,2 g de foies obtenues à partir de 8 rats sont lavés deux fois successives dans une solution de NaCl de concentration 9‰ , puis ils sont conservés dans le congélateur à (- 20 °C ).

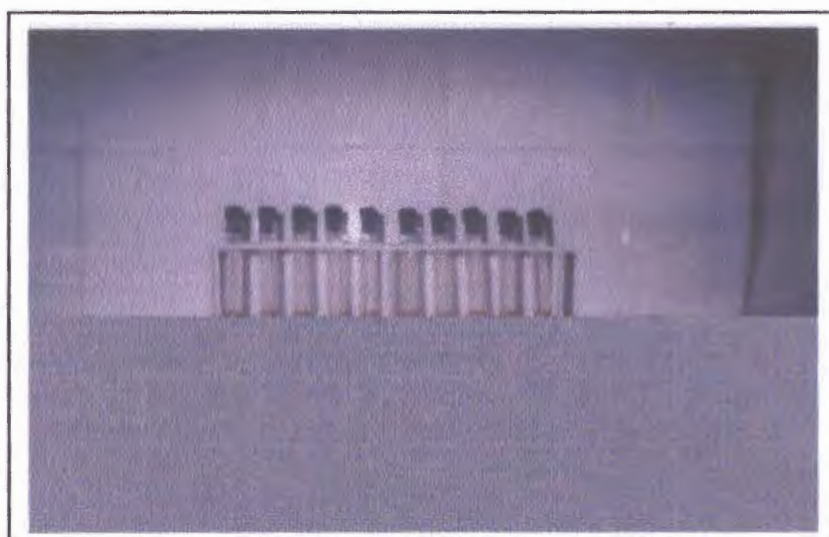
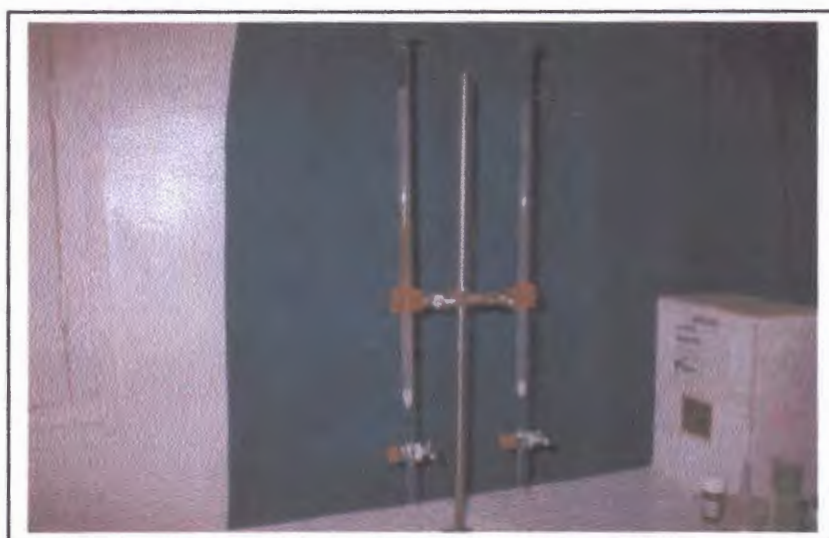
### **I - 2 - 2 - Préparation de l'extrait biologique brut :**

Les foies frais disséqués en petits morceaux, puis hachés finement dans un broyeur empilé de glace, avec l'addition successive de l'acétone jusqu'à 150ml.

Une filtration simple avec papier filtre sera effectuée, les effluants sont éliminés et on récupère le filtrat.

En deuxième étape on fait une centrifugation à 3000 tour/ min pendant 10 minutes.. L'acétone restante dans le filtrat est éliminée par pression avec une rotavaporation effectuée à 56 °C pendant 10 minutes.

Finalement, on réalise une deuxième centrifugation à 2000 tour/min pendant 15 minutes.. On élimine le surnageant et on récupère le culot contenant les protéines. Celles-ci constituent la préparation enzymatique brute à fractionner.



**Fig 14 : Matériels utilisés pour l'extraction et la séparation du mélange lipasique.**

## I - 3 – METHODE DE FRACTIONNEMENT DE L'ENZYME :

### I - 3 - 1- Chromatographie de filtration moléculaire sur séphadex G-100 :

- **Principe :**

La séparation par chromatographie de gel filtration repose sur le concept essentiel des deux phases; une phase mobile (liquide) traverse une phase stationnaire (solide). Il s'ensuit une migration différentielle, où les divers composants initialement présents dans la phase mobile sont sélectivement séparés d'après leur taille. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique ; les plus petites entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

- **Préparation de gel :**

Cette chromatographie a été réalisée en utilisant une colonne de verre remplie de gel sephadex G-100. Ce gel, dont le domaine de fractionnement est compris entre 4000 et 150000 daltons, se présente sous forme de poudre sèche et est utilisé en suspension après gonflement dans un tampon.

Pour une colonne de (45 x 1 cm), il faut environ 5,5 g de sephadex. Cette quantité est mise à gonfler dans 100ml de tampon PBS, pH7,3. Ensuite, la suspension est placée dans le bain-marie à 90 °C pendant 05 heures afin de la dégazer parfaitement.

- **Remplissage de la colonne :**

On a retenu comme colonne, une burette de diamètre 1 cm, à l'extrémité de laquelle on a introduit du coton en verre pour bloquer la phase solide.

La suspension du gel est coulée délicatement sur la paroi interne de la colonne pour empêcher l'emprisonnement des bulles d'air. Une fois le lit du gel se stabilise, on passe environ 200 ml du tampon PBS à travers la colonne pour équilibrer le gel.

- **Dépôt de l'échantillon et élution des protéines :**

Après avoir équilibré la colonne pendant une journée, l'échantillon du départ est décongelé puis ajusté à la concentration 2 mg/ml après dosage colorimétrique selon la méthode de biuret. 5ml de la préparation enzymatique , soit 10 mg de protéines, sont alors déposés soigneusement sur la surface du gel. L'élution de la colonne est effectuée avec le même tampon, à un débit de 15 ml/heure.

Des fractions de 1,5 ml/ 6min/tube sont collectées, et 40 tubes contenant 1,5 ml/tube sont mesurés à 280 nm par le suivi des protéines a l'aide d'un spectrophotomètre à UV. Les mesures



d'absorbances sont effectuées par rapport à un blanc (tampon). Les valeurs obtenues permettent de tracer le chromatogramme du densité optique (D.O) en fonction du volume d'éluion ( $v_e$ ) en ml.

La qualité de séparation des protéines sur le chromatogramme est appréciée par le calcul du facteur de résolution ( R ).

$$R = \frac{2 [ Ve_2 - Ve_1 ]}{W_2 + W_1}$$

$Ve$  : volume d'éluion

$W$ : largeur du pic mesurée en ml, soit la distance qui sépare les points d'intersection avec la ligne de base des deux tangentes aux points d'inflexion du pic .

Plus R est grand, plus la séparation est bonne. En pratique si R est inférieure à 1.5, il ya mélange partiel des deux constituants.

#### I - 4 – DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTEINES TOTALES :

Une des méthodes de dosage des protéines la plus employée est la réaction de Biuret.

Dans cette réaction, les ions cuivriques provenant du sulfate de cuivre forment avec les liaisons peptidiques, un complexe de coloration bleu-violacée. Le nombre de liaisons peptidiques, et par conséquent, la concentration en protéines, déterminent l'intensité de cette concentration.

Cette même intensité est mesurable en terme de densité optique (D.O) par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire.

##### I - 4 - 1- Mode opératoire :

- **Solution :**

- solution de NaCl 0.15 M ..... 250 ml.
- solution de Biuret .....250 ml.
- Solution de protéine standard (caséine).

- **procédure :**

pour la réalisation des dosages, on mélange les préparation selon le tableau ci -après :



	Le blanc	Protéines solubles
Echantillons	/	0,1 ml
NaCl 0,15 M	5,1 ml	05 ml
Solution de biuret	05 ml	05 ml

On laisse réagir 20 à 30 minutes, à la température ambiante jusqu'à ce que la réaction se produise. On procède ensuite à la lecture des D.O au spectrophotomètre à la longueur d'onde 550 nm contre le blanc .

Une courbe d'étalonnage est préalablement réalisée selon le même protocole par une série de dilutions protéiques issues d'une solution mère de caséine, et dont les concentrations sont connues ( voir annexe, tableau III ).

La courbe d'étalonnage :  $DO = F(C)$  « Fig 15 », ( voir annexe ), établie à partir des valeurs de D.O obtenues, permet de déduire la concentration en protéines totales présentes dans l'échantillon à doser.

## I - 5 – DETECTION DE L'ACTIVITE LIPOLYTIQUE :

### I - 5 - 1- Mode opératoire :

- Milieu Réactionnel :

- Huile d'olive (substrat) ..... 1 ml
- Tampon PBS à 0.02 M de pH 7,3 .....10 ml
- Préparation enzymatique.....1 ml

Pour détecter l'activité lipolytique dans les 40 tubes, on mesure le pH à  $t_0$ , dans le milieu réactionnel sans l'enzyme, puis on ajoute l'éluat et on place l'ensemble au bain-marie à 37 °C avec agitation douce.

Après 5 minutes on mesure le pH à  $t_1$

On calcul la variation de pH, qui est égale à :

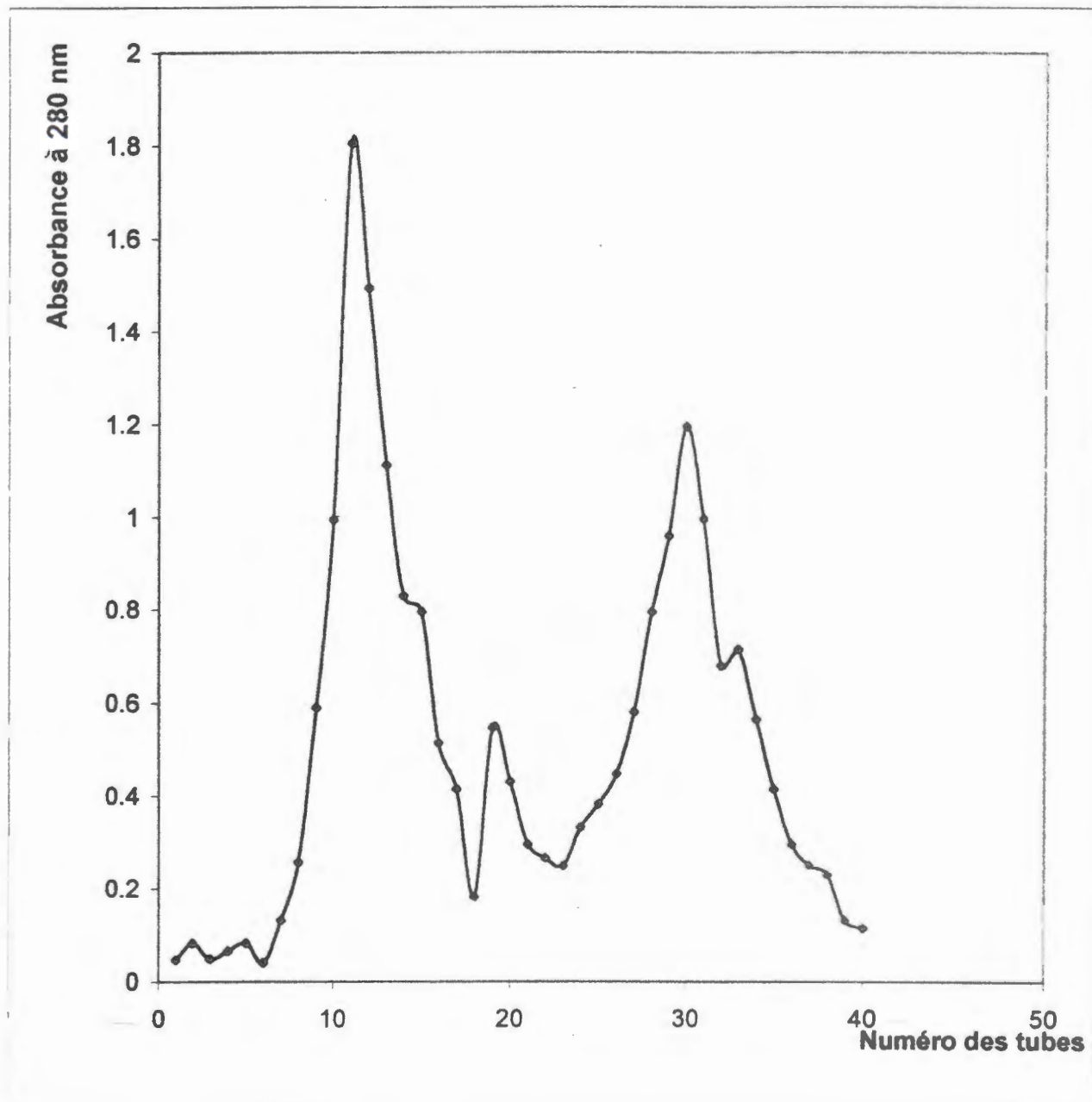
$$\Delta \text{pH} = \text{pH } t_0 - \text{pH } t_1$$

Cette baisse de pH correspond à l'activité de l'enzyme. Ces valeurs permettent de tracer l'activité lipolytique par rapport aux chromatogramme détectant les protéines à 280 nm.

# RESULTATS

Tableau IV : Densités Optiques (DO) à 280 nm de l'éluat.

TUBE	D.O (280 nm)
1	0,047
2	0,083
3	0,049
4	0,066
5	0,083
6	0,041
7	0,132
8	0,265
9	0,590
10	0,995
11	1,805
12	1,494
13	1,112
14	0,830
15	0,795
16	0,514
17	0,415
18	0,182
19	0,547
20	0,431
21	0,295
22	0,265
23	0,249
24	0,332
25	0,382
26	0,448
27	0,581
28	0,795
29	0,960
30	1,195
31	0,996
32	0,680
33	0,715
34	0,565
35	0,415
36	0,295
37	0,250
38	0,230
39	0,132
40	0,115

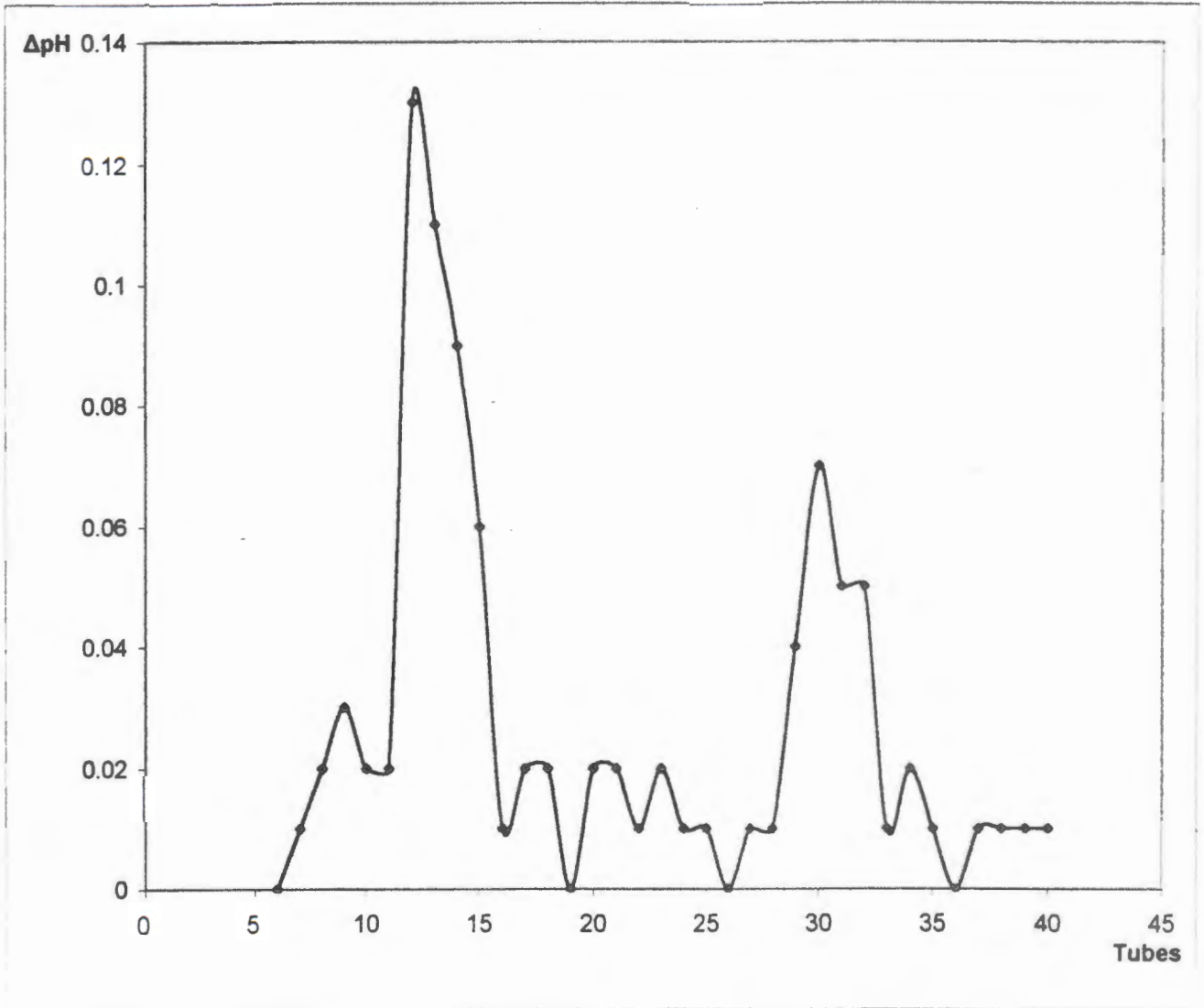


**Fig.16 : Profil d'absorbance à 280 nm des différentes tubes collectés**



**Tableau V : Variation de l'activité enzymatique en fonction des modifications du pH de l'éluat.**

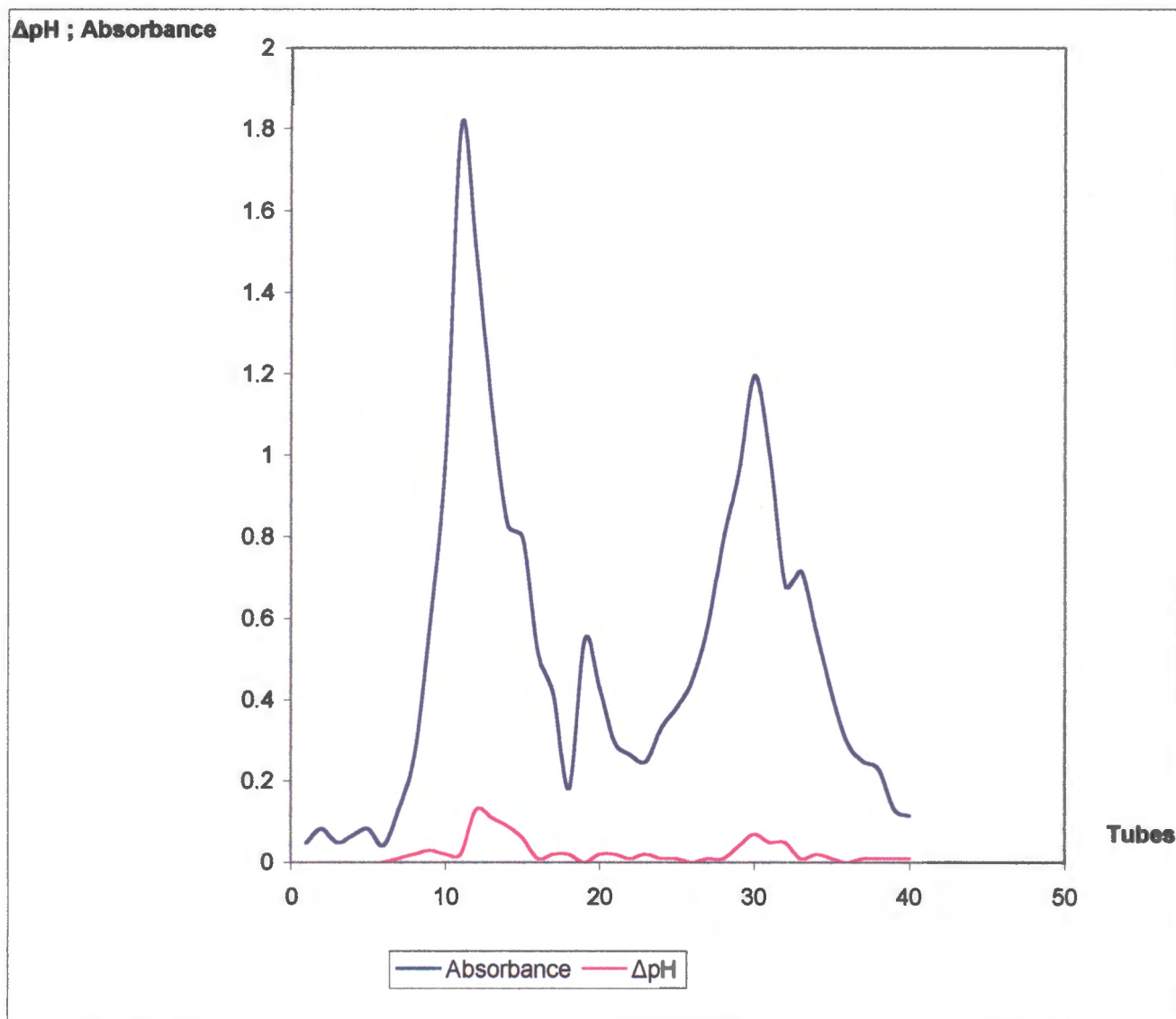
Tube	pH à $t_0$ (Eluat sans substrat)	pH à $t = 5\text{min}$ (Eluat avec substrat)	$\Delta\text{pH}$ $\Delta$ (Activité lipasique)
06	7,30	7,30	0,00
07	7,29	7,28	0,01
08	7,30	7,28	0,02
09	7,31	7,28	0,03
10	7,31	7,29	0,02
11	7,33	7,29	0,02
12	7,30	7,17	0,13
13	7,30	7,19	0,11
14	7,30	7,21	0,09
15	7,31	7,25	0,06
16	7,29	7,28	0,01
17	7,29	7,27	0,02
18	7,30	7,28	0,02
19	7,28	7,28	0,00
20	7,29	7,27	0,02
21	7,30	7,28	0,02
22	7,28	7,27	0,01
23	7,29	7,27	0,02
24	7,31	7,30	0,01
25	7,30	7,29	0,01
26	7,29	7,29	0,00
27	7,30	7,29	0,01
28	7,29	7,28	0,01
29	7,28	7,24	0,04
30	7,30	7,23	0,07
31	7,30	7,25	0,05
32	7,29	7,24	0,05
33	7,29	7,28	0,01
34	7,28	7,26	0,02
35	7,30	7,29	0,01
36	7,30	7,30	0,00
37	7,29	7,28	0,01
38	7,30	7,29	0,01
39	7,29	7,28	0,01
40	7,30	7,29	0,01



**Fig.17 : Profil de variation de  $\Delta pH$  des différentes tubes collectés.**



**DISCUSSION**



**Fig.18 : Détection de l'activité lipasique ( $\Delta\text{pH}$ ) par rapport au chromatogramme détectant les protéines à  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .**



### III - DISCUSSION :

Tous les résultats obtenus concernant la lecture de l'absorbance à 280 nm des différents tubes collectés ainsi que les mesures de l'activité lipolytique des éluats en présence du substrat sont représentés sur les tableaux IV et V respectivement.

Le profil d'éluion obtenu après chromatographie d'exclusion-diffusion de l'extrait enzymatique brut est représenté par la « Fig 16 ».

Ce profil montre que le mélange enzymatique a été fractionné en trois pics distincts : la première partie du chromatogramme correspond à une fraction protéique majoritaire située entre le 7<sup>ème</sup> et le 22<sup>ème</sup> tube.

Cette grande fraction se sépare en deux pics suffisamment rapprochés, élués dans des volumes de tampon de 28 ml et 32 ml respectivement. Une troisième fraction est éluee dans le volume totale de la colonne, soit environ 65ml d'éluant.

Ce Résultat permet de déduire que la matière première de départ est extrêmement hétérogène, constituée par une diversité de protéines n'ayant sûrement pas la même taille, et ne possédant pas un même comportement physico-chimique. Pour cela, il est pratiquement impossible d'isoler une molécule suffisamment purifiée, en une seule étape, sans faire appel à la combinaison d'un certain nombre d'opérations successives, adaptées au produit visé, et en fonction des propriétés globales de la molécule à purifier.

L'analyse qualitative du chromatogramme à été confirmée par le calcul du facteur de résolution R. Ainsi, on a obtenu une valeur  $R = 0,71$  entre le pic (1) et le pic (2), alors que la dernière fraction donne une valeur  $R = 2,66$ . Dans le dernier cas R est supérieure à 1,5, ce qui montre qu'il s'agit d'une bonne séparation chromatographique.

Pour, les deux premières fractions, R est inférieur à 1,5, ce qui signifie soit une zone de contamination entre les deux pics, soit une mauvaise résolution due à l'existence de protéines ayant des poids moléculaires très proches. En effet, les lipases ont une structure macromoléculaire très complexe, formées par l'assemblage de plusieurs chaînes polypeptidiques de poids moléculaire plus ou moins élevés. De ce fait, les constituants protéiques ayant approximativement la même masse moléculaire ne se séparent pas facilement l'un de l'autre sous

l'effet seul de tamis moléculaire, mais seront plutôt élués ensemble avec presque le même volume d'éluion. Cela, se traduit généralement par un aspect chevauché de certains pics du chromatogramme.

Afin d'éviter ce genre de problème et dans le but d'améliorer cette séparation, il serait intéressant de reprendre la même technique, en utilisant une colonne plus longue allant jusqu'à 60 cm ou plus avec un faible diamètre, et dont le débit est relativement faible. En travaillant dans telles conditions, on va évidemment permettre aux moyennes et petites molécules de s'éjourner plus longuement dans les pores du gel, et leur migration sera alors d'autant plus lente que des protéines de tailles à peu près similaires puissent se dissocier aisément. Cela permet d'améliorer la qualité de la résolution chromatographique, et, par conséquent, d'obtenir un bon chromatogramme dont les pics seront suffisamment espacés.

L'activité de la lipase a été suivie par la mesure de la variation de pH au bout de cinq minutes d'incubation de la fraction éluee avec son substrat (huile d'olive). Sur la « *Fig 18* », sont représentées les absorbances à 280 nm pour le suivi des protéines et l'activité lipasique par la variation du pH.

L'examen du tracé correspondant aux variations du pH de l'eluat montre que l'activité totale de l'extrait enzymatique est scindée en deux pics n'ayant pas la même hauteur. Au niveau de la première fraction protéique apparaît un pic majeur correspondant à l'activité maximale de l'enzyme. Une deuxième activité relativement faible est détectée au niveau de la 3<sup>ème</sup> fraction.

Par ailleurs, aucune autre activité lipasique n'est décelée dans les autres tubes testes y compris ceux qui correspondent à la deuxième fraction protéique. L'absence de telle activité au voisinage du 2<sup>ème</sup> pic s'explique soit par la faible concentration protéique dans la fraction correspondante qui ne comporte évidemment pas assez de sites catalytiques capables de transformer une large quantité de substrat, soit par le manque de spécificité réactionnelle étant donné que l'huile d'olive ne présente pas les caractéristiques physico-chimiques du substrat naturelle. Il serait alors possible d'augmenter l'efficacité de l'enzyme, en utilisant un substrat qui possède une étroite spécificité vis-à-vis de l'hydrolase (la butyrate d'éthyl, par exemple). Dans ce cas, l'enzyme sera capable de convertir le maximum de molécules d'un glycéride, libérant ainsi un grand nombre d'acides gras dans le milieu réactionnel, ce qui se traduit

traduit automatiquement par une forte déviation du pH ( augmentation de l'acidité du milieu). C'est donc grâce à l'emploi de substrats spécifiques qu'on peut vérifier et apprécier, avec plus d'exactitude, une activité lipasique au niveau de chaque fraction protéique.

D'une façon générale, ces différents résultats ont permis de conclure que les deux activités enzymatiques isolées au moyen d'une simple chromatographie sont superposées aux pics des protéines, ce qui élimine la contamination de l'enzyme . D'autre part, il s'avère que le PM est une propriété chimique fondamentale en faveur d'une activité maximale de l'enzyme.

Cette hypothèse doit cependant être confirmée par d'autre méthode d'analyse tels que l'électrophorèse et l'electrofocalisation .

La chromatographie d'exclusion-diffusion bien qu'elle soit une technique de base qui se révèle utile dans la séparation des mélanges biologiques, elle doit être compléter par d'autres techniques de purification (chromatographie d'échange ionique, chromatographie d'affinité et électrophorèse).

Pour l'obtention de fraction lipasique pures, la chromatographie d'affinité serait le meilleur outil de cette expérimentation . En effet, les travaux de H.TANAKA et COLL[ 24] ont montré q'une lipase d'origine pancréatique est purifiée totalement par affinité sur sepharose-heparine. En outre, divers travaux sur les lipases d'origine fongique *Aspergillus Niger* et *Penicillium Sp* [24] ont montré que ces souches secrètent un mélange d'isoenzymes qu'on a pu purifier et caractériser par plusieurs techniques.

## CONCLUSION



## CONCLUSION :

La lipase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse des liaisons esters formés par des acides gras et du glycérol.

Une **préparation brute de l'enzyme** est extraite à partir du foie, puis elle est fractionnée sur un support poreux de gel sephadex G-100. l'expérimentation est réalisé sur une colonne de dimension (45 x 1 cm ) et avec un débit de 15 ml/h, adaptée à un simple appareillage du laboratoires. Ces deux paramètres interviennent dans la qualité de la résolution chromatographique. Il s'agit d'une purification partielle.

Ce travail a permis d'obtenir un profil chromatographique avec des pics symétriques, bien séparés. L'apparition de trois fractions éluées successivement dans des temps de rétention espacés indique la présence, dans l'extrait du foie, de certaines activités lipasiques de poids moléculaires variés.

Afin de confirmer ces résultats et vérifier le taux de pureté de chaque activité lipasique, il serait souhaitable de compléter cette démarche analytique par d'autres méthodes d'analyse biochimique tel que l'électrophorèse SDS-PAGE.

**ANNEXE**

## ANNEXE

### 1 - CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION G-100 :

- **Composition du tampon PBS : pH 7,3, 0,02 M.**

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2,84 g.
- KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ..... 2,72 g.
- NaCl ..... 4,5 g.
- Eau distillée ..... 1000 ml

Ajuster à pH 7,3.

### 11 - DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DES PROTÉINES :

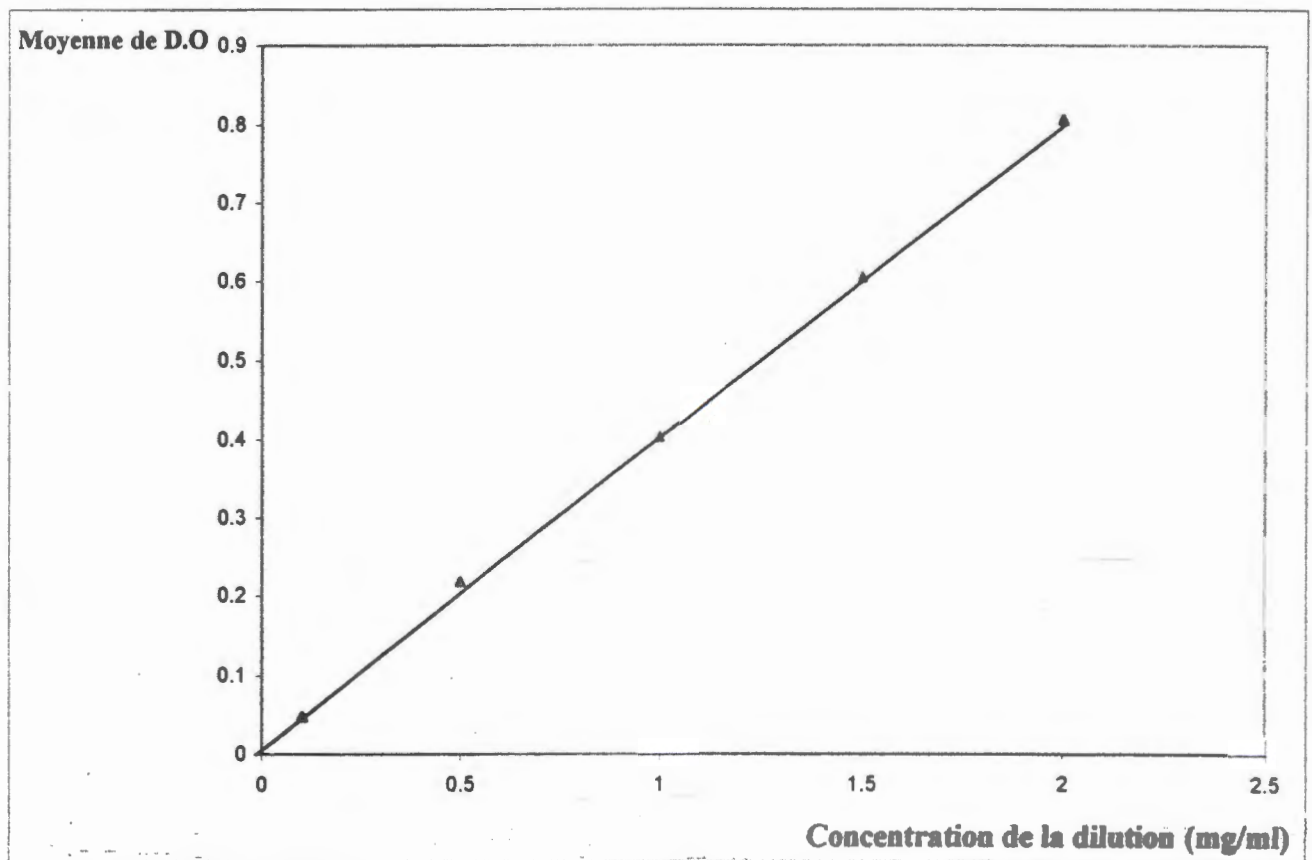
- **Composition de la solution de biuret :**

- NaOH ..... 7g dans 200 ml d'eau distillée.
- Tartrate double de potassium et de sodium : C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>.....14,11g dans 200 ml d'eau distillée.
- Iodure de potassium : KI ..... 2,49g dans 200 ml d'eau distillée
- Sulfate de cuivre : CuSO<sub>4</sub>.....3.74g dans 200 ml de l'eau distillée .

on complète jusqu'à 1000 ml avec l'eau distillée, avec agitation douce.

**Tableau n° III** : Réalisation de la gamme étalon à partir de différentes dilutions d'une solution de caséine.

Tubes	1	2	3	4	5
Concentration de la dilution mg/ml	0,1	0,5	1	1,5	2
Moyenne de D.O	0,047	0,218	0,403	0,605	0,807



**Fig.15**: Courbe d'étalonnage établie à partir de la lecture densitométrique des différentes dilutions.





**ABBREVIATIONS**

## ABREVIATIONS

- AMP<sub>C</sub> : Adénosine mono-phosphate cyclique.
- APOC III : Apoprotéines C<sub>III</sub>.
- cm : Centimètre.
- D.O : Densité Optique.
- EC : Enzyme Commission.
- g : gramme.
- h : heure.
- Kg : Kilogramme.
- $\mu$ m : Micromètre.
- mg : Milligramme.
- ml : millilitre.
- nm : Nanomètre.
- P : Précipité.
- PAGE : Polyacrylamide gel electrophorésis.
- PBS : Phosphate buffer saline.
- PLA : Phospholipase A.
- PLC : Phospholipase C.
- PLD : Phospholipase D.
- R : Radical.
- S : Surnageant.
- SAB : Sérum Albumine bovine.
- SDS : Dodécyl sulfate de Sodium.
- Sp :Espèce inconnu.
- THL : Tétrahydrolipostatine
- UV : Ultraviolet.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :**

- 1- Berkallof A., Bourguet J., Farrad P., et Lacroix J.C., 1978**  
Biologie et physiologie cellulaires II. Ed. Hermonn collection.
- 2- Boudier J.F., et Laquet F.M., 1981**  
Dictionnaire laitier. Deuxième édition.
- 3- Bougnicourt M., 1995.**  
Dictionnaire de microbiologie générale. Ed. Marketings. A.
- 4- Durand G., et Monsan P., 1982**  
Les enzymes : production et utilisation individuelle. Ed. Bordas. Paris
- 5- George L., Claude P., et Claude L., 1986**  
Petit larousse. Ed. librairie larousse. Paris
- 6- Hemissi A., 1998**  
Contribution à la mise au point de la purification des protéines antigéniques de *Fasciola hepatica*. Application au diagnostic immunologique par le test Elisa. Thèse de magister.
- 7- Hennen G., 1998**  
Biochimie 1<sup>er</sup> cycle, cours et question de révision. Ed. Dunod. Paris
- 8- Henry R.,**  
Biological chemistry. Deuxième édition. Ed. Dunod. Paris
- 9- Kaci A., Kermadi L., et Dergali F., 1997.**  
Purification des immunoglobulines G. thèse DES en biochimie.
- 10-Kamoun., 1977**  
Appareils et méthodes en biochimie. Ed. Vangirard ; Paris
- 11-Kessous C., 1996**  
Biochimie structurale : - protéines, glucides, lipides, acides nucléiques.  
Ed. Office des publications universitaires(o.p.u).
- 12-King J.,**  
Practical clinical enzymology. Ed. Ven Nostrand company LTD. London



**13-Kruth J., 1989.**

Biochimie- II -Métabolisme. Ed. Paris

**14-Larpent M. , et Gourgaud J.J. ( 1992)**

Biotechnologie , principes et méthodes. Ed. Doin. Paris

**15-Louisot P. , 1982**

Biochimie générale , . Ed. Simp. Volume 3

**16- Manuel., 1980.**

Pratique pour chromatographie d'échange d'ions, DEAE. Trisacryl. M/CM -Trisacryl. M  
Ed. IBF

**17-Mouranche A., et Coste C., 1958**

Hydrolases et dépolymérase, enzymes d'intérêt industriels. Ed. Gauthier -Villard. Paris.

**18- Penasse., 1974.**

Les enzymes cénitque et mécanisme. Ed Masson et Cie. Paris

**19-Percheron ., Perlés R., et Fogliette M.J., 1981**

Abrégés de biochimie générale. Deuxième édition. Ed. Masson. Tome 2.

**20- Pierre L., 1970**

simiologie biochimique : Analyse biochimiques, explorations fonctionnelle. Ed. Simp  
Editions.

**21- Richard D., 1997.**

Les lipids et les cellules adipeuses. Ed. Nothan. Paris.

**22- Sayad L., et Zeridi M., 1999.**

Etude de l'influence du nitrate de plomb sur l'activité de la lipase de deux variétés de blé.  
Thèse DES biochimie

**23- Taibi Z., 1999.**

Isolement et caractérisation d'une activité polygalacturonase chez cinq souches locales de  
champignons. Thèse de Magistere en biochimie.

**24-Tanaka H., Mierau I., Fumiro I.,1999**

purification and characterization of bovine pancreatic bile saltactivated lipase. By the Japanese  
biochemical society

**25- Weil J.H., 2001**

biochimie générale. Ed. Dunod. Paris.

26- Anonyme.,

chromatographie d'affinité. Théorie et pratique. Ed. Pharmacia Fine chemicals

27- Anonyme .,

filtration sur gel. Théorie et pratiques. Ed. Pharmacia Fine chemicals.

28- [http:// www.chups.Jussieu . Fr.](http://www.chups.Jussieu.Fr)

29- [http:// www.John. Libbey. Eurotest.fr.](http://www.John.Libbey.Eurotest.fr)

30- [http:// www.gazetelabo.fr.](http://www.gazetelabo.fr)



<b>NOM</b> <b>ALIOUA</b> <b>MOULAKMIM</b>	<b>PRENOM</b> <b>DALILA</b> <b>LYNDA</b>	<b>DATE DE SOUTENANCE</b>  <b>SEPTEMBRE 2003</b>
<b>FRACTIONNEMENT D'UN EXTRAIT LIPASIQUE BRUT A PARTIR DU FOIE DU RAT PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION MOLECULAIRE</b>		
<b>NATURE DE DIPLOME : DIPLOME D'ETUDE SUPERIEURE (D.E.S) BIOCHIMIE</b>		
<b>RESUME</b>		
<p>Ce travail a porté sur le fractionnement d'un extrait lipasique brut obtenu à partir du foie de rat. La chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel de sephadex G-100 a permis de séparer le mélange enzymatique en trois fractions protéiques. Par ailleurs deux activités lipolytiques sont détectées: La première eluée dans le premier pic, la deuxième apparaît au niveau de la dernière fraction. Ce résultat est en faveur de la présence de lipases dans le mélange de départ.</p>		
<b>SUMMARY</b>		
<p>This work has consisted in the fractionnement of a crude lipase extract obtained from rat liver. The chromatography of exclusion-diffusion on sephadex gel G-100 has allowed us to get three proteic fractions. Moreover two lipolytic activities are detected in the first peak and other in the last peak. This result is on the favor of the presence of lipases on start mixlure</p>		
<b>المخلص</b>		
<p>هذا العمل يعتمد على فصل خليط إنزيمي خام تحصلنا عليه انطلاقا من كبد الفئران . إن تقنية التصفية الجزيئية على الهلامة chromatographie d'exclusion diffusion sur gel sephadex G-100 مكننا من فصل الخليط الإنزيمي إلى ثلاثة أجزاء بروتينية بالمقابل كشفنا عن نشاطين لتطيل الدم: النشاط الأول مركز في المنحنى الأول و الثاني ظهر على مستوى الجزء الأخير للمنحنى . هذه النتيجة تؤكد وجود نشاط إنزيمي لليباز في الخليط الابتدائي.</p>		
<b>Mots Clés</b>		
<b>Lipase, Foie, Chromatographie de Filtration Moléculaire, Activité Lipasique.</b>		
<b>Encadreur : HEMISSI AHMED.</b>		