MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

Mémoire

Pour obtenir le grade de

Magister en chimie

Option : CHIMIE DE L'EAU / DESSALEMENT ET ENVIRONNEMENT

Par

TAMERSIT SABRINA

EAUX RESIDUAIRES DES TANNERIES ET MEGISSERIES

RECYCLAGE DE L'EAU ET

VALORISATION DES MATIERES POLLUANTES DES

BAINS D'EPILAGE PELANNAGE

Soutenue le 21 Join 2OO9, devant la commission d'examen :

Président	**B.DJELLOULI**	**Prf.**	**Université de Sétif.**
Rapporteur	**K. E. BOUHIDEL**	**Prf.**	**Université de Batna.**
Examinateur	**M. BOUHLASSA**	**MC.**	**Université de Constantine.**
Examinateur	**M. BOURAS**	**MC.**	**Université de Batna.**
Examinateur	**A. N. ZERTAL**	**Prf.**	**Université de Constantine**.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La tannerie compte parmi les industries les plus anciennes et les plus polluantes. Elle transforme les peaux animales en cuir après un traitement préliminaire d'épilage - pelanage destiné à éliminer l'épiderme, suivi d'une opération appelée tannage. Lors de l'étape d'épilage pelanage, attaque alcaline de l'épiderme et des poils, les protéines de la peau (le collagène, la kératine, l'élastine,……..) sont partiellement solubilisées et se retrouvent dans les eaux résiduaires.

Ces eaux sont chargées en matières organiques (protéines, peptides, acides aminés, acides gras,…), en sulfures, et en chaux. . Elles sont très polluées.
Le but de cette recherche est de valoriser ces eaux résiduaires. On s'intéressera tout particulièrement à :

- neutraliser l'eau par un procédé original qui permet le recyclage de l'eau ;
- la détermination, la séparation et la valorisation éventuelle des acides aminés libres

Cette recherche entre donc dans le cadre de l'application des technologies propres dont le but est triple : économie et recyclage de l'eau ; valorisation des polluants (matière organique,…) et protection de l'environnement.

Ces dernières années les industries pharmaceutiques, cosmétiques et aussi le domaine de la production biotechnologique portent un grand intérêt à la valorisation des acides aminés et des peptides.

Ce mémoire de magister est ainsi organisé :

- Chapitre 1 : Généralités sur les tanneries et l'industrie des cuirs ;
- Chapitre 2 : Etude de la structure de la peau ;
- Chapitre 3 : Généralités sur les acides aminés ;
- Chapitre 4 : Méthodes d'hydrolyse des protéines ;
- Chapitre 5 : Méthodes d'analyses des acides aminés ;
- Chapitre 6 : Partie expérimentale. Différents aspects seront traités dans cette partie : la neutralisation des eaux , l'étude des courbes de titrage , le dosage des acides aminés par différentes méthodes chimiques et chromatographiques , l'hydrolyse complète des protéines encore dissoutes ,…
- Chapitre 7 : Importance et utilisation des acides aminés, et peptides.

Premier
CHAPITRE :

GENERALITES SUR LES TANNERIES ET FABRICATION DES CUIRS

I. 1-INTRODUCTION

La tannerie est parmi les industries les plus anciennes, elle a comme but de transformer la peau animale en cuir. Ce dernier doit répondre à certaines caractéristiques. Car son rôle est la protection de tout ce qu'ils habillent contre les éléments extérieurs.

La fabrication du cuir se décompose en une succession d'opérations très différentes, mais interdépendantes dont le choix et la maîtrise conditionne la qualité de l'article fini **[1]**.

La majorité de ces opérations utilisent et consomment plusieurs produits chimiques. Ces opérations sont effectuées en milieux aqueux. Donc la pollution engendrée est une pollution de l'eau.

La pollution des eaux résiduaires de tannerie a deux sources :

- La peau elle-même ;
- Les réactifs chimiques utilisés dans les diverses opérations.

I. 2- PROCÉDÉ DES TANNERIE-MÉGISSERIES

Pour fabriquer les cuirs il faut que la peau animale passe par plusieurs opérations.

Les peaux brutes passent d'abord à la section rivière où s'effectue l'épilage. L'imputrescibilité est acquise lors d'une opération appelée tannage, qui consiste en une stabilisation chimique des groupements réactifs du collagène, réalisée à l'aide d'agents minéraux (sels de chrome) **[2]**.

On peut résumer toutes les opérations de cette industrie dans un organigramme qui représente toutes les étapes, les réactifs utilisés dans chaque étape ainsi que les différents déchets solides et les effluents **(figure 1)**.

I. 3- SOURCES DES SUBSTANCES AZOTÉES DANS LA TANNERIE

Les eaux résiduaires de l'étape d'épilage -pelanage sont caractérisées par la grande teneur en matière organique, surtout azotée (protéines, peptides, acides aminés).

Le but de cette étape est l'élimination des poils ou de la laine et de l'épiderme.

L'épilage est une attaque alcaline assez vigoureuse de l'épiderme et des poils, à condition de ne pas nuire au derme.

I. 3-1- Méthodes les plus usuelles d'épilage [3]:

1- méthodes d'enchaucenage :

a) Enchaucenage coté chair :

Les agents d'épilage pénètrent depuis le côté chair jusqu'aux racines des poils ou de laine qui sont relâchées sans être sérieusement attaquées. Il est généralement nécessaire de procéder à un pelanage ultérieur pour ouvrir la structure de peau.

b) Enchaucenage côté fleur :

Appliqué sur des catégories de peaux brutes spéciales en vue d'obtenir une fleur particulièrement lisse et fine (le poil est complètement détruit).

2- pelanage :

a) Liqueur de sulfure pur :

Le poil est détruit (faible ouverture de la peau), pour cuirs de fleur très plate et serrée (chevreaux glacés).

b) Traitement à la chaux pure :

Relâchement du poil (forte ouverture de la peau). Principalement utilisé pour le 2ème pelain, et plus rarement en bain de pelain long pour les cuirs souple à ganterie.

c) Pelain chaux sulfures combinés :

Procédé de pelanage le plus communément employé.

Formule indicative de composition d'un pelain :

250-400 % eau

2.5-4.0 % sulfure de sodium

1.0-5.0 % chaux hydratée poudre

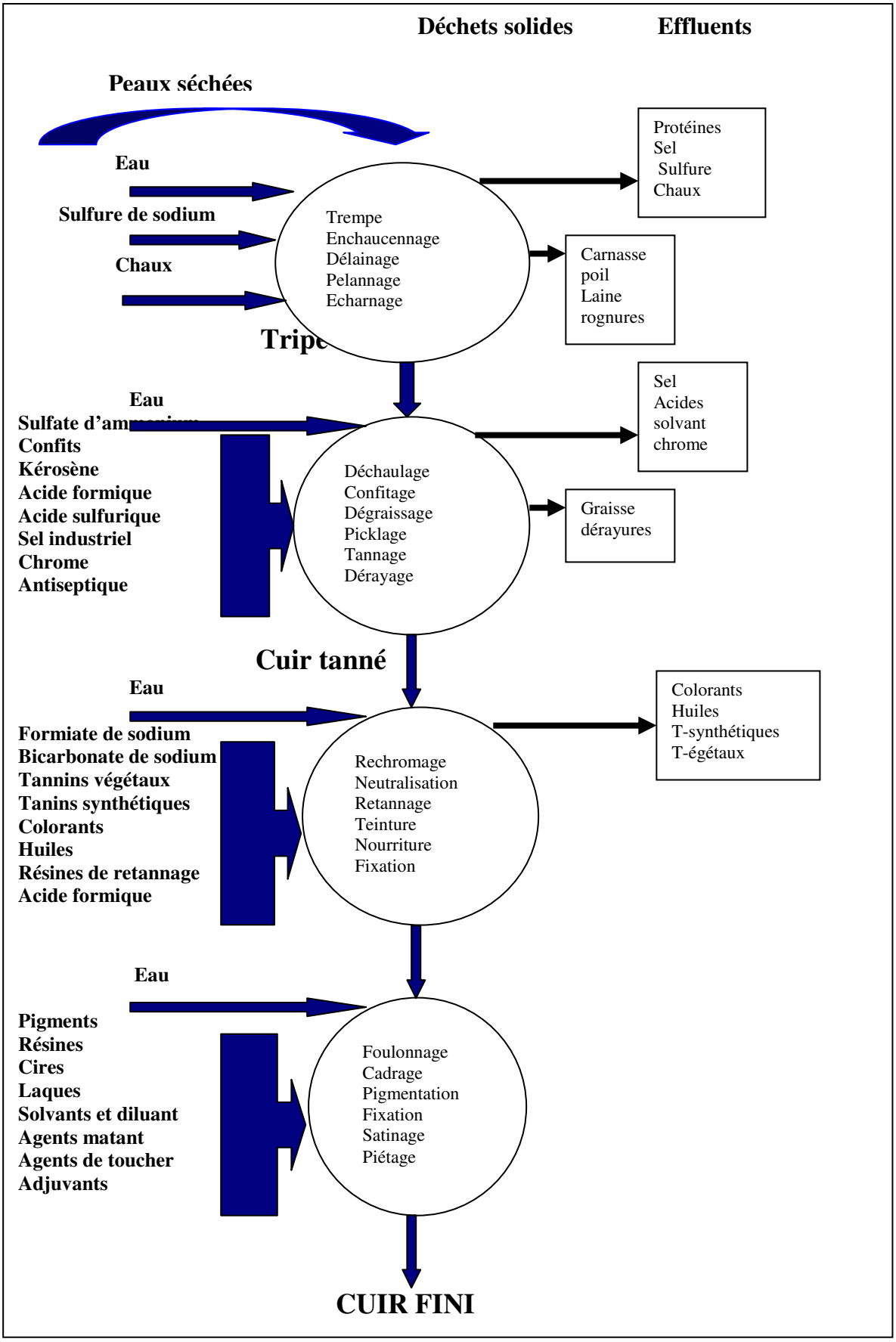


Figure I-1 : *Organigramme de fabrication de cuir, réactifs utilisés, déchets solides et effluents.*

I. 4- CONSOMMATION D'EAU ET DE PRODUITS CHIMIQUES D'UNE TANNERIE-MÉGISSERIE

Le tableau suivant représente la consommation d'eau et des produits chimiques au niveau de chaque opération.

Tableau I-1 : *Consommation d'eau et produits chimique (ENIPEC de Batna).*

Opération	Eau (m^3 /J)	Produits chimiques par opération
Prétrempe	28.8	pH =9
Ecraminage	8.0	
Trempe	28.8	1.2 % de Na_2S, 2% d'antiseptique ; à 30°C ; (pH= 11)
Epilage Pelanage	28.8	50Kg de Na_2S, 50Kg de chaux, 3Kg de NaOH ; à 30°C ; (pH= 12)
Rinçage	28.8	
Echarnage	12.0	
S/ total	135.2	
Déchaulage Confitage	18.0	2 % de NH_4NO_3, 0.1 % d'HCOOH ; 0.03% d'enzyme, 0.5 % d'agent mouillant
Rinçage	9.0	
Dégraissage	12.0	8 % de pétrole, 0.5 % d'agent mouillant
Rinçage	18.0	
Picklage tannage	18.0	8% de NaCl, 0.3 % d'HCOOH, 0.7% d'H_2SO_4 ; (pH= 2.8- 3) 6 % de sel de chrome, 1e fois 0.8 % de Na_2CO_3 ; à 30°C 2e fois 0.2% de Na_2CO_3 ; (pH= 4).
Rinçage	18.0	
Neutralisation	12.0	0.5 % de $Ca(HCOO)_2$, 0.8 % de $NaHCO_3$, 2 % tanin synthétique
Retannage	12.0	1.5 % tanin synthétique, 2% de tanin minéal, 3 % de mimosa, 3 % de quebracho
Teinture Nourriture	24.0	0.5 % d'NH_3, 2 % de colorant acide, 1% d'HCOOH ; à 50°C ; (pH = 6-7) ; Des huiles sulfonées
total	276.2	

Les eaux résiduaires d'épilage-pelanage :

L'épilage est une attaque alcaline de l'épiderme et des poils, dont le but principal est de dissoudre partiellement la kératine. Donc les effluents de cette étape renferment une forte quantité de chaux vive libre, et aussi le plus souvent de quantités importantes de sulfures de sodium, sans oublier la matière organique azotée comme les protéines, les peptides et les acides aminés libres **[2]**.

Tableau I-2 : *Composition d'un pelain [1].*

paramètres	valeurs
DBO_5	8 à 20 g/l
DCO	18 à 40 g/l
AZOTE N	3 à 4 g/l
MES	12 à 30 g/l
SULFURES S^{2-}	1.6 à 3 g/l
CHAUX	6 à 8 g/l
pH	12.5 à 13

I. 5- VALORISATION DES DÉCHETS DE TANNERIE

Pour fabriquer les cuirs, il est nécessaire d'éliminer les poils ; les résidus sous-cutanés, les pattes, la tête, des copeaux de cuir, à cause de l'irrugularité de la peau à fin de donner à cette peau une forme géométrique.

Dans l'industrie du cuir, ils utilisent seulement une partie de la peau brute. Donc tous les autres déchets constituent une source de pollution et un gaspillage.

Ces déchets peuvent trouver des utilisations dans les industries les plus diverses et les plus éloignées : de la pharmacie au nettoyage des sols industrielles **[4]**.

Biomatériaux collagéniques à usage cosmétique et médical :

Dés 1962, des travaux de recherche du centre technique du cuir (C.T.C) et du centre de recherche appliquée de dermobiochimie (C.E.R.A.D) relatifs au collagène sont valorisées. Ils ont porté sur la mise au point de procédés d'extraction du collagène et de toute une filiation de biomatériaux : gels, fibres, films, éponges, destinés à des applications cosmétiques et médicales mettant à profit, respectivement, les propriétés régénérantes et le caractère hémostatique et cicatrisant du collagène **[4]**.

I. 6- CONCLUSION

La connaissance des différents procédés de l'industrie de fabrication du cuir (consommation d'eau, produits chimiques), est nécessaire pour notre étude, et pour prévoir le genre d'effluents qu'on peut trouver dans chaque opération.

Les eaux résiduaires du bain d'épilage pelanage sont riches en sulfure, en chaux et en matière organique azotée (protéines, peptides, acides aminés).

La matière organique azotée est le polluant majeur du bain d'épilage, donc leur valorisation nous permet d'éliminer une grande partie de la pollution totale.

La récupération de matière organique azotée à partir des eaux résiduaires des différentes industries gagne une grande importance ces dernières années **[5]**.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Les eaux résiduaires de tanneries ; Techniques d'épuration et prévention de la pollution, (Application de certaines techniques à la tannerie de DJELFA), centre technique du cuire, Lyon (1980).

[2] R. Mostephaoui, thèse de magister, en chimie de l'eau, université de Batna. (1998).

[3] Mémento du technicien du cuir, 2e édition revue et augmentée, Basf Akiengesellschaf D- 6700 Ludwigshafen, pp. 62-65.

[4] M. Aloy, M. Folachier, G. Pichon et B. Vulliemet, « la valorisation des déchets de tannerie et mégisserie », agence nationale pour la récupération et l'élimination des déchets et centre technique du cuir, Lyon, décembre (1982).

[5] I.Kabdasli, T. Oimez, O.Tunay. "Nitrogen removal from tannery wastewater by protein recovery". J. Water science and technology 48. (2003).215-223.

Deuxième
CHAPITRE :

STRUCTURE DE LA PEAU

II.1- INTRODUCTION

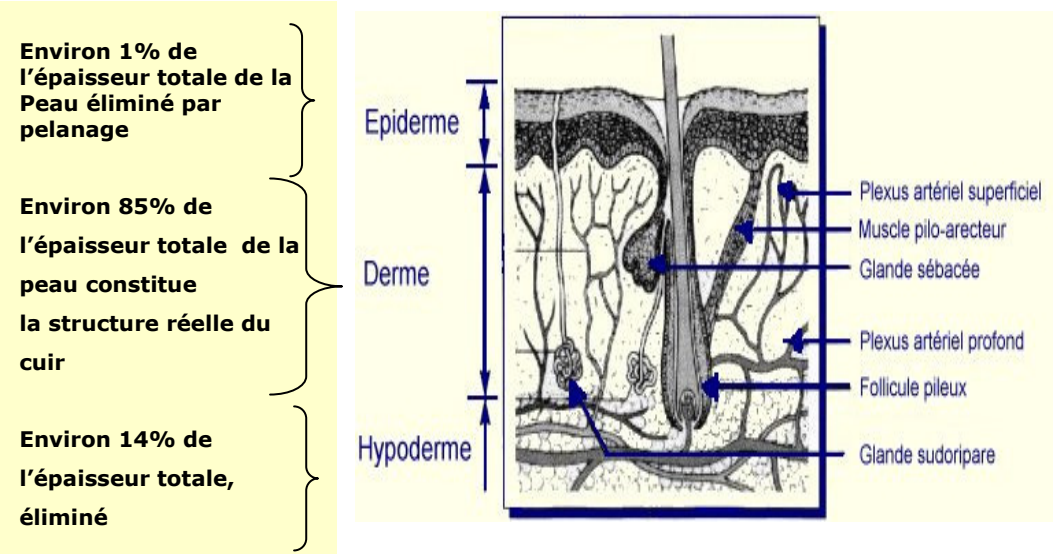
Pour enrichir notre travail et pour comprendre ce qui se passe au niveau de la tannerie et les substances que l'on peut trouver dans les eaux résiduaires, il est très important de faire une recherche succincte sur la structure et les composants d'une peau mammalienne.

La peau mammalienne est un organe qui répond à plusieurs fonctions physiologiques qui sont : la régulation de la température de la peau, le stockage des besoins du corps, la protection, l'élimination des déchets du corps, la détection sensoriel et la communication. L'âge, le sexe, l'environnement, le stress et l'état de santé se reflètent directement sur la peau.

Une peau fraîche se compose d'eau, de protéines, de matière grasse et de sels minéraux.
Le composant le plus important du cuir sont les protéines. Ces dernières peuvent être :

- le collagène : dans le tannage qui donne le cuir,
- la kératine : constituant des poils, de la laine, des cornes, des structures épidermales.

II. 2- LA PEAU BRUTE



FigureII-1 : *Structure de la peau.*

II. 3- LA COMPOSITION APPROXIMATIVE D'UNE PEAU FRAICHE ECORCHEE

Composition de la peau animale [1] :

Eau : environ 65%

Protéines : environ 33% (protéines structurales « fibreuses », et protéines non structurales « non-fibreuses »)

Substances minérales : environ 0.5%

Matières grasses : 2 à 6% (bovin, veaux)
2 à 10% (chèvre)
5 à 30% (mouton)

Autres substances (pigments, etc.…) 0,5%

Protéines de la peau animale :

1* Protéines fibreuses

(a) collagènes (environ 98%)
(b) élastine (environ 1%)
(c) kératines (épiderme, poils, laine)

} substances de base pour la fabrication du cuir

2* Protéines non fibreuses (environ 3.5 %)

(a) albumines
(b) globulines
(c) autres protéines et mélamine

} éliminées au cours des opérations de rivière

Composition élémentaire des protéines :

45 – 55 % de carbone
6 – 8 % d'hydrogène
19 – 25 % d'oxygène
16 – 19 % d'azote
0.5 – 2.5 % de soufre, phosphore, fer, iode, brome, chlore, etc.

II.4- QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES

4-1- pH isoélectrique (pHi) d'une protéine

Un enchaînement protéique est composé des radicaux (R) sous forme ionisée. Il existe des radicaux acides et basiques. Ces radicaux sont caractérisés par une valeur de pKa.

Le pH isoélectrique (pH_i) ,est le pH dont la molécule est neutre électriquement, le nombre des radicaux aminés chargés positivement égale au nombre des radicaux carboxyliques chargés négativement.

Dans le cas d'une modification dans le nombre de radicaux de même signe la valeur de pHi varie. Par exemple, une diminution du nombre de radicaux chargés négativement fait augmenter le pHi.

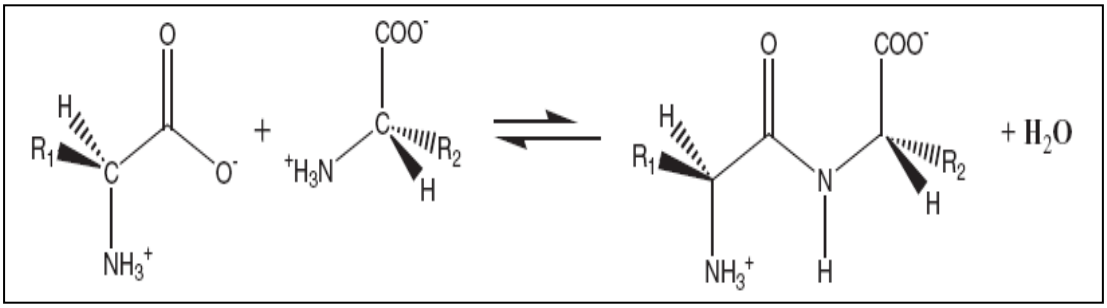
Tableau II- 1: *Valeur de pHi de quelques protéines*

Protéine	PH_i
Collagène natif (bovin)	7.0 – 7.8
Collagène pelané	4.9 – 5.5
Kératines	3.7 – 5.0
Albumine d'œuf	4.6 -4.7

4-2- Structure d'une chaîne polypeptidique d'acides aminés

Les acides aminés se polymérisent, avec élimination au moins d'une molécule d'eau.

Les polymères constitués d'un petit nombre (de 2 à 3) d'acides aminés ou unités peptidiques, comme ils peuvent constitués d'un grand nombre. Ces polymères son appelés respectivement, dipeptides, tripeptides, ou polypeptides. Donc les polypeptides sont des polymères linéaires, ou chaque acide aminé est lié à ses voisins par ses deux extrémités **[2]**.



FigureII-2: *Condensation de deux α-aminoacides pour former un dipeptides.*

Toutes les protéines sont composées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques.

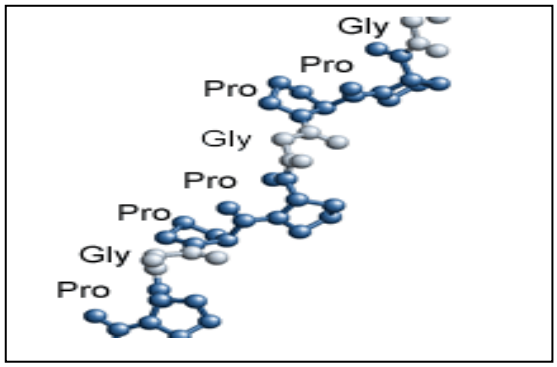
Pour le collagène le nombre de liaisons peptidiques est environ 1000 liaisons **[3]**.

4-3- Différentes structures des protéines [4]

Il existe quatre types de structure protéique, primaire, secondaire, tertiaire, et quaternaire.

Structure primaire :

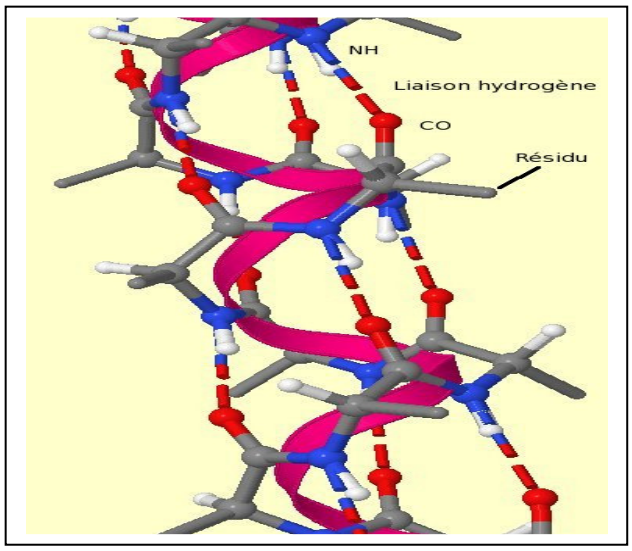
Dans cette structure les acides aminés sont liés par des liaisons peptidiques covalentes.



FigureII-3: *Modèle en boules et bâtonnets représentant l'enchaînement d'un motif de 3 acides aminés : deux prolines (en bleu) et une glycine (en blanc).*

Structure secondaire :

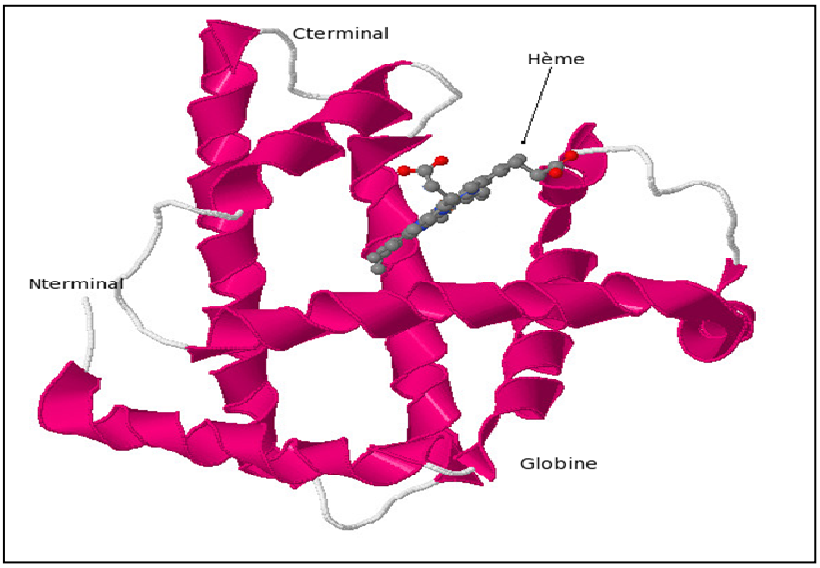
La structure secondaire d'une protéine décrit la présence de régions repliées de la chaîne polypeptidique. Les deux types de structure secondaire les plus communs son l'hélice α, et le feuillet β-plissé.



FigureII-4: ***L'hélice alpha*** *: elle est caractérisée par l'enroulement des liaisons peptidiques autour d'un axe. Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupements CO et NH de 2 liaisons peptidiques superposées.*

Structure tertiaire :

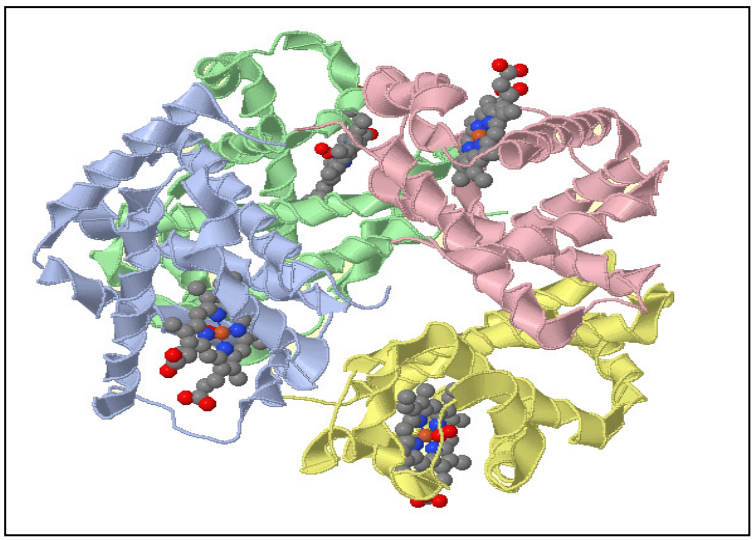
La structure tertiaire d'une protéine représente l'arrangement tridimensionnel de tous les acides aminés situés dans la chaîne polypeptidique. Cette structure est maintenue par de multiples liaisons non covalentes.



FigureII-5: ***Exemple de la myoglobine*** *La structure de la molécule s'organise alors selon les trois directions de l'espace.*

Structure quaternaire :

Cette structure est constituée de plus d'une chaîne polypeptidique. C'est l'arrangement spatial des différentes sous-unités polypeptidiques et la nature des interactions existant entre elles.



FigureII-6: ***Exemple de l'hémoglobine*** *Correspond à l'association de plusieurs sous unités protéiques (les monomères) pour former une protéine dite oligomérique*

4-5- Forces de cohésion dans les protéines

On peut regrouper les liaisons en :

1. Liaisons covalentes ;
2. Liaisons ioniques ou salines ;
3. Liaisons hydrogènes ;
4. Liaisons hydrophobes ou apolaires.

Ces liaisons augmentent la stabilité des protéines.

II. 5- PROTÉINES DE LA PEAU

5-1- Le collagène

Parmi toutes les protéines, le collagène du tissu conjonctif est la plus abondante, elle représente presque un tiers ou plus de l'ensemble des protéines du corps. La quantité du collagène est proportionnelle à la grandeur d'un animal, plus l'animal est grand (lourd) plus la quantité de collagène est importante. Le collagène est une protéine extracellulaire organisée dans des fibres et fibrilles de grande résistance à la traction. La disposition des fibrilles de collagène varie selon leur fonction biologique du tissu conjonctif. Dans la peau de la vache, les fibrilles de collagène forment un entrelacement de feuillets **[5]**. La molécule de collagène a une longueur d'environ 280nm et un diamètre d'environ 1.5 nm ; son poids moléculaire est d'environ 300000 daltons ; elle est composée de trois chaines polypeptidiques de même longueur enroulées les unes autour des autres en triple hélice. Chaque hélice ayant des séquences **gly- X-Y** répétées (glycine, X est souvent la proline, et Y est souvent l'hydroxyproline).

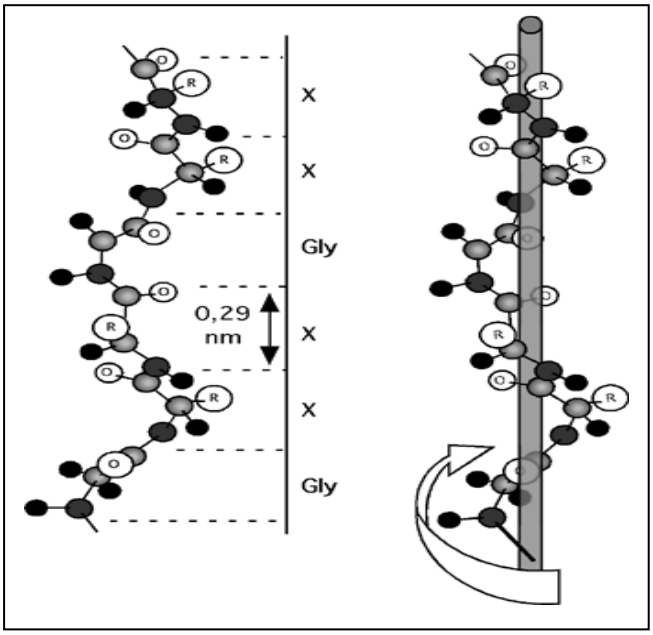
La structure primaire du collagène comprend 20 acides aminés différents dont les plus caractéristiques sont la glycine, la proline, et l'hydroxyproline.

Les collagènes de différentes espèces diffèrent quelque peu par leur séquence en aminoacides, mais la plupart contiennent environ 3% de glycocolle et 11% d'alanine, 12 % de proline et 9% d'hydroxyproline **[5].**

Propriétés physiques et chimiques :

- à l'état sec, blanchâtre, dur et cassant
- insoluble dans l'eau froide et les solvants organiques

- les tissus absorbent de l'eau jusqu'à 70% de leur poids
- le collagène peut absorber la vapeur d'eau jusqu'à 50%
- la conservation par déshydratation est possible
- le collagène est à son minimum de gonflement au pH isoélectrique.
- Par contre, un milieu acide ou alcalin dilué provoque un gonflement par une fixation d'eau plus importante.



FigureII-7: *Hélice de collagène, à chaque trois acides aminés on tombe sur une glycine; l'hélice est aussi très riche en proline et en hydroxyproline.*

5-2- Les kératines

Les kératines sont des protéines fibreuses, synthétisées par les cellules de la peau. Elles comprennent des protéines de la peau (le cuir chevelu est presque une kératine pure), ainsi que des structures ectodermiques comme la laine, les cheveux, les cornes.

Les kératines sont insolubles dans l'eau, les acides dilués, et les bases. On distingue deux types de kératines, les α- kératines, et les β- kératines.

TableauII-2 : *Différences entre les α- kératines et les β- kératines*

les α- kératines	*les β- kératines*
- riche en cystéine, et cystine ainsi que les ponts disulfures. Et en plus elle contient la majorité des acides aminés communs. **- comprennent la protéine fragile et dure des cornes et des ongles, ainsi que les kératines plus molles et plus flexibles de la peau, des cheveux et de la laine.** **- s'étirent quand elles sont chauffées et retrouvent leur taille par refroidissement, exemple : les cheveux.**	**- ne contient pas la cystéine ni la cystine, mais elles contiennent des acides aminés à courtes chaînes comme le glycocolle, l'alanine, et la sérine.** **- elles sont des constituants des fibres sécrétées par les araignées et les vers à soie et des écailles et reptiles et des oiseaux.** **- ne s'allongent pas par les mêmes conditions.**

La structure primaire des kératines comprend 21 à 22 acides aminés différents, la cystéine est présente en quantité considérable ainsi que les formes à ponts disulfures.

Sous l'action des substances alcalines, Na_2CO_3, NaOH, Na_2S,……le groupe disulfure est transformé. La dissociation hydraulique du pont disulfure lorsque le sulfure est liée à un peptide se produit à pH 10.6 **[1].**

$$R—CH_2—S—S—CH_2—R \quad + \quad OH^- \longrightarrow R—CH_2—S—OH \quad + \quad {}^-S—CH_2—R$$

Propriétés physiques et chimiques :

- teneur en soufre de 3 à 5 % caractéristique (ponts disulfure de cystine)
- Le pont disulfure de cystine es dissociable en milieu aqueux par réduction et oxydation **[3]**

5-3- L'élastine

L'élastine est une protéine fibreuse, flexible du tissu conjonctif. A l'opposé des chaînes polypeptidiques structurées et rigides des α-kératines et du collagène, l'élastine présente une conformation irrégulière, en chaîne désordonnée.

Cette protéine est riche en glycine et proline, mais contient peu d'hydroxyproline.

L'élastine est une protéine insoluble sous l'action des conditions alcalines d'épilage **[6]**.

II. 6- CONCLUSION

Ce chapitre nous permet de souligner quelques points très importants :

- Les acides aminés qu'on peut trouver en grand pourcentage dans les eaux du bain d'épilage sont celles des deux protéines fibreuses ; le collagène et les kératines.
- L'élastine parmi les grandes protéines fibreuses mais elle est insolubles sous l'action des conditions alcalines d'épilage.
- Les acides aminés qu'on peut trouver dans la structure du collagène et des kératines sont:

TableauII-3 : *Composition du collagène et des kératines en acides aminés* **[3]**.

Acide aminé	Fréquence collagène	La laine
Glycine	+ + + +	+
Alanine	+ + +	+
Valine	+	+
Leucine	+	+
Isoleucine	+	+
Proline	+ + +	+
Serine	+	+ +
Hydroxyproline	+ +	-
Cystéine	-	+ + +
tryptophane	-	+
phénylalanine	+	+

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] T.Varnali, what is leather? Bogazici University, faculty of arts and science, department of chemistry Bebek 80815 Istanbul- Turkey. (1987).

[2] A.Manz, N.Pamme, D.Iossifidis. Bioanalyical chemisry. Imperial college press. (2004).

[3] Mémento du technicien du cuir, 2eme édition revue et augmentée, Basf Akiengesellschaf D- 6700 Ludwigshafen, pp. 19-27.

[4] B.D.Hames, N.M.Hooper, J.D.Houghton. L'essentiel en biochimie. Berti editions.(2000).

[5] Albert L. Lehninger. Biochimie. « Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires ». Seconde édition, Flammarion médecine- sciences. (1993).

[6] I.Kabdasli. T. Oimez . O.Tunay. "Nitrogen removal from tannery wastewater by protein recovery". J. Water science and technology .48. (2003).215-223.

Troisième
CHAPITRE :

GÉNÉRALITÉS SUR LES ACIDES AMINÉS

III.1- INTRODUCTION

Les acides aminés sont parmi les molécules d'intérêt biologique très important, en tant que molécules libres ou encore en tant que maillons élémentaires des protéines **[1]**.

La conaissance des propriétés des acides aminés est très importante pour leur analyse, séparation et identification. Elle est également importante pour la compréhension des propriétés des protéines, et par la suite de pouvoir les analyser et les identifier.

Dans ce chapitre, on va voir quelques propriétés importantes de ces molécules.

III. 2- LES ACIDES AMINÉS PROTÉIQUES

Les acides aminés sont les blocs élémentaires des protéines. Les protéines chez toutes les espèces, des bactéries aux organismes supérieurs (humains), sont constituées d'une même série de 20 acides aminés.

Ces 20 acides aminés ont la même structure de base. Chaque acide aminé possède un carbone central, désigné carbone α, auquel sont attachés quatre substituants : un groupement amine basique ($-NH_2$), un groupement carboxyle acide (-COOH), un atome d'hydrogène, et une chaîne latérale ou groupement « R » variable.

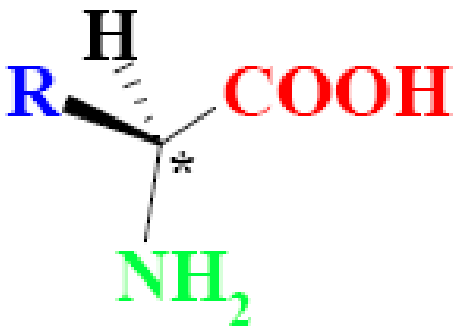


Figure III-1 : *Structure générale d'un α-acide aminé.*

Touts les acides aminés possèdent une fonction amine primaire à l'exception de la proline qui possède un second radical amine (imitative) **figure 2**.

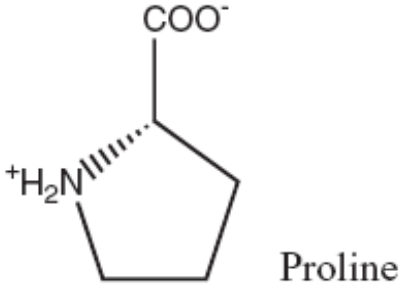
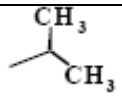
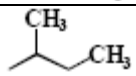
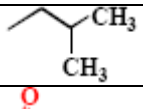
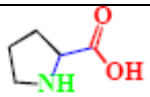
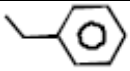
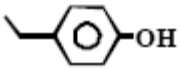
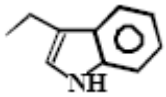
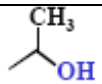
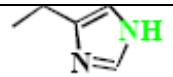


Figure III-2 : Structure de la proline.

Les acides aminés sont désignés souvent par une abréviation correspondant aux trois premières lettres de leur nom ou à une seule lettre. Par exemple, la glycine sera abrégée en Gly ou en G voir **tableau 1**.

Tableau III-1 : Symboles et chaînes latérales des 20 acides aminés **[1]**.

Acide aminé	**Symbole en trois lettres** **Symbole en une lettre**	**Chaîne latérale**
Glycine	**Gly** **G**	**-H**
Alanine	**Ala** **A**	**$-CH_3$**
valine	**Val** **V**	
Leucine	**Leu** **L**	
Isoleucine	**Ile** **I**	
Proline	**Pro** **P**	 Formule complète
Phénylalanine	**Phe** **F**	
Tyrosine	**Tyr** **Y**	
Tryptophane	**Trp** **W**	
Serine	**Ser** **S**	$-CH_2-OH$
Thréonine	**Thr** **T**	
Cystéine	**Cus** **C**	$-CH_2-SH$

Méthionine	**Met** **M**	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
Lysine	**Lys** **K**	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$
Arginine	**Arg** **R**	$-CH_2-CH_2-CH_2-\overset{H}{N}-\begin{matrix}NH_2\\NH\end{matrix}$
Histidine	**His** **H**	
Acide aspartique	**Asp** **D**	$-CH_2-COOH$
Acide glutamique	**Glu** **E**	$-CH_2-CH_2-COOH$
Aspargine	**Asn** **N**	$-CH_2-CONH_2$
Glutamine	**Gln** **Q**	$-CH_2-CH_2-CONH_2$

Un acide aminé diffère par rapport à un autre par sa chaîne latérale **-R**. Donc ils sont classés ou regroupés souvent en fonction des propriétés de leur chaîne latérale.

Certains sont acides, alors que d'autres sont basiques. Certains possèdent des chaînes latérales aromatiques, d'autres des chaînes latérales courtes ou longues,…

- Les cinq aliphatiques sont composés de la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, et l'isoleucine.
- Les trois aromatiques sont : la phénylalanine, la tyrosine, et le tryptophane.
- La proline le seul acide aminé qui possède une fonction amine secondaire.
- Les deux hydroxylés sont composés de la sérine, et la thréonine.
- Les deux soufrés sont composés de la cystéine, et la méthionine.
- Les trois basiques la lysine, l'histidine, et l'arginine.
- Les deux acides carboxyliques : l'acide aspartique, et l'acide glutamique.
- Les deux amides : l'asparagine, et la glutamine.

III. 3- PROPRIÉTÉ PHYSICO CHIMIQUES DES ACIDES AMINÉS

III. 3-1- Equilibres acido-basiques

Les acides aminés cristallisent à un point de fusion élevé, habituellement au dessus de 200°C **[2]**.

Ils sont solubles beaucoup plus dans l'eau que dans des solvants moins polaires.

Les acides aminés ont des propriétés acido-basiques remarquables **[3]**. Dans un milieu aqueux comme l'eau un acide aminé est dissocié, il peu agir à la fois comme un acide ou comme une base.

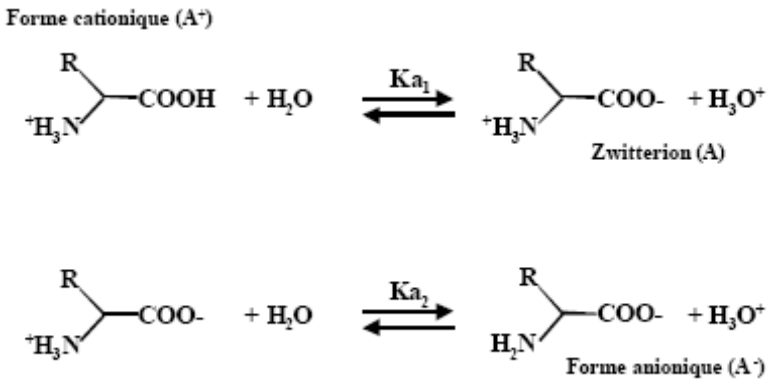


Figure III-3 : *Equilibres acido-basiques d'un acide aminé.*

Les α-amino acides ont deux groupes acido-basiques, tandis que ceux ayant des chaînes latérales ionisables, ont trois groupes.

III. 3-2- Diagrammes de répartition des espèces

On peut facilement représenter la concentration de chaque espèce (acide, basique, ou neutre) d'un acide aminé en fonction de pH. Utilisant les équilibres acido-basiques, et les valeurs de pKa.

$$Ka_1 = |\mathbf{AA^{+-}}| \,.\, |H^+| \;\; / \;\; |\mathbf{AA^+}|$$

$$Ka_2 = |\mathbf{AA^-}| \,.\, |H^+| \;\; / \;\; |\mathbf{AA^{+-}}|$$

$$|AA|_t = |AA^+| + |AA^-| + |AA^{+-}|$$

$$|\mathbf{AA^+}| \;\% = 100 \,/\, [1 + K_1 / |H^+| + K_1 . K_2 / |H^+|^2 \;]$$

$$|\mathbf{AA^{+-}}| \;\% = 100 \,/\, [1 + |H^+| \,/\, K_1 + K_2 / |H^+| \;]$$

$$|\mathbf{AA^-}| \;\% = 100 \,/\, [1 + |H^+|^2 / K_1 . K_2 + |H^+| \,/\, K_2]$$

On a comme exemple la courbe de répartition des espèces de la glycine :

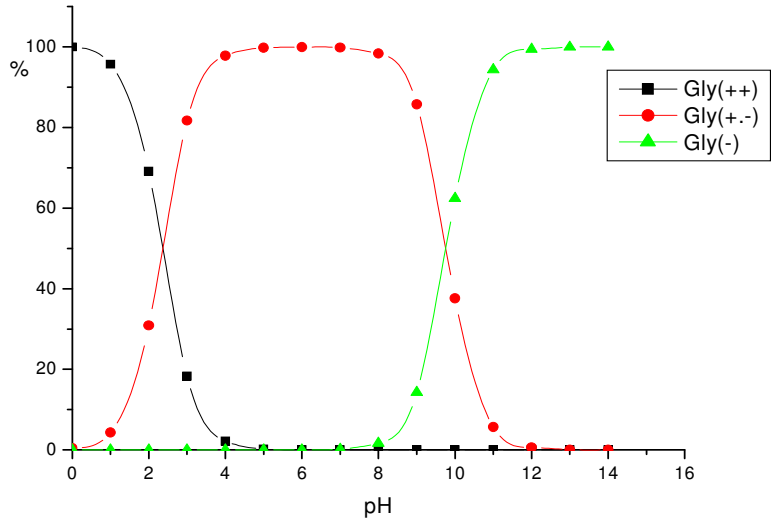


Figure III-4 : *Diagramme de répartition des espèces de la glycine*

III. 3-4- Point isoélectrique

Le point isoélectrique est le pH dont une molécule donnée ne possède aucune charge électrique nette. Pour les α acides aminés :

pI = ½ (pKi + pKj)

Ki, et Kj son les constantes de dissociations.

Dans le cas des acides aminés monoamines monocarboxyliques comme la glycine ; Ki et Kj correspondent à K_1 et K_2. Alors que dans le cas d'autres acides aminés tel que l'acide aspartique et l'acide glutamique, Ki, et Kj sont respectivement K_1 et K_R. Pour l'arginine et l'histidine et la lysine, Ki, et Kj correspondent à K_R et K_2.

Donc le point isoélectrique correspond à une charge globale nulle de l'acide aminé.

Tableau III-2 : *Valeurs de pI pour les 20 acides aminés [4].*

Acides aminés polaires	pI	Acides aminés polaires	pI	Acides aminés polaires	pI
Alanine	**6.02**	**Glycine**	**5.97**	**Lysine**	**9.74**
Valine	**5.97**	**Asparagine**	**5.41**	**Histidine**	**7.58**
Leucine	**5.98**	**Glutamine**	**5.65**	**Arginine**	**10.76**
Isoleucine	**6.02**	**Tyrosine**	**5.65**	**Acide aspartique**	**2.87**
Phénylalanine	**5.98**	**Cystéine**	**5.02**	**Acide glutamique**	**3.22**
Tryptophane	**5.88**	**Serine**	**5.68**		
Méthionine	**5.75**	**thréonine**	**6.53**		
proline	**6.1**				

On peut également calculer la charge globale apparente « Zi » d'un acide aminé en utilisant la formule suivante :

$$Zi = \frac{\sum n.[A^n]}{[A_0]}$$

n = charge de l'espèce
n = 0 pour un acide aminé neutre (zwitterion)

Si on utilise la formule précédente on peut tracer la charge de chaque acide aminé en fonction du pH ; exemple de la glycine voir **figure5**.

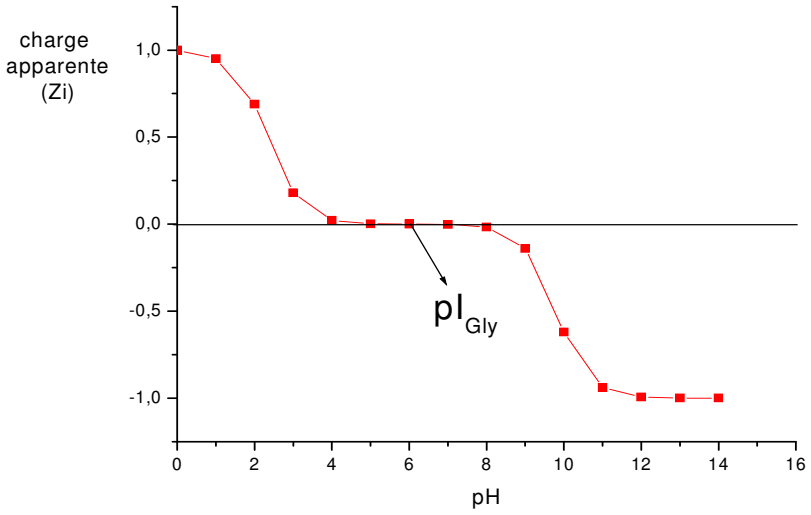


Figure III-4 : *Variation de la charge globale de la glycine en fonction du pH.*

III. 4- CONCLUSION

Après cette étude on peut estimer que les acides aminés ont des propriétés physico-chimiques très importantes.

Ces propriétés aident beaucoup pour l'analyse de ces molécules.

La séparation des acides aminés est facile lorsque leurs points isoélectrique (pI) sont différents. Dans le cas contraire il est très difficile de les séparés en utilisant cette propriété.

Dans ce cas on fait recoure à d'autre propriétés comme :

- Variation de la chaîne latérale (nature, taille) ;
- Taille globale de la molécule ;
- Nature de la molécule (affinité par rapport à la résine) ;
- Point de fusion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] P.Chambault, « Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur evaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse ». Thèse de doctorat. Université d'ORLÉANS. (2000).

[2] Albert L. Lehninger. « Biochimie. Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires ». Seconde édition. Flammarion Médecine-sciences. (1997).

[3] D.Voet. J.G. Voet. « Biochimie » 2eme édition. Traduction par G. Rousseau et L. Domenjoud. Bruxelles DeBoeck.pp 65-78.(2005).

[4] A.Manz, N.Pamme, D.Iossifidis. Bioanalyical chemisry. Imperial college press. (2004).

Quatrième
CHAPITRE :

MÉTHODES D'HYDROLYSES

IV.1- INTRODUCTION

L'hydrolyse consiste à fractionner une molécule en présence d'eau. L'eau peut réagir sous forme neutre H_2O, ou sous ses formes ioniques, H_3O^+ ou OH^- **[1]**.

L'équation suivante représente le modèle le plus simple d'une réaction d'hydrolyse avec l'eau :

$$A—B + H_2O \longrightarrow A—H + B—OH$$

L'hydrolyse avec l'eau est généralement effectuée en présence d'acide protonique à cause de leur plusieurs fonctions. On peu citer les fonctions suivantes :

1- Catalyseur, en faisant intervenir un proton, H^+, dans le mécanisme réactionnel,
2- Agent de déplacement de l'équilibre, en transformant un produit réactionnel en composé ionique insoluble dans la phase organique (une solution basique peut être parfois utilisée dans ce but) :

$$A—B + H_3O^+ \longrightarrow AH_2^+ + B—OH$$

3- Agent de solubilisation des sels ou hydroxydes métalliques dans la phase aqueuse, lorsque les composés hydrolysés sont des organométalliques.

Dans un milieu fortement basique, l'eau joue le rôle d'un solvant des ions hydroxydes OH^-, mais pas en tant que réactif (l'eau intervient comme réactif très rare), et les OH^- sont les véritables réactifs :

$$A—B + OH^- \longrightarrow AH + BO^-$$

Les composés organiques hydrolysables sont nombreux :

Les esters, les amides, les imines, les nitriles,…….

Les amides chez les chimistes sont des peptides et protéines chez les biologistes et les biochimistes.

Parmi ces composés, on ne va étudier que les méthodes d'hydrolyse des protéines (peptides).

On distingue trois types essentiels d'hydrolyse :

1-Hydrolyse acide

2-Hydrolyse basique

3-Hydrolyse enzymatique.

Le choix de l'une ou de l'autre méthode dépend directement du but qu'on veut atteindre à travers cette hydrolyse et aussi de la nature de l'échantillon.

IV. 2- HYDROLYSE DES PROTEINES

Le but de toute méthode d'hydrolyse est la libération quantitative de tous les acides aminés du substrat, et leur récupération par la suite dans l'hydrolysat.
Plusieurs facteurs influent sur ce processus, tels que la température, le temps, les agents et additifs d'hydrolyse.

La combinaison de ces facteurs est importante pour la détermination des résidus. Par exemple, il est facile d'obtenir des acides aminés à partir d'un échantillon de peptide, mais il est difficile d'avoir ces acides aminés à partir d'un mélange de protéines.
Donc le choix de ces facteurs dépend directement de l'échantillon qu'on veut étudier.
Pendant une analyse initiale d'un échantillon de peptides et (ou) protéines inconnues, il faut manipuler avec une variation des conditions opératoires (temps, température,…) pour déterminer les conditions optimales.

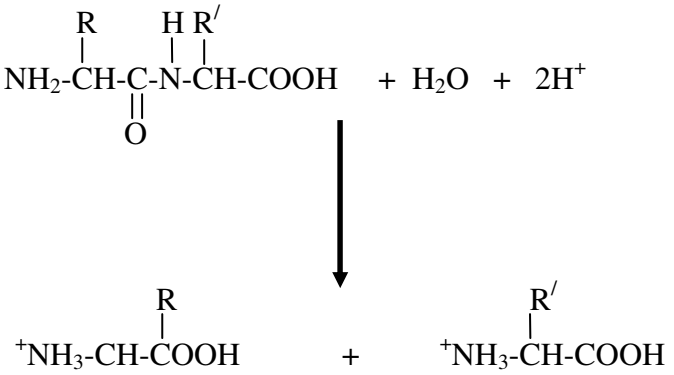
IV. 3- HYDROLYSE ACIDE

L'hydrolyse acide est la méthode la plus fréquente. La toute première expérience sur l'hydrolyse acide des protéines est réalisée par Braconnot (1820) qui a utilisé l'acide sulfurique concentré pour hydrolyser la gélatine, la laine et les fibres musculaires **[2] .** Durant les 100 années qui suivirent d'autres additifs ont été utilisés pour améliorer l'hydrolyse des protéines. L'hydrolyse avec HCl 6M est le réactif le plus utilisé pour hydrolyser des échantillons de peptides et (ou) protéines **[3]**.

La réaction d'hydrolyse est similaire à celle d'un amide :

$$CH_3CONH_2 + H_2O + H^+ \longrightarrow CH_3COOH + NH_4^+$$

Si on applique la même réaction sur un simple dipeptide il donne :



L'extraction des acides aminés contenus dans des protéines (peptides) par hydrolyse est effectuée à l'aide des acides minéraux forts, pour assurer la rupture des liaisons peptidiques et l'extraction des acides aminés correspondants avec un bon rendement. Il est recommandé que cet acide ait un pKa inférieur ou égal à -2. Mais il faut que cet acide ne provoque pas la dégradation des acides aminés formés au cours de la réaction d'hydrolyse, et l'excès de cet acide doit être facile à éliminer du mélange réactionnel après hydrolyse.

Le traitement avec l'acide chlorhydrique HCl est la méthode d'hydrolyse la plus utilisée. Car le HCl est un agent d'un usage courant dans diverses applications ; et on peut manipuler avec le HCl soit en phase liquide soit en phase gazeuse. A la fin de l'hydrolyse on a la possibilité de faire évaporer HCl. Ensuite l'hydrolysat est récupéré dans un petit volume.

En général, une hydrolyse acide d'une protéine nécessite l'utilisation de HCl 6M, et un chauffage sous vide pendant 20 ou 24h à 110°C **[4,5]**. Il apparaît peu ou pas de racémisation des aminoacides dans ces conditions **[6]**.

Dans ces conditions d'hydrolyse, l'asparginine et la glutamine sont hydrolysés complètement en acide aspartique et acide glutamique respectivement. Le tryptophane est détruit complètement. Tandis que la détermination directe de la cystéine à partir d'un hydrolysat acide n'est pas possible.

Darragh et *al,* appliquent une série d'hydrolyses avec variation du temps pour étudier la perte des acides aminés durant une hydrolyse acide. La plupart des résidus ont un degré de perte, et les plus grandes pertes sont observées pour l'acide cystéique et la sérine **[7]**.

Pour éviter ou bien pour réduire cette perte des résidus on utilise des agents protecteurs comme le phénol, l'acide thioglycolique, le mercaptoethanol, l'indole ou la tryptamine **[8]**.

L'HCl n'est pas le seul agent d'hydrolyse ; on peut aussi utiliser d'autres agents comme l'acide sulfonique, l'acide méthane sulfonique (MSA), p-toluène sulfonique,…

Tableau IV-1 : *Quelques agents d'hydrolyse utilisés [3]* .

	Agent d'hydrolyse	Conditions d'hydrolyse	Additifs	Méthode spécifique pour la détermination de	Réf
1	HCl 6M	110°C , 24h	0.02%phenol	tous les résidus sauf Cys, Trp	**[4, 8, 9,10]**
2	6M HCl ou 4M MSA	110°C,24h	0.2%sodium azide	Cys	**[11]**
3	4M MSA	160°C,45 min		tous les résidus	**[12, 13]**
4	HCl		Thioglycolic acide	Trp	**[14, 15]**
5	HCl	166°C,25min ou 145°C,4h	3%phenol	Trp	**[16]**

IV. 4- L'HYDROLYSE ALCALINE

L'hydrolyse alcaline, comme toute méthode d'hydrolyse, conduit à la rupture de toutes les liaisons peptidiques d'une protéine.

Cette hydrolyse utilise en général l'hydroxyde de sodium NaOH, l'hydroxyde de potassium KOH, et rarement l'hydroxyde de baryum.
En général l'hydrolyse basique s'effectue avec NaOH 6 M et un chauffage à reflux à 100°C pendant 4 à 8 heures.

L'hydrolyse alcaline est appliquée presque toujours uniquement pour la détermination du tryptophane, car il est stable sous les conditions alcalines.
L'inconvénient majeur de cette technique est la destruction de plusieurs acides aminés, la sérine, la thréonine, l'arginine, la cystéine, et la cystine. Les autres acides aminés sont ramifiés.

L'hydrolyse alcaline est souvent effectuée pour la détermination des phospho-amino acides. Une hydrolyse avec le KOH est appliquée pour la quantification de la tyrosine phosphorée et sulfatée. L'hydrolyse alcaline est aussi utilisée pour analyser le phosphohistidine.

IV. 5- AUTRES METHODES D'HYDROLYSE

IV. 5-1- Hydrolyse avec les radiations micro-ondes

L'utilisation de l'énergie des radiations de micro-ondes constitue le développement le plus important des techniques d'hydrolyse.

On peut appliquer cette méthode en phase liquide ou gaz utilisant l'acide chlorhydrique ou un autre acide.

Avec cette méthode on peut réduire le temps ; on passe de plusieurs heures on à quelques minutes, généralement 1-3 min pour une hydrolyse en phase liquide, et de 20-45 min pour une hydrolyse en phase gazeuse **[3]**.

Donc une hydrolyse avec une analyse d'un échantillon protéique prend seulement quelques minutes, et c'est l'avantage majeur de cette technique.

IV. 5-2- Hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse enzymatique des protéines est rarement appliquée. L'avantage d'une hydrolyse enzymatique c'est de permettre la quantification de l'asparagine et la glutamine, et les autres résidus qui sont détruits durant une digestion chimique.

Pour une digestion complète, l'incubation avec plusieurs enzymes est nécessaire, et les réactions sont, en générale, longues **[3]**.

Parmi les enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques, on distingue **[17]** :

- les exopeptidases qui exercent leur action à l'extrémité des chaines et détachent l'aminoacide N- ou C- terminal.
- les endopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur des chaines.

Church et *al*, utilisant un système immobilisé de protéase, ont obtenu une hydrolyse complète pendant 18-24 h avec un rendement de 92-103% comparée à une hydrolyse acide standard **[18]**.

IV. 6- CONCLUSION

Le choix d'une méthode d'hydrolyse est :

1-liée directement au but qu'on veut atteindre à travers cette hydrolyse

2-pour faire une analyse d'un mélange d'acides aminés d'une protéine, il est recommandé de choisir les conditions opératoires appropriées de l'hydrolyse.

La méthode d'hydrolyse acide est la plus utilisée, à cause de sa simplicité et de sont pouvoir de libérer la majorité des acides aminés sans les détruire.

Dans nos expériences nous effectuerons :

-des hydrolyses acides des protéines et peptides dissoutes dans les eaux résiduaires d'épilage des peaux ;

-des essais de vérification sur la présence de tryptophane ; l'épilage des peaux est réalisée en milieu alcalin et réducteur. Ces conditions favorisent elles l'hydrolyse alcaline et libèrent elles le tryptophane, un acide aminé aromatique très recherché ?

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Marcel Chavanne, Armand Jullien, Gaston J. Beaudoin, Eddy Flamand. « Chimie organique expérimentale ». Modulo Editeur. (1986).

[2] Catherine Cooper, Nicolle Packer, Keith Williams, Methods in Molecular Biology volume 159; "amino acid analysis protocols", Humana Press.(2001).

[3] Michael Fountoulakis, Hans- Werner Lahm, J.of chromatographie . A.826(1998) 109-134.

[4] J. Ozols, Methods Enzymol. 182 (1990) 587.

[5] A.S. Inglis, Methods Enzymol.91 (1983) 26.

[6] Albert L. Lehninger. Biochimie. «Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires ». Seconde édition, Flammarion médecine- sciences. (1993).

[7] A. J. Darragh, D. J. Garrick, P. J. Mougham, W. H. Hendriks, Anal. Biochem. 236 (1996) 199.

[8] S. Blackburn, in; S. Blackburn (ED). "Amino acid Determination" .Marcel Dekker, New York, 2 nd ed, (1978).

[9] C.H.W. Hirs, W.H. Sein, S.Moore, J. Biol. Chem. 211 (1954) 941.

[10] M. Weiss, M. W. Lahm, M. Fountoulakis, J. Chomatogr. A 795 (1998) 263.

[11] M. Manneberg, H.W. Lahm, M. Fountoulakis, Anal. Biohem. 231 (1995) 349.

[12] S. H. Chiou, K. T. Wang, J. Chromatogr. 448 (1988) 404.

[13] S. H. Chiou, Biochem. Int 17 (1988) 981.

[14] M. C. Allred, J.L. Mc Donald, J. Off. Anal. Chem.71 (1988) 603.

[15] Y. Yokote, K.M.Arai, K. Akahane, Anal. Biochem. 152 (1986) 245.

[16] K. Muramoto, H. Kamiya, Anal. Biochem. 189 (1990) 223

[17] Jacques henry Weil, Biochimie générale. 9eme édition DUNOD .(2001).

[18] F.C. Church, H. E. Swaisgood, G.L. Catignani, J. Appl. Biochem. 6 (1984) 205.

Cinquième
CHAPITRE

MÉTHODES D'ANALYSES DES ACIDES AMINÉS

V. 1- INTRODUCTION

Les méthodes d'analyse (qualitative et quantitative) des acides aminés sont très variées. Chaque méthode repose sur certaines propriétés de ces substances.

Les méthodes chromatographiques sont les plus utilisées. Nous commençons d'abord par la méthode la plus simple, la CCM puis nous décrirons les méthodes les plus modernes : l'HPLC, la GC et l'électrophorèse capillaire,…..

Le choix de l'une ou de l'autre méthode est lié directement à la nature de l'échantillon (acides aminés libres, hydrolysat, liquides biologiques,…) ainsi qu'à la résolution ou la sensibilité qu'on veut atteindre.

Dans le cas de séparation d'un mélange d'acides aminés, le problème qui s'impose toujours est le choix du mode de détection approprié. Cette difficulté est due à l'absence du groupement chromophore dans la structure de la plupart des acides aminés sauf les acides aminés aromatiques.

Dans ce chapitre on va essayer d'entamer toutes les méthodes d'analyse des acides aminés avec les modes de détection, leur principe, leur instrumentation, et leurs limites.

V. 2- SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULRAVIOLET ET LE VISIBLE

V. 2-1- INTRODUCTION

La spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'ultraviolet et le visible est la méthode la plus courante pour identifier et déterminer la concentration de plusieurs espèces organiques (acides aminés par exemple) et inorganiques. En générale, elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative.

Les concentrations des composés étudiés sont calculées à partir de la loi de Beer-Lambert. De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV/Visible perfectionnés à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés **[1]**.

Pour les acides aminés, la spectrophotométrie est utilisée :

1- comme analyse quantitative, après leur séparation. La détection s'effectue dans le visible à 570nm. Dans le cas d'un mélange, le résultat est approximatif, car tous les

acides aminés donnent une couleur violette, détectable à 570nm sauf la proline qui donne une couleur jaune, détectable dans le visible à 440nm.

2- comme détecteur UV/V associé à l'HPLC, souvent après une dérivatisation pré- ou post- colonne où tous les acides aminés deviennent détectables.

V. 2-2- PRINCIPE

L'absorption lumineuse est due à l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Un électron sous l'influence d'une radiation lumineuse passe d'une orbitale à une autre, plus énergétique il y a absorption d'énergie et donc de lumière. Les énergies mises en jeu varient en fonction de la longueur d'onde (**tableau 1**).

Tableau V-1 : *Les longueurs d'ondes des régions UV/Visible et énergies correspondantes [2].*

La région	La longueur d'onde	L'énergie
UV lointain	200 nm	1200 à 600 kj mol^{-1}
UV proche	200 à 400 nm	600 à 300 kj mol^{-1}
Le visible	350 ou (400) à 800nm	300 à 150 kj mol^{-1}

Beaucoup de molécules biologiques absorbent la lumière si elles possèdent dans leur structure un chromophore capable de capter l'énergie lumineuse (acides aminés aromatiques des protéines, bases purique et pyrimidique des acides nucléiques,…). Qualitativement, ce phénomène peut être visualisé par l'apparition d'un spectre d'absorption de la molécule étudiée, avec un λmax d'absorption caractéristique (le cas du tryptophane). Quantitativement, l'amplitude d'un spectre d'absorption est reliée à la concentration de la solution étudiée par la loi de Beer-Lambert.

Les composés ne sont pas nécessairement colorés, mais ils peuvent le devenir après réaction avec des réactifs appropriés et absorber la lumière dans la région d'UV ou visible. Comme dans le cas des acides aminés. Après leur réaction avec la ninhydrine ils donnent une couleur violette. Ces réactions sont souvent spécifiques et dans la plupart des cas, elles sont très sensibles. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du composé mesuré, tandis que la quantité de lumière absorbée est proportionnelle à l'intensité de la coloration, donc à la concentration.

V. 2-3- LOI DE BEER-LAMBERT

Cette loi relie, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution. Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique, d'intensité initiale I_0, traverse une solution dans une cuve transparente, une partie de lumière est absorbée et l'intensité de la lumière transmise I est inférieure à I_0. La perte d'intensité lumineuse est certe due à la diffusion de la lumière par les particules en solution et à la réflexion des parois de la cuve, mais aussi et surtout à l'absorption par la solution **(figure 1)**.

La relation entre I et I_0 dépend de la longueur du trajet optique dans le milieu l et de la concentration c de la solution absorbante. Ces facteurs sont mis en équation dans les lois de Lambert et Beer **[3]**.

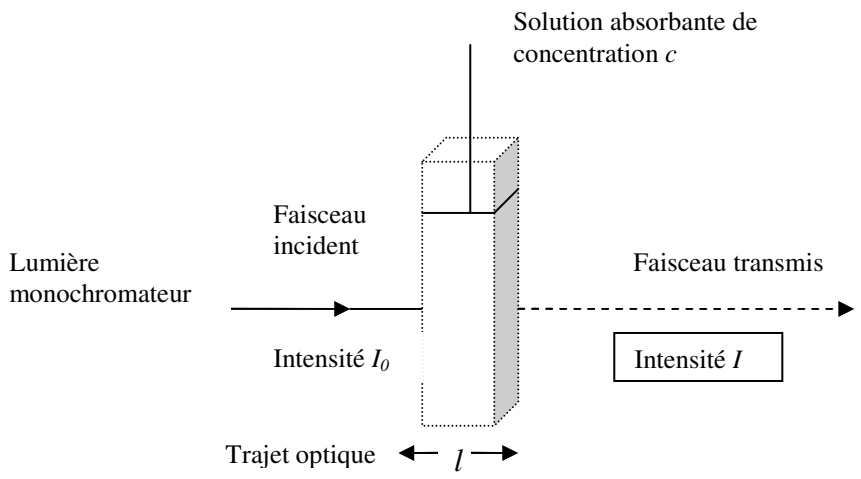


Figure V-1 : *Absorption de la lumière par une solution* [3].

Loi de *Lambert* :

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique traverse un milieu absorbant, son intensité décroît d'une manière exponentielle en fonction de l'augmentation de la longueur de son trajet dans le milieu absorbant.

$$I = I_0 \, e^{-K_\lambda l}$$

Loi de *Beer* :

Lorsqu'un faisceau de lumière monochromatique traverse un milieu absorbant, son intensité décroît d'une manière exponentielle en fonction de l'augmentation de la concentration du milieu absorbant.

$$I = I_0\ e^{-K_2 c}$$

Ces deux lois constituent ensemble la loi de *Beer-Lambert* :

$$I = I_0\ e^{-K_3 cl}$$

Transmittance : Le rapport des intensités est la transmittance (T), habituellement exprimée en pourcentage.

$$T(\%) = {}^{I}/_{I_0} \times 100 = e^{-K_3 cl}$$

La transmittance n'est pas très pratique à utiliser car la courbe du pourcentage de transmittance tracée en fonction de la concentration est une exponentielle négative.

Absorbance : Lorsque les logarithmes du rapport des intensités sont utilisées :

$$log\, {}^{I_0}/_{I} = K_3 cl$$

$$log_{10}\, {}^{I_0}/_{I} = K_3 cl/2.303$$

ou

$$log_{10}\, {}^{I_0}/_{I} = Kcl$$

L'expression logI_0/I est l'absorbance (A), par conséquent,

A=Kcl

Si la loi de *Beer-Lambert* est respectée et si l reste constant, la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration est une droite passant par l'origine, ce qui est plus pratique que la courbe obtenue pour la transmittance.

On peut observer des écarts à cette loi, écarts dus soit à des interactions moléculaires, ou encore à des problèmes instrumentaux **[4]**.

V. 2-4- INSTRUMENTATION

Un spectrophotomètre comporte une source de rayonnement, un dispositif monochromateur, un récepteur et un appareil de mesure ou d'enregistrement. L'échantillon est habituellement placé entre le monochromateur et le détecteur (**figure 2).**

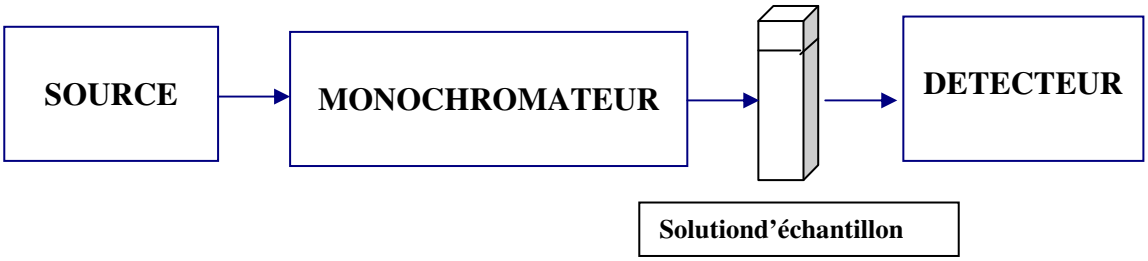


Figure V-2 : *Instrumentation dans l'uv/visible*

1-Source lumineuse :

En générale un spectrophotomètre comporte deux lampes à usage de sources, l'une pour l'uv et l'autre pour le visible. On les trouve généralement réunies :

1. Une lampe à arc au deutérium sous moyenne pression pour la partie uv (< 350 nm)
2. Une lampe à incandescence avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) pour la partie visible (> 350 nm)

2-Système dispersif :

Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau plan qui fait partie d'un montage appelé monochromateur. Ce dispositif permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission **[1].**

3-Détecteurs :

Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Sa sensibilité dépend de la langueur d'onde.

V. 2-5- AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS

Avantages :

1. L'avantage important de cette technique est que la purification complète du composé n'est pas indispensable et les constituants d'un mélange complexe comme le sang peuvent être détectés après de légères modifications.
2. La grande sensibilité, les limites de détection sont généralement comprise entre 10^{-4} à 10^{-5} M. Ce domaine peut s'étendre jusqu'à 10^{-6} ou même 10^{-7} M en modifiant certaines procédures.
3. Elle est de mise en œuvre facile, donc relativement peu onéreuse et facile à utiliser.

Inconvénients :

1. En générale l'analyse qualitative avec le spectre UV/V doit être complétée par d'autres données physiques ou chimiques fournies par d'autres méthodes d'analyse

comme la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie de masse, ou encore la solubilité et les points de fusion et d'ébullition.

2. l'analyse qualitative d'un mélange d'acides aminés est impossible, tandis qu'une analyse quantitative est approximative.

V. 3- LA SPECTROFLUORIMETRIE

V. 3-1- INTRODUCTION

La fluorescence est un phénomène d'émission très important du point de vue analytique. Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides, purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine de visible ou du proche ultraviolet. La fluorimétrie est une méthode basée sur ce phénomène, elle est sélective et très sensible ayant une résolution de 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'absorption. L'intensité de fluorescence est également utilisée dans la conception de détecteurs en chromatographie liquide. Pour les acides aminés elle est utilisée comme détecteur dans l'HPLC ou l'électrophorèse capillaire.

V. 3-2- PRINCIPE

Une particule (atome, ion, molécule), dans un état excité après absorption d'un rayonnement électromagnétique peut revenir vers un état plus stable en émettant un rayonnement qui porte le nom de rayonnement de fluorescence.

Tout chromophore n'est pas un fluophore ainsi chez les acides aminés, seul le tryptophane se révèle un excellent fluorophore. Si nous n'avons pas de fluorophore intrinsèque dans notre molécule d'intérêt, nous avons la possibilité d'introduire chimiquement un fluorophore extrinsèque qui rend la molécule d'intérêt fluorescente **[5]**.

L'utilisation analytique de fluorescence repose sur le fait que même si les particules fluorescentes sont de faibles densités, leur intensité du rayonnement est proportionnelle à leur concentration, ainsi que les longueurs d'ondes qui les composent sont dans une certaine mesure caractéristiques de ces particules.

V. 3-3- INSTRUMENTATION

On distingue trois éléments principaux qui composent un appareil de spectrométrie de fluorescence **(figure 1)** :

1. La source d'excitation : est une lampe qui fournie le rayonnement d'excitation pour la particule à étudier
2. La cellule de mesure : contenant l'échantillon à analyser, en générale c'est une cuve de quartz synthétique avec quatre faces polies, car dans la plupart des cas les applications analytiques concernent les solutions.

Une première lentille placée sur le trajet du rayonnement d'excitation assure sa focalisation au centre de la cuve de fluorescence, issu de la zone d'interaction laser-solution, sur la fente d'entrée du monochromateur de mesure **[6]**.

3. Détection de fluorescence : le plus souvent, le système de détection de fluorescence est un tube photomultiplicateur associé à un monochromateur. Le tube photomultiplicateur délivre un courant proportionnel à l'intensité lumineuse du rayonnement qu'il reçoit dans la bande spectrale sélectionnée par le monochromateur.

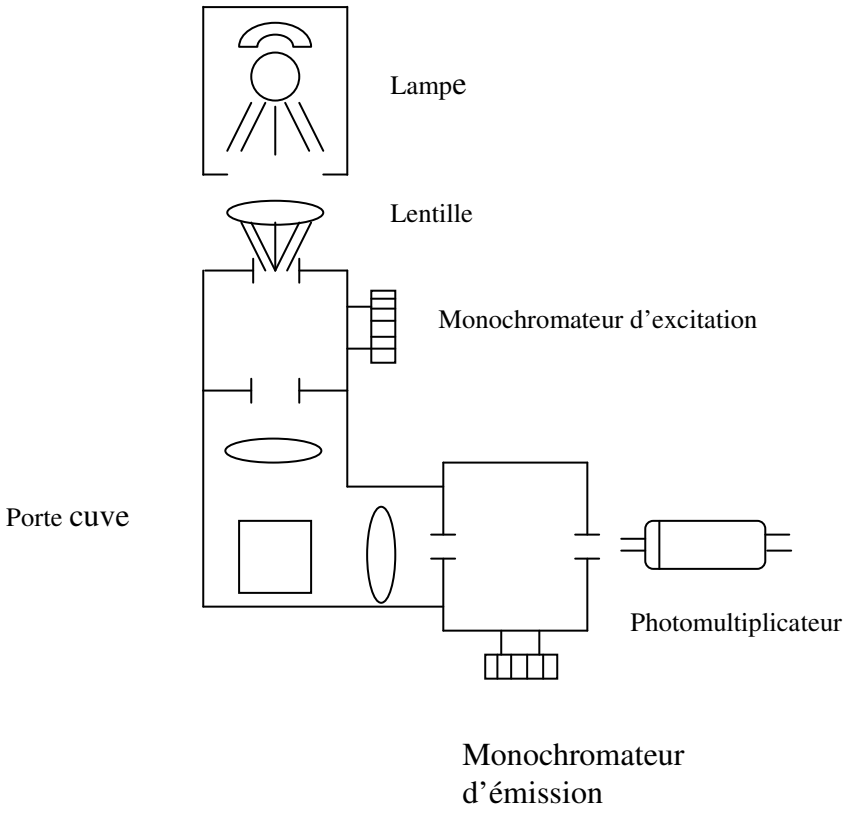


Figure V-3 : *Schéma d'un spectrofluorimètre* [5].

V. 3-4- APPLICATIONS

La plupart des applications analytiques de la spectrofluorimétrie sont dans le domaine de la chimie organique.

Industrie alimentaire : on distingue cinq catégories de composés dosés par la spectrophotométrie qui sont : les constituants azotés (protéines, acides aminés), les vitamines, les additifs, les résidus de pesticides et les mycotoxines. Pour les composés non fluorescents la mise en œuvre de la spectrophotométrie nécessite une préparation chimique à l'aide d'un additif approprie pour former un complexe fluorescent.

Pharmacie et biochimie : Les principales applications concernent le dosage des anesthésiques, sulfamides, antibiotiques, hormones, enzymes, coenzymes, acides aminés, vitamines.

Industrie chimique : Plusieurs composés chimiques peuvent être dosés par spectrofluorimétrie : les aldéhydes, les cétones, les produits pétroliers, le caoutchouc, les colorants, les détergents.

Composés inorganiques : Presque tous les composés inorganiques ne sont pas fluorescents, alors leurs analyses par spectrofluorimétrie nécessitent une complexation par des molécules organiques fluorescentes.

V. 4- LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

V. 4-1- INTRODUCTION

La chromatographie sur couche mince (CCM) c'est imposé comme une des techniques de base de séparation et de recherche des substances naturelles. Elle est très répandue à cause de sa simplicité de mise en œuvre et de sa capacité de séparation et d'analyse des mélanges complexes.

Les applications de cette technique sont multiples comme le montrent le nombre et la diversité des publications internationales sur ce sujet.

Elle est basée sur la séparation des quantités en microgramme d'un mélange par le mouvement d'un solvant le long de la plaque par capillarité. Les constituants du mélange se déplacent à différentes vitesses à cause de plusieurs paramètres (adsorption, solubilité, taille de molécule,…….).

Dans le cas d'un mélange d'acides aminés, et pour identifier ces matières on a recours à plusieurs techniques d'analyse modernes comme la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), mais la chromatographie sur

couche mince reste l'étape ou la méthode la plus importante avant d'entamer d'autres méthodes. Honegger **[7],** séparé un mélange d'amines et d'acides aminés (cystéine, cadavérine, diméthylamine, histamine, méthylamine, mecaline, noradrénaline, phényléthylamine, et propylènediamine). Opienska, Blauth et collaborateurs **[8]** ont également séparé 34 acides aminés sur silicagel G avec trois systèmes de solvants le n-propanol-eau (1 :1), phénol-eau (3 :1) ou n-butanol-acide acétique-eau (4 :1 :1). Les révélateurs utilisés sont : la ninhydrine, l'isatine ou le p. diméthylaminobenzaldéhyde. La cellulose a également été utilisée pour la séparation des acides aminés **[9]** suivant la technique bidimentionnelle. Le solvant de développement est le mélange : méthanol-chloroforme-ammoniaque (2 :2 :1) à 17% dans la première direction, et le méthanol-eau-pyridine (20 :5 :1) dans la deuxieme direction. T. Hodisan et monica culea utilisent la CCM dans leur analyse pour la séparation et l'identification des acides aminés libre issus d'une plante **[10].**

Historique [11] :

En 1938, Izmailov et Shraiber ont donné l'idée de répartir l'adsorbant, non plus dans une colonne mais sur une surface plane. Ils ont utilisaient des plaques de verre revetues d'une mince couche d'alumine.

Après onze ans, Meinhard et Hall introduisent l'amidon comme liant de l'adsorbant (alumine) réparti sur des plaques de verre. Ce liant permet d'accroître la stabilité mécanique de la couche adsorbante.

En 1951, Kichner, Miller et Keller ont développé une méthode semblable, connue sous le nom de « chromatostrip »

Reitsuma En utilisant les plaques de verre, a introduit les chromatoplaques sur lesquelles on éxécute simultanément plusieurs chromatogrammes.

Mottier et Potterat fractionnent les colorants hydrosolubles avec l'alumine en poudre, tessée à sec sur une plaque, de verre

Laderer En 1957 a préconise l'emploi de l'acide silicique pour la séparation des caroténoïdes et porphyrines, et Babier l'applique au fractionnement des benzoquinones.

En 1958 grâce aux travaux de professeur E. Stahl que le procédé ne cesse de se généraliser et de se développer un peu partout dans le monde.

V. 4-2- PRINCIPE

Leur principe repose sur des phénomènes d'adsorption. La séparation des constituants d'un échantillon est réalisée sur une fine couche (100-200 µm) de phase stationnaire. Cette dernière est généralement à base de gel de silice, fixé sur un support de verre, de plastique ou d'aluminium. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long de la phase stationnaire. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire les substances de l'échantillon sont partagées entre les deux phases et migrent avec différentes vitesses **[12]**. Au cours de cette phase appelée développement, il y a compétition entre l'éluant et la substance adsorbée sur la surface de l'adsorbant ; l'éluant déplace la substance adsorbée. Ce déplacement dépend du pouvoir éluant du solvant, de la polarité et de la structure de la substance étudiée, et de la capacité d'adsorption de l'adsorbant **(figure 1).**

Chaque constituant du mélange possède un coefficient d'adsorption propre et une affinité déterminée pour le solvant,et progresse avec une vitesse qui est caractéristique de cette substance et qui est symbolisée par son rapport frontal (R_f), On l'exprime par le rapport :

R_f = distance parcourue par une molécule / distance parcourue par le front du solvant

Choix de l'éluant :

L'éluant, formé d'un seul solvant ou d'un mélange de solvants. Le choix du solvant se fait à partir des solvants proposés dans les ouvrages spécialisés. Un éluant qui entraine tous les composants de l'échantillon est trop polaire ; tandis que le moins polaire empêche leur migration. Donc un éluant doit être bien choisis, ni trop polaire ni trop apolaire.

Donc pour une séparation CCM on distingue 3 étapes :

1. **dépôt de l'échantillon :** la substance à analyser est déposée à l'aide d'un capillaire calibré ou d'une seringue. La solution est déposée en un point de la plaque situé à environ 1cm de la partie inférieure. Le volume déposé doit être faible, 1 à 5µl, et il faut éviter de détruire la couche de la phase stationnaire avec le bout de la seringue. La tache doit être circulaire et petite que possible, idéalement elle ne devrait pas dépasser 3mm.

2. **développement de la plaque :** La plaque CCM est déposée verticalement dans la cuve, et la grande majorité des analystes continue d'utiliser la montée capillaire [technique de l'ingénieur].
3. **révélation post chromatographique :** Les principaux révélateurs sont : l'iode, l'UV, l'acide sulfurique. Si les composants de l'échantillon sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque, si ils sont incolores à l'aide d'un révélateur on les transforme en taches visibles. Les acides aminés sont révélés par la ninhydrine (couleur bleu- violet).

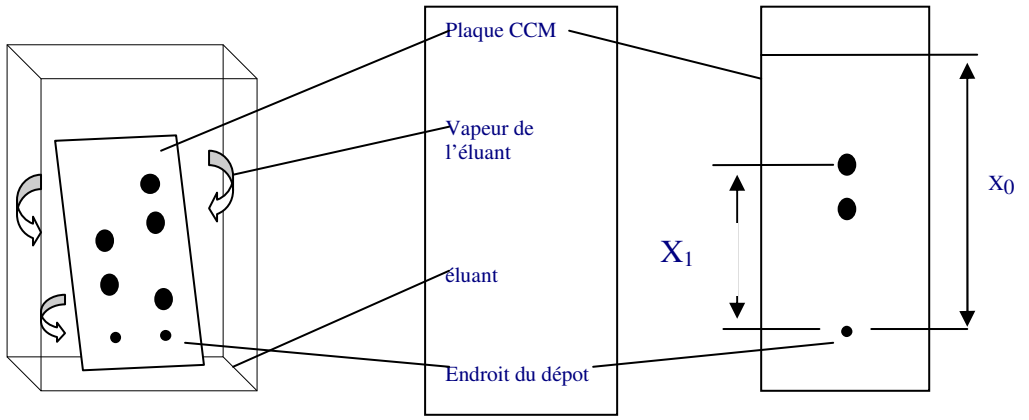


Figure V-4 : *Cuve vertical de développement et une plaque CCM*

V. 4-3- AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages :

1. Une méthode économique, rapide, souple
2. Possibilité de réaliser des chromatographies bidimensionnelles
3. l'influence de la température est d'autre part négligeable au cours de la séparation
4. utilisation de quantités très petites de matières première
5. domaine d'application très vaste
6. sensibilité 100 fois supérieure à la chromatographie sur papier, puisqu'on peut détecter des quantités de l'ordre de 1/100 de µg

Inconvénients :

1. elle est destinée beaucoup plus aux analyses qualitatives que quantitatives
2. la plaque chromatographique est facile à endommager
3. les caractéristiques de migration dépendent aux conditions opératoires
4. le principal inconvénient est le manque de reproductibilité des R_f

V. 4-4- APPLICATIONS

Cette technique est devenue très essentielle dans l'industrie pharmaceutique pour déterminer la pureté de ses produits. Elle est aussi très utilisée dans les laboratoires d'analyse médicale et de nombreux travaux biochimiques et biologiques.

On peu citer quelques applications de la CCM :

* Dans l'étude de substances naturelles
* Pour l'étude des plantes ;
* Dans l'étude les micro-organismes ;
* Différentes applications analytiques ;

V. 5- ÉLECTROPHORÈSE

V. 5-1- INTRODUCTION

De nombreuses molécules biologiques possèdent une charge électrique qui dépend de la nature de la molécule, du pH et de la composition du milieu. Ce phénomène est utilisé en électrophorèse pour séparer des molécules de charges différentes.

Elle est applicable pour les ions simples et pour les macromolécules, et permet de séparer aussi bien les biomolécules (protéines) que les composés de faible masse moléculaire (acides aminés).

Les particules chargées négativement se déplacent vers le pole positif, celles chargées positivement vers le pole négatif. Le support obtenu après migration des différentes substances est appelé électrophorégramme.

Le caractère amphotère des acides aminé rend cette technique applicable pour les séparés.

Honegger **[7]** a séparé un mélange d'acides aminés par électrophorèse, sur silicagel G imprégné d'un tampon à pH=2, constitué par l'acide acétique 2N et l'acide formique 0.6N (1 :1), sous une tension de 460 volts et un courant de 12.6mA.

M.Jaworska, Z.Szulinska, et M.Wilk **[13]** ont développé une méthode d'électrophorèse capillaire pour la séparation de certains acides aminés**.**

Historique

On peu résumer l'historique de la découverte de l'électrophorèse dans l'ordre suivant :

- grâce à l'allemand Quincke en 1959, il découvre que des particules colloïdales peuvent êtres entraînées par un courant électrique (cataphorèse)
- Helmholtz a pu observer le déplacement d'une substance chargée vers l'électrode de polarité opposée après l'application d'un champ électrique (phénomène électro-osmose)
- En 1892 Linder et Picton supposent l'application de cette méthode pour séparer des particules de charges différentes
- La concrétisation de cette approche est réalisée par le chimiste Suédois Tiselius (1902-1971), après la séparation des protéines du sérum sanguin et du lait (prix Nobel en 1948)
- L'amélioration de l'électrophorèse est venue par la suite : utilisation du papier comme support, et ensuite d'autres produits tels que gel d'amidon, d'agarose ou de polyacrylamide.

V. 5-2- ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE

V-5-2-1- INTRODUCTION

La migration des molécules s'effectue dans un support solide imprégné d'une solution tampon. On peu identifier les molécules séparées après leur déplacement avec différentes vitesses, l'analyse quantitative est possible après révélation (dans notre cas on utilise en général la ninhydrine).

Pour améliorer la séparation des molécules, il est possible de :

- Travailler en champ pulsé, c'est-à-dire on applique le champ électrique alternativement pendant un temps très court dans une direction puis dans la direction opposée. Ce changement favorise les molécules de poids moléculaire élevé de parcourir plus facilement les pores du gel.
- Réaliser des électrophorèses bidimensionnelles

V. 5-2-2- PRINCIPE

L'électrophorèse est le mouvement d'une espèce chargée sous l'influence d'un champ électrique au sein d'un électrolyte stationnaire **[14]**.

Soit une molécule chargée avec une charge ***q*** soumis à l'influence d'un champ électrique de force x, donc la force d'accélération de cette molécule est ***qx***. Cette force est en opposition avec la force de frottement pour donner une vitesse résultante ***V*** **[3]** :

$$q\,x = F\,V$$

La force de frottement est donnée par la loi de stockes

$$F = 6\,\pi\,\eta\,r$$

La mobilité électrophorétique $\overline{V}$ d'une molécule est définie comme la migration par unité de champ électrique, de telle façon que :

$$\overline{V} = \frac{V}{x} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Donc on peu dire que la mobilité d'une molécule dépend de la viscosité du milieu **(η),** de la taille, de la forme **(r)** et de la charge **(q)** de la molécule.

La mobilité électrophorétique dépend principalement des groupements ionisables présents à la surface de la particule. La charge de la molécule varie d'une manière spécifique, en fonction du pH du milieu, et de la force ionique. Par conséquent, le choix du milieu approprié permettra la séparation des molécules.

****Solution tampon**

Le choix du pH dépend de la nature du mélange à séparer.

La solution tampon ne doit pas causer de modifications chimiques ou de dénaturations des substances étudiées. Car certains ions peuvent réagir avec les composés : le borate, par exemple forme des complexes avec les sucres.

****La force ionique**

Elle peu influer sur la technique de différentes manières **[15]**:

1- elle modifie la conductivité du tampon et donc le champ électrique
2- elle entraîne des variations de la solubilité des protéines
3- l'existence d'une atmosphère ionique autour d'une particule chargée modifie sa mobilité en exerçant une force de freinage qui s'oppose à la migration de la particule

****Champ électrique**

Il est réalisé à l'aide d'un générateur de courant continu à voltage. Il doit être constant. La limite du champ électrique appliqué est fixée par l'intensité du courant qui traverse le support. Il faut choisir l'intensité I suffisamment faible pour éviter l'échauffement.

****L'évaporation**

Lors d'une manipulation d'électrophorèse on doit minimiser l'échauffement qui provoque l'évaporation, car une évaporation excessive a pour conséquences :

4- l'augmentation de la concentration des électrolytes sur le support qui correspond à la force ionique
5- .la dénaturation de certaines particules comme les protéines .

****Durée de l'électrophorèse**

Si on néglige les effets secondaires de l'électroendosmose, évaporation, échauffement, la migration d'une particule est proportionnelle seulement au champ électrique et au temps d'application du champ. Mais l'augmentation de la durée de l'électrophorèse n'améliore pas la séparation car la diffusion devient alors trop importante et la résolution de l'électrophorégramme risque de devenir d'autant mois bonne **[15]**.

V. 5-2-3- LES DIFFÉRENTS TYPES DE L'ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE

1- L'électrophorèse libre

Les particules migrent au sein d'un liquide bien déterminé, mais ils ne sont pas bien séparés, il se forme des frontières mises en évidence par des méthodes optiques telles que l'absorption ultraviolette pour les protéines.

2- L'électrophorèse de zone

Comme l'électrophorèse libre, la migration s'effectue dans une phase liquide, la différence est dans la présence d'un milieu poreux. Les supports les plus utilisés sont le papier, l'acétate de cellulose et les gels de gélose, d'agarose, d'amidon, de polyacrylamide et d'agarose-acrylamide.

3- L'électrophorèse analytique

Elle s'intéresse beaucoup plus à la bonne séparation d'un mélange. En général elle utilise comme support les gels d'amidon, de polyacrylamide, et d'agarose-acrylamide. Le choix des gels est dus a leur capacité de séparer les particules non seulement en fonction de la charge mais aussi de la taille.

4- L'électrophorèse préparative

Elle a pour but d'obtenir des quantités plus ou moins importantes d'un ou plusieurs constituants d'un mélange ; aussi le rendement de l'opération doit-il être pris en considération

aux dépens de finesse de la séparation. Les supports utilisés sont la cellulose, la poudre d'amidon et les gels d'acrylamide **[14]**.

V. 5-2-4- APPAREIL D'ÉLECTROPHORÈSE

Une cuve d'électrophorèse classique **(figure 1)** est constituée d'un support de séparation relié par l'intermédiaire de papier filtre ou de coton à deux compartiments contenant les électrodes. Ces derniers sont connectés par des mèches de coton. Même en solution tampon on peu avoir des variations de pH à proximité des électrodes, la division en deux compartiments permet de minimiser ces variations au voisinage direct du support d'électrophorèse **[3]**. La connexion entre les deux électrodes et la solution tampon s'effectue à l'aide de papier.

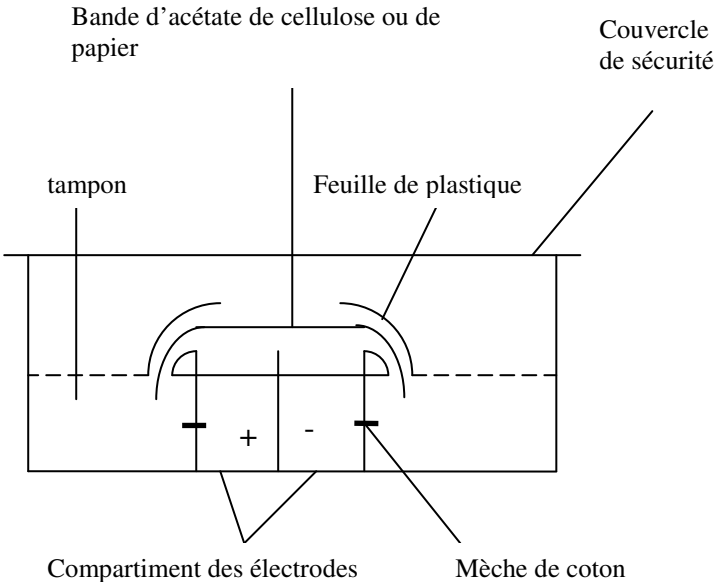


Figure V-5 : *Appareil d'électrophorèse horizontal* [14].

V. 5-2-5- AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages :

1. une mise au point facile et rapide

2. la connaissance des propriétés acide-base des acides aminés utilisant cette méthode nous permet de trouver la bonne technique de séparation d'un mélange donné d'aminoacide.

V. 5-3- ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

V. 5-3-1- INTRODUCTION

L'électrophorèse capillaire est un compromis entre électrophorèse classique et chromatographie liquide haute performance **[14]**. Elle commence à se développée considérablement depuis les années quatre-vingt. C'est une méthode sophistiquée, avec un système de détection similaire à celui de l'HPLC. Elle est plus utilisée que l'électrophorèse classique. Son domaine d'applications est très large, car elle a le pouvoir dans certaines conditions de séparer des espèces neutres (cas d'un mélange d'acides aminés neutre). C'est une méthode respectueuse à l'environnement car elle n'utilise pas de solvants organiques, contrairement à la chromatographie liquide.

Son principe similaire à celui de l'électrophorèse classique, est basé sur la migration différentielle des espaces chargées ou neutres sous l'effet d'un champ électrique. La migration se fait dans un capillaire étroit rempli d'électrolyte.

V. 5-3-2- PRINCIPE

Le déplacement des espèces est régi par deux phénomènes :

1- la migration électrophorétique :

En fonction de la charge et la masse des espèces, ces dernières sont déplacées avec certaines vitesses $\boldsymbol{V}$:

$$\boldsymbol{V = \mu \, . \, E}$$

Où, μ : mobilité électrophorétique .

2- La migration d'électroendosmose :

Comme on a vue dans l'électrophorèse classique, ce phénomène est un phénomène parasite. Par contre pour l'électrophorèse capillaire, la séparation est basée sur la migration électroendosmose.

On peu résumer ce phénomène comme suit **[14]** :

Les parois des capillaires en silice fondue portent des groupements silanol SiOH chargés négativement pour des pH > 2. Les groupements silanols au contact de l'eau s'ionisent en SiO^-. Les ions positifs de la solution d'électrolyte s'associent à ces charges négatives par attraction électrostatique. La couche ionique se déplace sous l'action du champ électrique vers la cathode entraînant avec elle les molécules de solvant ou de l'échantillon. Le flux ainsi crée donne aux particules une mobilité μ_0 dite endosmotique qui s'ajoute à la mobilité électrophorétique. L'intensité du flux augmente fortement entre pH=3 et pH=7

Donc le déplacement d'une molécule est régi par la combinaison des deux phénomènes :

$$V = \mu \, . \, E = (\mu_{ep} + \mu_0) \, . \, E$$

avec μ_{ep} : mobilité électrophorétique

et μ_0 : mobilité endosmotique.

Donc :

- les espèces chargées positivement se déplacent avec une mobilité apparente supérieure à la mobilité d'électroendosmose,
- les espèces chargées négativement se déplacent avec une mobilité apparente inférieure à la mobilité d'électroendosmose,
- les espèces chargées neutres se déplacent avec une mobilité apparente égale à la mobilité d'électroendosmose,

V. 5-3-3- APPAREILLAGE

Un appareil d'électrophorèse capillaire se constitue de (figure 2) :

1-Le capillaire : en général, les capillaires sont à base de silice fondue revêtue de molyimide. Avec un diamètre intérieur de 25 à 100µm et une longueur de 25 à 100cm. Ils sont remplis d'une solution tampon électrophorétique.

2-Systèmes d'injection : il est nécessaire que le volume de l'échantillon à analysée ne dépasse pas 1à 2µL pour éviter les problèmes d'élargissement des pics.

On distingue trois modes d'injections :

* Injection par gravité
* Injection par hydrodynamique
* Injection électrocinétique

3-Détecteurs : les détecteurs utilisés sont du même type qu'en HPLC :

* Le spectrophotomètre UV/Visible
* Fluorimètre
* Détecteur électrochimique

Le spectromètre de masse avec ionisation électrospray et analyseur quadripôle

Les signaux enregistrés fournissent un électrophorégramme.

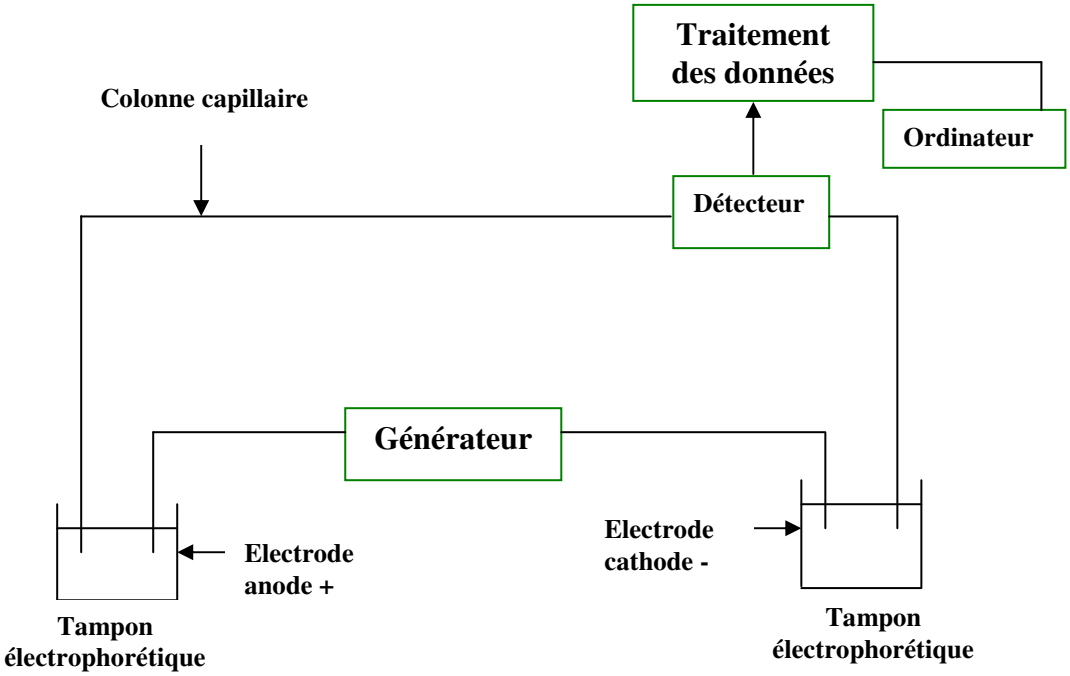


Figure V-6 : *Appareil d'électrophorèse capillaire* [14].

V. 5-3-4- AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages :

1. analyse rapide entre 5 à 20 minutes.
2. un pouvoir de résolution très élevée.
3. ne nécessite pas un grand volume d'échantillon pour l'injection.
4. séparation à température ambiante.
5. l'absence de solvant organique diminue les coûts d'utilisation par rapport aux méthodes chromatographique.

Inconvénients :

1. moins sensible que l'HPLC
2. la précision d'une analyse quantitative est inférieure à celle des méthodes chromatographiques (HPLC, et GC)

V. 5-3-5- APPLICATIONS

On peut l'utilisée dans l'hydrologie, l'analyse des ions minéraux (Ca^{++}, Mg^{++}, Cl^{-},SO_4^{2}), et des pesticides ou dans le domaine pharmaceutique, mais aussi dans le domaine de biologie chimique (électrophorèse des protéines et acides aminés)

V. 6- ÉCHANGE D'IONS

V. 6-1- INTRODUCTION

L'échange d'ions est l'une des méthodes couramment utilisées dans la séparation des particules organiques (acides aminés) est inorganique (les métaux). Leur principe est basé sur le partage d'un soluté entre deux phases non miscibles. Un échangeur d'ions est un solide ayant la propriété d'échanger les ions qu'il contient avec d'autres ions provenant d'une solution. Pour effectuer un échange le plus complet et le plus rapide possible, il faut finement diviser ce solide sous forme de grains très fins ou billes (une grande surface dans le volume le plus petit possible).

L'amélioration du principe d'échange d'ions est réalisée par W.Cohn, où les molécules d'un échantillon sont séparées grâce à leurs propriétés acides bases. Les aminoacides sont séparés en général sur une colonne d'échangeurs de cations, de type polystyrène sulfoné. Cette technique d'analyse des acides aminés fut mise au point par W.Stein et S.Moor en 1958 à l'institut Rock feller à New-York **[16]**.

La séparation par échange d'ions est toujours en amélioration, Gabor Simon, Laszlo Hanak **[17]**, développent cette technique pour séparer les acides aminés des eaux résiduaires de la tannerie.

Pour la séparation d'un mélange d'acides aminés, l'utilisation de la méthode classique n'est pas efficace, par contre la séparation sur colonne d'échange d'ions en HPLC est très efficace.

V. 6-2- PRINCIPE

Les résines échangeuses d'ions sont des substances insolubles qui ont le pouvoir d'adsorber ou attirer un anion ou un cation et de rejeter leur propre ion de même signe.

En générale les résines ont une forme sphérique avec un diamètre de 0.3 à 1.2mm.

Le phénomène d'échange d'ions est régi par la réaction suivante :

$$n(R^{-}A^{+}) + B^{n+} \rightleftharpoons R_n^{-}B^{n+} + nA^{+}$$

R^- : radical anionique faisant partie de la résine échangeuse d'ions

A^+ : ions fixés sur la résine neuve

B^{n+} : ions en solution

A l'équilibre on peu écrire :

$$K_{A^+}^{B^{n+}} = \frac{\left[R_n^- B^{n+}\right]_R . \left[A^+\right]_S^n}{\left[R^- A^+\right]_R^n . \left[B^{n+}\right]_S}$$

Où :

$\left[R_n^- B^{n+}\right]_R$: Concentration de l'ion B^{n+} dans la résine

$\left[B^{n+}\right]_S$: Concentration de l'ion B^{n+} dans la solution

$\left[R^- A^+\right]_R$: Concentration de l'ion A^+ dans la résine

$\left[A^+\right]_S$: Concentration de l'ion A^+ dans la solution

On a supposé des solutions diluées, donc on a remplacé les activités par des concentrations.

Le terme $K_{A^+}^{B^{n+}}$ est appelé coefficient de sélectivité. Ce dernier n'est pas une constante, car il est en fonction des conditions expérimentales.

L'affinité d'une résine diffère d'un ion à un autre. Par exemple, les ions polyvalents se fixent mieux que les ions monovalents. En plus, l'affinité d'une résine pour un ion est en fonction de la dimension de l'ion hydraté, car plus l'ion est hydraté plus sa liaison avec la résine est fragile.

Types de résines échangeuses d'ions

La plupart des résines sont fabriqués à partir d'un polymère. Elles varient en fonction des groupements fonctionnels qui influencent la capacité d'échange et la sélectivité.

On distingue deux catégories de résines, anioniques et cationiques ;

Résines échangeuses de cations :

1- Fortement acides ($R\text{-}SO_3H$), RSO_3Na : on peut régénérer cette résine à l'aide d'une solution concentrée de NaCl. L'efficacité de régénération est d'environ 30 à 50%.

2- Faiblement acides RCOOH, RCOONa : on peut régénérer cette résine à l'aide de NaOH ou également une solution de HCl à 5%. L'efficacité de régénération est d'environ 100%.

Résines échangeuses d'anions :

1- Fortement basiques R-NR_3OH : on peut régénérer cette résine à l'aide d'une solution de NaOH. L'efficacité de régénération est d'environ 30 à 50%.

2- Faiblement basiques R-NH_3OH : on peut régénérer cette résine à l'aide d'une solution concentrée de NaOH, de NH_4OH ou de Na_2CO_3.

V. 6-3- INSTRUMENTATION

L'échange sur résine est très simple et ne demande pas un grand matériel. Il se fait habituellement sur colonne. La colonne est remplie d'une résine anionique ou cationique ou les deux alternativement (un lit mélangé). Pour la séparation des acides aminés on utilise des résines fortement acides de type polystyrène sulfoné ou bien des résines faiblement acides de type amberlite, cette résine est utilisée à l'état équilibrée à pH 4.2.

Les acides aminés sont des ampholytes, leur état ionique dépend du pH du milieu, donc on change le pH du tampon pour faire la séparation .

V. 6-4- AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Tableau V-2: *Avantages et inconvénients de la séparation sur résines échangeuses d'ions*

Types de résine	Avantages	Inconvénients
Résines cationiques fortement acides	-élimination complète des cations, -capacité variable, -bonne stabilité physique, Bonne stabilité à l'oxydation.	-efficacité de fonctionnement
Résines cationiques faiblement acides	-très grande capacité, -très grande efficacité de fonctionnement.	-élimination partielle des cations, -capacité de fonctionnement fixe, -faible stabilité physique, - cinétiques faibles.
Résines anioniques fortement basiques	-élimination complète des anions (incluant la silice et CO_2) -efficacité variable -cinétiques excellentes, -rinçage court	-résistance faible aux polluants organiques, Vie limitée, Instable thermodynamiquement,
Résines anioniques faiblement basiques	-grande capacité d'élimination, -grande efficacité de régénération, -excellente résistance aux - polluants organiques, -bonne stabilité thermique, -bonne stabilité à l'oxydation.	-élimination partielle des anions, -n'élimine ni la silice ni le CO_2 -rinçage long, -cinétique faible.

V. 7- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

V. 7-1- INTRODUCTION

La chromatographie liquide haute performance est parmi les formes modernes des méthodes chromatographique. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographique liquide sur colonne. Elle a un grand champ d'application et son succés est du à la possibilité d'agir sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, et aussi le choix du système de détection convenable. Au contraire la chromatographie liquide classique est peu utilisée, en raison de la lenteur des séparations, de l'absence de détecteurs et de la quantité considérable d'échantillon nécessaire.

Les acides aminés sont difficiles à séparer. Cette difficulté est du à leur diversité, ils sont soit aliphatiques, soit aromatiques, et peuvent posséder une fonction alcool, ou une deuxième fonction amine.

L'analyse et la séparation des acides aminés s'effectuent en général par l'HPLC. Le plus souvent sur colonne échangeuse d'ions. Cette analyse nécessite souvent une dérivatisation des acides aminés pour qu'ils devenus détectables. On distingue deux méthodes génériques de drivatisation, dérivatisation post-colonne, après la séparation chromatographique, et dérivatisation pré-colonne, avant la séparation chromatographique. Le choix de la méthode de dérivatisation se fait paraport à l'échantillon.

La séparation et la détection des acides aminés ne peuvent être dissociées. En HPLC les deux modes de détection sont principalement la spectrophotométrie UV, et la spéctrofluorimétrie.

V. 7-2- PRINCIPE

Comme on a déjà vue, l'HPLC est dérivée de la méthode classique de chromatographie liquide, donc elle est basée sur les mêmes principes. Selon la nature de la phase stationnaire l'HPLC peut mettre en œuvre des phénomènes de partages qui sont les plus courants, des phénomènes d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion.

V. 7-3- INSTRUMENTATION

Une installation d'HPLC comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers spécialisés **(figure 1)**, ou intégrés dans un même châssis **[1]**. La liaison entre les différents modules est assurée à l'aide de canalisations de très faible diamètre interne (0.1mm), pour assurer la circulation de la phase mobile.

Les éléments de base de la méthode de séparation sont :

1- pompe :

Un appareil d'HPLC doit comporter au moins une pompe pour assurer la circulation de l'éluant.

2-Injecteur :

C'est une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques. Le temps d'injection doit être bref pour éviter la perturbation du régime de circulation.

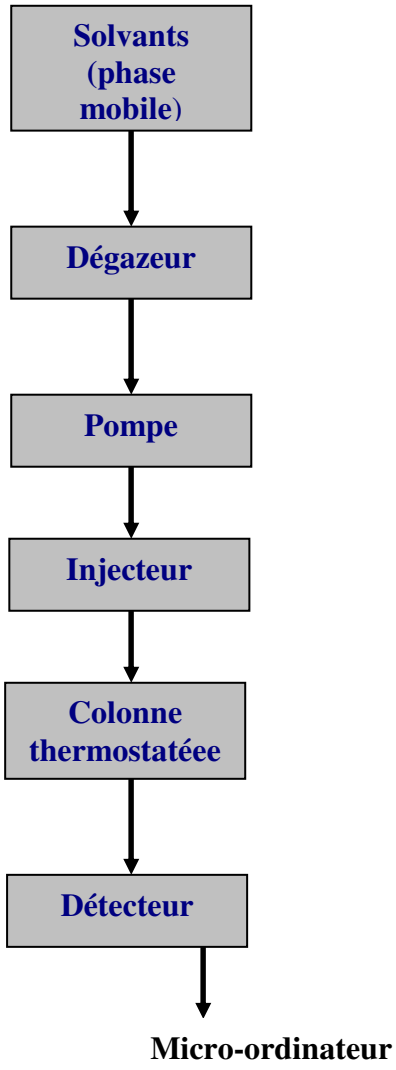


Figure V-7 : *Schéma d'une installation HPLC*

3- Colonnes :

Les colonnes ont une forme de tube, le plus souvent en acier avec différents diamètres, et longueurs. Une colonne est souvent associée à une pré colonne de même phase stationnaire qui sert à retenir certaines imputées, donc elle augmente la vie de la colonne principale.

4- Phase stationnaire :

On trouve une variété de phases stationnaires de nature et structure différentes. Le choix de la phase stationnaire est liée à la nature de substances à séparées.

5- Détecteur :

Comme pour la phase stationnaire le détecteur doit être adapté à la nature de l'échantillon. Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction,…..

Pour une analyse des acides aminés un appareil d'HPLC doit comprendre un réacteur post colonne de dérivatisation PCR (post column reactor) ou dérivatisation pré colonne. Habituellement le détecteur utilisé est ultratviolet-visible ou fluorescence tout dépend de la méthode de dérivatisation. Un appareil d'enregistrement (micro-ordinateur) est nécessaire pour transformer la lecture du détecteur en signale correspondant, et aussi pour faire la quantification.

Dérivatisation pré ou post-colonne :

A partir de 1980 à nos jours, plus de 4000 publications ont concerné des méthodes utilisant une dérivation pré- ou post- colonne pour réaliser une détection spectrophotométrique (uv, visible) ou spectrofluorométrique alors que moins d'une quarantaine d'articles concerne des méthodes avec détection sans dérivation **[18]**.

-dérivation post- colonne :

La séparation des acides aminés se fait sur une colonne échangeuse d'ions, puis la dérivation est en ligne (PCR : post column reactor). La détection est colorimétrique. C'est la méthode dite Ninhydrine.

-dérivation pré-colonne :

On utilise différents réactifs de dérivatisation (PITC, OPA, Fmoc, etc…), en suite la séparation en ligne (phase inverse, colonne type C18) des dérivés obtenus. La détection se fait avec l'uv ou la fluorimétrie.

Le choix de la méthode de dérivatisation est lié à la nature et l'origine de notre échantillon.

EXEMPLES :

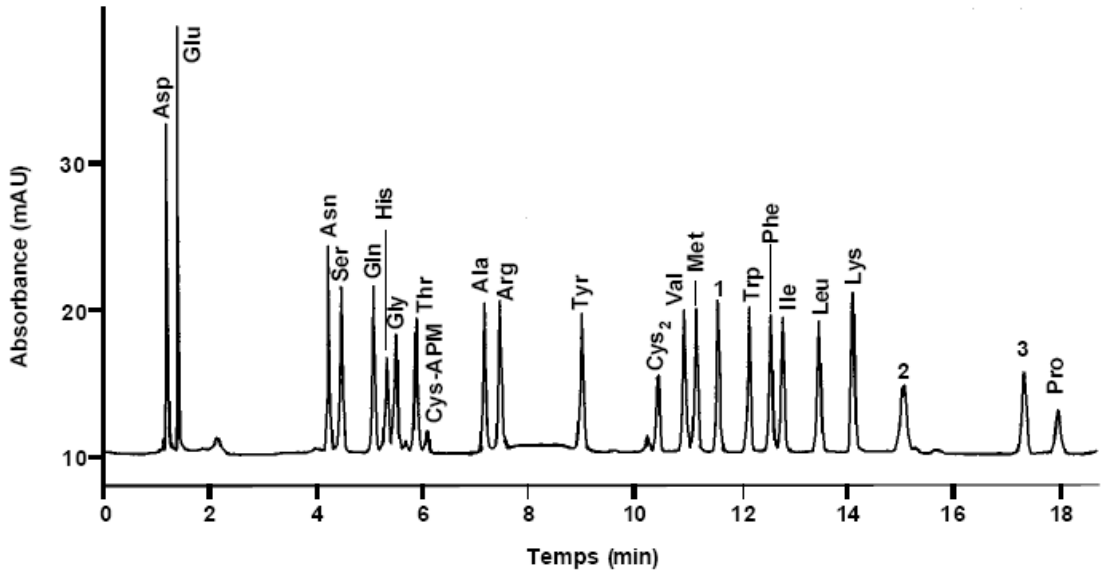


Figure V-8 : *Analyse des 20 acides aminés protéiques dérivés par CPL-UV à barrette de diodes. D'après [18]. La dérivation précolonne s'effectue en deux étapes. Les acides aminés primaires sont d'abord dérivés par l'OPA et l'acide mercaptopropionique (AMP), les acides aminés secondaires par le FMOC. La cystéine est détectée sous forme oxydée avec l'AMP. Autres composés: 1=acide 2 amino pentanoique, 2= hydroxyproline, 3=sarcosine. Colonne: Hewlett Packard Amino Acid Analysis (200 x 2,1 mm D.I). Phase mobile: A= Tampon acétate de sodium 20 mM contenant 0,018% de triéthylamine ajusté à pH= 7,2 avec de l'acide acétique additionné de 0,3% de THF. B= Tampon acétate de sodium ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique/acétonitrile/méthanol (20/40/40). De 0% à 60% de B en 17 minutes, puis 100% de B en 1 minute. Détection à 338 et 262 nm.*

V.7-4- AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages :

1- elle ne nécessite pas de grandes quantités d'échantillons de substances à analysées
2- on peut agir sur plusieurs paramètres afin d'améliorer la séparation.

Inconvénients :

1- entretient difficile.
2- elle nécessite la dérivatisation pour les molécules qui ne comportent pas un chromophore dans leur structure.

V. 8- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

V. 8-1- INTRODUCTION

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode analytique de séparation, très répandue. Ces premières applications sont depuis environ 60 ans. Son principe comme les autres méthodes chromatographiques, est basé sur la migration différentielle des constituants d'un échantillon à analyser à travers un substrat choisi. La CPG est destinée aux substances moléculaires thermostables et suffisamment volatiles. Donc il faut maintenir une

température minimale convenable, mais sans volatiliser la substrat. Pour les substances non volatils on peut les rendre volatils après une dérivatisation (cas des acides aminés).

La CPG constitue la méthode la plus puissante et la plus fine pour séparer, identifier, et quantifier les corps gazeux ou volatilisables.

En CPG et pour une phase stationnaire donnée il y a quatre paramètres opérationnels : L, longueur de la colonne et μ, vitesse de la phase mobile, T température de la colonne et β rapport de phase. Donc on peut agir sur ces paramètres pour améliorer la séparation et l'efficacité de la technique.

V. 8-2- PRINCIPE

En chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile est un gaz vecteur, généralement c'est l'azote ou l'hélium et parfois l'hydrogène. La phase mobile traverse une colonne capillaire renfermant des granules poreux, imprégnés d'un liquide très peu volatil qui constitue la phase stationnaire.

Lorsque l'échantillon à analyser est injecté dans la colonne, il est vaporisé, puis ses constituants sont entraînés à des vitesses inégales par le gaz vecteur. A la sortie ces constituants sont détectés.

Le début d'une analyse est réalisé au moment ou on injecte une très petite quantité de l'échantillon (liquide ou gaz) dans l'injecteur.

On utilise la dérivatisation pour les produits non volatils. Elle recouvre la réaction du produit à analysé avec un composé choisi qui le transforme quantitativement en un dérivé plus volatil.

De très nombreux réactifs sont proposés : la méthylation, la triméthylation, la trifluoroacétylation,… etc. L'exemple le plus répandu est celui de l'analyse des acides gras, et des acides aminés.

Pour les acides aminés, avant une analyse en CPG, on doit faire une estérification et une acylation.

V. 8-3- INSTRUMENTATION

Une installation de CPG comprend les modules suivants : injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter la colonne à une température élevée si nécessaire. Ces modules sont réunit dans le même bâti **(figure 9)**.

3- une bouteille de gaz vecteur avec un dispositif de régulation du débit gazeux pour suivre la pression d'entrée,
4- un dispositif d'introduction de l'échantillon (injecteur),
5- une colonne,
6- un détecteur en relation avec un enregistreur,
7- un manomètre à la sortie de la colonne donne la pression de sortie.

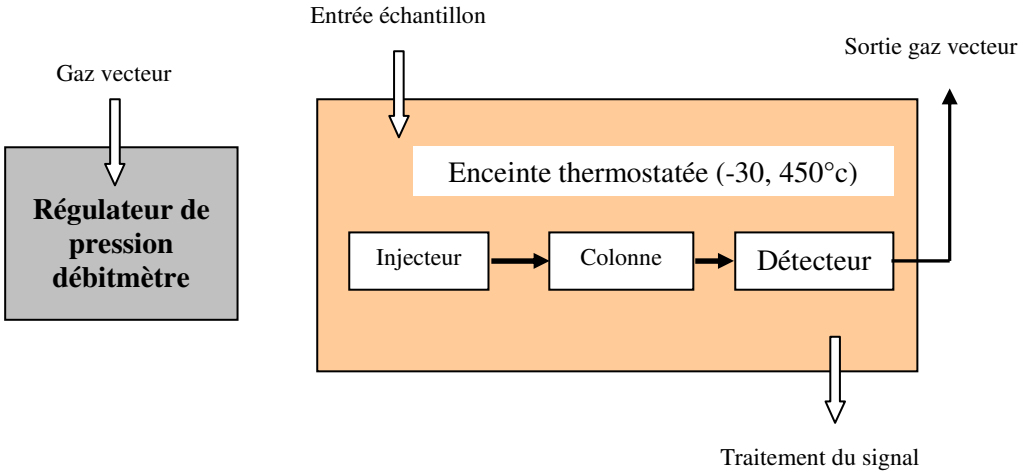


Figure V-9 : *Schéma d'un appareil CPG*

V. 9- AUTRES MÉTHODES D'ANALYSE ET SEPARATION

On peut voir facilement l'importance d'analyse et séparation des acides aminés dans les variétés d'articles concernant ce sujet. Dans ces articles les chercheurs améliorent les méthodes classiques d'analyse, ou bien développent de nouvelles méthodes d'analyse. Chaque méthode est basée sur un principe différent.

* C. Martin –Orue, S. Bouhallab, et A. Garem, utilisent la nanofiltration pour la séparation des acides aminés et peptides **[19]**.

*Kazuhisa Sato, utilise la dialyse pour séparer les acides aminés **[20]**.

*Malgorzata Jaworska, Zofia Szulinska, et Malgorzata Wilk, améliorent l'électrophorèse capillaire pour l'analyse des acides aminés **[13]**.

*Jang Hoon Kim, Jee Hye Kim, Jonggeon Jegal, et Kew-Ho Lee, développent une nouvelle membrane à base de polysaccharides destinée à la séparation des acides aminés **[21]**.

*Chambault Patrick améliore l'HPLC par l'utilisation de détecteur evaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse pour la séparation des acides aminés **[18]**.

*Daniel P. Glavin, et Jeffrey L. Bada, utilisent la sublimation pour isoler les acides aminés à partir des échantillons naturels **[22]**.

V. 10- CONCLUSION

Pour effectuer une bonne analyse d'un mélange d'acides aminés, on doit tout d'abord réaliser des analyses préliminaires (CCM, électrophorèse, échange d'ions sur colonne,…). Cette étape est très nécessaire, car les méthodes utilisées sont simples, peu coûteuses, et elle nous aide d'avoir des informations sur notre échantillon.

Après cette étape on peut faire une analyse approfondie, utilisant l'une des méthodes sophistiquées (HPLC, GC, EC) avec le choix de mode de détection convenable.

Le choix de la méthode à utiliser est très délicat. Tout dépend de l'origine et de la nature de notre échantillon, et le plus important est la disponibilité du matériel.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Francis Rouessac, Annik Rouessac, collaboration de Daniel Cruché, Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. 6e édition, DUNOD, (2003).

[2] M. Hamon, F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahuzier. Méthodes spectrales et analyse organique. 2éme édition, MASSON, Paris. (1999).

[3] David T. Plummer, traduction en français, Annick Pierce-crétel et Dominique Legrand, Introduction aux techniques de biochimie. EDISCIENCE, (1994).

[4] Bernard Malingrey, Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, p2795. Doc techniques de l'ingénieur, traité analyse et caractérisation.

[5] Michel Prats, Biochimie : méthodes biophysiques expérimentales. DUNOD, PARIS, (2002).

[6] P. Mauchien. Spectrofluorimétrie moléculaire et spectrométrie de fluorescence atomique. Technique de l'ingénieur traité : Analyse chimique et caractérisation. (1990).

[7] C.G.Honneger, Helv. Chim. Acta, ,46, (1963),1730.

[8] J. Opienska Blauth, H. Kraczkowski et H. Bruszkiewicz, dans Marini-Bettolo, p.165.

[9] P. Wollenweber, j. chromato, 9,(1962), 169.

[10] Teodor Hodisan, Monica Culea, Claudia Cimpoiu, Agata Cot. J. pharmaceutical and biomedical analysis, 18 (1998) 319-323.

[11] G.Vernin. La chromatographie en couche mince : techniques et applications en chimie organique. DUNOD PARIS. (1970).

[12] Marcel Chavanne, Armand Jullien, Gaston J. Beaudoin, Eddy Flamand, Chimie organique expérimentale. MODULO ÉDITEUR, (1986).

[13] Malgorzata Jaworska, Zofia Szulinska, Malgorzata Wilk. J of chromatography A. 993.(2003) .165-172.

[14] Gwenola Burgot, Jean-louis Burgot, Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications : Méthodes chromatographiques, électrophorèses et Méthodes spectrales. LAVOISIER. (2002).

[15] CI. Audigié, J. Figarella, F. Zonszain. Manipulations d'analyse biochimique. DOIN ÉDITEUR- PARIS.(1978).

[16] Albert L. Lehninger. Biochimie. «Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires ». Seconde édition, Flammarion médecine- sciences. (1993).

[17] Gabor Simon, Laszlo Hanak, Tibor Szanya, Gyula Marton. Journal of cleaner production.6 .(1998). 329-334.

[18] P.Chambault, « Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur evaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse ». Thèse de doctorat. Université d'ORLÉANS. (2000).

[19] C. Martin –Orue, S. Bouhallab, et A. Garem. J. of membrane science 142 (1998) 225-233.

[20] Kazuhisa Sato.j.of membrane science 196.(2002). 211-220.

[21] Jang Hoon Kim, Jee Hye Kim, Jonggeon Jegal, et Kew-Ho Lee. J. of membrane science 213. (2003). 273-283.

[22] Daniel P. Glavin, et Jeffrey L. Bada.analytical chemistry, vol 70, (1998), 15.

Sixième
CHAPITRE :

PARTIE EXPÉRIMENTALE

RESULTATS ET DISCUSSION

VI.1- INTRODUCTION

La tannerie mégisserie « **X** » (ex ENIPEC) de BATNA, utilise 28.8m^3/ jour d'eau pour l'opération d'épilage-pelanage (élimination des poils de la peau ovine ou caprine). Les eaux résiduaires de cette étape sont polluées en sulfure (Na_2S), chaux, et surtout, en matière organique (acides aminés, protéines, acides gras). La DCO de ces eaux peut atteindre 70 g/l.

Le but principal de cette étude est de :

- caractériser les acides aminés libres (analyses qualitative et quantitative) après une précipitation préalable des protéines ;
- de les séparer pour une éventuelle valorisation.
- de recycler l'eau après correction du pH et élimination de la DCO et une partie des sels ;

La méthode proposée est donc basée sur l'utilisation de technologies propres (valorisation de polluants, économie de l'eau et protection de l'environnement).

Ce chapitre comporte les manipulations suivantes :

Partie n° 1 : Dosages de l'eau du bain d'épilage-pelanage

1-1- Dosages acido basique de l'eau résiduaire ;

1-2- Dosage de l'eau résiduaire avec le CO_2.

Partie n° 2 : Dosages et analyses des acides aminés

2-1- Analyse pour la vérification de la présence des acides aminés ou peptides ;

2-2- Dosage par le formol des acides aminés libres après acidification et précipitation des protéines ;

2-3- Dosage spectrophotométrique ;

2-4- Dosage de l'azote protéique « méthode de KJELDHAL ».

Partie n° 3 : Hydrolyse acide du surnageant.

Partie n° 4 : Méthodes séparatives des acides aminés

4-1- Séparation par échange d'ions ;

4-2- Séparation par électrophorèse ;

4-3- Séparation chromatographique sur couche mince.

Dans ce travail touts les analyses sont effectuées sur deux types d'échantillons principaux :

Echantillon A :

On utilise directement l'eau résiduaire du bain d'épilage pour analyser et évaluer les substances azotées (protéines, acides aminés libres, et peptides).

Echantillon B :

On utilise le surnagent (filtrat) de l'eau résiduaire du bain d'épilage, après dosage avec un acide (HCl).

Les caractéristiques des échantillons se trouvent dans la première partie (page2).

Remarque :

Pour chaque manipulation ou analyse on a utilisé un échantillon différent, car on n'a pas pu conserver un seul échantillon pour toutes les manipulations effectuées.

VI. 2- DOSAGES DE L'EAU DE BAIN D'ÉPILAGE- PELANAGE

Les échantillons ont été prélevés à partir des premiers rejets des caniveaux de collecte lors de leurs rejets à partir de 6^h de matin. L'eau du bain d'épilage-pelanage est une eau basique avec un pH qui varie entre 12 et 14. Elle est chargée en sulfure, chaux et en matières organiques (acides aminés, protéines, acides gras).

L'échantillonnage se fait à partir d'un récipient bien fermé après quelques heures de décantation.

VI. 2-1- DOSAGE ACIDO BASIQUE DE L'EAU RÉSIDUAIRE

La première expérience qu'on a faite est le dosage du bain avec l'acide chlorhydrique jusqu'à pH 4. Elle permet d'évaluer la charge alcaline du bain et de déterminer la quantité d'acide nécessaire pour rabaisser le pH jusqu'à 4. Ce pH permet d'obtenir une solution décolorée, limpide, exempte de MES et de protéines.

2-1-1- Mode opératoire

Essai n°1 :

On neutralise 100ml de l'eau résiduaire, par une solution d'acide chlorhydrique (0.5M).

On détermine la valeur de pH à l'aide d'un pH mètre. Ce dosage est suivi d'une agitation lente pendant 15 mn.

A la fin on trace la courbe de titrage **(figure 1)**.

Pendant le dosage on peut caractériser le dégagement de H_2S grâce à son odeur spécifique.

A la fin du dosage on obtient un précipité protéique dense.

Après une décantation de 12h, on obtient une boue protéique qu'on peut éliminer par simple filtration. Le filtrat obtenu est un liquide limpide et clair.

Essai n°2 :

On réalise un dosage pH métrique (avec HCl) d'une solution synthétique d'un mélange de Na_2S, $Ca(OH)_2$, NaOH, avec une concentration similaire à celle du bain, afin de comparer les deux courbes obtenues, pour bien comprendre**(figure 2)**.

Essai n°3 :

On réalise un dosage pH métrique (avec HCl) d'une solution de Na_2S, à afin de comparer l'allure de ce dosage avec les autres courbes **(figure 3)**.

Essai n°4 :

On réalise un dosage pH métrique (avec HCl) d'une solution de $Ca(OH)_2$, pour comparer l'allure de la courbe de ce dosage avec les autres courbes **(figure 4)**.

2-1-2- Analyse de l'eau du bain

Les eaux résiduaires d'épilage-pelanage sont chargées en sulfures, chaux et sels dissous.

Des exemples sur les caractéristiques des bains résiduaires sont représentés au **tableau 1 [1]**.

Tableau VI-1 : *Exemple d'un bilan analytique des bains résiduaires d'épilage-pelanage.*

Bain n°	pH	MD ml/l	MES mg/l	S^{2-} mg/l	DCO $mg(O_2)/l$	γ ms/cm	Cl^- mg/l	TAC me/l
1	12.3	400	1400	679	32800	6.71	444	65
2	12.4	400	1096	1709	24800	12.8	870	122

2-1-3- Composition du bain

Tableau VI-2 : *Composition initiale du bain d'épilage en produits chimiques, par apport à 28.8m^3 d'eau, à 30°C.*

Na_2S	$Ca(OH)_2$	NaOH
50 Kg ≈ 0.023M	50 Kg ≈ 0.022M	3 Kg ≈ 0.0026M

Caractéristiques de l'eau du bain :

Couleur : vert jaune

pHi = 12.35

Conductivité : 8.26 mS/cm

Le surnageant ou filtrat :

pH_f =3.574

Absence de sulfures

Couleur : limpide et claire

Conductivité : 6.2 mS/cm

La boue obtenue :

Volume :25ml

Aspect : grains de couleur gris clair

1-1-4- Résultats

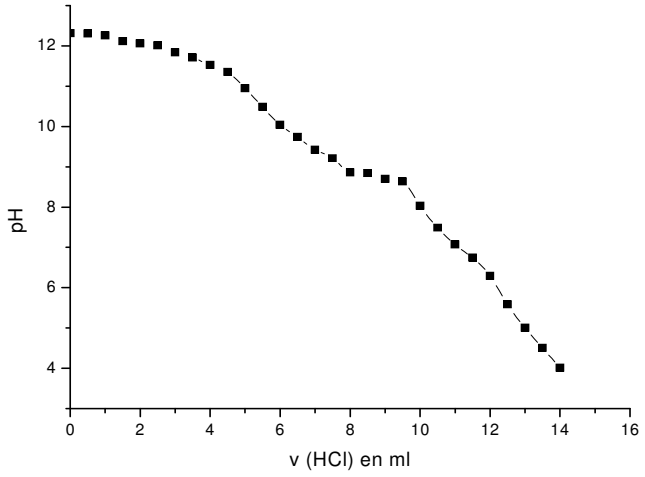


Figure1 : *Dosage pH-métrique du bain avec HCL 0.5M*

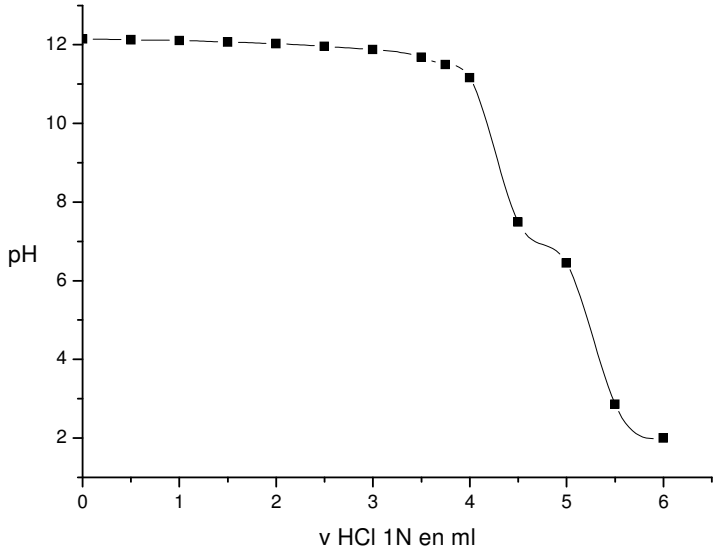


Figure2 : *Dosage pH-métrique de la solution synthétique avec HCl 0,5N*

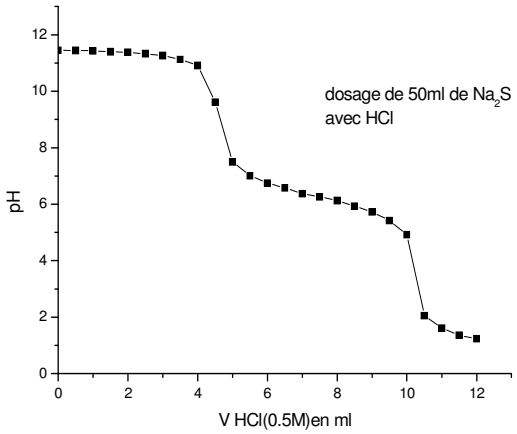


Figure3 : *Dosage pH-métrique de la solution de Na_2S avec HCl*

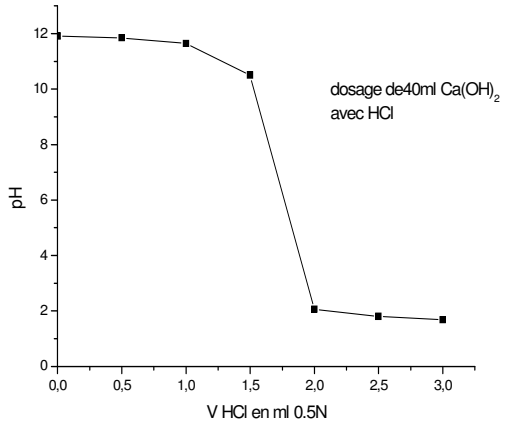


Figure4 : *Dosage pH-métrique de la solution de $Ca(OH)_2$ avec HCl*

2-1-5- Discussion

Pour une bonne compréhension du phénomène on va faire une comparaison entres les quatre diagrammes.

La courbe de neutralisation est caractérisée par une allure similaire à celle d'un dosage acido basique d'une polybase. Le pH initial est 12,35.

On peut diviser notre courbe de dosage de l'eau de bain d'épilage (**figure1**) en quatre parties :

Partie 1 : Correspond à un tampon au voisinage de pH ≈ 12 ; ce tampon est fixé par les deux espèces basiques S^{2-} et $Ca(OH)_2$. Car les deux sont des bases fortes et le ΔpKa ≈ 0,4 (donc les deux dosages ne sont pas séparés). Avec l'addition de l'acide, on remarque que le pH varie très lentement, jusqu'à pH environ 10,8. L'aspect de cette partie est similaire à celui de la courbe de titrage de $Ca(OH)_2$ (**figure 4**). Cette zone correspond à la neutralisation de la chaux, et les sulfures. Donc les différentes réactions qu'on a au niveau de cette partie sont :

$$S^{2-} + H^+ \rightleftharpoons HS^- \quad pKa_1 = 13$$

$$Ca(OH)_2 \rightleftharpoons Ca(OH)^+ + OH^- \quad pKa_1 = 12,6$$

Partie 2 : Correspond au premier point équivalent à pH ≈ 10,51, ce pH est directement liée à la concentration de HS^- et $Ca(OH)^+$.

Partie 3 : comprend deux zones tampons, au voisinage de pH ≈ 8,9 et pH ≈ 8,7. Ces zones se trouvent uniquement dans le diagramme de l'eau résiduaire, donc on a d'autres espèces (appart S^{2-}, et Ca $(OH)_2$) qui consomment les protons donnant des zones tampons. Ces espèces sont les protéines de la peau tel que le collagène et la kératine, car le pK_2 de ces espèces est proche de ce pH (voir **tableau 3**).

Partie 4 : de pH 7 à 4, l'allure de cette partie indique la présence de plusieurs substances chimiques, qui ont des pKa voisins. Ces substances sont les protéines, qui précipitent quantitativement au voisinage de leur point isoélectrique. Le pHi est entre 6 et 4 en moyenne **(tableau 3)**.

Sans oublier le dégagement de H_2S qu'on peut identifier par son odeur spécifique :

$$HS^- + H^+ \rightleftharpoons H_2S \qquad pKa_2 = 7$$

Au delà de pH 4 la courbe prend l'allure de celle d'une solution d'un acide fort.

A partir de cette courbe de neutralisation de l'eau du bain d'épilage-pelanege on peut déterminer les quantités de chaux et des sulfures **(annexe1)**.

Pendant le dosage et à partir d'un pH environ 10,5 en remarque le début de la formation du précipité protéique. Ce précipité devient de plus en plus dense à chaque fois qu'on diminue le pH. On peut expliquer ce phénomène par les arguments suivants :

On a dans notre échantillon un mélange de protéines dissoutes en milieu basique (protéines de la peau) : le collagène, la kératine,…. On sait que la solubilité d'une protéine diminue au voisinage de son pH isoélectrique. Donc au cours du dosage du bain, à chaque fois qu'on rapproche au pH isoélectrique d'une protéine, cette dernière précipite. Car l'espèce isoélectrique apparaît bien avant le pH_i, qui correspond à 100% de la molécule non chargée. Ce phénomène explique aussi l'allure de notre courbe (présence de plusieurs paliers).

Tableau VI-3 : *pH isoélectrique et pKa approximatives de quelques protéines* **[1]**

Protéine	**pH isoélectrique**	**pKa_1**	**pKa_2**
Albumine	**4,9**		
Globuline	**6,6**		
Collagène	**6,6**	**4,1**	**9,3**
Collagène pelané	**4,9 – 5,5**		
Elastine	**4,9**		
kératine	**5,5**		

2-1-6- Conclusion

Le dosage de l'eau du bain résiduaire nous permet de signaler les points suivants :

* malgré la simplicité et la rapidité de cette technique, elle est très efficace et peut fournir des informations analytiques très importantes sur notre échantillon.

*pour neutraliser 1l de l'eau du bain d'épilage-pelanage, il faut utiliser 0,51g de HCl en moyenne.

*l'eau résiduaire est très chargée en matière organique : protéines ; peptides et acides aminés.

VI. 2-2- DOSAGE DE L'EAU RÉSIDUAIRE AVEC LE CO_2

2-2-1- Introduction

L'étape d'épilage-pelanage est caractérisée par sa consommation élevée en eau. Si on peut recycler cette eau on va diminuer vraiment le coût de cette consommation et protéger l'environnement.

On va proposer une méthode propre pour la possibilité du recyclage de l'eau du bain, par l'utilisation du CO_2, comme agent de neutralisation des eaux alcalines à la place des acides forts.

On a étudié cette méthode au niveau de notre laboratoire en traçant la courbe de titrage du bain par le CO_2.

2-2-2- Mode opératoire

Avant le dosage, on mesure la conductivité initiale de l'eau du bain.

On a barboté des quantités de CO_2 dans l'eau du bain, un simple dosage acidimétrique, à l'aide d'un petit montage **(figure 5)**.

La création du CO_2, est à partir d'un dosage d'une solution de $NaHCO_3$, par un acide fort, H_2SO_4.

A chaque fois qu'on ajoute une quantité de l'acide (correspondante à une quantité de CO_2 dégagée), on note la valeur du pH.

Alors on peut tracer la courbe de variation du pH du bain pendant le dosage **(figure 6)**.

Après le dosage on filtre la solution et on mesure la conductivité.

Pour vérifier la reproductibilité de l'opération, la neutralisation au CO_2 est répétée trois fois.

Matériels et produits :

Solution de H_2SO_4 à 10%

Solution de $NaHCO_3$ à 10%

pH-mètre

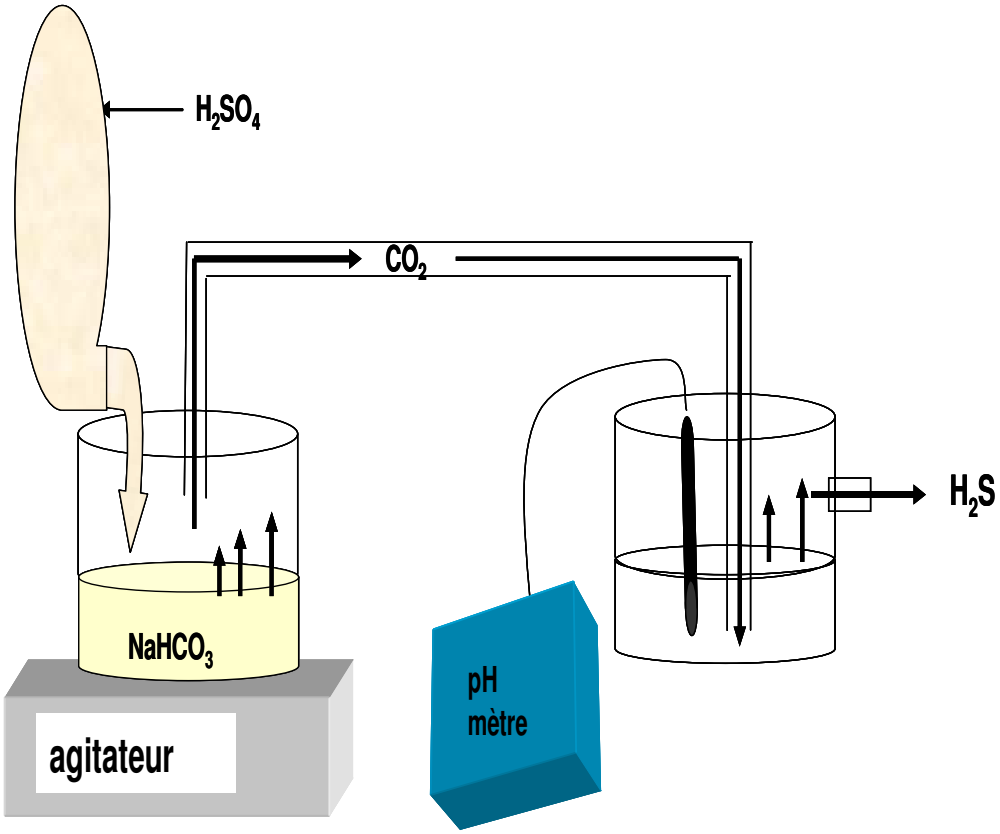
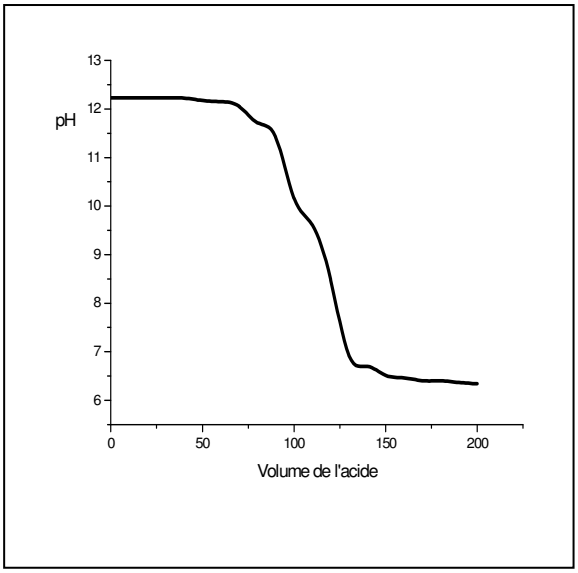
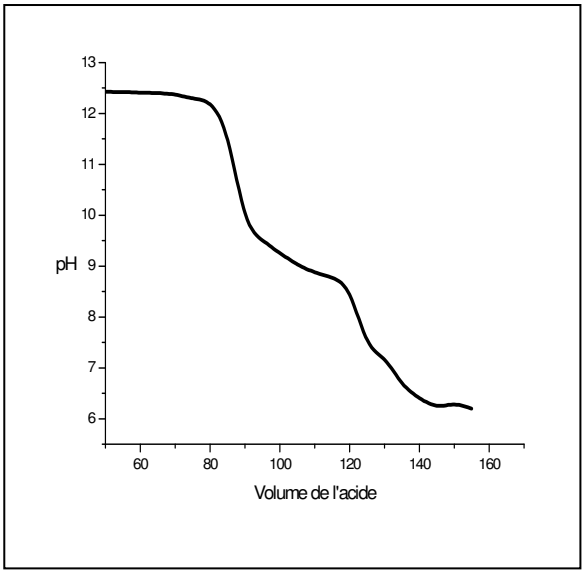


Figure VI-5 : *Montage du dosage du bain avec le CO_2*

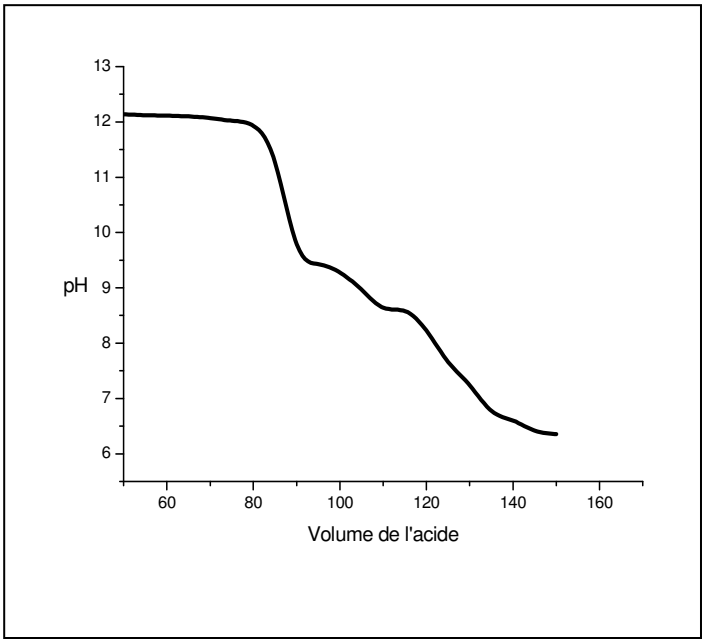
2-2-3- Résultats



Essai 1



Essai 2



Essai 3

Figure VI-6 : *diagrammes de dosage du bain par le CO_2.*

2-2-4- Discussion

On neutralise une quantité de l'eau du bain d'épilage-pelanage, par le CO_2 provenant de la réaction de H_2SO_4 avec $NaHCO_3$.

L'allure de cette courbe est différente de celle obtenue lors de la neutralisation avec HCl. Elle est proche beaucoup plus à celle du dosage de Na_2S avec HCl.

Le pH initial de l'eau du bain est au environs de 12,4.

On peut diviser l'allure de la courbe en quatre parties :

Partie 1 : On observe un tampon aux voisinages de pH 12, ce tampon est due à la réserve alcaline très importante de $Ca(OH)_2$, et Na_2S, en plus on a l'équilibre suivant :

$$\mathbf{CO_2\ gaz \rightleftharpoons CO_2\ aq,}$$

K de Henry ≈ $10^{-1,5}$ mol. l^{-1} .atm^{-1} , la pression partielle de CO_2 est constante 3. 10^{-4} atm.

La loi d'Heny :

$$\mathbf{|CO_2,aq| = K\ .\ Pco_2 = 10^{-5}\ mol\ .l^{-1}}$$

On va calculer la solubilité de CO_2 dans notre cas, pH ≈ 12.4 :

$$\mathbf{S = |CO_2|_t = |CO_2,aq| + |HCO_3^-| + |CO_3^{2-}|}$$

$$CO_2,aq \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \qquad Ka_2 = 10^{-6,4}$$
$$HCO_3^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H^+ \qquad Ka_1 = 10^{-10.3}$$

d'oŭ

$$S = |CO_2,aq| \; [\, 1 + Ka_2 / |H^+| + Ka_2 \,.\, Ka_1 / |H^+|^2 \,]$$

Donc dans ces conditions, la solubilité du gaz carbonique dans notre échantillon est égale à :

$$-\log S = -3,3$$

Notre échantillon est enrichi en dioxyde de carbone sous forme **HCO_3^-** et **CO_3^{2-}.**

Donc on a directement dans notre échantillon la précipitation du calcaire.

$$Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightleftharpoons CaCO_3\downarrow \quad pKs = 8,3$$

Si on calcule le pH du début de précipitation :

$$|Ca^{2+}|_t = 0.023M$$
$$pCa^{2+} = ½\ pKs - ½\ \log \alpha_{co_3(H)}$$
$$pHi = 8.16$$

Partie 2 : un saut de pH ente 12 et 9.5, le pHe est entre 10 et 11. Ce point équivalent proche du premier point équivalent de dosage de S^{2-}.

$$S^{2-} + H^+ \rightleftharpoons HS^- \qquad pKa_1 = 13$$
$$HS^- + H^+ \rightleftharpoons H_2S \qquad pKa_2 = 7$$

Le premier point d'équivalence est le pH d'une solution ampholyte :

pH = ½ (pK_1 + pK_2), donc pH = 10

Partie 3 : un tampon aux environs de pH 9 et 10. Le pH varie peu lorsqu'on ajoute le CO_2. Cette zone est liée au pKa des protéines.

Partie 4 : à partir de pH 8 on remarque que le pH varie peu, malgré l'addition de grandes quantités de CO_2. Ceci est dû à la présence de plusieurs espèces chimiques. Au delà de pH 6, le pH ne varie plus et reste constant. Cet arrêt est du à la saturation de la solution en acide carbonique (la loi d'Henry).

- pendant le dosage on a remarqué que la formation du précipité protéique est faible par comparaison avec celle en présence d'acide fort.
- à partir de pH 6, la neutralisation de l'eau du bain jusqu'à pH 4 nécessite une très petite quantité de HCl (quelques ml, maximum 2ml de HCl 0.5M pour 100ml d'eau).

Remarque :

Pendant le dosage on remarque la difficulté de stabilité de la valeur du pH.

Les courbes de titration des polypeptides et protéines, ne donnent pas que rarement des indications sur les valeurs des pKa individuels en raison du grand nombre de groupements ionisables présents (on trouve en moyenne 30 % de chaînes latérales d'acides aminés ionisables dans une protéine). De plus, la structure covalente et tridimensionnelle d'une protéine peut modifier le pK de chaque groupe ionisable de plusieurs unités de pH par rapport à sa valeur lorsque l'acide aminé est seul. Ceci résulte de l'influence électrostatique de groupes chargés voisins, de l'effet du solvant du à la proximité de groupes de faible constante diélectrique, et enfin de l'établissement de liaisons hydrogène. La courbe de titration d'une protéine dépend également de la concentration en sels comme le montre la **figure 7**, car les ions salins protègent, par effet électrostatique, les chaînes latérales les unes des autres, diminuant les interactions entre charges **[2]**.

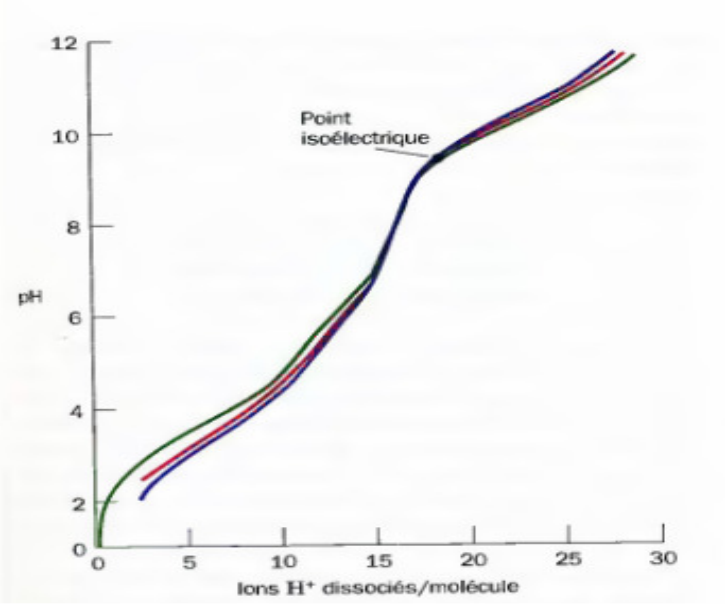


Figure VI-7 : *Courbes de titration de la ribonucléase A à 25°C. la concenration en KCl est 0.01M pour la courbe bleue, 0.03M pour la courbe rouge, et 0.15M pour la courbe verte [d'après Tanford, C. et Hauenstein,Jj.D., J. Am. Chem. Soc. 78, 5287 (1956)]*

2-2-5- Conclusion

* Pendant le dosage avec le CO_2 on a pu remarquer que la précipitation des protéines est peu par apport au dosage par HCl ;

* Le dégagement de H_2S est doux ;

* On a pu diminuer le pH du bain jusqu'à 6,3

* La conductivité de l'eau est :

Conductivité initiale : **k_0= 8,26ms/cm**

Conductivité de l'eau après un dosage avec HCl jusqu'à pH= 4 : **k_1= 6,2ms/cm**

Conductivité de l'eau après un dosage avec le CO_2 jusqu'à pH=6,3 : **k_f = 2,1ms/cm**

On peut résumer les avantages de cette méthode dans les points suivants :

1- élimination des éléments toxiques sans introduire de nouvelles substances.

2- possibilité de récupération de H_2S dans une solution de NaOH et la recyclée par la suite

3- la diminution de la conductivité du bain nous indique la possibilité de le recycler.

VI. 3- ANALYSES ET DOSAGES DES ACIDES AMINÉS

VI. 3-1- ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINÉS ET PEPTIDES.

3-1-1- Essai n°1 (analyse à la ninhydrine)

La ninhydrine est un réactif essentiel pour l'analyse des acides aminés, des peptides et des protéines. C'est aussi le réactif privilégié pour la détection d'empreintes digitales latentes sur des surfaces poreuses **[3]**.

La ninhydrine est très utilisée comme réactif révélateur des acides aminés en chromatographie. La ninhydrine est utilisée sous forme hydratée la 2,2-dihydroxyindan-1,3-dione.

Pour analyser la présence des acides aminés ; on réalise la méthode à la ninhydrine spécifique pour les acides aminés et (ou) peptides.

La réaction de la ninhydrine avec un acide aminé est détaillée dans l'**annexe 2.**

3-1-2- Mode opératoire

Dans un tube à essai on prend 1ml de notre échantillon (surnagent), on ajoute 2ml de solution à la ninhydrine (4mg/ml dans l'éthanol). On met le tube dans un bain marie à l'ébullition pendant cinq minutes. Après refroidissement on peut voir la couleur qui caractérise les acides aminés avec la ninhydrine (normalement une couleur violette).

3-1-3- ESSAI n°2 (méthode de BIURET)

La méthode de **BIURET (1949)** est une technique très fiable d'analyse et de quantification des peptides et protéines dans un échantillon donné.

On a utilisé la méthode de **BIURET** pour voir la présence des peptides ou protéines :

Les ions cu^{2+} (ajoutés sous forme de sulfate de cuivre) se lient aux atomes d'azote des liens peptidiques de la protéine dans des conditions de pH alcalin, produisant ainsi un complexe de couleur mauve :

$$\mathbf{Cu^{2+}/OH^{-} + \text{peptide ou protéine} \longrightarrow \text{Complexe } [\,Cu^{2+}\text{-peptide}\,]}$$

Couleur mauve

La formation d'un complexe nécessite une structure peptidique, les acides aminés ne réagissent pas.

Le temps d'attente d'environ 30minutes est nécessaire pour le développement de la couleur.

Limites de cette méthode :

Cette méthode est utilisée pour des concentrations de 1-5mg/ml.

Remarque :

Cette méthode est utilisée en général comme méthode spéctrophotométrique quantitative (absorption maximale à 540-550 nm), dans notre cas on l'a utilisé seulement comme méthode qualitative (présence ou non des peptides).

3-1-4- Résultats

-Pour l'essai n°1 :

L'analyse est positive, une couleur violette apparaît, donc on a la présence des acides aminés et (ou) peptides dans le surnagent.

-Pour l'essai n°2 :

L'analyse est positive donc on a la présence des peptides.

3-1-5- Conclusion

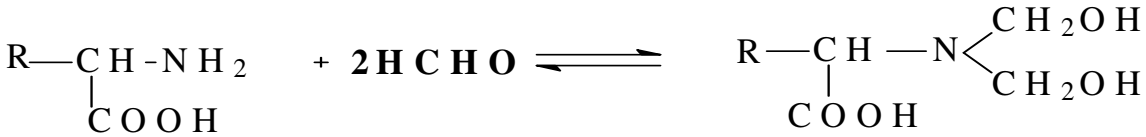
Le surnagent est ainsi constitué d'un mélange d'acides aminés libres et de peptides. Comme notre objectif est la valorisation des acides aminés libres du filtrat, on va donc s'intéresser à

- la détermination de la concentration totale des acides aminés libres par des méthodes titrimétriques (formol, kjeldahl, …)
- leur caractérisation par différentes techniques chromatographiques et électrophorétiques.

VI. 3-2- DOSAGE DES ACIDES AMINÉS PAR LE FORMOL

3-2-1- Introduction

Cette méthode a été découverte et développée par **SÖRENSEN (1909)** pour la titration des urines. Un excès de formol (à 40% formaldéhyde) est ajouté à l'échantillon à analyser. L'échantillon devient plus acide (diminution du pKa). Le formol réagit sur l'acide aminé selon la réaction suivante :



Le produit de la réaction est un acide plus fort dont le titrage par une solution basique étalon est plus facile (saut de pH net) permettant l'utilisation d'un indicateur usuel, la phénol phtaléine. Les acides aminés et polypeptides réagissent avec le formaldéhyde.

La réaction précédente est réversible. Cette réaction bascule vers la droite avec un excès de formaldéhyde, tandis que l'addition d'eau donne la réaction inverse **[4]**.

Par cette réaction l'acide aminé perd son caractère amphotère avec la disparition de la fonction amine primaire. Alors on dose le groupement carboxylique, devenu plus fort, par la soude.

3-2-2- Mode opératoire

On réalise un dosage pH-métrique en présence d'un excès de formol, et on effectue le dosage avec une solution étalon de NaOH.

Essai n°1 :

On a réalisé ce dosage tout d'abord avec une solution étalon de glycine

40ml de glycine 0,0095g/100ml, donc 1,2 10^{-3}M

On ajoute 20ml de formol

On dose avec NaOH 0,01M

On trace la courbe de dosage **figure 8**

Essai n°2 :

En suite on réalise ce dosage avec deux échantillons différents de surnageant de l'eau de bain

40ml d'eau filtrée avec 30ml de formol

Dosage avec NaOH 0,05M

On trace la courbe de dosage **figure 9, et 10**

3-2-3- Les résultats

On trace la courbe de titrage. Au point équivalent, devenu très net grâce au saut de pH et au changement de couleur de l'indicateur coloré, on détermine la quantité d'acides aminés et de peptides.

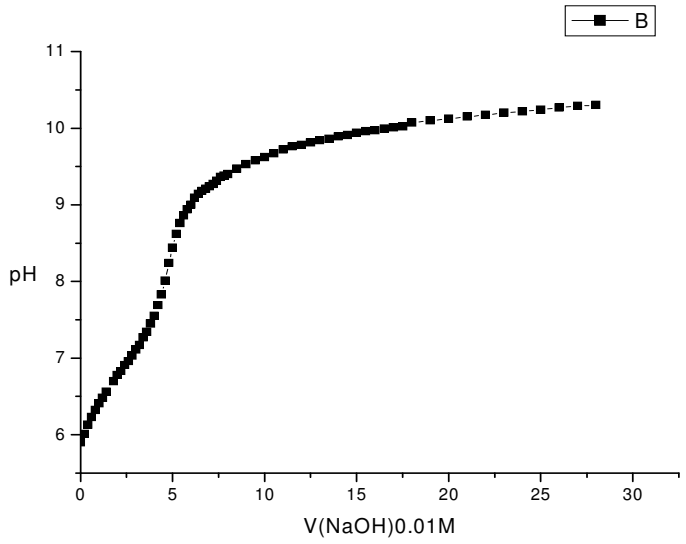


Figure VI-8 : *Dosage de la glycine avec le formol*

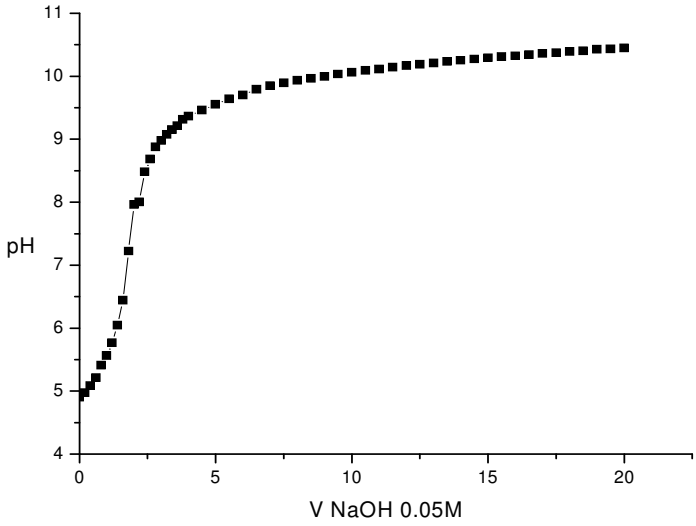


Figure VI-9 : *Dosage de l'eau du bain « Echantillon 1 »*

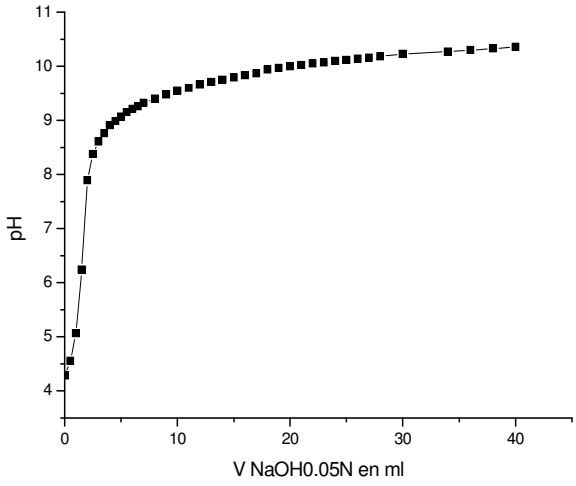


Figure VI-10 : *Dosage de l'eau du bain « Echantillon2 »*

La formule pour le calcul :

Au point équivalent on utilise la formule suivante :

$$C_a V_a = C_b V_b$$

Tableau VI-4 : *Dosage avec le formol : concentrations au point équivalent*

	Volume, et concentration de NaOH	**Concentration au point équivalent**
Solution synthétique de glycine	C_{NaOH}=0,01M 4,7 ml	**1,17 10^{-3} M**
Echantillon du bain n°1	C_{NaOH}=0,05M 1,78 ml	**2,22 10^{-3} M**
Echantillon du bain n°2	C_{NaOH}=0,05M 1,52 ml	**1.90 10^{-3} M**

3-2-4- Conclusion

D'après les résultas obtenu on peut conclure :

- le premier essai, qui est le dosage d'une solution de la glycine (avec une concentration connue), nous confirme l'efficacité de cette méthode pour déterminer la concentration des acides aminés. Au point équivalent, on a eu un très bon résultat (1,17 10^{-3} M) comparant avec la concentration de la solution de glycine qu'on a préparé 1,20 10^{-3} M.
- le deuxième essai, analyse des deux échantillons, nous a donné des résultats proches, malgré que ces échantillons sont différents :

  Le 1er échantillon : 2,22 10^{-3} M

  Le 2eme échantillon : 1,90 10^{-3} M

VI. 3-3- DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE

3-3-1- Introduction

Les acides aminés sont détectables dans le visible après réaction avec la ninhydrine, sauf les acides aminés aromatiques qu'on peut détecter dans le visible mais aussi dans l'ultra violet.

Tous les acides aminés donnent une couleur violette avec la ninhydrine, mais pas avec la même intensité. On peut lire cette coloration à 570nm. La proline est le seul acide aminé qui donne une couleur jaune lisible à 440nm.

Donc on va utiliser cette méthode pour avoir une approximation sur la concentration totale des acides aminés dans le surnageant.

3-3-2- Mode opératoire

La première expérience qu'on a réalisée est la confirmation de λ_{max}. Pour cela on a préparé une série de solutions de la glycine avec différentes concentrations, et on a ajouté une quantité fixe de la ninhydrine pour créer le complexe coloré (violet).

Ensuite, on a tracé d'abord la courbe de λ_{max} , puis la courbe d'étalonnage .

La courbe d'étalonnage, et la courbe de λ_{max} sont représentées respectivement dans **figure 11**, et **figure 12**.

Après ces étapes on a mesuré l'absorbance des échantillons du surnageant, après leur préparation de la même façon que les autres solutions.

Le mode opératoire et les résultats sont détailles dans l'**annexe 3.**

3-3-3- Les résultats

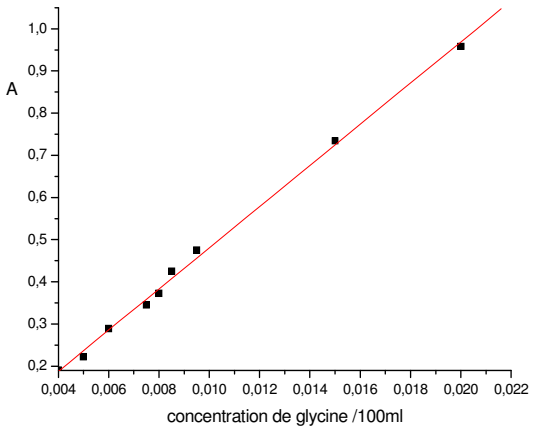


Figure VI-11 : *Courbe d'étalonnage de la glycine*

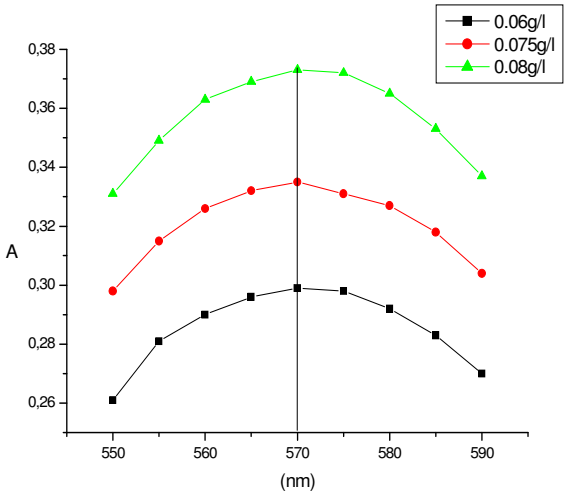


Figure VI-12 : *Courbe de* λ_{max}

Tableau n°5 : *Concentration des acides aminés e t peptides dans le filtrat*

	concentration
Echantillon 1	2,36 10^{-3} M
Echantillon 2	2,79 10^{-3} M

3-3-4 Conclusion

Malgré que cette technique est effectuée avec des échantillons différents, on remarque que les résultats sont très proches.

Même si on compare avec les résultats de dosage avec le formol on remarque que les résultats sont reproductibles.

VI. 3-4- DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE «MÉTHODE DE KJELDHAL »

3-4-1- Introduction

La méthode de Kjeldhal est une méthode d'analyse d'azote total protéique tels que les acides aminés, peptides, protéines,…. Elle ne permet pas le dosage d'azote inorganique (nitrates, nitrites,…).

Cette méthode comporte trois étapes principales :

1- **étape de minéralisation :**

Cette étape consiste à faire une digestion aux composés azotés, à l'aide de l'acide sulfurique concentré et chaud. Il transforme l'azote aminé en sulfate d'ammonium. Le carbone, l'hydrogène et l'oxygène moléculaires sont minéralisés en CO_2, et H_2O.

$$C,H,O\ \} \longrightarrow CO_2,\ H_2O$$

$$N \longrightarrow NH_3 \xrightarrow{H^+} NH_4^+$$

La minéralisation est généralement lente, en particulier pour les échantillons riches en matières organiques. On l'accélère par des catalyseurs. On distingue plusieurs types de catalyseurs ; K_2SO_4, Na_2SO_4, HgO, sels de cuivre,…….**[5]**

Il faut laisser l'échantillon chauffer jusqu'à devenir clair.

2- **distillation de l'ammoniac :**

3- Après refroidissement, on introduit à notre échantillon un excès d'hydroxyde de sodium concentré. L'ammoniac libéré est recueilli dans un excès d'une solution étalon d'acide après distillation.

4- **Dosage de l'ammoniac :**

La solution étalon d'acide est dosée par un titrage en retour par une base étalon.

3-4-2 Mode opératoire

On a réaliser cette méthode pour :

le surnageant avec deux échantillons différents ainsi que pour l'eau brute du bain avant la précipitation des protéines (un seul échantillon).

Matériels et produits utilisés

10ml de surnageant, 20ml de H_2SO_4 concentré, 6g de K_2SO_4, 1g de $CuSO_4$.

Hydroxyde de sodium à 40%.

Solution étalon de H_2SO_4 0.1M, Solution étalon de NaOH 0.2M

Indicateur coloré : méthyle orange

Un montage de distillation **(figure13)** .

La formule pour le calcul :

$$C_{NH_3} = \frac{2(C_{H_2SO_4}.V_{H_2SO_4}) - C_{NaOH}.V_{NaOH}}{V_{NH_3}}$$

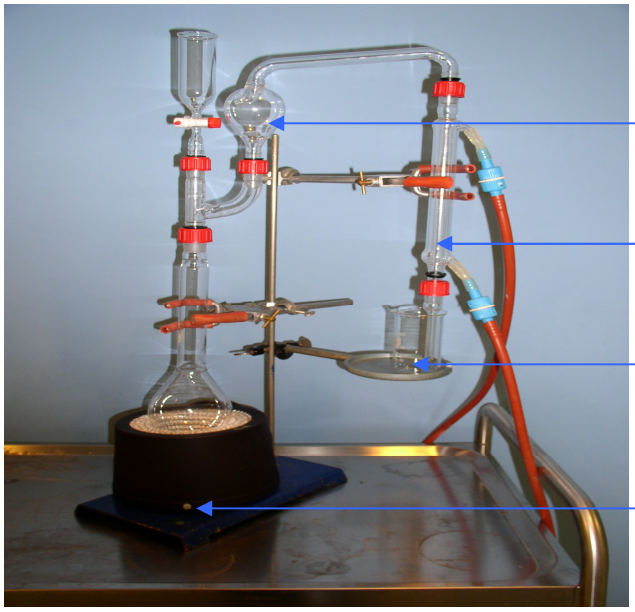


Figure VI-13 : *Montage de distillation de l'ammoniac*

3-4-3- Résultats

Les calculs qu'on a réalisé sont bien détaillés dans l'**annexe 4.**

Tableau VI-6 : *Teneur des différents échantillons en azote.*

Type de l'échantillon	**Concentration en azote (g/l)**
Eau brute de bain d'épilage	**1,96 g/l de N**
Eau brute de bain d'épilage	**4,48 g/l de N**
Surnageant (échantillon 1)	**0,70 g/l de N**
Surnageant (échantillon 1)	**0,84 g/l de N**

3-4-4- Conclusion

- L'eau résiduaire du bain d'épilage est très chargée en produits azotés. La méthode de Kjeldhal nous permet de quantifier ces produits, entre 2 et 4,5 g/l. Cette valeur est raisonnable comparant avec les valeurs bibliographique :

  Entre 3 et 4 g/l **[6]**

  Entre 2 et 4,4 g/l **[7]**

- Après filtration du précipité protéique, le surnagent contient toujours des substances azotés (acides aminés et (ou) peptides) : entre 0,70 et 0,84 g/l

VI. 4- HYDROLYSE ACIDE DU SURNAGEANT

4-1- Introduction

Le but de toute hydrolyse est la libération de tous les acides aminés du substrat (protéines, peptides) et leur récupération future.

On a vu dans les analyses précédentes que notre surnageant ne contient pas seulement des acides aminés, mais aussi des peptides.

Donc pour analyser les acides aminés soit par chromatographie sur couche mince, soit avec n'importe qu'elle méthode, il faut d'abord réaliser une hydrolyse pour transformer les peptides en acides aminés.

Les conditions d'une hydrolyse dépendent directement de la composition de l'échantillon en protéines, ou peptides, ou les deux.

Par exemple pour une hydrolyse complète d'une protéine, il faut utiliser une solution d'HCl 6 M, et un chauffage à reflux pendant 24h ou plus.

Dans notre cas une hydrolyse de 120ml d'eau demande 40ml de HCl 6M, et un chauffage à reflux pendant 2h.

4-2- Mode opératoire

On a réaliser une hydrolyse acide de 120ml de surnageant, utilisant l'HCl (6M), et un chauffage à reflux pendant 2h. On maintient la température à 100°C.

Cette hydrolyse est réalisée à l'aide d'un montage pour le chauffage à reflux.

Remarque :

Après l'hydrolyse on a effectué une adsorption sur charbon actif. Le but de cette filtration est l'élimination des impuretés, et les acides gras.

Le charbon actif n'adsorbe pas les acides aminés.

4-3- Résultat

Une hydrolyse complète du surnageant nécessite 40ml de HCl 6M, et un chauffage à reflux à 100°C pendant 2 heures.

VI. 5- MÉTHODES SÉPARATIVES

VI. 5-1- SÉPARATION SUR RÉSINES ÉCHANGEUSE D'IONS

5-1-1- Introduction

La séparation sur résines échangeuses d'ions est une technique très utilisée dans les laboratoires pour la valorisation commerciale et la purification de certains produits surtout les acides aminés dans le domaine de la production biotechnologique **[8]**.

Cette méthode est couramment utilisée pour la purification des hydrolysats protéiques.

On peut regrouper les acides aminés dans plusieurs types **[9]** :

1- les acides aminés basiques ; Arginine, histidine, lysine
2- les acides aminés dicarboxyliques ; Glutamique, Aspartique
3- les acides aminés neutres ; Glycine, Valine, Proline, Alanine, Hydroxyproline, Isoleucine, Leucine, Cystine, Threonine, Asparginine, glutamine, sérine.
4- les acides aminés aromatiques ; Phenylalanine, Tyrosine, Tryptophane.

Les acides aminés basiques sont adsorbés sur résines cationiques fortes (avec un groupement sodium ou ammonium), si le pH de la solution d'acides aminés est ajusté à un pH neutre ou peu basique. Mais les acides aminés basiques sont adsorbés sur résines cationiques faibles, quand le pH de la solution est ajusté à 4,7.

Stein et Moore utilisent une seule résine cationique forte (Dowex 50W) avec un changement des conditions d'élution, pour la séparation des acides aminés.

Winters et Kunin, utilisent trois résines sur cinq colonnes et différentes conditions d'élution, pour la séparation des acides aminés d'un hydrolysat dans leurs trois formes (acide, neutre, et basique) et aussi trois acides aminés individuels (histidine, arginine, et lysine).

L'utilisation des résines cationiques faibles est plus commode dans la séparation des acides aminés, leur avantage est le pouvoir tampon élevé comparé à celui des résines cationiques fortes.

5-1-2- Mode opératoire

- On utilise la séparation sur résines cationiques faibles et aussi sur résines anioniques faibles pour séparer les acides aminés de notre hydrolysat (**figure 14**).

- Avant d'effectuer la séparation on a régénéré les résines :
  - les résines cationiques sont régénérées à l'aide d'une solution d'HCl 5%

- les résines anioniques sont régénérées à l'aide d'une solution de NaOH 5%

On termine l'opération avec un rinçage à l'eau distillée.

- Après chaque récupération de notre échantillon on a recours à deux méthodes pour vérifier la présence d'acides aminés :

1- analyse à la ninhydrine (dans un tube à essais)

2- ou bien mettre une goutte d'échantillon sur un papier whatman, on sèche et on applique la solution de ninhydrine. S'il y a présence d'acides aminés une couleur violette apparaît.

Matériels et produits utilisés

Résines cationiques et anioniques faibles de type AMBERLITE

Solution tampon d'acétate (pH = 4,7)

Colonne de séparation avec un diamètre 1cm

Un pH mètre pour vérifier à chaque fois le pH du milieu.

On a utilisé le tableau qui présente la charge apparente des acides aminés en fonction du pH **Annexe 5 [10]**.

***les étapes de l'expérience :**

1- On fait passer l'hydrolysat sur une résine anionique pour éliminer l'excès de HCl ; la résine anionique adsorbe le Cl^- et rejette un OH^-. Donc la solution sort à la fin avec un pH un peu élevé.

2- Ajuster le pH de notre échantillon à 5,5-6 en utilisant quelques goutes de solution tampon.

3- On fait couler notre échantillon à travers des résines anioniques. Normalement seulement les acides aminés positifs sont retenus par les résines ; car à pH 5-6, seulement les acides aminés acides ont une charge négative. Les acides aminés neutres sont avec une charge nulle tandis que les acides aminés négatifs comprennent une charge globale positive.

4- Pour récupérer les acides aminés positifs retenus par les résines anioniques on applique une régénération, ou une élution avec une solution de NaOH 0,1M, et pour vérifier la présence des acides aminés on fait une analyse avec la ninhydrine

5- On ajuste le pH de la solution à pH 4,7

6- On fait passer cette solution sur résines cationiques ; car à pH 4,7 les acides aminés négatifs ont une charge globale positive.

7- Pour récupérer les acides aminés retenus sur résines cationiques on applique une élution avec HCl 0.1M.

5-1-3- Les résultats

On peut représenter les résultats dans le tableau suivant :

Tableau VI-7 : *Résultats de la séparation sur résines échangeuses d'ions***.**

	Analyse n°1	Analyse n°2
Acides aminés neutres et basiques	+	+
Acides aminés acides	-	-
Acides aminés basiques	-	-

5-1-3- Conclusion

Donc on peut conclure que notre échantillon ne contient pas d'acides aminés acides, ni d'acides aminés basiques. Tous les acides aminés libres du surnageant (ou filtrat), après hydrolyse, sont donc neutres. L'analyse chromatographique va-t-elle le confirmer ?

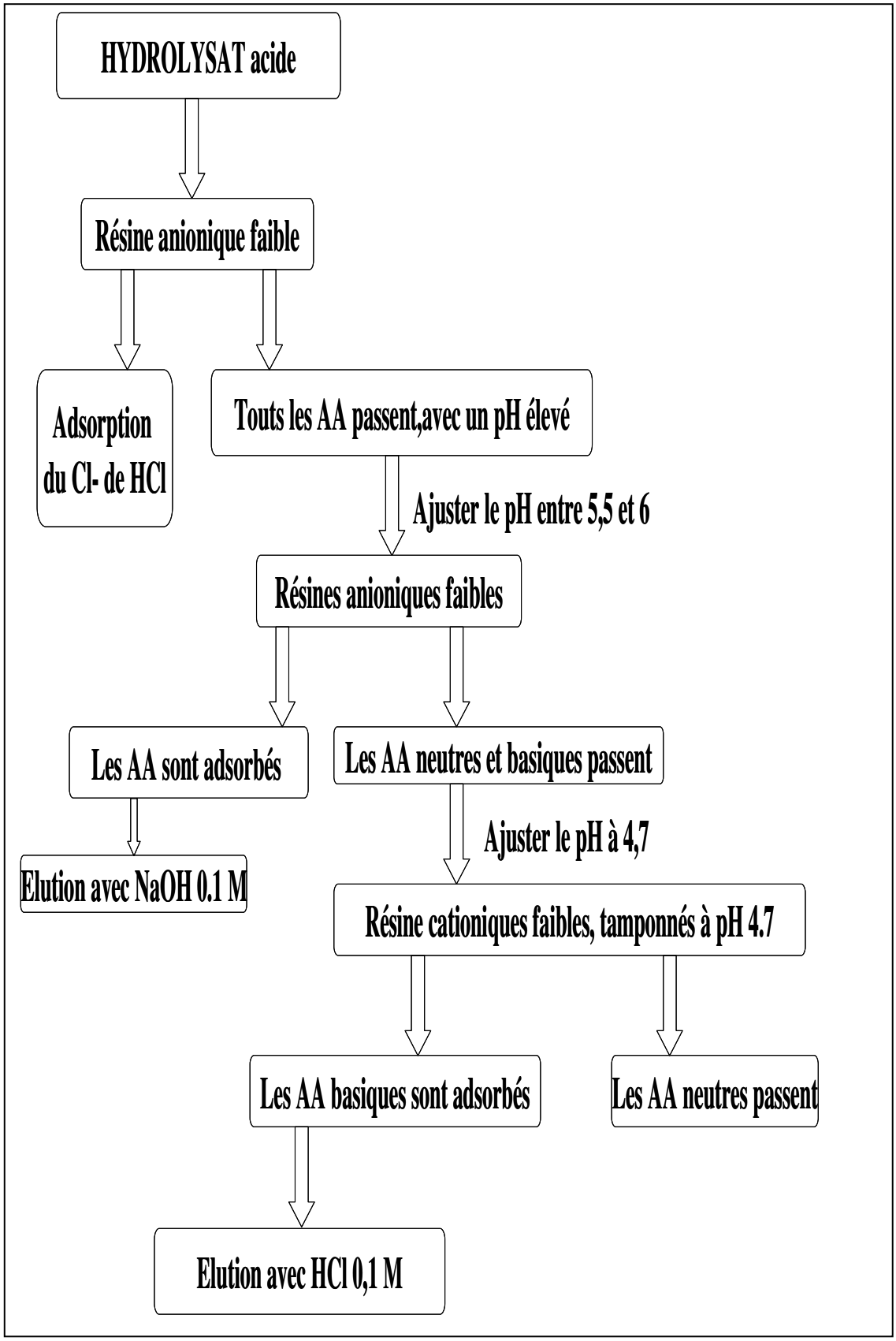


Figure VI-14 : *Organigramme de la séparation des acides aminés de l'hydrolysat sur résines échangeuses d'ions*

VI. 5-2- SÉPARATION PAR ÉLECTROPHORÈSE

5-2-1-Inroduction

L'électrophorèse est une technique d'analyse dont le principe est basé sur la séparation des molécules selon leur charge globale.

La charge globale des acides aminés est liée directement au pH du milieu. Alors on change le pH pour séparer ces substances.

A pH 4,7 touts les acides aminés possèdent une charge neutre, sauf :

* l'acide aspartique et glutamique qui possèdent une charge négative (voir **annexe 6**).

* la lysine, l'histidine, et l'arginine qui possèdent une charge positive (voir **annexe 6**).

Alors il suffit d'ajuster le pH de notre échantillon à 4,7 et voir les types d'acides aminés qu'on a lors de l'électrophorèse.

5-2-2- Mode opératoire

Préparer des bandelettes de papier whatman avec une longueur de 20cm et une largeur de 2cm.

On trace avec un crayon graphite le milieu de la bandelette, et on marque un point où nous allons poser notre échantillon.

L'électrophorèse sera réalisée dans un tampon (pH = 4,7).

À l'aide de pipettes capillaires, déposer le mélange à analyser ;

Placer la bande de papier sur le chevalet porte bande en la tendant modérément et en prenant garde de ne pas la déchirer. On réalisera une tache de faible diamètre en tenant la pipette bien verticalement.

Verser le tampon dans la cuve à électrophorèse (100 mL par compartiment).

Placer les chevalets porte bande dans la cuve contenant le tampon. Laisser monter le tampon par capillarité.

Appliquer une différence de potentiel de 200 à 250 V et un courant de 10mA

Le temps de la manipulation se situe entre 30 et 45 mn.

Sécher la bandelette.

Pulvériser la solution de ninhydrine sur la bande. Porter à l'étuve à 100 °C pendant 15 min au plus.

On arrête l'action du chauffage quand la coloration violette est bien nette.

5-2-3- Les résultats

Après une analyse avec l'électrophorèse, on a obtenu une seule tache dense et étalée au milieu de la bande. Donc tous les acides aminés de notre échantillon ont des pH isoélectriques voisins.

5-2-4- Conclusion

Les résultats de cette technique sont en accord avec ceux obtenus à partir des résines échangeuses d'ions.

Cet essai confirme que les acides aminés de notre échantillon sont neutres.

VI. 5-3- SÉPARATION PAR LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

5-3-1- Introduction

La séparation d'un mélange d'acides aminés par chromatographie sur couche mince est nécessaire. Elle peut nous révéler des informations sur le nombre et le type d'acides aminés qu'on a dans notre échantillon, par simple comparaison des R_f des taches réelles et celles des AA synthétiques.

R_f = distance parcourue par une molécule / distance parcourue par le front du solvant

L'éluant progresse à travers la phase stationnaire par capillarité. Donc les différents AA migrent à des vitesses différentes après un partage entre les deux phases.

On utilise deux méthodes de détection :

1-la détection avec la lampe UV

2-la détection avec la vaporisation de la ninhydrine.

5-3-2- Mode opératoire

On a utilisé deux types de plaques :

1-Des plaques CCM 20 cm×20 cm en gel de silice avec une épaisseur de 0.2mm, et un support d'aluminium.

2-Des plaques CCE 20 cm×20 cm en gel de silice

On a préparé une série de solutions synthétiques d'acides aminés avec une concentration de 0.1%. Ensuite en note la valeur de R_f spécifique pour chaque acide aminé (comme référence).

La séparation des acides aminés (libres ou synthétique) est réalisée avec l'utilisation de deux solvants. Le premier solvant est un mélange de 1-propanol, NH_3 pur (7,3, v/v) **[11]**. Le deuxième solvant est le mélange de n-butanol, acide acétique, eau (70, 18,12, v/v/v).

On a effectué cette technique en deux étapes, la première concerne l'eau du surnageant avant hydrolyse acide, et la deuxième étape concerne l'eau du surnageant hydrolysée. Pour voir qu'elles sont les acides aminés libres.

5-3-3- Les résultats

Etape n°1 : Application de la technique pour le surnageant avant hydrolyse :

Tableau VI-8 : *Valeurs de R_f de quelques acides aminés à partir des solutions standard utilisant le solvant (1)*

Acide aminé	glycine	valine	leucine	proline	aspartique	alanine	serine	cystine
R_{f1}	**0,23**	**0,39**	**0,46**	**0,2**	**0,15**	**0,29**	**0,27**	**0,26**

Tabl eau VI-9 : *Valeurs de R_f de quelques acides aminés à partir des solutions standards utilisant le solvant (2)*

Acide aminé	glycine	valine	leucine	proline	aspartique	alanine	serine	cystine
R_{f2}	**0,21**	**0,41**	**0,48**	**0,19**	**0,19**	**0,3**	**0,25**	**0,29**

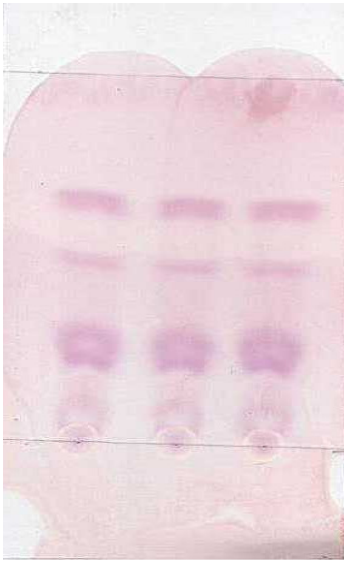


Figure 15 : *Plaque CCM après révélation avec la ninhydrine et avec l'utilisation du premier solvant : propanol1, NH_3 pur (7,3, v/v).*

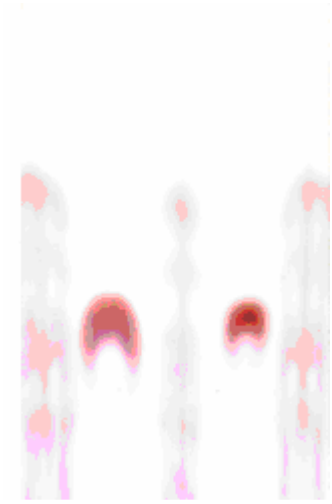


Figure n°16 : *Plaque CCM après révélation avec la ninhydrine et avec l'utilisation du deuxième solvant : n-butanol, acide acétique, eau (70, 18,12, v/v/v).,*

Discuss

Les plaques montrent la présence d'au moins cinq taches correspondant à cinq acides aminés et peptides. La résolution est moyenne (elle n'est pas de très bonne qualité).

Tableau VI-10 : *les valeurs des R_f pour les cinq taches sur la plaque.*

N° de tache	1	2	3	4	5
R_{f1}	0,18	0,22	0,32	0,4	0,46
R_{f2}	0,1	0,2	0,27	0,36	0,44

R_{f1} : élution avec le solvant n°1

R_{f2} : élution avec le solvant n°2

- Si on compare les R_f de notre échantillon et les R_f des acides aminés standard on peut déduire :

  Tache n° 1 ne correspond à aucun R_f, on suppose que c'est un peptide

  Tache n° 2 c'est la glycine

  Tache n° 3 ne correspond à aucun R_f, on suppose que c'est un peptide

  Tache n° 4 c'est la valine

  Tache n° 5 c'est la leucine

Etape n°2

Application de la technique pour le surnageant avant hydrolyse utilisant les plaques CCM:

On a trouvé que la séparation avec des plaques CCE donne de très bon résultat avec le solvant n° 1, et une mauvaise résolution avec le solvant n° 2.

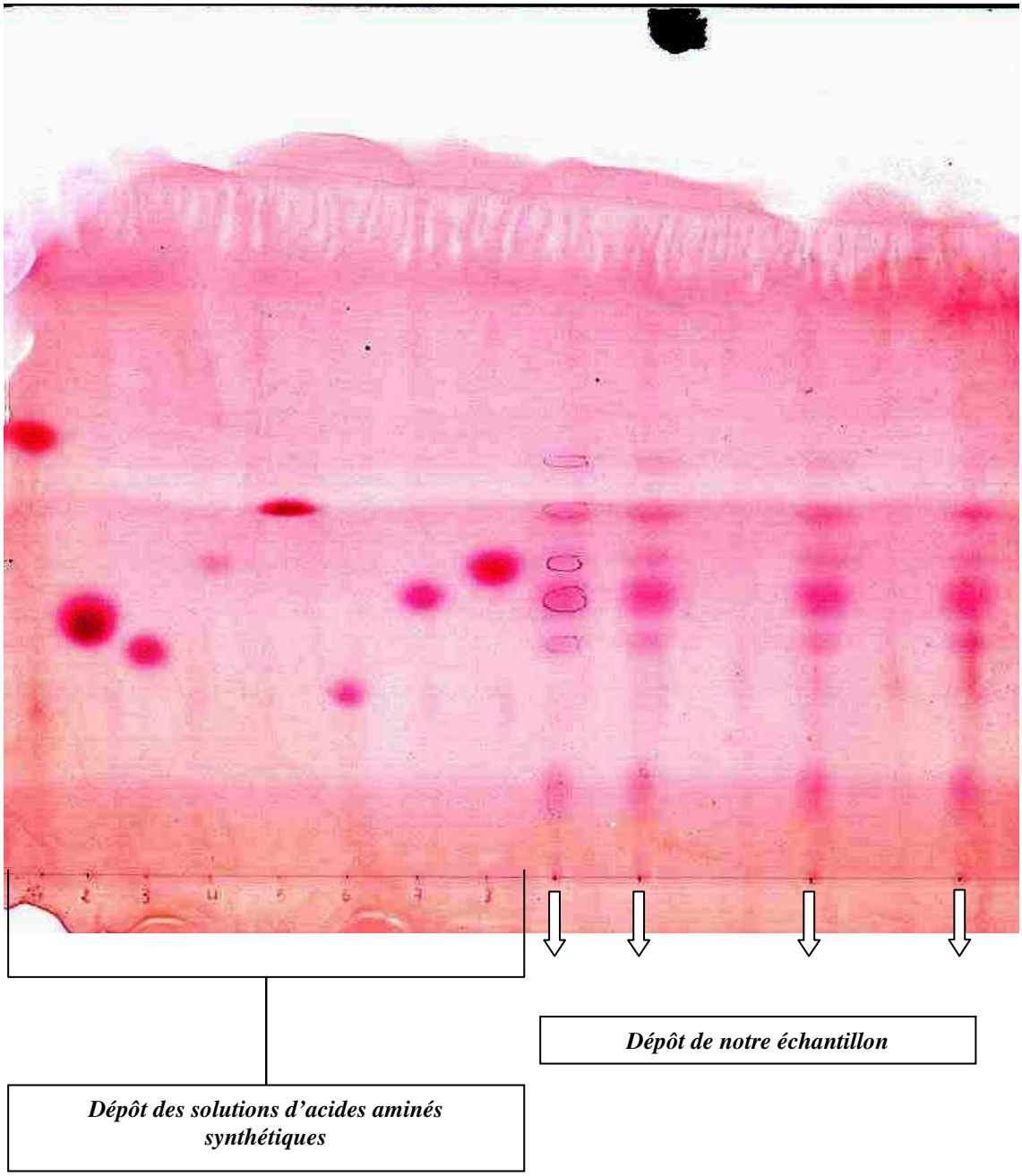


Figure VI-17 *: Plaque CCE après révélation avec la ninhydrine et avec l'utilisation du premier solvant : propanol1, NH_3 pur (7,3, v/v).*

Tableau VI-11 : *Valeurs de R_f de quelques acides aminés à partir des solutions standard utilisant le solvant (1)*

Acide aminé	glycine	valine	leucine	proline	aspartique	alanine	serine	cystéine
R_{f1}	**0,35**	**0,52**	**0,61**	**0,30**	**0,25**	**0,45**	**0,4**	**0,43**

Tableau VI-12 : Valeurs des R_f pour les taches sur la plaque

N° de tache	1	2	3	4	5	6	7
R_{f1}	0,146	0,29	0,35	0,42	0,46	0,54	0,61

*Si on compare les R_f de notre échantillon et les R_f des acides aminés standard :

Tache n° 1 : elle ne correspend à aucun R_f des solutions synthétiques.

Tache n° 2 : c'est la proline

Tache n° 3 : c'est la glycine

Tache n° 4 : c'est la cystéine

Tache n° 5 : c'est l'alanine

Tache n° 6 : c'est la valine

Tache n° 7 : c'est la leucine

Analyse avec la lampe UV :

Il n'y a aucune tache détectable avec la lampe UV. Notre échantillon ne contient donc pas d'acides aminés aromatiques. Nous rappelons qu'à l'origine nous avons entamé cette recherche pour identifier, séparer et valoriser le tryptophane (AA aromatique). Nous espérions que l'alcalinité du bain d'épilage hydrolyserait les protéines de la peau et détruirait tous les acides aminés, excepté le tryptophane qui garde son intégrité. Ces essais ont donc montré que ce milieu alcalin n'a pas la force suffisante pour hydrolyser les protéines de la peau et détruire les AA non aromatiques.

5-3-4- Conclusion

Donc les résultats de l'étape 1, et 2 sont complémentaires.

Parmi les sept acides aminés, on a pu identifier six acides aminés **(figure18)**:

la proline, la glycine, la cystéine, l'alanine, la valine, la leucine

VI. 6- ETUDE SUR LES ACIDES AMINÉS IDENTIFIES

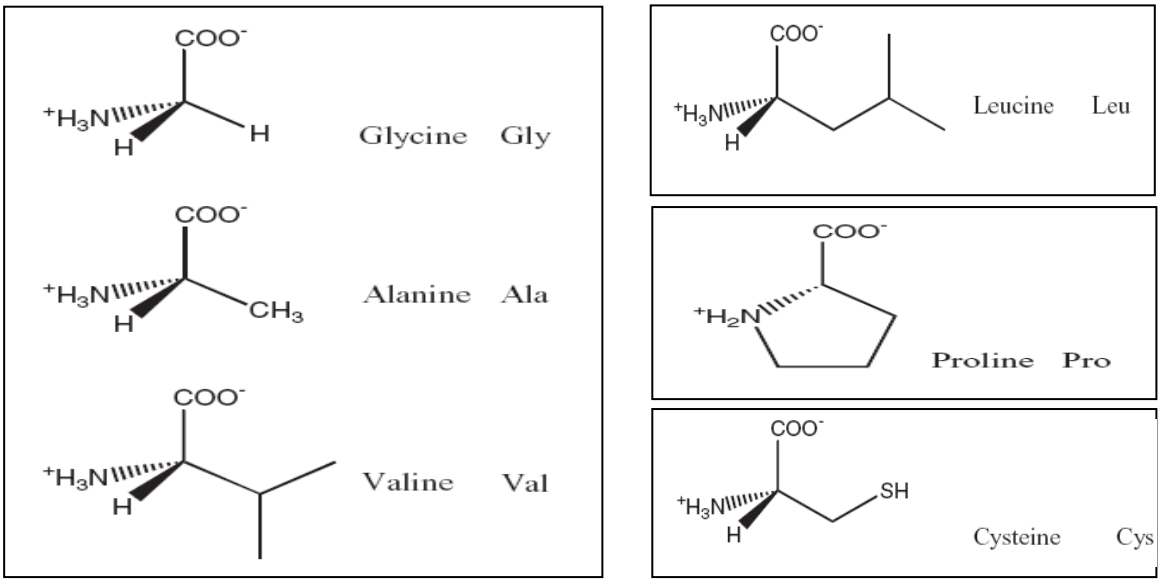


Figure VI-18 : *Formules des acides aminés identifiés*

6-1- Quelques propriétés de ces acides aminés

Tableau VI-13 : *Valeurs de pK de groupes ionisables, pH_i, et la fréquence des acides aminés [3].*

Acide aminé	pK_1	pK_2	pK_R	pH_i	Fréquence moyenne dans les protéines (%)
Glycine	2,35	9.78		6,06	6,80
Alanine	2,35	9.87		6,11	7,60
Valine	2,29	9.74		6,01	6,60
Leucine	2,33	9.74		6,03	9,50
Proline	1,95	10.64		6,29	5,00
cystéine	1,92	10.70	8,37	5,14	1,60

6-2- Diagrammes de répartition des espèces

Les diagrammes de répartition des espèces sont très importants, car ils peuvent nous aidé à trouver la méthode convenable pour les séparer.

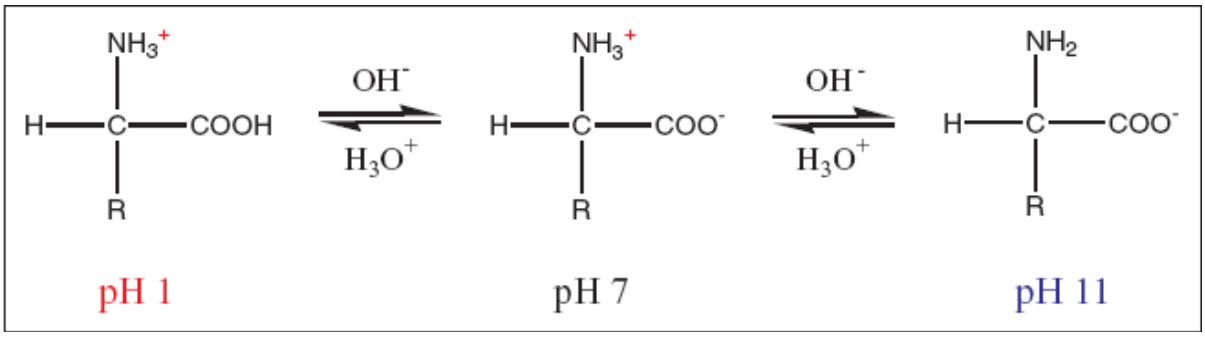


Figure VI-19 : *Formules des acides aminés identifiés*

$|AA|_t = |AA^+| + |AA^-| + |AA^{+-}| + \ldots$

Cette formule dépend de la nature d'acide aminé, nombre de pKa.

Dans le cas d'un acide aminé a deux pka :

$Ka_1 = |\mathbf{AA^{+-}}| . |H^+| \ / \ |\mathbf{AA^+}|$; $Ka_2 = |\mathbf{AA^-}| . |H^+| \ / \ |\mathbf{AA^{+-}}|$

$|\mathbf{AA^+}| \ \% = 100 / [1 + K_1 / |H^+| + K_1 . K_2 / |H^+|^2]$

$|\mathbf{AA^{+-}}| \ \% = 100 / [1 + |H^+| / K_1 + K_2 / |H^+|]$

$|\mathbf{AA^-}| \ \% = 100 / [1 + |H^+|^2 / K_1 . K_2 + |H^+| / K_2]$

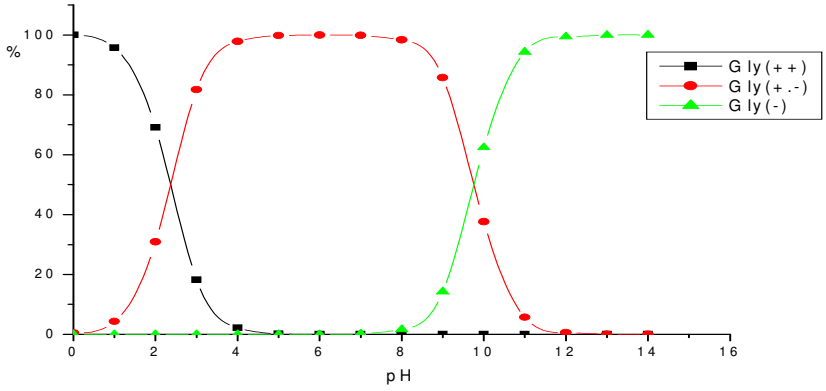


Figure VI-20 : *Diagramme de répartition des espèces de la glycine*

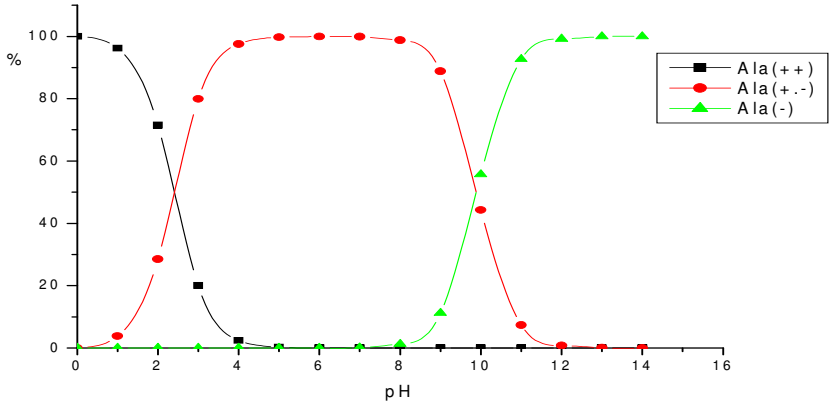


Figure VI-21 : *Diagramme de répartition des espèces de l'alanine*

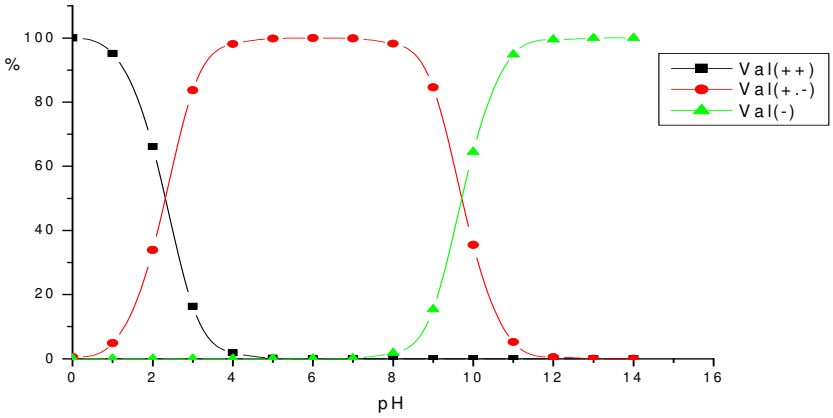


Figure VI-22 : *Diagramme de répartition des espèces de la valine*

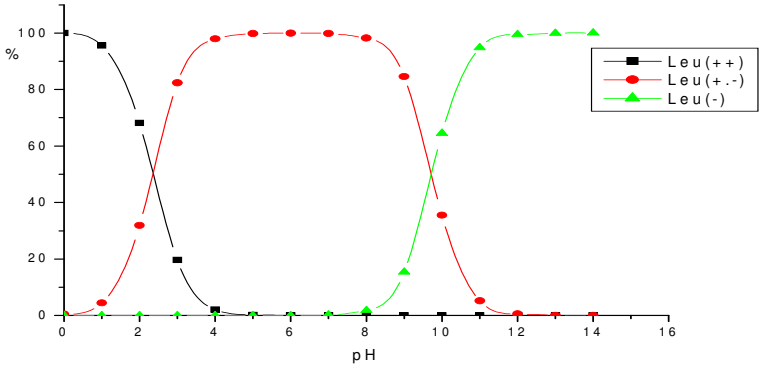


Figure VI-23 : *Diagramme de répartition des espèces de la leucine*

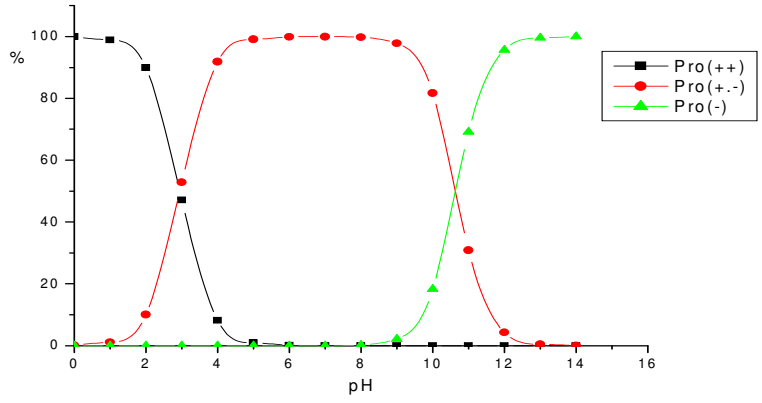


Figure VI-24 : *Diagramme de répartition des espèces de la proline*

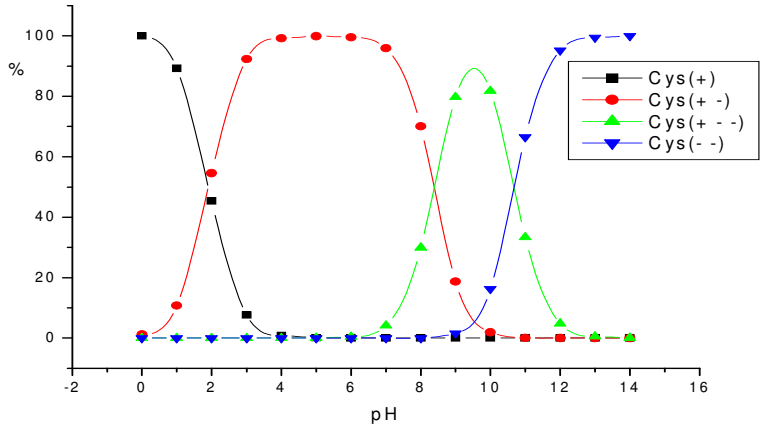


Figure VI-25 : *Diagramme de répartition des espèces de la cytséine*

6-3- Comparaison des résultats avec la bibliographie

Dans un pelain les protéines qu'on peut trouver en grand pourcentage sont les protéines fibreuses ; tels que le collagène la kératine et l'élastine. L'élastine est insolubles sous les conditions opératoires (alcaline) de l'étape d'épilage **[12]**. Donc elle est éliminée au cours de la filtration de surnageant.

Pour comparer notre résultat avec la biblio on rappelle la composition des protéines fibreuses en acides aminés :

Le collagène : la glycine (30 %), l'alanine (11 %), la proline (12 %), l'hydroxyproline (9 %)

La kératine : la cystéine, la cystine, elle contient aussi la majorité des acides aminés communs.

Tableau VI-14 : *Fréquence de quelques acides aminés dans les deux protéines fibreuses (collagène et kératine)* **[13]**

Acides aminés	**Fréquence dans :**	
	collagène	**kératine**
Glycine	+ + + +	+
Alanine	+ + +	+
Valine	+	+
Leucine	+	+
Proline	+ + +	+
Hydroxyproline	+ +	-
phénylalanine	+	+
Isoleucine	+	+
Serine	+	+ +
Cystéine	-	+ + +
Lysine	+	+
Hudroxylysine	+	+
tryptophane	-	+

G. Simon, et L. Hanak, utilisent l'échange d'ions pour la séparation de : la proline, la valine, phenilalanine, et la leucine, à partir des eaux résiduaires de la tannerie **[14]**.

6-4- Séparation pratique des acides aminés trouvés

Pour séparer les acides aminés et les valorisé par la suite, il faut opérer avec des méthodes séparatives propres.

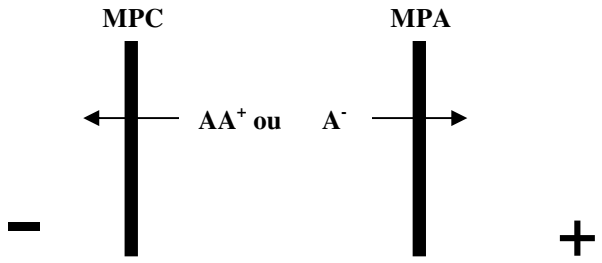
Comme première étape, on va utiliser les diagrammes de répartition des espèces en fonction du pH, pour montrer la possibilité de séparer ces acides aminés (gly, ala, leu, val, pro, cys).

Ces acides aminés se comportent comme un cation en milieu acide, comme un anion en milieu basique. Par compensation interne, la molécule n'est pas chargée lorsque le pH est proche du point isoélectrique.

Sur le diagramme de répartition, on peu voir facilement que le pH ou la molécule est neutre n'est pas limité à cette valeur particulière.

La première méthode qu'on peut proposer pour séparer un mélange d'acides aminés est l'électrodialyse. En milieu basique, les ions (AA^-) traversent des membranes perméables aux

anions, et en milieu acide les ions (AA^+) pourront traverser des membranes perméables aux cations **(figures 26)**.



MPC : membranes perméables aux cations
MPA : membranes perméables aux anions

Figures VI-26 : *Schéma du principe de l'électrodialyse*

Malheureusement, la plupart des acides aminés qu'on a, ont des diagrammes de répartition des espèces similaire.

Si on opère à 8 < pH < 10 :

La cystéine est sous forme basique à environ 80 %, par contre les autres acides aminés sont sous forme basique avec un pourcentage très bas, et sous forme neutre environ 84 à 97 %.

Donc on peut utiliser des membranes anioniques pour séparer la cystéine.

Si on opère à 2 < pH < 4 :

La proline est 50% acide, 50% neutre, les autres acides aminés sont neutres à plus de 80%. Donc on peut effectuer la séparation de la proline utilisant des membranes perméables aux cations.

Les autres acides aminés qui restent, ne peuvent êtres séparés par simple variation de pH.

On peu utiliser la séparation par chromatographie par échange d'ions. Cette méthode a été pratiquée depuis très longtemps. Car son principe n'es pas basé seulement sur la charge de la molécule. Le phénomène est plus complexe, l'affinité de la molécule envers la résine, joue un grand rôle et définit les conditions opératoires.

En chimie préparative, le couplage électrodialyse puis chromatographie par échange d'ions peut même être envisagé **[15]**.

On peut aussi se baser sur la taille des acides aminés pour les séparés, utilisant les techniques membranaires, comme la nanofiltration et l'ultrafiltration.

6-5- Conclusion

La chromatographie sur couche mince nous a permis d'identifier les acides aminés libres, pour l'échantillon avant hydrolyse :

La glycine, la valine, la leucine.

Et pour l'échantillon après hydrolyse on a le mélange d'acides aminés suivant :

la proline, la glycine, la cystéine, l'alanine, la valine, la leucine.

On a présenté quelques propriétés de ces acides aminés pour nous aider à trouver la méthode convenable pour les séparés.

Pour les séparés et les valoriser par la suite il faut utiliser des techniques de séparation propres. Donc on a proposé les techniques suivantes :

1- l'électrodialyse
2- résines échangeuses d'ions
3- couplage des deux méthodes précédentes
4- techniques membranaires (nanofilration, et ultrafiltration,…)

VI. 7- CONCLUSION

On peut résumer les résultats de notre travaille dans les points suivants :

- La diminution de pH du bain utilisant le CO_2 nous permet d'éliminer les différents polluants de l'eau, sans introduire de nouvelles espèces. Donc il est possible de faire un recyclage de l'eau du bain.
- Notre surnagent contient un mélange d'acides aminés et peptides.
- Les différentes analyses quantitatives sont approximatives, la quantité d'acides aminés et peptides dans notre échantillon est d'environ 10^{-3}M.
- Pour faire une analyse des acides aminés seulement dans notre échantillon on a fait une hydrolyse acide, afin de libérer tous les acides aminés.
- L'échange d'ions est une technique très fiable pour la séparation et la purification des acides aminés d'un hydrolysat.
- A travers la chromatographie sur couche mince on a pu identifier :
  1- les acides aminés libres sont : la glycine, la valine, la leucine.
  2- on a pu identifier six acides aminés après hydrolyse, la proline, la glycine, la cystéine, l'alanine, la valine, la leucine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] R. Mostephaoui, thèse de magister, en chimie de l'eau, université de Batna. (1998).

[2] D.Voet. J.G. Voet. « Biochimie » 2eme édition. Traduction par G. Rousseau et L. Domenjoud. Bruxelles DeBoeck.(2005).

[3] Hark R.R ; Hauze D.B. ; Petrovskaia O. ; Joulié M.M.Canadian journal of chemistry, « Synthetic studies of novel ninhydrin analogs », vol 79, n°11, (2001), pp.1632-1654.

[4] J.HOWARD BROWN, The formol titration of bacteriological media, from he department of animal pathology of the Rockefeller institute for medical research ,princeton, new jersey.

[5] CI. Audigié, J. Figarella, F. Zonszain. Manipulations d'analyse biochimique. DOIN ÉDITEUR- PARIS. (1978).

[6] Les eaux résiduaires de tanneries ; Techniques d'épuration et prévention de la polluion, (Application de certaines techniques à la tannerie de DJELFA), centre technique du cuire , Lyon (1980).

[7] M. Aloy. et B. Vulliermet. « Essais industriels d'ultrafiltration de bains résiduaires d'épilage chaux- sulfure en tannerie ». Technicuir, février (1980).

[8] F. J. DECHOW, "Separation and purification techniques in biotechnology". Noyes publications, New Jersey, U.S.A, 1989, pp.269-275

[9] T. Mckee. J.R. Mckee. « Biochemistry an inroduction ». McGrawHill.1999.pp. 80-85.

[10] P.Chambault, « Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur evaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse ». Thèse de doctorat. Université d'ORLÉANS. (2000).

[11] M.Chovanne, G.J.Beaudoin, J.Armand, E.Flamand. « Chimie organique expérimentale ». MODULO EDITEUR (1986).

[12] I.Kadasli. T. Oimez . O.Tunay. « Nitrogen removal from tannery wastwater by protein recovery. J. Water science and technology vol 48 N°1. (2003).pp 215-223..

[13] Memento du technicien du cuir, 2e édition revue et augmentée, Basf Akiengesellschaf D- 6700 Ludwigshafen, pp. 19-27.

[14] G. Simon, L. Hanak, T. Szanya, G. Marton, « Ion-exchange parametric pumping : a cleaner separation methode for producing amino acids from waste of the leather industry ». J. cleaner production 6(1998) 329-334.

[15] J.Y.Gal. « Eude analytique des réactions chimiques dans l'eau. Lavoisier, (1989).pp.441.

Septième
CHAPITRE :

IMPORTANCE ET UTILISATION DES ACIDES AMINÉS

IV.1- INTRODUCTION

Plus que 700 acides aminés ont été découverts dans la nature et la plupart sont des α-acides aminés **[1]**.

Les acides aminés s'assemblent pour former une chaîne peptidique ou une protéine. Ils peuvent également se trouver à l'état libre.

Les protéines, les peptides et les acides aminés jouent un grand rôle dans la vie des organismes. Ils assurent une grande partie du maintien de la vie, d'où de nombreuses études à leur sujet **[2]**.

Certaines carences peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la santé d'autant plus que l'organisme ne les synthétise pas tous **[3]**.

Les acides aminés sont indispensables pour la synthèse des protéines constitutives de la matière vivante. Parmi les 20 acides aminés certains sont dits essentiels, car ces acides aminés ne peuvent pas être fabriqués par l'organisme, et doivent donc être apportés par l'alimentation (Leu, Ile, Met, Lys, Phe, Thr, Trp, Val). Les autres sont dits non essentiels (Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Pro, Tyr, Ser).

Dans ce chapitre, et pour mettre ces molécules et leur valorisation en valeur, on va présenter quelques fonctions des acides aminés, et aussi leur utilisation dans l'industrie, en particulier l'industrie pharmaceutiques.

VII. 2- QUELQUES FONCTIONS DES ACIDES AMINÉS PROTÉIQUES

Les acides aminés protéiques ont plusieurs importantes fonctions. Ils peuvent être des agents de structure des muscles, mais aussi transmetteurs des chromosomes, et des récepteurs de certaines hormones.

La glycine :

- pour certaines valeurs elle est considérée comme une source de créatine. Cette dernière est essentielle pour le fonctionnement des muscles, la rupture du glycogène et libération de l'énergie.
- la glycine possède un rôle dans l'inhibition de la transmission de l'influx nerveux du système neveux central et est utilisée pour la biosynthèse des porphyrines constituant le groupe hème de l'hémoglobine **[2]**.
- construire le système immunitaire, production de l'immunoglobuline et les anticorps.

La proline :

- elle est extrêmement importante pour le bon fonctionnement des articulations, et les tendons, ainsi que pour des bons muscles du coeur.
- c'est le constituant majeur du collagène.
- promouvoir la construction du système immunitaire.

La leucine :

- promouvoir la guérison de la peau.
- abaisser la croissance du niveau de sucre dans le sang.

La valine :

- utiliser dans le traitement des carences sévères d'acides aminés.
-importante pour la croissance optimale des nourrissons et enfants.

L'alanine

-métaboliser les sucres, et les acides organiques.
-construire le système immunitaire, et produire les anticorps.

VII. 3-APPLICATIONS DES ACIDES AMINÉS

Depuis l'année 1900 on trouve beaucoup d'exemples sur la découverte et l'isolation des acides aminés à partir des sources naturelles **[1]**.

A cause de la grande importance biochimique et biologique des acides aminés, ils ont beaucoup d'applications dans divers domaines et industries.

Parmi ces industries, on cite l'industrie pharmaceutique, les intermédiaires de synthèse pharmaceutique, produits alimentaires, la nourriture des animaux, et l'industrie cosmétique…etc.

Ils peuvent être aussi utilisés pour la synthèse de nouveaux matériels **[4]**.

Ces derniers temps, la demande en acides aminés dans le marché est devenue de plus en plus importante. Ce qui explique le grand nombre de fabricants de ces substances.

Kyowa Hakko et Ajinomoto, sont les deux leaders mondiaux en matière de fabrication d'acides aminés pour l'industrie pharmaceutique, alimentaire, et cosmétique,…etc **[4]**.

La plupart des fabricants des acides aminés utilisent la fermentation bactérienne pour la production des acides aminés.

La valorisation des acides aminés à partir d'un hydrolysat protéique est limitée, car le rendement de chaque acide aminé est proportionnel à sa présence dans la protéine originale

[5]. Malgré ça, l'hydrolysat protéique est toujours utilisé comme matière brute pour la production commerciale de divers acides aminés.

Bretagne chimie fine, valorise plusieurs acides aminés (cystine, cystéine, tyrosine) à partir des plumes sortant des abattoirs, par hydrolyse acide. Aujourd'hui, Bretagne chimie fine couvre 10% du marché mondial des productions d'acides aminés. Par exemple, cette société a pu pénétré le marché japonais de la cosmétique, de la pharmacie et de l'alimentation infantile.

La valorisation des matières azotées (protéines, acides aminés, peptides) à partir des eaux résiduaires gagne une grande importance dans ces dernières années **[6]**.

VII. 3-1- QUELQUES EXEMPLES SUR LES APPLICATIONS DES ACIDES AMINÉS

La Glycine :

-il est efficace pour l'hyperacidité, donc il est utilisé dans les agents gastriques antiacides.

La Proline :

-il est utilisé pour la production de plusieurs produits pharmaceutiques telle que les agents hypertensifs.

La Cystéine :

-Détoxique beaucoup de produits chimiques nocifs.

-utilisé dans la production des antioxydants très importants tel que le Glutathion.

-précurseur d'arome.

-la fabrication carbocistéine, un fluidifiant bronchique utilisé en pharmacie.

La Valine :

-il est utilisé (avec l'isoleucine, et la leucine) pour la nutrition sportif, et l'alimentation médicale.

La Leucine :

-utilisé dans la production du parfum et les pastilles lubrifiantes.

-c'est un composé très important dans l'alimentation sportifs, et l'alimentation médicale, car la leucine augmente l'énergie et améliore l'endurance et la récupération des muscles.

L'Hydroxyproline :

-est l'un des acides aminés que l'on utilise comme intermédiaire de synthèse pour les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les médicaments anti-infectieux, mais aussi comme matière première pour les nutricosmétiques.

VII. 4-CONCLUSION

Ce chapitre nous permet de mettre en évidence la grande importance des acides aminés dans diverses industries telles que l'industrie pharmaceutique, les intermédiaires de synthèse pharmaceutique, produits alimentaires, et l'industrie cosmétique…etc.

L'augmentation de la demande en acides aminés par ces industries explique la croissance des sociétés qui fabriquent ces substances (Kyowa Hakko , Ajinomoto et Bretagne chimie fine…etc).

Ces dernières années les eaux résiduaires des différentes industries son très utilisés pour la valorisation des protéines et des acides aminés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] G.C. Barrett, D. T. Elmore. Amino acids and peptides. Cambridge University Press.(2004).

[2] P.Chambault, « Analyse d'acides aminés non dérivés par chromatographie en phase liquide avec le détecteur evaporatif à diffusion de la lumière et couplage avec la spectrométrie de masse ». Thèse de doctorat. Université d'ORLÉANS. (2000).

[3] L. Stryer, « Biochemistry », 3e édition, W. H Freeman and company, New York, (1998), p.15.

[4] W. He, G. Li, L. Kong, H. Wang, J. Huang, J. Xe.Application of hydrothermal eaction in resource recovery of organic wastes. J. Resources conservation and recycling. 52 (2008) 691-699.

[5] F. J. Dechow. Separation and purification techniques in biotechnology. Noyes Publications. Park Ridge, New Jersey, U.S.A.(1989).

[6] I.Kadasli. T. Oimez . O.Tunay. « Nitrogen removal from tannery wastwater by protein recovery. J. Waer science and technology vol 48 N°1. (2003).pp 215-223..

CONCLUSION GÉNÉRALE

A travers cette recherche on a étudié les possibilités de valorisation des eaux résiduaires de tanneries par le recyclage de l'eau et la récupération des acides aminés libres.

Les principaux résultats de ce travail sont les suivants.

- L'acidification des eaux usées alcalines jusqu'à pH 4 a permis de précipiter toutes les protéines dissoutes, d'éliminer le H_2S sous forme gazeuse et d'obtenir une eau d'une grande limpidité. Des tests montrent nettement que ces eaux clarifiées contiennent des acides aminés libres que l'on va identifier et valoriser ;
- La neutralisation de ces eaux alcalines par le CO_2 a donné une eau traitée à faible conductivité, tout à fait acceptable pour un éventuel recyclage ; c'est une technique tout à fait originale.
- L'étude des courbes de titrage acido-basique (bain usé par HCl) sont très instructives grâce à la netteté des zones tampons , des sauts de pH ,…
- La présence d'acides aminés libres dans les eaux décantées à pH 4.
- La chromatographie CCM a nettement confirmé la présence de sept acides aminés libres. Ces résultats sont en accord avec l'étude bibliographique qui nous a renseignée sur la composition des protéines du collagène et de la kératine ;

Les acides aminés identifiés sont à caractère neutre et sont les suivants **:** la proline, la glycine, la cystéine, l'alanine, la valine, la leucine. Pour le septième acide aminé on n'a pas pu l'édifier.

- La spectrophotométrie visible, les dosages acido-basiques (Formol et Kjeldahl),… ont permis d'estimer la concentration totales en acides aminés à quelques mmoles par litres, soit une moyenne d'environ 500 mg / l ou 500g/m^3.

- Les protéines précipitées sont en quantité, appréciables et peuvent être aussi valorisées.

Cette recherche permet aussi d'ouvrir des perspectives intéressantes :

- L'application des technologies propres dans l'industrie algérienne n'est pas impossible si des études sérieuses sont menées sur les eaux résiduaires.
- L'utilisation de moyens analytiques puissants (HPLC, CPG,…) est nécessaire pour une identification précise des acides aminés.
- Une recherche complémentaire est nécessaire pour séparer et purifier les acides aminés identifiés et pré purifiés.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Détermination de la chaux :

Comme on a déjà dit, au pH =10 on a la neutralisation de S^{2-} et la chaux.

V_1 est le volume d'acide nécessaire à la neutralisation de S^{2-} et la chaux.

V_2 est le volume nécessaire à la neutralisation de S^{2-}

Selon le diagramme de répartition des espèces de H_2S, à pH 12,31, la fraction molaire de S^{-2} est de 0.18. Donc pour la neutralisation de S^{2-} le volume est $(0.18 \times 2\ V_2)$.

On peut calculer la concentration de la chaux à l'aide de la formule suivante :

$$m = V_{HCl} \cdot C_{HCl} \cdot M$$

$$V_{HCl} = V_1 - 0.4V_2$$

Selon le diagramme qu'on a :

$V_1 = 6ml$, $V_2 = 1ml$, $C_{HCl} = 0.5M$, $M_{Chaux} = 74g/mol$

Donc, $m = (6 - 0{,}36 \cdot 1) \cdot 0.5 \cdot 74$

$m = 208.68$ mg

le volume de l'échantillon est 100ml,

Donc, **m = 2086,8mg par litre de la chaux.**

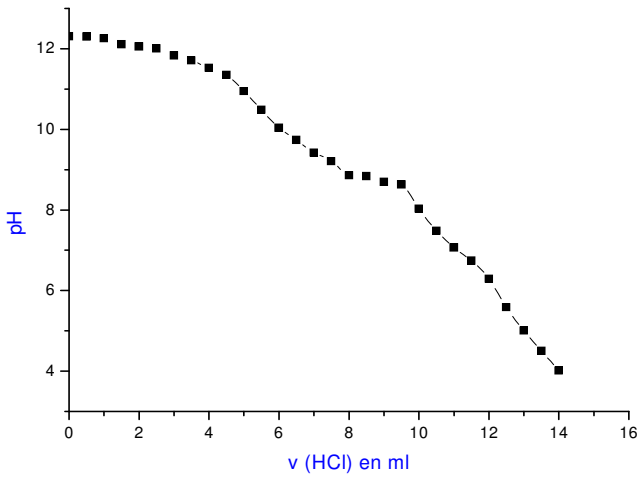


Figure1 : *Dosage pH-métrique du bain avec HCL 0.5M*

Détermination des sulfures :

On prend V_1 est le volume d'acide (HCl) nécessaire à la demi neutralisation de HS^-, entre le pH 10, et 7.

Donc pour déterminer la quantité de S^{2-} :

$$m = V_{HCl} . C_{HCl} . M$$

$V_{HCl} = 2 V_1 / V_1 = 5,1ml$
$C_{HCl} = 0.5M$ et $M = 32g/mol$

Donc, m = 165,12 mg de S^{2-}

le volume de l'échantillon est 100ml,

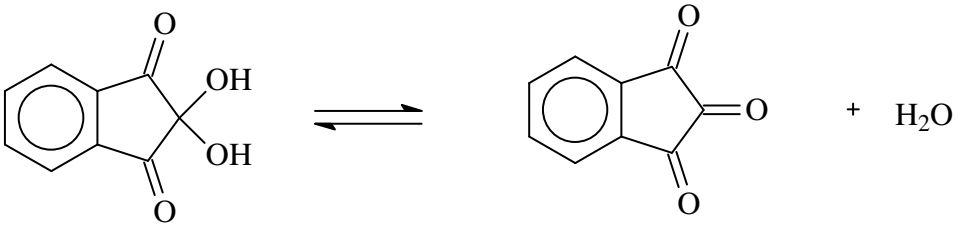
m = 1651,2 mg par litre de S^{2-}

ANNEXE 2 :

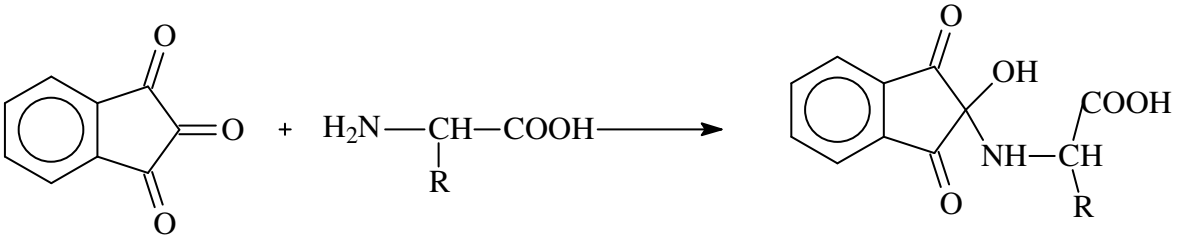
Réaction des acides aminés avec la ninhydine :

La ninhydrine est un réactif utilisé comme révélateur des acides aminés en chromatographie ou encore en spectrophotométrie.

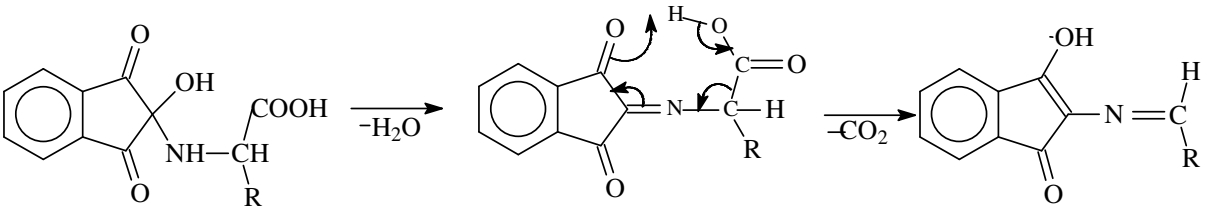
La ninhydrine est sous forme hydratée la 2,2-dihydroxyindan- 1,3-dione, soit :



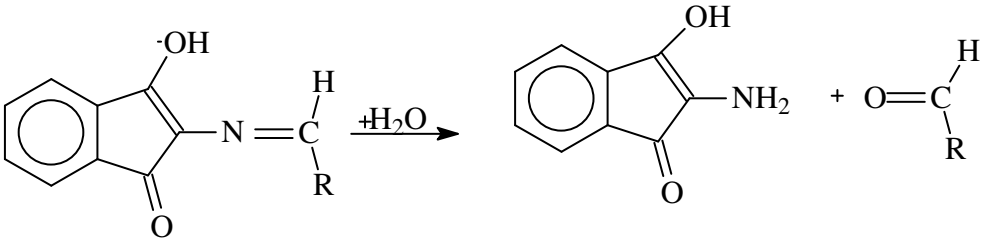
La fonction cétone centrale est très électrophile et réagit avec la fonction amine des acides aminés



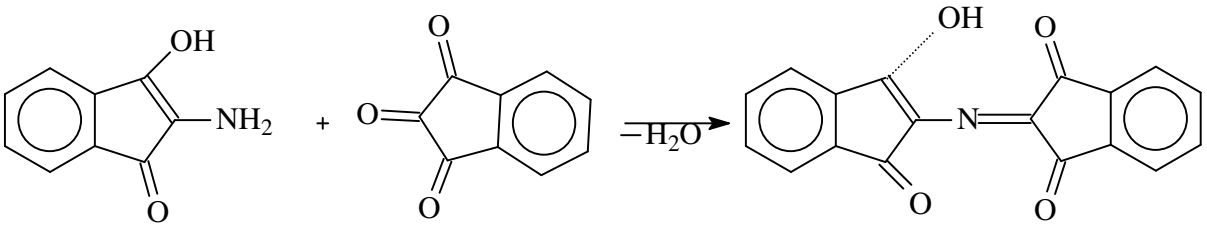
L'α-aminoalcool perd une mole d'eau, puis une mole de CO_2, en donnant une imine,



Cette imine est hydrolysée et libère un aldéhyde et une amine,



L'amine libérée réagit avec une autre mole de ninhydrine pour donner une nouvelle cétimine,



Ce composé fortement délocalisé est coloré, on le nomme Pourpre de Ruheman. Il est à noter qu'il ne reste qu'un atome d'azote provenant de l'acide aminé initial dans le colorant final.

ANNEXE 3 :

Le tableau suivant représente les concentrations des solutions (de glycine) utilisées dans la spectrophotométrie :

Solution1	Solution2	Solution3	Solution4	Solution5	Solution6	Solution7	Solution8	Solution9
0.004g	**0.005g**	**0.006g**	**0.0075**	**0.008g**	**0.0085g**	**0.0095g**	**0.015g**	**0.02g**

Confirmation de λ_{max} :

λ	550	555	560	565	**570**	575	580	585	590
A_2 pour Solution2	0.186	0.196	0.201	0.206	**0.210**	0.208	0.204	0.198	0.188
A_3 pour Solution3	0.243	0.257	0.271	0.277	**0.279**	0.278	0.261	0.262	0.251
A_4 pour Solution4	0.331	0.349	0.363	0.369	**0.373**	0.372	0.365	0.353	0.337

Tableau de la courbe d'étalonnage :

N° de solution	1	2	3	4	5	6	7	8
A	**0.190**	**0.222**	**0.289**	**0.345**	**0.372**	**0.425**	**0.734**	**0.958**

Préparation des échantillons :

Pour chaque tube : 1ml de solution de glycine +1ml d'eau distillée +2ml de solution de ninhydrine

On porte les tubes au bain-marie pendant 15 min

Après refroidissement des tubes sous l'eau froide on ajoute dans chaque tube 25ml de solution de dilution (éthanol/eau 50 :50)

On a appliqué la même chose sur les deux échantillons.

Le tableau suivant représente les valeurs de l'absorbance pour les deux échantillons :

	A_1	**A_2**
Echantillon 1	0.748	0.866
Echantillon 2	1.063	1.071

Pour l'eau 1 :

L'absorbance correspond à 0.0177g/100ml, donc à 0.17g/l

Si on suppose la masse molaire de la glycine on trouve une concentration de

2.3610^{-3}M

Pour l'eau 2 :

L'absorbance correspond à 0.021g/100ml, donc à 0.21g/l

Si on suppose la masse molaire de la glycine on trouve une concentration de 2.79 10^{-3}M

ANNEXE 4 :

Dans la méthode de kjeldhal, on applique la formule suivante pour trouver la quantité d'azote protéique :

La formule pour le calcul :

$$C_{NH_3} = \frac{2(C_{H_2SO_4}.V_{H_2SO_4}) - C_{NaOH}.V_{NaOH}}{V_{NH_3}}$$

Le cas d'un échantillon du bain n°1 ; avant précipitation :

L'échantillon de l'eau V = 10ml

Solution étalon de H_2SO_4 0,1M (100ml), Solution étalon de NaOH 0,2M

Volume de NaOH est 93ml

On peut écrire la formule précédente comme suit :

n (NH_3) = 2n (H_2SO_4) – n (NaOH)

n (NH_3) = $2(C_{H_2SO_4}.V_{H_2SO_4}) - C_{NaOH}.V_{NaOH}$

n (NH_3) = $2(0,1 \,.\, 100.10^{-3}) - (0,2 \,.\, 93\ 10^{-3})$

n (NH_3) =1,4 10^{-3}mol / C= n / V, et V =10ml =10. 10^{-3} l

C (NH_3) = 0,14 mol/l

C_p = C . M

Donc, C_p = 0,14mol/l . 14g/mol

C_p =1,96 g/l

Le cas d'un échantillon du bain n°1 ; après précipitation :

L'échantillon de l'eau V = 10ml

Solution étalon de H_2SO_4 0,1M (100ml), Solution étalon de NaOH 0,2M

Volume de NaOH est 84ml

On peut écrire la formule précédente comme suit :

n (NH_3) = 2n (H_2SO_4) – n (NaOH)

n (NH_3) = $2(C_{H_2SO_4}.V_{H_2SO_4}) - C_{NaOH}.V_{NaOH}$

$n\ (NH_3) = 2(0,1\ .\ 100.10^{-3}) - (0,2\ .\ 84\ 10^{-3})$

$n\ (NH_3) = 3,2\ 10^{-3}$mol / C= n / V, et V =10ml =10. 10^{-3} l

$C\ (NH_3) = 0,32$ mol/l

$C_p = C\ .\ M$

Donc, $C_p = 0,32$ mol/l . 14g/mol

$C_p = 4,48$ g/l

Le cas d'un échantillon du bain n°2 ; avant précipitation :

Volume de NaOH est 97,5ml

Le calcul est le même.

$C_p = 0,70$ g/l

Le cas d'un échantillon du bain n°2 ; après précipitation :

Volume de NaOH est 97ml

Le calcul est le même.

$C_p = 0,84$ g/l

ANNEXE 5 :

Charge apparente des acides aminés en fonction du pH:

pH	Asp	Glu	Asn	Gln	Lys	His	Arg	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Tyr	Trp
1,5	0,60	0,83	0,77	0,82	1,82	1,68	1,68	0,74	0,83	0,80	0,62	0,88	0,88	0,87	0,87	0,88	0,88	0,82	0,83	0,89
1,6	0,54	0,79	0,72	0,79	1,78	1,62	1,62	0,69	0,80	0,76	0,56	0,85	0,85	0,85	0,84	0,85	0,85	0,78	0,80	0,87
1,7	0,48	0,75	0,68	0,75	1,74	1,57	1,57	0,64	0,76	0,71	0,51	0,82	0,82	0,81	0,81	0,82	0,82	0,74	0,76	0,84
1,8	0,42	0,71	0,62	0,70	1,70	1,51	1,51	0,59	0,71	0,66	0,45	0,78	0,78	0,78	0,77	0,78	0,78	0,70	0,72	0,81
1,9	0,36	0,66	0,57	0,65	1,65	1,45	1,45	0,53	0,66	0,61	0,39	0,74	0,74	0,73	0,72	0,74	0,74	0,65	0,67	0,77
2,0	0,30	0,60	0,51	0,60	1,59	1,40	1,40	0,47	0,61	0,55	0,34	0,69	0,69	0,69	0,68	0,70	0,70	0,59	0,61	0,73
2,1	0,25	0,55	0,45	0,54	1,53	1,34	1,34	0,41	0,55	0,49	0,29	0,64	0,64	0,63	0,62	0,65	0,65	0,53	0,56	0,68
2,2	0,20	0,49	0,40	0,48	1,48	1,29	1,29	0,36	0,49	0,44	0,24	0,59	0,59	0,58	0,57	0,59	0,59	0,48	0,50	0,63
2,3	0,15	0,43	0,34	0,43	1,42	1,25	1,25	0,31	0,44	0,38	0,20	0,53	0,53	0,52	0,51	0,53	0,53	0,42	0,44	0,57
2,4	0,11	0,37	0,29	0,37	1,37	1,21	1,21	0,26	0,38	0,33	0,17	0,47	0,47	0,47	0,45	0,48	0,48	0,37	0,39	0,52
2,5	0,07	0,31	0,25	0,32	1,31	1,17	1,17	0,22	0,33	0,28	0,14	0,41	0,41	0,41	0,40	0,42	0,42	0,31	0,33	0,46
2,6	0,03	0,26	0,21	0,27	1,27	1,14	1,14	0,18	0,28	0,24	0,11	0,36	0,36	0,35	0,34	0,37	0,37	0,27	0,28	0,40
2,7	-0,01	0,21	0,17	0,23	1,22	1,12	1,12	0,15	0,24	0,20	0,09	0,31	0,31	0,30	0,29	0,31	0,31	0,22	0,24	0,35
2,8	-0,05	0,16	0,14	0,19	1,19	1,09	1,09	0,12	0,20	0,16	0,08	0,26	0,26	0,26	0,25	0,27	0,27	0,19	0,20	0,30
2,9	-0,09	0,12	0,12	0,16	1,15	1,08	1,08	0,10	0,16	0,13	0,06	0,22	0,22	0,22	0,21	0,22	0,22	0,15	0,17	0,25
3,0	-0,14	0,08	0,09	0,13	1,13	1,06	1,06	0,08	0,13	0,11	0,05	0,18	0,18	0,18	0,17	0,19	0,19	0,13	0,14	0,21
3,1	-0,18	0,04	0,08	0,11	1,10	1,05	1,05	0,07	0,11	0,09	0,04	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,10	0,11	0,18
3,2	-0,23	0,01	0,06	0,09	1,08	1,04	1,04	0,05	0,09	0,07	0,03	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,08	0,09	0,15
3,3	-0,29	-0,03	0,05	0,07	1,07	1,03	1,03	0,04	0,07	0,06	0,03	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,07	0,07	0,12
3,4	-0,34	-0,07	0,04	0,06	1,05	1,02	1,03	0,03	0,06	0,05	0,02	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,05	0,06	0,10
3,5	-0,40	-0,11	0,03	0,04	1,04	1,02	1,02	0,03	0,05	0,04	0,02	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,04	0,05	0,08
3,6	-0,46	-0,15	0,03	0,04	1,04	1,01	1,02	0,02	0,04	0,03	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,06
3,7	-0,52	-0,19	0,02	0,03	1,03	1,01	1,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05
3,8	-0,58	-0,24	0,02	0,02	1,02	1,00	1,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04
3,9	-0,64	-0,29	0,01	0,02	1,02	1,00	1,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
4,0	-0,69	-0,35	0,01	0,01	1,01	1,00	1,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03
4,1	-0,74	-0,40	0,01	0,01	1,01	0,99	1,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
4,2	-0,78	-0,46	0,01	0,01	1,01	0,99	1,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
4,3	-0,82	-0,52	0,01	0,01	1,01	0,98	1,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4,4	-0,85	-0,58	0,00	0,01	1,01	0,98	1,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4,5	-0,88	-0,64	0,00	0,00	1,00	0,97	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
4,6	-0,90	-0,69	0,00	0,00	1,00	0,96	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
4,7	-0,92	-0,74	0,00	0,00	1,00	0,95	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
4,8	-0,93	-0,78	0,00	0,00	1,00	0,94	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,9	-0,95	-0,82	0,00	0,00	1,00	0,93	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,0	-0,96	-0,85	0,00	0,00	1,00	0,91	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,1	-0,97	-0,88	0,00	0,00	1,00	0,89	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,2	-0,97	-0,90	0,00	0,00	1,00	0,86	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,3	-0,98	-0,92	0,00	0,00	1,00	0,83	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,4	-0,98	-0,93	0,00	0,00	1,00	0,80	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,5	-0,99	-0,95	0,00	0,00	1,00	0,76	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,6	-0,99	-0,96	0,00	0,00	1,00	0,72	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,7	-0,99	-0,97	0,00	0,00	1,00	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,8	-0,99	-0,97	0,00	0,00	1,00	0,61	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,9	-0,99	-0,98	0,00	0,00	1,00	0,56	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,0	-1,00	-0,98	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,1	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,44	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,2	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,39	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,3	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,4	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,28	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,5	-1,00	-1,00	0,00	0,00	1,00	0,24	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,6	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,20	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,7	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,16	0,99	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,8	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,13	0,99	0,00	0,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,9	-1,00	-1,00	-0,01	-0,01	0,99	0,11	0,99	0,00	0,00	-0,01	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,0	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,08	0,99	0,00	-0,01	-0,01	-0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,1	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,07	0,99	0,00	-0,01	-0,01	-0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,2	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,05	0,98	0,00	-0,01	-0,01	-0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01
7,3	-1,00	-1,00	-0,03	-0,01	0,99	0,03	0,98	0,00	-0,01	-0,02	-0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,02	-0,01
7,4	-1,01	-1,00	-0,04	-0,02	0,98	0,02	0,97	0,00	-0,02	-0,02	-0,10	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01
7,5	-1,01	-1,01	-0,05	-0,02	0,98	0,01	0,97	0,00	-0,02	-0,02	-0,12	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01
7,6	-1,01	-1,01	-0,06	-0,03	0,97	0,00	0,96	0,00	-0,02	-0,03	-0,15	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,03	-0,03	-0,01
7,7	-1,01	-1,01	-0,07	-0,04	0,97	-0,01	0,95	0,00	-0,03	-0,04	-0,18	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,03	-0,04	-0,02
7,8	-1,02	-1,01	-0,09	-0,04	0,96	-0,03	0,94	0,00	-0,04	-0,05	-0,22	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,04	-0,05	-0,02
7,9	-1,02	-1,02	-0,11	-0,06	0,95	-0,04	0,92	0,00	-0,05	-0,06	-0,26	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,05	-0,06	-0,03
8,0	-1,02	-1,02	-0,14	-0,07	0,94	-0,05	0,91	0,00	-0,06	-0,07	-0,31	-0,01	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,06	-0,07	-0,04
8,1	-1,03	-1,03	-0,17	-0,09	0,92	-0,07	0,89	0,00	-0,07	-0,09	-0,36	-0,02	-0,02	-0,03	-0,03	-0,03	-0,03	-0,08	-0,09	-0,04
8,2	-1,04	-1,03	-0,20	-0,11	0,90	-0,09	0,86	0,00	-0,09	-0,11	-0,42	-0,02	-0,03	-0,03	-0,04	-0,04	-0,03	-0,09	-0,11	-0,05
8,3	-1,05	-1,04	-0,24	-0,13	0,88	-0,11	0,83	0,00	-0,11	-0,14	-0,47	-0,03	-0,03	-0,04	-0,05	-0,05	-0,04	-0,12	-0,14	-0,07
8,4	-1,06	-1,05	-0,28	-0,16	0,86	-0,14	0,80	-0,01	-0,13	-0,17	-0,53	-0,03	-0,04	-0,05	-0,06	-0,06	-0,05	-0,14	-0,17	-0,08
8,5	-1,07	-1,06	-0,33	-0,19	0,83	-0,17	0,76	-0,01	-0,16	-0,20	-0,59	-0,04	-0,05	-0,06	-0,07	-0,07	-0,06	-0,17	-0,21	-0,10
8,6	-1,09	-1,08	-0,39	-0,23	0,79	-0,21	0,71	-0,01	-0,20	-0,24	-0,65	-0,05	-0,06	-0,08	-0,09	-0,09	-0,08	-0,21	-0,25	-0,13
8,7	-1,11	-1,10	-0,44	-0,27	0,75	-0,25	0,66	-0,01	-0,24	-0,28	-0,70	-0,06	-0,08	-0,09	-0,11	-0,11	-0,09	-0,25	-0,30	-0,15
8,8	-1,14	-1,12	-0,50	-0,32	0,70	-0,30	0,61	-0,01	-0,28	-0,33	-0,75	-0,08	-0,09	-0,11	-0,13	-0,14	-0,11	-0,29	-0,35	-0,19
8,9	-1,17	-1,15	-0,56	-0,37	0,65	-0,35	0,55	-0,02	-0,33	-0,39	-0,79	-0,10	-0,12	-0,14	-0,16	-0,17	-0,14	-0,34	-0,42	-0,22
9,0	-1,20	-1,18	-0,61	-0,43	0,59	-0,40	0,49	-0,02	-0,38	-0,44	-0,83	-0,12	-0,14	-0,17	-0,19	-0,20	-0,17	-0,40	-0,49	-0,27
9,1	-1,24	-1,21	-0,67	-0,48	0,53	-0,46	0,44	-0,03	-0,44	-0,50	-0,87	-0,15	-0,17	-0,20	-0,23	-0,24	-0,20	-0,45	-0,56	-0,31

pH	Asp	Glu	Asn	Gln	Lys	His	Arg	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Tyr	Trp
9,2	-1,28	-1,25	-0,72	-0,54	0,46	-0,52	0,38	-0,04	-0,49	-0,56	-0,90	-0,18	-0,21	-0,24	-0,28	-0,28	-0,24	-0,51	-0,64	-0,37
9,3	-1,33	-1,30	-0,76	-0,60	0,40	-0,57	0,33	-0,04	-0,55	-0,61	-0,93	-0,21	-0,25	-0,29	-0,32	-0,33	-0,29	-0,57	-0,72	-0,42
9,4	-1,39	-1,35	-0,80	-0,65	0,33	-0,63	0,28	-0,05	-0,61	-0,67	-0,96	-0,25	-0,29	-0,34	-0,38	-0,39	-0,34	-0,62	-0,81	-0,48
9,5	-1,44	-1,40	-0,83	-0,70	0,27	-0,68	0,24	-0,07	-0,66	-0,72	-0,98	-0,30	-0,34	-0,39	-0,43	-0,44	-0,39	-0,68	-0,89	-0,53
9,6	-1,50	-1,46	-0,86	-0,75	0,20	-0,73	0,20	-0,08	-0,71	-0,76	-1,01	-0,35	-0,40	-0,45	-0,49	-0,50	-0,45	-0,72	-0,98	-0,59
9,7	-1,56	-1,52	-0,89	-0,79	0,14	-0,77	0,16	-0,10	-0,76	-0,80	-1,03	-0,40	-0,45	-0,51	-0,55	-0,56	-0,51	-0,77	-1,07	-0,65
9,8	-1,61	-1,57	-0,91	-0,82	0,08	-0,81	0,13	-0,13	-0,80	-0,83	-1,06	-0,46	-0,51	-0,56	-0,60	-0,61	-0,56	-0,81	-1,16	-0,70
9,9	-1,67	-1,63	-0,93	-0,85	0,02	-0,84	0,11	-0,15	-0,83	-0,86	-1,09	-0,52	-0,57	-0,62	-0,66	-0,67	-0,62	-0,84	-1,24	-0,74
10,0	-1,72	-1,68	-0,94	-0,88	-0,04	-0,87	0,09	-0,19	-0,86	-0,89	-1,12	-0,57	-0,62	-0,67	-0,71	-0,72	-0,67	-0,87	-1,33	-0,78
10,1	-1,76	-1,73	-0,95	-0,90	-0,10	-0,89	0,07	-0,22	-0,89	-0,91	-1,16	-0,63	-0,68	-0,72	-0,75	-0,76	-0,72	-0,89	-1,41	-0,82
10,2	-1,80	-1,77	-0,96	-0,92	-0,16	-0,91	0,05	-0,27	-0,91	-0,93	-1,19	-0,68	-0,72	-0,76	-0,79	-0,80	-0,76	-0,91	-1,48	-0,85
10,3	-1,83	-1,81	-0,97	-0,94	-0,22	-0,93	0,04	-0,31	-0,92	-0,94	-1,24	-0,73	-0,77	-0,80	-0,83	-0,83	-0,80	-0,93	-1,56	-0,88
10,4	-1,86	-1,84	-0,98	-0,95	-0,29	-0,94	0,03	-0,37	-0,94	-0,95	-1,29	-0,77	-0,81	-0,84	-0,86	-0,86	-0,84	-0,94	-1,62	-0,90
10,5	-1,89	-1,87	-0,98	-0,96	-0,35	-0,96	0,02	-0,42	-0,95	-0,96	-1,34	-0,81	-0,84	-0,87	-0,88	-0,89	-0,87	-0,95	-1,68	-0,92
10,6	-1,91	-1,89	-0,98	-0,97	-0,42	-0,96	0,01	-0,48	-0,96	-0,97	-1,39	-0,84	-0,87	-0,89	-0,91	-0,91	-0,89	-0,96	-1,73	-0,94
10,7	-1,93	-1,91	-0,99	-0,97	-0,48	-0,97	0,00	-0,53	-0,97	-0,98	-1,45	-0,87	-0,89	-0,91	-0,92	-0,93	-0,91	-0,97	-1,78	-0,95
10,8	-1,94	-1,93	-0,99	-0,98	-0,55	-0,98	-0,01	-0,59	-0,97	-0,98	-1,51	-0,89	-0,91	-0,93	-0,94	-0,94	-0,93	-0,98	-1,82	-0,96
10,9	-1,95	-1,94	-0,99	-0,98	-0,61	-0,98	-0,01	-0,65	-0,98	-0,98	-1,57	-0,91	-0,93	-0,94	-0,95	-0,95	-0,94	-0,98	-1,85	-0,97
11,0	-1,96	-1,96	-0,99	-0,99	-0,66	-0,99	-0,02	-0,70	-0,98	-0,99	-1,62	-0,93	-0,94	-0,95	-0,96	-0,96	-0,95	-0,99	-1,88	-0,97
11,1	-1,97	-1,96	-1,00	-0,99	-0,71	-0,99	-0,03	-0,74	-0,99	-0,99	-1,68	-0,94	-0,95	-0,96	-0,97	-0,97	-0,96	-0,99	-1,90	-0,98
11,2	-1,98	-1,97	-1,00	-0,99	-0,76	-0,99	-0,04	-0,78	-0,99	-0,99	-1,72	-0,96	-0,96	-0,97	-0,97	-0,98	-0,97	-0,99	-1,92	-0,98
11,3	-1,98	-1,98	-1,00	-0,99	-0,80	-0,99	-0,06	-0,82	-0,99	-0,99	-1,77	-0,96	-0,97	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-1,94	-0,99
11,4	-1,98	-1,98	-1,00	-0,99	-0,84	-0,99	-0,07	-0,85	-0,99	-1,00	-1,81	-0,97	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-1,95	-0,99
11,5	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,86	-1,00	-0,09	-0,88	-0,99	-1,00	-1,84	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-0,99	-0,98	-1,00	-1,96	-0,99
11,6	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,89	-1,00	-0,11	-0,90	-1,00	-1,00	-1,87	-0,98	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,97	-0,99
11,7	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,91	-1,00	-0,14	-0,92	-1,00	-1,00	-1,89	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,97	-0,99
11,8	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,93	-1,00	-0,17	-0,94	-1,00	-1,00	-1,91	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,98	-1,00
11,9	-2,00	-1,99	-1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-0,21	-0,95	-1,00	-1,00	-1,93	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-0,99	-1,00	-1,98	-1,00
12,0	-2,00	-2,00	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-0,25	-0,96	-1,00	-1,00	-1,94	-0,99	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,99	-1,00

ANNEXE 6 :

Liste des pK des acides aminés protéiques

Acides aminés	$pK_{(\alpha\text{-}COOH)}$	$pK_{(\alpha\text{-}NH_2)}$	pK [Résidu]
Ala	2,34	9,69	x
Arg	1,82	8,99	12,48
Asn	2,02	8,80	x
Asp	1,88	9,60	3,65
Cys	1,92	10,46	8,35
Gln	2,17	9,13	x
Glu	2,19	9,67	4,25
Gly	2,35	9,78	x
His	1,82	9,17	6,00
Ile	2,36	9,69	x
Leu	2,36	9,60	x
Lys	2,16	9,18	10,69
Met	2,28	9,21	x
Phe	2,16	9,18	x
Pro	1,95	10,64	x
Ser	2,19	9,21	x
Thr	2,09	9,10	x
Trp	2,43	9,44	x
Tyr	2,20	9,11	10,13
Val	2,32	9,62	x

SOMMAIRE

	INTRODUCTION GENERALE.....……..	1
Chapitre I	**GENERALITES SUR LES TANNERIES ET FABRICATION DES CUIRS**	
I. 1-	INTRODUCTION……..	4
I. 2-	PROCÉDÉ DES TANNERIE-MÉGISSERIES……..	4
I. 3-	SOURCES DES SUBSTANCES AZOTÉES DANS LA TANNERIE……	4
I. 3-1-	METHODES LES PLUS USUELLES D'EPILLAE……	5
I. 4-	CONSOMMATION D'EAU ET DE PRODUITS CHIMIQUES D'UNE TANNERIE-MÉGISSERIE……	5
I. 5-	VALORISATION DES DÉCHETS DE TANNERIE……..	8
I. 6-	CONCLUSION……..	9
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……	10
Chapitre II	**STRUCTURE DE LA PEAU**	
II. 1-	INTRODUCTION……	12
II. 2-	LA PEAU BRUTE……..	12
II. 3-	LA COMPOSITION APPROXIMATIVE D'UNE PEAU FRAICHE ECORCHEE……....	13
II. 4-	QUELQUES PROPRIÉTÉS DES PROTÉINES……	14
II. 5-	PROTÉINES DE LA PEAU……..	17
II. 6-	CONCLUSION……..	20
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……	21
Chapitre III	**GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES**	
III. 1-	INTRODUCTION……	23
III. 2-	LES ACIDES AMINÉS PROTÉIQUE……..	23
III. 3-	PROPRIÉTÉ PHYSICO HIMIQUES DES ACIDES AMINÉS……..	25
III. 4-	CONCLUSION……..	28
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……	29
Chapitre IV	**METHODE D'HYDROLYSE**	
IV. 1-	INTRODUCTION……	31
IV. 2-	HYDROLYSE DES PROTEINES……	32
IV. 3-	HYDROLYSE ACIDE……	32
IV. 4-	L'HYDROLYSE ALCALINE……	34
IV. 5-	AUTRES METHODES D'HYDROLYSE ……	35
IV. 5-1-	Hydrolyse avec micro-ondes radiations……	35
IV. 5-2-	Hydrolyse enzymatique……..	35
IV. 6-	CONCLUSION……	36
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	37
Chapitre V	**METHODES D'ANALYSES DES ACIDES AMINÉS**	
V. 1-	INTRODUCTION……	39
V. 2-	SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION DANS L'ULRAVIOLET ET LE VISIBLE……	39
V. 2-1-	INTRODUCTION……	39
V. 2-2-	PRINCIPE……	40
V. 2-3-	LOI DE BEER-LAMBERT……	41
V. 2-4-	INSTRUMENTATION……	42
V. 2-5-	AVANTAGES ET INCONVÉNIENT ……..	43
V. 3-	LA SPECTROFLUORIMETRIE ……	44
V. 3-1-	INTRODUCTION ……	44
V. 3-2-	PRINCIPE……	44
V. 3-3-	INSTRUMENTATION……	44
V. 3-4-	APPLICATIONS……..	46
V. 4-	LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE……	46
V. 4-1-	INTRODUCTION……	46
V. 4-2-	PRINCIPE……	48
V. 4-3-	AVANTAGES ET INCONVENIENTS…….....	49
V. 4-4-	APPLICATIONS……...	50
V. 5-	ÉLECTROPHORÈSE…….....	50
V. 5-1-	INTRODUCTION……	50
V. 5-2-	ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE……..	51
V. 5-3-	ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE……	55
V. 6-	ÉCHANGE D'IONS……	58
V. 6-1-	INTRODUCTION……	58
V. 6-2-	PRINCIPE……...	58
V. 6-3-	INSTRUMENTATION……	60
V. 7-	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE……..	61
V. 7-1-	INTRODUCTION……	61

V. 7-2-	PRINCIPE……..….	61
V. 7-3-	INSTRUMENTATION……	61
V.7-4-	AVANTAGES ET INCONVENIENTS……..	64
V. 8-	CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE……..…….....	64
V. 8-1-	INTRODUCTION……	64
V. 8-2-	PRINCIPE……..……	65
V. 8-3-	INSTRUMENTATION……	65
V. 9-	AUTRES MÉTHODES D'ANALYSE ET SEPARATION……..……..	67
V. 10-	CONCLUSION……..……...…	67
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…….	68
Chapitre VI	**PARTIE EXPERRIMENTALE**	
VI.1-	INTRODUCTION……	71
VI. 2-	DOSAGES DE L'EAU DE BAIN D'ÉPILAGE- PELANAGE……..	73
VI. 2-1-	DOSAGE ACIDO BASIQUE DE L'EAU RÉSIDUAIRE…….	73
VI. 2-2-	DOSAGE DE L'EAU RÉSIDUAIRE AVEC LE CO_2…….....	79
VI. 3-	ANALYSES ET DOSAGES DES ACIDES AMINÉS……...	85
VI. 3-1-	ANALYSE QUALITATIVE DES ACIDES AMINÉS ET PEPTIDES …...……..	85
VI. 3-2-	DOSAGE PAR LE FORMOL DES ACIDES AMINÉS…….	87
VI. 3-3-	DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE…….	90
VI. 3-4-	DOSAGE DE L'AZOTE PROTÉIQUE «MÉTHODE DE KJELDHAL »…….	92
VI. 4-	HYDROLYSE ACIDE DU SURNAGEANT…….	94
VI. 5-	MÉTHODES SÉPARATIVES……	95
VI. 5-1-	SÉPARATION SUR RÉSINES ÉCHANGEUSE D'IONS…….	95
VI. 5-2-	SÉPARATION PAR ÉLECTROPHORÈSE……...	99
VI. 5-3-	SÉPARATION PAR LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE……	100
	SEPARATION PRATIQUE DES ACIDES AMINÉS TROUVÉS……	105
VI. 6-	PETITE ETUDE SUR LES ACIDES AMINÉS IDENTIFIES……...	106
VI. 7-	CONCLUSION……..……...…	111
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…….	112
Chapitre VII	**IMPORTANCE ET UTILISATION DES ACIDES AMINES**	
	INTRODUCTION……	115
VII.2-	QUELQUES FONCTIONS DES ACIDES AMINÉS PROTÉIQUES……...	115
VII.3-	APPLICATIONS DES ACIDES AMINÉS…….	116
VII.3-1-	QUELQUES EXEMPLES SUR LES APPLICATIONS DES ACIDES AMINÉS……	117
VII. 4-	CONCLUSION……..……...…	118
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…….	119
	CONCLUSION GENERALE……...	120
	ANNEXE 1……..	123
	ANNEXE 2……..	125
	ANNEXE 3……..	127
	ANNEXE 4……..	129
	ANNEXE 5……..	131
	ANNEXE 6……..	133