

Année : 2014

UNIVERSITÉ DE LILLE I - SCIENCES ET TECHNOLOGIES
École doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Amirouche DJAOUDI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 1

**SÉPARATION DE SOLUTIONS PEPTIDIQUES MODÈLES PAR
ÉLECTRODIALYSE AVEC MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION**

N° Ordre 41634

Préparée au laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien
(**ProBioGEM**), UPRES, EA 1026, IUTA-Polytech'Lille, France.

En collaboration avec l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (**INAF**),
Québec, Canada.

Soutenue le 19 décembre 2014 devant le jury composé de :

M. Laurent BAZINET, Professeur titulaire, Université Laval,

M. Pascal DHULSTER, Professeur des Universités, Université de Lille 1

Mme Loubna FIRDAOUS, Maître de Conférences, Université de Lille1

M. Renato FROIDEVAUX, Professeur des Universités, Université de Lille1

Mme Marie-Laure LAMELOISE, Professeur des Universités, AgroParisTech

Mme Florence LUTIN, Responsable R&D, Eurodia Industrie SA

M. Dominique TREBOUET, Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Co-encadrante de thèse

Examineur

Rapporteur

Membre invité

Rapporteur

Année : 2014

UNIVERSITÉ DE LILLE I - SCIENCES ET TECHNOLOGIES
École doctorale Science de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Amirouche DJAOUDI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 1

**SÉPARATION DE SOLUTIONS PEPTIDIQUES MODÈLES PAR
ÉLECTRODIALYSE AVEC MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION**

N° Ordre 41634

Préparée au laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien
(**ProBioGEM**), UPRES, EA 1026, IUTA-Polytech'Lille, France.

En collaboration avec l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (**INAF**),
Québec, Canada.

Soutenue le 19 décembre 2014 devant le jury composé de :

M. Laurent BAZINET, Professeur titulaire, Université Laval,

M. Pascal DHULSTER, Professeur des Universités, Université de Lille 1

Mme Loubna FIRDAOUS, Maître de Conférences, Université de Lille1

M. Renato FROIDEVAUX, Professeur des Universités, Université de Lille1

Mme Marie-Laure LAMELOISE, Professeur des Universités, AgroParisTech

Mme Florence LUTIN, Responsable R&D, Eurodia Industrie SA

M. Dominique TREBOUET, Professeur des Universités, Université de Strasbourg

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Co-encadrante de thèse

Examineur

Rapporteur

Membre invité

Rapporteur

Remerciements

Durant ces années de thèse, les diverses missions qui m'ont été confiées et mes déplacements enrichissants entre le centre INAF (Québec, Canada) et le laboratoire ProBioGem (Lille, France) m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes. J'exprime ici mes chaleureux remerciements envers chacune d'entre elles, en espérant n'oublier personne !!!

J'exprime d'abord toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers mes deux directeurs de thèse pour le travail proposé et pour la liberté qu'ils m'ont accordée dans la gestion du sujet et de mon agenda de travail. Merci d'avoir mis à disposition les moyens et l'encadrement nécessaires à l'aboutissement de mes idées. Un grand merci au professeur Laurent BAZINET du centre INAF pour sa disponibilité et son suivi constant de mon travail ainsi que pour la confiance accordée lors de mes deux séjours de doctorat au Québec. Nos nombreuses discussions ont à chaque fois permis de redéfinir les priorités de nos études et ont largement contribué à faire mûrir la thèse. Je remercie également chaleureusement le professeur Pascal DHULSTER, directeur de l'Institut Charles Violette et anciennement du laboratoire ProBioGEM, pour la participation active à ce travail, mais aussi pour l'intérêt constant et le soutien sans faille de toutes mes initiatives.

Je remercie vivement mon co-encadrante de thèse, le docteur Loubna FIRDAOUS pour sa proposition du sujet de thèse, son soutien permanent au travail, sa disponibilité tout au long de mon parcours et à son aide à la rédaction du manuscrit.

Je souhaite maintenant témoigner de mes sincères et respectueux remerciements envers les membres de mon jury de thèse. C'est avec spontanéité que les professeurs Marie-Laure LAMELOISE et Dominique TREBOUET respectivement d'AgroParisTech et de l'université de Strasbourg ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Votre haute expertise dans le domaine du génie des procédés était garante d'un apport critique et constructif à ce travail. Je vous remercie vivement du temps consacré à l'examen de ces travaux. J'adresse également de sincères remerciements à Rénato FROIDEVAUX, professeur à l'université de Lille1, qui a accepté d'examiner cette thèse en qualité de Président de Jury. Je n'ai pas douté un instant de la pertinence de vos critiques et je vous adresse toute ma considération pour le temps passé à examiner ce mémoire.

Merci aux nombreux ingénieurs et techniciens que j'ai pu solliciter au cours de mes travaux. De l'équipe ProBioGEM et de l'INAF, je citerais Laurent BONNEAU, Gabrielle CHATAIGNE, Corinne BOISTEL, Monica ARAYA-FARIAS, Diane GAGNON et bien sûr l'incontournable Max BECHET, avec qui la discussion de la semaine tournait inévitablement autour des résultats footballistiques.

J'adresse de vifs remerciements à tous les chercheurs, les enseignants et le personnel que j'ai croisé au cours de ces années et avec qui j'ai pu discuter et échanger des points de vue. Je pense notamment à Didier GUILLOCHON, Krasimir DIMITROV, Nour-Eddine CHIHIB, Djamel DRIDER (azul fellak) et Naïma NEDJAR-ARROUME. Je n'oublie évidemment pas le docteur François COUTTE avec qui j'ai partagé de nombreux moments de discussion au Restaurant Universitaire.

Ayant bénéficié d'un statut de moniteur puis d'ATER, j'ai pu apprendre la fonction d'enseignant à l'IUT auprès de Bertrand FERTIN, que je remercie vivement pour ses conseils, sa bienveillance et ses bonnes blagues.

Je remercie également Regis KESTELOOT, pour sa gentillesse, sans oublier Dominique VERCAIGNE-MARKO qui m'a confié cette mission d'enseignement. J'en profite aussi pour

remercier l'indispensable Cathy OUBLION, secrétaire incontournable du laboratoire ProBioGEM.

Je souhaite à présent exprimer toute mon amitié envers l'ensemble des post-doctorants, doctorants et stagiaires que j'ai côtoyé au cours de mes années de Thèse puis d'ATER. Je commencerais bien évidemment par Marwan (alias docteur Q ou Connard) avec qui j'ai partagé des moments de discussion et de fous rires sur de nombreux sujets. Je remercie vivement Juliette (alias Zorro), Adil le magnifique et Rémi (alias µbi..) pour leurs corrections de fautes d'orthographe du manuscrit. Une dédicace à mes camarades du Québec et plus particulièrement à Shyam et Sergey avec qui j'ai bravé le froid d'hiver. Je tiens à remercier également les anciens doctorants, je citerai Aurélien, Lucie, Joany, Pascal, Omar, Mathieu, Loyal, Jovana, Faiza, Rafik, Assaad, Rim, Fateh, Imad, Pauline, Niçolas, Alain, Cyril. Parmi les docteurs diplômés depuis peu, je salue Cédric le belge, Leandro (alias el gringo) et Karima. Je souhaite du courage et de l'ambition à tous les thésards actuels, Qassim, Ameen, Yazan, Alaa, Ahmed, Paola, Thibault, Alexandra, Taki (alias putoi-man), Delphine, Jean-Christian, Sonia, Alexandre (alias saluut), Oussama, Ramiro, Amel, Mickaël, Oumayma, Sabrine, Debarun, Luiz, Lamia et bien sûr Kalim (alias Mr Bricot dépôt). Merci pour toutes les discussions scientifiques et politiques plus animées les unes que les autres (La France a-t-elle une politique d'offre ou de demande...), mais aussi pour l'excellente ambiance générale et pour l'animation durant les nombreuses pauses-café. J'adresse également un salut aux membres de DEINOVE, Hugo, Marjorie, Guillaume et Marie-hélène et aux membres de LIPOFABRIK, Nacer et Arnaud.

J'adresse encore de chaleureux remerciements envers mes nombreux amis, dont beaucoup ont été cités, pour les moments nécessaires de distraction dans la vie d'un thésard. Avec une pensée plus qu'amicale pour mes camarades de la salle de sport d'European Fitness Paradise. Je remercie également Mohamed MOUSSAOUI (alias Moh) avec qui j'ai passé mes années d'étude au lycée Sévigné (Tourcoing) et qui m'a énormément aidé lors de mon arrivée en France.

Enfin, je tiens à remercier ma très très chère famille pour la joie et le bonheur permanent qu'elle m'apporte mais aussi pour leur soutien constant et pour avoir supporté mes humeurs. Je vous dédie ce modeste travail, avec une pensée émue pour ceux qui ne sont plus, particulièrement à Pascal MARTEL.

« La connaissance s'acquiert par l'expérience, tout le reste n'est que de l'information »

Albert Einstein

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	5
1 Les acides aminés et peptides-Généralités : Rappels sur les notions de pKa et pHi.....	6
2 Peptides à activité biologique.....	8
3 Procédés de fractionnement de mélanges peptidiques	9
3.1 Procédés chromatographiques.....	10
3.2 Procédés baro-membranaires	12
3.2.1 Limites des procédés baro-membranaires	14
3.2.1.1 <i>Polarisation de concentration</i>	14
3.2.1.2 <i>Colmatage membranaire</i>	15
3.3 Procédés électro-baro-membranaires	16
3.4 Procédés électromembranaires	17
3.4.1 <i>Électrodialyse conventionnelle</i>	18
3.4.2 <i>Électrophorèse à contacteur membranaire</i>	19
3.4.3 <i>Module d'électrophorèse à membranes de filtration</i>	20
3.4.4 <i>Électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF)</i>	22
3.4.4.1 Application de l'EDUF.....	24
3.4.5 <i>Paramètres électromembranaires</i>	25
3.4.5.1 <i>Membrane de filtration</i>	25
3.4.5.2 <i>Champ électrique</i>	26
3.4.5.3 <i>Débit</i>	27
3.4.5.4 <i>pH</i>	27
3.4.5.5 <i>Concentration</i>	28
3.4.5.6 <i>Configuration du module</i>	28
3.4.6 <i>Limites des procédés électromembranaires</i>	29
3.4.6.1 <i>Colmatage membranaire</i>	29
3.4.6.2 <i>Polarisation de concentration</i>	30
3.4.6.3 <i>Densité du courant limite et dissociation de l'eau</i>	31
3.4.7 <i>Transfert de matière dans les procédés électromembranaires</i>	37
3.4.7.1 <i>Diffusion</i>	37
3.4.7.2 <i>Electro-osmose</i>	37
3.4.7.3 <i>Electromigration</i>	38

3.4.7.4	<i>Nombre du transport</i>	39
Objectifs du travail		40
Chapitre 2 : Matériels et méthodes		43
1	Peptides synthétiques	44
2	Mesure de la mobilité électrophorétique des peptides 4-asp et 4-lys.....	47
2.1	Mesure par zétamétrie	47
2.1.1	<i>Principe</i>	47
2.1.2	<i>Mesure de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer 2000</i>	48
2.1.3	<i>Mesure de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer Nano ZS</i>	49
2.2.	Mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire.....	49
2.2.1	<i>Principe</i>	49
2.2.2	<i>Appareillage</i>	50
3	Séparation de solutions peptidiques par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration	50
3.1	Séparation de solutions peptidiques simples	50
3.1.1	<i>Pilote d'électrodialyse</i>	50
3.1.2	<i>Protocole expérimental</i>	50
3.2	Fractionnement de mélanges peptidiques	53
3.2.1	<i>Pilote d'électrodialyse</i>	53
3.2.2	<i>Protocole expérimental</i>	53
4	Méthodes analytiques	56
4.1	Analyse des ions.....	56
4.2	Analyse des peptides	56
4.3	Analyse statistique.....	57
Chapitre 3 : Résultats et discussion		59
1	Mesure de la mobilité électrophorétique	60
1.1	Mesure du potentiel zêta par zétamétrie.....	60
1.1.1	<i>Avec le Zetasizer 2000</i>	60
1.1.1.1	<i>Mobilité électrophorétique du peptide anionique (4-asp)</i>	60
1.1.1.2	<i>Mobilité électrophorétique du peptide cationique (4-lys)</i>	61
1.1.2	<i>Avec le Zetasizer Nano ZS</i>	64
1.1.2.1	<i>Mobilité électrophorétique du peptide anionique (4-asp)</i>	64
1.1.2.2	<i>Mobilité électrophorétique du peptide cationique (4-lys)</i>	65
1.2	Mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire.....	68
1.2.1	<i>Mobilité électrophorétique du peptide anionique 4-asp</i>	68

1.2.2	<i>Mobilité électrophorétique du peptide cationique 4-lys</i>	69
1.3	Récapitulatif	71
2	Séparation de solutions peptidique simples par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration	73
2.1	Migration d'un peptide anionique : l'acide tétra-aspartique (4-asp).....	73
2.1.1	<i>Evolution des paramètres électrodialytiques</i>	73
2.1.1.1	<i>Courant électrique</i>	73
2.1.1.2	<i>Intensité du courant</i>	75
2.1.2	<i>Migration ionique</i>	77
2.1.3	<i>Migration peptidique</i>	81
2.1.4	<i>Colmatage membranaire</i>	84
2.2	Migration d'un peptide cationique : la tétra-lysine (4-lys)	86
2.2.1	<i>Evolution des paramètres électrodialytiques</i>	86
2.2.1.1	<i>Courant électrique</i>	86
2.2.1.2	<i>Intensité du courant</i>	87
2.2.2	<i>Migration ionique</i>	90
2.2.3	<i>Migration peptidique</i>	94
2.2.4	<i>Colmatage membranaire</i>	95
2.2.5	<i>Discussion</i>	96
3	Fractionnement d'un mélange peptidique par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration.....	103
3.1	<i>Evolution des paramètres électrodialytiques</i>	103
3.1.1	<i>Intensité du courant</i>	103
3.1.2	<i>Conductivité électrique</i>	104
3.1.2.1	<i>Cas de la solution saline KCl</i>	105
3.1.2.2	<i>Cas du mélange peptidique</i>	105
3.2	<i>Migration ionique</i>	108
3.2.1	<i>Compartiment de récupération KCl1</i>	108
3.2.2	<i>Compartiment de récupération KCl2</i>	111
3.2.3	<i>Compartiment d'alimentation</i>	112
3.3	<i>Différence du potentiel membranaire</i>	112
3.3.1	<i>Aux interfaces des membranes d'ultrafiltration (MUF1 et MUF2)</i>	113
3.3.2	<i>Aux interfaces des membranes échangeuses d'ions (MEA et MEC)</i>	117
3.4	<i>Migration peptidique</i>	120

3.4.1	<i>Migration du peptide anionique 4-asp</i>	120
3.4.2	<i>Migration du peptide cationique 4-lys</i>	121
3.5	Colmatage membranaire	123
3.6	Discussion	124
	Conclusion et perspectives	131
	Références bibliographiques	134

Introduction

Aujourd'hui, tout le monde connaît, voire consomme, des aliments santé, fonctionnels ou produits nutraceutiques. Un aliment fonctionnel est un aliment qui peut avoir des effets bénéfiques sur la santé, notamment prévenir des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et l'obésité, ou encore améliorer les fonctions physiologiques. L'Union européenne ne reconnaît pas pour le moment les aliments fonctionnels comme une catégorie distincte d'aliments de la nutrition humaine. Néanmoins, en 2006, la commission européenne a émis des réglementations sur les allégations santé de produits alimentaires comme le contrôle de la publicité et de l'étiquetage (CE 1924/2006). En revanche, le Japon a adopté un système juridique concernant l'allégation santé sur les aliments fonctionnels grâce à l'introduction de la FOSHU (Foods for Specific Health Use) et ce dès 1991. Les entreprises japonaises peuvent ainsi demander une approbation à porter le label FOSHU pour leurs produits alimentaires fonctionnels.

L'action exercée par les aliments fonctionnels est due à une molécule ou un groupe de molécules bioactives qui sont présents en faible concentration dans les aliments conventionnels analogues. Les modes d'action des molécules bioactives sont divers et variés. On peut citer une action antimicrobienne exercée par déstabilisation de la membrane bactérienne ou encore l'association des molécules bioactives à des récepteurs biologiques liés à des maladies chroniques. Les molécules bioactives présentent une très grande diversité : polysaccharides, composés polyphénoliques, peptides bioactifs...

Ces dernières années, les peptides bioactifs connaissent un essor dans les domaines de la santé et de la nutrition humaine. En effet, des peptides à activité biologique sont régulièrement isolés et caractérisés et leurs applications dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique se multiplient. Ainsi, l'aplidine est un depsipeptide anticancéreux isolé à partir d'un organisme marin (*tunicier Aplidium albicans*). Le ProDiet F200 est un anti-stress isolé à partir d'un hydrolysat de caséine. Le Glutamin peptide est un immunomodulateur isolé à partir de protéines de lait et le CholesteBlock est un hypocholestérolémiant obtenu à partir de protéines de soja.

Des travaux de recherche sont également entrepris pour isoler des peptides à activité antimicrobienne dans l'optique d'offrir des solutions aux problèmes de résistance aux antibiotiques conventionnels rencontrés par certains pathogènes. D'autres travaux de recherche ont pour but de remplacer les additifs chimiques de synthèse par des peptides bioactifs afin d'assurer l'innocuité des produits alimentaires.

Les peptides bioactifs sont généralement produits par hydrolyse enzymatique à partir de protéines alimentaires ce qui offre de nombreuses possibilités de valorisation de co-produits. Néanmoins, la séparation des peptides d'intérêt à partir des hydrolysats est nécessaire pour augmenter leur activité biologique. Différentes méthodes allant de la chromatographie aux techniques membranaires ont été développées pour concentrer et/ ou séparer des peptides bioactifs. Les techniques chromatographiques offrent une bonne sélectivité et une faible productivité. Les techniques membranaires, quant à elles, offrent une meilleure productivité mais sont confrontées à une limitation liée à leur faible sélectivité. Afin d'y pallier, un champ électrique a été introduit dans les procédés membranaires, ce qui donne lieu à des procédés électromembranaires.

Récemment, une technique membranaire a été développée et brevetée. L'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF). Cette technologie s'est avérée particulièrement performante pour le fractionnement sélectif d'hydrolysats enzymatiques et l'obtention de fractions enrichies en peptides bioactifs. En effet, des peptides à activité ciblée ont été isolés et/ ou concentrés par EDUF entre autres à partir d'hydrolysats de protéines de soja, de crabe des neiges et de protéines de luzerne. Cependant, en raison du caractère complexe des mélanges peptidiques générés par hydrolyse, les mécanismes impliqués dans la séparation de peptides n'ont pas été parfaitement élucidés.

Dans ce contexte, cette étude s'attache à identifier les principaux mécanismes régissant la séparation de peptides synthétiques contenus dans des solutions modèles avec le procédé d'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration. Pour cela, deux peptides synthétiques cationique et anionique ont été sélectionnés sur la base de leurs propriétés physico-chimiques.

Les objectifs spécifiques de ce travail de thèse ont été les suivants :

- Caractériser les peptides d'étude en termes de mobilité électrophorétique dans différentes conditions expérimentales (pH, force ionique, contre-ions de synthèse).
- Caractériser le transfert avec deux solutions contenant chacune un seul peptide ; anionique et cationique.
- Étudier la séparation simultanée de ces deux peptides.

Le premier chapitre décrit les principaux procédés dédiés à la séparation de biomolécules : protéines, peptides et acides aminés. L'accent est mis sur les procédés électromembranaires. Dans un second chapitre, l'approche expérimentale adoptée est présentée. Enfin, le dernier

chapitre est dédié à la description des mécanismes observés lors des différentes opérations d'électrodialyses étudiées.

Ce travail de thèse a été mené au Laboratoire ProBioGem de l'université de Lille1 en collaboration avec le centre de l'INAF de l'université Laval. Cette collaboration a donné lieu à deux séjours de doctoraux au Québec.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique des procédés séparatifs les plus employés pour isoler et/ ou concentrer des peptides d'intérêt. Pour chacun, le principe, les applications ainsi que les limites seront abordés. L'accent sera mis sur les procédés électromembranaires et plus particulièrement sur l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF).

1 Les acides aminés et peptides-Généralités : Rappels sur les notions de pKa et pHi

Les peptides sont des molécules amphotères composées d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Les acides aminés possèdent des groupements amines et acides carboxyliques (Figure 1). Selon le pH du milieu, ces groupements peuvent être chargés positivement pour la fonction amine et négativement pour l'acide carboxylique, lorsqu'ils sont situés aux extrémités de la chaîne principale de la séquence peptidique. D'autres fonctions des chaînes latérales peuvent également porter une charge (alcool, thiol...).

L'état d'ionisation des groupements fonctionnels d'un acide aminé dépend de leurs constantes de dissociations (pKa). Considérons un acide aminé portant deux fonctions ionisables (Fig. 1) : une fonction acide carboxylique (COOH) et une fonction amine (NH₂) avec leur constante de dissociation respective pKa₁ et pKa₂. Les constantes de dissociation sont déterminées à partir d'une courbe de titration correspondant à un dosage acide/ base de l'acide aminé considéré avec un réactif titrant comme illustré dans la figure 2. Un saut de pH est observé lorsqu'on s'approche du point d'équivalence. Ce dernier correspond au pH du milieu pour lequel 100% du groupement fonctionnel considéré est dissocié. Ce point d'équivalence est déterminé graphiquement à l'aide de la méthode des tangentes. La valeur de pH correspondant au premier point de demi-équivalence (E1) est donnée comme étant la constante de dissociation pKa₁ de la fonction acide carboxylique. À cette valeur de pH, 50% des groupements de la fonction acide carboxylique sont sous la forme COOH et 50% sous la forme ionisée COO⁻. La valeur de pH au deuxième point de demi-équivalence (E2) correspond à la constante de dissociation pKa₂ de la fonction amine. De même, à cette valeur de pH, 50% des groupements de la fonction amine sont sous la forme ionisée NH₃⁺ et 50% sous la forme NH₂. Ainsi, un acide aminé sera ou non chargé à un pH donné. Lorsqu'un acide aminé est sous la forme d'un zwitterion (Fig. 1), on parle de son point isoélectrique (pHi). Le pHi est le pH du milieu pour lequel un acide aminé a une charge nette nulle. Ce point isoélectrique est spécifique à chaque acide aminé. Si on considère le même acide aminé que précédemment, son pHi va correspondre à la valeur de pH pour laquelle ses deux groupements fonctionnels sont ionisés à 100%. À un pH inférieur à son

2 Peptides à activité biologique

Les peptides bioactifs sont définis comme des fragments spécifiques de protéines ayant un impact positif sur la santé humaine (Kitts et Weiler, (2003) ; Bazinet et Firdaous, (2013)). À ce titre, les peptides bioactifs présentent un intérêt particulier pour les industries agroalimentaires comme produits nutraceutiques et pharmaceutiques à des fins thérapeutiques en raison de leur multitude de champs d'action (propriétés antimicrobiennes, anti-hypertensives, anti-cholestérolémiantes, anti-thrombotiques, antioxydantes, immunomodulatrices et opioïdes...) (Hartmann et Meisel, (2007) ; Agyei et Danquah, (2011) ; Udenigwe et Aluko, (2012)).

Certains peptides bioactifs sont multifonctionnels (Meisel et FitzGerald, (2003) ; Meisel, (2004) ; Korhonen, (2009)). Leur activité biologique dépend de leur séquence en acides aminés, de leur taille qui varie de 2 à 20 résidus et de leur charge (Recio et Visser, (1999)).

Actuellement, il existe différents modes d'obtention de peptides bioactifs : hydrolyse enzymatique, synthèse chimique, fermentation ou encore extraction à partir de sources naturelles (Korhonen et Pihlanto, (2006) ; Boudesocque et *al.*, (2012)).

- Hydrolyse enzymatique : C'est le mode d'obtention de peptides bioactifs le plus commun. L'intérêt de l'hydrolyse enzymatique réside dans la diversité des mélanges de peptides obtenus et dans son potentiel d'application élevé, principalement dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et nutraceutique. Des protéases sont utilisées comme catalyseur d'hydrolyse, généralement de la trypsine et/ ou de la pepsine (Korhonen et Pihlanto, (2006)). Chaque protéase permet de couper de manière spécifique une liaison peptidique entre deux acides aminés bien définis. Les peptides d'intérêt sont obtenus à partir de protéines d'origine animale ou végétale. Ainsi, un peptide opioïde (casomorphine-II) a été obtenu par hydrolyse de la caséine du lait (Meisel et Frister, (1989)). Des peptides antimicrobiens ont été extraits à partir d'hydrolysats d'hémoglobine bovine (Froidevaux et *al.*, 2001). Des peptides avec des propriétés tensio-actives, inhibiteurs d'ACE, anti-thrombotique ont été isolés à partir d'hydrolysats de soja (Shin et *al.*, (2001) ; Gibbs et *al.*, (2004) ; Lee et *al.*, (2005)). Un peptide antioxydant a été obtenu par hydrolyse du muscle squelettique du thon (Je et *al.*, (2007)). Un peptide issu de l'hydrolyse par des enzymes digestives de la β -lactoglobuline du lactosérum bovin a montré un effet anti-hypertensif (Pihlanto-Leppälä, (2000)).

- Synthèse peptidique : la synthèse peptidique est réalisée par voie chimique. Elle permet l'obtention de peptides avec des séquences en acides aminés préalablement définies. L'efficacité d'obtention de peptides par voie chimique est rendue plus accessible ces dernières années en raison des progrès des techniques de synthèse. Cependant, cette technique reste coûteuse et limitée pour la synthèse de peptides de taille supérieure à 10 résidus d'acides aminés (Andreu et Rivas (2002) ; Perez Espitia et *al.*, (2012)).
- Recombinaison d'ADN : les peptides sont obtenus par génie génétique. Meister et *al.*, (1994) ont produit un peptide opiacé (β -Casomorphine) à partir de la caséine bovine par clonage du gène codant pour le peptide d'intérêt dans un plasmide d'*E. coli*. Néanmoins, les auteurs ont constaté un faible rendement de cette technique ($\pm 40 \text{ nmol.L}^{-1}$).
- Fermentation : les peptides sont produits via l'utilisation de cultures cellulaires, naturelles ou génétiquement modifiées. Yamamoto et *al.*, (1994) ont rapporté que la caséine hydrolysée par une protéase de *L. helveticus* CP790 avait une activité anti-hypertensive chez le rat. Un peptide inhibiteur d'ACE a été obtenu par d'autres auteurs à partir des protéines du lait (β - caséine) et l'utilisation de la *streptococcus* pour la fermentation (Ashar et Chand, (2004) ; Korhonen et Pihlanto, (2006)).
- Extraction à partir de matières premières d'origine naturelle : cette approche permet l'obtention de peptides non connus ou non accessibles par les voies de synthèse chimique. Ainsi la pseudostéllarine B (peptide cyclique) a été extraite d'une herbe *Pseudostellaria heterophylla* et présente des propriétés antimicrobiennes (Han et *al.*, (2007)).

3 Procédés de fractionnement de mélanges peptidiques

Les peptides bioactifs les plus connus sont produits par hydrolyse enzymatique en utilisant des enzymes digestives (Gunther, (1979) ; Schlimme et Meisel, (1995) ; Korhonen et Pihlanto, (2006)). Il en résulte un mélange complexe formé d'un grand nombre de molécules non bioactives dont il faut extraire ou concentrer les peptides d'intérêt pour augmenter leur activité biologique (Aluko, (2008) ; Udenigwe et Aluko, (2012)).

Les procédés utilisés pour le fractionnement de peptides mettent à profit certaines propriétés des peptides comme la taille, la forme, la charge, le point isoélectrique (tableau 1). Les deux catégories de procédés couramment utilisés pour la séparation des peptides sont les techniques membranaires telles que l'ultrafiltration et la nanofiltration et les techniques

chromatographiques comme l'exclusion stérique et l'échange d'ions (Agyei et Danquah, (2011) ; Udenigwe et Aluko, (2012)).

Le choix du procédé de fractionnement dépend de la pureté requise du peptide d'intérêt. Pour une pureté de plus de 95% à usage pharmaceutique, les techniques les plus utilisées sont les techniques chromatographiques qui offrent une meilleure sélectivité. Pour un usage alimentaire, les techniques membranaires sont les plus utilisées pour le fractionnement de peptides, en raison de leur meilleur rendement à faible coût.

Propriétés du peptide Techniques séparatives	Forme	Taille	Charge	pHi	Activité biologique
Chromatographie d'exclusion stérique	X	X			
Chromatographie échangeuse d'ions			X	X	
Chromatographie d'affinité	X				X
Procédés baro-membranaires		X			
Procédés électro-baro-membranaires		X	X		
Procédés électromembranaires		X	X		

Tableau 1 : Principaux procédés de fractionnement des peptides.

3.1 Procédés chromatographiques

Différentes techniques chromatographiques sont utilisées pour la séparation de peptides bioactifs. On peut citer la chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'affinité et la chromatographie d'exclusion stérique (Bouhallab et *al.*, (1996) ; Crimmins, (1997)).

De par sa haute résolution et sa capacité de traitement, la chromatographie d'échange d'ions est la technique chromatographique la plus couramment utilisée pour la séparation de peptides (Boudesocque, (2010)). Elle possède une résine contenant des groupements ionisés qui peuvent interagir avec les peptides chargés contenus dans la solution à traiter (Fig. 3). Ces derniers s'adsorbent de façon réversible sur l'échangeur d'ions et sont relargués par la résine après changement de la composition de la phase mobile. À l'aide de cette technique, des fractions

peptidiques possédant une charge nette bien définie peuvent être séparées. À titre d'exemple, on peut citer l'obtention de deux fractions de peptides cationiques à partir d'un hydrolysats de protéines de pois (Li et Aluko, (2005)) et de cinq fractions de peptides cationiques à partir d'un hydrolysats de protéines de pois préalablement ultrafiltré (Pownall et *al.*, (2011)). Néanmoins, l'opération de purification doit être répétée plusieurs fois pour isoler le peptide d'intérêt, ce qui représente un inconvénient non négligeable. Par ailleurs, la résine échangeuse d'ions doit être régénérée après chaque opération, excluant la mise en place de procédés en continu. La montée en échelle de cette technique est problématique notamment due à des débits de traitement qui sont relativement faibles et à des problèmes de récupération de produits d'intérêt à partir des gros volumes d'effluents générés.

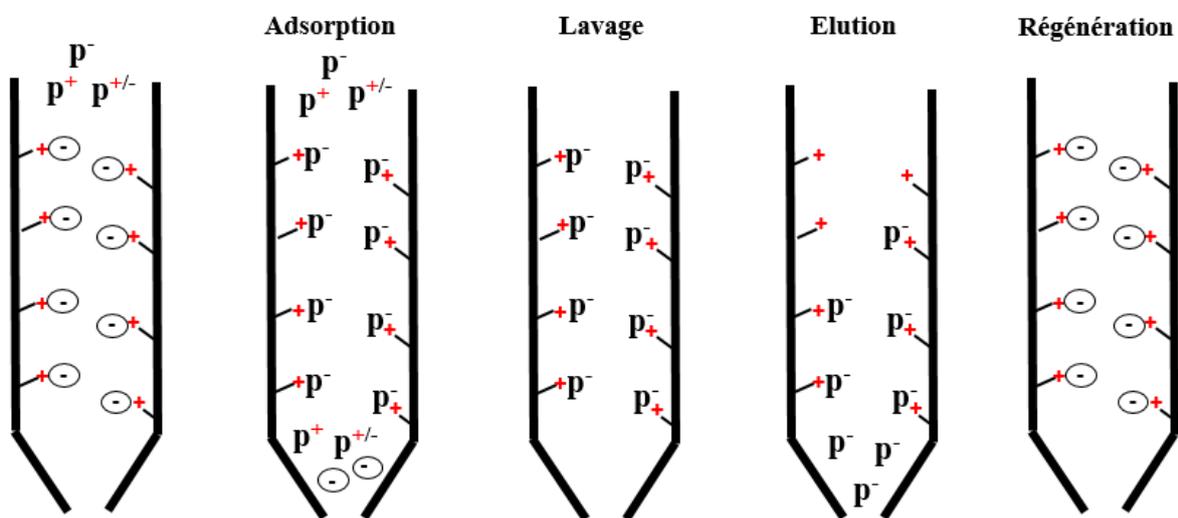


Fig. 3 : Configuration d'une chromatographie échangeuse d'anions. + : charge fixe de la résine ; (-) : charges de la résine échangeable. p⁻ : peptides anioniques ; p⁺ : peptides cationiques et p^{+/-} : peptides neutres.

Ces dernières années, des systèmes de chromatographie liquide/ liquide ont fait leur apparition. Ces technologies offrent des avantages en terme de récupération de composés cibles, de sélectivité, de durée du traitement et de montée en échelle par rapport aux techniques chromatographiques classiques utilisant des supports solide/ liquide. Ainsi, Ma et Ito (1995 et 1997), Ito (2013) ont développé un système biphasique (pH-zone-refining counter-current chromatography) pour la séparation de dipeptides. D'autres systèmes comme la technique d'échange d'ions mixte en chromatographie de partage centrifuge sont utilisés pour concentrer des peptides d'intérêt. En effet, un peptide antihypertenseur, obtenu à partir d'un hydrolysats de protéines blanches de luzerne, a été isolé avec ce procédé (Boudesocque, (2010) ; Boudesocque et *al.*, (2012)). Les mêmes auteurs ont rapporté qu'un fractionnement d'un peptide testé pour le

traitement de la sclérose en plaques (le dirucotide), obtenu à partir d'une protéine basique de myéline, a été concentré avec cette technique.

Cependant, le coût élevé (Bargeman et *al.*, (2000) ; Galier et Roux-de Balmann, (2005)), l'utilisation de solvants qui peuvent altérer les structures peptidiques essentielles pour leur activité biologique et le faible volume de traitement demeurent un frein pour l'utilisation des techniques chromatographiques à grande échelle.

3.2 Procédés baro-membranaires

Les procédés baro-membranaires utilisent comme principale force motrice de transfert, un gradient de pression de part et d'autre d'une membrane. La membrane est une structure poreuse avec des pores de l'ordre de 10 nm à 1 µm pour l'ultrafiltration et de quelques nm pour la nanofiltration. Sous l'effet de la pression, la solution d'alimentation se sépare en deux fractions: le perméat et le rétentat. La nature des éléments qui traversent la membrane vers le perméat dépend de leur poids moléculaire et du seuil de coupure membranaire. Les membranes de filtration permettent de réduire, voire de supprimer la consommation de produits chimiques.

Les applications des procédés baro-membranaires en particulier l'ultrafiltration et la nanofiltration, dans le domaine de fractionnement de mélanges peptidiques (tableau 2) ont récemment fait l'objet de deux articles de revue (Bazinet et Firdaous, (2011 et 2013)).

Procédés	Activités biologiques des peptides isolés	Sources protéiques de l'hydrolysats	Référence
Ultrafiltration	Opioïde	Hémoglobine bovine	Kapel et <i>al.</i> , (2003)
	Antioxydant Inhibiteur d'ACE	Tubercule de pomme de terre	Pihlanto-Leppälä et <i>al.</i> , (2008)
	Antimicrobien	Tubercule de pomme de terre	Kim J-Y., (2005) Kim M-H., (2006)
	La minéralisation des os et des dents, Amélioration de la bioactivité du calcium	Caséine bovine	Brulé et <i>al.</i> , (1982)
	Anticariogène	Caséine bovine	Reynolds, (2002)
	Inhibiteur d'ACE	Glycine du soja	Kuba et <i>al.</i> , (2005)
	Inhibiteur d'ACE	Protéines de poisson	Fujita et <i>al.</i> , (2001)
	Antioxydant	Protéines blanches de luzerne	Xie et <i>al.</i> , (2008)
	Inhibiteur d'ACE	Protéines blanches de luzerne	Kapel et <i>al.</i> , (2006)
Nanofiltration	Antimicrobien Inhibiteur d'ACE Opioïde	Protéines du lactosérum bovin	Pouliot et <i>al.</i> , (1999)
	Antimicrobien Inhibiteur d'ACE Opioïde	β -lactoglobuline du lactosérum bovin	Pouliot et <i>al.</i> , (2000)
	anti-thrombotique	caséinomacropéptide bovin	Martin-Orue et <i>al.</i> , (1999)

Tableau 2 : Principales applications de l'ultrafiltration et de la nanofiltration pour la séparation de peptides bioactifs à partir d'hydrolysats protéiques (adapté de Bazinet et Firdaous, (2013)).

L'utilisation de l'ultrafiltration pour le fractionnement d'hydrolysats peptidiques est limitée par la sélectivité du procédé à cause du faible spectre de masse des peptides du mélange. L'utilisation de la nanofiltration a permis d'améliorer cette sélectivité (Poulin, (2007)).

Par ailleurs, les techniques membranaires sont utilisées pour le fractionnement de molécules de différentes tailles sans tenir compte de leurs charges. Toutefois, la filtration membranaire peut être utilisée pour séparer des composés amphotères de manière sélective à partir de mélanges complexes en agissant sur les charges des composés et de la membrane (interactions composés/membrane). Ceci est obtenu par la variation du pH de la solution ou par l'adaptation de la composition ionique en fonction de la charge désirée (Saksena et Zydney, (1994); Tsuru et *al.*, (1994) ; Timmer et *al.*, (1997 et 1998)). Ainsi, des acides aminés de même taille, la leucine (neutre) et la lysine (basique) par exemple, peuvent être séparés avec une bonne sélectivité.

3.2.1 Limites des procédés baro-membranaires

3.2.1.1 Polarisation de concentration

Phénomène inhérent à tous les procédés membranaires, la polarisation de concentration correspond à une accumulation de manière réversible de particules à la surface de la membrane côté rétentat (Figure 4). La concentration de ces molécules est donc plus élevée au voisinage de la membranaire que dans le reste de la solution. Le phénomène de polarisation de concentration aboutit à une augmentation de la résistance à l'écoulement, provoquant une réduction du flux du perméat, une réduction de la sélectivité membranaire et une augmentation du risque de colmatage (Granier et Bimbenet, (1976)).

Polarisation de concentration

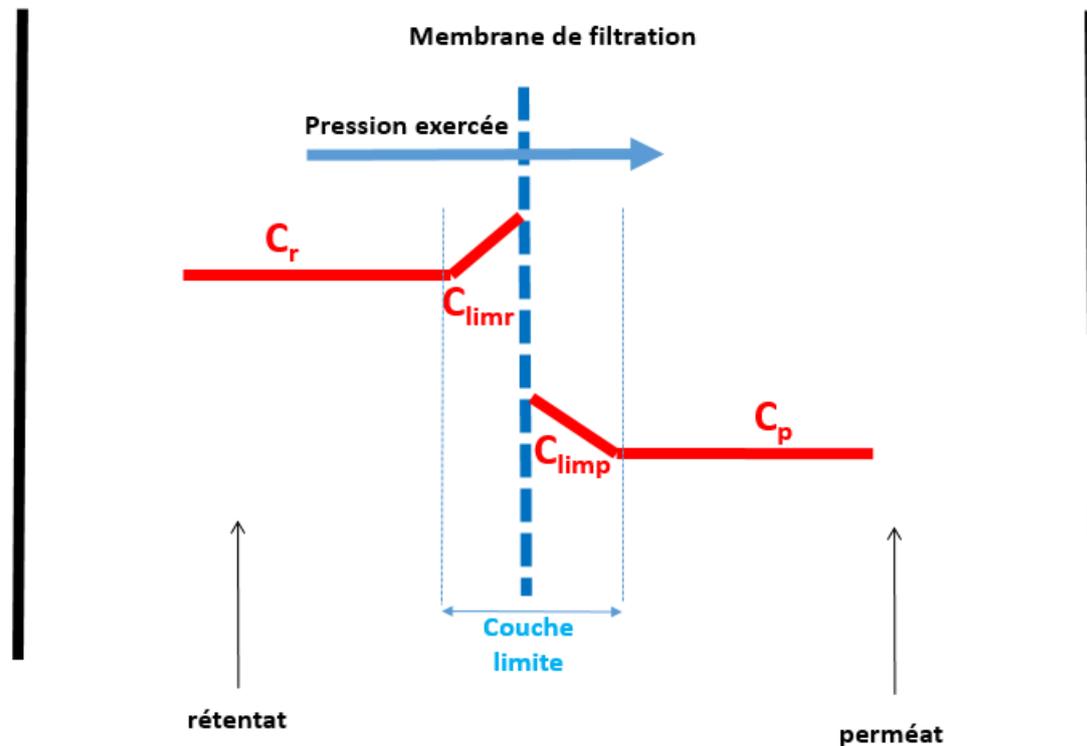


Fig. 4 : Phénomène de polarisation de concentration. C_r : concentration en soluté dans le rétentat ; C_{limr} : concentration en soluté au niveau de la couche limite côté rétentat ; C_{limp} : concentration en soluté dans la couche limite côté perméat et C_p : concentration en soluté dans le perméat.

3.2.1.2 Colmatage membranaire

Le colmatage est défini comme une accumulation irréversible ou permanente de molécules, colloïdes et sels minéraux à la surface ou à l'intérieur des membranes de filtration et provoque la décroissance progressive du flux (Korngold et *al.*, (1970)). En effet, au cours de la séparation et sous l'effet de la pression, le passage des molécules à travers la membrane est forcé vers le perméat. Par conséquent, un colmatage membranaire se forme à la surface par adsorption de molécules et à l'intérieur de cette membrane et obstrue ses pores, ce qui génère une baisse du flux et une modification de la sélectivité au cours du traitement (Marshall et *al.*, (1993)). L'apparition du colmatage est bien référencée dans la littérature (Huisman et *al.*, (2000) ; Marshall et *al.*, (1993) ; Chan et *al.*, (2004)) et les méthodes de nettoyage nécessitent d'utiliser des procédures coûteuses pour les industriels. Le colmatage membranaire dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques comme la concentration, la température, le pH, la force ionique et la nature du matériau membranaire.

Le colmatage membranaire par les peptides ou les protéines s'explique principalement par deux phénomènes. Premièrement, les peptides peu chargés au pH de la séparation forment des agrégats dus à la diminution des répulsions électrostatiques entre eux et obstruent les pores de la membrane (Marshall *et al.*, (1993)). Deuxièmement, les peptides de grande taille chargés positivement interagissent avec les membranes hydrophiles, les plus couramment utilisées (acétate de cellulose, polyethersulfone...), chargées négativement dans une large gamme de pH et obstruent les pores membranaires (Brink et Romijn, (1990)).

3.3 Procédés électro-baro-membranaires

Les techniques baro-membranaires présentent des limites pour la séparation et/ ou la concentration des peptides bioactifs en raison de leur sélectivité et des limitations liées à la polarisation de concentration et au colmatage membranaire. Leur efficacité de séparation peut être améliorée par l'introduction d'une différence de potentiel électrique externe dans le système (Robinson *et al.*, (1993); Daufin *et al.*, (1995)). Le couplage d'une différence de pression et d'un champ électrique donne lieu aux procédés électro-baro-membranaires (Fig. 5). Cette approche a été initialement proposée pour réduire le phénomène de polarisation de concentration (Radovich et Behnam, (1983) ; Rios *et al.*, (1988)).

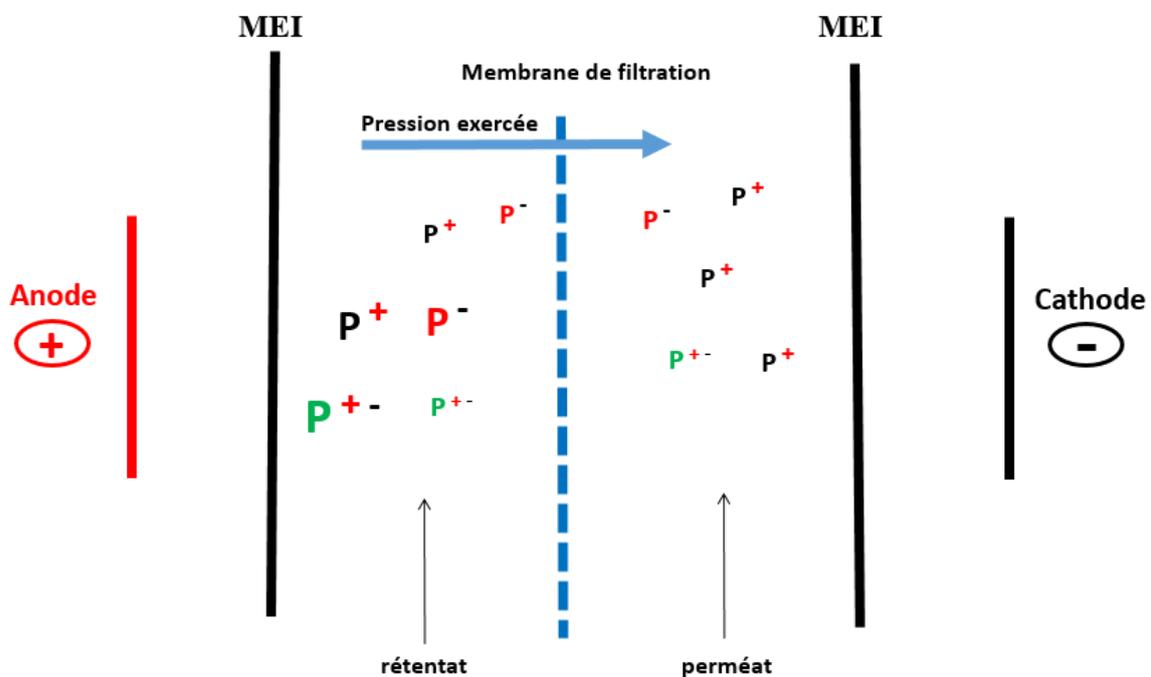


Fig. 5 : Configuration d'un procédé électro-baro-membranaire pour le fractionnement de peptides cationiques. MEI : membrane échangeuse d'ions ; p⁺ : peptides cationiques ; p⁻ : peptides anioniques.

Différents types de procédés électro-baro-membranaires ont été développés dans le but de séparer et/ ou concentrer des molécules chargées. Daufin *et al.*, (1995) et Bargeman *et al.*, (2000 et 2002) ont combiné la filtration membranaire avec un champ électrique en électrofiltration. Dans le cas du procédé développé par Bargeman, des membranes échangeuses d'ions ont été utilisées pour séparer les électrodes du rétentat et perméat. Le but étant de limiter les variations de pH dans ces solutions dues à l'électrolyse de l'eau au voisinage des électrodes.

L'utilisation d'un champ électrique permet de limiter la polarisation de concentration et d'améliorer le transfert des molécules chargées. Ainsi, un hydrolysate de la β -caséine a été étudié en électrofiltration par Daufin *et al.*, (1995) afin d'évaluer l'efficacité de séparation du procédé. Les auteurs ont montré que la migration sélective de peptides chargés s'est considérablement améliorée en présence d'un champ électrique.

L'électrofiltration a été appliquée pour la séparation de la lactoferrine à partir d'un hydrolysate de lactoferrine par Bargeman *et al.*, (2000), ainsi qu'un peptide antimicrobien à partir d'un hydrolysate de caséine- α_{s2} par Bargeman *et al.*, (2002a). Lapointe *et al.*, (2006) ont réalisé la séparation d'une fraction peptidique antihypertensive à partir d'un hydrolysate trypsique de la β -lactoglobuline par l'intermédiaire d'un module d'électrofiltration comprenant une membrane de nanofiltration. De leur côté, Leeb *et al.*, (2014) ont isolé un peptide inhibiteur d'ACE dans un module d'ultrafiltration tangentielle couplé à un champ électrique à partir d'un hydrolysate de la β -lactoglobuline et de micelles de caséine.

Bargeman *et al.*, (2002b) ont montré que la diminution de la pression dans le système et une augmentation de la tension électrique exercée permettent d'obtenir des meilleures migrations de peptides chargés avec une meilleure sélectivité.

3.4 Procédés électromembranaires

Les procédés électromembranaires sont basés sur le couplage de la sélectivité membranaire et l'action d'un champ électrique. Leur sélectivité est obtenue grâce aux différences d'électromigration des solutés à travers les membranes. Ces procédés connaissent aujourd'hui un véritable essor en matière de séparation et de purification de biomolécules (Tanaka, (2003) ; Aider *et al.*, (2008)).

3.4.1 *Électrodialyse conventionnelle*

L'électrodialyse est un procédé de séparation membranaire dans lequel des membranes échangeuses d'ions et un gradient de potentiel électrique sont utilisés pour séparer des espèces chargées à partir d'une solution aqueuse.

L'électrodialyse est très répandue dans le domaine industriel notamment dans la déminéralisation de solutions ou la production d'acides et de bases, l'élimination des minéraux du lactosérum (Bazinet et *al.*, (1998a et b)) et la déminéralisation pour la stabilisation tartrique des vins (Smagghe et *al.*, (1992)).

L'électrodialyse est également utilisée pour la séparation et la production d'acides aminés. Lautsch et *al.*, (1953) ont été les premiers à avoir appliqué les membranes échangeuses d'ions pour la séparation d'acides aminés. Sur le même principe, Traxler (1962) a breveté une technique simple de fractionnement d'acides aminés comprenant entre autres un compartiment de récupération d'acides aminés basiques et un compartiment de récupération d'acides aminés acides. Lee et Hong (1992) ont étudié le transport d'acides aminés à travers une membrane échangeuses de cations, ce qui leur a permis de développer un modèle de prédiction du transport d'acides aminés à un pH donné. Sandeaux et *al.*, (1998) et Grib et *al.*, (1998) ont montré qu'il était possible de séparer des acides aminés en électrodialyse à partir de mélanges complexes comprenant des acides aminés neutres, acides et basiques. Ils ont montré qu'une modification graduelle du pH de la solution permettait une séparation d'acides aminés de même groupe. Kattan Read et *al.* (2011) ont réussi une séparation de l'acide aspartique et de l'acide glutamique à partir d'un mélange complexe d'acides aminés avec des taux de récupérations de 83% et 90%, respectivement. Ils ont ensuite montré qu'il était possible de séparer les deux acides aminés portant une charge négative à pH neutre par une modification de l'acide glutamique en acide γ -aminobutyrique (GABA), électriquement neutre, grâce à l'acide glutamique α -décarboxylase (GAD).

Cependant, l'électrodialyse ne peut être utilisée comme telle pour la séparation de peptides de grande taille en raison du caractère dense des membranes échangeuses d'ions. Récemment, un couplage de membranes échangeuses d'ions avec des membranes de filtration a été mené, l'objectif étant une séparation de molécules chargées avec un poids moléculaire élevé (Ruckenstein et Zeng, (1998)). Ces procédés électromembranaires combinant un champ électrique à des membranes de filtration sans application d'un gradient de pression sont parmi

les technologies les plus récentes du domaine des membranes (Galier et Roux-de Balmann, (2005)).

Galier (2000) a développé un module d'électrophorèse à contacteur membranaire pour la séparation de solutions modèles de protéines. Un module d'électrophorèse à membrane de filtration a été réalisé par Van Nunen (1997) pour la séparation de solutions modèles d'acides aminés et protéines. À la différence de ces deux systèmes où le module membranaire a été conçu à l'échelle laboratoire, Bazinet et *al.* (2005a) ont breveté un système couplant une cellule d'électrodialyse conventionnelle à des membranes de filtration pour la séparation de molécules chargées tels que les peptides, donnant lieu à l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF). Ces trois procédés qui seront développés par la suite offrent des similitudes de conception en termes de module de séparation. D'autres systèmes électromembranaires ont été également développés. On peut citer, Liu et *al.* (1996a, b) qui ont proposé un système d'électrophorèse multicanaux (Multichannel flow electrophoresis) couplé à des membranes de filtration pour la séparation de protéines en mélange (hémoglobine et sérum albumine). Gradiflow™ a été breveté par Margolis (1991) pour le fractionnement de macromolécules en fonction de leur charge et de leur taille. Ce procédé est utilisé pour l'extraction de protéines à partir du plasma (Horvath et *al.*, (1994 et 1996)), du lactosérum (Corthals et *al.*, (1997)) et du blanc d'œuf (Ogle et *al.*, (2003)). Cet appareil a été modifié par Ogle et *al.* (2003) en insérant une douzaine de membranes au seuil de coupure décroissant pour permettre une séparation en cascade (Aider et *al.*, (2008)).

3.4.2 Électrophorèse à contacteur membranaire

L'électrophorèse à contacteur membranaire a été utilisée pour la séparation de biomolécules de différentes charges et tailles telles que l'hémoglobine bovine, l' α -lactalbumine et l'acide poly (L-glutamique) (Galier et Roux-de Balmann, (2011)). Ce module membranaire est composé de quatre compartiments dont deux correspondant à la solution de rinçage des électrodes, un compartiment de diluat et un compartiment de concentrat. Différentes configurations peuvent être envisagées selon la molécule d'intérêt à séparer. Pour une séparation de molécules cationiques, la solution d'alimentation sera délimitée par une membrane échangeuse d'ions (MEI) côté anode et une membrane de filtration. Pour une séparation de molécules anioniques, la solution d'alimentation sera délimitée par une MEI côté cathode et une membrane de filtration. Ce type de configuration (mode élution) est utilisé lorsqu'on désire obtenir des fractions pures. Pour une séparation simultanée de molécules

cationiques et anioniques, la solution d'alimentation est placée dans les deux compartiments de la chambre de séparation, séparés par une membrane d'ultrafiltration (Figure 6). Ainsi, une solution enrichie en molécules cationiques sera obtenue dans le compartiment côté cathode et inversement, une solution enrichie en molécules anioniques sera obtenue côté anode. Ce type de configuration (mode séparation) est utilisé lorsqu'on désire augmenter la productivité du système sans tenir compte de la pureté. À titre d'exemple, une séparation de l' α -lactalbumine à partir d'un mélange contenant de l'hémoglobine bovine a été réalisée (Galier et Roux-de Balman, (2004)). Les auteurs ont montré que la production de l' α -lactalbumine était de $5,5 \text{ mg.h}^{-1}$ en mode élution et de 17 mg.h^{-1} en mode séparation. En revanche, la pureté est passée de 99% en mode élution à 60% en mode séparation.

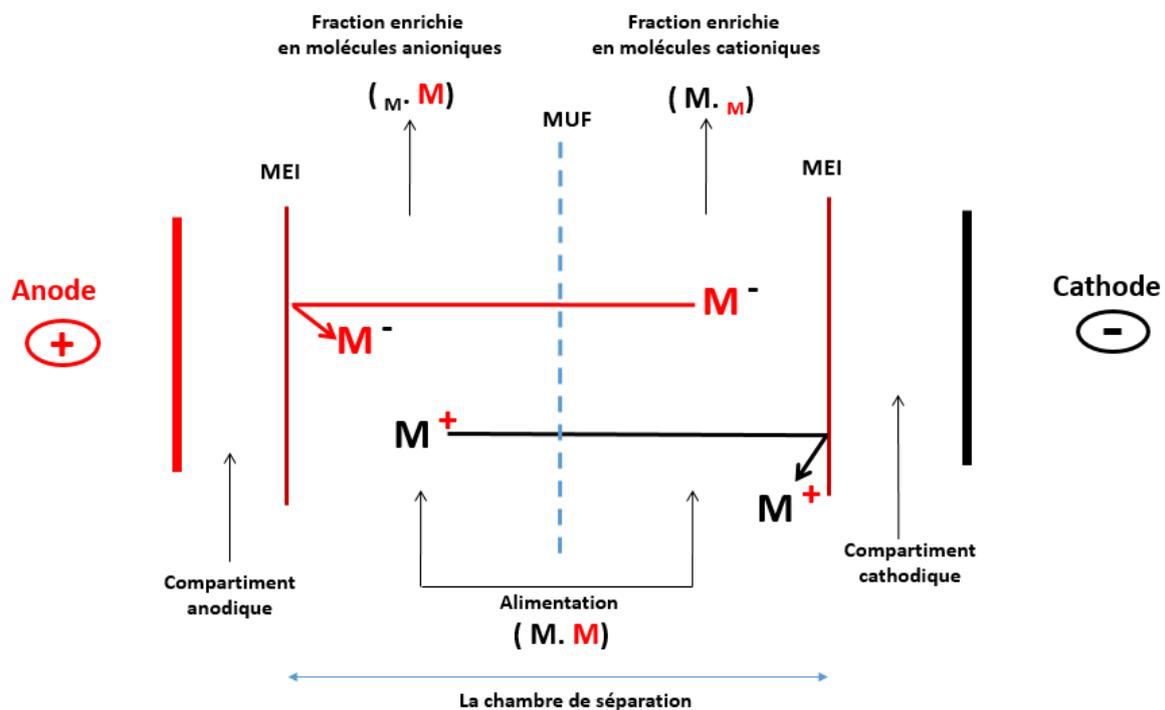


Fig. 6 : Configuration du contacteur à membranes permettant la récupération simultanée de peptides anioniques et cationiques (figure adaptée de Galier et Roux-de Balman, 2004). MEI : membrane échangeuse d'ions; MUF : membrane d'ultrafiltration ; M^+ : molécules cationiques ; M^- : molécules anioniques.

3.4.3 Module d'électrophorèse à membrane de filtration

Van Nunen (1997) a proposé un module où le positionnement des membranes échangeuses d'ions a été inversé. En effet, la membrane échangeuse de cations est positionnée côté anode et la membrane échangeuse d'anions est retrouvée côté cathode. Cette configuration appelée configuration alternative permet la migration des ions des compartiments d'électrolyte vers les compartiments d'alimentation et de récupération. Le module d'électrophorèse à membrane de filtration comporte au minimum quatre compartiments : deux compartiments de rinçage des

électrodes, un compartiment d'alimentation et un compartiment de récupération (Fig. 7). Ce procédé a été utilisé avec succès pour le fractionnement de protéines comprenant une lipase chargée négativement et un lysozyme porteur d'une charge neutre (Van Nunen, (1997)).

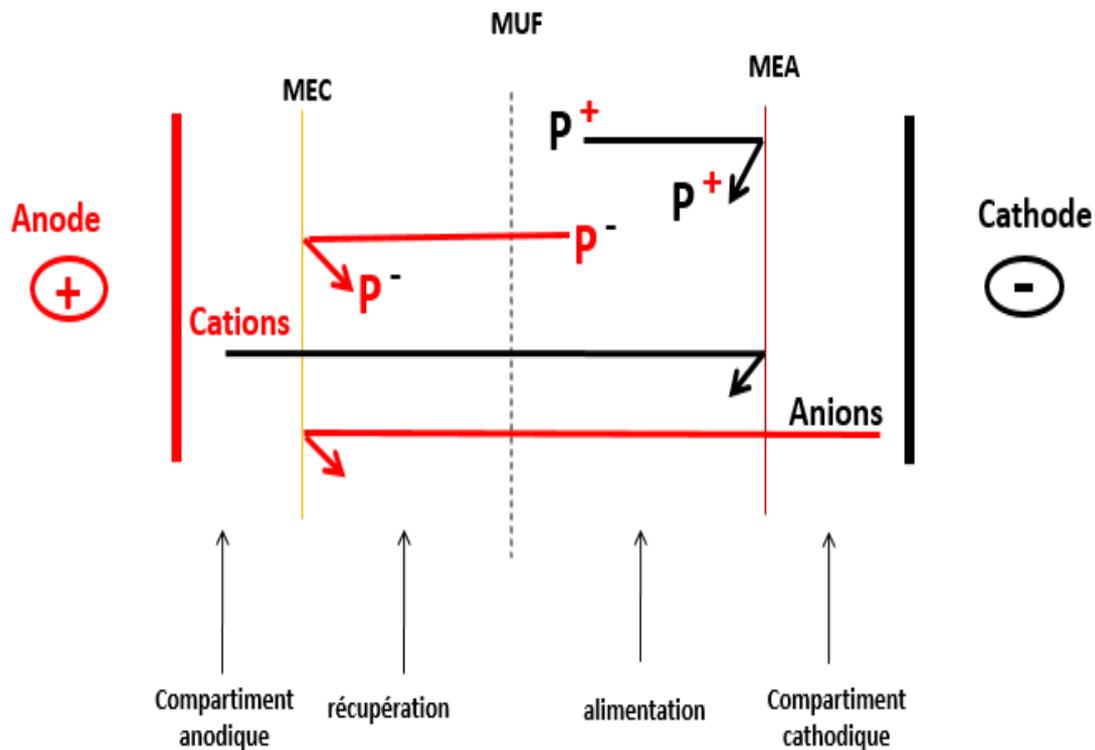


Fig. 7 : Configuration du module d'électrophorèse à membrane pour une séparation d'un peptide anionique (figure adaptée à partir de Van Nunen, (2007)). MEA : membrane échangeuse d'anions ; MEC : membrane échangeuse de cations ; MUF : membrane d'ultrafiltration ; P⁺ : protéines cationiques ; P⁻ : protéines anioniques.

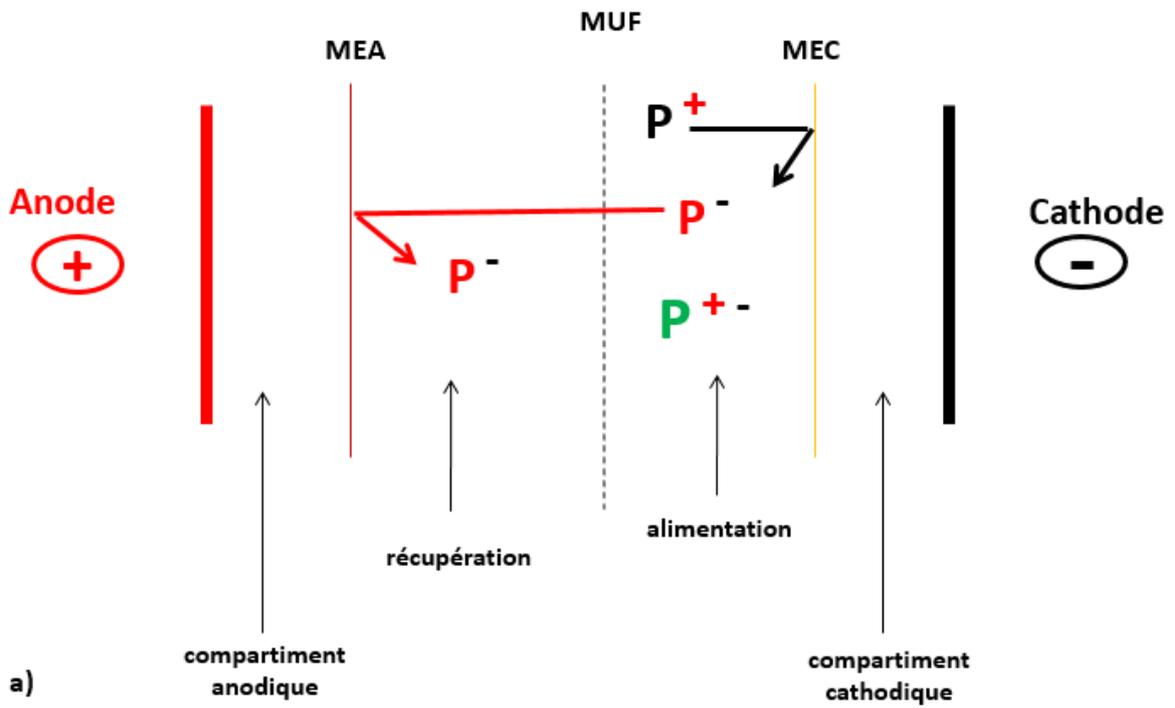
L'électrophorèse à contacteur membranaire et le module d'électrophorèse à membrane de filtration nécessitent la conception de nouveaux appareillages ou encore la mise à l'échelle de modules existant à l'échelle du laboratoire. De plus, les débits de traitement sont généralement faibles ce qui affecte la productivité de ce type de procédé. L'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF) utilise des modules d'électrodialyse classiques, commercialisés et disponibles à différentes échelles pour le traitement de différents volumes de solution. De ce fait, ce procédé se positionne idéalement pour la séparation de peptides bioactifs à l'échelle industrielle.

3.4.4 *Électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF)*

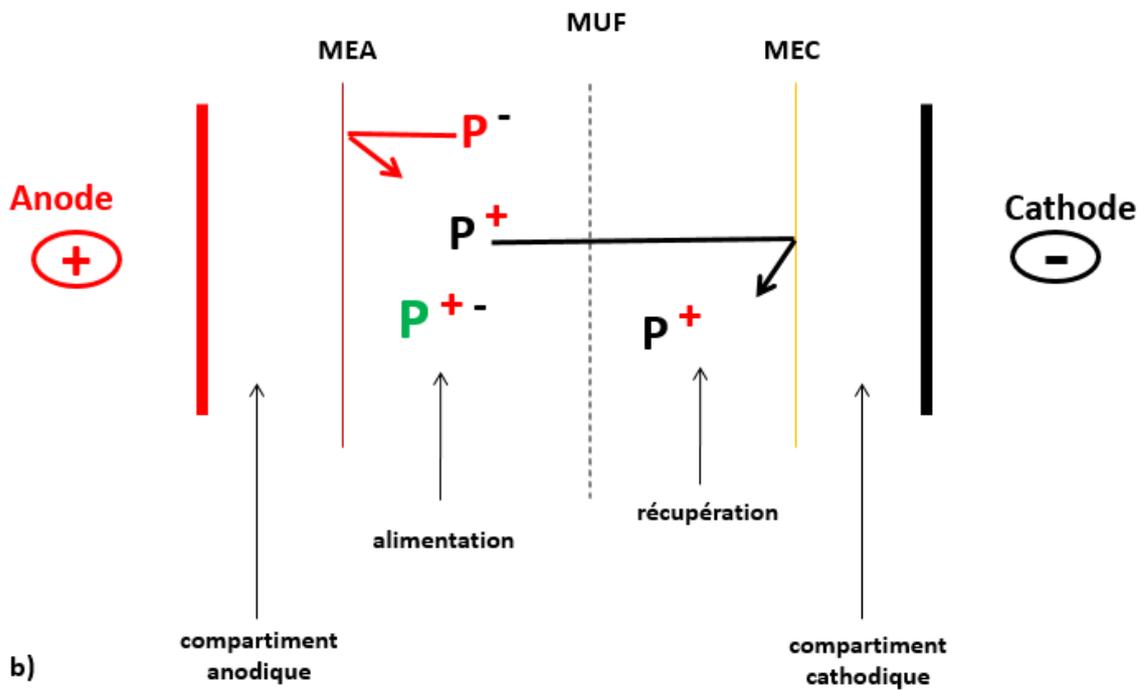
L'EDUF est un procédé hybride où une cellule d'électrodialyse conventionnelle avec des membranes d'ultrafiltration est utilisée et dont la séparation s'effectue en fonction de la charge et de la taille. Selon le peptide d'intérêt qu'on souhaite séparer, différentes configurations membranaires peuvent être envisagées. La configuration anionique permet la séparation de peptides anioniques à partir d'un mélange de peptides (Figure 8a). On distingue quatre compartiments : un compartiment d'alimentation (côté cathode) contenant la solution à traiter, un compartiment de récupération (côté anode) permettant de récupérer le peptide d'intérêt, un compartiment cathodique et un compartiment anodique. Sous l'effet d'un champ électrique externe, les peptides chargés négativement migrent du compartiment d'alimentation vers le compartiment de récupération en passant à travers la membrane d'ultrafiltration. Seuls les peptides anioniques avec un poids moléculaire inférieur au seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration traversent la membrane. Inversement, lorsqu'on désire la séparation de peptides cationiques, le compartiment d'alimentation sera placé côté anode et le compartiment de récupération sera lui placé côté cathode (Figure 8b) : on parle de configuration cationique.

La séparation simultanée de peptides anioniques et cationiques peut être réalisée en plaçant la solution à traiter dans un compartiment d'alimentation délimité par deux membranes d'ultrafiltration (Figure 8c). Les peptides anioniques avec un poids moléculaire inférieur au seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration côté anode (MUF1) migrent vers le compartiment de récupération côté anode (KC11) et les peptides cationiques avec un poids moléculaire inférieur au seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration côté cathode (MUF2) migrent vers le compartiment de récupération KC12 (Figure 8c).

Configuration anionique



Configuration cationique



Configuration simultanée

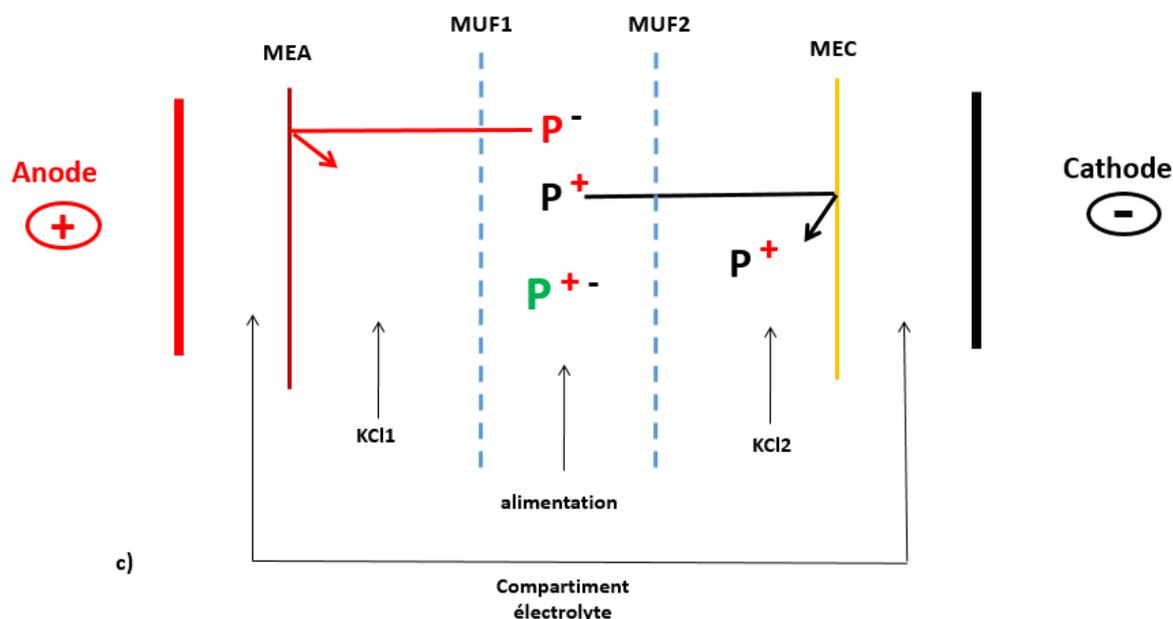


Fig. 8 : Représentation schématique d'une cellule d'EDUF pour a) une configuration anionique b) configuration cationique et c) configuration simultanée. MEA : membrane échangeuse d'anions ; MEC : membrane échangeuse de cations ; MUF : membrane d'ultrafiltration ; P⁺ : peptides cationiques ; P⁻ : peptides anioniques et P^{+ -} : peptides neutres (adaptée de Poulin *et al.*, (2006)).

3.4.4.1 Applications de l'EDUF

L'efficacité de l'EDUF pour la séparation et/ ou la concentration de molécules chargées de petites tailles a été démontrée : les polyphénols du tabac (Bazinet *et al.*, (2005b)), les polyphénols du thé vert (Labbé *et al.*, (2005)), les oligomères de chitosane (Aider *et al.*, (2008)) et les composés phénoliques du Cranberry (Bazinet *et al.*, (2009a)). Quant aux peptides bioactifs, le fractionnement sélectif d'hydrolysats enzymatiques par EDUF en vue d'obtention de fractions peptidiques à activité ciblée a fait l'objet de nombreuses études (Tableau 3).

Activités biologiques	Sources protéiques de l'hydrolysats	Référence
Inhibiteur d'ACE, Antihypertenseur, Antimicrobien, Opiöide	β -lactoglobuline de lactosérum bovin	Bazinet <i>et al.</i> , (2005) Poulin <i>et al.</i> , (2007et 2008)
Inhibiteur d'ACE	Protéines blanches de luzerne	Firdaous <i>et al.</i> , (2008 et 2010)
Antioxydant	Protéines de soja	Langevin <i>et al.</i> , (2012) Roblet <i>et al.</i> , (2012)
Anticancéreux Antimicrobien	Coproduit de crabe des neiges	Doyen <i>et al.</i> , (2011)
Antimicrobien	Lactoferrine bovine	Ndiaye <i>et al.</i> , (2010)
Hypocholestérolémique	β -lactoglobuline	Doyen <i>et al.</i> , (2012 et 2013)
Captation du glucose	Protéines de lin	Doyen <i>et al.</i> , (2014a)
Antidiabétique, Antihypertenseurs	Protéines de lin	Doyen <i>et al.</i> , (2014b)
Effet bénéfique sur le diabète de type II	Protéines de soja	Roblet <i>et al.</i> , (2014)

Tableau 3 : Principales applications de l'EDUF (adapté de Bazinet et Firdaous, (2013)) pour la séparation de peptides bioactifs à partir d'hydrolysats protéiques.

3.4.5 Paramètres électromembranaires

3.4.5.1 Membranes de filtration

La nature de la membrane de filtration peut avoir un effet sur la sélectivité et la productivité des procédés électromembranaires mettant en œuvre des membranes poreuses.

Galier et Roux-de Balmann (2002 et 2011) ont étudié l'influence des interactions électrostatiques entre l' α -lactalbumine, l'acide poly(L-glutamique), la β -lactoglobuline et des membranes d'ultrafiltration. Ils ont montré que le transfert de ces molécules est limité par des interactions électrostatiques de type répulsif avec les membranes d'ultrafiltration utilisées. Ces interactions électrostatiques sont fortement dépendantes de la charge électrique apparente des membranes de filtration (Clifton *et al.*, (1990); Soulet *et al.*, (1998). En outre, Liu *et al.*, (1997))

ont montré que la nature de la surface membranaire, qui présente des charges différentes, influence les interactions avec les protéines en solution et par conséquent leur vitesse de migration. Doyen et *al.*, (2011) ont montré une différence de migration de peptides d'un hydrolysat de crabe des neiges en EDUF selon le matériau membranaire (polyethersulfone ou acétate de cellulose). En effet, une portion de peptides de grande taille a été obtenue dans le compartiment de récupération uniquement avec l'utilisation de la membrane en acétate de cellulose. Ce résultat a été expliqué par les auteurs comme étant dû à une différence de répulsion électrostatique vis-à-vis des peptides entre les deux matériaux utilisés. Seifu Manenda (2013) a observé une différence en termes de migration de peptides d'un hydrolysat de protéines du lactosérum en EDUF entre l'utilisation d'une membrane d'ultrafiltration en PES (polyethersulfone) et d'une membrane d'ultrafiltration en PVDF (polyfluorure de vinylidène). En effet, pour les mêmes conditions opératoires en EDUF, des migrations totales en peptides de $22,94 \pm 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $49,65 \pm 6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ont été obtenues respectivement dans le cas de l'utilisation d'une membrane en PES et d'une membrane en PVDF.

L'effet de seuil de coupure a été étudié par Galier et Roux-de Balmann, (2011) pour la séparation de la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine en électrophorèse à contacteur membranaire. Un seuil de coupure de 30 KDa proche du poids moléculaire de la β -lactoglobuline a engendré une baisse de la migration par effet stérique pour la β -lactoglobuline.

3.4.5.2 Champ électrique

Van Nunen (1997) a montré que la hausse de la force du champ électrique permettait d'augmenter la migration des espèces chargées dans le module d'électrophorèse à membrane de filtration. Ainsi, le flux de la méthionine est passé de $4 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour un courant de 10 A à $1,2 \times 10^{-3} \text{ mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ avec un courant de 40 A. Cependant, l'auteur a également montré qu'il existait une valeur de courant limite, qui, une fois dépassée, n'a plus d'influence positive sur la migration des espèces chargées. En effet, lorsqu'un courant de 80 A est appliqué, le flux de la méthionine a chuté à $4,2 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

En EDUF, Doyen et *al.*, (2013) ont montré que l'augmentation de la tension électrique à des valeurs dépassant le courant limite n'a aucune influence sur la sélectivité du procédé lors de la séparation d'un hydrolysat de crabe des neiges. En revanche, le taux de migration peptidique était proportionnel à la force du champ électrique. Poulin et *al.*, (2007) ont montré que, lors du fractionnement d'un hydrolysat de la β -lactoglobuline, le doublement ou le quadruplement de

la valeur du champ électrique ($2,75 \text{ V.cm}^{-1}$ à $5,5 \text{ V.cm}^{-1}$ ou à 11 V.cm^{-1}) avec une surface membranaire de 10 cm^2 a permis d'augmenter d'autant la migration totale des peptides. Dans la même étude, les auteurs ont également montré que l'augmentation du champ électrique de mêmes valeurs que précédemment, mais avec une surface membranaire de 40 cm^2 , n'a pas d'influence positive sur la migration peptidique. De plus, un phénomène de rétromigration des peptides (migration du compartiment de récupération vers le compartiment d'alimentation) associé à des variations importantes de pH a été observé.

3.4.5.3 Débit

Van Nunen (1997) a montré que l'augmentation du débit de la solution d'alimentation dans le module d'électrophorèse à membrane a permis d'augmenter la valeur de courant limite par le biais de la baisse de l'épaisseur de la couche limite et ainsi d'améliorer le flux protéique. L'augmentation du débit a eu aussi pour effet la diminution du temps de séjour des solutés dans le module aboutissant à un meilleur facteur de séparation du mélange protéique étudié (lipase et lysozyme).

En EDUF, Poulin et *al.* (2008) ont montré que la variation du débit de la solution d'alimentation d'un hydrolysats tryptique de β -lactoglobuline n'a pas eu d'influence sur la migration totale des peptides vers le compartiment de récupération. Toutefois, à la valeur la plus élevée de débit testée (250 mL.min^{-1}), la sélectivité du procédé a été améliorée. En effet, la migration de peptides avec une mobilité électrophorétique faible a été ralentie.

3.4.5.4 pH

Le pH est un paramètre essentiel pour la séparation d'espèces amphotères dans les procédés électromembranaires. En effet, du pH dépend la charge des peptides et de la charge dépend le sens et l'intensité de leur électromigration. La migration la plus élevée des peptides est théoriquement obtenue aux pH les plus éloignés de leurs points isoélectriques.

Plusieurs travaux ont fait état de l'utilisation des procédés électromembranaires pour la séparation et/ ou la concentration de peptides ou protéines et le rôle déterminant du pH sur leur fractionnement a été constaté (Van Nunen, (1997) ; Poulin et *al.*, (2006) ; Firdaous et *al.*, (2009) ; Roblet et *al.*, (2013)). Ainsi, Van Nunen (1997) a montré que si des variations importantes de pH ont lieu dans le système, la migration de la lipase utilisée comme modèle pouvait être ralentie, stoppée ou encore inversée. Poulin et *al.*, (2006) ont également observé une rétromigration des peptides due au pH du compartiment de récupération. Les auteurs ont

conseillé de maintenir le pH des solutions des compartiments de récupération et d'alimentation constant au cours de l'EDUF afin d'éviter ce phénomène. Firdaous *et al.*, (2009) ont réalisé une séparation d'un dipeptide, VW avec un pH_i de 6,46, par EDUF à partir d'un hydrolysate de protéines de luzerne à deux pH différents (3 et 9). Ils ont montré que le taux de migration du peptide à pH 3 est deux fois plus important qu'à pH 9. Galier et Roux-de Balmann, (2011) ont montré que l'utilisation de plusieurs pH, lors de tests de faisabilité, est préférable au changement de seuil de coupure d'une membrane d'ultrafiltration en vue de la séparation de deux protéines. Roblet *et al.*, (2013) de leur côté ont montré que le pH peut avoir une influence sur la charge globale de la membrane de filtration et limiter la migration peptidique en provoquant des interactions peptide/ membrane de type électrostatique.

3.4.5.5 Concentration

- Concentration peptidique

La concentration de la solution d'alimentation est un facteur influençant la migration des molécules chargées. L'augmentation de la concentration en molécules chargées augmenterait en théorie leur migration d'autant. Ainsi, Galier et Roux-de Balmann (2004) ont observé une augmentation de la migration de l' α -lactalbumine passant de 17 $mg \cdot h^{-1}$ à 83 $mg \cdot h^{-1}$ (une augmentation avec un facteur de 5) avec l'augmentation de la concentration de 0,1 $g \cdot L^{-1}$ à 0,5 $g \cdot L^{-1}$. Néanmoins, Van Nunen, (1997) a rapporté qu'une augmentation de la concentration en lipase de 30 fois a eu comme conséquence une augmentation de son flux de seulement 18 fois.

- Concentration ionique

Suwal *et al.* (2014) ont étudié l'effet de la concentration en KCl (1, 3 et 5 $g \cdot L^{-1}$) dans le compartiment de récupération sur le champ électrique local, le taux de migration et la sélectivité peptidique lors d'un fractionnement en EDUF d'un hydrolysate de crabe des neiges. Les auteurs n'ont pas rapporté de différence significative de migration peptidique entre les différentes conditions testées. En revanche, ils ont montré qu'une augmentation de la concentration en KCl induit une augmentation de la taille des pores de la membrane d'ultrafiltration utilisée, ce qui entraîne une migration de peptide de grande taille.

3.4.5.6 Configuration du module

La configuration de la cellule et plus particulièrement le positionnement des membranes échangeuses d'anions et de cations par rapport à la cathode et à l'anode est un facteur influant l'efficacité des procédés électromembranaires. La configuration alternative du module où la

membrane échangeuse d'anions est placée côté cathode et la membrane échangeuse de cations est placée côté anode, permet une meilleure migration avec des facteurs d'augmentation de 1,2 fois (Van Nunen, 1997).

3.4.6 Limites des procédés électromembranaires

Les principaux facteurs limitants intervenant au cours d'une séparation électrodialytique sont le colmatage membranaire, la polarisation de concentration et la densité de courant limite.

3.4.6.1 Colmatage membranaire

L'utilisation d'un champ électrique comme seule force motrice permet de réduire considérablement le colmatage membranaire ((Poulin et *al.*, (2006) ; Firdaous et *al.*, (2009 et 2010) ; Doyen et *al.*, (2011)).

Les composés induisant un colmatage membranaire dans les procédés électromembranaires peuvent être classés en 3 catégories :

- Les tartres : formés de composés minéraux cristallins, ils se déposent à la surface membranaire et entartrent les membranes. Ce phénomène est plus particulièrement observé au niveau de la membrane échangeuse de cations. Exemple, le magnésium précipite sous forme d'hydroxyde à des conditions dépassant le pH 10 et la précipitation du calcium survient aux alentours de pH 7 (Shaposhnik et *al.*, (2002)).
- Les colloïdes : formés d'agrégats de matière en suspension qui se déposent à la surface membranaire, ce qui provoque son encrassement.
- Les composés organiques : notamment formés par les peptides cibles, ils vont établir des interactions de type électrostatique avec les charges fixes des membranes.

Les colloïdes et les composés organiques (peptides, protéines,...) sont généralement chargés négativement à pH neutre, souvent utilisé comme pH de séparation. Les membranes échangeuses d'anions sont ainsi le plus souvent colmatées par des espèces organiques, tandis que les membranes échangeuses de cations sont plutôt colmatées par des espèces inorganiques (Lindstrand et *al.*, (2000a et b)).

Un autre phénomène qui peut entraîner la formation d'un colmatage est la fuite des ions H^+ à travers la MEA. Les ions H^+ issus de la dissociation de l'eau sont attirés par la cathode et profitant d'un petit volume stérique, traversent la membrane échangeuse d'anions sans entrave en se servant des accepteurs de protons (Korngold et *al.*, (1970) ; Roualdes et *al.*, (2002)). Ces

derniers peuvent provoquer la précipitation de certains colloïdes ou protéines amenant à un colmatage membranaire (Bazinet et *al.*, (2003) ; Ayala-Bribiesca et *al.*, (2006) ; Doyen, (2010)).

Le colmatage membranaire est influencé par plusieurs paramètres opérationnels. On peut citer la charge, la taille des molécules à traiter ainsi que la densité de courant. En effet, les particules de petite taille fortement chargées auront tendance à moins colmater les membranes qu'une grosse molécule faiblement chargée. L'augmentation de la densité du courant mène à une migration plus importante des molécules chargées aboutissant à un colmatage plus important (Lindstrand et *al.*, (2000a). Le colmatage membranaire peut également être amplifié par le phénomène de polarisation de concentration (Davis, (1990)).

3.4.6.2 Polarisation de concentration

La polarisation de concentration est liée à l'établissement d'un gradient de concentration au niveau des couches limites des membranes échangeuses d'ions (MEI). Au niveau du concentrat, la concentration en contre-ions à l'interface solution/ membrane échangeuse d'ions est supérieure au reste de la solution (Fig. 9). Inversement, au niveau du diluat, la concentration en contre-ions est inférieure au niveau de la couche limite que dans le reste de la solution. La différence de transport des ions entre les MEI et la solution au voisinage est responsable de ce gradient de concentration. En effet, il a été montré que le transport du courant à l'intérieur des membranes échangeuses d'ions est assuré en quasi-totalité par les contre-ions alors que le transport du courant au niveau de la solution est assuré par les anions et les cations. (Strathmann, (1981) ; Tanaka, (2002) et (2010) ; Bazinet, (2005b)).

La polarisation de concentration entraîne une baisse de la migration des ions côté diluat à travers les membranes échangeuses d'ions et aboutit à l'apparition de la densité du courant limite, ce qui entraîne un phénomène de dissociation de l'eau.

Polarisation de concentration

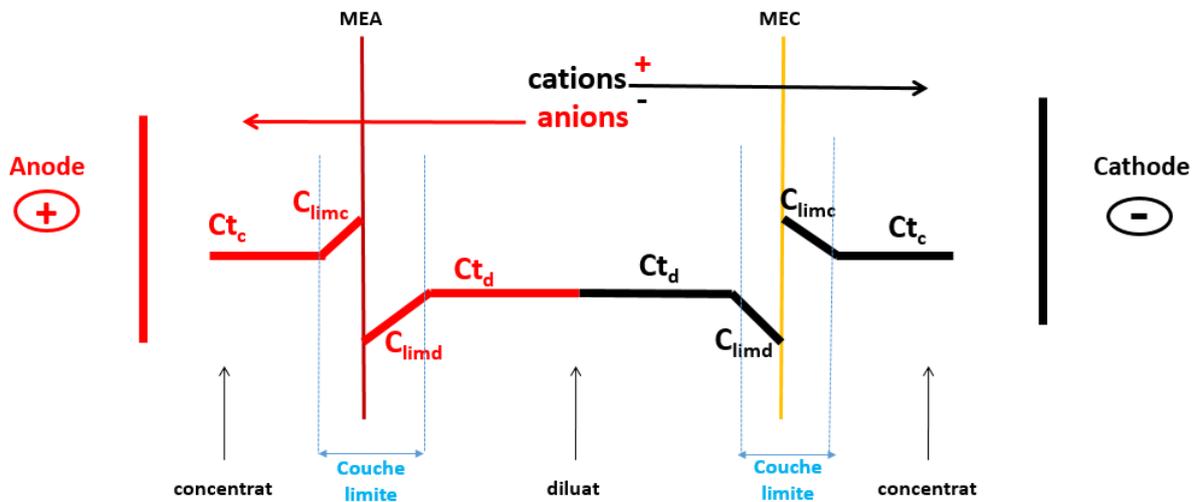


Fig. 9 : Polarisation de la concentration dans les procédés électromembranaires. C_{t_c} : concentration en anions dans le concentrat ; C_{t_c} : concentration en cations dans le concentrat ; C_{t_d} : concentration en anions dans le diluat ; C_{t_d} : concentration en cations dans le diluat ; C_{limd} : Concentration en anions dans la couche limite côté diluat ; C_{limd} : Concentration en cations dans la couche limite côté diluat ; C_{limc} : Concentration en anions dans la couche limite côté concentrat et C_{limc} : Concentration en cations dans la couche limite côté concentrat.

3.4.6.3 Densité du courant limite et dissociation de l'eau

Quand la densité de courant augmente, le flux ionique augmente plus rapidement à l'interface solution/ membrane que dans le reste de la solution. La concentration en contre-ions devient nulle au niveau de la couche limite côté diluat (Bazinet et *al.*, (1998b) ; Greiter et *al.*, (2002) ; Tanaka, (2003)). C'est la densité du courant maximale appelée densité de courant limite (DCL), décrite par Strathmann (1985) qui peut être atteinte sans apparition de la dissociation des molécules d'eau. Au-delà de cette valeur, la quantité de contre-ions pouvant transporter le courant à travers les membranes échangeuses d'ions n'est plus suffisante, ce qui donne lieu à la dissociation des molécules d'eau en protons (H^+) et en ions hydroxyles (OH^-) au niveau des membranes échangeuses d'ions pour pouvoir transporter le courant électrique (Simons, (1984) et (1985); Tanaka, (2002)).

Lorsqu'on mesure l'évolution de l'intensité du courant en fonction de la tension dans un système d'électrodialyse, on obtient une courbe représentant trois parties distinctes (Fig. 10) :

- Une région linéaire, notée (A), où la loi d'Ohm est vérifiée. Une relation linéaire entre le courant transporté et la tension appliquée est observée. La résistance électrique est constante et suit l'inverse de la pente de la droite. Dans cette région linéaire, seules les espèces ioniques rajoutées dans la solution à traiter portent le courant électrique.

- Un palier, noté (B) où l'augmentation de la tension exercée dans le système ne donne pas lieu à une augmentation de l'intensité du courant et donc au transfert d'espèces chargées. Cela signifie également une augmentation de la résistance dans le système. La concentration en contre-ions au niveau de la couche limite des membranes échangeuses d'ions côté diluat est quasi-nulle, la densité du courant limite est atteinte et la loi d'Ohm n'est plus vérifiée.
- Au-delà, l'intensité du courant recommence à croître de nouveau (C). Dans cette région, la densité de courant limite est dépassée attribuée à la dissociation de molécules d'eau en ions H^+ et en ions OH^- . Le transport du courant dans cette phase est principalement assuré par les ions H^+ et OH^- produits.

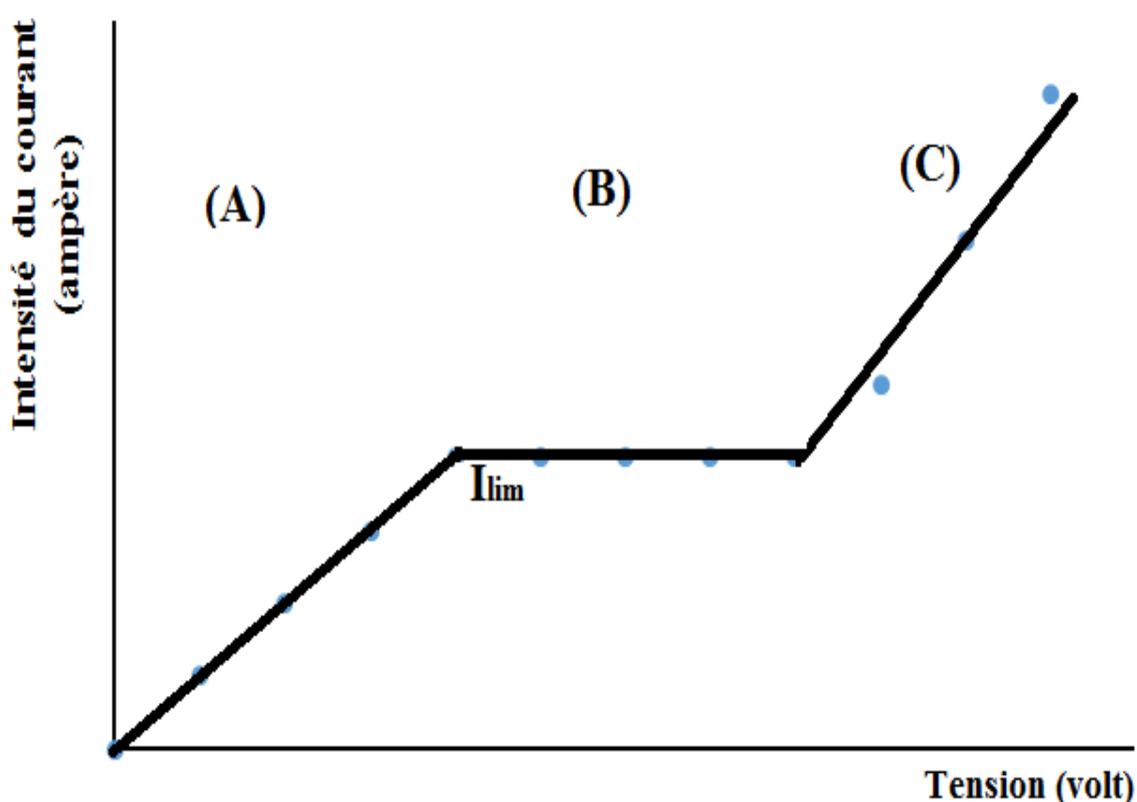


Fig. 10 : Évolution de l'intensité du courant en fonction de la tension appliquée. I_{lim} : dépassement de la densité du courant limite. A : région ohmique ; B : région de la densité de courant limite et C : région dépassant la densité du courant limite.

La dissociation des molécules d'eau survient à la surface des membranes échangeuses d'ions côté diluat (Kressman et Tye, (1969) ; Simons, (1985)). Elle se traduit par une acidification du côté cathodique de la membrane échangeuse d'ions par les ions H^+ et une alcalinisation du côté anodique de la membrane par la formation des ions OH^- (Fig. 11). Cette accumulation des ions H^+ et OH^- entraîne une importante variation du pH aux abords des membranes échangeuses

d'ions (MEI) (Cowan et Brown (1959) ; Kressman et *al.*, (1969) ; Krol et *al.*, (1999)). Cette variation du pH peut provoquer la précipitation et dépôt de particules sur les MEI (Oda et Yawataya, (1968)). Le dépassement de la densité de courant limite entraîne également une surconsommation d'énergie électrique (Tanaka, (2003)).

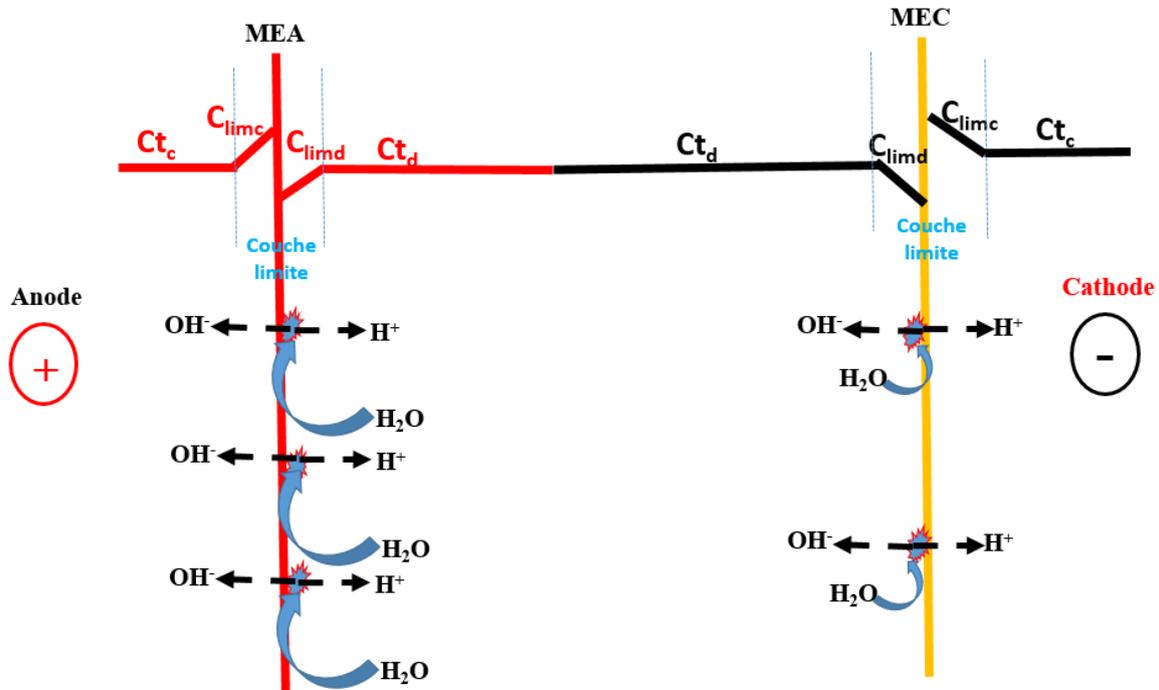


Fig. 11 : Phénomène de dissociation de l'eau dans les membranes échangeuses de cations et d'anions. ⚡ : lieu de dissociation de l'eau ; C_{t_c} : concentration en anions dans le concentrat ; C_{t_c} : concentration en cations dans le concentrat ; C_{t_d} : concentration en anions dans le diluat ; C_{t_d} : concentration en cations dans le diluat ; C_{limd} : Concentration en anions dans la couche limite côté diluat ; C_{limd} : Concentration en cations dans la couche limite côté diluat ; C_{limc} : Concentration en anions dans la couche limite côté concentrat et C_{limc} : Concentration en cations dans la couche limite côté concentrat.

Des méthodes expérimentales ont été proposées dans la littérature pour l'étude de la dissociation des molécules d'eau. L'une d'entre elles consiste à suivre l'évolution du pH au cours de l'électrodialyse. Les valeurs du pH sont ainsi reliées directement à la concentration en ions H^+ dans la solution traitée par la relation :

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Où $[H^+]$ est la concentration molaire des ions H^+ .

Il est aussi possible d'obtenir la concentration en ions OH^- à partir de la concentration en ions H^+ . En effet, le produit de la concentration molaire des ions H^+ par la concentration molaire des ions OH^- est une constante :

$$[H^+] [OH^-] = 10^{-14} \quad (\text{Eq. 2})$$

Par ailleurs, Simons ((1984 et 1985)) et Rubinstein et *al.* (1984) ont montré que la dissociation de l'eau est catalysée essentiellement par les groupements fonctionnels fixes de la membrane échangeuse d'anions : groupes aminés secondaires et tertiaires, produits après dégradation des groupes tetra-acyl-ammonium. De plus, le nombre de transport des contre-ions dans la membrane échangeuse de cations est en général inférieur au nombre de transport de contre-ions dans la membrane échangeuse d'anions (Tanaka, (2002)). De ce fait, l'appauvrissement en contre-ions se produit en premier lieu dans la membrane échangeuse d'anions. Toutefois, la dissociation de l'eau a été également observée dans les membranes échangeuse de cations. En effet, les groupes carboxyliques constituant les charges fixes des membranes échangeuses de cations présentent aussi une activité de dissociation des molécules d'eau (Simons, (1985)).

Par la suite, Rubinstein et *al.* (1979, 1984, 1988) ; Krol, (1997) ; Ibanez et *al.* (2004) ont expliqué le dépassement de la densité de courant limite par un mécanisme d'électro-convection. En effet, lorsque la concentration en contre-ions à la surface d'une membrane échangeuse d'ions est nulle, l'hypothèse d'électroneutralité dans cette zone n'est plus valable. Ceci se traduit par une non-uniformité du champ électrique à la surface de la membrane et peut provoquer un transfert du fluide par convection au sein de la membrane.

En pratique, pour éviter au maximum le phénomène de dissociation des molécules d'eau, la densité de courant est fixée en général à une valeur de 80% de la valeur de la densité de courant limite. Cependant, la dissociation de l'eau peut avoir lieu même à des faibles densités de courant (Korngold et *al.*, (1970)).

La valeur de densité de courant limite n'est pas fixe pour toute la durée du traitement et varie selon la concentration en ions dans le diluat lors d'une configuration conventionnelle du module d'électrodialyse. En effet, l'empilement des membranes échangeuses d'ions (MEA côté anode et MEC côté cathode) dans le cas d'une configuration classique facilite la déminéralisation des solutions traitées et mène inexorablement au dépassement de la densité de courant limite.

La densité de courant (I) passant à travers une membrane échangeuse d'ions est donnée par les flux ioniques des espèces chargées la traversant selon la loi de Faraday :

$$I = F \sum_{i=1}^n z_i J_{(i)} \quad (\text{Eq. 3})$$

F représente la constante de Faraday, $J_{(i)}$ correspond au flux de l'ion i à travers la membrane et z_i représente la valence de l'ion i .

La densité de courant limite (I_{lim}), décrite la première fois par Peers (1956), est donnée par l'équation (Krol et *al.*, (1999)) :

$$I_{lim} = \frac{F D_i}{t_i - \bar{t}_i} \frac{c_i}{\delta} \quad (\text{Eq. 4})$$

D_i est le coefficient de diffusion de l'ion (i), c_i est la concentration en espèce ionique i , \bar{t}_i est le nombre de transport de i dans la membrane, t_i est le nombre de transport de i dans la solution et δ correspond à l'épaisseur de la couche limite.

La détermination de la DCL à partir de cette équation est cependant problématique à cause notamment de paramètres tels que l'épaisseur de la couche limite, qui sont difficilement mesurables. De ce fait, différentes méthodes expérimentales ont été décrites dans la littérature pour la détermination de la DCL. On peut citer celle développée par Cowan et Brown (1959) qui permet de déterminer la densité du courant limite à partir des tangentes de la courbe représentant l'évolution de la résistance en fonction de l'inverse de l'intensité électrique. L'intersection des segments de la droite permet d'obtenir la valeur inverse du courant limite appelé point de polarisation.

Lorsque la densité de courant limite est dépassée, la migration d'espèces chargées peut être stoppée. En effet, Zabolotskii et *al.*, (1986) ont observé que le transport des acides aminés (leucine, valine et l'alanine) n'augmente pas, mais diminue à de grandes valeurs de tension électrique. Martinez et *al.*, (1992) ont étudié la migration de l'alanine dans des conditions où la densité de courant limite est dépassée en électrodialyse. Les auteurs ont montré qu'à des valeurs de pH fortement acides, les ions H^+ entrent en compétition avec le transport de l'alanine et ralentissent sa migration. Shaposhnik et Eliseeva, (1999) et Eliseeva et Shaposhnik, (2000) ont étudié le transport des acides aminés à travers les membranes échangeuses d'ions au cours de l'électrodialyse dans une gamme de courant dépassant trois fois la densité de courant limite. Un « effet barrière » (Fig. 12) a été observé lorsqu'ils ont étudié le transfert de la glycine (G) en électrodialyse conventionnelle. En effet, quand la densité de courant limite n'est pas dépassée, la glycine migre vers l'anode ou la cathode suivant sa charge. Dans le cas où la densité de courant est dépassée, le transport de la glycine à travers les membranes échangeuse d'ions s'arrête. Les auteurs expliquent ce phénomène par l'« effet circulation » de la glycine en présence des ions H^+ et OH^- . Au niveau de la membrane échangeuse d'anions (MEA), les ions OH^- traversent la membrane et passent du côté du compartiment anodique (Fig. 12). Une barrière formée de protons H^+ se crée au niveau de la couche limite de la MEA. La glycine du

compartiment d'alimentation chargée négativement (G^-) migre vers l'anode. Au niveau de la barrière H^+ , la glycine chargée négativement (G^-) est protonée, devient positive (G^+) et migre vers la cathode. Côté membrane échangeuse de cations (MEC), la glycine chargée positivement (G^+) est en contact avec la barrière OH^- , par conséquent, G^+ perd sa charge positive et devient négative (G^-) et migre à nouveau vers l'anode : on parle d'un « effet circulation ».

Metayer et *al.* (1991 et 2002), de leur côté ont décrit un autre phénomène dit « effet de facilitation » où la protonation par les ions H^+ d'une molécule amphotère de charge neutre permet d'augmenter sa charge et de migrer sous l'effet du champ électrique à travers une membrane échangeuse d'ions.

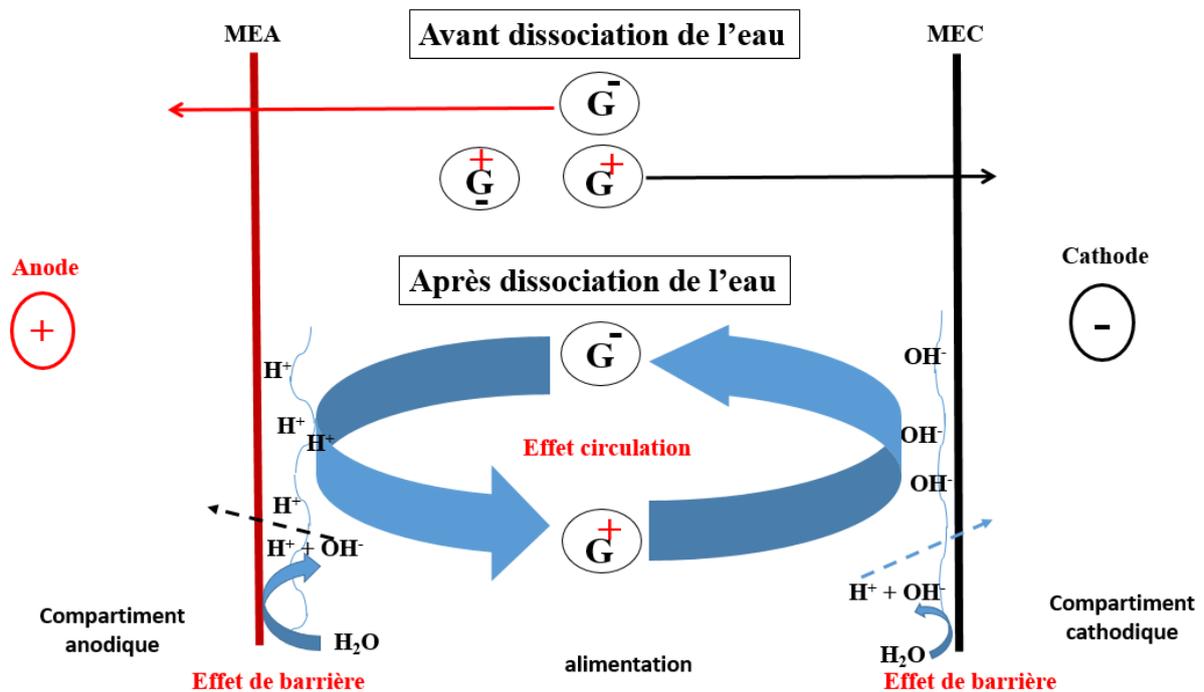


Fig. 12 : Représentation schématique de l'« effet circulation » de la glycine (G) lorsque la densité de courant limite est dépassée. MEA : membrane échangeuse d'anions ; MEC : membrane échangeuse de cations.

3.4.7 Transfert de matière dans les procédés électromembranaires

Les équations de Nernst-Planck ont été largement utilisées dans la littérature pour exprimer le transfert de matière de solutés à travers une membrane. Le transfert de matière dans les procédés impliquant comme seule force motrice, un champ électrique est théoriquement régi par trois phénomènes : la diffusion, l'électro-osmose et l'électromigration.

3.4.7.1 Diffusion

La polarisation de concentration et la différence de concentration en composés de part et d'autre des membranes entraînent une formation d'un flux diffusionnel dans la couche limite visant à la mise en place d'un équilibre. Le flux de matière par diffusion (J_d) d'une espèce i est exprimé par la loi de Fick tel que :

$$J_{d(i)} = - D_i \frac{dC_i}{dx} \quad (\text{Eq. 5})$$

Où D_i est le coefficient de diffusion de l'espèce i et $\frac{dC_i}{dx}$ correspond à sa concentration en tout point x de la couche limite.

3.4.7.2 Electro-osmose

Sous l'effet d'un champ électrique externe, les contre-ions en contact avec les charges fixes de la membrane entraînent du solvant au cours de leur migration provoquant un flux électroosmotique (Helfferich, (1962)). Le flux électroosmotique (J_{eo}) est donné par l'équation :

$$J_{eo} = v C_i \quad (\text{Eq. 6})$$

v représente la vitesse du transport convectif et C_i est la concentration en espèce i dans la solution.

Cette équation peut être reliée à la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) et au champ électrique (\vec{E}) selon l'équation (Galier et Roux-de Balman (2001)) :

$$J_{eo} = \mu_{eo} C_i \vec{E} \quad (\text{Eq. 7})$$

La mobilité électroosmotique dépend à la fois des caractéristiques de la membrane d'ultrafiltration (la taille des pores et la charge électrique), mais aussi de la nature du solvant telle que son pH, la force et la composition ionique.

La relation Helmholtz-Smoluchowski (Smoluchowski, (1918)) peut également être utilisée pour exprimer le flux électroosmotique :

$$J_{eo} = \frac{i \varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\mu \chi S} \quad (\text{Eq. 8})$$

Où i présente le courant, ε_0 est la constante diélectrique du vide, ε_r est la constante diélectrique relative de l'eau, ξ correspond au potentiel zêta de la membrane, μ est la viscosité dynamique, χ est la conductivité électrique, \vec{E} est le champ électrique appliqué et S est la surface de la membrane.

3.4.7.3 Électromigration

L'électromigration est le phénomène dominant de la migration lorsque la force motrice du procédé est une différence de potentiel électrique. Sous l'influence d'un champ électrique \vec{E} , une espèce chargée i se déplace avec un flux d'électromigration ($J_{e(i)}$) proportionnel à sa concentration (C_i) et à sa mobilité électrophorétique ($\mu_{e(i)}$) telles que :

$$J_{e(i)} = \mu_{e(i)} C_i \vec{E} \quad (\text{Eq. 9})$$

La mobilité électrophorétique d'une espèce est une caractéristique très spécifique exploitée dans le cas des procédés électromembranaires pour la séparation de molécules d'intérêts tels que les peptides. Cette mobilité électrophorétique est donnée par l'équation :

$$\mu_{e(i)} = \frac{D_i Z_i F}{RT} \quad (\text{Eq. 10})$$

D_i est la constante de diffusion de l'espèce i , Z_i est la valence de i , F est la constante de Faraday, R est la constante des gaz parfaits et T correspond à la température.

Le transfert de masse d'un composé chargé (i) est décrit par l'équation de Nernst-Planck étendue (Newman, (1991)) correspondant à la combinaison des phénomènes de diffusion, d'électro-osmose et d'électromigration selon l'équation :

$$J_{(i) \text{ total}} = -D_i \frac{dC_i}{dx} + (\mu_{e(i)} + \mu_{eo}) C_i \vec{E} \quad (\text{Eq. 11})$$

Toutefois, comme les membranes échangeuses d'ions possèdent une permselectivité aux ions, d'autres paramètres tels que le potentiel de Donnan, le nombre de transport et la permselectivité membranaire définissent le transfert de matière en leur sein.

3.4.7.4 Nombre de transport

La sélectivité d'une membrane échangeuse d'ions est donnée par son nombre de transport (\bar{t}_i). Le nombre de transport représente la fraction de courant transporté par une espèce ionique i (I_i) par rapport à l'ensemble du courant électrique transporté à travers une membrane échangeuse d'ions (I). Le nombre de transport d'une espèce i est défini par :

$$\bar{t}_i = \frac{I_i}{I} \quad (\text{Eq. 12})$$

Le nombre de transport peut être également déterminé à partir du flux ($J_{(i)}$) d'une espèce i tel que :

$$\bar{t}_i = \frac{J_{(i)} Z_i}{\sum_i J_{(i)} Z_i} \quad (\text{Eq. 13})$$

Par définition, le nombre de transport de toutes les espèces ioniques de la solution est égal à 1 tel que :

$$\sum_i \bar{t}_i = 1 \quad (\text{Eq. 14})$$

Le rapport des fractions de courant transporté par les anions et cations est exprimé par la permselectivité (P) des membranes échangeuses d'ions. Pour une membrane échangeuse de cations, la permselectivité est donnée par :

$$P = \frac{\bar{t}(\text{cations}) - \bar{t}(\text{anions})}{1 - \bar{t}(\text{anions})} \quad (\text{Eq. 15})$$

Dans le cas idéal, les co-ions ne traversent pas la membrane, on aura donc $P = 1$.

Objectifs de travail

L'étude bibliographique nous a montré la haute sélectivité de l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration dans le fractionnement de biomolécules. En effet, de nombreuses applications du procédé d'EDUF pour la séparation et/ ou la concentration de biomolécules actives ont été récemment publiées (Labbé *et al.* (2005), Poulin *et al.* (2006) et Firdaous *et al.* (2010)). La haute sélectivité du procédé a été par ailleurs démontrée pour le fractionnement de peptides bioactifs contenus dans des hydrolysats enzymatiques: séparation d'un peptide antihypertenseur (Firdaous *et al.* (2009)), de peptides anticancéreux (Doyen *et al.* (2011)), de peptides antioxydants (Langevin *et al.* (2012)) et de peptides antibactériens (Doyen *et al.* (2012)).

Cependant, même si ces études ont démontré la sélectivité élevée du procédé, en tenant compte de la complexité des mélanges peptidiques produits par hydrolyse enzymatique à séparer, les mécanismes de sélectivités impliqués en EDUF n'ont pas été complètement élucidés. En outre, contrairement à l'électrodialyse conventionnelle où les mécanismes de transfert des acides aminés à travers les membranes échangeuses d'ions ainsi que les limites du procédé sont bien décrits (Lee et Hong, (1992) ; Bobershova *et al.* (2002) ; Kulintsov *et al.* (2000) et Eliseeva *et al.* (2000)), aucun travail complet n'a été réalisé sur les mécanismes de transfert de peptides en EDUF. Toutefois, Galier *et al.* (2001) et van Nunen (1997) ont décrit les phénomènes de transfert de matière respectivement en électrophorèse à contacteur membranaire et au sein d'un module d'électrophorèse à membranes. Ils ont alors démontré que la force motrice de ces procédés, similaires à l'EDUF, est gouvernée principalement par électromigration.

Dans ce contexte, une approche fondamentale de mécanisme de transfert de matière a été développée pour comprendre et contrôler les phénomènes régissant la séparation en EDUF. Notre objectif est la compréhension des mécanismes de transfert de peptides anionique et cationique en électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration. Pour se faire, nous avons sélectionné un peptide anionique : l'acide tétra-aspartique (4-asp) et un peptide cationique : la tétra-lysine (4-lys) sur la base de leurs propriétés physico-chimiques.

Dans un premier temps, la mobilité électrophorétique de chaque peptide a été mesurée à différentes conditions expérimentales (pH, concentration ionique, contre ions de synthèse...). À ce stade, nous chercherons à déterminer les conditions expérimentales optimales pour l'électromigration des deux peptides en EDUF.

Dans un second temps, le fractionnement d'une solution simple en EDUF a été réalisé en tenant compte des résultats de mobilité électrophorétique. L'objectif étant la mise en évidence des mécanismes de transfert individuel des peptides en EDUF.

Enfin, le fractionnement simultané des deux peptides a été mené dans le but d'une compréhension des interactions peptide/ peptide et la mise en place de mécanisme de transfert d'un mélange peptidique en EDUF. En parallèle, une EDUF dans une configuration simultanée avec du KCl seul a été entreprise afin de mettre en évidence d'éventuels transferts compétitifs entre les peptides cationique/ anionique et les ions potassium/ chlorure.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1 Peptides synthétiques

Deux peptides synthétiques modèles ont été retenus au cours de cette étude :

- La tétra-lysine (4-lys) : peptide basique/ cationique ayant un point isoélectrique théorique de 11,01 et une masse molaire de 530,71 Da. Il comporte cinq fonctions amines et une fonction acide carboxylique libres. Théoriquement, il est chargé positivement à $\text{pH} < 11$.
- L'acide tétra-aspartique (4-asp) : peptide acide/ anionique avec un pH_i théorique de 3,31 et une masse molaire de 478,37 Da. Ce peptide comporte cinq fonctions acides carboxyliques et une fonction amine libres. Il est théoriquement chargé négativement à $\text{pH} > 3,3$.

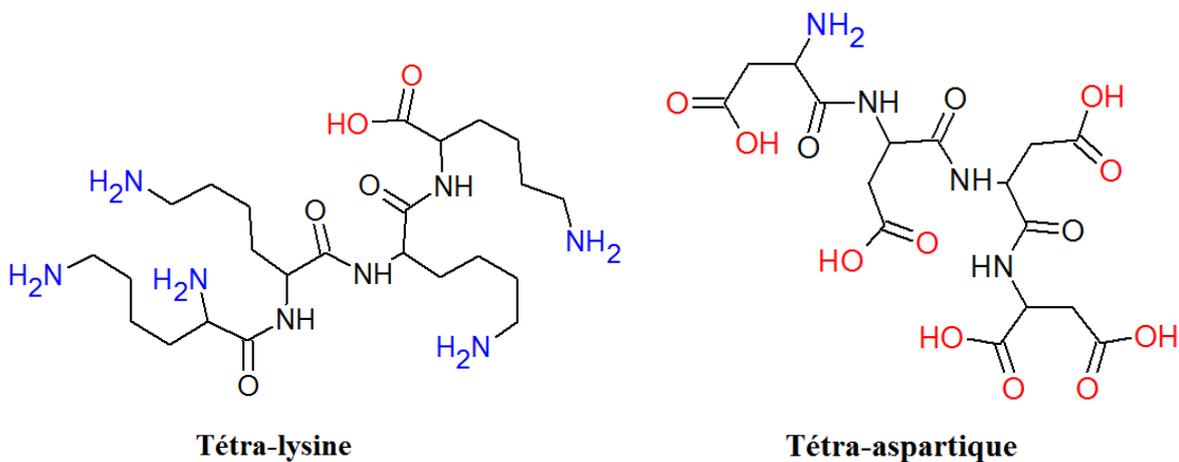


Fig. 13 : Structure chimique d'une tétra-lysine et d'un acide tétra-aspartique. NH_2 : fonction amine et COOH : fonction acide carboxylique.

La protonation et la dé-protonation des groupements fonctionnels des peptides en fonction du pH déterminent leur charge. La figure 14 correspond aux charges nettes théoriques des deux peptides en fonction du pH de la solution. Cette figure montre qu'à pH inférieur à 3, 4-asp est chargé positivement (+1). Si on augmente le pH à 3,3, le peptide 4-asp se retrouve sous forme zwitterion (électriquement neutre) correspondant à son point isoélectrique (pH_i). Au-delà de son pH_i , 4-asp porte une charge négative. À l'inverse, le peptide 4-lys est chargé positivement lorsque le pH est inférieur à 11. La figure 14 souligne également que dans une gamme de pH allant de 5 à 9, le peptide 4-lys porte une charge positive (+4) et le peptide 4-asp est porteur d'une charge négative (-4).

La charge théorique d'un peptide en fonction du pH (Figure 14) est déterminée par les pK_a , correspondant aux différentes constantes de dissociation des acides aminés qui le composent. Il a été rapporté que les pK_a d'un acide aminé peuvent varier, lorsque ce dernier est lié à d'autres

acides aminés. En effet, les acides aminés au voisinage de l'acide aminé considéré et la structure du complexe ainsi formé influencent ses pKa (Landers, 1997). Le tableau 4 correspond aux différents pKa de la lysine et de l'acide aspartique sous leur forme libre et liée.

Ainsi, on peut définir des constantes de dissociation pour la lysine et l'acide aspartique :

- pKa₁, correspondant à la dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO⁻.
- pKa₂, correspondant à la dé-protonation du groupement amine de sa forme NH₃⁺ à NH₂.
- pKa_r, correspondant à la dé-protonation des groupements acides carboxyliques ou amines de la chaîne latérale de l'acide aminé.

Dans le cadre de notre étude, nous retiendrons les valeurs de pKa de la forme liée des acides aminés (Fig.14).

	pKa de l'acide aminé lié			pKa de l'acide aminé libre		
	C pKa ₁	N pKa ₂	chaîne latérale pKa _r	C pKa ₁	N pKa ₂	chaîne latérale pKa _r
Acide aspartique	2,75	8,60	3,50	2,02	9,85	3,82
Lysine	3,20	7,70	10,30	2,17	9,06	10,66

Tableau 4 : Les constantes de dissociation de l'acide aspartique et de la lysine sous forme acide aminé libre et liés (adapté de Landers, 1997).

Les peptides 4-asp et 4-lys utilisés dans les expériences ont été synthétisés par CanPeptide (Montréal, Canada) avec une pureté de 98%. Un contre-ion lors de la synthèse peptidique est généralement utilisé pour faciliter la conservation des peptides. Le plus couramment utilisé est l'acide trifluoroacétique : TFA : CF₃COO⁻ + H⁺. Lors de cette étude, deux types de contre-ions, le TFA et/ ou l'acide chlorhydrique : HCl : Cl⁻ + H⁺, ont été testés dans certaines mesures de la mobilité électrophorétique des deux peptides.

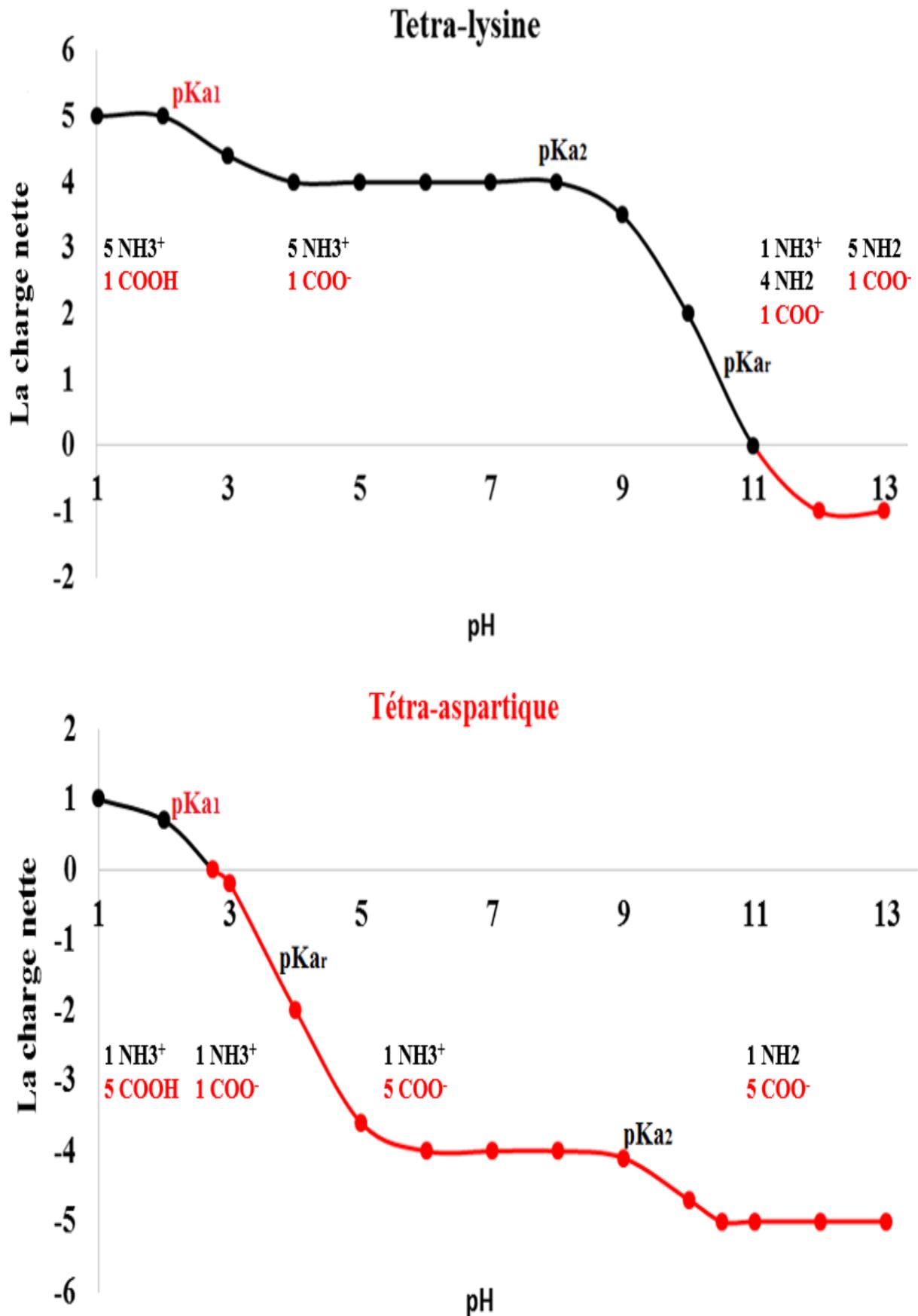


Fig. 14 : Charge théorique (source : <http://pepcalc.com/ppc.php>) et la prédominance des différentes formes acido-basiques du peptide 4-lys a) et du peptide 4-asp b) en fonction du pH. pKa adaptés de Landers, (1997).

2 Mesure de la mobilité électrophorétique des peptides 4-asp et 4-lys

2.1 Mesure par zétamétrie

2.1.1 Principe

Lorsqu'une particule chargée est mise en contact avec une solution d'électrolyte, il se produit au niveau de l'interface particule-solution une répartition des charges qui conduit à un équilibre thermodynamique. La couche du liquide qui entoure la particule est représentée sous la forme de deux couches. Une première couche correspondant à la région située dans les premières couches moléculaires du solvant au-delà de la surface de la particule et comportant des ions fortement liée à cette dernière : la couche de Stern. Une seconde couche, externe à la première, plus diffuse, présentant une distribution ionique déterminée par les forces électriques : la couche de Gouy-Chapman. Les deux couches forment la double couche électrique ou couche de Debye (Fig. 15). Le potentiel à la surface de contact entre la particule et la solution est appelé potentiel zêta.

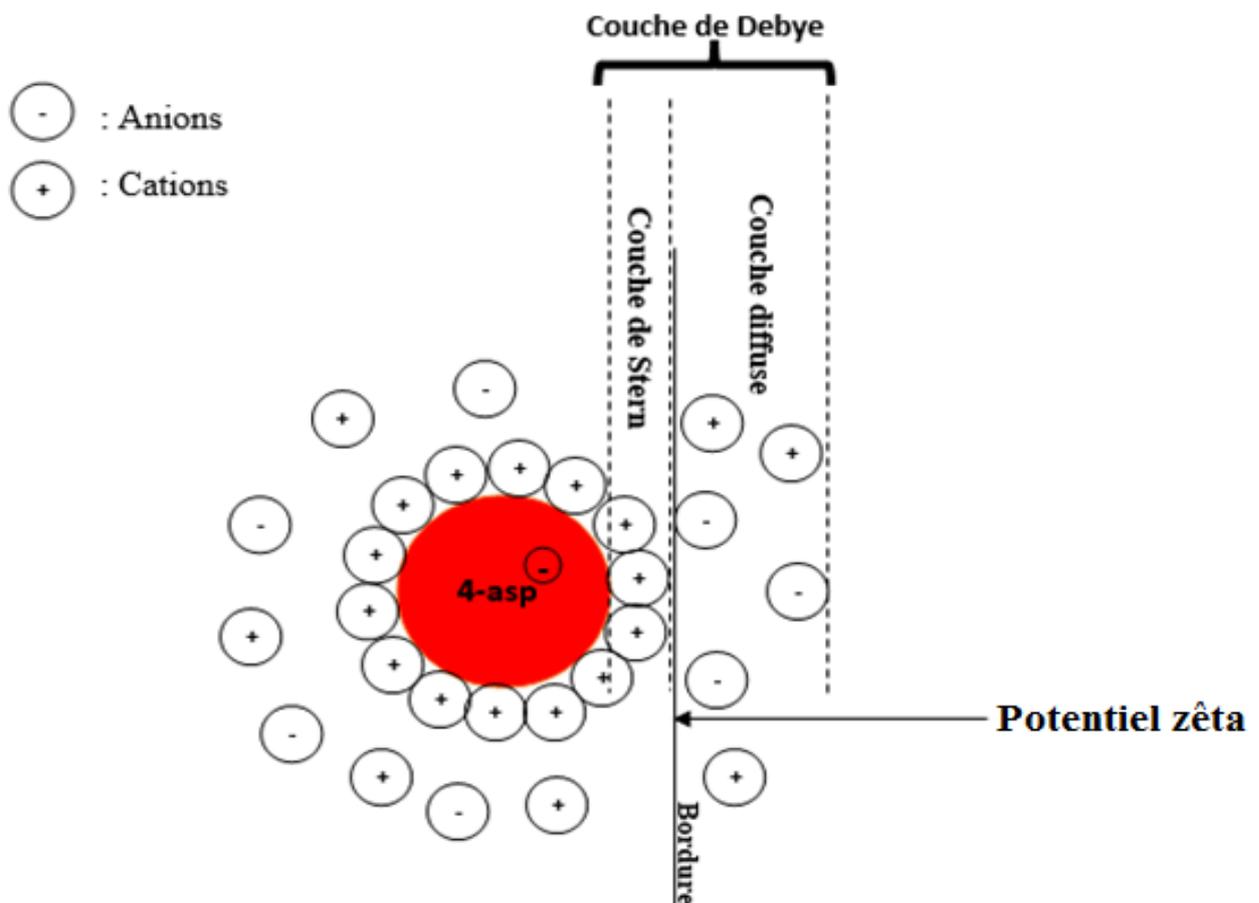


Fig. 15 : Schéma représentant le potentiel zêta d'un peptide chargé négativement (adapté de Grossman et Colburn (1992)).

La mesure du potentiel zêta est basée sur la mesure de la mobilité électrophorétique. En effet, dans un champ électrique E, les particules chargées contenues dans la solution sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Il s'établit un équilibre entre les forces coulombiennes et les forces de frottement conduisant à une vitesse limite de déplacement des particules V. La mobilité μ_e de la particule est définie par la relation :

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (\text{Eq. 16})$$

La valeur du potentiel zêta est calculée à partir de celle de la mobilité électrophorétique selon l'équation de Henry tel que :

$$\xi = \frac{3\mu_e \eta}{2 \varepsilon f(\kappa a)} \quad (\text{Eq. 17})$$

Où ξ représente le potentiel zêta, μ_e la mobilité électrophorétique, η la viscosité, ε la constante diélectrique et $f(\kappa a)$ correspond à la fonction d'Henry, qui varie entre 1 pour des forces ioniques faibles et 1,5 pour des forces ioniques élevées.

L'équation 17 montre que la mobilité électrophorétique dépend du potentiel zêta, de la viscosité, donc de la température, de la force ionique de la solution et des ions présents (Marinova et *al.*, 1996).

2.1.2 Mesure de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer 2000

La mobilité électrophorétique moyenne des peptides 4-asp et 4-lys a été mesurée en utilisant un dispositif commercial le Zetasizer 2000 system (Malvern Instruments Ltd, Worcs, United Kingdom) équipé d'un système de spectroscopie de corrélation de photons (PCS). La mesure du potentiel zêta des molécules se fait grâce à un laser Doppler. Un standard (DTS5050, Malvern instruments) est utilisé pour l'équilibrage de l'appareil. Les mesures sont effectuées à 80 Volt avec un temps de mesure de 60 secondes. La température est maintenue à 25°C pendant les mesures. Le pH des solutions est mesuré avec un compteur pH (SP20 symphonie modèle, VWR, États-Unis). La concentration peptidique utilisée est de 0,1% et le contre-ion de synthèse peptidique est du TFA. Les tests sont réalisés dans l'eau ou le KCl à 0,5 g.L⁻¹ à différents pH (3, 5, 7,10 et le pHi théorique du peptide) par ajout de HCl ou KOH. Les concentrations peptidiques et ioniques retenues sont celles envisagées ultérieurement dans les expériences d'électrodialyse. Chaque mesure est réalisée en triplicata.

2.1.3 Mesure de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer Nano ZS

Le Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd, Worcs, Royaume-Uni) a été également utilisé pour déterminer la mobilité électrophorétique des peptides. Cet équipement utilise une technique plus sensible dite d'analyse de phase de la lumière diffusée pour la mesure du potentiel zêta.

Le calibrage de l'appareil est réalisé avec un standard (DTS1230, Malvern Instruments) d'un potentiel zêta de -68 ± 7 mV à 25 °C. Le potentiel zêta des peptides synthétiques est mesuré par le mode de titration à 25 °C avec des cellules jetables de type DTS1061 (Malvern). Le pH de la solution est ajusté automatiquement par ajout de 1, 0,1 ou 0,01 M de KOH. La concentration en peptide des échantillons était de 0,1%. Les différentes variables étudiées sont le pH (2-12), contre-ion de synthèse (TFA: $\text{CF}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ ou HCl: $\text{Cl}^- + \text{H}^+$) et la force ionique (0 et 0,5 g.L⁻¹ de KCl). Les mesures sont effectuées en triplicata.

2.2 Mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire

2.2.1 Principe

La mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire permet de déterminer une mobilité apparente (μ_{app}) pour les peptides étudiés selon l'équation :

$$\mu_{app} = \frac{L_d L_t}{V t} \quad (\text{Eq. 18})$$

Où L_d représente la longueur du capillaire jusqu'au détecteur, L_t est la longueur totale du capillaire, V est le voltage appliqué et t le temps de rétention de la molécule considérée.

Cette mobilité apparente comprend la mobilité électrophorétique et la mobilité électroosmotique. En effet, la paroi interne du capillaire en silice est formée de groupement silanols qui se dé-protonnent à des valeurs de pH supérieur à 2 pour former une couche polyanionique (Si-O^-) chargés négativement. Un flux électroosmotique se craint dès lors qu'un champ électrique est appliqué et qu'un cation est présent dans la solution à traiter. L'acétone, présentant un pKa de 20, est utilisé comme marqueur neutre afin de déterminer l'apport du flux électroosmotique sur la mobilité apparente. La soustraction de cet apport donne la mobilité électrophorétique de la molécule considérée.

2.2.2 Appareillage

Les mesures ont été effectuées grâce à un appareil ProteomeLab™ PA800 (Backman Coulter, Californie, USA) équipé d'une lampe UV. La longueur d'onde utilisée est de 214 nm, typique des liaisons peptidiques. Les mesures sont effectuées à 25°C avec un voltage de 15 KV pendant 60 minutes et un capillaire en silice de 75 µm de diamètre est utilisé. Le pH de la solution est ajusté par ajout de 1, 0,1 ou 0,01 M de KOH ou HCl. La concentration peptidique utilisée est de 0,1% avec du TFA comme contre-ion de synthèse. Les différentes variables étudiées étaient le pH (2-12) et la force ionique (0 ou 0,5 g.L⁻¹ de KCl). Les mesures sont effectuées en triplicata.

3 Séparation de solutions peptidiques par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration

3.1 Séparation de solutions peptidiques simples

3.1.1 Pilote d'électrodialyse

Le pilote d'électrodialyse a été fabriqué au laboratoire. Il comprend une cellule d'électrodialyse de type MicroFlow (ElectroCell, AB, Täby, Suède) développant une surface membranaire de 10 cm². La cellule définit quatre compartiments distincts. Chaque compartiment est relié indépendamment à un réservoir externe gradué. Les solutions circulent grâce à quatre pompes centrifuges (Iwaki France, Marcoussis, France) et les débits sont contrôlés grâce à des débitmètres (Kobold Instrumentation, Cergy-Pontoise, France). Les membranes échangeuses d'ions sont de type AMX-SB pour la membrane anionique et CMX-SB pour la membrane cationique (Eurodia, Pertuis, France). La membrane d'ultrafiltration est en polyéthersulfone avec un seuil de coupure de 10 KDa (Eurodia, Pertuis, France). La différence de voltage est obtenue grâce à un générateur HQ power™ PS3003.

3.1.2 Protocole expérimental

Les expériences sont réalisées avec 300 mL de solution peptidique à pH 7. La solution est composée du peptide (4-asp ou 4-lys) à 0,1% et du KCl à 0,5 g.L⁻¹. Les expériences sont réalisées en mode batch avec deux configurations membranaires différentes :

- une configuration anionique (Fig. 16a) : le compartiment d'alimentation comprenant la solution peptidique 4-asp est délimité par la membrane échangeuse de cation et la membrane d'ultrafiltration. Cette configuration permet la migration, sous l'effet d'un

champ électrique, du peptide 4-asp chargé négativement à pH 7 du compartiment d'alimentation vers le compartiment de récupération localisé du côté de l'anode.

- Une configuration cationique (Fig. 16b) : le compartiment d'alimentation comprend la solution peptidique 4-lys. Il est délimité par la membrane échangeuse d'anions et la membrane d'ultrafiltration. Cette configuration permet la migration du peptide 4-lys chargé positivement à pH 7 du compartiment d'alimentation vers le compartiment de récupération localisé du côté de la cathode.

Le compartiment de récupération contient initialement 300 mL d'une solution de KCl à 2 g.L⁻¹. La solution d'électrolyte contient 300 mL d'une solution de Na₂SO₄ à 20 g.L⁻¹.

Le débit est de 200 mL.min⁻¹ dans les compartiments d'alimentation et de récupération et de 300 mL.min⁻¹ dans les compartiments d'électrolyte. Le pH est ajusté à 7 par ajout de KOH ou de HCl à 0,1 M dans les compartiments d'alimentation et de récupération. La tension de 20V correspondant à un champ électrique de 10 V.cm⁻¹ ainsi que le pH de 7 sont maintenus constants tout au long de l'EDUF. Des échantillons sont prélevés dans chaque compartiment avant l'application du champ électrique et toutes les 30 min. L'intensité du courant ainsi que la conductivité électrique sont mesurées toutes les 30 min dans les compartiments d'alimentation et de récupération. Un ajout de 0,5 g.L⁻¹ et 2 g.L⁻¹ de KCl est réalisé après 4 heures d'électrodialyse dans les compartiments d'alimentation et de récupération, respectivement. L'électrodialyse est arrêtée au bout d'une heure après ajout de KCl. À la fin de l'expérience, les membranes sont séchées pour être analysées afin de déterminer leur quantité d'azote membranaire.

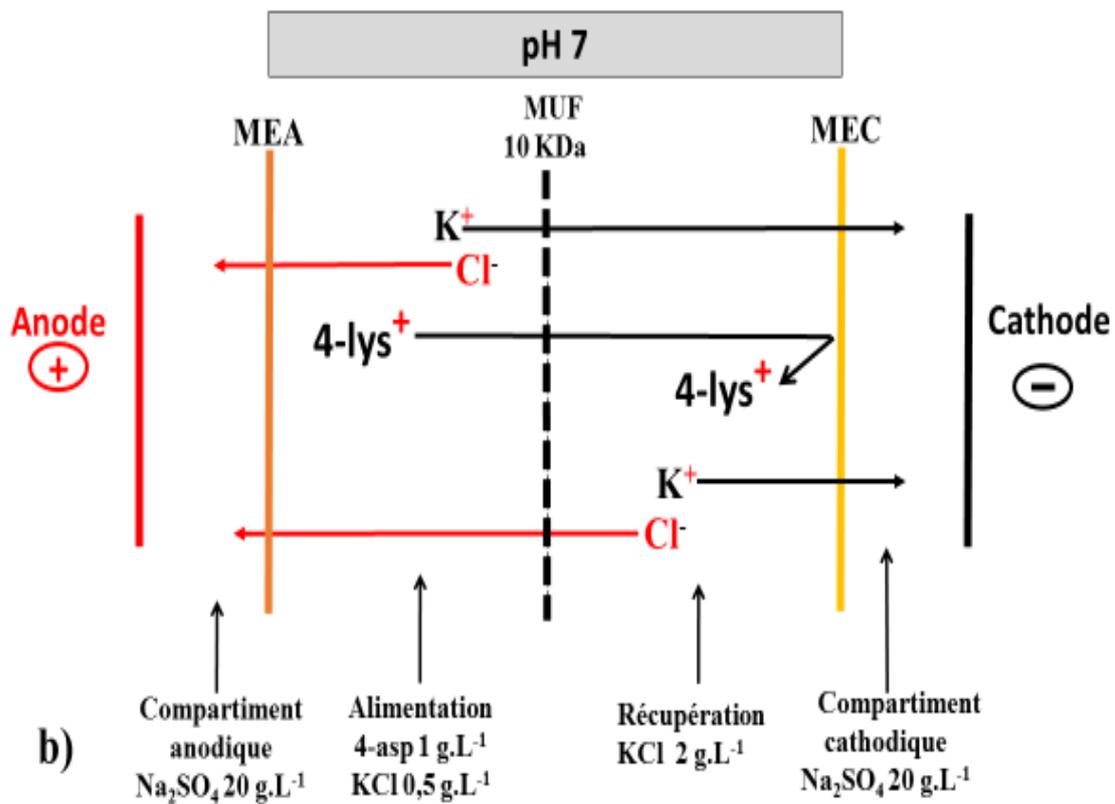
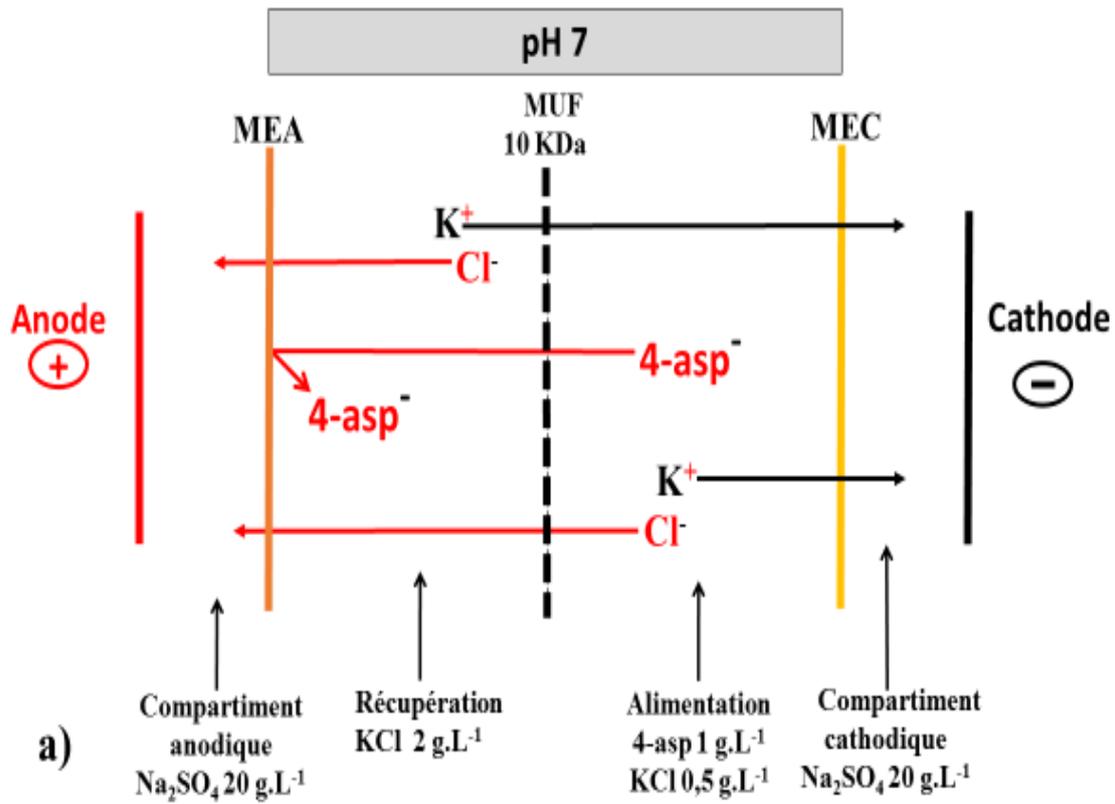


Fig. 16 : Configurations membranaires a) pour un peptide anionique (acide tétra-aspartique : 4-asp) et b) pour un peptide cationique (la tétra-lysine : 4-lys). MEC: membrane échangeuse de cations; MEA: membrane échangeuse d'anions; MUF: membrane d'ultrafiltration.

3.2 Fractionnement de mélanges peptidiques

3.2.1 Pilote d'électrodialyse

Le pilote d'électrodialyse qui a servi aux expérimentations a été fabriqué au département des sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval (Québec, Canada). La cellule d'électrodialyse utilisée pour le fractionnement du mélange peptidique est de type MP (ElectroCell, AB, Täby, Suède) développant une surface membranaire de 100 cm². La configuration de la cellule définit cinq compartiments distincts (Fig. 17) :

- Un compartiment d'alimentation délimité par deux membranes d'ultrafiltration.
- Deux compartiments de récupération : un compartiment de récupération (KCl1) du peptide anionique. Il est délimité par la membrane d'ultrafiltration (MUF1) et la membrane échangeuse d'anions. Un compartiment de récupération (KCl2) du peptide cationique. Il est délimité par une membrane d'ultrafiltration (MUF2) et la membrane échangeuse de cations.
- Deux compartiments d'électrolyte.

À l'exception des compartiments d'électrolyte, chaque compartiment est relié indépendamment à un réservoir externe. Les solutions circulent grâce à quatre pompes centrifuges (Iwaki Co. LTD, Tokyo, Japon) et les débits sont contrôlés grâce à des débitmètres (Gilmont Instrument Co, Barrington, IL, USA). Les membranes ainsi que les électrodes sont identiques à celles utilisées avec la cellule MicroFlow. La différence de voltage est maintenue constante grâce à un générateur de tension variable de 0 à 100V.

3.2.2 Protocole expérimental

Compte tenu du volume mort du pilote et de la cellule d'électrodialyse utilisés, il n'a pas été envisageable de travailler avec un volume de solution de 300 mL comme pour le traitement des solutions simples. Ainsi, l'électrodialyse est réalisée avec un volume de solution de 350 mL. Deux types d'expériences ont été réalisés. Une première expérience avec une solution saline de 0,5 g.L⁻¹ comme solution d'alimentation. Une deuxième expérience avec comme solution d'alimentation la solution peptidique à 0,05 % en chaque peptide afin d'aboutir à une concentration peptidique totale de 0,1 % comme pour les solutions peptidiques simples. Les solutions peptidiques sont obtenues par ajout de KCl à 0,5 g.L⁻¹.

Dans les deux cas, les solutions de récupération KCl1 et de récupération KCl2 contiennent initialement 350 mL d'une solution de KCl à 2 g.L⁻¹. Les compartiments d'électrolyte contiennent 350 mL d'une solution de Na₂SO₄ à 20 g.L⁻¹. Les expériences sont réalisées en mode batch. Les débits des solutions d'alimentation, de récupération et de rinçage des électrodes sont identiques à ceux retenus avec les solutions peptidiques simples.

Une tension de 42V correspondant à un champ électrique de 10 V.cm⁻¹ ainsi qu'un pH de 7 sont maintenus constants tout au long de l'électrodialyse. Une paire d'électrodes en platine (Goodfellow, Huntingdon, Royaume-Uni) a été placée aux interfaces de chacune des membranes utilisées afin de mesurer la différence de potentiel électrique membranaire durant l'électrodialyse (Fig. 18). Chaque paire d'électrodes est connectée à un multimètre numérique et la différence du potentiel électrique est relevée toutes les 5 min.

La surface membranaire effective étant 10 fois plus élevée que celle développée par le module Microflow, le temps de l'expérience est ramené à 70 min. L'ajout de KCl dans les compartiments de récupération (2 g.L⁻¹) et d'alimentation (0,5 g.L⁻¹) s'est effectué après 40 min d'expérience. Des échantillons sont prélevés dans chaque compartiment au début de l'expérience avant l'application du champ électrique et toutes les 10 min. L'intensité du courant ainsi que la conductivité sont mesurés toutes les 5 min dans les compartiments d'alimentation et de récupération KCl1 et KCl2. Les membranes ne sont retirées et séchées qu'après trois répétitions d'électrodialyse pour être analysées.

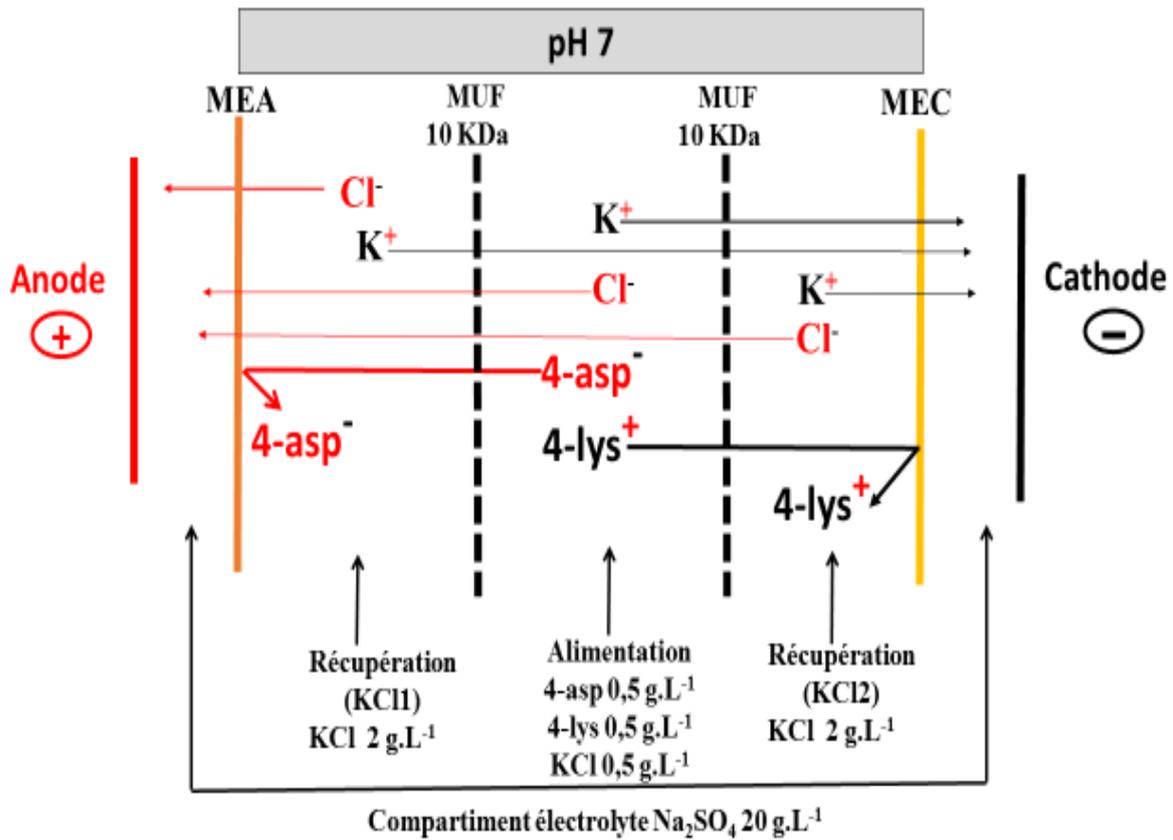


Fig. 17 : Configurations membranaires pour une séparation simultanée d'un peptide anionique (4-asp) et cationique (4-lys) en EDUF. MEC: membrane échangeuse de cations; MEA: membrane échangeuse d'anions; MUF: membrane d'ultrafiltration, P : peptide.

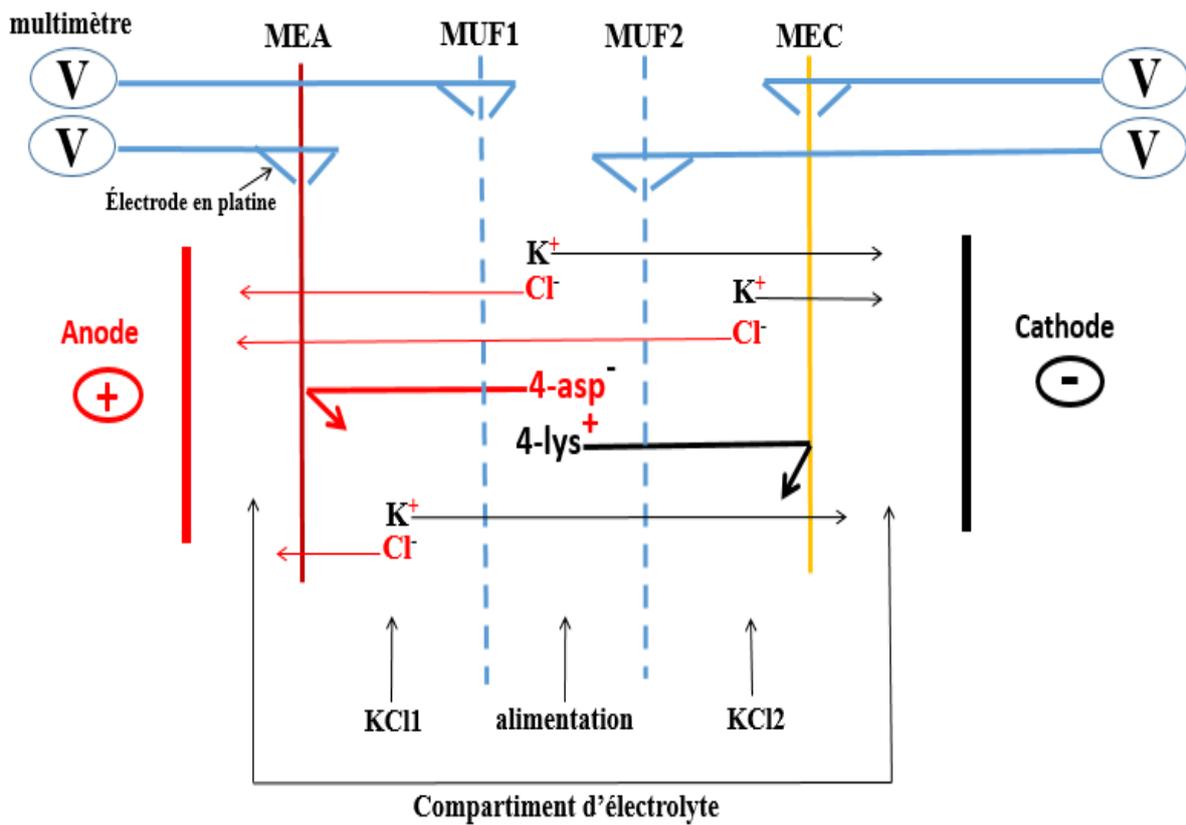


Fig. 18 : Configuration de la cellule d'électrodialyse pour la mesure des différences de potentiel membranaire.

4 Méthodes analytiques

4.1 Analyse des ions

La concentration des ions Cl^- est déterminée par chromatographie ionique (Dionex, Voisins Le Bretonneux, France) équipée d'un détecteur conductimétrique (ED40). Les échantillons sont dilués à $1/50^{\text{ème}}$ puis analysés grâce à une colonne de type Dinoex 4x250mm IonPac ® AS18 en utilisant un éluant contenant du KOH à 20 mM avec un débit de $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La concentration en ions K^+ est mesurée grâce à un spectromètre d'absorption atomique de type novAA 300 (analytikjena, Jena, Allemagne), selon un protocole de mesure standard. Avant chaque mesure, les échantillons sont préalablement dilués au $1/20^{\text{ème}}$.

4.2 Analyse des peptides

Conformément au protocole établi par le fournisseur des peptides (CanPeptide), la concentration des peptides dans le cadre de la séparation de solutions peptidiques simples est déterminée par CLHP avec une colonne C18, Vydac 250 mm x 3.0 mm. Le solvant employé est de l'eau avec TFA à 0,1% avec un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-1}$. La longueur d'onde utilisée est de 214 nm.

Les temps de rétentions des deux peptides 4-asp et 4-lys lors de leur dosage par CLHP sont similaires. De ce fait, la concentration de chaque peptide, pour le mélange peptidique, est déterminée par électrophorèse capillaire. Du KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ est utilisé comme tampon de migration et un voltage de 7 KV est employé. Les mesures sont réalisées dans un capillaire en silice de $75 \mu\text{m}$ de diamètre avec une longueur d'onde de 214 nm.

Dosage de l'azote membranaire

La teneur en azote des membranes échangeuses d'ions et d'ultrafiltration utilisée lors de l'électrodialyse est évaluée à l'aide du Leco FP-528 (Modèle 601-500, LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). Des échantillons de 1 cm^2 de chaque membrane sont utilisés. L'instrument Leco est étalonné au préalable avec de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Avant la mesure, les membranes ont été séchées pendant 12 heures dans un four à convection à 80°C .

4.3 Analyse statistique

Les résultats sont soumis à une analyse de variance avec $P \leq 0,05$ comme niveau de probabilité acceptable grâce au logiciel SigmaPlot (Version 11, SAS Institute Inc) :

- De type Anova : un facteur pour mettre en évidence une différence significative entre au moins deux moyennes induites par une condition opératoire. Exemple : effet du pH sur la mobilité électrophorétique d'un peptide.

- De type Student : pour exprimer une différence significative entre deux moyennes d'une variable mesurée dans deux conditions opératoires différentes. Exemple : différence entre l'effet du KCl et l'eau en moyenne sur la mobilité électrophorétique des peptides.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1 Mesure de la mobilité électrophorétique

Avant d'entreprendre la séparation des deux peptides synthétiques d'étude par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration, nous avons d'abord cherché à les caractériser en termes de mobilité électrophorétique. Cette donnée étant indispensable pour définir le pH optimal de séparation en électrodialyse. Pour cela, nous avons exploré deux techniques de mesure :

- La zétamétrie : les peptides ont fait l'objet de mesure de potentiel zêta donnant accès à la mobilité électrophorétique à l'aide de deux dispositifs commerciaux ; Zetasizer 2000 et Zetasizer Nano ZS.
- L'électrophorèse capillaire.

La mobilité électrophorétique a été mesurée en faisant varier le pH (3-10) et la force ionique (0 et 0,5 g.L⁻¹ de KCl). Les résultats obtenus ont été rapportés et comparés pour les différents systèmes étudiés.

1.1 Mesure du potentiel zêta par zétamétrie

1.1.1 Avec le Zetasizer 2000

Les résultats obtenus dans ce cadre sont représentés dans les figures 19a et 19b. Nous faisons ci-dessous la distinction entre le peptide anionique 4-asp et le peptide cationique 4-

1.1.1.1 Mobilité électrophorétique du peptide anionique (4-asp) :

- Dans l'eau :

Sur la gamme des pH étudiés, les résultats montrent que la mobilité électrophorétique du peptide 4-asp est positive au pH 3 où la mobilité électrophorétique mesurée est de $+0,76 \pm 0,20 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. À partir de la courbe, on détermine une valeur de pHi pour ce peptide de 3,3 identique à la valeur théorique. Dans un intervalle de pH allant de 4 à 10, la mobilité électrophorétique du peptide anionique est négative dont la valeur la plus élevée est obtenue à pH 10 avec une valeur de $-4,72 \pm 0,25 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

- Dans une solution de KCl à 0,5 g.L⁻¹ :

La mobilité électrophorétique du peptide anionique était positive à pH 3 avec une valeur moyenne de $+0,38 \pm 0,13 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le pHi est obtenu à un pH de 4,6. Dans une gamme de pH de 5 à 10, la mobilité électrophorétique du peptide anionique est négative. La plus forte

mobilité électrophorétique du peptide est enregistrée à pH 10 avec une valeur de $-2,47 \pm 0,25 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.1.1.2 Mobilité électrophorétique du peptide cationique (4-lys) :

- Dans l'eau :

La mobilité électrophorétique du peptide cationique était positive dans un intervalle de pH allant de 3 à 7 où la mobilité électrophorétique la plus élevée est obtenue à pH 3 avec une valeur moyenne de $+0,59 \pm 0,11 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. À partir d'un pH 7, la mobilité électrophorétique du peptide 4-lys est négative. La mobilité électrophorétique du peptide cationique la plus élevée est obtenue à pH 10 avec une valeur de $-1,19 \pm 0,06 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La valeur de pHi obtenue à partir de la courbe est de 8,7, valeur inférieure au pHi théorique de pH 11,01.

- Dans une solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:

La mobilité électrophorétique du peptide cationique est positive entre un pH compris entre 3 et 9. La mobilité électrophorétique la plus élevée est obtenue à pH 3 avec une valeur de $+0,46 \pm 0,03 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. À pH 10, la mobilité électrophorétique du peptide cationique est négative ($-0,54 \pm 0,25 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Dans la solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, la valeur du pHi est de 9,3 a été inférieur à la valeur théorique.

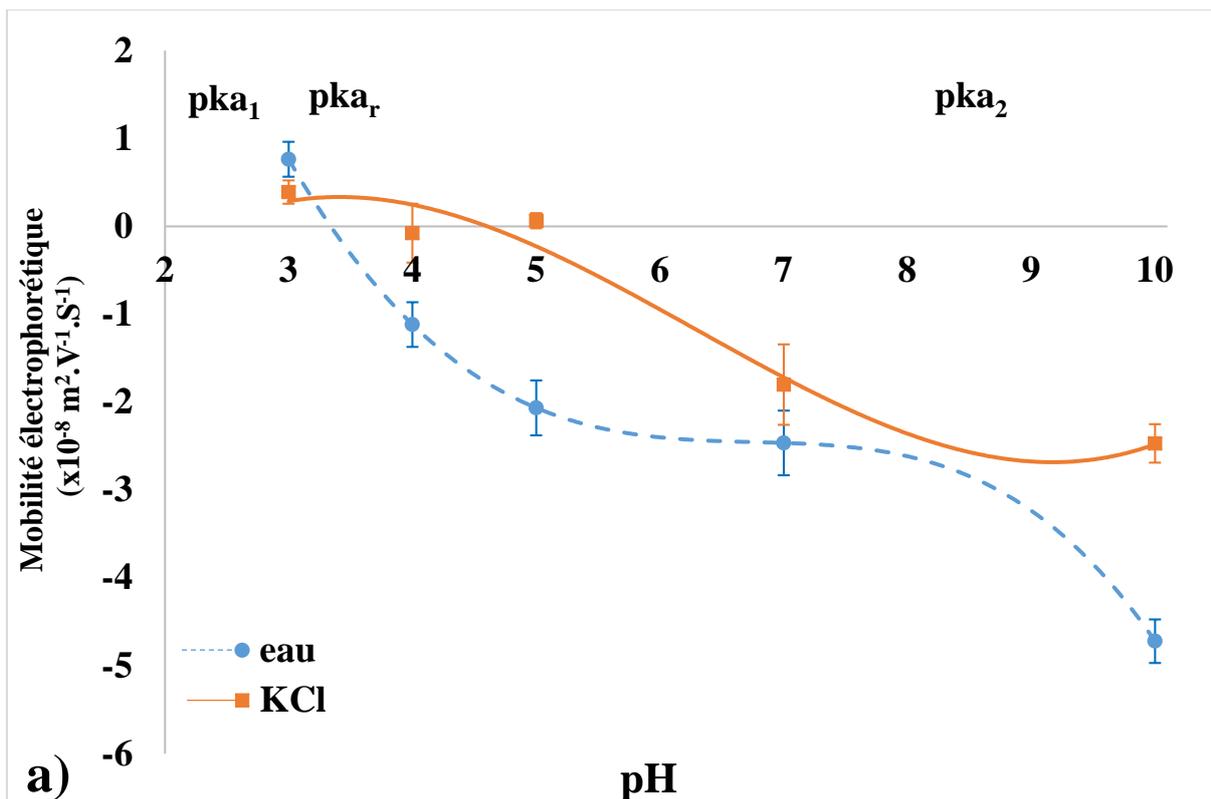


Fig. 19a : Mobilité électrophorétique mesurée avec le Zetasizer 2000 du peptide anionique en fonction du pH dans l'eau et le KCl à 0,5 g.L⁻¹. pKa₁ : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO⁻ ; pKa_r : dé-protonation des groupements acides carboxyliques de la chaîne latérale de l'acide aminé et pKa₂ : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH₃⁺ à NH₂.

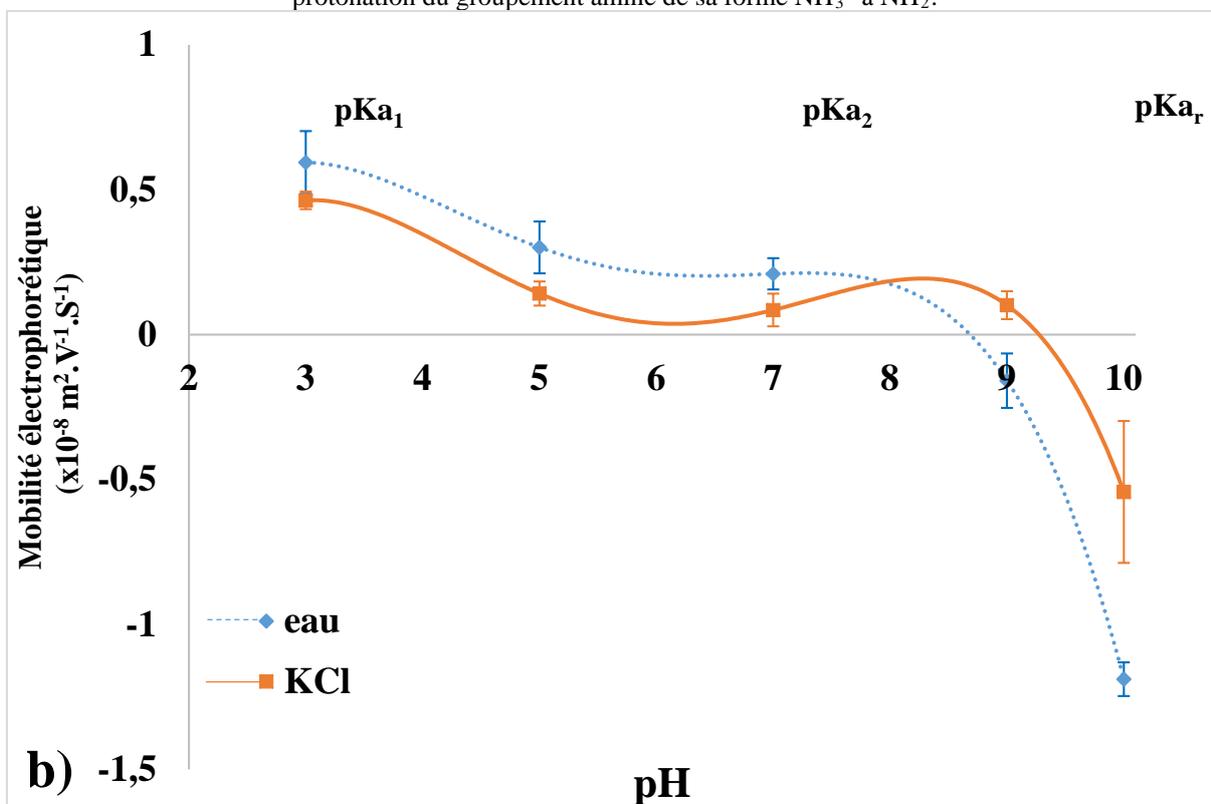


Fig. 19b : Mobilité électrophorétique mesurée avec le Zetasizer 2000 du peptide cationique en fonction du pH dans l'eau et le KCl à 0,5 g.L⁻¹. pKa₁ : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO⁻ ; pKa₂ : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH₃⁺ à NH₂ et pKa_r : dé-protonation des groupements amines de la chaîne latérale de l'acide aminé.

L'analyse des résultats obtenus avec les deux peptides montre que d'une part, le pH influence significativement la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides quelle que soit la force ionique utilisée ($P < 0,05$). La variation du pH de la solution entraîne une protonation et une dé-protonation des groupements fonctionnels des deux peptides. En effet, lorsque le pH de la solution est acide (inférieur aux pKa des deux peptides), les ions H^+ vont protoner les groupements NH_2 et COO^- des deux peptides synthétiques. Possédant cinq groupements NH_2 et un groupement COO^- , le peptide 4-lys porte une charge positive ($5 NH_3^+$ et $1 COOH$). Le peptide anionique, quant à lui, possède un groupement NH_2 et cinq groupements COO^- , il portera également une charge positive ($1 NH_3^+$ et $5 COOH$). À pH intermédiaire, la protonation et la dé-protonation des groupements fonctionnels des deux peptides se font suivant leur pKa respective, ce qui va influencer leurs charges. A titre d'exemple, à pH 7, le peptide 4-lys est chargé positivement ($5 NH_3^+$ et $1 COO^-$) et le peptide anionique 4-asp est chargé négativement ($5 COO^-$ et $1 NH_3^+$). À pH basique (supérieur aux pKa des deux peptides), une dé-protonation des groupements NH_3^+ et $COOH$ se produit. Les deux peptides synthétiques seront chargés négativement avec $5 NH_2$ et $1 COO^-$ pour 4-lys et $5 COO^-$ et NH_2 pour 4-asp. L'allure des courbes des deux peptides (Figures 19 a et b), typiques d'une titration, s'explique également par les pKa de 4-lys et 4-asp. En effet, lorsque le pH est ajusté à une valeur proche du pKa du peptide, un changement important de sa mobilité électrophorétique se produit. À l'opposé, lorsque le pH est ajusté à des valeurs éloignées du pKa du peptide, on n'observe aucun changement de sa mobilité électrophorétique. Ce comportement de la mobilité électrophorétique explique le plateau obtenu entre le pH 5 et 8 dans l'eau pour le peptide anionique 4-asp. Nos résultats sont en total accord avec ceux publiés dans la littérature où la variation la mobilité électrophorétique en fonction du pH a été largement décrite (Grossman et *al.*, 1988 ; Issaq et *al.*, 1992 ; Cifuentes et Poppe, 1995). D'autre part, les valeurs de la mobilité électrophorétique ne représentent pas de différence significative en fonction de la force ionique et ce pour les deux peptides étudiés ($P=0,056$ pour le peptide 4-asp et $P=0,743$ pour le peptide 4-lys).

On remarque par ailleurs que les valeurs de la mobilité électrophorétique obtenues dans le cas du peptide 4-lys sont faibles comparées à celles obtenues pour le peptide 4-asp. Or, compte tenu des propriétés physico-chimiques similaires des deux peptides en termes de taille et de nombre de fonctions ionisables, on aurait pu s'attendre à des valeurs absolues de mobilité électrophorétique très proches pour les deux peptides. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les différences :

- L'utilisation du TFA comme contre-ion de synthèse pourrait influencer les valeurs de la mobilité électrophorétique des deux peptides. En effet, il a été rapporté que le TFA pourrait influencer la conformation peptidique (Roux et *al.*, 2008), ce qui pourrait affecter la mobilité électrophorétique des deux peptides étudiés.
- L'utilisation du Zetasizer 2000 pour la mesure du potentiel zêta des deux peptides pourrait être à l'origine de la difficulté de mesure avec précision leur mobilité électrophorétique. En effet, les peptides étudiés sont de petite taille. Or, le zétamètre Zetasizer 2000 est habituellement utilisé pour la mesure du potentiel zêta de macromolécules telles que les protéines.

Afin de confirmer ou infirmer ces deux hypothèses, nous avons entrepris des mesures de la mobilité électrophorétique avec un équipement Zetasizer Nano ZS. Ce dernier utilise une technique plus sensible dite d'analyse de phase de la lumière diffusée pour l'analyse du potentiel zêta et semble donc mieux adapté pour déterminer le potentiel zêta de molécules de petite taille. Pour la seconde hypothèse, deux contre-ions (TFA et HCl) ont été retenus pour étudier l'effet de ce paramètre sur la valeur de la mobilité électrophorétique de chacun des deux peptides étudiés.

1.1.2 Avec le Zetasizer Nano ZS

Le Zetasizer Nano est habituellement utilisé pour déterminer la taille et la mobilité électrophorétique de protéines et le potentiel zêta de colloïdes et nanoparticules. Comme avec le Zetasizer 2000, nous avons mesuré la mobilité électrophorétique des deux peptides étudiés en fonction du pH (2-12), de la force ionique (0 ou 0,5 g.L⁻¹ de KCl). La nature du contre-ion de synthèse peptidique, TFA (CF₃-COO⁻ + H⁺) ou HCl (Cl⁻ + H⁺), a été également prise en compte pour voir son éventuelle influence sur la valeur de la mobilité électrophorétique. Les résultats des mesures effectuées avec le Zetasizer Nano sont représentés dans les figures 17a et 17b.

1.1.2.1 Mobilité électrophorétique du peptide anionique (4-asp)

Les résultats obtenus avec le peptide anionique sont portés sur la figure 20a.

- Dans l'eau

La mobilité électrophorétique du peptide 4-asp obtenue est positive à pH 2 et 3 quel que soit le contre-ion de synthèse. La valeur de mobilité électrophorétique la plus élevée est obtenue à pH 2 avec une mobilité moyenne de $+2,27 \pm 0,52 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le HCl et de $+1,93 \pm 0,17 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le TFA. Les valeurs du pHi sont de 3,5 et de 4,1 avec le TFA et le HCl,

respectivement. Ces valeurs sont proches de la valeur théorique du pHi de 3,31. Dans un intervalle de pH compris entre 4 et 12, la mobilité électrophorétique du peptide 4-asp est négative. La plus forte valeur de mobilité électrophorétique du peptide anionique est obtenue à pH 11 avec des valeurs moyennes de $-4,16 \pm 0,15 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le HCl et de $-3,99 \pm 0,35 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec le TFA.

- Dans une solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:

Comme pour l'eau, la mobilité électrophorétique du peptide anionique 4-asp est positive aux pH 2 et 3. La plus forte mobilité électrophorétique est obtenue à pH 2 dans le cas du HCl avec une valeur moyenne de $+0,61 \pm 0,21 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et à pH 3 pour le TFA avec une valeur moyenne de $+0,96 \pm 0,47 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La valeur du pHi est de 3,5 quel que soit le contre-ion utilisé. Dans un intervalle de pH de 4 à 12, la mobilité électrophorétique du peptide 4-asp est négative. La mobilité électrophorétique la plus élevée est obtenue à pH 11 avec $-2,53 \pm 0,20 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le HCl et $-3,44 \pm 0,34 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dans le TFA.

1.1.2.2 Mobilité électrophorétique du peptide cationique (4-lys)

Les résultats obtenus avec le peptide cationique sont portés sur la figure 20b.

- Dans l'eau :

La mobilité électrophorétique du peptide 4-lys est positive dans une gamme de pH de 2 à 9 dans le cas du HCl et de 2 à 7 avec le TFA. La mobilité électrophorétique la plus élevée du peptide 4-lys est obtenue à pH 3 dans le HCl ($+2,68 \pm 0,19 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$) et à pH 2 dans le TFA ($+1,87 \pm 0,51 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$). Les valeurs de pHi obtenues pour le peptide 4-lys dans l'eau sont de 9,1 avec le HCl et de 8 avec le TFA. Ces valeurs sont éloignées de la valeur théorique de 11,1. Dans un intervalle de pH allant de 9 à 12, la mobilité électrophorétique du peptide 4-lys est négative quel que soit le contre-ion utilisé. La valeur la plus élevée de la mobilité électrophorétique du peptide cationique est obtenue à pH 12 dans le HCl ($-3,52 \pm 0,16 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$) et le TFA ($-3,51 \pm 0,12 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$).

- Dans une solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:

Sur une gamme de pH allant de 2 à 6 dans le HCl et de 2 à 4 dans le TFA, la mobilité électrophorétique du peptide cationique est positive. La mobilité électrophorétique positive la plus élevée était obtenue à pH 2 dans le HCl ($+2,29 \pm 0,44 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$) et le TFA ($+1,87 \pm 0,52 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$). Les valeurs de pHi sont de 6,5 dans le HCl et de 5,3 dans le TFA. Ces valeurs sont éloignées de la valeur du pHi théorique du peptide 4-lys. Dans un intervalle de pH de 8 à 12 dans le HCl et de 6 à 12 dans le TFA, la mobilité électrophorétique mesurée est négative. La

plus forte mobilité électrophorétique du peptide cationique est obtenue à pH 12 avec des valeurs moyennes de $-3,22 \pm 0,41 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$ dans le HCl et de $-3,32 \pm 0,36 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1}$ dans le TFA.

Les résultats de mesures de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer Nano ZS montrent que le pH influence significativement la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides quels que soient la force ionique et le contre-ion ($P < 0,05$). Par ailleurs, les résultats ressortent un effet significatif de la force ionique sur la mobilité électrophorétique des deux peptides ($P < 0,05$) qui était plus élevée dans l'eau comparée à celle mesurée dans la solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. En effet, il a été rapporté dans la littérature que la force ionique du milieu peut affecter la mobilité électrophorétique d'une molécule chargée (Sung et al., 2007). Bahga et al., (2010) ont également démontré qu'en augmentant la concentration ionique, la mobilité électrophorétique diminue en raison de la diminution du degré d'ionisation du peptide. Ce phénomène peut être expliqué par l'effet-écran dû à l'augmentation du nombre d'ions dans la double couche électrique du peptide lorsque le KCl est utilisé tandis qu'aucun effet-écran n'a été rapporté avec de l'eau (Mechref et al., 2007). L'augmentation du nombre d'ions dans la double couche électrique du peptide masque sa charge électrique ce qui diminue sa mobilité électrophorétique. Ces résultats sont en adéquation avec les données de la littérature (Mechref et El-Rassi, 2007 ; El-Rassi, 1996). Le même phénomène a été précédemment observé par Aider et al., (2007) lors de l'étude de la mobilité électrophorétique avec le Zetasizer 2000 des oligomères de chitosane à différentes concentration en KCl. En effet, les auteurs ont montré que lorsque la concentration en KCl augmente, la mobilité électrophorétique des oligomères de chitosane diminue. Enfin, le contre-ion de synthèse n'a pas influencé de façon significative la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides ($P > 0,05$). Nécessitant moins d'étapes lors de la synthèse peptidique, le TFA a été retenu comme contre-ion pour le reste de l'étude.

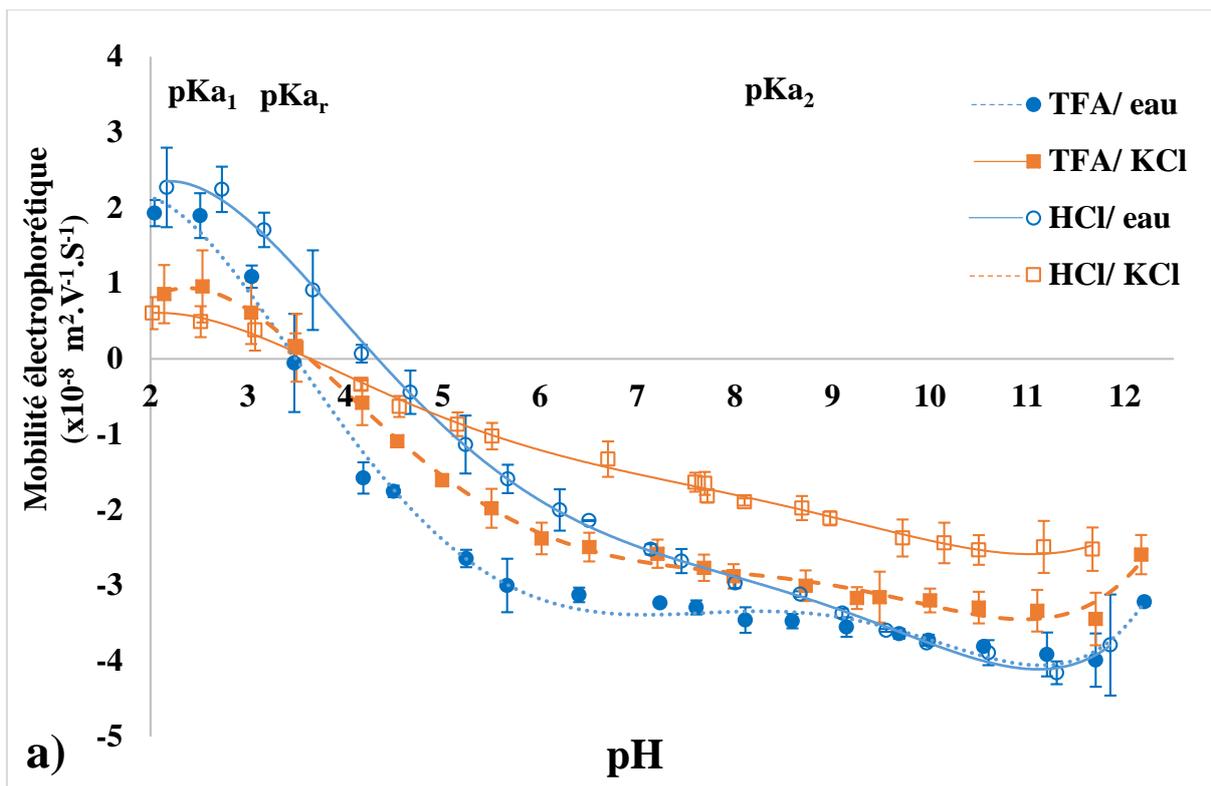


Fig. 20a : Mobilité électrophorétique mesurée avec le Zetasizer Nano du peptide anionique en fonction du pH dans l'eau ou le KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ avec TFA ou HCl comme contre-ion. pKa_1 : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO^- ; pKa_r : dé-protonation des groupements acides carboxyliques de la chaîne latérale de l'acide aminé et pKa_2 : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH_3^+ à NH_2 .

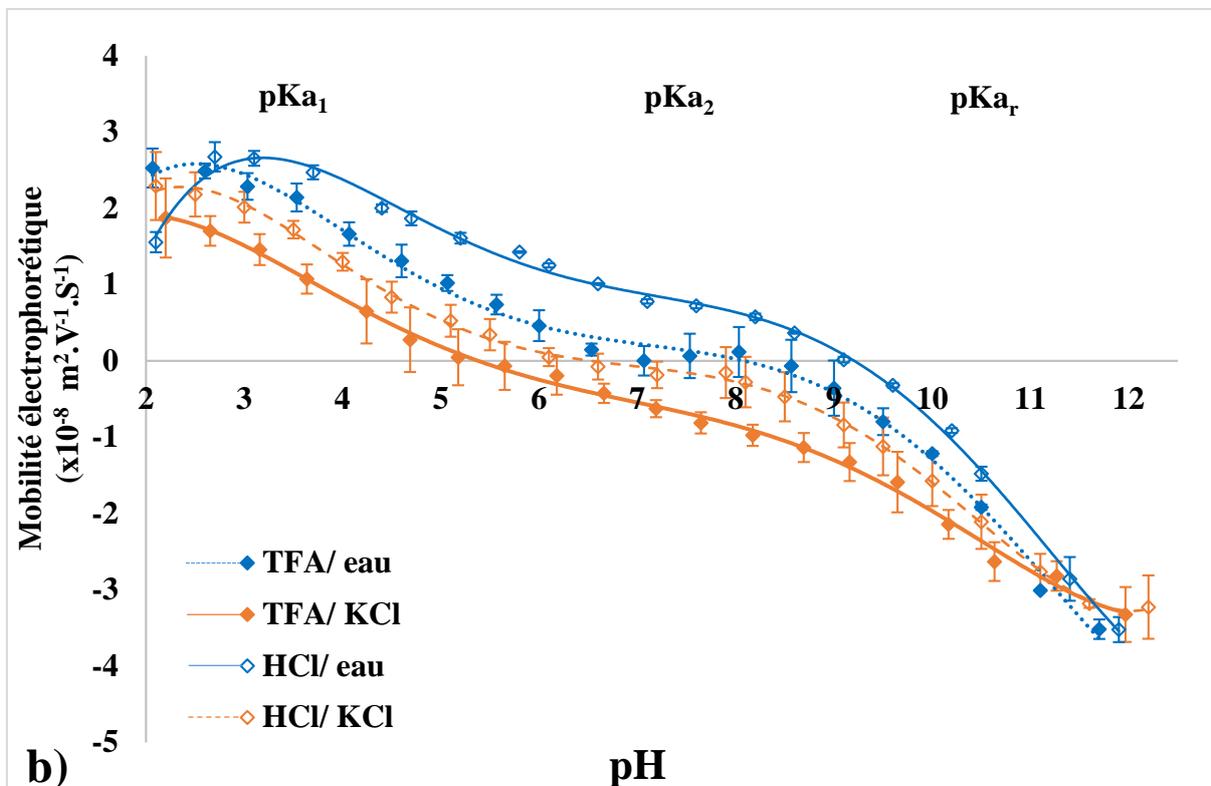


Fig. 20b : Mobilité électrophorétique mesurée avec le Zetasizer Nano du peptide cationique en fonction du pH dans l'eau ou le KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ avec TFA ou HCl comme contre-ion. pKa_1 : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO^- ; pKa_2 : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH_3^+ à NH_2 et pKa_r : dé-protonation des groupements amines de la chaîne latérale de l'acide aminé.

Même si les valeurs absolues de mobilité électrophorétique obtenues avec les peptides 4-lys et 4-asp ont été similaires, les valeurs du pHi pour le peptide cationique obtenues avec le Zetasizer Nano ne correspondent pas à la valeur théorique ce qui ne fut pas le cas pour le peptide anionique où les pHi mesurés ont été très proches de la valeur du pHi théorique. Les propriétés et la structure propre du peptide cationique pourraient être à l'origine des écarts observés. En effet, il a été rapporté qu'en présence de molécules de type halogène (Chlore, Iode, Fluor...), la poly-lysine présente des structures secondaires multiples (Dos et *al.*, 2008). Cette éventualité de changement de conformation du peptide 4-lys en présence d'ions Cl⁻ et du TFA pourrait perturber la mesure de sa charge de surface, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus avec les deux zétamètres.

L'électrophorèse capillaire est reconnue comme la technique de référence pour la mesure de la mobilité électrophorétique des protéines et des peptides. Cette technique permet de mesurer la mobilité électrophorétique d'une molécule directement à partir de sa migration dans un capillaire sous l'effet d'un champ électrique. Nous représenterons dans le paragraphe suivant les résultats obtenus avec cette technique dans le cadre de la mesure de la mobilité électrophorétique des deux peptides étudiés.

1.2 Mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire

Comme précédemment, nous avons mesuré la mobilité électrophorétique des deux peptides en fonction du pH (2-12) et de la force ionique (0 ou 0,5 g.L⁻¹ de KCl) avec comme contre-ion de synthèse le TFA. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 21a et 21b.

1.2.1 Mobilité électrophorétique du peptide anionique 4-asp

- Dans l'eau :

La mobilité électrophorétique du peptide 4-asp est positive à pH 2 avec une valeur de $+1,25 \pm 0,20 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Le pHi est de 3,1. Dans un intervalle de pH de 4 à 12, la mobilité électrophorétique du peptide anionique est négative. La mobilité électrophorétique la plus élevée du peptide 4-asp est obtenue à pH 9 avec une valeur moyenne de $-3,96 \pm 0,20 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

- Dans une solution de KCl à 0,5 g.L⁻¹ :

À pH 2, la mobilité électrophorétique du peptide anionique est positive ($+0,65 \pm 0,24 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). La valeur de pHi obtenue avec la solution de KCl est de 2,9. Dans un intervalle de pH compris entre 4 et 12, la mobilité électrophorétique du peptide 4-asp est négative. La plus forte

valeur de mobilité électrophorétique du peptide anionique de $-3,74 \pm 0,36 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est obtenue à pH 11.

1.2.2 Mobilité électrophorétique du peptide cationique 4-lys

- Dans l'eau :

La mobilité électrophorétique du peptide 4-lys est positive dans un intervalle de pH allant de 2 à 11. La plus forte valeur de mobilité électrophorétique du peptide cationique est obtenue à pH 2 ($+4,36 \pm 0,17 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). La valeur du pHi est de 11,8 conforme à la valeur du pHi théorique.

- Dans une solution de KCl à $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$:

Comme pour l'eau, la mobilité électrophorétique du peptide cationique avec la solution de KCl est positive pour des valeurs de pH entre 2 et 11. Le pHi est de 11,8 identique à la valeur obtenue avec l'eau. La mobilité électrophorétique la plus élevée du peptide 4-lys est obtenue à pH 2 avec une valeur de $+3,91 \pm 0,32 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

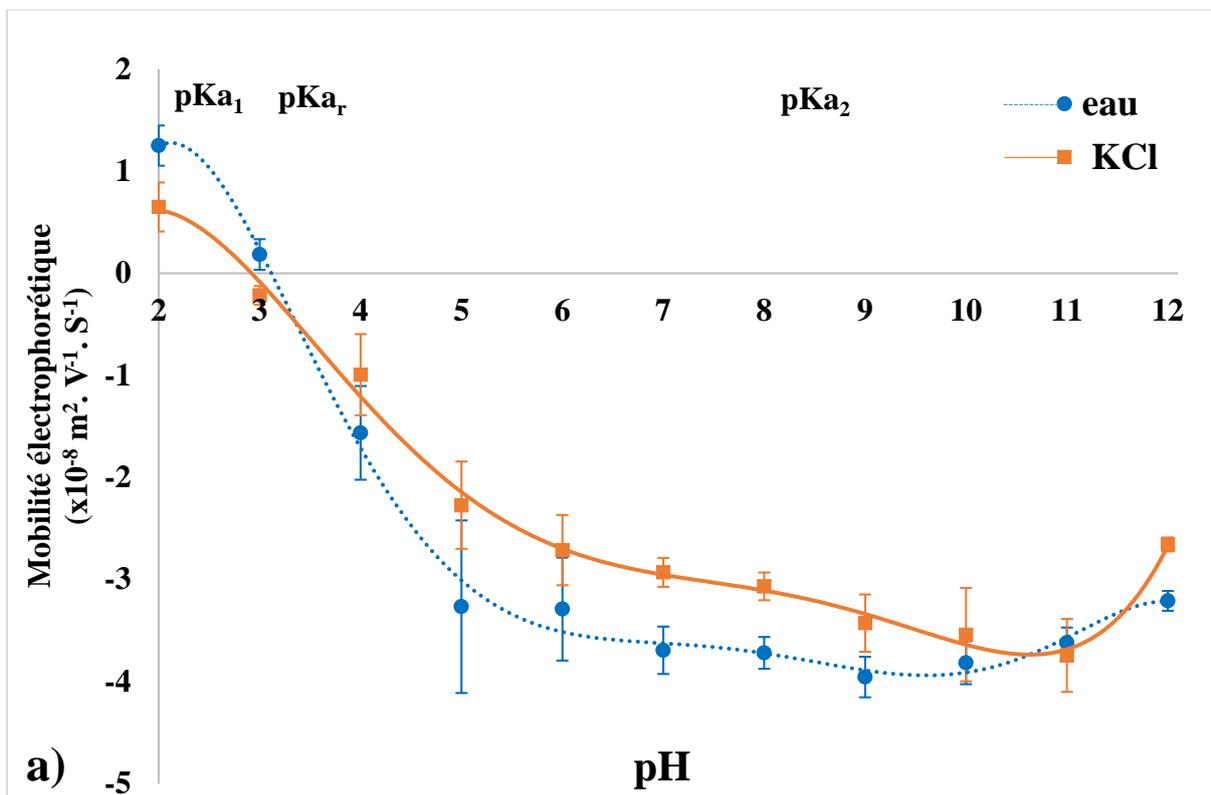


Fig. 21a : Mobilité électrophorétique mesurée par électrophorèse capillaire du peptide anionique en fonction du pH dans l'eau ou le KCl à 0,5 g.L⁻¹. pKa₁ : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO⁻ ; pKa_r : dé-protonation des groupements acides carboxyliques de la chaîne latérale de l'acide aminé et pKa₂ : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH₃⁺ à NH₂.

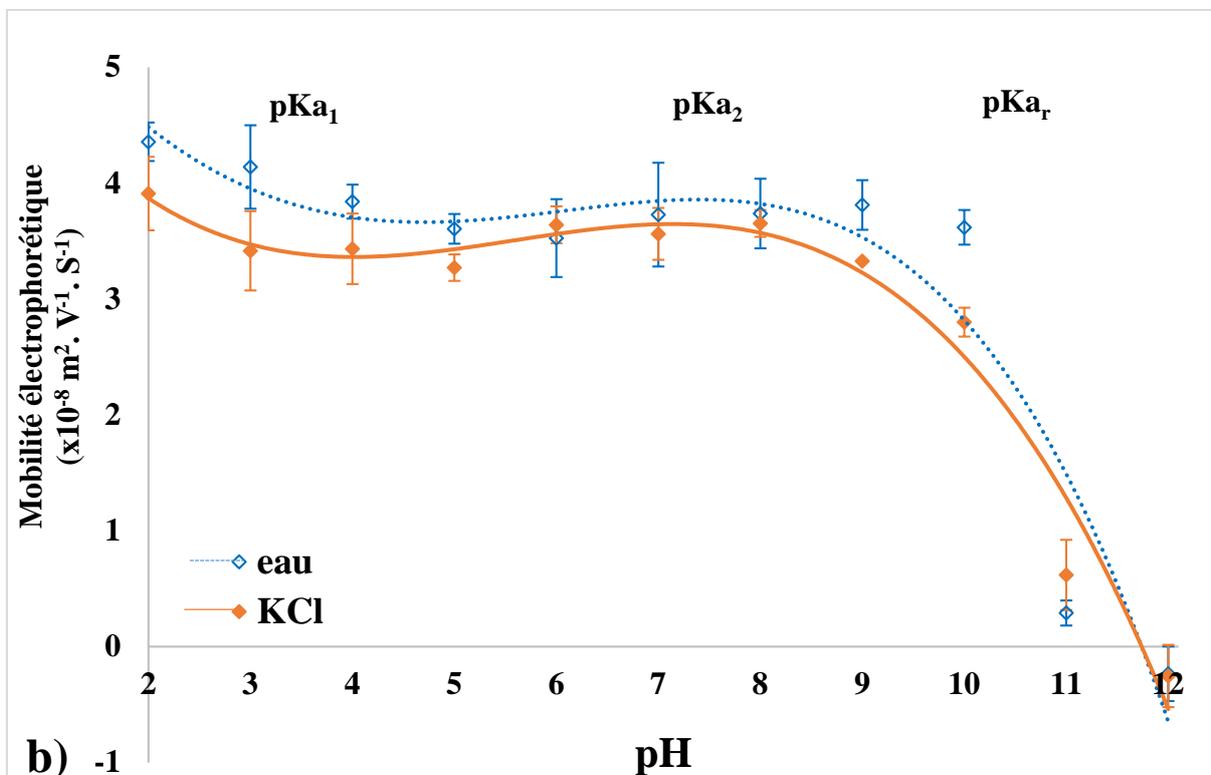


Fig. 21b : Mobilité électrophorétique mesurée par électrophorèse capillaire du peptide cationique en fonction du pH dans l'eau ou le KCl à 0,5 g.L⁻¹. pKa₁ : dé-protonation du groupe carboxylique de sa forme COOH à COO⁻ ; pKa₂ : dé-protonation du groupement amine de sa forme NH₃⁺ à NH₂ et pKa_r : dé-protonation des groupements amines de la chaîne latérale de l'acide aminé.

Les résultats de mesure de la mobilité électrophorétique par électrophorèse capillaire font ressortir les éléments suivants :

- Le pH influence significativement la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides quelle que soit la force ionique utilisée ($P < 0,05$). Tout comme les résultats obtenus avec les systèmes Zetasizer, l'effet du pH est expliqué par les différentes constantes de dissociation (pK_a) des deux peptides.
- La force ionique n'a pas d'influence sur la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides ($P > 0,05$). La faible force ionique mise en jeu (7 mM) pourrait être à l'origine de ce résultat. Il a été rapporté que l'effet de la force ionique sur la mobilité électrophorétique de peptides est significatif lorsque la concentration en ions est supérieure à 20 mM (Cifuentes et Poppe, 2005).

1.3 Récapitulatif

Pour mesurer la mobilité électrophorétique des deux peptides d'étude, nous avons opté pour deux systèmes de mesure du potentiel zêta (le Zetasizer 2000 et le Zetasizer Nano) et d'électrophorèse capillaire.

Nos résultats ont montré le rôle important que joue le pH sur la charge des deux peptides étudiés. En effet, le pH a eu un effet significatif sur la direction de la migration des deux peptides sous l'effet du champ électrique. Le pH détermine la charge peptidique et par conséquent, il détermine également la direction de son électromigration. En outre, nos résultats ont montré que lorsque le pH de la solution est proche du pH_i du peptide, la mobilité électrophorétique de ce dernier est proche de zéro. En revanche, lorsque le pH de la solution est éloigné de la valeur de pH_i du peptide, la mobilité électrophorétique de ce dernier augmente.

Un effet significatif de la force ionique sur la valeur de la mobilité électrophorétique des deux peptides étudiés n'a été obtenu qu'avec le système Zetasizer Nano ZS. La faible force ionique ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl) pourrait expliquer ce résultat. Néanmoins, même si l'effet du KCl sur la mobilité électrophorétique des deux peptides n'a pas été significatif, les valeurs de la mobilité des deux peptides obtenues dans l'eau étaient généralement supérieures aux résultats obtenus dans le KCl.

Le tableau 5 résume les valeurs du pH_i obtenues avec les trois systèmes de mesure utilisés. Il en ressort que seule l'électrophorèse capillaire a permis d'obtenir une valeur de pH_i conforme à la valeur théorique. Les écarts obtenus entre la valeur théorique du pH_i et celles obtenues avec les deux zétamètre utilisés pourraient être attribués aux propriétés intrinsèques du peptide 4-lys qui interféreraient avec la mesure de son potentiel zêta. En revanche, aucune différence entre

les valeurs théorique et mesurée du pHi avec les trois systèmes de mesure n'a pas été observée pour le peptide anionique 4-asp.

	4-asp			4-lys		
	Zetasizer 2000	Zetasizer Nano	Électrophorèse capillaire	Zetasizer 2000	Zetasizer Nano	Électrophorèse capillaire
pHi théorique	3,31			11,1		
pHi mesuré	3,3	3,5	3,1	8,7	8	11,8
Mobilité électrophorétique à pH 3	+0,76±0,20	+1,09±0,15	+0,18±0,15	+0,59±0,11	+2,27±0,17	+4,14±0,36
Mobilité électrophorétique à pH 7	-2,47±0,37	-3,23±0,09	-3,69±0,23	+0,21±0,05	0±0,19	+3,73±0,45
Mobilité électrophorétique à pH 11	-	-3,91±0,29	-3,61±0,15	-	-3±0,13	+0,29±0,11

Tableau 5 : Comparaison des résultats de la mobilité électrophorétique (en $\times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) obtenus dans l'eau et TFA comme contre-ion avec les différentes méthodes de mesure. - : mesure non déterminée.

2 Séparation de solutions peptidiques simples par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration

Le traitement de solutions contenant un seul peptide a pour objectif de mettre en évidence les mécanismes de transfert peptidique en électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration. Pour cela, deux peptides synthétiques ont été sélectionnés sur la base de leurs propriétés physico-chimiques : un peptide anionique (4-asp) et un peptide cationique (4-lys).

À la suite des mesures de la mobilité électrophorétique des deux peptides, nous avons fixé le pH à 7. Ce dernier confère aux peptides une mobilité électrophorétique proche en valeur absolue mais avec des charges opposées ; négative pour le peptide anionique 4-asp et positive pour le peptide cationique 4-lys.

Pour chacun des peptides étudiés, les expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires avec un suivi des paramètres électrodialytiques, de la migration des ions et des peptides. L'accent a été mis sur l'analyse des phénomènes qui régissent le transfert de chacun des peptides lors du procédé.

2.1 Migration d'un peptide anionique : l'acide tétra-aspartique (4-asp)

Dans la section « Matériels et méthodes », il a été indiqué que la durée de l'électrodialyse était de 5h avec un ajout de KCl au bout de 4h d'expérience. Cette étape a été envisagée suite à des expériences préliminaires avec le peptide anionique 4-asp programmées sur 4h qui ont montré un arrêt de la migration du peptide après 60 minutes. Ce phénomène peut être associé à une forte déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération donnant lieu à une dissociation de l'eau ce qui serait à l'origine de l'arrêt de la migration du peptide.

2.1.1 Évolution des paramètres électrodialytiques

2.1.1.1. Conductivité électrique

Les conductivités des compartiments d'alimentation et de récupération ont été mesurées toutes les 30 minutes au cours de l'électrodialyse. L'évolution en fonction du temps est représentée dans les figures 22a et b.

Durant les 240 premières minutes d'électrodialyse, la conductivité des compartiments d'alimentation et de récupération décroît au cours du temps. Dans la solution de récupération, la déminéralisation suit une vitesse constante. En effet, la conductivité passe de

$3286 \pm 174 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $581 \pm 125 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ correspondant à un taux de déminéralisation de 82% dans ce compartiment.

Dans le compartiment d'alimentation, la conductivité diminue selon deux phases :

- Une première phase de 0 à 150 min pendant laquelle la conductivité passe de $1595 \pm 46 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $794 \pm 72 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ donnant ainsi lieu à un taux de déminéralisation de 61%.
- Une deuxième phase qui s'étend de 150 à 240 min et se caractérise par une plus faible vitesse de déminéralisation. En effet, la conductivité passe de $794 \pm 72 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $625 \pm 46 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ce qui correspond à une déminéralisation de 21%.

La déminéralisation des solutions d'alimentation et de récupération est cohérente avec la configuration de la cellule d'électrodialyse : les ions K^+ et Cl^- migrent vers les compartiments cathodique et anodique respectivement. Cette migration est favorisée par le placement de la membrane échangeuse d'anion côté anode et la membrane échangeuse de cation côté cathode.

Les taux de déminéralisation obtenus sont globalement plus faibles comparés à ceux rapportés dans des études de fractionnement d'hydrolysats enzymatiques. En effet, lors du fractionnement d'un hydrolysat de la β -Lactoglobuline, Poulin et *al.*, (2007) ont obtenu un taux de déminéralisation de 70% sur seulement 120 min d'électrodialyse. Une déminéralisation de plus de 90% a été observée avec un hydrolysat de protéines blanches de luzerne (Firdaous et *al.*, (2010)). Les faibles taux de déminéralisation mesurés avec la solution peptidique 4-asp peuvent être expliqués par une plus faible concentration de départ en ions K^+ et Cl^- dans les solutions d'alimentation et de récupération, ce qui conduirait à une apparition de l'autoprotolyse de l'eau et donc à un ralentissement de la migration des ions.

La baisse de la vitesse de déminéralisation après 150 min d'électrodialyse dans le compartiment d'alimentation s'explique par une plus faible conductivité électrique initiale comparée à celle du compartiment de récupération ce qui est à l'origine d'une diminution de la vitesse de migration des espèces ioniques présentes dans la solution d'alimentation causée par l'apparition des ions H^+ et OH^- générés lorsque la densité du courant limite est dépassée. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature (Labbé et Bazinet (2006) ; Firdaous et *al.*, (2010) et Doyen et *al.*, (2014)).

À l'issue de 240 min d'électrodialyse, un ajout de KCl a été effectué dans les compartiments d'alimentation ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) et de récupération ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). La conductivité électrique diminue linéairement dans les deux compartiments avec des vitesses de déminéralisation plus importante

que précédemment. On peut constater par ailleurs que les conductivités initiales n'ont pas été rétablies en raison de la variation des volumes dans les deux compartiments due au phénomène d'électro-osmose.

2.1.1.2 Intensité du courant

La diminution de l'intensité du courant dans le système est corrélée à la diminution de la conductivité du compartiment de récupération, correspondant au compartiment le plus déminéralisé. En effet, la baisse de l'intensité du courant suit une vitesse constante au cours des 240 premières minutes d'électrodialyse (Fig. 22c, phase (1)). L'intensité du courant passe de $0,12 \pm 0,20A$ à $0,03 \pm 0A$. Après ajout de KCl, l'intensité du courant a rebondi à $0,17 \pm 0A$, puis elle a diminué linéairement jusqu'à la fin du traitement pour atteindre une valeur de $0,13 \pm 0,01A$ (Fig. 22c, phase (2)).

Tout comme la conductivité, la baisse de l'intensité du courant s'explique par une déminéralisation des deux compartiments favorisée par la configuration de la cellule d'électrodialyse.

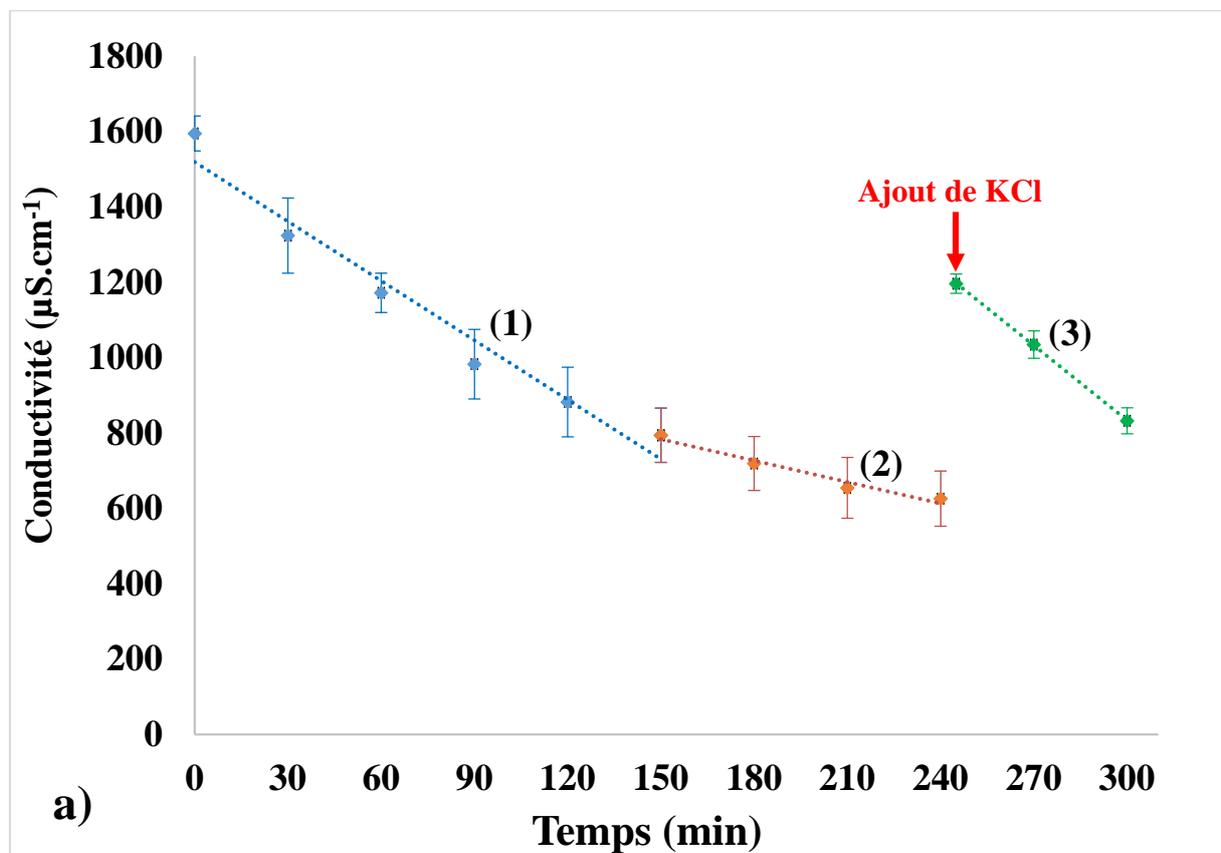


Fig. 22a : Évolution de la conductivité électrique dans la solution d'alimentation au cours du fractionnement du peptide anionique. (1) : phase 1 ; (2) : phase 2 et (3) : phase 3.

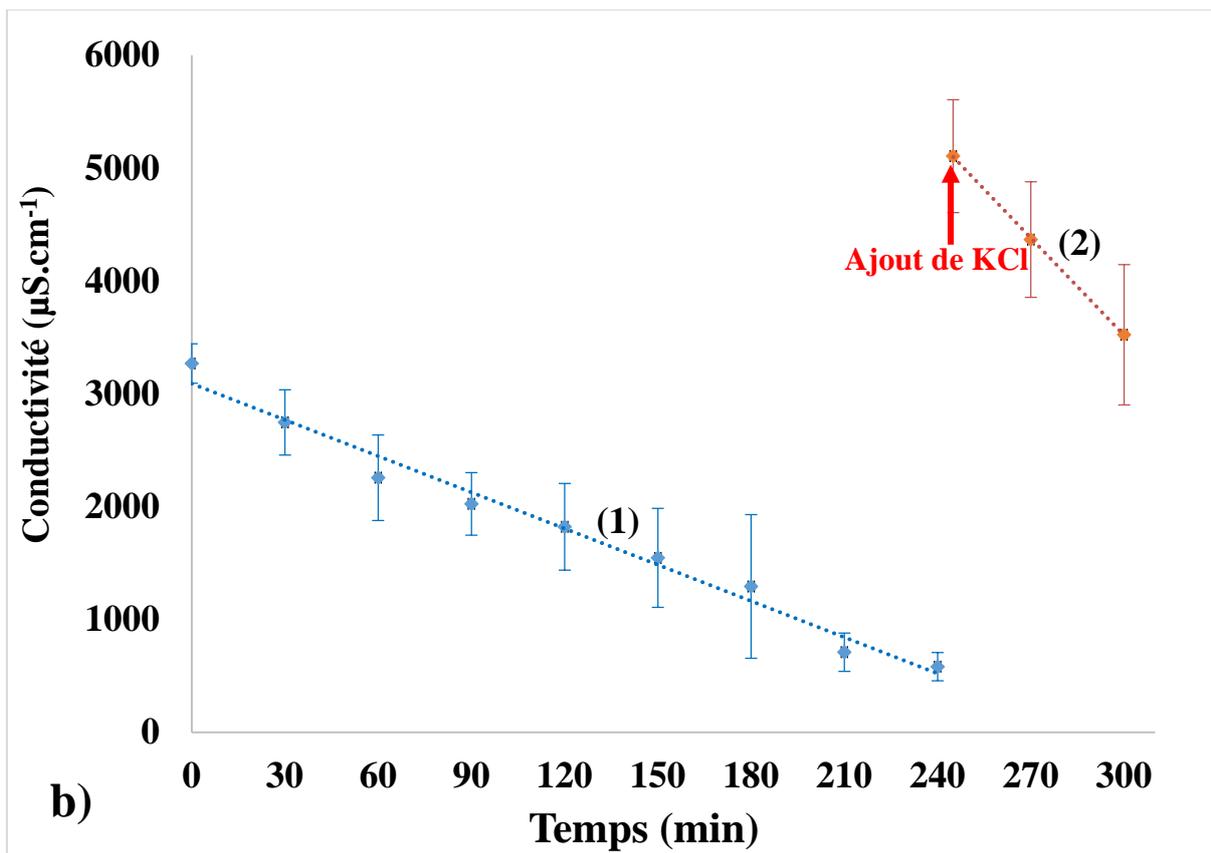


Fig. 22b : Évolution de la conductivité électrique dans la solution de récupération au cours du fractionnement du peptide anionique. (1) : phase 1 et (2) : phase 2.

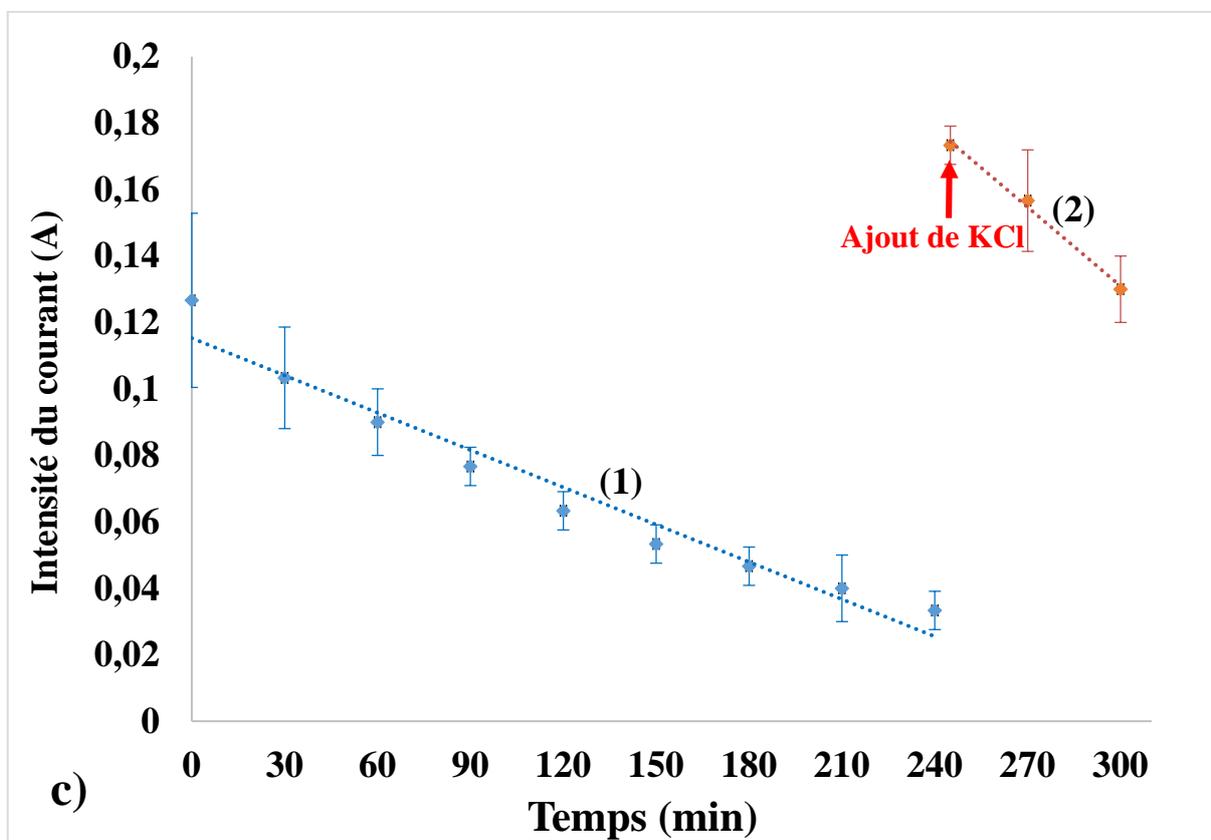


Fig. 22c : Évolution de l'intensité du courant au cours du fractionnement du peptide anionique. (1) : phase 1 et (2) : phase 2.

2.1.2 Migration ionique

Afin d'appuyer la tendance de déminéralisation obtenue avec la mesure de la conductivité, la concentration en ions K^+ et Cl^- dans les compartiments d'alimentation, de récupération et de rinçage des électrodes ont été suivies au cours de l'électrodialyse. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 23a, b, c et d.

Dans le compartiment d'alimentation, les concentrations en ions K^+ et Cl^- ont diminué suivant deux phases :

- Une première phase de 0 à 150 min d'électrodialyse correspondant à des flux de $21 \pm 3,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $23 \pm 0,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- .
- Une seconde phase comprise dans un intervalle de 150 à 240 min d'électrodialyse se distinguant par une baisse de la vitesse de déminéralisation du compartiment d'alimentation. En effet, des flux sortants de seulement $10,8 \pm 1,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $5,4 \pm 1,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ respectivement pour le K^+ et le Cl^- ont été mesurés.

À l'issue de l'ajout du KCl (phase 3), les concentrations en ions K^+ et Cl^- ont diminué linéairement avec des flux de $25,1 \pm 2,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $28,4 \pm 0,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ respectivement.

Dans le compartiment de récupération, on observe des évolutions identiques :

- Une première phase allant de 0 à 30 min d'électrodialyse pour le K^+ et de 0 à 150 min pour le Cl^- . Les flux ioniques correspondants étaient de $119,7 \pm 22,7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $81,9 \pm 22,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ respectivement pour le K^+ et le Cl^- .
- Une deuxième phase d'électrodialyse se caractérisant par une baisse de la migration des ions K^+ et Cl^- . En effet, des flux de seulement $37 \pm 6,9 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et $39 \pm 13,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- ont été mesurés.

Après ajout de KCl (phase 3), les flux ioniques étaient de $73,5 \pm 3,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $107,9 \pm 38,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ respectivement pour le K^+ et le Cl^- .

Une augmentation linéaire de la concentration en K^+ et en Cl^- dans les compartiments de rinçage des électrodes a été obtenue (Figure 23b et d). Sur 300 min d'électrodialyse, les flux ioniques mesurés étaient de $66,7 \pm 31,8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $87,5 \pm 11,1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- respectivement dans les compartiments cathodique et anodique. Aucune migration des ions K^+ dans le compartiment anodique, ni des ions Cl^- dans le compartiment cathodique n'a été obtenue, ce qui confirme la parfaite permselectivité des membranes échangeuses d'ions utilisées.

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, la déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération est due à la configuration de la cellule d'électrodialyse. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration des ions K^+ dans le compartiment cathodique s'explique par sa migration des compartiments d'alimentation et de récupération vers la cathode à travers la membrane échangeuse de cations. Celle des ions Cl^- dans le compartiment anodique s'explique à son tour par sa migration des compartiments d'alimentation et de récupération vers l'anode à travers la membrane échangeuse d'anions.

L'ensemble de ces résultats corrobore ceux obtenus avec la mesure de la conductivité. En effet, les différentes phases de déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération observées sont similaires à celles de l'évolution de la concentration des ions K^+ et Cl^- mesurées dans les mêmes compartiments.

On peut relever par ailleurs les faibles flux ioniques de K^+ et Cl^- comparés à ceux rapportés dans la littérature. En effet, Firdaous et *al.*, (2010) ont suivi l'évolution de la concentration en ions K^+ en électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration lors du fractionnement d'un hydrolysat de protéines blanches de luzerne où des flux plus élevés en ions K^+ ont été obtenus.

Cette différence peut être expliquée par une plus forte autoprotolyse de l'eau dans le cas présent due à une plus faible conductivité initiale de la solution peptidique et l'utilisation d'un champ électrique cinq fois plus élevé ce qui mène à un dépassement plus rapide de la DCL.

Les différentes phases de migration des ions K^+ et Cl^- observées au cours de l'électrodialyse sont en accord avec les données de la littérature. En effet, Labbé et Bazinet, (2006) et Firdaous et *al.*, (2010) ont également observé le même phénomène. Les auteurs ont expliqué la baisse de migration des ions K^+ et Cl^- par l'apparition des ions H^+ et OH^- suite à une importante déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération. En raison de leur mobilité électrophorétique importante (Tab. 6), les ions H^+ et OH^- générés par la dissociation de l'eau contribuent au transport du courant électrique au détriment des ions K^+ et Cl^- .

Ion	K^+	Cl^-	H^+	OH^-
Mobilité électrophorétique ($10^{-8} m^2.V^{-1}.S^{-1}$) (Bazinet et Castaigne, 2011)	7,61	7,95	36,3	20,5

Tableau 6 : Mobilités électrophorétiques des ions K^+ , Cl^- , H^+ et OH^- .

L'ajout de KCl après 240 min d'électrodialyse a permis de restaurer en grande partie les flux initiaux des ions K^+ et Cl^- dans les compartiments d'alimentation et de récupération. Ce résultat s'explique par une baisse de la dissociation des molécules d'eau avec l'augmentation de la conductivité des compartiments d'alimentation et de récupération apportée par l'ajout des ions K^+ et Cl^- .

Compte tenu des volumes et des concentrations, le bilan de matière a été vérifié pour K^+ et Cl^- . Sur les 240 min d'électrodialyse, le rendement ionique est de 90% pour K^+ et 114% pour Cl^- . Sur la dernière phase d'EDUF correspondant à l'ajout de KCl, le rendement est de 97% pour le K^+ et de 102% pour le Cl^- . Les rendements supérieurs à 100% sont dus aux ions Cl^- apportés par le HCl pour le maintien du pH constant.

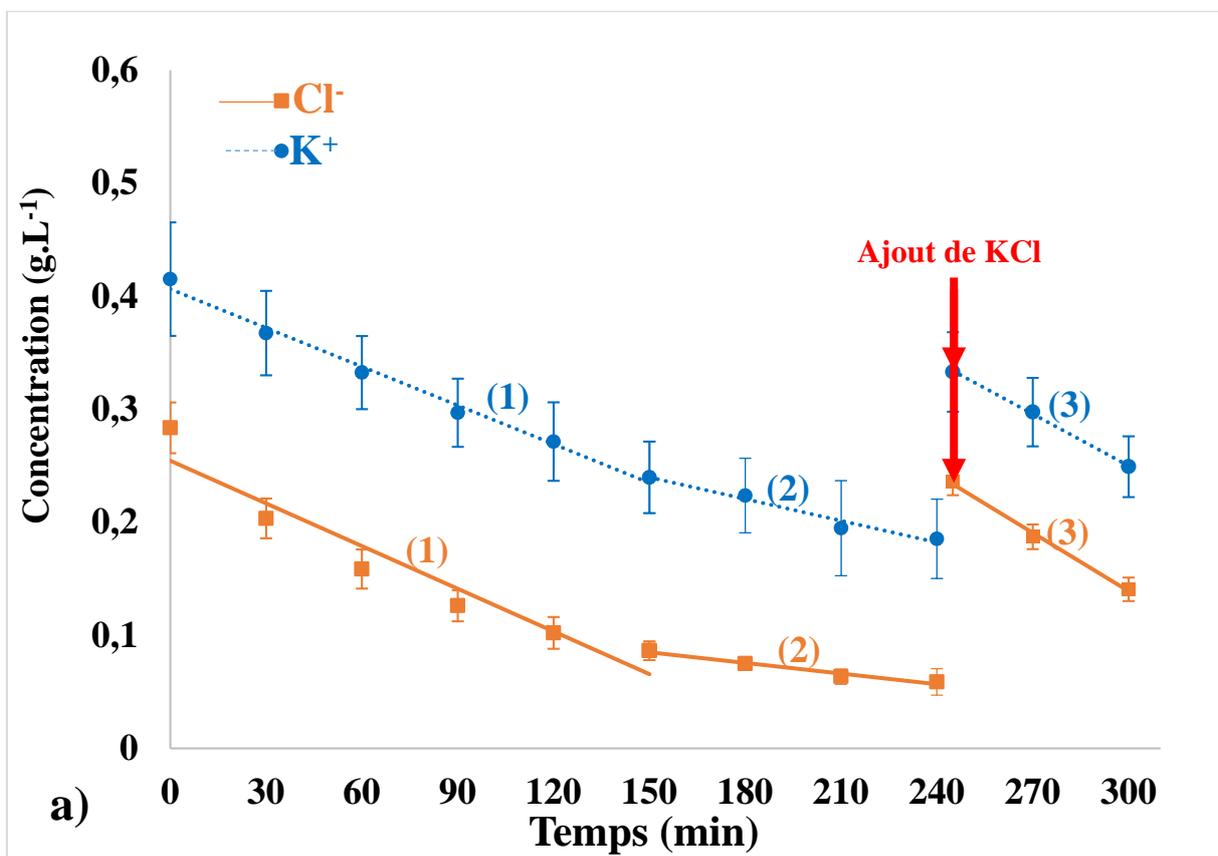


Fig. 23a : Évolution de la teneur en K^+ et en Cl^- dans le compartiment d'alimentation au cours de l'électrodialyse du peptide anionique.

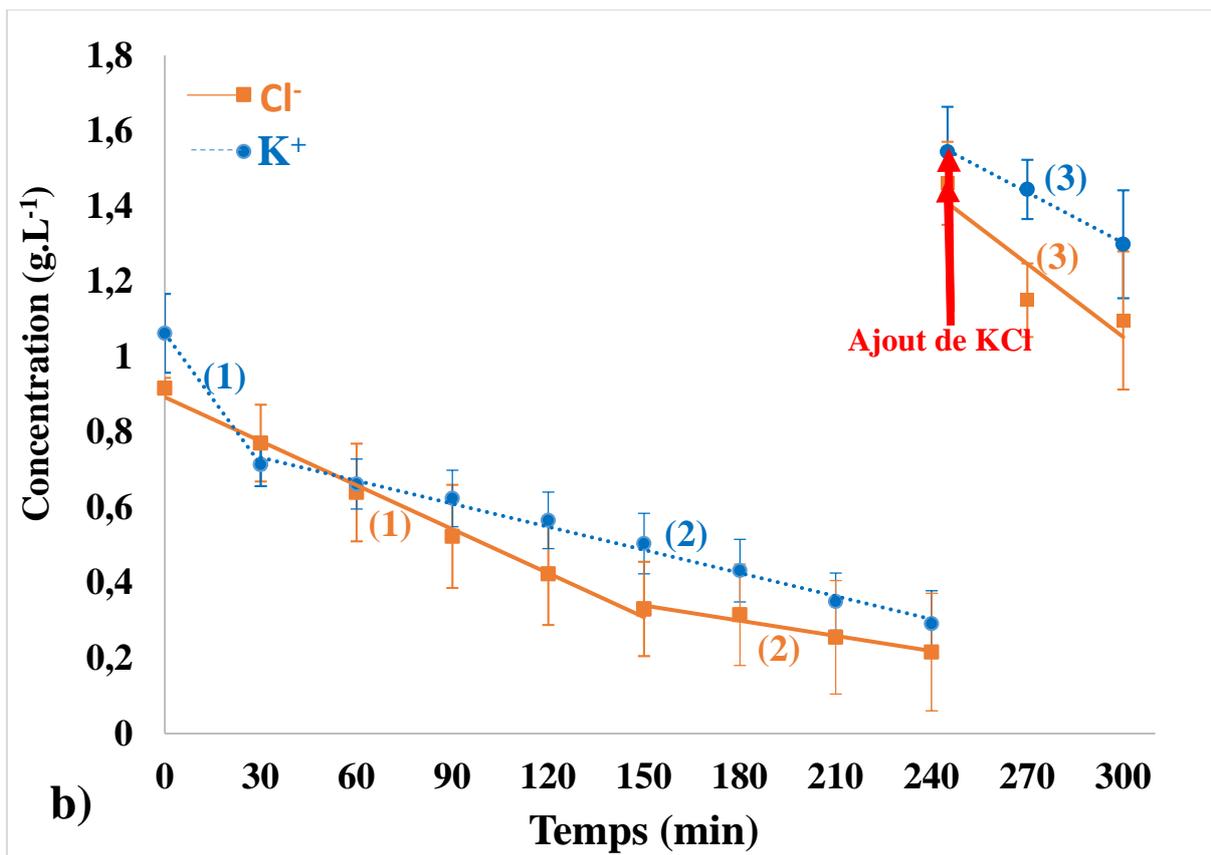


Fig. 23b : Évolution de la teneur en K⁺ et en Cl⁻ dans le compartiment de récupération au cours de l'électrodialyse du peptide anionique.

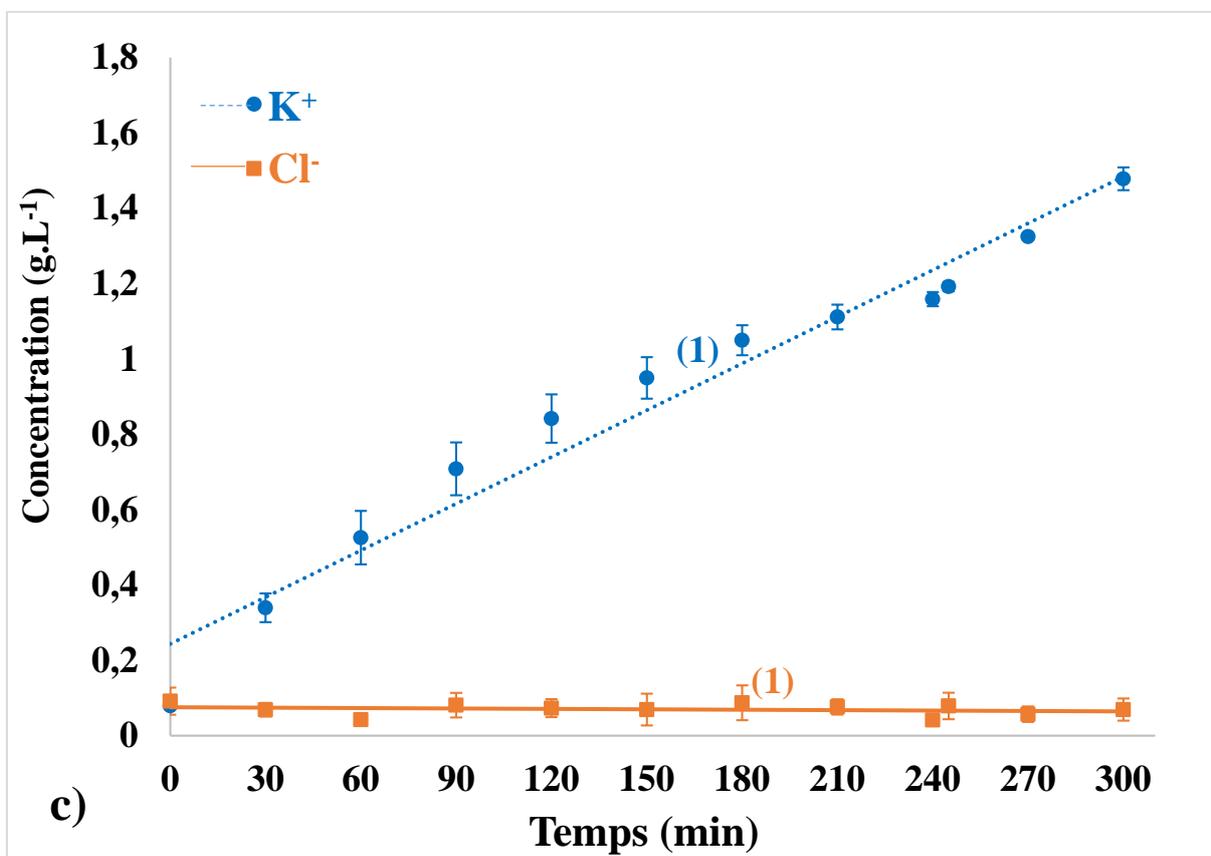


Fig. 23c : Évolution de la teneur en K⁺ et en Cl⁻ dans le compartiment cathodique au cours de l'électrodialyse du peptide anionique.

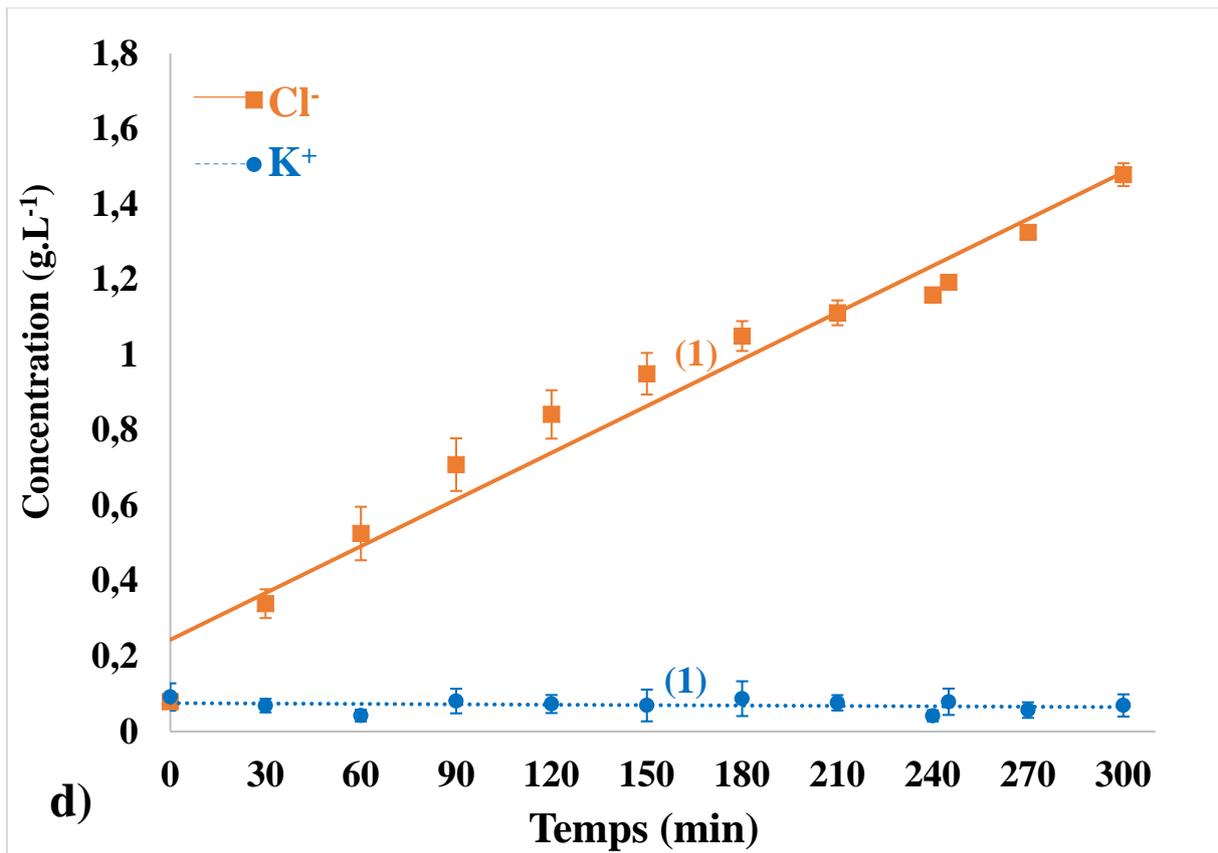


Fig. 23d : Évolution de la teneur en K^+ et en Cl^- dans le compartiment anodique au cours de l'électrodialyse du peptide anionique.

2.1.3 Migration peptidique

L'évolution de la concentration du peptide 4-asp au cours du temps est représentée dans les figures 24a et b pour les deux compartiments d'alimentation et de récupération.

Pendant les 240 premières minutes d'électrodialyse, on peut observer deux phases de migration du peptide dans les deux compartiments :

- Une première phase de migration (1) : elle s'étend sur les 60 premières minutes d'électrodialyse dans le compartiment d'alimentation (Fig 24a) et sur les 120 premières minutes dans le compartiment de récupération (Fig. 24b). Durant cette phase, on relève un flux entrant de $12 \pm 4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et un flux sortant de $56 \pm 8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans les compartiments de récupération et d'alimentation, respectivement.
- Une seconde phase de migration (2) : de 60 à 240 min d'électrodialyse dans le compartiment d'alimentation et de 120 à 240 min de traitement dans le compartiment de récupération. Lors de cette phase, on constate un arrêt de la migration du peptide 4-asp dans le compartiment d'alimentation et un faible flux peptidique entrant ($4 \pm 2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$) dans le compartiment de récupération.

Le flux peptidique obtenu dans le compartiment de récupération lors de la phase (1) est en accord avec les données de la littérature. En effet, des flux peptidiques totaux compris entre 6 et 10 $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ont été observés avec différents hydrolysats enzymatiques (Firdaous et *al.*, (2010) ; Doyen et *al.*, (2013) et Suwal et *al.*, (2014)).

La différence du flux entre les compartiments d'alimentation et de récupération peut être expliquée par un colmatage membranaire par le peptide anionique. La différence de durée de la phase (1) entre les deux compartiments peut s'expliquer un colmatage membranaire par le peptide 4-asp puis son relargage dans le compartiment de récupération.

Ce résultat suggère que le flux entrant du peptide 4-asp mesuré lors de la phase (2), vers le compartiment de récupération n'est pas dû à un transfert peptidique à partir du compartiment d'alimentation. Tout comme le résultat obtenu lors de la phase (1) d'électromigration, ce flux peptidique peut être expliqué par un relargage membranaire du peptide anionique.

La phase (3) correspond à l'ajout du KCl dans les compartiments d'alimentation et de récupération après 240 min d'électrodialyse. Une reprise de la migration peptidique a été observée avec un flux sortant de $38\pm 14 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment d'alimentation et un flux entrant de $23\pm 9 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment de récupération. Comme pour la phase (1), cette différence de flux peptidique entre les deux compartiments peut être expliquée par un colmatage membranaire.

La différence de flux sortant du compartiment d'alimentation et entrant dans le compartiment de récupération est moins importante durant la phase (3) que celle observée lors de la phase (1). Un colmatage membranaire plus important lors de la phase (1) serait probablement à l'origine de cette différence de flux observée.

La reprise de l'électromigration du peptide anionique après ajout de KCl confirme un ralentissement de l'autoprotolyse de l'eau du fait d'une augmentation de la conductivité des solutions d'alimentation et de récupération.

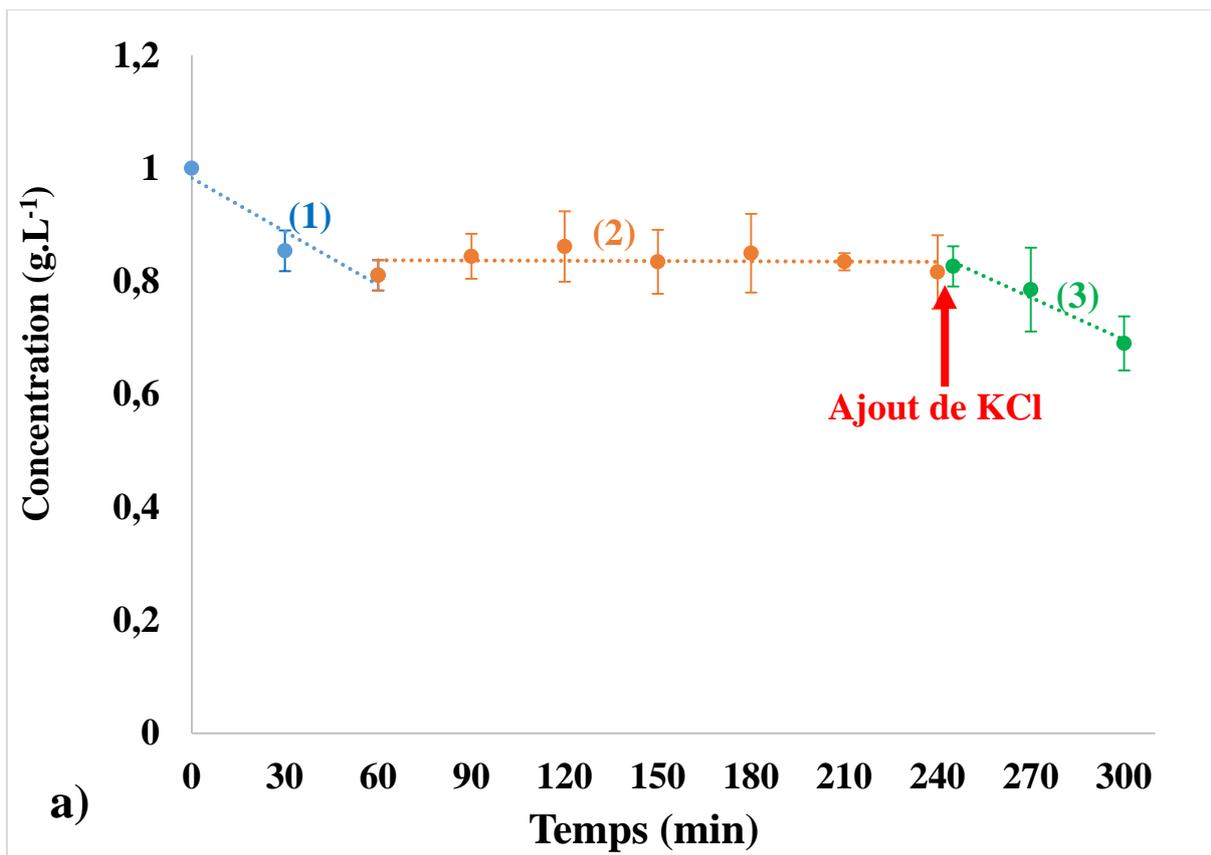


Fig. 24a : Évolution de la concentration en tétra-aspartique dans le compartiment d'alimentation au cours de l'électrodialyse.

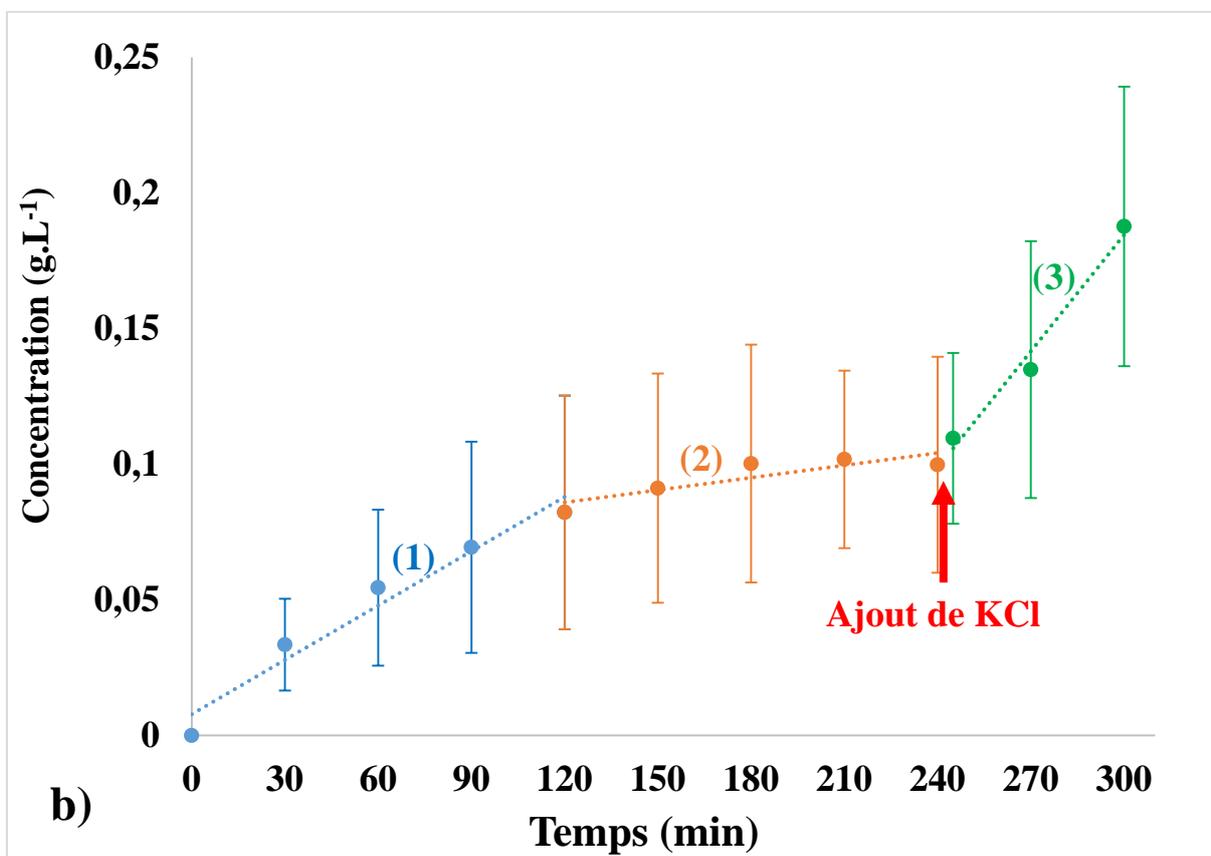


Fig. 24b : Évolution de la concentration en tétra-aspartique dans le compartiment de récupération au cours de l'électrodialyse.

2.1.4 Colmatage membranaire

La mesure du colmatage membranaire a été entreprise afin d'appuyer l'hypothèse formulée dans le paragraphe précédent concernant la différence de flux en peptide 4-asp sortant du compartiment d'alimentation et entrant dans le compartiment de récupération.

Le colmatage membranaire a été mesuré par un dosage de la teneur en azote total de chaque membrane utilisée en électrodialyse. La figure 25 montre que la teneur en azote de chaque membrane après électrodialyse était plus élevée par rapport à la membrane de contrôle ($P < 0,05$).

Les valeurs de teneur en azote des membranes échangeuses d'anions et de cations témoins étaient de $19,60 \pm 0,74$ et $6,82 \pm 0,70$ mgN.g⁻¹ de membrane sèche, respectivement. Ces valeurs sont proches de celles rapportées dans la littérature (Casademont et al. (2008) ; Langevin et Bazinet (2011)). À la fin de l'électrodialyse, la teneur en azote des membranes a atteint $24,50 \pm 1,50$ mgN.g⁻¹ pour la membrane anionique et $9,08 \pm 0,42$ mgN.g⁻¹ pour la membrane cationique soit une augmentation de 1,25 fois pour la MEA et de 1,33 fois pour la MEC. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Langevin et Bazinet (2011) où des augmentations de 2,9 et 1,3 fois de teneur en azote ont été obtenues respectivement pour la MEC et la MEA après trempage des membranes pendant 24h dans un hydrolysate de soja. D'après les auteurs, des interactions électrostatiques étaient à l'origine du colmatage des membranes échangeuses d'ions. Dans le cas présent, le colmatage de la membrane échangeuse d'anions est dû aux interactions électrostatiques qui auraient lieu entre le peptide anionique et la MEA. Le colmatage de la membrane échangeuse de cations par le peptide 4-asp peut être associé à « l'effet circulation » qui confère une charge positive au 4-asp et entraîne sa migration vers la cathode.

La teneur en azote de la membrane d'ultrafiltration est passée de $0,42 \pm 0,08$ à $0,65 \pm 0,08$ mgN.g⁻¹. Cette faible variation de la teneur en azote signifierait de faibles interactions entre le peptide et la membrane d'ultrafiltration qui peut s'expliquer par le seuil de coupure de la membrane 20 fois supérieur à la taille du peptide.

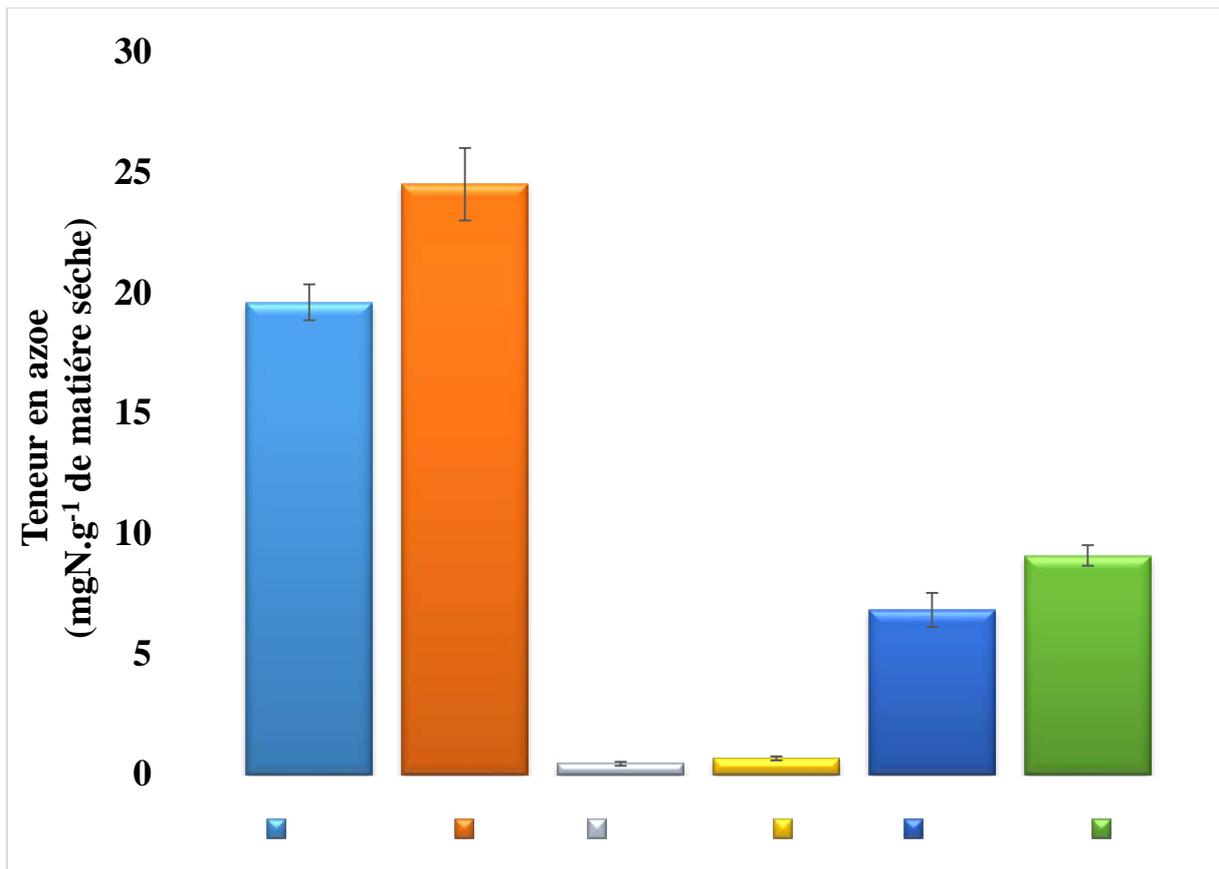


Fig. 25 : Évaluation de la teneur en azote des membranes échangeuses d'anions (MEA), d'ultrafiltration (MUF) et échangeuse de cations (MEC) avant (Tn: témoin négatif) et après électrodialyse.

2.2 Migration d'un peptide cationique : la tétra-lysine (4-lys)

Dans cette partie, nous nous intéressons au transfert d'un peptide cationique, la tétra-lysine, contenu dans une solution saline à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl.

Comme pour le peptide anionique, la durée de l'électrodialyse est fixée à 5 heures avec un ajout de KCl au bout de 4 heures d'expérience. Les paramètres électrodialytiques ont été suivis ainsi que la migration des ions et du peptide.

2.2.1 Évolution des paramètres électrodialytiques

2.2.1.1 Conductivité électrique

Les conductivités des compartiments d'alimentation et de récupération ont été suivies tout au long de l'électrodialyse. L'évolution en fonction du temps dans les compartiments d'alimentation et de récupération est représentée dans les figures 26a et b.

Durant les 240 premières minutes d'électrodialyse, les conductivités des solutions d'alimentation et de récupération diminuent selon deux phases :

- Une première phase allant de 0 à 60 min d'électrodialyse pendant laquelle la conductivité baisse de façon linéaire et passe de $1412 \pm 72 \mu\text{S.cm}^{-1}$ à $976 \pm 184 \mu\text{S.cm}^{-1}$ et de $3443 \pm 93 \mu\text{S.cm}^{-1}$ à $2343 \pm 90 \mu\text{S.cm}^{-1}$ donnant lieu à des taux de déminéralisation sur une heure de 31% et 32% respectivement dans les compartiments d'alimentation et de récupération.
- Une deuxième phase de 60 à 240 min d'électrodialyse qui se distingue par une plus faible vitesse de déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération. En effet, sur trois heures d'électrodialyse, la conductivité passe de $976 \pm 184 \mu\text{S.cm}^{-1}$ à $621 \pm 86 \mu\text{S.cm}^{-1}$ et de $2343 \pm 90 \mu\text{S.cm}^{-1}$ à $1310 \pm 89 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ce qui correspond à des taux de déminéralisation de seulement 36% et 44% respectivement dans les compartiments d'alimentation et de récupération.

Comme expliqué précédemment avec le peptide anionique 4-asp, la déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération est en accord avec la configuration de la cellule d'électrodialyse utilisée.

On constate, comme pour le peptide anionique, des taux de déminéralisation plus faibles que ceux habituellement observés en EDUF (Poulin et *al.*, (2007) ; Firdaous et *al.*, (2010)). Ce constat est dû à l'apparition des ions H^+ et OH^- qui contribuent au transport du courant électrique.

La baisse de la vitesse de déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération est survenue plus rapidement dans le cas du peptide cationique 4-lys. En effet, cette baisse a été observée après seulement 60min d'électrodialyse au lieu de 150 min comme c'était le cas pour le peptide 4-asp.

Ce résultat peut-être attribué à deux phénomènes : 1) une plus forte autoprotolyse de l'eau, 2) un colmatage membranaire plus important lors du fractionnement du peptide cationique 4-lys. Dans une étude du colmatage de membranes échangeuses d'ions en électrodialyse conventionnelle, Casademont et *al.*, (2007, 2008) ont également observé une baisse de la déminéralisation suite à un colmatage de la membrane échangeuse de cations, freinant ainsi le déplacement des ions.

Après 240 min d'électrodialyse, un ajout de KCl a été effectué dans les compartiments d'alimentation et de récupération (Fig. 23a, phase (3)). À l'issue de cet ajout, les conductivités sont supérieures aux valeurs initiales en raison d'espèces chargées présentes dans les deux compartiments à la fin de la phase (2) et diminuent linéairement au cours du temps. Dans le compartiment d'alimentation, la conductivité passe de $1430 \pm 192 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $1224 \pm 170 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ ce qui correspond à un taux de déminéralisation de 14%. Dans le compartiment de récupération, la conductivité passe de $4793 \pm 128 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $4360 \pm 98 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ donnant lieu à un taux de déminéralisation de 9%. On peut constater des vitesses de déminéralisation identiques à celles de la phase (2).

L'ajout du KCl après 240 min d'électrodialyse n'a pas permis de restaurer les taux de déminéralisation initiaux des compartiments d'alimentation et de récupération. Ce résultat conforte en partie l'hypothèse du colmatage membranaire qui freinerait la migration des ions K^+ et Cl^- vers les compartiments de rinçage des électrodes.

2.2.1.2 Intensité du courant

L'intensité du courant évolue de manière similaire que la conductivité au cours des 240 premières minutes d'électrodialyse (Fig. 26c) avec la diminution de l'intensité du courant selon deux phases. Cette évolution de l'intensité du courant est différente avec celle observée avec le peptide 4-asp pour lequel un changement de pente n'a pas été obtenu sur les premières 4h de l'électrodialyse. Ce comportement peut être lié à un colmatage membranaire à l'origine de la baisse de migration des ions K^+ et Cl^- vers les compartiments de rinçage des électrodes.

Avec l'ajout de KCl (Fig. 23c phase (3)), l'intensité du courant n'a pas repris sa valeur initiale et augmente légèrement sur la dernière heure de l'expérience. En effet, on enregistre une évolution de l'intensité du courant de $0,06 \pm 0$ A à $0,08 \pm 0$ A.

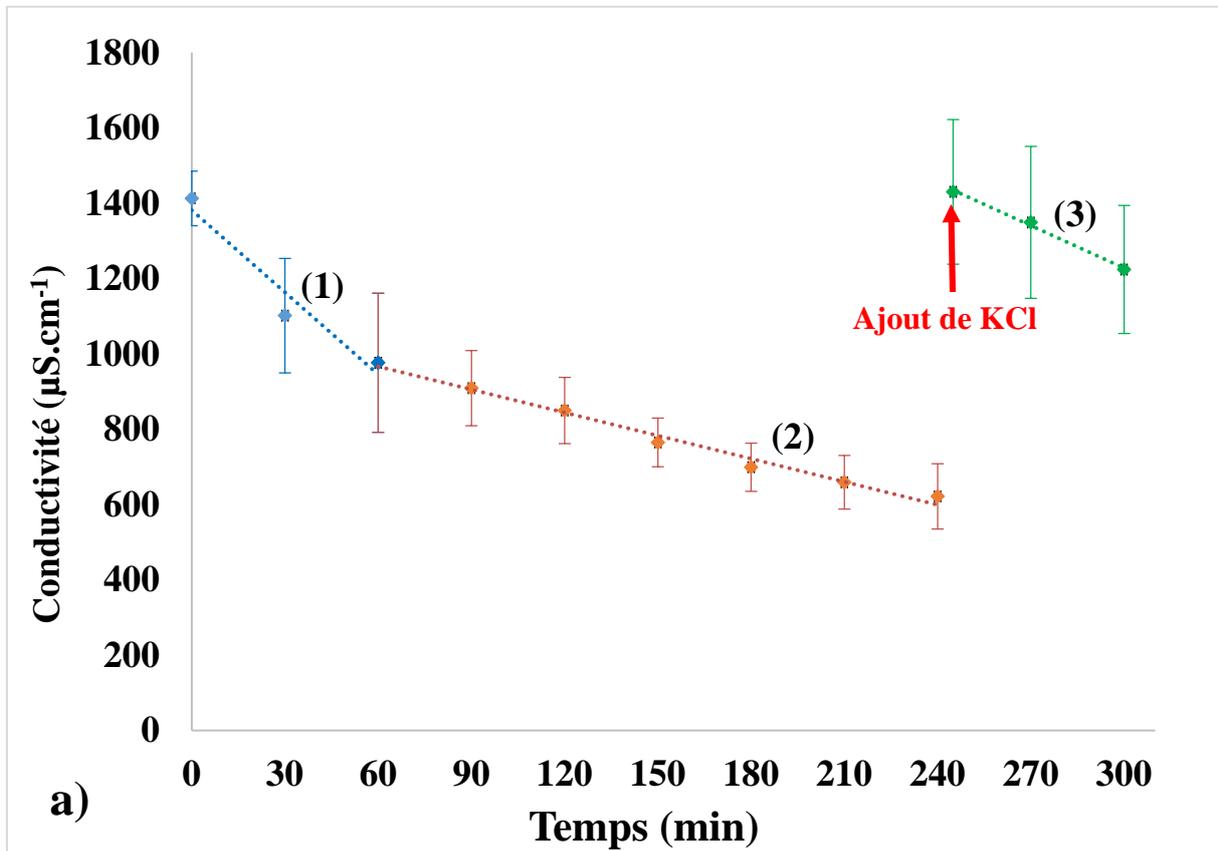


Fig. 26a : Évolution de la conductivité électrique dans la solution d'alimentation au cours du fractionnement du peptide cationique. (1) : phase 1 ; (2) : phase 2 et (3) : phase 3.

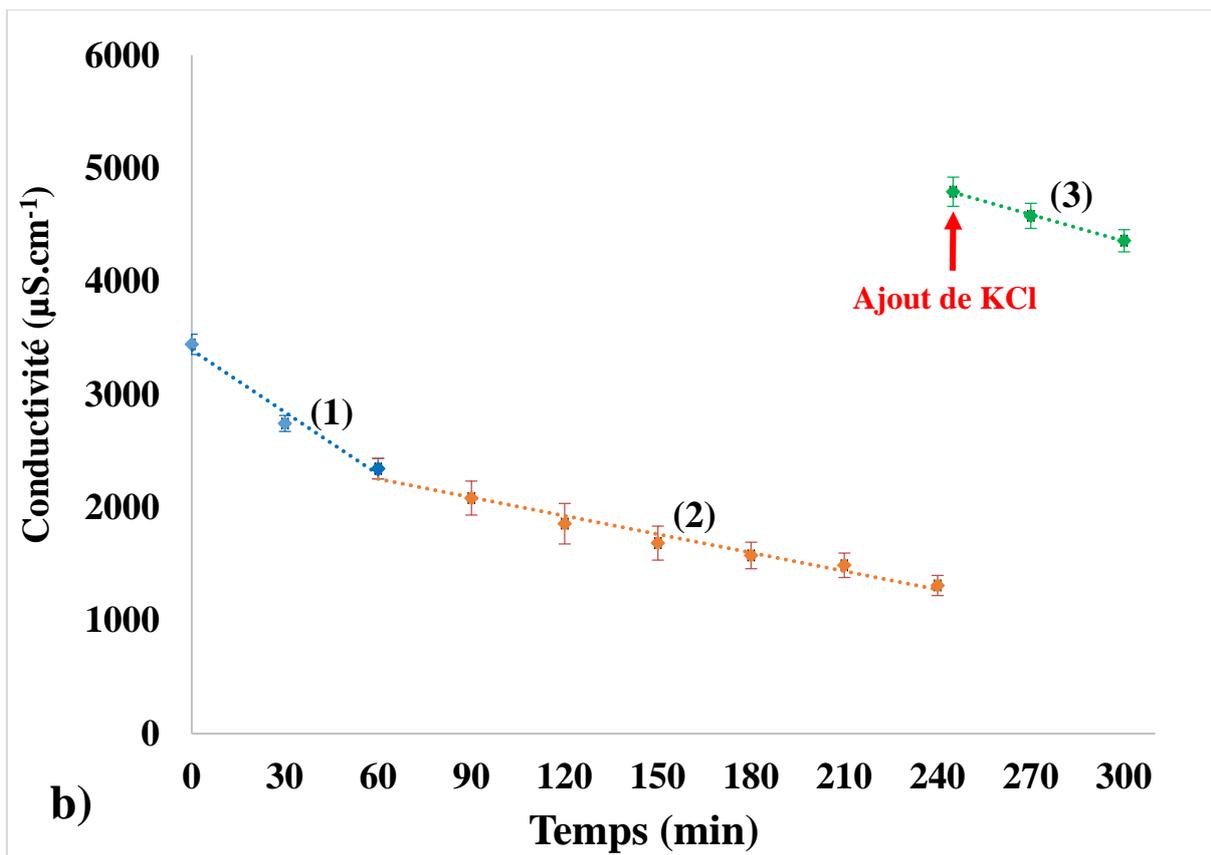


Fig. 26b : Évolution de la conductivité électrique dans la solution de récupération au cours du fractionnement du peptide cationique. (1) : phase 1, (2) : phase 2 et (3) : phase 3.

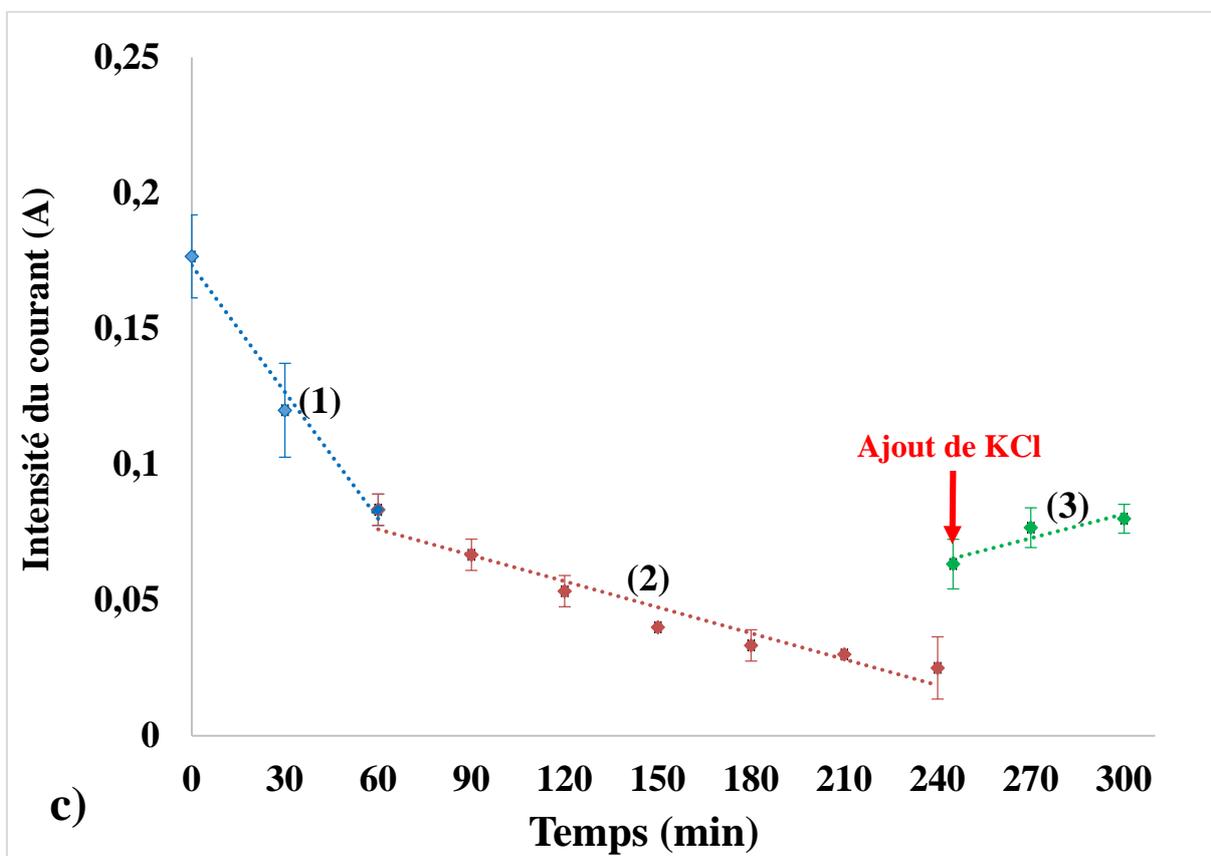


Fig. 26c : Évolution de l'intensité du courant au cours du fractionnement du peptide cationique. (1) : phase 1, (2) : phase 2 et (3) : phase 3.

2.2.2 Migration ionique

Les concentrations en ions K^+ et Cl^- dans les compartiments d'alimentation, de récupération et de rinçage des électrodes ont été mesurées toutes les 30 minutes au cours du fractionnement du peptide 4-lys. Les résultats sont représentés dans les figures 27a, b, c et d.

L'évolution de la concentration en ions K^+ et Cl^- dans le compartiment d'alimentation suit une vitesse de migration constante. En effet, les concentrations en ions K^+ et Cl^- ont baissé de façon linéaire au cours des 240 premières minutes d'électrodialyse. Les flux ioniques correspondants étaient faibles avec des valeurs moyennes de $5,81 \pm 1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $6,46 \pm 0,6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- .

Après ajout de KCl (Fig. 27b phase (2)), l'évolution de la concentration en ions K^+ et Cl^- dans le compartiment d'alimentation est identique à celle observée lors de la phase (1). Des flux ioniques de $16,7 \pm 1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $42 \pm 2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ont été mesurés respectivement pour le K^+ et le Cl^- . L'augmentation des flux en K^+ et Cl^- s'explique par l'augmentation de leur concentration après ajout de KCl dans le système et/ ou par la baisse de la dissociation de l'eau. La différence de flux entre les ions K^+ et Cl^- est probablement provoqué par un colmatage de la membrane d'ultrafiltration et/ ou échangeuse de cations, ce qui ralentirait la vitesse de migration du K^+ .

Dans le compartiment de récupération, la concentration ionique décroît selon deux phases au cours des 240 premières minutes d'électrodialyse : une première phase allant de 0 à 60 min d'électrodialyse correspondante à des flux de $128 \pm 12 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $104 \pm 21 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- et une deuxième phase comprise dans un intervalle de 60 à 240 min d'électrodialyse et se caractérisant par une baisse de la vitesse de migration des ions K^+ et Cl^- avec des flux de seulement $22 \pm 13 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et $37 \pm 8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et le Cl^- .

À l'issue des 240 min d'électrodialyse et l'ajout du KCl, (Fig. 27a phase (3)), une évolution linéaire de la concentration des ions K^+ et Cl^- a été observée. Des flux de $61 \pm 17 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $47 \pm 28 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- ont été obtenus lors de cette phase.

Dans les compartiments de rinçage d'électrolyte et durant les 300 min d'électrodialyse, l'évolution des concentrations en K^+ et Cl^- suit deux phases (Fig. 27b et d). Une première phase allant de 0 à 150 min d'électrodialyse correspondante à des flux de $114 \pm 5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $104 \pm 6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- . La deuxième phase est comprise entre 150 à 300 min d'électrodialyse et se distingue par une baisse de la vitesse de migration des ions K^+ et Cl^- . Des flux ioniques de $30 \pm 6 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et de $52 \pm 7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ont été mesurés pendant cette phase respectivement pour le K^+ et le Cl^- . On note par ailleurs une parfaite permselectivité des

membranes échangeuse d'ions et un transfert ionique compatible avec la configuration de la cellule d'électrodialyse, de la même manière qu'avec le peptide anionique.

Une baisse de la vitesse de migration des ions K^+ et Cl^- est observée dès 60 min d'électrodialyse dans le compartiment de récupération. Cette baisse n'a été observée qu'après 150 min d'électrodialyse pendant le fractionnement du peptide anionique 4-asp. Une baisse de la vitesse de migration des ions K^+ et Cl^- , non observée dans le cas du fractionnement du peptide 4-asp, a également été mesurée après 150 min d'électrodialyse dans les compartiments cathodique et anodique, respectivement. Ces résultats peuvent s'expliquer un colmatage membranaire et/ ou à une autoprotolyse de l'eau plus importante avec le peptide cationique 4-lys.

Contrairement au peptide 4-asp, l'ajout du KCl n'a pas permis de restaurer les flux ioniques initiaux dans le compartiment de récupération. Encore une fois, la cause de ce phénomène est liée à un colmatage membranaire qui freinerait le déplacement des ions K^+ et Cl^- à travers la ou les membranes colmatées.

Le bilan de matière a été vérifié pour les ions K^+ et Cl^- . Sur les premières 240 min d'électrodialyse, le rendement ionique est de 100%. Sur la dernière phase d'EDUF correspondant à l'ajout de KCl, le rendement est de 93% pour K^+ et Cl^- . Le bilan ionique indique une absence d'un colmatage membranaire significatif par les ions.

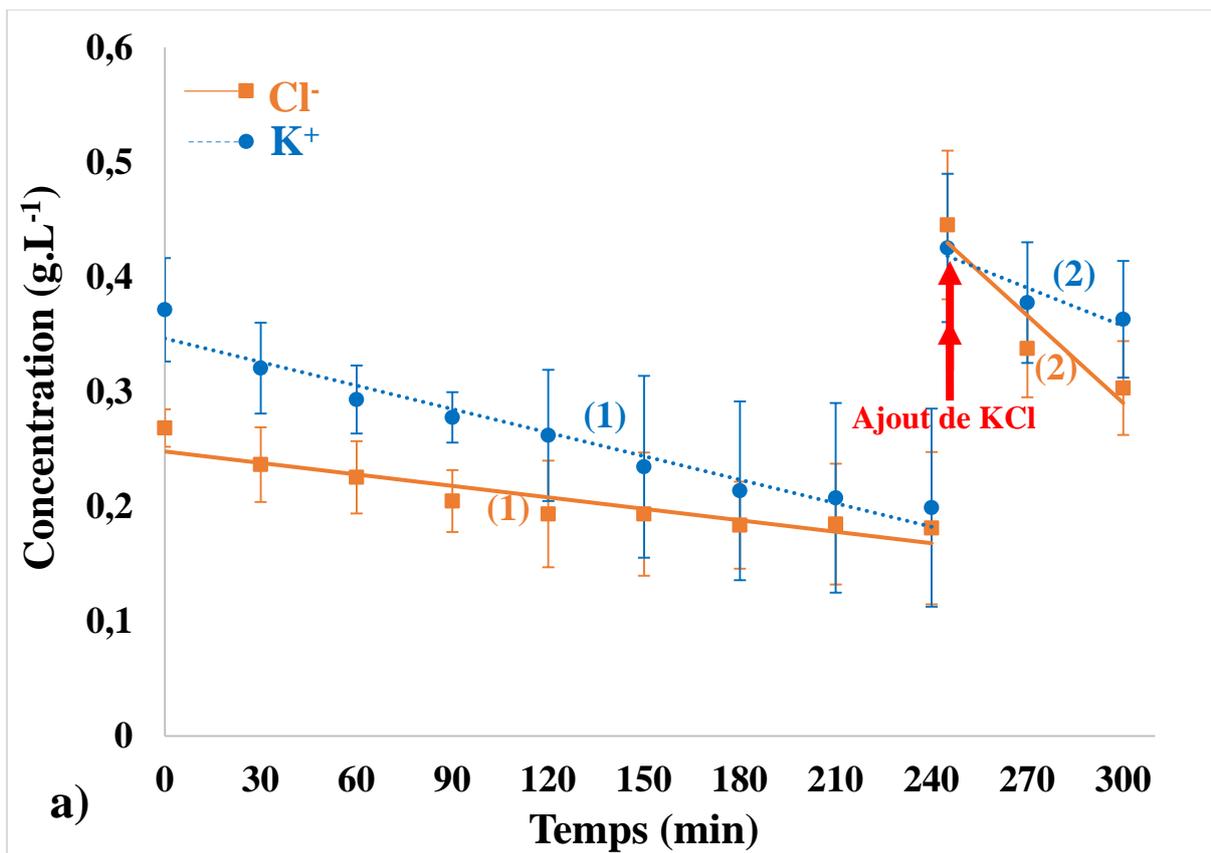


Fig. 27a : Évolution de la teneur en potassium et en chlorure dans le compartiment d'alimentation au cours de l'électrodialyse du peptide cationique.

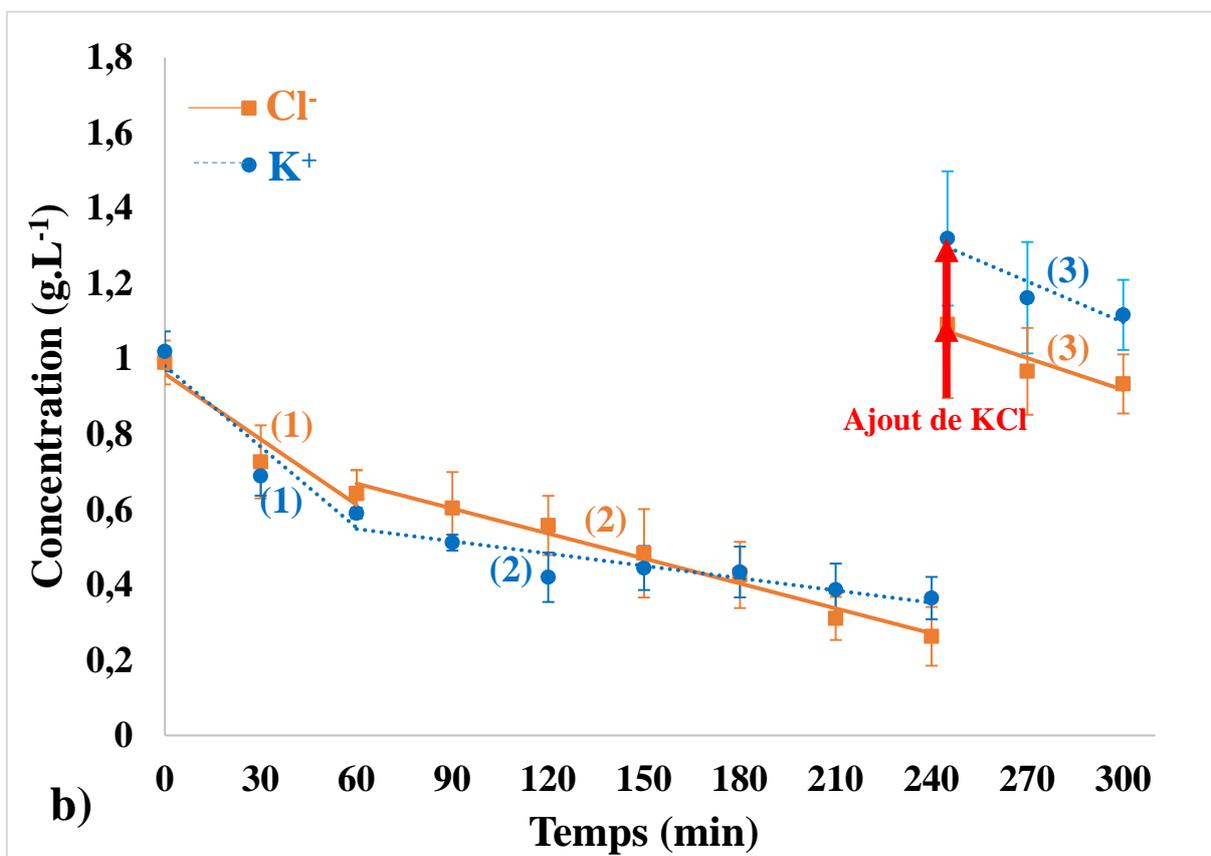


Fig. 27b : Évolution de la teneur en potassium et en chlorure dans le compartiment de récupération au cours de l'électrodialyse du peptide cationique.

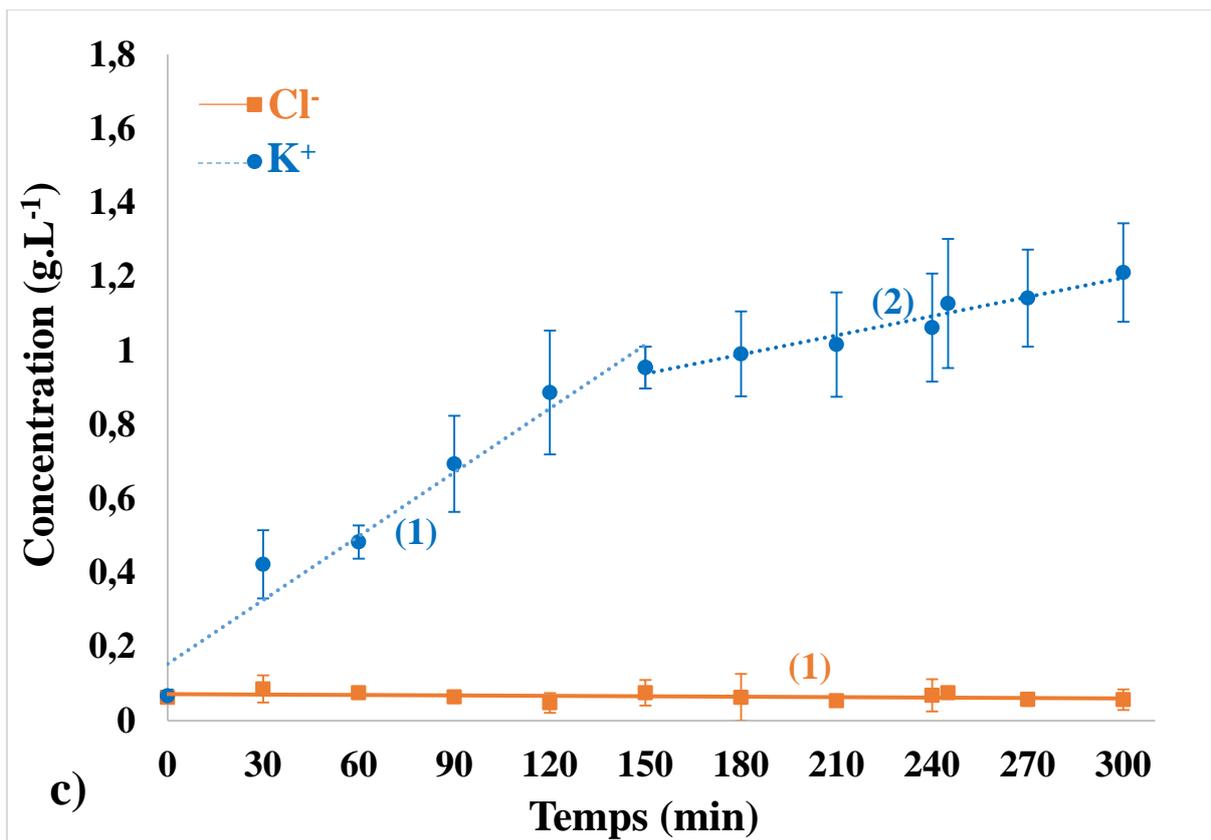


Fig. 27c : Évolution de la teneur en chlorure et en potassium dans le compartiment cathodique au cours de l'électrodialyse du peptide cationique.

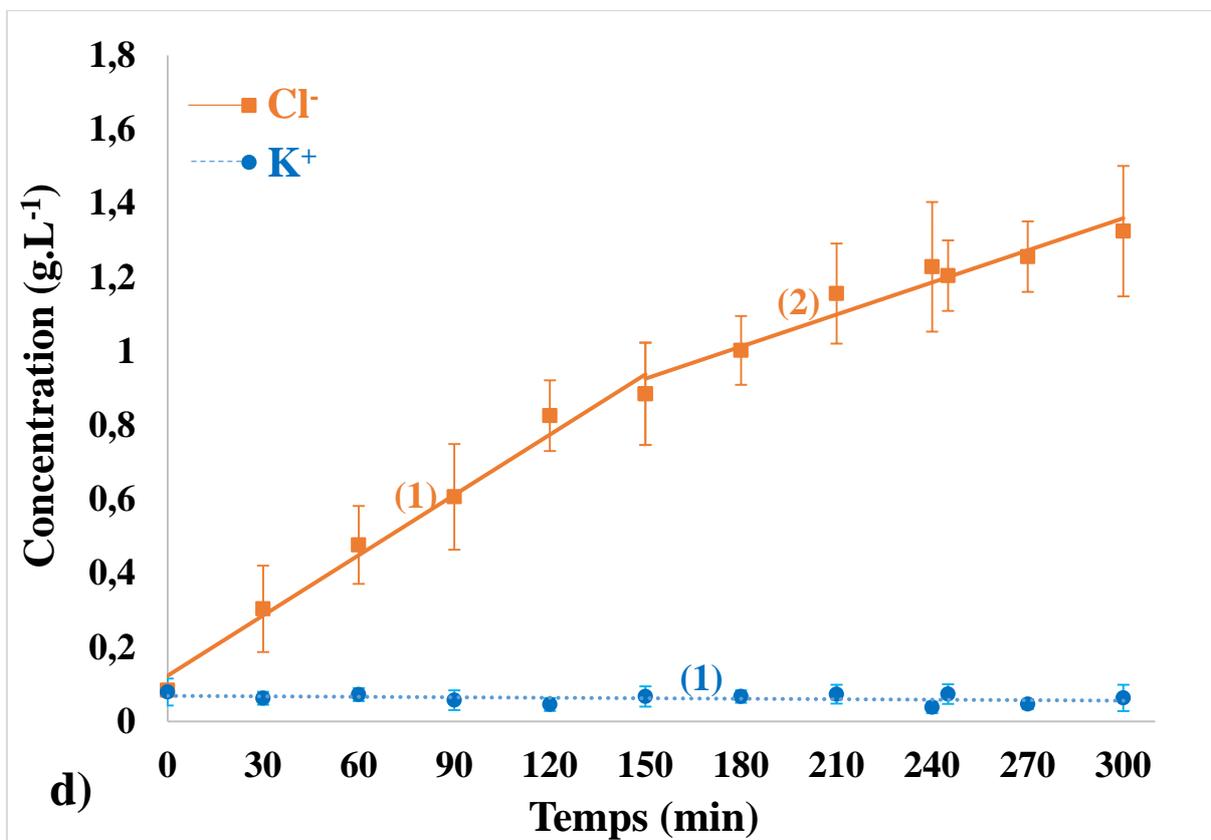


Fig. 27d : Évolution de la teneur en potassium et en chlorure dans le compartiment anodique au cours de l'électrodialyse du peptide cationique.

2.2.3 Migration peptidique

L'évolution de la concentration du peptide cationique 4-lys au cours du temps est représentée dans la figure 28 pour les deux compartiments d'alimentation et de récupération. Pour les deux compartiments, on observe deux phases de migration du peptide pendant les 300 min d'électrodialyse :

- Une première phase linéaire au cours des 60 premières minutes d'électrodialyse correspondant à la première phase de déminéralisation avec des flux sortants de 138 ± 26 $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et entrant de 107 ± 17 $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ du peptide dans les compartiments d'alimentation et de récupération, respectivement.
- Une seconde phase, dans un intervalle de 60 à 300 minutes d'électrodialyse, se caractérise par une baisse de la migration du peptide. Des flux du peptide 4-lys sortant de 29 ± 1 $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment d'alimentation et entrant de $11,61 \pm 1,28$ $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment de récupération ont été observés.

Par ailleurs, aucun transfert d'eau entre les compartiments d'alimentation et de récupération n'a été observé avec le peptide cationique 4-lys.

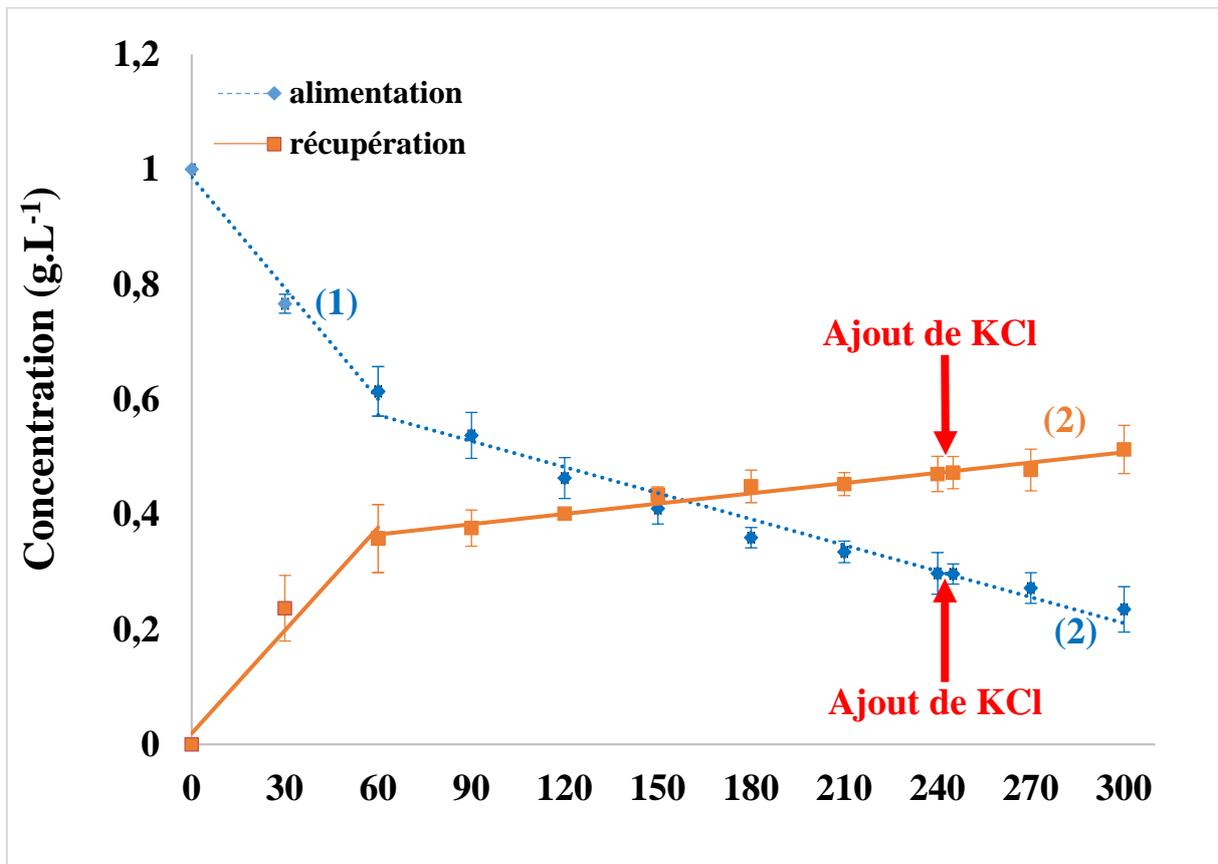


Fig. 28 : Évolution de la concentration en peptide 4-lys dans le compartiment d'alimentation et de récupération au cours de l'électrodialyse.

2.2.4 Colmatage membranaire

Les résultats du dosage de la teneur en azote de chaque membrane utilisée lors du fractionnement du peptide 4-lys et des membranes contrôles sont illustrés dans la figure 29. Pour chaque membrane, des différences significatives ont été obtenues avant (membrane contrôle) et après traitement ($P < 0,05$).

Les valeurs de la teneur en azote obtenues avec la membrane échangeuse d'anions contrôle et après traitement étaient de $19,6 \pm 0,7$ et $18,2 \pm 0,1 \text{ mgN.g}^{-1}$ de matière sèche, respectivement. Ces résultats sont semblables à ceux cités dans la littérature (Casademont et *al.*, (2008) ; Langevin et *al.*, (2011)). Les valeurs de la teneur en azote mesurées pour la membrane d'ultrafiltration contrôle et après traitement étaient respectivement de $0,43 \pm 0,08$ et $0,62 \pm 0,1 \text{ mgN.g}^{-1}$ de matière sèche.

On peut noter une faible variation de la teneur en azote avant et après électrodialyse pour les membranes anionique et d'ultrafiltration ce qui signifie de faibles interactions entre le peptide et ces membranes. Le même constat a été précédemment fait avec la membrane d'ultrafiltration lors du fractionnement de la solution peptidique 4-asp, expliqué par le seuil de coupure de la membrane d'ultrafiltration utilisée (20 fois la taille du peptide). Concernant la membrane échangeuse d'anions, sa faible interaction avec le peptide cationique 4-lys s'explique par leurs charges respectives. En effet, la membrane échangeuse d'anions et le peptide 4-lys portent des charges positives. Si des interactions entre les deux existent, elles seront de nature répulsive.

Cependant, la membrane échangeuse de cations présente une forte variation de sa teneur en azote après électrodialyse en comparaison avec la membrane témoin. Les teneurs en azote sont passées de $6,82 \pm 0,7 \text{ mgN.g}^{-1}$ à $46 \pm 6 \text{ mgN.g}^{-1}$ de matière sèche de la membrane avant et après électrodialyse ce qui correspond à une augmentation de 6,7 fois. À titre de comparaison, une augmentation de seulement 1,33 fois en teneur en azote de la MEC a été obtenue lors du fractionnement du peptide anionique et de 2,9 fois en teneur en azote de la membrane échangeuse de cations a été rapportée par Langevin et Bazinet (2011). Cette importante augmentation de la teneur en azote de la membrane résulte de fortes interactions électrostatiques entre la membrane cationique (chargée négativement) et le peptide 4-lys (chargée positivement) ce qui conduit à un colmatage de la membrane par le peptide 4-lys.

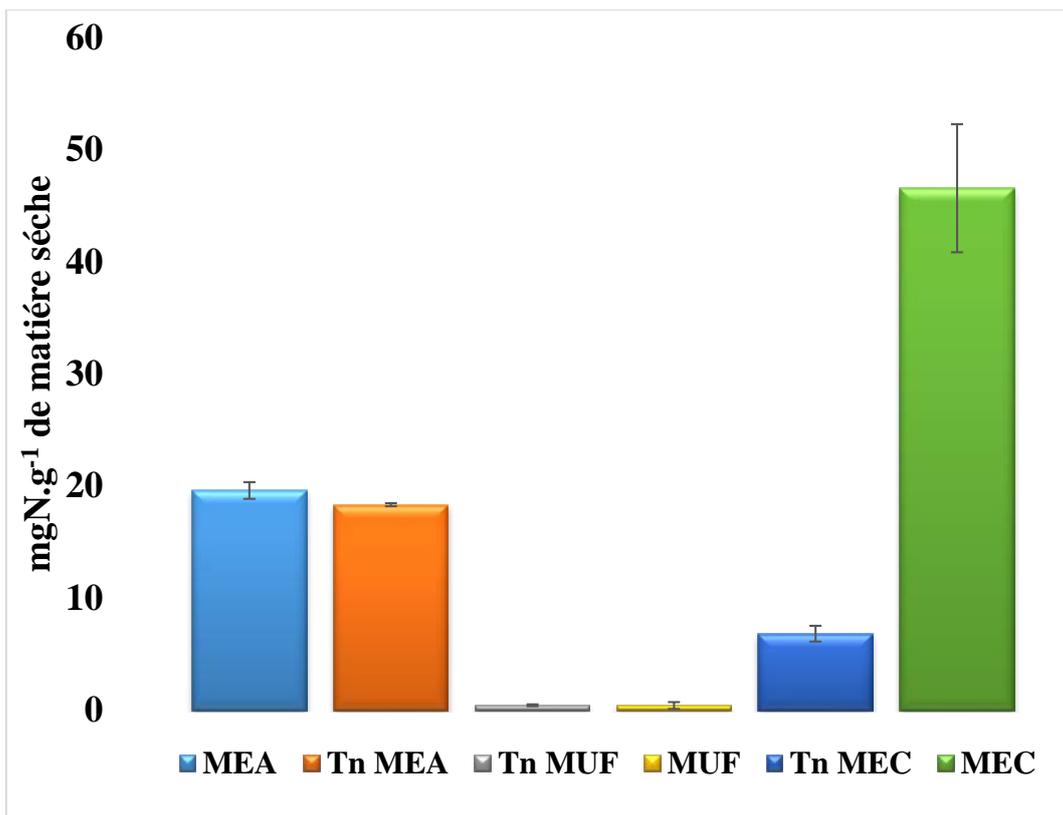


Fig. 29 : Évaluation de la teneur en azote des membranes échangeuses d'anions (MEA), des membranes d'ultrafiltration (MUF) et des membranes échangeuses de cations (MEC) avant (Tn : témoin négatif) et après électrodialyse.

2.2.5 Discussion

L'objectif d'étudier la migration peptidique avec des solutions modèles simples (contenant un seul peptide) était de mettre en évidence les phénomènes qui régissent le transfert de peptides en électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration. Pour cela, l'électrodialyse d'un peptide anionique (4-asp) et d'un peptide cationique (4-lys) a été entreprise séparément dans des conditions opératoires identiques.

Transferts ionique et peptidique sur les 240 premières minutes d'EDUF :

Le suivi des paramètres électrodialytiques a montré une corrélation entre l'évolution de la conductivité électrique et de l'intensité du courant et celle de la concentration en ions. En effet, la migration des ions K^+ et Cl^- vers les compartiments de rinçage des électrodes est accompagnée par une diminution de la conductivité et de l'intensité du courant. Ce constat confirme la contribution importante des ions K^+ et Cl^- au transport du courant au sein de la cellule d'électrodialyse et à la conductivité dans les compartiments d'alimentation et de récupération.

Compte tenu de la force du champ électrique fixée lors des expériences (10 V.cm^{-1}) et de la faible force ionique dans les compartiments d'alimentation et de récupération, la densité de courant limite a été rapidement atteinte lors de l'électrodialyse. Une étude récente de fractionnement par EDUF d'un hydrolysate de crabe des neiges (Doyen et *al.*, 2013) a montré que la densité de courant limite a été atteinte à partir d'un champ électrique de $3,6 \text{ V.cm}^{-1}$. Par ailleurs, des variations importantes de pH dans les compartiments d'alimentation et de récupération ont été observées dès le début de l'expérience confirmant le dépassement de la DCL. En effet, il a été rapporté dans la littérature qu'un changement de pH en électrodialyse est dû à la dissociation des molécules d'eau en ions H^+ et OH^- qui sont générés au niveau des membranes échangeuses d'ions après que la DCL soit dépassée (Cowan et Brown, (1959) ; Kressman et *al.*, (1969) ; Krol et *al.*, (1999)). Ce phénomène explique les deux phases de migration observées pour les ions K^+ et Cl^- lors des 240 premières minutes de l'électrodialyse et qui coïncide avec la diminution de la vitesse de déminéralisation dans les compartiments d'alimentation et de récupération. En effet, suite au dépassement de la densité de courant limite, les ions H^+ et OH^- générés participent au transport du courant au détriment des ions K^+ et Cl^- . On note par ailleurs que les tendances en termes de déminéralisation et de migration ionique ne présentent pas de différences significatives ($P < 0,05$) entre les deux peptides étudiés.

De la même manière que la migration ionique, la migration peptidique a été suivie. Deux phases de transfert ont été obtenues pour chacun des deux peptides. Contrairement aux ions, les mécanismes régissant le transfert peptidique semblent être différents entre le peptide anionique et le peptide cationique.

Pour le peptide anionique 4-asp, la première phase (60 min pour le compartiment d'alimentation et 120 min pour le compartiment de récupération) correspond à une migration peptidique due au champ électrique appliqué. La dissociation de l'eau qui intervient juste après l'application du champ électrique ne semble pas avoir un effet considérable sur la migration du peptide (Fig. 30a). En effet, un flux peptidique de $56 \pm 8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ a été obtenu.

Cette phase de migration a été largement décrite dans la littérature (Poulin et *al.*, (2006) ; Ndiaye et *al.*, (2010) ; Vanhoute et *al.*, (2010)). Elle correspond à l'électromigration d'une molécule chargée telle que les peptides sous l'effet d'un champ électrique. Pendant cette phase (1), des différences de flux peptidique sortant et entrant ainsi que de durée d'électromigration ont été observées entre les compartiments d'alimentation et de récupération. Le colmatage membranaire puis un possible relargage du peptide anionique 4-asp peuvent expliquer ce résultat. Ce relargage serait dû à une protonation du peptide 4-asp, adsorbé sur la membrane

échangeuse d'anions, par les ions H^+ . Le peptide 4-asp va ainsi porter une charge positive et migrer vers la cathode en passant par le compartiment de récupération. Comme les membranes n'ont été retirées qu'à la fin de l'électrodialyse, le suivi de la formation du colmatage au cours du temps n'a pas pu être possible. Toutefois, le calcul des rendements massiques à différents stades de l'électrodialyse (87% à 30 min, 87% à 60 min et 95% à 180 min) conforte l'hypothèse du colmatage de la membrane échangeuse d'anions par le peptide et du possible relargage de ce dernier au cours de l'électrodialyse.

La seconde phase (Fig. 30b) apparue après 60 minutes d'électrodialyse correspond à un arrêt de la migration du peptide anionique à partir du compartiment d'alimentation. Toutefois, un faible transfert du peptide 4-asp avec un flux de $4 \pm 2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ a été mesuré dans le compartiment de récupération. Comme expliqué précédemment lors de la phase (1), ce transfert peptidique serait provoqué par un relargage du peptide anionique par les membranes au cours de l'électrodialyse.

L'arrêt du transfert du peptide anionique lors de cette phase est dû à l'autoprotolyse de l'eau qui a donné lieu à des phases de protonation et déprotonation du peptide par les ions H^+ et OH^- générés au cours de l'électrodialyse. Ce phénomène préalablement décrit lors la séparation d'acides aminés par électrodialyse conventionnelle (Shaposhnik et *al.*, (1999) ; Shaposhnik et *al.*, (2009)) semble s'appliquer dans le cas présent. En effet, les ions H^+ formés au voisinage de la MEA migrent vers la cathode à travers la membrane d'ultrafiltration. Au cours de leur migration, ils interagissent avec les groupements fonctionnels du peptide anionique. La charge du peptide devient alors positive en raison de sa protonation et tente de migrer vers la MEC. Les ions OH^- générés au niveau de cette dernière reconstituent la charge peptidique par déprotonation. Par conséquent, le peptide 4-asp migre à nouveau vers l'anode. On parle alors d'un effet circulation qui empêche la migration du peptide anionique à travers la membrane d'ultrafiltration.

Pour le peptide cationique 4-lys, on distingue également deux phases de transfert avec une première phase (Fig. 31a) pendant les 60 premières minutes d'électrodialyse et qui donne lieu à un flux peptidique élevé de $107 \pm 17 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Durant cette phase (1), les ions H^+ générés par autoprotolyse de l'eau interagissent avec les groupements fonctionnels libres du peptide cationique et provoquent une augmentation de sa mobilité et donc de son transfert. Ce transport facilité, précédemment décrit par Metayer et *al.*, (1991 et 2002), est certainement à l'origine de la forte migration du peptide. On peut souligner par ailleurs un rendement massique de 91% du

peptide lors de cette première phase de transfert ce qui laisse penser qu'une forte migration du peptide défavorise les interactions entre le peptide et la membrane échangeuse de cations.

La seconde phase (Fig. 31b) intervient après 60 minutes d'électrodialyse et se distingue par une baisse du flux du peptide cationique qui s'évalue à $11,61 \pm 1,28 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Ce dernier est de même ordre de grandeur que celui obtenu avec le peptide anionique pendant les 60 premières minutes de l'électrodialyse. Au bout de 240 minutes d'électrodialyse, le rendement massique du peptide est de l'ordre de 78%. On peut en conclure que les interactions électrostatiques entre le peptide 4-lys et la membrane cationique ont eu lieu lors de cette phase de transfert.

Effet de l'ajout du KCl sur les transferts ionique et peptidique à l'issue de 240 minutes d'électrodialyse :

Afin de mettre davantage en évidence le rôle des effets de la densité de courant limite sur les transferts ionique et peptidique au sein de la cellule d'électrodialyse, nous avons procédé à un ajout de KCl dans les compartiments d'alimentation et de récupération de façon à ce que les conductivités initiales dans ces deux compartiments soient rétablies.

Globalement, le transfert ionique a été mesuré. Dans le cas du peptide cationique, les flux ioniques et la vitesse de déminéralisation ont été plus faibles probablement en raison du colmatage relativement important de la membrane échangeuse de cations. Le colmatage aurait pour effet de limiter la migration des espèces chargées à travers la MEC et provoquerait une chute de l'intensité du courant et du taux de déminéralisation des compartiments d'alimentation et de récupération. En effet, il a été rapporté que les dépôts formés à la surface membranaire lors d'un colmatage augmentent sa résistance électrique et provoquent la baisse de la migration des molécules chargées par le biais de la chute du courant électrique (Shaposhnik *et al.*, (2002)). L'addition de KCl a donc comme effet de limiter la dissociation des molécules d'eau par l'augmentation de la conductivité dans les deux compartiments. La baisse de l'autoprotolyse de l'eau a permis de restaurer en grande partie le flux peptidique initial de 4-asp (Fig. 30c). En effet, un flux de $38 \pm 14 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ a été obtenu. Quant au peptide cationique, l'ajout de KCl après 240 min d'électrodialyse n'a pas eu d'effet positif sur son transfert. Avec la limitation de la dissociation des molécules d'eau, les ions H^+ ne sont pas suffisamment générés pour promouvoir le transfert de 4-lys comme constaté lors de la phase (1).

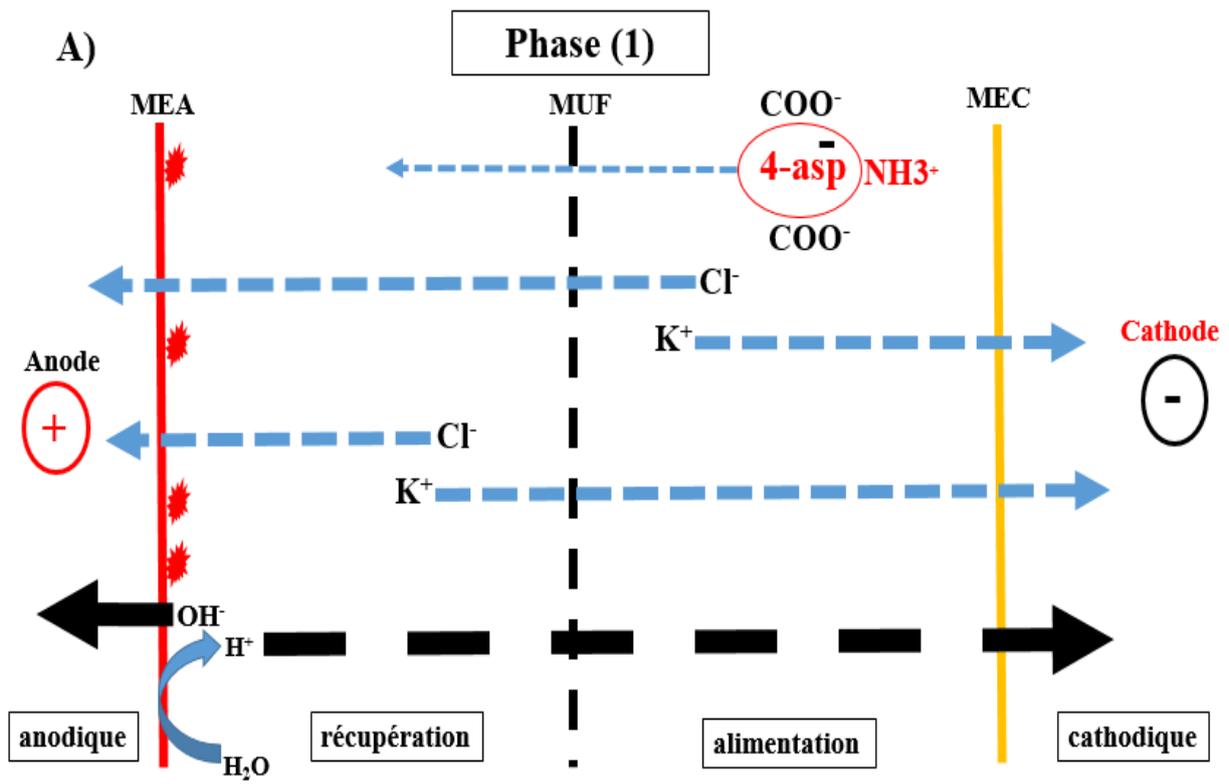


Fig. 30a : Représentation schématique du transfert du peptide 4-asp lors de la phase (1) d'électromigration.
 * : Colmatage membranaire par 4-asp ; - - - - : Sens de l'électromigration ; MUF : membrane d'ultrafiltration.
 MEA : membrane échangeuse d'anions et MEC : membrane échangeuse de cations.

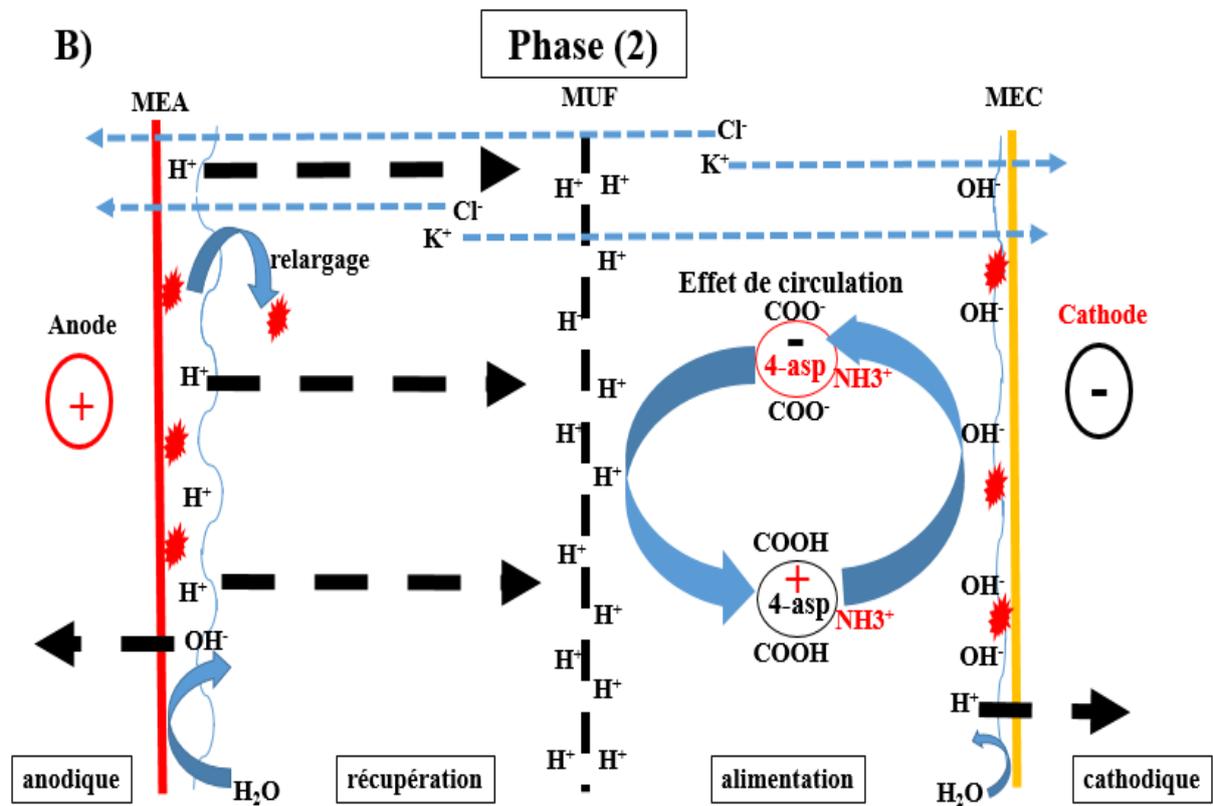


Fig. 30b : Représentation schématique du transfert du peptide 4-asp lors de la phase (2) d'électromigration.
 * : Colmatage membranaire par 4-asp ; - - - - : Sens de l'électromigration ; MUF : membrane d'ultrafiltration.
 MEA : membrane échangeuse d'anions et MEC : membrane échangeuse de cations.

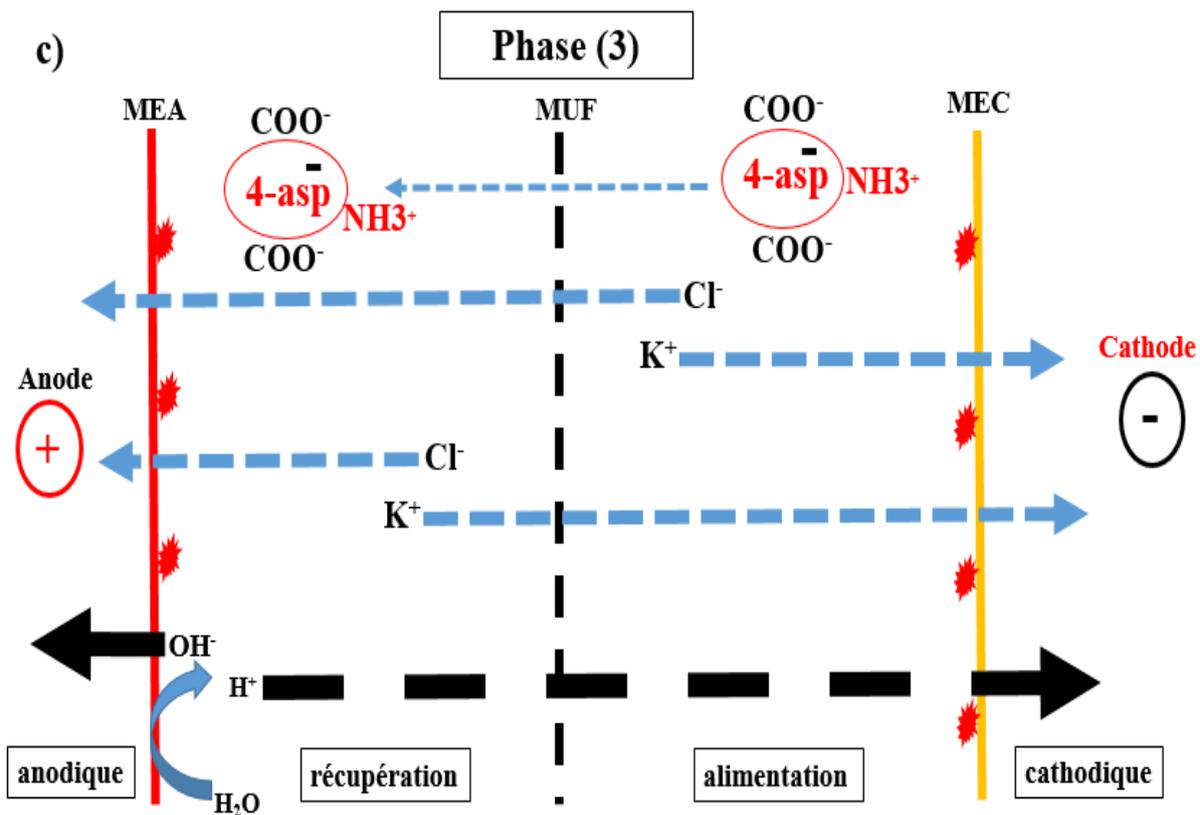


Fig. 30c : Représentation schématique du transfert du peptide 4-asp lors de la phase (3) d'électromigration.
 * : Colmatage membranaire par 4-asp ; - - - - - : Sens de l'électromigration ; MUF : membrane d'ultrafiltration.
 MEA : membrane échangeuse d'anions et MEC : membrane échangeuse de cations.

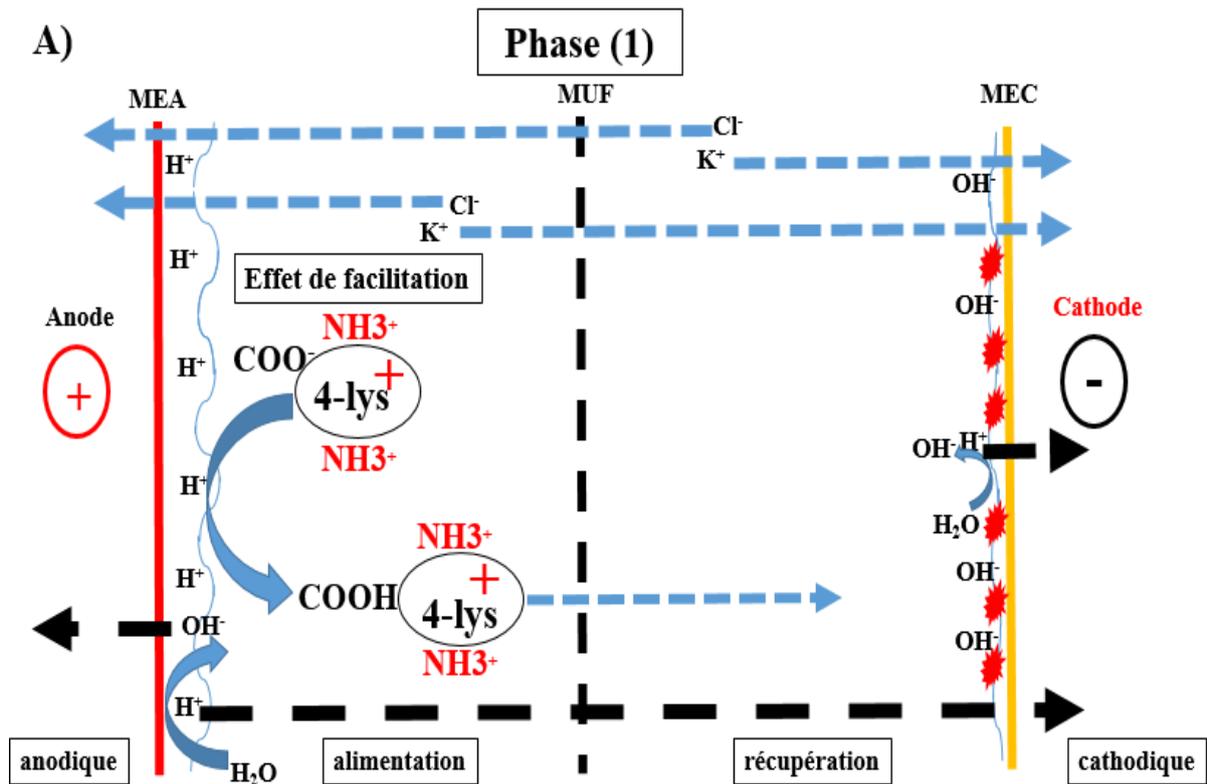


Fig. 31a : Représentation schématique du transfert du peptide 4-lys en EDUF lors de la phase 1 d'électromigration. ✱ : Colmatage membranaire par 4-lys ; - - - - - : Sens de l'électromigration. MUF : membrane d'ultrafiltration. MEA : membrane échangeuse d'anions et MEC : membrane échangeuse de cations.

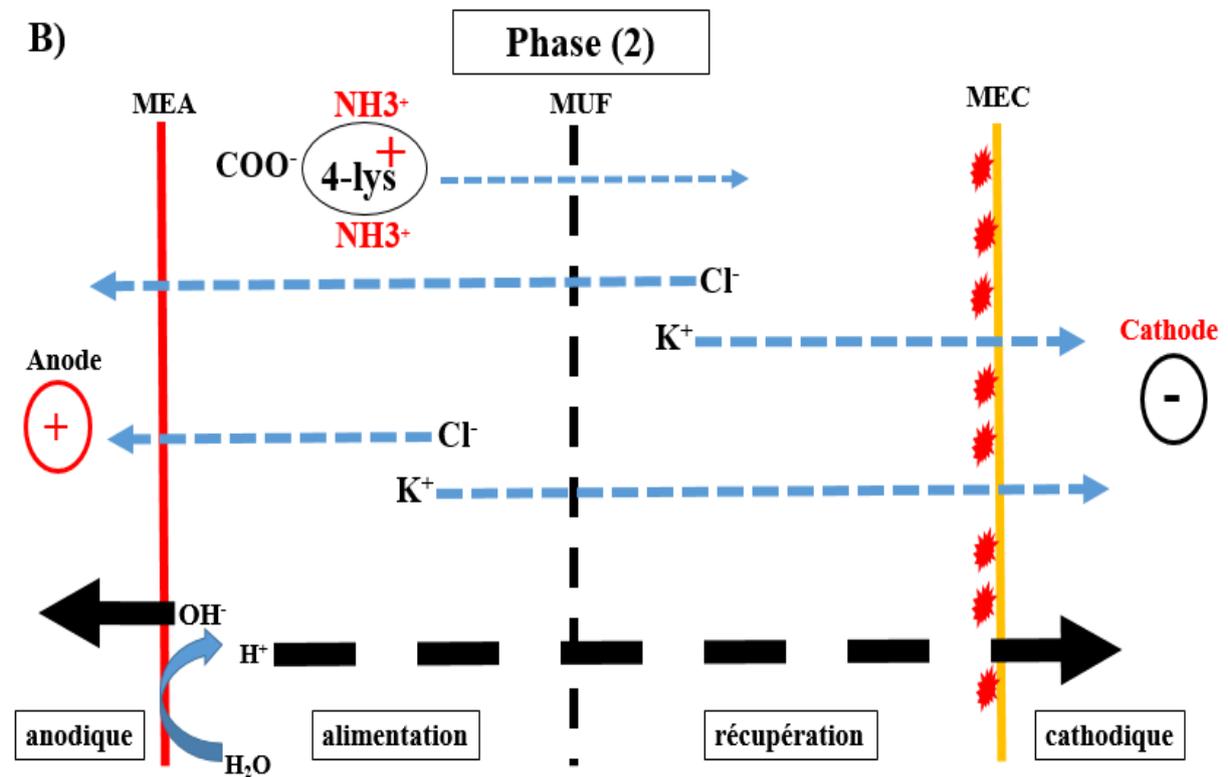


Fig. 31b : Représentation schématique du transfert du peptide 4-lys en EDUF lors de la phase 2 d'électromigration. ✱ : Colmatage membranaire par 4-lys ; - - - - - : Sens de l'électromigration. MUF : membrane d'ultrafiltration. MEA : membrane échangeuse d'anions et MEC : membrane échangeuse de cations.

3 Fractionnement d'un mélange peptidique par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration

La séparation de peptides au sein de solutions simples par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration a permis de mettre en évidence le rôle important que peut jouer l'autoprotolyse de l'eau sur la migration des peptides ainsi que celui des interactions peptide/MEI non négligeables dans ce procédé. L'étude a également montré que la migration individuelle des deux peptides est régie essentiellement par électromigration.

Dans cette partie de l'étude, nous nous intéressons au fractionnement d'un mélange contenant les deux peptides précédemment étudiés séparément. Dans le but de mieux comprendre l'impact des biomolécules tels que des peptides sur les transferts électrodialytiques au sein du procédé, deux séries de manipulation ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires. Une première série avec une solution saline de KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et une seconde série avec un système 4-asp (0,05%)/4-lys (0,05%)/KCl ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$).

En plus des paramètres suivis lors du traitement des solutions simples, nous avons également suivi l'évolution de la différence du potentiel électrique aux interfaces des différentes membranes utilisées.

3.1 Évolution des paramètres électrodialytiques

3.1.1 Intensité du courant

L'intensité du courant a été relevée toutes les 5 minutes tout au long de l'électrodialyse de la solution de KCl et du mélange peptidique. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 32.

Sur les 25 premières minutes d'électrodialyse, l'intensité du courant évolue très peu pour atteindre ensuite une valeur de $0,46 \pm 0,09 \text{ A}$ dans le cas du mélange peptidique et de $0,61 \pm 0,06 \text{ A}$ dans le cas de la solution saline KCl. Après ajout de KCl, l'intensité du courant augmente à $1,82 \pm 0,08 \text{ A}$ et $1,72 \pm 0,08 \text{ A}$ pour le mélange et la solution de KCl, respectivement. Pour les deux systèmes, on constate un léger plateau de l'intensité du courant pendant les 10 minutes qui ont suivi l'ajout de KCl avant qu'elle diminue linéairement jusqu'à la fin de l'électrodialyse.

La baisse de l'intensité du courant correspond à la configuration de la cellule d'électrodialyse utilisée qui conduit à la déminéralisation des compartiments de récupérations KCl1 et KCl2. Ce fut aussi le cas avec l'électrodialyse des solutions peptidiques simples.

Les plateaux observés pendant les 25 premières minutes d'électrodialyse et les premières minutes après ajout de KCl laissent penser que des espèces chargées autres que les ions K^+ , Cl^- et les peptides, sont générées au cours de l'électrodialyse pour participer au transport du courant. Ces espèces ne peuvent être que les ions H^+ et OH^- résultant de l'autoprotolyse de l'eau lorsque la densité du courant est dépassée.

Aucune différence significative n'a été obtenue concernant l'évolution de l'intensité du courant avec les deux solutions étudiées ($P > 0,05$). Ce résultat s'explique par la faible contribution des peptides 4-asp et 4-lys pour le transport du courant électrique.

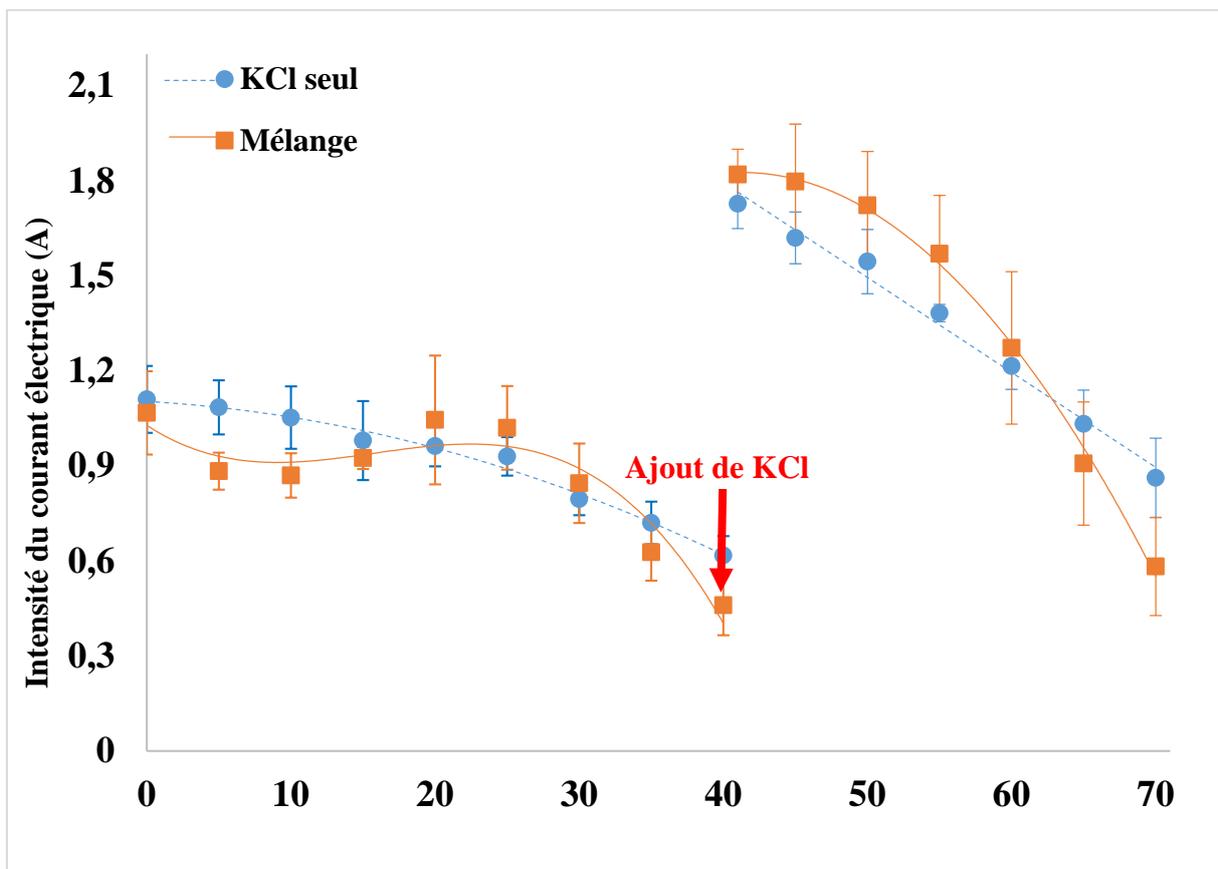


Fig. 32 : Évolution de l'intensité du courant des deux systèmes : KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et la solution peptidique.

3.1.2 Conductivité électrique

Les conductivités dans les compartiments de récupérations KCl1, KCl2 ainsi que dans le compartiment d'alimentation ont été mesurés toutes les 10 minutes au cours des expériences. Les résultats obtenus sont portés sur les figures 33a et 33b.

Les compartiments de récupération KCl1 et KCl2 donnent lieu à une déminéralisation au cours de l'électrodialyse. Nous faisons ci-dessous la distinction entre le traitement d'une solution

simple de KCl et celui d'une solution peptidique composée des peptides 4-asp et 4-lys et du KCl.

3.1.2.1 Cas de la solution saline KCl

Durant les 40 premières minutes d'électrodialyse, l'évolution de la conductivité dans les deux compartiments de récupération KC11 et KC12 est linéaire. Les conductivités passent de $3009 \pm 132 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $2036 \pm 320 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le KC11 correspondant à des taux de déminéralisation de 32% et de $2804 \pm 92 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $229 \pm 82 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le KC12, soit un taux de déminéralisation de 92%. L'ajout de KCl fait remonter les valeurs de conductivité à $4703 \pm 227 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans KC11 et à $2607 \pm 85 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans KC12. Sur les dernières 30 minutes d'électrodialyse, les taux de déminéralisation obtenus sont de 19,6% et de 78,2% dans KC11 et KC12, respectivement.

3.1.2.2 Cas du mélange peptidique

Sur les 40 premières minutes d'électrodialyse, la conductivité dans KC11 atteint un plateau au bout de 10 minutes d'électrodialyse. Elle passe de $2729 \pm 75 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $1813 \pm 543 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ soit un taux de déminéralisation de 33%. Dans le compartiment KC12, la conductivité diminue linéairement avec un taux de déminéralisation de 91% identique à celui obtenu avec la solution saline sans peptides. Avec l'ajout de KCl, la conductivité remonte à $4020 \pm 202 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans KC11 et à $2580 \pm 213 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans KC12. L'évolution est linéaire dans les deux compartiments avec des taux de déminéralisation de 37% et de 93% dans KC11 et KC12, respectivement.

Statistiquement, si on compare l'évolution de la conductivité dans les compartiments de récupération KC11 et KC12 dans le cas de la solution de KCl à $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ et de la solution peptidique, il ressort qu'aucune différence significative n'existe entre ces deux systèmes ($P > 0,05$). Ceci démontre que la présence des peptides n'influe pas de manière significative le fonctionnement de la cellule d'électrodialyse en termes de transfert ionique. Par ailleurs, ce constat appuie l'idée que les peptides ne participent pas significativement au transport du courant au sein de la cellule. En revanche, la différence est significative ($P < 0,05$) lorsqu'on compare l'évolution de la conductivité entre le compartiment KC11 et le compartiment KC12 avec les deux solutions. En effet, la déminéralisation est presque totale dans le compartiment KC12 alors qu'elle n'est que de 30% dans le compartiment KCl. Ce résultat s'explique par le dépassement de la densité du courant limite qui conduit à la dissociation de l'eau en ions H^+ et OH^- . Le compartiment KC11 semble être le plus touché par ce phénomène car délimité par la membrane échangeuse d'anions. En effet, il a été démontré (Tanaka, (2002) ; Zabolotskii et *al.*,

(2014) que la vitesse de la dissociation de l'eau à l'interface membrane échangeuse d'anions/solution était plus élevée comparée à l'interface membrane échangeuse de cations/solution.

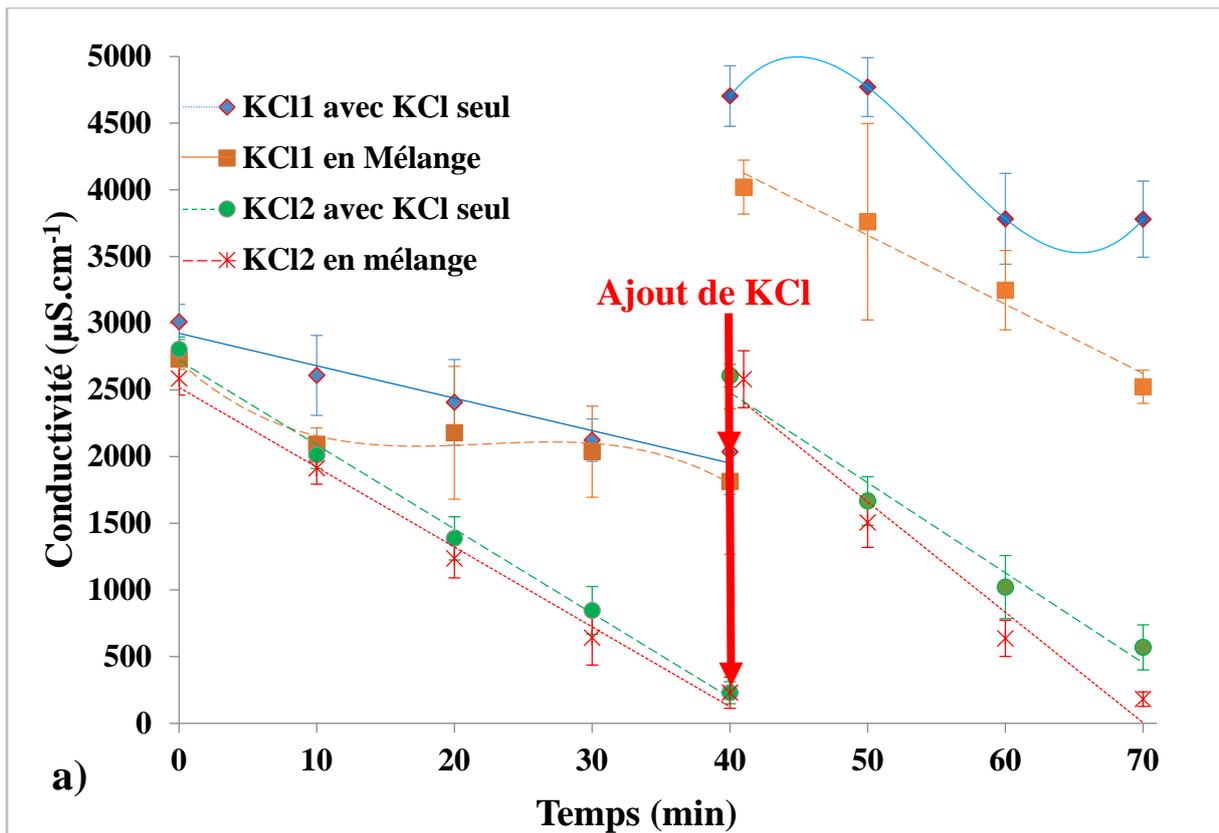


Fig. 33a : Évolution de la conductivité dans les compartiments de récupération KCl1 et KCl2 : KCl à 0,5 g.L⁻¹ et la solution peptidique.

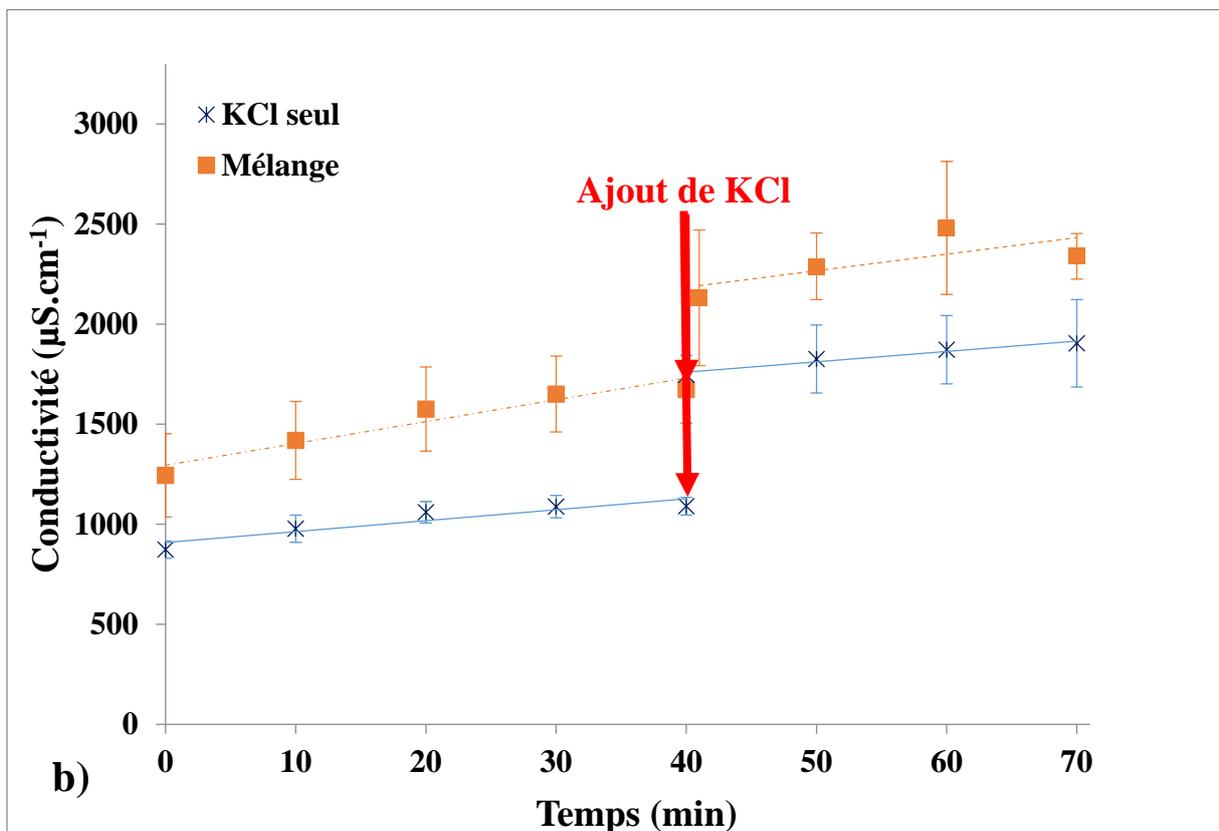


Fig. 33b : Évolution de la conductivité dans le compartiment d'alimentation pour les deux systèmes : KCl à 0,5 g.L⁻¹ et la solution peptidique.

Compte tenu de la configuration membranaire et contrairement au traitement des solutions peptidiques simples, le compartiment d'alimentation donne lieu à une déminéralisation. Dans le cas de l'électrodialyse de la solution de KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, la solution d'alimentation est minéralisée à hauteur de 20%. Quant au mélange peptidique, la minéralisation a atteint un taux de 26%. Étant donné que les conductivités initiales étaient différentes pour les deux systèmes étudiés en raison des charges apportés par 4-asp et 4-lys dans le mélange peptidique, l'évolution de la conductivité obtenue pour la solution saline et la solution peptidique sont statistiquement différentes ($P < 0,05$).

3.2 Migration ionique

La concentration des ions K^+ et Cl^- dans les compartiments d'alimentation et de récupération KC11 et KC12 a été suivie tout au long de l'électrodialyse pour les systèmes KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et le mélange peptidique.

3.2.1 Compartiment de récupération KC11

L'évolution de la concentration des ions K^+ et Cl^- dans le compartiment KC11 est portée sur la figure 34a.

On constate une diminution linéaire de la concentration des ions dans ce compartiment durant les 40 premières minutes d'électrodialyse.

Les variations de concentration correspondent à des flux ioniques sortants de $29 \pm 3 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et $25 \pm 6 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- dans le cas de la solution de KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Dans le cas du mélange peptidique, les flux sortants sont de $33 \pm 11 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour le K^+ et de $31 \pm 4 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour le Cl^- . À l'issue de l'ajout de KCl, soit entre 40 et 70 minutes d'électrodialyse, les concentrations ioniques diminuent à nouveau avec des flux sortants de $42 \pm 10 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour K^+ et $32 \pm 3 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour Cl^- avec le mélange peptidique.

Les principaux commentaires que ces résultats appellent sont :

- Des rapports de flux $J_{\text{K}^+}/J_{\text{Cl}^-}$ quasi-identique entre les deux systèmes durant les 40 premières minutes d'électrodialyse : de 1,16 pour le système KCl et 1,07 pour le mélange peptidique. Le léger écart entre les deux flux pour les deux systèmes est dû à l'apport d'ions K^+ par le KOH utilisé pour le maintien du pH.
- Des vitesses de migration ionique plus importante dans le cas du mélange peptidique. Cela suggère qu'en raison du pouvoir tampon des peptides, les ions K^+ et Cl^- se trouvent

moins affectés dans leur migration par les ions H^+ et OH^- générés par la dissociation de l'eau.

- Un flux d'ions K^+ plus important dans la deuxième phase d'électrodialyse (40 min-70 min) dû à un apport plus important de KOH pour le maintien du pH. En effet, l'ajout du KCl a entraîné une augmentation de l'intensité du courant qui a favorisé la migration des ions et a aussitôt conduit à la génération des ions H^+ et OH^- , d'où d'importantes variations du pH nécessitant un apport continu en KOH. On note par ailleurs lors de cette phase des effets de densité de courant limite plus prononcés dans le cas de la solution de KCl comparée à la solution peptidique en raison du pouvoir tampon des peptides. Ceci se traduit par un apport de flux J_{K^+}/J_{Cl^-} plus important dans le cas de la solution de KCl signifiant un apport plus important de KOH. En effet, ce rapport est de 2,25 dans le cas du KCl contre 1,27 pour le mélange peptidique.

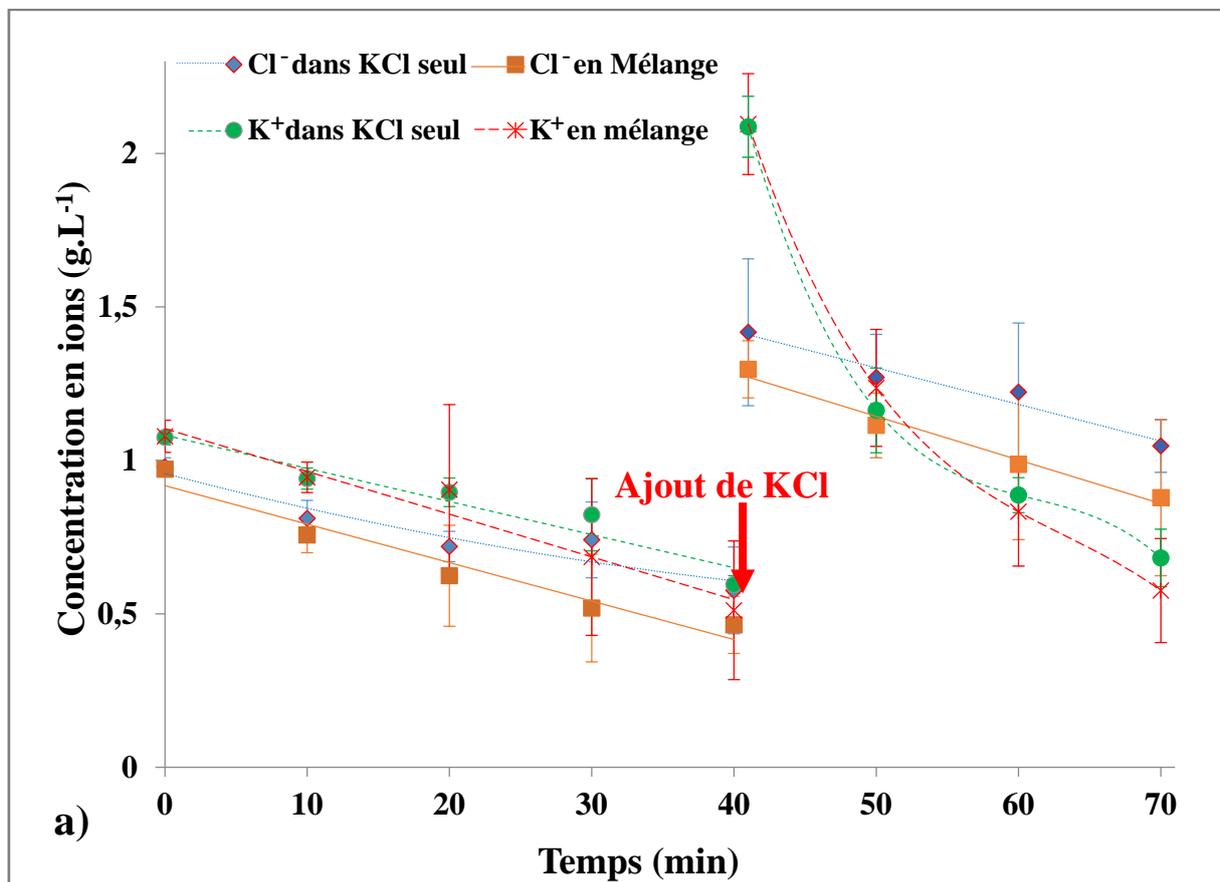


Fig. 34a : Évolution de la concentration en K^+ et en Cl^- dans le compartiment KCl1 pour les deux systèmes : KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et la solution peptidique.

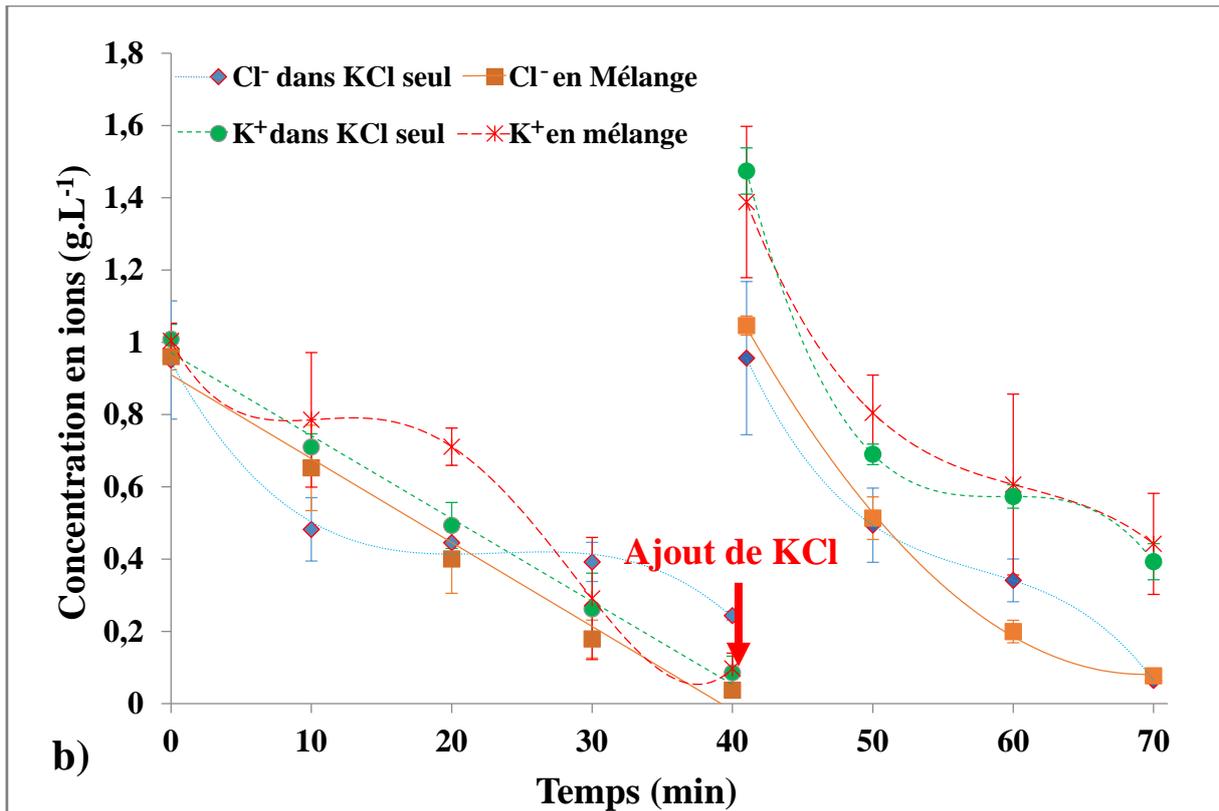


Fig. 34b : Évolution de la concentration en K^+ et en Cl^- dans le compartiment KCl2 pour les deux systèmes : KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et la solution peptidique.

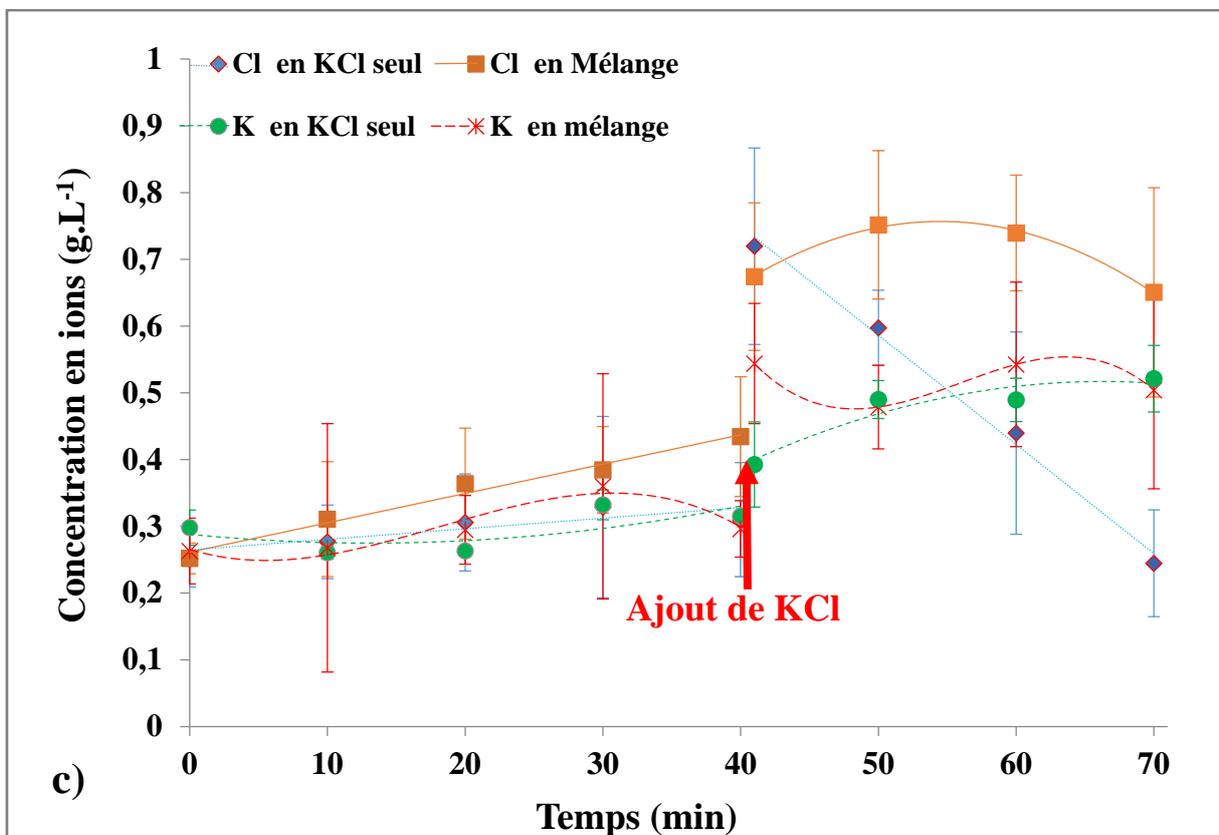


Fig. 34c : Évolution de la concentration en K^+ et en Cl^- dans le compartiment d'alimentation pour les deux systèmes : KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et la solution peptidique.

Comme pour la conductivité, on ne note aucune différence significative de l'évolution de la concentration en ions dans le compartiment KCl1 avec la solution KCl à 0,5 g.L⁻¹ et le mélange peptidique ($P > 0,05$).

3.2.2 *Compartiment de récupération KCl2*

Les résultats de variation de la concentration des ions K⁺ et Cl⁻ dans le compartiment de récupération KCl2 au cours de l'électrodialyse sont représentés à la figure 34b.

Comme pour le compartiment KCl1, les concentrations diminuent linéairement sur les 40 premières minutes d'électrodialyse. Les flux ioniques sortants sont de 48±1 g.m².h⁻¹ pour K⁺ et 36±9 g.m².h⁻¹ pour Cl⁻ dans le cas de la solution de KCl à 0,5 g.L⁻¹. Dans le cas du mélange peptidique, les flux sortants sont de 48±6 g.m².h⁻¹ pour K⁺ et 48±2 g.m².h⁻¹ pour Cl⁻. Avec l'ajout de KCl, les concentrations ioniques continuent à diminuer donnant lieu à des flux sortants de 85±4 g.m².h⁻¹ pour K⁺ et 67±17 g.m².h⁻¹ pour Cl⁻ avec la solution saline de KCl et de 88±23 g.m².h⁻¹ pour K⁺ et 69±21 g.m².h⁻¹ pour Cl⁻ avec le mélange peptidique.

Comparé au compartiment KCl1, on constate des flux ioniques plus élevés (avant et après ajout du KCl) dans le compartiment KCl2 en raison d'effets de densité du courant limite moins importants que dans KCl1. On note par ailleurs qu'entre 0 et 40 minutes d'électrodialyse, le rapport J_{K^+}/J_{Cl^-} est de 1,31 pour la solution KCl contre un rapport J_{K^+}/J_{Cl^-} de 1 dans le cas du mélange peptidique. Ceci est lié au pouvoir tampon des peptides dans le cas du mélange comme expliqué précédemment. En revanche, après l'ajout du KCl, le rapport J_{K^+}/J_{Cl^-} augmente à 1,27 dans le cas du mélange ce qui rejoint le constat déjà fait avec le compartiment KCl1.

L'analyse statistique indique qu'aucune différence significative de l'évolution de la concentration en ions dans le compartiment KCl2 n'existe entre les deux systèmes étudiés : KCl à 0,5 g.L⁻¹ et le mélange peptidique ($P > 0,05$). En revanche, une différence significative de l'évolution de la concentration en ions K⁺ et Cl⁻ est obtenue entre les deux compartiments de récupération KCl1 et KCl2 pour la solution de KCl et le mélange peptidique ($P < 0,05$). Comme expliqué pour la conductivité, cette différence est liée à une dissociation de l'eau plus rapide dans le compartiment KCl1. Ce compartiment est délimité par la membrane échangeuse d'anions pour laquelle la polarisation apparaît plus rapidement.

3.2.3 *Compartiment d'alimentation*

Dans ce compartiment, la faible variation de la conductivité s'est traduite par de faibles flux ioniques donnant lieu à de fortes variabilités entre les différentes répétitions pour la même expérience. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 34c.

Sur les 40 premières minutes d'électrodialyse, des flux ioniques entrants de $0,1 \pm 0,62 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour K^+ et de $1,5 \pm 1,1 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour Cl^- dans le cas de la solution saline de KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ sont obtenus. Dans le cas du mélange peptidique, on obtient un flux sortant de $2,5 \pm 2,5 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour K^+ et un flux entrant de $7,5 \pm 4,8 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour Cl^- . Avec l'ajout de KCl, un flux entrant de $7,6 \pm 1,6 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour K^+ et un flux sortant de $9,6 \pm 1,4 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour Cl^- sont obtenus avec la solution saline de KCl. Quant au mélange peptidique, on obtient des flux sortants de $8,9 \pm 4,9 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour K^+ et de $13,8 \pm 6,8 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ pour Cl^- . Globalement, les flux sont faibles comparés à ceux obtenus dans les compartiments de récupération.

De par la configuration membranaire utilisée, le compartiment d'alimentation est le siège de mouvements ioniques : les ions K^+ provenant du compartiment KCl1 en direction de la cathode et les ions Cl^- du compartiment KCl2 en direction de l'anode ce qui explique les flux entrants dans ce compartiment. L'écart obtenu entre les différents flux pourrait être attribué aux ions H^+ et OH^- issus de la dissociation de l'eau ainsi que les ions K^+ provenant du KOH utilisé pour le maintien du pH. Ces différents apports participent à l'équilibre ionique dans ce compartiment.

Les résultats de migration ionique pour K^+ et Cl^- obtenus dans les compartiments d'alimentation et de récupération KCl1 et KCl2 sont en parfaite adéquation avec ceux de la conductivité électrique. Il en a été de même pour l'électrodialyse des solutions peptidiques simples.

3.3 *Différence du potentiel membranaire*

La différence du potentiel électrique aux interfaces des membranes d'ultrafiltration (MUF1 et MUF2), de la membrane échangeuse d'anions (MEA) et de la membrane échangeuse de cations (MEC) a été mesurée *in situ* au cours du temps. La procédure expérimentale décrite par Lin Teng Shee et *al.*, (2008) et Doyen et *al.*, (2013) où des électrodes en platine sont placées aux interfaces des membranes du module d'électrodialyse a été appliquée lors des expériences (Fig. 35).

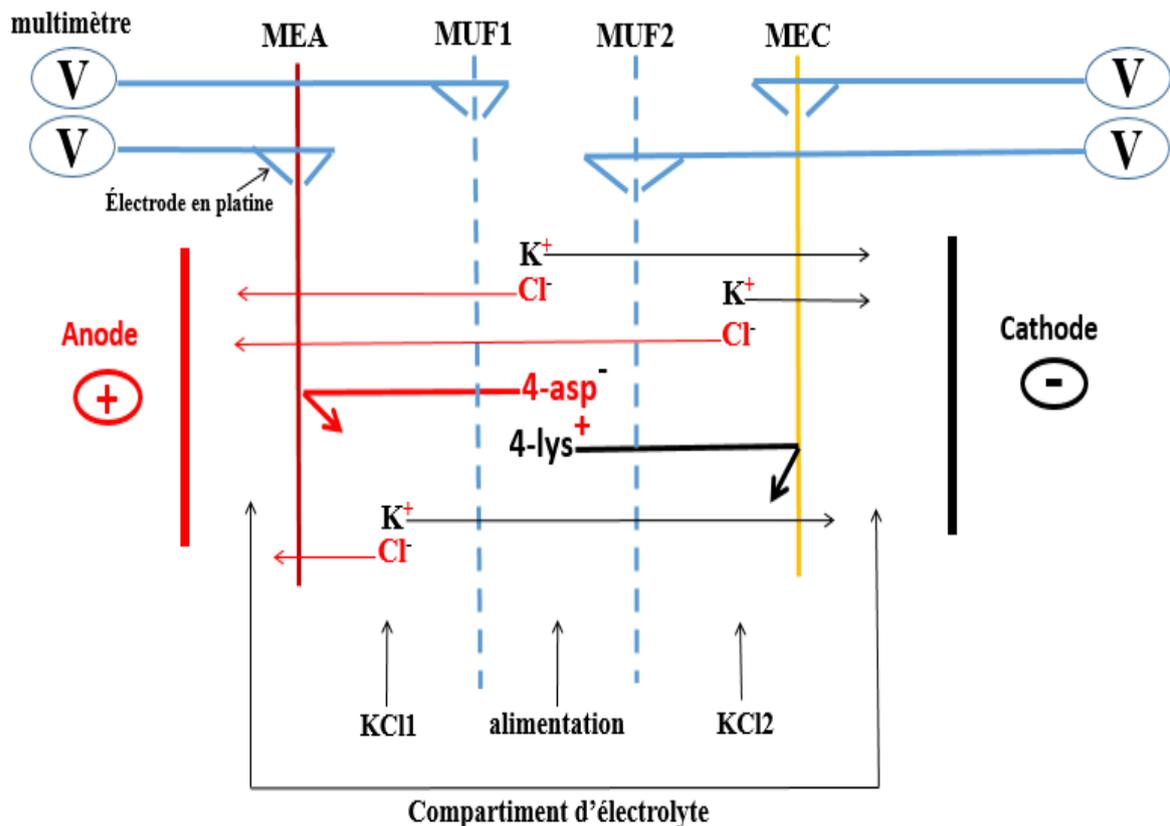


Fig. 35 : Configuration de la cellule d'électrodialyse pour la mesure des différences de potentiel membranaire. MUF1 : membrane d'ultrafiltration délimitant le compartiment de récupération KCl1 ; MUF2 : membrane d'ultrafiltration délimitant le compartiment de récupération KCl2 ; MEA : membrane échangeuse d'anions ; MEC : membrane échangeuse de cations.

3.3.1 Aux interfaces des membranes d'ultrafiltration (MUF1 et MUF2)

Les figures 36a et b montrent l'évolution de la différence du potentiel électrique aux interfaces des membranes d'ultrafiltration au cours du traitement, pour les deux systèmes étudiés.

Les différences de potentiel membranaire (DPM) de la MUF1 au début de l'expérience sont de $12 \pm 1,5$ V et $5,8 \pm 0,8$ V pour le mélange peptidique et la solution de KCl, respectivement. C'est valeurs élevées de DPM indiquent que la densité de courant limite a été dépassée dès le démarrage de l'expérience. En effet, la membrane MUF1 est située entre le compartiment KCl1 où la vitesse de dissociation de l'eau est la plus forte et le compartiment d'alimentation dont la conductivité varie peu au cours de l'électrodialyse. Par conséquent, les ions H^+ générés à l'interface MEA/KCl1 qui tentent de migrer vers la cathode se retrouvent du côté de la MUF1 engendrant ainsi une augmentation de la DPM à ses interfaces. Entre 20 et 40 min d'électrodialyse, la DPM de la MUF1 diminue dans le cas du mélange pour atteindre des valeurs similaires à celles obtenues avec la solution de KCl. Les valeurs moyennes de DPM obtenues après 40 min d'électrodialyse sont de $3,8 \pm 2,5$ V pour le mélange et de $1,75 \pm 0,3$ V pour la

solution de KCl. La baisse de la différence du potentiel de la membrane d'ultrafiltration a été également observée par Doyen et *al.*, (2014) lors d'un fractionnement d'un hydrolysate de protéines de pois. Les auteurs ont expliqué la baisse de la DPM puis sa stabilisation par la formation d'un équilibre entre la migration des anions et des cations à travers la membrane d'ultrafiltration.

Après 40 min d'électrodialyse, un ajout de KCl a été réalisé dans les compartiments d'alimentation de récupérations KCl1 et KCl2. La différence de potentiel membranaire augmente à $7,9 \pm 0,4$ V dans le cas du mélange puis diminue au cours du traitement pour atteindre des valeurs similaires à celles mesurées pour le fractionnement du KCl seul (Fig. 36a).

La différence des DPMs observée entre les deux systèmes étudiés, lors des 20 premières minutes d'électrodialyse et les 20 premières minutes après ajout de KCl, pourrait être liée à la migration du peptide anionique du compartiment d'alimentation vers le compartiment de récupération KCl1 à travers la MUF1. Un ralentissement ou un arrêt de la migration du peptide 4-asp expliquerait la diminution de la différence des DPMs de la MUF1 entre les deux systèmes étudiés.

La différence du potentiel membranaire avec la membrane MUF2 se présente différemment. D'une part, les valeurs initiales sont nettement moins élevées avec la MUF2 ce qui conforte l'idée d'effets de densité de courant limite plus prononcés dans le compartiment KCl1. D'autre part, les DPMs dans les deux systèmes varient peu lors des 40 premières minutes d'électrodialyse (Fig. 36b). Au début de l'électrodialyse, les valeurs moyennes des différences de potentiel membranaire mesurées sont de $2,9 \pm 1,5$ V pour le mélange et de $4,67 \pm 0,45$ V pour la solution de KCl. Après 40 min d'électrodialyse, les DPMs sont de $2,35 \pm 0,3$ V et $3,9 \pm 0,3$ V pour le mélange et la solution de KCl, respectivement. Ce résultat est dû à un équilibre de migration, des ions K^+ et Cl^- lors de l'électrodialyse de la solution de KCl et des ions K^+ , Cl^- et le peptide 4-lys lors du fractionnement du mélange, à travers la MUF2. Des explications similaires ont été précédemment avancées par Doyen et *al.*, (2014).

À l'issue de l'ajout du KCl, les différences de potentiel membranaire augmentent pour atteindre des valeurs de $5,71 \pm 1$ V pour la solution peptidique et de $6,3 \pm 1,4$ V pour la solution KCl puis baisse au cours de traitement (Fig. 36b). À la fin de l'électrodialyse, les DPMs mesurées sont de $1,72 \pm 0,3$ V et $3,9 \pm 0,3$ V pour la solution peptidique et la solution KCl, respectivement.

La diminution de la différence du potentiel membranaire après ajout du KCl pour les deux systèmes étudiés s'explique par la déminéralisation importante du compartiment de

récupération KCl_2 , ce qui a pour effet de diminuer la charge électrique de la solution de récupération KCl_2 délimitée sur un côté par la membrane MUF2.

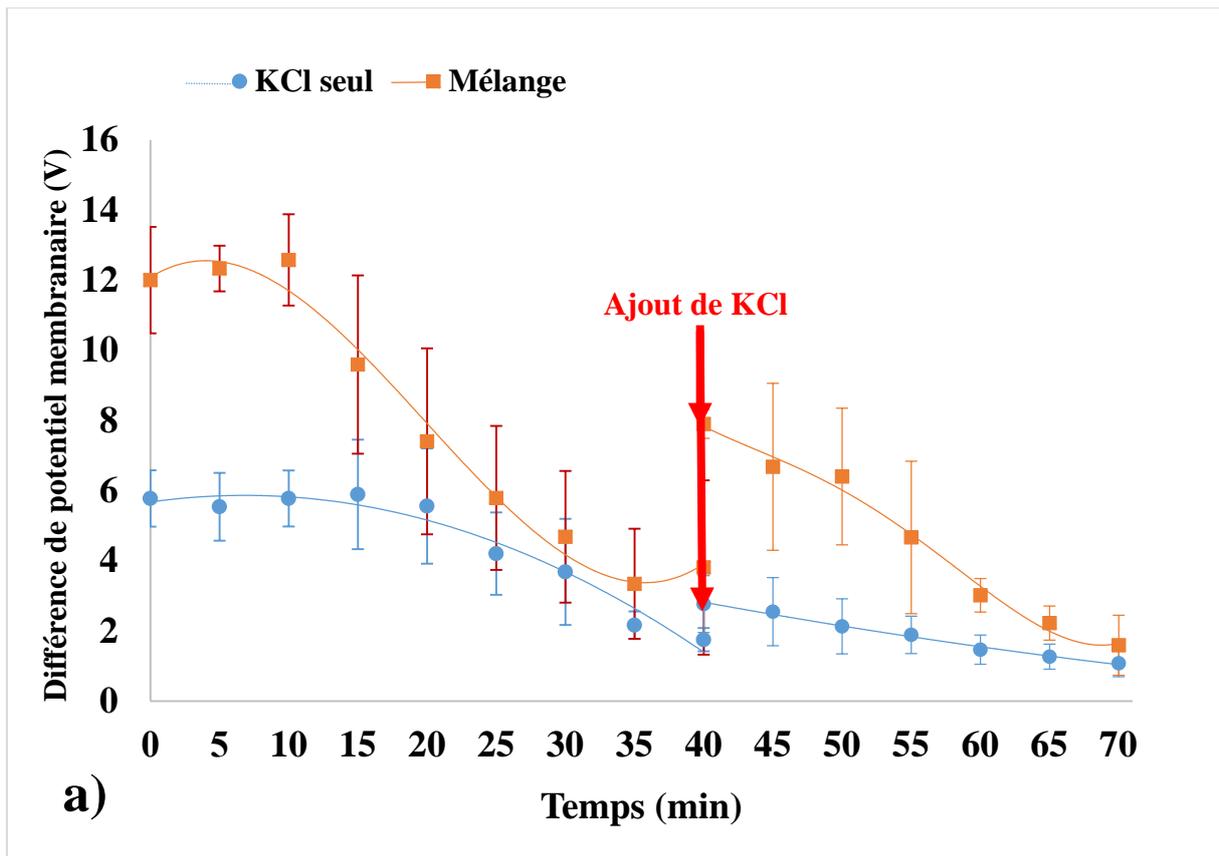


Fig. 36a : Évolution de la différence du potentiel de la MUF1 au cours de l'électrodialyse de la solution de KCl et du mélange peptidique.

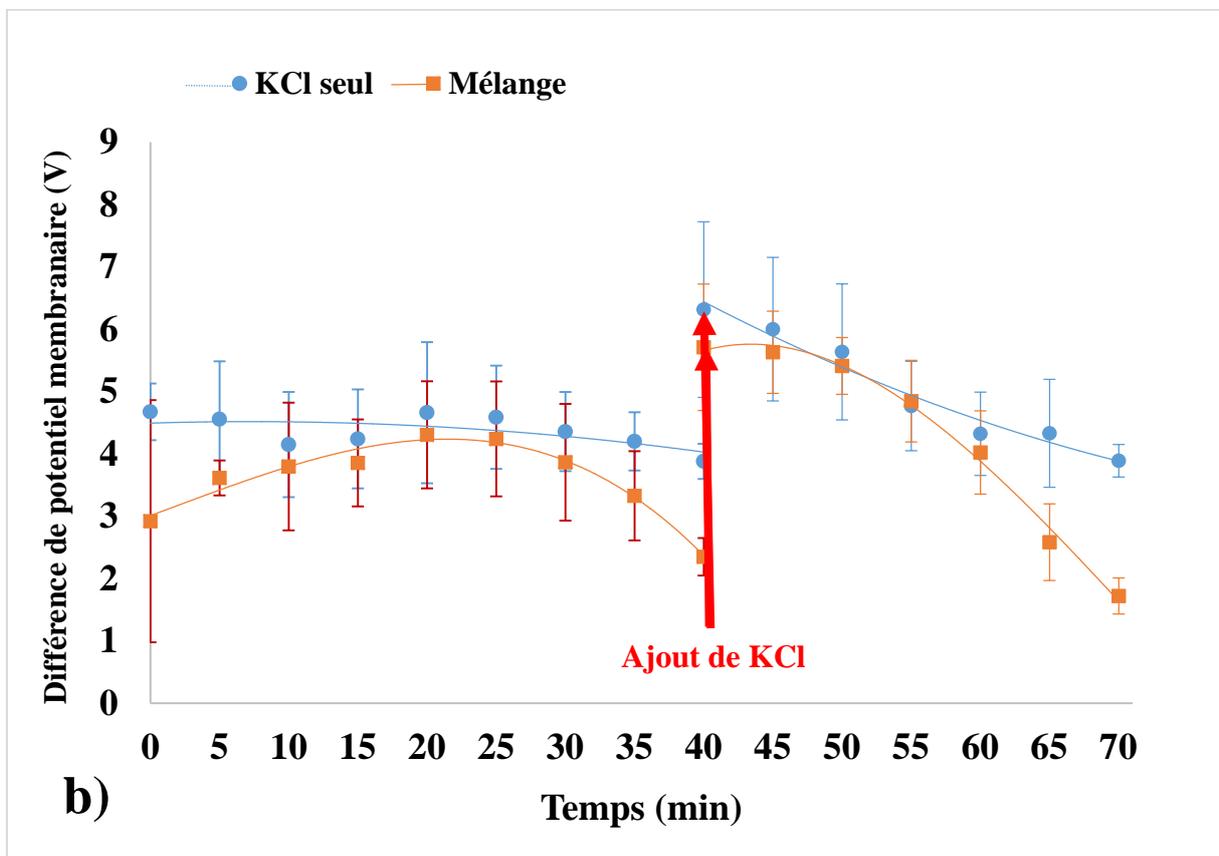


Fig. 36b : Évolution de la différence du potentiel de la MUF2 au cours de l'électrodialyse de la solution de KCl et le mélange peptidique.

3.3.2 Aux interfaces des membranes échangeuses d'ions (MEA et MEC)

L'évolution de la différence du potentiel électrique aux interfaces des membranes échangeuses d'ions au cours de l'électrodialyse, pour les deux systèmes étudiés, est représentée sur les figures 37a et b.

Dans le cas de la membrane échangeuse d'anions (MEA), une augmentation de la différence du potentiel membranaire est obtenue dès le début de l'électrodialyse avec le mélange peptidique et la solution KCl. La DPM passe de $0,70 \pm 0,4$ V au début de l'électrodialyse à $1,48 \pm 0,19$ V après 20 min de traitement avec le mélange peptidique (Fig. 37a). Quant à la solution KCl, la DPM passe de $0,81 \pm 0,05$ V à $1,07 \pm 0,14$ V sur les 5 premières minutes de l'électrodialyse. Cette évolution du potentiel électrique de la MEA est caractéristique du dépassement de la densité du courant limite (DCL) dans la cellule.

En effet, pour maintenir le transport du courant à travers les membranes échangeuses d'ions, lors d'un appauvrissement ionique, une dissociation des molécules d'eau en H^+ et OH^- se produit principalement à l'interface de la MEA (Simons, (1979)). Cela entraîne une augmentation de la différence du potentiel électrique de la membrane échangeuse d'anions (Simons, (1985)). Ce même phénomène a été observé lors du fractionnement d'hydrolysats en électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration pour des valeurs de tension correspondant à des intensités de courant supérieures à la DCL (Doyen et *al.*, (2013, 2014) ; Roblet et *al.*, (2013)).

Entre 20 et 40 minutes d'électrodialyse, la différence du potentiel électrique de la MEA a diminué pour atteindre des valeurs moyennes de $0,28 \pm 0,23$ V pour le mélange et de $0,42 \pm 0,1$ V pour la solution de KCl. L'augmentation de la charge électrique de la solution de récupération KCl1 par la migration d'espèces chargées (peptide anionique Cl^-) du compartiment d'alimentation et de récupération KCl2 vers le compartiment de récupération KCl1 serait à l'origine de la diminution de la DPM. L'ajout du KCl après 40 minutes d'électrodialyse avec les deux systèmes étudiés a permis de restaurer la DPM initiale de la MEA (Fig. 37c). On constate la même vitesse de diminution de la DPM que pendant la première phase d'électrodialyse. Toutefois, l'augmentation de la différence du potentiel électrique obtenue au début de l'électrodialyse avec la solution de KCl n'a pas été observée avec l'ajout du KCl. Le dépassement de l'intensité initiale du courant électrique après ajout du KCl, entraînant l'apparition de l'autoprotolyse de l'eau à des valeurs inférieures au temps de mesure de la DPM (qui était de 5 minutes), expliquerait ce résultat. Concernant le cas du mélange peptidique, l'augmentation de la différence du potentiel électrique de la MEA est apparue également plus rapidement après ajout du KCl, expliquée à son tour par le dépassement de l'intensité du courant

initiale. Ces observations rejoignent celles effectuées précédemment avec l'évolution de la conductivité et des concentrations ioniques.

Au niveau de la MEC, la différence de potentiel électrique membranaire varie peu avec les deux systèmes étudiés. Cette faible variation est due à la configuration d'électrodialyse utilisée. En effet, les ions K^+ des compartiments KCl1, KCl2 et d'alimentation, migrent vers le compartiment cathodique à travers la MEC. Dans le même temps, Na^+ et SO_4^{2-} sont piégés dans le compartiment cathodique. Ainsi, un équilibre ionique est atteint dans les deux compartiments (KCl2 et cathodique) séparés par la MEC et par conséquent, aucune variation de DPM n'est enregistrée. Le même phénomène a été rapporté par Doyen *et al.*, (2013) et Suwal *et al.*, (2014) lors de fractionnements d'hydrolysats en électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration.

La mesure de la DPM *in situ* des différentes membranes utilisées dans le cas de la solution de KCl et du mélange peptidique nous a permis de démontrer que la dissociation de l'eau apparaît plus rapidement au niveau de la membrane échangeuse d'anions. Ce résultat est en total accord avec les résultats déjà publiés dans la littérature (Simons, (1984, 1985) ; Tanaka, (2002) ; Doyen *et al.*, (2013) ; Zabolostskii *et al.*, (2014)). Nos résultats démontrent par ailleurs que le phénomène de dissociation de l'eau est apparu dès le début de l'électrodialyse ce qui démontre que la densité de courant limite a été dépassée dans nos conditions opératoires.

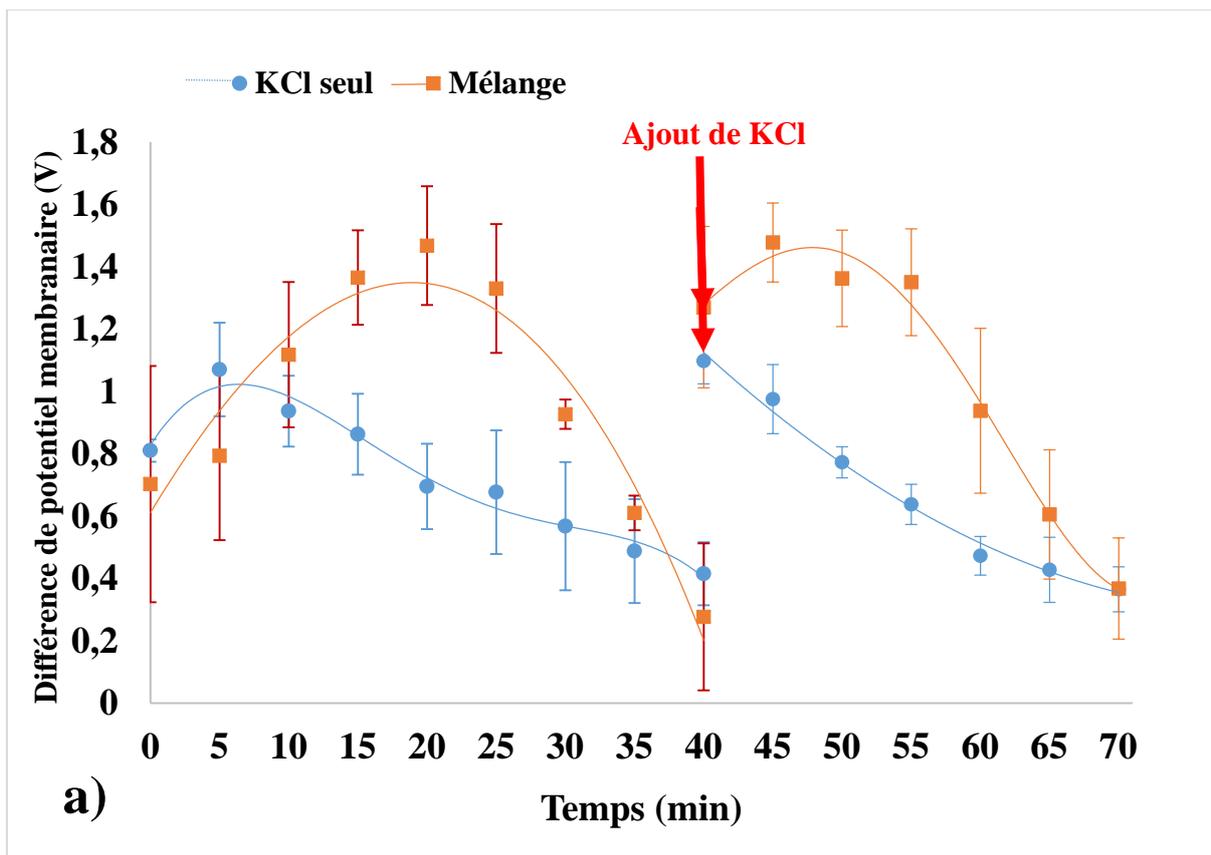


Fig. 37a : Évolution de la différence du potentiel de la MEA au cours d'électrodialyse de la solution de KCl et le mélange peptidique.

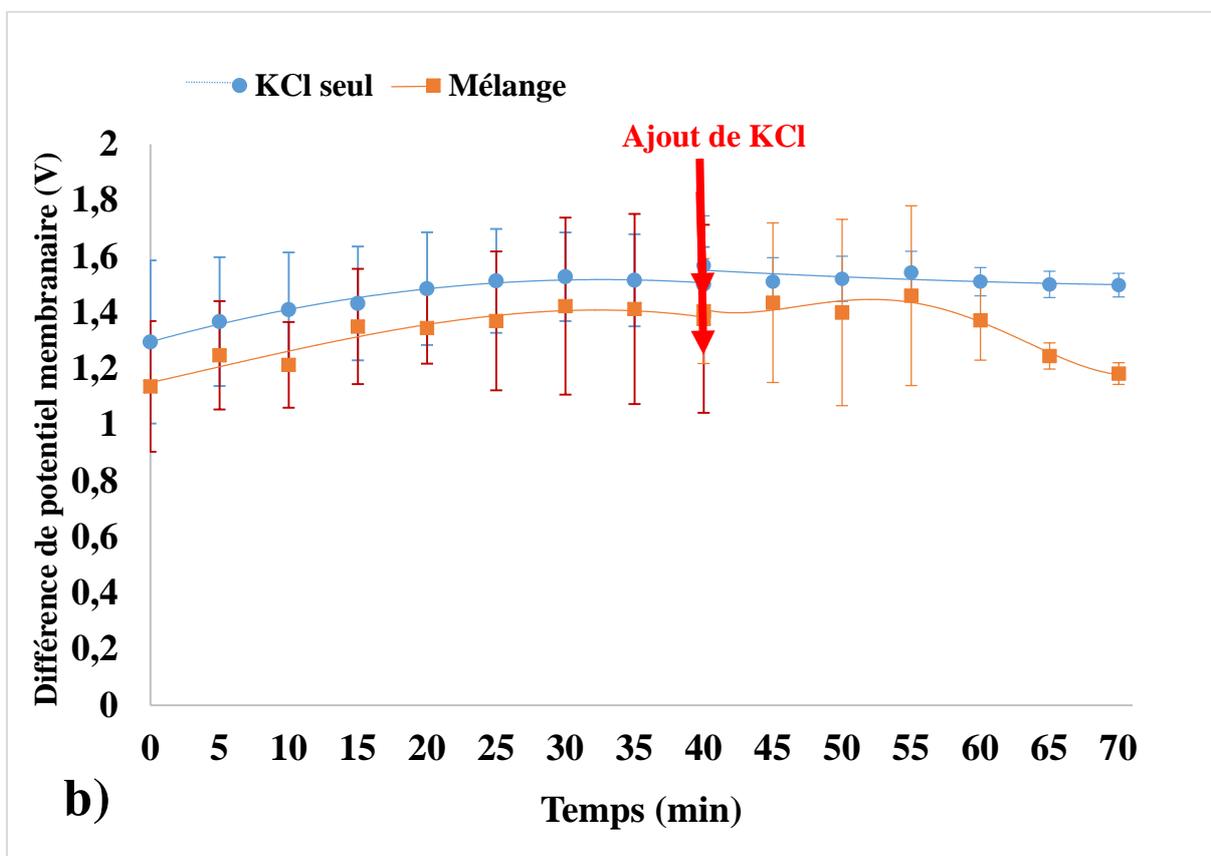


Fig. 37b : Évolution de la différence du potentiel de la MEC en fonction du temps durant l'électrodialyse du KCl seul et du mélange peptidique.

3.4 Migration peptidique

Comme pour les solutions peptidiques simples, l'électrodialyse du mélange 4-asp/4-lys a été effectuée à pH 7 maintenu constant durant l'expérience. De cette manière, le peptide 4-asp migrerait vers le compartiment KCl1 et le peptide 4-lys vers le compartiment KCl2.

L'évolution des concentrations des deux peptides au cours du temps est représentée dans les figures 38a et b. Il est important de signaler l'absence du peptide 4-asp dans le compartiment KCl2 et du peptide 4-lys dans le compartiment KCl1 ce qui souligne la très bonne sélectivité du procédé.

3.4.1 Migration du peptide anionique 4-asp

L'analyse des figures 38a et b ressort 3 phases de migration pour ce peptide :

- Une phase (1) durant les 10 premières minutes d'électrodialyse où la concentration du peptide diminue dans le compartiment d'alimentation. Cette diminution correspond à un flux peptidique sortant de $15 \pm 7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Du côté du compartiment de récupération KCl1, un flux entrant de $15 \pm 5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ a été obtenu.
- Une deuxième phase (2) entre 10 et 40 premières minutes d'électrodialyse où la migration du peptide chute d'un tiers à $5 \pm 1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment d'alimentation contre un flux entrant de seulement $1,9 \pm 1,7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment de récupération KCl1. Ces mêmes observations ont été faites dans le cadre du traitement de la solution peptidique simple de 4-asp. Ceci s'explique d'une part par la vitesse de dissociation de l'eau élevée dans le compartiment KCl1, le peptide 4-asp se trouve donc confronté à l'effet barrière qui affecte sa migration. D'autre part, de possibles interactions électrostatiques entre le peptide et la membrane échangeuse d'anions pourrait être à l'origine de l'écart entre les flux entrant et sortant du peptide.
- Une troisième phase (3) correspondant à l'ajout du KCl dans le système après 40 minutes d'électrodialyse. La vitesse de la dissociation de l'eau est ralentie ce qui permet d'augmenter la vitesse de migration du peptide. Un flux sortant dans le compartiment d'alimentation de $7 \pm 2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ est obtenu contre $1,1 \pm 0,8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment de récupération. L'hypothèse d'interactions peptide/MEA conduisant à l'adsorption du peptide à la surface de la membrane semble se confirmer.

3.4.2 Migration du peptide cationique 4-lys

Comparé au peptide 4-asp, le peptide cationique 4-lys se comporte différemment. À

l'analyse des figures 38a et b, on constate deux phases de migration :

- Une première phase entre 0 et 30 minutes : le flux sortant du peptide est de $20 \pm 0,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment d'alimentation. Quant au compartiment de récupération KCl2, le flux entrant est de $3,2 \pm 0,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ sur les 10 premières minutes d'électrodialyse avant de chuter à $0,9 \pm 0,1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. L'important écart constaté entre les deux compartiments s'expliquerait par les fortes interactions 4-lys/MEC déjà démontrées avec ce peptide dans le cas de l'électrodialyse de la solution simple de 4-lys.
- Une deuxième phase de 30 à 70 minutes : le flux peptidique dans le compartiment d'alimentation chute à $5 \pm 1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Dans le compartiment de récupération, le flux est quasi-identique à celui observé dans la première phase, soit $0,8 \pm 0,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Il apparaît clairement que l'ajout du KCl n'a pas eu d'effet sur la migration du peptide 4-lys. Ce même phénomène a été précédemment observé avec l'électrodialyse de la solution simple de 4-lys.

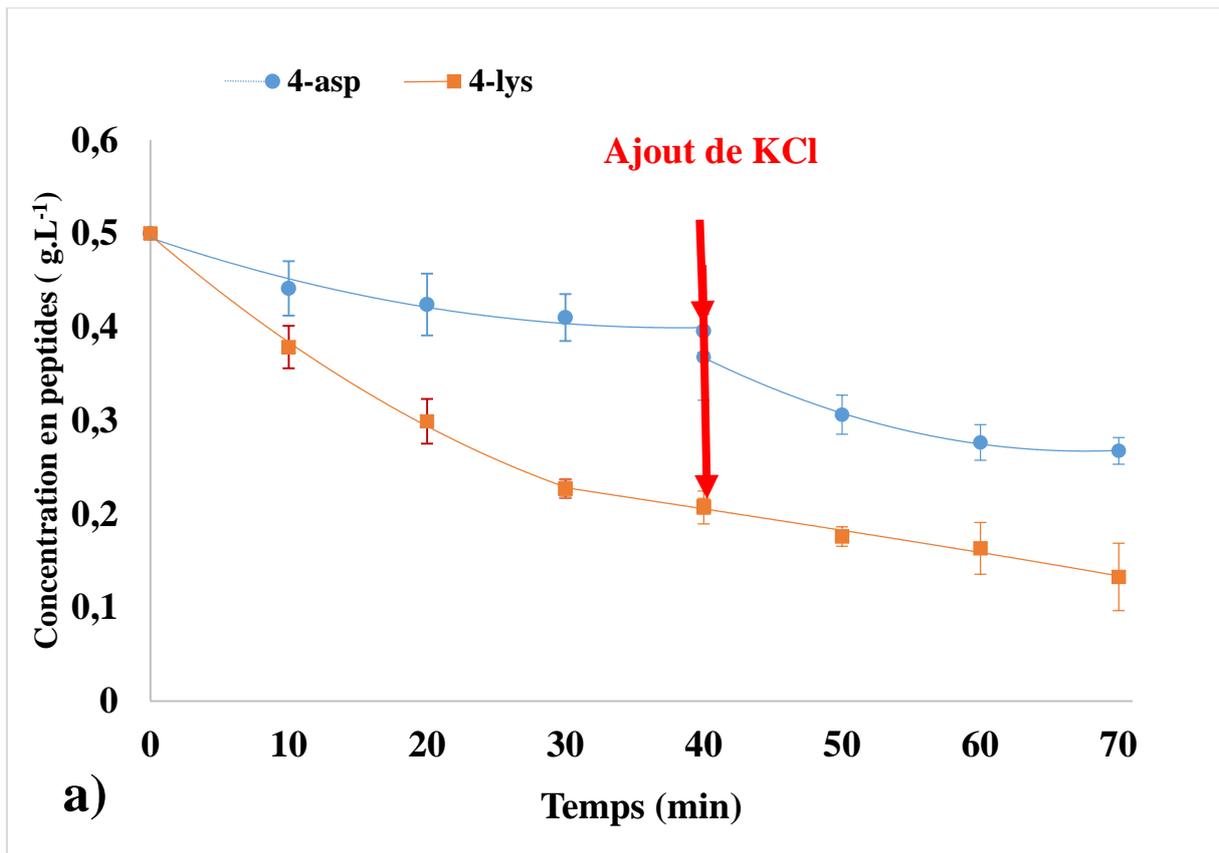


Fig. 38a : Évolution de la concentration des peptides 4-asp et 4-lys dans le compartiment d'alimentation au cours du fractionnement du mélange peptidique.

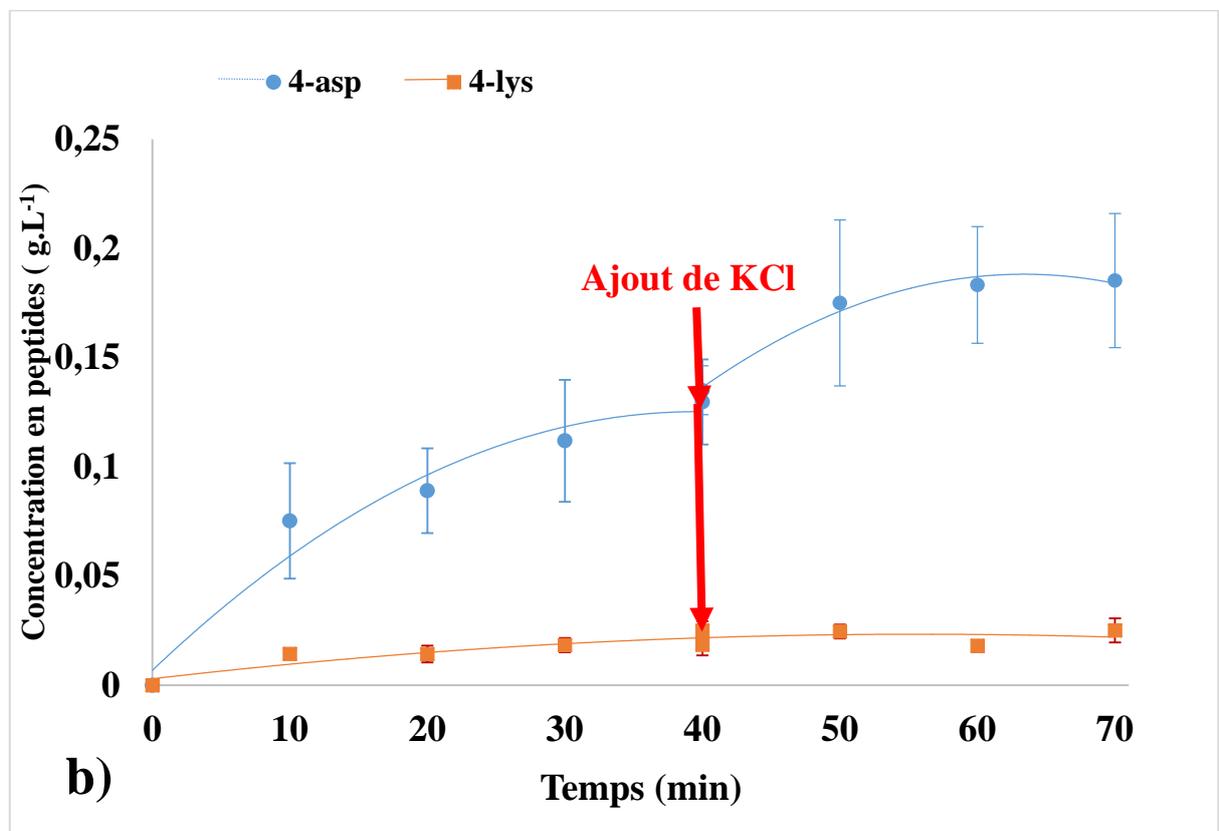


Fig. 38b : Évolution de la concentration des peptides 4-asp et 4-lys dans les compartiments de récupération KCl1 et KCl2.

3.5 Colmatage membranaire

Le colmatage membranaire a été mesuré par le dosage de la teneur en azote total de chaque membrane utilisée lors du fractionnement du mélange peptidique. Les résultats sont représentés dans la figure 39.

Les teneurs en azote mesurées des membranes contrôles sont de $19,6 \pm 0,7$ mgN.g⁻¹ de matière sèche pour la MEA et de $6,3 \pm 0,8$ mgN.g⁻¹ de matière sèche pour la MEC. Comme pour de solutions peptidiques simples, les valeurs de teneur en azote obtenues pour la MEA et la MEC sont proches de celles rapportées dans la littérature (Casademon et *al.* (2009) ; Langevin et Bazinet (2011)).

Curieusement, on ne constate aucune différence significative de la teneur en azote entre la MEA après électrodialyse et sa membrane contrôle ($P > 0,05$). En effet, la teneur en azote de la MEA après électrodialyse est de $19,2 \pm 0,5$ mgN.g⁻¹ de matière sèche. Or, les résultats de migration du peptide 4-asp dans la section précédente font état d'importants écarts entre les flux entrant et sortant du peptide qui s'expliqueraient en partie par une éventuelle adsorption du peptide sur la MEA. Ce constat inattendu pourrait être attribué à des difficultés de détection par la méthode de dosage d'une faible quantité de peptide sur une surface membranaire 10 fois plus importante dans le cas du mélange comparée à celle utilisée avec la solution peptidique simple.

Dans le cas de la MEC, une différence significative est obtenue ($P < 0,05$) puisque la teneur en azote de la membrane passe à 18 ± 1 mgN.g⁻¹ de matière sèche après électrodialyse. Cette augmentation est due à un colmatage de nature électrostatique de la MEC par le peptide cationique. Contrairement à la solution peptidique simple où l'augmentation était de 6,7 fois par rapport à la membrane contrôle, elle n'est que de 2,7 fois dans le cas du mélange. Ce résultat est peut-être lié à l'utilisation d'une surface membranaire dix fois plus importante et/ ou à un temps d'expérience plus court lors du fractionnement du mélange peptidique. On peut par ailleurs émettre l'hypothèse d'une possible interaction entre le peptide 4-asp et la MEC en raison de l'effet circulation du peptide anionique comme c'était le cas pour la solution peptidique simple.

Les teneurs en azote des membranes d'ultrafiltration sont de $0,4 \pm 0,08$ mgN.g⁻¹ de matière sèche pour la MUF contrôle, de $0,4 \pm 0,01$ mgN.g⁻¹ de matière sèche pour la membrane MUF1 et de $0,4 \pm 0,02$ mgN.g⁻¹ de matière sèche pour la MUF2. Comme pour les solutions peptidiques simples, le résultat des dosages de l'azote membranaire des membranes d'ultrafiltration obtenu avec le mélange peut être négligé en raison de sa faible concentration.

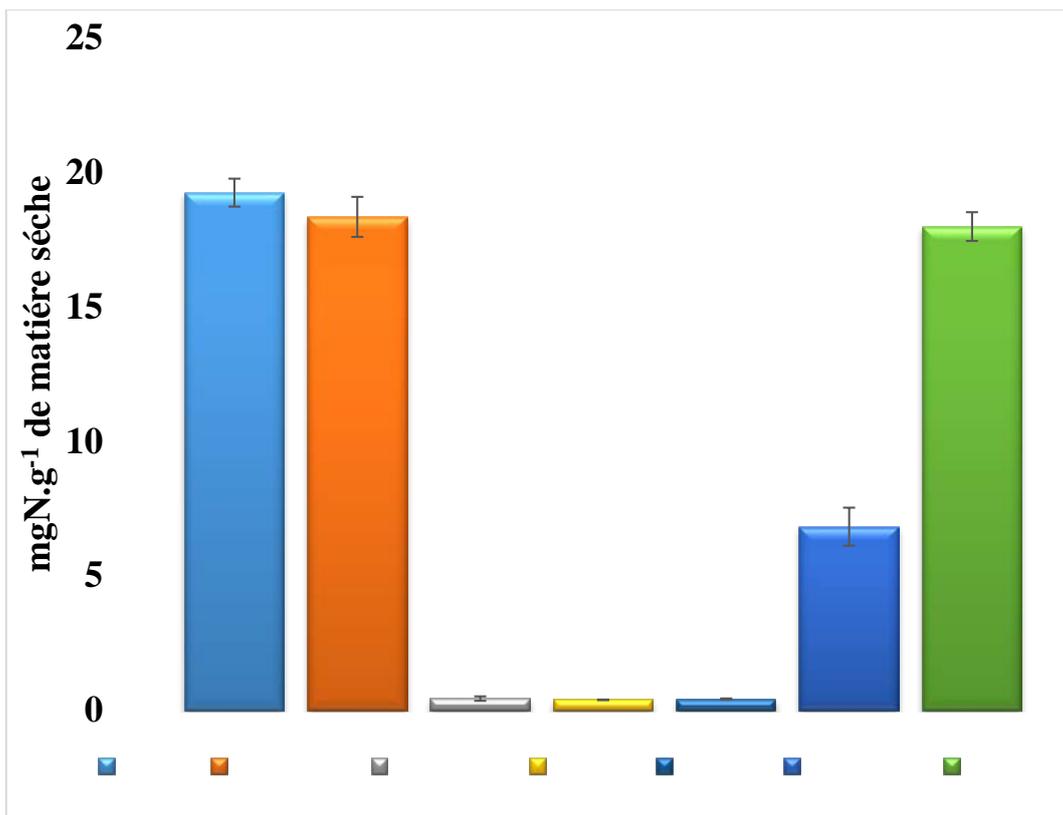


Fig. 39 : Évaluation de la teneur en azote des MEC, MEA, et d'ultrafiltration avant (Tn : témoin négatif) et après traitement lors du fractionnement du mélange peptidique.

3.6 Discussion

Dans l'objectif de mettre en évidence les mécanismes de transfert de peptides aux charges opposées au sein d'un mélange peptidique en électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration, le fractionnement d'une solution peptidique modèle composée d'un peptide anionique et d'un peptide cationique a été réalisé. La cellule d'électrodialyse utilisée définit quatre compartiments : un compartiment d'alimentation, un compartiment de récupération KCl1 (migration sélective du peptide anionique), un compartiment de récupération KCl2 (migration sélective du peptide cationique) et un compartiment de rinçage des électrodes.

Comparaison des deux systèmes KCl à 0,5 g.L⁻¹ et le mélange peptidique :

Nous avons étudié le fonctionnement de la cellule électrodialytique avec deux systèmes : une solution saline de KCl à 0,5 g.L⁻¹ et une solution peptidique 4-asp (0,05%)/4-lys (0,05%)/KCl (0,5 g.L⁻¹). La comparaison a porté sur l'évolution de l'intensité du courant, de la conductivité électrique et de la différence du potentiel membranaire et la migration ionique. Nos résultats ont mis en évidence que dans nos conditions opératoires, la densité de courant limite a été dépassée dès le début des expériences. Conformément aux données de la littérature (Simons,

(1985) ; Zabolotskii et *al.*, (2014)), nos résultats confirment que la densité de courant limite a d'abord eu lieu au niveau de la MEA. Ceci s'est traduit par :

- Une vitesse de déminéralisation plus faible dans le compartiment KCl1 comparé au compartiment KCl2. En effet, les flux ioniques ont été plus faibles dans ce compartiment. Ce dernier étant délimité par la MEA, la vitesse de dissociation de l'eau y est plus élevée. Par conséquent, la migration des ions K^+ et Cl^- subit un effet de concurrence avec les ions H^+ et OH^- générés.
- Des valeurs inhabituellement élevées de la différence du potentiel membranaire aux interfaces de la MUF1 et un pic d'augmentation de la différence du potentiel membranaire au niveau de la MEA au début de l'électrodialyse.

La comparaison des systèmes KCl à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ et le mélange peptidique a permis de dégager des similitudes en termes d'évolution de l'intensité du courant et de la conductivité. La présence de peptides dans la solution saline ne semble pas influencer de manière significative les mécanismes de déminéralisation au sein de la cellule électrodialytique. Les résultats d'une étude menée par Bukhovets et *al.*, (2011) vont dans ce sens. Les auteurs ont mesuré la densité de courant limite avec une solution diluée de NaCl et cette même solution enrichie en phénylalanine. L'étude a montré que la présence d'acides aminés ne modifiait pas la valeur de la densité de courant limite. Cependant, on a pu déceler de légers écarts au niveau des flux ioniques. Grâce au pouvoir tampon des peptides, les flux ioniques ont été légèrement plus importants dans le cas du mélange peptidique.

On note par ailleurs une parfaite corrélation entre l'évolution de la conductivité électrique, de l'intensité du courant et de la migration des ions K^+ et Cl^- expliqué par la contribution importante des ions K^+ et Cl^- au transport du courant électrique.

Transfert du peptide 4-asp :

Nos résultats ont mis en évidence trois phases de migration pour ce peptide :

- Une première phase de 10 minutes avec un flux peptidique sortant de $15 \pm 7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ du compartiment d'alimentation et un flux peptidique entrant de $15 \pm 5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le compartiment KCl1. Lors de cette phase, le rendement massique est de 99% et le rendement massique de récupération du peptide est de 14%. Comparons ces résultats avec ceux obtenus avec la solution peptidique simple de 4-asp lors de la première phase de migration (entre 0 et 60 min d'EDUF). Le flux peptidique sortant était de $56 \pm 8 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, soit 3,7 fois le flux sortant du même peptide dans le cas du mélange. Deux

explications peuvent être avancées pour expliquer cet écart : une concentration initiale 2 fois plus faible et une vitesse de dissociation de l'eau plus importante dans le cas du mélange liée à l'utilisation de voltages différents entre les deux cellules électrodialytiques. On note cependant des flux entrants très proches dans les 2 cas : $15 \pm 5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ dans le cas du mélange et $12 \pm 4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ avec la solution peptidique simple. Ceci peut s'expliquer par de très faibles interactions entre le peptide et la MEA dans le cas du mélange en raison d'une surface membranaire 10 fois plus importante et d'une durée de contact plus courte. En effet, le rendement massique était de 78% avec la solution simple contre 99% avec le mélange lors de la première phase de transfert. Enfin, le rendement de récupération du peptide était de 4,6% avec la solution simple alors qu'il est de 14% dans le cas du mélange, certainement en raison de la plus grande surface membranaire utilisée lors de l'électrodialyse du mélange. On peut par ailleurs envisager l'éventualité d'un effet compétition entre peptides ayant pour effet d'affecter les flux peptidiques.

- Une seconde phase entre 10 et 40 min d'électrodialyse qu'on peut comparer avec la phase 2 (de 120 à 240 min) dans le cas de la solution simple. Si l'on constate un arrêt de la migration peptidique avec la solution simple, on enregistre de faibles flux dans le cas du mélange (un flux sortant de $5 \pm 1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ et un flux entrant de $1,9 \pm 1,7 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$). Dans les deux cas, cette phase de transfert est gouvernée par l'effet circulation du peptide qui freine sa migration et par l'apparition d'interaction peptide/MEA. Lors de cette phase, le rendement massique est de 89% contre 79% dans le cas de la solution simple. Le rendement massique de récupération du peptide est de l'ordre de 20% dans le cas du mélange et de seulement 6% avec la solution peptidique simple.
- Une troisième phase du transfert entre 40 et 70 min qui correspond à l'ajout du KCl. Contrairement à la solution peptidique simple où la restauration de la force ionique a eu un réel effet sur la migration peptidique, cette phase s'est caractérisée dans le cas du mélange par un léger rebond du flux peptidique côté alimentation et un flux entrant dans le compartiment de récupération quasi identique à celui de la deuxième phase. En effet, l'ajout du KCl a engendré une importante augmentation de l'intensité du courant qui a favorisé la dissociation de l'eau au détriment de la migration peptidique. Lors de cette phase, le rendement massique est de 67% avec le mélange contre 74% dans le cas de la solution peptidique simple. À la fin de l'électrodialyse, le rendement massique de récupération de 4-asp atteint 23% pour le mélange alors qu'il n'était que de 8% pour la solution peptidique simple.

Il est à souligner qu'en dépit de bilans massiques allant dans le sens d'une adsorption progressive du peptide sur la MEA, le dosage de l'azote membranaire n'a pas permis de mettre en évidence de telles interactions. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : une possible adsorption du côté de la membrane cationique du peptide 4-asp à l'issue de sa protonation par effet barrière ou une difficulté de détection du peptide à la surface membranaire par la méthode de dosage compte tenu des faibles quantités peptidiques mises en jeu additionnées de l'importante surface membranaire utilisée en électrodialyse.

Transfert du peptide 4-lys :

On a pu distinguer deux phases de transfert pour le peptide cationique. Une première phase sur les 30 premières minutes d'électrodialyse caractérisée par un flux sortant de $20 \pm 0,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, un flux entrant de $3 \pm 0,4 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, un rendement massique de 46% et un rendement massique de récupération du peptide de 4%. Si on compare ces résultats avec ceux obtenus avec la solution peptidique simple de 4-lys lors de la première phase de migration (entre 0 et 60 min d'EDUF), le flux peptidique sortant était de $107 \pm 17 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, soit 5,3 fois le flux sortant du même peptide dans le cas du mélange, le rendement massique était de 91% et le rendement de récupération de 32%. Pour expliquer ces écarts, on peut s'appuyer sur les éléments suivants :

- Une configuration membranaire moins favorable : dans le cas de la solution simple, la solution peptidique circulait au voisinage de la membrane anionique génératrice d'ions H^+ ayant pour effet de recharger le peptide et favoriser sa migration (transport facilité). Dans le cas du mélange, la migration du peptide est moins favorisée du fait que la solution peptidique circule au voisinage de deux membranes d'ultrafiltration.
- Une concentration initiale en peptide deux fois plus faible que la solution simple.
- Un possible effet de compétition entre les peptides.
- L'important écart entre les flux sortant et entrant et par conséquent le faible rendement massique peuvent s'expliquer par d'importantes interactions 4-lys/MEC. En effet, on a pu constater ce phénomène avec la solution peptidique simple de 4-lys mais qui ne sont apparues qu'à un stade tardif de l'électrodialyse. Dans le cas du mélange, la densité du courant limite a été atteinte dès le début de l'expérience ce qui a pu favoriser le colmatage de la membrane par le peptide (Bukhovets et *al.*, (2011)). Ce colmatage précoce et certainement progressif a empêché le maintien du peptide en solution ce qui explique son faible taux de récupération (4,1%) comparé à la solution peptidique simple où le rendement était de 32% à l'issue de la première phase de l'électrodialyse (entre 0 et 60 min).

La deuxième phase du transfert a eu lieu entre 30 et 70 min. Le flux sortant a chuté à $5 \pm 1 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, le flux entrant à $0,8 \pm 0,4 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ et le rendement massique à 31%. L'ajout du KCl n'a pas eu d'effet sur la migration du peptide cationique comme pour le cas de la solution simple de 4-lys. Le transfert du peptide cationique dans le cas du mélange semble clairement défavorisé en grande partie en raison de sa forte interaction avec la membrane cationique.

Les représentations schématiques des différentes phases d'électromigration sont illustrées dans les figures 40a, b et c.

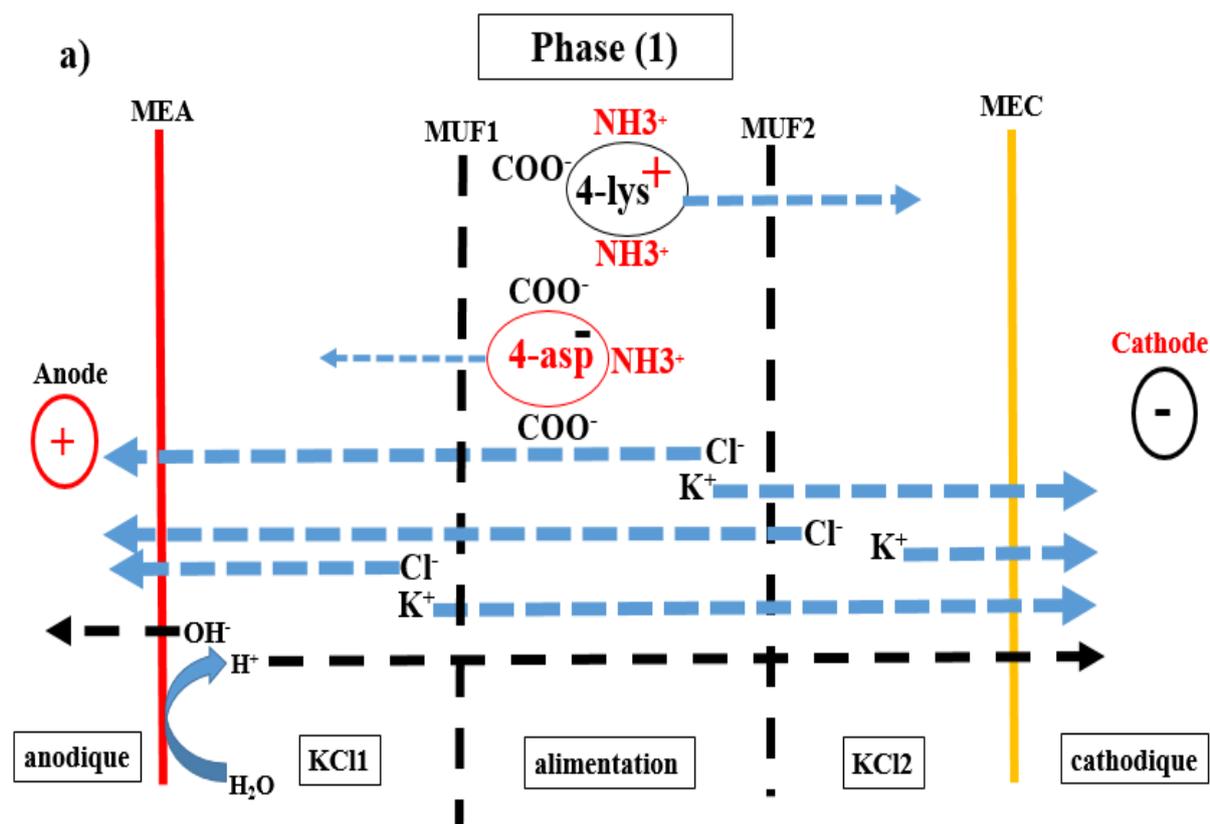


Fig. 40a : Représentation schématique du transfert des ions et des peptides lors de la phase (1).

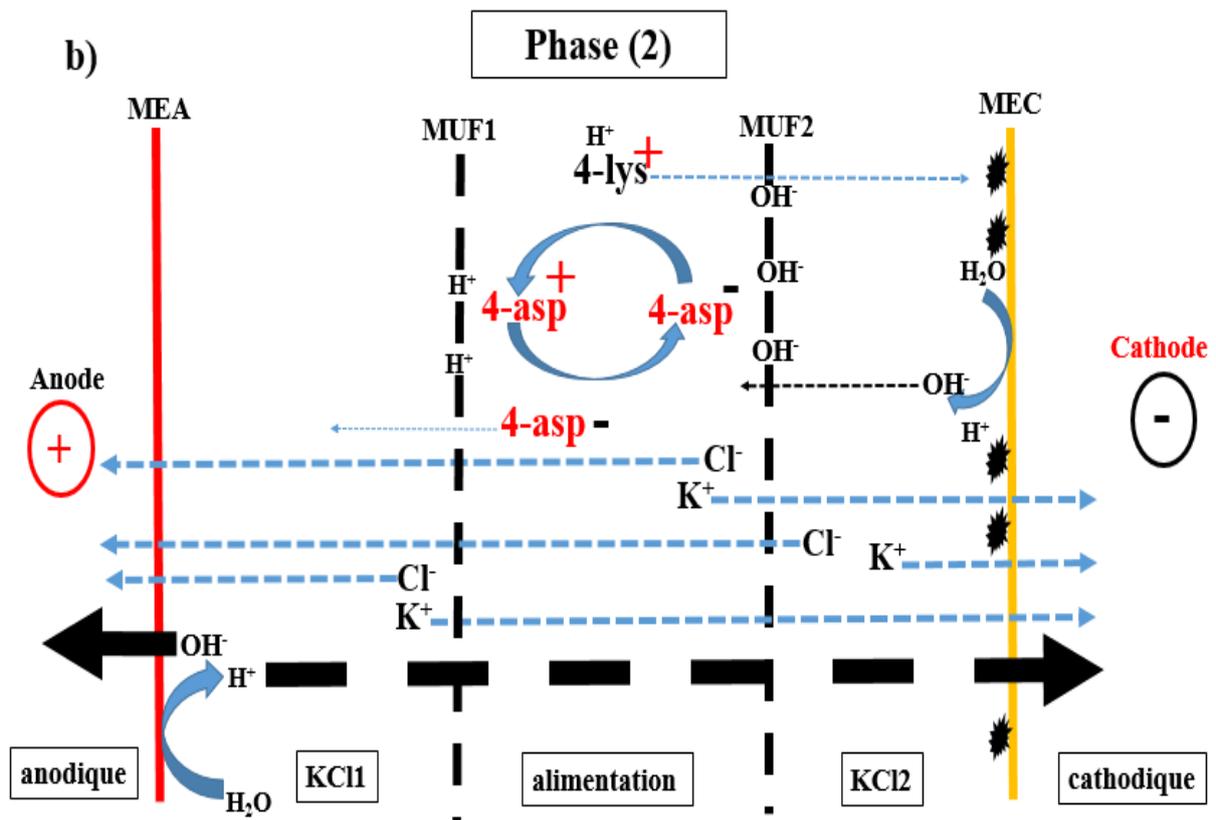


Fig. 40b : Représentation schématique du transfert des ions et des peptides lors de la phase (2).

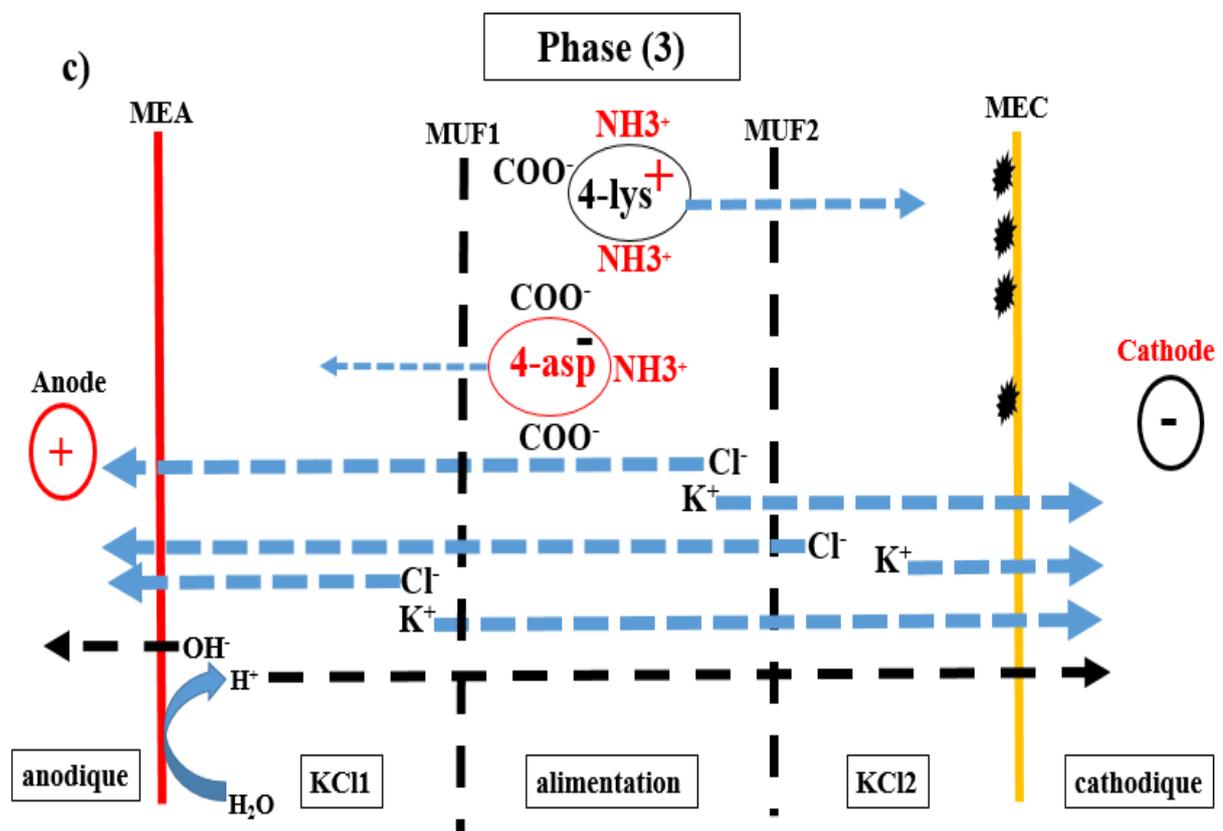


Fig. 40c : Représentation schématique du transfert des ions et des peptides lors de la phase (3).

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse consistait à étudier les mécanismes de séparation de peptides en électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration. Deux peptides synthétiques anionique (4-asp) et cationique (4-lys) ont été sélectionnés sur la base de leurs propriétés physico-chimiques. À notre connaissance, c'est la première fois que la séparation de peptides modèles est étudiée par électrodialyse.

Dans un premier temps, la mesure de la mobilité électrophorétique des deux peptides a été réalisée. L'influence des conditions opératoires (force ionique, pH, contre-ion de synthèse) sur la mobilité électrophorétique de chaque peptide a été étudiée. La mesure de la mobilité électrophorétique des peptides a aidé à définir les conditions de séparation en termes de pH et de force ionique lors de l'électrodialyse. Un pH neutre a été retenu de manière à ce que le peptide 4-asp soit chargé négativement et le peptide 4-lys porte une charge positive.

Dans un second temps, la séparation de solutions contenant un seul peptide a été réalisée. Les principaux résultats qui en ressortent sont :

- Le transfert des peptides est dû à l'action du champ électrique.
- La dissociation de l'eau qui survient suite au dépassement de la densité du courant limite dans la cellule électrodialytique influence considérablement les flux ioniques et peptidiques.
- La migration du peptide cationique 4-lys est favorisée grâce aux ions H^+ générés par la dissociation de l'eau. C'est le résultat de l'effet facilitation qui intervient au cours de l'électrodialyse du peptide cationique. D'importantes interactions avec la membrane échangeuse de cations ont été par ailleurs mises en évidence pour ce peptide.
- La dissociation de l'eau freine la migration du peptide anionique en raison de l'effet circulation qui apparaît au cours de l'électrodialyse.

En dernier lieu, la séparation du mélange des deux peptides en EDUF a été menée. Nous avons d'abord comparé le fractionnement de la cellule électrodialytique avec et sans peptides. Il s'est avéré qu'aux concentrations peptidiques mises en œuvre, les peptides n'influent pas véritablement les flux ioniques. Nous avons tout de même décelé de légers écarts en termes de flux ioniques entre la solution saline et la solution peptidique qu'on explique par le pouvoir tampon des peptides. Les résultats de migration peptidique obtenus se sont avérés conformes à ceux de l'étude de solutions peptidiques simples en matière des effets de la dissociation de l'eau et du colmatage de la membrane échangeuse de cations. Cependant, d'importants écarts en

termes de flux peptidiques et de rendements de récupération ont été enregistrés entre les solutions simples et le mélange peptidique. Les écarts s'expliquent par des conditions opératoires et des cellules membranaires différentes entre les deux systèmes.

Dans l'optique de réduire la dissociation de l'eau, nous avons procédé à un ajout du KCl dans les compartiments d'alimentation et de récupération après une première phase d'électrodialyse. Avec les solutions peptidiques simples, cette stratégie a permis de restaurer les flux ioniques et le flux peptidique de 4-asp ce qui fait germer l'idée de l'intérêt d'envisager un système de maintien de la conductivité des solutions d'alimentation et de récupération lors du fractionnement d'hydrolysats enzymatiques dans le but de s'affranchir des effets de la densité de courant limite ce qui aurait pour effet d'améliorer la productivité du procédé. Cette étape mérite d'être optimisée (niveau de conductivité à maintenir, concentration et nature du sel à ajouter...).

Dans le même ordre d'idée, il pourrait être envisagé un empilement membranaire où le placement des membranes échangeuses d'ions est inversé comme proposé par Van Nunen (1997). Cette configuration permettrait d'éviter le dépassement de la densité de courant limite mais aurait l'inconvénient de nécessiter une étape supplémentaire de dessalement des fractions séparées. De plus, la mobilité électrophorétique des peptides pourrait être affectée en raison d'une force ionique élevée dans les compartiments d'alimentation et de récupération.

Notre étude a également mis en évidence un important colmatage de la membrane échangeuse de cations par le peptide 4-lys. Il serait intéressant d'étudier le comportement d'un autre peptide cationique vis-à-vis de la membrane échangeuse de cations et de tester un matériau membranaire différent.

Références bibliographiques

- Agyei D. et Danquah M.D.**, Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides, *Biotechnology Advances* (2011), 29, 272-277.
- Aider M., Brunet S. et Bazinet L.**, Electro-separation of chitosan oligomers by electro-dialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) and impact on electro-dialytic parameters, *Journal of Membrane Science* (2008), 309, 222-232.
- Aider M.**, Étude de la mobilité électrophorétique des oligomères de chitosane et leur fractionnement par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF), thèse présentée à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, Québec, Canada (2007).
- Aluko R-E.**, Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea, and mung bean protein hydrolysates, *J AOAC Int* (2008), 91, 947-956.
- Andreu D., Rivas L.**, Chemistry and applications of synthetic antimicrobial peptides. In: Dutton CJ, Haxell MA, McArthur HAI, Wax RG, editors. *Peptide antibiotics: discovery, modes of action, and applications*, New York: Marcel Dekker Inc. (2002), 15-45.
- Ashar M-N., Chand R.**, Fermented milk containing ACE-inhibitory peptides reduces blood pressure in middle aged hypertensive subjects, *Am J Clin Nutr.* (2004), 59, 363-366.
- Ayala-Bribiesca E., Araya-Farias M., Pourcelly G. et Bazinet L.**, Effect of concentrate solution pH and mineral composition of a whey protein diluate solution on membrane fouling formation during conventional electro-dialysis, *Journal of Membrane Science* (2006), 280, 790-801.
- Bahga S., Bercovici M. et Santiago J.G.**, Ionic strength effects on electrophoretic focusing and separations, *Electrophoresis* (2010), 31, 910-919.
- Bargeman G., Dohmen-Speelmans M., Recio I., Timmer M. et van der Horst H.C.**, Selective isolation of high-value dairy components by electro-membrane filtration, *Lait* (2000), 80, 175-186.
- Bargeman G., Houwing J., Recio I., Koops G.H. et van der Horst H.C.**, Electro-membrane filtration for the selective isolation of bioactive peptides from an α_2 -casein hydrolysate, *Biotechn. Bioeng* (2002a), 80, 599-609.
- Bargeman G., Koops G.H., Houwing J., Breebaart I., van der Horst H.C. et Wessling M.**, The development of electro-membrane filtration for the isolation of bioactive peptides: the effect of membrane selection and operating parameters on the transport rate, *Desalination* (2002b), 149, 369-374.
- Bazinet L. et Castaigne F.**, Concepts de génie alimentaire: Procédés associés et applications à la conservation des aliments, *Ediction Tec & Doc Lavoisier* (2011), page 549.
- Bazinet L. et Firdaous L.**, Application of electromembrane processes to the production of nutraceuticals or functional foods, *Handbook of Membrane Research: Properties, Performance and Applications* (2009). (Gorley S.V, Ed.), Nova Science publishers, Inc, pp.
- Bazinet L. et Firdaous L.**, Recent patented applications of ion-exchange membranes in the agrifood sector, *Recent Patents on Chemical Engineering* (2011), 4, 207-216.
- Bazinet L. et Firdaous L.**, Separation of Bioactive Peptides by Membrane Processes: Technologies and Devices, *Recent Patents on Biotechnology* (2013), 7, 9-27.
- Bazinet L., Amiot J., Poulin J-F., Labbé D. et Tremblay D.**, International Patent WO 082495A1 (2005a).

Bazinet L., Cossec C., GAudreau H. et Desjardins Y., Production of a Phenolic Antioxidant Enriched Cranberry Juice by Electrodialysis with Filtration Membrane, *J. Agric. Food Chem.* (2009a), 57, 10245-10251.

Bazinet L., Electrodialytic phenomena and their applications in the dairy industry: A Review, *CRC Critical review in Food Science and Nutrition* (2005b), 45, 307-326.

Bazinet L., Lamarche F. et Ippersiel D., Bipolar-membrane electrodialysis: applications of electrodialysis in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* (1998a), 9, 107-113.

Bazinet L., Lamarche F. et Ippersiel D., L'électroacidification avec membranes bipolaires: une électrotechnologie environnementale pour la production d'isolats de protéines de soya, *Industries Alimentaires et Agricoles* (1998b), 1-7.

Bazinet L., Montpetit D., Ippersiel D., Mahdavi B., Amiot J. et Lamarche F., Neutralization of hydroxide generated during skim milk electroacidification and its effect on bipolar and cationic membrane integrity. *Journal of Membrane Science* (2003), 216, 229-239.

Boudesocque L., Kapel R., Paris C., Dhulster P. Marc I. et Renault J.H., Concentration and selective fractionation of an antihypertensive peptide from an alfalfa white proteins hydrolysate by mixed ion-exchange centrifugal partition chromatography, *Journal of Chromatography B* (2012), 905, 23-30.

Boudesocque L., Nouvelles méthodologies de purification de peptides par chromatographie de partage centrifuge: application à l'isolement et à la purification de peptides bioactifs, Thèse présentée à université de Reims Champagne-Ardenne, 2010.

Bouhallab S., Henry G. et Boschetti E., Separation of small cationic bioactive peptides by strong ion-exchange chromatography, *Journal of Chromatography A* (1996), 724, 137-145.

Brink L.E.S. et Romijn D.J., Reducing the protein fouling of polysulfone surfaces and polysulfone ultrafiltration membranes: Optimization of the type of presorbed layer, *Desalination* (1990), 78, 209-233.

Brulé G., Roger L., Fauquant J. et Piot M., Phosphopeptides from casein-based material. US4358465, 1982.

Bukhovets A-E., Eliseevaa T., Dalthrope N., Oren Y., The influence of current density on the electrochemical properties of anion-exchange membranes in electrodialysis of phenylalanine solution, *Electrochimica Acta* (2011), 56, 10283-10287.

Bukhovets A-E., Savel'eva A.M. et Eliseeva T.V., Separation of amino acids mixtures containing tyrosine in electromembrane systeme, *Desalination* (2009), 241, 68-74.

Casademont C., Pourcelly G., Bazinet L., Effect of magnesium/calcium ratios in solutions treated by electrodialysis: characterization of cation-exchange membrane fouling, *J. Colloid Interface Sci.* (2007), 315, 544.

Casademont C., Pourcelly G., Bazinet L., Effect of magnesium/calcium ratios in solutions treated by electrodialysis: morphological characterization and identification of anion-exchange membrane fouling, *J. Colloid Interface Sci.* (2008), 322, 215.

CE 1924/2006, Journal officiel de l'Union européenne, L 404 du 30 décembre 2006.

Chan R. et Chen V., Characterization of protein fouling on membranes: opportunities and challenges, *Journal of Membrane Science* (2004), 242, 169-188.

- Cifuentes A. et Hans Poppe H.**, Effect of pH and ionic strength of running buffer on peptide behavior in capillary electrophoresis: Theoretical calculation and experimental evaluation, *Electrophoresis* (1995), 16, 516-524.
- Clifton M.J., Jouve N., Roux-de Balman H. et Sanchez V.**, Conditions for purification of proteins by free-flow zone electrophoresis, *Electrophoresis* (1990), 11, 913-919.
- Corradini D., Cogliandro E., D'Alessandro L. et Nicoletti I.**, Influence of electrolyte composition on the electroosmotic flow and electrophoretic mobility of proteins and peptides, *J Chromatogr A.* (2003),1013, 221-32.
- Corthals G.L., Collins B.M., Mabbutt B.C., Williams K.L. et Gooley A.A.**, Purification by reflux electrophoresis of whey and of a recombinant protein expressed in *Dictyostelium Discoideum*, *J. Chromatogr. A* (1997), 773, 299-310.
- Cowan D. et Brown J.**, Effect of turbulence on limiting current in electro dialysis cell, *Ind. Eng. Chem.* (1959), 51, 1445-1448.
- Crimmins D.L.**, Strong cation-exchange high-performance liquid chromatography as a versatile tool for the characterization and purification of peptides, *Analytica Chimica Acta* (1997), 352, 21-30.
- Dauffin G., Kerhervé F.L., Aimar P., Mollé D., Léonil J. et Nau F.**, Electrofiltration of solutions of amino acids or peptides, *Lait* (1995), 75, 105-115.
- Davis T.A.**, Electrodialysis. In M.C. Porter (Ed.), *Handbook of Industrial Membrane Technology.* (1990) (pp. 482-510). Park Ridge, USA: Noyes Publications.
- Dos A., Volkmar Schimming V., Tosoni S. et Limbach H-H.**, Acid-Base Interactions and Secondary Structures of Poly-L-Lysine Probed by ¹⁵N and ¹³C Solid State NMR and Ab initio Model Calculations, *J. Phys. Chem. B* (2008), 112, 15604-15615.
- Doyen A., Beaulieu L., Saucier L., Pouliot Y. et Bazinet L.**, Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Separation and Purification Technology* (2011), 78, 321-329.
- Doyen A., Chibuike C., Udenigwec C.C., Mitchell P.L., Marette A., Aluko R.E. et Bazinet L.**, Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chemistry* (2014b), 145, 66-76.
- Doyen A.**, Fractionnement d'un hydrolysat peptidique de co-produits de crabe des neiges par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration : Impact des paramètres liés au procédé sur la migration et la sélectivité peptidique, Thèse université Laval 2010, Québec, Canada.
- Doyen A., Husson E. et Bazinet L.**, Use of an electro dialytic reactor for the simultaneous β -lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides, *Food Chemistry* (2013), 136, 1193-1202.
- Doyen A., Saucier L., Beaulieu L., Pouliot Y. et Bazinet L.**, Electro separation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chemistry* (2012), 132, 1177-1184.
- Doyen A., Udenigwe C.C., Aluko R.E. et Bazinet L.**, Double selective fractionation of flaxseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes: stacking of ultrafiltration membranes with different molecular weight cut-offs, *Food Chemistry.* Article soumis (2014a).

Eliseeva T-V. et Shaposhnik V.A., Effects of Circulation and Facilitated Electromigration of Amino Acids in Electrodialysis with Ion-Exchange Membranes, *Russian Journal of Electrochemistry* (2000), 36, 73-76.

Eliseeva T-V., Shaposhnik V-A., Krisilova E-V. et Bukhovets A-E., Transport of basic amino acids through the ion-exchange membranes and their recovery by electrodialysis, *Desalination* (2009), 241, 86-90.

El-Rassi Z., Capillary Electrophoresis of Carbohydrate Species. *Electrophoresis* (1996), 17, 275-437.

Firdaus L., Dhulster P., Amiot J., Doyen A., Lutin F., Vezina L.P. et Bazinet L., Investigation of the large-scale bioseparation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process, *J. Membr. Sci.* (2010), 355, 175-181.

Firdaus L., Dhulster P., Amiot J., Gaudreau A., Lecouturier D., Kapel R., Lutin F., Vezina L.P. et Bazinet L., Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultra filtration membranes, *J. Membr. Sci.* (2009), 329, 60-67.

Firdaus L., Dhulster P., Amiot J., Gaudreau A.; Lecouturier D.; Lutin F.; Vézina L.P. et Bazinet L., Bioséparation de peptides fonctionnels de luzerne par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration. Conférence présentée dans le cadre du 76ème congrès de l'ACFAS, symposium n°612 «peptides/protéines, relation structure fonction et effets physiologiques», Québec, Qc., 6 mai 2008.

Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckerbush C., Dhulster P. et Guillochon D., Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment, *FEBS Lett.* (2001), 491, 159-163.

Fujita H., Yamagami T., Oshima K., Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects, *Nutr Res* (2001), 21, 1149-1158.

Galier S. et Roux-de Balmann H., Electrophoretic Membrane Contactors, *Chemical Engineering Research and Design* (2005), 83, 268-275.

Galier S. et Roux-de Balmann H., Influence of electrostatic interactions in electrophoretic membrane contactors, *Desalination* (2002), 149, 351-356.

Galier S. et Roux-de Balmann H., Study of biomolecules separation in an electrophoretic membrane contactor, *Journal of Membrane Science* (2004), 241, 79-87.

Galier S. et Roux-de Balmann H., Study of the mass transfer phenomena involved in an electrophoretic membrane contactor, *Journal of Membrane Science* (2001), 194, 117-133.

Galier S. et Roux-de Balmann H., The electrophoretic membrane contactor: A mass-transfer-based methodology applied to the separation of whey proteins, *Separation and Purification Technology* (2011), 77, 237-244.

Galier S., Conception et étude d'un procédé de séparation électrophorétique utilisant une membrane poreuse comme contacteur, Thèse soutenue en 2000 à l'Université de Paul Sabatier, Toulouse.

Gibbs B-F., Zougman A., Masse R. et Mulligan C., Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food, *Food Research International* (2004) 37, 123-131.

- Granier P. et Bimbenet J.J.**, Les procédés de séparation par membranes : électrodialyse, osmose inverse, ultrafiltration, CDIUPA (1976).
- Greiter M., Novalin S., Wendland M., Kulbe K.D. et Fischer J.**, Desalination of whey by electro dialysis and ion exchange resins: analysis of both processes with regard to sustainability by calculating their cumulative energy demand, *Journal of Membrane Science* (2002), 210, 91-102.
- Grib H., Bonnal L., Sandeaux J. et al.**, Extraction of amphoteric amino acids by an electromembrane process. pH and electrical state control by electro dialysis with bipolar membranes, *J Chem Technol Biotechnol* (1998), 73, 64-70.
- Grossman P.D. et Colburn J.C.**, *Capillary electrophoresis: theory & practice*, Academic Press (1992), 114-115.
- Grossman P-D., Kenneth J-W., Gordon P. et Henk H-L.**, Effect of buffer pH and peptide composition on the selectivity of peptide separations by capillary zone electrophoresis, *analytical biochemistry* (1988), 173,265-270.
- Gunther R-C.**, Chemistry and characteristics of enzyme-modified whipping proteins, *Journal of the American Oil Chemists' Society* (1979), 56, 345-349.
- Han C., Chen J., Liu J., Lee F.C. et Wang X.**, Isolation and purification of Pseudostellarin B (cyclic peptide) from *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax by high-speed counter-current chromatography. *Talanta* (2007), 71, 801-805.
- Hartmann R. et Meisel H.**, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Current Opinion in Biotechnology* (2007), 18, 163-169.
- Helferich F.**, *Ion exchange*, McGraw-Hill, New York (1962).
- Horvath Z.S., Corthals G.L., Wrigley C.W. et Margolis J.**, Multifunctional apparatus for electrokinetic processing of proteins, *Electrophoresis* (1994), 15, 968-971.
- Horvath Z.S., Gooley A.A., Wrigley C.W., Margolis J. et Williams K.L.**, Preparative affinity membrane electrophoresis, *Electrophoresis* (1996), 17, 224-226.
- Huisman I.H., Prádanos P., Hernández A.**, The effect of protein-protein and protein-membrane interactions on membrane fouling in ultrafiltration, *Journal of Membrane Science* (2000), 179, 79-90.
- Ibanez R., Stamatialis D.F., Wessling M.**, Role of membrane surface in concentration polarization at cation exchange membranes, *Journal of Membrane Science* (2004), 239, 119-128.
- Issaq H-J., Janinia G-M., Atamna I-Z., Muschika G-M. & Lukszoa J.**, Capillary electrophoresis separation of small peptides: Effect of pH, buffer additives, and temperature, *Journal of Liquid Chromatography* (1992), 15, 6-7.
- Ito Y.**, pH-zone-refining counter-current chromatography: Origin, mechanism, procedure and applications, *Journal of Chromatography A* (2013), 1271, 71-85.
- Je J-Y., Qian Z-J., Byun H-G. et Kim S-K.**, Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis, *Process Biochemistry* (2007), 42, 840-846.
- Kapel R., Froidevaux R., Nedar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Dhulster P. et Guillochon D.**, Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide

LVV-haemorphin-7 (LVVh-7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor, *Biotechnol Appl Biochem* (2003), 37, 317-324.

Kapel R., Rahhou E., Lecouturier D., Guillochon D. et Dhulster P., Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor, *Proc Biochem* (2006), 41, 1961-1966.

Kattan Read O.M., Mengers H.J., Wiratha W., Wessling M. et Nijmeijer K., On the isolation of single acidic amino acids for biorefinery applications using electrodialysis, *Journal of Membrane Science* (2011), 384, 166-175.

Kim J.Y., Park S.C., Kim M.H., Lim H.T., Park Y. et Hahm K.S., Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato, *Biochem Biophys Res Commun* (2005), 330, 921-927.

Kim M.H., Park S.C., Kim J.Y. et al., Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley", *Biochem Biophys Res Commun* (2006), 346, 681-686.

Kitts D.D. et Weiler K., Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery, *Current Pharmaceutical Design* (2003), 9, 1309-1323.

Korhonen H. et Pihlanto A., Bioactive peptides: Production and functionality, *International Dairy Journal* (2006), 16, 945-960.

Korhonen H., Milk-derived bioactive peptides: From science to applications, *Journal of functional foods* (2009), 1, 177-187.

Korngold E., De Korosy F., Rahav R. et Taboch M.F., Fouling of anion-selective membrane in electrodialysis, *Desalination* (1970), 8, 195-220.

Kressman T.R.E. et Tye F.L., pH changes at the anion selective membranes under realistic flow conditions, *J. Electrochem. Soc.* (1969), 116, 25-31.

Krol J.J., Wessling M. et Strahmann H., Concentration polarization with monopolar ion exchange membrane: current-voltage curves and water dissociation, *Journal of Membrane Science* (1999), 162, 145-154.

Krol J-J., Monopolar and bipolar ion exchange membranes, *Mass Transport Limitations* (1997), Thèse université de Twente, Pays-bas.

Kuba M., Tana C., Tawata S. et Yasuda M., Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase. *Process Biochemistry* (2005), 40, 2191-2196.

Labbé D. et Bazinet L., Effect of membrane type on cation migration during green tea electromigration and equivalent mass transported calculation, *Journal of Membrane Science* (2006), 275, 220-228.

Landers J.P., in: *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997.

Langevin M.E., Roblet C., Moresoli C., Ramassamy C. et Bazinet L., Comparative application of pressure and electrically-driven membrane processes for isolation of bioactive peptides from soy protein hydrolysate, *Journal of Membrane Science* (2012), 403, 15-24.

Lapointe J.F., Gauthier S.F., Pouliot Y. et Bouchard C., Selective separation of cationic peptides from a tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin by electrofiltration, *Biotechnology and Bioengineering* (2006), 94, 223-233.

- Lautsch W. et Manecke G.**, Herstellung und anwendung von ionenaustauscher-papier, *Z. Naturorschuhg* (1953), 8, 232-236.
- Lee K. et Hong J.**, Electrokinetic transport of amino acids through a cation exchange membrane, *Journal of Membrane Science* (1992), 75, 107-120.
- Lee K-A. et Kim S-H.**, SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation. *Food Chemistry*, (2005), 90, 389-393.
- Leeb E., Holder A., Letzel T., Seronei Chelulei Cheison S.C., Kulozik U., Hinrichs J.**, Fractionation of dairy based functional peptides using ion-exchange membrane adsorption chromatography and cross-flow electro membrane filtration, *International Dairy Journal* (2014), 38, 116-123.
- Li H., Aluko R-E.**, Kinetics of the inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by pea protein-derived peptides, *The Journal of Nutritional Biochemistry* (2005), 16, 656-662.
- Lin Teng Shee F., Arul J., Brunet S. et Bazinet L.**, Performing a three-step process for conversion of chitosan to its oligomers using a unique bipolar membrane electro dialysis system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2008), 56, 10019–10026.
- Lindstrand V., Jönsson A.S. et Sundström G.**, Organic fouling of electro dialysis membranes with and without applied voltage, *Desalination* (2000a), 130, 73-84.
- Lindstrand V., Sundström G. et Jönsson A.S.**, Fouling of electro dialysis membranes by organic substances, *Desalination* (2000b), 128, 91-102.
- Liu Z., Huang Z., Chong J., Yang H., Ding F. et Yuan N.**, Continuous separation of proteins by Multichannel Flow Electrophoresis, *Sep. Sci. Technol.* (1996b), 31, 1427-1442.
- Liu Z., Yang H., Huang Z., Wang J., Ding F. et Yuan N.**, Multichannel flow electrophoresis in an alternating electric field, *Sep. Sci. Technol.* (1996a), 31, 2257-2271.
- Ma Y. et Ito Y.**, Peptide separation by pH-zone-refining countercurrent chromatography, *Journal of Chromatography A* (1997), 771, 81-88.
- Ma Y. et Ito Y.**, Separation of peptide derivatives by pH-zone-refining counter-current chromatography, *Journal of Chromatography A* (1995), 702, 197-206.
- Margolis J.**, Electrophoretic method for preparative separation of charged molecules in liquids. US5039386, 1991.
- Marinova K-G., Alargova R-G., Denkov N-D., Velev O-D., Petsev N-D., Ivanov I-B. et Borwankar R-P.**, Charging of oil-water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions, *Langmuir* (1996), 2045-2051.
- Marshall A.D., Munro P.A. et Trägårdh G.**, The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on perméate flux, protein retention and selectivity. A literature review, *Desalination* (1993), 91, 65-108.
- Martinez D., Sandeaux R., Sandeaux J. et Gavach C.**, Electrotransport of alanine through ion-exchange membranes, *Journal of Membrane Science* (1992), 69, 273-281.
- Martin-Orue C., Henry G. et Bouhallab S.**, Tryptic hydrolysis of kappa-caseinomaclopeptide: control of the enzymatic reaction in a continuous membrane reactor, *Enzyme and Microbial Technology* (1999), 24, 173-180.

- Mechref Y. et El-Rassi Z.**, Capillary electrophoresis of herbicides. Evaluation of alkylglucoside chiral surfactants in the enantiomeric separation of phenoxy acid herbicides. *Journal of Chromatography A*. (1997), 757, 263-273.
- Mechref Y., Ostrander G.K. et El Rassi Z.**, Capillary electrophoresis of carboxylated carbohydrates IV. Adjusting the separation selectivity of derivatized carboxylated carbohydrates by controlling the electrolyte ionic strength at subambient temperature and in the absence of electroosmotic flow, *Journal of Chromatography A* (1997), 792, 75-82.
- Meisel H. et FitzGerald R.J.**, Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* (2003), 9, 1289-1295.
- Meisel H. et Frister H.**, Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein, *Journal of Dairy Research* (1989), 56, 343-349.
- Meisel H.**, Multifunctional peptides encrypted in milk proteins, *Biofactors* (2004), 21, 55-61.
- Meister W., Birch-Hirschfeld E., Koban M., Schilken U., Kunze G., Blasig R. et al.**, In b-casomorphins and related peptides: Recent Developments, V Brantl and H Teschemacher Eds, VCH Weinheim (1994), 66-72.
- Metayer M., Langevin D., Mahi B.E. et Pinoche M.**, Facilitated extraction and facilitated transport of non-ionic permeants through ion-exchange membranes: influence of the stability of the permeant/carrier complexes, *J. Membr. Sci.* (1991), 61, 191-213.
- Metayer M., Legras M., Grigorichouk O., Nikonenko V., Langevin D., Labbé M., Lebrun L. et Shaposhnik V.**, Facilitated transport of α -alanine and phenylalanine through sulfonic cation-exchange membranes, *Desalination* (2002), 147, 375-380.
- Ndiaye N., Pouliot Y., Saucier L., Beaulieu L. et Bazinet L.**, Electroseparation of bovine lactoferrin from model and whey solutions, *Separation and Purification Technology* (2010), 74, 93-99.
- Newman J.**, *Electrochemical Systems*, 2nd Edition (1991), Prentice-hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.
- Oda Y., Yawataya T.**, Neutrality-disturbance phenomenon of membrane-solution systems, *Desalination* (1968), 5, 129-138.
- Ogle D., Sheehan M., Rumbel B., Gibson T. et Rylatt D.B.**, Design of a new, twelve-channel electrophoretic apparatus based on the Gradiflow technology, *Journal of Chromatography A* (2003), 989, 65-72.
- Peers A.M.**, General discussion, *Discussions of The Faraday Society* (1956), 21-24.
- Perez Espitia P.-J., Ferreira Soares N-F., dos Reis Coimbra J-S., de Andrade N-J., Renato Souza Cruz R. et Alves Medeiros E-A.**, Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food, *Food Science and Food Safety* (2012), 11, 187-204.
- Pihlanto-Leppälä A.**, Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends in Food Science & Technology* (2000), 11, 347-356.
- Pihlanto-Leppäilii A., Akkanen S. et Korhonen H-J.**, ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry* (2008), 109, 1004-1012.
- Poulin J.F., Amiot J. et Bazinet L.**, Impact of feed solution flow rate on peptide fractionation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, *J Agricul Food Chem* (2008), 56, 2007-2011.

- Poulin J.F., Amiot J. et Bazinet L.**, Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electro dialysis with ultrafiltration membrane, *Journal of Biotechnology* (2006), 123, 314-328.
- Poulin J-F., Amiot J. et Bazinet L.**, Improved peptide fractionation by electro dialysis with ultrafiltration membrane: Influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength. *Journal of Membrane Science* (2007), 299, 83-90.
- Pouliot Y., Gauthier S.F. et Heureux J.**, Effect of peptide distribution on the fractionation of whey protein hydrolysates by nanofiltration membranes, *Lait* (2000), 80, 113-122.
- Pouliot Y., Wijers M.C., Gauthier S.F. et Nadeau L.**, Fractionation of whey protein hydrolysates using charged UF/NF membranes. *J Memb Sci* (1999), 158, 105-114.
- Pownall T.L., Udenigwe C.C. et Aluko R.E.**, Effects of cationic property on the in vitro antioxidant activities of pea protein hydrolysate fractions, *Food Res Int* (2011), 44, 1069-1074.
- Radovich J.M. et Behnam B.**, Concentration ultrafiltration and diafiltration of albumin with an electric field, *Separ. Sci. Technol.* (1983), 18, 215-222.
- Recio I. et Visser S.**, Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane, *Journal of Chromatography A* (1999), 831, 191-201.
- Reynolds E-C.**, Production of phosphopeptides from casein. US20026448374, 2002.
- Rios G.M., Rakotoarisoa H. et Tarado de la Fuente B.**, Basic transport mechanisms of ultrafiltration in the presence of an electric field, *J. Membrane Sci.* (1988), 38, 147-159.
- Robinson C.W., Siegel M.H., Condemine A., Fee C., Fahidy T.Z. et Glick B.R.**, Pulsed-electric-field crossflow ultrafiltration of bovine serum albumin, *J. Membrane Sci.* (1993), 80, 209-220.
- Roblet C., Doyen A., Amiot J. et Bazinet L.**, Impact of pH on ultrafiltration membrane selectivity during electro dialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) purification of soy peptides from a complex matrix, *Journal of Membrane Science* (2013), 435, 207-217.
- Roblet C., Doyen A., Amiot J., Pilon G., Marette A. et Bazinet L.**, Enhancement of glucose uptake in muscular cell by soybean charged peptides isolated by electro dialysis with ultrafiltration membranes (EDUF): Activation of the AMPK pathway, *Food Chemistry* (2014), 147, 124-130.
- Roualdes S., Kourda N., Durand J. et Pourcelly G.**, Plasma-grafted PVDF polymers as anion exchange membranes for the electrotransport of Cr(VI). *Desalination* (2002), 146, 273-278.
- Roux S., Zekri E., Rousseau B., Paternostre M., Cintrat J.C. et Fay N.**, Elimination and exchange of trifluoroacetate counter-ion from cationic peptides: a critical evaluation of different approaches, *Journal of Peptide Science* (2008), 14, 354-359.
- Rubinstein I., Shtilman L.**, Voltage against current curves of cation exchange membranes, *J. Chem. Soc.* (1979), 75, 231-246.
- Rubinstein I., Staude E. et Kedem O.**, Role of the membrane surface in concentration polarization at ion-exchange membrane, *Desalination* (1988), 69, 101-114.
- Rubinstein I., Warshawsky A., Schechtman L., Kedem O.**, Elimination of acid-base generation (“water-splitting”) in electro dialysis, *Desalination* (1984), 51, 55-60.

Ruckenstein E. et Zeng X., Albumin separation with Cibacron Blue carrying macroporous chitosan and chitin affinity membranes, *Journal of Membrane Science* (1998), 142, 13-26.

Saksena S. et Zydney A.L., Effect of solution pH and ionic strength on the separation of albumin from immunoglobulins (IgG) by selective filtration, *Biotechnol. Bioeng.* (1994), 43, 960-968.

Sandeaux J., Sandeaux R., Gavach C., Grib H., Sadat T., Belhocine D. et Mameri N., Extraction of amino acids from protein hydrolysates by electrodialysis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71 (1998), 267-273.

Schlimme E. et Meisel H., Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects, *Nahrung.* (1995), 39, 1-20.

Seifu Manenda M., Separation of Bioactive Peptides by Electrodialysis with Ultrafiltration Membranes: Membrane Characteristics, Ex-situ and In-situ Digestion and Their Impact on Peptide Migration, Dissertation for obtaining the Master degree in Membrane Engineering (2013).

Shaposhnik V.A. et Eliseeva T.V., Barrier effect during the electrodialysis of ampholytes, *Journal of Membrane Science* (1999), 161, 223-228.

Shaposhnik V.A., Zubets N.N, Strygina I.P. et Mill B.E., High demineralization of drinking water by electrodialysis without scaling on the membranes, *Desalination* (2002), 145, 329–332.

Shin Z-I., Yu R., Park S-A., Chung D-K., Ahn C-W., Nam H-S., Kim K-S. et Lee H-J., His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2001), 49, 3004-3009.

Simons R., Electric field effects on proton transfer between ionizable groups and water in ion exchange membranes, *Electrochim. Acta* (1984), 29, 151.

Simons R., Water splitting in ion exchange membranes, *Electrochim. Acta* (1985), 30, 275-282.

Smaghe F., Mourgues J., Escudier J.L., Conte T., Molinier J. et Malmay C., Recovery of calcium tartrate and calcium malate in effluents from grape sugar production by electrodialysis. *Bioresource Technology* (1992), 39, 185-189.

Smoluchowski von M., Über den Begriff des Zufalls und den Ursprung der Wahrscheinlichkeitsgesetze in der Physik, *Z. Phys. Chem.* (1918), 6, 253-263.

Soulet N., Roux-de Balmann H. et Sanchez V., Continuous flow isoelectric focusing for purification of proteins, *Electrophoresis* (1998), 19, 1294-1299.

Strathmann H., Membrane separation processes, *Journal of Membrane Science* (1981), 9, 121-189.

Sung M., Huang C-P., Weng Y-H., Lin Y-T. et Li K-C., Enhancing the separation of nano-sized particles in low-salt suspensions by electrically assisted cross-flow filtration, *Separation and Purification Technology* (2007), 54, 170-177.

Suwal S., Roblet C., Doyen A., Amiot J., Beaulieu L., Legault J., Bazinet L., Electrodialytic separation of peptides from snow crab by-product hydrolysate: Effect of cell configuration on peptide selectivity and local electric field, *Separation and Purification Technology* (2014), 127, 29–38.

- Tanaka Y.**, Concentration polarization in ion-exchange membrane electro dialysis the events arising in a flowing solution in a desalting cell, *Journal of Membrane Science* (2003), 216, 149-164.
- Tanaka Y.**, Water dissociation in ion-exchange membrane electro dialysis, *Journal of Membrane Science* (2002), 203, 227-244.
- Tanaka Y.**, Water dissociation reaction generated in an ion exchange membrane, *Journal of Membrane Science* (2010), 350, 347-360.
- Timmer J.M.K. et van der Horst H.C.**, Whey processing and separation technology: State-of-the-art and New developments, Proceedings of the second international Whey Conference held in Chicago, USA, 27–29 October 1997, International Dairy Federation, Brussels.
- Timmer J.M.K., Speelmans M.P.J. et van der Horst H.C.**, Separation of amino acids by nanofiltration and ultrafiltration membranes, *Separ. Purif. Technol.* (1998), 14, 133-144.
- Traxler J.W.**, Amino acid separation process, U.S. Patent. 3051640, Filed 02.09.1959, Patented 28.08.1962.
- Tsuru T., Shutou T., Nakao S.I. et Kimura S.**, Peptide and amino acid separation with nanofiltration membranes, *Separ. Sci. Technol.* (1994), 29, 971-984.
- Udenigwe C-C. et Aluko R-E.**, Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits, *Journal of Food Science* (2012), 71, 11-24.
- Van Nunen C.A.P.M.**, Design of a large scale membrane-electrophoresis module for separation of proteins, Dissertation Thesis, Eindhoven University of Technology (1997), Eindhoven, The Netherlands.
- Vanhoute M., Firdaous L., Bazinet L., Froidevaux R., Lecouturier D., Guillochon D. et Dhulster P.**, Effect of haem on the fractionation of bovine haemoglobin peptic hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes, *Journal of Membrane Science*, (2010), 365, 16-24.
- Xie Z., Huang J., Xu X. et Jin Z.**, Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate, *Food Chemistry* (2008), 111, 370-376.
- Yamamoto M., Akino A. et Takano T.J.**, Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790, *Dairy Sci.* (1994), 77, 917-922.
- Zabolotskii V.I., Chermit R.Kh., Sharafan M.V.**; Mass transfer mechanism and chemical stability of strongly basic anion-exchange membranes under overlimiting current conditions, *Russian Journal of Electrochemistry* (2014), 50, 38-45.
- Zabolotskii V.I., Gnusin N.P., Yel'nikova L.F. et Blednich V.M.**, The investigation of the process of the deep desalination of amino acids of mineral impurities by electro dialysis with ion exchange membranes, *Zhurn. Prikl. Khimii* (1986), 59, 140-145.

Résumé : L'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF) est une technique de séparation innovante, particulièrement performante pour le fractionnement sélectif de peptides bioactifs à partir d'hydrolysats enzymatiques. Cependant, les mécanismes de séparation des peptides en EDUF n'ont pas été parfaitement élucidés en raison du caractère complexe des mélanges peptidiques générés par hydrolyse enzymatique. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier la séparation de mélanges peptidiques modèles afin d'identifier les mécanismes régissant la séparation de peptides. Deux peptides synthétiques anionique et cationique ont été sélectionnés. Avant leur séparation par électrodialyse, les deux peptides ont été caractérisés en termes de mobilité électrophorétique, ce qui nous a permis de définir des conditions optimales de migration. Ainsi, un pH de 7 et une force ionique de 0,5 g/L de KCl ont été retenus lors des séparations électrodialytiques. Les résultats de séparation de solutions simples puis de mélanges montrent que, dans les conditions opératoires utilisées, les phénomènes limitant le transfert des deux peptides en EDUF sont essentiellement dus à la dissociation de l'eau dans le cas du peptide anionique et au colmatage membranaire dans le cas du peptide cationique. En effet, il a été montré que la dissociation de l'eau provoquait un « effet circulation » du peptide anionique, ce qui a bloqué son électromigration. Un ajout de KCl a été effectué dans le but d'augmenter la conductivité du système. Ceci a permis de ralentir la dissociation de l'eau et par conséquent de restaurer le flux initial du peptide anionique. En revanche, l'ajout de KCl n'a pas eu d'effet sur la migration du peptide cationique. Un colmatage important de la membrane échangeuse de cations au cours de l'électrodialyse par ce dernier explique ce phénomène. L'étude confirme par ailleurs que le transfert peptidique dans ce procédé est régi essentiellement par électromigration.

Mots-clés : Peptides modèles ; Mobilité électrophorétique ; Electrodialyse avec membranes d'ultrafiltration (EDUF) ; Migration ionique ; Migration peptidique ; Dissociation de l'eau.

Summary: Electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF) is an innovative and performant separation technique, particularly used for the selective bioactive peptide fractionation from enzymatic hydrolysates. However, considering the solution mixture complexity used, the peptide separation mechanisms in EDUF process remain unclear. The purpose of this thesis was to study a peptides models mixture separation in order to identify the peptides separation mechanisms in EDUF process. Both anionic and cationic synthetic peptides were selected. First, the anionic and cationic peptides were characterized in terms of electrophoretic mobility. For both peptides, electrophoretic mobility was measured in order to define the optimal conditions for their migration. Therefore, pH 7 and ionic strength of 0.5 g/L were chosen as experimental conditions during electrodialysis. Furthermore, peptide electro-dialytic separation results have showed, under the operating conditions used, the important role played by water dissociation on anionic peptide and membrane fouling on cationic peptide electromigration. Indeed, it has been shown that the water dissociation caused anionic peptide "circulated effect" and blocked its electromigration. KCl addition was performed in order to increase the system conductivity and to slow down water splitting, which led to a restore of the anionic peptide initial flux. In contrast, the water dissociation did not affect the cationic peptide electromigration. An important cation exchange membrane fouling caused by the cationic peptide explain this phenomena. The study also confirms that the peptide transfer in EDUF is mainly governed by electromigration.

Keywords: Models peptides solutions; Electrophoretic mobility; Electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF); Ionic migration; Peptide migration; Water dissociation.