

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة العليا للعلوم البيولوجية بوهران
Ecole Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biologie Moléculaire

Séparation et Purification de la Sérum Albumine Bovine (BSA)

Présenté par :

BOUZID DAHOU Khatir
OULED BOUZIANE Abdelkader

Soutenu publiquement le : 31/ 08/ 2020

Devant le jury :

Mr BABA HAMED Mohammed Bey	Pr	ESSB Oran	Président
Mme HADDI Abir	MAA	ESSB Oran	Encadreur
Mme BOUGHRARA Wefa	MCA	ESSB Oran	Examinatrice
Mme CHERIFI ILIAS Wassila	MAB	ESSB Oran	Examinatrice

Année universitaire : 2019/2020

Remerciement

En préambule à ce mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui nous aide et qui nous a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

Nos vifs remerciements vont aux membres du jury ;

-Monsieur le président BABA HAMED M.B pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant de scruter notre travail et de l'enrichir par ses propositions.

-Nos sincères remerciements vont également aux les deux examinatrices Madame BOUGHRARA W et Madame CHERIFI ILIAS W pour leur aide, leur disponibilité, leurs compétences scientifiques, leur soutien et leur gentillesse.

Nous tenons à remercier notre encadreur Madame HADDI A, pour son soutien, ses conseils judicieux et sa grande bien vaillance durant l'élaboration de ce travail.

Nos remerciements s'étendent également à tous nos enseignants durant les années des études, et au corps professoral et administratif de l'école supérieure en sciences biologique d'Oran, l'école supérieure des sciences agronomiques de Mostaganem et la classe préparatoire de l'Université de batna1, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous remercions nos très chers parents pour leur amour, leurs encouragements, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui nous permis de réaliser les études que nous voulons et par conséquent ce mémoire et tous les membres des familles BOUZID DAHOU et OULED BOUZIANE.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci à tous et à toutes.

Table des matières

I. Introduction	1
II. Revue Bibliographique	
II.1. Les protéines plasmatiques	3
II.2. L'albumine	3
II.2.1. Synthèse de l'albumine	3
II.2.2. Sérum albumine bovine	3
II.2.2.1. Structure primaire	3
II.2.2.2. Structure secondaire	5
II.2.2.3. Structure tertiaire	5
II.2.3. Rôle biologique	5
II.2.3.1. Régulation de la pression osmotique	5
II.2.3.2. Transport plasmatique et détoxification	7
II.2.4. Application de l'albumine	7
II.3. Procédés d'obtention de l'albumine	7
II.3.1. Méthode de fractionnement plasmatique avec l'alcool éthylique	7
II.3.1.1. Méthode de Cohn combinée aux techniques chromatographies	8
II.3.1.2. Méthode du choc thermique	8
II.3.2. Méthodes de précipitation	9
II.3.2.1. Précipitation par affinité	9
II.3.2.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium combinée à la chromatographie en phase liquide.	9
II.3.2.3. Précipitation par l'acide trichloroacétique	9
II.3.2.4. Chromatographie sur colonne pour la purification de la BSA	9
II.3.2.4.1. Chromatographie sur membrane échangeuse d'ions (MEI)	10
II.3.2.4.2. Chromatographie en lit mobile simulé (SMB)	10
II.3.2.4.3. Chromatographie d'exclusion stérique (SXC)	10
II.3.2.4.4. Chromatographie d'adsorption à lit élargi	11
II.3.2.4.5. Chromatographie d'affinité	11
II.4. Ultrafiltration	11
II.5. Inactivation virale	11
II.5.1. Chaleur sèche	13
II.5.2. Pasteurisation	13
II.5.3. Traitement par solvant-détergent	13
II.5.4. Nanofiltration	13

II.6. L'albumine : production, besoins et déficits	13
--	----

III. Présentation du Projet

III.1. Description de l'entreprise	14
III.2. Objectif	14
III.3. Emplacement	14
III.4. Heures d'ouverture	14
III.5. Réalisation du projet	14
III.6. Fournisseurs	15
III.7. Gestion	15
III.8. Montage financier	15
III.9. Plan Marketing	15
III.10. Analyse SWOT	16
III.11. Coût du projet	17
III.12. Le prix final	18

IV. Matériels et Méthodes

IV.1. Produits chimiques utilisées	20
IV.2. Echantillonnage	20
IV.3. Obtention et conservation du plasma	20
IV.4. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford	20
IV.4.1. Principe	20
IV.4.2. Mode opératoire	21
IV.5. Extraction de l'albumine : Fractionnement plasmatique	21
IV.5.1. Principe	21
IV.5.2. Mode opératoire	21
IV.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS	23
IV.6.1. Principe	23
IV.6.2. Mode opératoire	23
IV.7. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)	23
IV.7.1. Principe	23
IV.7.2. Mode opératoire	24
IV.8. Elimination et inactivation virale	26
IV.9. Lyophilisation	26

V. Résultats et Discussion

V.1. Concentration des protéines totales	27
V.2. Révélation des bandes protéiques	29
V.3. Analyse de la BSA par RP-HPLC	30
V.4. BSA lyophilisée	30
VI. Conclusion	33
VII. Références Bibliographiques	34
VIII. Annexes	40
Annexe 1 : composition en acides aminés de la BSA	40
Annexe 2 : composition atomique de la BSA	40

Liste des figures

Figure 1 : Synthèse de l'albumine	4
Figure 2 : Modèle de la SAH	6
Figure 3 : Structure de l'albumine sérique sous la forme N, F et E	6
Figure 4 : Fractionnement de plasma selon la Méthode de Cohn et al	22
Figure 5 : Schéma d'un profil électrophorétique de la BSA purifiée et de la BSA commerciale ...	29
Figure 6 : BSA lyophilisée	30

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de la BSA	4
Tableau 2 : Pourcentage des principales protéines dans différentes fractions plasmatiques	8
Tableau 3 : Méthodes de purification de l'albumine	12
Tableau 4 : Matériels de réalisation de projet	17
Tableau 5 : L'amortissement des matériels	18
Tableau 6 : Coût du produit	18
Tableau 7 : Composition du réactif de Bradford	21
Tableau 8 : Composition de tampon de Laemmli	24
Tableau 9 : Composition des gels de concentration et de séparation	25
Tableau 10 : Composition du tampon de migration	25
Tableau 11 : Composition des solutions et de décoloration	26
Tableau 12 : Taux moyens des protéines totales, des albumines et des globulines	28

Liste des abréviations

ANSEJ : agence nationale de soutien à l'emploi des jeunes

BSA : sérum albumine bovine

CEI : chromatographie échangeuse d'ions

DSA : direction des services agricoles

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

g : symbole de gramme

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

IgA : immunoglobulines A

IgM : immunoglobulines M

IgG : immunoglobulines G

KDa : kilo dalton

MEI : chromatographie sur membrane échangeuse d'ions

MDS : médicaments dérivés du sang

nm : nanomètre

OVA : ovalbumine

PEG : polyéthylène glycol

pH : potentiel hydrogène

QSP : quantité suffisante pour

RP-HPLC : HPLC en phase inverse

SA : sérum albumine

SAH : sérum albumine humaine

SDS: dodécylsulfate de sodium

SMB : chromatographie en lit mobile simulé

SWOT : Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats

SXC : chromatographie d'exclusion stérique

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TCA : acide trichloroacétique

TFA : Acide trifluoroacétique

TR : temps de rétention

Tris : trisaminométhane

VHA : virus de l'hépatite A

% : symbole de pourcentage

Å : angström

°C : degré Celsius

Résumé

Pendant une longue période de temps, nombreux efforts ont été fournis pour purifier l'albumine ; une protéine présente en grande quantité dans le plasma sanguin et est connue pour ses nombreuses utilisations dans le domaine médical et celui de la recherche.

L'objectif de cette étude, est de mettre au point une procédure d'extraction et de purification en vue d'une éventuelle production de la sérum albumine bovine (BSA) en utilisant la méthode de Cohn combinée à une chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Pour répondre à cet objectif, un protocole expérimental suivant a été établi. Du sang bovin prélevé à partir d'une vache laitière dans des sacs en plastiques contenant un anticoagulant est conservé à 4 °C. Après centrifugation du sang, les protéines totales du plasma obtenu sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford.

L'extraction de l'albumine est ensuite réalisée par fractionnement à l'éthanol froid selon la méthode Cohn. L'extrait protéique est analysé par électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS, puis élué par RP-HPLC. L'élimination et l'inactivation virales peuvent être réalisées respectivement par nanofiltration et pasteurisation. En dernier le filtrat est lyophilisé pour avoir de l'albumine bovine sous forme de poudre.

La pandémie du Covid-19 et le confinement instauré dans le pays, ont fait que la réalisation de ce protocole nous ait été impossible. Nous nous pouvons alors que suggérer des résultats en se basant sur la littérature.

Nous pensons que le profil électrophorétique de l'extrait protéique obtenu par la méthode Cohn pourrait présenter outre la bande de la l'albumine, des bandes qui correspondent à d'autres protéines et que l'élution de ce dernier par RP-HPLC aboutirait à un produit hautement purifié qui se traduit par un chromatogramme montrant un seul pic qui correspond à la BSA.

Dans le cadre de la création d'une entreprise de production de la BSA, l'étude analytique des coûts de production de cette dernière au niveau national a permis de constater qu'elle serait moins chère qu'un produit importé. Une telle production permettrait un approvisionnement continu du produit avec de courts délais de livraison.

En dernier, nous concluons que l'extraction et la purification de la BSA par la méthode de Cohn combinée à une RP-HPLC permettrait d'avoir un produit hautement purifié et que la production de ce produit à grande échelle contribuerait au développement de l'économie nationale.

Mots clés : Sérum albumine bovine, Purification, Cohn, Production, RP-HPLC

Abstract

During a long time, many efforts have been made to purify albumin; a protein found in large quantities in the blood plasma and is known for its many uses in the medical and research fields.

The objective of this study is to develop an extraction and purification procedure for a possible production of bovine serum albumin (BSA) using Cohn's method combined with high performance liquid chromatography in reverse phase (RP-HPLC).

To reach this objective, the following experimental protocol has been established: Bovine blood taken from a dairy cow in plastic bags containing an anticoagulant is stored at 4 ° C. After blood centrifugation, plasma total proteins of plasma are assayed by the Bradford colorimetric method. Albumin extraction is then carried out by fractionation with cold ethanol according to the Cohn method. The protein extract is analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS, then eluted by RP-HPLC. Viral elimination and inactivation can be achieved by nanofiltration and pasteurization, respectively. Lastly, the filtrate is freeze-dried to obtain bovine albumin in the powder form.

The Covid-19 pandemic and the containment established in the country made it impossible for us to carry out this protocol. We can then only suggest results based on the literature.

We believe that the electrophoretic profile of the protein extract obtained by the Cohn method could present, in addition to the albumin band, bands which correspond to other proteins and that the elution of the latter by RP-HPLC would lead to a highly purified product represented in a chromatogram showing a single peak which corresponds to BSA.

Within the framework of the creation of a production company of BSA, the analytical study of the production costs of the latter at a national level revealed that it would be cheaper than an imported product. Such production would allow a continuous supply of the product with short delivery times

Finally, we conclude that the extraction and purification of BSA by the Cohn method combined with RP-HPLC allows to have a highly purified product and that the production of this protein on a large scale would contribute to the development of national economy.

Keywords: Bovine serum albumin, Purification, Cohn, Production, RP-HPLC

ملخص

منذ فترة طويلة من الوقت تم بذل العديد من الجهود لتنقية الألبومين ; بروتين موجود بكمية كبيرة في بلازما الدم كما يشتهر باستخداماته المتعددة في مجال الطب والبحث.

الهدف من هذه الدراسة هو تطوير إجراء استخلاص وتنقية لإنتاج محتمل لألبومين المصل البقري (BSA) باستخدام طريقة "كون" مقترنة بالكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في المرحلة العكسية (RP-HPLC).

لتحقيق هذا الهدف تم وضع بروتوكول تجريبي على النحو التالي : يتم تخزين الدم البقري المأخوذ من بقرة حلب في أكياس بلاستيكية تحتوي على مضاد التخثر عند 4 درجات مئوية. بعد الطرد المركزي للدم يتم قياس البروتينات الكلية للبلازما التي تم الحصول عليها بطريقة برادفورد اللونية.

بعد ذلك يستخرج الألبومين عن طريق التجزيء باستخدام الإيثانول البارد وفقاً لطريقة "كون". يتم تحليل مستخلص البروتين عن طريق الرحلان الكهربائي باستخدام جال عديد الأكريلاميد بوجود دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS-PAGE) , ثم يتم شطفه بواسطة الكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في المرحلة العكسية. يمكن القضاء على الفيروسات وتعطيلها عن طريق الترشيح النانوي والبسترة على التوالي. أخيراً يتم تجفيف المرشح للحصول على ألبومين البقر في شكل مسحوق.

إن وباء كورونا (Covid-19) وانتشاره في البلد جعل من المستحيل علينا تنفيذ هذا البروتوكول. و عليه فإننا في هذا العمل نطرح نتائج احتمالية مستنديين في ذلك على الدراسات المنجزة مسبقاً.

نعتقد أن نتيجة الرحلان الكهربائي لمستخلص البروتين الذي تم الحصول عليه بواسطة طريقة "كون" يمكن أن يقدم بالإضافة إلى حزمة الألبومين حزم تتوافق مع البروتينات الأخرى وأن شطف هذا الأخير بواسطة الكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في المرحلة العكسية سيؤدي إلى منتج عالي النقاء ينتج عنه كروماتوجراف يظهر ذروة واحدة تتوافق مع ألبومين المصل البقري.

في إطار إنشاء شركة إنتاج ألبومين المصل البقري، كشفت الدراسة التحليلية لتكاليف إنتاج هذا الأخير على المستوى الوطني أنها ستكون أرخص من منتج مستورد. سيسمح هذا الإنتاج بتوريد مستمر للمنتج مع أوقات تسليم قصيرة.

أخيراً نستنتج أن استخراج وتنقية ألبومين المصل البقري بطريقة "كون" مقترنة بالكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في المرحلة العكسية يتيح الحصول على منتج عالي النقاء وأن إنتاج هذا المنتج على نطاق واسع سيساهم في تطوير الإقتصاد وطني.

الكلمات المفتاحية : ألبومين المصل البقري, تنقية, طريقة "كون", إنتاج, الكروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء في

المرحلة العكسية

INTRODUCTION

La sérum albumine bovine (BSA) est une protéine globulaire, très similaire à la sérum albumine humaine (HSA) en termes de structure et de propriétés chimiques. Elle est largement utilisée dans divers applications biochimiques et immunologiques en raison de sa haute abondance dans le plasma bovin, sa stabilité structurelle et son interaction stabilisante avec la plupart des protéines (Peters, 1975 ; Peters, 1985 ; Tanka et *al.*, 2001). L'Albumine est utilisée dans le domaine médicale en tant que vecteur de plusieurs molécules dans les systèmes d'administration de médicaments, comme un agent à usage diagnostique principalement pour les tests hématologiques (Peters, 1985 ; Tanka et *al.*, 2001), et en tant qu'une protéine stabilisante pour diluer les anticorps. Elle a été utilisée pour la première fois comme diluant du sérum anti-Rh en 1945 (Tanka et *al.*, 2001). Elle est utilisée également dans le domaine de la recherche comme agent bloquant dans divers essais immunologiques, dans les cultures cellulaire et microbienne ainsi que dans la recherche biochimique.

En raison de la fonction physiologique et biopharmaceutique de l'albumine, de nombreux efforts ont été fournis pour avoir de l'albumine purifiée, ceci date de la deuxième guerre mondiale où il y avait un besoin urgent d'avoir des substituts de plasma pour traiter les soldats blessés qui soient pratiques à stoker, à inventorier, à transporter et à administrer. De là, E. Cohn a développé une procédure de "fractionnement" plasmatique permettant d'avoir l'albumine dans la 5^{ème} et dernière fraction, d'ailleurs c'est la cause pour laquelle, l'albumine est souvent appelée « Fraction V » (Cohn et *al.*, 1946).

Cette méthode a prouvé son efficacité dans la production de l'albumine à grande échelle, cependant certains contaminants de la BSA préparée commercialement peuvent subsister tels que les nucléases et les immunoglobulines G (IgG). De ce fait, nombreux chercheurs et équipes ont essayé d'innover de nouvelles méthodes de production d'albumine.

De nos jours, la plupart des approches de purification de la BSA combinent la version originale ou modifiée de la méthode de Cohn (Chon et *al.*, 1946) avec plusieurs étapes supplémentaires, telles que les méthodes chromatographique; la chromatographie échangeuse d'ions est citée à titre d'exemple, la combinaison de deux méthodes se fait dans le but principal d'atteindre un degré de pureté élevé (Hao, 1979 ; Denizli, 2011 ; Tanka et *al.*, 1998). D'autres étapes viennent s'ajouter pour garantir la sécurité virale du produit final.

Actuellement, la production de la BSA dans le monde est assurée par des méga-entreprises internationales, ce qui insinue que toute BSA utilisée en Algérie est importée le plus souvent avec des coûts assez élevés et des délais de livraison assez lents. De ce fait et suite à la demande croissante de cette protéine, nous proposons, dans le cadre de projet de fin d'études, de créer une

start-up productrice de BSA dans le but de subvenir dans un premier temps aux besoins pédagogiques (universités et écoles).

Une start-up se distingue des autres projets entrepreneuriaux par son fort potentiel de croissance, ceci nous laisse penser que, dans un deuxième temps, une meilleure purification de la protéine permettra non seulement d'élargir notre marché cible (laboratoires de recherche) mais d'aller vers une production à grande échelle.

Ce travail a donc pour but l'extraction et la purification de l'albumine bovine en vue d'une éventuelle production locale, et ce en utilisant le fractionnement plasmatique à l'éthanol froid décrit par Cohn et *al.*, 1946 en combinaison avec une technique chromatographique hautement résolutive; la chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Revue bibliographique

II.1. les protéines plasmatiques

Le sang est un liquide composé d'environ 45% de cellules et de 55% de plasma, ce dernier est la partie liquide du sang obtenue après centrifugation.

Dans 1 litre de plasma, on trouve 900 g d'eau, environ 10 g de substances minérales et 90 g de substances organiques dont près de 80 g de protéines, ces protéines peuvent être séparées par technique électro-phorétique, on trouve notamment l'albumine, le fibrogène et les globulines (Mitchell, 1952 ; Scheraga *et al.*, 1961).

II.2. L'albumine

L'albumine est une protéine globulaire, elle est la protéine la plus abondante dans l'organisme, elle représente 60% des protéines circulantes.

Le nom d'albumine est tiré d'Albumen (remonte étymologiquement à Albus qui signifie « blanc ») (Fanali *et al.*, 2012). Il existe différents types d'albumine selon les espèces, on trouve l'ovalbumine (OVA), la sérum albumine humaine (HSA) et la sérum albumine bovine (BSA).

II.2.1. Synthèse de l'albumine

La synthèse de l'albumine se produit dans les cellules hépatocytaires sous forme de précurseurs ; la prépro-albumine puis la pro-albumine (Figure 1), elle n'est toutefois pas stockées dans le foie et est, une fois produite, sécrétée dans la circulation, sa demi-vie est d'environ 19 jours (Raoufinia *et al.*, 2016). L'albumine est synthétisée à raison de 9 à 12 g/jour, la capacité de cette synthèse peut cependant être augmentée en cas de pertes urinaires importantes (Peters, 1985 ; Peters, 1995).

II.2.2. Sérum albumine bovine

L'albumine bovine est très similaire à l'albumine humaine en termes de structure et de propriétés chimiques. Son poids moléculaire se situe entre 66300-69000 daltons (Tanka, 2001). Elle appartient à une famille de protéines incluant l'alpha-fetoprotéine, elle est la protéine la plus abondante du sérum bovin, avec un taux de 30 à 40 g/litre de sang (Carter & Ho, 1994 ; Min He & Carter, 1994). Ses propriétés physico-chimiques sont données dans le tableau 1.

II.2.2.1. Structure primaire

La BSA consiste en une seule et assez longue chaîne polypeptidique d'environ 582 résidus d'acides aminés (Brown, 1975). La composition de la BSA en acides aminés a été publiée pour la première fois par J.R. Brown en 1975 et révisée en 1990 par Hirayama *et al.* (annexe 1), sa composition en nombre d'atomes de carbone, d'oxygène, de soufre et d'azote est déduite à partir de sa composition en acides aminés (annexe 2).

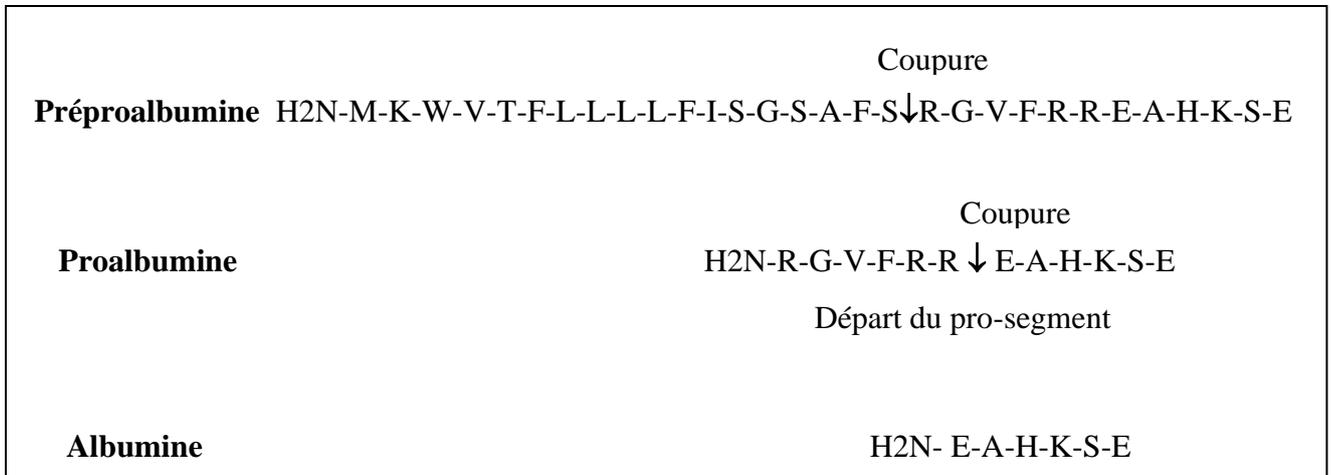


Figure 1 : Synthèse de l'albumine (El kadi, 2007)

*M: méthionine, K: lysine, W: tryptophane, V: valine, T: thréonine, F: phenylalanine, L: leucine
I: isoleucine, S: serine, G: glycine, A: alanine, R: arginine, E: glutamate, H: histidine
H2N: fonction amine*

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques de la BSA (Jaenicke & Lauffer, 1969 ; Peters, 1985 ; Sugio *et al.*, 1999)

Propriétés	Valeurs
Poids moléculaire (kDa)	66,5
Point isoionique	5,15
Masse volumique (g/cm ³) à pH7	1,36
Point isoélectrique	4,7
Charge totale à pH 7	-17

kDa : kilo dalton, g/cm³ : gramme par centimètre cube

La BSA présente une similitude de séquence de 76% avec l'albumine sérique humaine (HSA). La BSA diffère de la HSA au niveau de tryptophane, cette principale différence réside dans le fait que la BSA possède deux résidus tryptophane (T131 et T214), alors que la HSA n'en a qu'un seul (T214), la molécule contient peu de méthionine (4 pour BSA et 6 pour HSA) (Peters, 1995), une seule cystéine libre (cys34) (Min He & Carter, 1994) et des résidus chargés comme la lysine, l'arginine, l'acide glutamique (Peters, 1985). 34 résidus cystéine parmi 35 sont impliqués dans des ponts disulfure (Sugio et *al.*, 1999).

II.2.2.2. Structure secondaire

L'hélice α représente environ 70% de la structure secondaire de la SA et les feuillets β représentent 17%, dans les conditions normales (pH neutre), la structure possède 17 ponts disulfures qui lui donnent une stabilité remarquable, et la rendent ainsi très résistante à la dénaturation (Peters, 1985 ; Carter & Ho 1994).

II.2.2.3. Structure tertiaire

Les chercheurs supposent que la BSA et la HSA possèdent une structure tridimensionnelle très proche. La structure tridimensionnelle de la HSA a été déterminée par les Rayons X (6Å) pour la première fois dans l'espace en 1989 par une analyse cristallographie (Carter et *al.*, 1989), ensuite avec une résolution de 2,5Å par Sugio et *al.*, 1999 (Figure 2).

Ces protéines présentent une configuration presque sphérique en forme de cœur repliée de manière compacte (Brown, 1975). Une variation du pH peut cependant conduire à une isomérisation conformationnelle réversible de la protéine (Figure 3), affectant ainsi sa solubilité et sa viscosité intrinsèque (Bos et *al.*, 1989).

II.2.3. Rôle biologiques

L'albumine a diverses fonctions : fixer et transporter une multitude de ligands et débarrasser l'organisme de produits toxiques, elle peut s'associer de manière non covalente avec des molécules plus petites et avec des ions et elle possède quelques sites particuliers de fixation covalente de certaines substances (Petitpas et *al.*, 2001 ; Ghuman et *al.*, 2005).

II.2.3.1. Régulation de la pression osmotique

L'albumine maintient 80% de la pression osmotique du sang en empêchant la fuite de l'eau contenue dans le plasma vers les tissus grâce à sa taille, sa charge électrique élevée et sa capacité de liaison avec les amines (Carter & Ho, 1994). Elle a également un pouvoir tampon, limitant ainsi les variations de pH du sang, notamment lors de l'accumulation du gaz carbonique (Figge et *al.*, 1991).

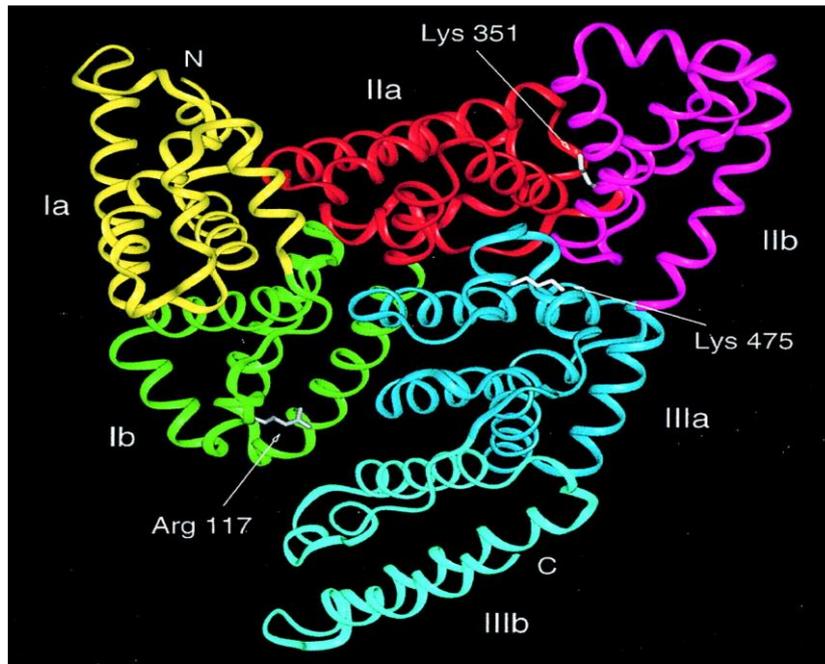


Figure 2 : Modèle de la HSA. Chaque domaine est d'une couleur différente, le N- et le C terminaux sont désignés par les lettres N et C. Les résidus Arg117, Lys351 et Lys475, sites de liaison pour les acides gras à longues chaînes, sont en blanc (Sugio *et al.*, 1999).

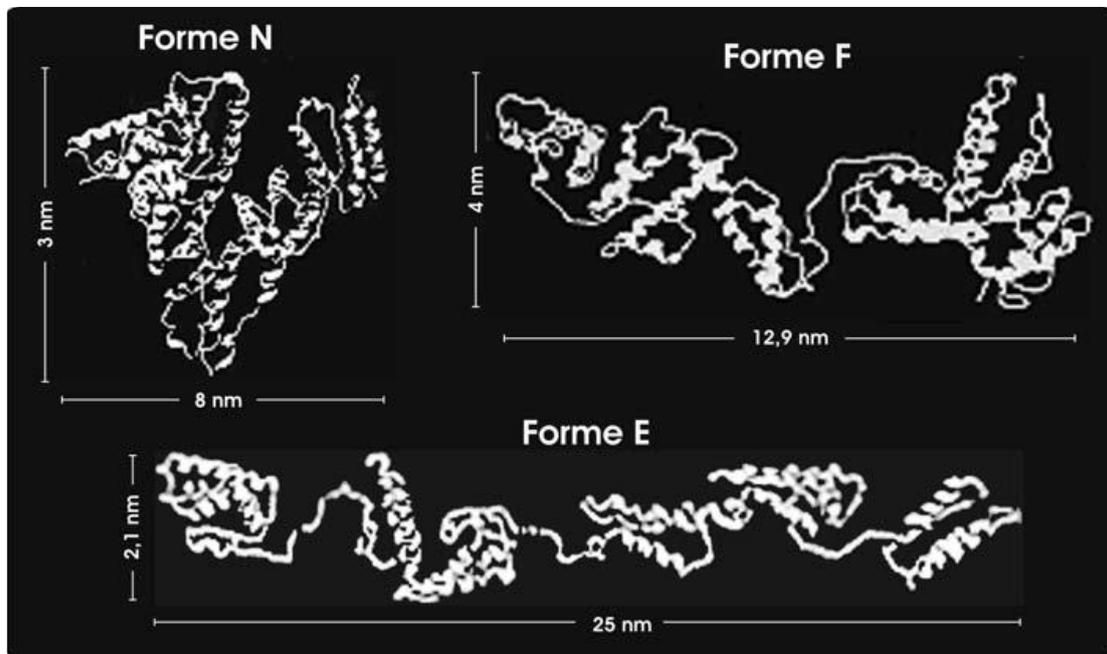


Figure 3 : Structure tertiaire de l'albumine sérique sous sa forme N, F et E (Young, 1955).

N: Normal, **F:** Fast, **E:** expanded

II.2.3.2. Transport plasmatique et détoxification

L'albumine joue également un rôle important dans le transport d'une très grande variété de substances endogènes et exogènes, dont certaines peuvent être toxiques pour l'organisme lorsqu'elles sont à l'état libre, la SA contribue ainsi à la détoxification de l'organisme en se liant avec certains métabolites (Olsen *et al.*, 2004).

II.2.4. Applications de l'albumine

L'albumine sérique est utilisée dans le cadre de divers essais cliniques tels que la restauration du volume sanguin, la gestion des brûlures aiguës et d'autres situations associées à l'hypovolémie. L'albumine sérique est considérée comme un biomarqueur noble pour le foie, ainsi que pour plusieurs maladies comme les troubles inflammatoires, les tumeurs cérébrales, les maladies rénales, les maladies à risque cardiovasculaire et le contrôle de la glycémie.

En outre l'albumine a différentes applications dans le domaine de la recherche, elle est utilisée dans la cryopréservation, comme stabilisateur de certaines protéines et comme complément dans la culture cellulaire (Raoufinia *et al.*, 2016). Elle est également utilisée comme agent bloquant dans les blots ou des applications ELISA. Les albumines humaines et bovines contiennent 16% d'azote et sont souvent utilisées comme étalons (dans les études d'étalonnages) (Scott & Eagleson, 1988).

II.3. Procédés d'obtention de l'albumine

II.3.1. Méthode de fractionnement plasmatique avec l'alcool éthylique

Il y a environ 75 ans, Cohn et ses collègues ont mis au point une méthode de purification des protéines en utilisant pour la première fois la technique de fractionnement du plasma aboutissant à la formation de 5 fractions (Tableau 2). Cette approche est basée sur la différence de solubilité de l'albumine avec d'autres protéines plasmatiques. Par rapport aux autres protéines plasmatiques, l'albumine sédimente à un pH plus faible et à une concentration d'éthanol plus élevée. Dans cette méthode, il existe cinq systèmes disponibles pour la séparation des protéines plasmatiques. Les principes de base comprennent l'alcool éthylique (8-40%), la température (-3 à -10 °C), le pH (4,5-7,2), la concentration de protéines (5,1-,8%) et la force ionique (0,14-0,01) (Cohn *et al.*, 1946 ; Buchacher & Iberer, 2005; Denizli, 2011). La séparation des protéines est le résultat de l'augmentation de la concentration d'alcool éthylique qui se produit dans chaque fraction, de sorte que l'albumine sera visible dans la dernière fraction (Fraction V). La méthode convient à la production à grande échelle et industrielle. Mais cette méthode présente également certains inconvénients : elle ne permet pas de produire un produit de grande pureté, une dénaturation des protéines peut se produire et cette méthode nécessite des zones froides (Denizli, 2011).

Tableau 2. Pourcentage des principales protéines dans différentes fractions plasmatiques

Fraction	Protéine %	Composantes
I	5-10	Fibrinogène Facteur de coagulation VIII
II+III	25	IgG IgA IgM
IV-1	5-10	α -and β -globulines α 1-antitrypsine Antithrombine III
IV-4	5-10	Composants du complément Céruleplasmine Haptoglobine Transferrine
V	50-60	Albumine

IgG : immunoglobulines G, IgA : immunoglobulines A, IgM : immunoglobulines M

II.3.1.1 Méthode de Cohn combinée aux techniques chromatographiques

La méthode de Cohn a été modifiée par Oncley et *al.* en 1949 et Kistler-Nitschman et *al.* en 1962 en la combinant à une chromatographie échangeuse d'ions (CEI) afin d'améliorer la pureté de l'albumine. Pour répondre à ce même objectif, en 1996 la division Bioplasma de CSL Limited, Victoria, Australie a combiné à une chromatographie en phase liquide, le produit qui en résulte a un degré de pureté d'environ 99%. De ce fait et en addition aux avantages de la méthode de Cohn, cette méthode a été considérée comme une méthode intégrée pour la purification et la production des protéines plasmatiques (Tanka et *al.*, 1998)

II.3.1.2. Méthode du choc thermique

Comme l'albumine est stable dans la fluctuation thermique par rapport aux autres protéines du plasma, elle peut être purifiée par la méthode du choc thermique. Ainsi, en utilisant un agent stabilisant du pH (pH 5), la protéine d'albumine résiste à l'augmentation de la température jusqu'à 60 °C, tandis que les autres protéines du sérum sont dénaturées et précipitées en solution.

L'albumine est ensuite concentrée par précipitation et ultrafiltration avec une pureté d'environ 98 % (Denizli, 2011).

II.3.2. Méthodes de précipitation

II.3.2.1. Précipitation par affinité

Cao et Ding (2013) ont fait état d'un procédé de précipitation par affinité pour la purification des protéines plasmatiques. Il est réalisé en utilisant des polymères solubles-insolubles de manière réversible combinés à un ligand d'affinité qui dépend des caractéristiques du polymère telles que la température, le pH et la réponse à la lumière. Un des avantages de cette nouvelle méthode est la production d'une albumine d'une pureté tolérable en une seule étape (Cao & Ding, 2013).

II.3.2.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium combinée à la chromatographie en phase liquide

Une autre méthode de purification de l'albumine est la précipitation par le sulfate d'ammonium combinée à la chromatographie liquide, qui permet d'obtenir environ plus de 90 % de la protéine purifiée (Odunuga & Shazhko, 2013). Dans cette méthode, l'albumine est séparée des immunoglobulines par 50 % de sulfate d'ammonium. Ensuite, les lipides sont éliminés à l'aide d'acétone glacée. En dernier les autres protéines (en particulier la transferrine qui le principal contaminant), la chromatographie échangeuse d'ions et la chromatographie d'exclusion de taille sont utilisés (Odunuga & Shazhko, 2013).

II.3.2.3. Précipitation par l'acide trichloroacétique

Bien que de nombreuses protéines sériques peu abondantes jouent un rôle important dans la détection des maladies en tant que biomarqueur, certaines d'entre elles, comme l'albumine qui existe en grande quantité, constituent un obstacle à la détection. Afin d'éliminer l'albumine du plasma pour la détection des maladies. Chen et *al.* ont développé en 2005 une méthode de précipitation utilisant l'acide trichloroacétique (TCA)/acétone, et affirment que leur méthode peut être une méthode de purification de l'albumine rapide et à grande échelle (Chen et *al.*, 2005). L'albumine isolée par cette méthode semble conserver sa structure native, ainsi que d'autres caractéristiques telles que la solubilité, la stabilité à la température, la mobilité électrophorétique, les caractéristiques de cristallisation et le comportement immunologique (Chen et *al.*, 2005).

II.3.2.4. Chromatographie sur colonne pour la purification de la SA

Bien que la méthode de fractionnement de l'alcool éthylique soit utilisée dans l'industrie pour le fractionnement des protéines sanguines, la pureté n'est pas suffisante (Denizli, 2011). Pour atteindre cet objectif, il existe des techniques de chromatographie variables, dont certaines sont parmi les plus répandues.

II.3.2.4.1. Chromatographie sur membrane échangeuse d'ions (MEI)

La CEI est largement utilisée pour la production d'albumine (Vasileva et *al.*, 1981 ; Kovacs & Guttman, 2013) et d'autres protéines. Cependant certaines des limites des méthodes conventionnelles pour la chromatographie sont à noter, telles que le temps de traitement retardé, les faibles débits, etc. Pour faire face à ces limitations, la nouvelle méthode de chromatographie sur membrane échangeuse d'ions (MEI) utilisant des adsorbants améliorés a été développée. Cette technique présente certains avantages, tels que des rendements de séparation élevés grâce à des temps de diffusion plus courts (Reif & Freitag, 1993; Camperi et *al.*, 1999), une réduction de l'utilisation de tampons (Phillips et *al.*, 2005) , une méthode simple sans matériel complexe. Malgré ces avantages, la membrane coûteuse et la faible efficacité de cette technique à des fins industrielles représentent un inconvénient majeur (Knudsen et *al.*, 2001 ; Charcosset, 2006).

II.3.2.4.2. Chromatographie en lit mobile simulé (SMB)

Il s'agit d'une méthode multi-colonnes basée sur la chromatographie en phase inversée dans laquelle la consommation de solvant est réduite. Parmi les avantages de cette méthode, les plus remarquables sont l'efficacité accrue (due au contre-courant entre les phases solide et liquide), une plus grande pureté et un rendement plus élevé. Néanmoins, elle présente deux inconvénients : d'une part, le nombre de fractions n'est pas supérieur à deux et chaque flux de produit contient plus d'un composé. D'autre part, la limitation du mode d'élution isocratique est un problème majeur. Pour surmonter ce problème, la pression, le pH et d'autres facteurs peuvent être modifiés (Imamoglu, 2002).

II.3.2.4.3. Chromatographie d'exclusion stérique (SXC)

La nouvelle méthode de purification des grandes protéines est la chromatographie d'exclusion stérique (SXC) qui est basée sur la précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG) et qui est réalisée sur une colonne de monolithe de crogel (Wang et *al.*, 2014). Le PEG dans la phase mobile aide les protéines à se retenir sur la phase stationnaire hydrophile. En 2014, Wang et *al.* ont rapporté que les crogels sont très utiles pour la séparation des protéines (Wang et *al.*, 2014). L'avantage de la colonne monolithique cryogénique par rapport aux monolithes polyméthacryliques est d'avoir les grands pores d'environ 10-100 μm ce qui conduit à un débit élevé avec une faible contre-pression. De plus, la capacité de rétention est censée être supérieure à celle de la chromatographie par adsorption. Cette technique pourra purifier l'albumine et aussi les globulines avec une grande pureté à partir d'un échantillon de sérum bovin.

II.3.2.4.4. Chromatographie d'adsorption à lit élargi

En 2009, Lihme et *al.* ont développé un nouveau procédé de fractionnement contenant cinq étapes d'adsorption en lit élargi utilisant des billes d'agarose/carbure de tungstène modifiées à haute densité (Lihme et *al.*, 2009). Grâce à cette méthode, l'albumine a été purifiée jusqu'à 99 % de pureté après une étape de récupération utilisant des billes d'agarose-10 % de carbure de tungstène couplées à un ligand à mode mixte dans des conditions acides (pH 4,5). Cette méthode de chromatographie pourrait être une alternative applicable à la méthode de fractionnement du plasma.

II.3.2.4.5. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est un type de chromatographie liquide dans laquelle un agent biologique appelé ligand d'affinité est utilisé comme phase stationnaire dans la colonne. La chromatographie d'affinité a été introduite pour la première fois à des fins de purification par Cuatrecasas (Cuatrecasas et *al.*, 1968). Il existe différents types de ligands d'affinité tels que les protéines, les enzymes, les substrats ou inhibiteurs d'enzymes, les anticorps, les antigènes, les hormones, les colorants biomimétiques, etc. Selon l'objectif visé, le type de ligand sélectionné est immobilisé dans la colonne et un processus de purification supplémentaire est effectué après la liaison sélective (Hage et *al.*, 2012):

Les méthodes de purification de l'albumine sont résumées dans le tableau 3.

II.4. Ultrafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de séparation membranaire, elle est utilisée pour éliminer les composants de faible poids moléculaire comme les sels et l'alcool, et permet la concentration des solutions de protéines. Ce procédé a été appliqué dès le début des années 80 pour la production de l'albumine et d'autres protéines plasmatiques (Belhoucie, 2009).

II.5. Inactivation virale

Différents procédés physico-chimiques sont mis en œuvre pour garantir l'innocuité des produits purifiés en minimisant la dégradation et la perte de leurs activités. Ces procédés sont réalisés soit au cours des différentes étapes de préparation et de purification soit au terme de ces étapes.

Tableau 3. Méthodes de purification de l'albumine (Raoufinia et *al.*, 2016).

méthode	Pureté %	Avantages	Désavantages	Utilisation clinique	A grande échelle
Fractionnement plasmatique	96	Faible coût, Son accessibilité, Nature bactériostatique du procédé, L'éthanol est accessible et peu coûteux, Sécurité du produit thérapeutique	Dénaturation des protéines, Besoin de matières premières de haute qualité, Besoin de réservoirs réfrigérés	+	+
Cohn + LC	99	Faible coût, qualité du produit fabriqué supérieure à celle de la méthode Cohn, grande pureté, rendement élevé, sécurité du produit thérapeutique	Possibilité de dénaturation et/ou d'agrégation des protéines lors de l'ajout d'éthanol	+	+
Précipitation par affinité	93,6	Pureté tolérable, étape unique	Dénaturation des protéines	-	-
Choc thermique	98	Haute pureté	Dénaturation des protéines	+	+
Sulfate d'ammonium+ LC	N/D	Pureté suffisante, Convient à une approche majeure en laboratoire, Rendement en albumine : ≤ 40 g/litre de sérum	Ne convient pas à une approche clinique majeure	-	+
IEC	≤ 95	Rendement élevé, Capacité d'adsorption élevée, Meilleure reproductibilité, Récupération élevée, Pratique pour la production à grande échelle	Médias élevés, Coûts d'investissement et fuites de ligands, Interactions entre l'albumine et les sortants d'échange d'ions, Séparation lente	+	+
SMB	96	Une efficacité accrue Une pureté et un rendement plus élevés	Complexité accrue, coûts de maintenance plus élevés	-	-
Chromatographie d'affinité des ligands colorants	≈ 98	Pureté et rendement plus élevés, Séparation rapide, Spécificité moyenne	La capacité d'adsorption est faible, L'état de l'environnement est difficile, Régénération incomplète	-	-

LC : chromatographie liquide, IEC : chromatographie par échange d'ions, SMB : chromatographie sur lit mobile simulé, CH : chromatographie, N/D : non disponible.

II.5.1. Chaleur sèche

Cette technique est efficace vis-à-vis des virus enveloppés et du virus de l'hépatite A (VHA). C'est un chauffage des produits lyophilisés entre 60° et 100 °C allant de 30 minutes jusqu'à 96 heures (Belhoucie, 2009).

II.5.2. Pasteurisation

Après décongélation du plasma, ce dernier est additionné de différents stabilisants qui serviront de protecteurs des molécules plasmatiques durant l'étape de chauffage. Le mélange est ensuite chauffé durant 10 heures à 60°C sous agitation, après refroidissement, celui-ci est soumis à une dialyse par ultrafiltration pour reconcentrer le plasma au taux de protéines initiales et éliminer les stabilisants (Belhoucie, 2009).

II.5.3. Traitement par solvant-détergent

Technique de référence pour l'inactivation virale des virus enveloppés, elle consiste en une incubation de la solution protéique en présence d'un solvant organique et d'un détergent. Les agents chimiques utilisés sont ensuite éliminés par différentes séries de chromatographies, d'ultrafiltrations ou de précipitations (Belhoucie, 2009).

II.5.4. Nanofiltration

C'est une technique qui permet l'élimination des agents infectieux en fonction de leurs tailles en utilisant des filtres avec un diamètre de 15 à 50 nm (Belhoucie, 2009).

D'autres techniques d'inactivation virales peuvent être utilisées tels que le traitement par pH acide ou encore un traitement par des rayonnements laser.

II.6. L'albumine : production, besoins et déficits

Les données disponibles sur l'industrie des « produits plasmatiques » concernent essentiellement les médicaments dérivés du sang humain. Cependant très peu voir aucune donnée précise sur la production de l'albumine bovine n'est disponible, en effet les besoins en albumine bovine sont difficiles à déterminer et les niveaux de consommation sont extrêmement divers dans les pays industrialisés.

La production de l'albumine bovine est détenue par de grandes entreprises internationales telles que Sigma, Proliant Biologicals...etc. Actuellement, il n'existe aucun centre de fractionnement plasmatique (humain ou bovin) sur le territoire national, les pays avoisinants sont des pays dits « collecteurs de plasma » pour des pays « fractionneurs ».

Représentation du projet

Projet de production de la sérum albumine bovine
Présentation de l'entreprise « **BSA PRODUCTION** »

III.1. Description de l'entreprise

Au cours de notre étude à l'Ecole Supérieure en Sciences Biologique d'Oran (ESSBO), nous avons observé que plusieurs produits utilisés dans les ateliers sont importés avec un processus très lent et avec des coûts très chers. Nous nous sommes alors posés la question pourquoi on arrive pas à produire certains produits comme la BSA malgré la présence de la matière première (le sang). Étant conscients de l'importance de ce produit dans le domaine de la pédagogie et de la recherche et de l'absence de producteurs locaux et motivés par les formations et les journées de l'entrepreneuriat organisées au sein de l'école, nous avons eu l'idée de créer notre start-up afin de pouvoir satisfaire les besoins du marché national.

BSA PRODUCTION est une petite entreprise de notre création spécialisée dans la production de la sérum albumine bovine. Elle est basée sur la transformation de la matière première en produit fini.

L'activité de la société est la première au niveau national, elle est établie en coopération avec l'école dans le cadre de la recherche et le développement afin de bien bénéficier du savoir des chercheurs.

III.2. Objectif

« L'entreprise crée la richesse ». C'est l'objectif principal de notre start-up. La création de richesse ne se résume pas seulement à la génération de profit pour les actionnaires mais aussi la création de postes d'emplois directs et indirects suite à la collaboration avec d'autres acteurs économiques (Sociétés d'emballage, de transports, revendeurs...etc.), ainsi que l'ouverture de nouveaux marchés. Notre entreprise ne néglige pas la dimension humaine.

III.3. Emplacement

Locale privée (laboratoire situé dans la wilaya d'Oran).

III.4. Heures d'ouverture

De huit heures du matin à quatre heures de l'après-midi.

III.5. Réalisation du projet

La BSA est une protéine extraite du sérum bovin, largement utilisée en laboratoire d'analyses et de la recherche scientifique.

La réalisation de ce projet va se segmenter en deux phases; la première étant de produire la BSA en utilisant la méthode de Cohn comme simple méthode de fractionnement, ceci va donner un produit avec un degré de pureté assez élevé destiné principalement aux laboratoires pédagogiques. Cette

première phase est nécessaire dans un premier temps pour la maîtrise du processus de fractionnement et l'impossibilité de l'acquisition d'une HPLC.

Dans une deuxième phase, la méthode de Cohn sera combinée à une chromatographie (HPLC) ce qui va permettre l'obtention d'un produit hautement purifié destiné principalement aux laboratoires de la recherche scientifique et éventuellement d'analyses médicales.

Le produit est caractérisé par : la stabilité, l'absence d'effets dans nombreuses réactions biochimiques et coût raisonnable. Le produit est à conserver à 2-8°C à l'abri de la lumière.

III.6. Fournisseurs

L'activité de l'entreprise est réalisée en coopération avec les abattoirs et la Direction des services agricoles de la wilaya d'Oran (DSA) afin de fournir la matière primaire (sang des bovins).

III.7. Gestion

La gestion de ce projet se fera par une équipe jeune et ambitieuse alliant savoir scientifique et technique ainsi que commercial et marketing.

III.8. Montage financier

Une demande de financement d'un montant de 5000000 DA sera déposée auprès du dispositif de l'ANSEJ, nous allons opter pour un financement triangulaire.

La gestion financière dépend des coûts de démarrage, frais juridiques, frais d'assurance, salaire des employés, frais de publicité et de promotion et le reste des coûts.

III.9. Plan Marketing

Après étude de marché, nous avons constatés une forte demande de la BSA face à une absence totale de producteurs locaux, nous avons constatés aussi une lenteur administrative concernant la procédure de l'importation de ce produit. Nous avons donc mis en place un plan marketing afin de pouvoir écouler notre produit et gagner une part de marché.

Nous allons d'abord procéder à une campagne ciblée à travers l'organisation de journées et de séminaires visant principalement la communauté scientifique (Laboratoires et universités). Nous élargissons par la suite notre champ d'action en utilisant les réseaux sociaux, médias et affichages.

Pour gagner du terrain sur le marché national, nous adopterons une politique de fidélisation des clients par l'abaissement des prix et la régularité de la distribution.

Part du marché ciblée : 10% des laboratoires nationaux.

Evolution sur trois ans : 30% des laboratoires nationaux.

III.10. Analyse SWOT



STRENGTHS

- Produit pure
 - Disponibilité de produit
 - Prix raisonnable
-



WEAKNESSES

- Faible quantité de production
 - Équipements chers
-



OPPORTUNITIES

- Encouragements des produits locaux
 - La volonté de l'État de réduire l'importation
-



THREATS

- Faible confiance sur les produits locaux
 - Manque d'hétérogénéité sur le marché des BSA
-

III.11. Coût du projet

Produit 1 (p1) obtenu seulement par la méthode de Cohn originale

Produit 2 (p2) obtenu par la méthode de Cohn combinée à RP-HPLC

Tableau 4 : Matériel de réalisation du projet

	Matériel/travail	Prix DA	Quantité/Unité (p1)	Quantité/Unité (p2)	Montant (p1) DA	Montant (p2) DA
Matériel biologique et les produits chimiques	Le sang	1500 (1L)	50 L	50 L	75000	75000
	Acide acétique	11884.2 (5L)	13 L	13 L	30898,92	30898,92
	Éthanol	22794 (10L)	50 L	50 L	113970	113970
	Acétate de sodium	13206.6 (1kg)	3 kg	3 Kg	39619,8	39619,8
	EDTA	13763.4 (100g)	500 g	500 g	68817	68817
	Tris	55158 (1kg)	500 g	500 g	27579	27579
	Acétonitrile	41377.2DA(2.5 L)	10 L	10 L	////	165508,8
	Acide trifluoroacétique	20007DA (4L)	10 L	10 L	////	50017,5
Les appareils	Autoclave	687500	1	1	343750	343750
	Réfrigérateur	502250	1	1	251125	251125
	Congélateur	864200	1	1	432100	432100
	Centrifugeuse	130890	1	1	65445	65445
	pH mètre	153810	1	1	76905	76905
	Agitateur	53925	1	1	26962,5	26962,5
	Les verreries	100000	x	x	50000	50000
	Colonne pour HPLC	64668.55	////	1	////	64668.55

III- Représentation du Projet

Tableau 5 : L'amortissement des matériels

Appareils	Prix (DA)	Prix/5	Prix/5/12	P1	P2
Autoclave	687500	137500 DA/ans	11458.4DA/mois	5729,2 DA/mois	5729,2 DA/mois
Réfrigérateur	502250	100450 DA/ans	8370.8 DA/mois	4185,4 DA/mois	4185,4 DA/mois
Congélateur	864200	172840 DA/ans	14404 DA/mois	7202 DA/mois	7202 DA/mois
Centrifugeuse	130890	26178 DA/ans	1648 DA/mois	824 DA/mois	824 DA/mois
pH mètre	153810	30762 DA/ans	2563.5 DA/mois	1281,7DA/mois	1281,7DA/mois
Agitateur	53925	10785DA/ans	898.75 DA/mois	449,37 DA/mois	449,37 DA/mois
Les verreries	100000	20000 DA/ans	1667 DA/mois	833,5 DA/mois	833,5 DA/mois
Colonne pour HPLC	64668,55	6466,855 DA/ans	5390 DA/mois	////	5390 DA/mois
		Total	////	20505,17 DA	25895,17 DA

Tableau 6 : Coût du produit

Les charges	L'opération	Montant(DA) p1	Montant(DA) p2
Charges directes de production	Coût d'achat	355884,72	571411,02
	L'emballage	10000	10000
	6 Salariés	150000	150000
	Amortissement du matériel HPLC (préstation de service)	20505,17 ////	25895,17 200000
Charges indirectes de production	Les factures	10000	10000
	L'assurance	25000	25000
	Location	15000	15000
	Transport	80000	80000
	Les frais de publicité	40000	40000
	Département Marketing	30000	30000
	Total	736389,89	1147306,19

III.12. Le prix final

Premier produit (p1)

Dans un mois 50 L a été consommé pour produire 500 g de BSA (p1)

Chaque flacon contient 10 g de BSA

La somme des coûts est 736389,89 DA

Le nombre de flacons produits par mois est de 50 unités

Le coût unitaire est 14727,79 DA

Le prix de notre BSA (p1) est **17675 DA** (10 g)

Chiffre d'affaire est 1250000 Da/mois

Les bénéfices **147360,5 DA/mois**

Deuxième produit (p2)

Dans un mois 50 L a été consommé pour produire 500 g de BSA (p2)

Chaque flacon contient 10 g de BSA

La somme des coûts est 1147306,19 DA

Le nombre de flacons produits par mois est de 50 unités

Le coût unitaire est 22946,1DA

Le prix de notre BSA est **27535,5DA** (10 g)

Chiffre d'affaire est 1375000 Da/mois

Les bénéfices **229470DA/mois**

La somme des bénéfices **376830,5 DA/ mois**

Matériel et méthodes

Pour information

A l'instar de tous les pays du monde, un état de confinement a été imposé par le gouvernement algérien suite à la propagation du Corona virus « Covid-19 », nous nous sommes, alors, retrouvés dans l'impossibilité d'effectuer nos travaux expérimentaux. Par conséquent, dans ce chapitre nous allons parler des produits dont nous aurions eu besoin et de la démarche expérimentale établie avant le confinement. Il est à noter que les protocoles présentés dans ce chapitre sont des protocoles dits « standards » et aucune mise au point n'a été adaptée pour les besoins de cette expérience.

IV.1. Produits chimiques utilisés

Plusieurs produits chimiques sont utilisés pour réaliser cette procédure, la BSA, Acide acétique glacial, éthanol, Glycine, Glycérol, Méthanol, Tétraméthyléthylènediamine (TEMED), Trisaminométhane (Tris) et Tris hydrochloride (Tris Hcl) de la marque Sigma-Aldrich, éthylènediaminetétraacétique (EDTA), β -mercaptoéthanol, Acétate d'ammonium, Acide citrique, Persulfate d'ammonium, Bleu de bromophénol, Coomassie G-250, Coomassie R-250, Acrylamide et acétonitrile fabriqués par Biochem chemopharma, l'Acide orthophosphorique de Honeywell, et le dodécylsulfate de sodium (SDS) de Vwr chemicals prolabo, en fin un kit de marqueur de taille protéique de Biolabs.

IV.2. Echantillonnage

Un volume de 450ml de sang est prélevé à partir de la veine caudale d'une vache laitière dans une ferme locale située dans la commune d'Ain-Turk, wilaya d'Oran. Le prélèvement est effectué par un vétérinaire dans des sacs en plastique contenant un anticoagulant; l'acide éthylène-Di-Amine-Tétra-Acétique (EDTA). Le sang est transporté dans une glacière puis conservé à 4°C dans un réfrigérateur (l'augmentation de la température provoque la décomposition des cellules sanguines, l'activation des bactéries et affecte chimiquement en raison de l'activité accrue des enzymes et sa diminution induit la congélation du sang).

IV.3. Obtention et conservation du plasma

Le plasma est obtenu par une simple centrifugation à 3500 tours/min à 4°C puis conservé en aliquotes à -80°C. Une quantité d'environ 200 ml peut être récupérée à partir du volume initial de l'échantillon.

IV.4. Dosage des protéines totales par la méthode de Bradford, 1976

IV.4.1. Principe

Afin de déterminer la concentration des protéines dans le plasma, la méthode de Bradford peut être privilégiée, de part sa simplicité et sa haute sensibilité. Cette méthode est un dosage colorimétrique basé sur le changement de la couleur du bleu de Coomassie après sa liaison avec

l'arginine, l'histidine et la lysine et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Cette complexation provoque un transfert du pic d'adsorption de ce colorant qui passe d'une couleur verdâtre (G-250) à une couleur bleue avec une absorption maximale à 595nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon.

IV.4.2. Mode opératoire

1 ml du réactif de Bradford (Tableau 7) est ajouté à 1 ml de plasma puis incubé pendant 15min à l'obscurité à température ambiante afin que l'équilibre de fixation protéine-colorant s'établisse. Des dilutions du plasma sont réalisées si nécessaire. La concentration des protéines totales est déterminée par la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie en comparaison à une gamme étalon obtenue à partir de la BSA.

Tableau 7 : Composition du réactif de Bradford

Composants	Quantités
Bleu de Coomassie G-250	100 mg
Éthanol à 95 %	50 ml
Acide orthophosphorique à 85%	100 ml
Eau distillée	Qsp 1000 ml

Qsp : quantité suffisante pour

IV.5. Extraction de l'albumine: Fractionnement plasmatique

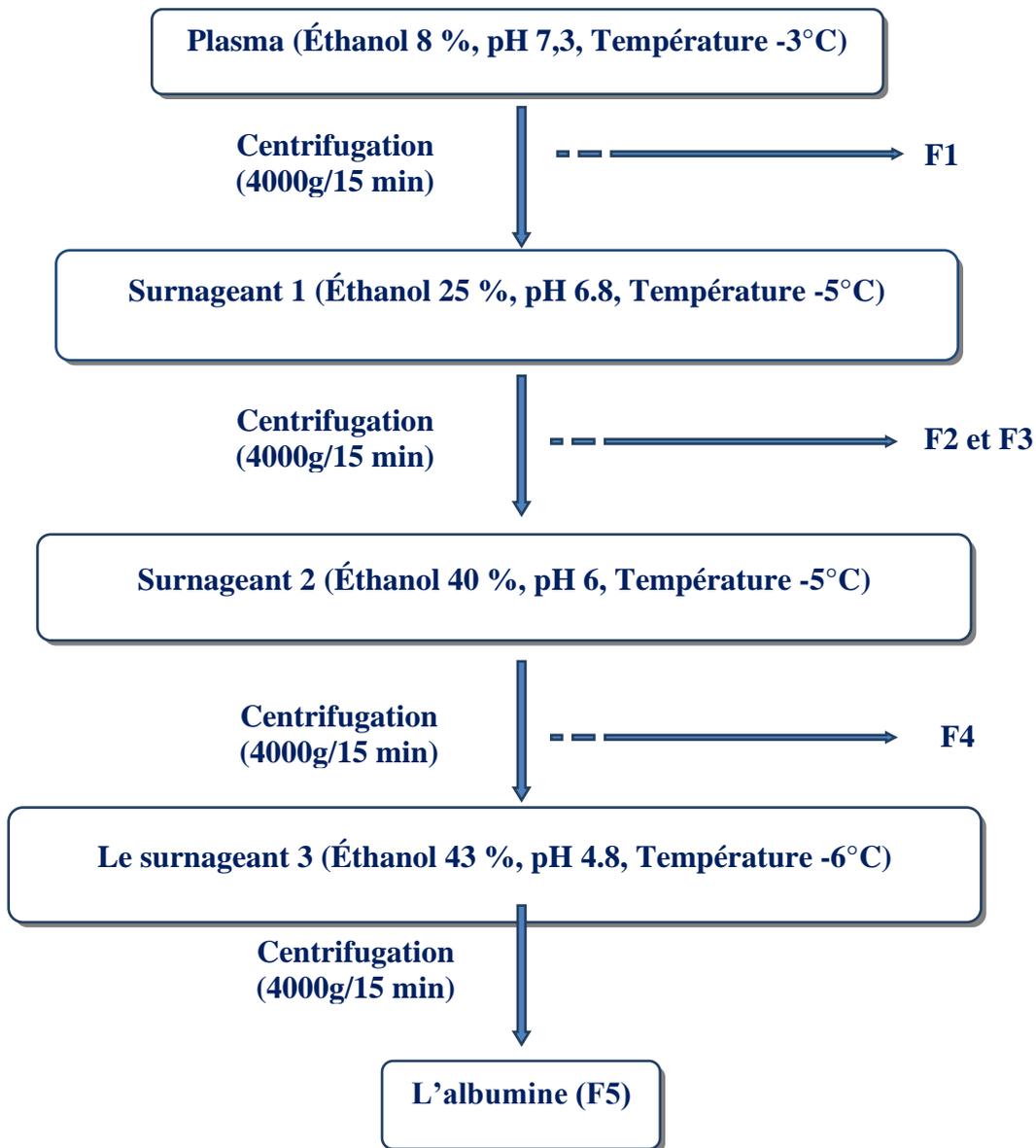
IV.5 .1. Principe

L'extraction de l'albumine est réalisée par fractionnement du plasma selon la méthode de Cohn *al.*, 1946. Cette méthode est basée sur les différences de solubilité des protéines plasmatiques en solution éthanolique en fonction du pH, de la température et de la force ionique. L'albumine est isolée à la 5^{ème} et dernière fraction (Fraction V).

IV.5.2. Mode opératoire

Dans un premier temps, de l'éthanol à 97% est additionné au plasma progressivement décongelé afin d'obtenir une solution d'éthanol à 8 %, le pH du plasma est ajusté à 7,2 avec du tampon acétate, pH 4 (4 M acétate de sodium, 10 M acide acétique), le mélange est ensuite centrifugé à 4000g pendant 15 min et le surnageant est récupéré. Les étapes suivantes consistent à

faire augmenter la concentration en éthanol et augmenter l'acidité du milieu (surnageant) avec du tampon citrate tout en maintenant une température inférieure à 0 °C. Ceci va permettre la précipitation des différentes protéines du plasma en fonction de leurs solubilités générant ainsi différentes fractions. Entre chaque fraction, une centrifugation à 4000g pendant 15 min est effectuée. En dernier, le précipité contenant l'albumine est solubilisé complètement dans le tampon Tris-HCl à 0,03 M de pH 7,35. Les détails du fractionnement sont représentés dans la figure 4.



F : Fraction

Figure 4 : Fractionnement de plasma selon la Méthode de Cohn et *al.*, 1946.

IV.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS

IV.6.1. Principe

Dans le but d'identifier l'albumine extraite dans la fraction 5 et vérifier sa pureté, une électrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) est réalisée. Cette technique consiste à faire migrer des protéines dans un gel de polyacrylamide, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. Cette dernière se fait en milieu basique en présence d'un détergent; le SDS qui masque la charge des protéines par sa propre charge négative et permet donc de faire migrer les protéines selon leurs poids moléculaires.

IV.6.2. Mode opératoire

Les échantillons protéiques sont dilués à 1, 25mg/ml avec du tampon de Laemmli (Tableau 8) puis chauffés à 95 °C pendant 3 min afin de migrer les protéines selon leurs poids moléculaires et leurs conformations uniquement. Ils sont ensuite déposés dans les puits formés au bord supérieur du gel de concentration (5%) ce qui permet leur tassement et leur entrée homogène dans le gel de séparation (12%). La composition du gel de concentration et du gel de séparation est donnée dans le tableau 9.

Les protéines migrent ensuite sous une tension 100V et une intensité de 30mA dans un tampon de migration à pH 8 (Tableau 10), après migration, le gel est démoulé et la révélation des bandes protéiques se fait par imprégnation de ce dernier, pendant 30 min, dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie R-250 (Tableau 12), suivie d'une décoloration sous agitation douce avec une solution de décoloration (Tableau 11).

La fraction V est comparée à la BSA commercialisée, un marqueur de taille protéique est utilisé (10-180 KDa).

IV.7. Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

IV.7.1. Principe

La chromatographie est une technique permettant de séparer plusieurs constituants d'un mélange en les faisant migrer, sur un support (phase stationnaire), par une phase liquide ou gazeuse (phase mobile). En RP-HPLC, la phase stationnaire (la colonne) est composée de silice greffée par des chaînes alkyles ayant 8 ou 18 atomes de carbone. Les phases stationnaires sont apolaires et hydrophobes et nécessitent donc une phase mobile (un éluant) polaire telle que l'acétonitrile, le méthanol, l'eau.... etc.

L'utilisation de la phase mobile permet d'inverser totalement la nature des interactions fournies par la silice. Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée (Jandera, 2006).

Le choix de la phase mobile (la nature de l'éluant) et de la phase stationnaire, entre autres, est un facteur déterminant pour le temps de rétention (t_R) d'un composé. L'élution de ce dernier se traduit par l'obtention d'un pic chromatographique d'allure gaussienne.

IV.2. Mode opératoire

Pour la purification de l'albumine, une phase stationnaire (colonne C18 , 5 μ m, 4,6 \times 150 mm) est équilibrée par une phase mobile A composée de 10% d'acétonitrile et 90% d'eau contenant 0,01% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'élution se fait par une phase mobile B composée de 90% d'acétonitrile et 10% d'eau contenant 0,01% de TFA. Un volume de 20 μ l de BSA est injecté à un débit de 1ml/min et l'absorbance est lue à 214nm. La BSA purifiée est éluée suivant un gradient linéaire de la phase mobile B pendant 20 min à température ambiante.

Tableau 8. Composition de tampon de Laemmli

Produits	Quantités
Tris Hcl 1M pH6.8	1,5 ml
SDS	0,6 g
Glycérol	3 ml
Bleu de bromophénol	0,03 g
β -mercaptoéthanol	0,35 ml
Eau distillée	QSP 7,5 ml

Tableau 9. Composition des gels de concentration et de séparation

Solutions	Gel de concentration (5%)	Gel de séparation (12%)
Solution d'acrylamide\ bis-acrylamide 40% (38\2)	500 µl	3 ml
Tampon Tris-Hcl1M (pH8,8)	/	3,75 ml
Tampon Tris-Hcl1M (pH6,8)	500 µl	/
SDS (10%)	40 µl	100 µl
Persulfate d'ammonium (10%)	20 µl	50 µl
TEMED	2 µl	5 µl
Eau distillée	2,94ml	3,1 ml
Volume totale	4ml	10 ml

Tableau 10. Composition du tampon de migration

Produits	Quantités
Glycine	14,4 g
Tris	3,6 g
SDS	1 g
Eau distillée	QSP 1000 ml

Tableau 11. Composition des solutions de coloration et de décoloration.

Produits	Solution de coloration	Solution de décoloration
Bleu de Coomassie R-250	0,2 g	/
Méthanol	10 ml	/
Acide acétique glacial	10 ml	100 ml
Eau distillée	80 ml	900 ml

IV.8. Elimination et inactivation virale

Pour l'élimination virale, une nanofiltration peut être utilisée. Ce procédé consiste tout simplement en une filtration sur membranes de porosités réduites; ainsi, toute particule de taille supérieure sera retenue et ainsi éliminée (Barin, 2008). Quant à l'inactivation virale, le filtrat pourra par la suite être pasteurisé pendant 10 heures à 60°C. Ces étapes sont cruciales pour limiter le risque de transmission de maladies infectieuses sans pour autant affecter les propriétés biologiques des protéines.

IV.9. Lyophilisation

La BSA en poudre est obtenue par une simple lyophilisation de la dernière fraction préalablement congelée à -80°C.

Résultats et discussion

V.1. Concentration des protéines sériques totales

Le tableau 13 regroupe des valeurs moyennes, recueillies depuis la littérature, des concentrations protéiques de sérum bovin. Ces données varient dans de larges limites : de 64,5 g/l (Francsics et *al.*, 1957) à 89,2 g/l (Heyndrickx, 1959). En effet, le taux des protéines totales et celui de l'albumine et des globulines du sérum sanguin des bovidés est une donnée très variable, d'un animal à un autre et d'un troupeau à un autre.

Cette variation peut s'expliquer par l'intervention de facteurs propres aux animaux tels que la race, l'âge. La gestation et la lactation. L'étude de Benayache en 2016 montre que la concentration plasmatique des protéines totales dans deux fermes, situées dans la région de Constantine, est assez différente durant la période de tarissement mais quasi identique durant le dernier mois de lactation avec une tendance à diminuer lors du tarissement et à augmenter lors de la lactation. Cependant les concentrations de l'albumine dans les deux fermes et durant les deux périodes (tarissement et lactation) restent stables avec des valeurs qui se situent autour de 28 à 31 g/l.

D'autres facteurs peuvent avoir un impact sur la concentration en protéines sériques tels que les facteurs environnementaux (saison, température, alimentation), ceci a été confirmé par l'étude de Ross, 1960 qui donne une concentration en protéines totales de 59,1 g/l en milieu tempéré et celle de Garner, 1950 qui rapporte une concentration de 78,8 g/l en climat tropical et une valeur moyenne de 31 g/l pour l'albumine.

Tableau 12: taux moyens des protéines totales, des albumines et des globulines du sérum de bovidés.

Protéines totales g/100 ml	Albumine g/100 ml	Globulines g/100 ml	Observations	Références
8,27 7,59	/	/	Vaches âgées Vaches jeunes	(Balkova, 1960 cité par Labouche, 1964)
7,31 7,24	1,75 1,71	5,62 5,55	Vaches Holstein, 15 jrs avant vêlage Vaches Holstein, 1jr avant vêlage	(Cabllero et vallenas, 1958- 1959 cité par Labouche, 1964)
8,12	/		Vaches âgées de plus de 64 mois	Dimopoulos (1961)
6,45	/	/	Race brune des alpes, non gestantes	Franciscis et <i>al.</i> (1957)
6,95	2,50	4,45	Zébu fulani, Nigeria	Ross (1960)
7,6	3,63	3,97	/	Dukes (1955)
8,92 ± 0,39	2,39	/	Race flamande orientale et Frisonne	Heyndrickx (1959)

V.2. Révélation des bandes protéiques

La figure 5 montre une schématisation d'un profil électrophorétique comparant la fraction V obtenue par précipitation à l'éthanol froid (méthode de Cohn) à la BSA commercialisée de chez Sigma-Aldrich en se référant à un marqueur de taille protéique. Nous envisageons deux possibilités, la première est la présence dans la fraction V, d'une seule bande majeure correspondant à la taille de la BSA (des monomères d'environ 60 KDa). La deuxième possibilité, est la présence d'une autre bande dans la fraction V qui pourrait correspondre à une protéine contaminant telle que les nucléases, les immunoglobulines G (IgG) et les endotoxines (Slaaby et *al.*, 2008 ; Trujillo et *al.*, 1990). Nous avançons cette possibilité du fait que la précipitation par la méthode de Cohn, bien qu'elle soit simple et efficace, n'offre pas un degré de pureté extrêmement élevé de l'albumine, suite à quoi, de nombreux protocoles combinant cette méthode à des méthodes chromatographiques ont été établies (Oncley et *al.*, 1949 ; Kistler-Nitschrnan et *al.*, 1962).

Pour la BSA commercialisée de chez Sigma-Aldrich, nous suggérons la présence d'une seule et unique bande protéique. La firme propose un produit de haute qualité et déclare purifier la BSA à partir d'une variété de méthodes primaires, y compris la véritable méthode de fractionnement de Cohn, les méthodes de fractionnement de l'éthanol modifiées, le choc thermique et la chromatographie ainsi que des étapes de purification supplémentaires de cristallisation ou de filtration au charbon.

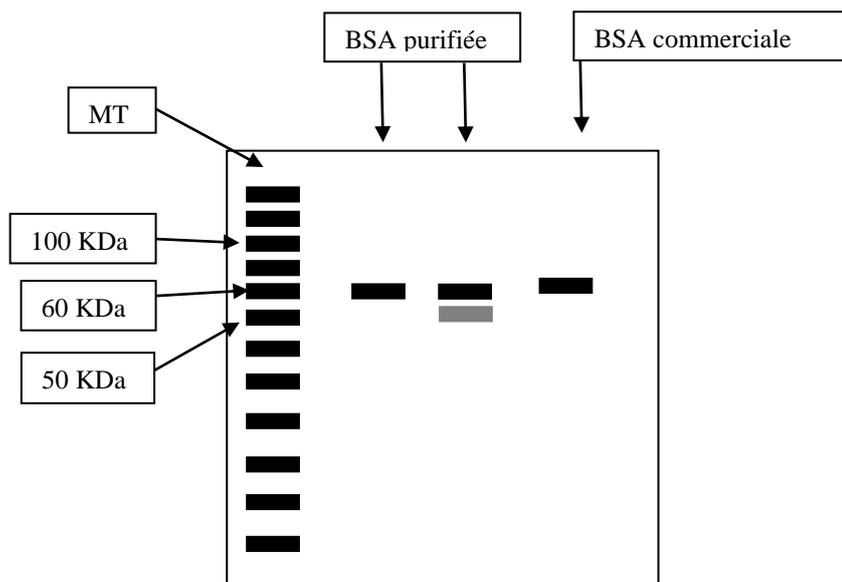


Figure 5 : schéma d'un profil électrophorétique de la BSA purifiée et de la BSA commerciale.

V.3. Analyse de la BSA par RP-HPLC

La pureté et l'homogénéité des protéines purifiées est analysée par HPLC, qui sépare les protéines en fonction de l'hydrophobie de surface. L'étude de Malik et *al.*, en 2013 montre que la BSA est éluée en seul pic avec un temps de rétention de 10,4 min. Cependant l'étude de Mukhopadhyay et *al.*, en 2013 montre que le temps de rétention de BSA est 1,406 min.

V.4. BSA lyophilisée

La BSA résultant du processus de lyophilisation se présente comme une poudre très légère de couleur blanc-cassé (figure 6).



Figure 6 : BSA lyophilisée

La séparation et la purification de la sérum albumine bovine dépend principalement du sang de la vache, de la quantité de celui-ci, et des techniques chromatographiques utilisées dans cette procédure.

Un des paramètres à considérer avant de commencer une purification de la BSA dans le but d'une production, est le choix de l'animal « donneur » et le moment du prélèvement, comme mentionné précédemment la quantité d'albumine peut varier sous l'influence de différents facteurs ce qui peut affecter le rendement.

Dans ce travail, l'un des premiers obstacles que nous avons rencontré était l'échantillonnage, en effet l'obtention du sang bovin avec une quantité suffisante dans des fermes d'élevage s'est avérée extrêmement difficile. La majorité des agriculteurs ont donné leurs consentements pour de très petites quantités. La collecte du sang bovin depuis les abattoirs est alors à envisager, ceci permet d'avoir les quantités nécessaires mais présente l'inconvénient d'avoir un plasma avec une concentration assez significative en hémoglobine, Tanaka et *al.*, 2001 rapportent une valeur de 54mg d'hémoglobine libre par dl de plasma. Dans ce cas de figure, avant de commencer le fractionnement, une étape supplémentaire est nécessaire pour éliminer l'hémoglobine et éviter ainsi que cette dernière persiste jusqu'à la fin de l'extraction générant ainsi un produit d'une couleur marron foncé avec risque de précipitation lors du stockage.

Le choix de la méthode de Cohn (fractionnement plasmatique à l'éthanol froid) pour l'obtention de l'albumine s'est fait principalement de part la facilité de la procédure et la disponibilité des produits, cependant, selon la littérature, cette méthode ne confère pas un degré de pureté élevé (Denizli, 2011). Ceci a fait que les grandes firmes productrices combinent souvent cette méthode à des techniques chromatographiques. Dans ce travail, nous avons choisi de poursuivre la purification de la BSA avec une HPLC en phase inversée qui est une des techniques chromatographiques utilisée, entre autres, dans la purification à grande échelle des médicaments thérapeutiques protéiques. Sa haute sensibilité permet de séparer des protéines de structures presque identiques (l'insuline humaine et l'insuline porcine).

Pour revenir au but initial de ce travail qui est la production, dans un premier temps à petite échelle de la BSA, et ce pour répondre à des besoins essentiellement pédagogiques (réalisation de travaux pratiques,...), le petit volume d'échantillons biologiques, le manque d'appareils HPLC et la manque de publications scientifiques sont des obstacles à considérer.

Malgré ces nombreuses difficultés, les avantages de cette production restent importants pour renforcer l'économie nationale. En effet, l'Algérie est un marché vierge pour la consommation de la BSA du fait du nombre d'universités et laboratoires existant. Une production locale permet

une communication facilitée par la proximité en diminuant les intermédiaires entre les consommateurs et le producteur, le coût d'achat peut diminuer et la marge du producteur peut augmenter, la réduction des distances de transports donc la réduction sur les coûts de transports, garantir l'origine de produit et sa qualité c'est-à-dire lien de confiance entre le consommateur et le producteur, et offre un meilleur contrôle de la qualité. Cette production pourrait aussi avoir des avantages indirects tels que l'encouragement de l'élevage bovin afin d'obtenir la matière primaire (le sang).

En dernier, La production de la BSA ouvre la porte à la production des médicaments dérivés du sang (MDS) tels que la HSA, les facteurs de coagulant et les immunoglobulines.

Conclusion

Ce travail a porté sur l'extraction et la purification de la BSA, avec l'éventualité de la création d'une start-up pour subvenir aux besoins du marché national.

Dans un premier temps et afin d'extraire et purifier la BSA, un plan de travail expérimental a été établi, avec la méthode Cohn comme méthode de fractionnement plasmatique; une procédure simple et peu coûteuse et la chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (RP-HPLC) comme méthode de purification de la protéine.

La combinaison de la méthode de Cohn à une RP-HPLC présente de nombreux avantages, puisque la haute sensibilité de cette dernière permet de séparer des protéines de structures presque identiques, le protocole de séparation et de purification de l'albumine est alors plus efficace, avec un rendement et une pureté hautement élevés. Cette méthode combinée a été choisie sur la base de la disponibilité des produits et du matériel nécessaire.

Dans un deuxième temps, vient l'idée de la création d'une start-up pour la production de la BSA. La création d'une entreprise n'est jamais une aventure simple, et ne doit en aucun cas être prise à la légère. Bien que la comparaison du coût de la production de la BSA par la méthode de Cohn originale à celui de la production par la méthode combinée proposée dans ce travail, montre une augmentation du coût escompté par rapport à la méthode originale, il nous tient à cœur de faire fonctionner ce projet et de le mener aussi loin que possible. Nous nous disons qu'il n'y a aucune raison que nous n'y arrivions pas en l'Algérie, d'autant plus que notre positionnement géographique est vierge de toute concurrence.

Malheureusement, à cause du confinement actuel suite à la pandémie du covid-19, nous n'avons pas pu réaliser ce travail sur le plan pratique, nous espérons pouvoir le réaliser et mettre au point le procédé exact pour l'obtention d'une BSA hautement purifiée et l'extrapoler par la suite à une plus grande échelle. En effet, une production à grande échelle contribuerait à réduire la quantité de BSA importée et par conséquent son coût. Dans nos perspectives aussi la purification d'autres protéines du sang.

La création d'une entreprise n'est jamais une aventure simple, et ne doit en aucun cas être prise à la légère. Bien que dans notre cas l'investissement soit faible et le risque peu important, il est important pour nous de faire fonctionner ce projet et de l'atteindre le plus possible. Certes, nous avons encore beaucoup de détails sur lesquels travailler avant son lancement, mais l'essentiel est là : la volonté d'y arriver.

En dernier, il est nécessaire de penser à une démarche de production de produits et réactifs chimiques pour le secteur de biologie entre autres, ceci contribuerait fortement au développement économique du pays.

Références Bibliographiques

- Barin, F (2008)**. La sécurité virale des médicaments d'origine biologique. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Vol, 66(3):129-139.
- **Belhoucie, J (2009)**. Les médicaments plasmatiques et recombinants utilisés dans le traitement de l'hémophile. Thèse de pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Rebat : 77.
- Benayache, S (2016)**. Etude des variations biochimiques du lait et du sang chez les vaches laitières en fonction de l'alimentation. Constantine: Université des frères mentouri Constantine : 151.
- **Bos, O.J., Labro, J.F., Fischer, M.J., Wilting, J. & Janssen, L.H (1989)**. The molecular mechanism of the neutral-to-Base transition of human serum albumin. acid/base titration and proton nuclear magnetic resonance studies on a large peptic and a large tryptic fragment of albumin. *Journal of Biological Chemistry*, Vol, 264 (2): 953-959.
- **Brown, J.R (1975)**. Structure of bovine serum albumin. *Federation Proceedings*, Vol, 34: 591.
- **Buchacher, A. & Iberer, G(2005)**. Purification of intravenous immunoglobulin g from human plasma-aspects of yield and virus safety. *Biotechnology Journal*, Vol, 1 (2):148-163.
- **Camperi S.A., Navarro del Canizo A.A., Wolman F.J, Smolko E.E., Cascone, O. & Grasselli, M (1999)**. Protein adsorption onto tentacle cation-exchange hollow-fiber membranes. *Biotechnology Progress*, Vol, 15 (3):500-505.
- **Carter, D.C., He, X.M., Munson, S.H., Twigg, P.D., Gernert, K.M., Broom, M.B. & Miller, T.Y (1989)**. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science*, Vol, 244(4909):1195-1198.
- **Carter, D.C. & Ho J.X (1994)**. Structure of serum albumin. *Advance in Protein Chemistry*, Vol, 45:153-203.
- **Charcosset, C (2006)**. Membrane processes in biotechnology: An overview. *Biotechnology Advances*, Vol, 24(5):482-492.
- **Chen, Y.Y., Lin SY., Yeh Y.Y., Hsiao H.H., Wu C.Y., Chen S.T. & al., (2005)**. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis*, Vol, 26(11):2117-2127.

- **Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., & al., (1946).** Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *Journal of American Chemical Society*, Vol, 68(3):459-475.

- **CSL Ltd, Victoria, Australia (1996).** New chromatographic albumin facility largest in the world. *Downstream*, 21:3-4.

- **Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, C.B (1968).** Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol, 61(2):636-43.

- **Denizli, A (2011).** Plasma fractionation: Conventional and chromatographic methods for albumin purification. *Hacettepe Journal Biology Chemistry*, Vol, 39(4):315-341.

- **Dimopoulos, G. T (1961).** Polysaccharide and protein relationships of normal bovine serum. *American Journal of Veterinary Research*, Vol, 22:986-989.

- **Ding, Z. & Cao X (2013).** Affinity precipitation of human serum albumin using a thermoresponsive polymer with an l-thyroxin ligand. *BMC Biotechnology*, Vol, 13(1):109.

- **Dukes, H.H (1955).** The physiology of domestic animals. London, Baillière, Tyndall & Cox, 70^{ème} edition, Vol, 1:1020.

- **El kadi, N (2007).** Etude des modifications de structure dans une protéine cargo : La sérum albumine. Thèse de doctorat en science de la vie et de la matière. Université Paris V Descartes :124.

- **Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M. & Ascenzi, P (2012).** Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol, 33(3):209-90

- **Figge, J., Rossing, T.H. & Fencl, V (1991).** The role of serum-proteins in acid-base equilibria. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol, 117(6):453-467.

- **Franciscis, G., Zacchi, B. & Bernini, L (1957).** Le proteine plasmatiche in bovine gravide. Nota preliminare. *Bollettino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, Vol, 33(10-11):1560-1561.

- **Garner, J.J (1950).** Physiological variations in serum proteins in cattle. *Nature*, Vol, 165(4205):896-897.

- **Ghuman, J., Zunszain, P.A., Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Otagiri, M. & Curry, S (2005).** Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, Vol, 353(1):38-52.

- **Hage, D.S., Anguizola, J.A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros E. & al., (2012).** Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol, 69:93-105.

- Hao, Y (1979).** A simple method for the preparation of human serum albumin. *Vox Sanguinis*, vol, 36(5):313-320.

- **Heyndrickx, G.V (1959).** Investigations on the lipids, proteins, lipo-and glycoproteins of udder lymph and plasma in cattle. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, Vol, 44(3):264-270.

- **Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M. & Ken-ichi (1990).** Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol, 173(2):639-646.

- **Imamoglu, S (2002).** Simulated moving bed chromatography (smb) for application in bioseparation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotecchnology*, Vol, 76:211-231.

- **Jaenicke, R. & Lauffer, M.A (1969).** Determination of hydration and partial specific volume of proteins with the spring balance, *Biochemistry*, Vol, 8(7):3077-3082.

- Jandera, P. (2006).** Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems. *Journal of Chromatography A*, Vol, 1126(1-2):195-218.

- Kistler, P.& Nitschmann, H (1962).** Large scale production of human plasma fraction .*Vox Sanguinis*, Vol, 7(4):414-424.

- **Knudsen, H.L., Fahrner, R.L., Xu, Y., Norling, L.A. & Blank, G.S (2001).** Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. *Journal of Chromatography A*, Vol, 907(1-2):145-154.

- **Kovacs, A. & Guttman, A (2013).** Medicinal chemistry meets proteomics: Fractionation of the human plasma proteome. *Current Medicinal Chemistry*, Vol, 20(4):483-490.

- Labouche, C (1964).** La protéinémie chez la vache. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays tropicaux*, Vol 17(4) :721-745.

- **Lihme, A., Hansen, M.B., Andersen, I.V. & Burnouf, T (2009)**. A novel core fractionation process of human plasma by expanded bed adsorption chromatography. *Analytical Biochemistry*, Vol, 399(1):102-109.

- Malik, A., Jankun, J.& Jankun, E.s (2013)**. Isolation and characterization of serum Albumin from *Camelus dromedarius*. *Experimental and therapeutic medicine*, Vol, 6(2):519-524.

- **Min He, X. & Carter, D.C (1994)**. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, Vol, 358(6383):209-215.

- **Mitchell, R. F (1952)**. Electron microscopy of plasma proteins. *Biochimicaof Biophysica Acta*, Vol, 9(4):430-442.

- Mukhopadhyay, G., Panja, T., Mazumder, S., Nag, S., Dey, S., Chakraborty, M., Sarkar, S., Ghosh, A & Ghosh, A (2013)**. HPLC analysis on separation of BSA from dilute solution ,*Endocrine Abstracts*, Vol, 31:40.

- **Odunuga, O.O., Shazhko, A (2013)**. Ammonium sulfate precipitation combined with liquid chromatography is sufficient for purification of bovine serum albumin that is suitable for most routine laboratory applications. *Biochemical Compounds*, Vol,1(1):3.

- **Olsen, H., Andersen, A., Nordbø, A., Kongsgaard, U.E. & Børmer, O.P (2004)**. Pharmaceutical-grade albumin: impaired drug-binding capacity in vitro. *BMC Clinical Pharmacology*, Vol, 4(1):4.

- Oncley, J.L., Melin, M., Eichert, D.A., Cameron, J.W. & Gross, P.M (1949)**. The separation of antibodies, isoagglutinis, prothrombin, plasmingen and beta-1-lipoprotein into sub-fractions of human plasma. *Journal of the American Chemical Society*, Vol, 71(2):541-550.

- **Peters Jr, T (1985)**. Serum Albumin, *Advances in Protein Chemistry*, Vol, 37:161-245.

- **Peters Jr, T (1995)**. All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Academic Press, San Diego: 1-432.

- **Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Twine, S., East, M. & Curry, S (2001)**. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *Journal of Biological Chemistry*, Vol, 276(25):22804-22809.

- **Phillips, M., Cormier, J., Ferrence, J., Dowd, C., Kiss, R., Lutz, H. & al., (2005).** Performance of a membrane adsorber for trace impurity removal in biotechnology manufacturing. *Journal of Chromatography A*, Vol, 1078(1-2):74-82.
- **Poteser, M. & Wakabayashi, I (2004).** Serum albumin induces iNOS expression and NO production in RAW 267.4 macrophages. *British Journal Pharmacology*, vol, 143(1):143-151.
- **Raoufinia, R., Mota, A., Keyhanvar, N., Safari, F., Shamekhi, S. & Abdolalizadeh, J (2016).** Overview of Albumin and its Purifications Methods. *Advanced pharmaceutical Bulletin*, Vol, 6(4):495-507. Doi : 10.15171/apb.2016.063.
- **Reif, O.W. & Freitag, R (1993).** Characterization and application of strong ion-exchange membrane adsorbers as stationary phases in high-performance liquid chromatography of proteins. *Journal Chromatography A*, Vol, 654(1):29-41.
- **Ross, J. G (1960).** Normal serum albumen values in Nigerian Zebu Cattle. *Veterinary Record*, Vol, 72:159-161.
- **Scheraga, H.A., Scott, R.A. & Loeb, G.I (1961).** The SHARPNESS of the transition in reversible protein denaturation. *Journal of Physical Chemistry*, Vol, 65(4):699.
- **Scott, T.& Eagleson, M (1988).** Concise Encyclopedia: Biochemistry, Second Edition, Walter de Gruyter, New York: 19-20.
- **Slaaby, R., Andersen, A.S. & Brandt, J (2008).** IGF-I binding to the IGF-I receptor is affected by contaminants in commercial BSA: the contaminants are proteins with IGF-I binding properties. *Growth Hormone & IGF Research*, Vol, 18(4):267-274.
- **Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda., M. & Kobayashi, K (1999).** Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering*, Vol, 12(6):439-446.
- **Tanaka, K., Shigueoka, E.M., Sawatani, E., Dias, G.A., Arashiro, F., Campos, T.C., & al., (1998).** Purification of human albumin by the combination of the method of cohn with liquid chromatography. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol, 31(11):1383-1388.
- **Tanka, K., Swatani, E., Shigueoka, E.M., Dias, G.A., Nakao, H.C. & Arashiro, F (2001).** Isolation of bovine plasma albumin by liquid chromatography and its polymerization for use in immunohematology, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol, 34(8):977-983.
- **Trujillo, L.E., Castellanos, L., Garcia, O. & Herrera, L (1990).** A protocol for the

VII- Références Bibliographiques

purification of bovine serum albumin free of deoxyribonuclease activity. *Biotechniques*, Vol, 9(5):620-622.

- **Vasileva, R., Jakab, M. & Hasko, F (1981)**. Application of ion-exchange chromatography for the production of human albumin. *Journal of Chromatography A*, Vol, 216:279-284.

- **Wang, C., Bai, S., Tao, S.P. & Sun, Y (2014)**. Evaluation of steric exclusion chromatography on cryogel column for the separation of serum proteins. *Journal of Chromatography A*, Vol, 1333:54-59.

- **Young, L (1955)**. Anodic oxide films, Part 4.-The interpretation of impedance measurements on oxide coated electrodes on niobium, *Transactions of the Faraday Society*, Vol, 51:1250-1260.

Annexes

Annexe 1 : composition en acides aminés de la BSA (Brown et *al.*, 1975 ;Hirayam et *al.*, 1990).

Acide Aminé	Nombre de résidus	
	Brown et <i>al</i>	Hirayama et <i>al</i>
Acide aspartique	41	41
Arginine	23	26
Asparagine	13	14
Acide glutamique	59	58
Glutamine	20	21
Histidine	17	16
Lysine	59	60
Sérine	28	32
Thréonine	34	34
Alanine	46	48
Isoleucine	14	15
Leucine	61	65
Méthionine*	04	05
Phénylalanine	27	30
Tryptophane	02	03
Tyrosine	19	21
Valine*	36	38
Cystéine	35	35
Glycine	16	17
Proline	28	28
Total	582	607
	Brown et <i>al</i>	Hirayama et <i>al</i>

*présence de S dans la molécule

Annexe 2 : composition atomique de la BSA (Brown et *al.*, 1975 ;Hirayam et *al.*, 1990).

Nombre d'atomes	C	N	O	S
Brown et <i>al</i>	2926	779	897	39
Hirayama et <i>al</i>	3030	841	947	40

C : Carbone, N : Azote, O : Oxygène, S : Soufre

