



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1360006057

[M]1991 NICOLAS-SIMONNOT, M-O 91 INPL 016N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INPL

Spécialité : Génie des Procédés

par

Marie-Odile NICOLAS-SIMONNOT

Ingénieur ENSIC



Sujet :

**Contribution à l'étude de la chromatographie frontale
des protéines par échange d'anions.
Application à l'albumine de sérum bovin.**

Soutenue publiquement devant la Commission d'Examen
le 11 février 1991

Jury:

Président : D. TONDEUR

Rapporteurs : J.P. RIBA
D. TONDEUR

Examineurs : G. GREVILLOT
W.H. HÖLL
J.F. STOLTZ

27

28

29

30

31

32

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (L.S.G.C.), qui est un laboratoire propre du C.N.R.S., hébergé par l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques. Je remercie son directeur, Monsieur D. Tondeur de m'y avoir accueillie.

Je lui exprime également ma gratitude d'avoir accepté de présider le jury et d'être rapporteur.

Je remercie Monsieur G. Grévilot, Directeur de Recherche (C.N.R.S.), qui a dirigé ce travail, pour son appui scientifique, ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je tiens à remercier Monsieur Riba, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Génie Chimique de Toulouse de m'accorder l'honneur d'évaluer ce travail en tant que rapporteur.

Monsieur le Professeur Stoltz (Centre Régional de Transfusion Sanguine et Unité INSERM U 284, Nancy), et Monsieur le Dr.-Ing. Höll (Kernforschungszentrum, Karlsruhe) ont accepté de juger ce travail et de participer au jury, qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur A. Laurent, Directeur de l'E.N.S.I.C., de m'avoir accueillie dans son établissement en tant qu'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche, au cours de la dernière année.

Je remercie vivement tous ceux qui ont apporté leur concours à cette recherche, Madame S. Chanel, pour son assistance technique, Monsieur M. Bailly, pour son aide en général, et en ce qui concerne l'informatique, Aurora Fernandez et Frédéric Charton pour leur participation. Je remercie les personnes avec qui j'ai pu discuter à plusieurs reprises, Messieurs P. Chenevière, D. Tondeur, D. Schweich, M. Sardin.

Merci également à ceux qui ont contribué à la réalisation du manuscrit, notamment à Monsieur J. Siotte, qui a réalisé de nombreuses illustrations, à Monsieur R. Genay, ainsi qu'au service de reprographie du C.P.I.C..

Enfin, je ne saurais trop exprimer ma reconnaissance aux membres du groupe G.S.M.P., et à toutes les personnes du Laboratoire et d'ailleurs qui ont su apporter leur soutien amical.

SOMMAIRE

RESUME	5
ABSTRACT	6
INTRODUCTION	7

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES PROTEINES	9
I-1 Composition et structure	9
I-2 Comportement en solution	10
II. LES TECHNIQUES DE PURIFICATION	11
II-1 Précipitation	11
II-2 Méthodes basées sur la taille moléculaire	12
II-3 Electrophorèse	12
II-4 Séparations par adsorption	13
III. LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS	17
III-1 Matériaux échangeurs d'ions	17
III-2 Equilibre d'échange d'ions	19
III-3 Approches théoriques de la chromatographie	24

CHAPITRE 2 : COMPORTEMENT DES ECHANGEURS D'IONS FAIBLES EN FONCTION DE L'ENVIRONNEMENT IONIQUE

INTRODUCTION	28
I. APPROCHE CLASSIQUE	29
I-1 Courbes de dosage acide-base	30
I-2 Détermination du pKa	31
II. ETUDE DU COMPORTEMENT D'UN ECHANGEUR DE CATIONS DE TYPE ACIDE FAIBLE	34
II-1 Théorie	34
II-2 Résultats expérimentaux et modélisation	37
II-3 Discussion	42
II-3.1 Exploitation des courbes	
II-3.2 Influence des différents paramètres ajustables	
II-3.3 Une stoechiométrie ou bien deux ?	
II-3.4 La capacité apparente	

III. ETUDE DU COMPORTEMENT D'UN ECHANGEUR D'ANIONS DE TYPE BASE FAIBLE	50
III-1 Supports à un site	51
III-1-1 Théorie	
III-1.2 Résultats expérimentaux et modélisation	
III-1-2.1 Duolite A375	
III-1-2.2 Duolite A368	
III-1.3 Discussion	
III-1-3-1 Exploitation des mesures	
III-1-3-2 Influence des paramètres ajustables	
III-1-3-3 Capacité apparente	
III-2 Support échangeur d'anions comportant des sites forts et des sites faibles	60
III-2.1 Théorie	
III-2.2 Expériences et modélisation	
III-2.3 Discussion	
CONCLUSION	70
ANNEXE 2. : Compléments d'informations sur les supports étudiés.	71

CHAPITRE 3 : PROPAGATION D'UN ELECTROLYTE FAIBLE DANS UNE COLONNE ECHANGEUSE D'ANIONS

INTRODUCTION	76
I. PROPAGATION D'ONDES DE pH	76
I-1 Théorie	76
I-2 Le système acide acétique-acétate de sodium	79
I-2.1 Variables - relations - variance	
I-2.2 Résultats expérimentaux, modélisation par la théorie de l'équilibre	
I-2.2.1 Premier cas : milieu basique	
I-2.2.2 Deuxième cas : milieu acide	
I-2.3 Simulations - Influence des paramètres	
I-3 Le système phosphate de potassium	88
I-3.1 Variables - relations - variance	
I-3.2 Résultats expérimentaux et modélisation par la théorie de l'équilibre	
I-3.2.1 Premier cas : excursion vers des pH plus élevés	
I-3.2.2 Deuxième cas : excursion vers des pH moins élevés	
I-3.3 Simulations	
II. ECHANGE D'ANIONS METTANT EN JEU UN TAMPON DE PH ET UN ANION IMPLIQUE DANS AUCUNE REACTION DE DISSOCIATION	95

II-1 Introduction sur les systèmes de variance trois	95
II-2 Système acétate de sodium-chlorure-hydroxyle	96
II-2.1 Approche théorique - Etablissement du diagramme	
II-2.2 Etude d'un cas	
II-3 Système dihydrogéné - hydrogéné phosphate de potassium - chlorure - hydroxyle	104
II-3.1 Approche théorique	
II-3.2 Etude expérimentale	
II-3.3 Simulations	
CONCLUSION	113
ANNEXE 3-1 : Système expérimental	114
ANNEXE 3-2 : Calcul des courbes de percée théoriques et valeur des paramètres	116
ANNEXE 3-3 : Elements de la théorie de l'équilibre-Construction du diagramme-Applications	125
CHAPITRE 4 : MODELISATION DU COMPORTEMENT ACIDO-BASIQUE DE L'ALBUMINE - MESURE D'ISOTHERMES	
INTRODUCTION	135
Première Partie : Etude du comportement acido-basique de l'albumine	
I. PRESENTATION GENERALE DE L'ALBUMINE DU SERUM BOVIN	136
II. DETERMINATION DE LA CHARGE ELECTROSTATIQUE D'UNE PROTEINE	
II-1 Charge électrostatique d'une protéine	136
II-2 Dosage acide-base des protéines	139
II-2.1 Méthodes expérimentales	
II-2.2 Interprétation des courbes de dosage	
III. EXPERIENCES DE DOSAGE DE LA BSA ET MODELISATION	143
III-1 Expériences	143
III-2 Modélisation des courbes de dosage	144
III-2.1 Modèle de l'albumine, au niveau acido-basique	
III-2.2 Détermination des paramètres	
III-2.3 Résultats	
CONCLUSION	152
Seconde partie : Etude de l'équilibre entre l'albumine du sérum bovin et deux échangeurs d'anions	
INTRODUCTION	153
I. REPRESENTATION DE L'EQUILIBRE D'ECHANGE D'IONS METTANT EN JEU UNE PROTEINE	153

I-1 Les modèles d'adsorption	153
I-2 Modèle de Langmuir et échange d'ions stoechiométrique	157
II. DEMARCHE EXPERIMENTALE	160
II-1 Méthodes	160
II-2 Expériences	162
III. RESULTATS ET MODELISATION	164
III-1 Détermination des paramètres n et K	164
III-2 Discussion	166
CONCLUSION	170
ANNEXE 4. : Interprétation des courbes de dosage acide-base d'une protéine par la méthode de Tanford.	171

CHAPITRE 5 : CHROMATOGRAPHIE FRONTALE DE L'ALBUMINE SUR ECHANGEUR D'ANIONS

INTRODUCTION	173
I. EXPERIENCES ET INTERPRETATION	173
I-1 Avec le support DEAE Spherodex LS	173
I-1.1 Echange binaire albumine-chlorure	
I-1.2 Echanges ternaires albumine-nitrate-chlorure	
I-1.3 Proposition d'un mécanisme	
I-1.4 Expériences en milieu tampon	
I-2 Expériences avec le support QMA Spherosil LS	193
I-2.1 Echange albumine-chlorure	
I-2.2 Echange albumine-nitrate-chlorure	
I-2.3 En milieu tampon phosphate	
II. VERS UN MODELE DE L'ALBUMINE EN TANT QU'ESPECE ECHANGEABLE	
II-1 Eléments de base	204
II-2 Simulation de l'échange chlorure albumine sur support fort	207
CONCLUSION	210
ANNEXE 5. : compléments sur la régénération	212
CONCLUSION	214
NOMENCLATURE	216
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	218
ANNEXES GENERALES	
1 : méthodes expérimentales et compléments sur les supports utilisés	228
2 : programmes de calcul	237

RESUME

La chromatographie d'échange d'anions mettant en jeu une protéine fait intervenir simultanément plusieurs phénomènes : l'échange d'ions proprement dit, ainsi que d'autres réactions, essentiellement de dissociation, en phase liquide ou solide. La démarche adoptée ici consiste à découpler toutes les contributions et à les examiner séparément, en vue de les regrouper à terme dans un modèle global.

Pour la chromatographie des protéines, des supports échangeurs d'ions faibles sont fréquemment utilisés. On étudie ici leur comportement, en fonction de l'environnement ionique. Ceci est réalisé à partir de la modélisation de courbes de dosage acide-base de ces supports. Grâce à cette approche, on est en mesure de prévoir la variation de la capacité d'échange suivant la composition de la solution.

On propose ensuite une étude de la propagation d'électrolytes faibles (tampons de pH), en l'absence de protéine, dans une colonne échangeuse d'anions (couplage de l'échange d'ions et de réactions de dissociation). Les résultats sont interprétés dans le cadre de la théorie de l'équilibre. On montre que malgré l'utilisation de solutions tampons, d'importantes variations de pH peuvent se produire dans la colonne.

Avant d'aborder les expériences en colonne avec une protéine-modèle (albumine de sérum bovin), on analyse les interactions entre cette protéine et la solution (modélisation de courbes de dosage). De même, on étudie les interactions entre la protéine et des échangeurs d'anions par la mesures d'isothermes dans différentes conditions.

Enfin, des expériences de chromatographie frontale sont présentées. On commence par des systèmes "simples" du point de vue de l'échange d'ions (échanges binaires ou ternaires, en milieu non tamponné), avant de travailler en milieu tampon (où toutes les contributions sont mêlées). L'interprétation de ces expériences nous conduit à proposer un mécanisme d'échange. On montre que le comportement global de la protéine s'approche de celui d'un électrolyte faible, ce qui constitue un point de départ en vue de l'élaboration d'un modèle.

ABSTRACT

Anion exchange chromatography performed with a protein, involves several coupled phenomena : ion exchange itself, as well as other reactions, predominantly dissociation reactions, in the liquid and the solid phase. Our general approach consists of decoupling these contributions and examining them separately, before joining them in a global model.

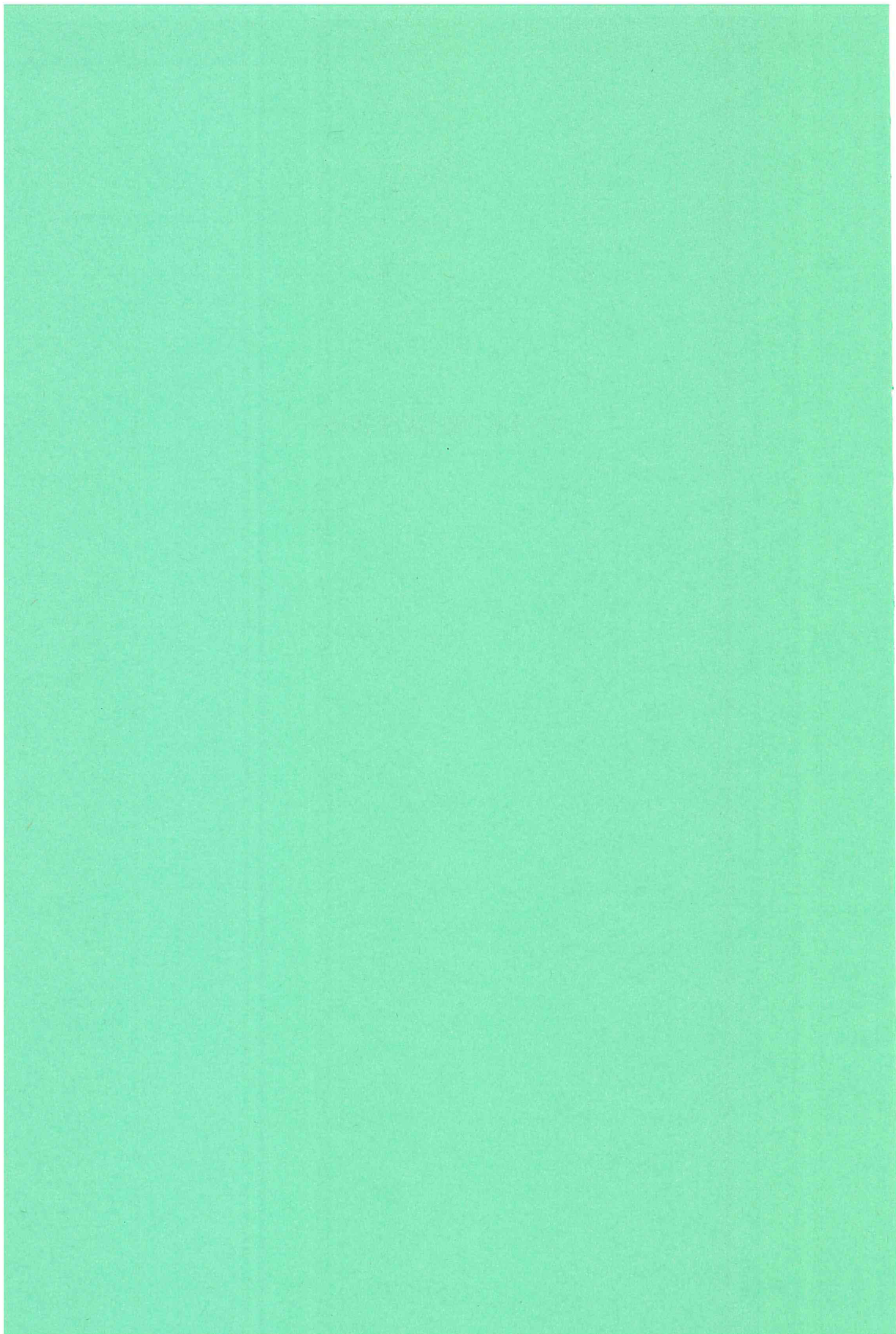
In protein chromatography, weak ion exchangers are often used. We study here their behaviour as a function of the ionic environment. This is made through the modelling of acid-base titrations. This approach enables us to foresee the variation of their exchange capacity following the solution composition.

We then propose a study of the propagation of weak electrolytes in an anion exchange column (anion exchange coupled with dissociation reactions). Results are interpreted in terms of equilibrium theory. It is shown that despite the use of buffers, important pH variations may occur in the column.

Before starting on column experiments with one model protein (bovine serum albumin), interactions between this protein and the solution are analysed (modelling of titrations). In the same way, interactions between the protein and anion exchangers are studied by means of isotherms measurements, in different conditions.

Frontal chromatography experiments are presented. To begin, "simple" ion exchange systems are studied (binary or ternary exchange, in unbuffered media), before working with buffered media (for which all contributions are coupled). The interpretation of these experiments leads us to the proposition of an exchange mechanism. It is shown that the global behaviour of the protein is close to the one of a weak electrolyte, which is a first point towards the building of a model.

INTRODUCTION



La chromatographie préparative liquide-solide est une technique en fort développement, notamment pour l'extraction et la purification des biomolécules. Son succès provient, pour une part importante, des performances obtenues à l'échelle analytique, où, en choisissant soigneusement le support adsorbant et les conditions d'élution (pH, force ionique, gradients...), on parvient à déterminer quantitativement de nombreuses espèces dans les mélanges complexes. Paradoxalement, certaines des difficultés qu'elle rencontre sont dues à ce succès ; trop souvent, elle est conçue comme une extrapolation de la chromatographie analytique : augmentation de la taille de la colonne et de la charge à séparer.

Le problème dans sa globalité est complexe, et nous ne traiterons ici que ce qui concerne la chromatographie frontale d'échange d'anions. Il comprend à la fois des aspects thermodynamiques (équilibre), cinétiques (transfert de matière entre phases ; les cinétiques des réactions mises en jeu semblent en général négligeables) et hydrodynamiques.

La description de l'**hydrodynamique** d'une colonne est un sujet en soi, bien identifié, qui peut être traité indépendamment des réactions qui se produisent dans la colonne. Nous la représentons par le modèle des mélangeurs en cascade.

Nous ne prendrons pas en compte les aspects **cinétiques** car leur étude nécessite la connaissance préalable des réactions mises en jeu, et de leurs **équilibres**. Par ailleurs, si on dispose de cette connaissance, on peut espérer représenter le comportement d'une colonne par extension des méthodes de l'adsorption non-linéaire, notamment la théorie dite "de l'équilibre". Cette théorie fournit en principe le comportement le plus favorable à la séparation, puisque toute dispersion (génératrice d'entropie) est négligée.

Dans la présente contribution, nous nous intéresserons aux réactions et **équilibres** associés et au **comportement de la colonne** qui en résulte dans le cadre de la théorie de l'équilibre, en mettant l'accent sur l'aspect **multiconstituant**.

En effet, la chromatographie d'échange d'ions en présence d'au moins une protéine se pose comme un problème multiconstituant du point de vue de l'échange d'ions, puisque sont mis en jeu la protéine, ainsi que les ions échangeables de la solution. En outre, elle fait intervenir simultanément plusieurs types d'interactions : les réactions d'échange entre la protéine et les ions ou entre les ions de différentes natures, les réactions en solution (essentiellement de dissociation), les réactions de dissociation en phase solide, dans le cas où on utilise un échangeur d'ions faible.

Notre approche consiste à **découpler** les différentes contributions et à les étudier séparément, dans le cas d'un système simple comprenant une protéine (l'albumine du sérum bovin), en vue de les regrouper à terme dans un modèle global.

Nous distinguerons alors trois pôles :

- le solide échangeur d'ions,
- les ions provenant d'un sel ou d'un tampon de pH,
- la protéine,

dont nous examinerons le comportement et les interactions.

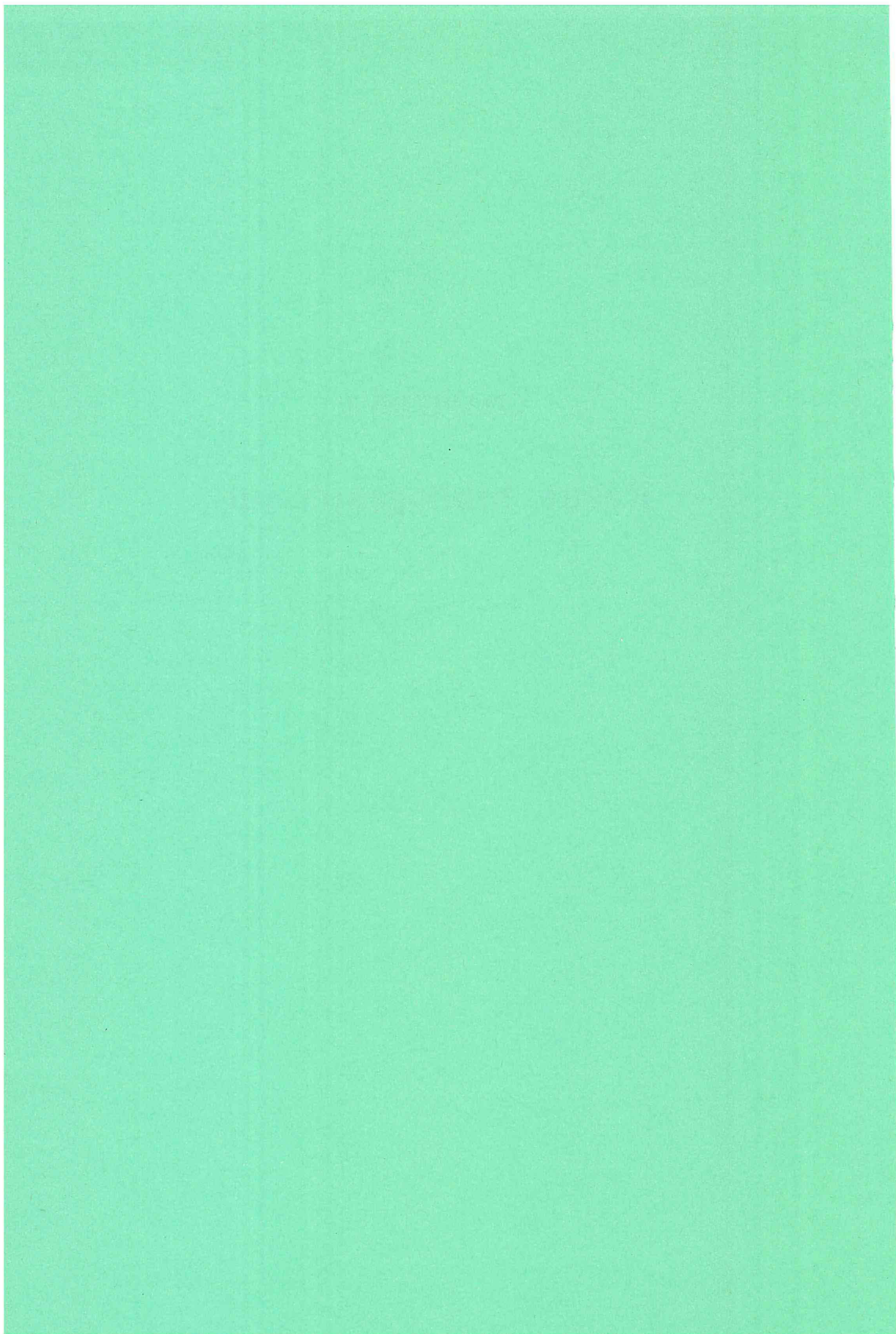
Nous étudierons successivement :

- l'ionisation des échangeurs d'ions faibles en fonction de l'environnement ionique en solution (Chapitre 2),
- la réponse d'une colonne échangeuse d'anions, sans protéine mais avec une réaction de dissociation en phase liquide (notamment la propagation de solutions tampons) (Chapitre 3),
- le comportement de la protéine en solution, et sa fixation sur des supports échangeurs d'anions (Chapitre 4),
- la réponse d'une colonne échangeuse d'anions alimentée par une solution contenant une protéine, en l'absence, puis en présence d'un tampon de pH (Chapitre 5).

Ceci devra nous amener à une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu au cours de la chromatographie frontale des protéines par échange d'ions.

CHAPITRE 1

Revue bibliographique



I. LES PROTEINES

Les protéines jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des systèmes vivants. Elles interviennent en tant que:

- catalyseurs de réactions chimiques particulières (enzymes)
- éléments structuraux
- éléments des systèmes contractiles
- protéines de transport et de stockage
- hormones, agents de protection.

Pourtant, elles sont toutes constituées à partir des mêmes acides aminés, au nombre de vingt.

Nous allons décrire brièvement la composition, la structure des protéines, ainsi que leurs principales propriétés en solution. [LEHNINGER 1977]

I-1 Composition et structure

Les protéines sont composées de carbone, hydrogène, oxygène, azote, presque toutes contiennent aussi du soufre, et certaines d'autres éléments (phosphore, zinc, cuivre, fer). Elles sont formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques, grands polymères non ramifiés constitués d' α aminoacides liés les uns aux autres par liaison peptidique, qui proviennent de l'élimination d'une molécule d'eau entre le carboxyle d'un aminoacide et la fonction aminée du suivant. Chaque protéine possède une séquence spécifique d'acides aminés, et une masse molaire pouvant varier de 6 000 à plusieurs millions. On distingue les holoprotéines, contenant uniquement des aminoacides et les hétéroprotéines qui comprennent également d'autres composés organiques ou inorganiques (ex: lipoprotéines, hémoprotéines...).

Chaque protéine possède une forme tridimensionnelle caractéristique ou conformation, qui détermine deux grandes classes:

- les protéines fibreuses, constituées de chaînes peptidiques parallèles et allongées, insolubles dans l'eau, jouant un rôle structural
- les protéines globulaires, formées de chaînes polypeptidiques disposées en pelotes sphériques ou ovoïdes, généralement solubles, ayant un rôle dynamique dans la cellule.

La conformation d'une protéine peut être décrite à quatre niveaux:

- la structure primaire désigne la séquence des aminoacides,
- la structure secondaire correspond à la disposition des chaînes polypeptidiques sous forme hélicoïdale, très nette dans le cas des protéines fibreuses,
- la structure tertiaire correspond à la manière dont les chaînes polypeptidiques sont repliées dans les structures globulaires,

- la structure quaternaire désigne l'arrangement dans l'espace des chaînes polypeptidiques des protéines dites oligomériques, c'est à dire contenant plusieurs chaînes appelées protomères.

D'après cette description, on peut constater que les protéines sont des molécules complexes, et par conséquent fragiles. Elles ne conservent leur conformation et leurs propriétés biologiques que dans un domaine restreint de température et de pH, au-delà duquel elles subissent des modifications : les chaînes polypeptidiques se déroulent ; on dit alors que la protéine est dénaturée, elle perd son activité biologique. Parfois cette dénaturation est complètement réversible et la protéine peut retourner à son état natif, correspondant à sa stabilité maximale.

I-2 Comportement en solution

** Propriétés acido-basiques, point isoélectrique*

Les propriétés acido-basiques des protéines dépendent essentiellement du nombre et de la nature des fonctions ionisables des chaînes latérales des aminoacides constitutifs.

Les protéines, comme les aminoacides et les peptides ont des propriétés amphotères, elles ont une charge nette qui dépend du pH en solution. Il existe un pH, dit point isoélectrique pI, caractéristique de chaque protéine, où la charge nette est nulle : la protéine ne peut migrer dans un champ électrique. A un pH supérieur à ce pI, elle porte une charge nette négative qui augmente avec le pH. De même, à un pH inférieur à ce pI, elle porte une charge nette positive.

La valeur du point isoélectrique dépend du nombre et de la constante d'acidité des chaînes latérales ionisables ; mais la plupart des protéines globulaires ont des pI compris entre 4,5 et 6,5. La courbe de titration de la protéine permet de déduire un certain nombre d'informations sur son comportement acido-basique, toutefois cette courbe dépend fortement des conditions expérimentales, en particulier de la force ionique en solution. [TANFORD 1955 ; EDSALL 1965 ; VAN OS et coll. 1972]

** Solubilité*

La solubilité des protéines globulaires est influencée par quatre paramètres principaux :

- le pH :

Pour une force ionique donnée, le minimum de solubilité d'une protéine correspond à son pH isoélectrique (minimum de répulsion électrostatique).

- la force ionique :

A basse concentration, les sels augmentent la solubilité des protéines, c'est l'effet de "salting-in", dû aux modifications de capacité d'ionisations des groupes ionisables. Si on augmente la concentration en sel, la solubilité des protéines passe par un maximum avant de décroître ; à des concentrations salines élevées, les protéines peuvent être complètement précipitées : effet de "salting-out" ou relargage.

- la nature du solvant :

L'addition de solvants organiques miscibles à l'eau, comme l'éthanol, diminue la solubilité des protéines et provoque leur précipitation.

- la température :

De 0 à 40°C, la solubilité des protéines augmentent avec la température ; au-delà, il y a risque de dénaturation.

Les propriétés spécifiques à l'albumine seront décrites ultérieurement.

II. LES TECHNIQUES DE PURIFICATION

La purification des protéines présente un intérêt croissant, notamment dans les domaines thérapeutique, alimentaire, industriel (utilisation d'enzymes pures comme catalyseurs de réactions chimiques).

Ces séparations résultent souvent de la combinaison de différentes techniques, basées sur les propriétés spécifiques aux protéines : solubilité, taille moléculaire, charge électrique, affinité biologique. La purification met en jeu plusieurs étapes de séparations éventuellement répétées. Compte tenu que le milieu contient généralement trois types d'espèces : l'eau, les sels et les protéines, on peut distinguer trois principaux types de séparation :

- séparation de l'eau : concentration,
- séparation sels - protéines : dessalage,
- séparation des protéines entre elles : c'est la purification proprement dite.

II-1 Précipitation

Elle est obtenue en faisant jouer l'un des quatre paramètres précédemment cités. Il s'agit de la méthode la plus ancienne, elle présente l'inconvénient d'être peu spécifique et risque de provoquer une dénaturation partielle des protéines. Une application importante est la purification de l'albumine par la méthode de Cohn.

II-2 Méthodes basées sur la taille moléculaire

En raison de leur taille importante, les protéines peuvent être facilement séparées des "petites" molécules. On peut citer à ce propos les procédés à membranes et la chromatographie d'exclusion.

Les principaux procédés à membranes sont la dialyse et ses dérivés, ainsi que l'ultrafiltration.

La dialyse est une technique très simple qui utilise une membrane semi-perméable qui retient les protéines mais permet le passage de l'eau, des sels et des molécules de petite taille.

En ultrafiltration, le passage des petites molécules est forcé par l'application d'une pression sur la membrane. Les seuils de coupure des membranes peuvent varier de 1000 à 300 000 daltons. [STRATHMAN 1985]

On peut remarquer que ces méthodes s'appliquent plutôt aux opérations de dessalage ou de concentration.

La chromatographie d'exclusion ou filtration sur gel utilise une colonne remplie de billes d'un matériau poreux. Selon leur taille, les protéines et autres molécules pénètrent plus ou moins à l'intérieur des pores ; elles traversent ainsi la colonne à des vitesses différentes, les plus petites étant les plus retardées, et sortent donc dans l'ordre décroissant des masses molaires. Cette méthode est d'autant plus performante que les tailles des molécules à séparer sont plus éloignées. Notons que même si elle est désignée parfois en termes de chromatographie, elle ne résulte pas d'un processus d'adsorption. [JANSON-HEDMAN 1982 ; MOORE 1988 ; JANSON-RYDEN 1989]

On peut encore évoquer un autre mode de séparation, basé celui-ci sur la sédimentation. Il s'agit de l'ultracentrifugation, au cours de laquelle l'accélération de la pesanteur (g) est remplacée par une accélération centrifuge développée par un rotor, pouvant atteindre des centaines de milliers de g. [AUDIGIE 1982]

II-3 Electrophorèse

Le terme électrophorèse couvre une gamme étendue de techniques. Dans tous les cas, l'échantillon contenant les protéines à séparer est placé dans un champ électrique qui provoque un déplacement des protéines chargées. La vitesse de migration d'une telle protéine est proportionnelle au champ électrique appliqué. Le facteur de proportionnalité est défini comme la mobilité électrophorétique : c'est une propriété intrinsèque à chaque protéine. Ainsi, les protéines migrent à des vitesses différentes ce qui permet de les séparer. En pratique, la

séparation est peu souvent effectuée en veine liquide à cause de la convection, mais plutôt sur un gel support, qui peut être inerte ou interagir avec les protéines.

Sans être exhaustif, on peut citer les techniques suivantes : [JANSON-RYDEN 1989]

** l'électrophorèse sur gel*

Tous les points du support sont au même pH, et les protéines migrent en fonction de leur charge nette. Celles qui ont un point isoélectrique égal au pH du tampon restent neutres et ne se déplacent pas. On peut jouer sur un certain nombre de paramètres, comme la nature du gel, du tampon, la présence de détergents etc.

** l'isoélectrofocalisation*

C'est une électrophorèse menée dans un gradient de pH établi sur un gel : les protéines chargées migrent jusqu'à la zone de pH qui correspond à leur point isoélectrique, et demeurent focalisées en ce point. Cette technique peut être appliquée à l'établissement de courbes de dosage des protéines. [ROSENGREN 1977]

** l'immunoélectrophorèse*

L'électrophorèse est suivie d'une réaction immunitaire, réalisée par diffusion d'antigènes et anticorps.

** les techniques bidimensionnelles*

Elles consistent à coupler deux principes de séparation électrophorétique appliquée à un même échantillon dans deux directions orthogonales.

Si elles connaissent un grand succès à l'échelle analytique, les techniques électrophorétiques sont encore limitées au niveau préparatif (chaleur importante provoquée par effet Joule, difficulté de récupération des fractions séparées, risques de contamination). C'est pourquoi on leur préfère la plupart du temps les méthodes chromatographiques.

II-4 Les séparations par adsorption

Ce terme regroupe les procédés au cours desquels une phase mobile, liquide dans le cas des protéines, interagit avec une phase solide, l'adsorbant. Celui-ci est presque toujours

disposé en lit fixe, dans une colonne, et les solutions sont percolées au travers de ce milieu poreux. Quel que soit le mode de mise en oeuvre, le protocole comprend généralement les étapes suivantes :

- contact entre la phase liquide et le solide, au cours duquel certaines protéines sont adsorbées,
- lavage permettant d'éliminer les protéines faiblement ou non fixées,
- élution par une phase mobile appropriée,
- régénération du solide, afin qu'il retrouve son état initial.

L'adsorbant est constitué d'une matrice plus ou moins inerte, à laquelle sont fixés des ligands, dont la nature détermine le mode d'interaction protéine-adsorbant. La variété des chaînes d'acides aminés présents dans les protéines permet plusieurs types d'interactions, indiquées dans le tableau I-1.

Le choix de l'adsorbant ou de la combinaison d'opérations dépend du type de séparation recherchée. Souhaite-t-on obtenir une seule protéine ou bien un mélange? Quel est le degré de pureté demandé ? etc..

Aucune règle générale ne peut être donnée. Nous allons passer rapidement en revue les principaux types de procédés d'adsorption. Pour plus de détails on pourra consulter les références suivantes : [ANDRADE 1985 ; CHASE 1988 ; JANSON-RYDEN 1989]

Principe de la séparation	Nature du ligand	Type de chromatographie
charge nette point isoélectrique	groupes chargés	échange d'ions focalisation
hydrophobicité	chaînes d'hydrocarbure	hydrophobe en phase inverse
hydrophilicité	groupes hydroxyles	hydrophile
fonction biologique	protéines/polysaccharides/ petites molécules anticorps	affinité immunosorption
présence de groupes thiols	sites covalents	covalente
affinité pour les métaux	ions métalliques	par chélates
divers		sur hydroxyapatite

Tableau I-1 : Principaux types de séparations par adsorption.

** la chromatographie d'échange d'ions*

Un échangeur d'ions est un solide chargé qui a la propriété de fixer des ions de manière réversible. Le terme "ions" est utilisé au sens large, puisqu'il comprend les polyélectrolytes comme les protéines. A un pH inférieur à son point isoélectrique, une protéine sera en principe retenue sur échangeur de cations, tandis qu'à un pH supérieur, ce sera sur un échangeur d'anions. Cette dernière opération est la plus fréquemment utilisée puisque aux pH voisins de la neutralité, auxquels on travaille le plus souvent, la plupart des protéines portent une charge négative.

Pour éluer une protéine adsorbée, il faut diminuer la force d'interaction, soit en modifiant le pH du tampon, ce qui transforme la charge de la protéine, soit en augmentant la force ionique, ce qui provoque une compétition entre les ions de la solution et la protéine pour les sites chargés. Le procédé d'échange d'ions sera développé plus en détail dans la section suivante.

** la chromatofocalisation*

Il s'agit d'une méthode similaire à l'échange d'ions, fonctionnant sur le principe de l'isoélectrofocalisation. Un gradient de pH est formé le long d'une colonne d'échange d'ions par injections successives de plusieurs tampons de pH. Les protéines préalablement fixées sont alors éluées dans l'ordre de leur point isoélectrique.[BERGSTRÖM et coll. 1982 ; SLUYTERMAN et coll. 1978, 1981 ; JANSON-RYDEN 1989 ; ITO 1990]

** la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) et la chromatographie en phase inverse (CPI)*

Le principe repose sur l'interaction entre les régions hydrophobes de la protéine en surface (zones qui ne peuvent pas former de liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau) et des groupements hydrophobes sur l'adsorbant. La densité de ligands est très élevée dans le cas des supports de CPI, ils semblent former une phase continue, ce qui provoque fréquemment une dénaturation des protéines globulaires. De plus, les conditions d'élution sont sévères, on utilise souvent des gradients de solvants organiques. En CIH, par contre, la densité de ligands est beaucoup moins importante, et, comme la force d'interaction est favorisée par une force ionique importante, l'élution peut être obtenue simplement en diminuant la concentration en sel, ou en changeant la polarité du solvant, en ajoutant par exemple de l'éthylène glycol.

** la chromatographie d'affinité*

Elle est basée sur des interactions biospécifiques qui peuvent exister entre une protéine et des petites molécules (acide nucléique, sucre, lectine...), entre un substrat et une enzyme, un anticorps et un antigène (immunosorption) etc. . Dans ce dernier exemple, l'interaction est extrêmement spécifique, dans d'autres cas, il se peut qu'elle soit sélective seulement pour un groupe de protéines. Dans tous les cas, il faut que le ligand puisse former des complexes réversibles avec la protéine à adsorber, avec une spécificité appropriée, et une force d'interaction suffisante, mais permettant quand même l'élution, dans des conditions pas trop sévères. Il faut aussi que le ligand puisse être immobilisé sur une matrice insoluble [SCOUTEN 1981 ; HILL et coll. 1983 ; ARNOLD et coll. 1985].

** l'adsorption covalente*

Certaines protéines peuvent former une liaison covalente stable avec un adsorbant. L'utilisation la plus répandue de cette méthode consiste à séparer des protéines portant des groupes thiols accessibles susceptibles de former des ponts disulfures avec des adsorbants appropriés. Les protéines fixées sont éluées avec des solvants réducteurs. On peut améliorer la sélectivité en utilisant des ligands immobilisés capables de former des liaisons covalentes avec un seul type de protéines.

** l'adsorption sur ion métallique immobilisé*

La plupart des protéines peuvent former des complexes avec des ions métalliques. Dans ce cas, une substance chélatante est fixée sur un support ; on ajoute des ions métalliques, qui forment un complexe. Celui-ci doit être tel que ces ions aient encore des sites "libres", capables de fixer des protéines. L'élution est effectuée en injectant un gradient de pH, des ligands compétitifs, ou des solvants organiques.

Toutes ces opérations sont mises en oeuvre essentiellement dans deux types de réacteurs : le réacteur agité fermé dans le cas d'une opération discontinue, et la colonne chromatographique à lit fixe pour un fonctionnement plus continu . Cette dernière est de loin la plus répandue au niveau industriel car elle offre beaucoup d'avantages par rapport au réacteur agité (pas de manipulation de solide). On voit apparaître également l'emploi de réacteurs à lit fluidisé qui permettent la purification de solutions non clarifiées au préalable [BISCANS 1985 ; BISCANS et coll. 1985 ; SANCHEZ et coll. 1985 ; VAN DER WIEL et WESSELINGH 1987 ; VAN DER WIEL 1989].

Comme on peut le constater, les techniques de purification basées sur l'adsorption présentent une importante diversité. Nous allons nous attacher dans ce qui suit à décrire plus précisément ce qui concerne l'échange d'ions.

III. LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

III-1 Les matériaux échangeurs d'ions

Un échangeur d'ions est composé d'une matrice substituée de groupements chargés positivement dans le cas d'un échangeur d'anions, négativement dans le cas d'un échangeur de cations. Ces groupements, ainsi que la matrice peuvent être de différentes natures.

** les groupes fonctionnels*

On qualifie ces groupes de "forts" lorsqu'ils sont dérivés d'un acide fort (ex. sulfonate, sulfopropyle) ou d'une base forte (ex. amine quaternaire), et de "faibles" lorsqu'ils dérivent d'un acide faible (ex. carboxyméthyle) ou d'une base faible (ex. diaminoéthyle). Les échangeurs forts ont une capacité d'échange constante, puisque leurs groupements sont toujours ionisés. Les échangeurs faibles, quant à eux, voient leur capacité varier en fonction de l'environnement ionique en solution, en particulier du pH : la capacité d'un échangeur type acide faible augmente avec le pH, tandis que celle d'un échangeur type base faible diminue avec le pH. Notons que ces capacités peuvent tendre vers zéro à partir de certaines valeurs de pH.

** qualités requises pour la chromatographie d'échange d'ions des protéines*

En raison de la spécificité des protéines, les échangeurs d'ions utilisés pour leur purification doivent posséder un certain nombre de propriétés :

- la matrice doit être hydrophile, insoluble et stable, en particulier elle doit résister au lavage par des solutions acides ou basiques ; elle ne doit pas occasionner d'interactions donnant lieu à une adsorption non spécifique,
- malgré la taille des protéines, les sites chargés doivent être faciles d'accès, grâce à une structure macroporeuse de l'échangeur. Les limitations cinétiques seront ainsi diminuées.
- les échangeurs d'ions doivent être mécaniquement stables.[KOPACIEWICZ et coll. 1987],
- il est préférable qu'ils ne gonflent pas trop sous l'effet d'un changement de pH ou de force ionique (pour ne pas perturber l'hydrodynamique de la colonne ou engendrer des surpressions),

- la capacité d'échange doit être suffisante pour permettre l'adsorption d'une quantité importante de protéines, mais la densité de charge ne doit pas être trop forte pour ne pas provoquer de dénaturation. Elle est généralement de l'ordre de 100 à 500 micromoles par ml de lit, c'est à dire 5 à 10 fois inférieure à celle des échangeurs "classiques" (utilisés pour les "petits" ions, en traitement des eaux).

Les échangeurs d'ions se trouvent le plus souvent sous forme de billes sphériques, mais peuvent exister parfois sous forme de fibres. Ils sont classés en termes de basse, moyenne ou haute pression (haute performance), ce qui fait référence à la perte de charge qui s'établit aux bornes d'un lit fixe. Celle-ci est inversement proportionnelle au carré du diamètre des billes et croît linéairement avec la longueur du lit et le débit volumique. Pour les applications "basse pression", on utilise des particules de diamètre 50 μm et plus, et on travaille à débit peu élevé. Pour les applications "haute pression", les matériaux sont plus rigides, permettent des débits élevés, les diamètres sont de l'ordre de 30 μm ou moins ; c'est le domaine de la HPLC. [BOISSEL et coll. 1983]

** Nature de la matrice*

- les résines :

Ce sont typiquement les échangeurs d'ions classiques, utilisés en traitement des eaux, des métaux etc.. Elles sont généralement fabriquées par polymérisation de styrène, ou à partir d'un squelette acrylique ou métacrylique, avec un pourcentage plus ou moins élevé de divinylbenzène (DVB) comme agent de réticulation. Elles sont peu utilisables avec les protéines en raison de leurs faibles tailles de pores, leur forte capacité d'échange, et leur nature très hydrophobe, qui provoque des interactions irréversibles. Elles conviennent toutefois pour l'échange de plus petites biomolécules comme les acides aminés ou les antibiotiques [SAMSONOV et coll. 1973 ; VEDENEEVA et coll. 1974 ; YASKOVICH et coll. 1974 ; YAKHONTOVA et coll. 1975 ; KLIKH et coll. 1976 ; KLYUEVA et coll. 1976 ; PRASAD et coll. 1980].

- les échangeurs à base de cellulose :

Ils ont été introduits au milieu des années 50 par Peterson et Sober, et sont toujours utilisées aujourd'hui. Au début, il s'agissait de fibres naturelles, maintenant ces matériaux existent sous forme de grains à base de cellulose, sur laquelle ont été substitués des groupements forts ou faibles [KNIGHT 1967 ; GRAHAM-FOOK 1982 ; BERGENHEM et coll. 1985 ; LEAVER et coll. 1987].

- les échangeurs d'ions à base de dextrane ou d'agarose :

Créés au départ pour la filtration sur gel, les gels de polysaccharide réticulés comme les billes de dextrane ou d'agarose ont été très rapidement utilisés comme supports d'échange d'ions (greffage de sites fonctionnels). Ces polymères très hydrophiles ont généralement une capacité importante en protéines. Ils présentent toutefois l'inconvénient de gonfler ou de se comprimer en fonction de la force ionique de la solution. Commercialisés essentiellement par Pharmacia (Sephadex, Sepharose), ils ont été utilisés dans le cadre de nombreux travaux. [JANSON-HEDMAN 1982 ; ; BERGLÖF et coll. 1983 ; YAMAMOTO et coll. 1983 ; TSOU-GRAHAM 1985 ; STROBEL 1987 ; SKIDMORE-CHASE et coll. 1988 ; SKIDMORE et coll. 1990 ; TSAI et coll. 1990]

S'apparentent aussi à cette catégorie les échangeurs basés sur des polymères organiques hydrophiles synthétiques, comme par exemple les copolymères acryliques type Trisacryl (IBF) et les Fractogels (Merck).

- les échangeurs d'ions à matrice de silice :

Un avantage des billes de silice réside dans leurs propriétés physiques puisqu'elles offrent une grande résistance mécanique et ne gonflent pas ; elles peuvent donc être employées pour des techniques haute pression [VANACEK et coll. 1980 ; GOODING-SCHMUCK 1985 ; ROUNDS et coll. 1986 ; SCHMUCK et coll. 1986]. Toutefois, elles ne peuvent être utilisées tel quel, car le caractère électronégatif de la surface dû aux fonctions silanol entraîne une adsorption presque irréversible des macromolécules. Dans les années 70 a été introduit le greffage de polymères hydrophiles sur la silice. Le revêtement des pores par des polymères réticulés a alors permis dans les années 80 le développement de nouveaux échangeurs composites comme les Spherodex, les Spherosils (IBF) . [MIRABEL 1980 ; BISCANS 1985 ; TAYOT 1986 ; VAN DER WIEL 1989]. Ces matériaux sont utilisés à grande échelle, notamment pour le fractionnement du plasma [STOLTZ et coll. 1987].

On trouvera des détails complémentaires sur les matériaux échangeurs d'ions appliqués à la séparation de protéines dans les références suivantes : SCOPES 1982 ; CHASE 1988 ; YAMAMOTO et coll. 1988 ; JANSON-RYDEN 1989.

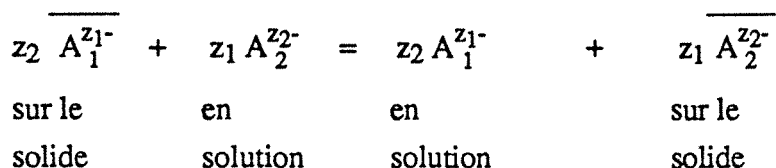
III-2 L'équilibre d'échange d'ions

** définition*

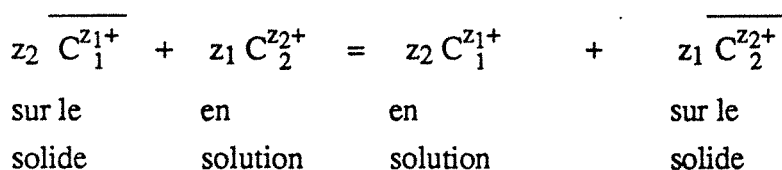
Pour satisfaire les contraintes d'électroneutralité, les charges portées par le support échangeur d'ions doivent être compensées par des ions de charge opposée ; ceux-ci peuvent

alors être échangés avec les ions de même signe en solution. La réaction s'écrit de manière analogue à une réaction chimique :

Echange d'anions :



Echange de cations :



A la différence de l'adsorption, l'échange d'ions obéit à une relation stoechiométrique, qui implique la présence de deux ions de même signe au moins.

Lorsqu'un grain de support échangeur d'ions est placé dans une solution d'électrolyte, il se produit un certain nombre de phénomènes jusqu'à l'établissement de l'équilibre thermodynamique. Outre l'échange d'ions, on observe des processus de sorption de solvant et de solutés ioniques ou non, que nous allons décrire brièvement. [HELFFERICH 1962 ; NICLOUD 1987].

Sorption de solvant - gonflement :

Le solvant pénètre dans les particules de support à base de polymères, d'une part pour solvater les parties ioniques ou polaires des chaînes, d'autre part pour des raisons d'osmose. Si la concentration en électrolyte à l'intérieur d'un grain est plus élevée qu'en solution, la différence de potentiel chimique provoque un transfert de solvant vers le grain (ceci est valable aussi pour les solutés non ioniques). Le support étant insoluble, il oppose une résistance à cette pénétration de solvant, et il en résulte un certain gonflement. Celui-ci est favorisé principalement par une faible réticulation du polymère, c'est à dire une matrice peu rigide, un solvant polaire (comme l'eau), une forte capacité d'échange, une faible concentration en solution, une forte hydratation des ions fixés. On peut noter que les supports macroporeux souvent plus réticulés gonflent moins que ceux de type gel, et que les supports faibles gonflent plus que les forts.

Sorption d'électrolytes - effet Donnan :

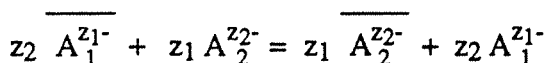
Considérons un support échangeur d'anions sous forme A^- dans une solution contenant l'électrolyte C^+A^- . En l'absence d'interaction, la concentration en C^+A^- deviendrait identique à l'intérieur et à l'extérieur du grain sous l'effet de la diffusion. Or comme la concentration en A^- est élevée à l'intérieur du grain (d'autant plus que la capacité d'échange est élevée), les anions libres A^- ne pénétreront que faiblement dans les pores. Par conséquent, les cations C^+ également, à cause de la contrainte d'électroneutralité dans les pores. Il en résulte que l'électrolyte est partiellement exclu de l'intérieur du grain : c'est l'exclusion de Donnan. Elle est favorisée notamment par une forte capacité d'échange, un fort taux de réticulation, une faible concentration en solution.

Sélectivité de l'échange d'ions :

Soit un support échangeur d'anions sous forme A_1^- mis en contact avec une solution contenant le seul anion A_2^- . A l'équilibre, le support et la solution contiennent des proportions différentes de A_1^- et de A_2^- . Ce phénomène de sélectivité résulte d'une différence d'affinité des anions pour les supports. On peut classer les anions (et bien sûr les cations) par ordre d'affinité vis à vis des supports (séries de Hofmeister).

* Représentation de l'équilibre d'échange d'ions

Considérons l'échange binaire, anionique par exemple, dans le cas d'un électrolyte fort et d'une résine forte :



L'échange étant normalement réversible, on peut appliquer la loi d'action de masse :

$$K_{2/1} = \frac{(\overline{A_2^{z_2^-}})^{z_1}}{(A_1^{z_1^-})^{z_2}} \frac{(A_1^{z_1^-})^{z_2}}{(\overline{A_2^{z_2^-}})^{z_1}}$$

où $(A_i^{z_i^-})$: concentration en solution (éq/l)

et $(\overline{A_i^{z_i^-}})$: concentration sur le support (éq par unité de support par exemple).

$K_{2/1}$ serait une constante à T et P constantes si on utilisait les activités. Il s'agit ici d'un coefficient de sélectivité défini en termes de concentrations ; on l'écrit aussi avec les titres ioniques :

$$y_i = \frac{\overline{(A_i^{z_i})}}{Q} \quad \text{fraction ionique de } i \text{ sur le support}$$

Q : capacité totale du support

$$x_i = \frac{(A_i^{z_i})}{N} \quad \text{fraction ionique de } i \text{ en solution}$$

N : normalité de la solution

$$K_{x\ 2/1} = \frac{(y_2)^{z_1}}{(x_2)^{z_1}} \frac{(x_1)^{z_2}}{(y_1)^{z_2}} = K_{2/1} \left(\frac{N}{Q} \right)^{z_1 - z_2}$$

Dans le cas où l'échange d'ions est le seul équilibre mis en jeu, cette relation permet de calculer la composition ionique sur le support connaissant la concentration en solution, en écrivant également la somme des fractions ioniques et l'électroneutralité dans chaque phase. On peut représenter graphiquement l'équilibre d'échange d'ions binaire grâce aux isothermes y_i vs x_i (ou $\overline{C_i}$ vs C_i), pour une normalité donnée (Figure 1-1).

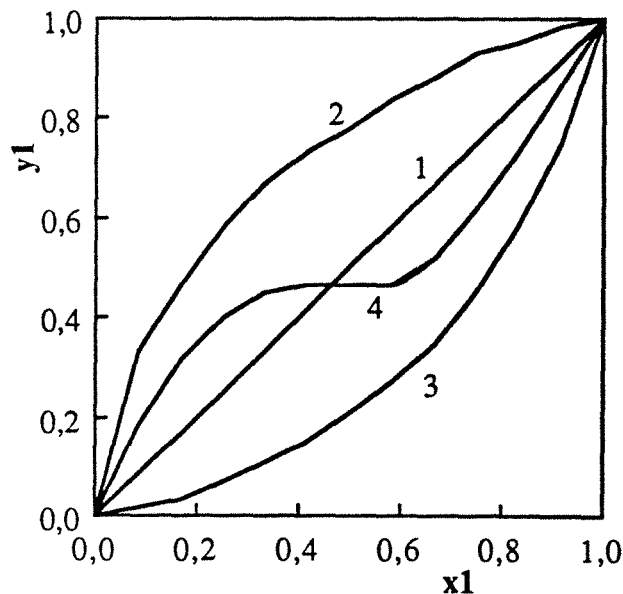


Figure 1-1 : 1 : isotherme linéaire $K_{x\ 2/1} = 1$; 2 : isotherme concave $K_{x\ 2/1} > 1$ (échange favorable à l'ion 1) ; 3 : isotherme convexe $K_{x\ 2/1} < 1$ (échange défavorable à l'ion 1) ; 4 : isotherme sigmoïde (inversion d'affinité).

On montre que la normalité de la solution n'a pas d'influence sur un échange d'ions homovalents, alors qu'elle intervient sur un échange hétérovalent.

L'écriture des relations reste valable pour un système à plusieurs constituants échangeables, on a alors un système d'équations. Toutefois, les choses peuvent se compliquer singulièrement dans le cas où interviennent des équilibres en solution (dissociation, complexation, précipitation etc.) ou des équilibres sur le solide (cas des supports faibles).

Si on ne peut pas découpler les phénomènes, on peut toujours représenter l'équilibre par une courbe donnant la concentration en soluté ionique i dans le solide en fonction de la concentration en i dans la solution dans des conditions données. La normalité n'est alors plus constante. On arrive à des isothermes analogues à celles obtenues en adsorption dites de Freundlich ou de Langmuir (Figure 1-2).

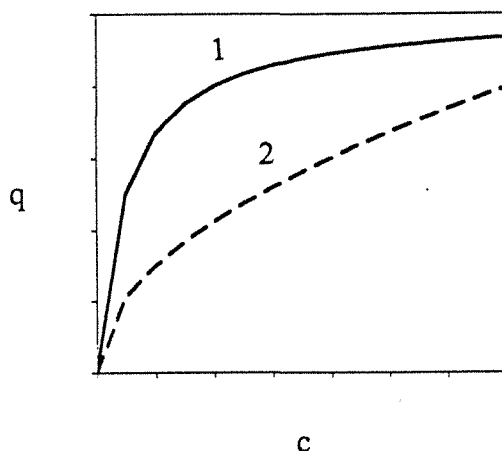


Figure 1-2 : 1 : isotherme de Langmuir $\bar{C} = \frac{aC}{1+bC}$;
2 : isotherme de Freundlich $\bar{C} = a C^n$ $n < 1$

Nous verrons que cette représentation contient beaucoup moins d'informations que l'isotherme d'échange d'ions binaire pour ce qui concerne la description des processus chromatographiques.

** le cas des protéines*

Ce cas est bien plus complexe que l'échange d'ions binaire, puisque la protéine a une charge dont le signe et la valeur dépendent des conditions en solution. Toutes choses étant fixées par ailleurs, on peut décrire l'échange entre une protéine P de valence Z_P et des "petits" ions (de faible masse molaire, de charge constante ; exemple : Cl^-) notés I de valence Z_I par :

$$Z_P \overline{I} + Z_I P = Z_I \overline{P} + Z_P I$$

C'est le modèle de déplacement stoechiométrique introduit par BOARDMAN et PARTRIDGE [1955]. Ce modèle a été repris et critiqué dans le cadre de certains travaux [KOPACIEWICZ et coll. 1983 ; ROUNDS et coll. 1984 ; VELAYUDHAN-HORVATH 1986 ; REGNIER 1987 ; REGNIER-MASZAROFF 1987 ; YAMAMOTO et coll. 1988 ; WHITHLEY et coll. 1989].

On ne peut pas l'utiliser a priori pour construire un isotherme binaire, car la valence de la protéine est souvent mal connue, la "normalité" en solution également ; en outre, la protéine se trouve la plupart du temps en milieu tampon, c'est à dire multiconstituant du point de vue de l'échange d'ions. De plus, on n'est jamais certain que la réversibilité soit totale. Les auteurs supposent généralement un partage constant de la protéine entre la phase liquide et la phase solide, ceci peut être vrai sur un domaine limité.

Dans l'ensemble, l'équilibre d'échange d'ions est plutôt décrit en termes d'adsorption, seul le partage de la protéine entre les phases est pris en considération, on néglige (ou on ne représente pas) les variations de concentration des autres espèces. L'équilibre d'échange d'ions est alors donné sous la forme d'un isotherme de Langmuir [BISCANS 1985 ; GRAHAM et coll. 1987 ; HUANG et HORVATH 1987 ; VAN DER WIEL 1987 ; CHASE 1988 ; PHILIPS et coll. 1988 ; GOSLING 1989 ; SKIDMORE et CHASE 1990] ou de Langmuir modifié [HUANG et coll. 1990 ; SKIDMORE et coll. 1990].

Notons que certains travaux ont pour objet la description thermodynamique fine des phénomènes à l'échelle microscopique, et s'attachent à décrire les interactions électrostatiques et autres entre la protéine et le support [NORDE et coll. 1978, 1979, 1985 ; LUNDSTRÖM 1985 ; LUNDSTRÖM et coll. 1989 ; MASZAROFF et coll. 1990], mais leurs résultats ne sont pas adaptables directement à l'échelle macroscopique.

III-3 Approches théoriques de la chromatographie

En chromatographie d'échange d'ions classique (disons traitement des eaux pour fixer les idées), on élue généralement les ions fixés de manière isocratique, ie en faisant percoler dans la colonne une solution de composition constante. Lorsqu'on travaille avec des protéines, on est souvent obligé d'avoir recours à d'autres modes d'élution, comme par exemple l'élution par échelons ou par gradient de force ionique ou de pH. On peut choisir aussi la chromatographie de déplacement, qui consiste à envoyer dans la colonne un déplaceur, qui a plus d'affinité pour le support que les ions fixés ; ceux-ci sortent alors à la même vitesse, par zones successives rectangulaires [PHILIPS et coll. 1988].

Quel que soit le mode d'élution, il est intéressant de connaître le comportement des constituants, au cours des différentes opérations, pour pouvoir par exemple prévoir où aura lieu la fuite du constituant que l'on cherche à fixer au cours de l'adsorption, les points où sortiront les différentes espèces au cours de l'élution, la forme des pics etc.. Ceci permettra de dimensionner correctement la colonne et d'optimiser le procédé chromatographique (choix des phases mobiles, du mode d'élution). Dans cette optique, nous allons présenter les grandes lignes des théories de la chromatographie, qui ne sont d'ailleurs pas restreintes à l'échange d'ions. Nous évoquerons principalement trois modèles : la théorie des plateaux, la théorie de l'équilibre et les modèles basés sur la cinétique.

** la théorie des plateaux*

Proposée par Martin et Synge dans les années 40, par analogie avec les méthodes de la distillation, elle consiste à schématiser la colonne par une cascade de plateaux théoriques équivalents, dans lesquels le rapport volumique entre la phase liquide et la phase solide est constant, et pour lesquels l'équilibre est atteint instantanément (pas de limitation cinétique). Le nombre de plateaux est un critère d'efficacité de la colonne ; il peut être calculé sur le principe de l'équation de Van Deemter [Guiochon 1979], ou bien par analyse du pic chromatographique selon la théorie des moments [VILLERMAUX 1973, 1981, 1982 ; GAREIL-ROSSET 1982 ; GAREIL et coll. 1979, 1980, 1983 ; JAULMES et coll. 1987]. De là, on peut déduire aisément le temps de rétention d'un soluté, le pouvoir de résolution de la colonne, la largeur des pics etc.. Cette théorie a fait l'objet de nombreux travaux revus dans le livre de YAMAMOTO et coll. [1988].

Elle est surtout bien adaptée à la chromatographie linéaire, c'est à dire lorsque le partage du soluté entre les deux phases est constant (isotherme linéaire), ce qui est généralement le cas à l'échelle analytique. Le passage de l'échelle analytique à l'échelle préparative a été étudié dès les années 70, en examinant l'influence de certains paramètres, comme le volume d'échantillon injecté [SCOTT-KUCERA 1973, 1976 ; WEHRLI et coll. 1976 ; COQ et coll. 1979 ; BARFORD et coll. 1978 ; DE JONG et coll. 1978, 1980, 1981 ; HUPE-LAUER 1981 ; GHODBANE-GUIOCHON 1988] dans l'hypothèse du partage linéaire, puis non linéaire. Cette théorie a été appliquée au cas des protéines [YAMAMOTO et coll. 1983 (a), (b), 1988]. Une revue du développement de la chromatographie préparative des biomolécules a été récemment effectuée par CRAMER et SUBRAMANIAN [1989].

** la théorie de l'équilibre*

Elle permet de décrire le transport de solutés en colonne dans l'hypothèse où l'équilibre est atteint en tout point à tout instant, en prenant en compte uniquement les réactions type adsorption / échange d'ions, dans le cas linéaire ou non linéaire, et pour une injection échelon [KLEIN et coll. 1967 ; TONDEUR 1968, 1969, 1981 ; RHEE et coll. 1970 ; RHEE 1981 ; RODRIGUES 1981 ; TONDEUR et BAILLY 1986].

Elle est basée sur une équation dite de propagation, obtenue à partir d'un bilan de matière différentiel, qui donne la vitesse à laquelle une concentration C_i se déplace le long de la colonne. Cette vitesse est fonction de la dérivée partielle $\partial \overline{C_i} / \partial C_i$, qui est aisément accessible (dérivée totale) lorsque i est le seul soluté : c'est la pente de l'isotherme.

Cette théorie permet une description semi quantitative des variations de concentrations dans la colonne, son intérêt majeur est de pouvoir traiter des problèmes non-linéaires, multiconstituants [HELFFERICH et KLEIN 1970 ; CLIFFORD 1982 ; HELFFERICH 1986].

Elle s'applique d'autant plus facilement que l'équilibre peut être décrit simplement (pour l'échange d'ions : loi d'action de masse à sélectivité constante), mais commence à s'étendre aux cas où doivent être pris en compte les réactions homogènes, comme la dissociation, ou hétérogènes telles que la précipitation et la dissolution. [KLEIN 1981 ; SCHWEICH et SARDIN 1981 ; HELFFERICH et BENNETT 1984 ; HWANG et coll. 1988]. Cette théorie a été largement utilisée dans le cas de l'échange d'ions simples [CLIFFORD 1978] mais assez peu dans le domaine des bioproduits [YANG et WANG 1987 ; YAMAMOTO et coll. 1987 ; HELFFERICH 1990].

** modèle cinétique*

Au cours du transport en colonne, on n'observe pas dans la réalité les transitions nettes prévues lorsque l'on prend en compte uniquement l'équilibre (élargissement des fronts etc.). Ceci est dû essentiellement à des raisons :

- hydrodynamiques (dispersion axiale)
- cinétiques.

On peut construire des modèles basés sur l'équilibre et prenant en compte la dispersion hydrodynamique (modèle des mélangeurs en cascade) [JAUZEIN 1988 ; CHENEVIERE 1989].

On peut aussi prendre en compte la cinétique de transfert de matière entre phases [VILLERMAUX 1982 ; RUTHVEN 1988 ; GORIUS 1988]. On distingue généralement :

- la résistance au transfert externe, pour laquelle la limitation est due à la diffusion du soluté à travers le film entourant la particule,

- la résistance au transfert interne, celui-ci étant limité par la diffusion au sein même de la particule

La diffusion dans les échangeurs d'ions a été étudiée en détail par HELFFERICH [1962].

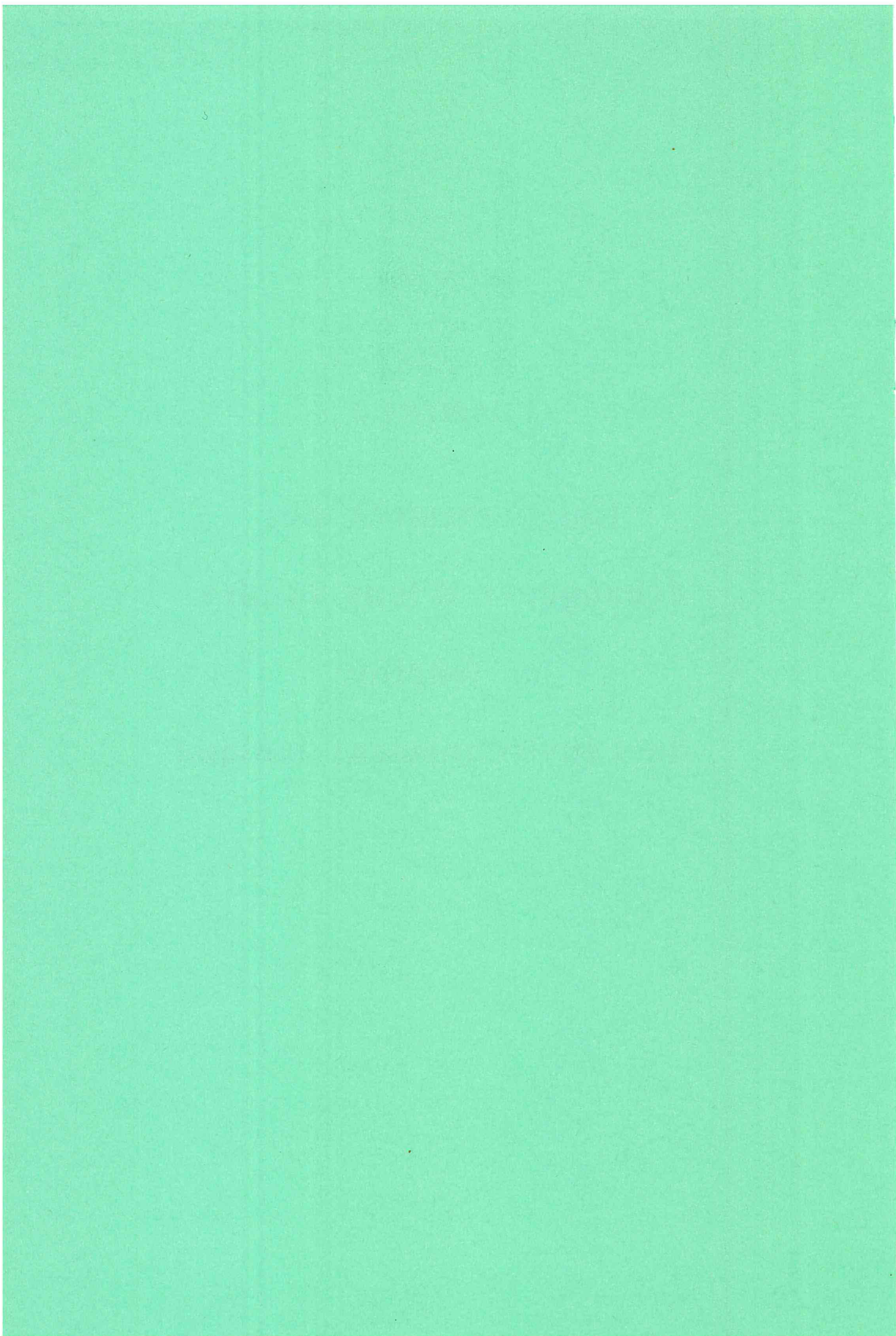
Les modèles de la littérature concernant les biomolécules développés à partir des lois cinétiques sont basées sur une loi d'équilibre simple, d'adsorption type Langmuir, même pour l'échange d'ions. Une revue a été effectuée par COWAN et coll. [1989].

Les principaux modèles sont fondés sur :

- le modèle des résistances en série, qui consiste à distinguer plusieurs étapes, comme la diffusion dans le film, dans les pores etc. [GRAHAM-FOOK 1982 ; TSOU-GRAHAM 1985 ; PHILIPS et coll. 1988]
- le modèle du coeur rétrécissant [GRAHAM et coll. 1987 ; VAN DER WIEL 1989], appliqué habituellement aux solides catalytiques consommables, et dont l'utilisation demeure restreinte. [KOPACIEWICZ et coll. 1987]
- un modèle pseudo-cinétique dans lequel le paramètre de résistance au transfert est lié à la représentation de l'équilibre [SKIDMORE-CHASE 88 ; SKIDMORE et coll. 1990]. Ce modèle assez simple est limité dans ses applications.

CHAPITRE 2

Comportement des échangeurs d'ions faibles en fonction de l'environnement ionique



INTRODUCTION

Les échangeurs d'ions de type faible, c'est à dire substitués de groupes fonctionnels dérivés des acides et des bases faibles, portent une charge superficielle susceptible de changer en fonction de la composition de la solution dans laquelle ils se trouvent. Autrement dit, ils ont une capacité apparente d'échange variable⁽¹⁾, ce qui est déterminant pour la description du processus d'échange d'ions.

Pour illustrer l'importance de ce phénomène, nous allons prendre l'exemple d'un échange chlorure-nitrate réalisé dans une colonne remplie d'un support échangeur d'anions comportant des sites faibles, effectué à deux pH différents (toutes conditions étant égales par ailleurs).

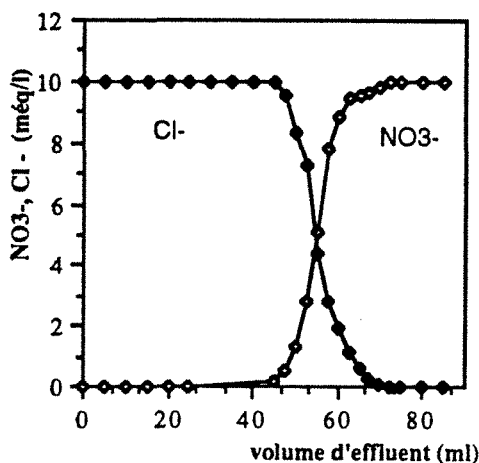


Figure 2-1a : Echange chlorure nitrate à pH 5.8. Colonne équilibrée par NaCl 10 mEq/l pH 5.8, alimentée par KNO₃, 10 mEq/l, pH 5.8

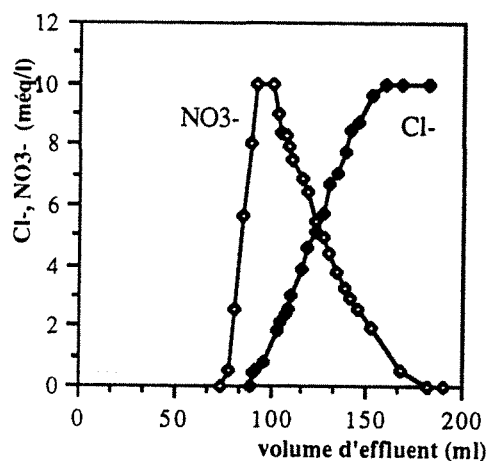


Figure 2-1b : Echange nitrate-chlorure à pH "acide". Colonne équilibrée par KNO₃ 10 mEq/l pH 5.8, alimentée par HCl 10 mEq/l, pH 2.15

Support DEAE Spherodex LS, colonne de volume 15 ml, débits 2ml/min.

(1) Précisons l'emploi du terme "capacité". On distingue:

- la capacité totale qui est le nombre de groupements fonctionnels rapporté à une quantité caractéristique d'échangeur d'ions (masse sèche sous une certaine forme ionique, ex: mEq/gsupport sec sous forme H⁺; volume de lit fixe, ex: mEq/ml de lit etc.).
- la capacité apparente qui est le nombre de groupements ionisés ramené à la quantité d'échangeur d'ions. Elle est inférieure ou égale à la capacité totale dans le cas de groupes fonctionnels ionisables (échangeurs faibles) et dépend des conditions expérimentales. Elle est égale à la capacité totale pour un échangeur fort.
- la capacité de sorption qui désigne la quantité de soluté sorbé ramenée à la quantité d'échangeur d'ions; elle dépend des conditions expérimentales.
- la capacité utile qui est la capacité utilisée en régime cyclique stationnaire.
- la capacité dynamique qui est la capacité réellement utilisée au cours des expériences en colonne, dépendant des conditions opératoires.

Dans le premier cas (Figure 2-1a), les solutions d'équilibration (NaCl 10 méq/l) et d'alimentation (KNO_3 10 méq/l) se trouvent au même pH, la capacité d'échange est constante, tout se passe comme dans le cas d'un échange d'ions binaire classique, seule la réaction d'échange entre en jeu (la nature du cation Na^+ ou K^+ est indifférente). La capacité apparente d'échange calculée par intégration des courbes correspond à 0.035 ± 0.005 méq/ml de colonne.

Dans le second cas (Figure 2-1b), la colonne est équilibrée par une solution de KNO_3 (10 méq/l) à pH 5.8 (suite à l'expérience précédente) et alimentée par une solution d'acide chlorhydrique (10 méq/l) à pH 2.15. On remarque que le front d'échange est retardé par rapport à l'expérience précédente : à mesure que l'acide pénètre dans la colonne, une certaine quantité de sites faibles jusqu'alors non dissociés s'ionisent en captant les H^+ de l'acide, et retiennent les chlorures, sans qu'il y ait d'effet sur les nitrates. Ceci correspond formellement à une sorption d' HCl . Ce n'est que lorsque l'ionisation des sites est achevée que se produit l'échange nitrate-chlorure, ce qui explique la position du front. La nouvelle capacité apparente calculée à partir des chlorures fixés est de 0.080 ± 0.005 méq/ml de colonne, autrement dit plus du double de celle obtenue pour l'expérience précédente. (On observerait le même type de comportement avec KCl et HNO_3 .)

Cet exemple montre bien l'effet de l'influence d'une variation de pH sur l'ionisation d'un support contenant des sites faibles (à température et force ionique fixées). On constate que pour contrôler le processus d'échange d'ions, il est important de pouvoir prévoir l'évolution de la capacité en fonction des conditions en solution. Plusieurs auteurs se sont intéressés à ce problème, en particulier Helfferich [1962], dont nous allons présenter les travaux. Nous étudierons ensuite en détail le comportement d'un support faiblement acide, puis de deux supports faiblement basiques. Nous terminerons par le cas d'un support comportant deux types de sites, fortement et faiblement basiques.

I. APPROCHE CLASSIQUE

Le modèle d'ionisation de surface repose sur le schéma bien connu de la double couche (Figure 2-2). Ce modèle indique que la charge répartie sur le solide est compensée par une charge de signe opposé, située dans une zone proche de la surface, comportant une couche compacte (Stern) et une couche diffuse (double couche).

Nous supposons que le système peut être représenté par deux phases :

- la phase liquide

- la phase solide qui comporte le solide proprement dit ainsi que la double couche électrique, considérée dans sa globalité sans distinguer couche compacte et couche diffuse.

Ainsi, les réactions d'ionisations de surface appartiennent à la classe des réactions homogènes [CHENEVIERE, 1989].

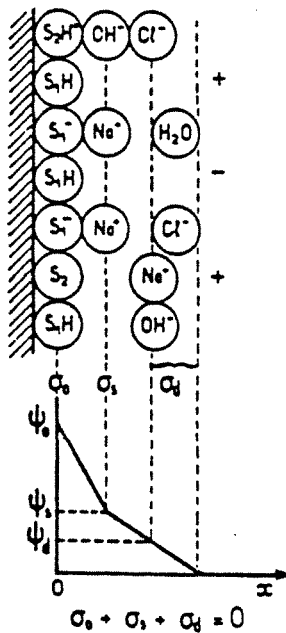
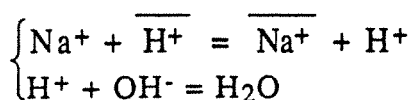


Figure 2-2 : Modèle d'ionisation de surface (d'après CHENEVIERE, 1989)

I-1 Courbes de dosage acide-base

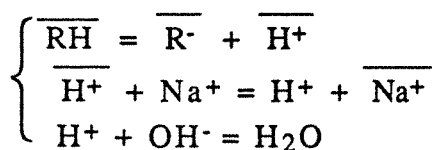
On peut chercher à avoir accès à l'état d'ionisation de surface d'un solide au moyen de techniques d'analyse sophistiquées, mais la méthode la plus simple à mettre en oeuvre reste le dosage acide-base. En effet, les échangeurs de cations sous forme H^+ et les échangeurs d'anions sous forme OH^- peuvent être considérés comme des acides ou des bases insolubles et être dosés par des acides et des bases standards, en phase aqueuse. Cette technique a été développée par Helfferich [1962].

Prenons l'exemple d'une résine forte échangeuse de cations sous forme H^+ , placée dans l'eau, dosée par une solution de soude ; il se passe les réactions suivantes :



Tant que la résine contient des H^+ , les ions Na^+ ajoutés s'échangent avec les H^+ , ceux-ci sont alors neutralisés par les ions OH^- en solution et le pH reste constant. Lorsque la résine ne contient plus de H^+ , la soude ajoutée provoque une brusque augmentation du pH, et on obtient une courbe analogue à celle du dosage d'un acide fort par une base forte. La capacité totale de la résine se calcule d'après la quantité de soude ajoutée au point d'équivalence.

Dans le cas d'une résine faible, comportant des sites de type $\overline{RH}$, le pH augmente dès le début de l'ajout car la réaction d'ionisation des sites et l'échange proprement dit sont couplés :



Le pH augmente brusquement quand la résine est saturée en sodium (on peut comme précédemment calculer la capacité totale d'après le point d'équivalence).

Ces dosages sont souvent réalisés en présence d'un sel ajouté comme NaCl. Prenons l'exemple d'une résine cationique forte sous forme H^+ . L'ajout de chlorure de sodium induit (et force) l'échange d'ions : la solution devient acide, plus ou moins selon la quantité de sel ; l'ajout de soude permet de doser l'acide en solution et de mener l'échange à son terme. La forme de la courbe est bien sûr différente de celle du cas précédent, mais on en déduit les mêmes informations.

On peut employer des méthodes analogues avec d'autres supports, en particulier les échangeurs d'anions, qui se comportent de manière tout à fait analogue.

I-2 Détermination du pKa

Nous allons montrer qu'à partir des courbes de dosage des résines faibles, on peut étudier l'évolution de la capacité apparente. Pour cela, on va introduire la notion de pKa, dont l'utilisation sera peut-être moins évidente que dans le cas de la dissociation d'un acide faible en solution. En particulier, sa valeur ne pourra pas être obtenue par lecture directe des courbes. C'est pourquoi nous allons commencer par définir ce pKa et établir le lien entre sa valeur et celle du pH en phase aqueuse.

Le traitement adopté est détaillé dans l'ouvrage d'Helfferich [1962]. Soit une résine échangeuse de cations, avec des groupes fonctionnels acides de type RH, initialement sous forme H^+ , dosée par NaOH en présence éventuellement de NaCl. On suppose que l'équilibre

est atteint en chaque point du dosage, et que l'on peut négliger le gonflement, ainsi que la sorption d'électrolyte.

On a les espèces suivantes : $\overline{\text{RH}}$, $\overline{\text{R}^-}$, $\overline{\text{H}^+}$, $\overline{\text{Na}^+}$ en phase résine, H^+ , Na^+ , OH^- en phase liquide et éventuellement Cl^- ; les réactions et les équilibres correspondants s'écrivent :

$$\left\{ \begin{array}{l} \overline{\text{RH}} = \overline{\text{R}^-} + \overline{\text{H}^+} \\ \overline{\text{H}^+} + \text{Na}^+ = \overline{\text{H}^+} + \overline{\text{Na}^+} \\ \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^- \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} K_a = \frac{(\overline{\text{R}^-})(\overline{\text{H}^+})}{(\overline{\text{RH}})} \\ K_{\text{Na,H}} = \frac{(\text{H}^+)(\overline{\text{Na}^+})}{(\overline{\text{H}^+})(\text{Na}^+)} \\ K_e = (\text{H}^+)(\text{OH}^-) \end{array} \quad (1)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \overline{\text{H}^+} + \text{Na}^+ = \overline{\text{H}^+} + \overline{\text{Na}^+} \\ \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^- \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} K_{\text{Na,H}} = \frac{(\text{H}^+)(\overline{\text{Na}^+})}{(\overline{\text{H}^+})(\text{Na}^+)} \\ K_e = (\text{H}^+)(\text{OH}^-) \end{array} \quad (2)$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \overline{\text{H}^+} + \text{Na}^+ = \overline{\text{H}^+} + \overline{\text{Na}^+} \\ \text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^- \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} K_{\text{Na,H}} = \frac{(\text{H}^+)(\overline{\text{Na}^+})}{(\overline{\text{H}^+})(\text{Na}^+)} \\ K_e = (\text{H}^+)(\text{OH}^-) \end{array} \quad (3)$$

On définit le pKa du groupe acide $\overline{\text{RH}}$:

$$\overline{\text{pKa}} = -\log K_a \quad (4)$$

où K_a est la constante apparente de l'équilibre de dissociation (écrite en concentrations).

Le degré de dissociation α est défini par :

$$\alpha = \frac{(\overline{\text{R}^-})}{(\overline{\text{R}^-}) + (\overline{\text{RH}})} \quad (5)$$

Le pH à la surface de la résine est :

$$\overline{\text{pH}} = -\log (\overline{\text{H}^+}) \quad (6)$$

D'après (4), (5) et (6), on a :

$$\overline{\text{pH}} = \overline{\text{pKa}} - \log \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (7)$$

Ainsi le pKa apparent est égal au pH de surface à la demi-dissociation.

$$\overline{\text{pKa}} = \overline{\text{pH}} \quad (\alpha = 0.5) \quad (8)$$

Le pH de surface $\overline{\text{pH}}$ doit être relié au pH de la solution ; pour cela il est nécessaire de faire une hypothèse sur la sélectivité de l'échange $\text{Na}^+ - \text{H}^+$:

on peut supposer par exemple $K_{\text{Na,H}} = 1$ (9)

$$\text{soit : } (\overline{H^+}) = (H^+) \frac{(\overline{Na^+})}{(Na^+)} \quad (10)$$

A 50% de dissociation, la concentration en sodium fixé, $(\overline{Na^+})$ vaut :

$$(\overline{Na^+})_{\alpha=0.5} = \frac{(\overline{X})}{2} \quad (11)$$

où $(\overline{X}) = (\overline{RH}) + (\overline{R^-})$ représente la concentration en groupes ionisables (ce qui revient à la capacité totale). Ceci suppose qu'à 50% de dissociation, tous les sites dissociés se trouvent sous forme Na^+ , ce qui est vrai dès que $(Na^+) \gg (H^+)$ (équation 10), et ceci est vérifié dans le cas d'un dosage par NaOH et/ou en présence de NaCl ajouté.

On obtient finalement :

$$pK_a = pH_{\alpha=0.5} + \log (\overline{Na^+})_{\alpha=0.5} - \log \frac{(\overline{X})}{2} + \log K_{Na,H} \quad (12)$$

La relation analogue avec les échangeurs d'anions de type base faible s'écrit :

$$pK = pH_{\alpha=0.5} - \log (\overline{Cl^-})_{\alpha=0.5} + \log \frac{(\overline{X})}{2} + \log K_{Na,H} \quad (13)$$

D'après ces relations, on peut calculer simplement la capacité apparente de la résine dans certains cas. Par exemple, lorsqu'une résine acide faible ayant atteint un certain degré de dissociation α est **totale**ment sous forme A^+ (le cation échangeable, par exemple Na^+), alors, $(\overline{A^+}) = \alpha (\overline{X})$. (14)

Cette situation est rencontrée lorsqu'il n'y a qu'un cation en solution en plus du proton, et dès que la concentration en ce cation est prédominante devant celle en proton (si on suppose $K_{Na,H} = 1$).

D'après (14), (7) et (10), α se calcule par :

$$\log \frac{1 - \alpha}{\alpha^2} = pK - pH + \log (\overline{X}) - \log (A^+) \quad (15)$$

La valeur de α ainsi obtenue permet de déterminer la capacité apparente. Le calcul est plus compliqué s'il y a plusieurs cations échangeables

Cette méthode peut s'appliquer au cas des échangeurs d'ions ayant des groupements polyfonctionnels, à condition que les valeurs de pKa diffèrent suffisamment les uns des autres⁽²⁾.

L'approche exposée ci-dessus est considérée comme une référence pour la description du comportement des résines faibles. On peut cependant émettre certaines réserves :

- on peut remettre en question l'hypothèse selon laquelle la sélectivité de l'échange entre le proton et un autre cation, ici le sodium, vaut 1, et étudier l'influence de la valeur de cette sélectivité.
- on peut aussi souhaiter calculer la capacité apparente dans le cas où l'échangeur ne se trouve pas totalement sous une forme donnée.
- le formalisme de représentation de l'ensemble des réactions est bien adapté au cas d'une résine acide faible, il est moins bien adapté à celui d'une résine base faible, comme nous le verrons dans la suite.

II. ETUDE DU COMPORTEMENT D'UN ECHANGEUR DE CATIONS DE TYPE ACIDE FAIBLE

L'étude qui suit porte sur le comportement d'un échangeur de cations faible de type carboxyle : le CM Spheredex ® LS (voir description en Annexe 2.).

II-1 Théorie

Nous allons procéder à deux types de dosage : support équilibré à pH acide dosé par une base et vice-versa, en présence ou non de sel. Dans tous les cas, nous emploierons l'acide chlorhydrique, la soude et éventuellement le chlorure de sodium.

Si on symbolise les sites faibles du support par RH / R^- , les espèces intervenant dans le problème sont les suivantes :

en phase liquide : $\text{H}^+, \text{OH}^-, \text{Na}^+, \text{Cl}^-$ (4 espèces)

en phase solide : $\overline{\text{RH}}, \overline{\text{R}^-}, \overline{\text{Na}^+}, \overline{\text{H}^+}$ (4 espèces)

Les réactions :

⁽²⁾ On trouvera dans l'ouvrage d'Helffferich un traitement plus rigoureux qui consiste à calculer le pK intrinsèque des groupes, en appliquant à la résine une théorie élaborée dans le cas des polyélectrolytes linéaires.

$$\left\{ \begin{array}{l} \overline{RH} = \overline{R^-} + \overline{H^+} \\ \overline{H^+} + \overline{Na^+} = \overline{H^+} + \overline{Na^+} \\ H_2O = H^+ + OH^- \end{array} \right. \begin{array}{l} \text{avec les lois} \\ \text{d'équilibre} \\ \text{associées} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} K_a = \frac{(\overline{R^-})(\overline{H^+})}{(\overline{RH})} \\ K_{Na,H} = \frac{(\overline{H^+})(\overline{Na^+})}{(\overline{H^+})(\overline{Na^+})} \\ K_e = (\overline{H^+})(\overline{OH^-}) \end{array} \right. \begin{array}{l} (16) \\ (17) \\ (3) \end{array}$$

On peut également écrire les relations suivantes :

$$\text{Electroneutralité en phase liquide : } (\overline{Na^+}) + (\overline{H^+}) = (\overline{Cl^-}) + (\overline{OH^-}) \quad (18)$$

$$\text{Electroneutralité en phase solide : } (\overline{R^-}) = (\overline{Na^+}) + (\overline{H^+}) \quad (19)$$

Toutes les concentrations sont exprimées en moles par litre de solution.

Ce système permet de calculer la spéciation en tout point du dosage, avec les hypothèses suivantes :

- l'équilibre est atteint
- la sorption d'électrolyte est négligeable (ce qui a été vérifié par ailleurs)
- les activités sont prises égales aux concentrations.

L'analyse stoechiométrique du schéma réactionnel montre qu'il existe 5 invariants pour ce système (8 constituants moins 3 réactions). En supposant vérifiées les deux contraintes d'électroneutralité, 3 bilans sont nécessaires à la validation de ce schéma.

On ne connaît a priori ni $K_{Na,H}$, ni K_a , ni précisément la capacité totale $(\overline{R})_t$. Expérimentalement, on peut mesurer le pH ainsi que les concentrations en sodium et chlorure en phase aqueuse. L'originalité de la démarche consiste à se placer à faible normalité, de manière à pouvoir suivre de manière significative les variations de concentrations de ces espèces.

II-1.1 Principe d'interprétation des mesures

II-1.1.1 Capacité totale

On déterminera en fait la concentration totale en sites ionisables (moles par litre de solution), dont on peut tirer immédiatement la capacité totale (moles par g de support sec par exemple).

• Dosage par l'acide chlorhydrique :

Une masse m de support est conditionnée sous forme Na^+ avec de la soude, placée dans un volume V de soude de normalité faible, connue, en présence ou non de NaCl . Le dosage s'effectue par ajouts successifs d' HCl .

A l'instant initial, on peut considérer que le support est totalement ionisé, les sites étant compensés par des ions sodium, et qu'à l'instant final, à pH acide, les sites sont totalement associés (RH), ils ne portent donc plus de sodium et le sodium libéré se trouve en phase liquide. La capacité totale du solide est ainsi donnée par la différence de concentration en sodium en phase liquide entre l'instant initial et l'instant final. On pourra améliorer la précision du calcul en tenant compte des perturbations provoquées par les ajouts et les prélèvements effectués au cours du dosage.

• Dosage par la soude :

Une masse m de support est équilibrée avec de l'acide chlorhydrique, placée dans un volume V d'acide de normalité faible, connue, en présence ou non de NaCl . Le dosage s'effectue par ajouts successifs de soude.

A l'instant initial, les sites du support ne sont pas dissociés ; au cours du dosage, à mesure qu'ils se dissocient, se produit l'échange $\text{H}^+ - \text{Na}^+$. A la fin du dosage, à pH basique, on peut considérer que tous les sites sont dissociés, et que le support est entièrement sous forme Na^+ (la concentration en sodium en phase liquide est très supérieure à la concentration en proton). La capacité totale du solide est alors égale à la différence entre la quantité de sodium ajouté et la quantité présente en solution à la fin du dosage, ce qui rend cette mesure plus délicate que la précédente.

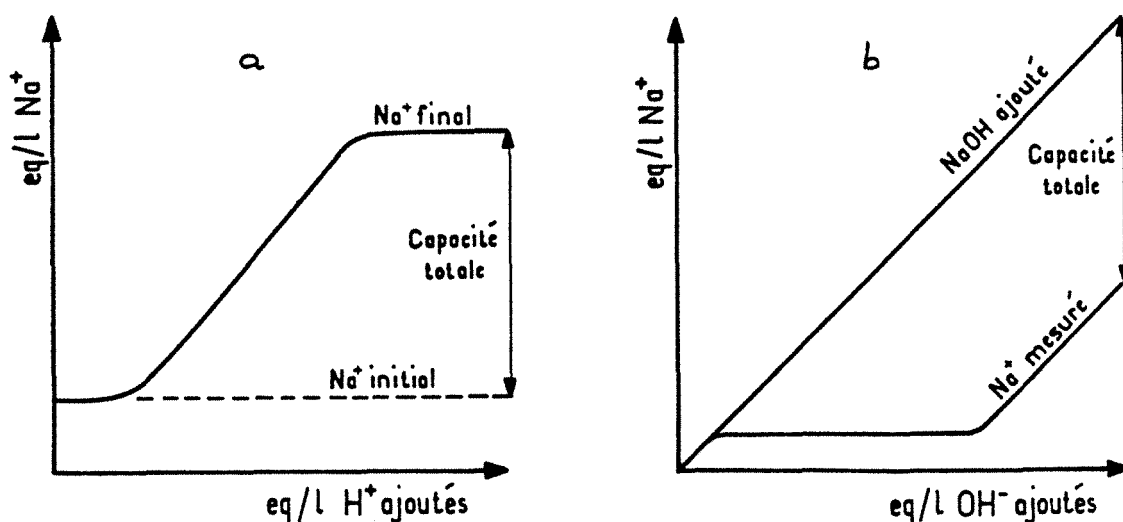


Figure 2-3 : Méthodes de détermination de la concentration totale en sites ionisables, et donc de la capacité totale. a : dosage par HCl , b : dosage par NaOH .

II-1.1.2 Détermination des constantes

Ne disposant que de deux bilans sur les espèces réactives au lieu de trois, on pourra au mieux déterminer le produit des constantes $K_a K_{Na,H}$; on procédera par optimisation, en cherchant à minimiser l'écart entre les courbes de pH et de sodium expérimentales et calculées pour un dosage donné. Les valeurs obtenues pourront être validées en vérifiant qu'elles permettent de décrire le dosage dans plusieurs situations expérimentales. L'influence des valeurs respectives de chacune des constantes sera discutée ultérieurement. On peut pour l'instant adopter l'hypothèse de Helfferich, selon laquelle la sélectivité de l'échange $Na^+ - H^+$ vaut 1, soit $K_{Na,H} = 1$, pour calculer la constante de dissociation des sites, K_a .

Avec cette hypothèse, on pourrait aussi calculer K_a selon la méthode préconisée par Helfferich : $K_a = (H^+)_{\alpha=0.5}$ (équation 8), mais le problème serait alors de déterminer avec précision le point où se situe la demi-dissociation des sites. D'après Chenevière [1989], on peut calculer ce point en se basant sur un dosage effectué à normalité élevée en sodium : le pH de demi-dissociation correspond au point où l'écart de consommation de protons entre le dosage et un dosage similaire mené en l'absence de solide devient égal à la moitié de la concentration en sites ionisables. Nous proposerons dans la suite une méthode simple pour déterminer ce point.

II-2 Résultats expérimentaux et simulations

Les dosages ont été effectués selon les modes opératoires décrits en II-1, avec 5 g de support pesé sec sous forme sodium, dans un volume de 100 ml de solution. Avant chaque ensemble de mesures, on a veillé à ce que l'équilibre soit bien établi.

Les courbes expérimentales et calculées sont présentées en figures 2-4 à 2-7 ; elles donnent le pH et la concentration en sodium en fonction de la concentration " de référence " d'acide ou de base ajouté, c'est à dire du nombre de moles ajoutées ramené au volume total de solution.

Les simulations ont été effectuées en utilisant le code de calcul HYBRID, avec un nombre de points correspondant au nombre de mesures réalisées, en tenant compte des variations dues aux ajouts et aux prélèvements. A chaque fois, le volume de prélèvement est identique à celui de l'ajout, le volume total de la solution reste constant.

La valeur obtenue pour la capacité totale est identique à celle indiquée par le fabricant, soit 0.090 méq/ml. Le pK indiqué par celui-ci est de 4.5, mais ce pK n'est pas vraiment défini, il correspond vraisemblablement au pH de la 1ère équivalence dans le cas du dosage par l'acide. Cette valeur donne uniquement une information d'ordre pratique : elle indique le pH limite en dessous duquel la capacité apparente du support tend vers 0 ; ceci permet de choisir le domaine

de pH, selon que l'on souhaite travailler à capacité élevée, dans le cas d'une saturation du support, par exemple, ou à capacité minimale, ce qui peut être utile dans l'étape de régénération (elle ne peut être utilisée tel quel dans les calculs).

Au niveau de la simulation, on peut aussi choisir de ne pas tenir compte des ajouts/prélèvements, mais de calculer sur un nombre important de points (100 par exemple), pour simuler un dosage quasi-continu, afin de dégager plus précisément certaines tendances comme l'évolution de la spéciation, la position des points d'inflexion etc.. Des exemples sont donnés sur les figures 2-8 et 2-9.

n° expérience	Composition initiale de la phase liquide (mol/l)	Titrant		Paramètres calculés	
		Titrant			
1	H ⁺ 1 x 10 ⁻³	Titrant	NaOH	KaK _{Na,H}	1.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 1 x 10 ⁻¹¹	Normalité (N)	0.9		
	Na ⁺ 0	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	1.65 x 10 ⁻²	Capacité totale	1.07 x 10 ⁻² mol/l
	Cl ⁻ 1 x 10 ⁻³				0.214 mmol/g support sec 0.035 mmol/ml lit fixe
2	H ⁺ 1e-3	Titrant	NaOH	KaK _{Na,H}	1.0 x 10 ⁻⁷
	Na ⁺ 1.05e-3	Normalité (N)	0.099		
	OH ⁻ 1e-11	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	1.58 x 10 ⁻²	Capacité totale	8.7 x 10 ⁻³ mol/l
	Cl ⁻ 2.05e-3				0.174 mmol/g support sec 0.078 mmol/ml lit fixe
3	H ⁺ 2 x 10 ⁻¹²	Titrant	HCl	KaK _{Na,H}	1.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 5 x 10 ⁻³	Normalité (N)	0.1		
	Na ⁺ 5 x 10 ⁻³	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	1.80 x 10 ⁻²	Capacité totale	9.6 x 10 ⁻² mol/l
	Cl ⁻ 0				0.192 mmol/g support sec 0.085 mmol/ml lit fixe
4	H ⁺ 6.85 x 10 ⁻¹²	Titrant	HCl	KaK _{Na,H}	1.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 1.46 x 10 ⁻³	Normalité (N)	1.099		
	Na ⁺ 1.46 x 10 ⁻³	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	1.76 x 10 ⁻²	Capacité totale	1.0 x 10 ⁻² mol/l
	Cl ⁻ 0				0.200 mmol/g support sec 0.089 mmol/ml lit fixe

Tableau 2-1 : Conditions expérimentales et paramètres optimisés.

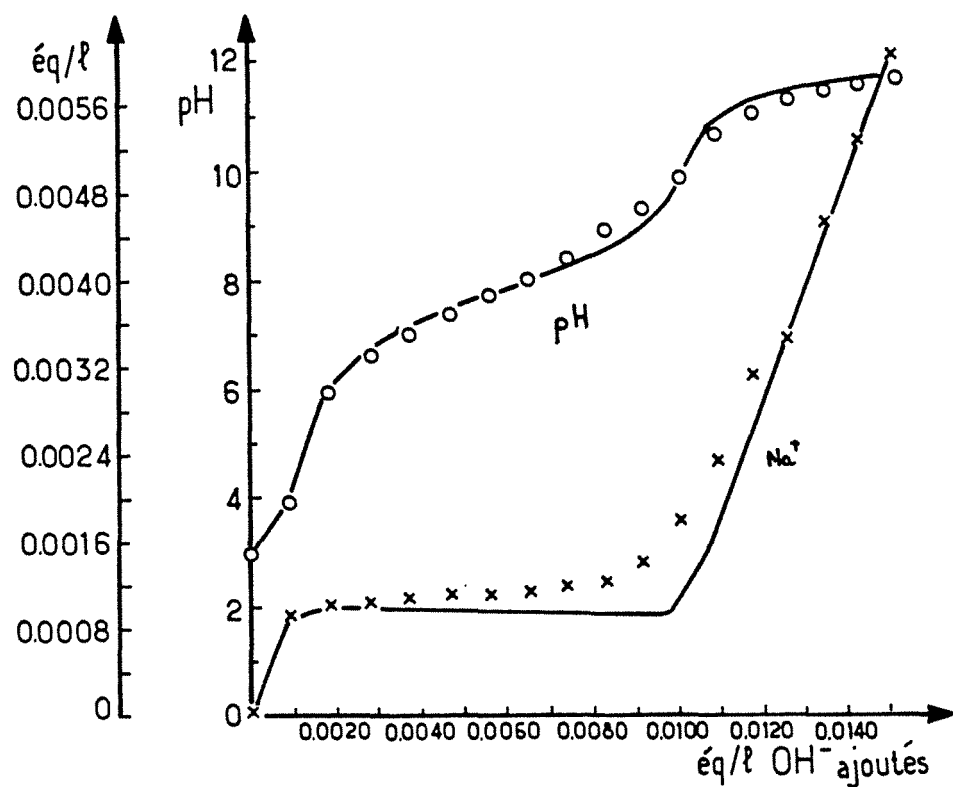


Figure 2-4 : Expérience 1: dosages expérimental et calculé du support CM Sphrodex LS. Support équilibré par HCl, dosé par NaOH.

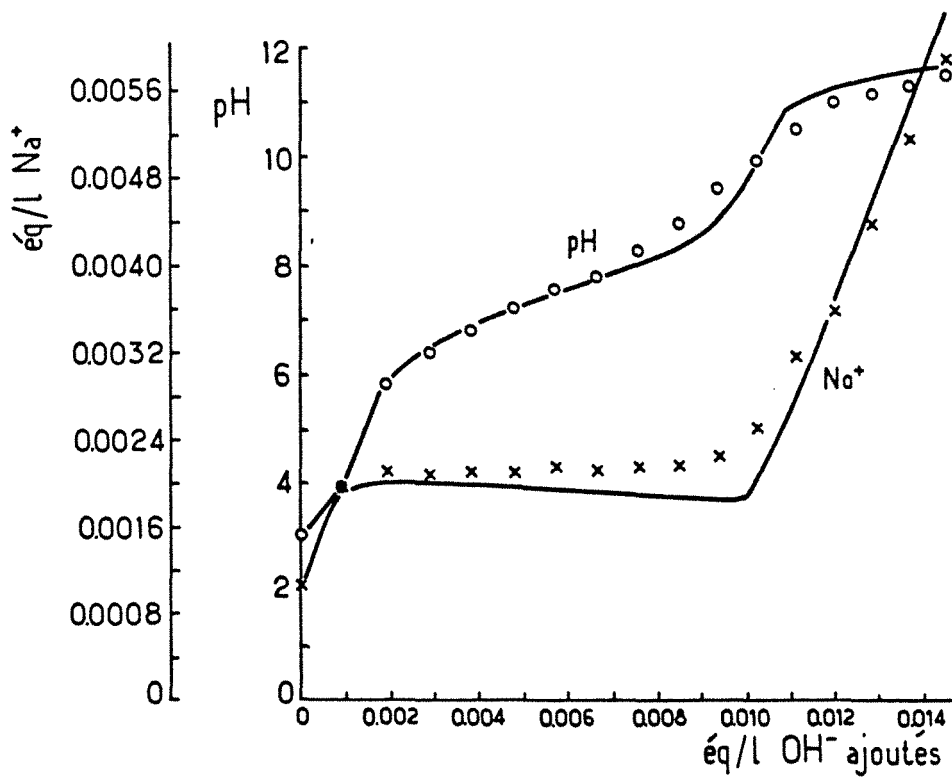


Figure 2-5 : Expérience 2 : dosages expérimental et calculé du support CM Sphrodex LS. Support équilibré par HCl, dosé par NaOH.

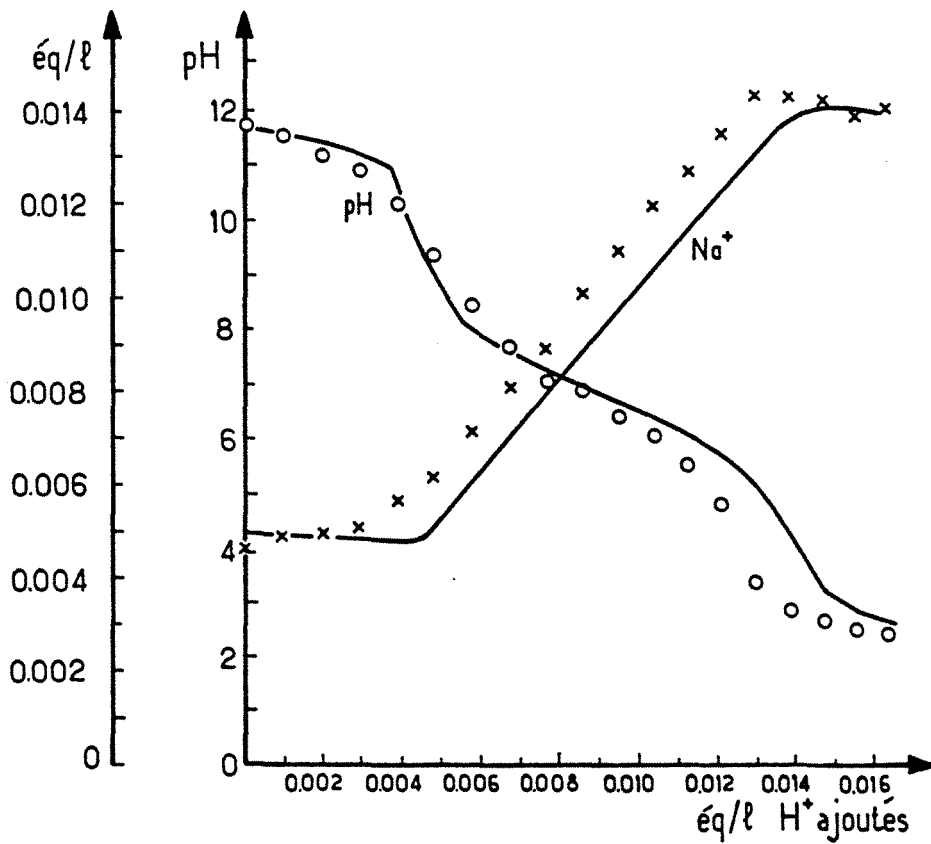


Figure 2-6 : Expérience 3 : dosages expérimental et calculé du support CM Spherodex LS. Support équilibré par NaOH, dosé par HCl.

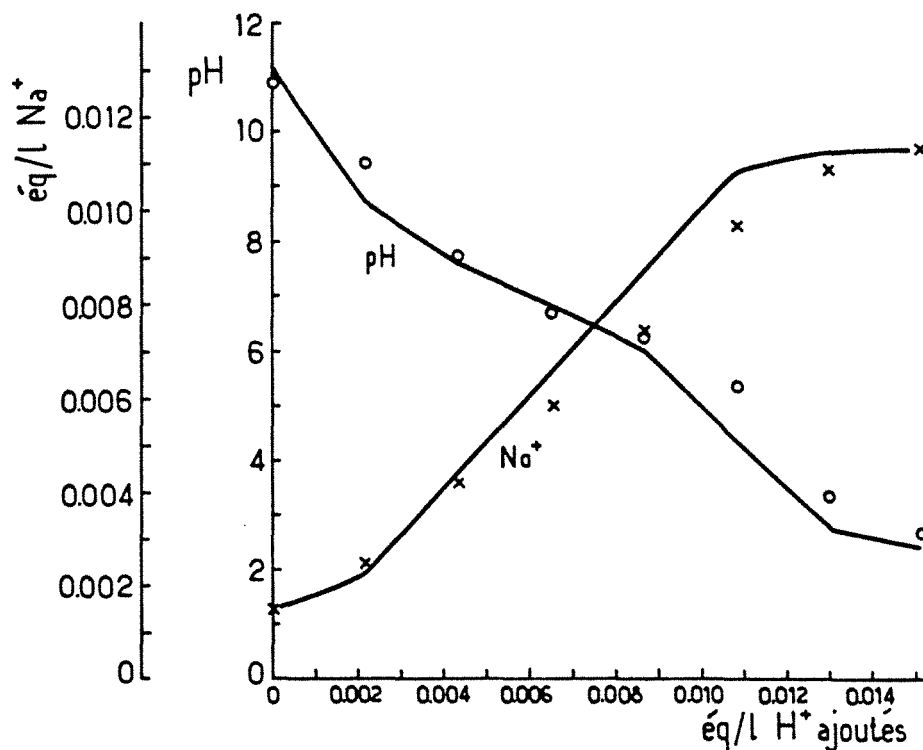


Figure 2-7 : Expérience 4 : dosages expérimental et calculé du support CM Spherodex LS. Support équilibré par NaOH, dosé par HCl.

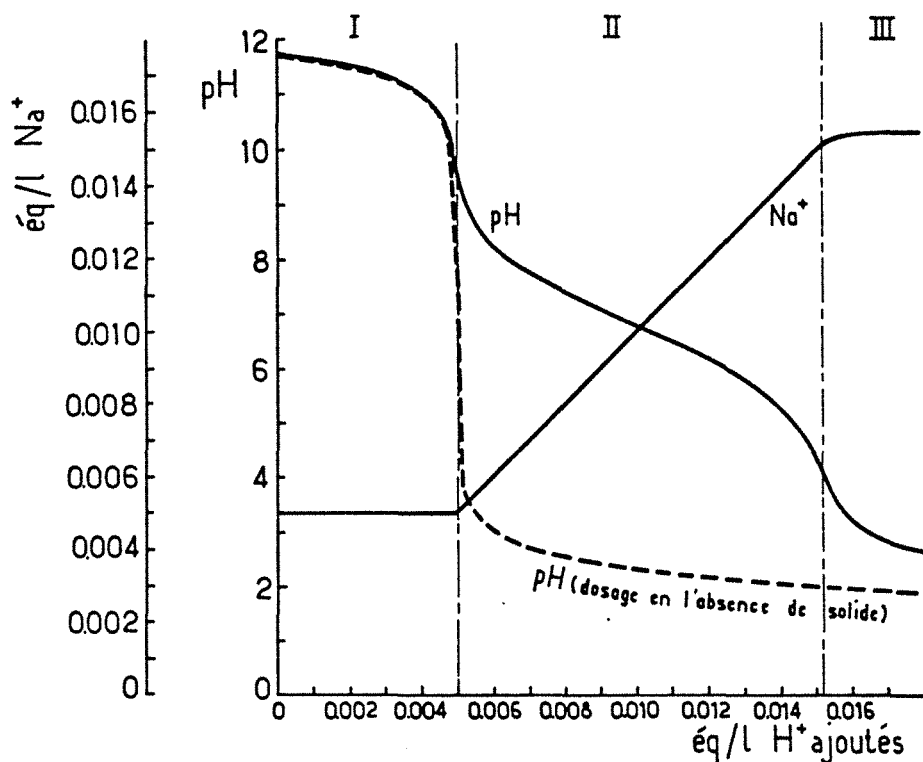


Figure 2-8 : Simulation du dosage du support CM Spheroex LS, équilibré par NaOH ($(\text{Na}^+) = 5 \cdot 10^{-3}\text{M}$, pH 11.7) dosé par HCl et du dosage de la solution effectué dans les mêmes conditions en l'absence de solide.

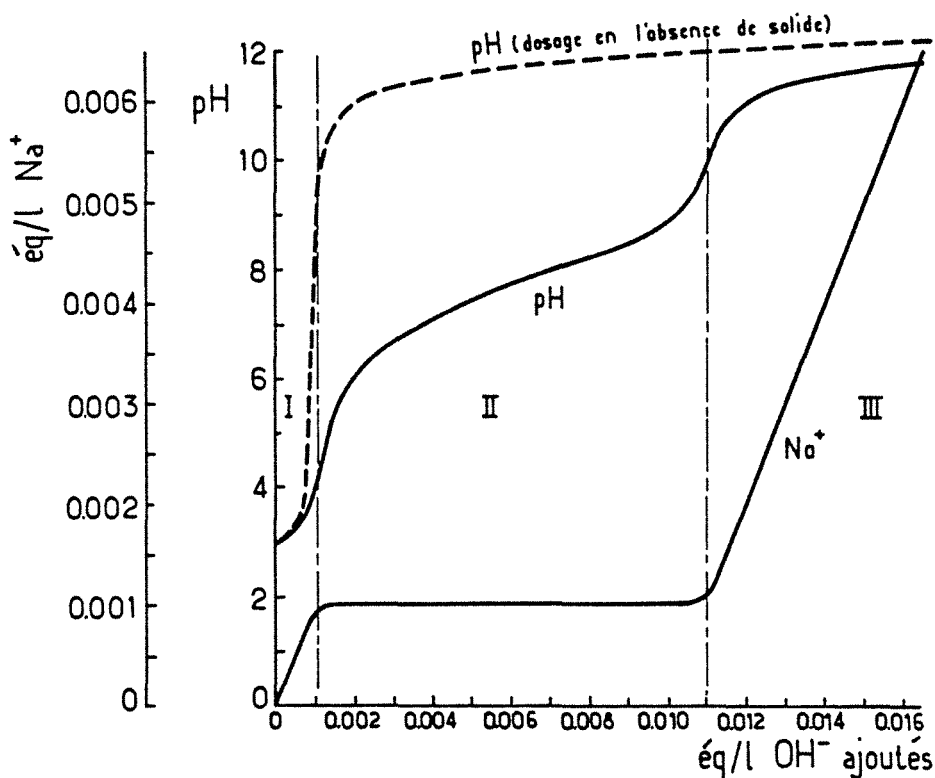


Figure 2-9 : Simulation du dosage du support CM Spheroex LS, équilibré par HCl ($(\text{Na}^+) = 0$, pH 3.0), dosé par HCl et du dosage de la solution effectué dans les mêmes conditions en l'absence de solide.

II-3 Discussion

Suite à ces résultats, nous sommes en mesure de discuter un certain nombre de points, en particulier l'évolution du pH et de la concentration en sodium au cours d'un dosage ainsi que l'influence de la valeur des paramètres ajustables sur ces courbes. Nous nous demanderons ensuite s'il est nécessaire d'établir une distinction entre l'ionisation des sites et l'échange de cations ou si l'on peut réunir ces deux phénomènes en une seule stoechiométrie. Nous examinerons enfin les variations de la capacité apparente en fonction du pH et de l'environnement ionique.

II-3.1 Exploitation des courbes

Sur les courbes de dosage, on distingue nettement 3 zones (Figures 2-8 et 2-9) :

II-3.1.1 *Zone I :*

Elle s'étend jusqu'au premier "saut" de pH.

* Dosage par HCl (Figure 2-8) :

Le pH évolue peu et la concentration en sodium est stable : les sites sont dissociés, sous forme R^- , substitués par du sodium. Cette zone correspond à la neutralisation des OH^- présents en solution à l'instant initial. A la courbe de pH, on peut superposer une courbe de dosage établie dans les mêmes conditions de solution mais en l'absence de solide.

* Dosage par NaOH (Figure 2-9) :

Au début du dosage, les sites sont associés, c'est à dire sous forme $\overline{RH}$. Le sodium apporté se retrouve intégralement en solution. La courbe de pH est identique à celle établie en l'absence de solide.

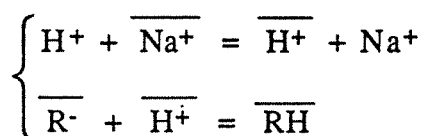
Dans les deux cas, tout se passe comme si il n'y avait pas de solide : le mécanisme de dissociation de l'eau, en phase liquide, est prépondérant. La longueur et l'existence même de cette zone dépendent de la composition de la solution à l'instant initial.

II-3.1.2 Zone II :

Limitée par les deux points d'inflexion de la courbe de pH, c'est la zone où ont lieu simultanément la dissociation du site et l'échange de cations.

* Dosage par HCl :

Le sodium est transféré de la phase solide à la phase liquide où on voit sa concentration augmenter ; les protons apportés par l'acide sont consommés par les deux réactions :



c'est pourquoi le pH décroît lentement jusqu'au second "saut" qui correspond au point où tous les sites sont associés.

* Dosage par NaOH :

C'est le cas inverse, les sites $\overline{\text{RH}}$ se dissocient et le sodium apporté est transféré en phase solide, la concentration en sodium en phase liquide reste constante. De manière analogue, le second "saut" de pH correspond au point où tous les sites sont dissociés : le sodium ajouté n'est alors plus capté par le solide, sa concentration en solution augmente.

II-3.1.3 Zone III :

Il ne se passe plus rien d'autre que la dissociation de l'eau.

On peut déduire de ces observations une conclusion importante, confirmé par l'étude des fichiers-résultats : **le point de demi-dissociation des sites faibles ($\alpha = 0.5$) est localisé à mi-chemin des deux points d'inflexion de la courbe de pH sur l'axe des abscisses (correspondant à la quantité de titrant ajouté), à condition que les perturbations dues aux ajouts et aux prélèvements soient négligeables. Par exemple, $\alpha = 0.5$ pour 0.010 éq/l de H^+ ajoutés sur la courbe de la figure 2-8.**

Grâce à cette information, on peut facilement employer la formule établie par Helfferich (équation 12) pour calculer le pKa :

$$\text{pKa} = (\text{pH})_{\alpha=0.5} + (\log \text{Na}^+)_{\alpha=0.5} - \log(\overline{\text{X}}/2) \quad (12)$$

Toutes les courbes nous donnent bien $pK_a = 7.0$, ce qui est cohérent avec les résultats trouvés précédemment. Par conséquent, même si l'on ne dispose pas d'un code de calcul, on peut déterminer simplement la constante de dissociation des sites.

II-3.2 Influence des différents paramètres ajustables

On peut déterminer les paramètres par une procédure d'optimisation, mais il est intéressant de les faire varier indépendamment afin d'étudier leur influence sur la forme des courbes de pH et de sodium.

* Influence de la capacité totale :

Comme on peut s'y attendre, un changement de la concentration totale en sites ionisables (c'est à dire la capacité totale) décale la montée du sodium et modifie la "largeur" de la zone II (figure 2-10).

* Influence de la valeur du produit $K_a K_{Na,H}$:

La figure 2-11 a été obtenue en gardant $K_{Na,H} = 1$, et en faisant varier K_a . Si on augmente la valeur de K_a , les sites se dissocient plus difficilement, il passe moins de protons en solution, la zone II de la courbe de pH est décalée vers le haut, de même que la courbe de sodium. C'est l'inverse si on diminue la valeur de K_a . Ces effets deviennent importants dès que l'on fait varier K_a de $\pm 0.1 \cdot 10^{-7}$.

* Influence des valeurs respectives de K_a et $K_{Na,H}$ pour $K_a K_{Na,H} = 1 \cdot 10^{-7}$:

On peut faire varier K_a et $K_{Na,H}$ dans des proportions relativement importantes (plusieurs puissances de 10) en gardant leur produit égal à $1.0 \cdot 10^{-7}$, sans que les courbes de pH et de sodium ne s'en trouvent apparemment modifiées (nous ne présentons donc pas de figure). L'effet de ces variations apparaît sur les valeurs calculées des concentrations en H^+ , Na^+ , H^+ et Na^+ , mais à une échelle très faible. En réalité, K_a doit rester compris entre certaines limites (où se situe l'intérêt de cette étude). En effet, si K_a devient trop grand, supérieur à 10^{-5} , les sites s'ionisent très facilement, et on ne peut plus considérer qu'ils sont encore tous sous forme $\overline{RH}$ à des pH de l'ordre de 3 (ceci est contraire à nos hypothèses concernant le calcul de la capacité). De même, si K_a devient trop petit, la dissociation est limitante, les sites restent sous forme $\overline{RH}$.

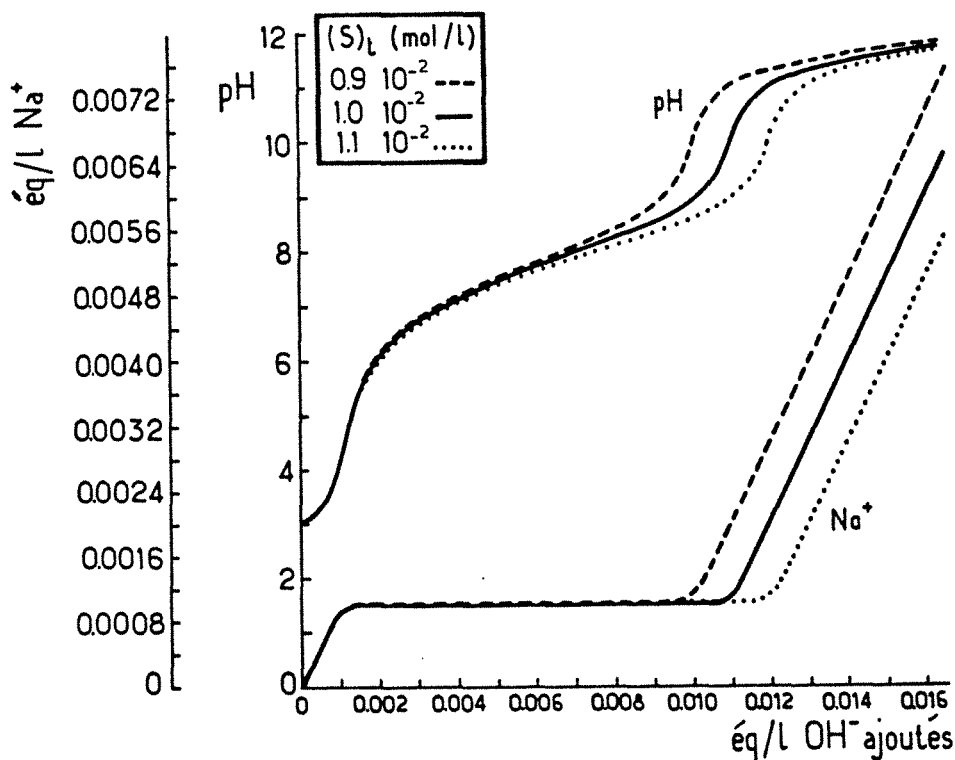


Figure 2-10 : Influence de la concentration totale en sites ionisables : simulation de dosages du support CM Spherodex LS équilibré par HCl et dosé par NaOH, pour différentes valeurs de la capacité totale en sites ionisables.

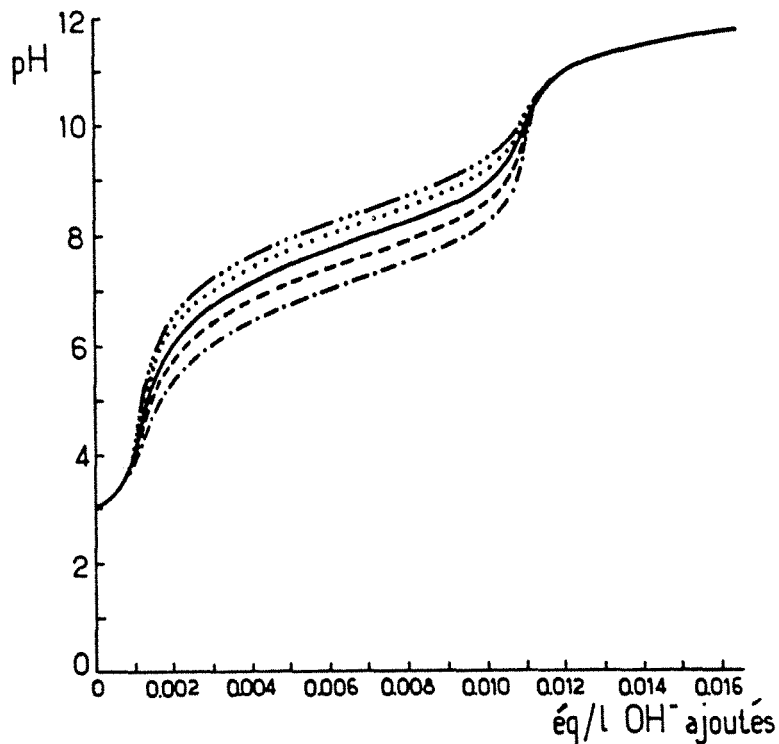


Figure 2-11 : Influence du produit $KaKi$: simulation de dosages du support CM Spherodex LS équilibré par HCl et dosé par NaOH, pour différentes valeurs du produit $KaKi$ (mol/l).

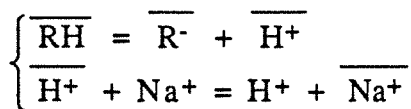
—... $KaKi = 5 \times 10^{-7}$ $KaKi = 2 \times 10^{-7}$ — $KaKi = 1 \times 10^{-7}$ --- $KaKi = 8 \times 10^{-8}$ — — $KaKi = 5 \times 10^{-8}$

Nous ne pouvons pas conclure sur ce point, il faudrait pour cela pouvoir effectuer des mesures plus fines des concentrations en solution et/ou avoir accès aux concentrations des espèces en phase solide. Il nous paraît donc raisonnable de conserver l'hypothèse d'Helfferich en affectant la valeur 1 à la sélectivité de l'échange $K_{Na,H}$.

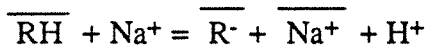
II-3.3 Une stoechiométrie ou bien deux ?

Considérer que la sélectivité de l'échange $Na^+ - H^+$ vaut un revient à supposer que le phénomène d'échange est largement prépondérant devant l'ionisation des sites, qui devient ainsi l'étape limitante : à peine le site $\overline{RH}$ est-il dissocié que l'espèce $\overline{H^+}$ formée disparaît au profit de $\overline{Na^+}$. L'échange apparaît comme un véritable "pompage" de $\overline{H^+}$, et cette espèce est toujours en quantité tellement faible que l'on pourrait à la limite considérer qu'elle n'existe pas. (Ceci justifie l'hypothèse $(\overline{Na^+})_{\alpha=0.5} = \frac{(X)}{2}$ de la page 33).

Ceci nous amène à la question suivante : faut-il considérer une stoechiométrie ou bien deux ? Au lieu de représenter la dissociation et l'échange par :



on pourrait écrire :



ce qui revient à supprimer une espèce et une réaction : la variance du problème ne change pas.

Dans le cas où on écrit deux stoechiométries distinctes, on obtient d'après le système composé des équations (3), (16), (17), (18), (19) :

$$\begin{cases} K_a K_{Na,H} = \frac{(H^+) (\overline{Na^+})}{(Na^+)} \frac{(\overline{Na^+}) \left(K_{Na,H} + \frac{(H^+)}{(Na^+)} \right)}{K_{Na,H} (\overline{R})_t - (\overline{Na^+}) \left(K_{Na,H} + \frac{(H^+)}{(Na^+)} \right)} & (20) \\ (Na^+) + (H^+) = \frac{Ke}{(H^+)} + (Cl^-) & (21) \end{cases}$$

si on écrit la seule stoechiométrie $\overline{RH} + Na^+ = \overline{R^-} + \overline{Na^+} + H^+$:

$$K_a K_{Na,H} = \frac{(\overline{Na^+})(\overline{R^-})(\overline{H^+})}{(\overline{Na^+})(\overline{RH})} \quad (22)$$

avec la nouvelle condition d'électroneutralité sur le solide : $(\overline{Na^+}) = (\overline{R^-})$

Le système composé des équations (21) et (22) devient alors :

$$\begin{cases} K_a K_{Na,H} = \frac{(\overline{Na^+})}{(\overline{R})_t - (\overline{Na^+})} \frac{(\overline{H^+})(\overline{Na^+})}{(\overline{Na^+})} & (23) \\ (\overline{Na^+}) + (\overline{H^+}) = \frac{K_e}{(\overline{H^+})} + (\overline{Cl^-}) & (21) \end{cases}$$

Les systèmes ((20),(21)) et ((21),(23)) ont même solution si $\frac{(\overline{H^+})}{(\overline{Na^+})} \ll K_{Na,H}$ soit encore $\frac{(\overline{Na^+})}{(\overline{H^+})} \gg 1$ (évident).

La plupart du temps, on est bien dans le cas où $\frac{(\overline{H^+})}{(\overline{Na^+})} \ll 1$ ($K_{Na,H}$). Il existe pourtant quelques exemples, comme les premiers points du dosage par la soude, où il n'y a pas de sodium en solution, mais dans ce domaine on a vu que seule intervenait la dissociation de l'eau.

Par conséquent, dans l'ensemble, tout se passe comme si il n'existait qu'une seule stoechiométrie. Mais alors, il n'est plus possible d'utiliser la notion de pKa telle qu'elle a été définie.

On continuera dans le cas général à supposer l'existence des deux réactions couplées, d'abord parce que la notion de pKa est intéressante, mais surtout parce que nous ne disposons d'aucun critère pour décider qu'une espèce est négligeable ou non. L'approche avec une seule stoechiométrie constitue cependant une **bonne approximation**, qui pourra s'avérer utile pour des calculs simplifiés.

II-3.4 Capacité apparente

La capacité apparente est égale à la concentration en sites ionisés rapportée à une quantité caractéristique d'échangeur d'ions.

La figure 2-12 représente les courbes de pH pour différentes forces ioniques, et la figure 2-13 donne les variations de la concentration en sites ionisés en fonction du pH correspondant à ces

dosages. La figure 2-14 montre les variations de concentration en sites ionisés obtenues au cours des expériences(1), (2), (3), (4).

On remarque (Figure 2-13) que pour un pH donné, la capacité peut prendre des valeurs très différentes selon la concentration initiale en sodium en solution : plus celle-ci est élevée, plus la capacité est importante, à pH fixé. Ceci montre bien que **la capacité apparente ne dépend pas uniquement du pH**. Elle varie aussi avec la concentration en sodium en solution et plus généralement avec l'environnement ionique.

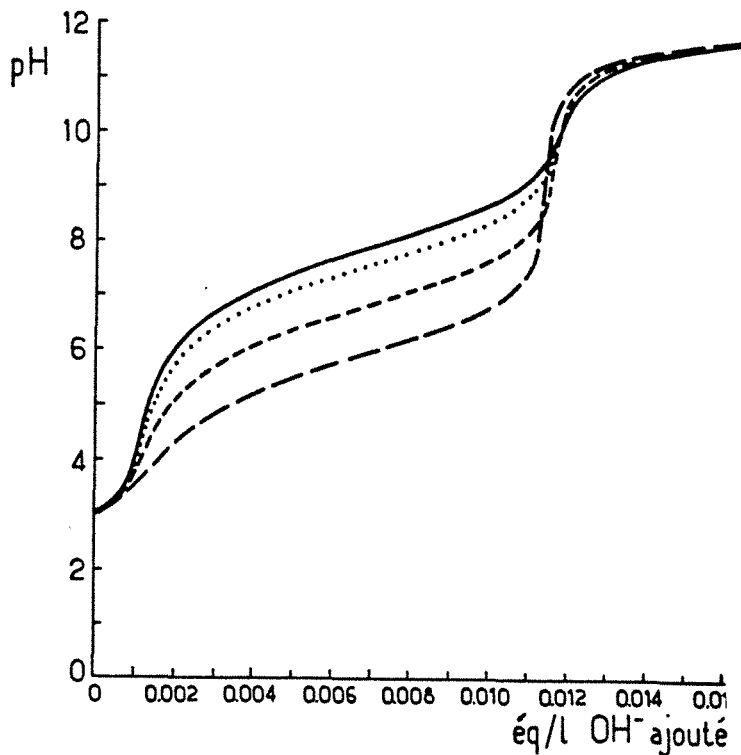


Figure 2-12 : Influence de la force ionique : simulations de dosages du support CM Spherox équilibré par HCl, et dosé par NaOH, calculé pour différentes concentrations initiales en sodium : — (Na^+) = 0. (Na^+) = 0.001 --- (Na^+) = 0.010 — — (Na^+) = 0.100(mol/l)

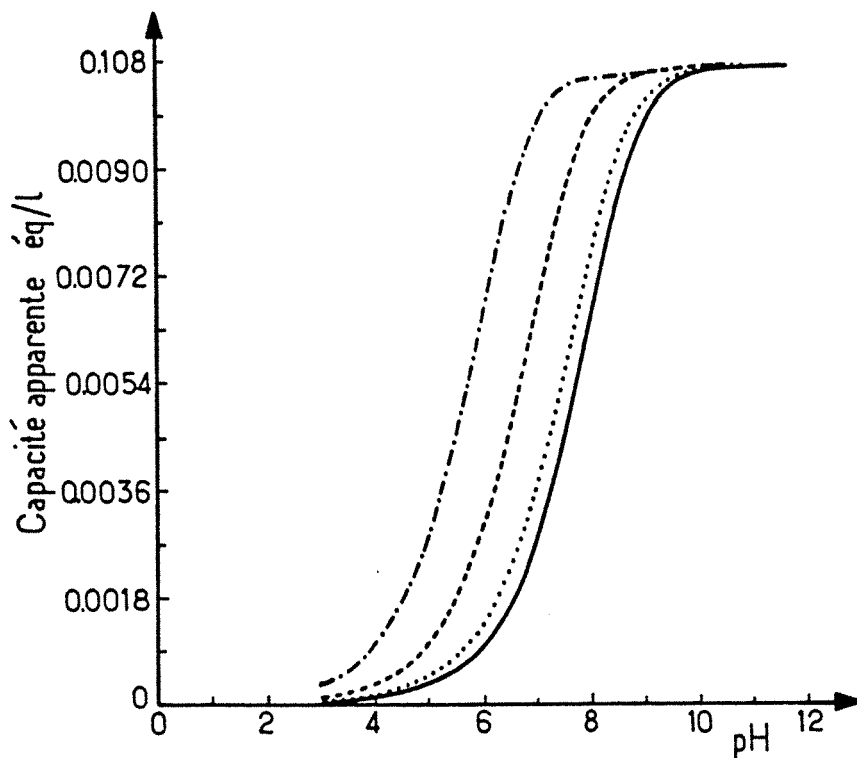


Figure 2-13 : Variations de la concentration en sites ionisés ($\overline{R^-}$) en fonction du pH, correspondant aux simulations présentées en Figure 2-12. Sodium initial : — (Na^+) = 0. (Na^+) = 0.001 ---- (Na^+) = 0.010 - · - · (Na^+) = 0.100 (en mol/l).

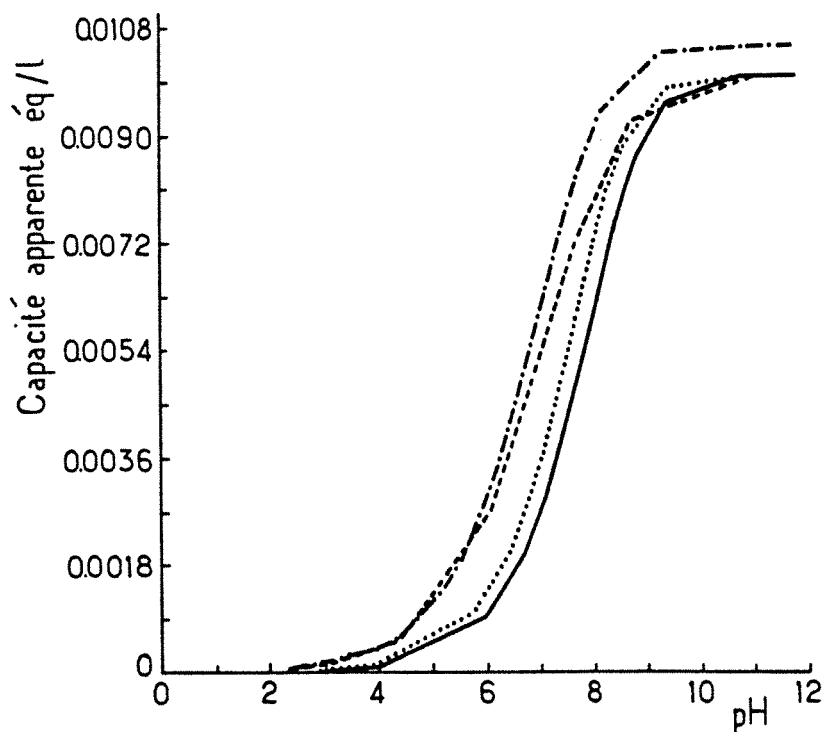


Figure 2-14 : Variations de la concentration en sites ionisés ($\overline{R^-}$) en fonction du pH, correspondant aux expériences - · - · Exp.1 ---- Exp.2 Exp.3 — Exp.4.

En présence d'un seul cation en plus du proton, la concentration en sites ionisés peut être calculée analytiquement. Si on admet que (H^+) est négligeable devant (Na^+) alors $(R^-) \cong (Na^+)$

D'après le système ((21),(22)), on obtient :

$$(\overline{R^-}) = \frac{K_{Na,H} K_a (Na^+)}{2 (H^+)} \left[\left(1 + \frac{4 (\overline{R^-})_t (H^+)}{K_{Na,H} K_a (Na^+)} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (24)$$

(ce qui revient au même que l'équation (15) établie par Helfferich moyennant les mêmes hypothèses).

On dispose donc d'une expression simple de la capacité apparente dans laquelle interviennent (H^+) et (Na^+) . Par contre, lorsqu'il y a plus d'un cation en solution en plus du proton, on ne peut pas calculer simplement la capacité apparente. Le schéma réactionnel plus complexe se résout numériquement.

III ETUDE DU COMPORTEMENT D'UN ECHANGEUR D'ANIONS DE TYPE BASE FAIBLE

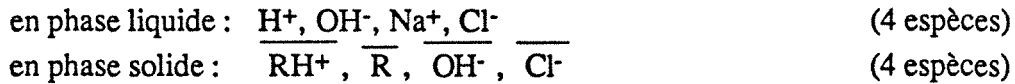
L'étude suivante porte sur deux types de supports :

- des résines classiques avec des sites amines tertiaires, utilisées en traitement des eaux, des jus sucrés, des lactosérums etc. ; il s'agit des résines Duolite A368 et A375.
- le support DEAE Spheredex LS, utilisé en chromatographie des protéines, qui a la particularité de comporter des sites faibles (DEAE, c'est à dire amine tertiaire) et des sites forts (amines quaternaires résultant de l'addition de deux amines tertiaires) (voir description de ces supports en annexe).

III-1 Supports à un site

III-1.1 Théorie

Dans le cas général d'un support comportant un seul type de sites faiblement basiques $\overline{RH^+} / \overline{R}$, on distingue les espèces suivantes :



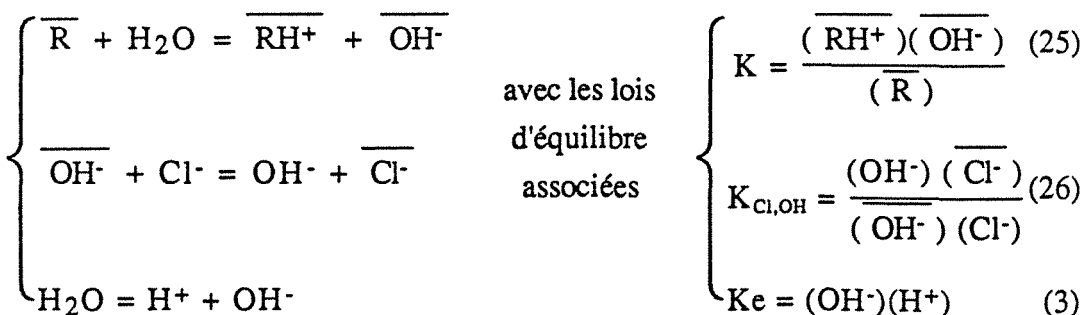
Pour décrire l'ionisation des sites et l'échange, l'écriture la plus simple a priori est :



mais elle présente deux inconvénients :

- elle fait intervenir un transfert de charge de la phase solide à la phase liquide, la première réaction n'est pas en phase homogène, puisque l'ion H^+ appartient à la phase liquide.
- Il manque un lien entre les deux réactions : la première réaction met en jeu un site $\overline{RH^+}$ du solide sans préciser par quel anion il est compensé, et la seconde un ion OH^- fixé sans indication de sa provenance.

C'est pourquoi on préférera adopter le schéma réactionnel suivant [JAMES et PARK 1981] :



et les autres relations :

$$\text{Electroneutralité} \quad (\overline{Na^+}) + (H^+) = (\overline{OH^-}) + (Cl^-) \quad (27)$$

$$(\overline{RH^+}) = (\overline{OH^-}) + (Cl^-) \quad (28)$$

Toutes concentrations exprimées en moles par litre de solution. Les hypothèses et inconnues sont identiques à celle du problème de l'échangeur de cations faible.

* pK :

On définira ici le pK par :

$$pK = -\log (\overline{OH})_{\alpha=0.5} \quad (29)$$

par analogie avec $pK_a = -\log (\overline{H^+})_{\alpha=0.5}$.

Il est important de bien préciser la définition choisie pour le pK. Pour plusieurs auteurs [Smith M.A. et coll. 1989, Gustafson R.L. 1970], il semble que le pK soit défini implicitement par $pK = -\log (H^+)_{\alpha=0.5}$, et des méthodes graphiques sont proposées pour le déterminer. Ce pK présente l'inconvénient de varier fortement avec les conditions expérimentales, en particulier la force ionique.

* Capacité totale :

On raisonne cette fois sur les concentrations en chlorure :

- la concentration totale en sites ionisables sera égale à la différence de concentration en chlorure entre le point initial et le point final dans le cas du dosage par la soude.
- elle sera égale à la différence entre la quantité de chlorure ajoutée et la quantité en solution à la fin du dosage dans le cas d'un dosage par l'acide chlorhydrique.

* Détermination des constantes :

On cherchera à ajuster la valeur de la constante K en supposant que la sélectivité de l'échange chlorure-hydroxyle, $K_{Cl,OH}$, est égale à l'unité.

III-1.2 Résultats expérimentaux et modélisation

III-1.2.1 *Duolite A375*

Les dosages ont été effectués à partir d'échantillons de 1g de résine humide, c'est à dire essorée sur büchner, ce qui correspond à 0.725 g de résine sèche sous forme chlorure, dans un volume de 100 ml de solution.

n° expérience	Composition initiale de la phase liquide (mol/l)	Titrant		Paramètres ajustables	
5	H ⁺ 1.04 x 10 ⁻³	Titrant	NaOH	KK _{Cl,OH}	3.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 9.61 x 10 ⁻¹²	Normalité (N)	0.10225	Capacité totale	0.026 x 10 ⁻² mol/l 2.6 méq/g résine essorée
	Cl ⁻ 1.04 x 10 ⁻³	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.026		
	Na ⁺ 0				
6	H ⁺ 6.02 x 10 ⁻⁴	Titrant	NaOH	KK _{Cl,OH}	3.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 1.66 x 10 ⁻¹¹	Normalité (N)	0.559	Capacité totale	0.026 x 10 ⁻² mol/l 2.6 méq/g résine essorée
	Cl ⁻ 6.02 x 10 ⁻⁴	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.026		
	Na ⁺ 0				
7	H ⁺ 6.76 x 10 ⁻³	Titrant	HCl	KK _{Cl,OH}	3.0 x 10 ⁻⁷
	OH ⁻ 1.48 x 10 ⁻¹²	Normalité (N)	1.0	Capacité totale	0.020 x 10 ⁻² mol/l 2.0 méq/g résine essorée
	Cl ⁻ 0	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.044		
	Na ⁺ 1.48 x 10 ⁻³				

Tableau 2-2 : Conditions expérimentales des dosages du support Duolite A375 et paramètres calculés.

Les figures 2-15, 2-16 et 2-17 montrent les variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure en phase liquide au cours des dosages (5), (6) et (7). La figure 2-18 donne l'évolution de la concentration en sites ionisés en fonction du pH pour ces dosages.

Encore une fois, on s'est efforcé au cours de la modélisation de s'approcher le plus possible du protocole expérimental, en tenant compte des variations de volume dues aux ajouts et prélèvements (ceux-ci n'étaient pas toujours identiques entre eux).

Les résultats sont assez bien décrits avec la valeur $3.0 \cdot 10^{-7}$ pour le produit $KK_{Cl,OH}$ ($pK = 6.5$ pour $K_{Cl,OH} = 1$). Une capacité totale correspondant à 0.026 mol/l convient aux expériences (5) et (6), tandis qu'une valeur de 0.020 mol/l est mieux adaptée à l'expérience (7). Ceci peut s'expliquer par une erreur de pesée ou par une perte de solide au cours des étapes de conditionnement. Des expériences supplémentaires permettraient de confirmer la valeur de la capacité totale. D'après les indications fournies par le fabricant, la capacité totale doit être de $2.20 \cdot 10^{-3} \text{ eq}$ pour 1 g de résine humide, ce qui est proche des valeurs que nous avons mesurées, mais la faible quantité de résine utilisée favorise les incertitudes. Le pK apparent donné est de 9.5 , ce qui indique, comme pour la résine faible, l'ordre de grandeur du pH limite, au-dessus duquel la capacité apparente s'annule.

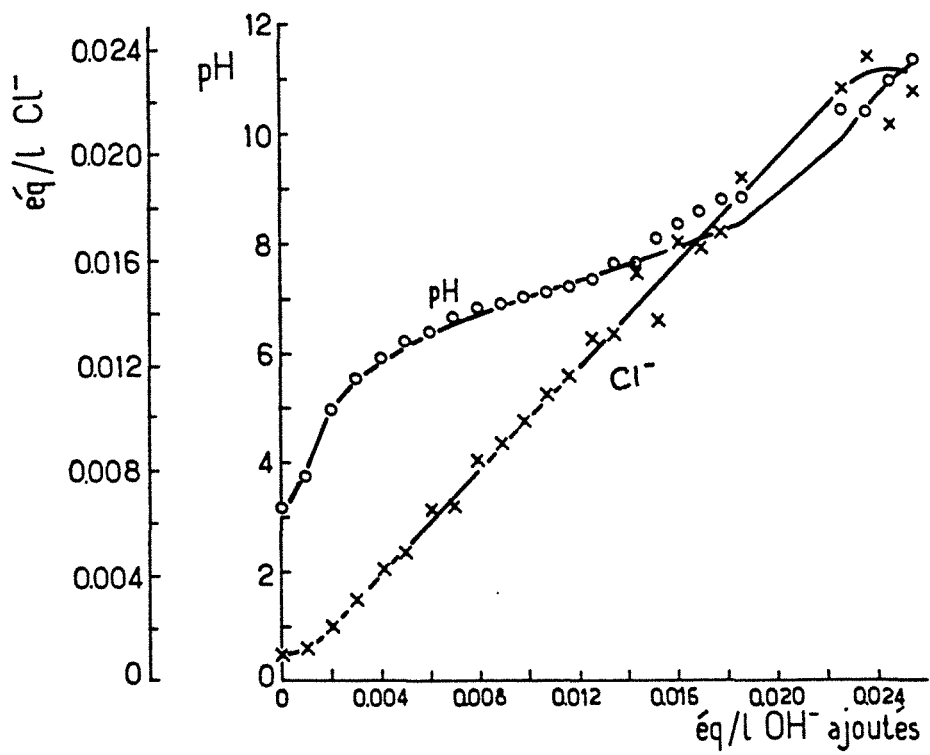


Figure 2-15 : Expérience 5 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure en phase liquide (Duolite A375).

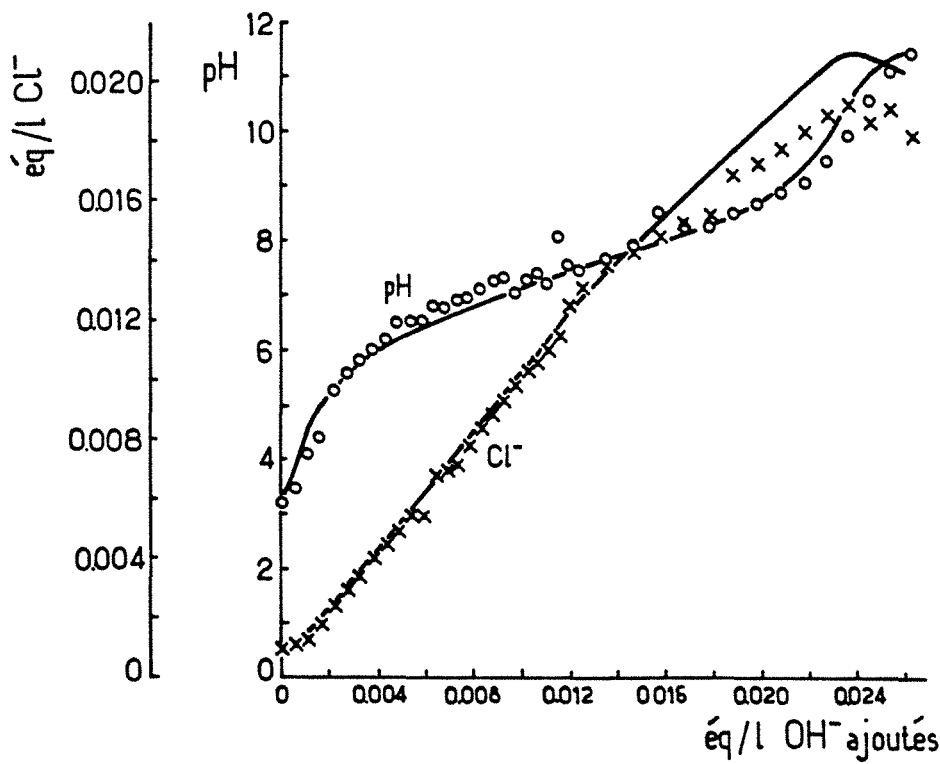


Figure 2-16 : Expérience 6 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure en phase liquide (Duolite A375).

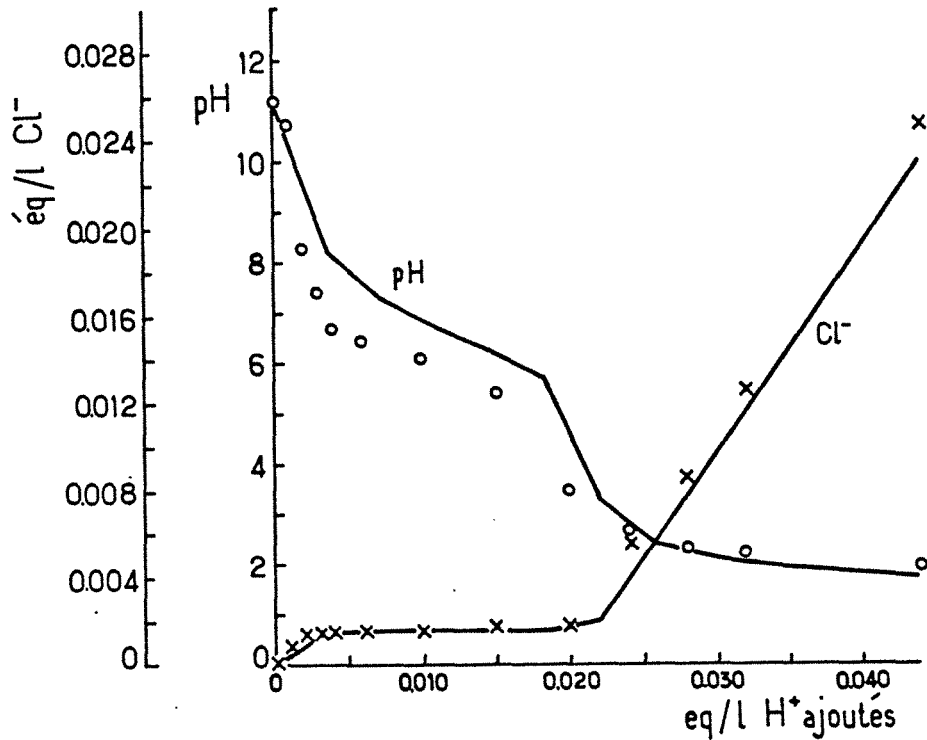


Figure 2-17 : Expérience 7 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure en phase liquide (Duolite A375).

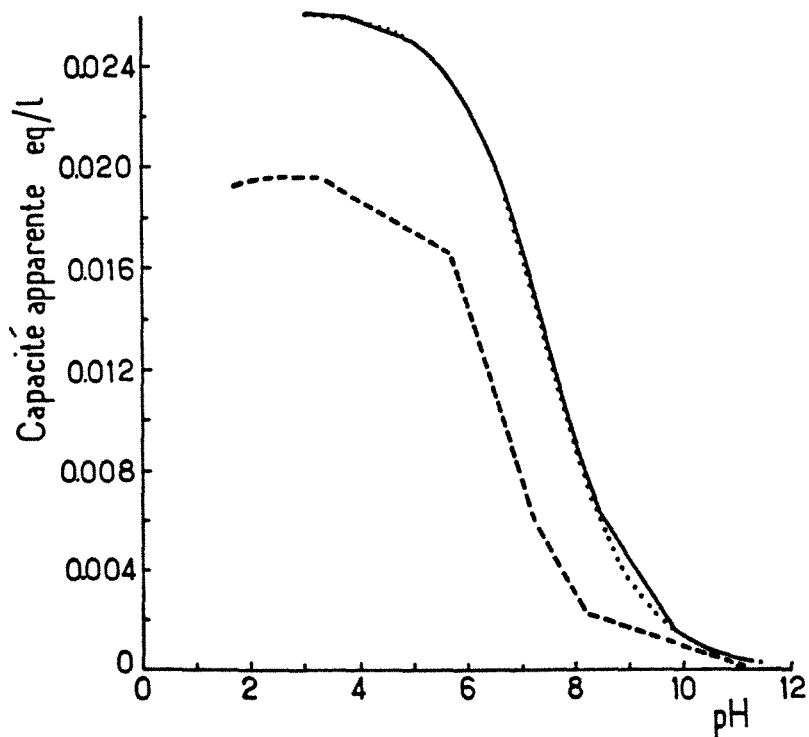


Figure 2-18 : Variations calculées de la concentration en sites ionisés en fonction du pH au cours des dosages (5) —, (6) ---- et (7) (Duolite A375).

III-1.2.2 Duolite A368

Il s'est avéré que pour cette résine, l'équilibration nécessitait environ quatre heures. Par conséquent, on a suivi un protocole différent : pour chaque dosage, une douzaine d'échantillons de 1g de résine humide ont été conditionnés, auxquels différentes quantité d'acide ou de soude ont été ajoutées, le volume total étant toujours ajusté à 100 ml. Le pH et les concentrations ioniques ont été mesurées à l'équilibre. Ainsi, à chaque point correspond une expérience.

n° expérience	Composition initiale de la phase liquide (mol/l)	Titrant		Paramètres ajustables	
8	H ⁺ 1.097 x 10 ⁻³	Titrant	NaOH	KK _{ClOH}	1.0 x 10 ⁻⁸
	OH ⁻ 9.11 x 10 ⁻¹²	Normalité (N)	1.0	Capacité totale	0.0222 mol/l 2.22 mmol/g résine essorée
	Cl ⁻ 1.097 x 10 ⁻³	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.070		
	Na ⁺ 0				
9	H ⁺ 6.80 x 10 ⁻⁴	Titrant	HCl	KK _{ClOH}	1.0 x 10 ⁻⁸
	OH ⁻ 1.47 x 10 ⁻³	Normalité (N)	1.0	Capacité totale	0.0222 mol/l 2.22 mmol/g résine essorée
	Cl ⁻ 0	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.033		
	Na ⁺ 1.47 x 10 ⁻³				

Tableau 2-3 : Dosages de la résine Duolite A368, conditions expérimentales et paramètres.

Les figures 2-19 et 2-20 donnent les variations du pH et de la concentration en chlorure expérimentales et calculées pour les expériences (8) et (9). Les calculs sont effectués avec K = 1.0 10⁻⁸ mol/l, et une concentration totale en sites ionisables de 2.22 10⁻² mol/l (pour 0.1 l de solution). (L'évolution de la capacité en fonction du pH n'est pas représentée car elle est analogue à celle de la résine précédente).

La valeur de la capacité totale est cohérente avec celle que l'on peut calculer d'après les données du fabricant, à savoir 2.32 méq pour 1 g de résine humide. Celle du pK apparent n'est pas donnée, mais l'utilisation est préconisée sur le domaine de pH 0-7 ; il s'agit bien d'une zone où la capacité d'échange est maximale.

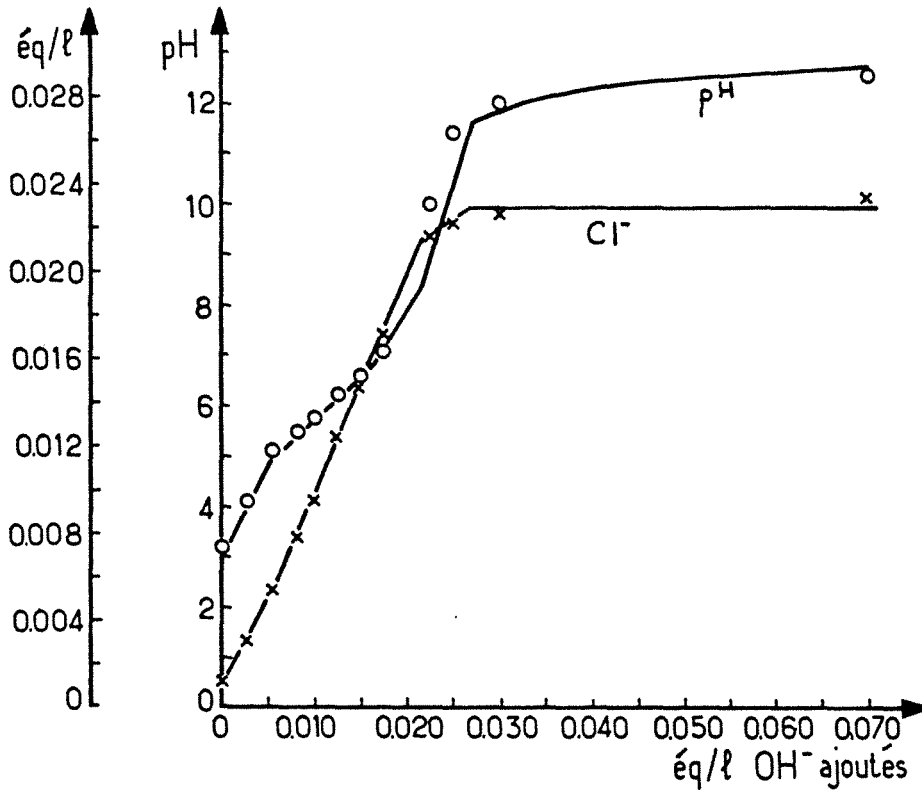


Figure 2-19 : Expérience 8 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure (Duolite A 368).

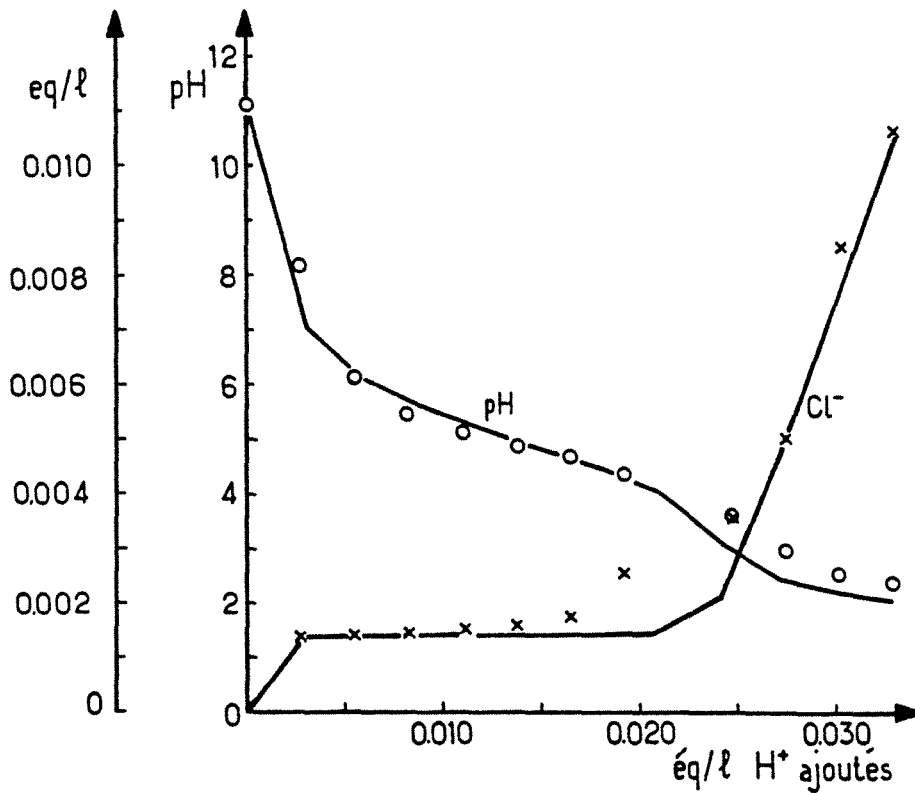


Figure 2-20 : Expérience 9 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure (Duolite A 368).

III-1.3 Discussion

Nous allons discuter brièvement l'interprétation des courbes, l'influence des paramètres, et l'évolution de la capacité apparente.

III-1.3.1 *Exploitation des mesures*

Nous pouvons à nouveau distinguer trois zones sur les courbes de dosage :

- la zone intermédiaire limitée par les deux points d'inflexion de la courbe de pH, à l'intérieur de laquelle se produisent l'ionisation des sites et l'échange d'anions
- les deux zones de part et d'autre des points d'inflexion où a lieu uniquement la dissociation de l'eau.

Le point de demi-dissociation des sites faibles se trouve à mi-chemin des deux points d'inflexion de la courbe de pH. Connaissant ce point, et supposant $K_{Cl,OH} = 1$, on calcule facilement le pK par :

$$pK = -\log (OH^-)_{\alpha=0.5} = 14 - pH_{\alpha=0.5} - \log \frac{(\bar{R})_t}{2} + \log (Cl^-)_{\alpha=0.5} \quad (30)$$

Les courbes prises en exemple ici (figure 2-21) sont calculées avec les paramètres de la résine A375 ($pK=6.5$).

III-1.3.2 *Influence des paramètres ajustables*

On vérifie que les paramètres exercent le même type d'influences que dans le cas des échangeurs de cations (nous ne présentons pas de figure). Nous ne reviendrons pas sur le rôle respectif des valeurs de K et $K_{Cl,OH}$ pour $KK_{Cl,OH}$ fixé, nous supposons $K_{Cl,OH} = 1$.

* Capacité totale :

Une modification de la capacité totale décale le second point d'inflexion de la courbe de pH correspondant au dosage des sites faibles.

* Produit $KK_{Cl,OH}$:

Une modification de la valeur de ce produit entraîne un décalage de la zone intermédiaire de la courbe de pH vers le haut (augmentation de la valeur de K, ionisation des sites favorisée, donc apparition d'hydroxyles en solution) ou vers le bas (diminution de K).

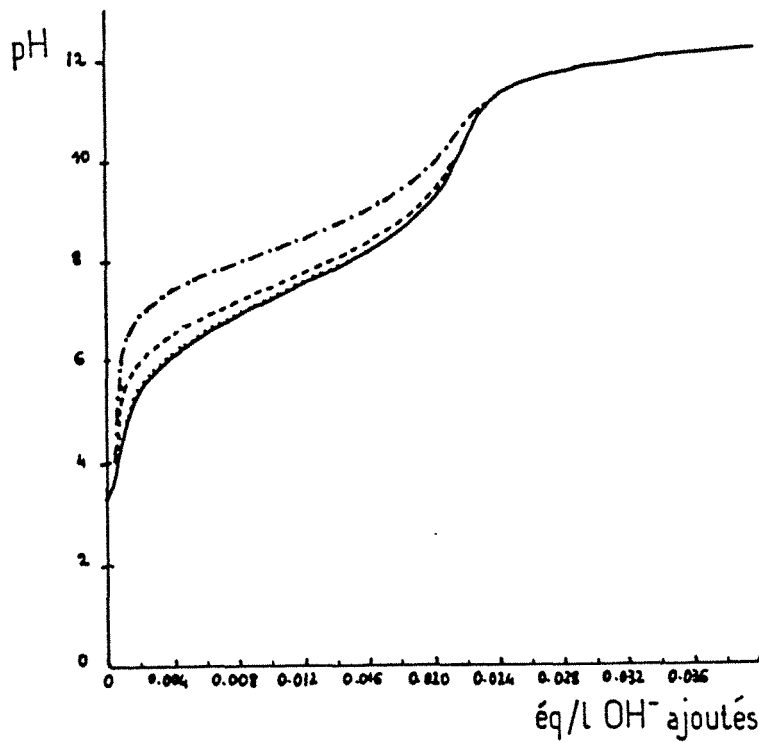


Figure 2-21 : Simulation d'un dosage de la résine Duolite A375, équilibrée par NaOH et dosée par HCl. (Cl^-) initial (mol/l) : — 0. 0.001 --- 0.010 —·— 0.100

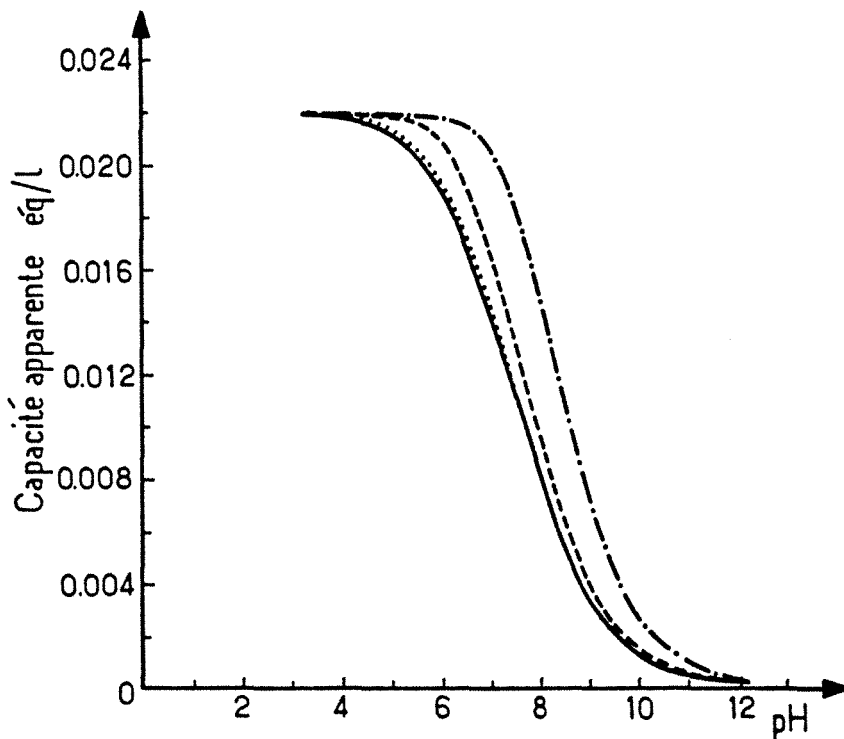


Figure 2-22 : Variations calculées de la concentration en sites ionisés en fonction du pH correspondant aux dosages calculés. (Cl^-) initial (mol/l) : — 0. 0.001 --- 0.010 —·— 0.100

III-1.3.3 Capacité apparente

Elle est représentée par la concentration en sites ionisés ($\overline{RH^+}$) qui dépend du pH et de l'environnement ionique en solution. On présente en figure 2-22 des courbes donnant la capacité apparente en fonction du pH pour des dosages effectués pour différentes concentrations initiales, pour lesquelles la concentration en chlorure varie.

De nouveau, on remarque que pour un pH fixé, plus la concentration initiale en chlorure (ou plus généralement la force ionique) est importante, plus la capacité apparente est forte.

Dans le cadre de nos expériences, lorsque chlorure et hydroxyles sont les seuls anions en solution, dans l'hypothèse où $(OH^-) \ll (Cl^-)$, la capacité apparente est identique à la concentration de chlorure en phase solide (rapporté dans le système correct d'unités).

$$(\overline{RH^+}) \cong (\overline{Cl^-})$$

On peut la calculer analytiquement d'après les équations (25), (26) et (3).

$$(\overline{RH^+}) = \frac{K_{Cl,OH} K}{2} \frac{(Cl^-)}{(OH^-)} \left[\left(1 + 4 \frac{(\overline{R})_t (OH^-)}{K_{Cl,OH} K (Cl^-)} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (31)$$

Cette expression fait intervenir les concentrations en ions OH^- et Cl^- , de la même façon que l'équation (24) fait intervenir (H^+) et (Na^+) .

Si d'autres anions sont présents en solution, cette équation n'est plus valable, et la capacité apparente se calcule numériquement.

III-2 Support échangeur d'anions comportant des sites forts et des sites faibles

III-2.1 Théorie

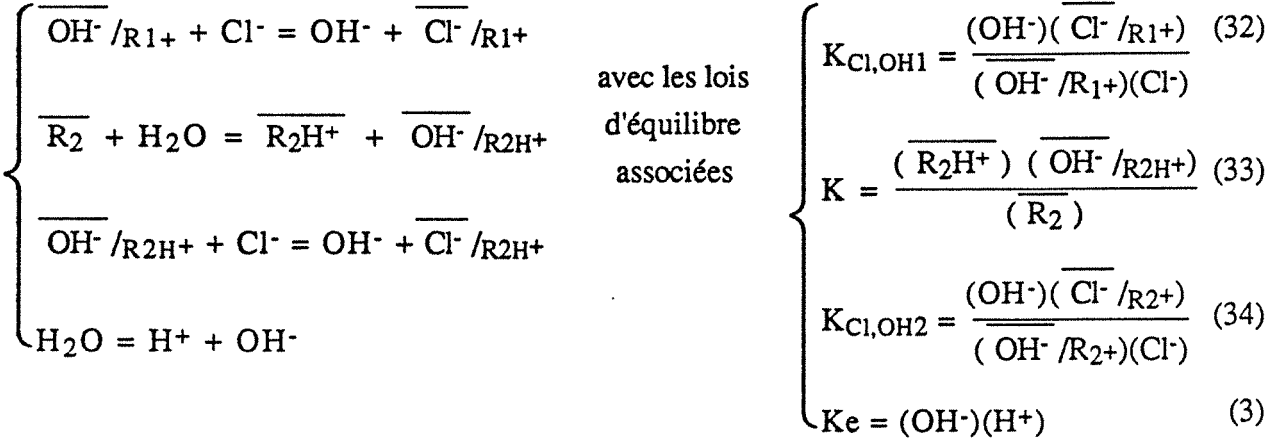
Dans le cas d'un support comportant à la fois des sites forts et des sites faibles, on doit ajouter au schéma réactionnel précédent deux inconnues et une réaction : il s'agit des deux anions fixés sur les sites forts et de la réaction d'échange sur ces sites.

On désignera les sites forts par $\overline{R_1^+}$ ($(\overline{R_1^+})$ est constante, par définition), et les anions fixés sur ces sites par $\overline{OH^- / R_1^+}$ et $\overline{Cl^- / R_1^+}$. On symbolisera par $\overline{R_2H^+}$ et $\overline{R_2}$ les deux formes ioniques des sites faibles, et par $\overline{OH^- / R_2H^+}$, $\overline{Cl^- / R_2H^+}$ les anions fixés sur $\overline{R_2H^+}$.

Les espèces en phase liquide sont toujours H^+ , OH^- , Na^+ , Cl^- (4 variables).

En phase solide, on distingue : $\overline{\text{OH}^-}/\text{R}_{1+}$, $\overline{\text{Cl}^-}/\text{R}_{1+}$ et $\overline{\text{R}_2\text{H}^+}$, $\overline{\text{R}_2}$, $\overline{\text{OH}^-}/\text{R}_{2\text{H}^+}$, $\overline{\text{Cl}^-}/\text{R}_{2\text{H}^+}$ (6 variables) .

Schéma réactionnel :



et les autres relations :

Electroneutralité

$$(\text{Na}^+) + (\text{H}^+) = (\text{OH}^-) + (\text{Cl}^-) \quad (35)$$

$$(\overline{\text{R}_{1+}}) = (\overline{\text{OH}^-}/\text{R}_{1+}) + (\overline{\text{Cl}^-}/\text{R}_{1+}) \quad (36)$$

$$(\overline{\text{R}_2\text{H}^+}) = (\overline{\text{OH}^-}/\text{R}_{2\text{H}^+}) + (\overline{\text{Cl}^-}/\text{R}_{2\text{H}^+}) \quad (37)$$

A priori, on ne connaît ni $K_{\text{Cl,OH1}}$, ni $K_{\text{Cl,OH2}}$, ni K , ni la quantité de sites forts ($\overline{\text{R}_{1+}}$) et de sites faibles ($\overline{\text{R}_2}$),

* Capacité totale en sites faibles :

Elle sera déterminée de préférence au moyen d'un dosage par la soude. Le support étant en équilibre avec de l'acide chlorhydrique, les sites faibles sont tous ionisés, compensés par des ions chlorures, de même que les sites forts. Au cours du dosage par la soude, les sites faibles se dissocient et libèrent des chlorures. Quant aux sites forts, si on se place dans des conditions telles que le chlorure en solution soit en excès par rapport aux hydroxyles, ces sites resteront sous forme chlorure, d'autant plus que le chlorure est habituellement "préféré" aux hydroxyles. Par conséquent, la quantité de chlorure qui apparaît en solution entre l'instant initial et l'instant final du dosage correspond à la quantité totale de sites faibles.

* Capacité totale en sites forts :

Elle doit être mesurée dans des conditions où seul l'échange sur les sites forts intervient. D'où l'idée suivante : si on travaille à pH très élevé, les sites faibles ne sont pas ionisés, et on peut supposer que les sites forts sont compensés par des hydroxyles. On procède alors à un dosage par un sel : on effectue des ajouts de très faibles volumes de chlorure de sodium concentré, jusqu'à ce que le chlorure soit en excès. Le pH n'est alors pas modifié par dilution et on assiste à un échange $\text{OH}^- - \text{Cl}^-$; le chlorure ajouté est d'abord échangé, sa concentration en solution demeure constante jusqu'à la saturation, à partir de laquelle elle augmente avec les ajouts. La différence entre la quantité de chlorure ajouté et celle en solution à la fin du dosage doit être égale à la concentration en sites forts (Figure 2-23).

* Détermination des constantes :

De même que précédemment, on ajustera les constantes en comparant les courbes expérimentales aux courbes calculées. On déterminera K et $K_{\text{Cl},\text{OH}_2}$ à partir des courbes de dosage par la soude et $K_{\text{Cl},\text{OH}_1}$ à partir des dosages par le sel.

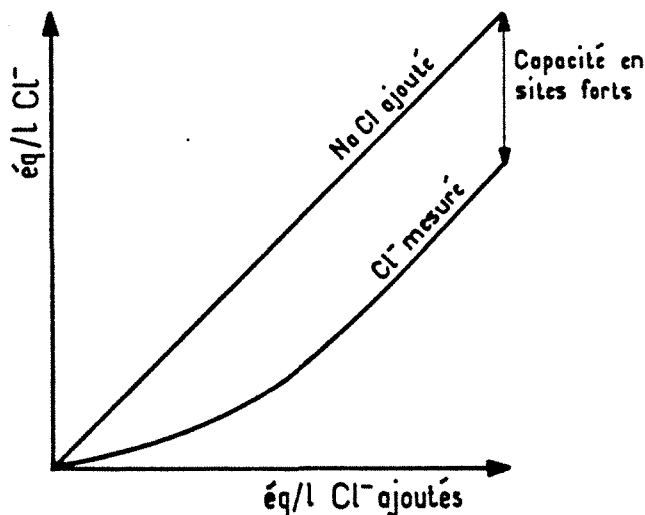


Figure 2-23 : Schéma de principe de la détermination de la concentration en sites forts sur le support DEAE Spheroex LS : dosage par NaCl.

III-2.2 Expériences et modélisation

Conformément aux méthodes présentées ci-dessus, nous avons effectué un dosage du DEAE Spheroex par NaCl (10) pour mesurer la concentration en sites forts, un dosage par la soude (11) pour mesurer la concentration en sites faibles, et un dosage par l'acide (12) qui doit

permettre la validation des paramètres obtenus. Toutes les expériences sont effectuées avec 5 g de support pesé sec sous forme chlorure dans un volume de 100 ml de solution.

n° expérience	Composition initiale de la phase liquide (mol/l)	Titrant	
10	H ⁺ 5.01 x 10 ⁻¹⁰	Titrant	NaCl
	OH ⁻ 9.61 x 10 ⁻¹²	Normalité (N)	1.0
	Cl ⁻ 0	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.020
	Na ⁺ 1.63 x 10 ⁻⁴		
11	H ⁺ 9.89 x 10 ⁻⁴	Titrant	NaOH
	OH ⁻ 1.01 x 10 ⁻¹¹	Normalité (N)	0.102
	Cl ⁻ 9.89 x 10 ⁻⁴	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.0184
	Na ⁺ 0		
12	H ⁺ 2.13 x 10 ⁻¹²	Titrant	HCl
	OH ⁻ 4.70 x 10 ⁻³	Normalité (N)	0.25
	Cl ⁻ 0	Concentration de réf. atteinte (mol/l)	0.033
	Na ⁺ 4.70 x 10 ⁻³		

Tableau 2-4 : Conditions expérimentales des dosages du support DEAE Spherodex LS.

Les dosages (10) et (11) ont donné les résultats suivants :

- concentration en sites forts : 4.12 10⁻³ mol/l
- concentration en sites faibles : 7.30 10⁻³ mol/l

Or, en modélisant le dosage par le sel, il s'est avéré impossible d'obtenir simultanément les courbes de pH et de chlorure correspondant à l'expérience. En effet, la courbe de pH calculée se trouve toujours au-dessus de la courbe expérimentale avec une différence d'environ une unité de pH (Figure 2-24). En jouant sur le nombre de sites forts et sur la constante d'échange KCl,OH1, on parvient seulement à déplacer de manière sensible la courbe de chlorure, on ne réussit pas de cette manière à diminuer la valeur du pH.

Cette différence ne peut pas être imputée à l'erreur expérimentale, puisque le pH a été mesuré à l'aide d'une électrode "haute alcalinité". Nous proposons l'explication suivante : le schéma réactionnel utilisé est trop simple pour décrire l'expérience, il faut y ajouter d'autres espèces et réactions. Ceci est confirmé par un bilan de matière, qui montre l'existence d'un déficit en anions dans la composition initiale de la phase liquide. On peut raisonnablement supposer que à ce pH, les espèces carboniques ne sont pas négligeables, et ajouter au schéma réactionnel l'un des ensembles de réactions suivants :

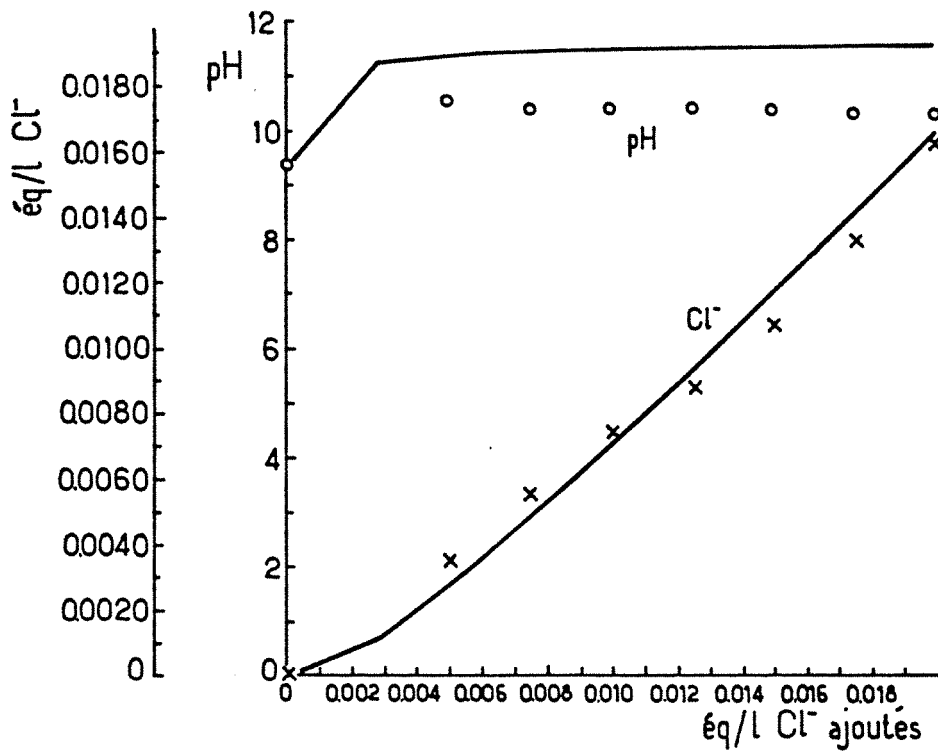
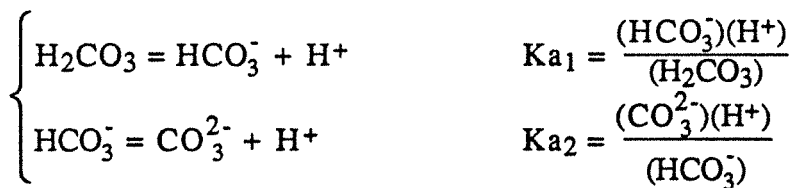


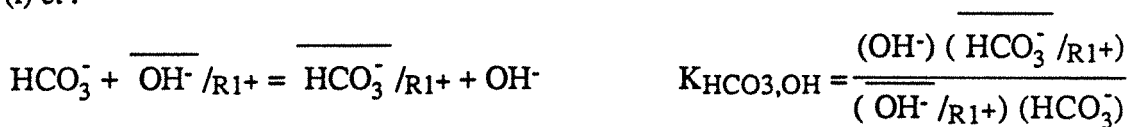
Figure 2-24 : Expérience 10 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure au cours du dosage du support DEAE Spheroex LS.

(i) les équilibres carboniques en phase aqueuse :



(ii) les équilibres carboniques en phase aqueuse plus une réaction d'échange sur sites forts $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ par exemple :

(i) et :



(iii) les équilibres carboniques en phase aqueuse plus deux réactions d'échange sur les sites forts $\text{HCO}_3^-/\text{OH}^-$ et $\text{CO}_3^{2-}/\text{OH}^-$ par exemple :

(ii) et :

$$\overline{\text{CO}_3^{2-}} + 2 \overline{\text{OH}^-} / \text{R1+} = \overline{\text{CO}_3^{2-}} / \text{R1+} + 2 \text{OH}^- \quad K_{\text{CO}_3, \text{OH}} = \frac{(\overline{\text{OH}^-})^2}{(\overline{\text{OH}^-} / \text{R1+})^2} \frac{(\overline{\text{CO}_3^{2-}} / \text{R1+})}{(\overline{\text{CO}_3^{2-}})}$$

En choisissant une concentration en carbonate raisonnable (de l'ordre de $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l, ce qui correspond à l'équilibre avec l'atmosphère), et si nécessaire des valeurs de constantes d'échange carbonate/hydroxyle, on arrive à faire coïncider les courbes expérimentales et calculées pour le chlorure et le pH. Un exemple est donné en figure 2-25, calculé avec le mécanisme (i) (on peut obtenir le même type de courbes avec les autres mécanismes proposés).

Malheureusement, nous ne sommes pas en mesure de valider ce mécanisme car il faudrait connaître précisément la concentration totale en carbonate, ainsi que les concentrations des espèces carboniques en phase aqueuse au cours du dosage.

Nous pouvons seulement en conclure que la méthode de mesure de la concentration en sites forts n'est pas fiable. Elle le serait si seul intervenait l'échange chlorure-hydroxyle, mais ce n'est pas le cas. Par conséquent, la mesure effectuée n'a pas de signification.

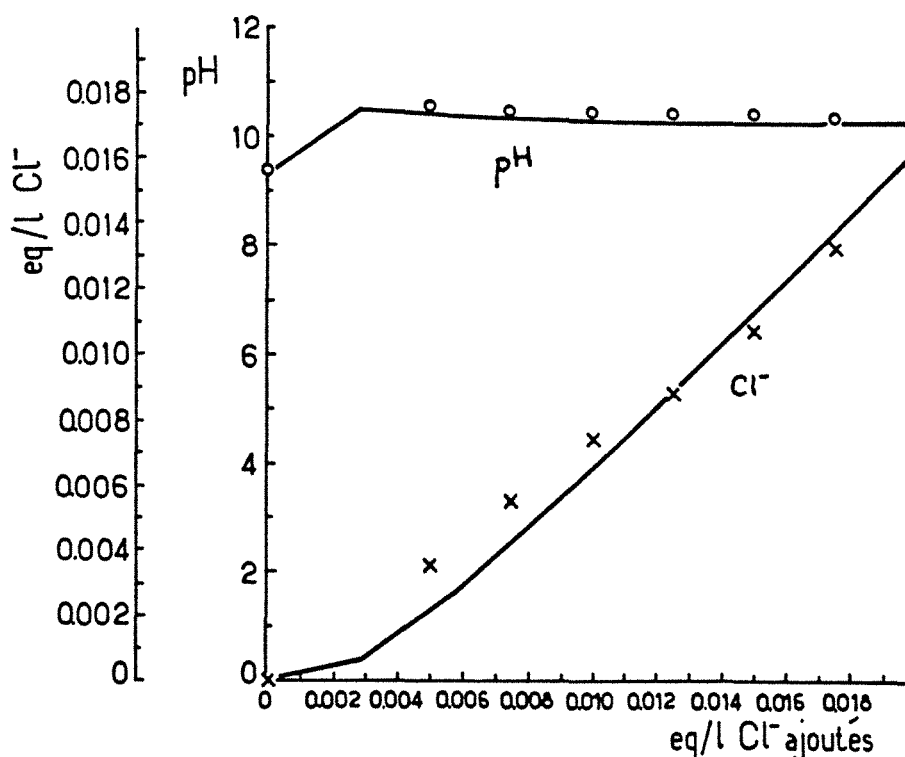


Figure 2-25 : Dosage par NaCl : variations du pH et de la concentration en chlorure expérimentale et calculées à l'aide du mécanisme (i) (DEAE Spheredex).

Notons que pour les autres types de support, l'influence des carbonates en tant qu'espèce échangeable peut être négligée :

- sur l'échangeur de cations faible, les carbonates ne jouent évidemment pas.
- sur l'échangeur d'anions faible, aux pH élevés (pour lesquels l'influence des carbonates est la plus importante), les sites ne sont plus ionisés, il n'y a donc plus d'échange possible.

De même, on ne parvient pas à modéliser le dosage (11) avec le nombre de sites faibles mesurés. Le calcul montre en effet que l'on ne peut pas découpler l'échange d'anions sur sites faibles de celui sur sites forts. On avait supposé que le dosage par la soude provoquerait la dissociation des sites faibles, sans échange OH^-/Cl^- sur les sites forts, étant donné que le chlorure serait toujours en excès par rapport aux hydroxyles au sein de la solution. Or, d'après nos calculs, l'échange Cl^-/OH^- sur sites forts commence dès le second point d'inflexion de la courbe de pH alors que s'achève la dissociation des sites faibles. Au-delà de ce point, le chlorure en solution provient des sites faibles et en partie des sites forts, ce qui montre que la mesure effectuée ne donne pas la concentration en sites faibles.

Autrement dit, il n'est pas évident de mettre au point une méthode pour mesurer séparément les concentrations totales en sites forts et en sites faibles, analogue à celle employée pour les autres supports.

Il reste la possibilité de réaliser un dosage en partant du support équilibré par la soude, en présence d'un excès de sel (NaCl 1N par exemple), et de doser par HCl . On obtiendra ainsi une courbe de pH avec deux points d'inflexion marqués. La quantité d'acide ajouté jusqu'au premier point d'inflexion sera proportionnelle à la capacité en sites forts, et la quantité totale d'acide ajouté jusqu'au second point d'inflexion donnera la capacité totale en sites (il est inutile de suivre la concentration en chlorure dont les variations de l'ordre du mEq/l ne sont pas mesurables dans ces conditions).

A partir d'un dosage ainsi effectué (Figure 2-26), on peut montrer que les capacités sont dans un rapport de 1/3 pour les sites forts, 2/3 pour les sites faibles.

On parvient à modéliser les courbes des dosages (11) et (12) avec le jeu de paramètres suivant :

$$\begin{array}{lll} K = 1 \cdot 10^{-8} \text{ mol/l} & K_{\text{Cl},\text{OH}1} = 1 & K_{\text{Cl},\text{OH}2} = 5 \\ \text{concentration totale en sites forts} & (\overline{R_1^+}) = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} & \\ \text{concentration totale en sites faibles} & (\overline{R_2})_t = 6 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l} & \text{(Figures 2-27 et 2-28)} \end{array}$$

ce qui correspond respectivement pour les sites forts et les sites faibles à :

$$\begin{array}{l} 0.040 \text{ et } 0.120 \text{ mmol/g support sec} \\ \text{et } 0.018 \text{ et } 0.053 \text{ mmol/ml de lit fixe (1g de support pour 2.25 ml)} \end{array}$$

La capacité totale d'échange ($0.018 + 0.053 = 0.071$ mmol/ml de lit fixe) est inférieure à celle indiquée par IBF, soit 0.95 méq/ml lit fixe. Ces valeurs sont donc physiquement raisonnables, même si leur précision pourrait être améliorée par des expériences complémentaires.

III-2.3 Discussion

L'étude de l'influence des paramètres concernant les sites faibles est analogue à celle du cas précédent, à la différence près que dans la zone située au-delà du point d'inflexion de la courbe de pH du côté des pH élevés, se produit l'échange Cl^-/OH^- sur les sites forts. La "largeur" de cette zone est donc déterminée par la capacité en sites forts.

La capacité apparente d'échange est la somme de deux termes : la capacité totale en sites forts (constante) et la capacité apparente en sites faibles. Les variations de celle-ci en fonction du pH et de la composition ionique de la solution se déduisent de celles obtenues dans le cas des supports faiblement basiques à un site (Figure 2-29).

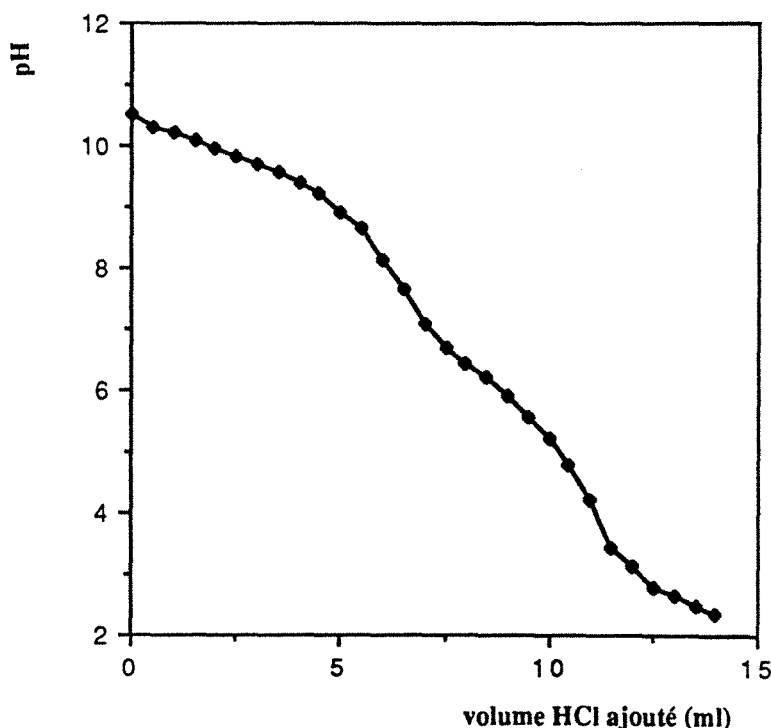


Figure 2-26 : Dosage expérimental du DEAE Sphero dex LS, support équilibré par NaOH, effectué en présence de KCl 1 N, dosé par HCl 0.1 N.

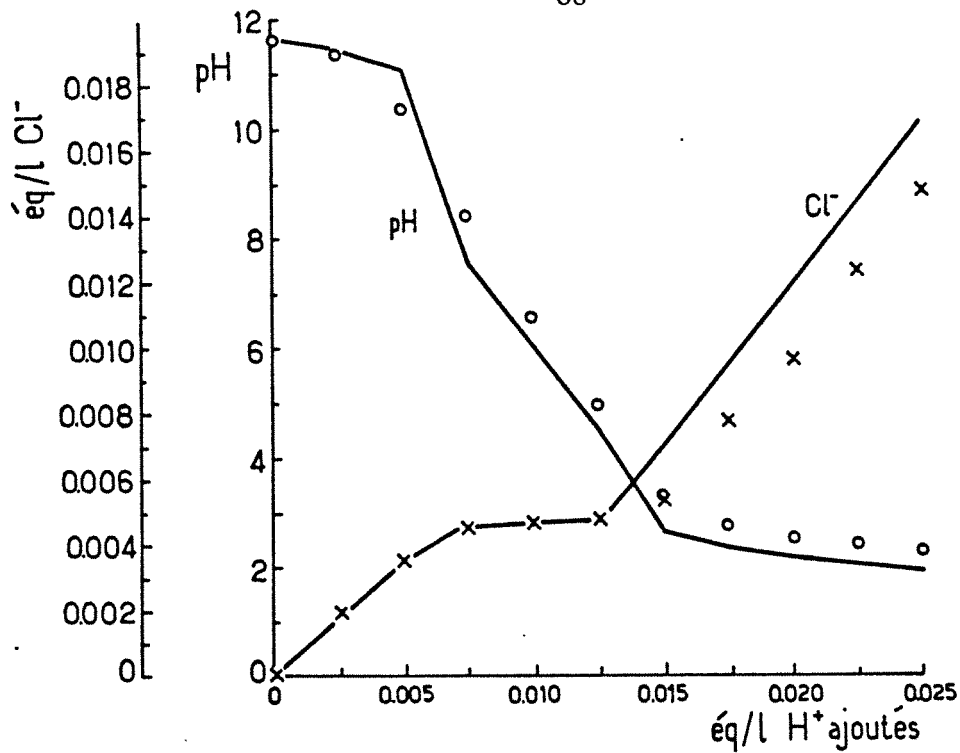


Figure 2-27 : Expérience 12 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure au cours du dosage du support DEAE Spherox LS ; support équilibré par NaOH et dosé par HCl.

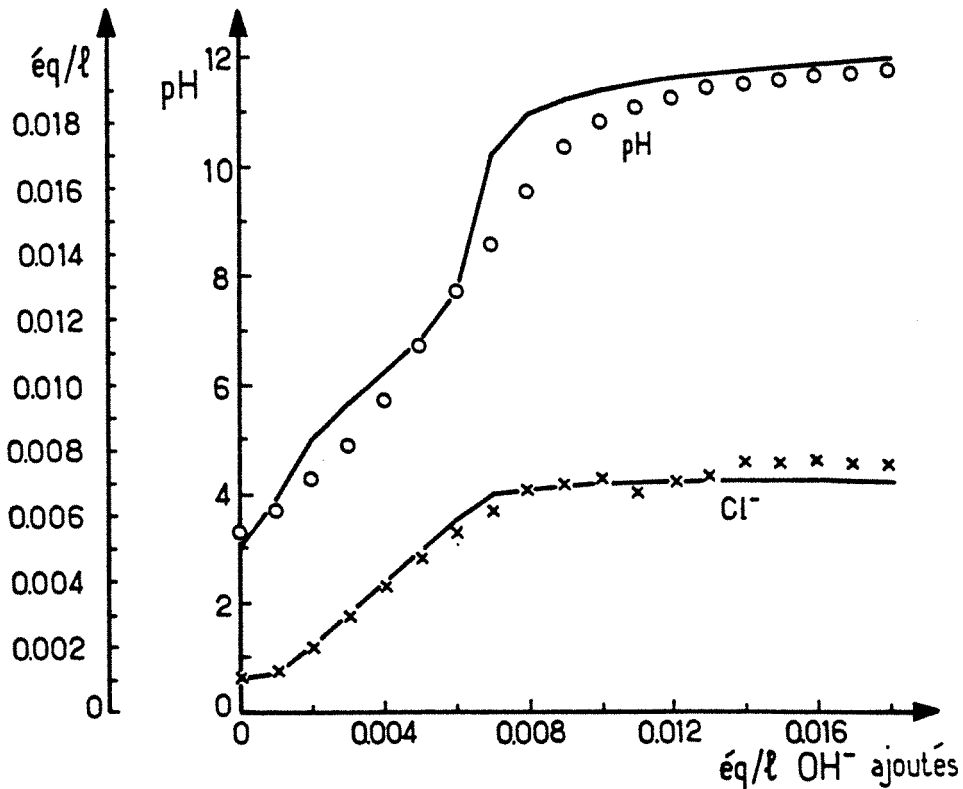


Figure 2-28 : Expérience 11 : variations expérimentales et calculées du pH et de la concentration en chlorure au cours du dosage du support DEAE Spherox LS ; support équilibré par HCl et dosé par NaOH.

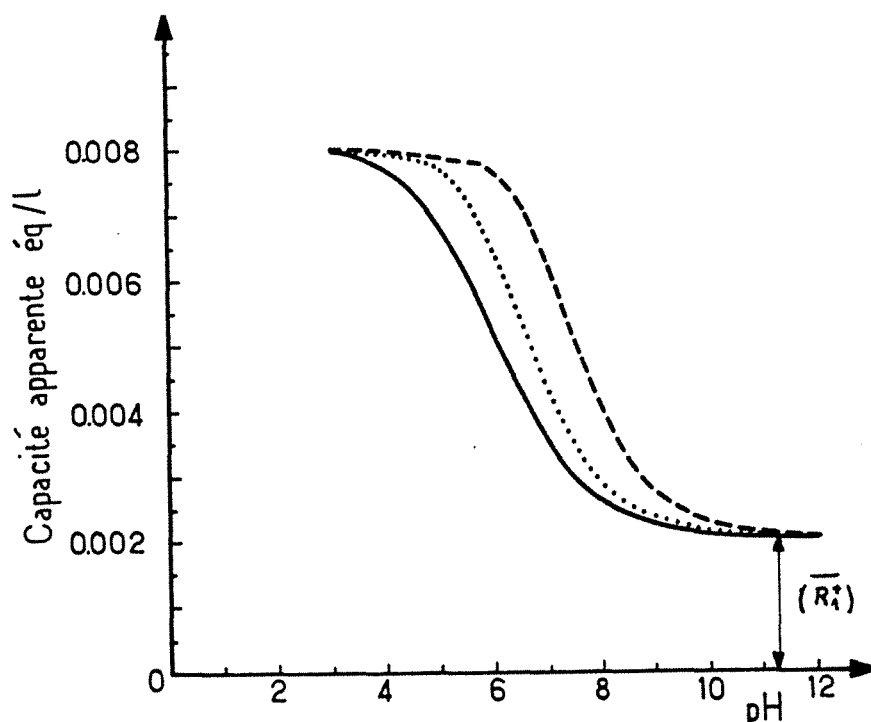


Figure 2-29 : Variations calculées de la concentrations en sites ionisés en fonction du pH au cours du dosage du support DEAE Spherox LS, équilibré par dosé par pour différentes valeurs de la concentration initiale en chlorure. (Cl^-) initial (mol/l) : 0. 0.01 0.10

Dans nos cas expérimentaux, en supposant que chlorure et hydroxyles sont les seuls anions échangeables, et que les sites faibles ionisés sont totalement compensés par des chlorures, la capacité apparente est donnée par :

$$(\overline{R_1^+}) + (\overline{R_2H^+}) = (\overline{R_1^+}) + \frac{KK_{\text{Cl,OH}_2}}{2} \frac{(\text{Cl}^-)}{(\text{OH}^-)} \left[\left(\frac{4(\overline{R_2})_t}{K_{\text{Cl,OH}_2} K} \frac{(\text{OH}^-)}{(\text{Cl}^-)} + 1 \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (38)$$

CONCLUSION

Pour les supports faibles étudiés, nous avons déterminé expérimentalement à partir de dosages acide-base, la capacité totale d'échange, ainsi que la constante de dissociation du site. Les capacités totales mesurées sont en accord avec les valeurs indiquées par les fabricants, bien que la faible taille des échantillons utilisés augmente l'incertitude, (surtout si l'on change la quantité caractéristique à laquelle la capacité est rapportée, par exemple lorsque l'on convertit des méq/g de support sec en méq/ml de lit fixe).

Les constantes de dissociation des sites n'ont pas de rapport avec les pK apparents indiqués par les fabricants. En effet, ces dernières valeurs fournissent une indication pratique, à savoir le pH limite au-dessus ou en-dessous duquel la capacité apparente s'annule.

Cette indication a une importance pratique, puisque en général, on cherche à optimiser l'utilisation du support, en travaillant à capacité maximale au cours de la saturation, et à capacité minimale en régénération. Mais ces valeurs ne peuvent pas être interprétées comme constantes de dissociation de sites et utilisées comme telles dans un schéma réactionnel.

En revanche, les valeurs de constantes de dissociation que nous avons déterminées ne donnent pas d'indication pratique immédiate, mais entrent dans des schémas réactionnels à partir desquels on peut simuler des dosages, mais aussi, et c'est sans doute le plus important, des échanges en réacteur fermé ou en colonne.

Cette approche a des limites dans la mesure où elle permet actuellement de décrire uniquement l'échange d'ions par une loi d'action de masse, avec une sélectivité constante, ce qui peut être insuffisant dans certains cas, par exemple lorsque l'isotherme de l'échange a une forme particulière (sigmoïde) ou que la "constante" dépende fortement de la normalité (échange hétérovalent). Il faudrait alors pouvoir employer une loi d'échange plus générale.

Mais dans son domaine d'utilisation, cette méthode donne des résultats plutôt satisfaisants.

ANNEXE 2. : COMPLEMENTS D'INFORMATION SUR LES SUPPORTS ETUDIES

I- DEAE-/CM-SPHERODEX® LS

d'après IBF (Product Information n° 205102)

Description :

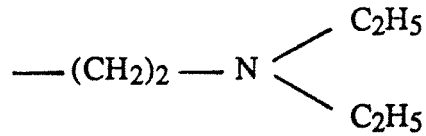
Les échangeurs Spheredex sont des échangeurs d'ions composites, qui se présentent sous forme de billes rigides constituées de silice recouverte d'un réseau de dextrane, substitué de groupes ionisables. La silice leur confère une forte rigidité, permettant de supporter des pressions importantes, tandis que le dextrane ionisable leur donne les caractéristiques d'échangeurs d'ions hydrophiles, biocompatibles. Les propriétés sont résumées dans le tableau A-2-1 :

	DEAE Spheredex®	CM Spheredex®
Taille de bille pour la qualité LS	100 - 300 µm	
Limite d'exclusion	10 ⁶ - 10 ⁷ dt	
Diamètre poreux moyen	1 000 Å	
Surface spécifique	25 cm ² /g	
Nature des groupes ionisables	amine tertiaire	acide carboxylique
Quantité de groupes ionisables	90 µég/ml	90 µég/ml
pK des groupes ionisables	10 et 6.5	4.2
Stabilité au pH	1 - 14	
Stabilité à la chaleur	autoclavable	
Stabilité aux solvants organiques	excellente	
Changement de volume dû au pH, à la force ionique, aux solvants	aucun	
Volume occupé par 1 g de support en lit fixe	2 - 2.5 ml	

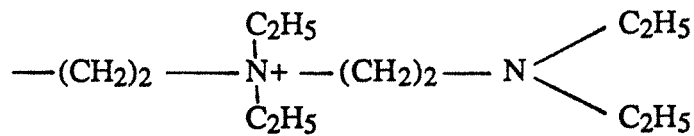
Tableau A-2-1 : Principales propriétés des supports Spheredex

Le support DEAE comporte 2 types de sites :

- l'amine tertiaire DEAE :



- l'amine quaternaire :



résultant de la polymérisation de sites DEAE.

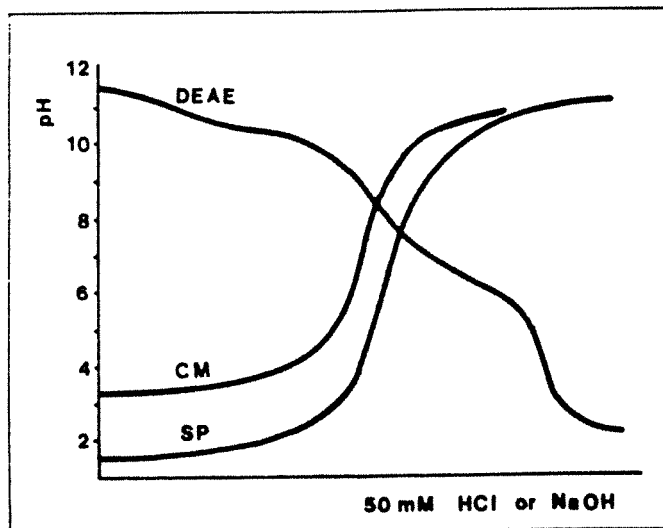


Figure A-2-1 : Exemple de courbe de dosage acide-base des supports Spheredex, d'après IBF Product Information n° 205102.

Applications :

Ces supports sont utilisés essentiellement pour la chromatographie des protéines, à l'échelle du laboratoire, ou à l'échelle préparative.

II- Duolite A375

d'après la note d'information Duolite DTS 0120 F.

Description :

La Duolite A375 est une résine échangeuse d'anions moyennement basique de porosité élevée. Sa structure polyacrylique macroporeuse lui confère des propriétés très intéressantes :

- une excellente résistance physique et une stabilité chimique élevée ;
- une porosité adaptée à la fixation réversible des matières organiques, ce qui réduit les risques d'empoisonnement ;
- une régénération complète à la soude à un taux voisin de la quantité stoechiométrique (110 % à 120 %) ;
- une basicité plus élevée que celle d'autres résines moyennement basiques ; cette propriété particulière lui donne un avantage décisif dans un grand nombre d'applications spéciales.

Ses propriétés sont résumées dans le tableau A-2-2.

Squelette	Polyacrylique macroporeux
Groupes fonctionnels	Amines tertiaires
Aspect	Billes blanc crème
Forme ionique de livraison	Base libre
Densité réelle	Environ 1.10
Masse volumique apparente	Environ 730 g/l
Granulométrie	0.3 à 1.2 mm
Rétention d'humidité	58 à 63 % (forme base libre)
Capacité totale d'échange	1.6 éq/l de lit
pK apparent	Environ 9.5
Gonflement réversible maximum	25 % entre base libre et Cl ⁻
Température maximum tolérée	60°C
Résistance chimique	Insoluble dans les acides et les bases dilués et dans les solvants habituels

Tableau A-2-2 : Principales propriétés du support Duolite A375.

Applications :

1. Traitement d'eau

Grâce à ses excellentes propriétés de fixation et de désorption des matières organiques, la Duolite A375 donne de très bons résultats en déminéralisation d'eaux de surface contenant des matières organiques. Elle produit une eau de plus faible conductivité et possède une capacité

utile d'échange plus élevée de 10 à 20 % que les résines moyennement basiques polystyréniques courantes.

2. Applications spéciales

La déminéralisation de solutions organiques n'est généralement pas totale et elle dépend à la fois de l'acidité des composants à fixer et de la basicité de la résine faiblement basique ; le pK de la Duolite A375, plus élevé, a été choisi pour apporter une solution efficace à ce problème.

On utilise la Duolite A375 pour fixer des composés acides (colorants, rejets industriels, etc.) dans des solutions où les autres résines faiblement ou fortement basiques se dégradent chimiquement, se polluent rapidement ou ne sont pas assez performantes.

On peut citer parmi les applications de cette résine :

- Désacidification des lactosérums,
- Déminéralisation de gélatine,
- Déminéralisation de jus sucrés,
- Fixation d'acides aminés.

III- Duolite A 368

d'après l'information Duolite D.D.L.0.039 F.

La Duolite A368 est une résine échangeuse d'anions moyennement basique, polystyrénique. Ses propriétés en font une résine remarquablement efficace en déminéralisation de l'eau, pour l'élimination des acides forts et la protection des échangeurs d'anions fortement basiques contre les matières organiques. La Duolite A368 est caractérisée principalement par :

- une excellente résistance mécanique et une grande stabilité chimique et thermique ;
- une bonne vitesse d'échange ;
- une forte capacité d'échange utile ;
- un excellent comportement à l'égard des matières organiques. La structure macroporeuse de la Duolite A368 lui assure de remarquables propriétés de fixation réversible des matières organiques.

Ses principales caractéristiques physiques et chimiques de la Duolite A368 sont indiquées dans le tableau A-2-3.

La résine est livrée à l'état humide et sous la forme régénérée OH. La Duolite A368 est une résine infusible, insoluble dans l'eau, les acides et bases non oxydants et dans les solvants usuels. Elle se présente sous forme de billes dont la taille est généralement comprise entre 0.3 et 1.2 mm.

Squelette	Polystyrénique macroporeux
Groupe fonctionnels	— N (R ₂) = environ 90 %
Aspect	Billes couleur ivoire
Densité réelle	1.06 forme Cl
Densité apparente	Environ 700 g/l - forme OH
Variation de volume maximum	Forme OH ---> forme Cl : + 40 %
Teneur en eau	Environ 50 %, forme OH
Capacité d'échange totale	1.7 éq/l
Températures maximales tolérées	60°C, forme OH 100°C, forme Cl

Tableau A-2-3 : Caractéristiques physiques et chimiques de la résine Duolite A368.

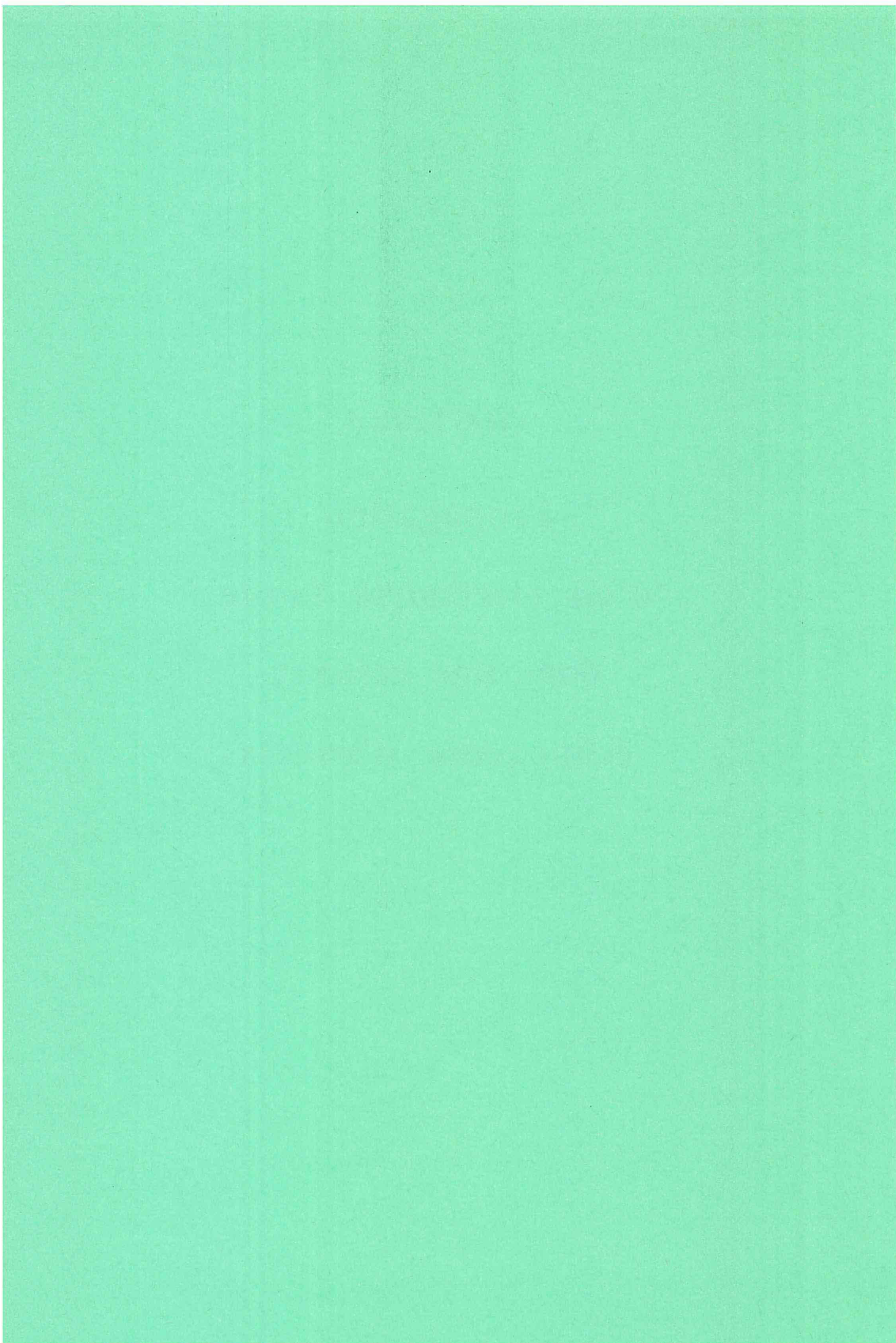
Applications :

L'utilisation de la Duolite A368 est par conséquent recommandée en déminéralisation de l'eau :

1. Lorsque l'on désire une capacité utile particulièrement élevée.
2. Lorsque la charge organique de l'eau à traiter est élevée et peut être sujette à des variations brutales (eaux de surface, possibilité de crues...).
3. Lorsque l'eau contiendra des quantités notables de détergents. Il sera préférable soit de protéger les échangeurs d'anions par une colonne scavenger (Duolite S37), soit de remplacer la Duolite A368 par la Duolite A561.

CHAPITRE 3

Propagation d'un électrolyte faible dans une colonne échangeuse d'anions



INTRODUCTION

Ce chapitre a pour objet la mise en évidence des interactions entre un support échangeur d'ions et un tampon de pH (ou plus généralement une solution comportant un équilibre de dissociation), en l'absence de protéine.

Dans la première partie, on étudie la réponse d'une colonne échangeuse d'anions équilibrée par un tampon de pH et alimentée par un tampon de même nature, au même pH mais de molarité différente. On montre alors théoriquement et expérimentalement l'existence d'une onde de pH, c'est à dire d'une variation de pH qui se propage dans la colonne. Les systèmes considérés ici sont les tampons acétate de sodium et phosphate de potassium, avec un échangeur d'anions fort.

Dans la seconde partie, on étudie le comportement d'une colonne échangeuse d'anions lorsque sont mis en jeu un électrolyte faible, tampon de pH par exemple, et un anion qui n'est impliqué dans aucune réaction de dissociation, comme le chlorure. On montre alors que malgré l'utilisation de solutions tampons, d'importantes variations de pH peuvent se produire dans la colonne.

I. PROPAGATION D'ONDES DE pH

I-1 Théorie

Les résultats sont interprétés dans le cadre de la théorie de l'équilibre [TONDEUR et BAILLY, 1986] , dont les principales hypothèses sont les suivantes :

- les équilibres d'échange d'ions et de dissociation en solution sont atteints en tout point, à tout instant,
- les cations et les espèces neutres sont exclus de l'intérieur de la résine,
- le volume du lit est constant (pas de gonflement),
- le transfert de matière s'effectue par convection,
- l'écoulement du liquide est piston,
- le comportement est isotherme,
- les sélectivités des échanges binaires sont constantes.

De plus, on négligera les corrections dues aux activités.

Ces hypothèses simplificatrices ne permettent pas une description quantitative précise du comportement de la colonne, mais on peut dégager les principales tendances, comme le nombre de fronts d'échange, leur vitesse de propagation, leur comportement compressif ou dispersif, ainsi que la composition des plateaux situés entre ces fronts. En ce sens, cette théorie a déjà fait ses preuves [CLIFFORD, 1978]. L'écart à l'équilibre se traduit essentiellement par un étalement des fronts, provoqué par des phénomènes d'ordre hydrodynamique et cinétique. Dans le cadre de ces hypothèses, le bilan de matière pour une espèce i dans une tranche différentielle de colonne s'écrit :

$$\left(\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial t} \right)_z + \left(\frac{\partial C_i}{\partial t} \right)_z + v_0 \left(\frac{\partial C_i}{\partial z} \right)_t = 0 \quad (1)$$

sous réserve que l'espèce i n'apparaisse ni ne disparaisse sous l'effet d'une réaction chimique, où v_0 est la vitesse intersticielle de déplacement du fluide, C_i la concentration en espèce i dans la solution, $\overline{C_i}$ la concentration en espèce i sur le support.

Du bilan (1), on peut déduire la vitesse à laquelle une concentration donnée, constante, se déplace dans la colonne :

$$v_{C_i} = \left(\frac{dz}{dt} \right)_{C_i} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_i} \right)_z} \quad (2)$$

Cette équation permet de calculer la vitesse de déplacement d'une onde de concentration (c'est à dire les vitesses de toutes les concentrations composant l'onde), appelée aussi transition ou front, habituellement utilisée en chromatographie d'échange d'ions multiconstituant.

Elle s'applique aux espèces qui ne sont impliquées dans aucune réaction chimique, comme par exemple Na^+ dans les cas présentés ultérieurement, et aux groupes d'espèces impliquées dans des réactions, mais dont la concentration totale reste constante [KLEIN, 1981]. Par exemple, la quantité totale d'acétate en solution reste inchangée par la réaction $\text{AcOH} = \text{AcO}^- + \text{H}^+$. Par conséquent, l'équation (2) peut s'appliquer à la concentration totale en acétate $(\text{Ac}) = (\text{AcO}^-) + (\text{AcOH})$.

L'équation (2) montre que la vitesse de déplacement d'une concentration C_i varie de façon

inverse à la quantité $\left(\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_i}\right)$ qui est égale à la pente de l'isotherme au point C_i pour un échange binaire, dans le cadre des hypothèses d'équilibre local. On peut de ce fait distinguer trois sortes de fronts :

- lorsque l'isotherme est favorable à l'espèce i , les fortes concentrations se déplacent plus vite que les faibles. Ainsi, si les conditions sont telles que les fortes concentrations se trouvent en aval des faibles concentrations, l'onde va s'étaler en se déplaçant : il s'agit d'une onde dispersive.
- Dans le cas contraire, elle se comprimera, il s'agit alors d'une onde compressive, qui tend vers l'état limite d'onde de choc (discontinuité entre les concentrations amont et aval) ; une onde de choc peut également se former immédiatement à l'intérieur de la colonne sous l'effet d'un signal d'entrée de type variation-échelon de concentration. Le bilan (1) ne s'applique pas aux discontinuités, il doit être remplacé par un bilan intégral, et la vitesse de propagation de l'onde est donnée par :

$$v_{\Delta C_i} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\Delta \overline{C_i}}{\Delta C_i}\right)_z} \quad (3)$$

où les Δ sont les différences de concentration entre les deux bornes du choc.

- Il peut exister un autre type d'onde, pour laquelle la vitesse de déplacement ne varie pas avec la concentration : il s'agit d'une onde indifférente (à l'échange d'ions). Elle est composée de variations de concentrations en solution uniquement, pour les espèces non impliquées dans une réaction d'échange d'ions (Na^+ par exemple). En principe, une telle onde ne se comprime ni ne s'étale, mais en réalité, sa forme est déterminée par les caractéristiques de l'écoulement dans le lit et la forme du signal d'entrée.

Dans le cas d'isothermes de forme particulière (par exemple sigmoïde), on peut avoir des ondes "composites" constituées à partir des précédentes.

I-2 Le système acide acétique-acétate de sodium

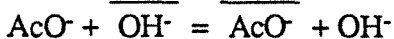
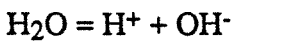
Ce système est relativement simple, puisqu'il comporte une seule réaction de dissociation, et un seul équilibre d'échange d'ions. On considère le cas où la colonne est équilibrée avec une solution d'acide acétique-acétate de sodium à une certaine concentration, et alimentée par une solution contenant les mêmes espèces, à une concentration différente ; le signal d'entrée est une variation échelon de concentration totale ou de normalité.

I-2.1 Variables - relations - variance

On distingue les espèces suivantes :

- en phase liquide : AcOH , AcO^- , H^+ , Na^+ , OH^-
- sur la résine (anionique forte) : OH^- , AcO^-

Les réactions :



Relations :

- équilibres de dissociation :

$$K_e = (\text{H}^+) (\text{OH}^-) \quad (4)$$

$$K_a = \frac{(\text{AcO}^-) (\text{H}^+)}{(\text{AcOH})} \quad (5)$$

- équilibre d'échange d'ions :

$$K_{\text{AcO},\text{OH}} = \frac{(\text{AcO}^-) (\text{OH}^-)}{(\text{AcO}^-) (\text{OH}^-)} \quad (6)$$

- électroneutralité :

$$(\text{OH}^-) + (\text{AcO}^-) = (\text{Na}^+) + (\text{H}^+) \quad (7)$$

$$(\text{OH}^-) + (\text{AcO}^-) = \bar{C} \quad (8)$$

Nous ajouterons la variable : $(Ac) = (AcOH) + (AcO^-)$ (9)

désignant la concentration totale en acétate dans la phase liquide.

Toutes les concentrations sont exprimées en moles par litre de solution.

Pour ce système, on a 8 variables et 6 relations indépendantes. Par conséquent, la variance vaut deux, et on peut montrer [KLEIN, 1981] que, pour un état initial uniforme du lit, une variation échelon de la composition d'alimentation engendre en général deux ondes. L'équation (2) donnant la vitesse de déplacement des concentrations peut s'appliquer au sodium et à la concentration totale en acétate, les autres espèces étant incluses dans des réactions chimiques. On peut alors écrire :

$$v_{Na^+} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{Na^+})}{\partial(Na^+)} \right)_z} = v_0 \quad (10)$$

étant donné que le sodium est exclu de la résine : $\frac{\partial(\overline{Na^+})}{\partial(Na^+)} = 0$

$$v_{Ac} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{AcO^-})}{\partial(Ac)} \right)_z} \leq v_0 \quad (11)$$

On en déduit que le front de concentration en sodium se déplace à la vitesse du fluide. A l'endroit où se trouve ce front, la concentration totale en acétate peut varier, mais, pour des raisons de cohérence, comme le front se déplace à la vitesse v_0 , on aura $\frac{\partial(\overline{AcO^-})}{\partial(Ac)} = 0$ à cet endroit. La composition en espèces fixées sera constante.

En d'autres termes, aucun échange d'ions ne peut se produire là où se trouve le front de sodium : l'échange ne peut s'effectuer que dans un front retardé par rapport au sodium. Le comportement de la colonne est illustré par la Figure 3-1.

I-2.2 Résultats expérimentaux, modélisation par la théorie de l'équilibre

I-2.2.1 Premier cas : milieu basique

La colonne est initialement en équilibre avec une solution (prééquilibrant) de faible molarité, de pH basique ; elle est alimentée par une solution de forte molarité, également

basique, qui devait se trouver au même pH que la précédente, mais cette différence de pH ne modifie pas le comportement général. Les milieux ne sont évidemment pas des tampons classiques, mélanges équimolaires d'acide acétique et d'acétate de sodium ; ce sont des solutions d'acétate de sodium, dont le pH a été ajusté par ajout de soude. Ce sont quand même bien des solutions tampons, au sens où leur pH ne varie pratiquement pas lors de faibles ajouts d'acide ou de base.

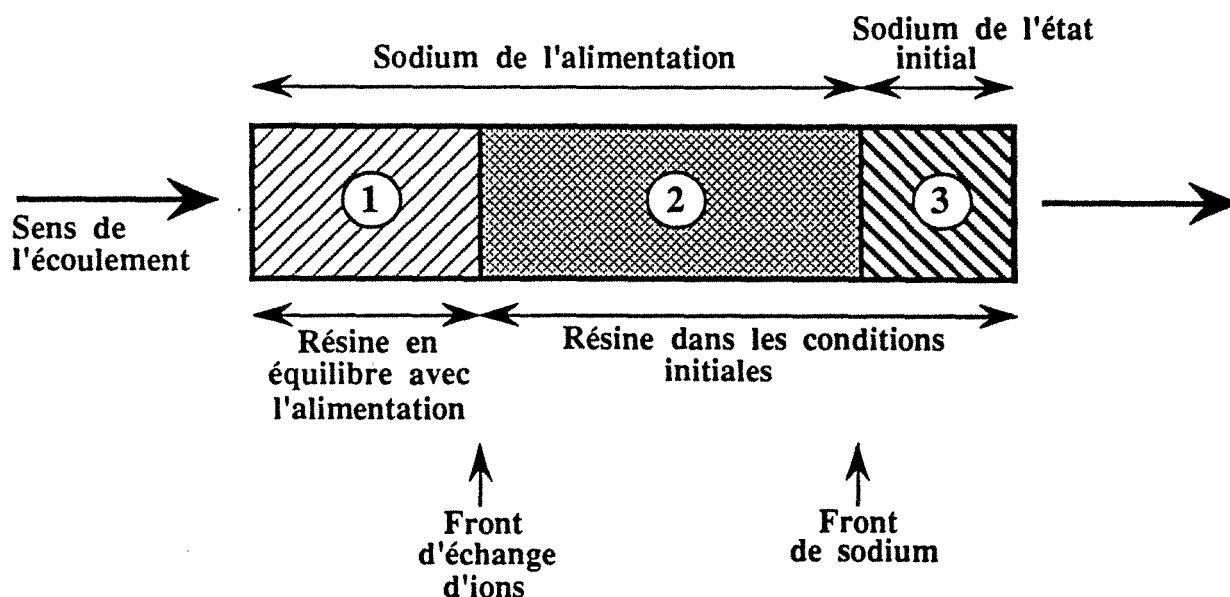


Figure 3-1 : Comportement de la colonne pour un système de variance deux.

La Figure 3-2 montre les évolutions en sortie de colonne du pH et des concentrations de sodium et d'acétate total, expérimentales et calculées d'après la théorie de l'équilibre. Les détails concernant la procédure expérimentale et le calcul se trouvent en Annexes 3-1 et 3-2.

La première onde (front de sodium) est une onde indifférente résultant uniquement du changement de normalité, qui sort théoriquement au volume mort de la colonne (1 Vp). Elle est composée d'une augmentation des concentrations des trois espèces Na^+ , OH^- , acétate total. Dans l'hypothèse retenue d'exclusion, la composition de la résine ne peut pas être modifiée par le passage de cette onde. Le volume mort observé (environ 2 Vp) est très supérieur au volume

mort théorique. Il y a donc probablement une sorption non négligeable d'électrolyte (ce qui n'a pas été observé par Helfferich et Bennett [1984]). Après cette onde, le sodium ne varie plus.

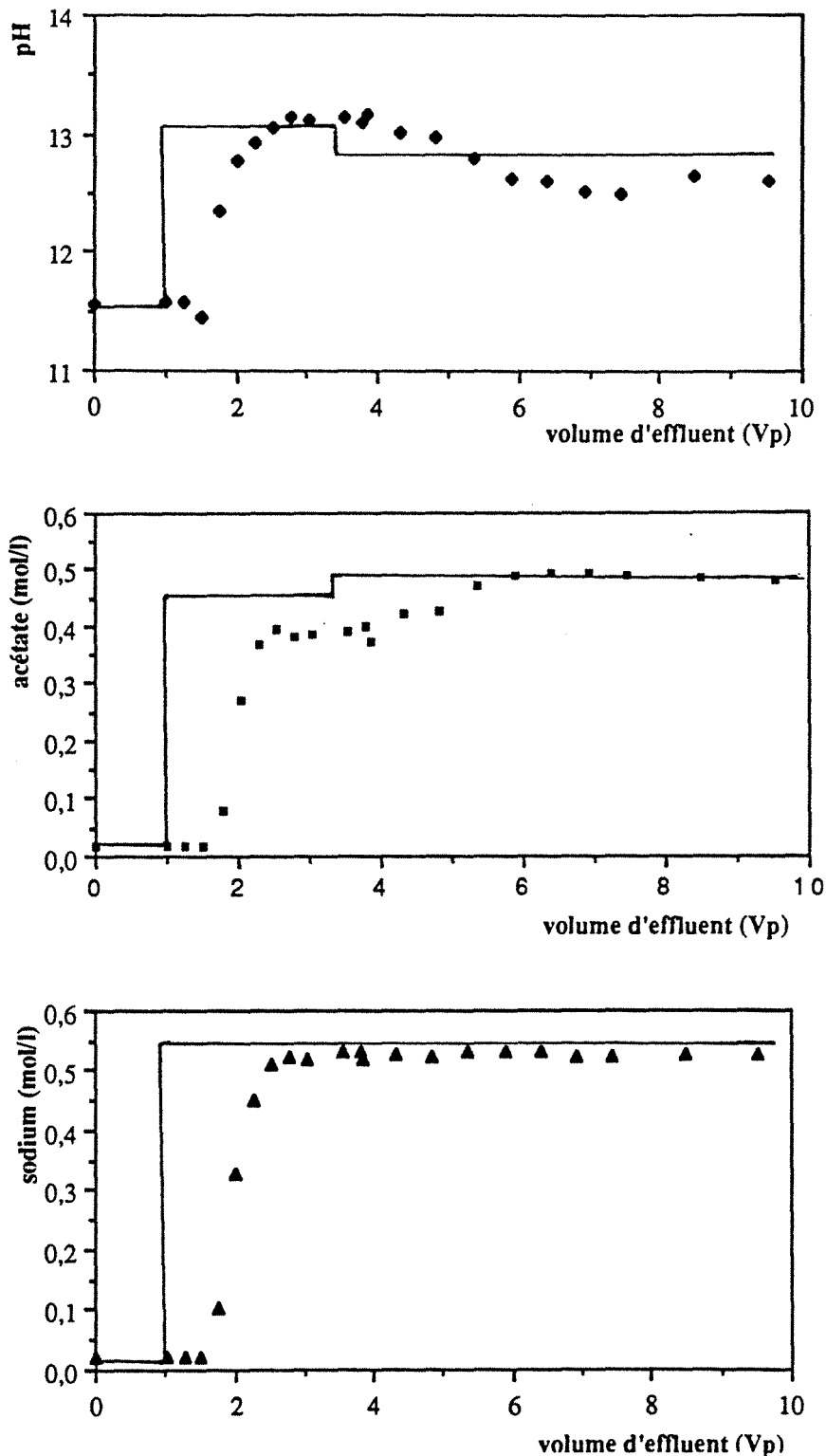


Figure 3-2 : Milieu basique : variations de concentrations dans l'effluent expérimentales et calculées par la théorie de l'équilibre, en fonction du volume d'effluent (exprimé en volumes de pore V_p). Colonne initialement équilibrée avec une solution d'acétate et hydroxyde de sodium (0.0158 mol/l en acétate, pH 11.59) ; alimentation : acétate et hydroxyde de sodium (0.497 mol/l en acétate, pH 12.89).

La seconde onde séparée de la première par un long palier est une onde compressive, dans laquelle le pH et la concentration en acétate varient en sens inverse, à cause de l'échange entre les ions AcO^- et OH^- .

La théorie représente bien qualitativement les résultats, c'est à dire les sens de variation des différentes espèces. Quantitativement, c'est surtout le décalage de la première onde sur l'échelle des volumes qui empêche un bon accord.

I-2.2.2 Deuxième cas : milieu acide

Initialement en équilibre avec une solution tampon acide acétique-acétate de sodium de faible molarité, la colonne est alimentée par une solution analogue de forte molarité, au même pH. Les résultats expérimentaux montrent le même type de comportement que le cas précédent (Figure 3-3).

Les valeurs de pH et de concentration en acétate sur le palier entre les deux ondes sont correctement prévues par la théorie. Par contre, la position théorique de la deuxième onde, quasiment confondue avec la première, est beaucoup plus précoce que la position expérimentale, ce qui confirme les résultats obtenus par Helfferich et Bennett [1984] pour le pH. La confirmation de son existence est apportée ici par la variation de l'acétate, qui montre clairement deux ondes. La représentation quantitative de ce phénomène requiert une révision des hypothèses de départ, en particulier celle concernant la sorption (d'après l'existence de deux ondes expérimentales, on peut penser que la variance resterait inchangée).

En dépit des différences observées entre la prévision théorique et l'expérience, et d'un point de vue pratique, on voit que le seul changement de molarité d'une solution tampon à l'entrée d'une colonne produit une excursion de pH importante, tant en amplitude qu'en durée.

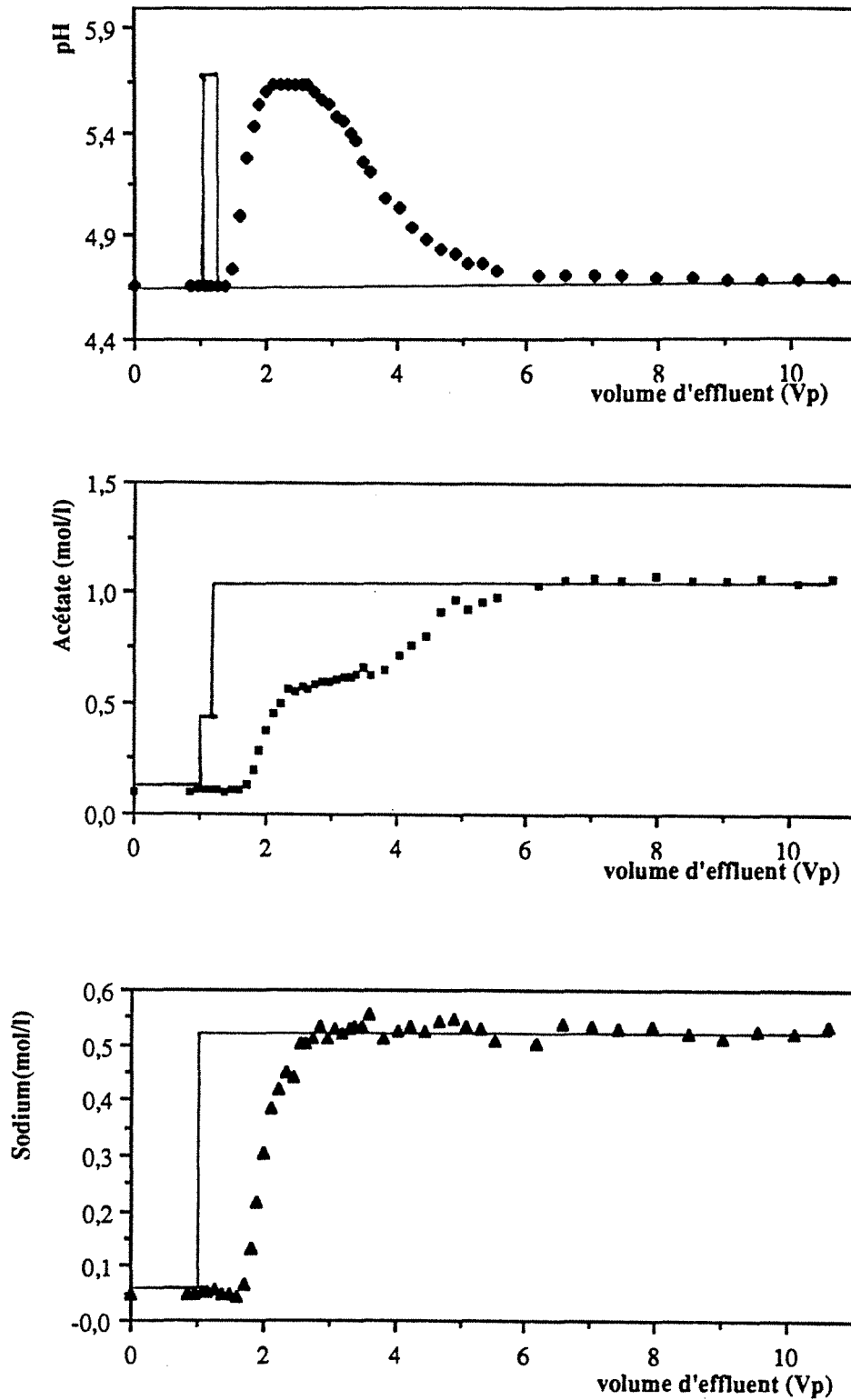


Figure 3-3 : Milieu acide : variations de concentrations dans l'effluent expérimentales et calculées par la théorie de l'équilibre en fonction du volume d'effluent. Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon acide acétique-acétate de sodium (0.104 mol/l en acétate, pH 4.69) ; alimentation : tampon acide acétique-acétate de sodium (1.068 mol/l en acétate, pH 4.70).

I-2.3 Simulations - Influence des paramètres

Nous avons également simulé les expériences et étudié l'influence des paramètres avec un calcul d'équilibres (Hybrid ou Impact, voir Annexe générale). Ces programmes utilisent le modèle des mélangeurs en cascade pour représenter l'écoulement (dispersion axiale) [VILLERMAUX, 1982]. Les résultats que l'on obtient correspondent à un état d'équilibre, mais les fronts peuvent être plus ou moins étalés sous l'effet de la dispersion axiale selon le réseau d'écoulement utilisé. Les fronts seront bien sûr d'autant plus proches de ceux prévus par la théorie de l'équilibre que le nombre de mélangeurs sera important.

La figure 3-4 montre les courbes de percée calculées pour l'acétate et le pH correspondant à l'expérience en milieu basique, avec un réseau d'écoulement comportant 100 mélangeurs en cascade. La position et la nature des fronts sont évidemment en bon accord avec celles prévues par la théorie de l'équilibre.

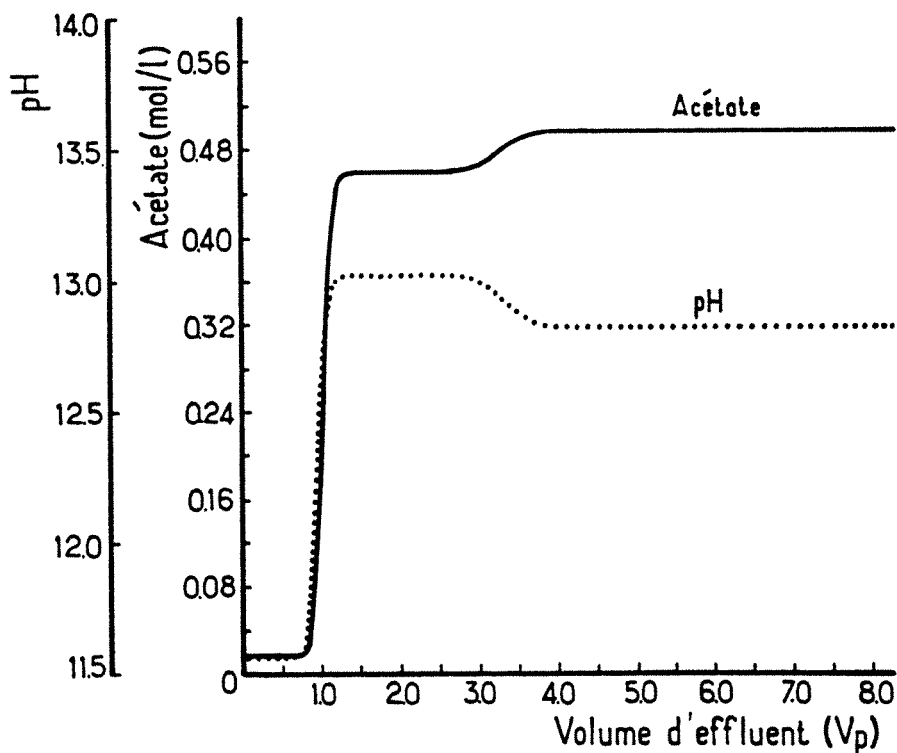


Figure 3-4 : Simulation de l'expérience en milieu basique : variations de concentrations dans l'effluent calculées en fonction du volume d'effluent. Colonne initialement équilibrée avec une solution d'acétate et hydroxyde de sodium (0.0158 mol/l en acétate, pH 11.59) ; alimentation : acétate et hydroxyde de sodium (0.497 mol/l en acétate, pH 12.89). 100 mélangeurs.

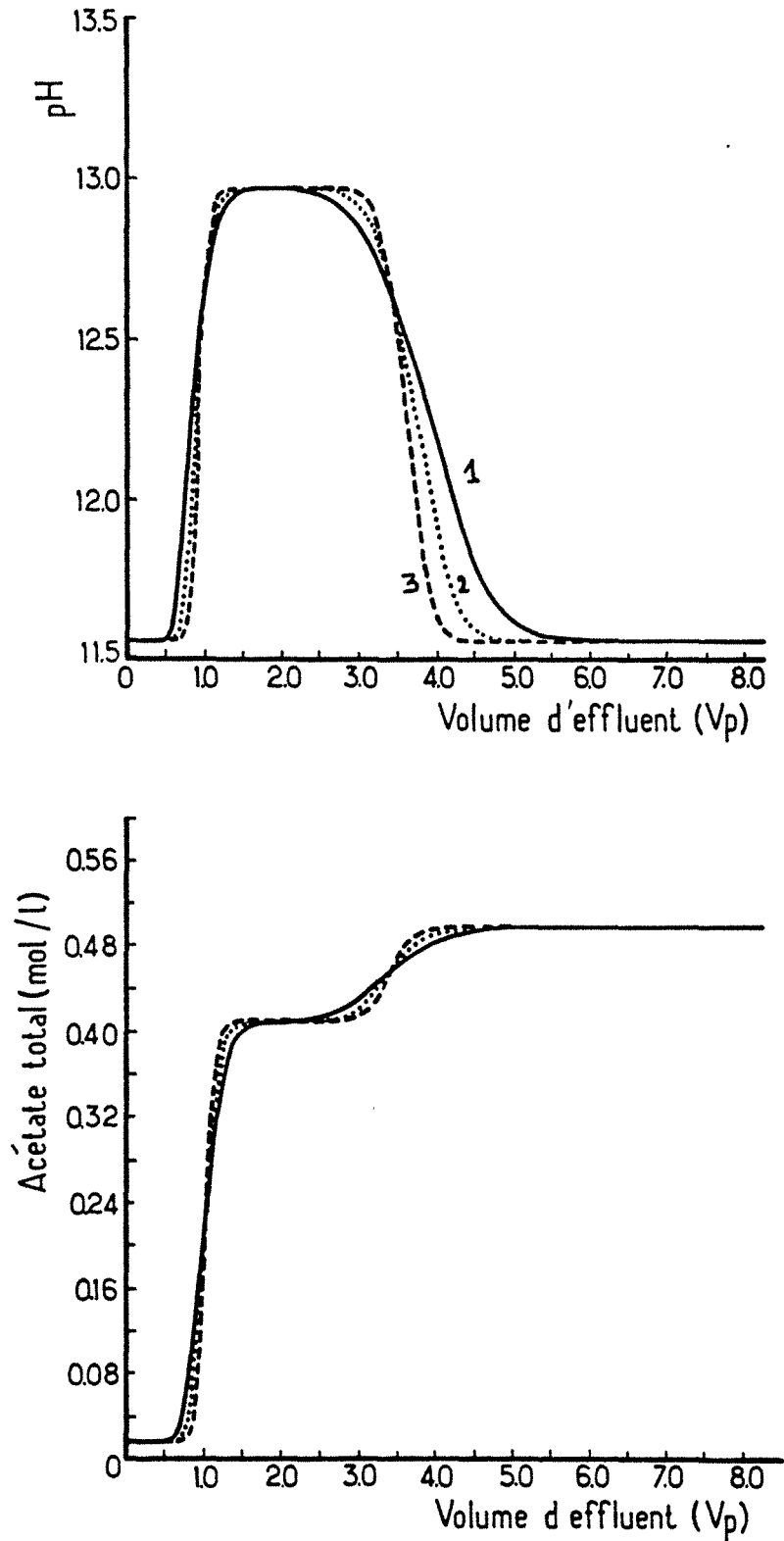


Figure 3-5 : Simulation d'expériences en milieu basique : variations de concentrations dans l'effluent calculées en fonction du volume d'effluent . Colonne initialement équilibrée avec une solution d'acétate et hydroxyde de sodium (0.0158 mol/l en acétate, pH 11.56) ; alimentation : acétate et hydroxyde de sodium (0.497 mol/l en acétate, pH 11.56). 1 : 25 mélangeurs ; 2 : 50 mélangeurs ; 3 : 100 mélangeurs

La figure 3-5 montre les résultats de la simulation d'une expérience analogue à celle effectuée en milieu basique, mais pour laquelle les solutions d'équilibration et d'alimentation seraient **exactement** au même pH. les résultats sont similaires aux précédents, mais l'**amplitude** de l'excursion de pH est plus importante. Cette figure illustre également l'influence du nombre de mélangeurs utilisés pour caractériser l'écoulement.

La figure 3-6 donne les résultats de la simulation de l'expérience en milieu acide. On remarque qu'il n'y a qu'une seule onde. La théorie de l'équilibre prévoyait l'existence de deux ondes, mais la seconde était pratiquement confondue avec la première, c'est pourquoi on ne voit pas d'excursion de pH selon ce modèle. Par conséquent, celle que l'on mesure en pratique est due à des effets supplémentaires à l'échange d'ions ou différents, comme nous avons évoqué précédemment.

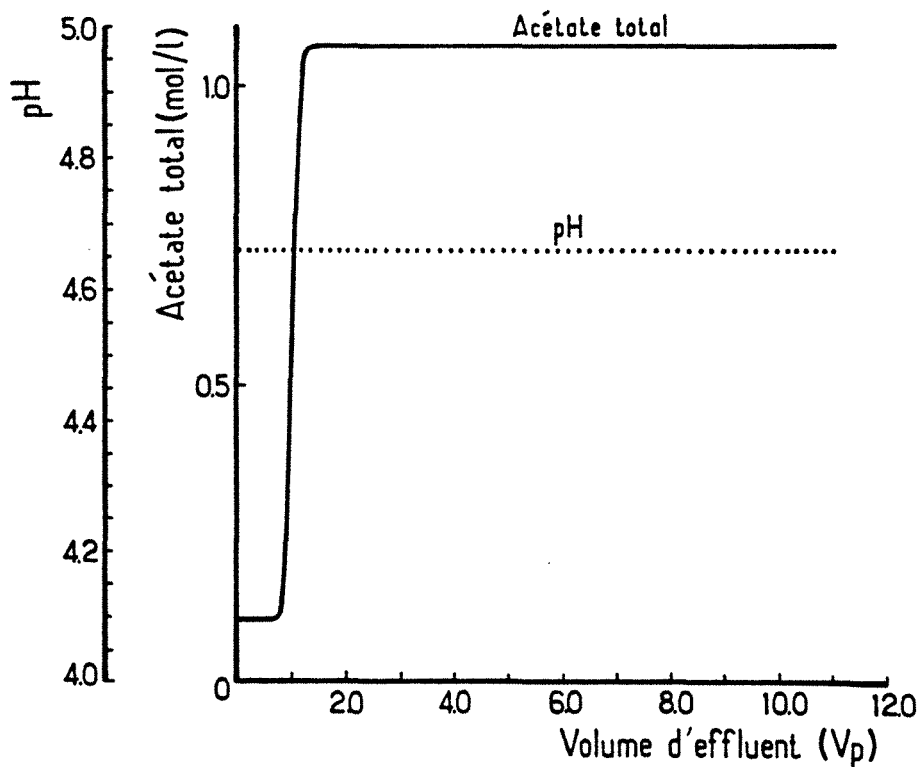


Figure 3-6 : Simulation d'une expérience en milieu acide : variations de concentrations dans l'effluent calculées en fonction du volume d'effluent . Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon acide acétique-acétate de sodium (0.094 mol/l en acétate, pH 4.66) ; alimentation : tampon acide acétique-acétate de sodium (1.067 mol/l en acétate, pH 4.66).

Pour l'expérience en milieu basique, on peut examiner l'influence de deux paramètres, à savoir la sélectivité de l'échange acétate-hydroxyle et la capacité totale d'échange (les expériences ci-dessus ont été effectuées avec des résines classiques de forte capacité, or en chromatographie des protéines, les supports utilisés ont des capacités pouvant être jusqu'à dix ou vingt fois plus faibles). Le calcul montre que :

- pour un support de capacité dix fois plus faible, on observe les mêmes phénomènes, mais la largeur du plateau est nettement diminuée.
- plus la sélectivité de l'échange acétate-hydroxyle est élevée, plus l'affinité des acétates envers le support est importante : la composition du palier intermédiaire est conservée mais sa largeur diminue, jusqu'à tendre vers zéro (pour une très grande affinité). Par conséquent, la variation de pH sera d'autant plus forte que la capacité sera forte et la sélectivité faible.

I-3 Le système phosphate de potassium

Nous allons effectuer le même type d'expériences avec des solutions tampons composées de dihydrogéné- et d'hydrogéné- phosphate de potassium. Ce système est un peu plus complexe que le précédent, puisqu'il y a une espèce échangeable supplémentaire.

I-3.1 Variables - relations - variance

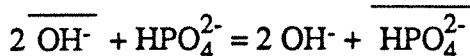
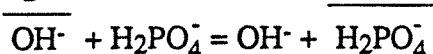
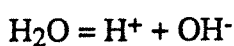
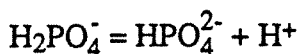
Dans la zone de pH dans laquelle on travaille, les espèces à prendre en compte sont les suivantes :

- en phase liquide : K^+ , H^+ , OH^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}

- en phase solide : $\overline{OH^-}$, $\overline{H_2PO_4^-}$, $\overline{HPO_4^{2-}}$

On négligera les espèces : H_3PO_4 , PO_4^{3-} et $\overline{PO_4^{3-}}$

Les réactions :



Equilibres de dissociation :

$$K_e = (H^+) (OH^-) \quad (4)$$

$$K_a = \frac{(HPO_4^{2-}) (H^+)}{(H_2PO_4^-)} \quad (12)$$

Equilibres d'échange d'ions :

$$K_{H_2PO_4, OH} = \frac{(\overline{H_2PO_4^-}) (\overline{OH^-})}{(H_2PO_4^-) (\overline{OH^-})} \quad (13)$$

$$K_{HPO_4, OH} = \frac{(\overline{HPO_4^{2-}}) (\overline{OH^-})^2}{(HPO_4^{2-}) (\overline{OH^-})^2} \quad (14)$$

Electroneutralité :

$$(\overline{OH^-}) + (\overline{H_2PO_4^-}) + 2 (\overline{HPO_4^{2-}}) = (H^+) + (K^+) \quad (15)$$

$$(\overline{OH^-}) + (\overline{H_2PO_4^-}) + 2 (\overline{HPO_4^{2-}}) = \overline{C} \quad (16)$$

Nous ajouterons la variable (P) concentration en phosphate total dans la phase liquide :

$$(P) = (H_2PO_4^-) + (HPO_4^{2-}) \quad (17)$$

et son équivalent en phase résine ($\overline{P}$) :

$$(\overline{P}) = (\overline{H_2PO_4^-}) + (\overline{HPO_4^{2-}}) \quad (18)$$

Toutes les concentrations sont exprimées en moles par litre de solution.

Avec 8 variables et 6 relations indépendantes, le problème est de variance deux comme précédemment. On observera deux ondes dans la colonne : un front de concentration en potassium se déplaçant à la vitesse du fluide (équation 19) , et un front d'échange dont la vitesse est donnée par l'équation 20.

$$v_{K^+} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{K^+})}{\partial(K^+)} \right)_z} = v_0 \quad (19)$$

$$v_P = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\bar{P})}{\partial(P)} \right)_z} \leq v_0 \quad (20)$$

I-3.2 Résultats expérimentaux et modélisation par la théorie de l'équilibre

I-3.2.1 Premier cas : excursion vers des pH plus élevés

La colonne est initialement en équilibre avec une solution de tampon hydrogéno-dihydrogéno- phosphate de potassium de faible molarité, puis alimentée par une solution des mêmes sels mais de forte molarité à pH très voisin. La Figure 3-7 montre les variations de concentrations dans l'effluent, expérimentales, et calculées par la théorie de l'équilibre.

La théorie fait apparaître d'abord une onde indifférente, dans laquelle les concentrations en potassium et phosphate total ainsi que le pH augmentent, suivie d'un court palier. Ensuite, la concentration en phosphate et le pH varient en sens inverse le long d'une onde dispersive (voir calcul en Annexe 3-2). Cette onde est très peu dispersive, comme on peut l'observer, en raison de la forte affinité du phosphate divalent.

L'expérience montre effectivement deux ondes pour le pH, bien que la position de la seconde ne soit pas correctement prévue. Pour le phosphate, on peut aussi distinguer deux ondes, en remarquant l'inflexion vers $V_p = 5$. Le plus apparent est que les ondes expérimentales sont beaucoup plus étalées que les ondes théoriques. Ceci peut être dû à des phénomènes annexes, comme la sorption d'électrolyte, dont on a parlé précédemment ou une variation des coefficients de sélectivité avec la force ionique. En outre, il faut noter que les coefficients de sélectivité utilisés ont été déterminés de manière indirecte, à partir d'expériences d'équilibre avec le chlorure (Annexes 3-1 et 3-2) et de résultats extraits de la littérature. Une description meilleure requiert une connaissance plus approfondie des paramètres, et sans doute la mise au point d'autres méthodes de détermination.

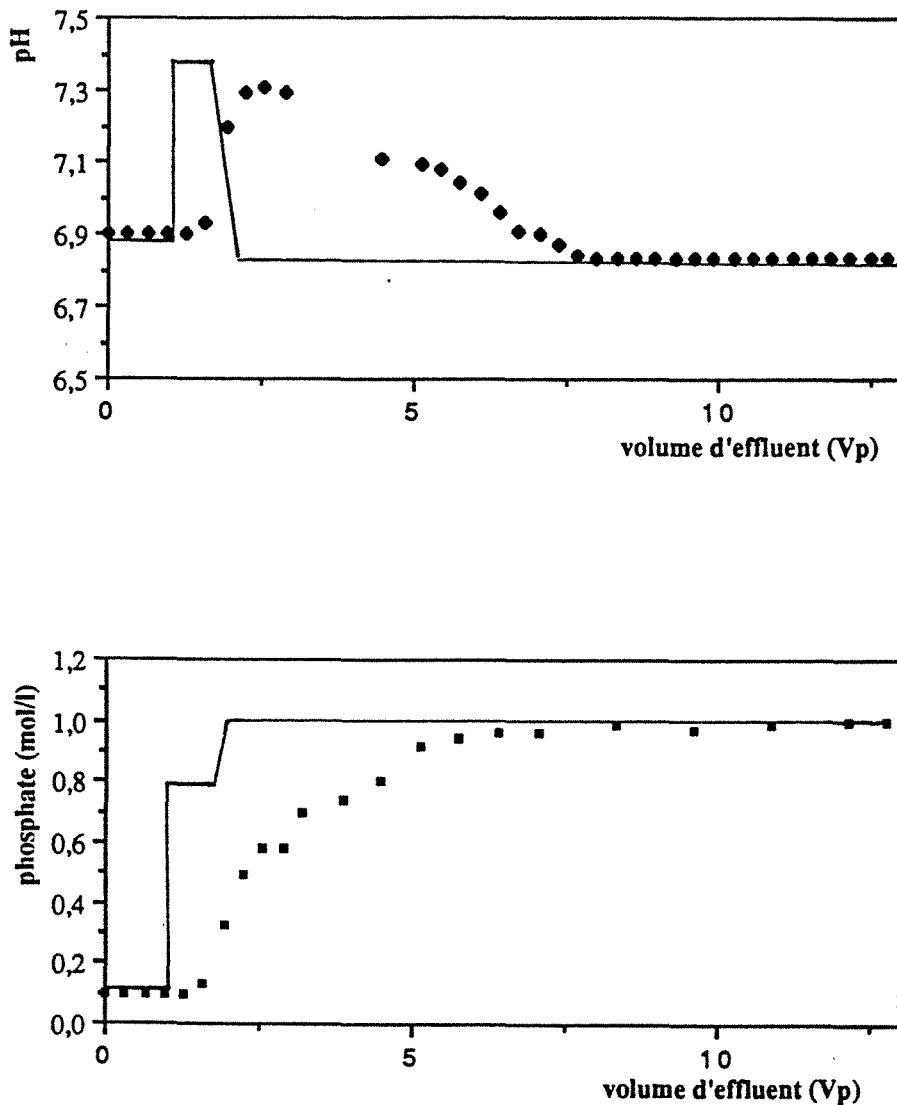


Figure 3-7 : variations de concentrations dans l'effluent expérimentales et calculées par la théorie de l'équilibre en fonction du volume d'effluent. Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon phosphate de potassium (0.106 mol/l en phosphate, pH 6.75) ; alimentation : tampon phosphate de potassium (1.078 mol/l en phosphate, pH 6.70).

I-3.2.2 Deuxième cas : excursion vers des pH moins élevés

L'expérience "inverse" de la précédente est effectuée : la colonne est initialement en équilibre avec une solution tampon hydrogéné- dihydrogéné- phosphate de potassium de forte molarité, et alimentée par une solution de mêmes sels de faible molarité. La figure 3-8 montre l'histoire de l'effluent expérimentale et calculée.

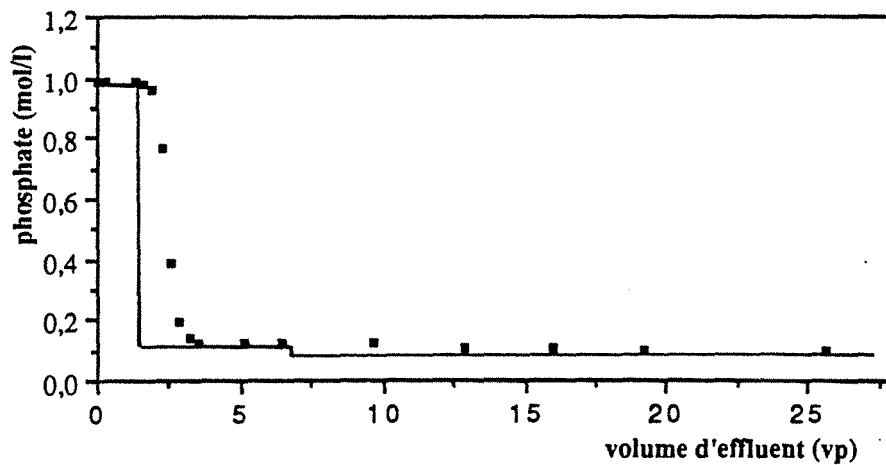
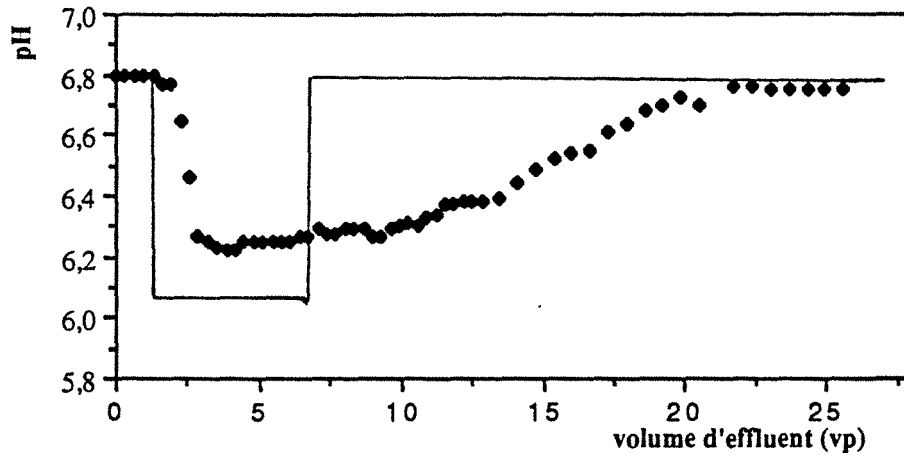


Figure 3-8 : variations de concentrations dans l'effluent expérimentales et calculées par la théorie de l'équilibre en fonction du volume d'effluent. Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon phosphate de potassium (0.987 mol/l en phosphate, pH 6.80) ; alimentation : tampon phosphate de potassium (0.096 mol/l en phosphate, pH 6.80).

D'après la théorie, on doit voir d'abord une onde indifférente dans laquelle les concentrations en potassium, phosphate total et hydroxyle diminuent, suivie d'un palier. On observe donc une excursion vers les pH moins élevés. Ensuite apparaît une onde compressive, le long de laquelle les concentrations en phosphate et en hydroxyle varient en sens inverse (calculs en Annexe 3-2). On ne voit pas expérimentalement la seconde variation de la concentration en phosphate, car la théorie montre que son amplitude est très faible. De nouveau, on constate un certain accord entre les résultats théoriques et expérimentaux, mais qui reste principalement d'ordre qualitatif.

I-3.3 Simulations

Les figures 3-9 et 3-10 présentent les résultats obtenus pour deux expériences du type des précédentes calculées avec le code Impact.

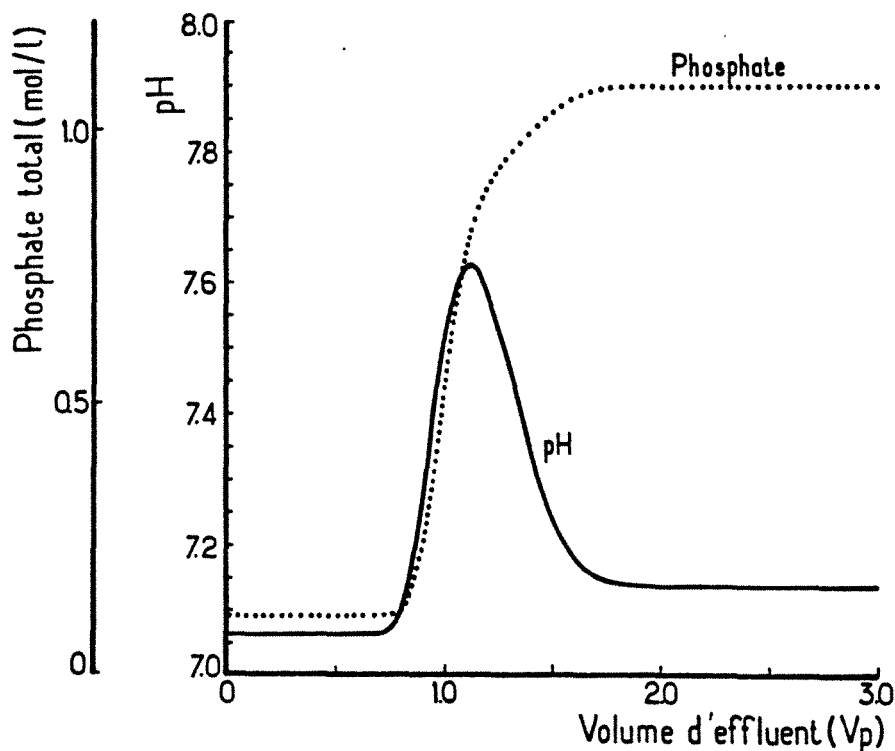


Figure 3-9 : Simulation d'une "excursion positive" en pH : variations de concentrations dans l'effluent calculées en fonction du volume d'effluent. Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon phosphate de potassium (0.094 mol/l en phosphate, pH 7.06) ; alimentation : tampon phosphate de potassium (1.078 mol/l en phosphate, pH 7.13).

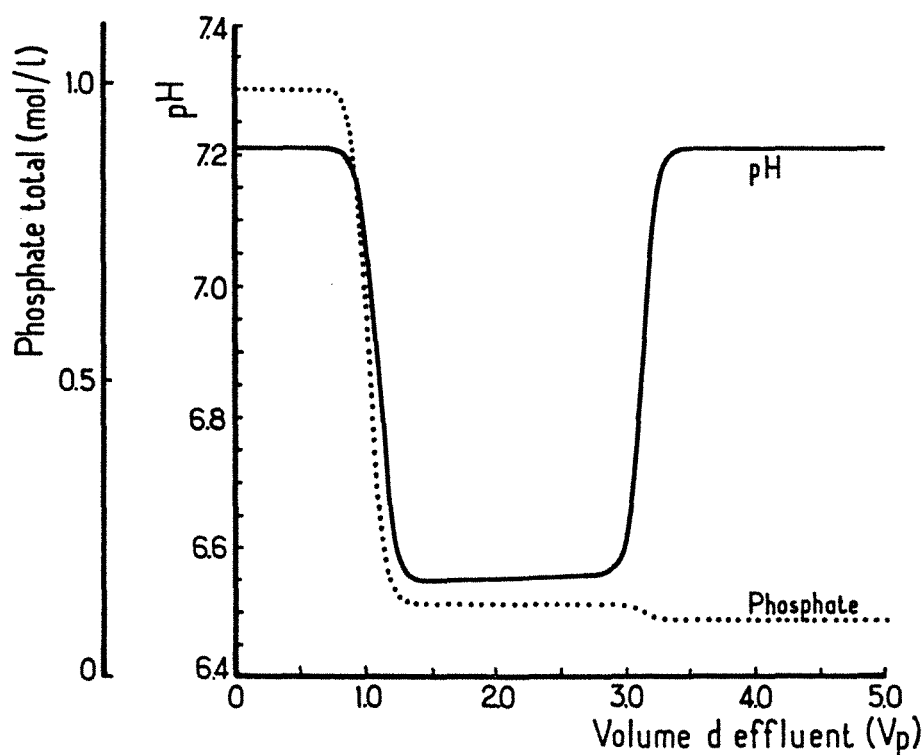


Figure 3-10 : Simulation d'une "excursion négative" en pH : variations de concentrations dans l'effluent calculées en fonction du volume d'effluent . Colonne initialement équilibrée avec une solution tampon phosphate de potassium (0.987 mol/l en phosphate, pH 7.21) ; alimentation : tampon phosphate de potassium (0.096 mol/l en phosphate, pH 7.21).

L'intérêt du code de calcul est indiscutable : il permet d'avoir rapidement accès à des résultats sur des systèmes complexes, en incluant la dispersion axiale, et d'étudier l'influence des paramètres. Mais si l'on ne dispose pas d'un tel code, les exemples qui précèdent montrent que le calcul effectué à l'aide de la théorie de l'équilibre indique les bonnes tendances de comportement (tant que les systèmes ne sont pas trop compliqués).

II. Echange d'anions mettant en jeu un tampon de pH et un anion impliqué dans aucune réaction de dissociation

Dans la partie I de ce chapitre, on a étudié le comportement d'une colonne échangeuse d'anions équilibrée par une solution tampon alimentée par une solution du même tampon, au même pH, de normalité différente. La théorie de l'équilibre fournit une bonne description semi-quantitative de ce genre de systèmes. Nous allons examiner maintenant ce qui se passe lorsqu'on ajoute une espèce échangeable, non impliquée dans une réaction de dissociation, comme le chlorure.

Dans un premier temps, nous étudierons le système acétate de sodium / hydroxyle / chlorure au niveau théorique, puis nous présenterons des expériences effectuées avec le système dihydrogéné- hydrogéné- phosphate de potassium /hydroxyle /chlorure et leur interprétation.

Les systèmes de ce type présentent un grand intérêt pratique. Ils interviennent par exemple en traitement des eaux, lorsque l'on souhaite éliminer le nitrate, alors que l'eau contient également des sulfates, chlorures, carbonates (procédé CARIX par exemple, [HÖLL et FEUERSTEIN 1986]). Ils sont mis en jeu aussi au cours du fractionnement de biomolécules, lorsqu'une colonne épuisée est régénérée avec du chlorure de sodium, puis équilibrée par un tampon de pH, avant d'être de nouveau saturée par la solution de biomolécules en milieu tampon.

II-1 Introduction sur les systèmes de variance trois

Les hypothèses concernant l'utilisation de la théorie de l'équilibre sont identiques à celles de la partie I-1. Nous résumons en annexe 3-3 quelques concepts nécessaires à la compréhension des phénomènes.

Les systèmes étudiés sont de variance trois : pour un état initial uniforme de la colonne et une variation-échelon du signal d'entrée, on observera trois ondes. Par analogie avec les systèmes de variance deux, on verra encore une onde indifférente, se déplaçant à la vitesse du fluide, correspondant à la propagation de la variation de concentration en cation (sodium ou potassium). Mais on aura cette fois-ci deux ondes d'échange d'ions, l'une qualifiée de "plus rapide" qui précédera la "plus lente" en sortie de colonne. La figure 3-11 schématise le comportement d'un système de variance trois.

II-2 Système acétate de sodium-chlorure-hydroxyle

Ce système présente beaucoup d'intérêt au niveau théorique. En effet, la construction du diagramme d'état est relativement simple, ce qui permet de prévoir à l'aide d'une méthode graphique la réponse de la colonne à une perturbation échelon. Nous n'avons pas effectué d'expériences pour ce système ; nous nous sommes basés sur des travaux existants [HELFFERICH et BENNETT 1984]. Nous présenterons des simulations réalisées sur ce système, en introduction à l'étude de systèmes plus complexes (avec des phosphates).

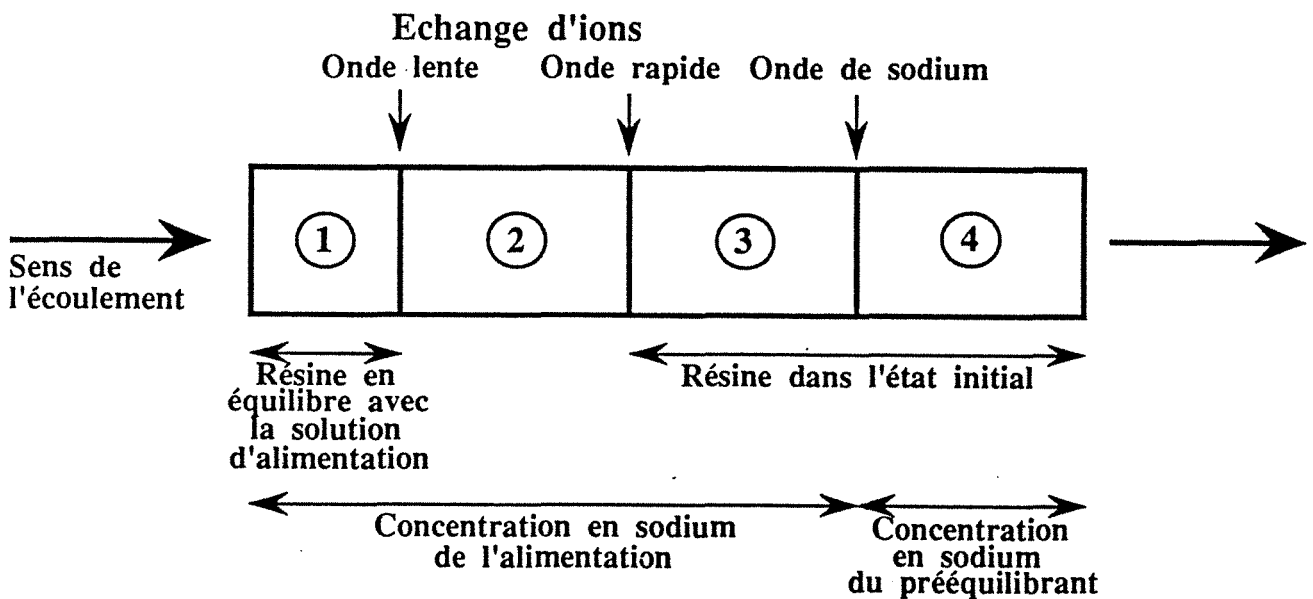


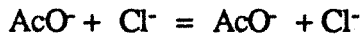
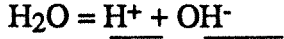
Figure 3-11 : Comportement d'un système de variance trois.

II-2.1 Approche théorique - Etablissement du diagramme

Ce paragraphe est construit à partir de l'analyse effectuée par HELFFERICH et BENNETT [1984], sur le système acétate de sodium-chlorure-hydroxyle. Les espèces intervenant dans le problème sont les suivantes :

- en phase liquide : AcOH , AcO^- , H^+ , Na^+ , OH^- , Cl^- (6 espèces)
- en phase solide : OH^- , AcO^- , Cl^- (3 espèces)

Les réactions :



Les relations indépendantes décrivant le système :

- équilibres de dissociation :

$$K_e = (\text{H}^+) (\text{OH}^-) \quad (4)$$

$$K_a = \frac{(\text{AcO}^-) (\text{H}^+)}{(\text{AcOH})} \quad (5)$$

- équilibres d'échange d'ions :

$$K_{\text{AcO}, \text{Cl}} = \frac{(\overline{\text{AcO}^-}) (\text{Cl}^-)}{(\text{AcO}^-) (\overline{\text{Cl}^-})} \quad (21)$$

$$K_{\text{OH}, \text{Cl}} = \frac{(\overline{\text{OH}^-}) (\text{Cl}^-)}{(\text{OH}^-) (\overline{\text{Cl}^-})} \quad (22)$$

- relations d'électroneutralité :

$$(\overline{\text{OH}^-}) + (\overline{\text{AcO}^-}) + (\overline{\text{Cl}^-}) = (\text{Na}^+) + (\text{H}^+) \quad (23)$$

$$(\text{OH}^-) + (\text{AcO}^-) + (\text{Cl}^-) = \overline{\text{C}} \quad (24)$$

Toutes les concentrations seront exprimées en moles par litre de solution. Avec 9 variables de concentration et 6 relations indépendantes, le système est bien de variance trois.

On ajoutera comme précédemment la variable désignant la concentration en acétate total en solution définie par $(\text{Ac}) = (\text{AcOH}) + (\text{AcO}^-)$ (9), ce qui, comme nous l'avons vu ne change pas la variance.

On choisit de décrire le comportement du système à l'aide des trois espèces suivantes : sodium, chlorure et acétate total. Les vitesses de propagation de ces espèces sont données par les trois équations :

$$v_{\text{Na}^+} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial (\text{Na}^+)}{\partial (\text{Na}^+)} \right)_z} = v_0 \quad (10)$$

$$v_{Ac} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\text{AcO}^-)}{\partial(\text{Ac})} \right)_z} \leq v_0 \quad (11)$$

$$v_{Cl^-} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\text{Cl}^-)}{\partial(\text{Cl}^-)} \right)_z} \leq v_0 \quad (25)$$

Comme pour les systèmes de variance deux, la dérivée partielle intervenant dans l'équation (10) est nulle, puisque le sodium n'est pas retenu. L'une des ondes est l'onde de sodium (indifférente) qui se propage à la vitesse du fluide, et pour laquelle il ne peut y avoir aucune variation de concentration dans l'échangeur. Les deux autres ondes sont des ondes d'échange retardées par rapport à la vitesse du fluide ; pour chacune d'elles, les valeurs des dérivées partielles des équations (11) et (25) relatives à l'acétate et au chlorure sont égales.

Etablissement du diagramme d'état :

Le diagramme complet se construit, pour un système de variance trois, dans un espace à trois dimensions, dont les axes portent les concentrations des trois constituants clés, ici le sodium, l'acétate total et le chlorure. On peut représenter un diagramme à deux dimensions en se plaçant dans un plan acétate total - chlorure, pour une concentration en sodium donnée, constante.

Les courbes caractéristiques, suivies par les compositions au cours des transitions dispersives, peuvent être calculées avec précision en résolvant une équation aux valeurs propres (Annexe 3-3). Il n'est pas indispensable ici de suivre une telle démarche, car on montre qu'il est possible de construire graphiquement un diagramme plan simplifié, très proche du diagramme plan théorique (Annexe 3-3).

Le diagramme plan (Figure 3-12) est partagé en deux régions de part et d'autre d'une droite "d'équivalence", définie comme le lieu des points tels que $(\text{Ac}) + (\text{Cl}^-) = (\text{Na}^+)$.

Dans la région I, située à gauche de cette droite, les points vérifiant $(\text{Ac}) + (\text{Cl}^-) < (\text{Na}^+)$, la concentration en OH^- est significative, celle en H^+ étant négligeable, le milieu est basique. Dans la région II, partie supérieure droite du diagramme, c'est l'inverse, $(\text{Ac}) + (\text{Cl}^-) > (\text{Na}^+)$,

la concentration en proton est donc importante.

Par conséquent, on observe une forte variation de pH entre ces deux régions au voisinage de la droite. Ceci se conçoit aisément, si on considère que le déplacement à partir d'un point de la région I le long d'une droite verticale correspond au dosage d'une solution basique acétate-chlorure par une solution d'acide chlorhydrique, avec un saut de pH au voisinage du point d'équivalence, point qui est représenté par l'intersection entre la droite "d'équivalence" et la droite verticale.

* Dans la zone I, on peut considérer que tout l'acétate se trouve sous forme dissociée, ce qui nous ramène au cas d'un échange d'anions à trois constituants sans réaction chimique. Dans l'hypothèse où les facteurs de séparation sont constants, les courbes caractéristiques sont des droites ; leur construction est expliquée en annexe 3-3.

* Dans la zone II, en milieu acide, on peut considérer que la concentration en hydroxyle est négligeable. Par suite, dans cette région, le déplacement des deux ondes d'échange d'ions s'interprète de la façon suivante :

- l'une des ondes se propage quasiment à la vitesse du fluide ; elle traduit une augmentation de la concentration en acide non dissocié en solution, tandis que la composition de l'échangeur n'est pas modifiée, donc le rapport acétate/chlorure en solution demeure constant. Si ce rapport est fixé ainsi que la concentration en sodium, toute augmentation de la concentration en acide acétique provoquera une augmentation de la concentration en acétate total, sans effet sur le chlorure, ce qui correspond à une caractéristique horizontale.

- la seconde onde, retardée par rapport au fluide, résulte d'un échange acétate-chlorure, sans modification de la concentration en acide non dissocié. La caractéristique sera une droite parallèle à la droite "d'équivalence".

* Plus la concentration en sodium est élevée, plus la droite "d'équivalence" s'éloigne de l'origine dans le plan chlorure-acétate total. Le diagramme garde exactement la même allure, mais la région I s'agrandit proportionnellement à la concentration en sodium.

Au voisinage de la droite "d'équivalence", on observe un brusque changement de direction des caractéristiques, ce qui est inhabituel pour les diagrammes d'état, mais s'explique ici par le saut de pH important qui a lieu lorsque cette droite est franchie. Ce changement de direction s'accompagne d'un changement brusque de la vitesse propre. Par conséquent, une onde non compressive dont le chemin traverse la droite "d'équivalence" comporte une partie

lente (basique) et une partie rapide (acide) séparées par une zone dans laquelle le pH change, tandis que la composition en acétate et en chlorure varient peu.

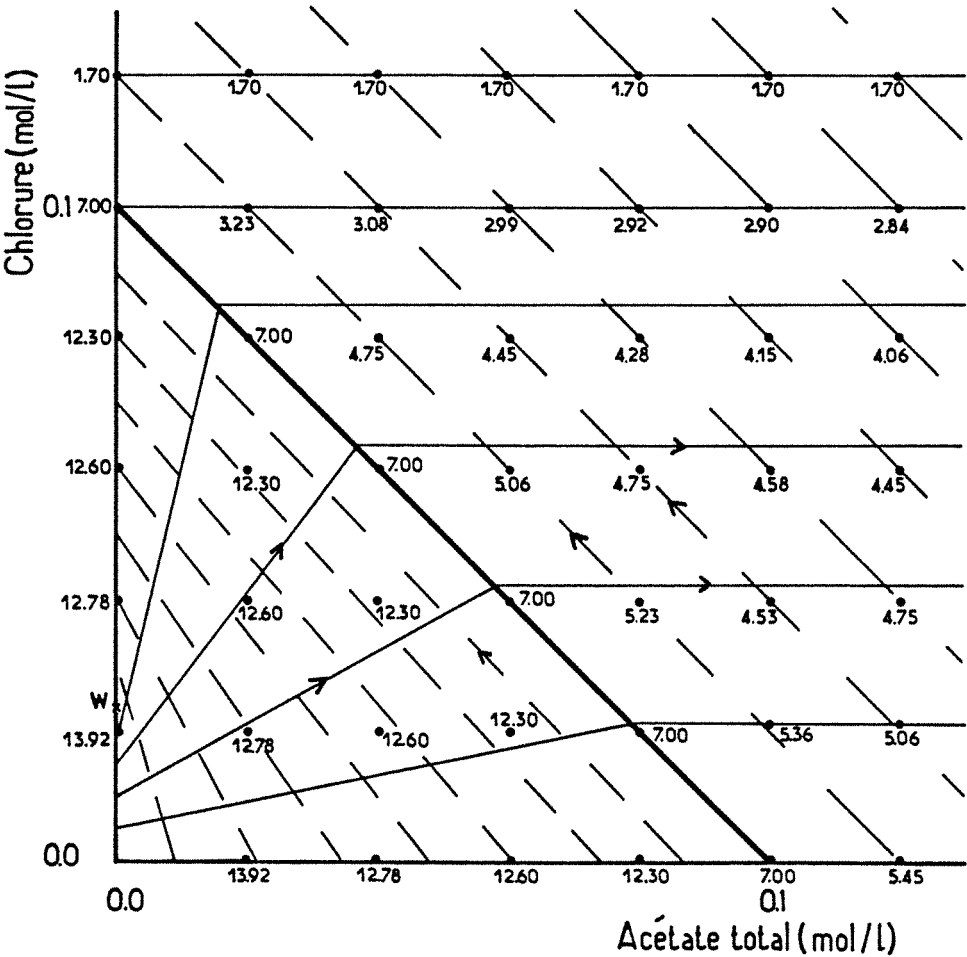


Figure 3-12 : Diagramme d'état du système acétate/chlorure/hydroxyle, construit pour une concentration en sodium de 0.1 M. — caractéristiques "rapides" ; - - - caractéristiques "lentes". Les flèches indiquent les sens des transitions dispersives. Les valeurs indiquées sont celles des pH calculés.

II-2.2 Etude d'un cas

Afin de bien expliquer l'utilisation du diagramme, nous avons étudié plusieurs types de situations possibles ; ces cas se trouvent en annexe 3-3. Nous présentons ici une situation rencontrée en chromatographie préparative des protéines par échange d'anions. Généralement pour ce type d'applications, on rencontre les étapes classiques suivantes :

- la colonne est prééquilibrée par un tampon de pH,
- saturée par le mélange à séparer,
- régénérée.

Cette dernière opération peut être effectuée sous l'effet d'une variation-échelon ou gradient de pH ou de force ionique. L'augmentation de force ionique est provoquée par l'ajout d'un sel neutre, comme le chlorure de sodium. A ce moment-là, en fin de régénération, la colonne est en équilibre avec la solution de sel ou avec un mélange tampon-sel et doit être rééquilibrée par le tampon de pH.

Considérons le tampon acétate ; la colonne se trouve sous forme chlorure-acétate (en fin de régénération), et on l'alimente par le tampon acétate pH 4.7. C'est le cas que nous allons étudier théoriquement ici. Les conditions sont résumées dans le tableau 3-1. Pour simplifier, nous avons choisi des solutions d'équilibration et d'alimentation ayant même concentration en sodium, afin que le chemin d'échange soit contenu dans un diagramme plan, mais ce n'est pas nécessaire dans le cas général.

On place sur le diagramme les points A et P représentatifs respectivement de la composition d'alimentation et de prééquilibration (Figure 3-13), et on détermine le chemin suivi au cours de l'échange dans le sens du profil (c'est à dire dans le sens inverse de la courbe de percée), de l'alimentation vers le prééquilibrant.

On remarque que le trajet AP suit d'abord une caractéristique parallèle à la droite "d'équivalence" (caractéristique lente), dans le sens des transitions dispersives jusqu'à un certain point I, intersection de la caractéristique issue de P (représentatif de la composition du palier intermédiaire). A partir de ce point, on observera une transition compressive, le chemin ne suit donc pas nécessairement une caractéristique. On rappelle que les caractéristiques n'indiquent que les chemins établis à partir de bilans différentiels. Le trajet réellement suivi est déterminé par la position de I, qui doit être telle que la condition intégrale de cohérence soit respectée. Ici, comme la caractéristique issue de P est une droite, elle satisfait la condition intégrale de cohérence, et par conséquent, le point I se trouve bien à l'intersection des deux

caractéristiques (AI) et (IP), et le trajet s'effectue le long de la caractéristique.

	Prééquilibrant	Alimentation
pH	4.75	4.75
Acétate total (mol/l)	0.010	0.200
Chlorure (mol/l)	0.095	0
Sodium (mol/l)	0.100	0.100
Capacité totale (mol/l)	2.95	
K _{OAc,OH}	2.95	
K _{Cl,OH}	7.39	
Nombre de mélangeurs	50	

Tableau 3-1 : Conditions utilisées pour la simulation

D'après l'étude du profil, on peut en déduire que la courbe de percée sera composée des éléments suivants (Figure 3-14) dans l'ordre :

- (il n'y a pas d'onde de sodium, étant donné que les deux solutions se trouvent à la même concentration en sodium.)
- un palier très étroit (un volume de pore) représentant la composition du prééquilibrant,
- une transition compressive (IP), le long de laquelle la concentration en chlorure ne varie pratiquement pas, celle en acétate total augmente, et le pH diminue, sous l'effet de la contrainte d'électroneutralité, pour compenser l'augmentation de concentration en acétate dissocié,
- un palier correspondant à la composition du point I,
- une transition dispersive (AI) suivant laquelle la concentration en acétate total et le pH augmentent, tandis que celle en chlorure diminue,
- un palier correspondant à la solution d'alimentation.

Ce comportement est bien illustré par la figure 3-14, on notera que l'onde d'échange la plus rapide se déplace pratiquement à la vitesse du fluide donc sa position serait confondue avec celle de l'onde indifférente.

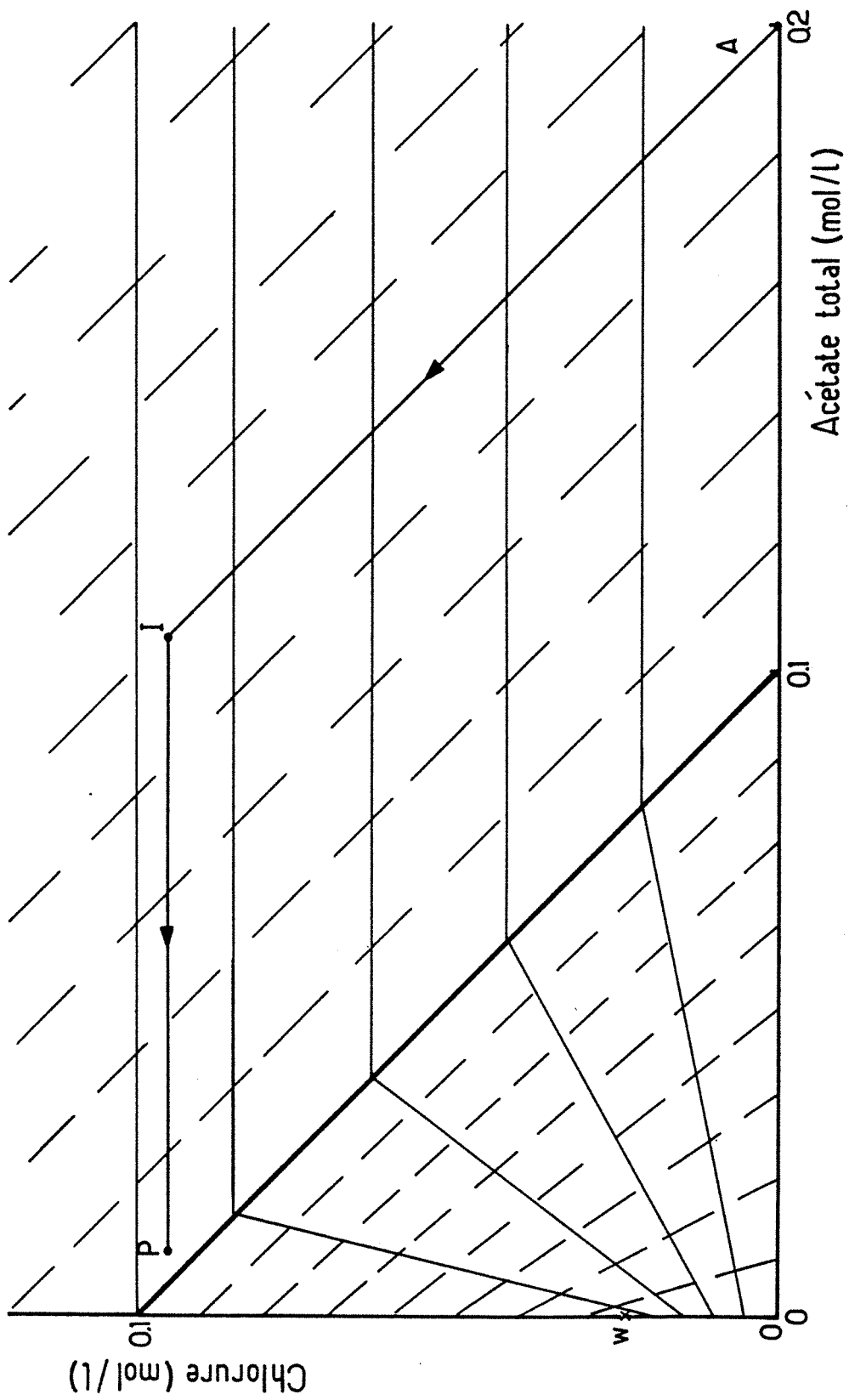


Figure 3-13 : Chemin d'échange AIP.

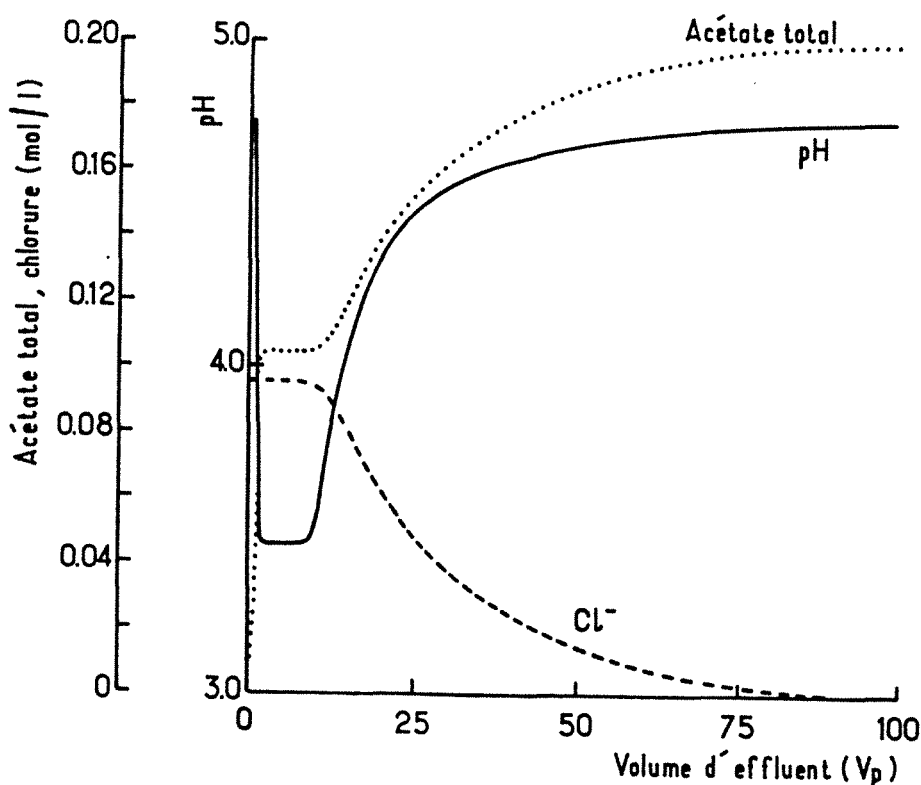


Figure 3-14 : Courbes de percée calculées, correspondant au chemin AIP.

La tendance de comportement que nous avons voulu souligner ici est la suivante : l'échange d'anions faisant intervenir un tampon de pH comme l'acétate de sodium et un anion minéral comme le chlorure, donne lieu à des excursions de pH pouvant être relativement importantes, même lorsque la colonne est prééquilibrée et alimentée par des solutions se trouvant au même pH. Ceci se produit dans des situations souvent rencontrées, notamment en biochromatographie. La connaissance du diagramme d'état permet de prévoir l'évolution des concentrations en sortie de colonne. La topologie du diagramme s'est avérée relativement simple pour le système étudié, mais ceci n'est pas aisément généralisable.

II-3 Système dihydrogéné- hydrogéné phosphate de potassium-chlorure-hydroxyle

Ce système est d'un grand intérêt pratique, car l'effet tampon se produit dans le domaine des pH voisins de la neutralité, dans lequel les biomolécules sont généralement les plus stables. Nous présentons ici un travail expérimental précédé d'une approche théorique qui

demeure limitée, puisque nous ne pouvons pas construire simplement le diagramme d'état, dont la topologie est plus complexe que pour le système acétate.

II-3.1 Approche théorique

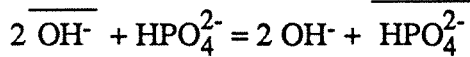
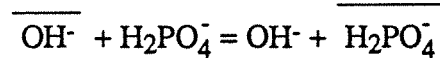
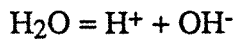
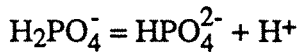
On distingue les espèces suivantes :

- en phase liquide : K^+ , H^+ , OH^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , Cl^- (6 espèces)

- en phase solide : $\overline{OH^-}$, $\overline{H_2PO_4^-}$, $\overline{HPO_4^{2-}}$, $\overline{Cl^-}$ (4 espèces)

On négligera les espèces H_3PO_4 , PO_4^{3-} et $\overline{PO_4^{3-}}$, dont les concentrations sont très faibles pour les pH compris environ entre 3 et 9.

Les réactions :



Les relations indépendantes qui décrivent le système :

- équilibres de dissociation :

$$K_e = (H^+) (OH^-) \quad (4)$$

$$K_a = \frac{(HPO_4^{2-}) (H^+)}{(H_2PO_4^-)} \quad (12)$$

- équilibres d'échange d'ions :

$$K_{H_2PO_4, OH} = \frac{(\overline{H_2PO_4^-}) (OH^-)}{(\overline{H_2PO_4^-}) (OH^-)} \quad (13)$$

$$K_{HPO_4, OH} = \frac{(\overline{HPO_4^{2-}}) (OH^-)^2}{(\overline{HPO_4^{2-}}) (OH^-)^2} \quad (14)$$

$$K_{Cl,OH} = \frac{(\overline{Cl^-})(OH^-)}{(Cl^-)(\overline{OH^-})} \quad (26)$$

- relations d'électroneutralité :

$$(\overline{Cl^-}) + (\overline{OH^-}) + (\overline{H_2PO_4^-}) + 2(\overline{HPO_4^{2-}}) = (H^+) + (K^+) \quad (27)$$

$$(\overline{Cl^-}) + (\overline{OH^-}) + (\overline{H_2PO_4^-}) + 2(\overline{HPO_4^{2-}}) = \overline{C} \quad (28)$$

Toutes les concentrations sont exprimées en moles par litre de solution. Avec 10 variables de concentration et 7 relations indépendantes, le système est bien de variance trois.

On peut ajouter les variables représentant la concentration en phosphate total en solution et dans le solide (P) et ($\overline{P}$) et les relations :

$$(P) = (\overline{H_2PO_4^-}) + (\overline{HPO_4^{2-}}) \quad (17)$$

$$(\overline{P}) = (\overline{H_2PO_4^-}) + (\overline{HPO_4^{2-}}) \quad (18)$$

La variance ne change pas.

Remarquons qu'elle ne serait pas non plus modifiée par la prise en compte de l'acide phosphorique non dissocié et du phosphate trivalent. En effet, on ajouterait trois variables (H_3PO_4), (PO_4^{3-}) et ($\overline{PO_4^{3-}}$) et trois relations d'équilibre, deux de dissociation et une d'échange d'ions :

$$K_1 = \frac{(\overline{H_2PO_4^-})(H^+)}{(H_3PO_4)} \quad (29)$$

$$K_2 = \frac{(\overline{PO_4^{3-}})(H^+)}{(\overline{HPO_4^{2-}})} \quad (30)$$

$$K_{PO_4,OH} = \frac{(\overline{PO_4^{3-}})(\overline{OH^-})^3}{(\overline{PO_4^{3-}})(\overline{OH^-})^3} \quad (31)$$

Il faudrait évidemment ajouter la contribution du phosphate trivalent dans les relations d'électroneutralité relatives aux deux phases .

Les trois variables choisies pour décrire le système peuvent être les concentrations en potassium, chlorure et phosphate total en solution. Les vitesses de propagation de ces trois concentrations ont pour expression :

$$v_{K^+} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{K^+})}{\partial(K^+)} \right)_z} = v_0 \quad (19)$$

$$v_P = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{P})}{\partial(P)} \right)_z} \leq v_0 \quad (20)$$

$$v_{Cl^-} = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{\partial(\overline{Cl^-})}{\partial(Cl^-)} \right)_z} \leq v_0 \quad (25)$$

Comme précédemment, le potassium non retenu se propage à la vitesse du fluide ; pour raisons de cohérence, il ne peut y avoir aucun échange d'ions au passage de cette onde. Les deux autres vitesses se rapportent aux ondes d'échange d'ions, retardées par rapport au fluide.

II-3.2 Etude expérimentale

Des expériences d'échange chlorure-tampon phosphate ont été effectuées sur le support QMA Spherosil, qui sera utilisé pour les expériences avec les protéines. Pour ce support, nous ne connaissons pas a priori les constantes thermodynamiques des échanges, ni même l'ordre d'affinité des espèces. Il faudrait déterminer ces paramètres par des expériences annexes. Ici, notre objectif est seulement la mise en évidence des variations de pH pouvant se produire au cours de l'échange.

** Expérience 1 :*

La colonne est initialement en équilibre avec une solution de chlorure de potassium, environ 10 mM, alimentée par le tampon phosphate de potassium, environ 10 mM, pH 6.85. On mesure les concentrations en potassium, chlorure, phosphate total et le pH. A partir de ces deux dernières informations, sont calculées les concentrations en phosphate monovalent et

divalent. La figure 3-15 montre les variations de ces différentes concentrations dans l'effluent.

On observe d'abord une onde indifférente qui sort au volume mort, dans laquelle les concentrations en potassium et chlorure augmentent, suivie d'un palier.

Ensuite apparaît une onde d'échange d'ions, à laquelle correspond la percée du phosphate monovalent ; les concentrations en chlorure et phosphate monovalent varient en sens inverse et le pH diminue. On constate que ce front est plus étalé que le précédent, il est de nature plutôt dispersive.

Le second palier est suivi de la deuxième onde d'échange d'ions, le long de laquelle la concentration en phosphate divalent augmente, celle en chlorure diminue et s'annule, celle en phosphate monovalent décroît légèrement, tandis que le pH augmente. Cette onde se termine par un palier correspondant à l'alimentation. La forme du front, moins étalé que le précédent, indique une transition plutôt compressive. Toutefois, comme pour l'onde précédente, le caractère dispersif ou compressif n'est pas très net.

La première conclusion qui s'impose est que le système est bien de variance trois comme prévu. De cette expérience, on peut déduire par ailleurs un certain nombre d'informations.

- On peut notamment s'interroger sur l'ordre d'affinité des anions, donnée par la nature présumée des fronts, et par l'ordre dans lequel percent les espèces.

Le phosphate monovalent apparaît avant le divalent en solution, il est donc moins retenu. Le front qui correspond à l'échange chlorure-phosphate monovalent est plutôt dispersif, ceci indique que l'affinité du chlorure est plus élevée que celle du phosphate monovalent ; la nature compressive du second front, chlorure-phosphate divalent indique que l'affinité du chlorure est moins élevée que celle du phosphate divalent.

On peut donc conclure sur l'ordre d'affinité suivant : $\text{HPO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$ qui est différent de celui observé pour la résine utilisée en III-1.

- On peut également effectuer des bilans de matière sur les espèces échangeables, en calculant les quantités de chlorure élué et de phosphate fixé par intégration graphique des courbes de percée. La quantité de chlorure élué doit être égale à la quantité de phosphate retenue (exprimée en équivalents). Cette contrainte est vérifiée à condition que le phosphate soit fixé majoritairement sous forme divalente, ce qui explique alors la variation de pH.

On constate que l'échange chlorure-tampon phosphate étudié ici donne lieu à une variation du pH dans l'effluent, non négligeable du point de vue de l'amplitude aussi bien que de la durée.

* *Expérience 2 :*

Cette expérience a été effectuée à la suite de la précédente : la colonne est donc initialement en équilibre avec une solution de tampon phosphate de potassium, et alimentée par un mélange tampon phosphate-chlorure de potassium, au même pH (6.85), de normalité totale voisine. La figure 3-16 montre les variations de concentrations dans l'effluent.

On observe l'onde indifférente le long de laquelle augmentent les concentrations en potassium et phosphate, suivie d'un premier palier, puis d'une onde d'échange, le long de laquelle la concentration en phosphate total diminue, tandis qu'augmente celle en chlorure. Le pH est constant, c'est pourquoi on n'a pas représenté les concentrations en phosphate mono et divalent.

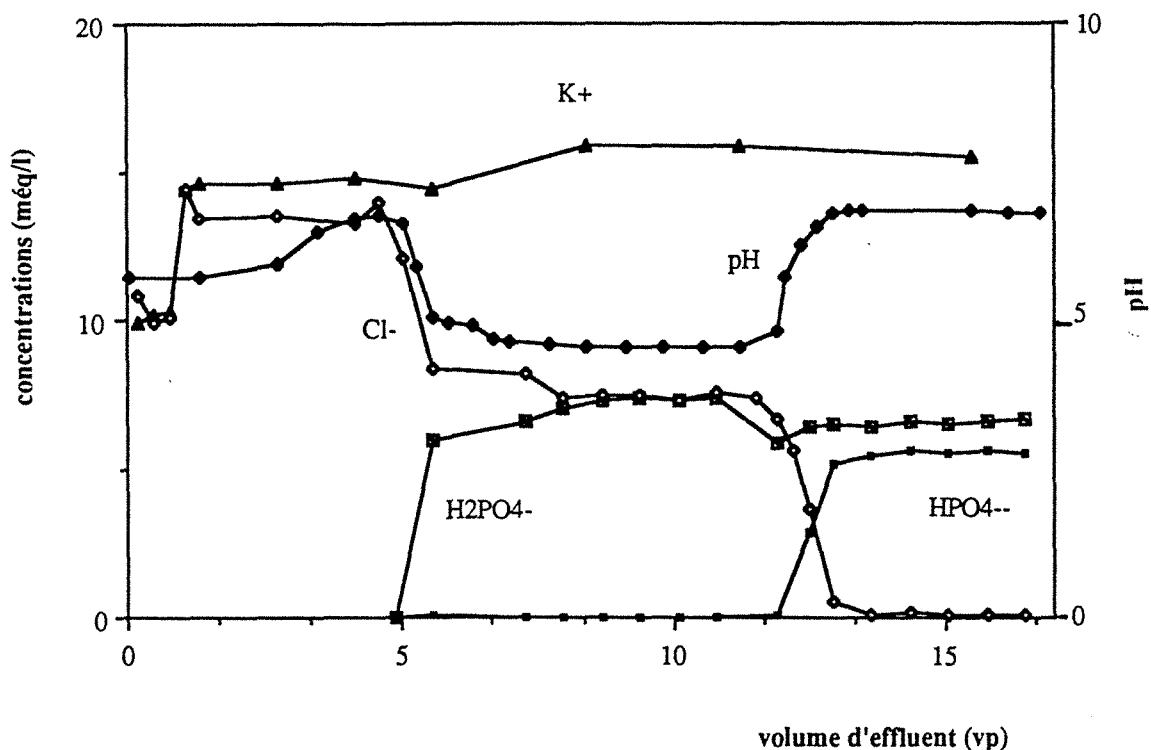


Figure 3-15 : Expérience 1 : colonne équilibrée par une solution de KCl (9.63 mM), alimentée par une solution de tampon phosphate de potassium (9.61 mM, pH 6.83), capacité totale 0.113 éq/l.

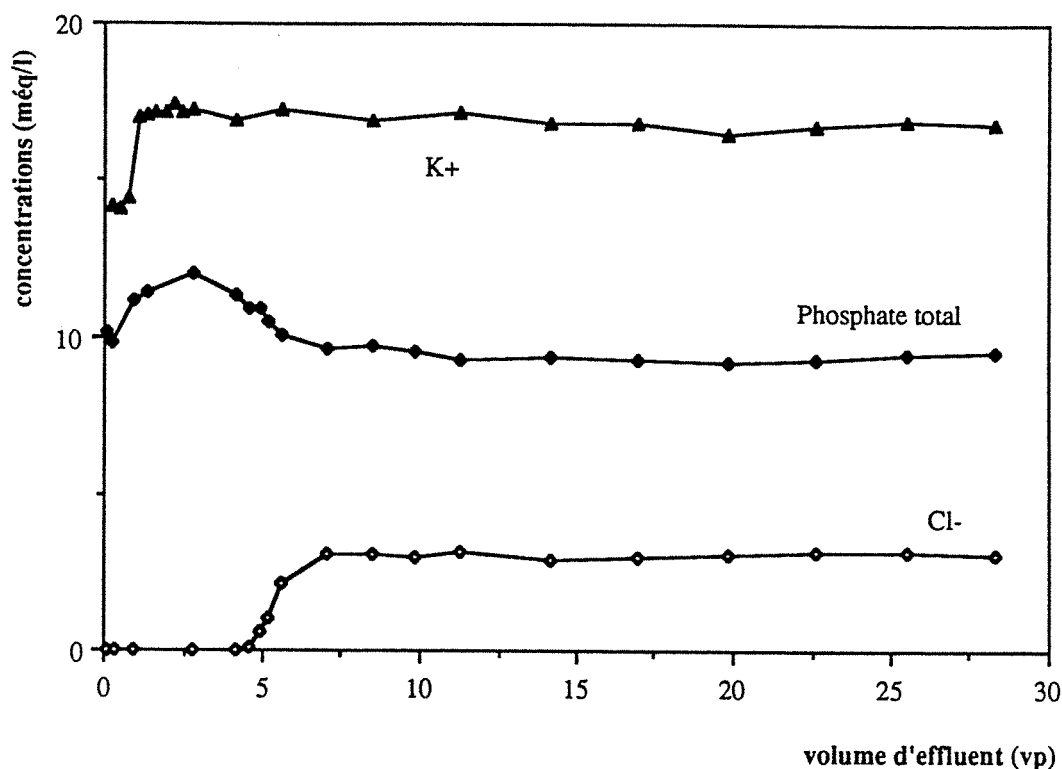


Figure 3-16 : Expérience 2 : colonne équilibrée par une solution de tampon phosphate de potassium (9.61 mM, pH 6.83), alimentée par un mélange tampon phosphate de potassium (9.61 mM, pH 6.83)-chlorure (3.2 mM), capacité totale 0.113 éq/l.

On devrait voir un palier et une onde supplémentaires, il est probable que l'amplitude de cette variation soit très faible, donc pas visible expérimentalement.

L'intégration des courbes de percée permet d'obtenir la quantité de chlorure fixé et de phosphate élué. D'après la quantité de chlorure fixé, connaissant la capacité totale du support, on peut calculer le titre ionique en chlorure fixé, et le comparer au titre ionique de chlorure en solution. Comme le phosphate est majoritairement retenu sous forme divalente, cela donne un point de l'isotherme phosphate divalent-chlorure, à normalité et capacité totale fixées ($x_{Cl} = 0.20$; $y_{Cl} = 0.13$ environ). Ce point se trouve en dessous de la première bissectrice, ce qui confirme la conclusion tirée de l'expérience précédente, à propos de l'ordre d'affinité chlorure-phosphate divalent.

Cette expérience n'a donné lieu à aucune excursion de pH, ce qui n'était pas évident a priori. Seule la connaissance du diagramme d'état aurait pu permettre de prévoir ce comportement.

II-3.3 Simulations

Les deux expériences précédentes ont été simulées, les résultats sont présentés en figures 3-17 et 3-18. Ne connaissant pas les valeurs des constantes d'échange d'ions, nous avons testé plusieurs jeux de constantes, et nous avons bien trouvé les tendances correctes de comportement avec l'ordre d'affinité : $\text{HPO}_4^{2-} > \text{Cl}^- > \text{H}_2\text{PO}_4^-$.

Les constantes ont été prises égales à

5	pour $\text{KH}_2\text{PO}_4, \text{OH}$
10	pour KCl, OH
15	pour KHPO_4, OH

Le nombre de mélangeurs a été choisi égal à 50.

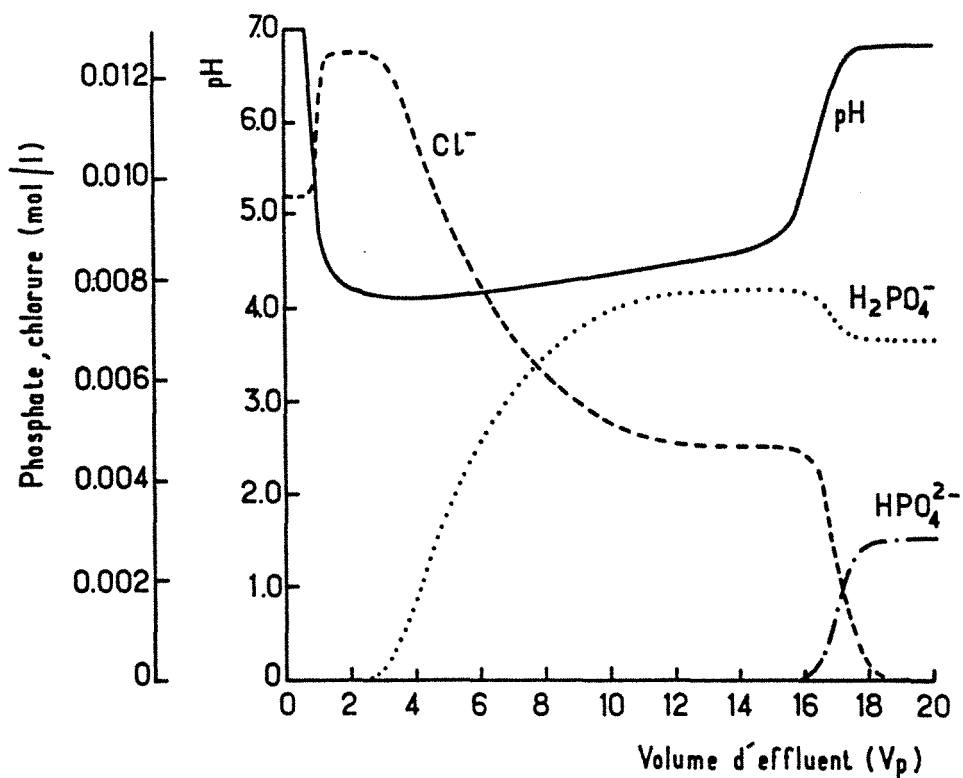


Figure 3-17 : Expérience 1 : variations calculées des concentrations dans l'effluent.

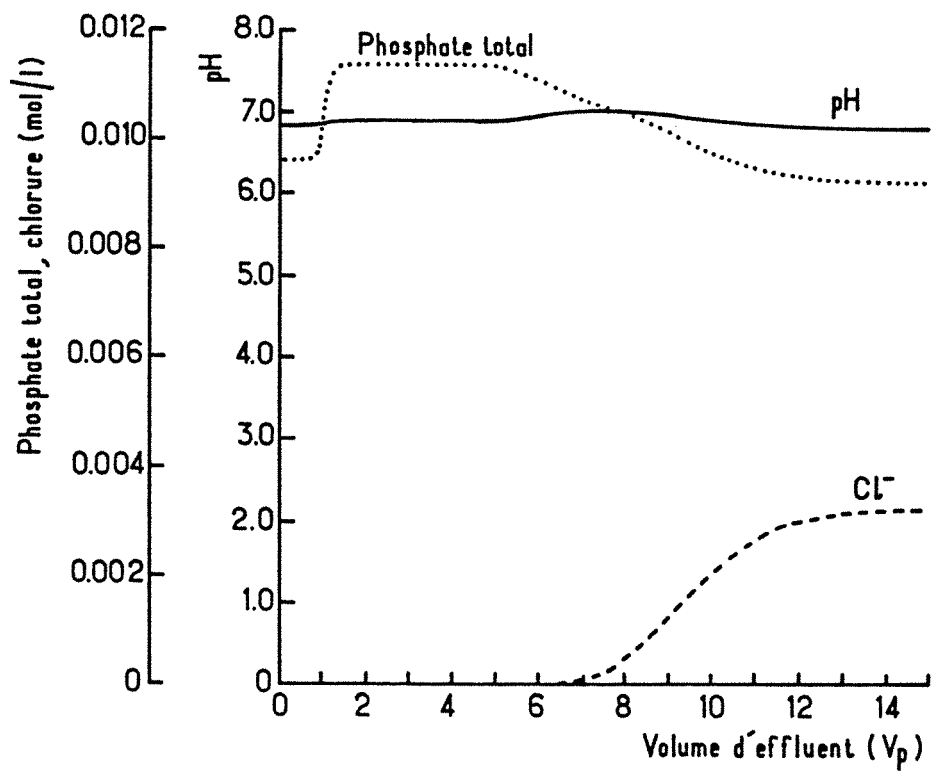


Figure 3-18 : Expérience 2 : variations calculées des concentrations dans l'effluent .

CONCLUSION

L'objet de ce chapitre était d'étudier la propagation d'un électrolyte faible dans une colonne échangeuse d'anions. Autrement dit, il s'agissait de donner un aperçu du comportement dynamique de systèmes relativement complexes, pour lesquels interviennent simultanément des équilibres d'échange d'ions et de dissociation.

Nous avons montré que d'importantes variations de pH pouvaient se produire lorsqu'une colonne équilibrée par une solution tampon à un certain pH était alimentée par une solution tampon au même pH, en présence ou non d'un ion échangeable en plus de ceux du tampon. Le modèle d'équilibre utilisé donne une bonne interprétation des résultats, en ce qui concerne les sens de variations des concentrations. Pour parvenir à une meilleure description quantitative, il faudrait très certainement ajouter dans le modèle une loi de sorption. La prévision du comportement de ce type de système s'avère assez simple lorsque le diagramme d'état est connu (acide acétique-acétate-chlorure). Dans le cas général, apparaissent certaines difficultés liées à la connaissance des paramètres et à la résolution numérique.

Cette étude a été réalisée dans le cadre des supports échangeurs d'anions forts, et mérite d'être étendue à celui des échangeurs faibles. Une approche préliminaire nous a permis de constater que le comportement général n'était pas changé, mais que l'amplitude des variations de pH était atténuée par un certain effet tampon, dû à la dissociation des sites du solide.

ANNEXE 3-1 : SYSTEME EXPERIMENTAL

I. EXPERIENCES EN COLONNE

I-1 Ondes de pH

Le montage se compose successivement dans le sens de l'écoulement de:

- un réservoir contenant la solution d'alimentation,
- une pompe péristaltique,
- une colonne en verre avec piston Téflon ajustable (écoulement de haut en bas),
- une cellule de très faible volume (environ 1ml) contenant l'embout de l'électrode de pH,
- un collecteur de fractions.

La résine utilisée est une résine anionique forte de type gel : Dowex SBR-P.

- granulométrie : 0.6-0.8 mm
- porosité : 0.4
- capacité totale d'échange : $C = 1.22 \text{ éq/l lit}$ soit 3.06 éq/l de solution
- volume de lit : 45.4 ml
- section de la colonne : 1.54 cm^2
- capacité d'échange du lit : 55.4 méq
- débits : environ 2 ml/min

Les analyses sont effectuées par absorption atomique pour le sodium, par HPIEC pour les anions et pour le potassium (voir Annexe générale : méthodes d'analyse). Le pH est mesuré à l'aide d'une électrode haute alcalinité [TBC 11/HA] reliée à un pHmètre Tacussel [PHN 81].

I-2 Echange chlorure-phosphate

Le montage est pratiquement identique au précédent, mais la colonne a des dimensions différentes, et le pH est mesuré d'une autre façon. En effet, on ne peut utiliser une cellule de mesure de pH que lorsque la colonne a un volume suffisant pour que l'on puisse considérer que la présence de la cellule ne perturbe pas l'écoulement. Ici le volume de colonne est plus faible que dans le cas précédent, et on ne peut pas utiliser la même cellule car son volume n'est plus négligeable, et elle jouerait le rôle d'un petit réacteur agité en série avec la colonne, ce qui perturberait toutes les mesures. Il faut donc utiliser une microélectrode avec une cellule de très faible volume. Celle dont on dispose ne donne pas une réponse très fiable, c'est pourquoi on préfère mesurer directement le pH dans les tubes.

Le support utilisé est le QMA Spherosil LS (cf Annexe générale).

- volume du lit :	18 ml
- porosité totale :	environ 0.8
- section de la colonne :	0.636 cm ²
- capacité d'échange du lit :	1.67 méq
- débits :	2.12 ml/min

Les analyses sont effectuées par absorption atomique pour le potassium et par HPIEC pour les anions. Le pH est mesuré en discontinu avec les mêmes instruments que précédemment.

II. MESURE D'ISOTHERME EN REACTEUR FERME AGITE

Le principe de l'expérience en réacteur fermé agité consiste à placer un échantillon de résine de composition ionique connue dans un certain volume de solution de composition connue, et à laisser l'équilibre s'établir. Après plusieurs heures d'agitation, lorsque l'équilibre est atteint, on prélève un échantillon de solution pour analyse. Un bilan de matière sur les espèces échangeables, entre l'instant initial et l'instant final permet de calculer la composition ionique du solide ; ainsi, la connaissance de la composition ionique du solide et de la solution en équilibre donne un point d'isotherme. On peut déterminer successivement sans trop d'erreur trois points d'isotherme à partir du même échantillon de résine : le volume prélevé pour analyses doit être remplacé par le même volume de solution de composition connue (on suppose que le mélangeage en phase liquide est infiniment plus rapide que l'échange). Connaissant la nouvelle composition initiale, on répète la même procédure pour obtenir un second point d'isotherme etc.

On a employé ici trois échantillons d'environ 15 ml de résine Dowex SBR-P, qui ont été préalablement équilibrés en colonne et dont la capacité d'échange a été mesurée. La résine sous forme chlorure est rincée, essorée sur büchner et placée dans trois erlenmeyers en présence de 100 ml d'un mélange KCl-K₂HPO₄ de composition connue. Pour l'un des trois, la normalité totale est fixée à 0.155 N, pour les deux autres, à 1.48 N. Au bout de quatre heures d'agitation, on prélève des échantillons de solution (environ 15 ml) pour analyse, que l'on remplace par le même volume de solution mère KCl-K₂HPO₄, et ainsi de suite. A partir de chacune des trois expériences, on mesure trois points d'isotherme, ce qui donnera trois points pour l'isotherme à 0.155 N et six pour celle à 1.48 N. Les résultats se trouvent en annexe 3-2.

ANNEXE 3-2 : CALCUL DES COURBES DE PERCEE THEORIQUES ET VALEUR DES PARAMETRES

I. SYSTEME ACIDE ACETIQUE-ACETATE DE SODIUM

D'après les équations (4), (5), (6), (7), (8), on peut écrire :

$$K_{AcO,OH} = \frac{\overline{(AcO^-)}}{\overline{(OH^-)}} \frac{\overline{(OH^-)}}{\frac{(Ac)}{1 + \frac{Ke}{Ka(OH^-)}}} \quad (A.3.2.1)$$

$$(Na^+) + \frac{Ke}{(OH^-)} = \frac{(Ac)}{1 + \frac{Ke}{Ka(OH^-)}} + (OH^-) \quad (A.3.2.2)$$

* En milieu très basique

On peut négliger les termes $\frac{Ke}{(OH^-)}$ et $\frac{Ke}{Ka(OH^-)}$, le système des deux équations (A.3.2.1) (A.3.2.2) devient :

$$K_{AcO,OH} = \frac{\overline{(AcO^-)}}{\overline{(OH^-)}} \frac{(OH^-)}{(AcO^-)} \quad (A.3.2.3)$$

$$(Na^+) = (Ac) + (OH^-) \quad (A.3.2.4)$$

ce qui revient à supposer $(H^+) \cong 0$ et $(AcOH) \cong 0$. Connaissant les valeurs des concentrations en sodium et en acétate total dans les solutions d'équilibration et d'alimentation, on peut facilement en déduire toutes les autres. Dans les zones extrêmes de la colonne, on calcule la composition de la résine en équilibre avec la solution d'équilibration et d'alimentation.

Pour calculer la composition du plateau intermédiaire, on prend comme concentration en sodium celle de l'alimentation, et comme concentration en acétate fixé, celle qui correspond à l'équilibre avec le prééquilibrant. On en déduit alors les autres concentrations.

Les positions des fronts sont ensuite calculées d'après l'équation (2) donnant la vitesse, sachant que le premier front, indifférent, se déplace à la vitesse du fluide, et que le second front est compressif.

*** En milieu acide**

D'après les équations (4), (5), (6), (7), (8), on peut écrire celle qui donne le pH :

$$(H^+)^3 + (H^+)^2 [(Na^+) + Ka] - (H^+) [Ke + Ka [(Ac) + (Na^+)]] - KaKe = 0 \quad (A.3.2.5)$$

Pour $pH < 7$, on néglige le terme constant de l'équation (A.3.2.5), qui se ramène ainsi au second degré. On peut ensuite calculer la composition de la résine d'après l'équation (8) ; par substitution, on obtient :

$$\overline{(AcO^-)} = \frac{K_{AcO,OH} \overline{C}}{K_{AcO,OH} + A} \quad (A.3.2.6)$$

$$\text{avec } A = \frac{\frac{Ke}{(H^+)}}{(Na^+) + (H^+) - \frac{Ke}{(H^+)}}$$

Les calculs de composition de paliers et de position de fronts s'effectuent comme précédemment. Les résultats sont résumés dans le tableau A.3.2.1.

*** Valeur des paramètres**

Si on exprime les concentrations par rapport au volume de solution, les paramètres sont les suivants :

$$Ke = 1.0 \times 10^{-14} \text{ (mol/l)}^2$$

$$Ka = 1.76 \times 10^{-15} \text{ (mol/l)}$$

$$K_{AcO,OH} = 2.95$$

[HELFFERICH et BENNETT 1984]

	1er cas : milieu basique				2ème cas : milieu acide			
	(Na ⁺)	(Ac)	(AcO ⁻)	pH	(Na ⁺)	(Ac)	(AcO ⁻)	pH
	(mol/l solution)				(mol/l solution)			
Alimentation	0.5740	0.4967	2.8972	12.89	0.504	1.068	3.06	4.70
Onde d'échange d'ions	0.305 v _o environ 3.3 V _p (59 ml)				1.000 v _o 1 V _p (18.1 ml)			
Plateau intermédiaire	0.5740	0.4604	2.8145	13.06	0.504	0.449	≅ 3.06	5.70
Onde de sodium	1.000 v _o 1 V _p				1.000 v _o 1 V _p			
Prééquilibrant	0.0197	0.0158	2.8145	11.59	0.048	0.104	≅ 3.06	4.69

Tableau A-3-2-1 : Compositions calculées à partir des concentrations en sodium et en acétate total.

II. SYSTEME EXPERIMENTAL HYDROGENO- DIHYDROGENO-PHOSPHATE DE POTASSIUM

Connaissant les concentrations en phosphate total et en potassium, nous allons expliciter le calcul des autres concentrations.

* Calcul du pH

D'après les équations (4), (12),(15) et (17), on obtient :

$$K_a = \frac{(H^+) [(K^+) + (H^+) - (P) - (OH^-)]}{2(P) + (OH^-) - (K^+) - (H^+)}$$

(A.3.2.7)

dont on déduit l'équation permettant de calculer le pH :

$$(H^+)^3 + (H^+)^2 [(K^+) - (P) + K_a] - (H^+) [K_a(2(P) - (K^+)) + K_e] = 0$$

(A.3.2.8)

* Calcul de la composition de la résine en équilibre avec une solution donnée

On connaît la composition de la solution, on cherche à calculer (OH^-) , $(H_2PO_4^-)$ et (HPO_4^{2-}) .

D'après (14) et (15), on calcule le rapport $\frac{K_{H_2PO_4,OH}}{K_{HPO_4,OH}}$:

$$K_{HPO_4,OH} = \frac{(\overline{H_2PO_4^-})(\overline{OH^-})}{(\overline{HPO_4^{2-}})} \frac{K_a}{K_e} \quad (A.3.2.9)$$

Explicitons le terme $\frac{(\overline{H_2PO_4^-})(\overline{OH^-})}{(\overline{HPO_4^{2-}})}$:

On remplace $(\overline{H_2PO_4^-})$ par $\overline{C} - (\overline{OH^-}) - 2(\overline{HPO_4^{2-}})$ (équation 17).

Le terme $\frac{(\overline{OH^-})^2}{(\overline{HPO_4^{2-}})}$ qui intervient est alors substitué par $\frac{(\overline{OH^-})^2}{(\overline{HPO_4^{2-}})} \frac{1}{K_{HPO_4,OH}}$

finalement

$$\frac{(\overline{H_2PO_4^-})(\overline{OH^-})}{(\overline{HPO_4^{2-}})} = \left(\frac{\overline{C}}{(\overline{OH^-})} - 1 \right) \left(\frac{(\overline{OH^-})^2}{(\overline{HPO_4^{2-}})} \frac{1}{K_{HPO_4,OH}} \right) - 2(\overline{OH^-}) \quad (A.3.2.10)$$

$(\overline{OH^-})$ est connu d'après le pH, et $(\overline{HPO_4^{2-}})$ est déduit de la concentration en phosphate total.

A partir de l'électroneutralité (équation 15) et de l'équation de dissociation (équation 12), on obtient :

$$(\overline{HPO_4^{2-}}) = \frac{(\overline{K^+}) - (\overline{H^+}) - (\overline{OH^-})}{2 + \frac{(\overline{H^+})}{K_a}} \quad (A.3.2.11)$$

En reportant (A.3.2.11) dans (A.3.2.10), on arrive à une expression qui peut être reportée dans (A.3.2.9). On parvient à :

$$(\overline{OH^-})^2 + \frac{1}{2} \left(\frac{K_e}{K_a} \frac{K_{H_2PO_4,OH}}{K_{HPO_4,OH}} + A \right) (\overline{OH^-}) - \frac{A \overline{C}}{2} = 0 \quad (A.3.2.12)$$

avec $A = \frac{(\overline{OH^-})^2}{B K_{HPO_4,OH}} \left(2 + \frac{(\overline{H^+})}{K_a} \right)$

et $B = (\overline{K^+}) + (\overline{H^+}) - (\overline{OH^-})$

A partir de l'équation (A.3.2.12), on calcule $(\overline{OH^-})$, puis on déduit $(\overline{H_2PO_4^-})$ et $(\overline{HPO_4^{2-}})$, en reportant dans les expressions de $K_{H_2PO_4,OH}$ et $K_{HPO_4,OH}$ (équations 13 et 14). On connaît

alors la composition de la résine en équilibre avec la solution donnée, qui peut être le prééquilibrant ou l'alimentation.

*** Calcul du pH d'une solution en équilibre avec une résine de composition donnée (pour le palier intermédiaire)**

Sur le palier intermédiaire, l'état de la résine est fixé par le prééquilibrant, et la concentration en potassium est celle de l'alimentation. On connaît donc (P) , (K^+) , $(H_2PO_4^-)$, (HPO_4^{2-}) , (OH^-) , il manque (H^+) , (OH^-) , $(H_2PO_4^-)$, (HPO_4^{2-}) .

De la relation (A.3.2.12) on extrait le terme A :

$$A = \frac{(\overline{OH^-})^2 + \frac{K_e}{K_a} \frac{K_{H_2PO_4, OH}}{K_{HPO_4, OH}} (\overline{OH^-})}{(\overline{C}) - (\overline{OH^-})} \quad (A.3.2.13)$$

Connaissant la valeur de A, on peut, d'après sa définition, calculer le pH par :

$$(H^+)^3 + (H^+)^2 (K^+) - \left(K_e + \frac{K_e^2}{A K_{H_2PO_4, OH} K_a} \right) (H^+) - \frac{2 K_e^2}{A K_{HPO_4, OH}} = 0 \quad (A.3.2.14)$$

Connaissant le pH et le phosphate total, on peut calculer toutes les concentrations.

*** Calcul des courbes de percée**

A partir des équations (A.3.2.7) à (A.3.2.14), on peut calculer la composition des deux phases au niveau des trois plateaux. La première transition se propage à la vitesse du fluide, elle apparaît dans l'effluent pour un volume égal à un volume de pore. La position et la nature de la seconde transition sont déterminées à partir de l'équation de la vitesse (20).

Cette équation fait intervenir la dérivée de la concentration en phosphate total fixé par rapport à la concentration en phosphate total en solution, soit $\frac{d\overline{P}}{dP}$. Nous n'avons pas d'expression analytique de la fonction $\overline{P} = f(P)$, mais il est possible de calculer numériquement des valeurs de la dérivée en incrémentant le pH et en gardant la concentration en potassium constante.

Par exemple, pour le premier cas, on trouve un pH pour le palier intermédiaire de 7.49, et on sait que ce pH va diminuer pour atteindre la valeur qu'il a dans la solution d'alimentation, soit 7.13. On calcule alors les compositions des deux phases "juste après" le plateau intermédiaire (pour $pH = 7.49 + \epsilon$ avec ϵ tendant vers zéro) et "juste avant" la plateau correspondant à la solution d'alimentation ($pH = 7.13 + \epsilon$), puis la valeur de la dérivée $\frac{d\overline{P}}{dP}$, la vitesse de

propagation, et la position du point en question. Si on trouve que la palier correspondant à la solution d'alimentation apparaît dans l'effluent avant que ne disparaisse le palier intermédiaire (ce qui est impossible physiquement), la transition est stable, sa vitesse et sa position s'évaluent d'après la quantité $\overline{\Delta P} / \Delta P$; dans le cas contraire, le front est dispersif.

Les résultats sont présentés dans le tableau A.3.2.2.

	1er cas : augmentation de pH				2ème cas : diminution de pH			
	(K ⁺)	(P)	(P)	pH	(K ⁺)	(P)	(P)	pH
	(mol/l solution)				(mol/l solution)			
Alimen- tation	1.333	1.078	1.728	6.70	0.123	0.096	1.584	6.80
Onde d'échange d'ions	0.625 v ₀ (alim.) 0.714 v ₀ (palier) entre 1.4 V _p et 1.6 V _p (dispersif) (252 et 286 ml)				0.152 v ₀ (choc) 6.6 V _p (119 ml)			
Plateau intermé- diaire	1.333	0.793	1.589	7.38	0.123	0.116	1.584	6.00
Onde de sodium	1.000 v ₀ 1 V _p (18.1 ml)				1.000 v ₀ 1 V _p (18.1 ml)			
Prééqui- librant	0.133	0.106	1.591	6.75	1.264	0.987	1.696	6.80

Tableau A.3.2.2 : Compositions calculées à partir des concentrations en phosphate total et en potassium

* Valeur des paramètres

$Ke = 1.0 \times 10^{-14} \text{ (mol/l)}^2$

Les trois constantes d'acidité de l'acide phosphorique à 25°C valent respectivement 2.12 - 7.21- 12.67. Celle qui nous concerne est la seconde, qui représente l'équilibre entre H₂PO₄⁻ et HPO₄²⁻.

On ne connaît pas les valeurs des constantes relatives aux équilibres d'échange d'ions, K_{H₂PO₄,OH} et K_{HPO₄,OH} On ne peut pas avoir accès directement à ces valeurs, puisque les échanges OH⁻/H₂PO₄⁻ et OH⁻/HPO₄²⁻ sont couplés à la dissociation du phosphate.

• Détermination de K_{H₂PO₄,OH}

La valeur de K_{H₂PO₄,OH} est déterminée indirectement en utilisant des valeurs extraites de la littérature [SAMUELSON, 1963].

Pour une résine fortement anionique, cette référence indique :

$$K_{OH,Cl} = \frac{\overline{(OH^-)} (Cl^-)}{(OH^-) (Cl^-)} = 0.09$$

$$K_{H_2PO_4,Cl} = \frac{\overline{(H_2PO_4^-)} (Cl^-)}{H_2PO_4^- (Cl^-)} = 0.25$$

On en déduit :

$$K_{H_2PO_4,OH} = \frac{\overline{(H_2PO_4^-)} (OH^-)}{(H_2PO_4^-) (OH^-)} = \frac{K_{H_2PO_4,Cl}}{K_{OH,Cl}} = 2.78$$

• Détermination de $K_{HPO_4,OH}$

La valeur de $K_{HPO_4,OH}$ est déterminée indirectement en mesurant expérimentalement l'isotherme de l'échange HPO_4^{2-}/Cl^- et en rapportant la valeur de la constante à celle de l'échange OH^-/Cl^- .

Deux isothermes ont été mesurées, pour deux valeurs de la normalité totale, étant donné que les expériences en colonne mettent en jeu des solutions de phosphate à faible et à forte normalité (voir procédure expérimentale en annexe A.3.1). Les résultats sont donnés dans le tableau A.3.2.II, et les courbes correspondantes en figure A.3.2.1.

A partir des points expérimentaux, on peut calculer la constante de l'échange Cl^-/HPO_4^{2-} . Cette constante peut être exprimée dans différents formalismes :

- la constante thermodynamique s'exprime théoriquement à partir des activités, que l'on assimilera ici aux concentrations :

$$K_{HPO_4,Cl} = \frac{\overline{(HPO_4^{2-})} (Cl^-)^2}{(HPO_4^{2-}) (Cl^-)^2} \quad (A.3.2.15)$$

- la sélectivité de l'échange s'écrit à partir des titres ioniques :

$$K_{x,y}^{HPO_4,Cl} = \frac{y_{HPO_4} (1 - x_{HPO_4})^2}{x_{HPO_4} (1 - y_{HPO_4})^2} \quad (A.3.2.16)$$

Elle dépend fortement de la normalité et de la capacité totale.

- la constante de Gaines-Thomas s'écrit en termes de titres ioniques pour ce qui concerne la phase solide, et de concentrations pour la phase liquide :

$$K_{GT}^{HPO_4,Cl} = \frac{y_{HPO_4}}{(1 - y_{HPO_4})^2} \frac{(Cl^-)^2}{(HPO_4^{2-})} \quad (A.3.2.17)$$

Elle dépend peu de la normalité et de la capacité.

Les relations entre ces différentes écritures sont données par l'équation (A.3.2.18) où l'on désigne par C la normalité totale et $\bar{C}$ la capacité totale :

$$K_{HPO_4,Cl} = \frac{C}{\bar{C}} K_{x,y}^{HPO_4,Cl} = \frac{1}{2} \frac{C}{\bar{C}} K_{GT}^{HPO_4,Cl}$$

Les constantes calculées pour les points expérimentaux (toutes les concentrations exprimées en moles par litre de solution) dans le tableau A.3.2.3.

L'incertitude sur les valeurs des titres ioniques est de l'ordre de ± 0.02 , l'erreur sur les constantes est difficile à estimer précisément, mais elle est relativement importante (jusqu'à 50%).

On remarque d'abord que le phosphate divalent a une affinité moins importante pour le support que le chlorure (généralement les ions divalents ont une affinité plus forte que les monovalents, du moins à faible normalité ; ce peut être l'inverse à forte normalité).

On constate ensuite que les isothermes dépendent beaucoup de la normalité, et que la détermination des constantes n'est pas très précise. La description par loi d'action de masse, c'est à dire avec une sélectivité constante n'est peut-être pas la mieux adaptée, mais c'est la plus simple a priori. Pour avoir des résultats plus fiables, il faudrait effectuer des expériences complémentaires. Les résultats dont on dispose permettent quand même de connaître le bon ordre de grandeur des paramètres.

Pour le calcul des compositions intervient la constante $K_{HPO_4,Cl}$, nous prenons la valeur 1.405 qui est la moyenne entre 0.76 et 2.05 (soit 174 pour $K_{HPO_4,OH}$).

Ces valeurs même si elles ne sont qu'approchées permettent d'obtenir une bonne allure des courbes de percée.

	$x\text{HPO}_4^{2-}$	$y\text{HPO}_4^-$	$K_{\text{HPO}_4,\text{Cl}}$	$K_{x,y}^{\text{HPO}_4,\text{Cl}}$	$K_{\text{GT}}^{\text{HPO}_4,\text{Cl}}$
Echantillon 1 :					
Normalité de la solution 0.155 éq/l	0.51	0.46	1.35	0.74	0.231
	0.60	0.51	1.04	0.57	0.168
Capacité totale de la résine 8.34 méq	0.67	0.58	1.02	0.53	0.171
Echantillon 2 :					
Normalité de la solution 1.48 éq/l	0.87	0.62	0.84	0.083	0.234
	0.89	0.65	0.67	0.072	0.191
Capacité totale de la résine 14.52 méq	0.91	0.68	0.76	0.059	0.164
Echantillon 3 :					
Normalité de la solution 1.48 éq/l	0.32	0.06	1.94	0.098	0.309
	0.54	0.16	1.47	0.089	0.270
Capacité totale de la résine 8.82 méq	0.69	0.41	2.74	0.164	0.484

Tableau A.3.2.3 : Résultats expérimentaux des mesures d'isothermes de l'échange $\text{Cl}^-/\text{HPO}_4^{2-}$ à 20°C, sur la résine anionique forte Dowex SBR-P et calcul des constantes d'échange.

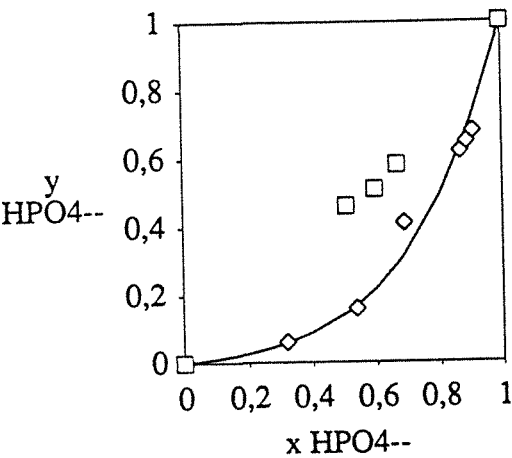


Figure A.3.2.1 : Isotherme de l'échange $\text{Cl}^- - \text{HPO}_4^{2-}$, à 20°C. Valeurs expérimentales (normalité totale : $\square$ 0.155 éq/l ; $\diamond$ 1.48 éq/l) et calculées avec $K_{x,y}^{\text{HPO}_4,\text{Cl}} = 0.094$.

ANNEXE 3-3 : ELEMENTS DE LA THEORIE DE L'EQUILIBRE - CONSTRUCTION DU DIAGRAMME - APPLICATIONS.

I. ELEMENTS DE LA THEORIE DE L'EQUILIBRE

I-1 Cohérence

En général, une composition arbitraire injectée dans une colonne, sous la forme d'une variation échelon par exemple, ne peut se propager telle quelle à travers la colonne. Elle se sépare en plusieurs ondes, qui se déplacent à des vitesses différentes, séparées les unes des autres par des zones de composition uniforme. L'onde initiale est dite non cohérente, tandis que les ondes qu'elle génère, qui elles-mêmes ne se diviseront pas en plusieurs ondes, sont dites cohérentes. La cohérence est en fait un état stable vers lequel tendent les systèmes multiconstituants, partant de conditions initiales arbitraires. La connaissance de ce principe indique, au niveau mathématique, que seules les solutions correspondant à la cohérence doivent être retenues, dès lors que l'on s'intéresse au comportement ultime (asymptotique) de la colonne.

Pour être cohérente, une onde doit répondre à la condition de cohérence, c'est à dire que les vitesses auxquelles se déplacent les concentrations d'une composition donnée doivent être identiques en tout point, à tout instant.

Pour un front dispersif, à tout instant, on doit avoir localement :

$$\left(\frac{\partial z}{\partial t}\right)_{Ci} = v_c \quad \text{pour toute espèce } i \quad (\text{A.3.3.1})$$

La vitesse locale de propagation de la composition C, v_c , est identique pour toutes les espèces i. Il s'agit de la **condition différentielle** ou **locale de cohérence**.

Pour une onde de choc, avec des variations de concentrations discontinues ou non :

$$\left(\frac{\partial z}{\partial t}\right)_{\Delta Ci} = v_{\Delta c} \quad \text{pour toute espèce } i \quad (\text{A.3.3.2})$$

En fait, pour un choc vrai (distribution continue), la condition (A.3.3.1) est vérifiée aussi, avec de plus, l'égalité des vitesses en tout point du choc.

De même, $v_{\Delta c}$ doit être la même pour toutes les espèces, ceci est la **condition intégrale de cohérence**.

Si ces conditions n'étaient pas respectées, les variations de concentration des différentes espèces se déplaceraient dans la colonne à des vitesses différentes, ce qui pourrait engendrer plusieurs ondes. L'onde serait alors non cohérente par définition.

I-2 Caractéristiques et chemins d'échange

Les variations de composition arbitraires sont en général non cohérentes. Seules, certaines variations de composition discrètes sont compatibles avec la condition de cohérence ; elles peuvent alors être représentées par des courbes dans l'espace des compositions, c'est à dire, pour un système de variance n , l'espace de dimension n , dont les axes portent les concentrations de ces constituants.

De telles courbes, représentant un comportement cohérent, sont appelées **caractéristiques**. Le réseau formé par ces caractéristiques dépend uniquement des **propriétés d'équilibre** du système, il est indépendant des conditions opératoires. Ainsi, pour un système donné, on peut tracer un **diagramme d'état**, qui sera utilisé pour prévoir le comportement du système, quelles que soient les conditions opératoires. Il existe, dans l'espace des compositions, une infinité de courbes caractéristiques, dont seules certaines sont représentées sur les diagrammes. Pour un système de variance n , chaque point représentatif d'une composition se trouve à l'intersection de n caractéristiques, une de chaque "famille". Chaque caractéristique coupe les caractéristiques des autres familles, mais jamais celles de sa propre famille.

Les variations de composition (transitions) et les zones de composition constante (plateaux) qui se forment dans une colonne pour des conditions opératoires données, peuvent être représentées par une courbe dans le diagramme d'état. Cette courbe est le **chemin d'échange** correspondant à cette opération. Du moment que toutes les ondes sont cohérentes, ce chemin doit suivre les courbes caractéristiques.

I-2.1 Equations d'onde et vitesses propres

Pour une espèce, ou un groupe d'espèces dont la concentration totale n'est pas modifiée sous l'effet d'une réaction chimique, la vitesse de propagation de la concentration est donnée par l'équation d'onde :

$$v_{ci} = \left(\frac{\partial z}{\partial t} \right)_{Ci} = \frac{v_o}{1 + \left(\frac{\partial \bar{Ci}}{\partial Ci} \right)_z} \quad (\text{A.3.3.3})$$

comme cela a été montré au paragraphe I. Dans cette partie, cette équation pouvait être évaluée directement pour toute composition donnée, puisque la concentration d'une espèce fixée $\bar{Ci}$ était fonction univoque de la concentration Ci de cette espèce en phase liquide, de telle sorte que la dérivée partielle $\left(\frac{\partial \bar{Ci}}{\partial Ci} \right)_z$ de l'équation (2) pouvait être remplacée par la dérivée totale

$d\overline{C_i}/dC_i$. Avec une espèce supplémentaire, la dérivée partielle peut en principe prendre n'importe quelle valeur, et l'équation (2) n'est pas suffisante pour calculer la vitesse.

Pour les ondes cohérentes, la condition de cohérence (A.3.3.2) impose que les vitesses de propagation des différentes espèces au cours d'une transition doivent être identiques entre elles. Ainsi, la dérivée partielle de l'équation (2) doit avoir la même valeur pour toutes les espèces :

$$\left(\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_i}\right)_z = \lambda \quad \text{pour tout } i \quad (\text{A.3.3.4})$$

où λ est le même pour tout i . On peut montrer que c'est typiquement un problème de valeurs propres, dans lequel les valeurs propres λ sont données par :

$$\det ([M] - \lambda[I]) = 0 \quad (\text{A.3.3.5})$$

où $[M]$ est une matrice carrée dont les éléments sont $\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_j}$ et $[I]$ la matrice identité. Les valeurs propres, qui sont les valeurs de $\left(\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_i}\right)_z$ compatibles avec la condition de cohérence, sont reliées aux vitesses propres (vitesses des ondes cohérentes) par l'équation (A.3.3.3). Les vecteurs propres associés (dC), calculables d'après :

$$([M] - \lambda[I]) (dC) = 0 \quad (\text{A.3.3.6})$$

donnent les directions des courbes caractéristiques au point auquel le problème aux valeurs propres a été résolu. Les équations (A.3.3.5) et (A.3.3.6) peuvent ainsi être utilisées pour calculer les courbes caractéristiques du diagramme d'état, ainsi que les chemins d'échange.

Pour les discontinuités de concentrations, dans le cas des chocs, les dérivées partielles $\frac{\partial \overline{C_i}}{\partial C_i}$ ne sont pas définies, et la condition de cohérence intégrale doit être utilisée à la place de la condition différentielle. A ce moment-là, c'est un système d'équations algébriques que l'on résout au lieu d'un problème aux valeurs propres.

I-2.2 Variance- Nombre de fronts

Le nombre de valeurs propres obtenues pour une composition donnée C est désignée comme la variance du système. Cette variance indique le nombre de courbes caractéristiques qui se coupent en un point représentatif d'une composition. Elle indique aussi le nombre d'ondes cohérentes qui sont engendrées à partir d'une variation-échelon de concentration non cohérente (à l'entrée de la colonne par exemple). La variance correspond au nombre minimum de variables de concentrations requises pour déterminer la composition d'un système à l'équilibre ;

c'est la différence entre le nombre de variables de concentration et le nombre de relations d'équilibre indépendantes (condition d'électroneutralité, équilibres de dissociation et équilibres d'échange d'ions).

I-2.3 Construction des chemins d'échanges

A partir du moment où le diagramme d'état est établi, la construction du chemin d'échange pour des conditions opératoires données est simple. Pour des systèmes comme ceux que l'on étudie, avec des compositions constantes pour le prééquilibrant et la solution d'alimentation, **les chemins suivent les courbes caractéristiques** (sauf pour les chocs). Le chemin, partant de la composition d'alimentation et arrivant à la composition du prééquilibrant, suit les caractéristiques dans l'ordre des ondes de vitesse croissante : il suit d'abord une caractéristique "lente", puis une "intermédiaire", et finalement une "rapide" (pour un système de variance 3, qui comporte 3 familles de caractéristiques). Ceci est la conséquence du fait qu'à un instant donné, l'onde la plus lente aura parcouru la plus petite distance depuis l'entrée de la colonne, tandis que l'onde la plus rapide aura parcouru la distance la plus longue. Par exemple, dans le cas du système acétate-sodium-chlorure, les caractéristiques "rapides" et "intermédiaires" sont situées dans un diagramme plan, à sodium constant, et sont suivies par des ondes d'échange d'ions. La caractéristique "lente" ne se trouve pas dans le diagramme plan, elle est relative aux changements de concentrations qui se produisent dans la phase liquide au passage de l'onde indifférente.

La réserve émise pour le cas des ondes de choc est que deux points placés sur la même courbe caractéristique calculée à partir de la condition différentielle de cohérence ne satisfont pas nécessairement la condition intégrale de cohérence, à moins que la caractéristique ne soit linéaire. Ainsi, si au moins l'une des ondes est un choc, le chemin tracé le long d'une caractéristique (obtenue d'après la condition différentielle) n'est qu'approximatif ; si on souhaite une plus grande précision, le chemin doit être corrigé à partir de la condition intégrale de cohérence.

II. CONSTRUCTION DU DIAGRAMME POUR LE SYSTEME ACETATE DE SODIUM-CHLORURE-HYDROXYLE

On présente ici la méthode utilisée par HELFFERICH et BENNETT [1984] pour calculer le diagramme d'état. Cette méthode est générale, et peut être employée pour tout système de variance trois. Elle consiste en une procédure qui doit être répétée pour un grand nombre de points initiaux (elle nécessite par conséquent l'écriture d'un programme).

Dans le cas du système acétate de sodium-chlorure-hydroxyle, l'établissement d'un diagramme très proche du diagramme exact peut être effectuée "manuellement". Nous présentons dans la suite la construction du diagramme approché, à partir duquel nous avons travaillé.

II-1 Résolution du problème aux valeurs propres

Dans un plan à concentration en sodium constante, le diagramme d'état a pour axes les concentrations en chlorure et en acétate total, il fait apparaître des caractéristiques "intermédiaires" et "rapides". Pour construire chaque famille de caractéristiques, on choisit un point initial $((Cl^-), (Ac))$, pour lequel on résout le problème aux valeurs propres, afin d'obtenir le vecteur propre $(d(Cl^-), d(Ac))$ qui donne la direction de la caractéristique. On recommence le calcul pour un point proche du point initial, et ainsi de suite.

Pour résoudre le problème aux valeurs propres, partant d'une composition donnée en sodium, chlorure, acétate total, on peut calculer toutes les concentrations en phase liquide et en phase solide.

- En phase liquide, on obtient la concentration en ion acétate d'après les équations (22), (23), (26) et (28), en résolvant :

$$(AcO^-)^3 + a(AcO^-)^2 + b(AcO^-) + c = 0 \quad (A.3.3.7)$$

$$\text{avec} \begin{cases} a = ((Cl^-) + K_a - \frac{K_e}{K_a} - (Ac) - (Na^+)) \\ b = (Ac) (2K_a - (Cl^-) - (Na^+)) \\ c = K_a (Ac)^2 \end{cases}$$

De là, on peut calculer (H^+) , (OH^-) , $(AcOH)$.

- Pour obtenir la composition de la résine en équilibre avec le liquide, les équations (24), (25) et (29) donnent :

$$(\overline{Cl^-}) = \overline{C} \left[K_{AcO,Cl} \frac{(AcO^-)}{(Cl^-)} + \frac{1}{K_{Cl,OH}} \frac{(OH^-)}{(Cl^-)} + 1 \right]^{-1} \quad (A.3.3.8)$$

Le calcul de (Cl^-) permet celui des autres concentrations en phase résine. Connaissant toutes les concentrations, on peut calculer les éléments $\frac{\partial \overline{Cl}}{\partial Cl}$ de la matrice $[M]$, à partir des relations d'équilibre, avec une méthode aux différences finies. Les valeurs propres se calculent alors à partir de l'équation caractéristique, qui peut s'écrire :

$$\lambda^2 + a\lambda + b = 0 \quad (A.3.3.9)$$

$$\text{avec } \begin{cases} a = - \left[\frac{\partial(\overline{\text{AcO}^-})}{\partial(\overline{\text{Ac}})} + \frac{\partial(\overline{\text{Cl}^-})}{\partial(\overline{\text{Cl}})} \right] \\ b = - \left[\left(\frac{\partial(\overline{\text{AcO}^-})}{\partial(\overline{\text{Ac}})} \right) \left(\frac{\partial(\overline{\text{Cl}^-})}{\partial(\overline{\text{Cl}})} \right) - \left(\frac{\partial(\overline{\text{AcO}^-})}{\partial(\overline{\text{Cl}})} \right) \left(\frac{\partial(\overline{\text{Cl}^-})}{\partial(\overline{\text{Ac}})} \right) \right] \end{cases}$$

La plus petite valeur de λ correspond aux caractéristiques "intermédiaires", la plus petite aux caractéristiques "rapides". En chaque point, connaissant λ , on peut calculer la vitesse de propagation des concentrations. Les directions des caractéristiques sont obtenues en normant :

$$\{dC\} = \begin{pmatrix} 1 \\ d(\overline{\text{Cl}^-}) \end{pmatrix}$$

Cette procédure permet de calculer point par point les caractéristiques du diagramme.

II-2 Diagramme simplifié

La topologie assez simple de ce diagramme, surtout dans l'hypothèse où les coefficients sont constants, donc les caractéristiques linéaires, permet la construction graphique directe, sans résolution du problème aux valeurs propres.

La première étape consiste à tracer la droite "d'équivalence", qui délimite les deux zones du diagramme.

* Région I

La construction des caractéristiques dans cette région s'effectue en suivant la méthode propre aux systèmes à trois composants sans réaction chimique, à facteurs de séparation constants. On classe les anions de 1 à 3 par ordre d'affinité décroissante, ici $\text{Cl}^- > \text{AcO}^- > \text{OH}^-$; on définit le titre ionique de l'ion i , $x_i = \frac{C_i}{(\text{Na}^+)}$ puisque (Na^+) représente la normalité totale. On place le point W (watershed point) sur le côté joignant $x_1 = 0$ à $x_2 = 0$, défini par :

$$\begin{cases} x_1 = \frac{\alpha_{12} - 1}{\alpha_{13} - 1} \\ x_2 = 0 \end{cases} \quad (\text{A.3.3.10})$$

$$\text{avec } \alpha_{ij} = \frac{y_i}{x_j} \frac{x_j}{y_j}$$

W est un point singulier (égalité de deux valeurs propres) qui possède un certain nombre de propriétés [TONDEUR et BAILLY, 1986]. En particulier, ce point partage l'axe $x_2 = 0$ (ici l'axe des ordonnées) en deux segments interceptés sur les côtés du triangle sont dans un rapport constant :

$$\frac{a}{b} = 1 - \frac{c}{d} = \frac{1 - \alpha_{32}}{1 - \alpha_{31}} = 0.235 \quad (\text{ici})$$

Ceci permet de construire le diagramme dans la région I.

** Région II*

Dans la région "acide", les caractéristiques consistent en un réseau de droites horizontales et de parallèles à la droite "d'équivalence", en première approximation.

La construction du diagramme à trois dimensions dans l'espace sodium-chlorure-acétate total requiert des considérations supplémentaires, que nous ne détaillerons pas ici, car elles ne sont pas indispensables dans le cadre de cet exposé.

III. Investigation du diagramme : étude de cas

En plus du cas étudié dans le chapitre 3, pour lequel le chemin d'échange se trouve à l'extérieur du triangle, entièrement dans la région II, nous allons considérer deux cas :

- un lequel le chemin d'échange se trouve à l'intérieur du triangle qui délimite la région I,
- un pour lequel le chemin d'échange traverse la droite "d'équivalence".

III-1 Echange dans la région I

On trouvera dans l'article de HELFFERICH et BENNETT [1984] un cas pour lequel les compositions ont été choisies de manière à ce que les ondes d'échange d'ions soient des chocs. Nous allons examiner ici une situation pour laquelle il n'y a pas de variation de la concentration en sodium (on verra uniquement les deux ondes d'échange d'ions) et les transitions sont dispersives. Les conditions sont résumées dans le tableau (A.3.3.1).

Le chemin d'échange (Figure A.3.3.1) suit d'abord une caractéristique "intermédiaire" qui passe par A1 (alimentation) jusqu'au point I1 (palier intermédiaire), intersection de cette caractéristique et de la caractéristique "rapide" qui passe par P1 (prééquilibrant), et qui est confondue avec l'axe vertical, puisque le point P1 est un sommet du triangle.

On doit voir dans le sens de la courbe de percée, séparées par des paliers :

- une onde dispersive (transition PII1), au cours de laquelle la concentration en chlorure diminue, celle en acétate total restant nulle ; par conséquent, la concentration en hydroxyle doit augmenter, donc le pH également,
- une onde dispersive (transition P1A1), le long de laquelle la concentration en chlorure diminue, tandis que celle en acétate augmente. Etant donnée que la caractéristique suivie est

pratiquement parallèle à la droite "d'équivalence", la somme des concentrations en acétate et chlorure reste à peu près constante, donc le pH ne varie pas au cours de cette transition.

La figure A.3.3.2 représente les variations de concentrations calculées pour la courbe de percée.

III-2 Echange pour lequel la droite "d'équivalence" est franchie

On trouvera dans l'article de HELFFERICH et BENNETT [1984] un cas pour lequel les compositions ont été choisies de manière à ce que les ondes d'échange d'ions soient des chocs. Ici, nous allons considérer un cas où l'une des ondes est dispersive. Les conditions sont résumées dans le tableau (A.3.3.1).

Le chemin d'échange suit d'abord une caractéristique "intermédiaire" qui passe par A2 jusqu'au point I2. Etant donné que l'onde suivante est un choc, la position du point I2 est déterminée à l'aide d'un bilan de matière (condition intégrale de cohérence) ; on remarquera que ce point ne se trouve pas à l'intersection des caractéristiques. Ensuite, le chemin suit la droite I2P2 (choc).

On doit voir dans le sens de la courbe de percée, séparées par des paliers :

- une onde compressive (transition P2I2), au cours de laquelle la concentration en chlorure augmente, celle en acétate total également ; le pH chute (traversée de la droite "d'équivalence").
- une onde dispersive (transition I2A2), le long de laquelle la concentration en chlorure diminue, tandis que celle en acétate augmente. La valeur du pH augmente pour arriver vers celle de l'alimentation (Figure A.3.3.3).

	Prééquilibrant Alimentation		Prééquilibrant Alimentation	
	Premier cas		Deuxième cas	
pH	7.00	12.15	12.30	5.34
Acétate total (mol/l)	0	0.080	0	0.117
Chlorure (mol/l)	0.100	0.006	0.080	0.007
Sodium (mol/l)	0.100	0.100	0.100	0.100
Capacité totale (mol/l)		2.95		
KOAc,OH		2.95		
KCl,OH		7.39		
Nombre de mélangeurs		50		

Tableau A.3.3.1 : Conditions pour lesquelles les deux exemples sont calculés.

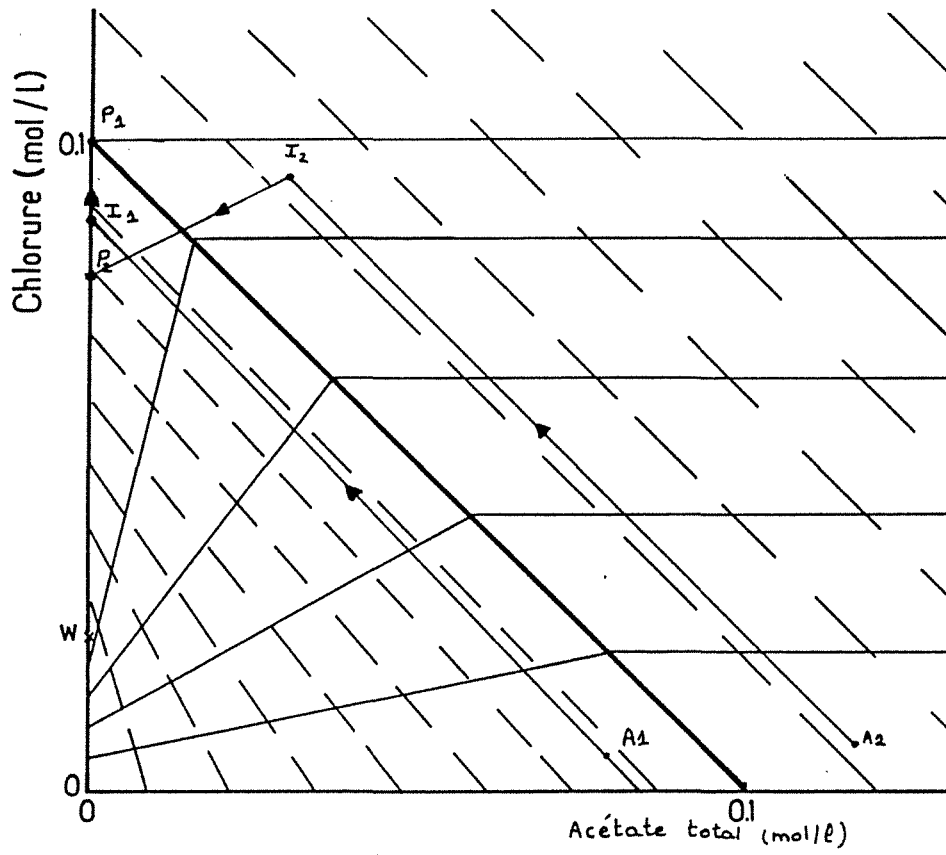


Figure A.3.3.1 : Chemins d'échange A1I1P1 et A2I2P2.

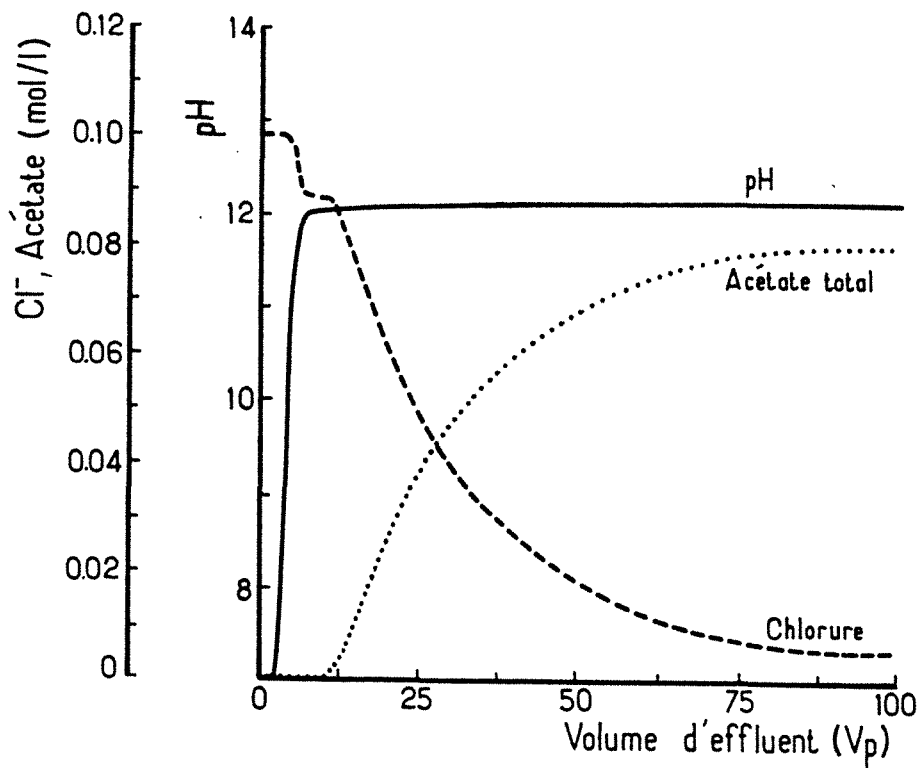


Figure A.3.3.2 : Premier cas : P1I1A1 : Courbes de percées calculées.

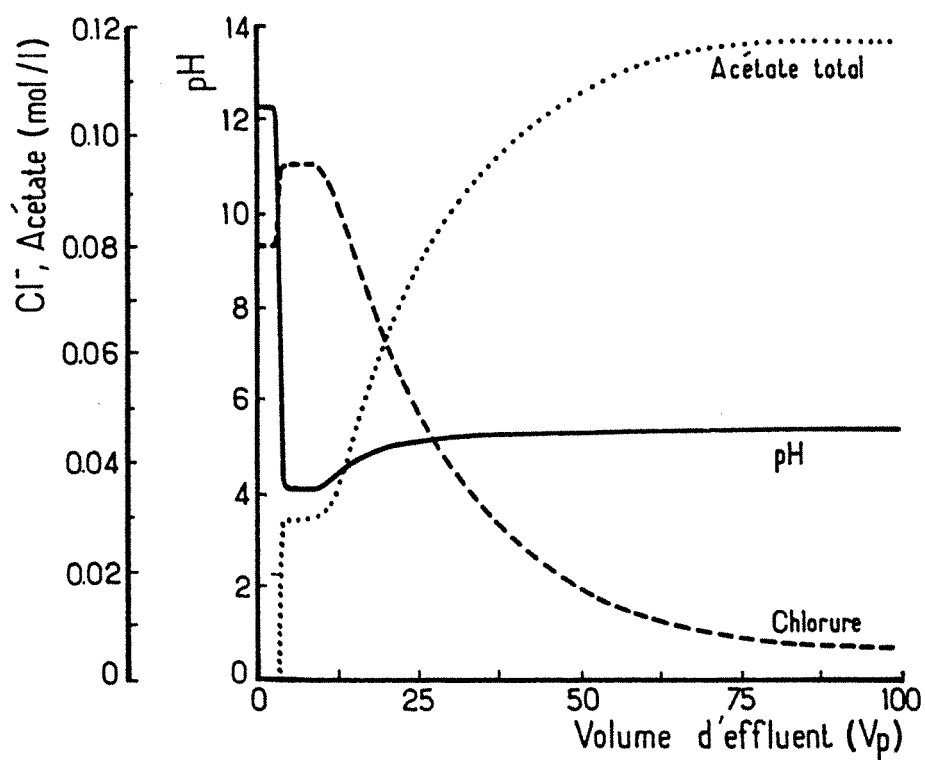


Figure A.3.3.3 : Second cas P2I2A2 : Courbes de percées calculées.

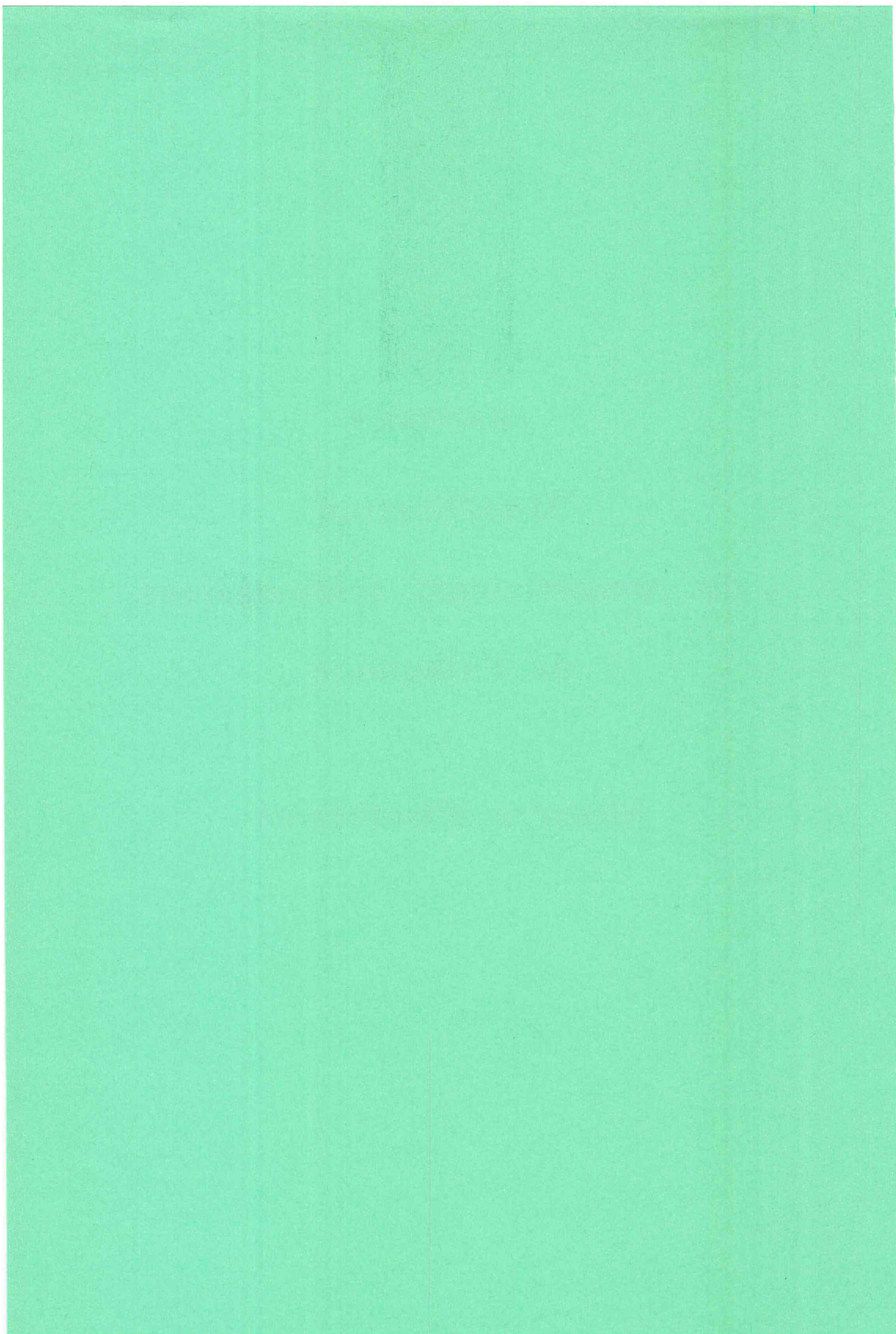
CHAPITRE 4

Modélisation

**du comportement acido-basique
de l'albumine**

-

Mesures d'isothermes



INTRODUCTION

Le présent chapitre est conçu dans un double objectif : avant d'aborder l'étude de l'équilibre entre une protéine et un échangeur d'ions, il est consacré à l'investigation du caractère acido-basique de la protéine en solution aqueuse.

En effet, puisque l'échange d'ions est gouverné par des interactions de nature électrostatique, il importe de bien cerner le comportement de la protéine en tant qu'ion. Autrement dit, on peut poser les questions suivantes :

- qu'est-ce qui détermine la charge électrostatique de la protéine en solution?
- comment évaluer cette charge?

Dans une première partie, nous proposons de traiter ce problème par l'étude du dosage acide-base de la protéine. A partir de l'analyse de courbes expérimentales, nous serons conduits vers l'élaboration d'un modèle simple, permettant de prévoir l'état d'ionisation de la protéine, et par conséquent sa charge nette.

Dans une seconde partie, nous nous intéressons aux interactions "protéine-support", en étudiant l'équilibre d'échange entre la protéine et des anions. Des expériences de mesure d'isothermes effectuées dans différentes conditions ioniques, sur deux supports distincts sont présentées. La manière d'interpréter les résultats est discutée, nous nous demanderons en particulier s'il est opportun d'utiliser un formalisme de type adsorption, et s'il existe une alternative possible.

PREMIERE PARTIE : ETUDE DU COMPORTEMENT ACIDO-BASIQUE DE L'ALBUMINE DU SERUM BOVIN EN SOLUTION

I. PRESENTATION GENERALE DE L'ALBUMINE DU SERUM BOVIN

La protéine choisie pour cette étude est l'albumine du sérum bovin (notée BSA), fréquemment utilisée comme protéine modèle pour des études physiques ou chimiques, car peu fragile, donc relativement simple d'emploi. Nous allons décrire brièvement ses principales propriétés majeures, dont on trouvera une revue dans l'article de PETERS [1985].

Les albumines sont toutes constituées d'une seule chaîne polypeptidique. L'albumine du sérum bovin est composée de 582 résidus d'acides aminés (tableau 4-1), sa structure primaire est donnée en figure 4-1. Sa masse molaire est de $67\,000 \pm 400$ g/mol; cette protéine a la forme d'un ellipsoïde, de dimensions 4.2 x 14.1 nm.

Sa structure tertiaire consiste en trois domaines principaux distincts, (figure 4-2) qui portent des charges nettes différentes, autrement dit la distribution de charge est asymétrique. Au niveau de la structure quaternaire, sa conformation varie selon les conditions en solution, on observe notamment des transitions réversibles pour des pH inférieurs à 4.3 et supérieurs à 8.0. Sa charge électrostatique dépend du pH : son point isoélectrique est de 4.9 (plus exactement il varie entre 4.9 et 5.2 suivant les références), sa charge nette est nulle à ce pH, elle porte une charge nette positive pour des pH inférieurs et négative pour des pH supérieurs.

On peut signaler enfin qu'il s'agit de la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin, où elle a principalement un rôle de dépôt et de transport; elle possède pour cela des sites de liaison spécifiques, sur lesquels les molécules viennent se fixer [KRAGH-HANSEN 1981].

II. DETERMINATION DE LA CHARGE ELECTROSTATIQUE D'UNE PROTEINE

II-1 Charge électrostatique d'une protéine

La charge électrostatique d'une protéine est due principalement à ceux de ses acides aminés qui portent des groupes acides ou basiques sur des chaînes latérales; en effet, les

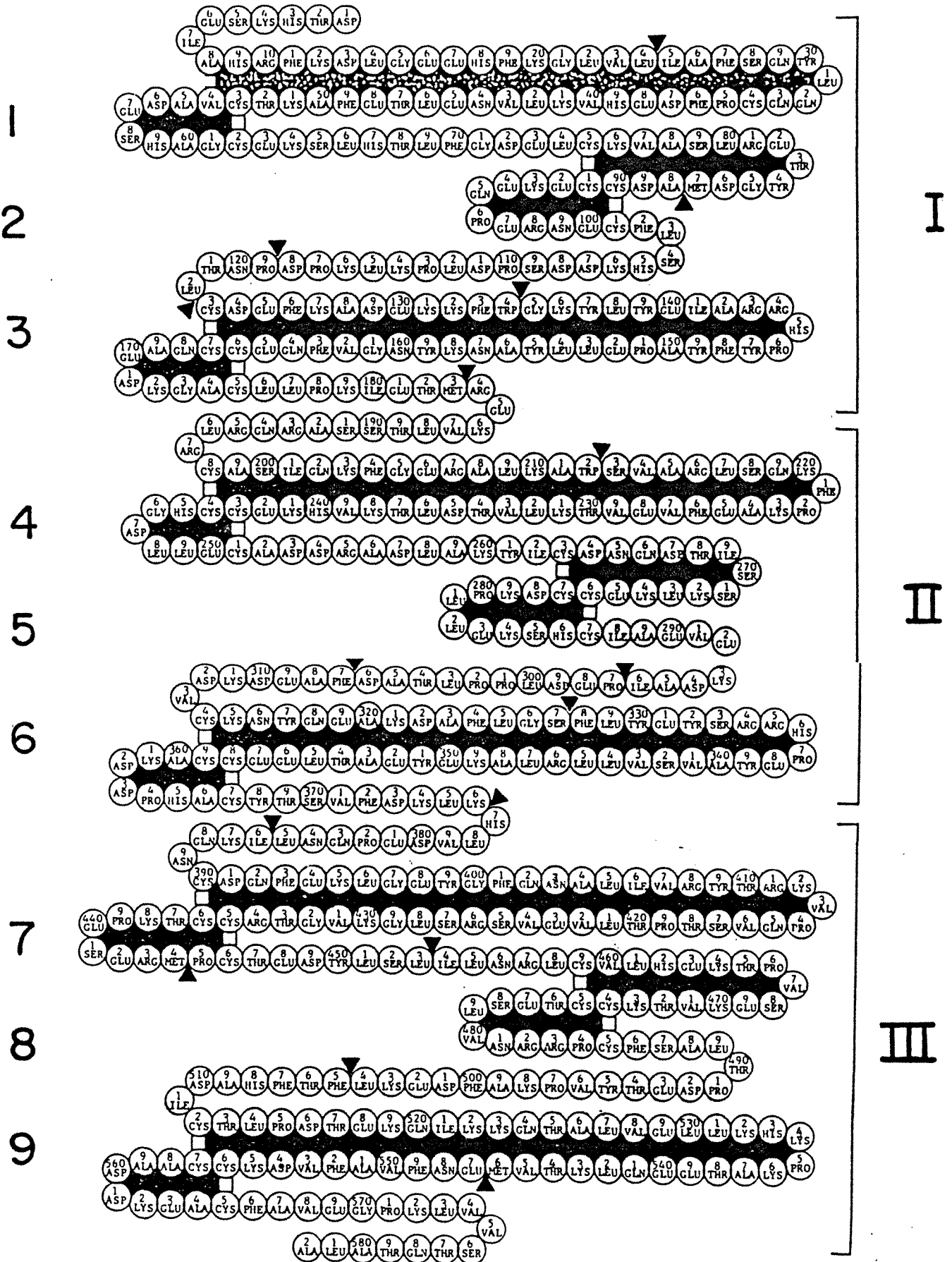


Figure 4-1 : Structure primaire de l'albumine du sérum bovin (d'après PETERS, 1985).

Amino acid	Bovine	Human	Rat
Aspartic acid	41	36	32
Asparagine	13	17	20
Threonine	34	28	33
Serine	28	24	24
Glutamic acid	59	62	57
Glutamine	20	20	25
Proline	28	24	30
Glycine	16	12	17
Alanine	46	62	61
Valine	36	41	35
L-Cystine	35	35	35
Methionine	4	6	6
Isoleucine	14	8	13
Leucine	61	61	56
Tyrosine	19	18	21
Phenylalanine	27	31	26
Lysine	59	59	53
Histidine	17	16	15
Tryptophan	2	1	1
Arginine	23	24	24
Total	582	585	584
Number of nitrogen atoms	779	786	785
Calculated net charge, pH 7	-18	-15	-12
Average residue weight	113.86	113.57	112.79

Tableau 4-1 : Composition de l'albumine du sérum bovin (d'après PETERS, 1985).

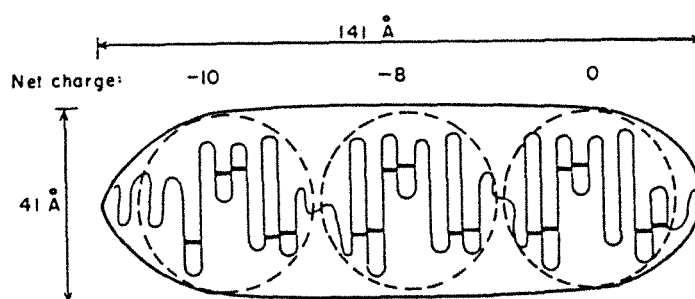


Figure 4-2 : Structure tertiaire de l'albumine du sérum bovin (d'après PETERS, 1985).

groupes carboxyles ou amines terminaux sont impliqués dans la liaison peptidique et ne contribuent pas à la charge, à l'exception de ceux qui se trouvent à l'extrémité des chaînes.

D'une manière générale, on peut partager les groupements acides en deux catégories :

- les acides non chargés, comme les carboxyles, qui sont électriquement neutres en solution fortement acide, dont la base conjuguée est chargée négativement. On symbolisera ces couples acide-base par SH/S^- .
- les acides cationiques, comme les imidazoles ou les amines, qui portent une charge nette positive en solution très acide, et dont la base conjuguée est neutre; on désignera ces couples par SH^+/S .

D'après la composition en acides aminés d'une protéine, on peut distinguer les groupes titrables suivants :

- carboxyles ($\text{S}_1\text{H}/\text{S}_1^-$) : on trouve peu d' α carboxyles à part ceux des extrémités de chaîne, mais surtout des β et γ carboxyles des chaînes latérales, provenant des résidus aspartiques et glutamiques
 - imidazoles ($\text{S}_2\text{H}^+/\text{S}_2$) : provenant de l'histidine
 - amines ($\text{S}_3\text{H}^+/\text{S}_3$) : amines α à l'extrémité des chaînes, amines ϵ provenant de la lysine
 - phénols ($\text{S}_4\text{H}/\text{S}_4^-$) : provenant de la tyrosine
 - guanidines ($\text{S}_5\text{H}^+/\text{S}_5$) : provenant de l'arginine
- et quelques sulfhydryles.

Dans une solution fortement acide, la protéine porte sa charge positive maximale. Si elle contient n groupes acides cationiques, cette charge vaut $+n$; si n protons sont retirés par ajout de base, la charge nette (différence entre le nombre de charges positives et négatives) s'annule, le pH alors atteint est défini comme le point isoionique, qui correspond au point isoélectrique à condition que la protéine ne fixe pas d'autres ions que le proton.

Pour l'albumine, on considèrera que ces points sont confondus, donc que la charge est déterminée par le pH de la solution, et peut être obtenue par dosage acide-base.

II-2 Dosage acide-base des protéines

En dépit de l'existence de méthodes d'analyse très sophistiquées, la technique du dosage acide-base est encore fréquemment employée. En effet, les courbes de dosage permettent non seulement d'évaluer la charge électrostatique de la protéine, mais constituent également une source d'informations d'ordre structural et fonctionnel. A partir de ces courbes, on peut notamment extraire des données sur le nombre de groupements donneurs-accepteurs de

protons, leur constante d'ionisation, les éventuels changements de conformation etc. [VAN OS et coll. 1972].

II-2.1 Méthodes expérimentales

- La méthode la plus courante consiste à effectuer un dosage acide-base classique, dans l'eau, à partir d'une solution de protéine isoionique, c'est à dire en équilibre avec les ions provenant de la dissociation du solvant, les autres ions éventuellement présents ayant été éliminés par échange d'ions ou par dialyse. Le dosage peut être mené à partir d'une seule solution à laquelle on ajoute successivement des quantités connues d'acide ou de base, ou bien à partir de plusieurs solutions auxquelles on ajoute une quantité différente d'acide ou de base, chaque point de la courbe de dosage représente alors une expérience distincte [TANFORD 1955 article]. Ce dernier protocole permet d'ajuster la valeur de la force ionique, afin de la garder constante.

- On peut aussi chercher à identifier la contribution d'un certain type de groupements en ajoutant un solvant spécifique, comme l'alcool ou le dioxane [EDSALL 1965, SUN 1970] ou en inactivant certains groupes par traitement chimique [EDSALL 1965]. Il existe enfin des méthodes destinées à mesurer uniquement le nombre de groupements d'un type donné, par exemple les résidus de lysine [MOLNAR-PERL 1987].

II-2.2 Interprétation des courbes de dosage

Dans l'ouvrage de TANFORD [1961] se trouve un traitement détaillé de la théorie générale des équilibres multiples, c'est à dire de l'étude de l'association réversible des petites molécules ou des ions et des macromolécules. Celle-ci est décrite en termes de constantes de dissociation, et différentes hypothèses sont envisagées concernant notamment la nature des sites de liaison (ils peuvent par exemple être identiques entre eux ou non, interagir ou non etc.). Dans l'ensemble, il s'agit d'une étude d'ordre microscopique, traitée par une approche de type statistique [EDSALL 1965]. Elle est appliquée aux courbes de dosage acide-base des polyélectrolytes, en particulier aux protéines.

Dans ce qui suit, nous allons présenter la méthode de construction et d'interprétation des courbes de dosage acide-base des protéines [TANFORD 1955 I] et son application à la BSA.

** Méthode de Tanford : démarche expérimentale et construction des courbes*

Les courbes sont obtenues à partir de solutions de BSA isoioniques, en effectuant une expérience distincte pour chaque point de dosage, en gardant la force ionique constante et en mesurant uniquement le pH¹.

Les courbes représentent en fonction du pH le nombre de protons liés par mole de BSA, c'est à dire la quantité d'ions H⁺ ou OH⁻ ajoutée, diminuée de la quantité mesurée en solution².

En raison de l'éventualité de changements de conformation irréversibles, il est nécessaire de tester la réversibilité afin de vérifier que la courbe représente bien un équilibre thermodynamique. Les courbes obtenues avec la BSA sont réversibles, en tout cas sur le domaine de pH de 2 à 12, ceci n'est pas nécessairement vrai pour toutes les protéines. Un exemple de courbe de dosage de l'albumine bovine est donné en figure 4-3.

** Interprétation*

Pour expliquer les courbes de dosage, on pourrait considérer la protéine comme un polyacide, PH_n avec n équilibres de dissociation successifs $PH_n = PH_{n-1}^- + H^+$. Mais ceci aurait l'inconvénient de faire intervenir n constantes d'équilibre, que l'on ne sait pas déterminer.

L'approche adoptée consiste à supposer qu'il existe un certain nombre de groupes fonctionnels, et que les sites susceptibles de fixer un proton sont identiques entre eux à l'intérieur de chaque groupe : la courbe de dosage est alors interprétée comme la superposition de plusieurs portions de courbes, correspondant chacune au dosage d'un type de groupements, en tenant compte toutefois de l'existence d'une interaction électrostatique. Ces types de groupements sont présentés au paragraphe II-1, il s'agit essentiellement des carboxyles, imidazoles, amines, phénols et guanidines. (Voir traitement détaillé en Annexe 4-1).

De cette manière, l'auteur interprète simplement les courbes de dosage des protéines, en particulier celle de la BSA, avec toutefois l'inconvénient de représenter le dosage "par morceaux", et non dans son ensemble. Dans ce qui suit, nous allons établir un modèle de

¹ On montre qu'une variation de la force ionique sur les courbes de dosage se traduit par un effet de rotation des courbes autour du point isoélectrique [EDSALL 1965].

² Pour convertir le pH mesuré en molalité de protons, l'auteur suppose que l'activité de l'ion H⁺ dans une solution donnée de protéine est identique à celle qu'il aurait dans une solution de mêmes pH et force ionique sans protéine, ce qui revient à considérer que les ions H⁺ dont on mesure l'activité se trouvent effectivement en solution, et non associés à la protéine. L'auteur justifie ces hypothèses en affirmant qu'une protéine de charge Z ne peut pas contribuer à la force ionique de la même façon qu'un ion de valence Z à cause de la distribution espacée des charges. A partir de la corrélation établie entre pH et molalité en ions H⁺, le nombre de protons liés par mole de BSA peut être calculé.

représentation du comportement acido-basique de l'albumine du sérum bovin, valable sur la totalité du dosage.

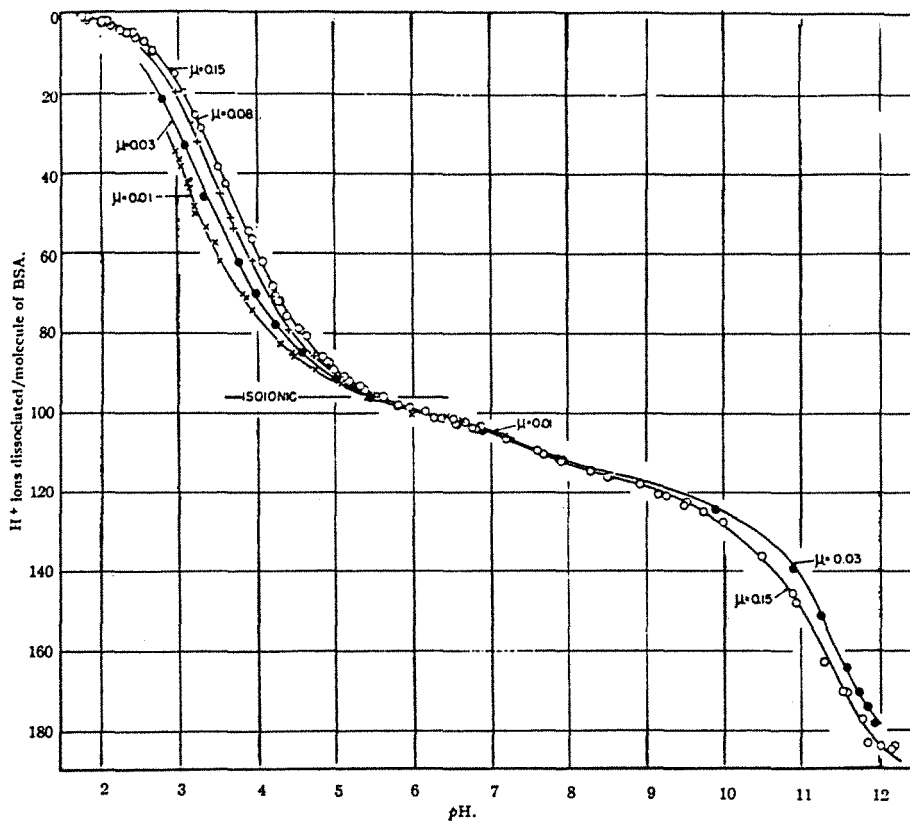


Figure 4-3 : Exemple de courbe de dosage de l'albumine du sérum bovin (d'après Tanford, 1955).

III. EXPERIENCES DE DOSAGE DE LA BSA ET MODELISATION

III-1 Expériences

Nous avons effectué deux séries de dosage, la première à titre exploratoire - nous avons mesuré uniquement le pH-, tandis que pour la seconde nous avons également suivi les concentrations des autres ions présents.

Pour tous les dosages, nous avons travaillé à partir d'albumine dissoute dans l'eau, sans chercher à rendre la solution isoionique. Or, lorsque l'on dissout la BSA dans l'eau, la solution est à un pH de l'ordre de 6.8 et contient, outre les ions provenant de la dissociation de l'eau, des ions chlorure et sodium¹ que nous supposons non liés à la protéine².

Selon cette hypothèse, lorsque la BSA porte une charge nette moyenne Z (positive ou négative), l'électroneutralité s'écrit :

$$(H^+) + (Na^+) - (OH^-) - (Cl^-) + Z (BSA) = 0 \quad (5)$$

Si toutes les concentrations sont connues, on peut d'après ce bilan calculer la charge nette moyenne de l'albumine. Il n'est donc pas indispensable de rendre la solution isoionique pour effectuer un dosage.

L'albumine dissoute dans l'eau est amenée à pH basique par ajouts de soude de normalité connue, titrée par l'acide chlorhydrique, éventuellement un dosage retour par la soude est effectué. On veille à ce que l'équilibre soit atteint en chaque point, c'est à dire que le signal de pH soit stable. Si on souhaite mesurer les concentrations en chlorure et sodium, on procède à des prélèvements de volume connu, une dizaine environ au cours de l'expérience. Les conditions expérimentales sont données dans le tableau 4-2. Des exemple de courbe de dosage seront données en figure 4-5.

On remarque que la courbe est relativement "lisse", c'est à dire qu'on ne distingue pas de point d'inflexion marqué, du moins pour le domaine de pH balayé, ce qui correspond bien à l'allure générale observée par TANFORD [1955]. On note aussi au cours des expériences que les concentrations en chlorure et en sodium évoluent uniquement sous l'effet de la dilution, il semble donc bien que ces ions interviennent en tant qu'inertes réactionnels.

¹ On observe un excès d'ions sodium par rapport au chlorure. Nous supposons qu'il y a peu de chlorure de sodium résiduel (moins de 1 meq/l), et que les ions sodium en excès compensent la charge de l'albumine, négative à ce pH.

² En effet, d'après DOHERTY P. et BENEDEK G.B. [1974], on peut considérer que pour une force ionique faible, moins de un ion chlorure ou sodium est fixé par mole de BSA.

Dosage	A	B	C	D	E	F
conditions initiales						
C BSA g/l	33.56	9.92	9.55	9.94	9.56	34.02
pH	10.10	10.05	2.76	10.06	2.60	6.60
(Na ⁺) méq/l	12.8	5.34	5.14	4.45	4.28	5.21
(Cl ⁻) méq/l	0.181	0.207	18.8	0.208	19.3	0.215
vol. total, ml	84	100	104	100	100	
titrant	HCl	HCl	NaOH	HCl	NaOH	HCl
normalité, éq/l	0.10	0.50	0.46	0.50	0.47	
vol. ajouté, ml	28.5	3.9	5.8	4.0	5.1	10.0

Tableau 4-2 : Conditions expérimentales.

III-2 Modélisation des courbes de dosage

III-2.1 Modèle de l'albumine, au niveau acido-basique

Avant de connaître les publications concernant l'interprétation des courbes de dosage acide-base des protéines, nous avons cherché à représenter l'albumine le plus simplement possible, par un mélange de deux types de couples acide-base, de la forme S_1H/S_1^- et S_2H^+/S_2 . Ce modèle s'est avéré incorrect, en particulier il ne permettait pas de retrouver des valeurs de la charge de la protéine connues pour différentes conditions en solution (équation 5).

Nous avons alors décidé de construire un modèle basé sur la composition de la protéine en sites ionisables, dans le même esprit que l'approche de Tanford. Ce modèle consiste à représenter l'albumine par un mélange d'espèces ionisables en solution (tableau 4-3), avec pour chaque espèce des sites identiques et indépendants. Cette représentation très simplifiée n'indique pas que les sites ionisables appartiennent à une même molécule avec une topologie fixée. Elle ne prétend pas rendre compte du comportement global de la protéine en solution, elle est uniquement destinée à déterminer son état d'ionisation, et nous allons montrer qu'elle permet de calculer des courbes de dosage acide-base très proche des courbes expérimentales.

Type de groupements	nombre de sites par mol de BSA	symbole	ordre de grandeur du pK (Tanford)	pK des petits ions correspondants
carboxyle	99	S_1H/S_1^-	3.9-4.0	4.6
imidazole	17	S_2H^+/S_2	6.9	7.0
amines	59	S_3H^+/S_3	9.8	10.1-10.6
phénol	19	S_4H/S_4^-	10.35	9.6
guanidine	23	S_5H^+/S_5	>12	>13
sulfhydryle	0	/	/	/

Tableau 4-3 : composition de la BSA en espèces ionisables (d'après PETERS [1985])

D'après le tableau 4-3, on peut remarquer que dans un milieu très acide où aucun site ne serait dissocié, la molécule de BSA aurait sa charge positive maximale, qui correspondrait à la somme des sites de type SH^+/S , soit 99; tandis que dans un milieu très basique où tous les sites seraient dissociés, la charge négative maximale correspondrait à la somme des sites SH/S^- , soit -118. Ce deuxième cas est hypothétique, car étant donné l'ordre de grandeur des constantes de dissociation des derniers sites, ceux-ci ne se trouvent jamais complètement dissociés dans les domaines de pH usuels. On peut aussi noter que la molécule est globalement neutre lorsque les sites S_1H/S_1^- sont totalement dissociés. Nous proposons le schéma réactionnel suivant :

Schéma réactionnel :

On considère qu'une solution d'albumine dans l'eau contient les espèces suivantes : H^+ , OH^- , Na^+ , Cl^- , S_1H , S_1^- , S_2H^+ , S_2 , S_3H^+ , S_3 , S_4H , S_4^- , S_5H^+ , S_5 .

Le schéma réactionnel s'écrit :



$$S_3H^+ = S_3 + H^+ \quad \text{associées} \quad K3 = \frac{(H^+) (S_3)}{(S_3H^+)} \quad (9)$$

$$S_4H = S_4^- + H^+ \quad K4 = \frac{(H^+) (S_4^-)}{(S_4H)} \quad (10)$$

$$S_5H^+ = S_5 + H^+ \quad K5 = \frac{(H^+) (S_5)}{(S_5H^+)} \quad (11)$$

Electroneutralité :

$$(Na^+) + (H^+) + (S_2H^+) + (S_3H^+) + (S_5H^+) = (Cl^-) + (OH^-) + (S_1^-) + (S_4^-) \quad (12)$$

Conservation de chaque type de site :

$$(S_1H) + (S_1^-) = C_1 = 99 \text{ (BSA)} \quad (13)$$

$$(S_2H^+) + (S_2) = C_2 = 17 \text{ (BSA)} \quad (14)$$

$$(S_3H^+) + (S_3) = C_3 = 59 \text{ (BSA)} \quad (15)$$

$$(S_4H) + (S_4^-) = C_4 = 19 \text{ (BSA)} \quad (16)$$

$$(S_5H^+) + (S_5) = C_5 = 23 \text{ (BSA)} \quad (17)$$

Toutes les concentrations sont exprimées en moles par litre.

Se pose alors le problème suivant : on ne connaît pas les valeurs des constantes K_i ($1 \leq i \leq 5$) , mais seulement un ordre de grandeur, d'après TANFORD (Tableau 4-3). Nous nous proposons de déterminer les valeurs de ces constantes par optimisation, à partir de nos points expérimentaux.

III-2.2 Détermination des paramètres

On dispose d'un certain nombre de points de dosage pour lesquels on connaît, avec plus ou moins de précision les concentrations en albumine, sodium, chlorure et le pH. On utilise alors le programme BSA1 [M. BAILLY], qui pour chaque dosage, lit dans un fichier de données les valeurs des concentrations en albumine, sodium et chlorure, et permet :

- de calculer le pH et donc l'état de dissociation des sites pour un ensemble de constantes données,
- ou de déterminer les valeurs des constantes.

Calcul du pH :

Le pH est calculé à partir de l'équation d'électroneutralité (12). Pour cela, on définit l'écart à l'électroneutralité E comme la différence entre les deux termes de l'équation (12). L'expression de E (équation 18) se déduit des équations (6) à (17) :

$$E = (Na^+) - (Cl^-) + (H^+) - \frac{Ke}{(H^+)} + (BSA) \left[\frac{- 99 K1}{K1 + (H^+)} + \frac{17 (H^+)}{K2 + (H^+)} + \frac{59 (H^+)}{K3 + (H^+)} - \frac{- 19 K4}{K4 + (H^+)} + \frac{23 (H^+)}{K5 + (H^+)} \right]$$

(18)

Pour un ensemble de valeurs de constantes, le pH et par conséquent l'état de dissociation des sites sont calculés en assurant l'électroneutralité de la solution en chaque point. Ceci revient à minimiser E, par rapport à la variable (H⁺), ce qui est fait par une méthode de Newton-Raphson [rtsafe, VETTERLING et coll. 1988].

Détermination des constantes :

Elle est réalisée par une méthode d'optimisation multivariable avec contraintes [flexiplex, HIMMELBLAU, 1972]. La fonction objectif à minimiser est constituée de la somme des carrés des écarts entre le pH expérimental et le pH calculé en chaque point du dosage. On peut optimiser une constante seule ou plusieurs simultanément, en imposant à chacune une valeur minimale et une valeur maximale (contraintes inégalités).

III-2.3 Résultats

Courbes de dosage :

Pour chaque dosage (Tableau 4-2), nous avons optimisé simultanément les deux premières constantes d'une part, les trois dernières d'autre part, en imposant les contraintes données dans le tableau 4-4.

K	min.	max.
1	1 10 ⁻⁵	1 10 ⁻³
2	1 10 ⁻⁸	1 10 ⁻⁶
3	1 10 ⁻¹⁴	1 10 ⁻⁹
4	1 10 ⁻¹⁴	1 10 ⁻⁹
5	1 10 ⁻¹⁴	1 10 ⁻⁹

Tableau 4-4 : Bornes inférieure et supérieure imposées aux constantes Ki (mol/l)

Les résultats de l'optimisation sont présentés dans le tableau 4-5, et deux exemples de courbes (dosages C et D) en figure 4-5.

Dosage	K1 (mol/l)	K2 (mol/l)	K3 (mol/l)	K4 (mol/l)	K5 (mol/l)
A	$3.76 \cdot 10^{-4}$	$2.50 \cdot 10^{-7}$	$1.00 \cdot 10^{-14}$	$1.20 \cdot 10^{-10}$	$1.00 \cdot 10^{-14}$
B	$2.12 \cdot 10^{-4}$	$2.66 \cdot 10^{-7}$	$1.96 \cdot 10^{-13}$	$5.06 \cdot 10^{-10}$	$1.93 \cdot 10^{-13}$
C	$1.87 \cdot 10^{-4}$	$2.10 \cdot 10^{-7}$	$4.92 \cdot 10^{-12}$	$4.92 \cdot 10^{-12}$	$4.96 \cdot 10^{-10}$
D	$3.69 \cdot 10^{-4}$	$3.04 \cdot 10^{-7}$	$1.00 \cdot 10^{-14}$	$2.60 \cdot 10^{-10}$	$1.00 \cdot 10^{-14}$
E	$2.77 \cdot 10^{-4}$	$9.32 \cdot 10^{-8}$	$1.25 \cdot 10^{-12}$	$1.25 \cdot 10^{-12}$	$1.38 \cdot 10^{-10}$
F	$3.95 \cdot 10^{-4}$	$5.44 \cdot 10^{-7}$	/	/	/

Tableau 4-5 : Résultats de l'optimisation des constantes.

En faisant varier chaque constante "à la main", nous avons remarqué que **K1 et K2** étaient celles qui permettaient d'assurer une bonne représentation des courbes entre pH 3 et 8, c'est à dire dans le domaine qui nous intéresse le plus. Ceci est confirmé par les résultats donnés dans le tableau 4-5 : on obtient pour K1 et K2 des valeurs cohérentes entre elles, tandis que pour K3, K4 et K5, les valeurs sont plus aléatoires. Etant donné l'ordre de grandeur de ces dernières, il aurait fallu disposer d'un plus grand nombre de points expérimentaux pour les calculer avec précision, mais ce n'est pas essentiel pour nous.

En changeant manuellement les valeurs des constantes, on s'aperçoit que :

- une modification de K1 ou K2 a une influence sur la courbe dans le domaine couvert par les deux constantes (pH 3-8 environ), ce qui indique que K1 et K2 ne sont pas indépendantes ; K1 est plus "sensible" que K2 (une modification de $\pm 1.0 \cdot 10^{-7}$ mol/l (environ 30%) sur K2 ne se voit pratiquement pas, alors qu'une modification de $\pm 1.0 \cdot 10^{-4}$ mol/l sur K1 (environ 30%) déplace un peu la courbe.)
- si on fait varier K3 et K5, il ne se passe rien tant que leurs valeurs restent inférieures à $1.0 \cdot 10^{-11}$ mol/l,
- la valeur de K4 par contre a une influence plus marquée sur la forme de la courbe.

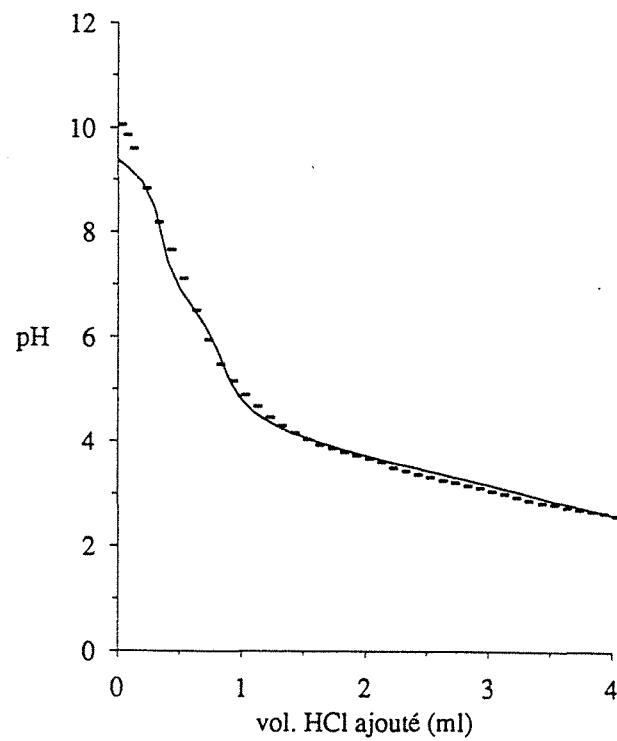
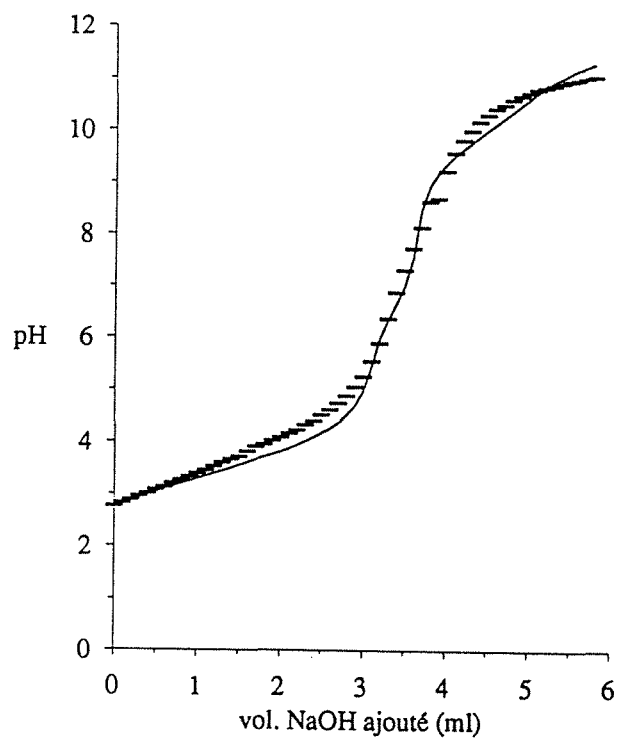


Figure 4-5 : Exemples de courbes de dosage expérimentales et simulées.

En conclusion, il nous semble raisonnable de prendre pour les constantes les moyennes des valeurs obtenues par optimisation (sachant que pour K3 à K5 ces valeurs n'ont pas grande signification).

$$K1 = 3.03 \cdot 10^{-4} (\pm 1 \cdot 10^{-4}) \text{ mol/l}$$

$$K2 = 2.78 \cdot 10^{-7} (\pm 1 \cdot 10^{-7}) \text{ mol/l}$$

$$(K3 = 1.3 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l})$$

$$(K4 = 1.8 \cdot 10^{-10} \text{ mol/l})$$

$$(K5 = 1.3 \cdot 10^{-10} \text{ mol/l})$$

Deux courbes tracées avec ces valeurs (dosages C et D) sont données en figure 4-5.

On voit qu'une représentation correcte est assurée, surtout dans le domaine de pH compris entre 3 et 8.5.

Charge nette de la protéine en fonction du pH :

A partir des calculs précédents, on peut représenter pour chaque dosage les variations de la charge nette en fonction du pH. Deux exemples sont présentés en figure 4-6 (dosages C et D).

Dans l'ensemble, ces courbes donnent une tendance correcte de la variation de la charge avec le pH, à une restriction près : Z ne s'annule pas à pH 4.9 (point isoélectrique de l'albumine). Ceci peut être provoqué par la présence d'ions chlorure et sodium (équation 12), ou bien cela peut être un effet des paramètres du modèle. Pour le savoir, on calcule à l'aide du programme le pH d'une solution d'albumine en équilibre avec les ions provenant de la dissolution de l'eau (sans chlorure ni sodium). On trouve un pH de 5.4, ce qui est cohérent avec les valeurs lues sur les courbes Z vs pH.

Par quels paramètres ce pH est-il déterminé ?

Dans l'équation qui indique que la charge s'annule pour un certain pH, interviennent K1 et K2 ainsi que les nombres de sites de chaque type (carboxyle, imidazole etc.), soit en tout sept paramètres. On montre qu'une légère modification d'un nombre de sites déplace nettement le pH auquel la charge s'annule (il suffit d'ajouter 2 carboxyles par mole d'albumine, soit environ 2%, pour amener ce pH à 4.9). En réalité, vu le nombre de paramètres on peut très bien arriver à ce que l'on veut !

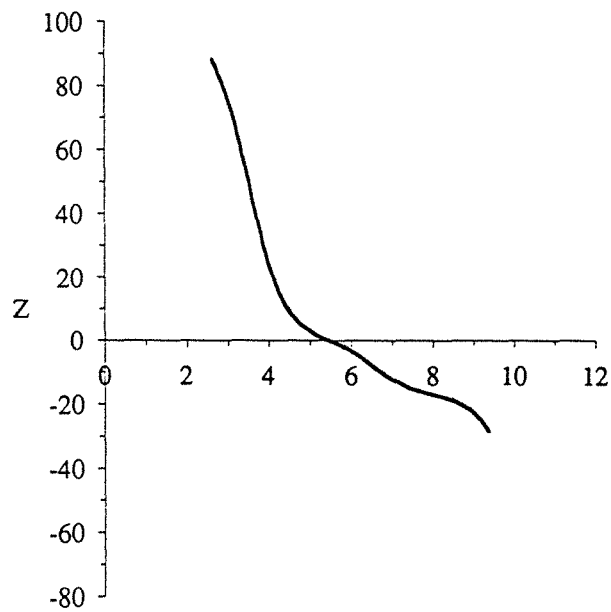
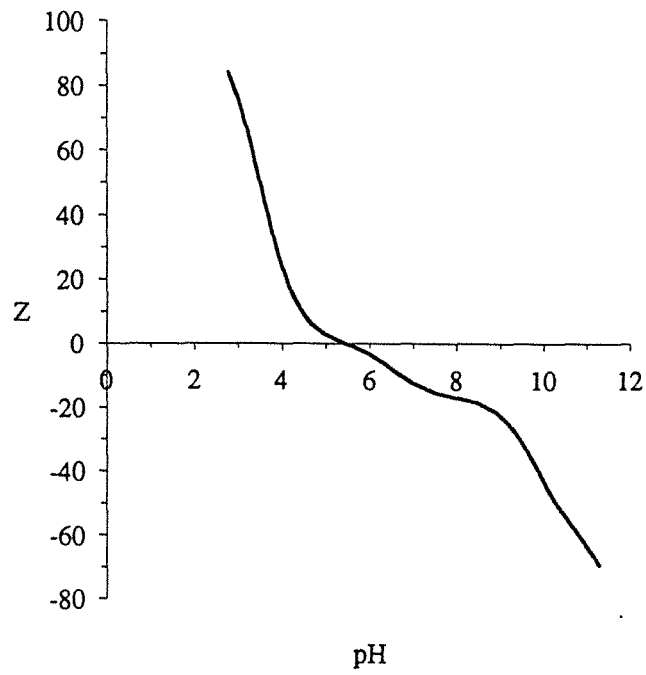


Figure 4-6 : variation de la charge en fonction du pH calculées pour les dosages

Par conséquent, nous supposerons qu'il n'y a pas d'incertitude sur les nombres de sites. Dans cette hypothèse, étant donné que le modèle (avec les constantes déterminées) permet de calculer les courbes de dosage (ainsi que d'autres points expérimentaux), nous ne chercherons pas à le modifier, même si la charge nette s'annule pour un pH un peu supérieur à 4.9 . D'ailleurs certaines références donnent 5.2 comme valeur du point isoélectrique, ce qui n'est pas très éloigné de nos résultats.

CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons proposé une représentation du comportement acido-basique de l'albumine en solution. Pour cela, des dosages acide-base ont été effectués et un modèle simple a été élaboré : il consiste à considérer l'albumine comme un mélange d'espèces ionisables, chacune comportant des sites identiques et indépendants. Les constantes de dissociation ont été déterminées par optimisation.

A l'aide de ce modèle, les courbes de dosage ont été calculées, et on constate un bon accord entre l'expérience et le calcul, en particulier entre pH 2.5 et 8.5. Si cette représentation ne prétend pas refléter la globalité du comportement de l'albumine en solution, elle permet néanmoins de calculer son état d'ionisation, ainsi que sa charge nette. Ces deux informations devront nous aider à progresser dans la compréhension des mécanismes intervenant dans le processus d'échange d'ions.

SECONDE PARTIE : ETUDE DE L'EQUILIBRE ENTRE L'ALBUMINE DU SERUM BOVIN ET DEUX ECHANGEURS D'ANIONS

L'équilibre entre une protéine et un solide échangeur d'ions implique la contribution simultanée de plusieurs phénomènes couplés, à savoir l'échange protéine-ion proprement dit, l'échange entre ions si plusieurs espèces ioniques sont présentes, les réactions de dissociation dans chacune des phases. En raison de cette complexité, l'équilibre d'échange est le plus souvent représenté par un modèle global "d'adsorption", et décrit par des isothermes de Langmuir.

Nous allons dans un premier temps présenter les hypothèses de ce modèle, ainsi que son utilisation et ses limites dans le cas de l'équilibre entre une protéine et un échangeur d'ions. Nous regarderons ensuite s'il est possible d'établir un lien entre adsorption et échange d'ions. Enfin, après un aperçu des méthodes expérimentales, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus avec la BSA dans différentes conditions.

I. REPRESENTATION DE L'EQUILIBRE D'ECHANGE D'IONS METTANT EN JEU UNE PROTEINE

I-1 Les modèles d'adsorption

Nous n'allons pas procéder ici à l'inventaire des travaux sur l'adsorption, nous mentionnerons simplement l'ouvrage de RUTHVEN [1984], qui constitue une bonne référence en ce qui concerne les principes généraux. Nous citerons également un article [COWAN et coll. 1989] qui propose une revue des récentes publications où il est question de la modélisation de l'adsorption mono et multiconstituant, ainsi que des dernières techniques de mesure d'isothermes (HPLC, microcolonnes etc.). Cette présentation d'ordre tout à fait général, évoque d'abord le problème de l'adsorption de gaz, avant de se focaliser sur l'adsorption de protéine.

Dans ce dernier cas, on remarque que l'équilibre atteint à l'interface solide-liquide, pour un système "monoconstituant"¹ (une seule protéine), est représenté le plus souvent à l'aide du **modèle de Langmuir**. A l'origine, ce modèle a été construit pour décrire l'adsorption de gaz, mais il peut s'appliquer à l'adsorption liquide-solide en solution diluée [ANDRADE, 1985]. Les hypothèses sont les suivantes :

¹ Le terme "monoconstituant" n'est pas très bien adapté, car en présence d'ions de charge de même signe que la protéine, celle-ci n'est pas le seul "constituant adsorbable".

- une seule molécule peut être adsorbée par site (adsorption monocouche),
- il n'existe qu'un seul type de sites (surface homogène), identiques et indépendants,
- les molécules adsorbées n'interagissent pas,
- il n'y a qu'une seule espèce adsorbable (pas d'adsorption compétitive),
- le nombre de sites est fini,
- la solution est diluée,
- l'adsorption est réversible.

On peut alors écrire :

$$q^* = \frac{nKc^*}{1 + Kc^*} \quad (19)$$

où q^* : quantité de soluté adsorbé (ex. g de protéine/ g support sec)
 c^* : quantité de soluté en solution (ex. g de protéine/l de solution)
 * signifie "à l'équilibre"

les unités de n et K dépendent de celles employées pour q^* et c^* , l'unité de n est la même que celle de q^* , celle de K est l'inverse de c^* .

Cet équilibre est représenté par une courbe de la forme de celle de la figure 4-7.

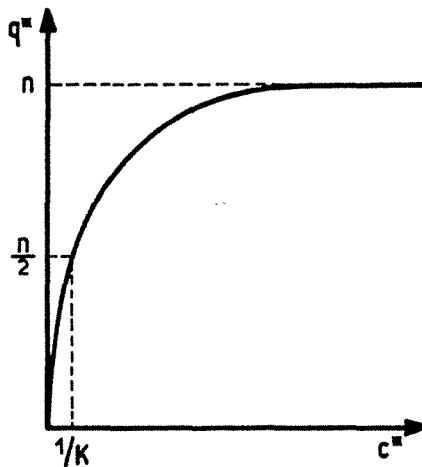


Figure 4-7 : Isotherme de Langmuir.

On constate immédiatement que :

$$\lim_{c^* \rightarrow \infty} q^* = n \quad (20)$$

Le paramètre n représente la capacité d'adsorption maximale.

$$\frac{dq^*}{dc^*} = \frac{nK}{(1+Kc^*)^2} \rightarrow nK \quad (21)$$

$$c^* \rightarrow 0$$

La valeur de K caractérise la pente de l'isotherme à l'origine (ce que l'on peut exprimer aussi en notant que lorsque $q^* = \frac{n}{2}$, $c^* = \frac{1}{K}$; plus la valeur de K est élevée, plus la valeur de c^* correspondant à la demi-saturation est faible, donc plus la valeur de la pente à l'origine est élevée).

Ce modèle est donc fréquemment utilisé pour décrire l'adsorption d'une protéine sur un échangeur d'ions (tableau 4-6). C'est vrai aussi pour les acides aminés [GOSLING et coll. 1989 ; DYE et coll. 1990]. Pourtant, les hypothèses de Langmuir ne sont manifestement pas respectées dans ce cas, même si la solution ne contient qu'une seule protéine, puisque :

- il y a compétition entre la protéine et les ions présents en solution pour les sites d'échange,
- la protéine n'est pas fixée sur un seul site, mais sur plusieurs (cf chapitre suivant),
- l'adsorption n'est pas toujours parfaitement réversible [ANDRADE et coll. 1985],
- des interactions peuvent exister entre les molécules adsorbées.

La question de la réversibilité est très importante. Elle a été étudiée notamment par SODERQUIST [1980], ANDRADE [1985] et NORDE [1986]. Ils ont conclu que des changements de conformation pouvaient se produire pour les protéines adsorbées, et que la réversibilité du processus dépendait du temps de séjour : plus celui-ci augmente, moins la réversibilité est probable (pour devenir totalement improbable pour des temps très longs). Cela dépend évidemment de la protéine et des conditions d'adsorption (type de surface, d'interaction, environnement physicochimique etc.).

Par conséquent, on ne se trouve pas dans le domaine d'utilisation du modèle de Langmuir. Bien entendu, on peut quand même adopter ce modèle pour décrire des résultats expérimentaux. Il s'agit alors seulement d'utiliser cette équation comme une loi empirique servant à présenter des résultats, de même que l'on pourrait employer un polynôme ou un autre formalisme, étant donné l'absence de lien entre la nature de l'équation et sa signification physique. Le point clé ici est l'absence de caractère prédictif : la connaissance d'une courbe, c'est à dire d'un ensemble de données correspondant à un ensemble de conditions physicochimiques (nature des ions présents, force ionique, pH, température etc.) ne permet pas de déduire les données correspondant à d'autres conditions.

Auteurs	Protéines	Supports échangeur d'ions
BISCANS 1985	β lactoglobuline α lactalbumine	résine échangeuse de cations forte Duolite C20
HUANG et coll. 1987	RNase lysozyme α chymotrypsinogène	échangeurs de cations faible (WCX-300) et fort (SCX-300) Du Pont
KOPACIEWICZ et coll. 1987	α lactalbumine BSA ferritine	échangeur d'anions synthétisés à base de silice, différentes granulométries
SKIDMORE et coll. 1988	BSA lysozyme	échangeur de cations fort S Sepharose FF
VAN DER WIEL 1989	BSA	échangeur d'anions fort QMA Spherosil
WHITLEY et coll. 1989	lysozyme myoglobine BSA	échangeur d'anions fort : Q Sepharose FF faible : DEAE Sepharose F échangeur de cations fort : S Sepharose FF faible : CM Sepharose FF
HUANG et coll. 1990	albumine de poulet conalbumine	échangeur d'anions faible TSK-DEAE-5PW
SKIDMORE et coll. 1990	BSA lysozyme	échangeur de cations fort S Sepharose FF

Tableau 4-6 : Références dans lesquelles l'adsorption d'une protéine est modélisée par l'isotherme de Langmuir

On peut modifier ce modèle de base pour l'appliquer à des cas plus complexes (surface hétérogène, compétition entre plusieurs espèces adsorbables, adsorption multicouche etc.). Par exemple, l'équilibre de Langmuir pour un système multiconstituant comprenant n espèces adsorbables s'écrit [JACOBSON et coll. 1987] :

$$q_i^* = \frac{a_i c_i^*}{1 + \sum_{j=1}^n b_j c_j^*} \quad 1 \leq i \leq n \quad (22)$$

où q_i^* désigne la quantité d'espèce i adsorbée, l'adsorbant étant en équilibre avec une solution de composition $(c_i^*)_{1 \leq i \leq n}$.

Ce modèle a été employé pour décrire l'adsorption de plusieurs protéines. Cela a été fait par exemple par SKIDMORE et CHASE [1990], qui ont adopté l'approche "multiconstituant" pour décrire l'adsorption en colonne de deux protéines (BSA et lysozyme) sur un échangeur de cations fort (F Sepharose FF). Ils ont testé deux modèles ; le premier est fondé sur l'absence de compétition entre les deux protéines, l'adsorption étant décrite par deux équations de Langmuir distinctes ; le second repose sur une hypothèse de compétition totale, et utilise deux équations de Langmuir modifiées (équation 4). Leurs résultats sont plutôt mieux décrits par ce dernier modèle, bien qu'aucun des deux ne soit parfaitement représentatif (ni prédictif).

En résumé, l'échange d'ions mettant en jeu une protéine reste un problème complexe, généralement décrit en termes d'adsorption. Ceci n'est guère satisfaisant, à cause du **manque de pouvoir prédictif**. Nous allons examiner maintenant s'il est possible d'établir un lien entre le modèle de Langmuir et le modèle d'échange d'ions stoechiométrique.

I-2 Modèle de Langmuir et échange d'ions stoechiométrique

Certains auteurs ont cherché à adapter l'écriture stoechiométrique de l'équilibre d'échange d'ions au cas d'une protéine [BOARDMAN et PARTRIDGE 1955 ; VELAYUDHAN et HORVATH 1986 ; REGNIER 1987].

L'échange ion-protéine est alors représenté par la réaction :



où P et $\overline{P}$ représentent la protéine de valence Z respectivement dans la phase liquide et dans la phase solide, de même C et $\overline{C}$ le contre-ion (supposé monovalent pour simplifier) dans chaque phase.

La loi d'action de masse ou loi d'échange s'écrit à ce moment-là :

$$K = \frac{(\overline{P}) (C)^Z}{(P) (\overline{C})^Z} \quad (23)$$

les concentrations étant exprimées en mol/l (par exemple).

Nous avons vu dans le Chapitre 1, que cette écriture s'appliquait à la réaction d'échange binaire entre "petits" ions, c'est à dire de faible masse molaire et de valence fixée (exemple : échange chlorure-nitrate). Elle est alors valable quelles que soient les conditions physicochimiques (bien que K puisse dépendre de la normalité pour les échanges hétérovalents), elle permet de déterminer la composition du support en équilibre avec une solution donnée.

Considérons maintenant un échange ion-protéine et réduisons le nombre de variables en choisissant un échange "binaire" entre une protéine et un ion impliqué dans aucune réaction (par exemple BSA-chlorure) sur un échangeur fort (QMA Spherosil). Cette situation présente encore des difficultés, essentiellement à cause de la détermination de Z , qui est le nombre moyen de sites intervenant dans la liaison entre une molécule de protéine et le support échangeur d'ions. On peut se faire une idée de la valeur de Z en calculant la charge nette de la protéine, soit à partir d'une courbe de dosage acide-base effectuée dans les mêmes conditions de force ionique, soit à partir d'un simple bilan d'électroneutralité calculé d'après la composition de la solution. On sait déjà que la valeur de la charge nette dépend du pH et des concentrations ioniques, donc même pour un échange simple type BSA-chlorure, cette valeur n'est pas fixée, elle dépend de l'environnement ionique.

On peut ajouter un degré de complexité en remarquant que le nombre Z n'est pas nécessairement égal à la charge nette de la protéine [KOPACIEWICZ W. et coll. 1983 ; ROUNDS M.A. et REGNIER F.E. 1984 ; REGNIER F.E. 1987 ; WHITHLEY R.D. et coll. 1989]. La preuve en est par exemple qu'une protéine peut être retenue sur un échangeur d'ions à son point isoélectrique, de même, une protéine de charge nette positive peut être retenue sur un échangeur d'anions et vice-versa. De plus, les sites ionisés de la protéine pouvant potentiellement intervenir dans l'échange ne sont généralement pas tous sollicités, ceci pour des raisons stériques ; si la distribution de charges sur la protéine est symétrique, ces charges ne pourront pas contribuer toutes à l'échange, alors que si cette distribution est plutôt asymétrique (c'est le cas de la BSA), la protéine s'orientera de manière à ce qu'une proportion de charge la plus importante possible participe à l'échange (Figure 4-8).

On s'aperçoit donc que même dans l'exemple choisi, pourtant relativement simple, l'écriture stoechiométrique de l'échange d'ions ne rend pas compte d'un mécanisme indépendant des conditions physicochimiques. Par conséquent, elle n'apporte guère plus d'informations au niveau prédictif qu'une équation de Langmuir.

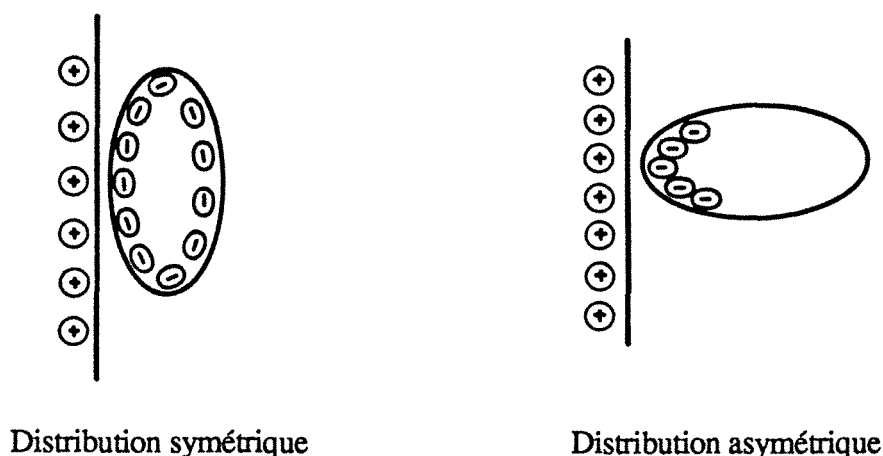


Figure 4-8 : Influence de la symétrie de la distribution de la charge d'une protéine sur le nombre de liaisons protéine-support.

WHITHLEY et coll. [1989] ont cherché à mettre en évidence un lien entre les deux formalismes. A partir de l'équation (5), en introduisant $(\overline{P})_{\max}$, la capacité de l'échangeur d'ions en protéine P, et en supposant que C est pratiquement égal à la concentration en contre-ions, ils arrivent à :

$$(\overline{P}) = K Z^Z \left(\frac{(\overline{P})_{\max} - \overline{P}}{C} \right)^Z \quad (24)$$

Ils montrent alors que, dans le cas où $Z = 1$, la loi d'action de masse peut être réarrangée en expression de Langmuir :

$$(\overline{P}) = \frac{a (P)}{1 + b (P)} \quad (25)$$

$$\text{avec } a = \frac{K (\overline{P})_{\max}}{C} \quad \text{et} \quad b = \frac{K}{C}$$

a et b ne sont pas des constantes, puisqu'elles dépendent de C, et de toutes manières, dans le cas général, Z ne vaut pas un. On en conclut qu'il n'existe pas de relation simple entre les deux écritures.

De même pour un échange d'ions classique, il n'y a pas de relation entre le formalisme loi d'action de masse et celui de Langmuir car ils s'agit de mesures différentes. En effet, quand on cherche à déterminer une constante d'échange d'ions pour un échange binaire, sans réaction chimique, pour une capacité donnée, on fixe la normalité totale, et on fait varier uniquement la proportion de chacun des ions. Par contre, si on souhaite construire une isotherme d'adsorption, on mesure la quantité adsorbée d'un ion donné en fonction de sa concentration dans la solution ; la normalité varie d'un point à l'autre. Autrement dit, chaque point de l'isotherme d'adsorption appartient à une isotherme d'échange binaire, il n'y a pas de relation simple entre les deux représentations.

On peut aussi souligner un autre point : on a souvent tendance à croire qu'une courbe de Langmuir indique une "forte affinité" de l'espèce fixée pour le support (ce qui est vérifié pour un mécanisme d'adsorption). Or, si on étudie la fixation d'une espèce (sans en connaître le mécanisme a priori) en augmentant sa concentration en solution, on a toutes les chances d'obtenir une courbe type Langmuir, quelle que soit l'affinité de l'espèce en question.

Prenons l'exemple d'un échange chlorure-nitrate : si on effectue des expériences pour lesquelles on augmente la quantité de chlorure en solution, et que l'on mesure la quantité de chlorure fixé sur le support, on obtiendra une courbe "de Langmuir", bien que le nitrate ait une affinité plus forte pour le support.

Autrement dit, la connaissance du sens de concavité de la courbe ne constitue pas toujours une indication suffisante (puisque si $\bar{q} = \frac{aC}{1 + bC}$ avec a et b positifs, on a toujours $\frac{d^2q}{dC^2} = \frac{-2a}{(1+bC)^3} < 0$; la valeur de la pente à l'origine témoigne d'une affinité plus ou moins forte de l'espèce sorbée, au moins au niveau qualitatif).

II. DEMARCHE EXPERIMENTALE

II-1 Méthodes

On peut construire des isothermes d'échange binaire ou d'adsorption à partir d'expériences en réacteur fermé agité ou en colonne. Ces méthodes, quoique très générales, vont être présentées dans le cadre de l'étude de l'équilibre entre une protéine et un échangeur d'ions.

** En réacteur fermé agité :*

On met en présence une quantité connue d'échangeur d'ions, conditionné sous une forme donnée (chlorure par exemple), et un volume connu de solution de concentration C_0 en protéine. Après équilibration, on mesure la concentration finale en protéine C_f et on obtient par bilan de matière la quantité fixée q^* . Le point (C_f, q^*) caractérise l'état d'équilibre ainsi atteint.

* En colonne :

On fait percoler dans une colonne, équilibrée sous une forme donnée, une solution de concentration C_0 en protéine, à un débit suffisamment faible, pour minimiser les résistances au transfert de matière. Lorsque la concentration en protéine de l'effluent est égale à celle de la solution d'alimentation, la colonne est saturée, l'expérience est terminée, et on peut calculer la quantité de protéine fixée.

- Si on a recueilli la totalité de l'effluent dans un volume connu, la quantité de protéine fixée est estimée directement par différence entre la quantité sortie et la quantité entrée (Figure 4-9a).

$$A = C_0 (V_f - V_p) - \int_p^{V_f} C \, dV \quad (26)$$

C_0 : concentration en protéine dans la solution d'alimentation (mol/l, g/l ...)

V_f : volume d'effluent tel que la concentration en protéine soit égale à C_0 (l)

V_p : volume poreux (l)

- Si on a suivi la courbe de percée, la quantité de protéine fixée est donnée par la valeur de l'aire A (Figure 4-9b). On a ainsi un point d'isotherme (C_0, q^*).

On peut aussi obtenir plusieurs points d'isotherme en injectant des échelons successifs de solutions de concentration de plus en plus élevée en protéine, C_0, C_1, C_2 etc. toutes choses étant égales par ailleurs. On aura alors une courbe de percée dont l'allure est donnée en figure 3b. Par intégration, on aura accès à plusieurs points d'isotherme, (C_0^*, q_0^*) sera donné par la valeur de l'aire A_0 , (C_1^*, q_1^*) par celle de A_1 , etc..

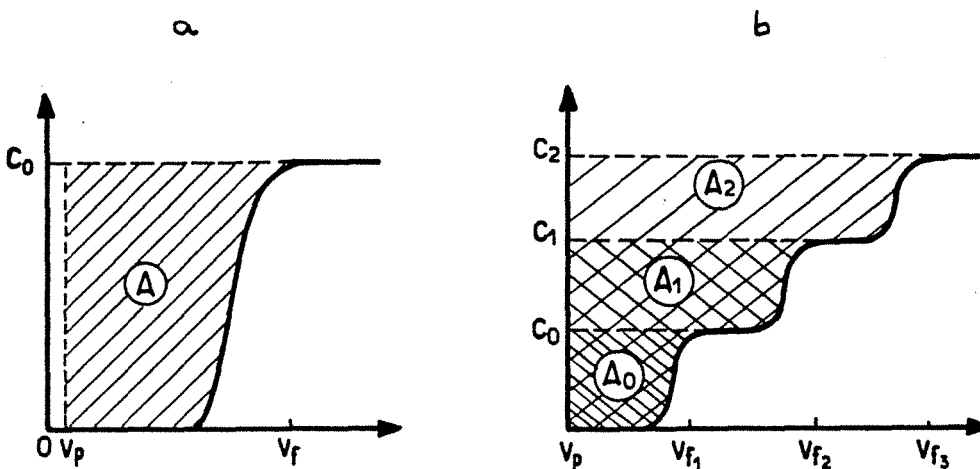


Figure 4-9 : Détermination graphique de la quantité de protéine fixée. a : dans le cas d'une variation échelon ; b : dans le cas de plusieurs échelons successifs.

II-2 Expériences

Nous avons étudié l'équilibre de fixation de la BSA en effectuant plusieurs séries de mesures, en réacteur fermé agité. Ce protocole a été choisi car il semblait comporter moins de sources d'erreur que les expériences en colonne. Pour ces dernières en effet, il est indispensable de connaître le volume poreux avec la plus grande précision, ce qui peut poser des problèmes.

Nous avons travaillé sur le support échangeur d'anions fort QMA Spherosil, et sur l'échangeur d'anions faible DEAE SpheroDEX. Sur ces deux supports, des expériences ont été faites en milieu non tamponné (pour s'affranchir des réactions de dissociation), en présence de chlorure de sodium, et en milieu tamponné, avec du phosphate de sodium. Les deux milieux se trouvent pratiquement au même pH : le pH du tampon est 6.80, et celui du milieu chlorure de sodium, il varie entre les valeurs 6.65 et 6.80. Dans ce dernier cas, le pH est déterminé par les quantités d'ions chlorure et sodium qui accompagnent la BSA quand elle est mise en solution. Pour chacun de ces milieux, on a étudié l'influence de la concentration en sel en se plaçant à trois concentrations différentes, 10 - 25 et 50 mM, pour des concentrations de BSA de 0 à 25 g/l environ (Tableau 4-7).

	QMA Spherosil	DEAE SpheroDEX
Chlorure de sodium 10-25-50 mM environ	Série I	Série III
Tampon phosphate de potassium 10-25-50 mM environ	Série II	Série IV

Tableau 4-7 : Expériences

Protocole expérimental :

* Equilibration du support :

Pour les séries I et III, on a placé une certaine masse de support (1g pour le DEAE SpheroDEX, 2g pour le QMA Spherosil) dans des flacons, et les différentes opérations d'équilibration sont effectuées en changeant le surnageant. La réhydratation du support

comporte un lavage à l'acide chlorhydrique 0.1N, à la soude 0.05N (QMA Spherosil), 0.1N (DEAE Sphero-dex), à l'eau, puis un ajout d'acide chlorhydrique pour neutralisation, un lavage au chlorure de sodium 0.1N. On amène ensuite la concentration en chlorure de sodium à sa valeur fixée. A la fin, le flacon contient, en plus du solide, une certaine quantité de liquide qui est mesurée par pesée. Cette méthode minimise la manipulation de solide, mais elle a l'inconvénient d'être longue et délicate, c'est pourquoi nous avons ensuite adopté la suivante.

Pour les séries II et IV, une certaine masse de support pesé sec (de l'ordre de 15g) est réhydratée et mise en colonne. Le solide est équilibré en colonne par la même séquence de solutions que précédemment, suivie d'une solution de tampon phosphate 0.1 M. Lorsque l'échange chlorure-phosphate est terminé, la concentration en phosphate est amenée à la valeur fixée, par exemple 10 mM. A ce moment-là, la colonne est vidée, le solide étant entraîné par la solution 10 mM. Il est ensuite essoré sur büchner et pesé. On veille à ce que la masse n'évolue plus (équilibre avec l'atmosphère), on détermine le rapport masse humide/masse sèche (qui est toujours de l'ordre de 2.1), et on place dans les flacons des échantillons correspondant à 1g sec pour le Sphero-dex et 2g sec pour le Spherosil.

** Ajout de la solution protéique :*

Pour chaque isotherme, on prépare une solution concentrée de BSA (environ 50 g/l) dans le milieu donné, chlorure de sodium ou tampon phosphate de concentration fixée. La protéine mise en solution est toujours accompagnée d'ions sodium (compensateurs) et de chlorure résiduel. Par conséquent, pour les expériences en milieu chlorure de sodium, la BSA est dissoute dans la solution de concentration choisie (10-25-50 mM) sans autre traitement. Par contre, pour les expériences en milieu tampon phosphate, la protéine est dissoute dans le tampon, puis dialysée contre ce même tampon, afin d'éliminer le chlorure.

A la fin de ces opérations, on mesure la concentration en protéine, et on calcule le volume V_i de solution à injecter dans chaque flacon pour obtenir le point initial souhaité, pour un volume total choisi (100 ml par exemple). Supposons que l'on travaille en milieu chlorure de sodium 25 mM, avec un volume total de 100 ml. Chaque flacon contient du solide avec un certain volume résiduel de solution. On ajoute alors le volume de solution de chlorure de sodium nécessaire pour atteindre le volume 100- V_i (ml), et on complète avec le volume V_i de solution de protéine concentrée (on suppose que le mélange des deux solutions est infiniment rapide devant l'adsorption de la protéine). Les flacons sont placés sur agitateur pendant 24h, à une vitesse de rotation de l'ordre de 200 à 250 tr/min. A la fin de l'expérience, les concentrations en BSA, anions et cations sont mesurées, ainsi que le pH.

* Température :

L'influence de la température a été étudiée par VAN DER WIEL [1989], qui a travaillé à 10 et 22°C, et HUANG et coll. [1990] qui ont comparé des résultats obtenus à 15, 25 et 35°C. Une augmentation de la température provoque une diminution de la quantité de protéine adsorbée, qui devient surtout importante à partir de 30 à 35°C. Nous avons choisi pour des raisons pratiques de travailler à la température ambiante, c'est à dire entre 20 et 25°C.

III. RESULTATS ET MODELISATION

Les résultats obtenus sont présentés en figures 4-10 à 4-13. Les valeurs des points expérimentaux sont environ à 0.01 g/g support sec près pour q^* et 0.05 près pour c^* . Nous avons représenté la quantité de protéine adsorbée en g de protéine par g de support sec, on aurait pu aussi la donner en g de protéine par ml de support en lit fixe. Pour passer de la première unité à la seconde, il suffit de diviser par 2.25. Les courbes sont construites par l'équation de Langmuir, $q^* = \frac{nKc^*}{1+Kc^*}$, dont les paramètres n et K sont donnés dans le tableau 4-8.

III-1 Détermination des paramètres n et K

- On peut calculer n et K par régression linéaire, en portant $1/q^*$ en fonction de $1/c^*$. On doit obtenir une droite de pente $1/nK$ et d'ordonnée à l'origine $1/n$.
- On peut employer d'autres méthodes de régression linéaire, comme celle dite de Scatchard [BLANCO R. et coll. 1989 ; HUANG J.-X. et coll. 1990], qui consiste à porter q^*/c^* en fonction de q^* , sachant que $q^*/c^* = nK - Kq^*$.
- Pour une expression non linéaire, comme ici, la régression non linéaire donne généralement de meilleurs résultats que la régression linéaire. Nous disposons du logiciel Enzfitter [LEATHERBARROW 1987], qui pour une équation choisie -ici Langmuir- calcule la courbe qui approche au mieux les points expérimentaux. Ce logiciel est fondé sur la méthode du chi carré, les valeurs des paramètres sont trouvées en minimisant la somme pondérée des écarts entre les valeurs expérimentales et calculées (Δy_i). Cette quantité est désignée par :

$$\chi^2 = \sum_i \left(\frac{\Delta y_i}{\sigma_i} \right)^2 \quad (9)$$

σ_i désigne la variance (lorsque l'on dispose de plusieurs mesures en chaque point) ;
ici, $\sigma_i = 1$.

QMA SPHEROSIL			
		Chlorure de sodium	Tampon phosphate de potassium
10 mM	n	0.226	0.218
	K	0.952	0.848
25 mM	n	0.215	0.154
	K	1.432	0.589
50 mM	n	0.192	0.102
	K	1.137	2.000
DEAE SPHERODEX			
		Chlorure de sodium	Tampon phosphate de potassium
10 mM	n	0.380	0.254
	K	18.32	11.73
25 mM	n	0.300	0.172
	K	7.078	2.031
50 mM	n	0.242	0.158
	K	1.516	0.218

Tableau 4-8 : Paramètres calculés des isothermes de Langmuir. n est exprimée en g de BSA/g support sec et K en (g/l)⁻¹

Cette dernière méthode donne apparemment les meilleurs résultats. C'est par elle que nous avons obtenu les paramètres donnés dans le tableau 4-8. Toutefois, il faut remarquer que l'on obtient des résultats très proches en portant $1/q^*$ en fonction de $1/c^*$ (écart de moins de 2% sur n et de moins de 5% sur K), ce qui est appréciable pour une régression linéaire. La méthode de Scatchard donne des résultats un peu différents des précédents, car en portant q^*/c^* vs q^* , on arrive à un nuage de points, et le choix d'une droite moyenne s'avère pour le moins subjectif.

Dans l'ensemble, l'incertitude sur le paramètre n (définie comme la moyenne des écarts) est assez faible (de 2 à 6% environ), tandis que celle sur K est assez forte (elle dépend de chaque courbe, généralement de l'ordre de 30%, elle peut aller jusqu'à 80 à 100%).

III-2 Discussion

* Comme on pouvait s'y attendre intuitivement, on remarque que plus la concentration en ions (chlorure ou phosphate) augmente, plus la quantité de protéine fixée diminue. Ceci indique bien la compétition entre la protéine et les ions en solution pour les sites d'échange, ce qui est en accord avec les résultats de VAN DER WIEL [1989]. Cette observation va bien dans le sens d'un mécanisme d'échange d'ions.

* Qualitativement, on s'aperçoit que les points expérimentaux sont moins dispersés, en présence de tampon phosphate d'une part, sur le DEAE Spherox d'autre part. On peut interpréter ceci par un effet "stabilisant" du tampon sur la forme ionique de la protéine, le support faible DEAE jouant aussi ce rôle de tampon.

Apparemment les deux supports fixent une quantité plus importante de protéine en milieu chlorure de sodium qu'en milieu tampon phosphate. Le pH étant sensiblement le même pour les deux milieux, on peut suggérer deux explications :

- soit la compétition ion-protéine est un peu différente, en raison de la présence de deux contre-ions (H_2PO_4^- et HPO_4^{2-}) dont un divalent en milieu tampon phosphate, au lieu d'un seul contre-ion en milieu chlorure de sodium. L'adsorption de protéine serait quelque peu défavorisée dans le tampon.
- soit la compétition ion-protéine est la même dans les deux types de solution et la différence observée est due seulement à la normalité. En effet, même si pour les deux milieux on travaille aux mêmes molarités (10-25-50 mM), la normalité est plus élevée dans le cas du tampon phosphate ; pour cette raison, il est possible que la fixation de protéine soit moins favorisée dans ce dernier cas.

Dans cette dernière hypothèse, on peut chercher à corréler la quantité maximale de protéine fixée à la quantité d'anions en solution (méq/l). Même si ceci n'a pas beaucoup de signification au niveau de l'échange d'ions, cela peut indiquer une tendance de comportement. Les résultats sont représentés en figure 4-14. Etant donné le faible nombre de points et leur dispersion, il est un peu hasardeux de suggérer un comportement linéaire. Il faudrait, pour pouvoir conclure sur ce point, disposer de données expérimentales plus nombreuses, établies au même pH, pour différents tampons, à différentes normalités.

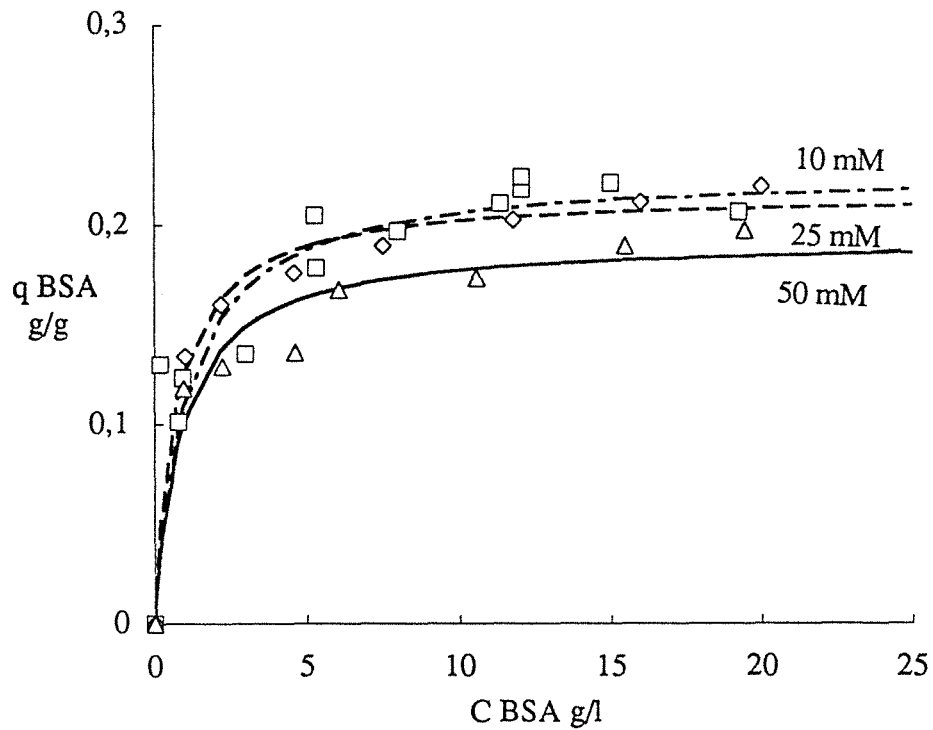


Figure 4-10 : Isotherme de fixation de l'albumine sur QMA Spherosil, en milieu chlorure de sodium 10, 25 et 50 mM.

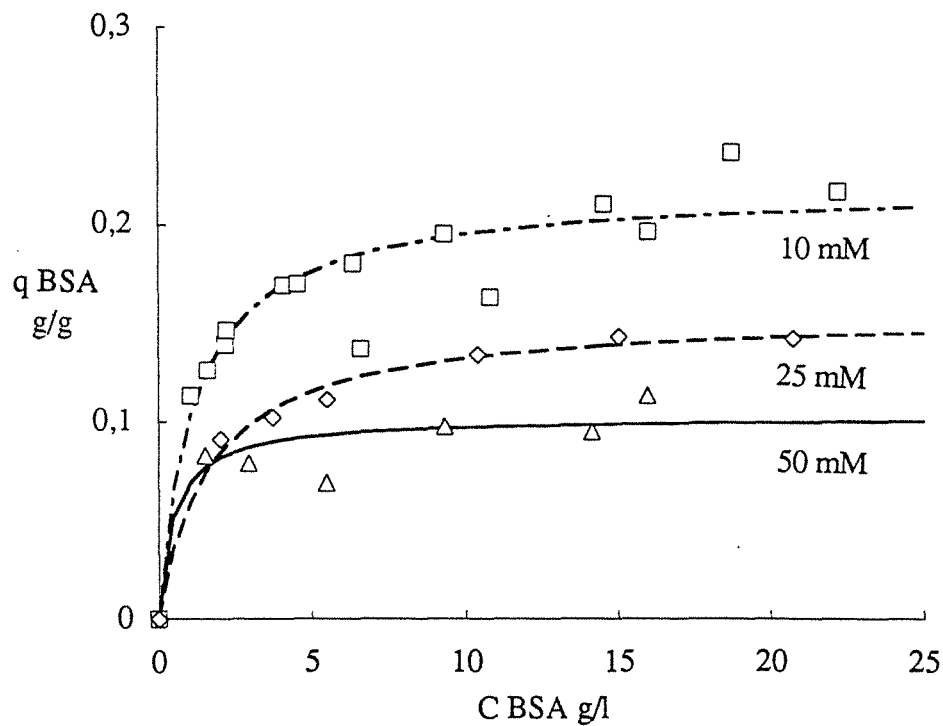


Figure 4-11 : Isotherme de fixation de l'albumine sur QMA Spherosil, en milieu tampon phosphate, 10, 25 et 50 mM.

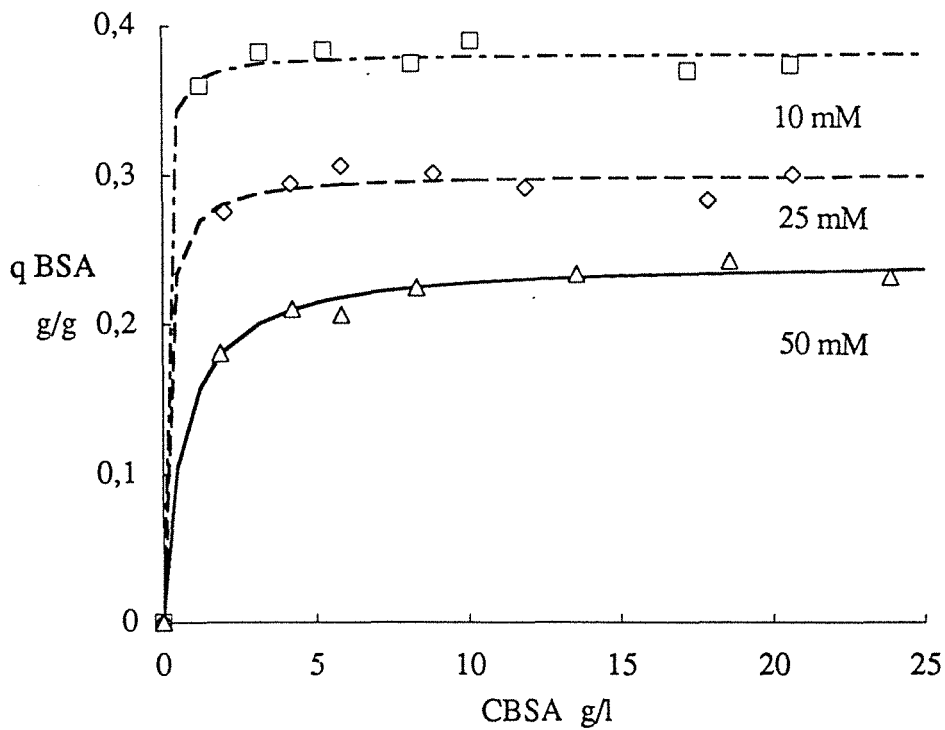


Figure 4-12 : Isotherme de fixation de l'albumine sur DEAE Spheroex, en milieu chlorure de sodium 10, 25 et 50 mM.

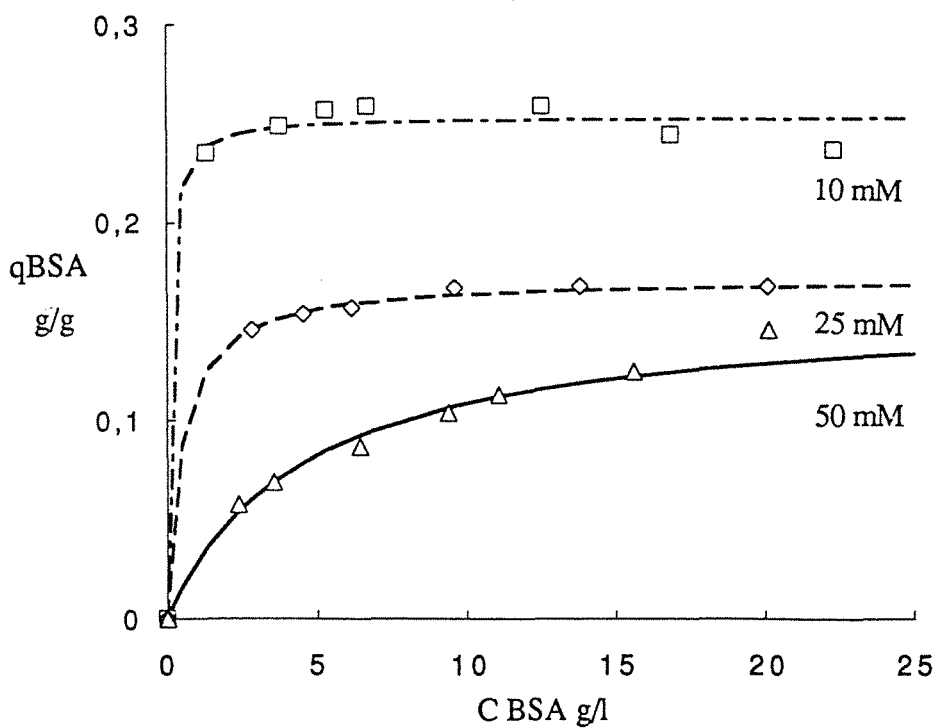


Figure 4-13 : Isotherme de fixation de l'albumine sur DEAE Spheroex, en milieu tampon phosphate, 10, 25 et 50 mM.

En ce qui concerne l'influence du pH, elle a été étudiée notamment par ROY et coll. [1980], puis par VAN DER WIEL [1989], pour la BSA et le support QMA Spherosil, entre pH 4.0 et 8.0. Il trouve que la quantité de protéine adsorbée jusqu'à pH 6.0 environ, atteint un maximum, au-delà duquel elle décroît ou bien reste constante. Ses résultats sont un peu difficiles à interpréter en raison de l'utilisation de deux tampons différents (acétate et phosphate), à des degrés de dissociation distincts. Pour étudier la seule influence du pH, il faudrait pouvoir faire varier uniquement ce paramètre, toutes choses étant égales par ailleurs.

Au pH auquel on travaille, le QMA Spherosil a une capacité ionique un peu supérieure à celle du DEAE Spheroex. Pourtant, il a une capacité maximale d'adsorption en albumine moins élevée (le rapport varie entre 0.6 et 0.8). Skidmore et Chase ont établi la même comparaison entre les supports Q et DEAE Sepharose, le premier ayant une capacité d'adsorption en protéine moins forte que le second, malgré une capacité d'échange ionique plus élevée.

La différence observée entre le QMA Spherosil et le DEAE Spheroex indique que, même si l'échange d'ions est le phénomène principal, d'autres facteurs peuvent intervenir, notamment la nature de la matrice.

* Connaissant pour chaque point initial et final les concentrations de toutes les espèces, nous avons cherché à effectuer des bilans de matière sur les contre-ions, ainsi que des bilans d'électroneutralité. En particulier, nous souhaitons rapporter la quantité de protéine fixée à celle d'ions relargués. Cette démarche ne s'est pas montrée concluante, en raison de la faible capacité d'échange d'ions des supports, les différences (environ 0.2 méq/g support) sont du même ordre de grandeur que l'incertitude expérimentale. On ne peut donc pas obtenir des résultats très fiables.

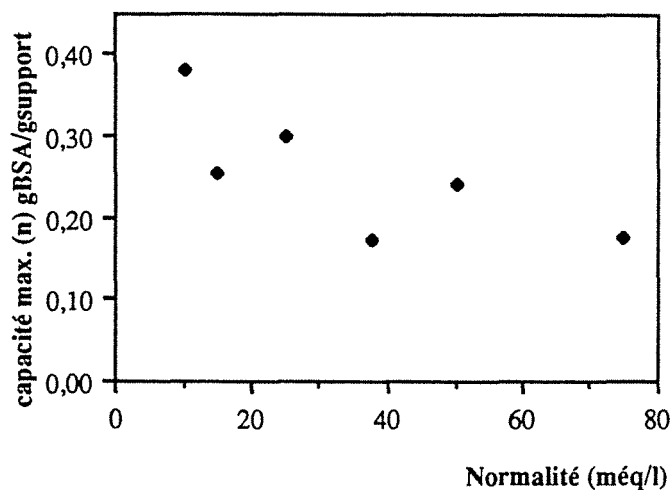


Figure 4-14 : Capacité maximale (n) de fixation d'albumine sur les deux supports, en fonction de la normalité de la solution .

CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons proposé une réflexion sur la manière de représenter l'équilibre entre une protéine et un échangeur d'ions. Nos résultats expérimentaux sont présentés dans le formalisme de Langmuir. Mais nous avons remarqué que l'utilisation d'un formalisme de type adsorption n'était pas complètement satisfaisant, étant donné l'absence de caractère prédictif. En effet, la quantité de protéine fixée n'est pas une fonction univoque de la concentration en protéine en solution :

- d'une part, la composition de la solution (pH, force ionique) détermine la forme ionique de la protéine,
- d'autre part, comme l'échange d'ions est une loi stoechiométrique, la fixation de la protéine dépend de la nature et de la quantité des autres ions échangeables présents.

Par conséquent, contrairement aux isothermes "réelles" d'adsorption (de gaz par exemple), la forme de l'isotherme ne donne pas d'informations sur le caractère compressif ou dispersif des fronts en colonne.

Il n'existe certainement pas de représentation simple de cet équilibre, si ce n'est éventuellement sous la forme d'un diagramme d'état, comme ceux employés pour décrire l'équilibre entre un électrolyte faible et un anion "simple" (Chapitre 3). Mais la construction d'un tel diagramme nécessiterait la mise au point d'une méthode de détermination des constantes d'échange.

ANNEXE 4. : INTERPRETATION DES COURBES DE DOSAGE ACIDE-BASE D'UNE PROTEINE PAR LA METHODE DE TANFORD.

Par hypothèse, les sites d'un groupe donné sont considérés comme identiques et indépendants. Ainsi, l'énergie libre standard de dissociation d'un site peut s'écrire:

$$\Delta F^{\circ} = \Delta F^{\circ}_{\text{int}} + \Delta F^{\circ}_{\text{elec}} \quad (\text{A.4.1.1})$$

où $\Delta F^{\circ}_{\text{int}}$ est l'énergie libre intrinsèque d'ionisation et $\Delta F^{\circ}_{\text{elec}}$ représente le travail nécessaire pour amener un proton dissocié du voisinage de la molécule à l'infini. Ce terme dépend de la force ionique, de la température, de la taille de la forme de la protéine etc.. On supposera qu'il peut être écrit comme fonction de la charge nette, d'où:

$$\Delta F^{\circ} = \Delta F^{\circ}_{\text{int}} - 2 R T W Z \quad (\text{A.4.1.2})$$

où W est le facteur d'interaction électrostatique. Ce terme sera d'autant plus faible que la protéine sera de grande taille et aura une distribution de charge asymétrique, ce qui est le cas de la BSA.

Par conséquent, pour décrire une portion de la courbe de dosage relative à un type de groupements, on pourra écrire:

$$\text{pH} - \log \frac{x}{1-x} = \text{pK}'_{\text{int}} - 0.868 W Z \quad (\text{A.4.1.3})$$

où x est le degré de dissociation de ces groupements

K'_{int} la constante de dissociation

Z la charge nette de la protéine.

Détermination de chaque terme:

Z est obtenue en considérant qu'au pH le plus bas possible, on a la charge positive la plus élevée; à ce moment-là, en comptant le nombre de H^+ dissociés, on obtient pour chaque pH la charge nette de la protéine; il faut ajouter à cette valeur la charge éventuelle d'autres ions liés.

$\frac{x}{1-x}$ est évaluée en considérant qu'à l'intérieur d'une classe donnée les sites sont identiques entre eux, donc:

$$\frac{x}{1-x} = \frac{r}{n-r} \quad (\text{A.4.1.4})$$

où n est le nombre de groupes identiques et r le nombre d' H^+ dissociés à ce pH, provenant de ces sites.

Un problème se pose lorsque deux groupes entrent en jeu sur le même domaine de pH, comme les amines et les phénols; il faut alors trouver une méthode annexe pour les différencier.

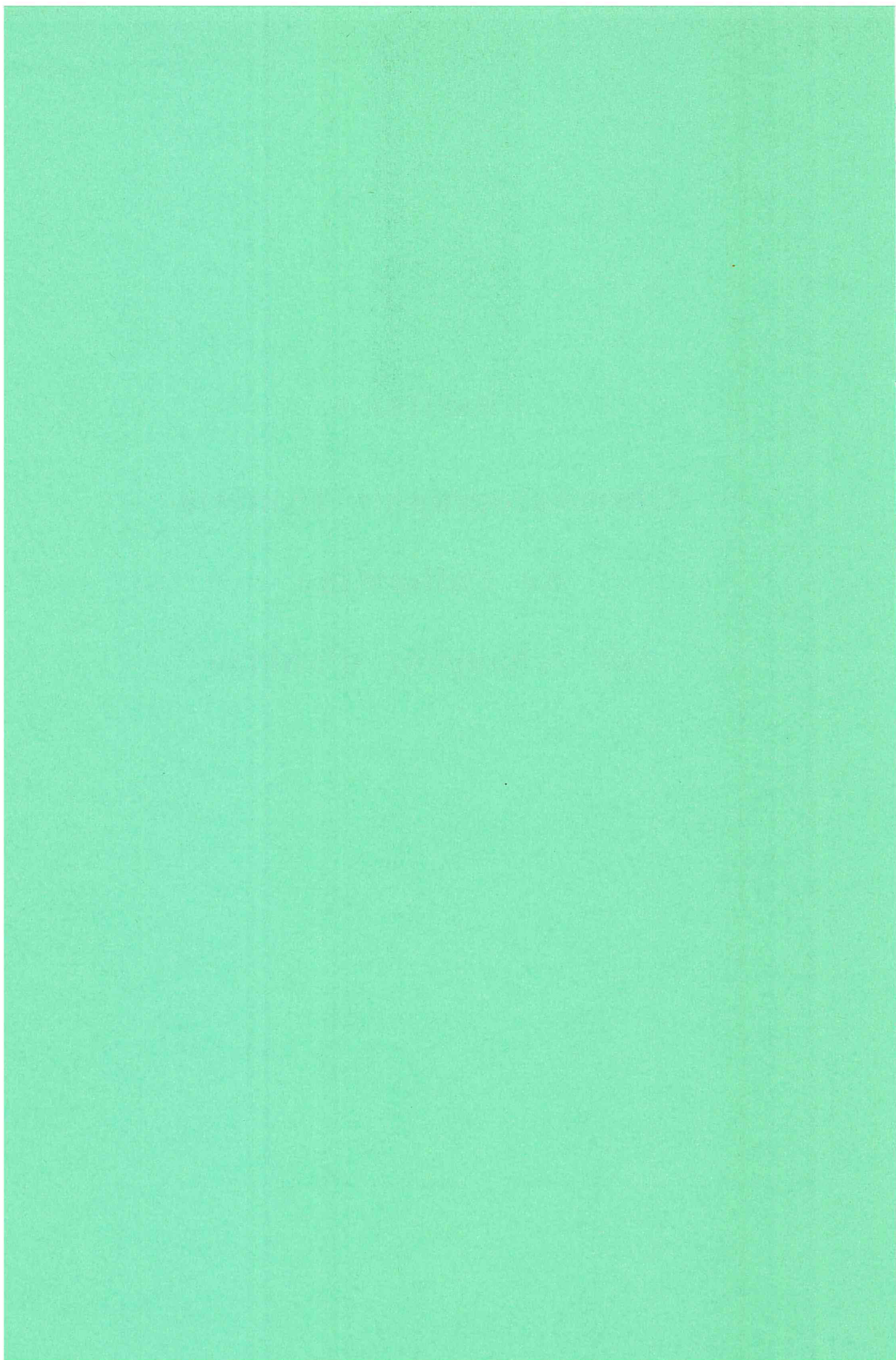
K'_{int} et W sont déterminés en traçant $pH - \log \frac{x}{1-x}$ vs Z , on doit obtenir une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine donnent accès à K'_{int} et W , en supposant que W ne varie pas trop avec Z (l'expérience montre que l'on n'a pas toujours une droite). Le facteur électrostatique ne dépend pas du type de groupement considéré, car les courbes de dosage sont continues au passage d'une région à l'autre.

Si on représente W vs pH pour la BSA à différentes forces ioniques, on peut mettre en évidence les changements réversibles de conformation qui ont lieu pour les pH inférieurs à 4.3 et supérieurs à 8.0.

Par ailleurs, on peut aussi calculer W d'après la théorie de Debye et Hückel, en assimilant la protéine à une sphère rigide, impénétrable aux ions, dont la charge nette est distribuée sur toute la surface.

CHAPITRE 5

Chromatographie frontale de l'albumine sur échangeur d'anions



INTRODUCTION

Dans cette partie, nous allons présenter des expériences effectuées en colonne avec l'albumine. On utilisera d'abord le support échangeur d'anions faible DEAE Sphero-dex LS, puis le support fort QMA Spherosil LS. Dans les deux cas, on commencera par réaliser des expériences en milieu non tamponné, afin de s'affranchir des réactions de dissociation du tampon et de l'échange des anions du tampon. On cherchera à travailler sur des systèmes simples du point de vue de l'échange d'ions, c'est à dire des binaires, puis des ternaires. Ensuite, seront employées des solutions d'albumine en milieu tampon, pour lesquelles interviennent simultanément plusieurs équilibres d'échange d'ions, ainsi que des réactions de dissociation.

Pour chaque expérience, on procèdera à l'analyse des variations de concentrations dans la courbe de percée, et l'on effectuera des bilans de matière et de charge.

L'ensemble de ces observations va nous amener à proposer un mécanisme de comportement de la protéine, en ce qui concerne sa propagation dans une colonne d'échange d'ions. Nous pourrions alors élaborer un modèle approché, permettant de représenter les principales tendances.

I. EXPERIENCES ET INTERPRETATION

Note : Pour toutes les expériences présentées, on considère que 1 g de support Sphero-dex ou Spherosil pesé sec correspond à 2.25 ml de lit fixe, et que la porosité totale est de l'ordre de 80% (voir Annexe Générale 1).

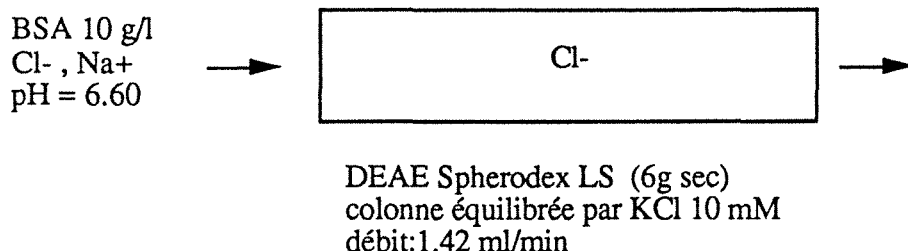
I-1 Avec le support DEAE Sphero-dex LS

I-1.1 Echange binaire albumine-chlorure

Saturation

Des expériences d'échange binaire albumine chlorure ont été effectuées. Un exemple est présenté en figure 5-1 (page 175). Il correspond aux conditions suivantes :

- la colonne est équilibrée sous forme chlorure (KCl 10 méq/l) puis rincée,
- elle est ensuite alimentée par un échelon d'une solution d'albumine dans l'eau (10 g/l).



Il s'agit de l'un des premiers essais, effectués à titre exploratoire, en supposant que la protéine joue le même rôle qu'un anion "simple", comme le chlorure ou le nitrate. On peut faire les remarques suivantes :

Variations de concentrations :

- On observe un front d'échange et deux paliers de concentration.
- La concentration en sodium et le pH, non représentés ici, restent constants ($(\text{Na}^+) = 1.8 \text{ méq/l}$, $\text{pH} = 6.60$)
- La concentration en chlorure ne s'annule pas au niveau du palier d'albumine, en raison de la présence de chlorure résiduel dans la solution d'alimentation.

Apparemment, le système constitué des deux anions albumine et chlorure se comporte comme un système binaire d'échange d'ions classique (c'est à dire composé d'ions "simples").

Bilans de matière et de charge

Par intégration, on peut calculer la quantité de protéine fixée sur la colonne à la fin de l'expérience. On trouve $2.41 \pm 0.05 \text{ g}$ d'albumine, soit à peu près 0.420 g par gramme de support sec, ce qui est bien de l'ordre de grandeur de ce que l'on obtient par mesure d'isotherme (la capacité maximale est de 0.380 g de protéine par g de support sec en milieu chlorure de sodium 10 mM ; elle est sans doute un peu plus élevée ici, en l'absence de chlorure ajouté).

Les points expérimentaux concernant le chlorure ne sont pas suffisamment nombreux ni précis pour effectuer des bilans d'électroneutralité, excepté au niveau du palier, où l'on trouve 9.4 éq/mol d'albumine, ce qui est bien de l'ordre de grandeur attendu (voir I-1.2).

Régénération

Au cours des premières expériences, notre objectif était de régénérer la colonne de manière à récupérer le maximum d'albumine dans un faible volume de solution, ce qui présente un grand intérêt pratique. C'est pourquoi les régénérations étaient effectuées en injectant dans la

colonne un échelon de solution saline de concentration relativement "élevée" (NaCl 50 mM par exemple) ; ceci permet en effet de récupérer une fraction importante de la quantité totale de protéine fixée, sous la forme d'un pic assez étroit (quelques dizaines de ml) dont le maximum peut atteindre une concentration de l'ordre de 100 g/l en albumine. Un exemple de courbe est donné en Annexe 5 (Figure A-5-1).

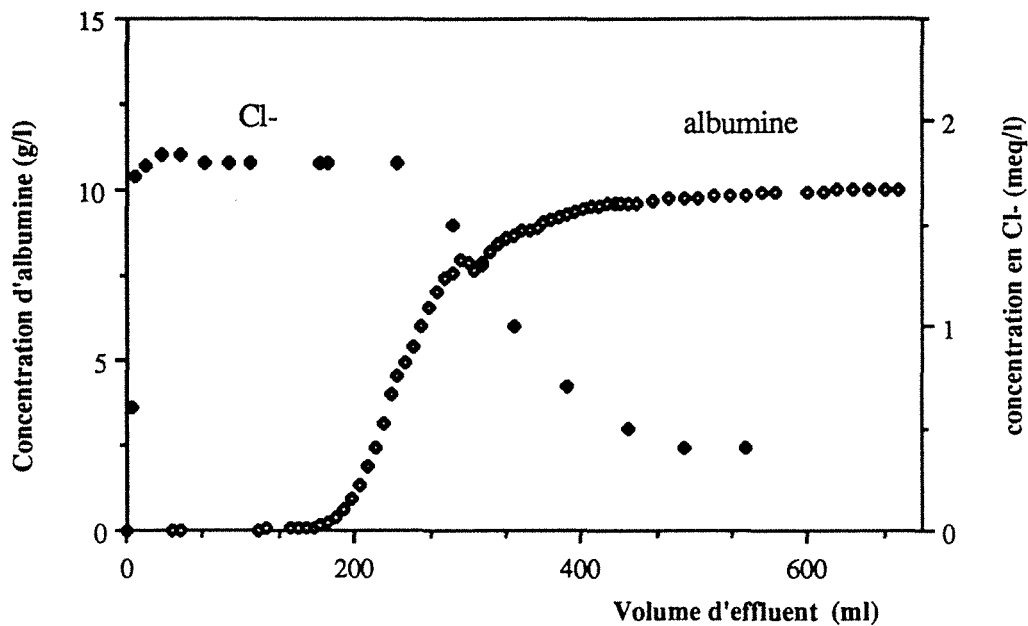


Figure 5-1 : Variations des concentrations pour l'échange albumine-chlorure, support DEAE Spherox.

I-1.2 Echanges ternaires albumine-nitrate-chlorure

Pour bien comprendre le rôle du chlorure (en tant qu'anion échangeable) présent dans les solutions d'albumine, nous avons décidé d'ajouter un anion. Nous avons choisi le nitrate pour des raisons de simplicité, car il est monovalent et n'intervient dans aucune réaction à part l'échange. Des échanges ternaires albumine-nitrate-chlorure devront permettre de déterminer si le chlorure "résiduel" participe ou non à l'échange, ceci à partir de l'étude des variations de concentrations dans l'effluent. Nous allons présenter tout d'abord des expériences de saturation, avant d'aborder les régénérations.

Saturation

Dans les trois expériences suivantes, la colonne est initialement en équilibre avec une solution de nitrate (KNO_3 10 méq/l), rincée, puis alimentée par une solution contenant de l'albumine et du chlorure. Il s'agit successivement de :

- une solution d'albumine dans l'eau (10 g/l) et son chlorure résiduel (expérience 1)
- une solution d'albumine dans l'eau à une concentration deux fois plus élevée (20 g/l) et son chlorure résiduel, dans l'intention de voir l'influence de la valeur de la concentration en protéine (expérience 2)
- une solution d'albumine (20 g/l) dans l'eau avec du chlorure de sodium ajouté (2 méq/l).

Les conditions expérimentales sont présentées dans le tableau 1, et les courbes de percée en figures 5-2, 5-3, 5-4 (pages 179-180).

Expérience	1	2	3
prééquilibration de la colonne	6 g de Spherox LS (pesé sec) KNO_3 10 méq/l rincage à l'eau dégazée		
alimentation			
BSA (g/l)	9.77	19.12	19.75
Cl^- (méq/l)	0.335	0.279	2.20
Na^+ (méq/l)	1.73	3.70	5.60
pH	6.60	6.80	6.80
débit (ml/min)	2.20	1.99	2.05

Tableau 5-1: Conditions expérimentales.

Bilans de matière et de charge - valence de l'albumine

Pour chacune des expériences, la normalité de l'effluent est constante, elle correspond à la concentration en sodium mesurée, OH^- et H^+ sont négligeables car le pH reste voisin de la neutralité. Par conséquent, par différence, on peut déduire la courbe donnant la concentration en anion compensateur (en principe l'albumine) [SIMONNOT et coll. 1989] et relier cette concentration calculée à celle mesurée en albumine. Autrement dit, cela revient à calculer en un certain nombre de points la **charge nette** moyenne de l'albumine en solution, à partir du bilan d'électroneutralité suivant en solution :

$$(H^+) + (Na^+) - (Cl^-) - (OH^-) - (NO_3^-) + Z (BSA) = 0$$

(1)

(Z pouvant être positive ou négative)

soit

$$Z \approx \frac{-(Na^+) + (Cl^-) + (NO_3^-)}{(BSA)}$$

(2)

Au voisinage de la neutralité, (H⁺) et (OH⁻) sont négligeables devant les autres concentrations. Dans le tableau 5-2, on donne la valeur de la charge nette moyenne de l'albumine dans l'effluent calculée pour chacune des expériences.

On peut aussi, pour chaque expérience, effectuer un bilan de matière global, c'est à dire calculer la quantité d'albumine et de chlorure fixés, ainsi que la quantité de nitrate élué, et rapporter la quantité totale d'albumine fixée à la capacité d'échange de la colonne (supposée constante en première approximation), ceci indiquera la "valence", c'est à dire le "nombre de sites" intervenant dans la liaison entre une molécule d'albumine et le support. Les résultats sont présentés dans le tableau 5-2.

Expérience	1	2	3
BSA fixée (g) ±0.1	2.46	2.20	2.18
Cl ⁻ fixés (méq) ±0.02	0.04	0.02	0.09
NO ₃ ⁻ élués (méq) ±0.02	0.55	0.40	0.35
charge nette moyenne (par mol de BSA)	-8	-12	-12
valence (par mol de BSA)	-10.6	-11.6	-8.0

Tableau 5-2 : Résultats des bilans de matière et de charge

- La quantité d'albumine fixée est respectivement 0.410, 0.383 et 0.363 g de BSA par g de support sec (soit entre 0.160 et 0.180 g de BSA par ml de lit fixe), ce qui est à comparer

avec la capacité maximale 0.380 g de BSA par g de support sec en milieu chlorure de sodium 10 mM, obtenue par mesure d'isotherme.

- La quantité de nitrate élué donne pour chaque expérience la capacité effective de la colonne (saturée en nitrate), soit respectivement 0.091, 0.067 et 0.058 méq/g de support sec ou 0.041, 0.030 et 0.026 méq/ml de lit fixe, ce qui est comparable avec des valeurs obtenues par échange chlorure-nitrate (voir annexe générale).

Les différences qui apparaissent sur ces valeurs peuvent être dues à des incertitudes sur l'analyse ou le calcul, ou bien à une diminution de la capacité totale de la colonne, provoquée par l'inactivation éventuelle de certains sites d'échange (après plusieurs utilisations de la colonne).

Si on calcule la charge nette de la protéine en solution, on remarque qu'elle prend des valeurs assez aléatoires, tant que les concentrations en protéine et en ions sont faibles. Ces valeurs n'ont pas de signification, en raison des erreurs de mesure sur les faibles concentrations (l'indétermination étant encore plus importante si l'on calcule un rapport entre deux valeurs faibles). Par conséquent, les valeurs de la charge nette indiquées dans le tableau sont les moyennes de celle obtenues au niveau du plateau de concentration en albumine.

- La valence donnée dans le tableau est calculée avec une incertitude d'au moins ± 1 pour les mêmes raisons que précédemment.

On rappelle que cette valeur est calculée dans l'hypothèse d'une capacité effective d'échange de la colonne constante. Les valeurs ainsi obtenues sont du même ordre de grandeur que la charge nette en solution.

On aurait tendance à supposer a priori que la capacité d'échange est constante, car on ne voit pas varier la normalité totale, ni le pH de l'effluent. Toutefois des "réarrangements internes" entre la protéine et le support sont susceptibles de se produire, et de modifier la capacité d'échange sans effet sur la courbe de percée.

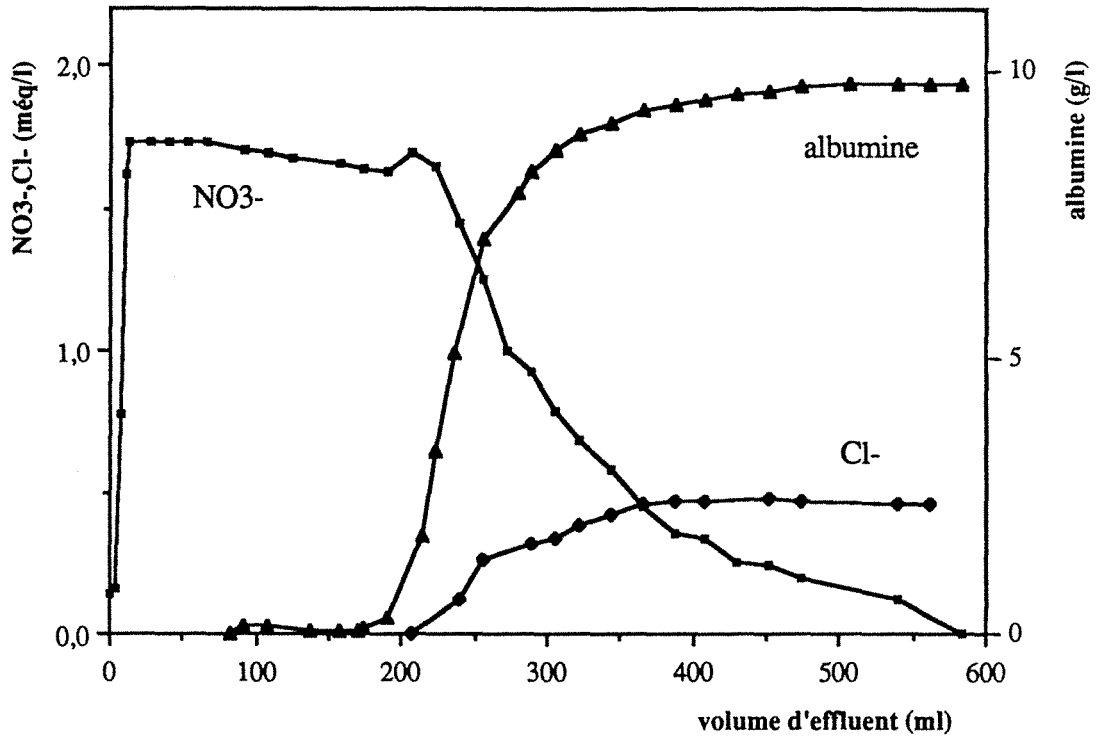


Figure 5-2 : Variations de concentrations dans l'effluent correspondant à l'expérience 1 (DEAE SpheroDEX).

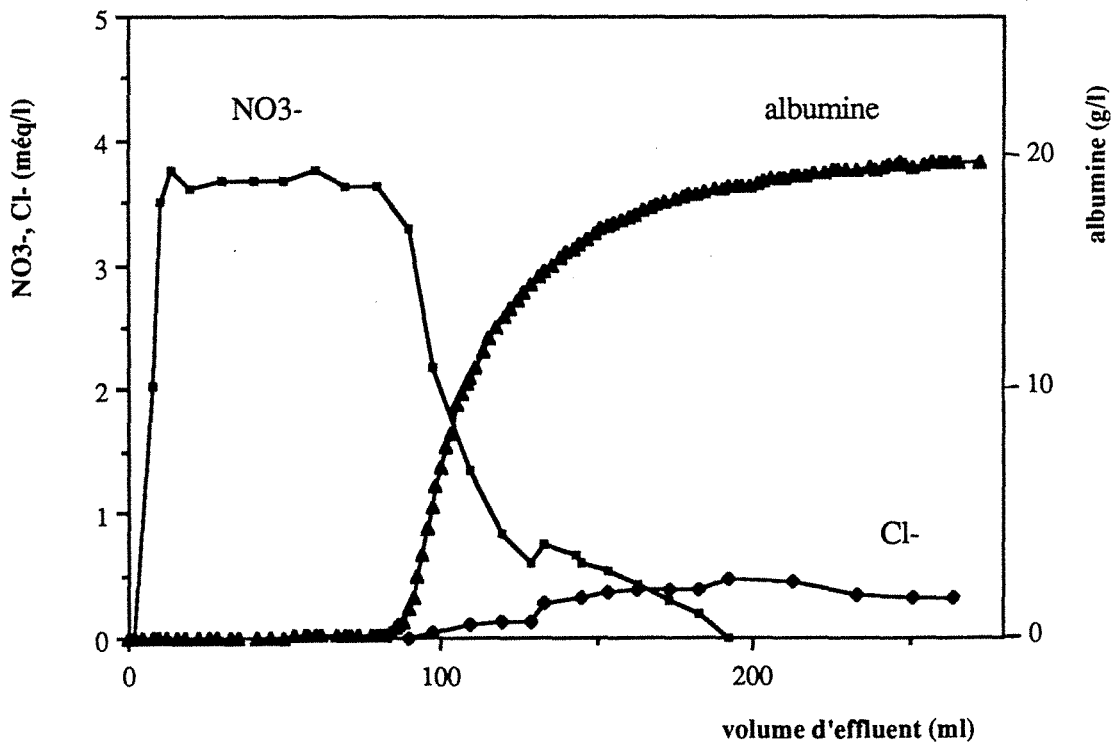


Figure 5-3 : Variations de concentrations dans l'effluent correspondant à l'expérience 2 (DEAE SpheroDEX).

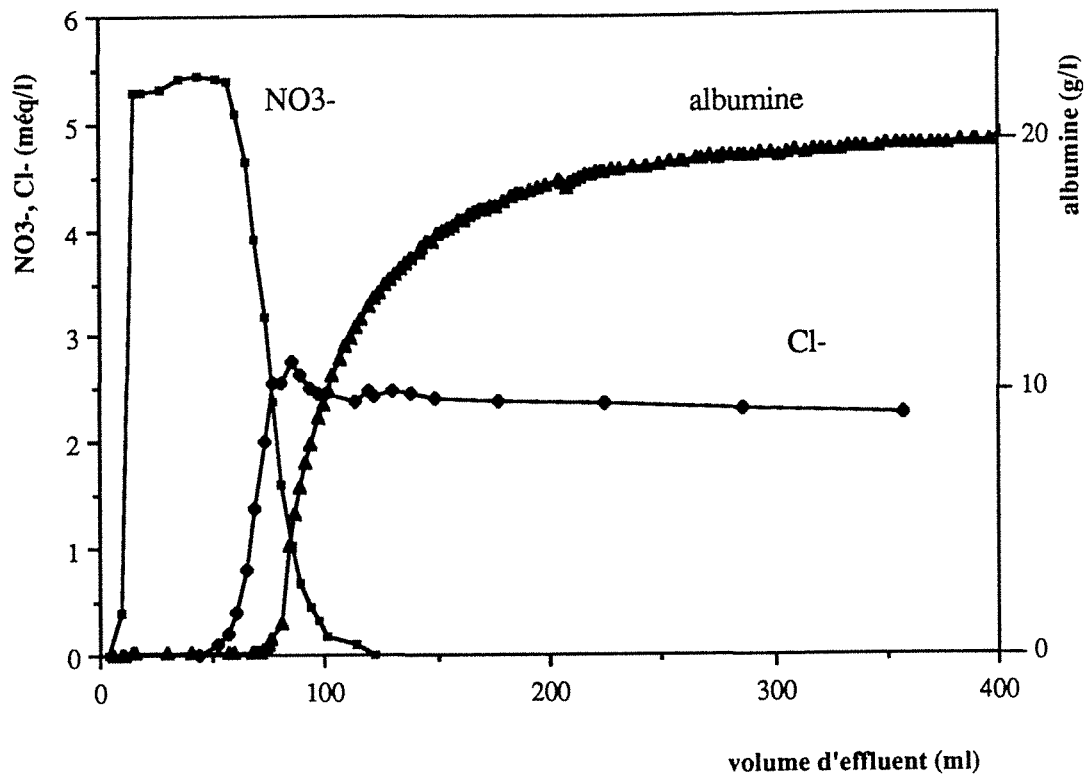


Figure 5-4 : Variations de concentrations dans l'effluent correspondant à l'expérience 3 (DEAE Spheroex).

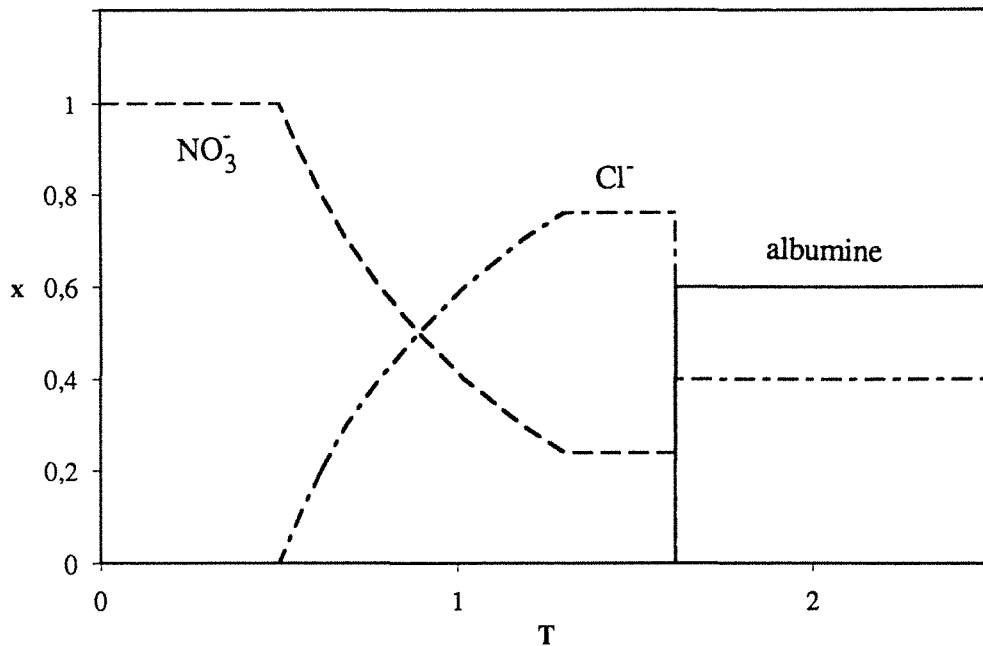


Figure 5-5 : Variations de concentrations calculées correspondant à l'expérience 3 (DEAE Spheodex).

Variations de concentration dans l'effluent

La théorie de l'équilibre prévoit que, pour un système ternaire ordonné, la réponse de la colonne à une variation-échelon de concentration est constituée de trois paliers de concentrations, séparés par deux transitions stables ou dispersives. Ceci se voit bien sur la figure 5-4.

Supposons que l'ordre d'affinité des trois espèces soit le suivant : $BSA > NO_3^- > Cl^-$; l'affinité la plus forte est attribuée à l'albumine à cause de sa charge nette élevée, l'ordre entre nitrate et chlorure a été déterminé en mesurant l'isotherme de leur échange (Annexe générale). Les variations de concentration dans l'effluent calculées avec cet ordre d'affinité sont présentées en figure 5-5. On a porté x , titre ionique de chaque espèce en solution en fonction de T , paramètre de percolation. Les titres ioniques sont calculés pour une normalité de 5.7 méq/l. T est un nombre adimensionnel souvent employé pour le calcul de la position des fronts d'après la théorie de l'équilibre [TONDEUR 1969 ; TONDEUR et BAILLY 1986]. Il est défini par :

$$T = \frac{\text{nombre d'équivalents passés à l'abscisse } z \text{ au temps } t}{\text{capacité d'échange de la colonne en amont de } z} \quad (3)$$

$$\text{ici } z \text{ désigne la sortie de la colonne, donc } T = \frac{C(V - v\varepsilon)}{\text{capacité totale}} \quad (4)$$

avec C : concentration ionique totale ($C = 5.7$ méq/l)

ε : porosité ($\varepsilon = 0.8$)

v : volume de colonne ($v = 13.5$ ml)

V : volume d'effluent

capacité totale : 0.35 méq

(quand $T = 1$, $V = 72.2$ ml).

Les variations de concentrations ont été calculées avec les valeurs suivantes :

$$\alpha_{NO_3}^{BSA} = 10 \text{ et } \alpha_{NO_3}^{Cl} = 1.2 .$$

On peut reconnaître successivement (Figure 5-5) :

- un palier de nitrate pur
- une transition dispersive nitrate-chlorure
- un palier nitrate-chlorure
- une transition stable nitrate-chlorure-albumine.
- un palier correspondant à la solution d'alimentation.

On constate un bon accord qualitatif avec les résultats expérimentaux de la figure 5-4, qui incluent des phénomènes hydrodynamiques et cinétiques ayant pour effet d'étaler les fronts, et qui ne sont pas pris en compte dans le calcul des courbes théoriques.

On observe bien :

- un palier de nitrate pur, dont la concentration est égale à celle du sodium,
- une transition nitrate-chlorure
- un maximum sur le chlorure qui témoigne de l'existence d'un palier intermédiaire ; on ne voit pas de palier sur le nitrate ni sur l'albumine, mais ce peut être une conséquence de la dispersion
- une seconde transition qui n'est pas très nette, mais la décroissance du chlorure après le maximum et la percée de l'albumine, franchement postérieure à celle du chlorure montrent bien son existence
- un palier correspondant à la solution d'alimentation.

En ce qui concerne cette expérience, on voit que la saturation de la colonne avec le mélange albumine-chlorure correspond bien en apparence à un échange ternaire classique. Par contre, pour les deux expériences précédentes, on ne peut pas se livrer à la même analyse, car les courbes de percée ont une allure quelque peu différente. On observe (Figures 5-2 et 5-3):

- un palier de nitrate pur (dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en albumine dans l'alimentation
- un front d'échange nitrate-albumine; la percée de l'albumine est immédiatement suivie (on peut même dire qu'elle est accompagnée) de celle du chlorure. Il n'y a apparemment pas de palier intermédiaire, la concentration en chlorure n'admet pas de maximum dans cette zone,
- un palier correspondant à la solution d'alimentation.

Il serait un peu délicat de conclure immédiatement sur le sens de ces expériences :

- soit on considère le chlorure comme une espèce échangeable, bien que sa concentration ne varie pas de la manière attendue, et l'on attribue ce comportement à des raisons d'écart à l'équilibre (limitations cinétiques, gêne stérique etc.).
- soit les chlorures sont liés d'une manière ou d'une autre à l'albumine, et "l'accompagnent" dans l'échange. Nous pencherions plutôt vers cette seconde explication a priori, d'autant plus que le calcul montre l'existence d'un rapport pratiquement constant entre les concentrations en protéine et en chlorure au cours de la percée de ces deux espèces (rapport

qui vaut environ 3.3 pour l'expérience 1 et 1.4 pour l'expérience 2 (ces valeurs différentes peuvent être expliquées par le fait qu'il ne s'agit pas du même lot d'albumine).

Régénération

Si on régénère la colonne avec des solutions salines de concentration élevées, on est confronté au problème déjà évoqué au paragraphe 1 : la protéine sera récupérée dans un faible volume de régénérant, mais on n'aura pas d'informations sur les variations de concentrations. Des exemples de courbes sont donnés en Annexe 5 (Figure A-5-2).

Pour être en mesure d'étudier ce qui se passe au cours de la régénération, nous sommes partis de l'idée suivante :

Prenons un cas simple où une colonne initialement en équilibre avec une solution contenant le seul anion A_1^- est alimentée par une solution contenant le seul anion A_2^- à 10 méq/l (ces anions n'étant impliqués dans aucune réaction autre que l'échange). C'est la normalité de la solution d'alimentation qui fixe la hauteur du palier de concentration en A_1^- , qui sera donc de 10 méq/l.

Lorsque la colonne est saturée en A_2^- , si on injecte une solution de A_1^- à 10 méq/l, on obtiendra en premier lieu un palier de A_2^- pur à 10 méq/l (quelle que soit la nature des transitions). Pour un échange comportant plusieurs constituants, c'est la même chose : la hauteur des paliers est fixée par la normalité de l'alimentation.

Ici, pour l'expérience 3 par exemple, le palier de nitrate pur a une hauteur de 5 méq/l environ. Que se passe-t-il si on régénère la colonne avec une solution de nitrate de potassium à 5 méq/l ?

La courbe ainsi obtenue est présentée en figure 5-6, page 186 (des courbes du même type ont été obtenues suite à l'expérience 1), et les régénérations suivantes en Annexe 5.

Bilans de matière et de charge

Si on calcule, de la même manière que pour la saturation, la charge nette de l'albumine en plusieurs points, on s'aperçoit qu'elle n'est plus de l'ordre de -8 à -12, mais de -25 à -30 en moyenne. De même, si on effectue un bilan de matière global sur cette expérience, on trouve :

NO_3^- fixé	0.206 ± 0.05 méq
Cl^- élué	0.070 ± 0.05 méq
BSA éluee	0.296 g (soit environ 13% de la quantité totale fixée)

Seule une faible fraction de la protéine est recueillie dans ces conditions. Si on effectue un bilan de charge en rapportant cette masse aux nombres de moles des autres anions échangés :

$$\begin{array}{rclcl} \text{Z (nombre de mole} & = & \text{nombre d'équivalents} & - & \text{nombre d'équivalents} \\ \text{de BSA éluée)} & & \text{de nitrate fixé} & & \text{de chlorure élué} \end{array}$$

On trouve $Z = -30$, ce qui confirme le bilan par point.

Autrement dit, il semble que la protéine sorte de la colonne sous une forme ionique différente de celle sous laquelle elle était entrée, sa charge nette ayant été multipliée par un facteur d'environ 3.

Variations de concentrations

Les variations de concentration dans l'effluent calculées avec le modèle d'équilibre, en utilisant le même ordre d'affinité que précédemment sont présentées en figure 5-7. On reconnaît successivement un palier de concentration en chlorure et albumine, déterminé par l'état initial de la colonne, une transition stable dans laquelle le chlorure s'annule, le nitrate perce et la concentration en albumine augmente, et enfin une transition très dispersive, où la concentration en albumine décroît jusqu'à s'annuler pour une valeur très élevée du volume ($T = 10$ hors figure).

Comparons avec les résultats expérimentaux (figure 5-6). Il faut exclure les volumes inférieurs à 20 ml environ, qui correspondent au balayage du volume mort de la colonne, préalablement rincée, c'est à dire à la mise à la normalité de l'alimentation. On observe entre 20 et 35 ml environ un palier en albumine et chlorure conforme aux prévisions, ensuite la concentration en chlorure décroît et s'annule, tandis que le nitrate perce. On ne voit pas la variation de la concentration en albumine qui devrait accompagner, ni le palier de nitrate et albumine qui devrait suivre. Pour les volumes supérieurs à 45 ml, on observe une croissance lente du nitrate et une décroissance lente de l'albumine, conformes à ce que prévoit la théorie.

En résumé, la théorie de l'équilibre permet de dégager certaines tendances du comportement du système, même si l'accord entre les courbes expérimentale et calculée n'est pas parfait. Ces différences peuvent être dues notamment à des limitations cinétiques, ou à des effets plus spécifiques à la protéine (changement de conformation par exemple).

Revenons sur la question du rôle du chlorure précédemment évoquée, et de sa liaison avec l'albumine. On voit sur la figure 5-6 que la concentration en chlorure s'annule, tandis que

celle en albumine décroît lentement (ici la concentration en chlorure ne suit plus celle en albumine). De plus, dans les autres régénérations, il n'y a pas de chlorure dans l'effluent. Autrement dit, il semble qu'une certaine quantité de chlorure accompagne la protéine dans sa fixation au cours de la saturation, et que ce chlorure soit élué facilement lors de la régénération. Il ne s'agit donc pas de chlorure lié "fortement" à l'albumine, mais plutôt de chlorure échangeable sur l'albumine, susceptible d'être éliminé ou bien remplacé par du nitrate lors de la régénération. On envisage ainsi un rôle échangeur d'ions de l'albumine elle-même.

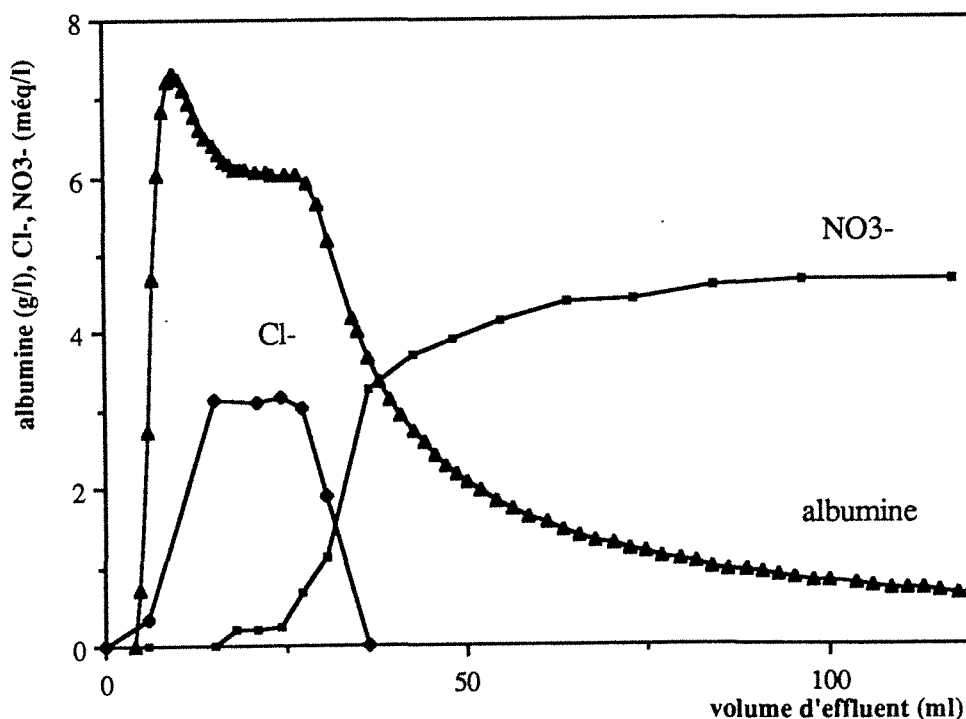


Figure 5-6 : Variations de concentrations expérimentales au cours de la régénération par KNO₃ 5 méq/l (DEAE Spheredex).

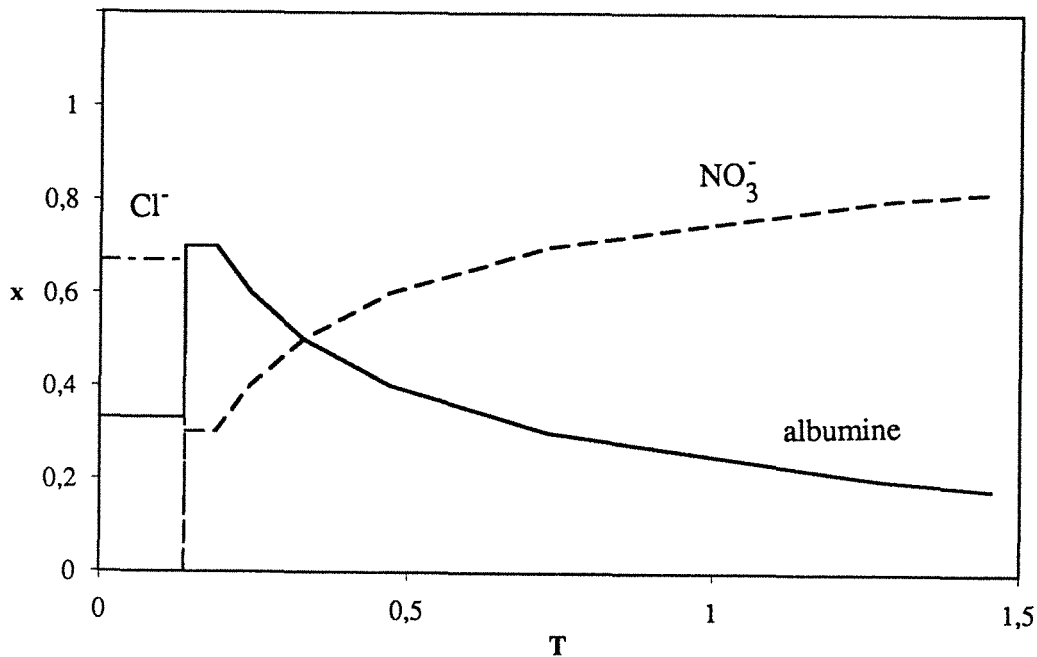


Figure 5-7 : Variations de concentrations calculées correspondant à l'expérience précédente (DEAE Spherox).

I-1.3 Proposition d'un mécanisme

Pour simplifier les schémas, on va supposer que l'albumine porte 5 charges négatives et 2 charges positives (sa charge nette est donc de -3), et que l'un des sites positif est compensé par un site négatif voisin, l'autre site positif par un ion chlorure et les quatre autres sites négatifs par des ions sodium (Figure 5-8). Certains des sites positifs sont compensés par des sites négatifs de la protéine, sinon il y aurait beaucoup plus de chlorure compensateur.

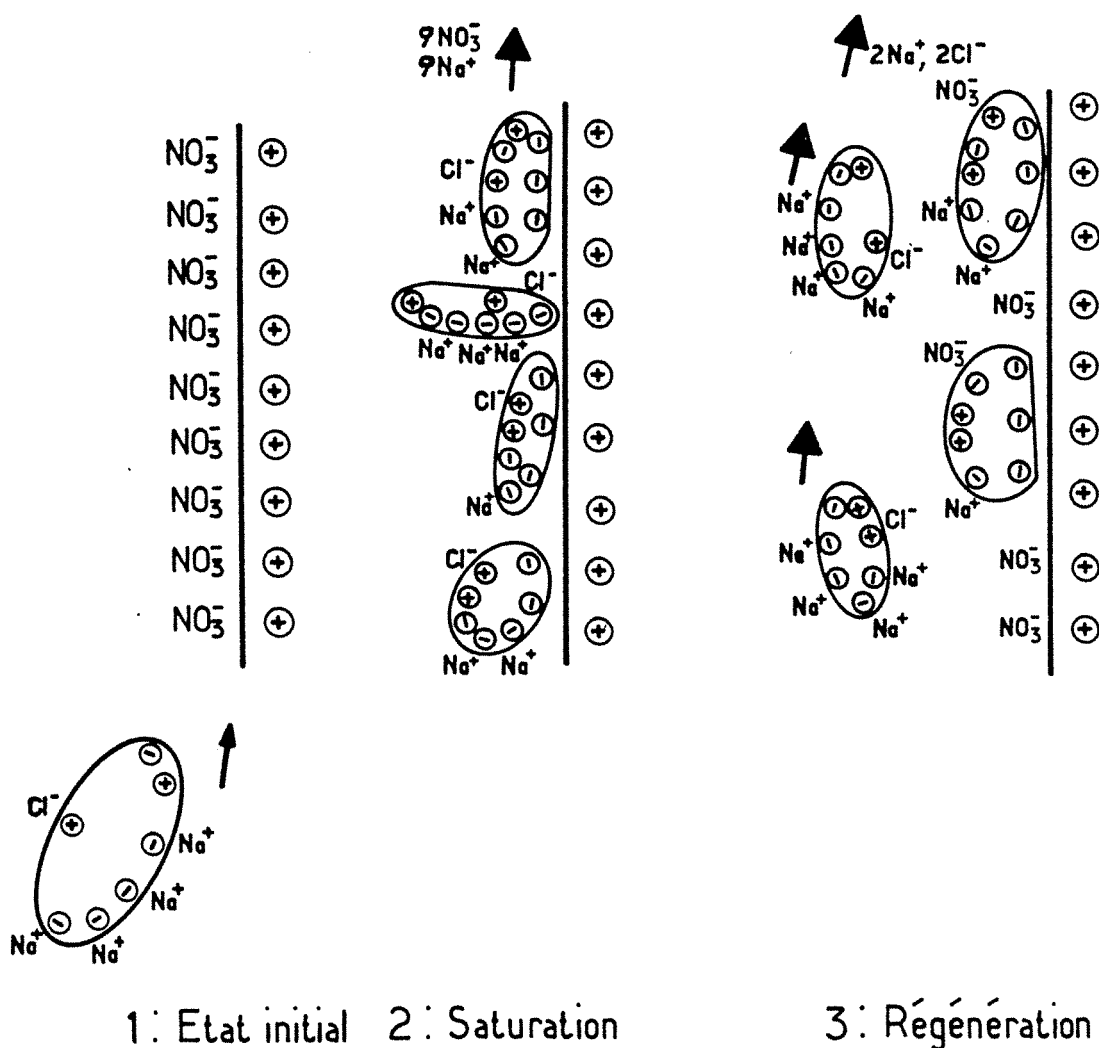


Figure 5-8 : Mécanisme possible de fixation de l'albumine sur échangeur d'anions faible.

- 1) Etat initial de la colonne** : les sites cationiques du support sont compensés par des ions nitrates. Entre alors l'albumine escortée de son cortège d'ions compensateurs chlorure et sodium.
- 2) Saturation** : les molécules de protéine se fixent sur les sites, tandis que sortent les ions nitrates. En moyenne, elles occupent un nombre de sites égal à leur charge nette, -3 (certaines sont liées à 4 sites, d'autres à 2, d'autres à 1 etc.). Les ions chlorure qui compensaient certaines des charges positives restent à leur place, a priori. Au rinçage, seules sont entraînées les molécules non fixées se trouvant dans le volume intersticiel.
- 3) Régénération** : Les molécules liées à un faible nombre de sites (1 ou 2 ici) sont éluées facilement mais les conditions ne sont pas assez fortes pour que les molécules liées à un nombre de sites plus important soient échangées. C'est pourquoi seule une fraction de protéine totale fixée est éluée. Les ions chlorures faiblement liés aux protéines sont entraînés et probablement remplacés par des ions nitrates.

Ce schéma indique un comportement possible de la protéine cohérent avec ce que l'on connaît au niveau des variations de concentrations dans l'effluent de colonne en régénération. Toutefois, il n'explique pas le changement de charge nette de l'albumine constaté entre la saturation et la régénération. Pour interpréter ce changement, nous proposons l'hypothèse suivante : il existe un certain nombre de groupes acides sur l'albumine susceptibles de se dissocier, en libérant un proton. De même, il existe sur le support échangeur d'ions des sites faibles qui ne sont pas ionisés au moment de la saturation. Sachant que les molécules de protéine subissent des transformations dans l'état adsorbé, on peut penser que certains groupes acides de la protéine libèrent un proton¹, donc que la charge nette de la protéine augmente,

- les H^+ ainsi libérés provoquent la protonation de sites ionisables du support échangeur d'anions faible

- une interaction s'établit entre les nouveaux sites ionisés et les "nouvelles charges" de la protéine,

Ceci est schématisé par la figure 5-9.

Remarque : on montre ici un cas où la charge nette est multipliée par 2, cela pourrait aussi bien être 3 ou plus. Il faut bien voir que les phénomènes schématisés sur la figure 5-9 et de la figure 5-10 se produisent simultanément. Ils ont été représentés séparément pour des raisons de clarté.

Validation

Le schéma proposé explique l'augmentation de la charge nette de l'albumine, en traduisant bien aussi que l'on n'observe pas de diminution de pH dans l'effluent : les H^+ libérés par la protéine n'apparaissent pas dans l'effluent, tout se passe à l'intérieur de la colonne. Pour valider ceci, il faudrait pouvoir, en une seule étape de régénération, éliminer toutes les molécules d'albumine (par exemple avec $NaNO_3$ 1 M), et mesurer la capacité effective de la colonne dans ces conditions, en quelque sorte prendre une photographie instantanée de l'état de la colonne.

¹ On ne fera pas d'hypothèse sur la nature des groupes qui se dissocient (à ce pH il est probable qu'il s'agisse des imidazoles). De toutes manières, quelle que soit la forme du groupe, $SH = S^- + H^+$ ou bien $SH^+ = S + H^+$, la dissociation a pour effet une augmentation de la charge nette de la protéine, provoquée soit par l'apport d'une charge négative S^- soit par la perte d'une charge positive SH^+ .

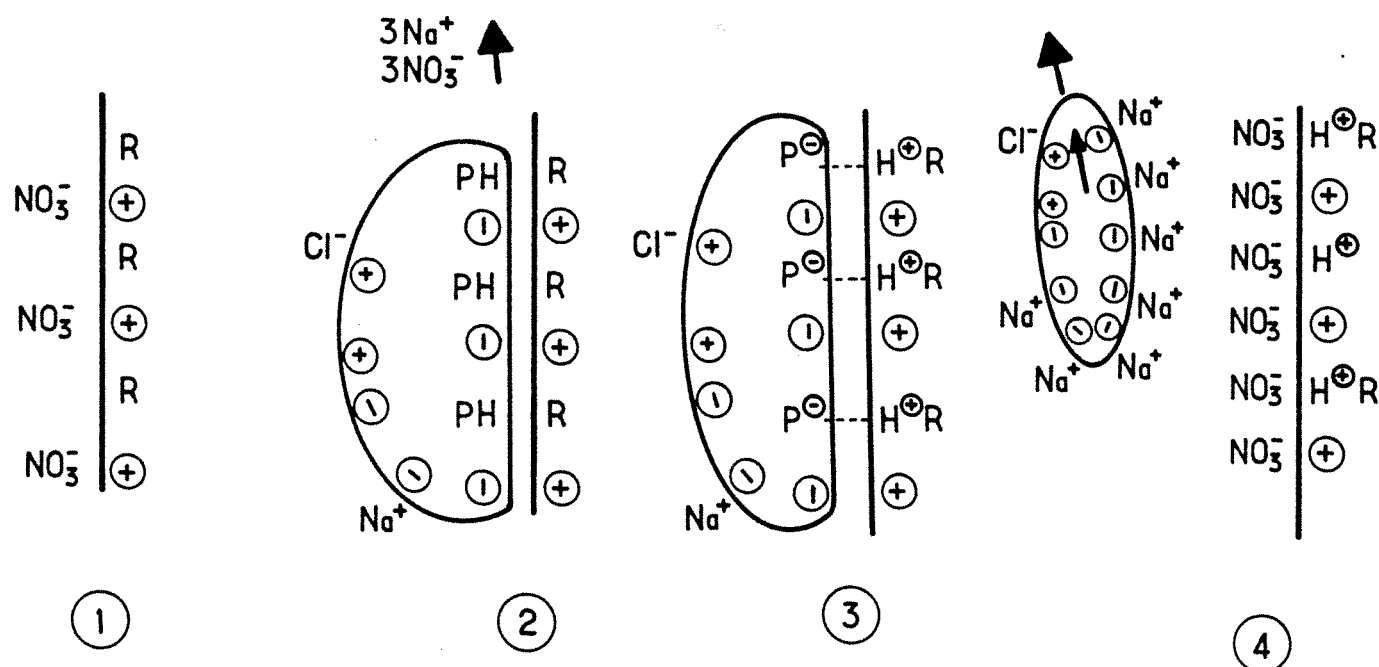


Figure 5-9 : Mécanisme de fixation de l'albumine, sur échangeur d'anions faible (complément).

- 1) 3 sites ionisés sur le support et 3 sites ionisables
- 2) une molécule de BSA avec une valence de -3 se fixe sur 3 sites
- 3) 3 groupes acides de la BSA se dissocient, et les 3 H⁺ libérés ionisent les 3 sites S du support, la BSA est alors fixée sur 6 sites
- 4) pour éluier la BSA, il faut apporter 6 ions nitrate, et la BSA sort de la colonne avec une charge nette de -6.

Malheureusement, cela ne semble pas possible en pratique. En effet, pour mesurer la capacité (en échangeant ensuite le nitrate par un autre anion) il faudrait d'abord éliminer le nitrate interstitiel, très concentré. Ceci nécessitera un rinçage abondant à l'eau, qui risque de modifier tous les équilibres (et donc la valeur de la capacité). Il ne nous semble pas possible de valider ce schéma simplement, uniquement par une opération de régénération, mais des

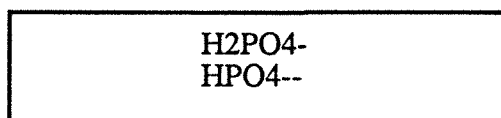
expériences sur support fort devront permettre de confirmer ou non le mécanisme proposé, pour le comportement de l'albumine propre.

I-1.4 Expériences en milieu tampon

Nous présentons ici une expérience de saturation réalisée en milieu tampon phosphate. Ce cas a l'avantage de s'approcher des opérations couramment effectuées en chromatographie des protéines, mais nous allons voir qu'il est plus complexe à interpréter, puisqu'interviennent plusieurs constituants échangeables (albumine phosphate mono et divalent), impliqués dans des réactions de dissociation (dissociation de l'eau, du tampon, des sites de l'albumine et de ceux du support).

La colonne est initialement en équilibre avec une solution tampon phosphate de potassium, 9.20 mM en phosphate total, pH 6.80, puis alimentée par une solution d'albumine 8.43 g/l dans un tampon à 9.65 mM en phosphate total, pH 6.85. Il n'y a pas de chlorure résiduel, car l'albumine a été dialysée au préalable contre du tampon.

BSA 8.43 g/l
phosphate total 9.65 mM
pH 6.85



DEAE Spherox LS (6 g sec)
colonne équilibrée par une solution de
tampon phosphate de potassium (9.20 mM
en phosphate, pH 6.80)
débit : 2.1 ml/min

Les courbes de percée en phosphate, albumine et potassium sont données en figure 5-10. Le pH n'est pas représenté car il garde la valeur 6.85.

Variations de concentration dans l'effluent

Etant donné que la colonne n'a pas été rincée, on observe un premier front vers 15 ml (volume mort) qui correspond à la mise à la normalité, au cours duquel les concentrations en phosphate total et potassium augmentent, la concentration en potassium reste ensuite constante. On voit après un plateau de phosphate pur, suivi d'une transition au cours de laquelle

l'albumine perce puis sa concentration augmente, tandis que celle en phosphate total diminue, pour parvenir à la composition de l'alimentation. (Nous n'avons pas calculé les contributions respectives en phosphate mono et divalent, puisque le pH reste constant, les deux concentrations doivent varier de la même façon). Ce front est suivi d'un plateau correspondant à la composition de l'alimentation.

Avec un seul front d'échange, les courbes de percée ressemblent tout à fait à celles obtenues au Chapitre 3 (Figure 3-16), lorsque la colonne (remplie de QMA Spherosil) était équilibrée en tampon phosphate, puis alimentée par un mélange chlorure-tampon phosphate. Dans ces conditions, l'albumine se comporte comme un ion de valence fixée. Ceci avait déjà été mis en évidence lors de la mesure d'isothermes (Chapitre 4), on avait remarqué que les points d'équilibre étaient assez peu dispersés lorsque l'albumine était en milieu tampon.

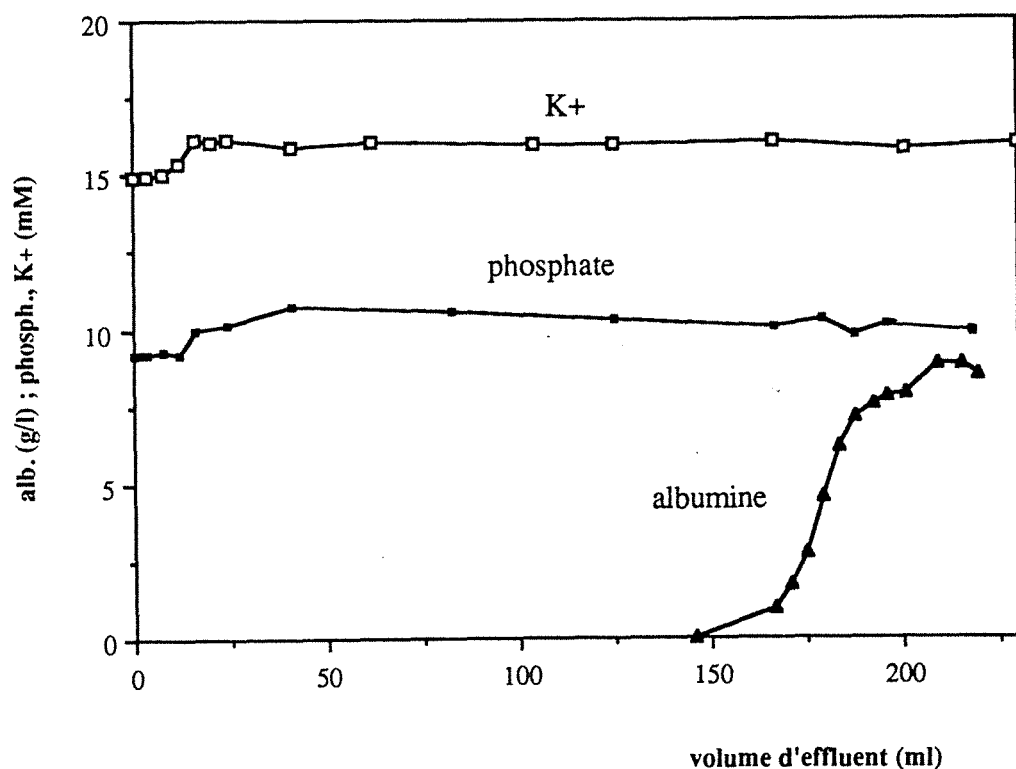


Figure 5-10 : Variations de concentrations dans l'effluent. Colonne équilibrée par une solution de tampon phosphate 9.2 mM, alimentée par une solution d'albumine 8.43 g/l en milieu tampon phosphate 9.65 mM (DEAE Sphero dex).

Bilans de matière et de charge

Un bilan sur l'albumine indique que la quantité fixée dans la colonne est de 1.38 ± 0.1 g, soit 0.230 g d'albumine par g de support sec. Cette valeur est de l'ordre de la capacité maximale obtenue par mesure d'isotherme : 0.254 g d'albumine/g de support sec.

Les points expérimentaux concernant le phosphate sont un peu trop dispersés pour calculer avec précision la quantité de phosphate libéré, celle-ci est assez faible, de l'ordre de 0.2 méq.

En ce qui concerne l'électroneutralité, il est difficile d'obtenir des résultats cohérents, car on se heurte toujours à des incertitudes importantes en effectuant des différences sur des valeurs du même ordre de grandeur.

Connaissant la concentration en phosphate total et le pH, on peut calculer les concentrations en phosphate mono et divalent, d'après la loi d'équilibre de dissociation. On doit pouvoir ensuite calculer la charge nette moyenne de l'albumine en solution d'après le bilan suivant :

$$(K^+) + (H^+) - (OH^-) - 2 (HPO_4^{2-}) - (H_2PO_4^-) + Z (BSA) = 0 \quad (5)$$

$$Z \approx \frac{-(K^+) + 2 (HPO_4^{2-}) + (H_2PO_4^-)}{(BSA)} \quad (6)$$

Si on applique ce bilan à la solution d'alimentation, on trouve $Z \approx -25$, ce qui est plus élevé en valeur absolue que la valeur habituelle ($Z \approx -12$). Mais on constate qu'une erreur de 10% sur la concentration en potassium par exemple fait varier considérablement cette valeur. En effet, avec $(K^+) = 14.20$ méq/l au lieu de 15.78, on trouve $Z \approx -13$.

Malgré la finesse des méthodes d'analyse employées, on trouve souvent un écart entre la normalité mesurée sur les anions et celle mesurée sur les cations, même sur une solution sans protéine. Lorsque la solution ne contient qu'un électrolyte fort, comme NaCl, on peut apporter quelques corrections, soit en prenant comme concentration la moyenne entre celles obtenues sur le sodium d'une part, sur le chlorure d'autre part, soit en considérant que l'une des mesures (plutôt celle en sodium) est plus fiable que l'autre. Lorsqu'on a plusieurs cations ou anions en présence, les erreurs s'ajoutent. Il apparaît souvent que la concentration en potassium est un peu surestimée par rapport à celle en phosphate. Par exemple pour la solution de prééquilibration, $(P) = 9.20$ mM à pH 6.80, ce qui donne $(HPO_4^{2-}) = 2.58$ mM et $(H_2PO_4^-) = 6.62$ mM. La somme $2 (HPO_4^{2-}) + (H_2PO_4^-)$ est de 11.8 méq/l, ce qui n'est pas égal à la

concentration en potassium. Autrement dit, il est un peu hasardeux d'effectuer des bilans d'électroneutralité sur l'albumine dans ces conditions.

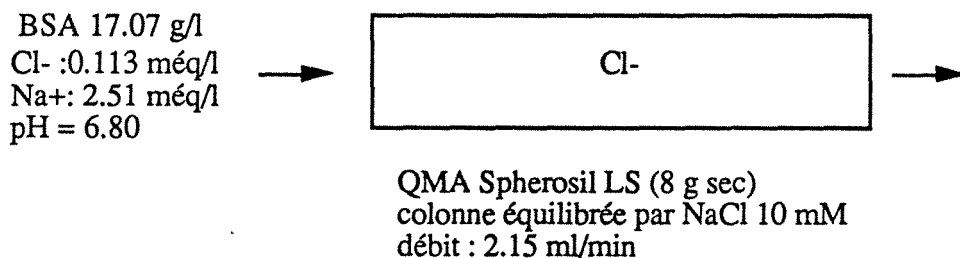
I-2 Expériences avec le support QMA Spherosil LS

Ce support est un échangeur d'anions fort, qui a l'avantage d'avoir une capacité d'échange constante. Nous allons présenter des expériences d'échange avec le système albumine-chlorure, puis avec le système ternaire albumine-chlorure-nitrate, et enfin avec l'albumine en milieu tampon phosphate.

I-2.1 Echange albumine-chlorure

Saturation

La colonne prééquilibrée par du chlorure de sodium, non rincée, est alimentée par une solution d'albumine 17 g/l .



Les courbes de percée sont présentées en figure 5-11.

Variations de concentration

Paradoxalement, elles sont plus complexes que dans le cas de support faible. Etant donné que la colonne n'a pas été rincée, on observe un premier front vers 15 ml (volume mort) qui correspond à la mise à la normalité.

Après le volume mort, on remarque que la concentration en sodium reste bien constante (elle indique la normalité totale, si le sodium est le seul cation présent, hormis H⁺, dont on peut négliger la contribution au voisinage de la neutralité). On observe une diminution du pH jusqu'à 4.1, un plateau très étroit de chlorure, suivi d'une augmentation de la concentration en chlorure, accompagnée de la percée de l'albumine.

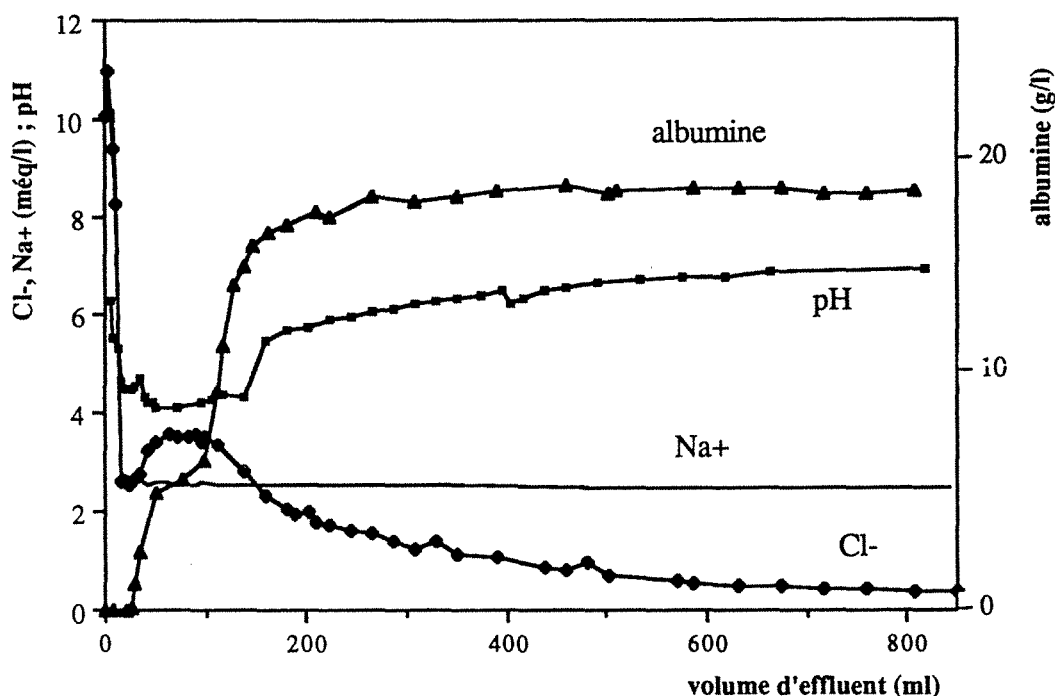


Figure 5-11 : variations de concentrations expérimentales dans l'effluent correspondant à la saturation (QMA Spherosil).

Cette transition est suivie d'un plateau où les concentrations en chlorure et albumine sont constantes. A ce niveau, il faut remarquer deux éléments importants :

- le pH est descendu à 4.1, ce qui est inférieur au point isoélectrique de l'albumine, donc celle-ci porte une charge nette positive en solution, elle est globalement cationique,
- la concentration en chlorure sur le plateau est supérieure à la concentration en sodium ; ceci est dû au fait que dans cette zone, le sodium n'est plus le seul cation présent, il faut tenir compte de la contribution de l'albumine et des protons, qui ne sont plus négligeables à ce pH. Le chlorure vient compenser l'augmentation de la concentration totale en cations, autrement dit, on assiste à une augmentation de la normalité.

On observe ensuite une transition le long de laquelle la concentration en chlorure diminue, celle en albumine croît, de même que le pH : l'albumine redevient anionique. Cette transition est très

dispersive, puisque le chlorure commence à décroître à partir d'un volume d'environ 100 ml, jusqu'à plus de 700 ml (soit plus de 50 volumes de pore). La protéine semble atteindre assez rapidement la concentration de la solution d'entrée, mais comme le pH ne cesse de croître lentement, et la concentration en chlorure de diminuer, la charge de la protéine évolue sans cesse.

En bref, le comportement du système albumine-chlorure est relativement complexe, et ne peut pas s'interpréter en assimilant la protéine à un anion simple. Par contre, cela ressemble tout à fait à un échange d'anions couplé à la dissociation de groupements acide, et concorde avec le mécanisme proposé au paragraphe I-3-4 (Figure 5-9) à propos des expériences sur le support faible. En effet, si le pH diminue, c'est parce que l'albumine se fixe en libérant des protons, mais comme il n'y a pas de sites ionisables sur le support, ces protons apparaissent dans l'effluent : ils provoquent une rééquilibration des molécules d'albumine en solution, dont le résultat global est une baisse du pH et une charge nette positive des molécules.

Bilans de matière et de charge

La quantité d'albumine retenue sur le support est de 1.57 ± 0.1 g soit 0.196 ± 0.01 g par g de support sec (soit environ 0.105 g/ml de lit fixe). Cette valeur est cohérente avec ce que l'on obtient par les isothermes (0.218 g par g de support sec), bien qu'elle soit un peu plus faible. La quantité de chlorure élué est de 1.07 ± 0.05 méq, soit environ la moitié de la capacité totale (voir Annexe générale). Une partie du chlorure resterait donc fixé dans la colonne.

En ce qui concerne l'électroneutralité, la charge nette de l'albumine dans la solution d'alimentation vaut -9.4 (ordre de grandeur habituel). Si on calcule cette charge en plusieurs points de l'effluent, on remarque qu'elle varie entre environ +15 et -8.5 (valeur vers laquelle elle tend à la fin, proche de la valeur obtenue pour la solution d'alimentation) et s'annule pour un pH compris entre 4.34 et 5.45. Etant donné les incertitudes sur les valeurs des concentrations, qui induisent des erreurs non négligeables sur le calcul de la charge, on peut juger ces résultats assez satisfaisants.

Si on rapporte la masse totale d'albumine retenue sur le support à la quantité de chlorure élué, on trouve qu'une molécule d'albumine est liée à environ 40 à 45 sites du support. Cette valeur est un peu plus importante que celle obtenue pour le support faible (25 à 30), mais néanmoins du même ordre de grandeur.

Si on considère que l'albumine occupe tous les sites, et qu'une partie du chlorure est restée fixée à la protéine, il faut rapporter la masse totale de protéine fixée à la capacité totale de la

colonne : et on trouve que les molécules de protéine sont chacune liées à environ 25 sites, ce qui correspond à la valeur trouvée pour le support faible.

Régénération

Plusieurs étapes de régénération sont effectuées (sans rinçage), avec les solutions suivantes : NaCl 3.5 - 10 - 50 - 100 - 500 méq/l suivies des opérations indiquées par le fabricant (NaCl 1M, HCl etc.).

Les courbes correspondant aux trois premières régénérations sont présentées en figure 5-12.

* Régénération 1 (NaCl 3.5 méq/l)

L'albumine sort sous forme d'un pic contenu dans les 15 premiers ml (volume mort), puis tend à s'annuler. Si on rapporte la quantité sortie (0.153 g) à la concentration en albumine de la solution d'alimentation, on obtient à peu près la valeur du volume intersticiel. Ceci indique que seule l'albumine contenue dans ce volume est sortie, il n'y a pratiquement pas de protéine échangée dans ces conditions.

* Régénération 2 (NaCl 10 méq/l)

Une très faible fraction de l'albumine fixée est éluée dans ces conditions (0.06 ± 0.01 g soit environ 4%). Les conditions ne sont pas assez fortes pour permettre l'échange.

* Régénération 3 (NaCl 50 méq/l)

Le calcul indique que 0.065 ± 0.05 g d'albumine sont élués, soit environ 41%. L'albumine restante est ensuite éliminée par des traitements plus sévères (augmentation de la force ionique jusqu'à 1N etc.).

Ces expériences montrent que la régénération est une opération qui nécessite des conditions relativement "fortes". Après élution d'une fraction probablement assez faiblement liée, il apparaît que l'albumine est de plus en plus difficile à éluer, comme si elle occupait de plus en plus de sites à mesure qu'elle se déplace dans la colonne. Par conséquent, le problème de la réversibilité de l'échange demeure en suspens.

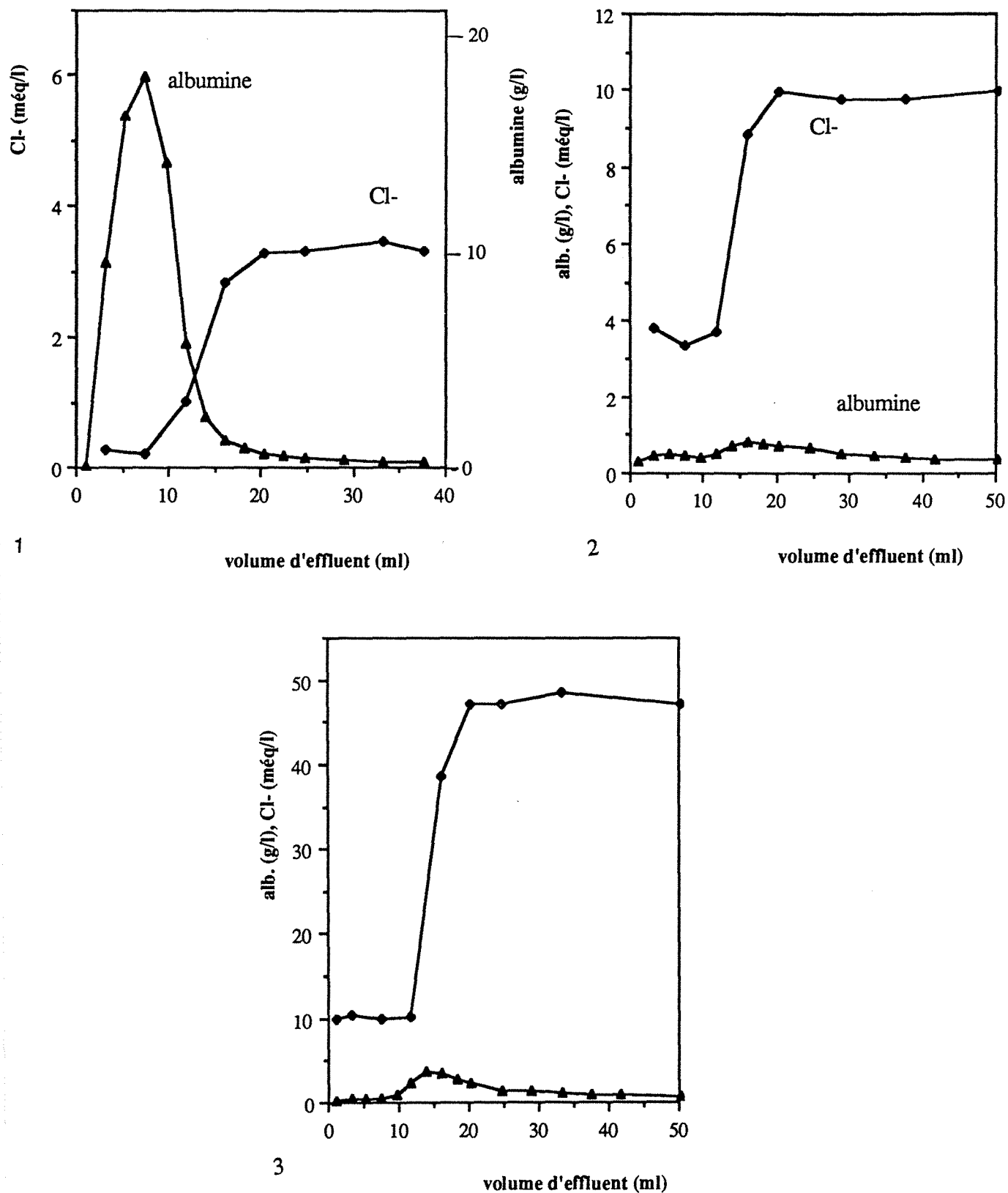


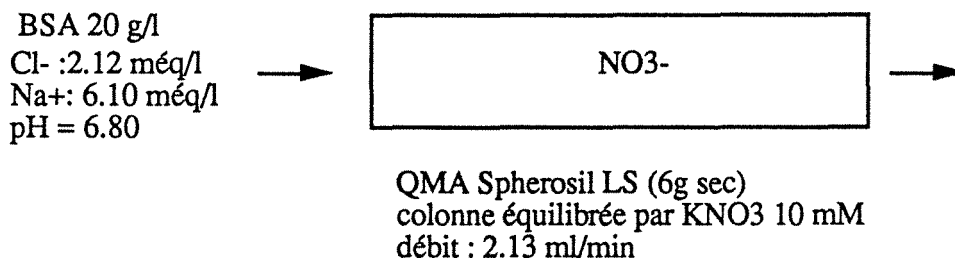
Figure 5-12 : Régénération de la colonne (QMA Spherosil) saturée en albumine.

1 : NaCl 3.5 mEq/l ; 2 : NaCl 10 mEq/l ; 3 : NaCl 50 mEq/l.

I-2.2 Echange albumine-nitrate-chlorure

Saturation

La colonne est prééquilibrée par une solution de nitrate de potassium, rincée, puis alimentée par un mélange albumine (20 g/l) - chlorure de sodium (2 méq/l) .



Les courbes de percée sont présentées en figure 5-13.

Variations de concentration

Il s'agit du même type de comportement que pour l'expérience précédente. Après le volume mort, on observe les phénomènes suivants :

- la concentration en sodium reste constante,
- il y a d'abord un plateau de nitrate pur (plus marqué que le plateau de chlorure du cas précédent), suivi d'une transition au cours de laquelle la concentration en nitrate augmente et l'albumine apparaît. On a ensuite un palier nitrate-albumine, pour lequel la concentration en nitrate est supérieure à celle en sodium, puis une transition le long de laquelle la concentration en albumine croît, tandis que décroît celle en nitrate.
- Le chlorure perce apparemment plus tard (si la percée a lieu plus tôt, c'est de manière tellement dispersée que l'on ne peut pas avoir accès aux premiers points, en raison des faibles valeurs de concentration).
- Le pH n'a pas été mesuré, en raison de problèmes pratiques.

Nous avons arrêté l'expérience en nous basant sur la concentration en albumine, mais il apparaît que l'équilibre n'est pas atteint puisque le nitrate ne s'est pas annulé et que le chlorure n'a pas encore la valeur de la solution d'alimentation (et probablement le pH non plus).

Bilans de matière et de charge

Un bilan d'électroneutralité sur la solution d'alimentation indique que l'albumine porte une charge nette d'environ -13, ce qui est bien de l'ordre de grandeur de ce que l'on obtient habituellement (de -8 à -12).

Le même calcul effectué en plusieurs points montre que la charge nette varie entre +12 et -8.5, valeur vers laquelle elle tend pour les derniers points. Si l'expérience avait été poursuivie, la charge aurait continué à croître en valeur absolue, pour tendre vers la valeur de la solution d'alimentation.

Un bilan de matière global sur l'expérience (entre 0 et 280 ml) donne les résultats suivants:

NO_3^- élué	1.68 ± 0.05 méq
Cl^- fixé	0.42 ± 0.05 méq
BSA fixée	1.52 ± 0.1 g

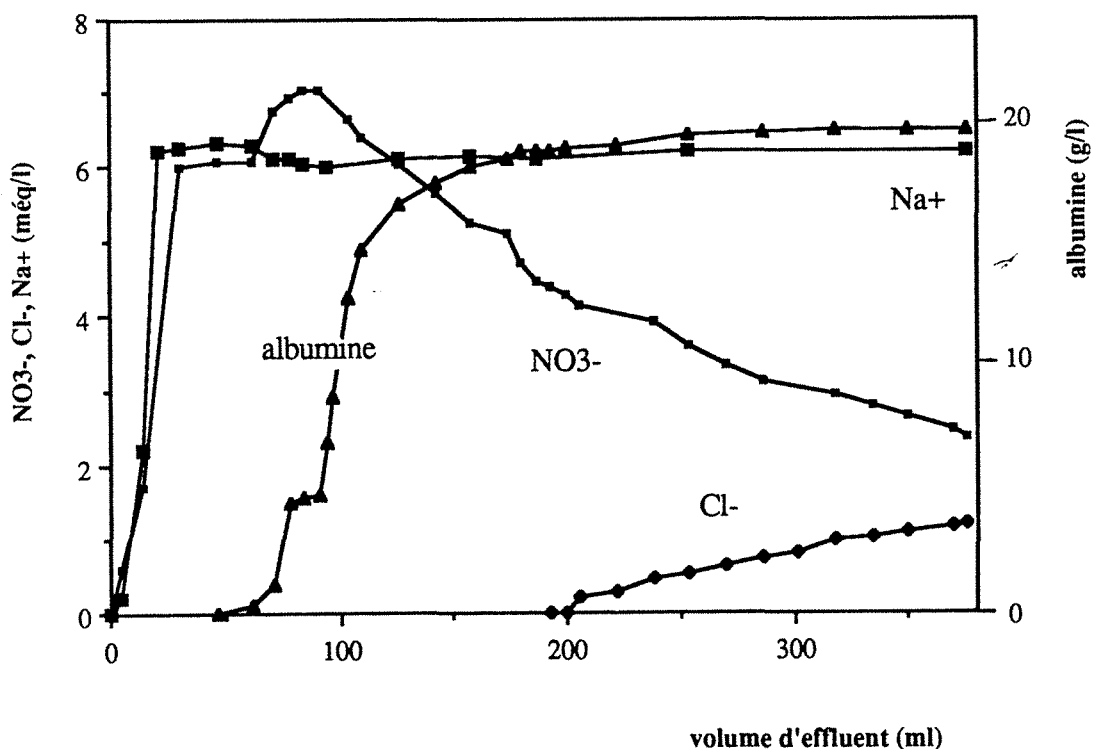


Figure 5-13 : Variations de concentrations dans l'effluent. Colonne équilibrée par KNO_3 10 mM, alimentée par une solution BSA 20g/l, Cl^- 2.1méq/l (QMA Spherosil).

Le calcul du nombre moyen de sites impliqués dans la liaison entre une mole d'albumine et le support donne 55, valeur supérieure à celle obtenue au cours des expériences précédentes, mais du même ordre de grandeur (correspondant environ à 4 fois la charge nette).

Régénérations

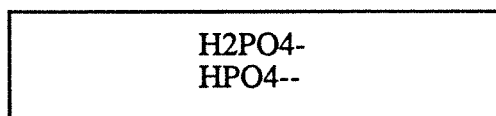
Des régénérations ont été effectuées avec du nitrate de potassium 5 - 50 méq/l, puis 1 N.

I-2.3 En milieu tampon phosphate

Saturation

La colonne est préalablement équilibrée par une solution de tampon phosphate de potassium, puis alimentée par une solution d'albumine préparée dans ce tampon.

BSA 22.3 g/l
K⁺: 16.6 méq/l
Na⁺: 0.65 méq/l
Phosphate total: 9.04 mM
pH = 6.82



QMA Spherosil LS (8 g sec)
colonne équilibrée par une solution de
tampon phosphate de potassium (10 mM)
débit : 2.13 ml/min

Les courbes de percée sont représentées en figure 5-14.

Variations de concentrations

Qualitativement, les courbes de percée ressemblent tout à fait à celles obtenues lorsque la colonne était prééquilibrée par une solution de tampon phosphate de potassium et alimentée par un mélange tampon phosphate-chlorure de potassium.

Au niveau du volume mort, on assiste à une augmentation de la concentration en potassium et en phosphate total, suivie d'un palier. Ensuite a lieu une transition au cours de laquelle l'albumine perce, tandis que décroît la concentration en phosphate total. Cette transition est beaucoup plus dispersée que pour le système phosphates-chlorure. Le pH reste constant tout au long de l'expérience.

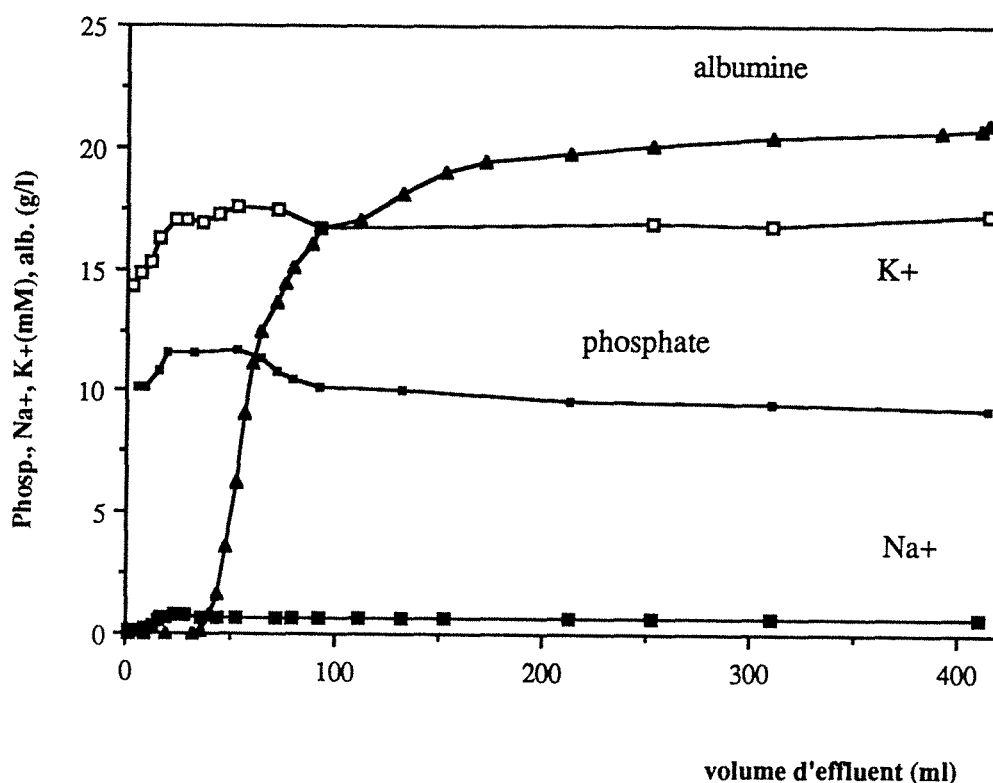


Figure 5-14 : Variations des concentrations dans l'effluent. Colonne équilibrée par un tampon phosphate (10 mM), alimentée par une solution d'albumine 22.3g/l en milieu tampon phosphate (9 mM). (QMA Spherosil).

Contrairement aux saturations effectuées en milieu non tamponné (albumine-chlorure et/ou nitrate), on n'observe pas de palier intermédiaire sur la courbe de percée de l'albumine, ni de chute de pH. Ceci s'explique par l'effet tampon du phosphate qui "absorbe" en quelque sorte les protons libérés, maintient le pH constant, et stabilise ainsi l'état d'ionisation de l'albumine.

Bilans de matière et de charge

Un bilan de charge calculé en plusieurs points de la courbe montre que la charge nette de l'albumine est partout négative, et qu'elle tend vers une valeur de -17 à -19, ce qui est plus élevé en valeur absolue que les valeurs précédemment obtenues (-8 à -12). Comme il a été montré en I-1.4, les valeurs de la charge nette moyenne de l'albumine sont très sensibles aux

incertitudes, d'autant plus que le nombre d'ions en présence augmente, et étant donné une incertitude sur le potassium et/ou le phosphate.

Un bilan de matière global donne les résultats suivants :

BSA fixée :	$1.84 \pm 0.1 \text{ g}$
Phosphate élué :	$0.350 \pm 0.05 \text{ mM}$

On ne sait pas sous quelle forme ionique le phosphate était fixé, on peut considérer les deux cas extrêmes où il s'agit soit uniquement de monovalent, soit uniquement de divalent, ce qui donne un nombre de liaisons compris entre 13 et 26 par mole d'albumine.

Régénérations

Nous présentons deux régénérations effectuées en injectant successivement un échelon de chlorure de sodium 25 puis 50 mM (Figure 5-15).

En ce qui concerne la première régénération, on observe un premier front vers 15 ml, dû à la mise à la normalité : la concentration en phosphate total augmente, l'albumine intersticielle est éliminée. Il est probable que ce front soit confondu avec un front d'échange (sinon l'albumine s'annulerait rapidement, alors qu'ici on observe une traînée). Après le plateau, a lieu une transition au cours de laquelle le phosphate s'annule, tandis que perce le chlorure. Autrement dit, cette régénération a permis d'éliminer une fraction de l'albumine fixée (environ 0.32 g, soit 17%), mais surtout la totalité du phosphate fixé, qui a été échangé contre du chlorure.

Ceci est confirmé par la seconde régénération, où l'on observe un front de mise à la normalité (vers 15 ml) suivi d'un très court plateau, et d'un front d'échange albumine - chlorure. La concentration en albumine décroît de manière très dispersive, et ne s'annule pas. La quantité d'albumine élue à la fin de l'expérience n'est que de 8%.

A la fin de ces expériences, la majeure partie de l'albumine est encore fixée dans la colonne. De nouveau, des opérations menées dans des conditions plus sévères seront nécessaires à la régénération de la colonne.

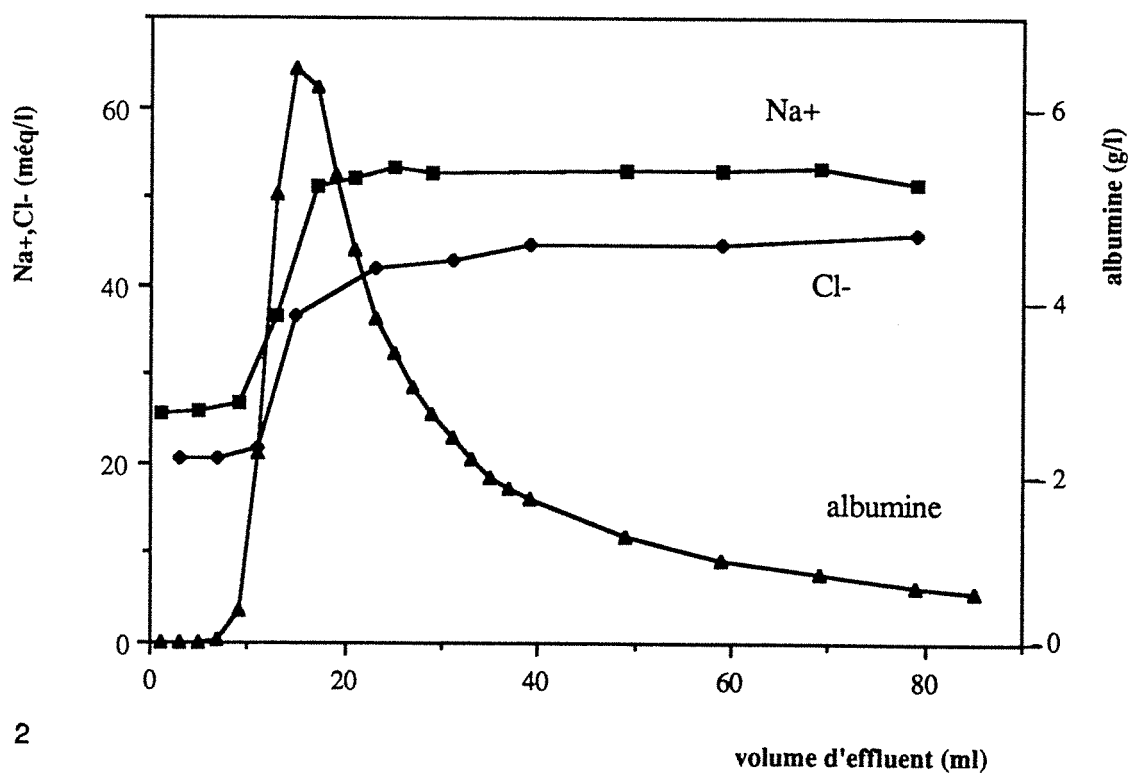
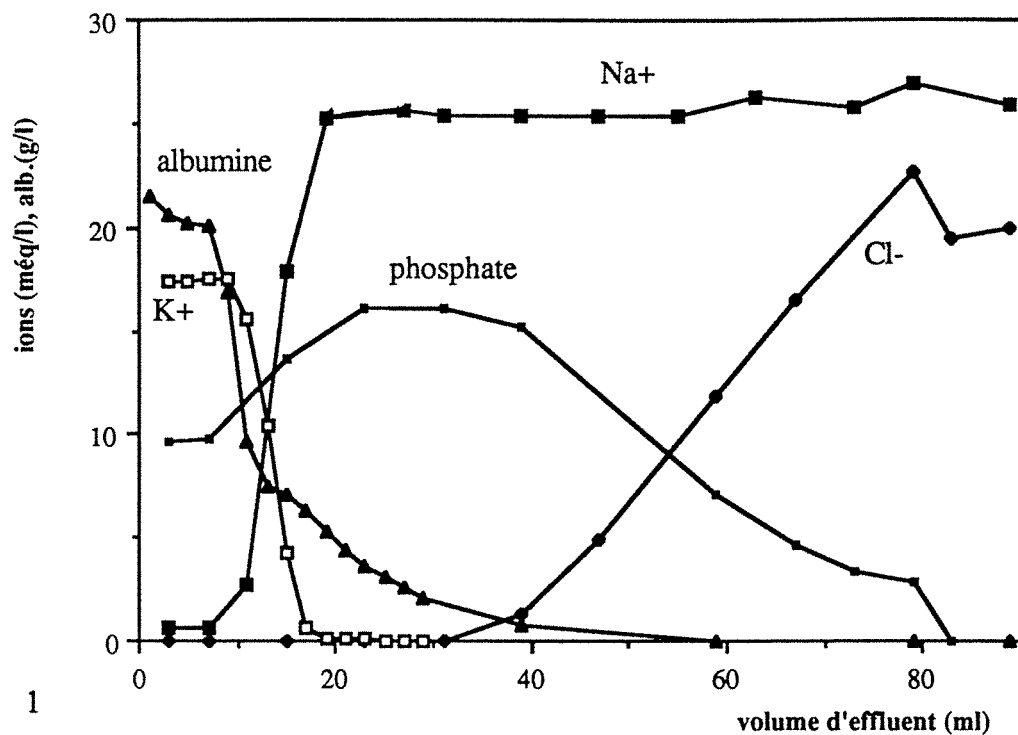


Figure 5-15 : Régénérations du support saturé par une solution albumine-tampon phosphate (QMA Spherosil). 1 : NaCl 25 mM ; 2 : NaCl 50 mM.

II. VERS UN MODELE DE L'ALBUMINE EN TANT QU'ESPECE ECHANGEABLE

A l'aide de ce qui a été observé au cours des expériences en colonne, nous allons proposer un modèle simple de l'albumine en tant qu'espèce échangeable. Ce modèle constitue une première approche, et a pour objet la représentation des principales tendances.

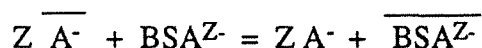
II.1 Eléments de base

La première partie du Chapitre 4 était consacrée à l'élaboration d'un modèle de l'albumine au niveau acido-basique (en l'absence d'échangeur d'ions). Nous avons conclu que la protéine était assimilable à une espèce comportant des sites ionisables, pouvant être classés en cinq groupes². Chaque groupe était constitué d'un certain nombre de sites identiques, indépendants, ayant la même constante d'acidité, K_i $1 \leq i \leq 5$.

Les expériences en colonne échangeuse d'anions ont apporté des informations sur l'albumine en tant qu'espèce échangeable. L'étude des variations des concentrations dans l'effluent, ainsi que le calcul de bilans de matière et de charge ont permis de proposer un mécanisme représentant l'échange (I-2.1). Le point-clé de ce mécanisme repose sur l'observation d'un changement de la charge nette moyenne de la protéine entre les étapes de saturation et de régénération. Autrement dit, dans les conditions de l'expérience, il apparaît que l'albumine se comporte de manière analogue à celle d'un électrolyte faible. L'échange d'ions est alors couplé à une réaction de dissociation en phase liquide.

Nous allons chercher à écrire ceci dans le cadre d'un modèle d'équilibre. Pour cela, il faut être capable de construire un schéma réactionnel décrivant le système. Se pose alors le problème suivant : *comment représenter l'albumine et écrire la réaction d'échange d'ions ?*

Il vient immédiatement à l'esprit une relation stoechiométrique du type :



Mais cette relation ne permet pas de rendre compte du changement de charge nette. Pour remédier à cela, on pourrait la coupler à une ou plusieurs dissociations :



² On rappelle que ces groupes contiennent des sites acides faibles, dont les couples acides-bases sont respectivement de la forme S_1H/S_1^- ; S_2H^+/S_2 ; S_3H^+/S_3 ; S_4H/S_4^- ; S_5H^+/S_5 .

Mais ceci aurait plusieurs inconvénients, notamment :

- il faudrait écrire Z relations de dissociation ainsi que Z réactions d'échange pour parvenir à obtenir une protéine dont la charge nette est multipliée par deux ; ceci conduirait à un schéma réactionnel très complexe, avec au moins 2 Z paramètres inconnus (constantes de dissociations et sélectivité des échanges).
- les lois d'action de masse utilisées comporteraient des exposants égaux à Z ou plus, ce qui pose des problèmes de calcul.

En vertu du modèle d'albumine présenté au Chapitre 4, nous proposons l'approche présentée ci-dessous, qui consiste à écrire l'échange non plus entre une molécule d'albumine et Z anions, mais entre un site anionique de l'albumine et un anion.

Examinons la figure 5-16, elle indique les domaines de prédominance des formes ioniques des groupes faibles de l'albumine en fonction du pH, jusqu'à un pH d'environ 10. Par exemple, pour $pH \ll pK_1$, les éléments du groupe 1 se trouvent sous forme S_1H , ceux du groupe 2 sous forme S_2H^+ , etc. Les expériences en colonne ont été effectuées entre pH 6.5 et 7.0 environ, ce qui correspond au domaine où seule a lieu la dissociation des groupes S_2H^+ . Autrement dit, dans cette région, la situation est la suivante :

Groupes	Forme prédominante	Nombre par mole d'albumine
1	S_1^-	99
2	$(S_2H^+ = S_2 + H^+)$	17
3	S_3H^+	59
4	S_4H	19
5	S_5H^+	23

Pour une mole d'albumine, tous les sites ont une forme ionique fixée à l'exception de ceux du groupe 2. La charge nette se calcule par :

$$Z = - 99 + (\text{nombre de } S_2H^+) - 59 - 23 \quad (\text{par mole d'albumine}) \tag{7}$$

- soit $Z = 0$ si aucun S_2H^+ n'est dissocié,
 $Z = - 1$ si 1 site S_2H^+ est dissocié,
 $Z = - 2$ si 2 sites S_2H^+ sont dissociés etc.

Z peut ainsi varier de 0 à -17.

Ainsi, chaque fois qu'un groupe S_2H^+ se dissocie, la charge nette moyenne augmente d'une unité en valeur absolue. A partir de ces observations, dans le domaine de pH considéré, on suggère de représenter l'albumine par **une espèce fictive SH**, qui se dissocie selon : $SH = S^- + H^+$.

La constante d'acidité de cette espèce est égale à celle de sites du groupe 2 de l'albumine, soit $2.78 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$.

Pour une solution d'albumine de concentration C (en g/l), correspond la solution de concentration totale en espèce S : $(SH) + (S^-) = 17 \times \frac{C}{67\,000} \text{ (mol/l)}$. (8)

On écrira alors l'échange entre un anion et un S^- .

Evidemment, ce modèle ne propose pas une représentation du comportement de l'albumine dans sa globalité ; il s'agit essentiellement d'une vue schématique, qui va néanmoins permettre la construction d'un schéma réactionnel.

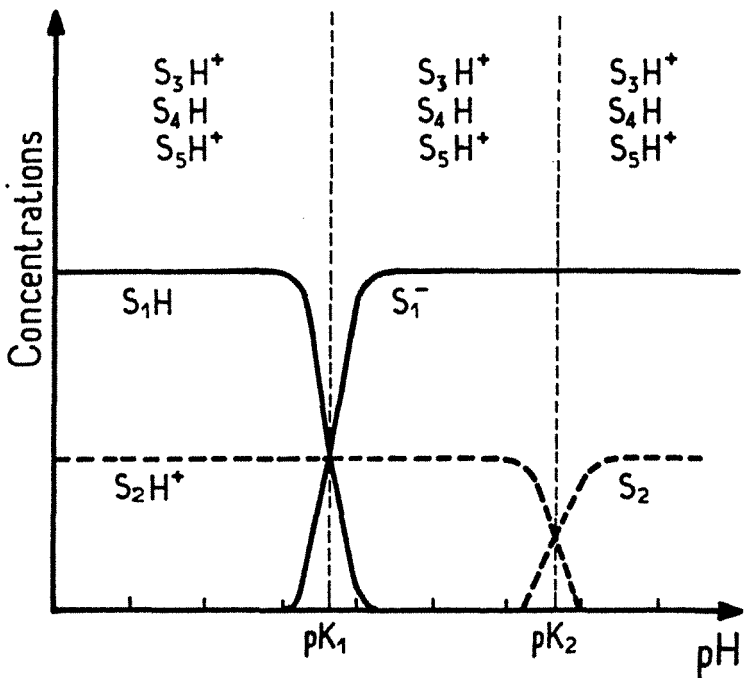


Figure 5-16 : Diagramme de prédominance des groupements acido-basiques de l'albumine en fonction du pH.

II.2 Simulation de l'échange chlorure-albumine sur support fort

Prenons par exemple le cas d'un échange chlorure-albumine sur échangeur fort (I-2.1), les espèces présentes sont les suivantes :

- en phase liquide : l'albumine représentée par SH/S^-
 Cl^- , Na^+ , OH^- , H^+
- en phase solide : S^- , Cl^- (on néglige OH^-)

avec les lois d'équilibre associées :

$$K_e = (\text{H}^+) (\text{OH}^-) \quad (9)$$

$$K_a = \frac{(\text{S}^-) (\text{H}^+)}{(\text{SH})} \quad (10)$$

$$K_{\text{S,Cl}} = \frac{(\text{S}^-)}{(\text{S}^-)} \frac{(\text{Cl}^-)}{(\text{Cl}^-)} \quad (11)$$

En supposant K_a connu, ainsi que $(\text{SH}) + (\text{S}^-)$, il reste le seul paramètre inconnu $K_{\text{S,Cl}}$.

Utilisons ce schéma réactionnel pour décrire l'expérience (I-2.1), qui est un cas simple a priori, celui d'un échange binaire sur support fort (QMA Spherosil). La colonne était équilibrée par une solution de chlorure de sodium 10 mM, alimentée par une solution d'albumine 17.07 g/l, contenant également du chlorure et du sodium $(\text{Na}^+) = 2.51 \text{ méq/l}$, $(\text{Cl}^-) = 0.113 \text{ méq/l}$, $\text{pH} = 6.80$.

Conditions du calcul :

Calculons la composition de la solution d'alimentation correspondante, ainsi que l'état initial de la colonne :

* Composition de la solution d'alimentation :

D'après l'équation (8), on calcule la quantité

$$(\text{SH}) + (\text{S}^-) = 17.07 \times \frac{17}{67\,000} = 4.33 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

D'après l'électroneutralité en solution :

$$(\text{Na}^+) + (\text{H}^+) = (\text{Cl}^-) + (\text{OH}^-) + (\text{S}^-) \quad (12)$$

$$\text{soit } (S^-) \approx (Na^+) - (Cl^-) \quad (13)$$

$$(S^-) = 2.40 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}^3$$

$$(SH) = 1.93 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$$

Si on ajuste la constante d'acidité K_a sur ces valeurs, connaissant le pH, on trouve :

$$K_a \approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$$

c'est à dire pratiquement la valeur de K_2 (la moyenne calculée au Chapitre 4 pour cette constante était de $2.78 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$).

On connaît ainsi la composition de la solution d'alimentation.

* Etat initial de la colonne :

La capacité totale de la colonne est de 2.15 méq (résultat expérimental, obtenu d'après un échange chlorure/nitrate), pour 8 g de Spherosil pesé sec. Considérons que 8 g de Spherosil occupent $8 \times 2.25 = 18 \text{ ml}$ de colonne, avec une porosité de 80% ; le volume poreux est de 14.4 ml, la capacité totale ramenée au volume de phase liquide vaut par conséquent 0.149 éq/l de phase liquide.

Le calcul de l'expérience dans ces conditions conduit aux courbes de percée présentées en figures 5-17 et 5-18, calculées avec $K_{S,Cl} = 1$ (Impact). (La figure 5-18 se déduit de la figure 5-17 en ajoutant (SH) et (S^-)).

On observe :

- au niveau du volume mort, la mise à la normalité (chute de la concentration en chlorure), accompagnée d'une décroissance du pH, ainsi que la percée de l'espèce neutre SH,
- un plateau de chlorure,
- un front d'échange Cl^-/S^- ,
- un plateau correspondant à la composition de l'alimentation.

On peut remarquer que :

- la hauteur du palier en chlorure est déterminée par la concentration en S^- dans l'alimentation,
- le rapport entre les hauteurs de paliers entre SH et S^- (à pH constant) permet d'accéder à la constante d'acidité du couple SH/ S^- ,
- la largeur du palier de chlorure est fixée par la capacité totale de la colonne,

³ Si on recalcule à partir de (S^-) la charge nette moyenne de l'albumine, on obtient $Z \approx -9.5$, ce qui est correct.

- le caractère compressif/dispersif du front est déterminé par la valeur de la constante $K_{S,Cl}$.

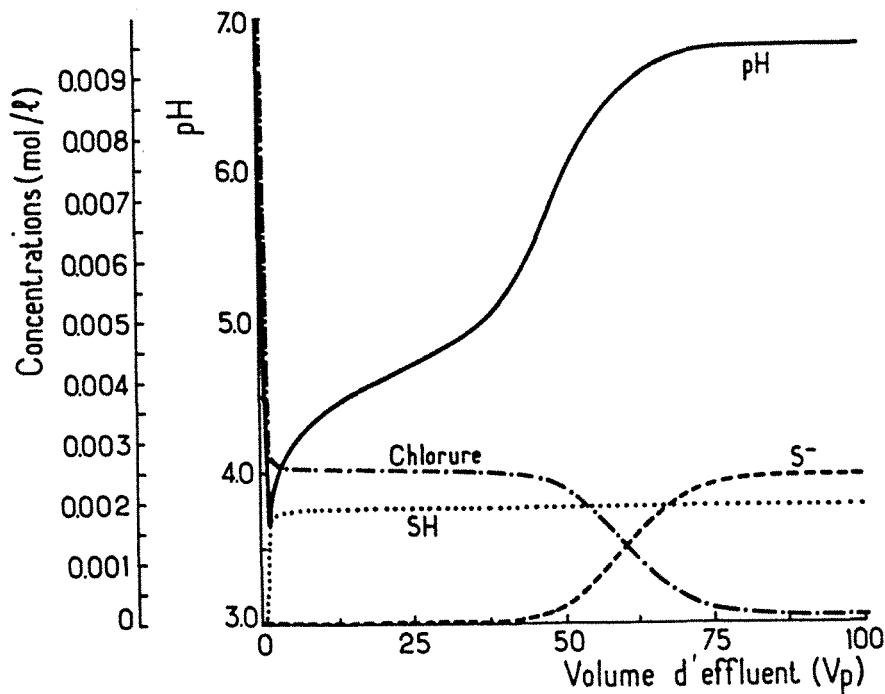


Figure 5-17 : Variations calculées des concentrations en Cl^- , SH, S^- et du pH dans l'effluent correspondant à l'expérience présentée en I-2.1 (échange chlorure-albumine sur QMA Spherosil).

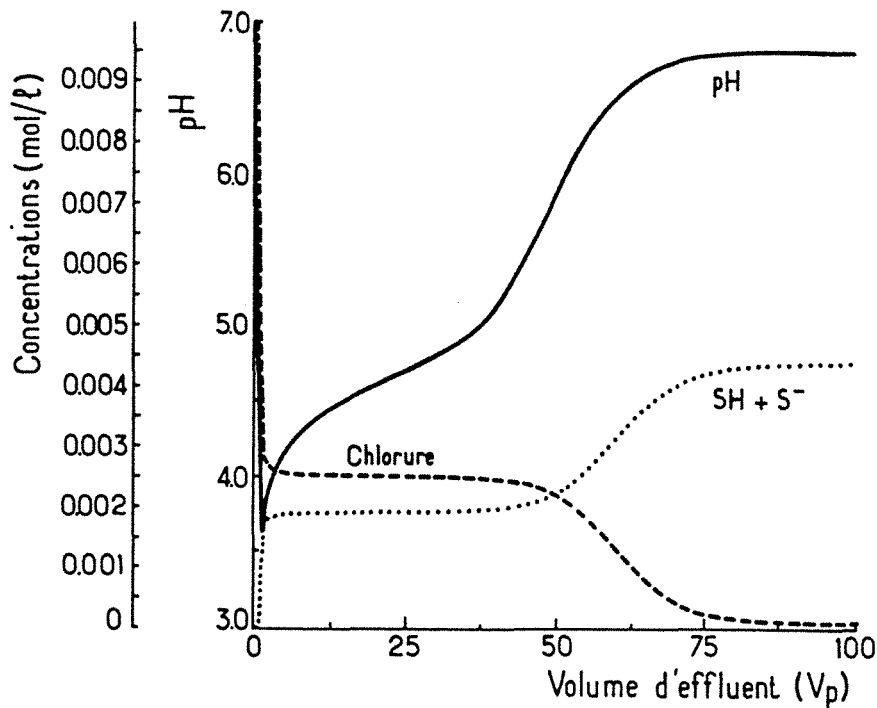


Figure 5-18 : Variations calculées des concentrations en Cl^- , SH + S^- et du pH dans l'effluent correspondant à l'expérience présentée en I-2.1 (échange chlorure-albumine sur QMA Spherosil).

Comparaison modèle-expérience :

Si on compare à la courbe de percée expérimentale (Figure 5-11), on s'aperçoit que toutes les tendances ne sont pas reflétées :

- Contrairement à l'espèce SH, l'albumine ne perce pas au volume mort. Cette percée de SH est bien sûre inhérente au modèle, il faudrait exprimer que SH n'est pas indépendante de S^- , au niveau du transport dans la colonne, car appartenant à la même molécule.
- Il existe sur la courbe expérimentale un premier front qui correspond à l'augmentation de la concentration en chlorure, qui n'apparaît pas dans les courbes calculées.
- De même, il n'est pas possible de rendre compte du changement de signe de la charge nette de l'albumine.

Toutefois,

- on fait bien apparaître la chute de pH, qui se produit généralement lors d'un échange couplé à une dissociation,
- on montre bien l'évolution de la concentration en albumine avec un palier intermédiaire.

Conclusion

En résumé, ce modèle fait apparaître certaines tendances, mais ne permet pas encore d'expliquer tous les phénomènes. Nous nous bornons à l'appliquer sur cet exemple, car les autres cas (support faible, présence d'ions nitrates ou de tampon phosphate) impliquent l'addition d'équilibres supplémentaires, avec des paramètres plus ou moins connus.

Si cette approche constitue une première base, elle nécessite néanmoins quelques améliorations. Nous proposons pour cela les perspectives suivantes :

On peut garder la même démarche générale, mais en utilisant un couple acide-base S_2H/S_2^{2-} . Ceci doit permettre de rendre compte du fait que la percée de l'albumine ne se produit pas au volume mort. Si on calcule la contribution de chacune des espèces au niveau de la solution d'alimentation d'après l'équation d'électroneutralité, la cohérence sur K_a n'est plus respectée (on obtient un K_a de l'ordre de 10^{-8}). De plus, on introduit deux paramètres pour l'échange d'ions. Les calculs que nous avons effectués ne nous ont pas encore fournis de résultats satisfaisants.

Une autre démarche (plus complexe à mettre en oeuvre), consisterait à modifier le programme de calcul d'équilibre comme suit :

- la protéine serait représentée par un ensemble de cinq groupes de sites ionisables (cf Chapitre 4),
- l'équilibre en solution serait calculé à l'instant t ,
- de là, d'après toutes les concentrations en sites ionisables, la charge nette Z de la protéine serait déterminée,
- la composition de la phase solide serait alors calculée en considérant que l'échange d'ions a lieu entre une espèce fictive (la protéine) de charge Z et les ions de la solution,
- ensuite, la composition de la phase liquide serait de nouveau calculée etc.

On devrait être ainsi en mesure de représenter le changement de valence de la protéine. Toutefois, cette approche risque de poser quelques problèmes au niveau des calculs.

ANNEXE 5. : COMPLEMENTS SUR LA REGENERATION

Nous allons donner ici quelques exemples de courbes de régénération de la colonne saturée en albumine.

On présente tout d'abord un cas où la colonne (DEAE Spheroex) est régénérée à l'aide d'une solution NaCl 50 mM (Figure A-5-1). Cette opération suit la saturation présentée en figure 5-1. On constate que l'albumine peut ainsi être récupérée relativement concentrée, dans un volume très faible.

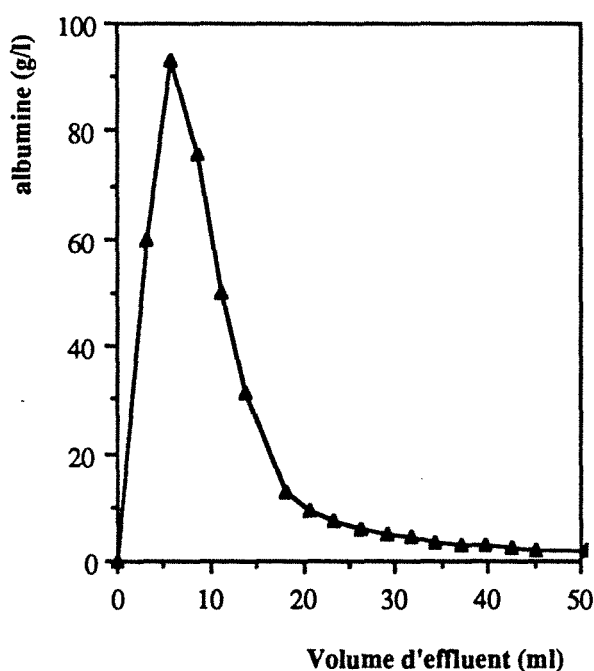


Figure A-5-1 : Colonne saturée en albumine, régénérée par NaCl 50 mM (DEAE Spheroex).

De même, en figure A-5-2, on présente un ensemble de trois régénérations consécutives d'une colonne saturée en albumine (DEAE Spheroex). L'albumine est d'abord éluée par une solution de KNO_3 50 mM, puis par NaCl 1N, enfin par HCl 0.1N. On constate que pratiquement la totalité de l'albumine fixée est recueillie grâce aux deux premières opérations.

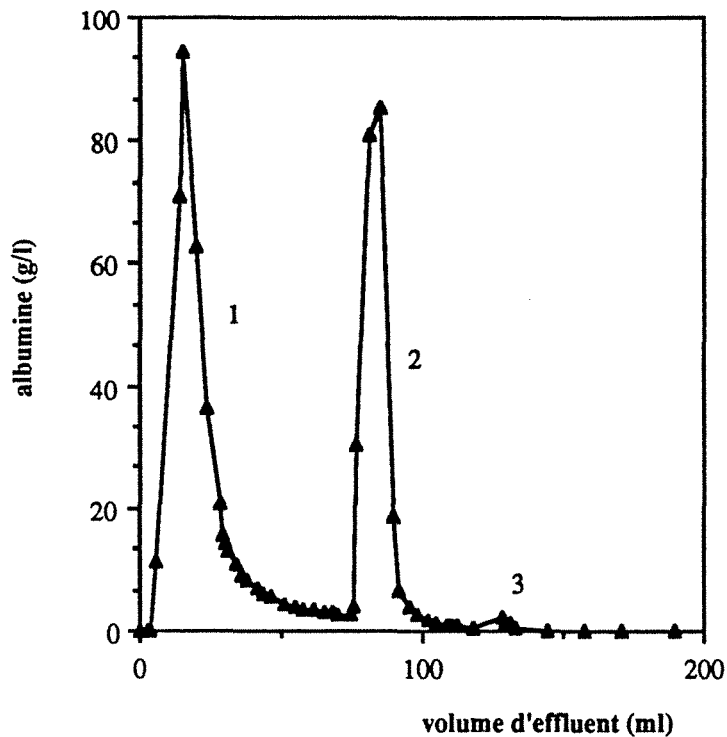
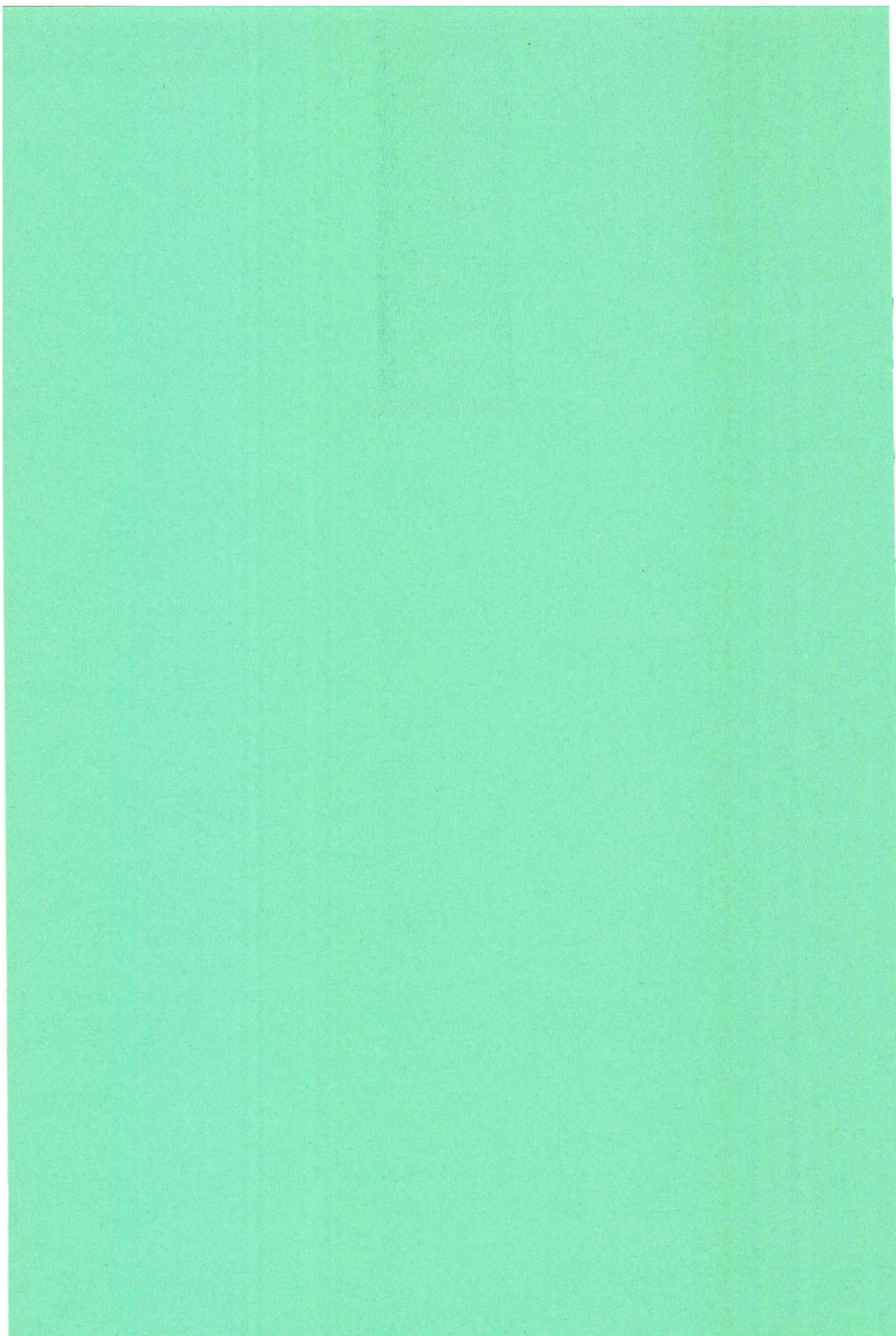


Figure A-5-2 : Colonne saturée en albumine (DEAE Spheroex). régénérations par KNO_3 50 mM (1), NaCl 1N (2), HCl 0.1 N (3).

CONCLUSION



Notre travail a consisté à étudier séparément les éléments qui interviennent en chromatographie frontale de l'albumine par échange d'anions, ainsi que leurs interactions, en vue de construire un modèle global.

Nous avons pu ainsi mettre en lumière un certain nombre de résultats intéressants :

- Un mécanisme permettant de décrire le comportement des échangeurs d'ions faibles en fonction de l'environnement ionique a été proposé. En effet, malgré un emploi assez répandu, le fonctionnement de ce type de support ne semble pas toujours très bien compris. Ce mécanisme est écrit sous la forme d'un schéma réactionnel, et peut ainsi être utilisé dans un programme de calculs d'équilibres. Les paramètres sont obtenus sans difficulté à partir de dosages acide-base.
- Des expériences concernant la propagation d'électrolytes faibles (tampons de pH) dans une colonne échangeuse d'anions ont été présentées, ainsi que leur interprétation dans le cadre de la théorie de l'équilibre, et des simulations.
- Un modèle de l'albumine en tant qu'espèce ionisable a été proposé ; il permet une description globale simple du comportement acido-basique de la protéine en solution aqueuse.
- Une réflexion a été menée sur la manière de représenter l'équilibre en une protéine et un échangeur d'ions. Nous avons remarqué que le formalisme de type adsorption n'avait qu'un intérêt limité. Il n'est cependant pas évident d'en construire un autre, qui puisse tenir compte des équilibres de dissociation en plus de l'échange d'ions. On peut envisager la mise au point d'une sorte de diagramme d'état, comparable à ceux utilisés pour les électrolytes faibles.
- Des expériences de chromatographie frontale en colonne échangeuse d'anions ont été effectuées avec l'albumine en l'absence, puis en présence de tampons de pH. On a mis en évidence la présence de transitions et de paliers de concentration pour les différentes espèces. L'interprétation des résultats de saturation et de régénération a été effectuée en proposant un mécanisme d'échange qui considère que le comportement de l'albumine s'approche de celui d'un électrolyte faible.

Nous avons proposé dans ce mémoire une méthodologie originale d'étude de la chromatographie d'échange d'ions de l'albumine en nous appuyant notamment sur les acquis

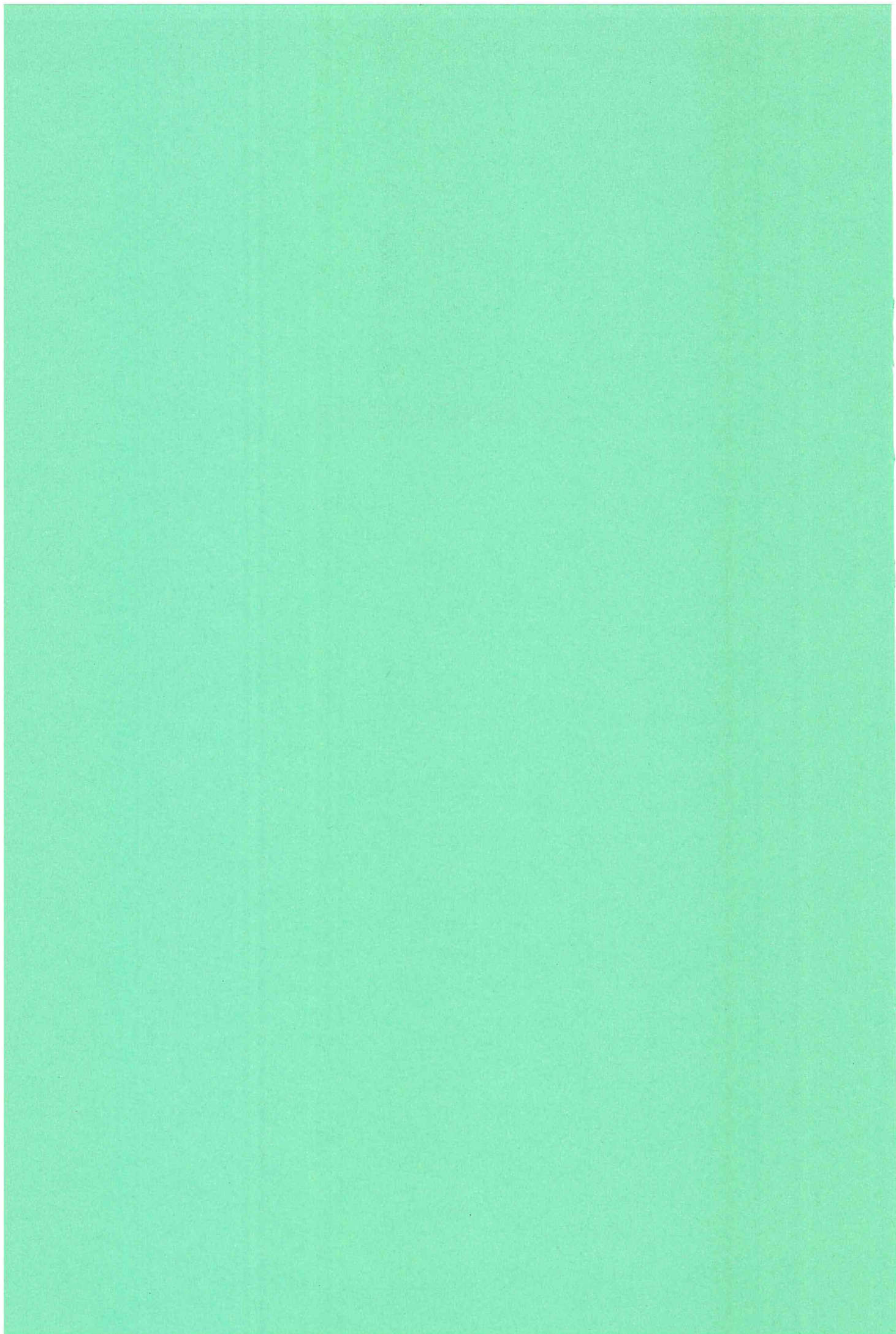
de l'échange d'ions simples. Il reste bien sûr des zones d'ombres, en particulier sur la possibilité de déterminer expérimentalement certains équilibres entre l'albumine et le support.

Quelles en sont les perspectives ?

On peut soulever une question, pertinente d'ailleurs aussi pour d'autres problèmes : Faut-il continuer à développer un modèle, qui finalement s'avère assez complexe, dans lequel on tient compte de la contribution de nombreux phénomènes, et qui comporte un certain nombre de paramètres, auxquels on n'a pas accès expérimentalement ? Sinon, comment construire un modèle "boîte noire", comme il est d'usage en Génie des Procédés, mais néanmoins prédictif ?

Si des travaux sont poursuivis dans cette voie, ils devraient probablement d'abord venir compléter le modèle de l'albumine, puis examiner s'il est facilement généralisable à d'autres protéines, avant d'aborder l'étude d'un mélange constitué de plusieurs protéines.

NOMENCLATURE



Chapitre 1

$\overline{C_i}$	concentration en espèce i fixée sur le support (mol/l)
C_i	concentration en i en solution (mol/l)
$K_{2/1}$	coefficient de sélectivité pour l'échange entre A_1^{Z1-} et A_2^{Z2-} (défini dans le sens de la fixation de A_2^{Z2-})
$K_{x\ 2/1}$	sélectivité pour l'échange entre A_1^{Z1-} et A_2^{Z2-} (écrit avec les titres ioniques)
N	normalité de la solution (éq/l)
Q	capacité totale du support (éq/l)
x_i	fraction ionique de i en solution
y_i	fraction ionique de i fixé

Chapitre 2

K	constante de dissociation des sites $\overline{RH^+}$ (mol/l)
Ka	constante de dissociation des sites $\overline{RH}$ (mol/l)
Ka1	1ère constante de dissociation de l'acide carbonique (mol/l)
Ka2	2ème constante de dissociation de l'acide carbonique (mol/l)
Ke	produit ionique de l'eau (mol/l) ²
$K_{A,B}$	coefficient de sélectivité pour l'échange entre A et B (défini dans le sens de la fixation de A)
α	degré de dissociation des sites faibles

Chapitre 3

$\overline{C_i}$	concentration en espèce i fixée sur le support (mol/l)
C_i	concentration en i en solution (mol/l)
Ka	constante de dissociation de l'acide acétique (mol/l)
Ka	2ème constante de dissociation de l'acide phosphorique (mol/l)
$K_{A,B}$	coefficient de sélectivité pour l'échange entre A et B (défini dans le sens de la fixation de A)
Ke	produit ionique de l'eau (mol/l) ²
$K_{GT}^{A,B}$	constante de Gaines-Thomas pour l'échange entre A et B
$K_{x,y}^{A,B}$	sélectivité de l'échange entre A et B
K1	1ère constante de dissociation de l'acide phosphorique (mol/l)
K2	2ème constante de dissociation de l'acide phosphorique (mol/l)
t	temps (s)
v_{Ci}	vitesse de propagation dans la colonne de la concentration C_i (m/s)
$v_{\Delta Ci}$	vitesse de propagation dans la colonne de la discontinuité ΔC_i (m/s)

V_p	volume interstitiel de la colonne (volume de pore) (l)
u_0	vitesse interstitielle de déplacement du fluide (m/s)
z	abscisse dans la colonne (m)

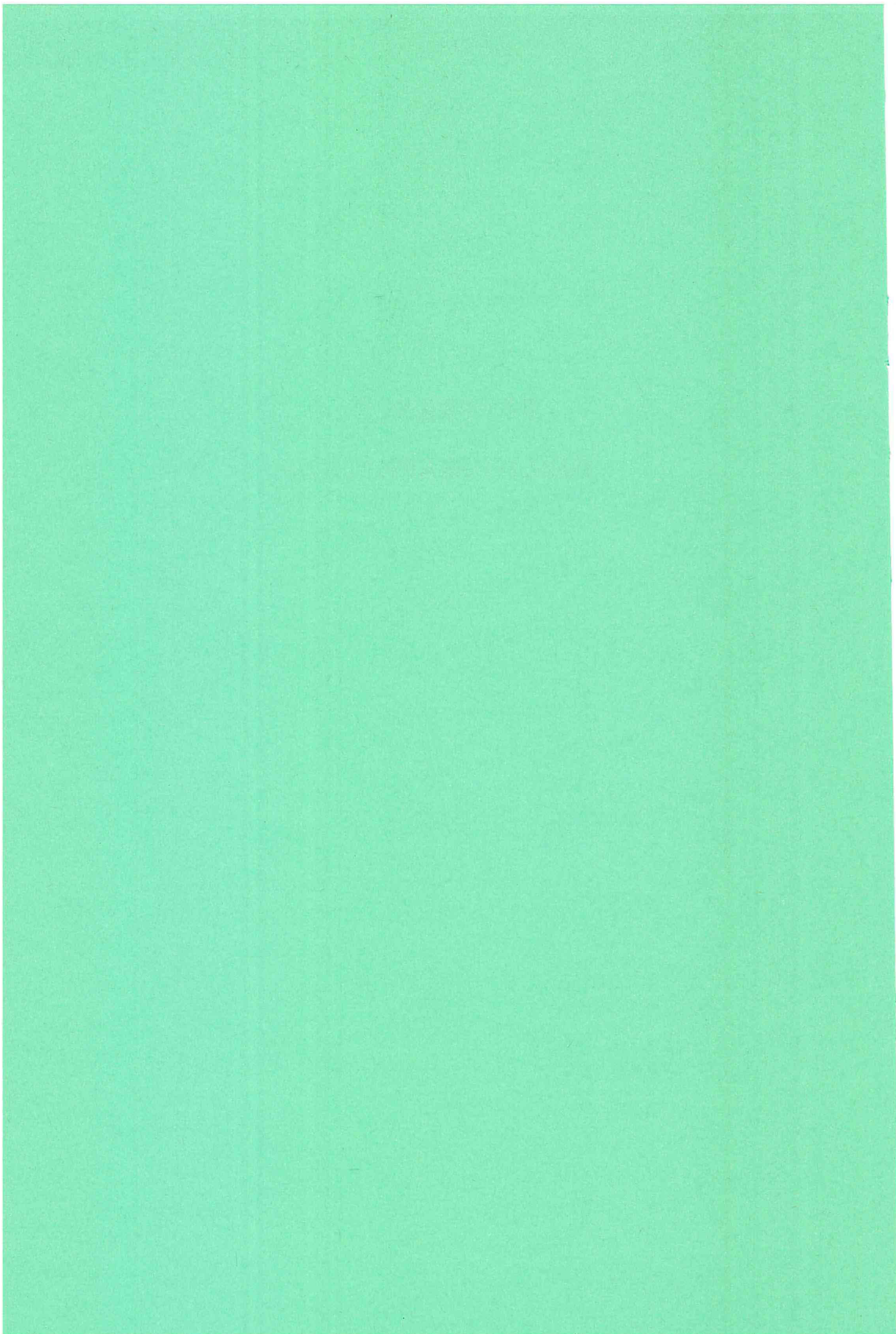
Chapitre 4

c^*	concentration en soluté dans la solution en équilibre avec la quantité adsorbée q^* (mol/l)
C_0	concentration en protéine dans la solution d'alimentation (g/l)
K	paramètre énergétique (éq. de Langmuir) (mol/l) ⁻¹
K	coefficient de sélectivité pour l'échange protéine-ions (défini dans le sens de la fixation de la protéine)
K_e	produit ionique de l'eau (mol/l) ²
$K_i \ 1 \leq i \leq 5$	constante de dissociation des sites n°i de l'albumine (mol/l)
n	capacité maximale d'adsorption (éq. de Langmuir) (ex.g de soluté/g support sec)
q^*	quantité de soluté adsorbé en équilibre avec la solution de concentration c^* en soluté (ex. g de soluté/g support sec)
V_f	volume d'effluent tel que la concentration en protéine soit égale à C_0 (l)
V_p	volume interstitiel de la colonne (volume de pore) (l)
Z	charge nette moyenne de l'albumine

Chapitre 5

C	concentration ionique totale (éq/l)
$K_{A,B}$	coefficient de sélectivité pour l'échange entre A et B (défini dans le sens de la fixation de A)
K_e	produit ionique de l'eau (mol/l) ²
$K_i \ 1 \leq i \leq 5$	constante de dissociation des sites n°i de l'albumine (mol/l)
T	paramètre de percolation
v	volume de colonne (l)
V	volume d'effluent (l)
V_p	volume de pore (l)
Z	charge nette moyenne de l'albumine
α_B^A	sélectivité de l'échange entre A et B (fixation de A)
ϵ	porosité

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



- ANDRADE J.D., Principles of protein adsorption. in : Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers, vol.2, 1-80. Ed : Andrade J.D., Plenum Press NY & London, 1985.
- ARNOLD F.H., BLANCH H.W., WILKE C.R., Analysis of affinity separations I : Predicting the performance of affinity adsorbers. The Chemical Engineering Journal, 30, B9-B23, 1985.
- AUDIGIE D., DUPONT G., ZONSZAIN F., Principe des méthodes d'analyse biochimique Tome 1, coll. Biologie Appliquée, Ed. Doin, Paris 1982.
- BARFORD R.A., MCGRAW R., ROTHBART H.L., Large sample volumes in preparative chromatography. Journal of Chromatography, 166, 365-372, 1978.
- BARFORD R.A., KUMOSINSKI T.F., PARRIS N., WHITE A.E., Salt-binding effects in hydrophobic-interaction chromatography. Journal of Chromatography, 458, 57-66, 1988.
- BENSON E.S., HALLAWAY B.E., On the mechanisms of pH-dependent hydrogen exchange of bovine plasma albumin in the range of pH 5 to 8.5. The Journal of Biological Chemistry, 245, 16, 4144-4149, 1970.
- BERGENHEM N., CARLSSON U., KLASSON K., Rapid ion-exchange chromatography for preparative separation of proteins, application to porcine and bovine carbonic anhydrases. Journal of Chromatography, 319, 59-65, 1985.
- BERGLÖF J.H., ERIKSSON S., CURLING J.M., Chromatographic preparation and in vitro properties of albumin from human plasma. Journal of Applied Biochemistry 5, 282-292, 1983.
- BERGSTRÖM J., SÖDERBERG L., WAHLSTRÖM L., MÜLLER R.M., DOMICELJ A., HAGSTRÖM G., STALBERG R., KÄLLMAN I., HANSSON K.A., Recommendations for obtaining optimal separations on MonobeadTM ion exchangers. Protides of the Biological Fluids, 30, 641-646, 1982.
- BINGCHANG L., WANG J., Influence of the partition isotherm on the elution curve. Journal of Chromatography, 438, 171-179, 1988.
- BISCANS B., Chromatographie d'échange d'ions en couche fluidisée - extraction des protéines du lactosérum. Thèse de Docteur Ingénieur, INP Toulouse, France, 1985.
- BISCANS B., RIBA J.P., COUDERC J.P., Ion-exchange resins in a fixed bed and in a multistage fluidized bed, Comparison of processes. Chemical Engineering Journal, 30 (2), 81-90, 1985.
- BLANCO R., ARAI N., GRINBERG N., YARMUSH D.M., KARGER B.L., Role of association on protein adsorption isotherms, β -lactoglobulin A adsorbed on a weakly hydrophobic surface. Journal of Chromatography, 482, 1-12, 1989.
- BOARDMAN N.K., PARTRIDGE S.M., Separation of neutral proteins on ion-exchange resins. Biochemical Journal, 59, 543-552, 1955.
- BOISSEL J.P., DELPECH M., ROCHETTE J., WACJMAN H., Utilisation de la chromatographie haute performance d'échange d'ions en chimie des protéines. INSERM, 115, 115-130, 1983.
- CHASE H.A., Adsorption separation processes for protein purification. in : Downstream Processes : Equipment and Techniques, 159-204, Alan R. Liss, Inc., 1988.
- CHENEVIERE P., Méthodologie d'étude du transport transitoire de suspensions dans les milieux poreux, application à la récupération améliorée des hydrocarbures par voie microbienne. Thèse INPL-ENSIC, Nancy, 1989.

CLIFFORD D., Nitrate removal from water supplies by ion-exchange. EPA-600/2-78-052, National Technical Information Service, Springfield Virginia USA, 1978.

CLIFFORD D., Multicomponent ion-exchange calculations for selected ion separations. I & EC Fundamentals, 21, 141-153, 1982.

COQ B., CRETIER G., GONNET C., ROCCA J.L., How to approach preparative liquid chromatography. *Chromatographia*, 12, 3, 139-146, 1979.

COQ B., CRETIER G., ROCCA J.L., Preparative liquid chromatography : sample volume overload. *Journal of Chromatography*, 186, 457-473, 1979.

COWAN G.H., GOSLING I.S., SWEETENHAM W.P., Modelling for scale-up and optimisation of packed-bed columns in adsorption and chromatography. in : *Separations for biotechnology*. Ed : Verral M.S., Hudson M.J., chap. 10, 152-175, 1987.

COWAN G.H., GOSLING I.S., SWEETENHAM W.P., Modelling methods to aid the design and optimisation of batch stirred-tank and packed-bed column adsorption and chromatography units. *Journal of Chromatography*, 484, 187-210, 1989.

CRAMER S.M., SUBRAMANIAN G., Preparative liquid chromatography of biomolecules-new directions. in : *New directions in sorption technology*. Ed : Keller II G.E., Yang R.T., Butterworth Publishers USA, 1989.

DE CLERK K., BUYS T.S., Moment analysis in non-linear chromatography I. The first moment. *Journal of Chromatography*, 63, 193-202, 1971.

DE JONG A.W.J., POPPE H., KRAAK J.C., Contribution to the choice of optimal geometric conditions for preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 148, 127-141, 1978.

DE JONG A.W.J., KRAAK J.C., POPPE H., NOOITGEDACHT F., Isotherm linearity and sample capacity in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 193, 181-195, 1980.

DE JONG A.W.J., POPPE H., KRAAK J.C., Column loadability and particle size in preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 209, 432-436, 1981.

DYE R.D., DECARLI J.P., CARTA G., Equilibrium sorption of amino-acids by a cation-exchange resin. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 29, 849-857, 1990.

EDSALL J.T., Proteins as acids and bases. in : *Proteins, Amino Acids and Peptides*, chap. 20, 445-505. Ed : Cohn E.J., Edsall J.T., Hafner N.Y., 1965.

GAREIL P., PERSONNAZ L., CAUDE M., Influence de la déformation des pics d'élution sur l'optimisation de la séparation d'un mélange binaire en chromatographie en phase liquide préparative. *Analisis*, 7, 7/8, 401-407, 1979.

GAREIL P., PERSONNAZ L., CAUDE M., Etude de l'élution non-linéaire en chromatographie en phase liquide préparative. *Journal of Chromatography*, 192, 53-74, 1980.

GAREIL P., ROSSET R., La chromatographie en phase liquide préparative par développement par élution I. Notions fondamentales. Processus linéaire et non linéaire. *Analisis*, 10, 9, 397-408, 1982.

GAREIL P., ROSSET R., La chromatographie en phase liquide préparative par développement par élution II. Aspects pratiques, stratégie et appareillage. *Analisis*, 10, 10, 445-459, 1982.

GAREIL P., DURIEUX C., CAUDE M., Optimization of production rate and recovered amount in linear and nonlinear preparative elution liquid chromatography. *Separation Science and Technology*, 18, 5, 441-459, 1983.

GHODBANE S., GUIOCHON G., Influence of the relative concentrations of two components of a binary mixture on their overloaded elution profiles. *Journal of Chromatography*, 440, 9-22, 1988.

GOODING K.M., SCHMUCK M.N., Comparison of weak and strong high-performance anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 327, 139-146, 1985.

GORBUNOV A.A., LUKYANOV A.Ye., PASECHNIK V.A., VAKRUSHEV V., Computer simulation of protein adsorption and chromatography. *Journal of Chromatography*, 365, 205-212, 1986.

GORIUS A., Théorie perturbative de la dynamique de l'adsorption en lit fixe : caractérisation de la cinétique de sorption par la méthode des micro-colonnes, description analytique des fronts. Thèse de Docteur es Sciences, INPL-ENSIC, 1988.

GOSLING I., COOK D., FRY M.D.M., The role of adsorption isotherms in the design of chromatographic separations for downstream processing. *Chem. Eng. Res. Des.*, 67, 232-242, 1989.

GRAHAM E.E., FOOK C.F., Rate of protein adsorption and desorption on cellulosic ion exchangers. *AIChE Journal*, vol.28, N° 2, 245-250, 1982.

GRAHAM E.E., PUCCIANI A., PINTO N.G., A comparative study of models to predict protein adsorption. *Biotechnology Progress*, vol.3, N°3, 1987.

GREVILLOT G., TONDEUR D., Phénomènes d'interférence dans un lit fixe d'échangeur d'ions sous l'effet d'un changement de la normalité de l'alimentation. *The Chemical Engineering Journal*, 7, 187-200, 1974.

GUSTAFSON R.L., FILLIUS H.F., KUNIN R., Basicities of weak base ion exchange resins. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 9, 2, 221-229, 1970.

GUIOCHON G., Preparation and operation of liquid chromatographic columns of very high efficiency. *Journal of Chromatography*, 185, 3-26, 1979.

HAFF L.A., FÄGERSTAM L.G., BARRY A.R., Use of electrophoretic titration curves for predicting optimal chromatographic conditions for fast ion-exchange chromatography of proteins. *Journal of Chromatography*, 266, 409-425, 1983.

HELFFERICH F.G., *Ion exchange*, McGraw Hill, 1962.

HELFFERICH F.G., KLEIN G., *Multicomponent chromatography ; Theory of Interference*. *Chromatographic Science*, vol.4, Marcel Dekker, Inc. 1970.

HELFFERICH F.G., BENNETT B.J., Weak electrolytes, polybasic acids, and buffers in anion exchange columns I. Sodium acetate and sodium carbonate systems. *Reactive Polymers*, 3, 51-66, 1984.

HELFFERICH F.G., BENNETT B.J., Weak electrolytes, polybasic acids, and buffers in anion exchange columns II. Sodium acetate chloride system. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 2 (7&8), 1151-1184, 1984.

HELFFERICH F.G., *Theory of multicomponent chromatography : a state-of-the-art report*. *Journal of Chromatography*, 373, 45-60, 1986.

HELFFERICH F.G., Ion-exchange equilibria of amino-acids on strong-acid resins : theory. *Reactive Polymers*, 12, 95-100, 1990.

HILL E.A., HIRTENSTEIN M.D., *Advances in Biotechnological Processes*, 1, 31-66, Alan R. Liss, Inc., N.Y., 1983.

HIMMELBLAU D.M., *Applied Nonlinear Programming*. Mc Graw Hill book, N.Y., 1972.

HÖLL W.H., FEUERSTEIN W., Partial demineralization of water by ion exchange using carbon dioxide as regenerant. *Reactive Polymers* 4, 147-153, 1986.

HUANG J.-H., SCHUDEL J. GUIOCHON G., Adsorption behaviour of albumin and conalbumin on TSK-DEAE 5PW anion exchanger. *Journal of Chromatography*, 504, 335-349, 1990.

HUANG J.-X., HORVATH C., Adsorption isotherms on high-performance liquid chromatographic sorbents. II Proteins on cation exchangers with silica support. *Journal of Chromatography*, 406, 285-294, 1987.

HUPE K.P., LAUER H.H., Selection of optimal conditions in preparative liquid chromatography I. Theory. *Journal of Chromatography*, 203, 41-52, 1981.

HWANG Y.-L., HELFFERICH F.G., LEU R.-J., Multicomponent equilibrium theory for ion-exchange columns involving reactions. *AIChE Journal*, 34, 10, 1615-1625, 1988.

ITO R., ANABUKI K., KONDO O., Simulation of continuous separation of proteins by isoelectric focusing. *International Chemical Engineering*, 30, 2, 259-267, 1990.

JACOBSON J.M., FRENZ J.H., HORVATH C., Measurement of competitive adsorption isotherms by frontal chromatography. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 26, 43-50, 1987.

JAMES R.O., PARKS G.A., Characterization of aqueous colloids by their electrical double-layer and intrinsic surface chemical properties. in : *Surface and Colloid Science*, vol.12, ed : E. Matijevic, Plenum Press, 119-214, 1981.

JANSON J.C., HEDMAN P., Large-scale chromatography of proteins. *Advances in Biochemical Engineering*, 25, 43-99, 1982.

JANSON J.C., HEDMAN P., On the optimization of process chromatography of proteins. *Biotechnology Progress*, Vol.3, N°1, 1987.

JANSON J.C., RYDEN L., *Protein purification, Principles, High Resolution Methods and Applications*. VCH Publishers, N.Y., 1989.

JAULMES A., GONZALES M.J., VIDAL-MADJAR C., GUIOCHON G., Non-linear elution peak model Influence of the mobile phase composition in reversed-phase chromatography. *Journal of Chromatography*, 387, 41-53, 1987.

JAUZEIN M., *Méthodologie d'étude du transport transitoire de solutés dans les milieux poreux*. Thèse ENSIC-INPL, Nancy, 1988.

JAUZEIN M., ANDRE C., MARGRITA R., SARDIN M., SCHWEICH D., A flexible computer code for modelling transport in porous media : Impact. *Geoderma*, 44, 95-113, 1989.

KALINICHEV A.I., PRONIN A. Ya., ZOLOTAREV P.P., GORYACHEVA N.A., CHMUTOV K.V., FILIMONOV V. Ya., Moment analysis in non-linear frontal-elution and elution chromatography. *Journal of Chromatography*, 120, 249-256, 1976.

- KATAOKA T., YOSHIDA H., Kinetics of ion exchange accompanied by neutralization reaction. *AIChE Journal*, 34, 6, 1020-1026, 1988.
- KLEIN G., TONDEUR D., VERMEULEN T., Multicomponent ion exchange in fixed beds, general properties of equilibrium systems. I. & E.C. Fundamentals, 6, 339-351, 1967.
- KLEIN G., Ion exchange and chemical reactions in fixed beds. in : *Percolation Processes : Theory and Applications*. Ed. : Rodrigues A.E., Tondeur D.. NATO ASI Series, Series E, 33, 363-424, Sijthoff & Noordhoff, 1981.
- KLEIN G., NASSIRI M., VISLOCKY J.M., Multicomponent fixed-bed sorption with variable initial and feed compositions. Computer prediction of local-equilibrium behavior. *AIChE Symposium Series*, 80 (233), 14-20, 1984.
- KLIKH S.F., EL'KIN G.E., SAMSONOV G.V., Sorption kinetics of erythromycin and oleandomycin by telogenated sulfo resins. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 10, 360-363, 1976.
- KLYUEVA L.M., GEL'PERIN N.I., Study of effects of fractionating compositions of ion-exchange resins upon recovery of antibiotics from solution. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 10, 97-99, 1976.
- KNIGHT C.S., Some fundamentals of ion-exchange-cellulose design and usage in biochemistry. *Advances in Chromatography*, 4, 61-110, 1967.
- KOLTISKO B., WALTON A., Chromatographic analysis of protein adsorption. in : *Surface and Interfacial aspects of Biomedical Polymers*, vol.2 ; 217-239, ed : Andrade J.D., Plenum Press NY & London, 1985.
- KOPACIEWICZ W., ROUNDS M.A., FAUSNAUGH J., REGNIER F.E., Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 266, 3-21, 1983.
- KOPACIEWICZ W., FULTON S., LEE S.Y., Influence of pore and particle size on the frontal uptake of proteins, implications for preparative anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 409, 111-124, 1987.
- LEATHERBARROW R.J., Enzfitter, a non linear regression data analysis program for the IBM PC, manual. Elsevier Science Publishers BV, 1987.
- LEAVER G., CONDER J.R., HOWELL J.A., A method development study of the production of albumin from animal blood by ion exchange chromatography. *Separation Science and Technology*, 22 (8-10), 2037-2059, 1987.
- LEHNINGER, *Biochimie. Flammarion médecine-sciences*, 1977.
- LUNDSTRÖM I., Models of protein adsorption on solid surfaces. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 70, 76-82, 1985.
- LUNDSTRÖM I., ELWING H., Simple kinetic models for protein exchange reactions on solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 136, 1, 68-84, 1990.
- MASZAROFF I., VARADY L., MOUCHAWAR G.A., REGNIER F.E., Thermodynamic model for electrostatic-interaction chromatography of proteins. *Journal of Chromatography*, 499, 63-77, 1990.
- MELANDER W., HORVATH C., Effect of neutral salts on the formation and dissociation of protein aggregates. *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, 2, 141-161, 1977.

MIRABEL B., Séparation des protéines par chromatographie préparative. *L'actualité chimique*, 39-44, Juin-Juillet 1980.

MOLNAR-PERL I., PINTER-SZAKACS M., Determination of total basicity and available lysine in proteins by nonaqueous titrimetry. *Analytica Chimica Acta*, 202, 159-166, 1987.

MOORE P.M., Gel filtration chromatography. in : *Adsorption : Science and Technology*. Ed : Rodrigues A.E., Le Van M. D., Tondeur D., NATO ASI Series, Series E : Applied Science, vol. 158, 561-576, Kluwer Academic Publishers, 1987.

NICOLAS M.O., CHANEL S., GREVILLOT G., Propagation d'ondes de pH dans une colonne chromatographique échangeuse d'anions alimentée par des tampons de pH. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 1, n°2, 203-209, 1987.

NICOUD R.M., Influence respective des facteurs thermodynamiques, hydrodynamiques et diffusionnels sur le fonctionnement des échangeurs d'ions. Application à un procédé d'échange ionique : le Nymphéa. Thèse INPL-ENSIC, Nancy, 1987.

NORDE W., LYKLEMA J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, I. Adsorption isotherms. Effect of charge, ionic strength, and temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 66, 2, 257-265, 1978.

NORDE W., LYKLEMA J., The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces, IV. the charge distribution in the adsorbed state. *Journal of Colloid and Interface Science*, 66, 2, 285-294, 1978.

NORDE W., LYKLEMA J., Thermodynamics of protein adsorption. Theory with special reference to the adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at polystyrene surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 71, 2, 350-366, 1979.

NORDE W., LYKLEMA J., Proton titration and electrokinetic studies of adsorbed protein layers. in : *Surface and Interfacial aspects of Biomedical Polymers*, vol.2, 241-262, ed : Andrade J.D., Plenum Press NY & London, 1985.

PERUTZ M.F., Electrostatic effects in proteins. *Science*, 201, 1187-1191, 1978.

PHILIPS M.W., SUBRAMANIAN G., CRAMER S.M., Theoretical optimization of operating parameters in non-ideal displacement chromatography. *Journal of Chromatography*, 454, 1-21, 1988.

PLICKA J., SVOBODA V., KLEINMANN I., UHLIROVA A., Mathematical modelling of the peak in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 469, 29-42, 1989.

PRASAD R., GUPTA A.K., BAJPAI R.K., Adsorption of Streptomycin on Ion Exchange Resins : Equilibrium and Kinetic Studies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 30, 324-331, 1987.

REGNIER F.E., MASZAROFF I., A theoretical examination of adsorption processes in preparative liquid chromatography of proteins. *Biotechnology Progress*, vol.3, N°1, 23-26, 1987.

REGNIER F.E., The role of protein structure in chromatographic behavior. *Science*, 238, 319-323, 1987.

RHEE H.-K., ARIS R., AMUNDSON N.R., On the theory of multicomponent chromatography., *Phil. Trans. Roy. Soc.*, A267, 419-455, 1970.

RHEE H.K., Equilibrium theory of multicomponent chromatography. in : Percolation Processes : Theory and Applications. Ed. : Rodrigues A.E., Tondeur D.. NATO ASI Series, Series E, 33, 285-328, Sijthoff & Noordhoff, 1981.

RODRIGUES A.E., Modelling of percolation processes. in : Percolation Processes : Theory and Applications. Ed. : Rodrigues A.E., Tondeur D.. NATO ASI Series, Series E, 33, 31-82, Sijthoff & Noordhoff, 1981.

ROSENGREN A., BJELLQVIST B., GASPARIC V., in : Electrofocusing and Isotachopheresis. Ed. : Radola B.J., Graesslin D., 165- , De Gruyter, Berlin, 1977.

ROUNDS M.A., KOPACIEWICZ W., REGNIER F.E., Factors contributing to intrinsic loading capacity in silica-based packing materials for preparative anion-exchange protein chromatography. *Journal of Chromatography*, 362, 187-196, 1986.

ROUNDS M.A., REGNIER F.E., Evaluation of a retention model for high-performance ion-exchange chromatography using two different displacing salts. *Journal of Chromatography*, 283, 37-45, 1984.

ROY A. K., BURGUM A., ROY S., Preparation of ion-exchange silica and effect of pH on protein binding on ion-exchange silica. *Journal of Chromatographic Science*, 22, 84-86, 1984.

RUTHVEN D., Adsorption kinetics. in : Adsorption : Science and Technology. Ed : Rodrigues A.E., Le Van M. D., Tondeur D., NATO ASI Series, Series E : Applied Science, vol. 158, 87-114, Kluwer Academic Publishers, 1987.

SAMSONOV G.V., BAKAEVA R.M., SOROKINA Y.N., KOLOMITSEV O.P., Selective adsorption of novobiocin by macroreticular anion exchange resins. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 7, 424-426, 1973.

SANCHEZ V., MILCAN B., COUDERC J.P., RIBA J.P., Chromatographic separations of biological macromolecules. Brevet n° de publication 2 575 666 (n° enr. national 85 00463), 1985.

SCHMUCK M.N., GOODING D.L., GOODING K.M., Comparison of porous silica packing materials for preparative ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*, 359, 323-330, 1986.

SCHWEICH D., SARDIN M., Adsorption, partition, ion-exchange and chemical reaction in batch reactors or in columns-a review. *Journal of Hydrology*, 50, 1-33, 1981.

SCOPES R.K., Protein Purification Principles and Practice. Springer-Verlag N.Y. Inc., 1982.

SCOTT R.P.W., KUCERA P., Incremental gradient elution some factors that affect resolution and analysis time, *Journal of Chromatography*, 83, 257-266, 1973.

SCOTT R.P.W., KUCERA P., Some aspects of preparative-scale liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 119, 467-482, 1976.

SCOUTEN W.H., Affinity chromatography. J. Wiley, N. Y., 1981

SHALLCROSS D.C., HERRMANN C.C., McCOY B.J., An improved model for the prediction of multicomponent ion exchange equilibria. *Chemical Engineering Science*, 43, 2, 279-288, 1988.

SIMONNOT M.O., CHANEL S. GREVILLOT G., Chromatographie des protéines : analyse théorique et expérimentale des fronts d'échange albumine-anions minéraux. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, 3, n°8, 197- , 1989.

SKIDMORE G.L., CHASE H.A., Two-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose ® FF. *Journal of Chromatography*, 505, 329-347, 1990.

SKIDMORE G.L., HORSTMANN B.J., CHASE H.A., Modelling single-component protein adsorption to the cation exchanger S Sepharose ® FF. *Journal of Chromatography*, 498, 113-128, 1990.

SLUYTERMAN L.A.AE., WIJDENES J., Chromatofocusing : isoelectric focusing on ion-exchange columns II Experimental verification. *Journal of Chromatography*, 150, 31-44, 1978.

SLUYTERMAN L.A.AE., WIJDENES J., Chromatofocusing III the properties of a DEAE-Agarose anion exchanger and its suitability for protein separations. *Journal of Chromatography*, 206, 429-440, 1981.

SMITH M.A., GILLESPIE P.C., Ionization of DEAE-cellulose dependence of pK on ionic strength. *Journal of Chromatography*, 409, 111- , 1989.

SODERQUIST M.E., WALTON G., Structural changes in proteins adsorbed on polymer surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 75, 2, 386-397, 1980.

STOLTZ J.F., RIVAT C., GESCHIER C., COLOSETTI P., SERTILLANGES P., TONDON J., REGNAULT V., Purification chromatographique de l'albumine plasmatique humaine à l'échelle pilote. *Bio-Sciences*, 6, n°4, 103-106, 1987.

STRATHMAN H., *Trends in Biotechnology*, 3, 112-118, 1985.

STROBEL J.H., Adsorption chromatography for protein purification. in : *Adsorption : Science and Technology*. Ed : Rodrigues A.E., Le Van M. D., Tondeur D., NATO ASI Series, Series E : Applied Science, vol. 158, 577-584, Kluwer Academic Publishers, 1987.

SUN S.F., Acid-base titrations of bovine serum albumin in a water-dioxane mixture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 200, 433-441, 1970.

TANFORD C., Hydrogen ion titration curves of proteins. in : *Electrochemistry in Biology and Medicine*, chap.13, 248-265, J.Wiley, N.Y., 1955.

TANFORD C., SWANSON S.A., SHORE W.S., Hydrogen ion equilibria of bovine serum albumin. *Journal of American Chemical Society*, 77, 6414-6421, 1955.

TAYOT J.L., Développement industriel de la chromatographie dans les productions biologiques. *Biofutur*, Nov. 1986.

TONDEUR D., Théorie des colonnes d'échange d'ions Construction de profils de concentration pour des systèmes à plusieurs constituants. *Chimie et Industrie - Génie Chimique*, 100, 7, 1968.

TONDEUR D., Théorie des colonnes d'échange d'ions. Thèse, Publications de l'Université de Nancy, France 1969.

TONDEUR D., Population migration and wave phenomena in percolation operations. in : *Percolation Processes : Theory and Applications*. Ed. : Rodrigues A.E., Tondeur D.. NATO ASI Series, Series E, 33, 1-30, Sijthoff & Noordhoff, 1981.

TONDEUR D., BAILLY M., Design methods for ion-exchange processes based on "the equilibrium theory". in : *Ion Exchange Science and Technology*. Ed. : Rodrigues A.E., NATO ASI Series , Series E, 107, 147-197, Nijhoff, 1986.

TSAI A.M., ENGLERT D., GRAHAM E.E., Study of the dynamic binding capacity of two anion exchangers using bovine serum albumin as a model protein. *Journal of Chromatography*, 504, 89-95, 1990.

TSOU H.-A., GRAHAM E.E., Prediction of adsorption and desorption of protein on dextran-based ion-exchange resin. *AIChE Journal*, vol.31, N°12, 1959-1966, 1985.

VAN DER WIEL J.P., Continuous recovery of bioproducts by adsorption. Thesis, Academic Boeken Centrum, De Lier, The Netherlands, 1989.

VAN DER WIEL J.P., WESSELINGH J.A., Continuous adsorption in Biotechnology. in : *Adsorption : Science and Technology*. Ed : Rodrigues A.E., Le Van M. D., Tondeur D., NATO ASI Series, Series E : Applied Science, vol. 158, 561-576, Kluwer Academic Publishers, 1987.

VANECEK G., REGNIER F.E., Variables in the high-performance anion-exchange chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry*, 109, 345-353, 1980.

VAN OS G.A.J., DE BRUIN S.H., JANSSEN L.H.M., Hydrogen ion titration curves of proteins as a source of structural and functional information. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 37, 303-311, 1972.

VEDENEEVA V.V., DOBRYNINA O.V., MOMOT N.N., SAMSONOV G.V., Dynamics of the processes of anion-exchange sorption and desorption of phenoxymethylpenicillin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 3, 121-124, 1974.

VELAYUDHAN A., HORVATH C., On the stoichiometric model of electrostatic interaction chromatography for biopolymers. *Journal of Chromatography*, 367, 160-162, 1986.

VETTERLING W.T., TEUKOLSKY S.A., PRESS W.H., FLANNERY B.P., Numerical Recipes example Book [C]. Cambridge University Press, 1988.

VILLERMAUX J., Génie de la réaction chimique conception et fonctionnement des réacteurs. Lavoisier Tec & Doc, 1982.

VILLERMAUX J., Relations entre la forme des pics chromatographiques et les paramètres physiques et opératoires de la colonne. *Journal of Chromatography*, 83, 205-222, 1973.

VILLERMAUX J., Theory of linear chromatography. in : *Percolation Processes : Theory and Applications*. Ed : Rodrigues A.E., Tondeur D.. NATO ASI Series, Series E, 33, Sijthoff & Noordhoff, 1981.

WEHRLI A., HERMANN U., Effect of phase system selectivity in preparative column liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 125, 59-70, 1976.

WHITLEY R.D., WACHTER R., LIU F., WANG N.-H.L., Ion-exchange equilibria of lysozyme, myoglobin and bovine serum albumin, effective valence and exchanger capacity. *Journal of Chromatography*, 465, 137-156, 1989.

YAKHONTOVA L.F., VAISBERG E.S., KOBZIEVA S.N., ISAEVA N.L., SAVITSKAYA E.M., Ion-exchange sorption of gentamycin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 9, 32-35, 1975.

YAMAMOTO S., NAKANISHI K., MATSUNO R., KAMIKUBO T., Ion-exchange chromatography of proteins - Prediction of elution curves and operating conditions. I. Theoretical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV, 1465-1483, 1983.(a)

YAMAMOTO S., NAKANISHI K., MATSUNO R., KAMIKUBO T., Ion-exchange chromatography of proteins- Prediction of elution curves and operating conditions. II. Experimental verifications. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV, 1373-1391, 1983.(b)

YAMAMOTO S., NOMURA M. SANO Y., Adsorption chromatography of proteins : determination of optimum conditions. *AIChE Journal*, vol. 33, N°9, 1987.

YAMAMOTO S., NAKANISHI K., MATSUNO R., Ion-Exchange chromatography of proteins. *Chromatographic Science Series*, vol.43, Marcel Dekker, Inc. 1988.

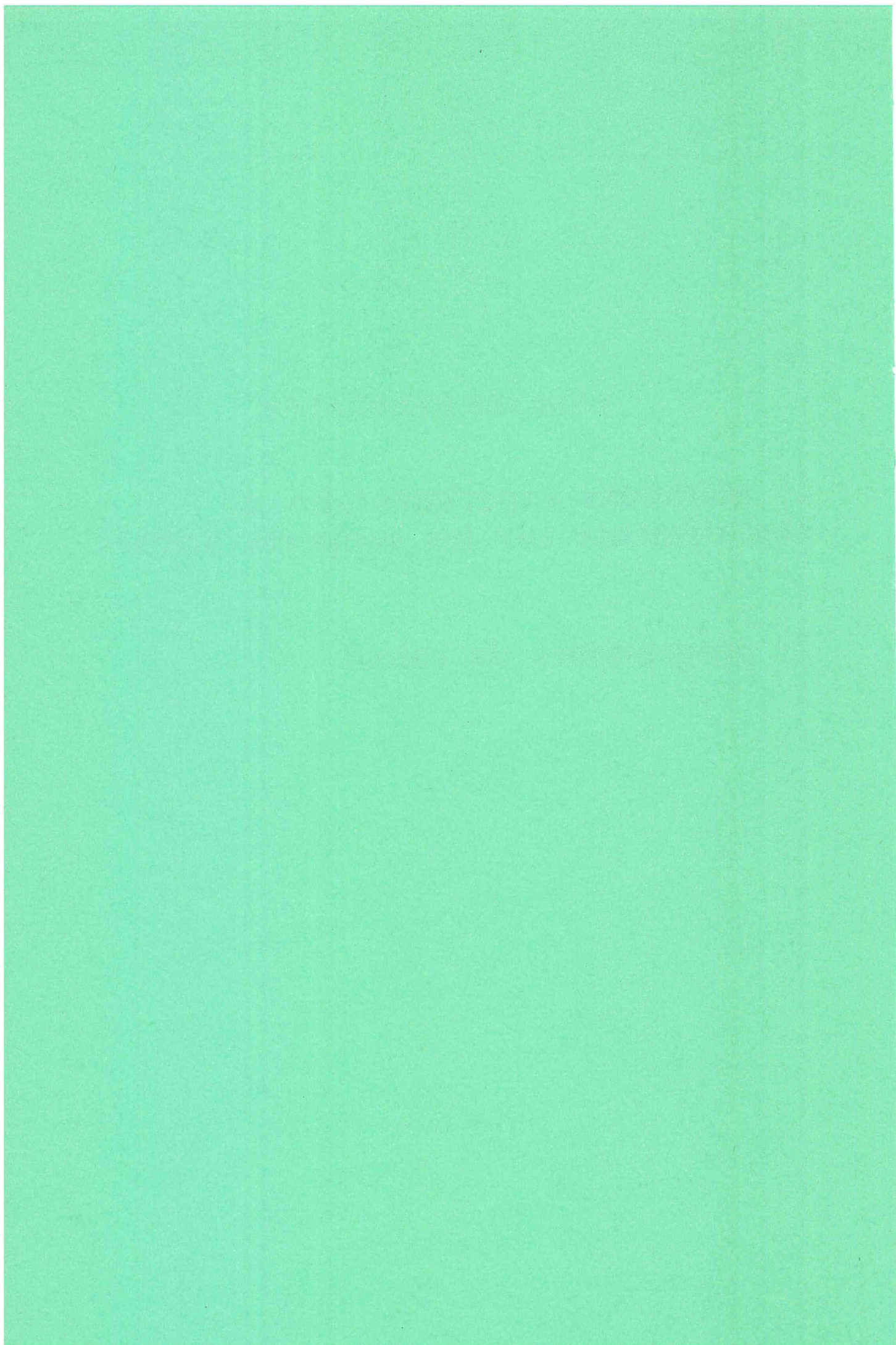
YANG Q.YU., WANG N.H.L. , Multicomponent ion-exchange chromatography for separating amino acids mixtures. *Reactive Polymers*, 6,33-44, 1987.

YASKOVICH G.A., KOZNEVA E.P., EL'KIN G.E., VOROB'eva V.Y., SAMSONOV G.V., Kinetics of sorption of the desoxyribonuclease of *actinomyces streptomycini* from a native solution with KMT carboxyl cation-exchange resin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 12, 631-634, 1974.

ANNEXES GENERALES

**1: méthodes expérimentales et
compléments sur les supports utilisés**

2: programmes de calcul



ANNEXE GENERALE 1 : METHODES EXPERIMENTALES ET COMPLEMENTS SUR LES SUPPORTS UTILISES

I. DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LES EXPERIENCES EN COLONNE

Pour les expériences en réacteur fermé ou semi-fermé, les méthodes ont été décrites au fur et à mesure dans le rapport. En ce qui concerne les expériences en colonne, nous avons employé le dispositif-type présenté en figure A.G.1-1. Il se compose successivement :

- d'un réservoir contenant la solution d'alimentation,
- d'un robinet 3 voies permettant la vidange des tuyaux,
- d'une colonne de verre avec embouts Téflon avec un piston,
- d'une cellule permettant la mesure du pH à l'aide d'une microélectrode, le pHmètre étant relié à un enregistreur,
- d'un spectrophotomètre UV-visible pour la mesure directe de concentration en protéine, à l'aide de cuves à circulation (1mm), à la longueur d'onde 280 nm. Le spectrophotomètre est relié à un ordinateur pour l'acquisition de données.
- d'un collecteur de fractions.

N.B.: La cellule de mesure de pH n'était pas toujours employée. Le pH était alors mesuré dans les tubes du collecteur. De même, le suivi de la Densité Optique (D.O.) permettait surtout d'obtenir des indications sur le déroulement de l'expérience. Les concentrations en albumine sont le plus souvent mesurées à partir des fractions (avec des cuves de 1 cm).

II. METHODES D'ANALYSE ET DE MESURE

• Le pH

- Pour le suivi en continu, le matériel utilisé est le suivant :
microélectrode : IBF (électrode de pH analytique, code 262551)
pHmètre : Tacussel PHN 81
enregistreur : Servotrace
- Pour les mesures discontinues :
électrode Tacussel, triaxiale avec sonde de température, XC 300
pHmètre : Tacussel PHN-850

- **L'albumine**

La concentration a été mesurée directement par absorption dans l'U.V. à 280 nm.

spectrophotomètre : Hitachi U-2000

cuves à circulation : quartz, 1 mm

cuves ordinaires : quartz, 1 cm

- **Les anions**

Les concentrations ont été mesurées par chromatographie ionique haute performance.

Système Dionex 4000-I.

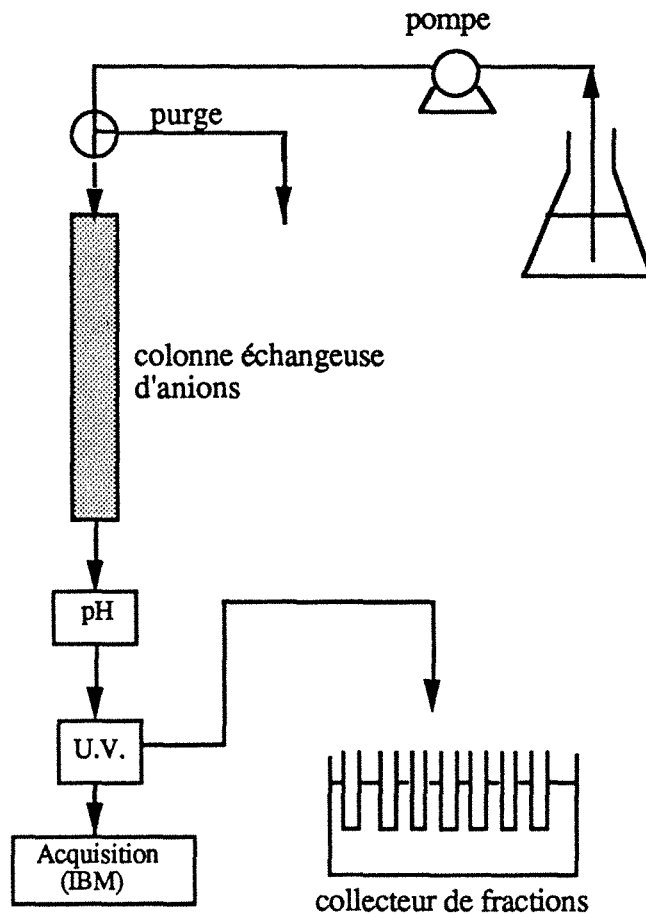
colonne : AS4A

éluant : carbonate/bicarbonate pour les chlorures, nitrates, phosphates

éluant : borate de sodium pour les acétates

- **Les cations**

Les concentrations ont été mesurées par absorption atomique Varian AA20, à 589.5 nm pour le sodium et 766.5 nm pour le potassium.



FigureA.G.1-1 : Schéma de l'installation

III. COMPLEMENTS SUR LES SUPPORTS ECHANGEURS D'IONS

III-1 Généralités

On a utilisé le support échangeur d'anions faible DEAE Spherodex ® LS, et le support fort QMA Spherosil ® LS (il n'existe pas de support anionique fort dans la gamme Spherodex). Ces supports sont fabriqués par IBF.

Il s'agit de supports composites, constitués de billes de silice recouvertes d'un polymère greffé de sites échangeurs d'ions. Pour le Spherodex, le polymère employé est le dextrane (hydrophile), pour le Spherosil, il s'agit de styrène vinyl triéthoxysilane (légèrement hydrophobe).

Dans l'annexe 2. (placée à la suite du Chapitre 2), se trouvent les informations concernant le DEAE Spherodex. Nous présentons ici dans le tableau A.G.1-1 les caractéristiques du support QMA Spherosil ® LS.

Des mesures effectuées au L.S.G.C. sur granulomètre (compteur Coulter) ont montré que la taille de bille était centrée sur un diamètre d'environ 100 µm pour les deux supports (Figures A.G.1-2 et A.G.1-3).

Taille de billes	100 - 300 µm
Limite d'exclusion	10 ⁶ - 10 ⁷ dt
Diamètre poreux moyen	1 000 Å
Volume poreux moyen	1 cm ³ /g
Surface spécifique moyenne	25 m ² /g
Nature des groupes ionisables	amine quaternaire
Quantité de groupes ionisables	300 µeq/g
Changement de volume	aucun

Tableau A.G.1-1 : Caractéristiques principales du support QMA Spherosil ® LS

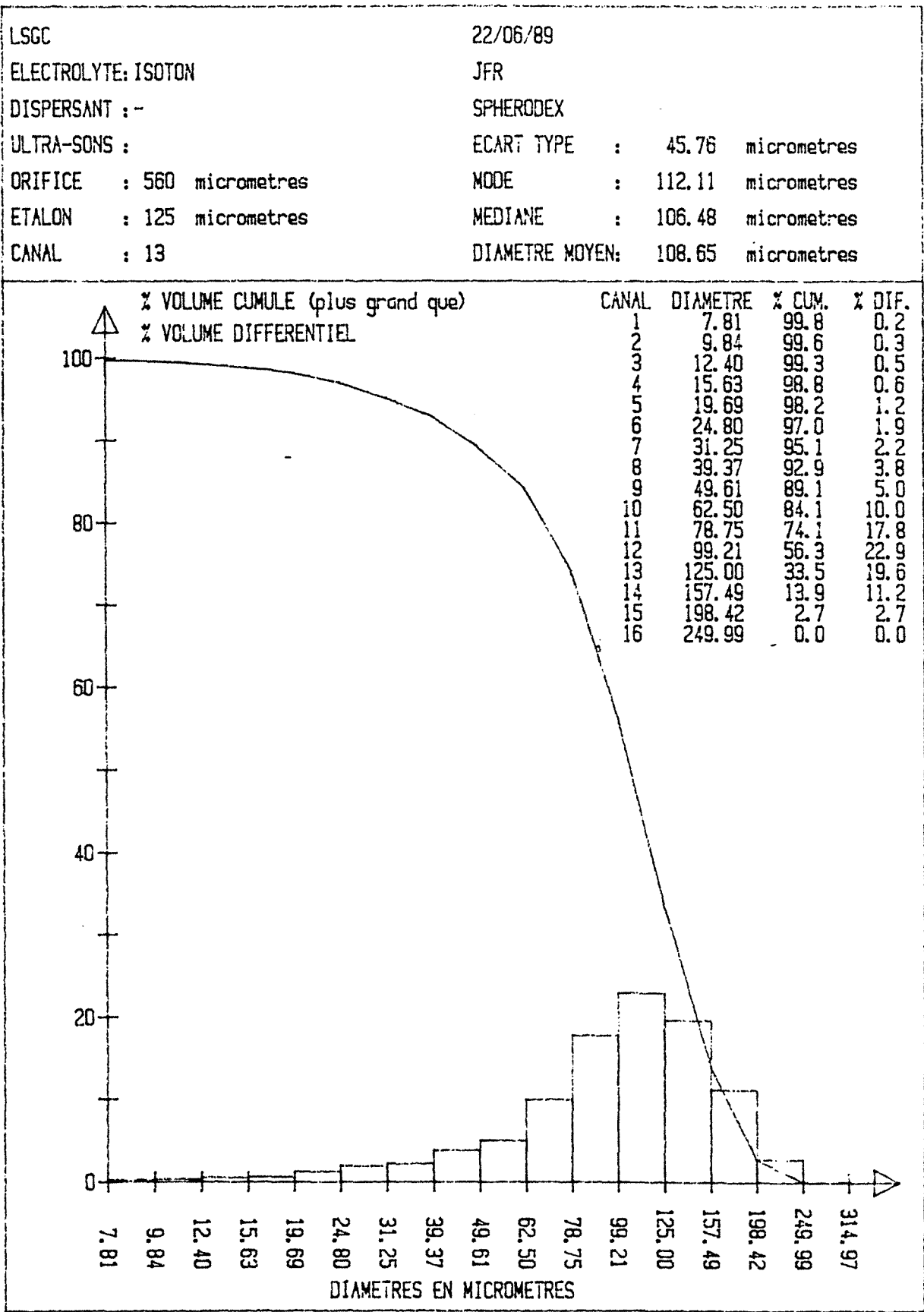


Figure A.G.1- 2 : Mesure de taille de particules : support DEAE SpheroDEX LS

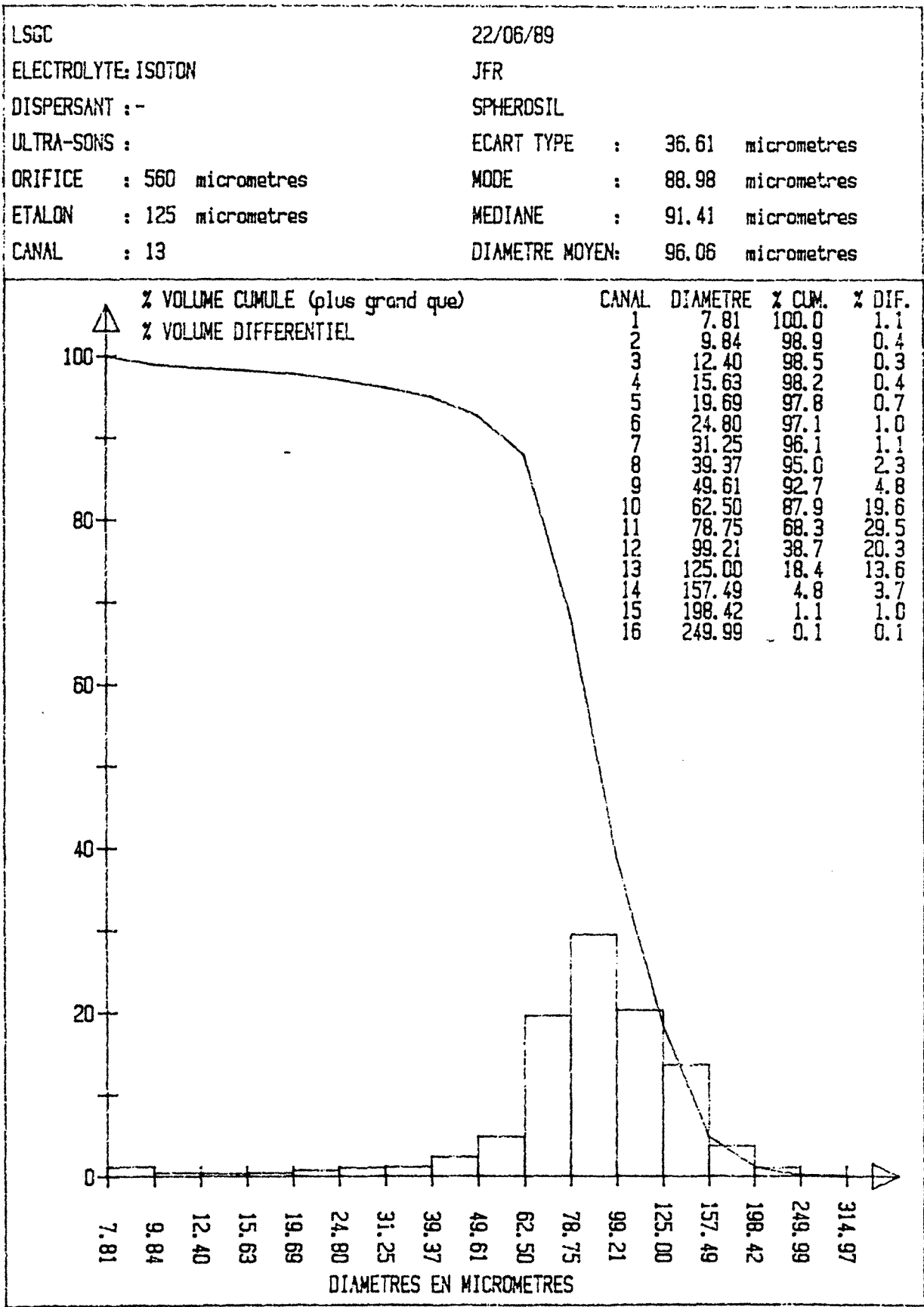


Figure A.G.1-3 : Mesure de tailles de particules : support QMA Spherosil

III-2 Caractérisation des supports par échange chlorure-nitrate

DEAE Spherox

- Dans le Chapitre 2 (Figure 2-1) ont été présentés des échanges chlorure-nitrate à différents pH. Ces échanges ont marqué le point de départ à l'étude de l'évolution de la capacité apparente en fonction de l'environnement ionique en solution.
- Nous avons également mesuré l'isotherme de l'échange chlorure-nitrate sur ce support, à pH 5.80. (Cette mesure a été effectuée de manière analogue à celle décrite en Annexe 3-1 pour l'échange chlorure-phosphate). Les résultats sont présentés en figure A.G.1-4. L'échange à ce pH peut être représenté par une loi d'action de masse avec un coefficient de sélectivité $K = 1.2 \pm 0.1$.

QMA Spherosil

Des expériences d'échange chlorure-nitrate ont été effectuées en colonne pour mesurer la capacité du support. Pour une colonne contenant 8 g de Spherosil (pesé sec), on trouve une capacité de 2.15 ± 0.1 méq, ce qui correspond à 0.269 ± 0.01 méq/g support sec, soit 0.119 ± 0.01 méq/ml de colonne (en considérant que 1 g de Spherosil pesé sec occupe 2.25 ml de colonne).

Des exemples d'échange chlorure-nitrate sont présentés en figure A.G.1-5 : on observe nettement la formation d'un front compressif lorsque le nitrate "vient remplacer" le chlorure, et un front dispersif dans le sens inverse (Figure A.G.1-6). (Ceci correspond à l'ordre d'affinité nitrate > chlorure, habituel pour les résines échangeuses d'anions).

Si on considère la dispersion hydrodynamique et cinétique négligeable, on peut, à partir du front dispersif, construire l'isotherme d'échange chlorure-nitrate (figure A.G.1-7).

On obtient une isotherme pouvant être représentée à partir de la loi d'action de masse avec un coefficient de sélectivité $K = 2.5 \pm 0.1$.

En dépit de sa faible capacité d'échange, on constate que le support QMA Spherosil a le comportement d'un échangeur d'anions classique.

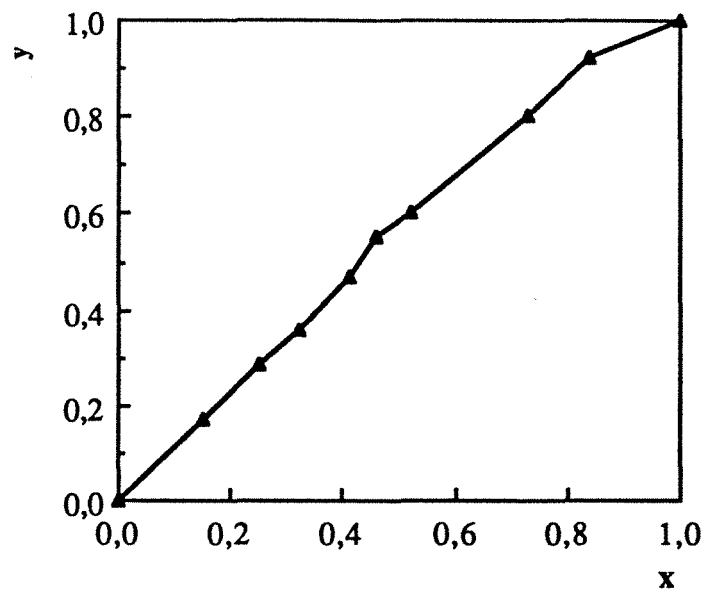


Figure A.G.1-4 : Isotherme expérimentale d'échange chlorure-nitrate sur DEAE Sphero-dex LS. y_{NO_3} vs x_{NO_3} . 20°C.

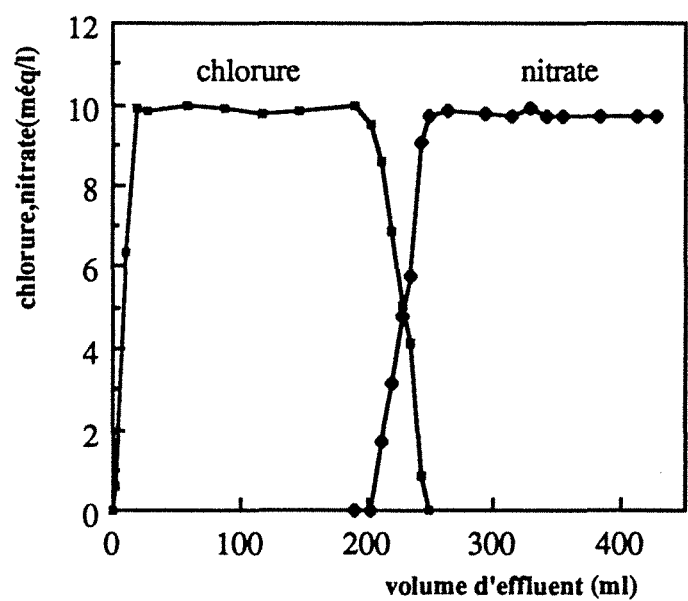


Figure A.G.1-5 : colonne (QMA Spherosil) équilibrée en chlorure (NaCl 10mM), alimentée en nitrate (KNO₃ 10 mM).

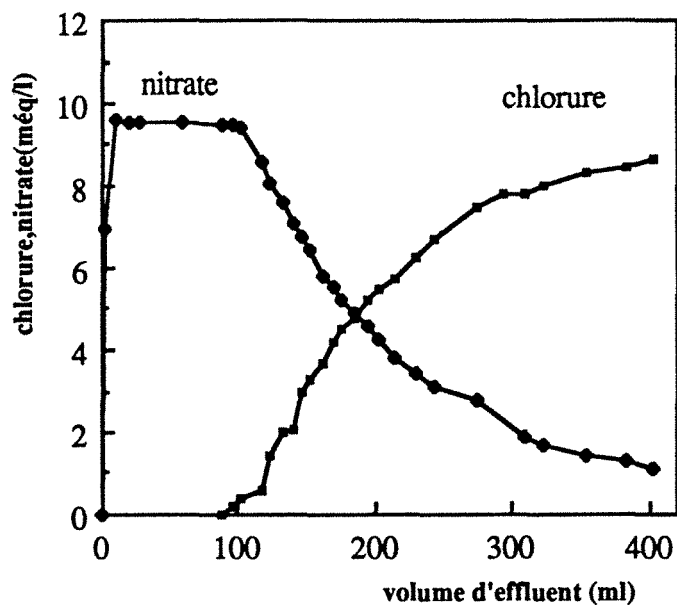


Figure A.G.1-6 : colonne (QMA Spherosil) équilibrée en nitrate (KNO_3 10 mM), alimentée en chlorure (NaCl 10 mM).

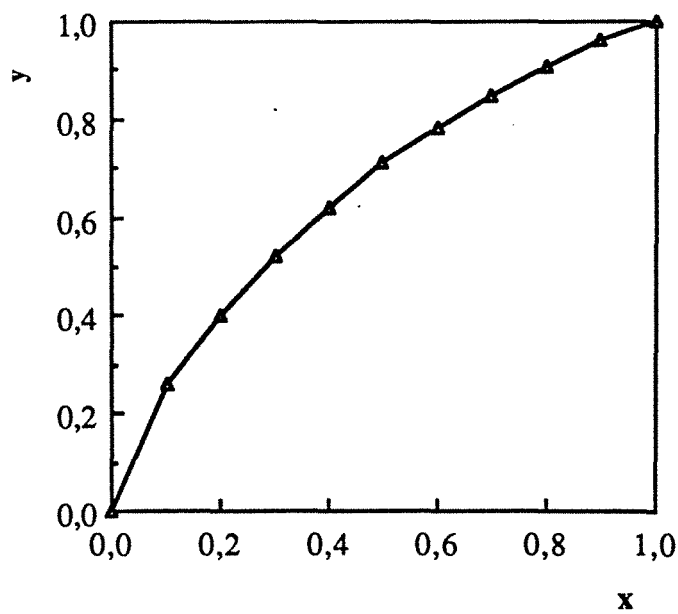


Figure A.G.1-7 : Isotherme d'échange nitrate-chlorure (QMA Spherosil LS), calculée à partir du front dispersif. y_{NO_3} vs x_{NO_3} . 20°C.

III-3 Mesures de Distribution de Temps de Séjour (DTS)

Des mesures de DTS [VILLERMAUX 1982] ont été effectuées sur une colonne remplie de 6g de Spheredex (pesé sec), en vue de caractériser l'hydrodynamique de la colonne.

• Chlorure de sodium :

Le premier traceur choisi était le chlorure de sodium. En tête et en sortie de colonne étaient placées deux sondes conductimétriques reliées à deux conductimètres, connectés à un enregistreur. La colonne était équilibrée avec une solution de chlorure de sodium 10 mM.

Des injections de type Delta de Dirac de chlorure de sodium 1N ont été effectuées sur un flux continu de NaCl 10mM (à l'aide d'une boucle d'injection 6 voies). Les signaux conductimétriques étaient suivis à l'entrée et à la sortie de la colonne.

L'analyse des pics obtenus, pour plusieurs expériences, à différents débits, ont permis de calculer notamment le nombre de mélangeurs (modèle des mélangeurs en cascade), ainsi que le volume accessible au fluide, donc par conséquent la porosité.

On a trouvé un nombre de mélangeurs $J = 50 \pm 5$ et une porosité totale moyenne de 82 %.

On est parti de l'hypothèse de non-interactivité entre le traceur et le milieu poreux ; cette hypothèse demandant à être vérifiée.

• Albumine :

Il ne nous était pas possible de suivre la concentration en albumine à l'entrée et à la sortie de la colonne. Au lieu d'effectuer des injections-impulsions, nous avons réalisé des injections échelons : la colonne était équilibrée par une solution d'albumine de concentration C_1 , un échelon de solution de concentration C_2 était injecté à l'état initial.

La concentration était suivie en sortie de la colonne par spectrométrie UV (acquisition de données). L'exploitation des résultats a été effectuée à l'aide d'une méthode mise au point pour les expériences en micro-colonne [GORIUS 1988]. L'ensemble tuyaux + cellule de mesure a été assimilé à un réacteur piston + un réacteur agité, en série avec la colonne.

La porosité ainsi mesurée était de 56 % (± 5).

Ceci n'est pas surprenant : étant donné la taille de la protéine, elle ne peut avoir accès à tout le volume poreux offert à NaCl. De plus, il se produit un certain colmatage. Encore une fois, ces mesures reposent sur l'hypothèse de non-interactivité entre le traceur et le milieu, ce qu'il serait bon de vérifier autrement.

ANNEXE GENERALE 2 : PROGRAMMES DE CALCUL

Nous avons utilisé deux programmes de calcul d'équilibre qui ont été écrits au L.S.G.C. : il s'agit des codes HYBRID [Chenevière 1989] et IMPACT [Jauzein et coll. 1989]. Ces programmes permettent le calcul de la composition d'un système chimique, en réacteur fermé et au cours du transport en colonne (calcul de profils ou de courbes de percée). Le système est décrit par un ensemble de réactions chimiques (schéma réactionnel), auxquelles sont associées des lois d'équilibre. Ils reposent sur les hypothèses suivantes :

- la température et la pression sont uniformes et constantes,
- les proportions entre les différentes phases sont conservées, ainsi que la géométrie du milieu poreux ⁽¹⁾,
- l'équilibre local est réalisé, pour chacune des phases,
- seule la phase liquide est mobile, et l'écoulement est permanent,
- chaque phase reste électriquement neutre,
- la composition initiale de l'ensemble des phases est uniforme sur la totalité du milieu poreux.

Au niveau hydrodynamique, l'écoulement est représenté par le modèle des mélangeurs en cascade [Villermaux 1982], dont le motif élémentaire est le réacteur parfaitement agité continu (la géométrie du réacteur est constante).

I. EQUATIONS DE BASE

Soit N le nombre d'espèces chimiques A_j présentes, et R le nombre de réactions indépendantes. La stoechiométrie des réactions s'écrit :

$$\sum_{j=1}^N v_{ij} A_j = 0 \quad \text{avec } 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.1})$$

v_{ij} est le coefficient stoechiométrique de l'espèce A_j dans la réaction i ($v_{ij} < 0$ pour les réactifs, $v_{ij} > 0$ pour les produits).

Les lois d'action de masse associées ont pour expression :

⁽¹⁾ Le colmatage éventuel du milieu n'est pas pris en compte.

$$K_i = \prod_{j=1}^N a_j^{v_{ij}} \quad 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.2})$$

où K_i est la constante d'équilibre thermodynamique, a_j l'activité de l'espèce j .

La composition de chaque phase est décrite à l'aide des concentrations $[A_j]$ exprimées en mole par litre de phase aqueuse.

Si on convertit les activités en concentration, les lois d'équilibre s'écrivent :

$$K_i = \prod_{j=1}^N [A_j]^{\eta_{ij}} \quad 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.3})$$

$\eta_{ij} = v_{ij}$ dans le cas de réactions homogènes (nous travaillons dans ce cas), mais il faut noter que cela peut être différent dans le cas de réactions hétérogènes (pour une précipitation, par exemple, η_{ij} peut s'annuler si A_j est le minéral pur).

Si toutes les espèces sont présentes, (A.G.2.3) représente un système de R équations non linéaires, entre N concentrations. Les $N-R$ équations restantes nécessaires au calcul sont données par des bilans de matières et de charge.

Calcul d'équilibre en réacteur fermé

A partir des contraintes stoechiométriques (A.G.2.1), les concentrations peuvent être reliées à une concentration de référence, arbitraire, connue, par :

$$[A_j] = [A_j]_0 + \sum_{i=1}^R v_{ij} \xi_i \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{A.G.2.4})$$

où ξ_i est l'avancement de la réaction i par rapport à la composition de référence.

D'après cette écriture, on peut déduire :

$$K_i = \prod_{j=1}^N \left([A_j]_0 + \sum_{i=1}^R v_{ij} \xi_i \right)^{\eta_{ij}} \quad 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.5})$$

(A.G.2.5) est un système de R équations algébriques, à R inconnues (ξ_i). La résolution des équations (A.G.2.4) et (A.G.2.5) permet d'obtenir les concentrations d'équilibre. Cette

résolution est effectuée par une méthode de Newton-Raphson, après transformation logarithmique des équations (A.G.2.5).

Cette méthode est valable lorsqu'il n'y a pas disparition d'espèce (comme c'est le cas par exemple en précipitation/dissolution). Les codes de calcul sont prévus pour éliminer des relations d'équilibre qui deviennent superflues si des espèces disparaissent.

Calcul d'équilibre en écoulement

Pour une espèce inerte (impliquée dans aucune réaction), le bilan de matière sur un réacteur agité est :

$$\frac{d[A]}{dt} = ([A]_e - [A]) \frac{Q}{V_0} \quad (\text{A.G.2.6})$$

où $[A]$ est la concentration dans le réacteur et dans le courant de sortie, $[A]_e$ est la concentration dans le courant d'alimentation, Q est le débit volumique et V_0 le volume de phase liquide du réacteur.

Pour une espèce réactive, ce bilan devient :

$$\frac{d[A_j]}{dt} = ([A_j]_e - [A_j]) \frac{Q}{V_0} + \sum_{i=1}^R \nu_{ij} r_i \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{A.G.2.7})$$

où $(\nu_{ij} r_i)$ est le flux de production de l'espèce j par la réaction i à l'équilibre. Dans le cas de limitations cinétiques, r_i est fonction de la composition ; à l'équilibre r_i est inconnu et doit être éliminé de l'équation (A.G.2.7). Soit $[A_j]^*$ et ξ_i tels que :

$$[A_j] = [A_j]^* + \sum_{i=1}^R \nu_{ij} \xi_i \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{A.G.2.8})$$

$$\frac{d[A_j]}{dt} = \frac{d[A_j]^*}{dt} + \sum_{i=1}^R \nu_{ij} \frac{d\xi_i}{dt} \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{A.G.2.9})$$

Si on substitue l'équation (A.G.2.9) dans l'équation (A.G.2.7), on obtient N équations différentielles, avec $N+R$ inconnues ($[A_j]^*$ et ξ_i). Etant donné que le choix de $[A_j]^*$ et de ξ_i est arbitraire dans l'équation (A.G.2.8), les bilans de matière peuvent être écrits :

$$\frac{d[A_j]^*}{dt} = ([A_j]_e - [A_j]) \frac{Q}{V_0} \quad 1 \leq j \leq N \quad (\text{A.G.2.10})$$

$$\frac{d\xi_i}{dt} = r_i \quad 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.11})$$

Les équations (A.G.2.10) et (A.G.2.11) montrent que le transport et le processus chimique peuvent être partiellement découplés. La condition initiale est :

$$[A_j] = [A_j]^* \quad \xi_i = 0 \quad (\text{A.G.2.12})$$

Etant donné que les termes r_i sont inconnus à l'équilibre, l'équation (A.G.2.11) peut être remplacée par les contraintes d'équilibre :

$$K_i = \prod_{j=1}^N \left([A_j]^* + \sum_{i=1}^R \nu_{ij} \xi_i \right)^{\eta_{ij}} \quad 1 \leq i \leq R \quad (\text{A.G.2.13})$$

Les équations (A.G.2.8), (A.G.2.10) et (A.G.2.13) sont résolues simultanément pour $[A_j]^*$ et ξ_i . La méthode de Newton-Raphson utilisée pour les systèmes en réacteur fermé est employée pour résoudre les équations algébriques. Dans le code IMPACT, une méthode prédicteur-correcteur avec un pas d'intégration variable est utilisée pour intégrer les équations différentielles. Dans le code HYBRID, c'est un algorithme de type "Explicit-Implicit Improved Euler".

II. UTILISATION DES CODES DE CALCUL

Nous présentons ici très brièvement la manière d'utiliser ces programmes. Dans tous les cas, il est nécessaire évidemment de fournir l'ensemble des réactions qui décrivent le système (schéma réactionnel) ainsi que les constantes d'équilibre.

- Pour un calcul en réacteur fermé, il faut donner une composition de référence à partir de laquelle le calcul est effectué. (IMPACT ; HYBRID).
- Pour un calcul en réacteur semi-fermé (dosage acide-base, par exemple), il faut entrer en plus la nature de l'espèce ajoutée (titrant), sa normalité, le nombre d'ajouts, le volume d'ajout et/ou de prélèvement. (On peut aussi négliger les variations de volume et calculer sur un certain nombre de points jusqu'à une concentration de référence indiquée) (HYBRID).
- Pour un calcul en réacteur ouvert (transport en colonne), il faut définir le réseau d'écoulement, ce qui consiste, pour le modèle des mélangeurs en cascade, à indiquer le nombre de mélangeurs, J, donner le volume accessible au fluide, et le débit volumique. Il faut aussi

donner les compositions du système à l'instant initial, ainsi que la composition d'équilibre de la (ou des) solution(s) d'alimentation. Enfin, il faut indiquer le volume de solution injecté, et l'intervalle de saisie des résultats.

III. COMPLEMENTARITE DES DEUX CODES DE CALCUL : POINT DE VUE DE L'UTILISATEUR

Les deux codes HYBRID et IMPACT ont pour objectif commun le calcul d'équilibre en réacteur fermé et au cours de l'écoulement en colonne. Si les équations de base sont les mêmes, ces deux programmes présentent des différences de conception (langage, organisation du programme, etc.).

Pour l'utilisateur, ces différences apparaissent essentiellement dans les points suivants :

- IMPACT fournit des résultats très rapidement en ce qui concerne le transport en colonne, grâce à une méthode d'intégration très performante. Mais dans l'état actuel des choses, il ne permet pas de prendre en compte les réactions d'ionisations en phase solide (supports échangeurs d'ions faibles) : le calcul d'équilibre peut être effectué uniquement pour une capacité d'échange constante. Les simulations d'expérience en colonne sur support fort ont été effectuées avec IMPACT.
- Conçu à l'origine pour le transport d'espèces particulières en milieu poreux, HYBRID comporte un éventail de réactions plus étendu (ionisation de supports faibles, réactions spécifiques aux particules, transport particulaire, etc.). Il permet également le calcul d'équilibre en réacteur semi-fermé (dosage acide-base, par exemple).
Par contre, en ce qui concerne le transport en colonne, l'intégration est assez longue et n'aboutit pas toujours à des résultats.
Par conséquent, si HYBRID a été parfois employé pour simuler des expériences en colonne, il a été essentiellement utilisé pour les simulations de dosages acide-base.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur TONDEUR, Directeur de Recherches CNRS, ENSIC/INPL,
Monsieur RIBA, Professeur, ENSIGC Toulouse.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame NICOLAS-SIMONNOT Marie-Odile

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse
intitulée :

Contribution à l'étude de la chromatographie frontale des protéines par échanges d'anions.
Application à l'albumine du sérum bovin"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : "GENIE DES PROCÉDES"

Fait à Vandœuvre le, 28 Janvier 1991

Le Président de l'IN.P.L.,

M. GANTOIS
DE
LORRAINE
NANCY



2, avenue de la Forêt de Haye - B.P. 3 - 54501 VANDŒUVRE CEDEX

Téléphone : 83. 59. 59. 59 - Télex : 961 715 F - Télécopie : 83. 59. 59. 55