



HAL
open science

Conception et optimisation d'un procédé extrapolable de purification d'acides hyaluroniques produits par culture microbienne

Nadia Oueslati

► **To cite this version:**

Nadia Oueslati. Conception et optimisation d'un procédé extrapolable de purification d'acides hyaluroniques produits par culture microbienne. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0191 . tel-01751135

HAL Id: tel-01751135

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751135v1>

Submitted on 6 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

UNIVERSITE DE LORRAINE (UL)

Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)
Laboratoire Réaction et Génie des Procédés (LRGP)

THESE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Nadia OUESLATI

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Génie des procédés

CONCEPTION ET OPTIMISATION D'UN PROCEDE EXTRAPOLABLE DE PURIFICATION D'ACIDES HYALURONIQUES PRODUITS PAR CULTURE MICROBIENNE

Soutenue publiquement le 04 décembre 2014

Membre du Jury

Rapporteurs :	Violaine ATHES	Professeur des universités, AgroParisTech, Paris
	Dominique TREBOUET	Professeur des universités, IUT, Strasbourg
Examineurs :	Laurent FALK	Directeur de Recherche, CNRS, LRGP, Nancy
	Patrick BOURSEAU	Professeur des universités, LIMATB, Lorient
	Romain KAPEL	Maître de conférences, UL, LRGP, Nancy
	Ivan MARC	Directeur de Recherche, CNRS, LRGP, Nancy
Membres invités	Stéphane MEUNIER	Directeur R&D Teoxane, Genève
	Christelle HARSCOAT - SCHIAVO	Chargée de Recherche, CNRS, Pessac

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de thèse Mr Ivan Marc, Mr Romain Kapel et Mme Christelle Harscoat-Schiavo pour m'avoir fait confiance et m'avoir guidé, encouragé, conseillé tout en me laissant une grande liberté et en me faisant l'honneur de me déléguer plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Mes remerciements vont également à Mr Stéphane Meunier, pour la gentillesse et la patience qu'il a manifesté ainsi qu'à la société Teoxane de m'avoir confié l'élaboration de son procédé de purification.

Je remercie Mme Violaine Athes, Mr Dominique trébouet, Mr Laurent Falk et Patrick Bourseau pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe bioprocédés – Biomolécules et particulièrement Mr Emmanuelle Rondags, Mr Xavier Framboisier, Mr Arnaud Aymes et Mme Eveline Ronat qui ont été présents et d'une aide inestimable tout au long de ma thèse.

Mention spéciale à Pierrick Leblanc qui m'a supporté, soutenue et largement contribué au déroulement de ma thèse dans la joie et la bonne humeur.

Pour leurs encouragements et leur assistance aussi bien matérielle que morale qui m'a permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement Alice, Julien, Abdoul Karim, Kenza, Claudia, Claudine, Salima, Pien, Enzo, Yousef, Nicla, Romain, Gari, Estelle, Nicolas, Myriam, David, Clémence, Laurie, Charlotte, Yoan, Sophie, Alexis, Pierre, Ylara, Frank, Marie Laure, Adeline, Aline, Lenna et Amanda.

Un immense MERCI à ma mère et ma famille qui ont largement contribué à la construction de ma personne et qui ont été d'un soutien inégalable.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à ma thèse et à mon quotidien durant ces trois belles années.

Sommaire général

1	INTRODUCTION GENERALE.....	1
2	ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
2.1	L'ACIDE HYALURONIQUE	7
2.2	LA PRODUCTION D'AH PAR VOIE MICROBIENNE.....	22
2.3	LES PROCEDES DE PURIFICATION DE L'AH	27
2.4	LES METHODES DE SECHAGE.....	48
2.5	AIDE A L'OPTIMISATION PAR L'UTILISATION DES PLANS D'EXPERIENCES.....	48
3	MATERIEL ET METHODES	52
3.1	LES PRODUITS ET LE MATERIEL.....	54
3.2	LES METHODES DE QUANTIFICATION	57
3.3	LES METHODES DE SEPARATION DE L'AH	61
4	RESULTATS ET DISCUSSION	73
4.1	DEVELOPPEMENT DE METHODES ANALYTIQUES.....	75
4.2	SEPARATION DE L'AH DU MILIEU DE CULTURE BACTERIEN.....	97
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	157
6	REFERENCES.....	165

Abréviations

aa : acide aminé

AA : absorption atomique

AH : acide hyaluronique

BHI : brain heart infusion

BSA : bovine serum albumin

CES : chromatographie d'exclusion stérique

CTAB : bromure de cétrimide ammonium

CTACL : chlorure de cétrimide ammonium

CTM : méthode turbidimétrique au bromure de cétrimide ammonium

DF diafiltration

DF : diffusion de la lumière

DV : diavolume

FCV : facteur de concentration volumique

G' : module conservatif

G'' : module dissipatif

HasA : hyaluronate synthétase

ICP-AES : spectrométrie d'émission par plasma à spectrométrie d'émission atomique

IR : indice de réfractométrie

Mw : poids moléculaire (molecular weight)

NaCl : chlorure de sodium

PD : pression différentielle

PE : pression d'entrée

Abréviations

PEO : polyéthylène glycol

PES : polyéthersulfone

PTM : pression transmembranaire

PVDF : fluorure de polyvinylidène

SDS : dodécyl sulfate de sodium

TCA : acide trichloroacétique

TR : taux de rétention

UF : ultrafiltration

VI : viscosité intrinsèque

Nomenclature

A_0 : surface de la membrane (m^2)

B_z : perméabilité de la couche ($m.s^{-1}$)

C : concentration dans le rétentat ($g.l^{-1}$)

C_0 : concentration initiale ($g.l^{-1}$)

C_0 : concentration initiale moyenne en solutés ($kg.m^{-3}$),

C_m : concentration à la membrane ($g.l^{-1}$)

C_p : concentration de particules dans le perméat ($g.l^{-1}$)

C_R : concentration de particules dans le rétentat ($g.l^{-1}$)

D : coefficient de diffusion du soluté ($m^2.s^{-1}$)

d : diamètre de particule (m)

dp : chute de pression du filtrat (Pa)

dU/dy : gradient transversale de vitesse (s^{-1})

dz : épaisseur (m)

E : efficacité de séparation (-)

e_d : épaisseur du dépôt (m)

J : flux de perméat ($\mu m.s^{-1}$)

K et α : constantes de Mark Houwink

K : coefficient de transfert du soluté ($m.s^{-1}$)

K_f et n : constantes de l'équation de Freudlich (-)

K_L : constante de Langmuir (-)

m : masse d'adsorbant (g)

m_{AH} : quantité d'AH après purification (kg)

Nomenclature

m_{AHO} : quantité d'AH avant purification (kg)

m_{total} : masse du milieu contenant l'AH (kg)

M_w : poids moléculaire (Da)

n : caractérise le modèle de filtration

P : pression à l'équilibre (Pa)

P_0 : pression de vapeur saturante (Pa)

P_A : pressions d'alimentation (P_A)

P_R : pression dans le rétentat (P_R)

P_R : productivité ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

Q : quantité de molécules adsorbées par unité de masse d'adsorbant ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Q_{mon} : quantité de molécules nécessaire pour former une monocouche par unité de masse d'adsorbant ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Q_p = débit de perméat en ($\mu\text{m}^3\cdot\text{mn}^{-1}$)

R : taux de rétention (-)

$r\omega^2$: accélération centrifuge ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$)

t : durée de filtration (s)

U_z : flux de filtrat ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

v : quantité d'adsorbat fixée à la pression P (cm^3 TNP par gramme (22414 cm^3 TNP = 1 mole))

V_0 : volume initial de rétentat (m^3)

VI : viscosité intrinsèque en ($\text{m}^3\cdot\text{kg}$)

V_m : capacité de la monocouche (cm^3 TNP. g^{-1})

V_w : volume total d'eau ajouté (m^3)

W_z : masse de gâteau (kg)

X : quantité de molécules adsorbées sur charbon actif (g)

Symboles grecs

$\Delta\rho$: différence de masse volumique (kg.m^{-3})

P_{HA} : pureté de l'AH (%)

α_z : résistance spécifique ($\text{s.kg}^{-1}.\text{m}^{-1}$)

β : constante d'érosion propre à la suspension (-)

δ : épaisseur de la polarisation de concentration (m)

η : viscosité dynamique (Pa.s)

η_a : viscosité apparente (Pa.s)

η_{HA} : rendement en acide hyaluronique

σ : conductivité (S.cm^{-1})

τ : contrainte de cisaillement (Pa)

τ_c : contrainte critique d'érosion (Pa)

τ_w : contrainte de cisaillement à la paroi (Pa)

Υ : gradient transversal de vitesse (s^{-1})

φ_d : masse volumique du dépôt (kg.m^{-3})

Ω : section unitaire de gâteau (m^2)

Equations

Numéro d'équation	Equations
1	$\tau = \eta \times \frac{dU}{dy}$
2	$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$
3	$VI = K \times M_w^\alpha$
4	$\log\left(\frac{\eta_r - 1}{C}\right) = \log(VI) + K(VI)C$
5	$RI \text{ signal} = K(RI) \times \frac{dn}{dc} \times C$
6	$\text{Intensité} = K(DL) \times \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \times C \times M_w$
7	$M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i}$
8	$Pol = \frac{M_w}{M_n}$
9	$M_n = \frac{\sum C_i}{\sum \frac{C_i}{M_i}}$

Equations

10	$\frac{4(\text{PD})}{(\text{PE}) - 2(\text{PD})} = C \times VI$
11	$V = \frac{d^2 \times \Delta\varphi}{18 \times \eta} \times r\omega^2$
12	$E = \frac{C_{\text{filtrat}}}{C_{\text{solution}}}$
13	$J_z = -\frac{B_z dp}{\eta dz}$
14	$B_z = \frac{\Omega \times d_z}{\alpha_z \times W_z \times dV}$
15	$J = -\frac{\Omega}{\eta \times \alpha \times W \times dV} \times dp$
16	$\Delta P = \frac{P_A + P_R}{2} - P_P$
17	$TR = 1 - \frac{C_p}{C_R}$
18	$J = \frac{Q_p}{S}$
19	$J_{\text{stat}} = \frac{D}{\delta} \ln \left(\frac{C_m - C_p}{C_R - C_p} \right)$
20	$J_{\text{lim}} = K \ln \frac{C_m}{C_0}$

Equations

21	$\frac{dJ}{dt} = -KJ(JA_0)^{2-n}$
22	$\varphi_d \frac{de_d}{dt} = JC_0 - \beta(\tau_w - \tau_c)^{3/2}$
23	$\eta_{AH} = \frac{m_{AH}}{m_{AH_0}}$
24	$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{AH}}{m_{\text{total}}}$
25	$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{AH}}{t}$
26	$C = C_0 e^{-(1-TR) \times \frac{V_{\text{eau}}}{V_0}}$
27	$\eta_{AH} = \frac{C_0 e^{-(1-RR) \times \frac{V_{\text{eau}}}{V_0}}}{C_0 \times V_0}$
28	$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{AH} \times J}{V_{\text{eau}}}$
29	$\frac{\frac{P}{P_0}}{V \times \left(1 - \frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{C \times V_m} + \frac{C-1}{C \times V_m} \times \left(\frac{P}{P_0}\right)$
30	$\frac{X}{m} = K_f \times C^{\frac{1}{n}}$
31	$Q = \frac{Q_{\text{mon}} \times K_L \times C}{1 + K_L \times C}$

Equations

32	$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_i^2 + a_{ij\dots z} X_i X_j \dots X_z$
33	$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \dots + \sum a_{ii} X_i^2 + a_{ij\dots z} X_i X_j \dots X_z + e$
34	$Y = X a + e$
35	Pente de la droite = - 0,93 [Cl ⁻ (M)] + 0,51
36	$\text{AH extrait (\%)} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{témoin}}}{C_{\text{total}}} \times 100$
37	$Y = 6,24 X_1 + 3,20 X_2 - 9,57 X_3 + 48,04$
38	$Y = 0,07 X_1 + 0,04 X_2 - 0,13 X_3 + 1,58$
39	<i>(Charged microsolutes) = (dry matter) ((HA) + (aa/ peptides))</i>
40	$\frac{C}{C_0} = e^{- (1-R) \frac{V_w}{V_0}}$
41	$P_{\text{HA}} = \frac{C_{0\text{HA}} e^{- (1-R_{\text{HA}}) \frac{V_w}{V_0}}}{\sum C_{0i} e^{- (1-R) \frac{V_w}{V_0}}}$
42	$P_{\text{productivity}} = \frac{C_{\text{HA}} \times V_0}{t_{\text{DF}} \times A}$

Equations

43	$t_{DF} = \int_{V_0}^{V_w} \frac{1}{J \times A} dV_w$
44	$K = a_K \times \sigma^{b_K}$
45	$C_w = a_{C_w} \times \sigma^{b_{C_w}}$
46	$J_p = (a_K \times \sigma^{b_K}) \ln \left(\frac{(a_{C_w} \times \sigma^{b_{C_w}}) - C_p}{C_0 - C_p} \right)$
47	$Productivity = \frac{V_0 \times C_{0,HA} \times e^{-(1-R_{HA}) \times \frac{V_w}{V_0}}}{\int_{V_0}^{V_w} \frac{1}{J_p} \times dV_w}$
48	$Y_1 = 95,9 + 49,7 X_1$
49	$Y_2 = 65,0 + 35,2 X_1 - 8,5 X_2 + 10,2 X_3$

Table des figures

Figure 1. Schéma illustrant la démarche globale de la thèse.....	4
Figure 2. Structure primaire de l'acide hyaluronique.	7
Figure 3. Structure variable en fonction du mode de préparation (i) chaîne d'AH en solution diluée, (ii) double hélice, (iii) deux hélices antiparallèles ; (iv) simples hélices en arrangement serré, (v) six chaînes en arrangement ordonné, (vi) six chaînes en arrangement plus compact, (vii) chaînes individuelles en pleine expansion (Atkins et Sheehan 1973).	8
Figure 4. Rhéomètre à cylindres coaxiaux (Kinexus ultra plus Malvern).	9
Figure 5. Viscosité en fonction du taux de cisaillement pour une solution d'AH 2 MDa à différentes concentrations, en NaCl 0.15 M, à 20 °C : (■) 50, (◆) 60, (▲) 70, (○) 80, (□) 90, (Δ) 100 g.l ⁻¹ (Pires et Santana, 2011).	10
Figure 6. Réseaux d'AH microbien. (a-b) 0.01 g.l ⁻¹ , (c et d) 1 g.l ⁻¹ (Aline M. B. Pires et Santana 2011).	11
Figure 7. Influence de la concentration en AH, en NaCl 0.15 M à 20 °C, sur la viscosité spécifique (Pires et Santana, 2011).	12
Figure 8. Détermination de la viscosité intrinsèque par l'équation de Martin.	16
Figure 9. Chromatogramme d'AH 4 MDa obtenu par CES/Multidétection.	17
Figure 10. Dépendance angulaire de la diffusion de la lumière en fonction de la taille des nanoparticules/molécules.	18
Figure 11. Le concept du pont de Wheastone.	19
Figure 12. Méthodologie de détermination des coefficients de Mark Houwink.	20
Figure 13. Influence de la température et de la durée du traitement sur la viscosité des solutions d'AH 0,03 % (Lowry et Beavers, 1994).	21
Figure 14. Pourcentage de réduction de la taille des AH en fonction du pH. En gris est présentée la dégradation à 1 mois d'incubation à 40 °C et, en noir, à 3 mois (Caspersen et al., 2014).	22
Figure 15. Photographie obtenue par microscopie électronique à transmission de Streptococcus zooepidemicus en phase exponentielle de croissance cultivée en bioréacteur aérobie (Chong et al., 2004).	23
Figure 16. Voie de biosynthèse de l'AH chez les streptococci (Chong et al. 2004).	25
Figure 17. Comparaison de trois procédés industriels de purification de l'AH.	28
Figure 18. Schéma d'un système de microfiltration tangentielle. (1) Pompe péristaltique, (2 et 3) manomètres, (4) membrane d'ultrafiltration, (5) vanne de contre pression, (6) agitateur magnétique et (7) éprouvette graduée.	33

Table des figures

Figure 19. Modélisation de la polarisation : théorie du « film ». J : le flux de perméat, D : coefficient de diffusion, C_P : concentration dans le perméat, C_R : concentration dans le rétentat, δ : épaisseur de la couche de polarisation, U : le débit tangentiel l'alimentation.	35
Figure 20. Les phénomènes responsables du colmatage des membranes.....	36
Figure 21. Schéma d'un système de diafiltration. (1 et 2) Pompes péristaltiques, (3 et 4) manomètre, (5) agitateur magnétique, (6) vanne de contre pression, (7) membrane, (8) éprouvette graduée et (9) réservoir d'alimentation.	41
Figure 22. Schéma du dispositif de filtration frontale.	63
Figure 23. Schéma du dispositif de filtration frontale sur adjuvant de filtration.	64
Figure 24. Dispositif de séparation de l'AH par ultrafiltration. (1) Pompe péristaltique, (2-3) manomètre, (4) membrane, (5) vanne de contre pression, (6) agitateur magnétique et (7) éprouvette graduée.	64
Figure 25. (A) Effect of the reaction duration on CTM sensitivity: evolution of absorbance at 600 nm at various HA concentrations. (B) Slope of the standard curves plotted versus incubation time.....	80
<u>Traduction</u> : Figure 25. (A) Effet de la durée d'incubation sur la sensibilité de la mesure par CTM : évolution de l'absorbance à 600 nm à différentes concentrations en AH.	
Figure 26. (A) Absorbance of CTM assays in relation to HA concentration. (B) R^2 of the standard curve established for various HA concentration ranges. 2 MDa HA was used. The incubation duration prior absorbance measurement was 10 min.	81
<u>Traduction</u> : figure 26. (A) Absorbance à 600 nm en fonction de la concentration en AH. (B) R^2 établi pour différentes gammes de concentrations d'AH. De l'AH de 2 MDa a été utilisé. La durée d'incubation avant la mesure de l'absorbance est de 10 mn.	
Figure 27. Impact of HA size on the HA quantification by CTM. The regression coefficients (R^2) and the slope of the standard curves were plotted against the HA size.	82
<u>Traduction</u> : figure 27. Influence de la taille d'AH sur la méthode de quantification par CTM. Les coefficients de régression (R^2) et la pente de la droite d'étalonnage sont présentés en fonction de la taille d'AH.	
Figure 28. No pH effect on the CTM sensitivity. The standard curves and regression coefficients were established with 2 MDa HA solutions in 0.1 M phosphate buffer. pH was adjusted by NaOH or H ₂ SO ₄	83
<u>Traduction</u> : figure 28. Absence d'influence du pH sur la sensibilité de la CTM. Les droites de la pente d'étalonnage et les coefficients de régression ont été déterminés à partir d'une solution d'AH dans un tampon phosphate 0,1 M. Le pH a été ajusté par de la soude ou de l'acide sulfurique.	

Table des figures

Figure 29. Impact of KCl concentration on the slope of the standard curve established by CTM. KCl was added to HA solution to obtain KCl final concentration between 0 and 0.5 M. The standard curve was established for each KCl concentration and the slope is plotted..... 84

Traduction : figure 29. Influence de la concentration en KCl sur la pente de la droite d'étalonnage établie par la CTM. Le KCl est ajouté aux solutions d'AH afin d'obtenir des concentrations comprises entre 0 et 0,5 M. Les pentes des droites d'étalonnage ont été établies pour chaque concentration en KCl et tracées en fonction de celle-ci.

Figure 30. Competition of chloride anion with HA for CTAB interaction. The slope of the standard curve of 2 MDa HA in 0.3 M of ionic strength of phosphate buffer was compared to the standard curves at 0.3 M of ionic strength obtained by addition of NaCl and KCl..... 85

Traduction : figure 30. Compétition des ions chlorure lors de l'interaction de l'AH avec le CTAB. La pente de la droite d'étalonnage établie à partir d'AH dans du tampon phosphate à 0,3 M de force ionique est comparée aux droites d'étalonnages établies en solution d'AH de 0,3 M de force ionique obtenue par addition de NaCl ou de KCl.

Figure 31. CTM (A) and carbazole method for assaying HA in phosphate buffer (\diamond) and BHI (\times). Standard curve obtained from equation 36 using 0.125 M NaCl is also displayed (\circ). 86

Traduction : figure 31. La CTM (A) et la méthode au carbazole pour la quantification de AH en tampon phosphate (\diamond) et en BHI (\times). La courbe d'étalonnage est obtenue par l'équation 36 en utilisant une concentration en NaCl de 0,125 M.

Figure 32. GPC-LS-RI chromatogram of cross-linked HA degraded by sonication. Elution was performed by phosphate buffered saline at a flow rate of 0.35 ml.min⁻¹. Dn/Dc used to calculate the HA concentration was 0.147. PEO 19k universal calibration was used to determine the HA size. Average HA size calculated was 980 kDa. 87

Traduction : figure 32. Chromatogramme de CES-DL-IR d'AH réticulé dégradé par sonication. L'élution est réalisée par un tampon phosphate salin à un débit de 0,35 ml.min⁻¹. Une calibration universelle réalisée à partir d'un PEO 19k est utilisée pour déterminer la taille de l'AH. La taille moyenne déterminée de 980 kDa.

Figure 33. Chromatogramme de CES/Réfractométrie d'AH (2 MDa) injecté à des concentrations comprises entre 0 et 1 g.l⁻¹. 50 μ l de chaque solution sont injectés. 90

Figure 34. Chromatogramme de CES/Diffusion de la lumière (7 °) d'AH de différentes tailles. 50 μ l de solution d'AH de taille comprise entre 70 kDa et 4,2 MDa sont injectés à 0,5 g.l⁻¹. Les chromatogrammes obtenus pour chaque taille sont superposés. 91

Figure 35. Comparaison de la détermination de la taille d'AH par la méthode de référence et la CES/Diffusion de la lumière à 7°. Huit tailles d'AH comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa ont été

Table des figures

déterminées par les deux méthodes (de référence et GPC/Diffusion de la lumière) et sont comparées.	92
Figure 36. Chromatogramme de CES/ Viscosimétrie de l'AH à différentes tailles. 50 µl d'AH de tailles comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa sont injectés à 0,5 g.l ⁻¹ . Les chromatogrammes obtenus pour chaque taille sont superposés.	93
Figure 37. Comparaison de la viscosité intrinsèque de référence et celles mesurées par CES/Viscosimétrie de huit tailles d'AH comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa.	94
Figure 38. Comparaison des coefficients de Mark Houwink K et α déterminé par CES/multi-détection à différentes tailles d'AH et des approximations utilisées pour le calcul de la taille par la méthode de référence.....	95
Figure 39. Schéma récapitulatif des méthodes de suivi des composés du milieu de culture microbienne.....	96
Figure 40. Influence de la concentration en SDS sur la libération de l'AH présent dans la capsule bactérienne. L'AH extrait représente la part d'AH libérée par rapport à l'AH total en solution.	97
Figure 41. Evolution du flux de perméat lors de la séparation des cellules du milieu de culture en microfiltration en fonction du nombre de facteur de concentration volumique pour différent taux de rétention (TR) de l'AH.	99
Figure 42. Résumé des expériences invalidant la microfiltration tangentielle pour la séparation des cellules du milieu.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 43. Séparation des cellules par filtration sur terre de diatomée. (A) Précouche de terre de diatomée et (B) superposition des couches filtrantes de cellules et de terre de diatomée. (Source : matevi-france.com/oenologie/filtration/filtre-a-alluvionnage/en-savoir-sur-le-filtre-a-alluvionnage).	103
Figure 44. Chromatogramme de CES/Multi-détection d'un mélange d'AH 2 MDa et 70 KDa. (A) Chromatogramme de CES/Réfractométrie. (B) les tailles d'AH déterminées par diffusion de la lumière à 7 °C.....	105
Figure 45. Chromatogrammes de CES/Multi-détection d'AH du rétentat et du perméat à FCV 3 de l'ultrafiltration du mélange d'AH 2 MDa et 70 kDa sur une membrane de 1 MDa. En chaque point du chromatogramme la concentration (C_R , C_P) et la taille (M_w) de l'AH est déterminée.	106
Figure 46. Sélectivité de taille des membranes d'ultrafiltration. Ultrafiltration d'un mélange de taille d'AH 70 kDa et 2 MDa (1 : 1) à 0,5 g.l ⁻¹ sur membrane de 100 kDa et 1 MDa. Les concentrations en AH dans le perméat et rétentat sont présentées en A, les taux de rétention globaux (TR) en B, les flux (J) en C et D, et les taux de rétention (TR) par taille d'AH en E et F.	107
Figure 47. Influence du pH (A) et de la force ionique (B) sur la sélectivité de taille en UF. Ultrafiltration, sur une membrane de 1 MDa, d'une solution à 0,5 g.l ⁻¹ d'un mélange d'AH de tailles 70 kDa et 2 MDa	

Table des figures

<i>(1 : 1). En A, le pH de la solution a été diminué à pH 2 et, en B, la force ionique a été augmentée à 1 M par du NaCl.</i>	<i>108</i>
<i>Figure 48. Influence du débit d'alimentation sur le flux de perméat (A) et le taux de rétention (B) pour différentes tailles d'AH. Ultrafiltration de solutions d'AH à 1 g.l⁻¹ sur membrane de 100 kDa. Le débit et le taux de rétention sont mesurés après 30 mn de recirculation à chaque débit d'alimentation... 109</i>	
<i>Figure 49. Influence de la PTM et de la concentration en AH en fonction de la taille sur le taux de rétention de l'AH sur membrane de 100 kDa (A) et 1 MDa (B). Les concentrations d'AH sont mesurées après 30 mn de recirculation totale. La modélisation est réalisée à partir d'un polynôme du second degré par le logiciel Modde.9.</i>	<i>114</i>
<i>Figure 50. Influence de la PTM et de la concentration en AH en fonction de la taille sur le flux de perméat sur membrane de 100 kDa (A) et de 1 MDa (B). Le flux de perméat est mesuré après 30 mn de recirculation totale. La modélisation est réalisée à partir d'un polynôme du second degré par le logiciel Modde.9.</i>	<i>116</i>
<i>Figure 51. Récapitulatif des conditions opératoires permettant d'améliorer la rétention de l'AH et le flux de perméat d'ultrafiltration.</i>	<i>117</i>
<i>Figure 52. Schematic diagram of the membrane filtration system (1, 2: peristaltic pump; 3, 4: pressure gauge; 5: magnetic agitator; 6: valve; 7: membrane module; 8: permeate tank; 9: water tank).</i>	<i>121</i>
<i><u>Traduction</u> : figure 52. Schéma d'un système de filtration membranaire (1,2 : pompes péristaltiques ; 3, 4 : manomètre ; 5 : agitateur magnétique ; 6 : vanne ; 7 : membrane ; 8 : bac de perméat ; 9 : bac d'eau).</i>	
<i>Figure 53. Relative concentration of 2 MDa HA, aminoacids/peptides and minerals in the course of DF (100 kDa PES membrane at 2.5 bar of TMP). V_w/V_0 corresponds to the number of diavolume that passed through the membrane. HA, aminoacids/peptides and minerals relative concentrations were calculated from CTM, BCA and conductivity analysis respectively. The theoretical relative concentrations are presented in dotted line.</i>	<i>123</i>
<i><u>Traduction</u> : figure 53. Concentration relative de l'AH (2 MDa), des acides aminés/ peptides et des minéraux au cours de la DF (membrane de 100 kDa à 2,5 bar de PTM). V_w/V_0 correspond au nombre de diavolumes qui traverse la membrane. Les concentrations relatives de l'AH, des acides aminés / peptides et des minéraux sont calculées à partir des mesures réalisées par la CTM, BCA et de la conductivité, respectivement. Les concentrations relatives théoriques sont présentées (courbe en pointillés).</i>	
<i>Figure 54. Yield and purity in diafiltration process. Theoretical and experimental yield and purity are presented respectively in A and B, versus V_w/V_0 (number of diavolumes).</i>	<i>126</i>

Table des figures

Traduction : figure 54. Rendement et pureté au cours de la diafiltration. Les rendement et pureté expérimentaux et théoriques sont respectivement, présentés en A et B en fonction du nombre de diavolumes (V_w/V_0).

Figure 55. Permeate flow rate of AH DF. 1 g.l⁻¹ HA was introduced in semi synthetic, mineral media or water. The DF conditions were constant during the DF process (2.5 bar TMP, 36 ml.min⁻¹ feeding rate and room temperature)..... 127

Traduction : figure 55. Flux de perméat de la DF d'une solution d'AH. De l'AH à 1 g.l⁻¹ est introduit en milieu semi-synthétique, milieu minéral et en eau. Les conditions de DF sont constantes durant la DF (2,5 bar de PTM, 36 ml.mn⁻¹ et à 25 °C.

Figure 56. A- Effect of the conductivity (due to charged microsolutés) on the permeate flux. B and C- The transfer coefficients k and the wall concentration C_w as a function of the conductivity. Coefficient values were calculated by regression from the permeate flux experiments measured at different HA concentration and conductivities. Flux were taken after 30 min of total recirculation at 2.5 bar of PTM, 36 ml.min⁻¹ feed rate and room temperature. 129

Traduction : figure 56. A – Effet de la conductivité (liée à la charge des microsolutés) sur le flux de perméat. B et C le coefficient de transfert et la concentration en AH à la membrane (C_w) en fonction de la conductivité. La valeur des coefficients est calculée à partir des flux de perméat mesurés à différentes concentrations d'AH et conductivités. Les flux de perméat sont mesurés après 30 mn de recirculation totale, à 2,5 bar de PTM, 36 ml.mn⁻¹ et à 25 °C.

Figure 57. Semi-synthetic medium. Comparison between calculated and experimental permeate fluxes, J_p , versus the number of diavolumes (A) and productivities (B) versus purity in the course of the diafiltration process..... 131

Traduction : figure 57. Milieu semi-synthétique. Comparaison des valeurs calculées et expérimentales du flux de perméat (J_p) en fonction du nombre de diavolumes (A) et de productivité (B) en fonction de la pureté, au cours de la diafiltration.

Figure 58. Impact of the initial mineral concentration (A) and aminoacids/peptides (B) on the productivity as a function of the purity required..... 133

Traduction : figure 58. Influence de la concentration initiale en minéraux (A) et en acides aminés / peptides (B) sur la productivité en fonction de la pureté requise.

Figure 59. Natural HA mixture (microbial culture). Comparison of calculated and experimental yield (A) and purity (B) versus the number of diavolumes. 135

Traduction : figure 59. AH produit par voie microbienne. Comparaison des valeurs expérimentales et calculées du rendement (A) et de la pureté (B) en fonction du nombre de diavolumes.

Table des figures

Figure 60. Comparison of the calculated and theoretical permeate flow rates versus the number of diavolumes (A) and productivity versus purity (B).....	136
<i>Traduction</i> : figure 60. Comparaison des valeurs expérimentales et calculées du flux de perméat en fonction du nombre de diavolume (A) et de la productivité en fonction de la pureté (B).	
Figure 61. Influence de la diafiltration sur la taille des AH. Diafiltration à 10 diavolumes de l'AH à 1 g.l ⁻¹ à température ambiante, 2,5 bar de PTM et 36 ml.mn ⁻¹ de débit d'alimentation. Tailles mesurées par CES/Diffusion de la lumière. Les distributions de taille avant et après diafiltration sont superposées.	137
Figure 62. Positionnement de la quantité de protéines (A) et des acides nucléiques (B) à dix diavolume par rapport à la limite des normes de la pharmacopée européenne (droite rouge).....	139
Figure 63. Cinétique d'adsorption des acides nucléique (A) et des protéines (B) sur les charbons actifs ENO-PC et L3S. 1 g.l ⁻¹ de charbon actif est ajouté en milieu complexe. Après 2 h d'incubation à 4 °C le charbon actif est éliminé et la concentration en protéines ainsi que l'absorbance à 260 nm sont mesurées afin de déterminer l'adsorption.	140
Figure 64. Isothermes d'adsorption des acides nucléiques (A) et des protéines (B) à 4 °C. Six quantités de charbon actif (ENO-PC et L3S) sont additionnées pour atteindre les concentrations de 1 g.l ⁻¹ , 2,5 g.l ⁻¹ , 5 g.l ⁻¹ , 10 g.l ⁻¹ , 15 g.l ⁻¹ et 20 g.l ⁻¹ . Après 2 h d'incubation à 4 °C, le charbon est éliminé et les acides nucléiques et les protéines sont quantifiés afin d'établir l'isotherme d'adsorption. Chaque essai est réalisé en triplicat.	141
Figure 65. Influence de la température sur l'adsorption des acides nucléiques (A) et protéines (B) sur le charbon actif ENO-PC. Six quantités en charbon actif (ENO-PC et L3S) sont additionnées pour obtenir des concentrations de 1 g.l ⁻¹ , 2,5 g.l ⁻¹ , 5 g.l ⁻¹ , 10 g.l ⁻¹ , 15 g.l ⁻¹ et 20 g.l ⁻¹ . Après 2 h d'incubation à 4 °C, le charbon est éliminé et les acides nucléiques et les protéines sont quantifiés afin d'établir l'isotherme d'adsorption.	143
Figure 66. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'adsorption des acides nucléiques. Le milieu de force ionique élevée est un milieu complexe contenant 13 g.l ⁻¹ de sels. La faible force ionique est obtenue à partir du même milieu sans les sels. Les pH des deux solutions sont également abaissés à pH 4.	144
Figure 67. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'adsorption des protéines. Le milieu de force ionique (FI) élevée est un milieu complexe contenant 13 g.l ⁻¹ de sels. La faible force ionique est obtenue à partir du même milieu sans les sels. Les pH, des deux solutions, sont également abaissés à pH 4.	144
Figure 68. Impact de la composition des solutions sur les propriétés rhéologiques des solutions (2 g.l ⁻¹ d'AH, 0,1 M de NaCl et pH de 2,5). La cohésion importante des chaînes d'AH empêche le retrait de la sonde de pH.	149

Table des figures

<i>Figure 69. Diagrammes confrontant les valeurs modélisées et expérimentales du rendement (A) et de la pureté (B) obtenus pour la précipitation de l'AH à l'éthanol à différentes concentrations d'AH, force ionique mais aussi nombre de bains successives du précipité d'AH. La modélisation est réalisée par le logiciel modde.9.</i>	<i>151</i>
<i>Figure 70. Influence de la force ionique et de la concentration en AH sur le rendement de précipitation et la pureté. Aucun bain du précipité n'est réalisé afin d'éliminer les sels du précipité. La modélisation est réalisée par modde.9 à partir des données du tableau 14.</i>	<i>152</i>
<i>Figure 71. Influence du nombre de bains du précipité de l'AH en éthanol pur sur la pureté de l'AH. (En surimpression blanche, les rendements de précipitation inférieurs à 100 %). La modélisation est réalisée par le logiciel modde.9 à partir des données du tableau 14.</i>	<i>153</i>
<i>Figure 72. Influence de la précipitation sur la taille des AH (pH = 2,5, 60 % d'éthanol, 3 g.l⁻¹ d'AH et 4 bains successifs du précipité à l'éthanol). Les tailles avant et après précipitation sont mesurées par CES/Multi-détection.</i>	<i>154</i>
<i>Figure 73. Précipitation de l'AH par de l'éthanol (50 ml d'AH à 3 g.l⁻¹, pH 2,5, 65 % d'éthanol, 0,1 M de NaCl, 4 bains du précipité à l'éthanol). Le précipité d'AH en fin de précipitation est présenté en A et après 24 h de séchage à 37 °C en B.</i>	<i>155</i>
<i>Figure 74. Aspect de l'AH après lyophilisation.....</i>	<i>155</i>
<i>Figure 75. Comparaison des tailles avant et après lyophilisation du même AH.</i>	<i>156</i>
<i>Figure 76. Récapitulatif des étapes du procédé de purification.</i>	<i>162</i>

Table des tableaux

Tableau 1. Approximation des coefficients de l'équation de Mark Howink en fonction de la taille des AH.	15
Tableau 2. Récapitulatif de la nature et des seuils de coupure des membranes d'ultrafiltration utilisées pour la séparation de l'AH.	40
Tableau 3 : Les différents types de pores des charbon actifs.	45
Tableau 4. Expériences constituant le plan complet de l'étude de l'impact de la PTM, de la concentration et de la taille des AH sur le flux de perméat et le taux de rétention.	66
Tableau 5. Caractéristiques des charbons actifs L3S et ENO-PC.	70
Tableau 6. Décomposition du milieu semi-synthétique en deux parties : les minéraux (A), les peptides/acide aminées et l'AH (B).	71
Tableau 7. Composition des milieux utilisés dans le cadre de l'étude de l'influence de la force ionique et pH sur l'adsorption des acides nucléiques et protéines.	71
Tableau 8. Ensemble des conditions expérimentales entrant dans la construction du plan d'expériences composite à faces centrées pour l'étude de l'influence de la concentration en AH, de la force ionique et du nombre de bains du précipité sur le rendement et la pureté de l'AH.	72
Tableau 9. Impact de la concentration d'AH (2 MDa, VI = 21,6 dl.g ⁻¹) sur la détermination de la taille et la viscosité intrinsèque par CES/Multi-détection.	90
Tableau 10. Plan d'expériences (plan complet) de l'étude de l'influence de la PTM et de la concentration sur le taux de rétention et le flux de perméat en fonction de la taille d'AH, en ultrafiltration sur membrane de 1 MDa. L'AH est dissous dans de l'eau osmosée.	111
Tableau 11. Plan d'expériences (plan complet) de l'étude de l'influence de la PTM et de la concentration en AH sur le taux de rétention et le flux de perméat en fonction de la taille, en ultrafiltration sur membrane de 100 kDa. L'AH est dissous dans de l'eau osmosée.	112
Tableau 12. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation, par un polynôme du second degré, du flux de perméat et du taux de rétention en l'ultrafiltration de l'AH sur membrane 1 MDa en fonction de la PTM et de la concentration à différentes tailles d'AH.	113
Tableau 13. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation, par un polynôme du second degré, du flux de perméat et du taux de rétention en l'ultrafiltration de l'AH sur membrane 100 kDa en fonction de la PTM et de la concentration à différentes tailles d'AH.	113
Table 14. Initial concentration (C ₀) and retention (R) of each component group of the mixture. R is calculated from experimental data. HA and aminoacids initial concentrations were from CTM, and	

Table des tableaux

<i>BCA assays respectively. Charged microsolute are deduced by difference with dry matter concentration.</i>	125
<i>Table 15. Coefficients of the polynomial models of k and C_w</i>	130
<i>Table 16. Initial concentrations and retention values of the microsolute and HA contained in the complex HA culture medium.</i>	134
<i>Tableau 17. Coefficient de la modélisation de Freundlich et Langmuir de l'adsorption des acides nucléiques.</i>	142
<i>Tableau 18. Coefficient de la modélisation de Freundlich et Langmuir de l'adsorption des protéines.</i>	142
<i>Tableau 19. Coefficients de corrélation de l'équation de Freundlich de l'adsorption des acides nucléiques et de Langmuir de l'adsorption des protéines à pH 4 et à faible force ionique.</i>	145
<i>Tableau 20. Tableau regroupant les caractéristiques de la diafiltration d'un milieu-semi synthétique et les quantités de charbon actif à ajouter afin d'éliminer les protéines et acides nucléiques résiduels.</i>	146
<i>Tableau 21. Impact de la concentration en AH, de la force ionique et du nombre de bains du précipité d'AH sur la pureté de l'AH et le rendement de précipitation de l'AH.</i>	150
<i>Tableau 22. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation du rendement de précipitation de l'AH par l'éthanol. La modélisation est réalisée à partir d'un polynôme du second degré.</i>	151
<i>Tableau 23. Impact des conditions de précipitation de l'AH à l'éthanol (pH = 2,5, 60 % d'éthanol, 3 g.l⁻¹ d'AH et 4 bains successifs du précipité à l'éthanol) sur la taille des AH.</i>	154
<i>Tableau 24. Impact de la lyophilisation sur les caractéristiques de l'AH</i>	156

1 INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'acide hyaluronique (AH) est un polymère linéaire non branché appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Il est constitué de la répétition d'une unité diholosidique (acide β -D-glucuronique-(1-3)- β -D-N-acétylglucosamine), liés entre eux par des liaisons glycosidiques β -1,4. Le nombre d'unités constituant l'AH n'est pas fixe ce qui conduit à une gamme de tailles d'AH très étendue (70 kDa à 4 MDa). Ce polyside de haute valeur ajoutée est utilisé dans le domaine de la santé du fait de ces intéressantes propriétés mécaniques et biologiques mais aussi qu'il est non immunogène. Il est ainsi utilisé en ophtalmologie, en otolaryngologie et en chirurgie orthopédique, rhumatologique et plastique. La diversification des applications de l'AH est le reflet d'un marché en pleine expansion (10 %/an selon Millennium Research Group). Le marché de l'AH est estimé à environ 1 milliard d'euros en 2014.

Initialement, l'AH était issu d'une extraction à partir de crêtes de coq. Néanmoins, des problèmes règlementaires dus aux risques de contaminations croisées associées à l'utilisation de l'AH d'origine animale dans le domaine biomédical ont conduit au développement d'une production par voie microbienne (streptocoques du groupe A et C) qui présente, en outre, l'avantage de s'adapter plus facilement à la demande croissante en AH. L'AH ainsi produit se trouve, d'une part, en solution dans un milieu de production et, d'autre part, associée à la cellule composant la capsule.

L'AH pour des applications dans le domaine biomédical doit présenter d'une part une pureté élevée et d'autre part garantir une taille élevée des AH. Les normes de la pharmacopée européenne sont très restrictives sur de nombreux critères (aspect, pureté, viscosité intrinsèque, concentration en fer, plomb, chlorure, endotoxine, acides nucléiques et protéines). Développer un procédé de purification qui permet d'atteindre ces normes, est complexe. A cette difficulté, s'ajoute des contraintes liées à la taille des AH. Les grandes tailles d'AH sont à l'origine de contraintes rhéologiques importantes qui peuvent entraver les méthodes de séparation. De plus, le maintien de ces tailles élevées doit être garanti car celles-ci sont le témoin de la conservation de ses propriétés biologiques.

L'objectif de cette thèse est de proposer un enchaînement d'opérations et de conditions opératoires permettant une purification de l'AH de grande taille à partir d'un milieu de production. Pour cela, quatre étapes sont nécessaires : la séparation / extraction de l'AH associé aux parois bactériennes, la séparation des cellules du milieu contenant l'AH, la purification de l'AH du milieu de culture et la stabilisation de l'AH sous forme sèche. Le maintien de la taille des AH devra également être garanti.

La caractérisation de l'AH et le suivi de la composition des solutions d'AH au cours du procédé de purification sont essentiels pour la détermination des performances de chaque étape du procédé et pour vérifier que le produit fini est conforme aux normes de la pharmacopée européenne.

Néanmoins certaines d'entre elles ne sont pas applicables en mélange complexe. Deux méthodes seront développées : la méthode turbidimétrique au bromure de cétyltriméthylammonium (CTM) et la chromatographie d'exclusion stérique associée à un système de multi-détection (CES-Multi-détection). La première méthode doit permettre de quantifier l'AH et la seconde, la détermination de la taille. Ces méthodes auront pour but de se substituer aux méthodes de référence (quantification de l'AH au carbazole et détermination de la taille par mesure de la viscosité intrinsèque) non applicables en milieu complexe. La première partie de la thèse sera destinée au développement des méthodes de suivi de l'AH en milieu complexe.

La seconde partie sera dédiée à l'étude de différentes opérations unitaires composant le procédé de purification.

Ainsi, la première étape unitaire aura pour objectif de séparer la capsule d'AH des cellules. Celle-ci peut contenir jusqu'à 20 % de l'AH total (Goh, 1998). Deux traitements d'extraction seront évalués : un traitement au dodécylsulfate de sodium et à l'acide trichloracétique. L'application de ces traitements permet de mettre en évidence le rapport de l'AH lié par rapport à celui libre. Ce rapport conduira à de statuer sur la mise en place ou non d'un traitement d'extraction dans le procédé.

La deuxième étape du procédé est la séparation des cellules du milieu de culture. Deux méthodes ont été envisagées : la microfiltration tangentielle et la filtration frontale.

L'étape de purification de l'AH (troisième étape) qui consistera à éliminer les composants du milieu de culture afin d'atteindre le niveau de pureté requis sera ensuite considérée. Dans la littérature, les procédés les plus utilisés sont l'ultrafiltration / diafiltration et la précipitation de l'AH en solvant organique. La précipitation en solvant organique est très consommatrice en solvant puisque des précipitations successives sont nécessaires pour atteindre le degré de pureté requis par la pharmacopée européenne. Par conséquent, les techniques de séparation membranaires seront préférées du fait qu'elles n'utilisent que de l'eau comme seul solvant. Dans un premier temps, l'influence des conditions opératoires d'ultrafiltration (pression transmembranaire, débit d'alimentation, concentration et taille d'AH et seuil de coupure) sera examinée afin de mettre en évidence les conditions favorisant le rendement et la productivité. Puis dans les conditions opératoires alors définies, l'action de la diafiltration sera étudiée. La modélisation du rendement, de la pureté et de la productivité représenteront un enjeu majeur dans cette étude. L'outil proposé devra être applicable à divers milieux pour faciliter l'agencement des étapes du procédé. En fin de diafiltration, les molécules, du milieu de culture, résiduelles devront être identifiées et, pour les « polluantes », leur élimination sera envisagée par adsorption sur charbon actif. Les cinétiques et les isothermes d'adsorption seront, dans un premier temps, établies pour deux types de charbon actif. Puis, l'impact des paramètres physico-chimiques (température, force ionique et pH) sur l'adsorption

sera déterminé. Les isothermes établies en condition favorable d'adsorption pourront, par la suite, être utilisées pour trouver un compromis entre l'avancement de la diafiltration et la quantité de charbon actif à ajouter.

La dernière étape du procédé consistera en une opération de séchage de l'AH. La forme classique de l'AH commercialisé est une poudre ou une structure fibreuse. Les méthodes de séchage les plus utilisées sont la lyophilisation et le séchage de l'AH en étuve après précipitation en solvant organique. La précipitation de l'AH à l'éthanol est souvent réalisée empiriquement et est peu maîtrisée. L'étude des paramètres de précipitation (pH, force ionique, titre en éthanol) permettra une optimisation de cette étape.

L'amélioration des performances de séparation, d'un côté, par le choix des conditions opératoires adéquates et, de l'autre, par l'agencement approprié des opérations unitaires devront permettre de proposer un procédé performant de purification de l'AH de grande taille répondant aux exigences de la pharmacopée européenne (Figure 1).

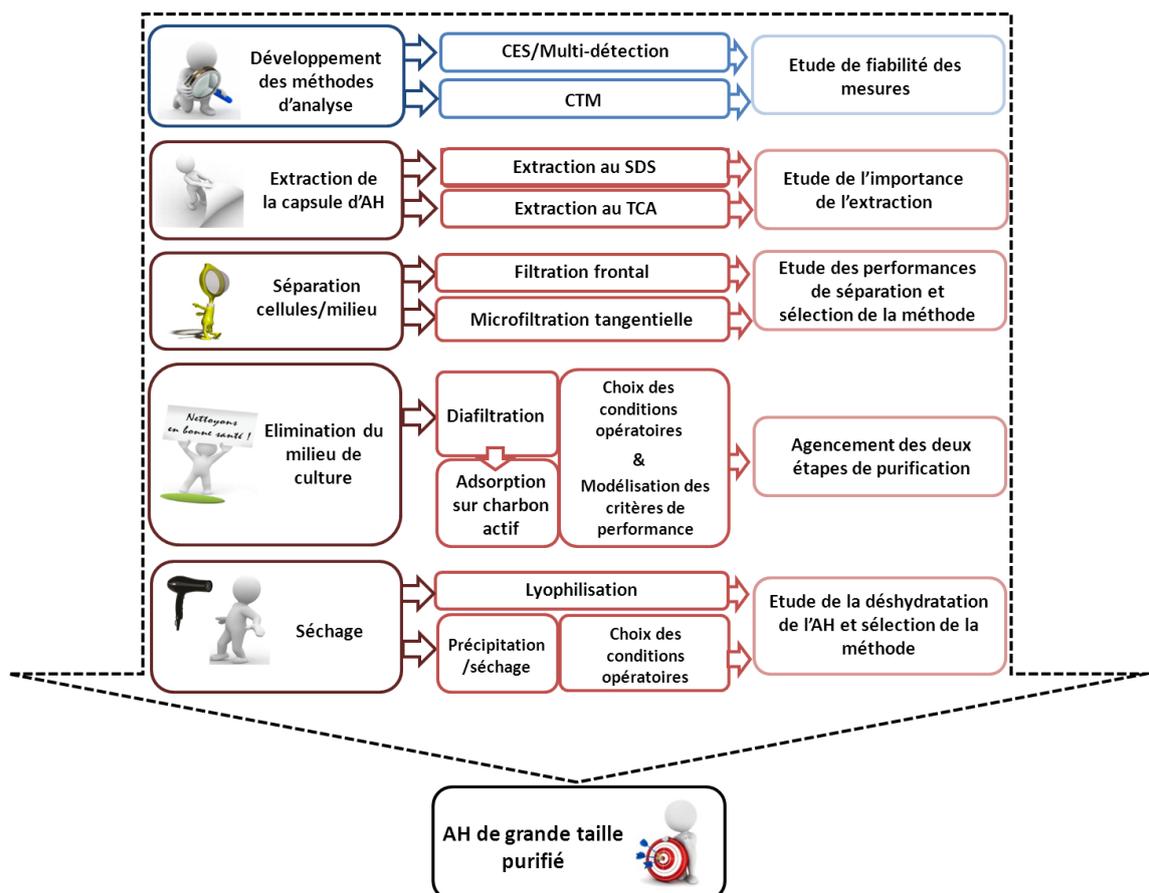


Figure 1. Schéma illustrant la démarche globale de la thèse

Afin de mieux comprendre les choix stratégiques qui seront réalisés dans cette thèse, une partie bibliographique sera présentée dans la partie 1 suivante.

2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Sommaire de l'étude bibliographique

2.1	L'ACIDE HYALURONIQUE	7
2.1.1	Structure de l'AH.....	7
2.1.2	Propriétés rhéologiques et biologiques de l'AH.....	8
2.1.2.1	Propriétés rhéologiques des solutions d'AH.....	8
2.1.2.2	Propriétés biologiques de l'AH et enjeux économiques	13
2.1.3	Impact de l'environnement physico-chimique des solutions sur la stabilité de l'AH....	14
2.1.3.1	Mesure de la taille d'AH.....	15
2.1.3.2	Stabilité de l'AH vis-à-vis de la température.....	20
2.1.3.3	Influence du pH.....	21
2.2	LA PRODUCTION D'AH PAR VOIE MICROBIENNE	22
2.2.1	Les bactéries productrices d'AH.....	22
2.2.2	Synthèse de l'AH.....	23
2.2.3	Les conditions et modes de culture.....	25
2.3	LES PROCEDES DE PURIFICATION DE L'AH.....	27
2.3.1	Extraction de l'AH capsulaire	29
2.3.2	Méthodes de séparation des cellules du milieu	30
2.3.2.1	La centrifugation	30
2.3.2.2	La filtration frontale	31
2.3.2.3	La microfiltration tangentielle	33
2.3.3	Les méthodes de purification	39
2.3.3.1	Purification par ultrafiltration	39
2.3.3.2	Purification de l'AH par adsorption sur charbon actif	43
2.3.3.3	Les méthodes de précipitation de l'AH.....	47
2.4	LES METHODES DE SECHAGE.....	48
2.5	AIDE A L'OPTIMISATION PAR L'UTILISATION DES PLANS D'EXPERIENCES..	48
2.6	CONCLUSION.....	51

2.1 L'acide hyaluronique

2.1.1 Structure de l'AH

L'AH est un polymère constitué de la répétition d'un dimère d'acide D-glucuronique et de D-N-acétylglucosamine, liés entre eux par des liaisons glycosidiques alternées β -1,3 et β -1,4 (Weissmann et Meyer, 1954) (Figure 2). Le nombre de répétitions du dimère d'AH est compris entre 2000 et 25 000 (Chong et al., 2004). Les gammes de tailles d'AH sont par conséquent très étendues, allant de quelques dizaines de milliers à plusieurs millions de daltons. La polydispersité qui caractérise la diversité des tailles au sein d'un échantillon peut donc être très variable.

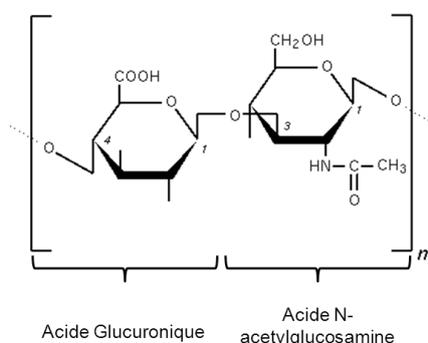


Figure 2. Structure primaire de l'acide hyaluronique.

En solution, l'AH a la capacité de former différentes structures tridimensionnelles. A l'heure actuelle, ces structures ne sont pas encore clairement établies. La principale difficulté est leur durée de vie trop faible. En effet, aucune de ces structures n'est réellement plus stable qu'une autre en solution en raison de la faible variation d'énergie entre les différentes conformations. Néanmoins, des données de modélisation prenant en compte la mobilité des liaisons osidiques ainsi que les interactions de charge ont permis de proposer jusqu'à sept structures différentes (Atkins et Sheehan 1973) (Figure 3). En fonction des conditions environnementales, la taille et la concentration en AH, les chaînes d'AH s'agenceront selon une des sept conformations suivantes :

- i. une chaîne d'AH en solution dilué,
- ii. deux chaînes d'AH formant une double hélice,
- iii. deux hélices antiparallèles,
- iv. des simples hélices en arrangement serré,
- v. six chaînes en arrangement ordonné,
- vi. six chaînes en arrangement plus compact,
- vii. des chaînes individuelles en pleine expansion.

Cette diversité des configurations spatiales est à l'origine des propriétés rhéologiques et biologique de l'AH.

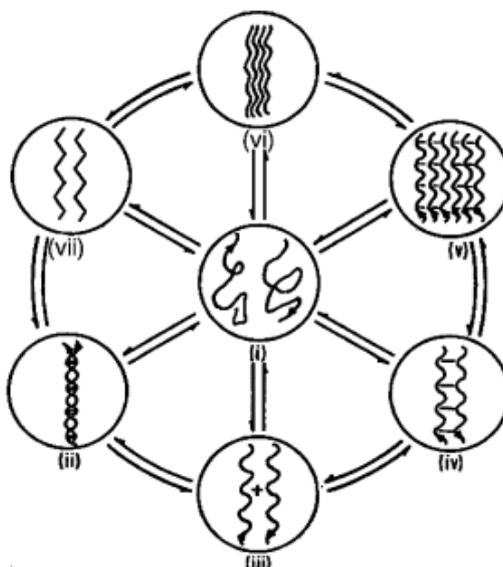


Figure 3. Structure variable en fonction du mode de préparation (i) chaîne d'AH en solution dilué, (ii) double hélice, (iii) deux hélices antiparallèles ; (iv) simples hélices en arrangement serré, (v) six chaînes en arrangement ordonné, (vi) six chaînes en arrangement plus compact, (vii) chaînes individuelles en pleine expansion (Atkins et Sheehan 1973).

2.1.2 Propriétés rhéologiques et biologiques de l'AH

2.1.2.1 Propriétés rhéologiques des solutions d'AH

L'étude du comportement rhéologique des solutions d'AH s'organise en deux parties. La première partie caractérise les propriétés du fluide et la seconde traite plus particulièrement de la viscosité des solutions d'AH et de l'influence des paramètres physico-chimiques sur celui-ci.

➤ Caractérisation des propriétés rhéologiques des solutions d'AH

Afin de caractériser les propriétés rhéologiques de l'AH, il est nécessaire de déterminer, dans un premier temps, si les solutions d'AH présentent un comportement newtonien ou non. Un fluide est dit newtonien lorsqu'il existe une corrélation linéaire entre la contrainte de cisaillement exercée sur le fluide et la vitesse de cisaillement. Cette corrélation linéaire s'exprime par la loi de Newton (équation 1) :

$$\tau = \eta \times \frac{dU}{dy} \quad (\text{Equation 1})$$

avec τ : la contrainte de cisaillement (Pa), η : la viscosité dynamique (Pa.s) et dU/dy : le gradient transversale de vitesse (s^{-1}). Lorsque le rhéogramme $\tau = f(\gamma)$ avec γ : le gradient transversal de vitesse, est tracé, une droite est obtenue dont la pente est la viscosité apparente. Les rhéogrammes sont tracés à l'aide de mesures faites avec des viscosimètres tels que les rhéomètres à cylindre coaxiaux (Figure 4).



Figure 4. Rhéomètre à cylindres coaxiaux (Kinexus ultra plus Malvern).

Dans ce type d'appareil, le cylindre externe est généralement immobile. Le cylindre interne est entraîné en rotation par un système élastique. La vitesse angulaire ω et le rapport des diamètres des cylindres permettent de calculer le gradient de vitesse. La déformation élastique du système d'entraînement est proportionnelle au moment du couple résistant qui s'exerce sur le cylindre interne, ce qui permet de calculer facilement la contrainte de cisaillement τ .

L'AH est un fluide non newtonien. En conséquence, les rhéogrammes ne correspondent plus à des droites. La viscosité apparente (mesurée) est alors exprimée pour un gradient de vitesse donnée (équation 2) :

$$\eta_a = \frac{\tau}{\gamma} \quad (\text{Equation 2})$$

Avec η_a : la viscosité apparente (Pa.s), τ : la contrainte de cisaillement (Pa) et γ : le gradient transversal de vitesse (s^{-1}).

Les fluides non newtoniens peuvent être classés en trois grandes catégories :

1. les fluides sans hystérésis pour lesquels le gradient de vitesse ne dépend que de la contrainte de cisaillement (fluides rhéofluidisants, fluides rhéoépaississants, les fluides avec seuil d'écoulement, etc.),
2. les fluides avec hystérésis pour lesquels la vitesse de cisaillement dépend non seulement de l'intensité de la contrainte mais aussi de sa durée (fluides thixotropes et rhéopexes),
3. les fluides viscoélastiques présentant, en plus, des propriétés de viscosité des propriétés élastiques.

Les solutions d'AH ont des propriétés rhéologiques très particulières ; elles sont des fluides ne conduisant pas à des phénomènes d'hystérésis mais elles présentent, par contre, un comportement viscoélastique.

○ Caractérisation des solutions d'AH comme fluide sans hystérésis

Il existe différents types de fluide sans hystérésis. La mesure de la viscosité apparente en fonction de la contrainte de cisaillement permet de définir plus précisément le comportement rhéologique des solutions d'AH. La viscosité apparente diminue avec l'augmentation de la contrainte de cisaillement (Figure 5, Pires et Santana, 2011). Les solutions d'AH de 2 MDa ont donc un comportement rhéofluidifiant quelle que soit la concentration en AH.

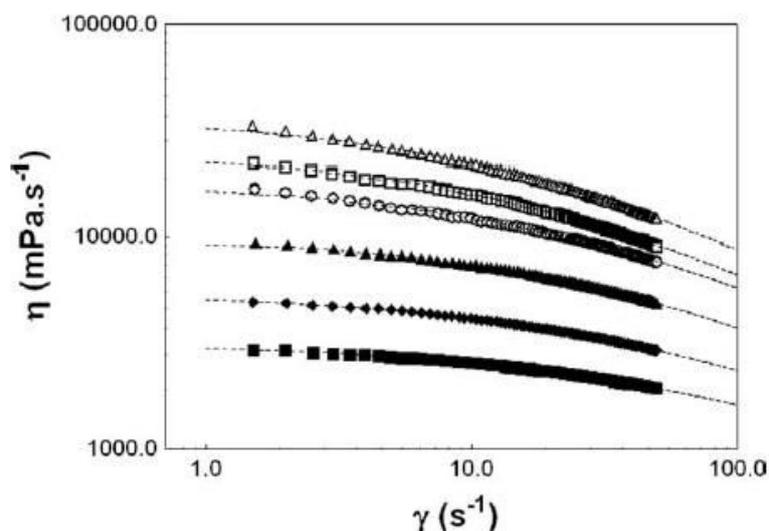


Figure 5. Viscosité en fonction du taux de cisaillement pour une solution d'AH 2 MDa à différentes concentrations, en NaCl 0.15 M, à 20 °C : (■) 50, (◆) 60, (▲) 70, (○) 80, (□) 90, (Δ) 100 g.l⁻¹ (Pires et Santana, 2011).

○ Caractérisation des solutions d'AH comme fluide viscoélastique

L'étude des comportements viscoélastiques des solutions se fait par l'étude du comportement élastique (déformation proportionnelle à la contrainte) et du comportement visqueux. Pour cela deux modules sont déterminés : le module conservatif G' qui correspond au comportement élastique (stockage d'une partie de l'énergie) et le module dissipatif G'' qui correspond à la composante visqueuse (perte de l'énergie par frottement visqueux). La mesure de ces modules se fait par analyse mécanique dynamique. Un échantillon est soumis à une contrainte ou à une déformation oscillatoire (sinusoïdale). Les solutions viscoélastiques ne répondent pas de la même manière lorsqu'elles sont soumises à une sollicitation très rapide ou longue. Dans le cas d'une sollicitation courte, les composantes élémentaires n'ont pas le temps de se déformer de manière importante et une réponse élastique peut être observée. En revanche, pour des durées de sollicitation plus longues, une réponse de type visqueux est observée. L'application d'une déformation oscillatoire permet, de ce fait, de mesurer le comportement élastique et visqueux.

Les modules conservatif G' et de dissipatif G'' ont été déterminés en fonction de la concentration en AH. Les deux modules augmentent de manière quasi similaire avec la concentration en AH (jusqu'à 100 g.l^{-1}). Le module G' est supérieur au module G'' ce qui indique que l'AH est sous forme de gel. Le module de conservation G' augmente proportionnellement au logarithme de la concentration en AH ce qui traduit la présence de nombreuses interactions inter et intra-chaînes. La Figure 6 présente des images de microscopie à force atomique de solution d'AH à $0,01 \text{ g.l}^{-1}$ et 1 g.l^{-1} . Le réseau d'AH est parfaitement visible.

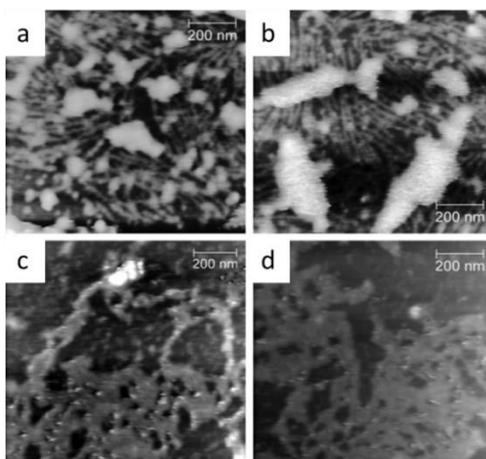


Figure 6. Réseaux d'AH microbien. (a-b) 0.01 g.l^{-1} , (c et d) 1 g.l^{-1} (Pires et Santana, 2011).

➤ **Influence de la concentration en AH et de l'environnement physico-chimique sur la viscosité des solutions**

De nombreux paramètres tels que la concentration, la taille des AH, les sels ou encore la température modifient de la viscosité des solutions. La modification des propriétés de viscosité est principalement corrélée à la mobilité des chaînes d'AH en solution.

L'augmentation de la concentration en AH conduit à la diminution de l'espace entre les chaînes d'AH et à la formation d'un réseau de plus en plus dense limitant la mobilité des chaînes. La Figure 7 montre que pour des concentrations faibles en AH ($< 4 \text{ g.l}^{-1}$), la viscosité spécifique augmente d'un facteur 1,02 l.g^{-1} en fonction de la concentration (régime dilué) et d'un facteur de 3,09 l.g^{-1} pour des concentrations élevées (entre 4 g.l^{-1} et 100 g.l^{-1} , régime semi-dilué). Deux régimes ont été distingués : dilué et semi-dilué. En régime dilué, les chaînes d'AH peuvent se mouvoir librement entre elles. En revanche en milieu semi-dilué, l'enchevêtrement des chaînes d'AH réduit la mobilité des chaînes. La concentration critique d'enchevêtrement déterminée dans ces conditions (AH de 2 MDa) est de 4 g.l^{-1} . La concentration en AH réduit la mobilité des chaînes entre elles et augmente la viscosité.

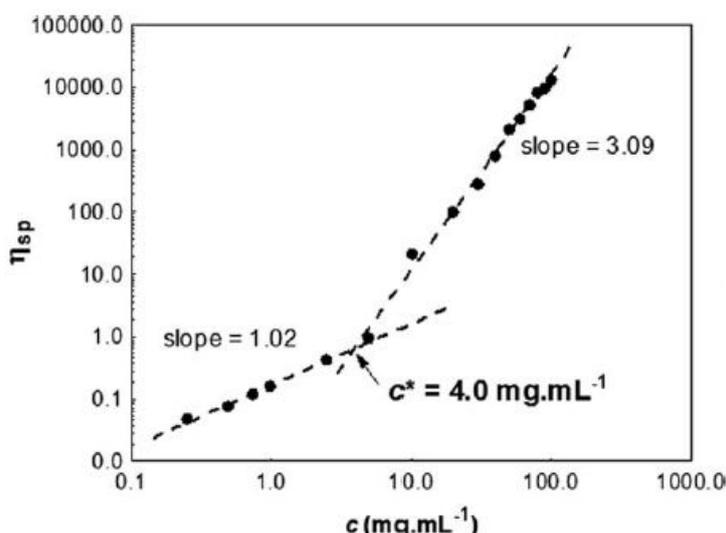


Figure 7. Influence de la concentration en AH, en NaCl 0.15 M à 20 °C, sur la viscosité spécifique (Pires et Santana, 2011).

L'augmentation des tailles des chaînes d'AH présente également le même effet que la concentration. En effet, les grandes tailles d'AH augmentent l'enchevêtrement des chaînes et limitent leur mouvement (Gura et al., 1998). Des corrélations reliant la viscosité à la taille des chaînes d'AH ont été établies. La plus utilisée est l'équation de Mark Houwink (équation 3) :

$$VI = K \times M_w^\alpha \quad (\text{Equation 3})$$

Avec VI : la viscosité intrinsèque en (m³.kg), M_w : le poids moléculaire (Da) et K et α : constantes de Mark Houwink qui dépendent du polymère, solvant et température.

La mobilité des chaînes ne dépend pas seulement de l'espace dont les chaînes d'AH disposent pour se mouvoir. Les interactions inter et intra-chaîne régissent également la mobilité des chaînes d'AH et par conséquent de la viscosité des solutions. Ces interactions ioniques, de Van Der Waals ou encore hydrophobes peuvent être modifiées par les paramètres physicochimiques et conduire à la modification de la viscosité (Scott et al., 1991). Ainsi, l'augmentation de la concentration en sels notamment du chlorure de sodium et de l'hydrochlorate de guanidine diminue la viscosité des solutions d'AH (Mo et al., 1999). Ces sels ont la capacité de neutraliser les charges autour des molécules d'AH. De même, la protonation des chaînes d'AH par réduction du pH (pH <5) diminue la viscosité (Gura et al., 1998). Ainsi, la charge de l'AH a un rôle majeur dans le comportement rhéologique des solutions. La température favorise également le mouvement des chaînes entre elles en apportant l'énergie nécessaire à la rupture de liaisons faibles inter et intra-chaînes. Par conséquent la viscosité des solutions diminue avec l'augmentation de la température (Maleki et al., 2008).

2.1.2.2 Propriétés biologiques de l'AH et enjeux économiques

L'AH est une molécule très présente dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux. L'AH a souvent été considéré comme une molécule inerte. Par conséquent, les rôles attribués à l'AH sont régulièrement liés aux propriétés physiques et mécaniques. Le réseau d'AH, responsable des propriétés viscoélastiques, permet de protéger la surface des cartilages en limitant les chocs et les frottements (par lubrification). Néanmoins, d'autres propriétés biologiques de l'AH se manifestent par des interactions avec des constituants de la matrice extracellulaire (protéines, protéoglycans) ou des cellules. Ainsi, la liaison des hyaladhérines (protéines) avec l'AH permet la formation d'agrégats massifs de proteoglycans indispensables à l'expansion et à la stabilisation du tissu conjonctif (Watanabe et al., 1997). De plus, l'implication de l'AH dans la régulation des fonctions cellulaires, du développement des tissus, de l'inflammation, de la cicatrisation et de la progression tumorale et métastatique a également été démontrée. Celle-ci se réalise via la liaison de l'AH à des récepteurs de la surface des cellules qui activent de nombreuses voies de signalisation (Dicker et al., 2014 ; Horton et al., 1998 ; Lokeshwar et Selzer, 2000 ; Toole et al., 2002).

Le déficit en AH peut conduire à de nombreuses maladies telles que l'arthrite, les désordres immunitaires et inflammatoires, ou encore à des maladies vasculaires ou pulmonaires (Toole et al., 2002). Certaines régions déficitaires en AH peuvent être « réparées » par addition de ce polymère ; il s'agit particulièrement du traitement de l'arthrose du genou.

L'AH est largement utilisé dans le domaine de la santé. Par exemple en ophtalmologie, lors de la transplantation de la cornée. Cela permet de protéger les tissus délicats et de donner l'espace nécessaire aux manipulations chirurgicales. En otolaryngologie, certaines lésions des cordes vocales peuvent être traitées par ajout d'AH afin de combler ou d'augmenter le volume tissulaire. En chirurgie plastique, l'AH peut servir au comblement de rides. La séparation des tissus conjonctifs altérés par une opération chirurgicale nécessite parfois l'ajout d'AH afin de prévenir l'adhésion et l'aggravation des cicatrices. Dans le secteur médical, des nouvelles applications ne cessent d'être développées telles que la libération localisée de médicaments (Brown et Jones, 2005). A cela s'ajoutent également les applications cosmétiques. En effet, l'AH entre dans la composition de shampooing, de crèmes hydratantes ou anti-âge. En conséquence, le marché de l'AH montre des perspectives très encourageantes.

Il existe dans le monde de nombreux producteurs d'AH mais deux d'entre eux se partagent la moitié du marché mondial : Sanofi (marché des Etats-Unis) et Seikagaku (marché asiatique). En 2010, le marché de l'AH était estimé à près de 860 millions d'euros selon Novozyme. Avec une croissance de 9 % entre 2010 et 2014, selon Millenium Research Group ; le marché actuel est estimé 1,22 milliard d'euros. Ce marché est réparti entre les diverses applications de l'AH.

2.1.3 Impact de l'environnement physico-chimique des solutions sur la stabilité de l'AH

La taille des AH est un marqueur de qualité de l'AH. Plus les tailles sont importantes plus l'AH présente des propriétés rhéologiques intéressantes. Néanmoins, de nombreux facteurs peuvent altérer ces tailles en provoquant la dépolymérisation des chaînes d'AH ou la rupture de celle-ci. La concentration en AH, la taille et les conditions environnementales augmentent ou réduisent la mobilité inter et intra-chaînes. L'absence de mobilité entre les chaînes, sous des contraintes physiques, peut conduire à leur rupture. Favoriser cette mobilité peut permettre de réduire l'impact du procédé sur les tailles d'AH. L'augmentation de la force ionique ou de la température et la diminution du pH peuvent permettre d'améliorer cette mobilité. Cependant, la température ou encore le pH peuvent induire une dégradation de l'AH.

2.1.3.1 Mesure de la taille d'AH

La taille peut être déterminée par deux méthodes : la méthode de référence par mesure de la viscosité intrinsèque et par chromatographie d'exclusion stérique associée à un module de multi-détection (CES/Multi-détection).

➤ **Détermination de la taille d'AH par mesure de viscosité intrinsèque : Méthode de la pharmacopée européenne**

La méthode de référence de détermination de la taille des AH est une mesure de la viscosité intrinsèque. En effet, la corrélation empirique de Mark Houwink permet de déterminer la taille d'un polymère en solution via la viscosité intrinsèque (équation 3).

Les coefficients K et α sont appliqués spécifiquement pour l'AH en fonction de la taille (Tableau 1).

Tableau 1. Approximation des coefficients de l'équation de Mark Howink en fonction de la taille des AH.

	K	α
Taille < 300 kDa	$5,78.10^{-6}$	0,919
Taille > 300 kDa	$9,78.10^{-5}$	0,690

La mesure de viscosité intrinsèque, permettant d'accéder à la taille d'AH, est déterminée à partir de la droite de régression établie par la méthode des moindres carrés suivant l'équation de Martin (équation 4) :

$$\log\left(\frac{\eta_r - 1}{C}\right) = \log(VI) + K(VI)C \quad (\text{Equation 4})$$

Avec η_r : la viscosité relative, VI : la viscosité intrinsèque ($m^3.kg^{-1}$), C : la concentration en ($kg.m^{-3}$) et K : la constante de Martin.

En traçant $\log((\eta_r-1)/C) = f(C)$, l'ordonnée à l'origine correspond au logarithme de la viscosité intrinsèque (Figure 8).

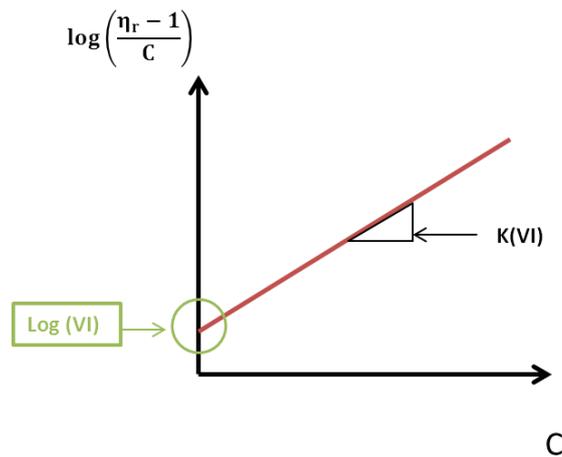


Figure 8. Détermination de la viscosité intrinsèque par l'équation de Martin.

➤ **Caractérisation de l'AH par Chromatographie d'exclusion stérique (CES) Multi-détection**

La chromatographie d'exclusion stérique associée à une méthode de multi-détection (CES/Multi-détection) permet à partir d'un faible volume (50 μl), de déterminer :

- la concentration,
- la taille,
- la viscosité intrinsèque,
- la polydispersité.

La CES permet de séparer les différentes tailles d'AH et le système de multi-détection sert à caractériser l'AH en tout point de la distribution. Trois mesures sont réalisées afin de caractériser l'AH (Figure 9) :

- une mesure d'indice de réfractométrie,
- une mesure de viscosité,
- une mesure de diffusion de la lumière (7° et 90°).

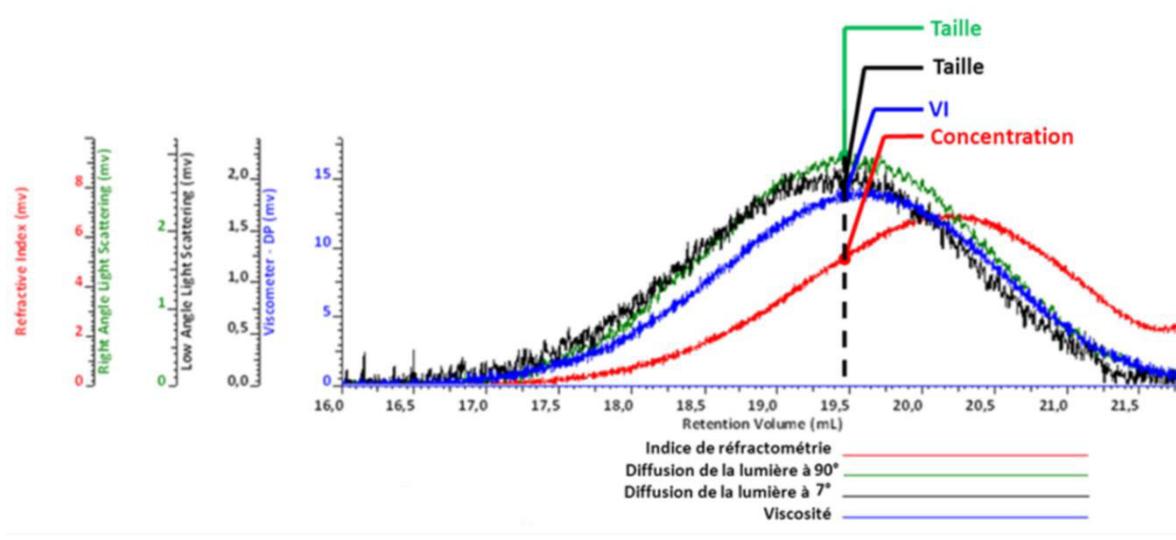


Figure 9. Chromatogramme d'AH 4 MDA obtenu par CES/Multidétection.

○ **Détermination de concentration par réfractométrie**

La mesure de la concentration en AH se fait par réfractométrie. Le réfractomètre mesure la différence d'indice de réfraction entre la solution et l'éluant seul. La concentration en AH est déterminée par l'équation 5 :

$$\text{RI signal} = K_{(\text{RI})} \times \frac{dn}{dc} \times C \quad (\text{Equation 5})$$

Avec $K_{(\text{RI})}$: les constantes instrumentales, C : la concentration du polymère en solution et dn/dc : l'incrément d'indice de réfraction spécifique (ml.g^{-1}).

La concentration est donnée en chaque point de la distribution. La concentration de l'échantillon est donnée par intégration du pic. Le dn/dc est une donnée essentielle pour le calcul de la concentration. Il peut être déterminé expérimentalement par mesure de la réfractométrie à différentes concentrations en AH.

○ **Détermination de la taille**

La taille de l'AH est déterminée par une mesure de diffusion de la lumière par l'équation 6 :

$$\text{Intensité} = K_{(\text{DL})} \times \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \times C \times M_w \quad (\text{Equation 6})$$

Avec $K_{(DL)}$: les constantes instrumentales, C : la concentration du polymère en solution, et M_w : la taille des AH (Da).

La taille est déterminée en tout point de la distribution. La mesure de la taille peut se faire, soit par une mesure de l'intensité de la lumière diffusée à faible angle (7°), soit par une mesure à un angle de 90° . L'angle de mesure à choisir dépend de la taille de la molécule. Pour des molécules de tailles inférieures à 15 nm, l'angle à 90° sera utilisé alors que pour les molécules de tailles supérieures à 15 nm, l'angle à 7° sera préféré. Cette différence est liée au phénomène de dépendance angulaire de la diffusion de la lumière. En effet, selon la taille des molécules la diffusion de la lumière autour de celle-ci peut être isotrope ou anisotrope (Figure 10).

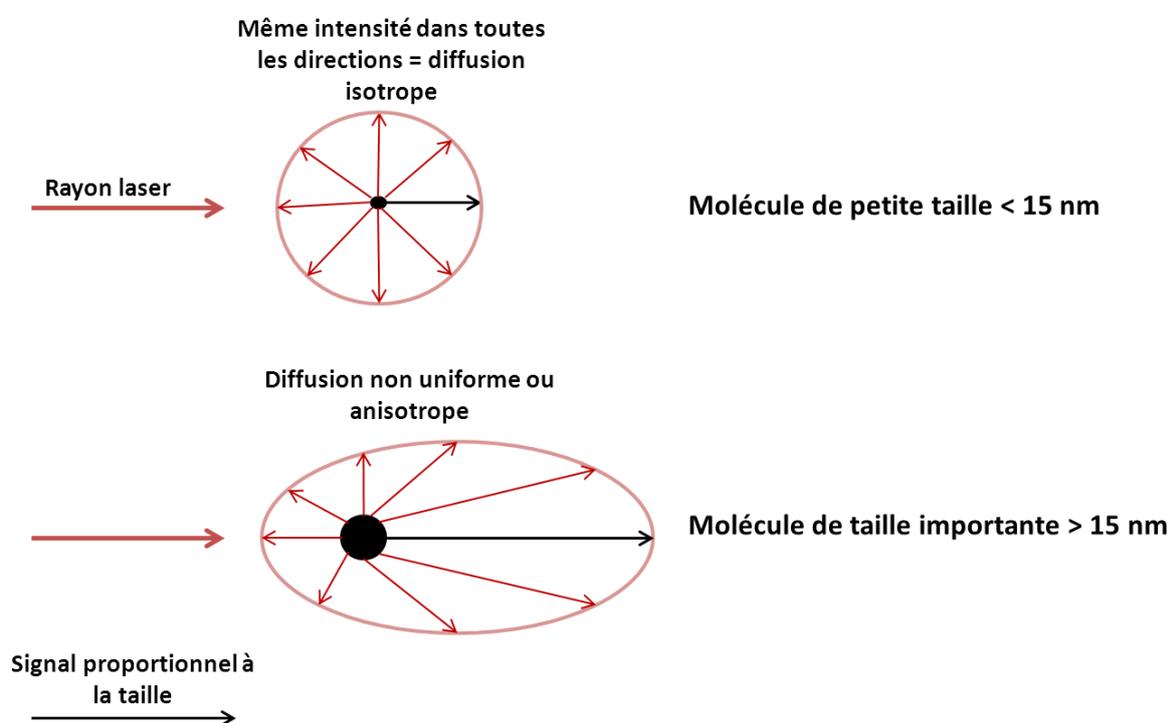


Figure 10. Dépendance angulaire de la diffusion de la lumière en fonction de la taille des nanoparticules/molécules.

La diffusion de la lumière est isotrope autour des molécules de petites tailles, la mesure de l'intensité de la diffusion de la lumière est alors identique à 7° ou à 90° . En revanche, pour les molécules de taille importante tel l'AH, la mesure doit se faire à 7° . En angle nul de mesure, il n'existe pas de dépendance angulaire. Cependant, la mesure à angle nul n'est pas possible en raison de l'interférence liée au laser. En revanche, s'en rapprocher (7°) permet de minimiser les impacts de la dépendance angulaire de la diffusion de la lumière. A cet angle, la mesure de taille est plus juste, par contre elle est plus sujette aux interférences. C'est pourquoi l'angle de 90° est préféré pour les

petites tailles. L'appareil de CES/Multi-détection fait un choix automatique entre l'angle à 7° et 90° selon la taille des molécules.

Une fois la taille déterminée en tout point de la distribution, une moyenne peut être calculée en bornant le pic d'intérêt. La moyenne est calculée selon l'équation 7 :

$$M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} \quad (\text{Equation 7})$$

Avec C_i : la concentration d'AH déterminé par réfractométrie (g.l^{-1}) et M_i : le poids moléculaire (Da).

A partir de la mesure de la taille et de la concentration, la polydispersité peut être déterminée par l'équation 8 :

$$\text{Pol} = \frac{M_n}{M_w} \quad (\text{Equation 8})$$

Avec M_n : la moyenne de taille. La moyenne de taille est calculée par l'équation 9 :

$$M_n = \frac{\sum C_i}{\sum \frac{C_i}{M_i}} \quad (\text{Equation 9})$$

○ **Détermination de la viscosité intrinsèque**

La viscosité intrinsèque est déterminée par un pont de Wheastone (Figure 11).

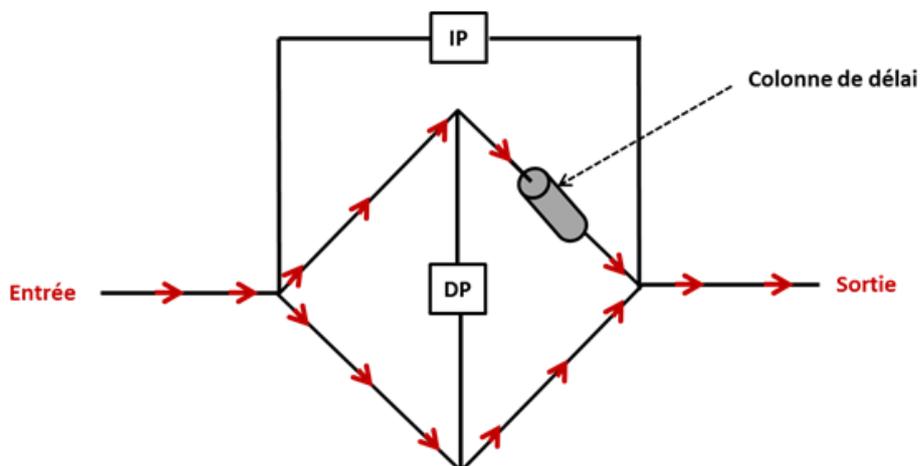


Figure 11. Le concept du pont de Wheastone.

Le fluide traverse les deux branches du pont de Wheatstone. En traversant la colonne de délais, le fluide est retardé de manière proportionnelle à sa viscosité. Une différence de pression sera alors mesurée par les détecteurs de pression (pression différentielle PD et pression d'entrée PE). La viscosité spécifique est calculée par l'équation 10 :

$$\frac{4(PD)}{(PE) - 2(PD)} = C \times VI \quad (\text{Equation 10})$$

La viscosité intrinsèque est déterminée en tout point de la distribution. Les coefficients de Mark Houwink (α et K) peuvent être déterminés en utilisant la taille déterminée par diffusion de la lumière et la viscosité intrinsèque (Figure 12).

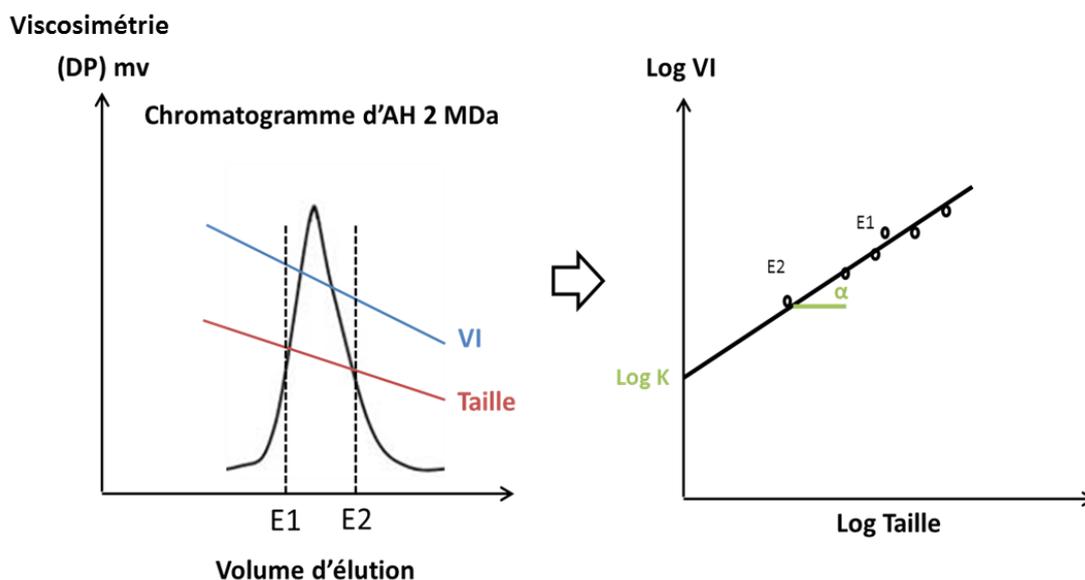


Figure 12. Méthodologie de détermination des coefficients de Mark Houwink.

2.1.3.2 Stabilité de l'AH vis-à-vis de la température

L'AH est une molécule biologique thermosensible. La Figure 13 montre l'influence de la température et de la durée du traitement sur la viscosité relative de solutions d'AH 0,03 % (m/v) (Lowry et Beavers, 1994). Les diminutions de viscosité relative sont attribuées à la dégradation de l'AH. Entre 25 °C et 50 °C aucune dégradation n'est observée sur la durée étudiée (40 h), seules les températures supérieures à 60 °C sont responsables d'une dégradation significative de l'AH. L'AH en solution à des températures inférieures à 25 °C est stable pendant des centaines d'heures. En revanche, à des températures supérieures à 90 °C, la durée de stabilité est inférieure à 1 h.

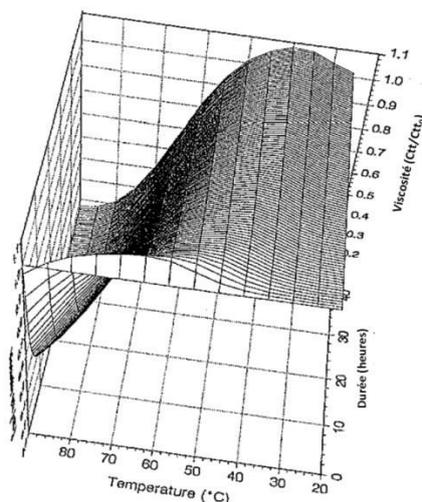


Figure 13. Influence de la température et de la durée du traitement sur la viscosité des solutions d'AH 0,03 % (Lowry et Beavers, 1994).

Des températures comprises entre 0 et 60 °C permettent de garantir une stabilité de l'AH durant un minimum de 40 h.

2.1.3.3 Influence du pH

Le pH montre deux influences : il modifie la viscosité des solutions et peut conduire à la dégradation de l'AH. Le groupement carboxyle porté par l'acide glucuronique fait que l'AH présente différents états de charge en fonction du pH. A des pH supérieurs à 5, la charge globale de l'AH est négative, en revanche, à des pH inférieurs à 5, la molécule devient neutre. Les propriétés de charge de l'AH conduisent à la modification des propriétés structurales. La taille des colloïdes d'AH est réduite à des pH inférieurs à 5 (Gura et al., 1998). A des pH proches de 2,5, les solutions d'AH montrent un comportement rhéologique particulier. Ce comportement est attribué à de fortes interactions inter-chaînes (Gatej et al., 2005). De fortes interactions inter-chaînes limitent leur mobilité qui peuvent conduire à leur dégradation lorsqu'elles sont soumises à des contraintes physiques.

La Figure 14 montre l'influence du pH sur la taille des AH. Un pH de 7,2 -7,3 permet une stabilité optimale de l'AH. L'augmentation de la concentration en ions hydronium (H_3O^+) à pH acide et en ions hydroxyde (HO^-) à pH basique, favorise l'hydrolyse de l'AH par β -élimination (Caspersen et al., 2014).

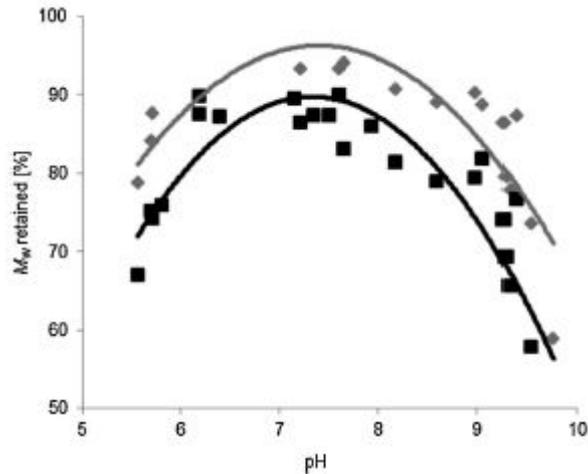


Figure 14. Pourcentage de réduction de la taille des AH en fonction du pH. En gris est présentée la dégradation à 1 mois d'incubation à 40 °C et, en noir, à 3 mois (Caspersen et al., 2014).

2.2 La production d'AH par voie microbienne

2.2.1 Les bactéries productrices d'AH

Un marché fleurissant de l'AH ainsi que des exigences de qualité de produit ont conduit à développer des méthodes de production de plus en plus performantes. Initialement, l'AH était produit par extraction à partir de crêtes de coqs. Cependant, l'introduction de l'AH dans le milieu médical a laissé place à des craintes en ce qui concerne les contaminations croisées (inter espèces). En conséquence, la production par voie microbienne, mieux maîtrisable et plus sûre, a remplacé l'extraction des crêtes de coqs.

L'AH microbien est produit par des streptocoques des groupes A et C (classification de Lancefield). Les bactéries synthétisent de l'AH tout autour de la cellule formant une capsule. Celle-ci est un facteur de virulence des bactéries car la capsule d'AH permet aux bactéries (1) une dissimulation au sein des organismes (Schmidt et al., 1996), (2) une résistance aux stress oxydants (Cleary et Larkin, 1979) ou encore (3) de faciliter la migration des cellules (Cywes et Wessels, 2001). Au microscope, les cellules sont sous forme sphérique ou ovoïde, associées en chaînes ou en paires. Les cellules sont entourées d'une capsule d'AH épaisse (Figure 15).

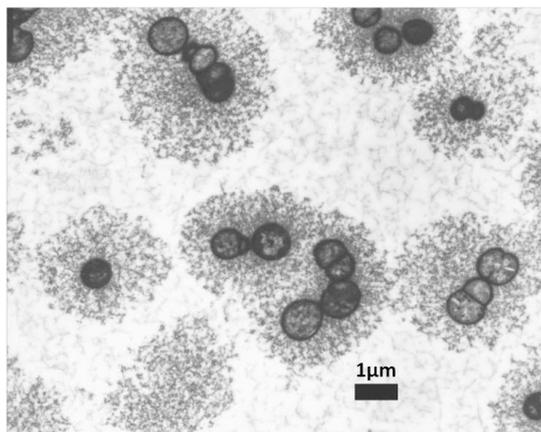


Figure 15. Photographie obtenue par microscopie électronique à transmission de *Streptococcus zooepidemicus* en phase exponentielle de croissance cultivée en bioréacteur aérobie (Chong et al., 2004).

Sur gélose au sang, les colonies de bactéries apparaissent β -hémolytiques. La bactérie le plus souvent utilisée à l'échelle industrielle est *Streptococcus zooepidemicus* (Liu et al., 2011).

2.2.2 Synthèse de l'AH

La voie de synthèse de l'AH est présentée dans la Figure 16. L'acide D-glucuronique et le N-acétyl glucosamine sont respectivement des dérivés du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate (Matsubara et al., 1991). La première étape est la phosphorylation du glucose par une glucokinase qui permet de le maintenir au sein des cellules (étape commune à de nombreux organismes). A partir du glucose-6-phosphate, les deux précurseurs de l'AH sont synthétisés : l'UDP-glucuronique et l'UDP-N-acetyl glucosamine.

Synthèse de l'UDP-glucuronique

La transformation du glucose-6-P en glucose-1-P est réalisée par la phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2). Le glucose-1-P peut être utilisé par la suite pour la production de polysaccharides pariétaux. L'UDP-glucose phosphorylase (EC 2.7.7.9) catalyse la réaction entre un UTP et le Glucose-1-P pour produire UDP-glucose. L'acide UDP-glucuronique est ensuite obtenu par oxydation spécifique du groupement alcool de l'UDP-glucose par l'UDP-glucose deshydrogénase (EC 1.1.1.22).

Synthèse de l'UDP-N-acetyl glucosamine

Le transfert du groupement amine de la glutamine vers le fructose-6-P est réalisé par une aminotransférase (EC 2.6.1.16). Le groupement acétyle est ensuite greffé sur le glucosamine-6-P par une acétyltransférase (EC 2.3.1.4) pour former le N-acétyl glucosamine-6-P. Cette étape est

consommatrice d'énergie. Celle-ci est alors puisée dans l'hydrolyse de la liaison thioester de l'acétyl CoA. Le réarrangement du groupement phosphate est réalisé par une mutase (EC 5.4.2.3) formant le N-acétyl glucosamine-1-P. La dernière étape de la synthèse des précurseurs est l'addition de l'UDP pour former l'UDP-N-acétyl glucosamine par la pyrophosphorylase (EC 2.7.7.23).

La polymérisation de l'acide hyaluronique à partir des deux précurseurs (acide UDP-glucuronique et UDP-N-acétyl glucosamine) est réalisée par la hyaluronate synthétase (HasA). La taille des AH serait probablement liée à la durée de vie de cette enzyme (HasA) (Kitchen et Cysyk, 1995). En effet, la durée moyenne de la synthèse d'une chaîne d'AH est équivalente à la durée de vie de l'HasA. De plus, la disponibilité et l'équilibre des précurseurs de l'AH auraient également une influence sur la taille des AH (Liu et al., 2011). La taille des AH est donc dépendante à la fois de la HasA et de la disponibilité des précurseur d'AH, c'est pourquoi, l'AH peut présenter une large gamme de tailles et est polydisperse.

Il faut quatre moles d'ATP pour produire une mole d'unité disaccharidique d'AH. La production d'AH est hautement consommatrice d'énergie. De plus, la voie de synthèse est également à l'origine de précurseurs de la synthèse de composés structuraux des cellules (paroi cellulaire, peptidoglycane, acide téichoïque et antigène de la paroi). Ces composés constituent environ 20 % de la matière sèche des cellules ce qui réduit de manière notable la quantité de précurseur de l'AH.

Dès lors, afin de produire de l'AH en grande quantité, il est nécessaire de diriger le flux métabolique vers la synthèse de l'acide UDP-glucuronique et de l'UDP-N-acetyl glucosamine en réduisant celle de la paroi cellulaire, mais également en inhibant partiellement la voie de la glycolyse et des pentoses phosphate. La réduction de l'ensemble de ces voies réduirait probablement la densité cellulaire au profit de la surproduction d'AH.

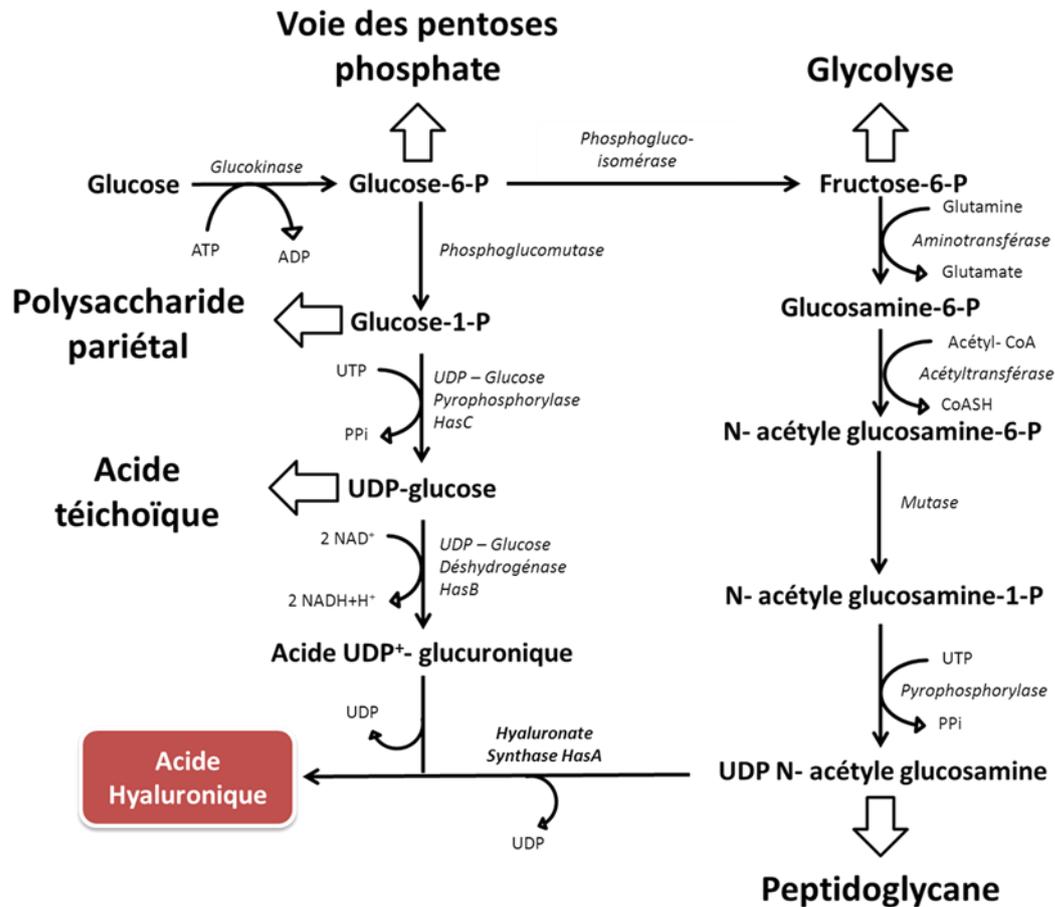


Figure 16. Voie de biosynthèse de l'AH chez les streptococci (Chong et al., 2004).

Afin de conduire à la surproduction d'AH, deux méthodologies peuvent alors être utilisées. La mutagenèse (aléatoire ou dirigée) qui permet de bloquer certaines voies métaboliques, et les conditions de culture (milieu, aération, pH...) qui permettent de diriger les flux métaboliques en fonction des précurseurs disponibles au sein de la cellule. Dans cette étude nous ne traiterons que de l'optimisation des conditions de culture.

2.2.3 Les conditions et modes de culture

La composition des milieux de culture se rapproche de l'environnement naturel de croissance des bactéries *in vivo*. Il doit donc contenir des nutriments essentiels à la croissance cellulaire mais il doit également permettre de maintenir des conditions physicochimiques favorables à la croissance (pH, température, force ionique, etc.). De plus, en ajustant les conditions de culture, les flux métaboliques peuvent être modulés afin d'optimiser la production d'AH de manière qualitative et quantitative. Les organismes tels que *S. zooepidemicus* croissent habituellement dans un milieu semi-synthétique qui contient des oses comme source de carbone et d'énergie, de l'extrait de levure et des peptones comme source d'azote et de carbone, et enfin des nutriments incluant des acides aminés, minéraux,

nucléotides et vitamines (Leblanc, 2014). Deux approches peuvent être utilisées pour l'optimisation de la production de l'AH, soit une approche nutritionnelle globale soit l'analyse des flux métaboliques.

La première approche considère les besoins nutritionnels de la bactérie en carbone, en azote et en énergie. Un rapport carbone/azote idéal permettrait d'améliorer la production d'AH (Lai, 2011). La nature des sources de carbone et d'azote sont également des facteurs clés de la production d'AH. Les sources de carbone et d'azote permettant les meilleures performances de production sont le glucose et les extraits de levure respectivement (Im et al., 2009). Les performances de production d'AH sont régies par le ratio carbone/azote ainsi que par leurs concentrations initiales (Pires et al., 2010). La meilleure production d'AH est obtenue pour une concentration en glucose de 25 g.l⁻¹, et lorsque celle-ci excède 40 g.l⁻¹, la croissance cellulaire est affectée. En revanche, l'augmentation de l'apport en azote conduit à une augmentation de la croissance cellulaire au détriment de la production d'AH (Jagannath et Ramachandran, 2010).

La seconde approche prend en compte les flux métaboliques. En effet, l'analyse des flux métaboliques met en avant une compétition entre production d'AH et de biomasse. Différentes stratégies peuvent être considérées. La première est l'addition de lysozyme. Cette enzyme dégrade le peptidoglycane ce qui permet de libérer des précurseurs de l'AH (Kim et al., 1996). La seconde approche consistant en la supplémentation du milieu en pyruvate, tryptophane ou glutamine peut permettre de rediriger le flux de carbone vers la synthèse d'AH par inhibition de la glycolyse (Shah et al., 2013). Il peut également être choisi de saturer la glycolyse en augmentant la source de carbone (Jagannath et Ramachandran, 2010).

L'optimisation du milieu de culture permet de produire 5 à 10 g.l⁻¹ d'AH. La concentration maximale atteinte dépend de la taille des AH. En effet, plus elle est élevée moins la concentration dans le milieu est importante en raison des propriétés rhéologiques du fluide défavorables à la croissance cellulaire. De plus, le taux de croissance des cellules est d'autant plus faible que la taille des AH sont élevée (Chong et al., 2004).

L'AH produit se retrouve, d'une part, lié aux cellules et, d'autre part, libre dans le milieu de culture. L'AH lié aux cellules peut être dû à deux raisons essentielles. La première est que les chaînes d'AH sont liées aux enzymes qui les synthétisent (HasA), elles-mêmes liées aux cellules. La seconde, l'AH polymérisé forme un réseau compact englobant la cellule. La part d'AH lié aux cellules représente au maximum 20 % de l'AH total (Goh, 1998).

2.3 Les procédés de purification de l'AH

A partir du milieu de culture, l'AH est purifié afin d'être utilisé pour la fabrication de cosmétiques ou de solutions médicamenteuses. Les procédés de purification ne sont pas uniques, c'est ainsi que différentes procédures peuvent être appliquées. Afin de les identifier, trois procédés industriels de purification de l'AH ont été sélectionnés pour être comparés (Figure 17). Les procédés débutent soit par une étape de dilution qui peut permettre de réduire la viscosité des solutions (Gaspar et al., 1989 ; Santosh et al., 2010) soit par ajout d'un agent d'extraction de la capsule bactérienne, l'acide trichloracétique (Hemant et al., 2013). Puis une étape de clarification est réalisée afin d'éliminer les cellules du milieu. Une fois les cellules séparées, les molécules ayant servi à la croissance cellulaire (peptides, acides aminés, minéraux, sucres, etc.) sont éliminées afin de purifier l'AH. Les méthodes de purification les plus récurrentes sont la diafiltration, l'adsorption sur charbon actif et la précipitation en solvant organique (Carlino et Magnette, 2002; Dong, 2013; Murata et Fukuda, 2009; Gaspar et al., 1989). Ces trois méthodes semblent être incontournables. Néanmoins, d'autres méthodes peuvent être mises en place telles que l'ajout de bentonite pour ôter les protéines ou encore l'utilisation de résines échangeuses d'ions afin d'éliminer les ions métalliques (Gaspar et al., 1989 ; Santosh et al., 2010). Une microfiltration (0,22 µm) peut être ajoutée (Santosh et al., 2010) avant le séchage de l'AH afin de garantir l'élimination des bactéries en fin de procédé de purification. La lyophilisation quant à elle, semble la méthode de référence pour le séchage de l'AH (Hemant et al., 2013; Santosh et al., 2010; Gaspar et al., 1989).

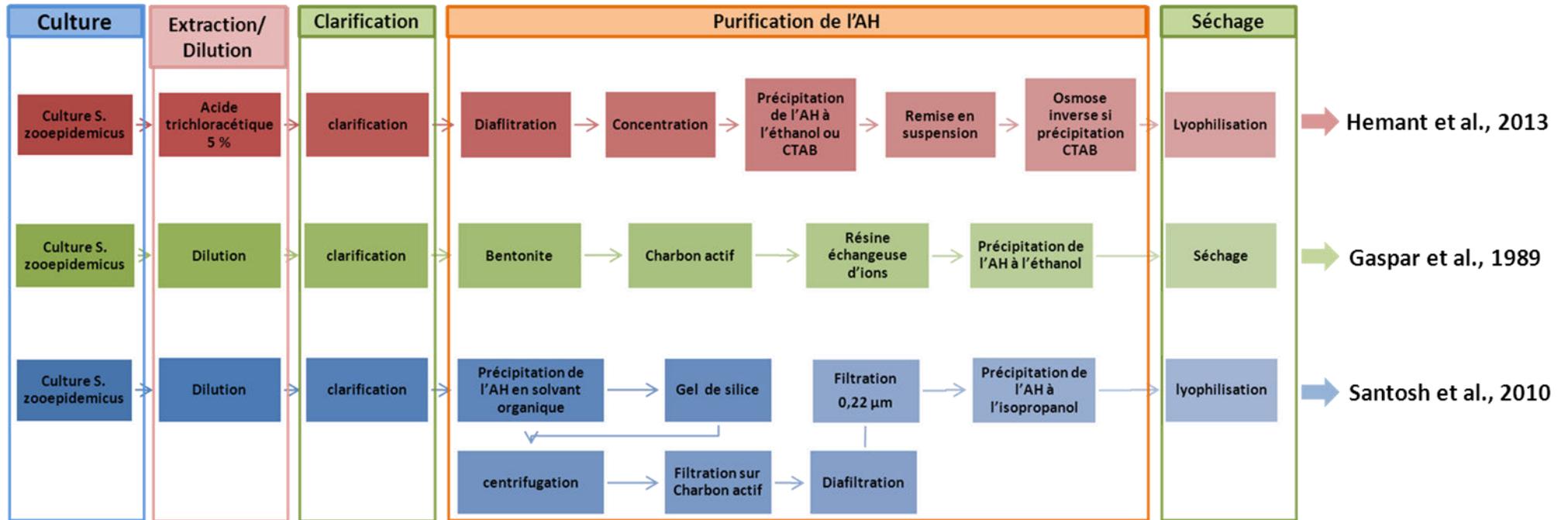


Figure 17. Comparaison de trois procédés industriels de purification de l'AH.

2.3.1 Extraction de l'AH capsulaire

En 1998, Goh a réalisé une étude complète de l'extraction de la capsule de *S. zooepidemicus* (Goh, 1998). Différents traitements ont été appliqués faisant intervenir :

- le dodécyl sulfate de sodium (SDS),
- le dichlorure de zinc,
- le phosphate,
- une enzyme (pronase E),
- la hyaluronidase bovine
- un ajustement du pH du milieu.

Les tailles et la quantité d'AH après traitement ont été mesurées afin de déterminer le rendement d'extraction et l'impact des traitements sur la taille des AH. Des photographies de microscopie électronique ont permis de visualiser l'élimination de la capsule d'AH. Le traitement au SDS (0,05 % (m/v) pendant 5 mn) et l'ajustement du pH (pH 4 pendant 30 mn) montrent une extraction totale de l'AH capsulaire sans affecter sa taille. En revanche, les traitements au dichlorure de zinc, au phosphate et à la pronase E ne permettent d'extraire que partiellement la capsule bactérienne. Le traitement à la hyaluronidase dégrade la capsule d'AH et permet de récupérer de l'AH sous forme de fragments de taille réduite.

L'efficacité du traitement SDS et pH semble indiquer que la liaison de l'AH aux cellules n'est pas covalente. Cependant, des liaisons covalentes peuvent exister entre les chaînes naissantes d'AH et la HasA (enzyme de synthèse de l'AH). Ces liaisons sont en minorité. L'AH, après sa synthèse, semble rester associé à la cellule par des liaisons faibles entre les chaînes d'AH et le peptidoglycane. Le SDS et le pH permettent de rompre les liaisons faibles entre l'AH et le peptidoglycane (Goh, 1998).

L'extraction au SDS ou par ajustement de pH est souvent employé dans la littérature (Deng et al., 2007 ; Im et al., 2009 ; Vázquez et al., 2010). L'acide le plus souvent utilisé pour l'ajustement du pH à 4 est l'acide trichloacétique (TCA). Les brevets quant à eux font souvent référence à une extraction par acidification du milieu à l'acide trichloacétique (5 à 20 % (m/v)) (Dong, 2013 ; Kweon et al., 2012) mais rarement à l'extraction au SDS. De plus, certains brevets ne présente pas de méthodes d'extraction (Hemant et al., 2013 ; Santosh et al., 2010). Goh (1998) a montré qu'il était récupéré au maximum 20 % de l'AH total par extraction. Les traitements d'extraction ne sont pas sans conséquence sur les milieux. Par exemple, l'ajout de SDS conduit à une hydrolyse partielle des cellules libérant des solutés divers dans le milieu qui devront être éliminés par la suite. Le gain en AH peut probablement être contrebalancé par les pertes dans des étapes de purification.

Les méthodes d'extraction extrapolables et performantes les plus utilisées sont l'acidification du milieu par du TCA pendant 30 mn ou l'ajout volume à volume de SDS 0,1 % (m/v) pendant 15 mn. L'absence de méthode d'extraction peut également être envisagée.

Après extraction, l'AH est sous forme libre en solution dans un milieu poly-phasique. L'élimination des cellules est alors nécessaire.

2.3.2 Méthodes de séparation des cellules du milieu

La séparation des cellules du milieu nécessite une opération de séparation solide/liquide. Trois méthodes principales utilisées sont la centrifugation, la filtration frontale et la microfiltration tangentielle.

2.3.2.1 La centrifugation

La centrifugation est une méthode de séparation des particules exploitant l'accélération centrifuge. Les composants de densités plus importantes se déposent au fond du bol en rotation. La vitesse de sédimentation dans le champ centrifuge est déterminée par l'équation 11 suivante :

$$V = \frac{d^2 \times \Delta\varphi}{18 \times \eta} \times r\omega^2 \quad (\text{Equation 11})$$

Avec d : le diamètre de particule (la particule est considérée sphérique en m), $\Delta\varphi$: la différence de masse volumique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), η : la viscosité (Pa.s) et $r\omega^2$: l'accélération centrifuge ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$).

La vitesse de sédimentation sera d'autant plus faible que le diamètre des particules est faible et la viscosité élevée. Les bactéries (*S. zooepidemicus*) sont des particules de faible diamètre (1 μm) et la viscosité des solutions d'AH peut être élevée (9,5 Pa.s pour un AH de 3 MDa à 4 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (viscosité 10 000 fois supérieure à celle de l'eau). En conséquence, cette méthode ne semble pas être un choix idéal dans le cas de suspensions contenant de l'AH. Cependant, elle est souvent retrouvée à l'échelle du laboratoire (Chen et al., 2009 ; Pires et al., 2010 ; Kim et al., 2013). A l'échelle industrielle, en revanche, cette méthode est absente, les méthodes de filtration lui sont préférées (Dong, 2013 ; Murata et Fukuda, 2009).

Dans le cas de l'AH, la séparation par centrifugation peut être difficile à obtenir en raison de la faible taille des particules (bactéries) et de la viscosité élevée. De plus, la centrifugation devra probablement être associée à une étape de séparation membranaire afin de répondre à la norme fixée à 10^2 UFC.g⁻¹d'AH par la pharmacopée européenne. Les brevets font souvent référence à la filtration qui semble une méthode plus adaptée à l'acide hyaluronique.

2.3.2.2 La filtration frontale

La filtration frontale (sur membrane ou à gâteau) est une méthode de séparation au cours de laquelle le liquide à séparer est conduit de manière frontale à la surface d'un support (grille, toile, filtre ...) sur lequel les particules se déposent sous la forme d'un gâteau. L'efficacité de filtrat sera plus ou moins élevée suivant les dimensions des particules, le maillage du support et l'épaisseur du gâteau.

L'efficacité (E) de la séparation se détermine par la relation suivante (équation 12) :

$$E = \frac{C_{\text{filtrat}}}{C_{\text{solution}}} \quad (\text{Equation 12})$$

Avec C_{solution} et C_{filtrat} : les concentrations en particules avant et après filtration (g.l⁻¹).

L'écoulement de la charge se fait sous l'effet d'une différence de pression qui doit être supérieure à la perte induite par le filtre et le gâteau.

Les lois de la filtration sur support sont obtenues à partir de l'équation de Darcy, appliquée à une couche élémentaire de gâteau d'épaisseur dz et pour un écoulement en flux laminaire (équation 13) :

$$J_z = -\frac{B_z}{\eta} \frac{dp}{dz} \quad (\text{Equation 13})$$

Avec U_z : le flux (m.s⁻¹), B_z : la perméabilité de la couche (m.s⁻¹), dp : la chute de pression du filtrat (Pa) et η la viscosité dynamique du filtrat (Pa.s).

En considérant une section unitaire de gâteau Ω (m²), d'épaisseur dz (m), de masse de gâteau W_z (kg) et de résistance spécifique α_z (s.kg⁻¹.m⁻¹) permettant d'obtenir un volume dV (m³) de filtrat, la perméabilité de la couche B_z peut être déterminée par la corrélation suivante (équation 14) :

$$B_z = \frac{\Omega \times d_z}{\alpha_z \times W_z \times dV} \quad (\text{Equation 14})$$

Au cours de la séparation, le gâteau s'épaissit et par conséquent la résistance induite par le gâteau ($\alpha.W$) augmente et réduit la perméabilité de gâteau. De ce fait, le flux de filtrat diminue lors d'une séparation à pression constante. En couplant les équations 13 et 14, la réduction du flux peut être déterminée par l'équation 15 :

$$J = - \frac{\Omega}{\eta \times \alpha \times W \times dV} \times dp \quad (\text{Equation 15})$$

Néanmoins, Il peut être choisi de maintenir un flux constant par augmentation de la pression. La pression devra être augmentée de manière proportionnelle à la résistance ($\alpha.W$) induite par le gâteau (pour un gâteau incompressible). Il peut également être choisi d'appliquer une pression constante ou une pression et un débit variable.

Afin de choisir le mode de conduite de la filtration, la compressibilité du gâteau doit être considérée. En effet, dans le cas d'un gâteau peu compressible, travailler en pression croissante permet de maintenir un flux idéal jusqu'à atteindre les limites de résistance des membranes. En revanche dans le cas des gâteaux compressibles, maintenir une pression faible est indispensable pour empêcher le tassement du gâteau.

Dong, 2013 réalise la séparation des cellules du milieu par filtration frontale. Cependant, certains points peuvent constituer une entrave à la séparation. Les solutions d'AH en fin de culture microbienne sont non seulement chargées en bactéries ($1-2 \text{ g.l}^{-1}$) mais aussi de viscosité élevée. Les bactéries vont colmater progressivement la membrane et augmenter la résistance. De plus, l'importante viscosité de l'AH réduira également le flux de filtrat. Afin de réduire ces effets, certains auteurs réalisent une dilution préalable du milieu de culture (Santosh et al., 2010 ; Hemant et al., 2013) et afin d'empêcher le phénomène de colmatage à la surface des membranes des adjuvants de filtration peuvent être utilisés (Kweon et al., 2012). La principale caractéristique des adjuvants de filtration est leur grand pouvoir de rétention joint à une grande perméabilité. C'est ainsi que, pour retenir des fines particules, au lieu d'utiliser un support de faible diamètre de pore qui freinerait considérablement l'écoulement, le milieu est filtré sur une précouche d'adjuvants déposée sur un support de diamètre de pore moyen. Si la précouche a tendance à être colmatée en surface par les particules de la suspension, de l'adjuvant peut être ajouté à la suspension et former ainsi un gâteau constitué de fines particules et d'adjuvants dont la perméabilité est supérieure à celle du gâteau de particules seules.

Les principaux adjuvants de filtration sont le kieselguhr et les perlites. D'autres adjuvants telles les fibres de cellulose ou d'amiante, les poudres de charbon, la sciure de bois, peuvent également être utilisés.

La faisabilité de la clarification par filtration sur adjuvant a d'ores et déjà été montrée pour la séparation des cellules du milieu contenant l'AH (Kweon et al., 2012 ; Hemant et al., 2013). Cette étape devra être associée à une étape de microfiltration. En effet, afin d'atteindre le critère de la pharmacopée européenne (10^2 UFC.g⁻¹), les cellules et les particules d'adjuvant de filtration résiduelles devront être éliminées.

La filtration sur adjuvant suivie d'une microfiltration sur support permettrait d'obtenir un milieu dépourvu de cellules. Néanmoins, la microfiltration tangentielle pourrait être une alternative à la filtration frontale.

2.3.2.3 La microfiltration tangentielle

La microfiltration tangentielle permet une séparation solide/liquide grâce à l'utilisation de membranes dont les diamètres de pores sont compris entre 0,1 et 10 μm (Figure 18). La solution circule tangemment à la membrane grâce à une pompe (1). Les particules en suspension de diamètre supérieur à celui des pores sont retenues dans le rétentat par la membrane (4). Le milieu qui traverse la membrane et est alors appelé perméat.

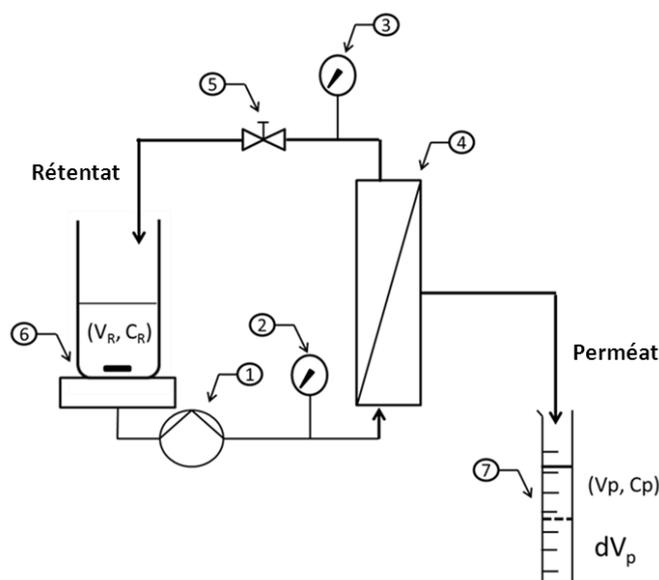


Figure 18. Schéma d'un système de microfiltration tangentielle. (1) Pompe péristaltique, (2 et 3) manomètres, (4) membrane d'ultrafiltration, (5) vanne de contre pression, (6) agitateur magnétique et (7) éprouvette graduée.

Etude bibliographique

Le transfert de matière à travers la membrane se fait par l'application d'une pression transmembranaire. La pression transmembranaire (PTM) (équation 16) est caractérisée par la moyenne de pressions d'alimentation (P_A) et rétentat (P_R) à laquelle est soustraite la pression du compartiment perméat (P_P) :

$$\Delta P = \frac{P_A + P_R}{2} - P_P \quad (\text{Equation 16})$$

En microfiltration tangentielle, l'optimisation de productivité et l'efficacité sont recherchées. L'efficacité du procédé qui correspond à la sélectivité du procédé est caractérisée par le taux de rétention. Un taux de rétention (TR) de 1 signifie que la molécule est totalement retenue par la membrane. Le TR est calculé par l'équation 17 :

$$TR = 1 - \frac{C_P}{C_R} \quad (\text{Equation 17})$$

Avec C_P : la concentration de particules dans le perméat (g.l^{-1}) et C_R : la concentration de particules dans le rétentat (g.l^{-1}).

La productivité (P_R) du procédé doit être maximisée pour minimiser les coûts de fonctionnement. Le transfert de solvant transmembranaire (le flux de perméat) conditionne l'efficacité du procédé. Le flux de perméat est défini comme étant le débit de perméat par unité de surface de la membrane. Ce flux représente également la vitesse moyenne du fluide perpendiculaire à la surface de la membrane (équation 18) :

$$J = \frac{Q_p}{S} \quad (\text{Equation 18})$$

Lorsque la membrane est utilisée pour retenir des particules, la perméabilité décroît. Cette baisse de perméabilité est imputable à l'accumulation de matière à la surface (ou dans) la membrane. Deux phénomènes sont caractérisés : la polarisation de concentration et le colmatage.

La polarisation de concentration résulte de l'accumulation de matière à la surface des membranes sous forme solubilisée et dispersée. Ce phénomène est réversible en diminuant la pression, la matière solubilisée ou dispersée dans la couche revient en solution par diffusion. La couche de polarisation est un phénomène réversible qui se met en place en quelques minutes et disparaît si le gradient de transfert est annulé. Une diminution du flux de perméat peut être observée ainsi qu'une variation de la sélectivité. L'augmentation de la concentration d'une espèce au voisinage de la membrane est régie par un équilibre qui s'établit entre le flux de matière transféré à travers la

membrane sous l'action du gradient de pression et le flux qui diffuse en sens inverse sous l'action du gradient de concentration. La concentration aux abords de la membrane est la plus forte (C_m) et réduit progressivement jusqu'à atteindre la concentration du rétentat (C_R) (Figure 19).

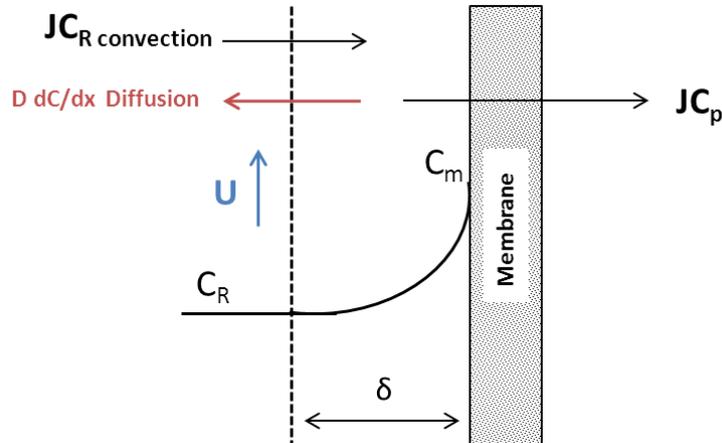


Figure 19. Modélisation de la polarisation : théorie du « film ». J : le flux de perméat, D : coefficient de diffusion, C_p : concentration dans le perméat, C_R : concentration dans le rétentat, δ : épaisseur de la couche de polarisation, U : le débit tangentiel l'alimentation.

La détermination du flux de perméat en régime stationnaire se réalise par la théorie du film (équation 19) :

$$J_{\text{stat}} = \frac{D}{\delta} \ln \left(\frac{C_m - C_p}{C_R - C_p} \right) \quad (\text{Equation 19})$$

Avec C_0 , C_p et C_m : la concentration de soluté respectivement dans la solution (g.l^{-1}), dans le perméat et au niveau de la membrane, D : le coefficient de diffusion du soluté ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et δ : l'épaisseur de la polarisation de concentration (m). En considérant que la concentration dans le perméat est nulle, il est possible de décrire le flux limite à partir de l'équation 20 :

$$J_{\text{lim}} = K \ln \frac{C_m}{C_0} \quad (\text{Equation 20})$$

Avec K : le coefficient de transfert du soluté (m.s^{-1}).

Le colmatage peut résulter soit de l'obstruction des pores à l'intérieur de la membrane (colmatage en profondeur), soit d'un phénomène d'adsorption, soit d'un dépôt de matière à la surface de la membrane (Figure 20).

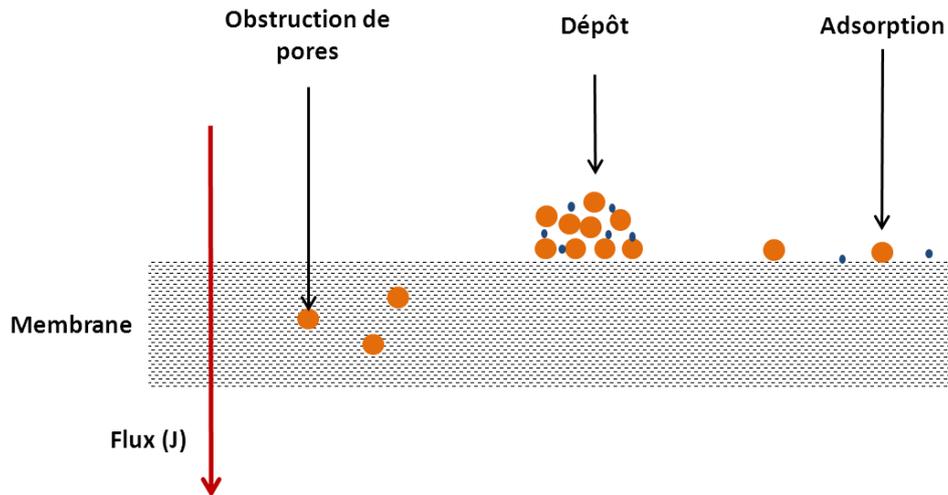


Figure 20. Les phénomènes responsables du colmatage des membranes.

Le colmatage engendre une résistance à l'écoulement. Le colmatage par dépôt de matière en surface de la membrane peut être éliminé par un balayage tangentiel ou par un rétro lavage. Définir des lois de colmatage est très complexe en microfiltration tangentielle. En effet, il est nécessaire d'intégrer le balayage tangentiel de la membrane qui réduit l'épaisseur du dépôt en surface de la membrane. Néanmoins, certains modèles ont été développés en décomposant le colmatage en trois catégories :

- le blocage total de pores,
- la restriction du diamètre des pores,
- la filtration sur gâteaux.

Le flux peut alors être exprimé par l'équation 21 (Ho et Zydney, 2000) :

$$\frac{dJ}{dt} = -KJ(JA_0)^{2-n} \quad \text{(Equation 21)}$$

Avec t : la durée de filtration (s), J : le flux de perméat ($m \cdot s^{-1}$), A_0 : surface de la membrane (m^2) et K : le coefficient de transfert ($m \cdot s^{-1}$) et n : caractérise le modèle de filtration. n prend différentes valeurs selon les cas :

- $n = 0$ pour la filtration sur gâteau
- $n = 1$ pour le blocage intermédiaire des pores
- $n = 1,5$ pour la restriction des pores
- $n = 2$ pour l'obstruction complète des pores.

L'optimisation des paramètres de séparation peut permettre de réduire les phénomènes de colmatage et l'impact de la couche de polarisation. Les principaux paramètres de la séparation sont les propriétés de membranes (nature et seuil de coupure), les propriétés de solution (concentration en macromolécule, composition, pH...) et les paramètres opératoires (PTM, débit d'alimentation et température).

➤ **Influence des caractéristiques des membranes**

Le matériau constituant la membrane et le seuil de coupure ont un rôle dans la sélectivité du procédé. En effet, le taux de rétention de la molécule d'intérêt est régi par la taille des pores mais aussi par la géométrie de la molécule en solution. La nature de la membrane, quant à elle, joue un rôle dans les interactions de surface entre la membrane de séparation et les molécules présentes en solution. Afin de réaliser une séparation par la taille, les interactions entre la membrane/molécule doivent être minimisées.

Les membranes peuvent être de nature organique (cellulose, polyamide ou acrylique) ou inorganique (carbone, alumine, métal, silico-aluminate ou carbure de silicium). Les membranes peuvent présenter une structure symétrique, asymétrique ou composite. Les membranes de structure symétrique sont constituées d'un seul matériau et présentent des pores de taille homogène. Les membranes de structure asymétrique sont constituées d'une couche très fine posée sur une sous-couche poreuse plus épaisse. La séparation sera assurée par la couche plus fine, plus sélective. Ces membranes permettent d'augmenter le flux. Les membranes composites sont des membranes organiques et anisotropes, les deux couches sont constituées de deux matières différentes.

La géométrie des membranes peut être de trois types :

- membrane plane,
- membrane tubulaire,
- membrane à fibre creuse.

La séparation des cellules du milieu contenant de l'AH est réalisé par des membranes planes à structure symétrique en fluorure de polyvinylidène (PVDF) avec des diamètres de pores compris entre 0,22 et 0,45 μm (Zhou et al., 2006).

➤ **Influence des propriétés des solutions**

Les propriétés des solutions (concentration, pH, force ionique, viscosité...) ont une influence sur la performance de la séparation (sélectivité et flux de perméat). Les molécules contenues dans le milieu

vont participer au colmatage et à la formation de la couche de polarisation. La réduction du pH à 4 et l'augmentation de la force ionique permet d'améliorer le passage de l'AH à travers la membrane de microfiltration (Zhou et al., 2006). La protonation ou la neutralisation des charges de l'AH permet de minimiser la rétention de l'AH en microfiltration.

➤ **Influence des conditions opératoires**

Les paramètres opératoires sont des facteurs qui peuvent être modulés afin d'optimiser la séparation des molécules. La PTM et la température ont une influence non négligeable sur la productivité du procédé. En effet, en considérant la loi de darcy (équation 13), plus la PTM est élevée plus le flux de perméat sera important. De même, l'augmentation de la température réduit la viscosité et, par conséquent, augmente le flux de perméat. L'augmentation du débit d'alimentation augmente également la productivité du procédé. Elle permet d'éroder la couche de polarisation ou le dépôt de matière responsable du colmatage à la surface des membranes. Un modèle phénoménologique de dépôt-érosion peut être utilisé (équation 22). Ce modèle établit un bilan entre le dépôt de matière à la surface des membranes par convection et l'entraînement de matière résultant de l'érosion (Barnier et De Bank, 1992) :

Dépôt = apport – érosion

$$\varphi_d \frac{de_d}{dt} = J C_0 - \beta (\tau_w - \tau_c)^{3/2} \quad (\text{Equation 22})$$

Avec t : la durée de la microfiltration (s), e_d : l'épaisseur du dépôt (m), φ_d : la masse volumique du dépôt (kg.m^{-3}), J : le flux de perméat ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}.\text{m}^{-2}$), C_0 : la concentration moyenne (kg.m^{-3}), β : une constante propre à la suspension, τ_w : la contrainte de cisaillement à la paroi (Pa) et τ_c : la contrainte critique d'érosion (Pa).

L'augmentation du débit d'alimentation en séparation membranaire permet de réduire le dépôt en surface de la membrane responsable de la résistance au flux de perméat. En conséquence, l'augmentation du débit d'alimentation augmente le flux de perméat.

La microfiltration de solutions bactériennes contenant de l'AH est possible. Cependant, dans les conditions optimales déterminées par Zhou et al. (2006) (pH 4 et 0,25 mmol.l⁻¹ de NaCl), la rétention de l'AH est de 0,2. Ainsi, une part de l'AH est retenue. Les conditions de microfiltration devront probablement être étudiées afin de se rapprocher d'une rétention nulle.

2.3.3 Les méthodes de purification

Une fois les cellules éliminées, l'AH se retrouve libre dans un milieu complexe contenant des solutés variés (protéines, peptides, acides nucléiques, minéraux...). Afin d'éliminer ces solutés, diverses méthodologies de purification peuvent être mises en place telles que la diafiltration, la précipitation ou encore l'adsorption sur charbon actif. Les différentes séparations sont basées sur la différence de propriétés qu'il existe entre l'AH et les autres molécules du milieu. Une des caractéristiques qui distingue de manière radicale l'AH des autres molécules est sa taille. En effet, l'AH présente une taille comprise entre quelques dizaines de kDa à plusieurs MDa.

2.3.3.1 Purification par ultrafiltration

L'ultrafiltration est une méthode de séparation membranaire faisant intervenir des membranes dont le diamètre de pores est compris entre 1 et 100 nm. Elle est basée sur le même principe que la microfiltration tangentielle (§2.3.2.3). Par conséquent, toutes les équations citées précédemment sont applicables à la séparation par ultrafiltration. L'ultrafiltration peut être utilisée pour la concentration de l'AH mais également pour sa purification (diafiltration).

La séparation de l'AH par ultrafiltration est influencée par les caractéristiques de la membrane (matériaux, seuil de coupure, module etc.), les propriétés de la solution (pH, force ionique, viscosité etc.) et les conditions opératoires (pH, température, PTM, etc.)(§2.3.2.3). La mise en œuvre d'une étape de séparation par ultrafiltration demande donc de faire le choix de nombreux paramètres : nature de la membrane, diamètre de pores, propriété des solutions (concentration en AH, viscosité, pH...), PTM, température et débit d'alimentation.

Les membranes de la séparation de l'AH sont recensées dans le

Tableau 2. Les membranes sont toutes des membranes planes. La nature des membranes les plus utilisées est soit le fluorure de polyvinylidène (PVDF), soit le polyéthersulfone (PES). Les seuils de coupure sont compris entre 50 et 675 KDa. La surface des membranes est variable. Les solutions séparées sont pour la plupart des milieux de culture microbienne. La température de fonctionnement est comprise entre la température ambiante et 35°C. La PTM est comprise entre 0,5 et 2 bar.

Les performances de séparation sont variables. Néanmoins, en conditions optimisées, un taux de rétention de 0,96 et un flux de 20 l.m⁻².h⁻¹ (10,4 cm²) peuvent être envisagées (Zhou et al., 2006 ; Murado et al., 2012 ; Rangaswamy et Jain, 2008).

Tableau 2. Récapitulatif de la nature et des seuils de coupure des membranes d'ultrafiltration utilisées pour la séparation de l'AH.

milieu	Composition de la membrane	Surface (m ²)	Seuil de coupure (kDa)	Référence
Milieu de culture	PES	/	50	(Rangaswamy et Jain, 2008)
Œil de poisson	PES	6,00.10 ⁻²	100 - 300 - 675	(Murado et al., 2012)
Milieu de culture	PVDF	7.10 ⁻¹	300	(Carlino et Magnette, 2002)
Milieu de culture	PES	10 ⁻¹	5	(Santosh et al., 2010)
Milieu de culture	PES	1,14	30	(Gaspar et al., 1989)
Milieu de culture	PVDF	1,04.10 ⁻²	100 - 300	(Zhou et al., 2006)

Les conditions optimales mises en place lors de l'ultrafiltration permettent d'améliorer le rendement et la productivité lors de l'ultrafiltration. En revanche, pour optimiser la pureté d'une solution d'AH, l'ultrafiltration sera utilisée en mode diafiltration. La diafiltration consiste en l'addition d'eau (ou de tampon) dans le rétentat afin d'en maintenir le volume constant (Figure 21). Maintenir un volume constant dans le rétentat permet d'éviter une concentration de l'AH dans le perméat qui conduit au colmatage de la membrane tout en favorisant le passage des molécules de faible taux de rétention.

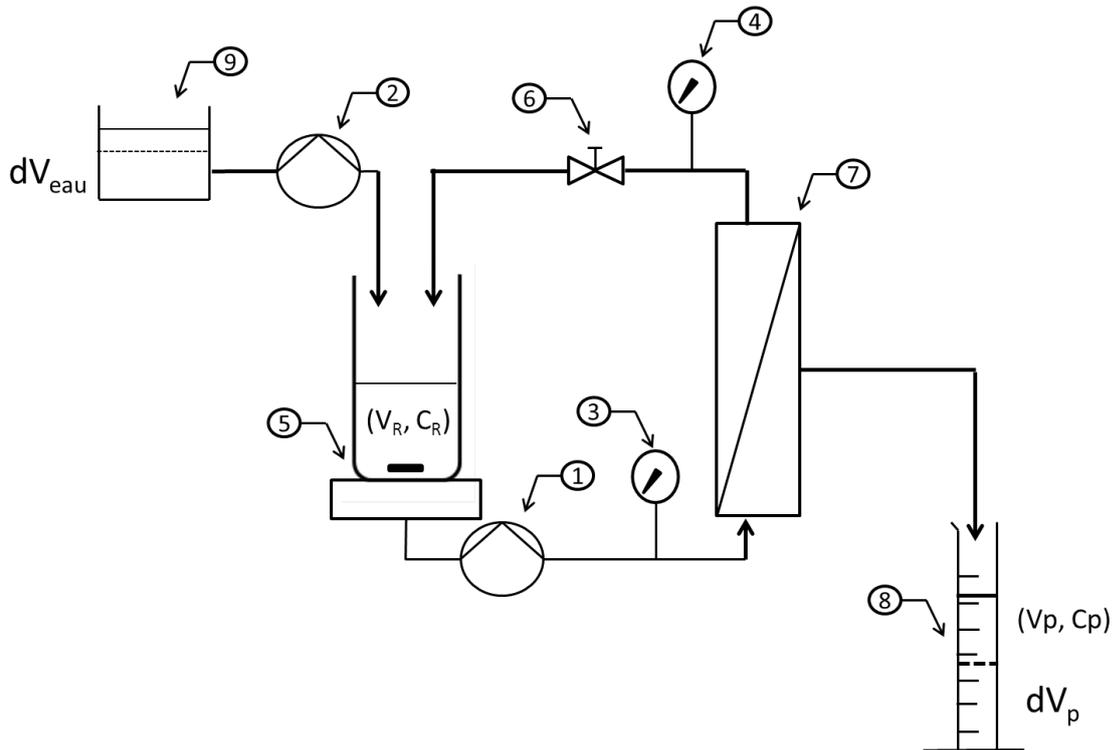


Figure 21. Schéma d'un système de diafiltration. (1 et 2) Pompes péristaltiques, (3 et 4) manomètre, (5) agitateur magnétique, (6) vanne de contre pression, (7) membrane, (8) éprouvette graduée et (9) réservoir d'alimentation.

Les performances de purification en diafiltration s'expriment par le rendement, la pureté et la productivité.

Le rendement est déterminé par l'équation 23, elle permet d'évaluer la quantité d'AH conservé au cours des étapes de purification :

$$\eta = \frac{m_{AH}}{m_{AH0}} \quad \text{(Equation 23)}$$

avec m_{AH0} et m_{AH} : la quantité d'AH avant et après purification (kg).

La pureté est définie par l'équation 24, elle permet de suivre l'élimination des éléments autres que l'AH :

$$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{AH}}{m_{\text{total}}} \quad \text{(Equation 24)}$$

Avec m_{total} , la masse du milieu contenant l'AH (kg).

La productivité peut être déterminée par l'équation 25 :

$$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{\text{AH}}}{t} \quad (\text{Equation 25})$$

Avec t , la durée de l'étape de diafiltration (s).

La concentration en AH dans le rétentat évolue selon l'équation 26 (Cheryan, 1986) :

$$C = C_0 e^{-(1-TR) \times \frac{V_{\text{eau}}}{V_0}} \quad (\text{Equation 26})$$

Avec C : la concentration dans le rétentat (g.l^{-1}), C_0 : la concentration initiale (g.l^{-1}), v_{eau} : le volume total d'eau ajouté (m^3) et V_0 : le volume initial de rétentat (m^3).

Cette relation permet de déterminer l'évolution du rendement en diafiltration en l'associant l'équation 24. Le calcul du rendement devient alors (équation 27) :

$$\eta = C_0 e^{-(1-RR) \times \frac{V_{\text{eau}}}{V_0}} \quad (\text{Equation 27})$$

La productivité, de la même manière que pour la pureté, peut être exprimée en fonction du flux de perméat et de l'équation 25. La productivité peut alors être déterminée par l'équation 28 :

$$P_{\text{productivité}} = \frac{m_{\text{AH}} \times J}{V_{\text{eau}}} \quad (\text{Equation 28})$$

La pureté est difficile à déterminer de manière théorique. En effet, elle nécessite de connaître la concentration de chaque composé contenu dans le milieu. Les milieux de culture microbiens présentent une variété importante de composés (protéines, peptides, acides aminés, oses, sels, vitamines...) et une composition souvent approximative, notamment due à l'ajout de composés tels que les extraits de levure. Il est donc difficile d'évaluer la composition initiale et l'évolution des milieux complexes en diafiltration. De ce fait, la pureté, est, dans la plupart des cas, déterminée expérimentalement. Le nombre de volumes de diafiltration est à ajuster en fonction du degré de pureté requis.

La diafiltration est une méthode de séparation très performante en ce qui concerne la purification de l'AH. Elle permet de purifier l'AH d'un facteur de 1000 avec un rendement de 77 % (Zhou et al., 2006). Le suivi de l'élimination des sels en diafiltration peut se faire par mesure de conductivité et

constitue souvent une référence dans les procédés industriels (Gaspar et al., 1989). A quatre diavolumes la quasi-totalité des sels du milieu de culture de *S. zooepidemicus* sont éliminées (Choi et al., 2014). Santosh et al. (2010) font référence à cinq diavolumes pour la purification de l'AH. La diafiltration est souvent associée à d'autres méthodes de purification telle l'adsorption sur charbon actif ou la précipitation.

2.3.3.2 Purification de l'AH par adsorption sur charbon actif

La purification de l'AH par l'addition de charbon actif pour l'adsorption des solutés du milieu de culture est retrouvée à l'échelle industrielle (Kweon et al., 2012 ; Morikawa et al., 2009 ; Santosh et al., 2010). L'adsorption est un phénomène de surface par lequel des molécules se fixent par des liaisons faibles à la surface d'adsorbants. Ainsi, certaines molécules telles que les protéines, les acides nucléiques, les métaux lourds et les endotoxines interagissent avec la surface du charbon actif. Après adsorption, l'adsorbant est éliminé de la solution en captant les molécules adsorbées.

➤ **Les charbons actifs**

Les charbons actifs présentent une large gamme de structures. La structure est liée à la nature de la matière première organique utilisée ainsi qu'aux conditions de fabrication. Les matières premières utilisées peuvent être du bois, de la coque de noix de coco, des noyaux d'olives ou bien de la houille, de la tourbe ou de la lignine. Cette matière première est dans un premier temps carbonisée. Durant cette étape, les composés organiques sont hydrolysés en gaz volatil tels que l'oxygène, l'hydrogène et l'azote par pyrolyse (300 °C) laissant un squelette de carbone. Ce squelette contient des pores de différentes tailles qui vont faire du charbon actif un excellent adsorbant. Les pores du squelette de carbone, après carbonisation, restent parfois obstrués par de la matière dégradée. L'activation permet d'éliminer les matières carbonisées afin d'obtenir la plus large distribution de tailles et de formes des pores, et d'accroître considérablement la surface spécifique des charbons actifs. L'activation du charbon actif peut se faire physiquement ou chimiquement.

L'activation physique (ou gazéification partielle à haute température) est une combustion thermique à 700-1000 °C effectuée dans un courant d'air et de vapeur d'eau et/ou dioxyde de carbone injecté sous pression (procédé d'oxydation contrôlé). Ce procédé conduit à l'obtention de pores étroits.

L'activation chimique est l'ajout d'un agent déshydratant à haute température entre 400-600 °C. Cet agent est souvent de l'acide phosphorique mais peut également être de l'acide sulfurique ou du chlorure de zinc. Cet agent est ajouté en grande quantité et est lavé par la suite. Ce type de procédé

donne des pores plus larges que dans le cas de l'activation physique (Torregrosa et Martinmartinez, 1991 ; Ahmadpour et Do, 1996).

Les charbons actifs existent sous différentes formes : concassé, en grain ou en poudre.

Chaque charbon actif présente des caractéristiques propres d'adsorption selon son origine, sa forme ou son activation.

➤ **La caractérisation des charbons actifs**

Les charbons actifs ont tous des propriétés qui dépendent de l'origine de la matière organique et du procédé de fabrication. Afin de pouvoir différencier les divers types de charbon actif ainsi que leurs performances d'adsorption, plusieurs paramètres sont définis.

La caractérisation d'un charbon actif se fait par la détermination de la surface d'adsorption et de la distribution des diamètres de pores. L'origine de la matière première doit également être spécifiée.

La mesure de la surface spécifique d'adsorption est basée sur la détermination de la quantité d'adsorbat nécessaire pour former une monocouche à la surface du charbon actif. La détermination de la surface se fait par la théorie de Brunauer, Emmett et Teller (BET) (Brunauer et al., 1938). Une isotherme d'adsorption du diazote à température de l'azote liquide sur 8 points est établie. A partir de cette isotherme, le volume de la monocouche de diazote peut être déterminé (m³) par l'équation de BET (équation 29) :

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{V \times \left(1 - \frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{C \times V_m} + \frac{C - 1}{C \times V_m} \times \left(\frac{P}{P_0}\right) \quad (\text{Equation 29})$$

Avec v : la quantité d'adsorbat fixée à la pression P exprimée en cm³ TNP par gramme (22.414 cm³ TNP = 1 mole), P : la pression à l'équilibre (Pa) et P₀ : la pression de vapeur saturante (Pa), V_m la capacité de la monocouche (cm³ TNP.g⁻¹) et C : la constante liée aux énergies d'adsorption.

En rapportant le volume de la monocouche de diazote au volume d'une molécule de diazote, la surface spécifique notée N₂-BET en m².g⁻¹ est déterminée. Plus la surface spécifique est importante plus les capacités d'adsorption seront importantes. Elle est comprise entre 500 et 1500 m².g⁻¹.

La détermination du diamètre de pore majoritaire est quant à elle réalisée par une méthode de porosimétrie au mercure (Washburn, 1921). Trois types de pores sont distingués selon leurs tailles (Tableau 3).

Tableau 3 : Les différents types de pores des charbon actifs.

Type de pores	Diamètre de pores
Micropore	Inférieur à 2 nm
Mésopore	Entre 2 et 50 nm
Macropore	Supérieur à 50 nm

Les capacités d'adsorption sont caractérisées par l'indice de mélasse, l'indice de bleu de méthylène et l'indice d'iode. Chaque indice caractérise la capacité des molécules à se fixer à un type de pores. L'indice de mélasse traduit la capacité d'un charbon actif à fixer de grosses molécules dans les macropores. Il est généralement compris entre 95 et 600 mg mélasse.g⁻¹ de charbon actif. L'indice de bleu de méthylène traduit la capacité à fixer les colorants qui sont de taille moyenne dans les mésopores et l'indice d'iode caractérise la fixation des petites molécules dans les micropores généralement compris entre 500 et 1200 mg d'iode.g⁻¹ de charbon actif.

➤ **Adsorption des molécules sur des charbons actifs**

Deux forces d'interaction principales sont mises en jeu, des interactions dites physiques c'est-à-dire les forces de Van Der Waals ou des interactions chimiques qui sont liées à une redistribution des électrons entre la surface du solide et l'atome adsorbé. La chimisorption qui met en jeu le partage des électrons entre l'atome et l'adsorbant, est une interaction plus forte (40 à 400 KJ.mol⁻¹) que la physisorption (10 à 20 KJ.mol⁻¹) (Bansal et Goyal, 2010). Contrairement à la physisorption, la chimisorption est spécifique.

La quantité adsorbée à l'équilibre (lorsque la vitesse d'adsorption = vitesse de désorption) pour un système adsorbant-adsorbé donné dépend de la température. C'est pourquoi, l'adsorption est communément présentée sous la forme d'une isotherme adsorption (adsorption des molécules mesurée à température fixe). L'adsorption en milieu liquide peut principalement être représentée par deux équations d'isothermes : les équations de Freundlich et de Langmuir (Hoda et al., 2006 ; Fabbricino et al., 2013 ; Chyka et al., 2001 ; Netzer et Hughes, 1984 ; Sekaran et al., 1996).

L'équation de Freundlich (équation 30) est une équation qui représente empiriquement la quantité de molécules adsorbées par unité de masse d'adsorbant :

$$\frac{X}{m} = K_f \times C^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Equation 30})$$

Avec X : la quantité de molécules adsorbées, m : la masse d'adsorbant (charbon actif), C : la concentration de la molécule à adsorber en solution, K_f et n sont des constantes qui dépendent de l'adsorbant, de l'adsorbé et de la température.

Cette équation est souvent utilisée pour caractériser l'adsorption des molécules telles que les sucres, les colorants ou les huiles en milieu liquide (Jaroniec, 1975).

L'équation de Langmuir permet de caractériser la surface de l'adsorbant recouverte par la molécule adsorbée (équation 31). L'équation de Langmuir est basée sur l'équilibre adsorption/désorption d'une molécule à un site de fixation. L'utilisation de cette équation sous-tend les trois postulats suivants :

- il existe des sites actifs M à N molécules liées,
- chaque site de liaison ne peut lier qu'une seule molécule,
- chaque site actif est indépendant.

$$Q = \frac{Q_{\text{mon}} \times K_L \times C}{1 + K_L \times C} \quad (\text{Equation 31})$$

Avec Q : la quantité de molécules adsorbées par unité de masse d'adsorbant (g.g^{-1}), Q_{mon} : la quantité de molécules nécessaire pour former une monocouche par unité de masse d'adsorbant (g.g^{-1}), C : la concentration en molécules à adsorber en solution (g.g^{-1}) et K_L : une constante qui dépend de l'adsorbant, l'adsorbé et la température.

En traçant, $1/Q$ en fonction de $1/C$, l'ordonnée à l'origine fournit la valeur de Q_{mon} et la pente de la droite permet de déduire K.

L'établissement des isothermes d'adsorption doit prendre en compte :

- les propriétés du charbon actif : la structure chimique (nature, polarité et la concentration des groupements chimiques à la surface du charbon ainsi que la surface) et la distribution des tailles de pore).
- les propriétés des molécules adsorbées : la structure chimique, la polarité et la taille.
- les propriétés de la solution (s'il s'agit de molécules en solution) : la concentration des molécules, la force ionique et le pH de la solution.

En effet, Sekaran et al., (1996) ont étudié l'impact des propriétés de solution (concentration, force ionique, pH) et de la température sur l'adsorption de l'albumine de sérum de bovin au charbon actif. L'adsorption augmente avec l'augmentation de la concentration en protéines jusqu'à atteindre une valeur limite lorsque le charbon actif est saturé. En revanche, l'augmentation de la force ionique réduit l'adsorption des protéines. En effet, la force ionique neutralise les charges à la surface de la protéine ce qui réduit son interaction avec le charbon actif. Le pH d'adsorption optimale déterminé est de 7, la molécule est alors chargée négativement. L'augmentation de la température diminue également l'adsorption. En effet, l'augmentation de la température apporte l'énergie nécessaire à la rupture des liaisons.

L'adsorption sur charbon actif de solution d'AH est réalisée de préférence en fin de processus de purification (Kweon et al., 2012). L'addition de charbon actif, après diafiltration, permet l'élimination des protéines, endotoxines, métaux lourds et acides nucléiques résiduels (Choi et al., 2014).

L'adsorption sur charbon actif est influencée par les caractéristiques du charbon, les propriétés des molécules à adsorber ainsi que la composition des solutions. La maîtrise de ces paramètres permet d'obtenir une fixation optimale des protéines, acides nucléiques, endotoxine et métaux lourds.

2.3.3.3 Les méthodes de précipitation de l'AH

➤ Précipitation au sel de cétrimide ammonium

La précipitation de l'AH par le chlorure ou le bromure de cétrimide ammonium (CTACI ou CTAB) est réalisée pour la purification d'antigènes capsulaires de nature polysidique chargés négativement et produits par des bactéries comme *Hemophilus influenzae* ou *S. zooepidemicus* (Brown et al., 1994 ; Anderson et Smith, 1977 ; Bartoloni et al., 1995). L'utilisation du chlorure de cétrimide ammonium bromide a été bannie du fait de sa toxicité. Le bromure de cétrimide ammonium quant à lui est toujours employé. Le précipité d'AH et de CTAB formé est récupéré par centrifugation et est, par la suite, remis en suspension par une solution de NaCl. Le CTAB est ensuite éliminé par osmose inverse ou diafiltration (Hemant et al., 2013).

➤ Précipitation de l'AH par des solvants organiques

La purification de l'AH peut se faire par précipitation en solvant organique (Kweon et al., 2012). L'ajout de solvant organique oblige les molécules d'AH très hydrophile à se regrouper et à précipiter afin de limiter leur contact avec l'éthanol. La force ionique ainsi que le titre en éthanol sont deux facteurs qui influencent la précipitation (Murado et al., 2012). Pour des concentrations en AH de 1 à 3 % (m/v), il est ajouté 44 à 60 % (V/V). D'autres solvants organiques que l'éthanol peuvent être

utilisés tel l'acétone ou le méthanol. Pour la précipitation au méthanol, il faut une concentration en AH de 3 à 6 % (m/v) et 55 à 65 % (v/v) de méthanol et pour celle à l'acétone une concentration en AH de 3 à 4 % (m/v) et 40 à 50 % (v/v) (Murata et Fukuda, 2009). La précipitation à l'éthanol permet la précipitation de concentrations plus faibles en AH. Pour les grandes tailles en AH, la viscosité augmente rapidement avec la concentration et il devient difficile de concentrer les solutions du fait des contraintes rhéologiques importantes.

La précipitation à l'éthanol permettra de précipiter de plus faibles concentrations en AH réduisant l'étape de concentration en amont. Le désavantage de la précipitation en solvant organique est la consommation importante en solvant ainsi que la nécessité de mettre en place des zones particulières de sécurité.

2.4 Les méthodes de séchage

Il existe de nombreuses méthodes de séchages. Le choix d'une méthode appropriée doit prendre en compte les caractéristiques physico-chimiques de la solution mais également le comportement de la molécule d'intérêt au cours du séchage. Il est primordial de maintenir l'intégrité de la molécule et ses propriétés biologiques. L'acide hyaluronique est une biomolécule thermosensible qui est capable de fixer jusqu'à 1000 fois sa masse en eau. Les solutions d'acide hyaluronique de grande taille et de concentrations élevées sont très visqueuses. Les technologies développées pour ce type de solutions sont rares. Deux méthodes sont principalement utilisées pour le séchage de l'AH : la lyophilisation et la précipitation par solvant organique suivies de l'évaporation de l'éthanol résiduel (Murata et Fukuda 2009 ; Santosh et al., 2010 ; Hemant et al., 2013).

2.5 Aide à l'optimisation par l'utilisation des plans d'expériences

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (Goupy 2001). Ils permettent de trouver des corrélations entre une grandeur d'intérêt (Y) et des variables (X). La grandeur d'intérêt Y portera le nom de réponse alors que les variables le nom de facteur. La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lors de l'étude de l'influence d'un facteur sur la réponse, les variations du facteur sont limitées entre deux bornes : niveau haut et bas. L'ensemble des valeurs que peut prendre le facteur entre ces deux bornes est appelé domaine. A chaque point du domaine d'étude est associé une réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse

nécessite un espace ayant une dimension supplémentaire de l'espace expérimental. Ainsi, un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : deux dimensions pour les facteurs et une dimension pour la réponse. L'ensemble des réponses se localise sur une surface appelée surface de réponse. Le nombre et l'emplacement des points expérimentaux sont le problème fondamental des plans d'expériences. La meilleure précision de la surface de réponse est recherchée en minimisant le nombre d'expériences.

Pour pouvoir calculer l'ensemble des réponses entre les points expérimentaux, un polynôme est utilisé. La fonction mathématique est un développement limité de la série de Taylor Mac Laurin. Elle prend la forme suivante (équation 32) :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z \quad (\text{Equation 32})$$

Où y : est la réponse ou la grandeur d'intérêt, x_i : représente le niveau attribué au facteur i (valeurs connues) et a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} : sont les coefficients du modèle mathématique (non connus et doivent être calculés à partir des résultats expérimentaux). Cette équation ne prend pas en compte l'erreur expérimentale ainsi que le manque d'ajustement du modèle. En effet, lorsqu'un point expérimental est réalisé à plusieurs reprises, la réponse n'est pas toujours la même, c'est ce que l'on appelle l'erreur expérimentale. De plus, le modèle « a priori » est fort probablement différent du modèle réel. L'écart entre le modèle et la mesure réelle est le manque d'ajustement (lack of fit en anglais). Ces deux écarts, l'erreur expérimentale et le manque d'ajustement sont regroupées dans un seul écart noté e ; l'équation devient alors (équation 33) :

$$Y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z + e \quad (\text{Equation 33})$$

A la fin du plan d'expériences, un système à n équations provenant de n essais à p inconnues peut s'écrire (équation 34) :

$$Y = X a + e \quad (\text{Equation 34})$$

Avec Y : le vecteur de réponse, X : la matrice du modèle (ou de calcul) qui dépend des points expérimentaux choisis pour exécuter le plan, a : est le vecteur de coefficient et e : le vecteur d'écart.

Ce système possède un nombre d'équations inférieur au nombre d'inconnues. Il y a n équation et $(p + n)$ inconnus. Pour résoudre ce système, une régression basée sur le critère des moindres carrés est utilisé. Une estimation des coefficients est donc obtenue (\hat{a}).

Les plans d'expériences peuvent être classés en deux grandes catégories : les plans complets et les plans fractionnaires.

➤ **Les plans complets**

La réalisation de tels plans nécessite la réalisation de toutes les combinaisons de niveaux. Ces plans peuvent être utilisés strictement pour les variables continues et pour les variables discrètes. Ce type de plan est utilisé lorsque le nombre de facteurs et niveaux est relativement réduit. Un plan complet de k facteur à n niveaux nécessitera n^k expériences. Ainsi, pour seulement 7 facteurs et 2 niveaux par facteur, le nombre d'expériences à réaliser serait de 128. Pour diminuer le nombre des essais en conservant la possibilité d'étudier tous les facteurs, les plans factoriels fractionnaires ont été introduits.

➤ **Les plans factoriels fractionnaires**

Ces plans sont des plans factoriels qui permettent d'étudier tous les facteurs mais dont le nombre d'essais est réduit par rapport au plan complet. Le nombre d'expériences s'écrit alors n^{k-q} . Le plan présentera nq moins d'expériences que le plan complet. A la fin du plan factoriel on obtient n équations à p coefficients inconnus avec p plus grand que n . Pour résoudre un tel système, le nombre d'inconnues doit être diminué. Les coefficients sont regroupés de telle manière à obtenir n inconnues. Ces regroupements de coefficients sont appelés des contrastes ou des aliasés. Les coefficients sont alors aliasés dans les contrastes. Les hypothèses d'interprétation de ces modèles sont :

- les interactions d'ordre 3 (entre 3 facteurs) ou d'ordre plus élevé sont négligeables,
- un contraste est nul si les effets et les interactions aliasées sont tous nuls (fort probable) ou que les effets et interactions aliasées se compensent (peu probable),
- deux contrastes sont faibles si leur interaction l'est aussi, et si un contraste est fort et l'autre faible, leur interaction est faible,
- deux contrastes sont forts, leur interaction peut l'être aussi.

Ces hypothèses sont souvent vérifiées.

Les plans complets et fractionnaires sont basés sur des modèles mathématiques du premier degré. Ils conviennent pour la plupart des besoins des expérimentateurs lors des étapes de dégrossissage. Cependant d'autres plans, également basés sur des modèles du premier degré ont été mis au point pour résoudre des situations spécifiques. Il s'agit par exemple du plan de Koshal qui permet de déterminer uniquement les effets principaux. Il existe des plans faisant intervenir des équations du second degré, ce sont des plans de surface de réponse. Ces plans sont utilisés pour des variables continues et lorsque la réponse est proche d'un minimum ou d'un maximum. Il s'agit par exemple des plans composites qui sont parfaitement adaptés à une acquisition progressive des résultats.

Conclusion

La structure en réseau de l'AH est responsable de ses propriétés rhéologiques particulières convoitées dans le domaine de la santé. Lors de la production par voie microbienne, ces propriétés limitent le transfert de matière au sein de la culture et peuvent conduire, pour des concentrations et des tailles d'AH élevées, à l'arrêt de la croissance microbienne. En purification, à l'identique que pour la production, la présence d'AH n'est pas sans conséquence sur les méthodes séparatives. La viscosité des fluides ont une influence non négligeable sur les performances de séparation. En effet, en microfiltration, le flux de perméat diminue avec l'augmentation de la viscosité de la solution conduisant à une réduction de la productivité. La comparaison des différents procédés de purification utilisés à l'échelle industrielle permet de mettre en évidence des méthodes de séparation adaptées à la structure en réseau de l'AH. Ainsi, les méthodes membranaires, d'adsorption ou de précipitation semblent être les méthodes les plus robustes pour la purification de l'AH. La structure en réseau de l'AH, qui résulte de fortes interactions interchaînes, peut empêcher ou améliorer certains mécanismes de séparation. La considération des propriétés particulières de l'AH est indispensable au développement de procédés de purification.

On notera que si des pistes d'utilisation associées de plusieurs technologies de séparation / purification ont été signalées dans la littérature, celle-ci ne fait part d'aucune étude permettant de modéliser les performances de ces étapes. Un des objectifs du travail de cette thèse est de proposer des connaissances et des outils de modélisation utilisables en vue de définir la meilleure séquence et les meilleures conditions de mise en œuvre des différentes opérations unitaires nécessaires pour une plus haute efficacité de purification d'AH d'origine microbienne qui soit.

3 Matériel et Méthodes

Sommaire du matériel et méthodes

3.1 LES PRODUITS ET LE MATERIEL	54
3.2 LES METHODES DE QUANTIFICATION.....	57
3.2.1 Quantification et caractérisation de l'AH.....	57
3.2.1.1 Quantification de l'AH	57
3.2.1.2 Mesure de la taille de l'AH	58
3.2.2 Quantification et suivi des composés du milieu de culture.....	58
3.2.2.1 Quantification des protéines.....	58
3.2.2.2 Quantification du fer et du plomb.....	59
3.2.2.3 Détermination de la matière sèche.....	61
3.2.2.4 Les méthodes de suivi de l'élimination des sels et acides nucléiques	61
3.3 LES METHODES DE SEPARATION DE L'AH.....	61
3.3.1 Les méthodes d'extraction de la capsule bactérienne	61
3.3.2 Elimination des cellules du milieu de culture	62
3.3.2.1 Elimination par microfiltration tangentielle.....	62
3.3.2.2 Elimination par filtration frontale	63
3.3.2.3 Elimination des cellules par filtration sur adjuvant de filtration.....	63
3.3.3 Purification de l'AH	64
3.3.3.1 Ultrafiltration de l'AH	64
3.3.3.2 Diafiltration de l'AH.....	67
3.3.3.3 Identification des contaminants résiduels	69
3.3.3.4 Adsorption sur charbon actif.....	70
3.3.4 Le séchage de l'AH	71
3.3.4.1 Lyophilisation.....	71
3.3.4.2 Précipitation en solvant organique	72

3.1 Les produits et le matériel

Les produits

Produit	Fournisseur	Ville, Pays
tétraborate de sodium	Carlo Erba	Peypin, France
Acide sulfurique 96 %	Carlo Erba	Peypin, France
Carbazole	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Ethanol absolu	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Ethanol 96 %	Carlo Erba	Peypin, France
Dihydrogénophosphate de sodium	Carlo Erba	Peypin, France
Dihydrogénophosphate de potassium	Carlo Erba	Peypin, France
Hydrogénophosphate de potassium	Carlo Erba	Peypin, France
Chlorure de sodium	Carlo Erba	Peypin, France
Chlorure de potassium	Carlo Erba	Peypin, France
Sulfate de manganèse	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Sulfate de magnésium	VWR international	Briare, France
Chlorure de calcium	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Acétate de sodium	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Bicarbonate de sodium	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Extrait de levure	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Peptone de soja	Organotechnie	La Courneuve, France
Peptone de caséine	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Glucose	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Bromure de cétyltriméthylammonium	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Hydroxyde de sodium	Carlo Erba	Peypin, France
Dosage des protéines par l'acide bicinchoninic (BCA Protein Assay Reagent)	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Acide nitrique (optima grade)	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Standard de fer	CaPurAn	Voisin le Bretonneux, France
Standard de plomb	CaPurAn	Voisin le Bretonneux, France

Matériel et méthodes

Infusion cœur cerveau (BHI)	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Dodécylsulfate de sodium	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
Acide trichloracétique	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Célite	Sigma-Aldrich	Saint-Quentin Fallavier, France
PEO 19K	Malvern	Orsay, France
LS3	Ceca Arkema	Parentis-en-Born, France
ENO-PC	Ceca Arkema	Parentis-en-Born, France
Acide hyaluronique toutes tailles	HTL biotechnology	Javené, France
Tampon pH 3,5	Carlo Erba	Peypin, France

Le matériel

Matériel	Fournisseur	Pays
Spectrophotomètre à cuve (50 Scan)	Varian	Les Ulis, France
UV-Vis Spectrophotomètre à plaque, Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Chromatographie d'exclusion stérique /Multi-détection	Malvern	Orsay, France
Précolonne et Colonne A6000M et A7000M	Malvern	Orsay, France
Microplaque à fond plat	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Microplaque à fond rond	Starlab	Bagneux, France
Coupelle en aluminium (pour matière sèche)	Sartorius	Aubagne, France
Coupelle en aluminium (pour lyophilisation)	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Bain-marie	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
ICP OES (ICAP 6000)	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Applikon ADI à agitation contrôlée 1032 stirrer controller	Applikon biotechnology	France
Filtre seringue RC 25	Sartorius	Aubagne, France
Cassette de dialyse	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Système de filtration tangentielle	Millipore	Molsheim, France
Membrane PES ou PVDF 50 cm²	Millipore	Molsheim, France
Filtre fibre de verre 50 µm	Zenpure	Nancy, France
Papier Watman 10 µm (grade 1)	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Filtre cellulose régénérée 0,22 µm	Sartorius	Aubagne, France
Conductimètre CDM 210	Radiometer analytical	Villeurbanne, France
pH mètre PHM 210	Radiometer analytical	Villeurbanne, France
Centrifugeuse	Thermo Fisher Scientific	Illkirch, France
Lyophilisateur	Heto-Holten	Yadevang, Danemark
Balance de précision	Mettler AT200	Viroflay, France

3.2 Les méthodes de quantification

3.2.1 Quantification et caractérisation de l'AH

3.2.1.1 Quantification de l'AH

- **Méthode au carbazole (Kosakai et Yosizawa, 1979) : méthode de la pharmacopée européenne**

La méthode au carbazole est la méthode de référence pour la quantification de l'AH. 1 ml de solution d'AH (HTL Biotechnology, Javené, France) est introduit dans un tube en verre. 5 ml de solution de 25 mM tétraborate de sodium (Carlo Erba, Peypin, France) en acide sulfurique 96 % (Carlo Erba, Peypin, France) est ajouté. L'ensemble est incubé 30 mn à 95 °C pendant 15 mn en bain-marie (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) puis refroidi dans de la glace. 200 µl de solution de carbazole (0,125 % de carbazole en éthanol absolu (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)) sont ajoutés. L'ensemble est incubé 15 mn à 95 °C. Après refroidissement, une lecture d'absorption à 530 nm est réalisée (spectrophotomètre Varian, les Ulis, France). La concentration en AH est déduite à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Celle-ci est réalisée pour des concentrations en AH comprises entre 0 et 0,3 g.l⁻¹.

- **Méthode turbidimétrique au bromure de cetyltriméthylammonium (CTM) (Queslati et al., 2014)**

La méthode CTM permet la quantification de l'AH en milieu complexe (milieu de culture microbien). En effet, la méthode au carbazole est interférée par la présence d'oses ou d'osides (glucose, saccharose, etc.). La CTM est une méthode de substitution fiable. Elle est utilisée pour suivre la concentration en AH durant toutes les étapes de purification de l'AH. 50 µl de la solution à doser sont introduits dans une microplaque de 96 puits (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). 50 µl de tampon phosphate 0,1 M sont ajoutés (Carlo Erba, Peypin, France). L'ensemble est incubé 15 mn à 37 °C puis 100 µl de solution de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) (2,5 % de bromure de cetyltriméthylammonium (sigma-Aldrich, saint-Quentin Fallavier, France) additionné à 2 % d'hydroxyde de sodium (Carlo Erba, Peypin, France) sont ajoutés. Après 10 mn d'incubation et 10 s d'agitation en début et en fin d'incubation, une lecture de turbidité est réalisée à 600 nm (UV-VIS Spectrophotomètre à plaque Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, France). La concentration d'AH est déduite d'une courbe d'étalonnage réalisée pour des concentrations comprises entre 0 et 0,6 g.l⁻¹ dans les mêmes conditions.

3.2.1.2 Mesure de la taille de l'AH

➤ **Mesure de la taille par la viscosité intrinsèque : méthode de référence de la pharmacopée européenne**

La viscosité relative (η_r) qui correspond au rapport de la viscosité de la solution sur la viscosité du solvant est déterminée pour quatre concentrations d'AH : 0,2 g.l⁻¹, 0,15 g.l⁻¹, 0,10 g.l⁻¹ et 0,05 g.l⁻¹. Les solutions d'AH sont préparées avec du chlorure de sodium 0,15 M (Carlo Erba, Peypin, France) en tampon phosphate 0,01 M (Carlo Erba, Peypin, France) à pH 7. La viscosité relative des solutions est calculée à partir des temps d'écoulement mesurés par un viscosimètre à niveau suspendu (spécification : plage de viscosité cinématique de 1-5 mm².s⁻², volume du réservoir de 5,6 ml, diamètre intérieur du tube 2,8-3,2 mm) possédant un capillaire inférieur en forme d'entonnoir. La mesure est réalisée en triplicata.

➤ **Mesure de la taille d'AH par CES/Multi-détection**

50 µl de solution d'AH à doser à 0,5 g.l⁻¹ sont injectés dans le système de CES/Multidétection (Malverne, Orsay, France). Le système est constitué d'une précolonne, deux colonnes (A6000M et A7000M) connectées en série, d'un détecteur de diffusion de la lumière, d'un réfractomètre et d'un viscosimètre. Les colonnes et le dispositif de multi-détection sont thermostatés à 35 °C. L'élution est réalisée en tampon phosphate salin à pH 7,4 composé de 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl (Carlo Erba, Peypin, France), 10 mM de Na₂HPO₄ (Carlo Erba, Peypin, France) et 2 mM de KH₂PO₄ (Carlo Erba, Peypin, France). Le débit d'élution est de 0,35 ml.mn⁻¹. Une calibration universelle est réalisée à partir d'un PEO-19kD (Malvern, Orsay, France). Le dn/dc utilisé pour déterminer la concentration en AH est de 0,147 ml.g⁻¹ (déterminé expérimentalement).

3.2.2 Quantification et suivi des composés du milieu de culture

3.2.2.1 Quantification des protéines

Le dosage des protéines peut se réaliser par diverses méthodes : la méthode de Biuret, méthode de Lowry ou de Bradford. La pharmacopée européenne recommande l'utilisation de la méthode de Lowry. Cette méthode est un dosage colorimétrique des protéines, complémentaire à celle de Biuret. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin (réactif de Gornall de la méthode du biuret) puis un second réactif, dit phosphotungstomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu), est ajouté. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Ce réactif permet la

réduction des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé dont on mesurera l'absorbance à 750 nm. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de détecter des concentrations faibles en acides aminés ou en protéines. Cependant, la méthode de Lowry n'est pas totalement fiable à cause du grand nombre d'interférents. De plus, elle nécessite un certain temps de mise en œuvre. La gamme étalon nécessaire à la détermination de la concentration d'une solution inconnue est délicate à réaliser. C'est pourquoi, une méthode similaire plus simple et rapide est préférée pour la quantification des solutions riches en protéines : la méthode à l'acide bicinchoninique.

25 µl de solution à doser sont introduits en microplaque à fond rond (Starlab, Bagneux, France). 200 µl de réactif de Biuret (Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid), Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) est ajouté. Après 30 mn d'incubation à 37 °C et retour à température ambiante, une mesure d'absorbance est réalisée à 562 nm. La concentration est déduite de la courbe d'étalonnage réalisée à partir d'albumine de sérum bovin. La gamme d'étalonnage est réalisée pour des concentrations comprises entre 0 et 2 g.l⁻¹.

3.2.2.2 Quantification du fer et du plomb

➤ Les méthodes de référence de la pharmacopée européenne

La norme de la pharmacopée européenne indique que la présence en plomb et en fer des solutions d'AH ne doit pas dépasser 10 ppm (pour une solution d'AH à 2 g.l⁻¹) et 80 ppm (pour une solution d'AH à 20 g.l⁻¹) respectivement.

➤ Quantification du plomb

La présence de plomb est estimée par réaction de celui-ci avec le thioacétamide (40 g.l⁻¹) (Carlo Erba, Peypin France). Le test réside dans la comparaison de deux solutions (le témoin et la solution à caractériser). Un test de conformité de la méthode est également réalisé en comparant un blanc avec la solution témoin. Les solutions sont composées :

- de la solution à caractériser: 12 ml de la solution à examiner,
- du témoin : 10 ml de solution à 2 ppm additionnés à 2 ml de solution à caractériser,
- du blanc : 10 ml d'eau additionné à 2 ml de la solution à caractériser.

A chaque solution sont ajoutés 2 ml de tampon pH 3,5 (Carlo Erba, Peypin, France) ainsi que 1,2 ml de thioacétamide. Le système est conforme si la coloration du témoin présente une coloration brune plus importante que le blanc. La solution à examiner est conforme aux exigences de la

pharmacopée européenne si la coloration du témoin est plus intense que celle de la solution à caractériser.

➤ **Quantification du fer par absorption atomique (AA)**

La quantification du fer se réalise par absorption atomique (AA) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) (méthode de référence). Cette méthode permet le dosage mono-élémentaire des cations majeurs de l'ordre du mg.l^{-1} dans des échantillons liquides. Chaque élément a un nombre spécifique d'électrons associés à son noyau. Lors du procédé d'absorption atomique l'énergie fournie à l'atome provient d'une source lumineuse appelée lampe à cathode creuse. L'atome dans son état de base absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde spécifique et passe à un état d'excitation. Un détecteur mesure la quantité de lumière absorbée (à 248,3 nm). Le contact entre les atomes et la source lumineuse est assuré par la cellule d'absorption. La cellule d'absorption est en fait une flamme générée par la combustion d'un mélange air/acétylène (2500 °C).

1 ml d'acide nitrique ultra pur (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) est introduit dans 9 ml de solution à doser. L'ensemble est chauffé à 100 °C pendant 30 mn au bain-marie (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) puis refroidi avant d'être introduit en absorption atomique. La flamme est générée par la combustion d'air/acétylène. La durée de la mesure est de 4 s. La longueur d'onde de mesure est de 248,3 nm. Le courant de la lampe est de 75 %. La bande passante est de 0,2 nm. La concentration en fer est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage comprise entre 0 ppm et 200 ppm (CaPurAn, Voisin le Bretonneux, France).

➤ **Dosage du fer et du plomb par spectrométrie d'émission par plasma à spectrométrie d'émission optique (ICP-OES)**

La méthode de dosage du fer par AA est moins sensible que par spectrométrie d'émission par plasma à spectrométrie d'émission optique (ICP-OES). Les cultures d'AH présentent peu de fer. De ce fait, l'ICP-OES est plus appropriée pour le suivi du fer au cours des étapes du procédé de purification. De plus, elle permet également de quantifier le plomb simultanément.

L'ICP-OES est une méthode de dosage permettant de doser le fer et le plomb simultanément, en quelques minutes. La méthode consiste à ioniser l'échantillon en l'injectant dans un plasma d'argon, ou parfois d'hélium. Les électrons des atomes excités (ionisés) retournent à l'état fondamental en émettant un photon dont l'énergie (la longueur d'onde) est caractéristique de l'élément. La lumière émise par le plasma est analysée par un réseau polychromateur et la concentration est déterminée.

1 ml d'acide nitrique ultra pur est introduit dans 9 ml de solution à doser. L'ensemble est chauffé à 100 °C pendant 30 mn. Puis la solution est introduite en ICP-OES (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). La durée de prélèvement est de 30 s. Le plasma est en visée axiale. Le débit de gaz de nébulisation est de 0,50 l.mn⁻¹. La mesure du fer se fait à 259,9 nm et du plomb à 182,2 nm. Les concentrations en fer et plomb sont déterminées à l'aide de courbes d'étalonnage réalisées pour une gamme de 0 à 1000 ppb (CaPurAn, Voisin le Bretonneux, France).

3.2.2.3 Détermination de la matière sèche

5 ml de solution d'AH sont introduits en coupelle d'aluminium (Sartorius, Aubagne, France) et desséchés en étude à 100 °C pendant 48 h. Après pesée sur balance de précision (Mettler AT200), la matière sèche est déterminée après déduction du poids de la coupelle d'aluminium en g.l⁻¹.

3.2.2.4 Les méthodes de suivi de l'élimination des sels et acides nucléiques

➤ Suivi des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont difficiles à quantifier notamment dans les milieux complexes. Leur quantification est réalisée pour des solutions pures, par la mesure de l'absorbance à 260 nm. Cependant en milieu complexe, de nombreuses molécules absorbent à 260 nm. La mesure de l'absorbance est donc biaisée. Néanmoins, elle permet tout de même de suivre approximativement l'élimination des acides nucléiques au cours du procédé de purification (méthode de référence de la pharmacopée européenne).

➤ Suivi des sels

Une sonde de mesure de la conductivité est introduite dans les échantillons à quantifier. La valeur de conductivité est déterminée en mS.cm⁻¹ (Radiometer analytical, Villeurbanne, France).

3.3 Les méthodes de séparation de l'AH

3.3.1 Les méthodes d'extraction de la capsule bactérienne

Streptococcus equi subsp. *zooepidemicus* (ATCC® 6580™) est cultivée dans un milieu contenant 0,01 g.l⁻¹ de MnSO₄ (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1 g.l⁻¹ de MgSO₄ (VWR international, Briare, France), 0,1 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 0,5 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,01 g.l⁻¹ CaCl₂ (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), 4,5 g.l⁻¹ de NaC₂H₃O₂.3 H₂O (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 2,5 g.l⁻¹ NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1,6 g.l⁻¹ NaH₂PO₄, H₂O,

3,7 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 30 g.l⁻¹ d'extrait de levure (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 13,8 g.l⁻¹ de peptone de soja (Organotechnie, La Courneuve, France) et 50 g.l⁻¹ de glucose (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). La préculture est réalisée dans un milieu Brain Heart Infusion (BHI) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) puis deux précultures successives sont réalisées dans le même milieu que celui de la conduite du bioréacteur. Lorsque la densité optique est comprise entre 1,7 et 3, le bioréacteur, de 2 l de volume utile (Applikon ADI 1032 stirrer controller, Applikon Biotechnology, France), est inoculé par 100 ml de préculture. Les cultures sont conduites pendant 24 h à pH 7, 37 °C, 0,25 -1 vvm d'airs et 400 tr.mn⁻¹.

Les solutions d'acide trichloractique (ATC) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) et de dodécylsulfate de sodium (SDS) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) sont préparées avec de l'eau osmosée. Les solutions d'ATC sont préparées à des concentrations de 5 %, 10 %, 15 % et 20 % (m/v) et les solutions de SDS à 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % et 1 % (m/v). A 5 ml de milieu de culture, il est ajouté 5 ml d'agent d'extraction. L'ensemble est agité pendant 15 mn à température ambiante. La solution est ensuite filtrée sur filtre de 0,22 µm (Sartorius, Aubagne, France). Les filtrats obtenus par traitement au SDS sont directement quantifiés par CTM. Les filtrats obtenus par traitement à l'ATC sont dialysés pendant 24 h en cassette de seuil de coupure de 10 kDa (slide a lyser dialysis cassette, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) en raison de l'interférence de l'ATC au dosage par CTM. Les échantillons sont ensuite quantifiés par CTM.

3.3.2 Elimination des cellules du milieu de culture

Les cultures microbiennes sont des cultures de *S. zooepidemicus* ayant lieu dans les mêmes conditions que précédemment (§3.3.1).

3.3.2.1 Elimination par microfiltration tangentielle

La microfiltration est réalisée avec une cassette de 50 cm² en polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0,22 µm ou 0,60 µm de seuil de coupure (Millipore, Molsheim, France) placées sur un système de filtration tangentielle (Millipore, Molsheim, France). Le débit d'alimentation est de 36 ml.mn⁻¹, la pression transmembranaire (PTM) de 2,5 bar, le volume de culture de 500 ml. La séparation a lieu à température ambiante. Le flux de perméat est déterminé par empotage et la concentration par CTM.

3.3.2.2 Elimination par filtration frontale

La filtration frontale est réalisée sur un filtre de 0,5 µm en fibre de verre (Zenpure, Nancy, France). La Figure 22 présente le dispositif de filtration frontale. Le passage du milieu de culture à travers le filtre est réalisé par poussée à l'air. La pression de part et d'autre de la membrane est de 2 bar.

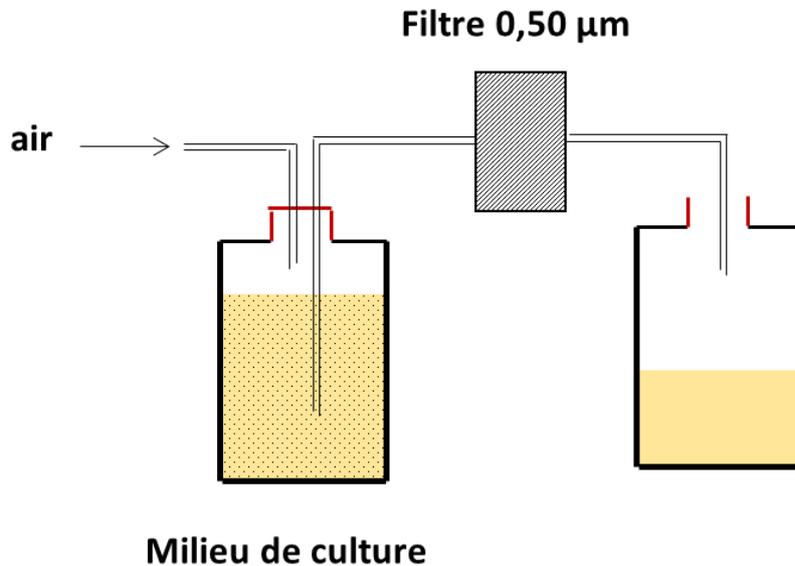


Figure 22. Schéma du dispositif de filtration frontale.

3.3.2.3 Elimination des cellules par filtration sur adjuvant de filtration

Le dispositif de filtration frontale est présenté en **Erreur ! Référence non valide pour un signet.** 5 g de céélite (terre de diatomée) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont dilués dans 40 ml d'eau et sont déposés en couche mince sur une feuille de papier Watman de 9 cm de diamètre (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). La couche formée présente une épaisseur de 2 mm. 50 g de céélite sont introduits par litre de milieu de culture. Le mélange est par la suite filtré sur la couche de céélite. Le filtrat est filtré sur filtre en fibre de verre 0,5 µm pour éliminer les particules de céélite et les cellules résiduelles (Sartorius, Aubagne, France).

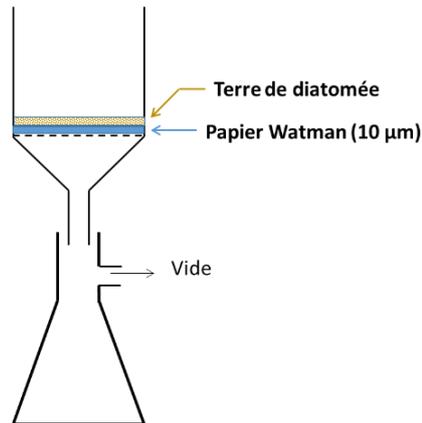


Figure 23. Schéma du dispositif de filtration frontale sur adjuvant de filtration.

3.3.3 Purification de l'AH

3.3.3.1 Ultrafiltration de l'AH

➤ Etude de la sélectivité de taille

0,5 g.l⁻¹ d'AH de 2 MDa et 70 kDa en proportion égale (soit 0,25 g.l⁻¹ d'AH 2 MDa et 0,25 g.l⁻¹ d'AH 70 kDa) est dissous dans de l'eau osmosée pendant 24 h. 200 ml de la solution sont séparés. Le dispositif de séparation est présenté en Figure 24.

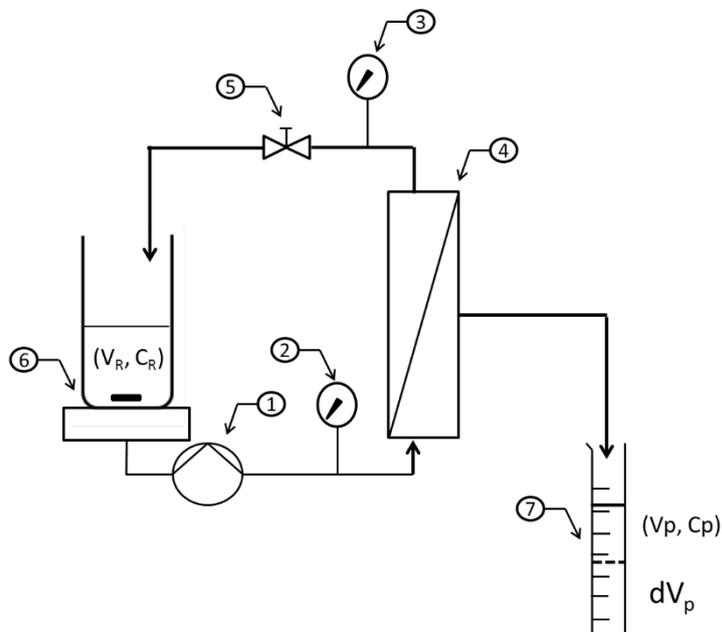


Figure 24. Dispositif de séparation de l'AH par ultrafiltration. (1) Pompe péristaltique, (2-3) manomètre, (4) membrane, (5) vanne de contre pression, (6) agitateur magnétique et (7) éprouvette graduée.

Des membranes de seuil de coupure de 100 kDa et de 1 MDa en polyéthersulfone (PES) (Millipore, Molsheim, France) sont utilisées. La PTM appliquée est de 2,5 bar et le débit d'alimentation de 36 ml.mn⁻¹. Des prélèvements sont réalisés dans le rétentat et le perméat à 5 facteurs de concentration volumique (FCV) (1,1 ; 1,3 ; 1,5 ; 2 et 3). L'étude de l'impact de la force ionique est réalisée par ajout de 1 M de NaCl dans les solutions d'AH et celle du pH par ajustement du pH à 2 par de l'acide sulfurique 5 M.

➤ **Optimisation du flux de perméat par le débit d'alimentation**

1 g d'AH est dissous dans 1 l d'eau osmosée. L'étude de l'impact du débit d'alimentation est réalisée sur quatre tailles d'AH : 1,1 MDa, 2 MDa, 3 MDa et 4 MDa. La PTM est maintenue à 2,5 bar à température ambiante. Les débits d'alimentation évalués sont de 18, 27, 36, 45, 54, 72 et 90 ml.mn⁻¹. La pression maximale d'alimentation tolérée par le système est de 5 bar. 200 ml de solution sont utilisés lors de la séparation. Une recirculation totale de 30 mn est réalisée avant la mesure du débit. Le débit est mesuré par empotage. Des prélèvements dans le perméat et le rétentat sont réalisés et quantifiés.

➤ **« Optimisation » du flux de perméat par la PTM, le seuil de coupure, la taille et la concentration en AH**

Pour l'« optimisation » des conditions d'UF, un plan complet a été utilisé. Un plan d'expériences est réalisé pour chaque seuil de coupure. Deux seuils de coupure sont étudiés : 100 kDa et 1 MDa. Les domaines sont les suivants :

- PTM : 1,5 à 3 bar
- taille : 2 à 4 MDa
- concentration en AH : 0,5 à 1,5 g.l⁻¹.

L'ensemble des expériences réalisées est présenté dans le Tableau 4.

Tableau 4. Expériences constituant le plan complet de l'étude de l'impact de la PTM, de la concentration et de la taille des AH sur le flux de perméat et le taux de rétention.

Numéro d'expériences	PTM (bar)	Taille (MDa)	Concentration (g.l ⁻¹)
1	1,5	2	0,5
2	2,5	2	0,5
3	3,5	2	0,5
4	1,5	3	0,5
5	2,5	3	0,5
6	3,5	3	0,5
7	1,5	4	0,5
8	2,5	4	0,5
9	3,5	4	0,5
10	1,5	2	1
11	2,5	2	1
12	3,5	2	1
13	1,5	3	1
14	2,5	3	1
15	3,5	3	1
16	1,5	4	1
17	2,5	4	1
18	3,5	4	1
19	1,5	2	1,5
20	2,5	2	1,5
21	3,5	2	1,5
22	1,5	3	1,5
23	2,5	3	1,5
24	3,5	3	1,5
25	1,5	4	1,5
26	2,5	4	1,5
27	3,5	4	1,5
28	2,5	3	1

Les solutions sont préparées à 0,5 g.l⁻¹ pour chacune des tailles et sont concentrées par ultrafiltration à 1 g.l⁻¹ et 1,5 g.l⁻¹. Une recirculation de 30 mn est respectée avant la mesure du flux de perméat et des concentrations dans le perméat et le rétentat. La modélisation est réalisée par le logiciel Modde.9 (Umetrics).

3.3.3.2 Diafiltration de l'AH

➤ **Les milieux à séparer**

○ **Milieu semi-synthétique**

Un milieu semi-synthétique est utilisé afin d'établir le model de prédiction de la pureté, du rendement et de la productivité. Il est composé de 1 g.l⁻¹ de MgSO₄, 10 mg.l⁻¹ de MnSO₄, 2,5 g.l⁻¹ de NaHCO₃, 4,5 g.l⁻¹ de NaC₂H₃O₂, 4,5 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 7,75 g.l⁻¹ de Na₂HPO₄, 2,5 g.l⁻¹ de peptone de caséine, 0,5 g.l⁻¹ de glucose, 7,5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 10 mg.l⁻¹ de CaCl₂ et 1 g.l⁻¹ d'AH (2 MDa).

○ **Milieu complexe**

Le milieu complexe est obtenu par culture de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Farrow and Collins (ATCC® 6580™) dans le milieu de composition suivante : 0,5 g.l⁻¹ de MgSO₄, 2 g.l⁻¹ de K₂HPO₄, 2 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g.l⁻¹ de (NH₄)₂PO₄, 50 g.l⁻¹ de glucose, 10 g.l⁻¹ tryptone et 10 g.l⁻¹ d'extrait de levure. Les précultures de la bactérie sont réalisées en trois étapes successives. Les bactéries sont dans un premier temps introduites en milieu BHI. Puis deux cultures successives en milieu de composition similaire à celui utilisé pour la croissance en bioréacteur sont réalisées. Lorsque la densité optique de la préculture est comprise entre 1,7 et 3, le bioréacteur (Applikon ADI 1032 stirrer controller) de 2 L de volume utile est inoculé par 100 ml de préculture. La culture dure 24 h dans les conditions suivantes : pH 7, 37 °C, 0,25 - 1 vvm air, 400 tr.mn⁻¹. En fin de culture les cellules sont directement séparées sur terre de diatomée (§3.3.2.3) et le filtrat est filtré sur une membrane de 0,22 µm de diamètre de pores.

➤ **Conditions opératoires de la diafiltration**

200 ml de chaque solution sont diafiltrés. Le débit d'alimentation est de 36 ml.mn⁻¹ et la PTM appliquée est de 2,5 bar. La séparation à lieu à température ambiante sur une membrane en polyethersulfone (PES) de 100 kDa de seuil de coupure. 30 mn de recirculation totale sont réalisés avant la mise en place de la diafiltration. L'eau est ajoutée progressivement au cours de la diafiltration dans le rétentat à l'aide d'une pompe péristaltique. A chaque diavolume une mesure du débit de perméat par empotage est réalisée et des prélèvements dans le rétentat et le perméat sont effectués.

➤ **Suivi des composés du milieu au cours de la diafiltration et détermination des taux de rétention**

Les protéines sont mesurées par la méthode BCA (§3.2.2.1), les acides nucléiques par mesure de l'absorbance à 260 nm (§3.2.2.4), les sels par mesure de la conductivité (§3.2.2.4), l'AH par la CTM (§3.2.1.1) et la pureté à partir de la matière sèche (rapport : masse d'AH/matière sèche). Les taux de rétention de chaque molécule sont calculés à partir des concentrations mesurées dans le perméat et le rétentat après les 30 mn de recirculation totale en initial de la diafiltration.

➤ **Etude de l'impact des sels sur le flux de perméat**

- **Evolution du flux de perméat en diafiltration**

Afin d'étudier l'impact des sels sur le flux de perméat deux milieux sont étudiés :

- un milieu semi-synthétique constitué de 1 g.l⁻¹ de MgSO₄, 10 mg.l⁻¹ de MnSO₄, 2,5 g.l⁻¹ de NaHCO₃, 4,5 g.l⁻¹ de NaC₂H₃O₂, 4,5 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 7,75 g.l⁻¹ de Na₂HPO₄, 10 mg.l⁻¹ de CaCl₂ et 1 g.l⁻¹ d'HA (2 MDa),
- un milieu contenant de l'AH (2 MDa) à 1 g.l⁻¹ dans de l'eau osmosée.

200 ml de cette solution sont diafiltrés dans les mêmes conditions que précédemment. Les débits de perméat sont mesurés par empotage et comparés au flux en milieu semi-synthétique complet.

- **Calcul des coefficients de transfert**

La détermination du coefficient de transfert ainsi que de la concentration à la membrane est réalisée à partir du milieu contenant la part saline du milieu semi-synthétique. La part saline du milieu sans AH est diluée dans de l'eau osmosée à différents facteurs (0,5, 2, 3 et 10). Pour chaque dilution, trois solutions d'AH sont réalisées :

- 0,5 g.l⁻¹,
- 1 g.l⁻¹,
- 1,5 g.l⁻¹.

200 ml de chaque solution sont ultrafiltrés. Une recirculation totale de 30 mn est réalisée avant chaque mesure. Les coefficients de transfert et la concentration en AH sont déterminés par la méthode des moindres carrés entre le flux de perméat calculé par l'équation du flux limite (équation 19) :

$$J_{\text{stat}} = \frac{D}{\delta} \ln \left(\frac{C_m - C_p}{C_R - C_p} \right)$$

(Equation 19)

3.3.3.3 Identification des contaminants résiduels

Deux milieux ont été utilisés afin d'identifier les éléments des milieux de culture qui peuvent présenter un frein à la purification.

Le **Milieu I** est composée de 1 g.l⁻¹ de MgSO₄, 7 H₂O, 0,01 g.l⁻¹ de MnSO₄, H₂O, 4,5 g.l⁻¹ de NaC₂H₃O₂, 3 H₂O, 2,5 g.l⁻¹ de NaHCO₃, 0,5 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,1 g.l⁻¹ de K₂HPO₄, 3,7 g.l⁻¹ de Na₂HPO₄, 1,6 g.l⁻¹ de NaH₂PO₄, H₂O, 0,05 g.l⁻¹ de CaCl₂, 7,5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 2,5 g.l⁻¹ de peptone de caséine, 50 g.l⁻¹ de glucose et 2,5 g.l⁻¹ de glutamine.

Le **milieu II** est composé de 10 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 10 g.l⁻¹ de peptone de caséine, 2 g.l⁻¹ de KH₂PO₄, 2 g.l⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.l⁻¹ de MgSO₄, 7 H₂O, 0,5 g.l⁻¹ de (NH₄)₂PO₄ et 50 g.l⁻¹ de glucose.

Les deux milieux servent à la culture de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (ATCC® 6580™). Les précultures sont réalisées dans un milieu BHI suivi de deux cultures successives en milieu similaire à celui utilisé pour la conduite du bioréacteur. La durée des précultures est variable et influence la production de l'AH. La totalité de la dernière préculture est utilisée pour inoculer le bioréacteur (Applikon ADI 1032 stirrer controller) de 2 L de volume utile. La culture dure 24 h dans les conditions suivantes : pH 7, 37 °C, 0,25 - 1 vvm air, 400 tr.mn⁻¹.

Les cellules en fin de culture sont éliminées par filtration sur terre de diatomée (§3.3.2.3). Le filtrat est à nouveau filtré sur une membrane en cellulose régénérée 0,22 µm afin d'éliminer les particules de terre de diatomée et les cellules résiduelles. 200 ml du milieu sont diafiltrés par ajout d'eau osmosée dans le rétentat jusqu'à 10 volumes de diafiltration. La séparation a lieu à température ambiante et sur une membrane en PES de 100 kDa de seuil de coupure. La PTM et le débit d'alimentation appliqués sont de 2,5 bar et 36 ml.mn⁻¹ respectivement. En fin de diafiltration, le plomb et le fer sont quantifiés par ICP-OES (§3.2.2.2), l'AH par La CTM (§3.2.1.1), les protéines par BCA (§3.2.2.1) et la pureté est déterminée par matière sèche (§3.2.2.3).

3.3.3.4 Adsorption sur charbon actif

Les caractéristiques des charbons actifs sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques des charbons actifs L3S et ENO-PC.

	L3S	ENO-PC
N2-BET (m².g⁻¹)	980	1750
Origine	Bois de pin	Bois de pin
Nature de l'activation	physique	chimique
Indice de mélasse	215	470
Indice de bleu	15	20
Indice d'iode	970	1200

➤ Etablissement des cinétiques d'adsorption et des isothermes d'adsorption

Le milieu utilisé pour étudier l'adsorption est composé de : 1 g.l⁻¹ de MgSO₄, 7 H₂O, 0,01 g.l⁻¹ MnSO₄, H₂O, 4,5 g.l⁻¹ NaC₂H₃O₂, 3 H₂O, 2,5 g.l⁻¹ NaHCO₃, 1,6 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 3,7 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 0,05 g.l⁻¹ CaCl₂, 7,5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 2,5 g.l⁻¹ peptone de caséine et 1 g.l⁻¹ AH (2 MDa).

○ Cinétiques d'adsorption

1 g.l⁻¹ de charbon actif L3S et ENO-PC est ajouté aux solutions d'AH (Caca Arkema, Parentis-en-Born, France). L'adsorption des protéines et acides nucléiques sont mesurés à 15 mn, 30 mn, 1 h, 1 h 30, 2 h, 4 h et 6 h. L'adsorption est stoppée par élimination du charbon par filtration sur filtre seringue de 0,22 µm de diamètre de pores.

○ Isothermes d'adsorption et influence de la température

Cinq concentrations en charbon actif sont introduites en milieu (1 g.l⁻¹, 2,5 g.l⁻¹, 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹, 15 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹) pour les deux types de charbon actif (L3S et ENO-PC). 2 h d'incubation à 4 °C ou 25 °C sont réalisées. La réaction est stoppée par élimination du charbon actif par filtration.

➤ Influence de l'environnement physico-chimique sur l'adsorption des protéines et des acides nucléiques

Le milieu semi-synthétique est décomposé en deux parties (Tableau 6) afin d'étudier l'effet de la force ionique et du pH sur l'adsorption des acides nucléiques et protéines.

Tableau 6. Décomposition du milieu semi-synthétique en deux parties : les minéraux (A), les peptides/acide aminées et l'AH (B).

Partie A		Partie B	
Concentration (g.l ⁻¹)		Concentration (g.l ⁻¹)	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	1	Extrait de levure	7,5
MnSO ₄ , H ₂ O	0,01	Peptone de caséine	2,5
NaC ₂ H ₃ O ₂ , 3 H ₂ O	4,5	AH (2 MDa)	1
NaHCO ₃	2,5		
KH ₂ PO ₄	1,6		
Na ₂ HPO ₄	3,7		
CaCl ₂	0,05		
AH (1,5 MDa)	1		

Quatre milieux sont formés à partir du mélange des différentes parties du milieu semi-synthétique et de l'ajustement pH (Tableau 7).

Tableau 7. Composition des milieux utilisés dans le cadre de l'étude de l'influence de la force ionique et pH sur l'adsorption des acides nucléiques et protéines.

Milieu	Force ionique	Ajustement du pH	Composition du milieu
I	Elevée	7	A + B
II	Faible	7	B
III	Elevée	4	A + B
IV	Faible	4	B

Pour chacun de ces milieux, une isotherme d'adsorption à 4°C est établie. Cinq concentrations en charbon actif sont introduites en milieu (1 g.l⁻¹, 2,5 g.l⁻¹, 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹, 15 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹) pour les deux types de charbon actif (LS3 et ENO-PC). Après 2 h d'incubation à 4°C, la réaction est stoppée par élimination du charbon actif par filtration. Le séchage de l'AH

3.3.3.5 Lyophilisation

200 ml solution d'AH sont introduits dans une coupelle d'aluminium (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) et congelés à - 20 °C. La coupelle est ensuite introduite en lyophilisateur pendant 48 h (Heto-Holten, Yadevang, Danemark).

3.3.3.6 Précipitation en solvant organique

L'étude de l'influence de la concentration en AH, de la force ionique et du nombre de bains sur la pureté et le rendement de l'AH est réalisée par plan d'expériences. Un plan composite à faces centrées est utilisé. L'ensemble des expériences réalisées est présenté dans le Tableau 8. La surface de réponse est « modélisée » à partir d'un polynôme du second degré.

50 ml d'AH de 2 MDa sont introduits dans un bécher. Le pH est ajusté à 2,5 (+/- 0,3) et 100 ml d'éthanol sont ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante, le mélange eau/éthanol est éliminé à l'aide d'un entonnoir Büchner (étape de précipitation). Le précipité est alors placé dans un bain de 50 ml d'éthanol (96 %) pendant 2 h à température ambiante (étape de lavage). Cette dernière étape est répétée jusqu'à 4 fois (après précipitation de l'AH) afin d'éliminer les sels piégés dans le précipité.

Tableau 8. Ensemble des conditions expérimentales entrant dans la construction du plan d'expériences composite à faces centrées pour l'étude de l'influence de la concentration en AH, de la force ionique et du nombre de bains du précipité sur le rendement et la pureté de l'AH.

Numéro d'expérience	Concentration en AH (g.l ⁻¹)	Force ionique (M)	Bains
1	1	0,1	0
2	3	0,1	0
3	1	0,3	0
4	3	0,3	0
5	1	0,1	4
6	3	0,1	4
7	1	0,3	4
8	3	0,3	4
9	1	0,2	2
10	3	0,2	2
11	2	0,1	2
12	2	0,3	2
13	2	0,2	0
14	2	0,2	4
15	2	0,2	2
16	2	0,2	2

L'AH après précipitation est séché en étuve pendant 24 h à 37°C.

4 RESULTATS ET DISCUSSION

Sommaire de résultats et discussion

4.1	DEVELOPPEMENT DE METHODES ANALYTIQUES.....	75
4.1.1	Quantification de l'AH en milieu complexe par turbidimétrie au bromure de cétyltriméthylammonium.....	76
4.1.1.1	Article : CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form.....	76
4.1.1.2	Contribution de l'article.....	89
4.1.2	Caractérisation de l'AH.....	89
4.1.2.1	Fiabilité de la mesure de la concentration, de la viscosité intrinsèque et de la taille par CES/Multi-détection en fonction de la concentration en AH.....	90
4.1.2.2	Fiabilité des mesures de taille par diffusion de la lumière.....	92
4.1.2.3	Fiabilité de la mesure de la viscosité intrinsèque et implication des coefficients de Mark Houwink lors du calcul de la taille des AH	94
4.2	SEPARATION DE L'AH DU MILIEU DE CULTURE BACTERIEN.....	98
4.2.1	Extraction de l'AH capsulaire.....	98
4.2.1.1	Extraction au SDS.....	98
4.2.1.2	Extraction au TCA.....	99
4.2.2	Élimination des cellules du milieu contenant l'AH.....	99
4.2.2.1	Élimination des cellules par microfiltration tangentielle.....	99
4.2.2.2	Élimination des cellules par filtration frontale.....	103
4.2.2.3	Élimination des cellules par filtration frontale avec adjuvant de filtration.....	103
4.2.3	Purification de l'AH.....	104
4.2.3.1	Purification de l'AH par ultrafiltration.....	105
4.2.3.2	Purification de l'AH par adsorption sur charbon actif.....	139
4.2.4	Séchage de l'AH.....	147
4.2.4.1	Concentration par précipitation en solvant organique de l'AH/Séchage	147
4.2.4.2	Séchage de l'AH par lyophilisation.....	155

Introduction

Le procédé de purification a été divisé en étapes unitaires qui sont développées indépendamment. La mise en place des méthodes d'analyse, sans lesquelles le suivi des performances de purification n'est pas possible, constitue une étude préalable à la purification. Cette étude sera suivie de celle de l'extraction de la capsule bactérienne, puis de celle de la séparation des cellules du milieu contenant l'AH. Pour finir, l'élimination des éléments nutritifs du milieu ayant servi à la croissance microbienne sera réalisée afin d'obtenir un AH pur qui sera ensuite déshydraté.

4.1 Développement de méthodes analytiques

Les méthodes de quantification sont indispensables à l'élaboration et à l'optimisation du procédé de purification. Elles permettent la détermination des paramètres clés tels le rendement, la productivité ou encore la taille des molécules d'AH. Les méthodes de quantification doivent être fonctionnelles dans un milieu de culture microbien complexe contenant des protéines, des acides nucléiques, des sels et de l'AH.

Dans cette étude, les méthodes de référence de la pharmacopée européenne sont celles qui sont préférentiellement utilisées. Le suivi des acides nucléiques au cours du procédé sera alors réalisé par mesure de l'absorbance à 260 nm. Cependant, les méthodes de référence sont parfois peu adaptées aux milieux de culture microbiens qui présentent de nombreuses molécules interférentes ou sont des méthodes moins précises que des méthodes développées plus récemment.

L'absorption atomique (AA) a donc été remplacée par la spectrométrie d'émission par plasma à spectrométrie d'émission optique (ICP –OES) pour quantifier le fer et le plomb, qui est une méthode plus sensible et plus précise. La quantification des protéines est réalisée par la méthode de Biuret qui est plus adaptée au milieu riche en protéines et le suivi du chlore est réalisé par mesure de conductivité pour garantir l'élimination du chlore mais également des minéraux du milieu de culture microbienne au cours du procédé de purification. La quantification de l'AH par la méthode de référence n'est pas envisageable en raison des interférents, de nature osidique, contenu dans les milieux complexes. La méthode turbidimétrique au bromure de cetyltriméthylammonium (CTM) a donc été développée pour la quantification de l'AH en milieu complexe. La détermination des différentes tailles d'AH dans un mélange n'est pas possible par la méthode de référence. En conséquence, la chromatographie d'exclusion stérique associée à un module de multi-détection (CES/Multi-détection) a été mise en place.

La première partie de ce travail expose le développement de deux méthodes de quantification / caractérisation : la méthode turbidimétrique au bromure de cetyltriméthylammonium (CTM) et la

chromatographie d'exclusion stérique associée à un module de multi-détection (CES/Multi-détection).

4.1.1 Quantification de l'AH en milieu complexe par turbidimétrie au bromure de cétyltriméthylammonium

4.1.1.1 Article : CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form.

Carbohydrate Polymers (2014) volume 112: pages 102- 108. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.05.039.

Nadia Oueslati Pierrick Leblanc, Christelle Harscoat-Schiavo, Emmanuel Rondags, Stéphane Meunier, Romain Kapel and Ivan Marc.

Keywords: Hyaluronic acid, Cetyltrimethylammonium bromide, Carbazole, Analytical method.

Abstract

The cetyltrimethylammonium bromide turbidimetric method (CTM) has been developed to quantify the hyaluronic acid (HA) in complex media to overcome the lack of selectivity and specificity of the standard carbazole method. The objective of this work is to assess the potential application of CTM to determine HA concentration. Factors such as duration of incubation, linearity range, HA size and form (natural linear HA or cross linked HA), pH and ionic environment impact were investigated. The incubation time was set to 10 min and the calibration curve was linear up to 0.6 g.L⁻¹. The quantitative method was relevant whatever the HA size and form, and also for a wide range of conditions. The robustness of the CTM added to its high specificity and simplicity demonstrated that the CTM is a valuable method that would be an interesting substitute to the carbazole assay for HA quantification.

➤ **Introduction**

Hyaluronic acid (HA) is a linear and unbranched mucopolysaccharide, composed of N-acetylglucosamine and glucuronic acid joined alternately by $\beta(1-3)$ and $\beta(1-4)$ glycoside bonds. This molecule exhibits a wide range of molecular weights between ten thousand Da and several million Da. HA is abundant in the synovial fluid of articulation joints and in the intercellular space of the epidermis. It plays many physiological functions, notably in cell proliferation and differentiation. Furthermore, its rheological properties make HA an attractive biomaterial for medical-related applications like pharmacology and drug delivery, orthopedic surgery and rheumatology, dermatology and plastic surgery, ophthalmology and otolaryngology (Kogan et al., 2007).

For biomedical applications, at first, HA was extracted and purified from rooster combs. Nowadays, HA production by microbial culture is preferred since it allows the standardization of molar mass distribution (Huang et al., 2008a; Kim et al., 2006; Shiedlin et al., 2004; Yamada et Kawasaki, 2005). After the microbial culture step, HA has to be separated from cells and purified from the various molecules composing the complex culture medium. To do so, tangential flow filtration (micro- and ultra-filtration) (Carlono et Magnette, 2000; Zhou et al., 2006), ethanol (Pires et al., 2010) or isopropanol (Reddy et al., 2011) precipitation are often used. Then, HA can be further processed by chemical cross-linking (for rheological properties improvement) (Jeon et al., 2007) or heat treatment (for sterilization). In this context, the quantification of HA in complex and variable mixtures or under different reticulation states is a current issue.

The conventional method for quantifying HA is the so-called carbazole method (Bitter & Muir, 1962; Cesaretti et al., 2003). The principle of this method lies on a full hydrolysis of HA, a conversion of released monosaccharides into furfural derivatives (under highly acidic conditions and temperature of 95 °C) and a chemical complexation with carbazole reactant to form a violet chromophore that can be assayed by spectrophotometry. However, to be applicable, the carbazole method requires the HA solution to be pure since any other ose or oside (like glucose or sucrose) present in solution would also react and strongly interfere with the assay (Chen et al. 2009; Pires et Santana, 2010; Song et al., 2009). Other quantification methods include Gel Permeation Chromatography - Light Scattering - Refractive Index (GPC-LS- RI), which is difficult to perform in complex media because of many operating problems occurring, such as the seal of the chromatography column or the RI signal interference. As a consequence, this method is usually not convenient to follow HA production in microbial culture broth or HA quantification along the purification process. Taken as a whole, this led us to focus on the development of an alternative method for HA quantification.

It is well known that polyanionic polymers (like HA) are precipitated by organic ammonium cations such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) or hexadecyltrimethylammonium chloride (HTMACl). The turbidity resulting from the precipitation is related to polymer concentration and can be titrated by spectrophotometry. Interesting results for HA quantification were obtained with CTAB (J. E. Scott 1960). The CTAB Turbidimetric Method (CTM) was even demonstrated to be more accurate, sensitive and specific than the carbazole method (Chen et Wang, 2009; Song et al., 2009). Thanks to its high specificity, CTM allows HA quantification from microbial broth directly. Consequently, this makes CTM a possible and convenient alternative to carbazole assay. However, further investigation on the impact of the environment of HA, its molecular weight or its reticulation state on CTM assay has to be carried out in order to broaden the possibility of use of the assay and to assess its robustness. This study investigates the effect of HA environment (pH, ionic strength and microbial culture media), HA form (butanediol-diglycidyl ether cross-linked or linear HA) and size, assay incubation duration and the linearity range on the CTM assay.

➤ **Material and methods**

○ **Material**

Freeze-dried HA (70 kDa, 0.5 MDa, 2 MDa and 4 MDa) were obtained from HLT biotechnology (Javene, France). Cross-linked HA came from Teoxane laboratories (Geneva, Switzerland). CTAB, carbazole, Brain Heart Infusion (BHI) and hyaluronidase (HAase) were purchased from Sigma Corporation (St-Quentin Fallavier, France). Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , H_2SO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, KCl, NaCl and NaOH were purchased from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France).

○ **Methods**

✓ **Carbazole method**

According to the method reported by (Kosakai et Yosizawa 1979), 1 ml of HA solution was introduced into glass tubes filled with 5 ml of 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ in H_2SO_4 . The tubes were incubated for 15 min at 95 °C, then cooled in ice for 2 min. 200 μl of 0.125 % (w/v) carbazole in absolute ethanol were introduced and the tubes were incubated for 15 min at 95 °C. After cooling, the absorbance was read at 550 nm (spectrophotometer Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). The equation of the standard curve used to determine the HA concentration was: Absorbance = 6.2 [HA] with HA concentration in $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (equation obtained experimentally). Each assay was performed in triplicate.

✓ **GPC-LS – RI method**

50 µl of HA solution at 0.5 g.l⁻¹ were injected into a GPC-LS-RI apparatus (Malvern, Orsay, France). The GPC-LS-RI apparatus was constituted of a pre-column, two columns (A6000M and A7000, Malvern) connected in series, a light scattering (LS) detector and a Refractive Index (RI) detector. The eluent was phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄) pH 7.4 at a flow rate of 0.35 ml.min⁻¹. The universal calibration was performed with PEO-19kD (Malvern). The Dn/Dc used to determine the HA concentration was 0.147 ml.g⁻¹ (experimentally determined value).

✓ **CTM Assay**

The CTAB reagent (2.5 g) was dissolved in 100 mL of 2 % (w/v) NaOH according to (Di Ferrante 1956). 50 µl of HA standard solutions were introduced into 96 well plates filled with 50 µl of 0.1 M phosphate buffer pH 7. The plates were incubated at 37 °C for 15 min in the UV-VIS spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific, Gometz-le-Châtel, France). Then, 100 µl of CTM reagent at 37 °C were added to each well and the plate was incubated for 10 min at 37 °C. The plate was shaken for 10 s at the beginning and at the end of this incubation. Absorbance was read at 600 nm against the blank (HA solution replaced by 0.1 M phosphate buffer pH 7) and plotted against HA concentrations. The slope of the standard curve was obtained by the linear regression for HA concentration range between 0 and 0.6 g.l⁻¹ (concentration over which the curve was no longer linear).

✓ **Quantification of cross linked HA**

1 g of butanediol-diglycidyl ether cross-linked HA (BDDE-cross-linked HA) gel was dissolved in 20 ml 0.1 M phosphate buffer pH 7 under sonication (10 cycles of 30 s at 22 W) (Vibra-cell Ultrasonic Processor, Sonics & Materials, France). Then, the HA solution was further diluted in 50 mL final volume in 0.1 M phosphate buffer pH 7. The solution was quantified by CTM, the carbazole method and the GPC-LS-RI method.

➤ **Results and discussion**

○ **CTM assay for solubilized microbial HA**

✓ **Kinetic stability**

In order to assess the impact of incubation duration in the presence of the CTM on the quantification method, assays were performed with various durations. 2 MDa HA was chosen to represent the HA size range. Indeed, HA mostly produced by microbial culture presents molecular weights from 70 kDa

to 6 MDa (Im et al. 2009). Solutions with 2 MDa HA in 0.1 M phosphate buffer were used at concentrations ranging from 0 to 0.6 g.L⁻¹. Absorbance at 600 nm was automatically measured every minute for 1 hour. These are reported in Figure 25A. The absorbance is due to the turbidity induced by the formation of HA/CTAB precipitate occurring in the course of the reaction. Figure 25A shows that absorbance increases in the very first moments of the reaction (before 5 min) then slowly decreases. This variation with time is more noticeable for the highest HA concentrations. The HA precipitation triggered by CTAB probably results from an intermolecular association and dissociation reaction. The very slow decreasing of absorbance after 50 min, obviously going on after 60 min (since non constant value was reached) indicated that the equilibrium between association and dissociation was probably not reached even after 60 min incubation. Then, the HA/CTAB precipitate formed is not very stable. From the absorbance values displayed in Figure 25A, the slope of the HA standard curves were calculated and plotted as a function of the CTM reaction duration (Figure 25B). As expected, the slope values clearly decrease from 5 to 60 min duration meaning that the sensitivity of the assay is optimal for a low duration of reaction (between 0 and 5 min). However, in this duration range, the precipitates are the most unstable and too short a duration might lead to manipulation issues. Thus, the reaction duration for the protocol was arbitrarily set to 10 minutes in order to balance sensitivity and ease to handle the reaction duration.

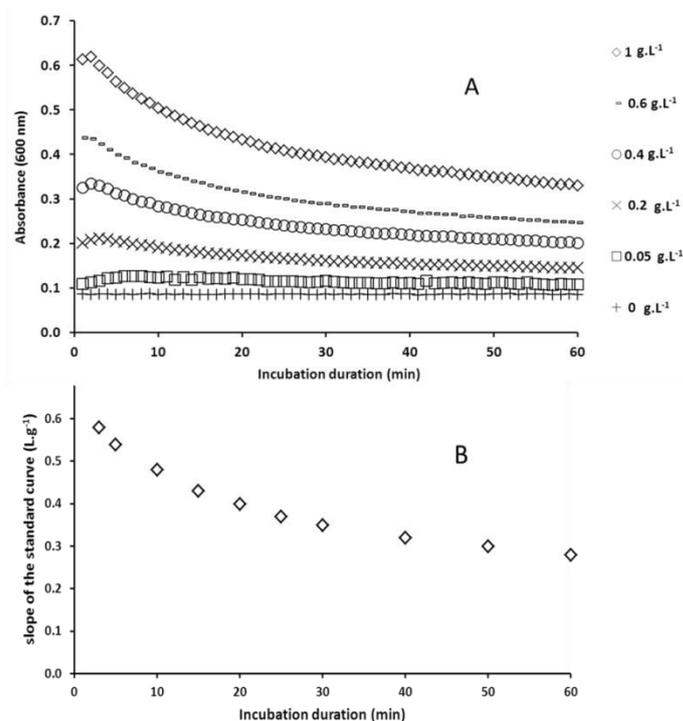


Figure 25. (A) Effect of the reaction duration on CTM sensitivity: evolution of absorbance at 600 nm at various HA concentrations. (B) Slope of the standard curves plotted versus incubation time.

✓ **Linearity range**

The next step of the study was to determine the range of concentrations for which the assay was valid. 2 MDa HA was assayed at concentration ranging from 0 to 1 g.l⁻¹ in 0.1 M phosphate buffer pH 7 in order to check the linearity range of the standard curve (Figure 26A). Linear regressions were drawn using four sets of concentration (0 g.l⁻¹ to 0.5, 0.6, 0.8 and 1 g.l⁻¹). Correlation coefficients (R²) of the regressions are presented in Figure 26B. R² value is satisfactory and constant up to 0.6 g.l⁻¹, and it decreases as the highest HA concentration increases. This is a particularly good result since a previous study showed a good linearity only up to 0.16 g.l⁻¹ (Chen et Wang, 2009).

The lack of linearity observed beyond 0.6 g.l⁻¹ can be due either to a poor mixing efficiency caused by increase of sample viscosity at high HA concentration or to a saturation of CTAB by HA. The slope of HA assay (from 0 to 0.6 g.l⁻¹) in the conditions of Figure 25 (using a 10 s shaking duration) was 0.49 l.g⁻¹ (R² = 0.990). The same experiment was carried out using a shaking duration of 20 s (data not shown). In these conditions, the slope observed was 0.50 l.g⁻¹ (R² = 0.980). The weak influence of shaking tends to demonstrate that the problem of linearity at high HA concentration is not due to a lack of mixing efficiency.

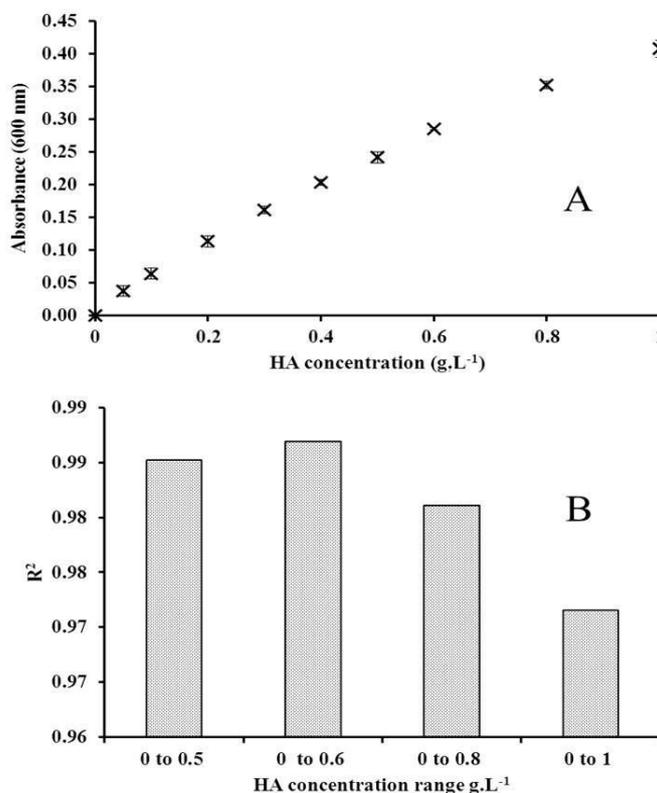


Figure 26. (A) Absorbance of CTM assays in relation to HA concentration. (B) R² of the standard curve established for various HA concentration ranges. 2 MDa HA was used. The incubation duration prior absorbance measurement was 10 min.

✓ **Impact of HA size**

The first part of this study concerning (i) the influence of the incubation duration and (ii) the linearity range assessment was performed using HA with a 2 MDa molecular weight. The following step of the study focused on the influence of the HA size on the CTM method. The slope values of CTM standard curves established for HA concentration between 0 and 0.6 g.l⁻¹ with molecular weights of 70 kDa, 0.5 MDa, 2 MDa and 4 MDa were close to 0.50 l.g⁻¹ with regression coefficients of 0.99 (Figure 27). Accordingly, the HA size did not affect the CTM. This result appeared surprising. Indeed, a reinforcement of HA-CTAB interactions would be expected with a high molecular size HA since more negative charges would be exposed at the surface of the polymer. As a consequence, larger complexes should be formed impacting the precipitation reaction. The secondary and tertiary structures of HA in aqueous solution proposed by (Scott et al., 1991) might explain this absence of size dependence. According to these authors, in aqueous solution, the HA would constitute a complex network of interwoven polymer chains. So, as a matter of fact, the CTAB reaction would most likely occur with pieces of HA network rather than with individual HA molecules, thus limiting the effect of the polymer molecular weight on CTM. This result proved to be particularly interesting since it indicates that the standard curve established with a particular HA molecular weight will apply for assaying HA in a wide range of molecular size.

Furthermore, the constant slope and R² values shown whatever the molecular weight of HA sample confirm that the shaking conditions used provide an efficient mixing and tends to confirm that the lack of linearity observed in Figure 26 is not related to the sample viscosity.

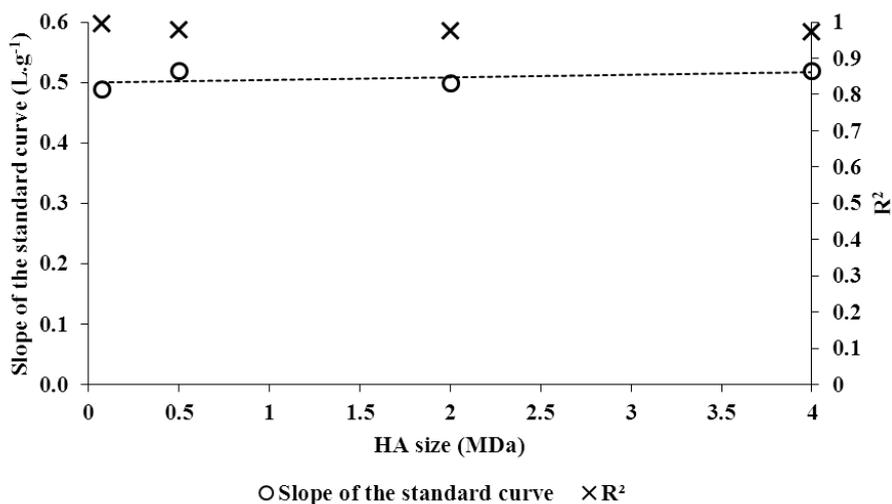


Figure 27. Impact of HA size on the HA quantification by CTM. The regression coefficients (R²) and the slope of the standard curves were plotted against the HA size.

✓ **Effect of the HA sample environment on CTM**

HA can be found in many different environments: in the microbial culture medium of HA production, in solution with various salinities or pH during the purification steps, or in pure water. The following study investigates the robustness of the assay for various HA solutions.

- Effect of sample pH

The pH of the final solution (after all reactants were added) needs to be high enough to achieve precipitation of the HA. Indeed, carboxylic acid functions of glucuronic acids must be in a negatively charged form. Thus, if the added reagents do not buffer the HA sample enough, alterations of the assay might occur. The impact of sample pH was then investigated. 2 MDa HA samples (from 0 to 0.6 g.l⁻¹) were adjusted either at pH 2 and at 4 (using 1 M H₂SO₄) or at pH 8 and at 10 (by 5 M NaOH) prior to the addition of assay reagents. Figure 28 clearly shows that the slopes of the standard curves obtained for the various pH samples are constant, indicating that the assay conditions guarantee a high enough pH to allow a precise quantification whatever the HA sample pH. This can be due either to the presence of NaOH or phosphate buffer in CTM reactants. The same set of experiments was achieved without adding NaOH in the CTM reactant (data not shown). In this case, slopes obtained for HA samples with pH ranging from 4 to 10 were all close to 0.5 l.g⁻¹ while no HA-CTAB precipitation occurred with pH 2 samples. So, when the sample pH value is equal to or higher than 4, the overall pH solution is high enough to allow precipitation. This is not the case for samples whose pH values stand below 4: NaOH in the reagent is therefore needed to achieve the precipitation.

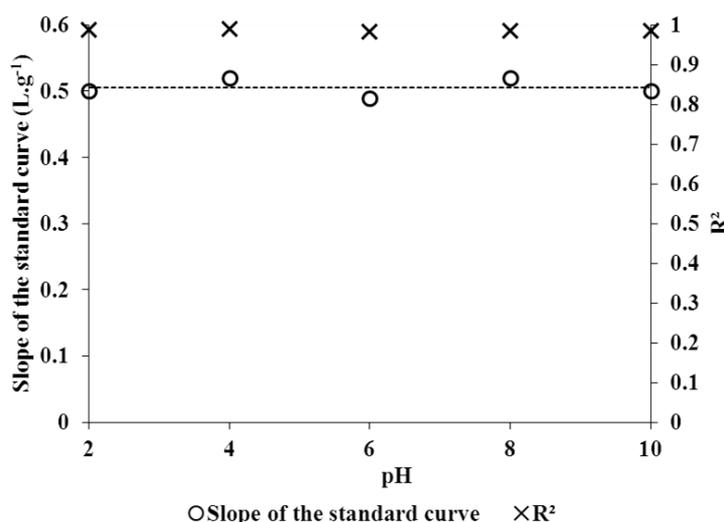


Figure 28. No pH effect on the CTM sensitivity. The standard curves and regression coefficients were established with 2 MDa HA solutions in 0.1 M phosphate buffer. pH was adjusted by NaOH or H₂SO₄.

The study of the pH impact confirmed that the interaction between HA and CTAB is an ionic interaction. As a consequence, it might be dependent on the ionic strength.

- Effect of sample salt content

To study the effect of the salt environment on the assay, HA samples were adjusted to KCl concentrations ranging from 0 to 0.50 M. Figure 29 exhibits the evolution of standard curve slopes obtained as a function of KCl concentration. This figure shows a linear decrease in slopes with increasing KCl concentrations. After regression, the following equation between KCl concentration in sample and CTM HA standard curve slope was proposed:

$$\text{Slope of standard curve} = - 0.93 [\text{Chloride ion concentration (M)}] + 0.51 \quad (\text{Equation 35})$$

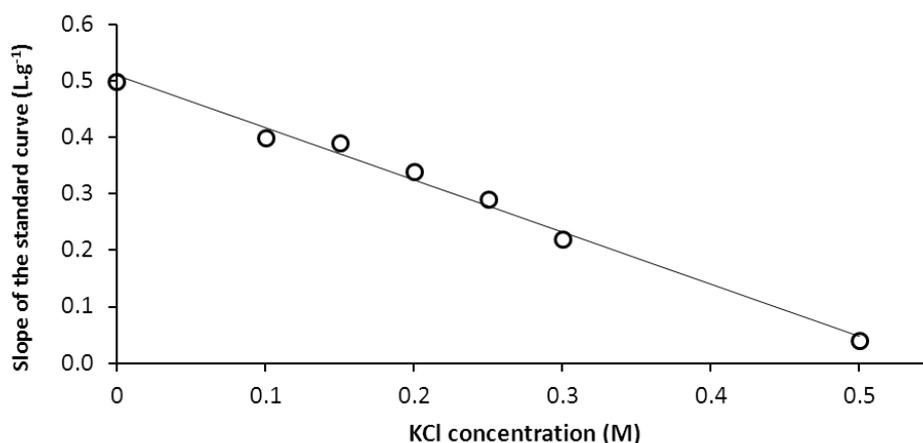


Figure 29. Impact of KCl concentration on the slope of the standard curve established by CTM. KCl was added to HA solution to obtain KCl final concentration between 0 and 0.5 M. The standard curve was established for each KCl concentration and the slope is plotted.

This phenomenon could result from a negative influence of the overall ionic strength on HA-CTAB association constant or a direct competition of chloride anion with HA for CTAB interaction. Figure 30 exhibits assay curve slopes obtained with HA samples in phosphate buffer, NaCl or KCl with 0.3 M of ionic strength. It reveals that modifying ionic strength through phosphate addition has no effect whereas increasing ionic strength through KCl or NaCl addition induces a significant slope decrease. The decrease with Na or K as counter ion is of the same extent when the anion used is Cl⁻. The observed salt interference is thus probably related to the chloride anion. This could explain why when regarding the use of CTAB in the field of carbohydrate purification, carbohydrate – CTAB is usually dissolved by chlorinated salts (mainly CaCl₂ and NaCl) (Anderson & Smith, 1977; Bartoloni et al., 1995).

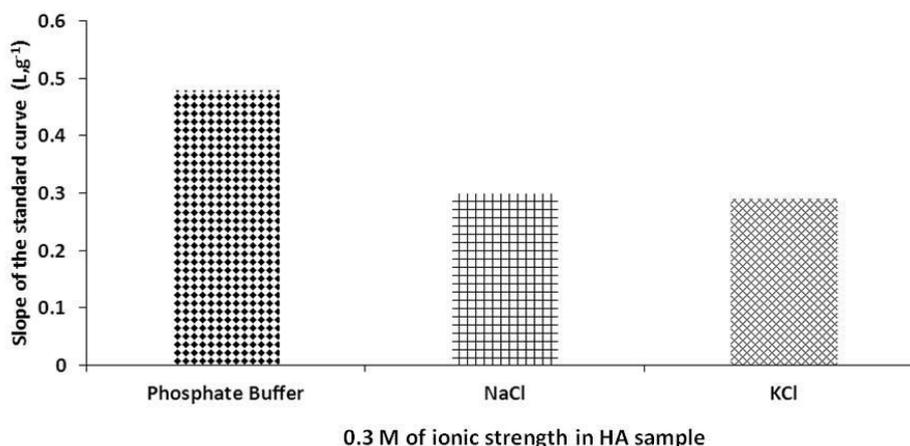


Figure 30. Competition of chloride anion with HA for CTAB interaction. The slope of the standard curve of 2 MDa HA in 0.3 M of ionic strength of phosphate buffer was compared to the standard curves at 0.3 M of ionic strength obtained by addition of NaCl and KCl.

- Effect of a complex biochemical environment

Standard curves of 2 MDa HA (from 0 to 0.6 g.l⁻¹) in 0.1 M phosphate buffer pH 7 and in Brain Heart Infusion (BHI) were compared (Figure 31A). BHI is a complex mixture commonly used as culture medium for microbial cultures. It is composed of proteins, peptides, amino acids, glucose and salts. HA standard curve in BHI (pH 7) remains linear up to 0.6 g.l⁻¹, indicating that CTM can be used for direct HA quantification in samples from production or purification steps. The observed slope is lower in BHI than in phosphate buffer. So, BHI matrix modified the assay by limiting HA-CTAB aggregate formation though. BHI contains many different biomolecules (like peptides, amino acids, nucleic acids, etc.) and is rather rich in salts which were demonstrated to influence the CTM. According to the manufacturer, the concentration of NaCl in BHI is 0.125 M. Equation 36 was used to calculate the slope of HA standard curve in phosphate buffer at the corresponding concentration of NaCl. From the calculated slope (0.4 l.g⁻¹), absorbances of CTM assay at HA concentration from 0 to 0.6 g.l⁻¹ were added to Figure 31A, named “theoretical BHI”. They are very close to the actual values from HA in BHI. This indicates that the main effect of BHI complex environment is coming from its salt content. Other biomolecules composing this medium probably have no or minor influence, confirming previous observations (Song et al., 2009).

The spectrophotometric method commonly used to quantify HA in solution is the so-called carbazole method. The standard curves of 2 MDa HA in phosphate buffer and BHI obtained with the carbazole method are presented in Figure 31B. As expected, the carbazole method is perfectly efficient to quantify HA when using phosphate buffer. Its sensitivity is even higher than that of the CTM. However, in BHI, a saturation of the spectrophotometer occurs in every HA concentration preventing

any use of the method in such media. The carbazole method is based on (i) a full hydrolysis of HA into free carbohydrates (glucuronic acid and N-acetyl glucosamine) under a strong acidic condition and high temperature, (ii) a conversion of these free carbohydrates into hydroxymethylfurfural compounds and (iii) a combination of the compound yielded from glucuronic acid to produce a chromophore quantified by spectrophotometry. However, the last step is poorly specific and many hydroxymethyl furfural obtained from other carbohydrates (with 6 carbons) may interfere. The high content in free sugars (and particularly glucose) in BHI or other culture media prevent the use of the carbazole method for HA quantification in complex environment.

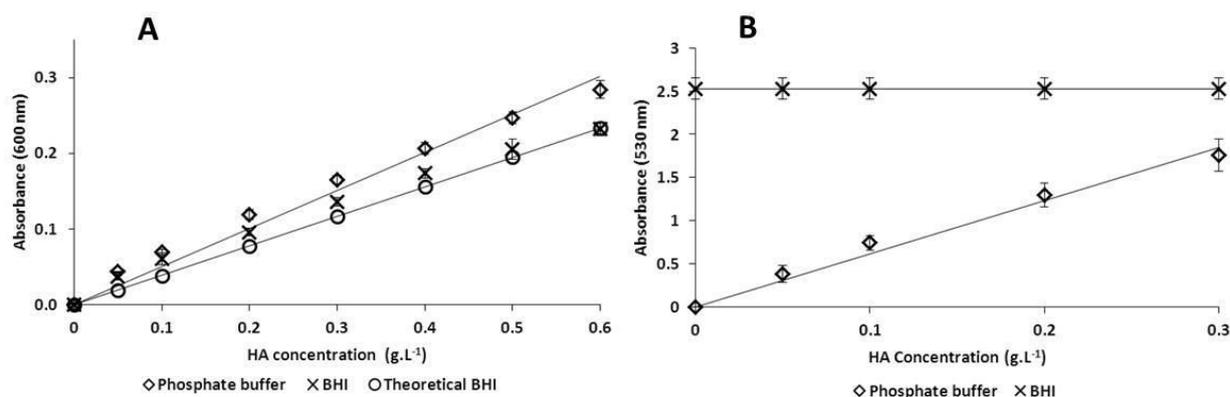


Figure 31. CTM (A) and carbazole method for assaying HA in phosphate buffer (◇) and BHI (×). Standard curve obtained from equation 35 using 0.125 M NaCl is also displayed (○).

○ **Assessment of the CTM accuracy for the quantification of BDDE-cross-linked HA**

The cross-linking of HA by BDDE helps to tailor the mechanical properties and the degradation rates (Jeon et al., 2007; Schanté et al., 2011). This specificity is mostly used in the treatment of osteoarthritis of the knee or for wrinkle fillers. The following study focuses on the quantification of cross linked HA. This last HA form leads to aggregates in solution. And then, it has to be partially degraded by sonication to obtain a homogeneous solution. Cross-linked HA treated by sonication was quantified simultaneously by the CTM, the GPC-LS-RI and the carbazole methods. The chromatogram shown in Figure 31 was obtained by GPC-LS-RI. The right angle light scattering (green curve) and the low angle light scattering (black curve) were used to calculate the size of the HA for each elution volume by the Zimm equation (black “linear” curve). The mean value of sizes was 980 kDa. Thus, a sonication treatment degraded the reticulated HA but its final size remained high enough (include into 70 kDa and 4 MDa) to be assayed by the CTM. The cross-linked HA concentration determined by the refractive index (red curve; $D_n/D_c = 0.147$) was 25 mg.g⁻¹ (Figure 32). When assessed by the carbazole method and the CTM, the cross-linked HA concentration was 26 mg.g⁻¹. The three methods

gave similar results. Then, the sonication of HA did not hinder its quantification. The CTM was thus efficient for the quantification of cross-linked HA.

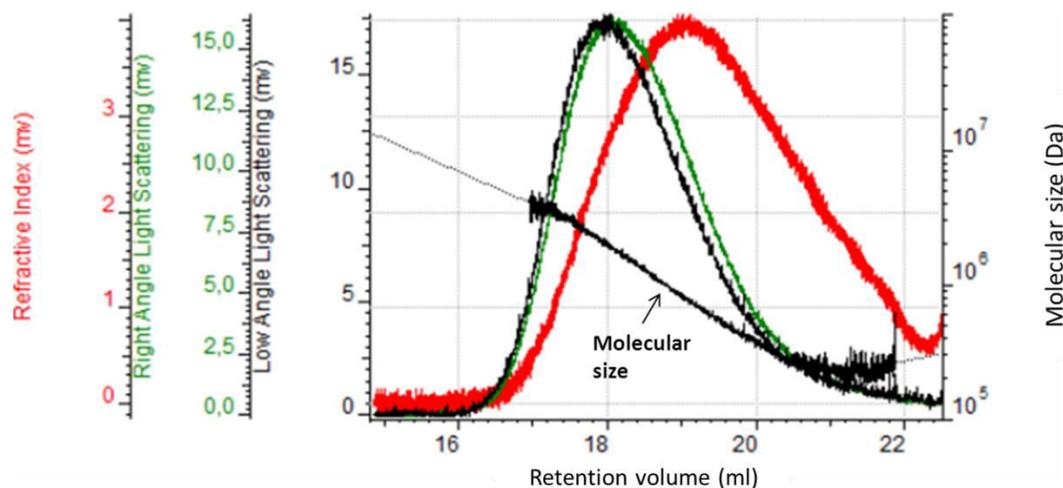


Figure 32. GPC-LS-RI chromatogram of cross-linked HA degraded by sonication. Elution was performed by phosphate buffered saline at a flow rate of $0.35 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. D_n/D_c used to calculate the HA concentration was 0.147. PEO 19k universal calibration was used to determine the HA size. Average HA size calculated was 980 kDa.

Conclusion

The HA quantification is classically performed by using the carbazole method to determine HA concentrations. But this method presents many drawbacks, particularly a low specificity and, a time consuming experimental procedure. Moreover, its set up is dangerous because of the use of sulfuric acid. Based on the formation of a complex between HA and CTAB, the CTM is an alternative method that proved to be highly specific and safer. Previous studies on the CTM were rather limited, therefore the purpose of this study was to complete them and particularly to determine the limits of its application in terms of incubation duration, linearity range, HA size and form (natural linear HA or BDDE-cross-linked HA), and environment. The turbidity evolution with time was noticed and a compromise between sensitivity and handling issues led to set the incubation duration to 10 min. The CTM led to a linear curve in the HA concentration range of $0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ to $0.6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. It was not dependent on the HA size from 70 kDa to 4 MDa. Chloride ions interfered with the CTM reagent but when the chloride ion concentration was known, the slope of the standard curve could be determined and used to quantify HA concentrations. The CTM proved to be very robust in a fermentation medium and with the modifications of solution pH and/or ionic strength. All the results showed that the CTM was stable in a wide range of conditions. As a consequence, the CTM could be used to follow the HA concentration during a microbial process but also in all downstream processes and after BDDE-cross-linking. In view of these results, the CTM constitutes an alternative to the

conventional carbazole method. In addition, CTAB may react with other capsular polysaccharides. (Anderson et Smith 1977) and (Bartoloni et al. 1995) purified a bacterial capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* by CTAB. Accordingly, the CTM should be a simple method to determine the concentration of various bacterial capsular polysaccharides.

4.1.1.2 Contribution de l'article

Les résultats de cet article montrent que la CTM est une méthode appropriée à la quantification de l'AH en milieu complexe. La réponse est linéaire pour des concentrations comprises entre 0 et 0,6 g.l⁻¹ alors qu'elle n'est comprise qu'entre 0 à 0,3 g.l⁻¹ pour la méthode au carbazole (pharmacopée européenne). La méthode n'est pas sensible aux composés du milieu de culture à l'exception des ions chlorure. Cependant, s'affranchir de cette interférence est aisément réalisable lorsque la concentration en chlorure est inférieure à 0,3 M. De plus, la CTM est une méthode rapide, de faible consommation en réactifs et en échantillon (50 µl), et dont les réactifs sont moins dangereux que ceux de la méthode au carbazole. La CTM est alors une méthode qui est incontestablement plus adaptée à la quantification de l'AH. Le suivi de l'AH au cours des étapes du procédé de purification sera réalisé par cette méthode.

4.1.2 Caractérisation de l'AH

La méthode de référence pour évaluer la taille d'AH repose sur une mesure de la viscosité intrinsèque étant liée à la taille par l'équation de Mark Houwink (équation 4). Cette méthode de la pharmacopée européenne présente toutefois des limitations pour l'estimation rapide de la taille d'AH au cours d'un procédé de production ou de purification. En particulier, les coefficients de la corrélation de Mark Houwink dépendent de l'environnement chimique de l'AH. Or, l'environnement de l'AH dans le milieu de production ou de purification n'est pas contrôlé. D'autre part, les coefficients de Mark Houwink sont des approximations qui dépendent de la taille moyenne d'AH en solution. Cependant, les différentes populations de tailles au sein d'un échantillon ne sont pas connues au préalable. La CES/multi-détection est une méthode alternative indispensable au suivi des caractéristiques de l'AH au cours du procédé de purification.

Celle-ci est une méthode de mesure directe de la répartition des tailles moléculaires (Mw et polydispersité). Elle permet, également, une mesure simultanée de viscosité intrinsèque (VI) et un dosage d'AH en solution. La mesure de concentration en AH par réfractométrie est indispensable à la détermination de toutes les caractéristiques de l'AH (taille, polydispersité et VI). Sa fiabilité est prépondérante. C'est pourquoi elle a été évaluée.

La mesure de la taille par diffusion de la lumière est une mesure directe, elle devrait donc être plus fiable que la détermination de la taille par la seule mesure de la viscosité intrinsèque. Les études suivantes permettront également de statuer sur la méthode aux meilleures performances.

4.1.2.1 Fiabilité de la mesure de la concentration, de la viscosité intrinsèque et de la taille par CES/Multi-détection en fonction de la concentration en AH

La fiabilité des mesures des différentes caractéristiques de l'AH (taille, polydispersité et VI) en CES/Multi-détection dépend de la concentration. En effet, la concentration en AH intervient dans le calcul de toutes ces caractéristiques. Le domaine de concentrations d'AH permettant une quantification fiable de l'AH a donc été établie.

Le signal du réfractomètre en ligne de l'élution est transformé en concentration par l'équation 5. Puis, son intégration permet d'établir la concentration de l'échantillon.

$$RI = K(RI) \times \frac{dn}{dc} \times C \quad (\text{Equation 5})$$

Avec $K(RI)$: les constantes instrumentales, C : la concentration du polymère en solution (g.ml^{-1}) et dn/dc : l'incrément d'indice de réfraction spécifique ($0,147 \text{ ml.g}^{-1}$).

Du fait de sa viscosité élevée, la concentration de départ ne peut pas excéder 1 g.l^{-1} sans occasionner un colmatage important des colonnes de séparation. Un AH de 2 MDa et de $VI = 21,6 \text{ dl.g}^{-1}$ à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 g.l^{-1} est donc injecté et analysé en CES/multi-détection. Les mesures sont réalisées en triplicat. La Figure 33 montre les chromatogrammes obtenus pour chaque concentration d'AH. Plus la concentration en AH est importante, plus l'indice de réfractométrie est important. De plus, un décalage du sommet des pics vers les faibles tailles d'AH (volume de rétention élevée) est observé pour des concentrations élevées en AH, ce qui indique une probable diminution de la taille avec la concentration en AH.

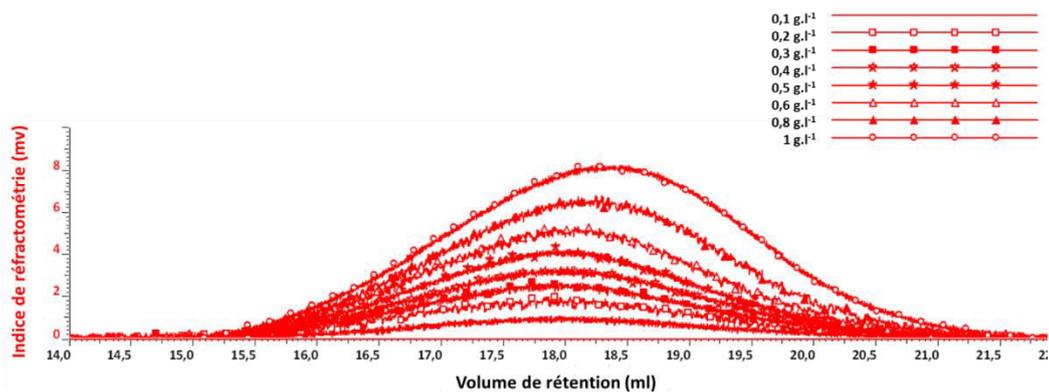


Figure 33. Chromatogramme de CES/Réfractométrie d'AH (2 MDa) injecté à des concentrations comprises entre 0 et 1 g.l⁻¹. 50 µl de chaque solution sont injectés.

Après intégration de chaque pic, les concentrations mesurées par CES/réfractométrie sont comparées aux concentrations mesurées par CTM (Tableau 9). L'écart entre ces deux mesures n'excède pas 5 %. Ainsi, la mesure de concentration par réfractométrie peut être considérée comme fiable quelle que soit la concentration d'AH.

La mesure de concentration étant fiable, les mesures de la taille par diffusion de la lumière (DL) et de la viscosité intrinsèque par viscosimétrie devrait l'être également. Les mesures de taille et de VI sont également présentées dans le Tableau 9. Pour des concentrations en AH inférieures à 0,5 g.l⁻¹, la taille mesurée est similaire (moins de 5 % d'incertitude) à la taille attendue (2 MDa). En revanche, au-delà de 0,5 g.l⁻¹ d'AH, plus la concentration est élevée, plus la taille est faible (augmentation des volumes de rétention visible dans le chromatogramme). L'augmentation de la concentration en AH réduit la mobilité interchaînes. De ce fait, sous la contrainte de cisaillement les chaînes d'AH peuvent se rompre réduisant la taille globale mesurée. En revanche, la VI ne semble pas être influencée par l'augmentation de la concentration en AH (moins de 15 % d'erreur sur la mesure).

Tableau 9. Impact de la concentration d'AH (2 MDa, VI = 21,6 dl.g⁻¹) sur la détermination de la taille et la viscosité intrinsèque par CES/Multi-détection.

Concentration mesurée par CTM (g.l ⁻¹)	Concentration RI (g.l ⁻¹)	Erreur sur la concentration (%)	VI (dl.g ⁻¹)	Erreur sur la VI (%)	Taille mesurée par DL (MDa)	Erreur sur la taille (%)
0,11	0,11 (+/-0,006)	0	20,9 (+/- 2,3)	3	2,1 (+/- 0,31)	3
0,23	0,23 (+/-0,006)	0	19,0 (+/-0,3)	13	2,0 (+/- 0,15)	2
0,32	0,32 (+/-0,012)	0	20,5 (+/-0,9)	5	2,0 (+/- 0,10)	0
0,42	0,42 (+/-0,006)	0	20,9 (+/-0,2)	3	2,0 (+/- 0,00)	0
0,51	0,50 (+/- 0,006)	2	21,1 (+/- 0,1)	3	2,0 (+/- 0,00)	0
0,64	0,64 (+/-0,017)	0	20,1 (+/-0,4)	7	1,8 (+/- 0,00)	11
0,84	0,85 (+/-0,010)	1,2	20,3 (+/-0,4)	6	1,7 (+/- 0,00)	16
1,15	1,10 (+/-0,017)	4,4	19,6 (+/-0,4)	10	1,6 (+/- 0,00)	22

Une concentration en AH n'excédant pas 0,5 g.l⁻¹ est donc indispensable à une caractérisation fiable de l'AH. De plus, une concentration en AH se rapprochant de 0,5 g.l⁻¹ sera préférée lors des analyses. A cette concentration la mesure de taille est moins variable qu'à faibles concentrations.

4.1.2.2 Fiabilité des mesures de taille par diffusion de la lumière

Le calcul de la taille par CES/Multi-détection des AH se fait à partir de la diffusion de la lumière à 7 ° pour des solutions d'AH à 0,5 g.l⁻¹ de taille comprise entre 70 kDa et 4,2 MDa. La Figure 34 montre les spectres de la diffusion de la lumière pour les différentes tailles d'AH. Plus les tailles d'AH sont importantes plus le signal mesuré est important.

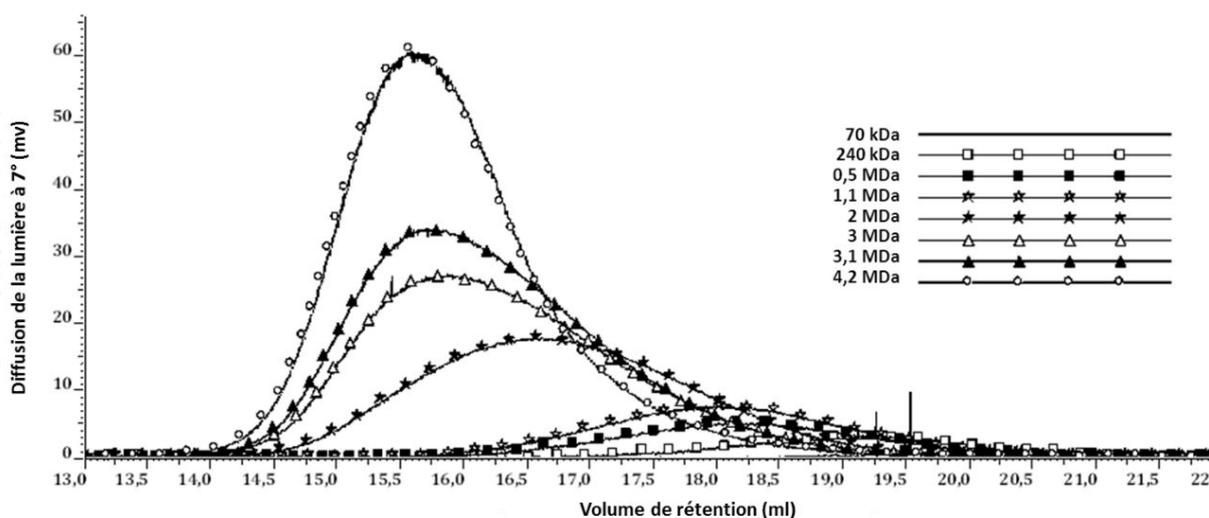


Figure 34. Chromatogramme de CES/Diffusion de la lumière (7 °) d'AH de différentes tailles. 50 µl de solution d'AH de taille compris entre 70 kDa et 4,2 MDa sont injectés à 0,5 g.l⁻¹. Les chromatogrammes obtenus pour chaque taille sont superposés.

La taille des AH en tous points de la distribution est déterminée par l'équation 6 :

$$\text{Intensité} = K(\text{DL}) \times \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \times C \times M_w \quad (\text{Equation 6})$$

La taille moyenne de l'échantillon est ensuite déduite par l'équation 7 :

$$M_w = \frac{\sum C_i M_i}{\sum C_i} \quad (\text{Equation 7})$$

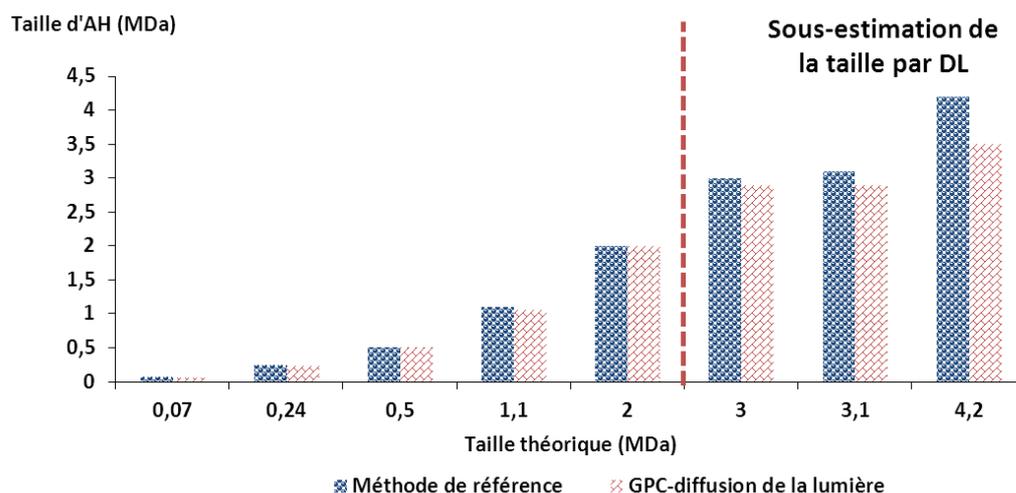


Figure 35. Comparaison de la détermination de la taille d’AH par la méthode de référence et la CES/Diffusion de la lumière à 7°. Huit tailles d’AH comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa ont été déterminées par les deux méthodes (de référence et GPC/Diffusion de la lumière) et sont comparées.

Les tailles déterminées par la diffusion de la lumière sont comparées aux tailles déterminées par la méthode de référence (Figure 35). Deux tendances peuvent être observées :

- une taille d’AH mesurée identique (moins de 5 % d’erreur), pour les deux méthodes de caractérisation, pour des tailles d’AH inférieures à 2 MDa (taille mesurée par la méthode de référence),
- une taille sous-estimée de 15 % en moyenne par diffusion de la lumière pour les tailles d’AH supérieures à 2 MDa (taille mesurée par la méthode de référence).

La sous-estimation de la taille d’AH (pour les tailles supérieures à 2 MDa) peut être liée à :

- la dégradation de l’AH au sein des colonnes de chromatographie d’exclusion stérique. L’augmentation des tailles d’AH augmente l’enchevêtrement des chaînes qui deviennent alors plus sensibles aux contraintes de cisaillement ;
- une surestimation de la taille par la méthode de référence (pour les tailles supérieures à 2 MDa). En effet, les approximations des coefficients de Mark Houwink utilisées peuvent être non adaptées aux grandes tailles.

Néanmoins, 15 % d’erreur sur la mesure de grandes tailles d’AH restent acceptables. La taille peut également être déterminée par la mesure de VI. La partie suivante évalue la fiabilité de la mesure de viscosité intrinsèque et la détermination de la taille par l’équation de Mark Houwink.

4.1.2.3 Fiabilité de la mesure de la viscosité intrinsèque et implication des coefficients de Mark Houwink lors du calcul de la taille des AH

En CES/Multi-détection, la mesure de la viscosité intrinsèque est réalisée à l'aide d'un pont de Wheastone. La Figure 36 montre la mesure de pression différentielle (DP) du viscosimètre des tailles d'AH comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa, en tout point de la distribution. Les AH de grande taille sortent en premier de la colonne de chromatographie et induisent une pression plus élevée (DP) que les plus petites tailles d'AH qui sortent plus tardivement.

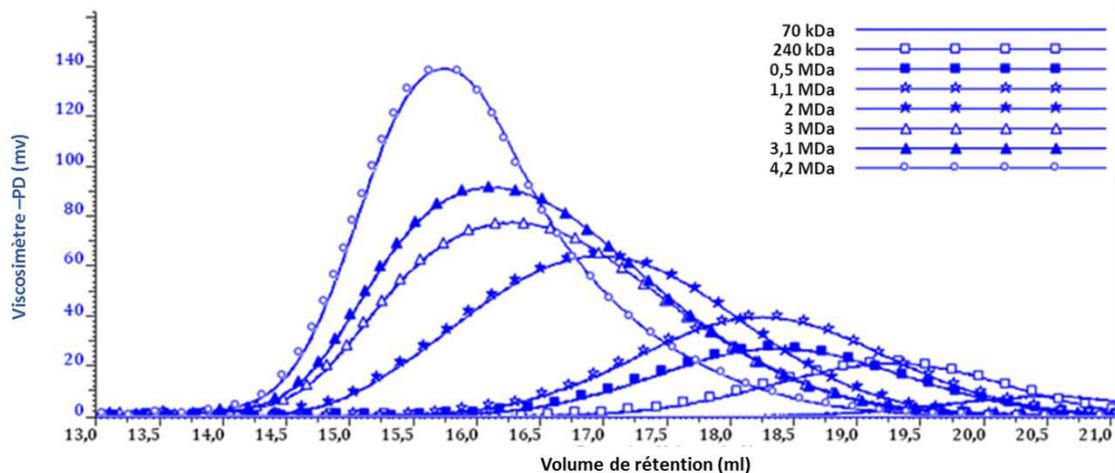


Figure 36. Chromatogramme de CES/ Viscosimétrie de l'AH à différentes tailles. 50 µl d'AH de tailles comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa sont injectés à 0,5 g.l⁻¹. Les chromatogrammes obtenus pour chaque taille sont superposés.

La VI est calculée par l'équation 10 pour chaque taille d'AH :

$$\frac{4(PD)}{(PE) - 2(PD)} = C \times VI \quad (\text{Equation 10})$$

La Figure 37 montre la comparaison entre les viscosités intrinsèques de référence et celles mesurées.

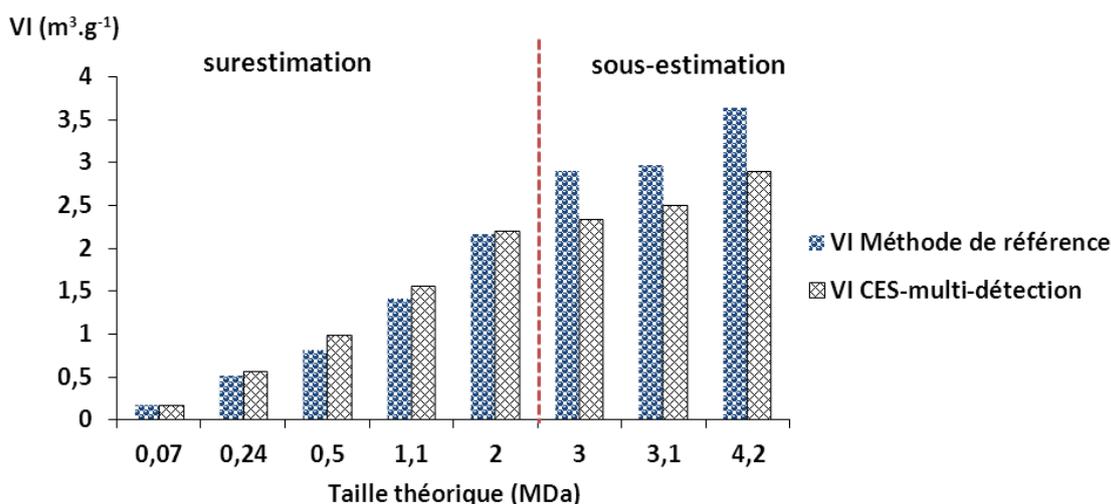


Figure 37. Comparaison de la viscosité intrinsèque de référence et celles mesurées par CES/Viscosimétrie de huit tailles d’AH comprises entre 70 kDa et 4,2 MDa.

Deux tendances peuvent être observées :

- une VI similaire pour les deux méthodes de mesure (10 % d’erreur en moyenne sur la mesure de VI) pour des tailles d’AH (déterminées par méthode de référence) inférieures à 2 MDa,
- une sous-estimation de 20 % en moyenne de la viscosité intrinsèque par CES/Multi-détection pour des tailles d’AH (déterminées par la méthode de référence) supérieures à 2 MDa.

La sous-estimation de la VI est cohérente avec la mesure de diffusion de la lumière. En effet, cette sous-estimation de la taille peut être liée à une dégradation de l’AH en CES ou à une différence de méthode de mesure.

La mesure de VI est sensiblement moins précise que la mesure de diffusion de la lumière. Le choix de la diffusion de la lumière pour la détermination de la taille semble alors plus approprié. De plus, l’utilisation de la VI de l’AH pour la détermination de la taille fait intervenir des approximations des coefficients de Mark Houwink qui peuvent biaiser la mesure. Les approximations utilisées pour le calcul de la taille par la méthode de référence sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Approximation des coefficients de l’équation de Mark Howink en fonction de la taille des AH utilisée lors du calcul de la taille par le méthode de référence.

	K	α
Taille < 300 kDa	5,78.10 ⁻⁶	0,919
Taille > 300 kDa	9,78.10 ⁻⁵	0,690

Afin de mettre en évidence la variabilité de ces coefficients, ils ont été déterminés pour les différentes tailles d'AH à partir de la VI mesurée et de la taille mesurée en diffusion de la lumière (§2 : Etude bibliographique) et sont présentés en Figure 38. Les coefficients K et α diminuent avec l'augmentation de la taille d'AH. Ces résultats sont en accord avec ceux de Caspersen et al., 2014. Les approximations de la méthode de référence utilisées pour le calcul de la taille à partir de l'équation de Mark Houwink sont présentées par une ligne verte (taille < 300 kDa) et une ligne noire (taille > 300 kDa). L'approximation du coefficient K est bien éloignée des valeurs mesurées (Figure 38A) en raison de la différence de conditions opératoires. En effet, K est dépendant du solvant, du polymère et de la température. En revanche, les approximations du coefficient α sont proches des mesures réalisées (Figure 38B).

Il peut également être remarqué que la segmentation des approximations K et α en deux catégories de tailles n'est pas très judicieuse. En effet, une segmentation de ces approximations en trois catégories serait préférable :

- tailles inférieures à 300 kDa,
- tailles comprises entre 300 kDa et 2 MDa,
- tailles supérieures à 2 MDa.

L'utilisation des approximations des coefficients de Mark Houwink pour le calcul des tailles d'AH élevées (> 2 MDa) conduira probablement à une surestimation de la taille puisque plus la taille des AH est importante, plus les approximations s'éloignent des coefficients réels K et α . Ces résultats sont cohérents avec les mesures de la diffusion de la lumière. Une surestimation des grandes tailles d'AH par la méthode de référence est observée. La mesure de la taille par CES/Diffusion de la lumière semble alors plus fiable que la méthode de référence puisqu'elle est une mesure directe de la taille de l'AH.

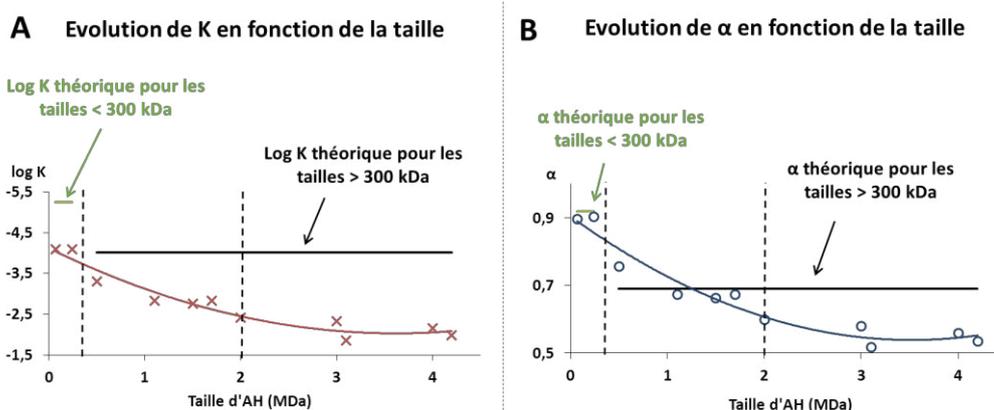


Figure 38. Comparaison des coefficients de Mark Houwink K et α déterminé par CES/multi-détection à différentes tailles d'AH et des approximations utilisées pour le calcul de la taille par la méthode de référence.

La mesure de la taille d'AH au cours du procédé de purification se fera donc par mesure de CES/diffusion de la lumière.

En résumé

La caractérisation de l'AH est possible grâce aux méthodes développées dans cette étude. La CTM permet une quantification simultanée de l'AH en milieu complexe et la CES/multi-détection permet une caractérisation des différentes tailles en solution, de la polydispersité, de la concentration et de la viscosité intrinsèque de l'AH.

La Figure 39 représente l'ensemble des méthodes utilisées pour le suivi des molécules présentes dans le milieu de culture. L'élimination des sels et des acides nucléiques du milieu sera suivie par mesure de la conductivité et de l'absorbance à 260 nm respectivement. Les protéines globales seront quantifiées par la méthode de Buret (KIT BCA) et, le fer ainsi que le plomb par spectrométrie d'émission par plasma à spectrométrie d'émission optique (ICP-OES).

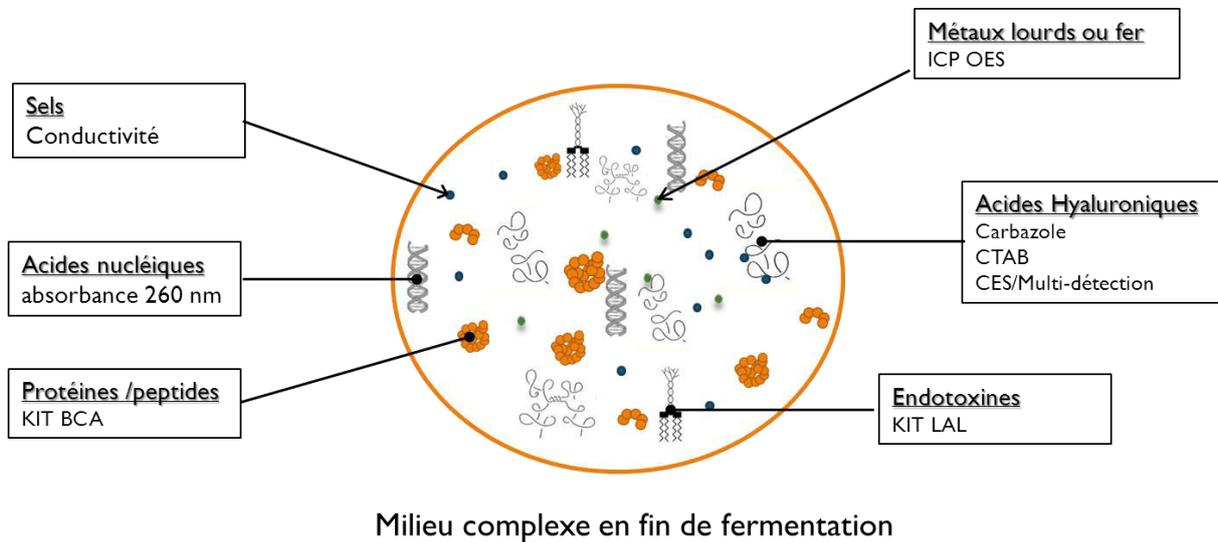


Figure 39. Schéma récapitulatif des méthodes de suivi des composés du milieu de culture microbienne.

4.2 Séparation de l'AH du milieu de culture bactérien

4.2.1 Extraction de l'AH capsulaire

L'AH en fin de culture peut être retrouvé sous deux formes : libre dans le milieu de culture microbienne ou lié à la cellule au niveau de la capsule bactérienne. L'AH capsulaire extrait par un traitement SDS 0,1 % peut représenter jusqu'à 20 % de l'AH totale selon Goh (1998). En conséquence, la fraction d'AH associée aux bactéries peut limiter le rendement de production. Dans cette partie, les performances d'extraction, correspondant à l'AH capsulaire récupéré par rapport à l'AH total, sont étudiées pour deux traitements d'extraction : une extraction au dodécylsulfate de sodium (SDS) et une extraction à l'acide trichloracétique (TCA).

Les traitements d'extraction sont réalisés à partir de cultures de *S. Zooepidemicus*.

4.2.1.1 Extraction au SDS

Quatre concentrations en SDS finales ont été évaluées 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % et 1 %. L'AH libéré de la capsule par le traitement d'extraction est déterminée par l'équation 36 :

$$\text{AH extrait (\%)} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{témoin}}}{C_{\text{total}}} \times 100 \quad (\text{Equation 36})$$

Avec C_{total} : la concentration en AH après extraction (g.l^{-1}) et $C_{\text{témoin}}$: la concentration en AH sans agent d'extraction (g.l^{-1}). L'extraction a été évaluée sur quatre cultures différentes de *S. zooepidemicus* et chaque essai a été réalisé en triplicat.

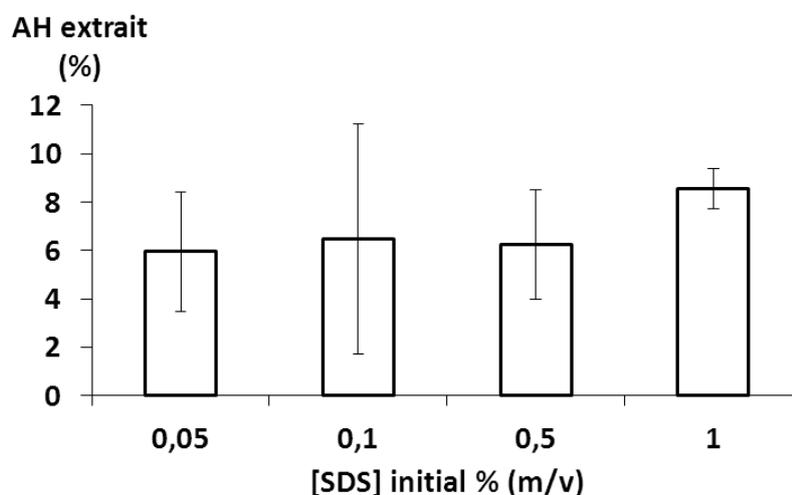


Figure 40. Influence de la concentration en SDS sur la libération de l'AH présent dans la capsule bactérienne. L'AH extrait représente la part d'AH libérée par rapport à l'AH total en solution.

La Figure 40 A présente l'AH extrait pour les quatre concentrations en SDS. L'AH libéré de la capsule par le traitement d'extraction (par rapport à l'AH total) est variable et est en moyenne de 7 % quelle que soit la concentration en SDS comprise entre 0,05 et 1 %. Ce résultat est plus faible que celui attendu. La faible part d'AH récupéré par ajout de SDS n'est pas suffisante à la mise en place d'une étape d'extraction dans le procédé de purification. En effet, l'étape de purification nécessaire à l'élimination du SDS conduira probablement à la perte de ces 7 % d'AH et à une augmentation des coûts.

4.2.1.2 Extraction au TCA

Quatre concentrations en TCA ont été étudiées : 5 %, 10 %, 15 % et 20 %. Le TCA étant un « interférent » du dosage CTM, une dialyse en cassette de 10 kDa est réalisée pendant 48 h. Aucune extraction n'est observée pour le traitement au TCA quelle que soit la concentration. Ceci peut être dû à une inefficacité du traitement TCA ou à une hydrolyse de l'AH en présence de TCA qui serait alors éliminé au cours de la dialyse.

Le traitement au TCA ne semble pas approprié pour l'extraction de la capsule d'AH. En revanche, le SDS permet de libérer jusqu'à 7 % de l'AH total. Ce faible pourcentage ne permet pas d'envisager un traitement d'extraction dans le procédé de production. En effet, l'ajout de SDS nécessitera son élimination en purification qui conduira à des pertes d'AH. Le bénéfice de l'étape d'extraction n'est pas suffisant pour être envisagé.

4.2.2 Elimination des cellules du milieu contenant l'AH

Afin d'éliminer les cellules productrices d'AH du milieu, trois méthodes ont été envisagées :

- la microfiltration tangentielle,
- la filtration frontale,
- la filtration frontale avec adjuvant de filtration.

Le procédé identifié nécessitera une optimisation qui ne sera pas présentée dans cette thèse. Les séparations sont réalisées à partir de cultures microbiennes de *S. zooepidemicus* produisant de l'AH de 2 MDa environ sur le milieu choisi (cf. matériel et méthodes).

4.2.2.1 Elimination des cellules par microfiltration tangentielle

La microfiltration tangentielle présente a priori les meilleures performances de séparation. Le premier critère de performance étudié est le taux de rétention des cellules et de l'AH ainsi que le flux de perméat. La différence de rétention entre les cellules et l'AH doit être la plus grande possible. Un

récapitulatif des expériences est présenté en Figure 42. Le taux de rétention des cellules est de 1 quelles que soient les conditions de séparation (aucune présence de cellules sur cellule de Thoma). Le taux de rétention de l'AH a été mesuré lors de la microfiltration d'une culture de *S. zooepidemicus* séparé à température ambiante sur une membrane de diamètre de pores de 0,22 μm en PES (résistante aux fortes pressions transmembranaires). Une pression transmembranaire de 2,5 bar est appliquée. La viscosité du fluide entraîne une pression d'alimentation élevée même à faible débit d'alimentation, imposant de travailler à une PTM importante. Dans ces conditions, une augmentation de la viscosité du rétentat est observée empêchant rapidement la poursuite de la microfiltration. Le flux de perméat n'a pas pu être déterminé. En revanche, le taux de rétention a pu être précisé. Il est de **0,97**. L'AH est donc retenu par la membrane. Ce résultat est très surprenant. En effet, l'AH ayant une taille largement inférieure au diamètre des pores, il ne devrait pas être retenu. De plus, il a été également montré que peu d'AH était lié aux cellules. Par conséquent, les raisons de la rétention peuvent être attribuées à :

- l'interaction des chaînes d'AH entre elles qui limiterait le transfert à travers la membrane,
- un diamètre de pores trop faible qui ne permettrait pas le passage de l'AH.

Afin de perturber la structure de l'AH, du SDS (0,1 %) a été ajouté. Les mêmes conditions de séparations ont été appliquées. Le taux de rétention, dans ces conditions, est de **0,86**. La perturbation des interactions interchaînes ne permet qu'une faible diminution du taux de rétention de l'AH. La Figure 41 montre l'évolution du flux à ce taux de rétention. Le flux de perméat diminue rapidement pour se stabiliser à un débit proche de zéro. Cela montre la présence d'une couche de polarisation importante qui augmente la résistance au passage du flux.

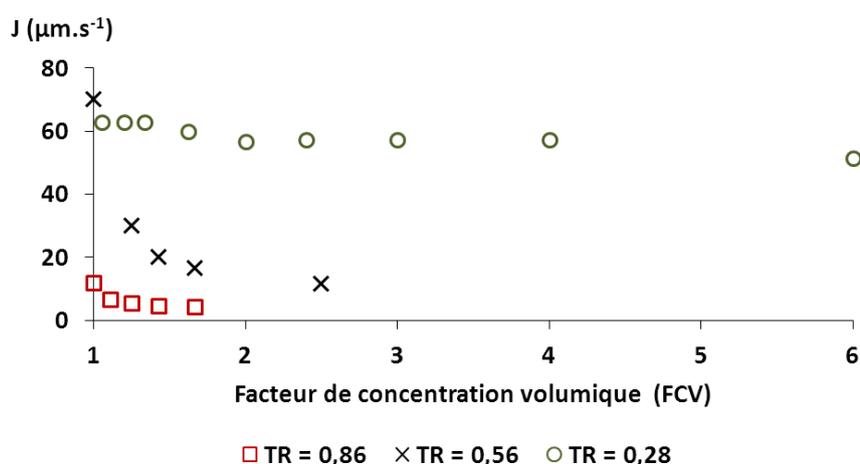


Figure 41. Evolution du flux de perméat lors de la séparation des cellules du milieu de culture en microfiltration en fonction du nombre de facteur de concentration volumique pour différent taux de rétention (TR) de l'AH.

La culture traitée par du SDS 0,1 % (v/v), soit 0,05 % en concentration finale, a donc été microfiltrée sur une membrane de diamètre de pores de 0,60 μm afin d'évaluer l'implication du diamètre de pores dans la rétention de l'AH. Les mêmes conditions de séparation ont été appliquées. Dans ce cas, le taux de rétention est de **0,56**. Le taux de rétention a été amélioré mais reste tout de même élevé. L'augmentation du diamètre de pores facilite le passage de l'AH. Cependant, le flux de perméat diminue rapidement pour se rapprocher de zéro à l'identique de ce qui a été observé précédemment. De ce fait, il semble que la couche de polarisation prenne plus de temps à se mettre en place sur la membrane de 0,60 μm . Ce qui explique l'amélioration du taux de rétention.

Ni l'ajout de SDS, ni l'augmentation du diamètre de pores ne permettent le passage de la totalité de l'AH à travers la membrane. Il semble que les cellules empêchent le passage de l'AH. C'est pourquoi, elles ont été éliminées par centrifugation à 15 000 g pendant 15 mn après un traitement d'extraction au SDS 0,1 % (v/v). Le taux de rétention est alors de **0,28**. La rétention de l'AH a nettement diminué. Une faible partie des cellules reste dans le surnageant de centrifugation qui est probablement responsable de la rétention de l'AH à 0,28. Le flux de perméat reste quasiment constant durant la séparation. L'AH en absence de cellules traverse la membrane et ne contribue pas à la formation d'une couche de polarisation responsable de l'augmentation très importante de la résistance membranaire.

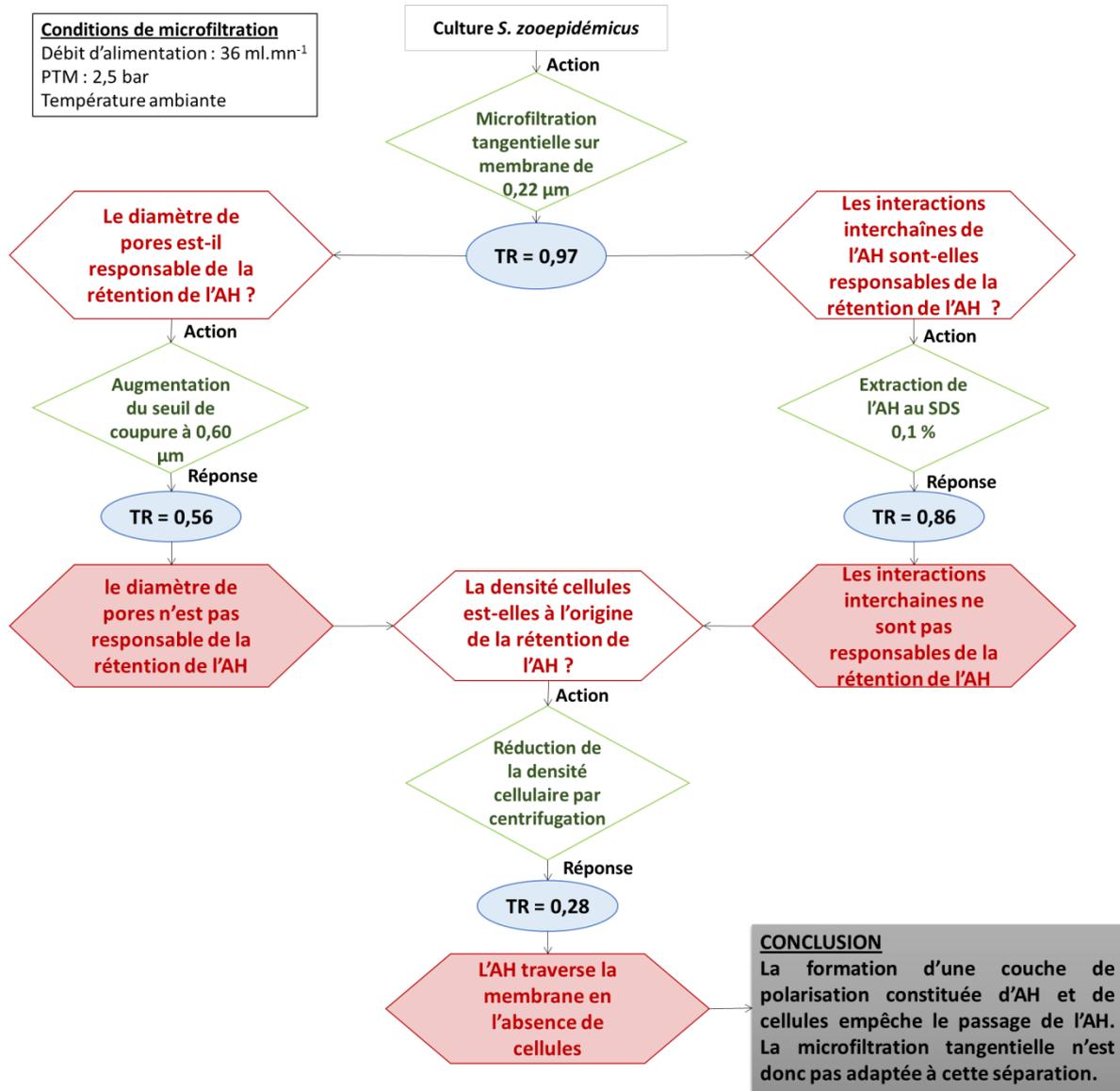


Figure 42. Résumé des expériences invalidant la microfiltration tangentielle pour la séparation des cellules du milieu.

La différence entre le taux de rétention de l'AH et celui des cellules n'est pas suffisamment grande pour envisager une séparation des cellules par microfiltration tangentielle.

4.2.2.2 Elimination des cellules par filtration frontale

La séparation des cellules du milieu de culture par filtration frontale est réalisée sur un filtre en fibres de verre de 0,5 μm de diamètre de pores. Une perte de charge de 2 bar est appliquée de part et d'autre du filtre. Une réduction rapide du flux de filtrat est observée. La concentration bactérienne élevée (2 g.l^{-1}) et la grande viscosité (2 g.l^{-1} d'AH 2 MDa) sont responsables du colmatage du filtre.

L'élimination des cellules par filtration frontale basique sur filtre en fibre de verre 0,5 μm n'est pas envisageable.

4.2.2.3 Elimination des cellules par filtration frontale avec adjuvant de filtration

La filtration sur adjuvant permet de réduire la concentration en particules tout en maintenant une grande porosité.

La première étape de la séparation a consisté à déposer une couche de 2 mm de terre de diatomée (5 g) sur une feuille de papier Whatman (10 μm) de 64 cm^2 (Figure 43 A). Le milieu de culture a été déposé sur la terre de diatomée. Le passage du milieu à travers la membrane s'est fait à l'aide d'une pompe à vide. Un colmatage a été rapidement observé. Les bactéries colmatent la pré-couche d'adjuvant de filtration en surface.

Afin de limiter ce colmatage de surface, une solution alternative, qui a consisté à ajouter 50 g.l^{-1} de terre de diatomée dans la culture microbienne, a été mise en œuvre. 500 ml de mélange ont été ensuite déposés à la surface de la pré-couche de terre de diatomées. Ainsi, se sont superposées, plusieurs couches filtrantes comprenant l'adjuvant filtrant et les cellules retenues (Figure 43B). Le gâteau formé de cellules et de terre de diatomée a présenté une filtrabilité bien plus importante que la pré-couche de terre de diatomée seule. Les cellules ont ainsi été éliminées. Des particules de terre de diatomée et quelques cellules ont traversé la membrane de séparation. Une clarification a alors été nécessaire. L'utilisation d'un filtre de 0,5 μm en fibres de verre a permis d'éliminer les bactéries et les particules de terre de diatomée résiduelles. Ainsi, 450 ml de milieu dépourvu de cellules ont pu être obtenus avec une concentration en AH après filtration similaire à celle avant filtration.

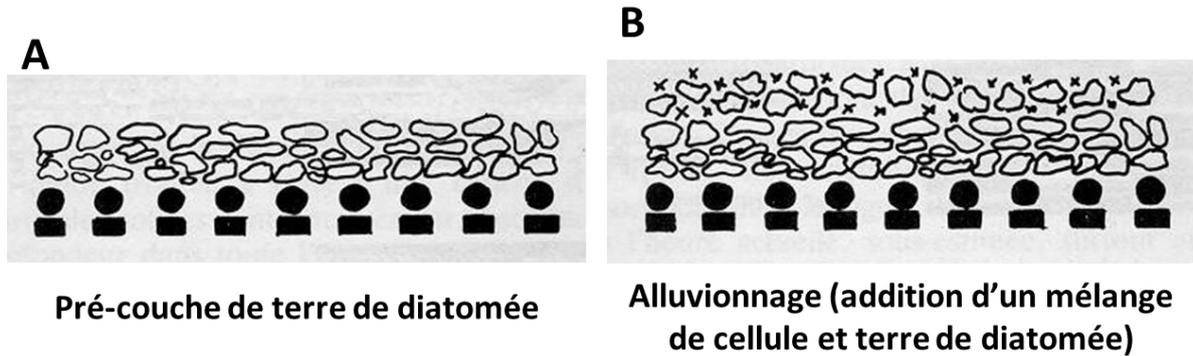


Figure 43. Séparation des cellules par filtration sur terre de diatomée. (A) Précouche de terre de diatomée et (B) superposition des couches filtrantes de cellules et de terre de diatomée. (Source : matevi-france.com/oenologie/filtration/filtre-a-alluvionnage/en-savoir-sur-le-filtre-a-alluvionnage).

La présence d'AH complique la séparation des cellules du milieu de culture. En effet, l'AH en microfiltration tangentielle est retenu par les cellules qui ne peuvent, de ce fait, être séparés de manière efficace en raison de la couche de polarisation formée. La filtration frontale est une méthode efficace de séparation, cependant la concentration « élevée » en bactéries (2 g.l^{-1}) conduit à un colmatage rapide du filtre. L'utilisation de terre de diatomée est une méthode qui permet d'éliminer de manière efficace les cellules du milieu, elle est donc la méthode sélectionnée.

Les études présentées dans cette partie ont permis de choisir une méthode de séparation des cellules du milieu. Les études d'optimisation devront être réalisées ultérieurement.

4.2.3 Purification de l'AH

La purification de l'AH est principalement réalisée par des méthodes de séparation membranaire et par précipitation. Elle est ensuite complétée par une méthode d'adsorption sur charbon actif. Les méthodes de précipitation sont des méthodes qui mettent en jeu des solvants organiques ou des sels d'ammonium. Afin d'obtenir un haut degré de pureté, des précipitations successives sont souvent requises. De plus, dans le cas de la précipitation de l'AH aux sels d'ammonium, l'élimination de ces sels après précipitation est nécessaire (souvent réalisée par des techniques membranaires). La précipitation en solvant organique, quant à elle, est très consommatrice en solvant et nécessite la mise en place de procédés de recyclage. L'ultrafiltration permet de s'affranchir des contraintes liées à la précipitation. Elle est une méthode de purification douce et efficace qui permet d'obtenir une grande pureté en utilisant l'eau comme seul solvant. Elle est donc la méthode choisie dans le cadre

de cette étude. Les contaminants résiduels seront par la suite identifiés et une élimination ciblée par adsorption sur charbon actif sera alors envisagée.

4.2.3.1 Purification de l'AH par ultrafiltration

L'objectif de cette partie est la purification d'AH de grandes tailles. Dans un premier temps, il est important de définir dans quelle mesure les différentes tailles d'AH, au sein d'un échantillon, peuvent être séparées. Cela conditionne, en partie, le choix des membranes de séparation. Dans un deuxième temps, les conditions opératoires (PTM, concentration en AH, débit d'alimentation, etc.) à maintenir en diafiltration doivent être caractérisées afin de garantir les meilleures performances de séparation. Pour finir, Les critères de performances en diafiltration (rendement, pureté et productivité), aux conditions opératoires fixées, sont étudiés.

➤ **Etude de l'impact du seuil de coupure et des conditions physico-chimique sur sélectivité de taille en ultrafiltration**

L'AH en fin de culture peut présenter, au sein d'un même échantillon, plusieurs tailles d'AH. Cette étude se concentre sur la rétention des molécules de grande taille et l'élimination des petites tailles. Ainsi, un mélange de deux tailles d'AH en proportion égale a été séparé (70 kDa et 2 MDa). L'étude de la sélectivité de taille se divise en deux parties :

- une étude de la sélectivité des membranes d'ultrafiltration. Deux seuils de coupure ont été sélectionnés: 100 kDa et 1 MDa.
- une étude de l'impact de la charge de l'AH et de l'environnement ionique sur la sélectivité. ^

○ **Influence du seuil de coupure sur la sélectivité de taille**

Le mélange d'AH (2 MDa et 70 kDa) à 0,5 g.l⁻¹ en eau osmosée est ultrafiltré sur des membranes de 100 kDa et 1 MDa. La Figure 44 A montre les chromatogrammes du mélange d'AH. Deux pics d'AH sont observés en réfractométrie (Figure 44 A). Les tailles d'AH, en tous points du chromatogramme de la CES, sont déterminées par diffusion de la lumière (Figure 44B). Le débit de perméat, la concentration ainsi que les tailles d'AH dans le rétentat et le perméat ont été mesurés jusqu'à un facteur de concentration volumique (FCV) de 3.

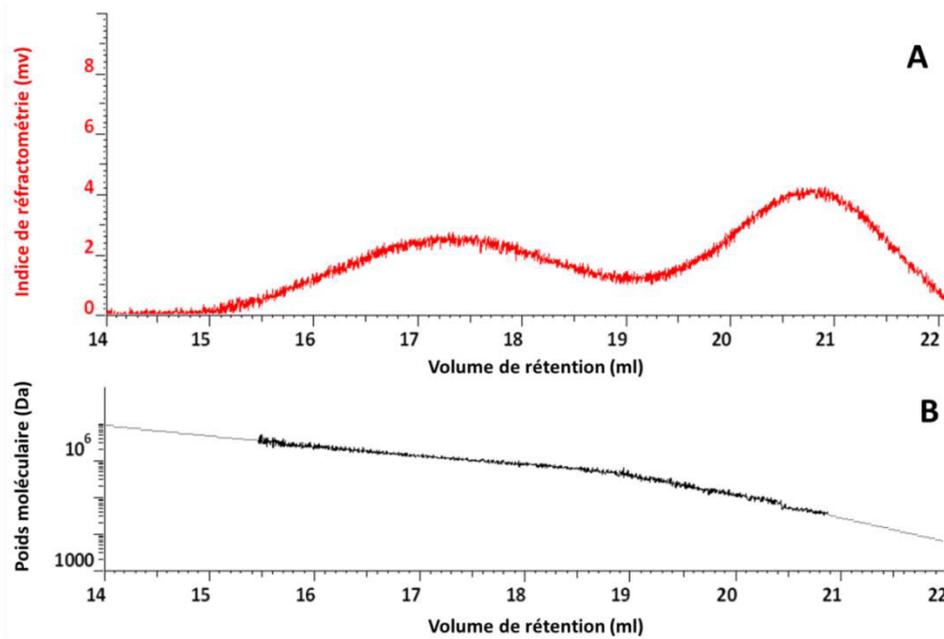


Figure 44. Chromatogramme de CES/Multi-détection d'un mélange d'AH 2 MDa et 70 KDa. (A) Chromatogramme de CES/Réfractométrie. (B) les tailles d'AH déterminées par diffusion de la lumière à 7 °C.

La Figure 46A présente l'évolution de la concentration en AH dans le rétentat et le perméat pour les deux membranes d'UF (100 kDa et 1 MDa). Dans les deux cas, la concentration dans le rétentat augmente de manière proportionnelle au nombre de FCV. La concentration dans le perméat pour la membrane de 100 kDa est extrêmement faible ($0,02 \text{ g.l}^{-1}$ en moyenne) alors que pour la membrane de 1 MDa cette concentration est plus élevée ($0,3 \text{ g.l}^{-1}$ en moyenne). Ceci indique que la membrane de 1 MDa, implique une transmission d'AH plus importante que la membrane de 100 kDa. En conséquence, le taux de rétention de l'AH est plus élevé pour la membrane de 100 kDa que pour celle de 1 MDa. Avec une membrane de 100 kDa, la rétention semble constante, à 1, alors qu'elle augmente pour la membrane de 100 kDa de 0,40 à 0,90 (Figure 46 B). Les Figure 46 C et D montrent l'évolution des flux de perméat au cours de l'ultrafiltration. Pour la membrane de 100 kDa, le flux est quasi constant alors que pour la membrane de 1 MDa, le flux de perméat diminue rapidement. Le flux peut être corrélé aux taux de rétention de l'AH. L'évolution du taux de rétention est concomitante à l'évolution du flux. En effet, la formation de la couche de polarisation qui permet la rétention de l'AH augmente la résistance au flux. Une recirculation en début de procédé pourrait permettre de limiter le passage de l'AH au travers de la membrane.

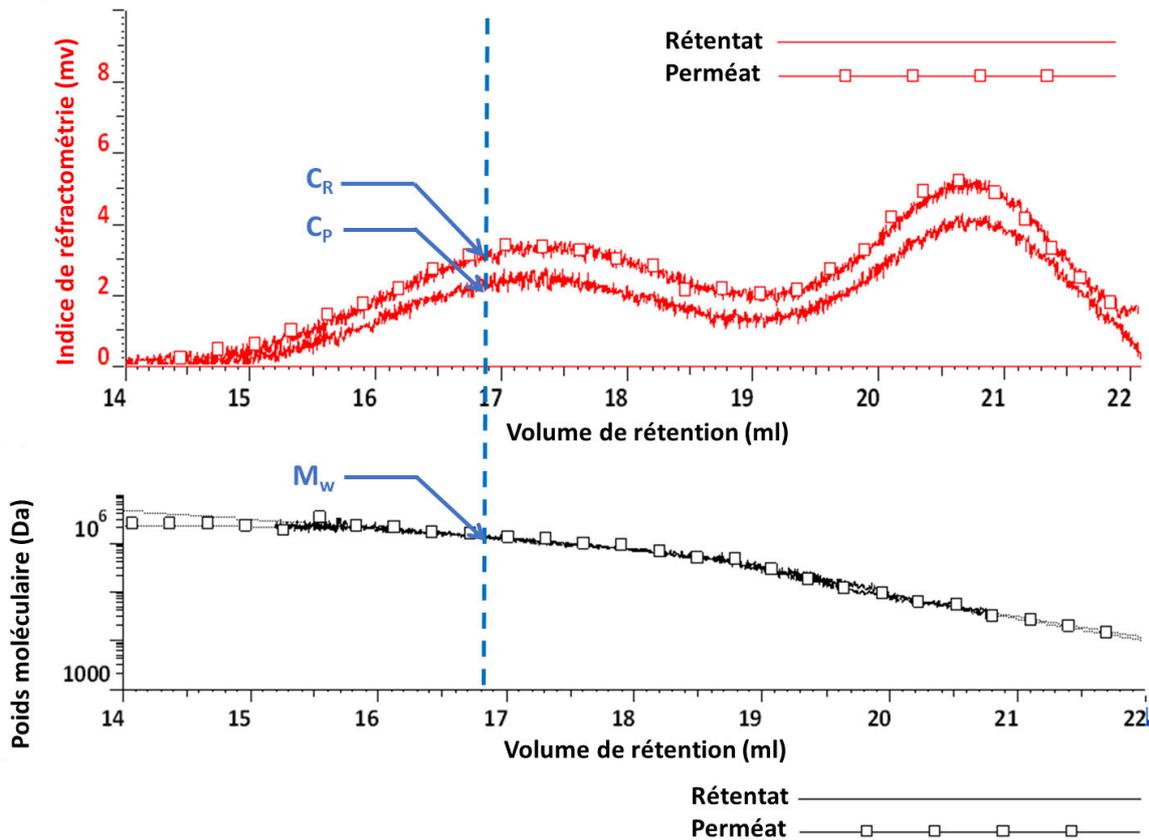


Figure 45. Chromatogrammes de CES/Multi-détection d'AH du rétentat et du perméat à FCV 3 de l'ultrafiltration du mélange d'AH 2 MDa et 70 kDa sur une membrane de 1 MDa. En chaque point du chromatogramme la concentration (C_R , C_P) et la taille (M_w) de l'AH est déterminée.

La Figure 45 montre les chromatogrammes de CES des solutions d'AH dans le rétentat et le perméat d'AH à FCV 3 du mélange d'AH. Pour chaque taille, une concentration en AH est déterminée pour le rétentat et le perméat. Celles-ci sont utilisées pour le calcul du taux de rétention. Les Figure 46 E et F montrent les taux de rétention par taille d'AH. La rétention de l'AH est la même quelle que soit la taille de l'AH et identique au taux de rétention moyen. Ce résultat est surprenant. En effet, un passage des AH de petite taille (70 kDa) à travers la membrane et une rétention des tailles les plus élevées (2 MDa) sont attendus. La molécule d'AH est une molécule linéaire. De ce fait, les seuils de coupure annoncés même faibles peuvent autoriser le passage de la molécule dans sa longueur.

Cependant, si les molécules de toutes les tailles peuvent traverser la membrane pourquoi n'ont-elles pas toutes traversé la membrane ? Les caractéristiques structurales de l'AH sont probablement responsables de sa rétention. La structure de l'AH en réseau permet de former une seconde membrane de chaînes enchevêtrées en surface de la membrane (couche de polarisation). Ce phénomène est principalement lié au passage tangentiel de la solution. Celui-ci, lors de la microfiltration, avait empêché la séparation des cellules du milieu. Dans le cas présent, elle empêche

la séparation des différentes tailles d'AH en eau. Néanmoins, la diminution des interactions ioniques majoritairement responsables de la structure de l'AH en eau pourrait permettre de faciliter la séparation de tailles différentes.

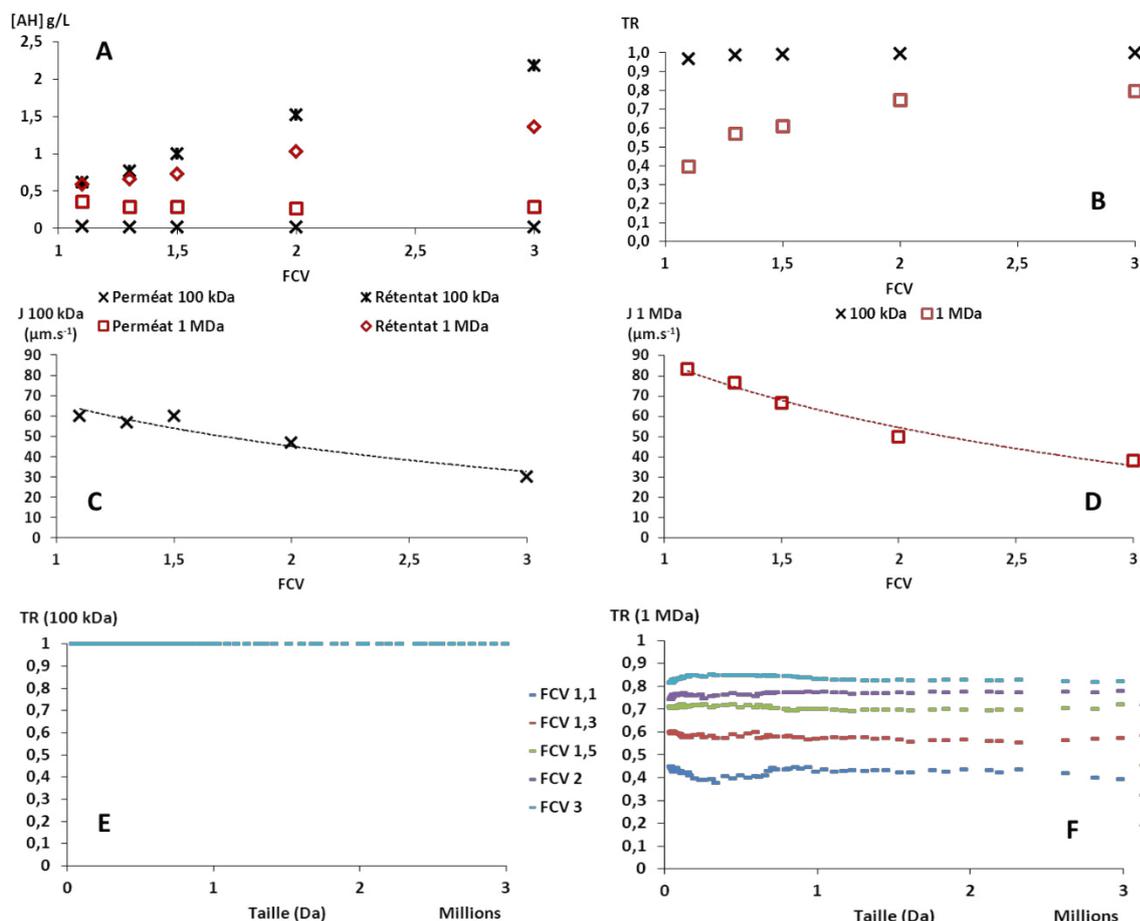


Figure 46. Sélectivité de taille des membranes d'ultrafiltration. Ultrafiltration d'un mélange de taille d'AH 70 kDa et 2 MDa (1 : 1) à $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sur membrane de 100 kDa et 1 MDa. Les concentrations en AH dans le perméat et rétentat sont présentées en A, les taux de rétention globaux (TR) en B, les flux (J) en C et D, et les taux de rétention (TR) par taille d'AH en E et F.

○ Influence de la force ionique et du pH sur la sélectivité de taille

Les interactions ioniques de l'AH avec l'eau pour former une structure tridimensionnelle stable sont à l'origine de la formation du réseau d'AH en eau (Heatley et Scott., 1988). La réduction de ces interactions AH / eau en construisant un bouclier électronique autour de l'AH ou en protonant la molécule, en abaissant le pH en dessous de 5, pourrait permettre de faciliter la séparation de tailles différentes. La force ionique a été augmentée par l'ajout de NaCl 1 M et la protonation de l'AH est réalisée par ajustement du pH à 2 par de l'acide sulfurique. La séparation a été réalisée sur une

membrane de 1 MDa plus favorable à la transmission de l'AH. La taille et le taux de rétention de l'AH dans le rétentat et perméat ont été déterminés.

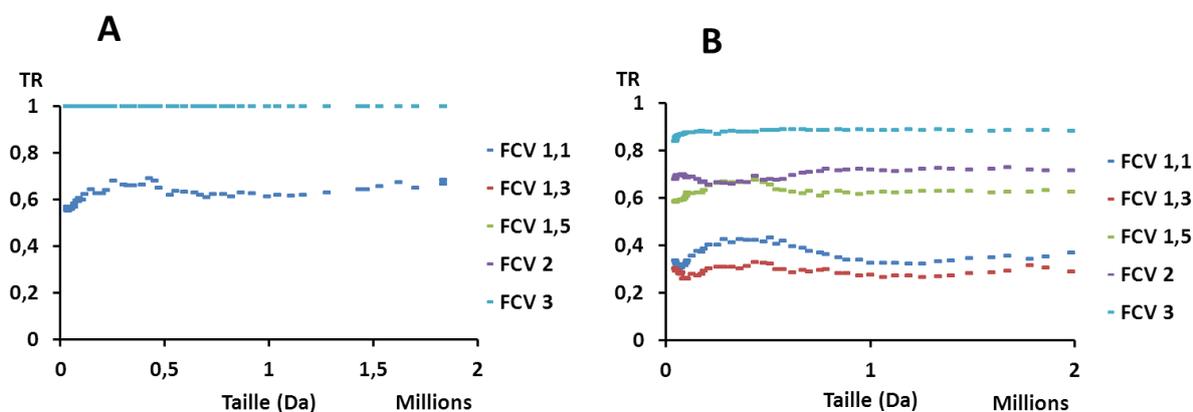


Figure 47. Influence du pH (A) et de la force ionique (B) sur la sélectivité de taille en UF. Ultrafiltration, sur une membrane de 1 MDa, d'une solution à 0,5 g.l⁻¹ d'un mélange d'AH de tailles 70 kDa et 2 MDa (1 : 1). En A, le pH de la solution a été diminué à pH 2 et, en B, la force ionique a été augmentée à 1 M par du NaCl.

Les Figure 47 A et B montrent les taux de rétention à pH 2 et à 1 M de NaCl respectivement pour chaque taille d'AH. Les taux de rétention globaux sont modifiés par le changement de conditions opératoires. Ceci indique que le changement de pH et de force ionique modifie la structure du réseau d'AH. Cependant, aucune sélectivité de taille n'est observée, le taux de rétention est le même quelle que soit la taille, et similaire au taux de rétention moyen. La réduction des interactions interchaînes ne permet pas d'obtenir une séparation des tailles. La concentration de polarisation constitue une deuxième membrane d'AH qui retient l'AH quelle que soit sa taille.

La sélectivité de taille n'est donc pas envisageable par séparation membranaire.

Les taux de rétention sont élevés quelles que soient les membranes de séparation (> 0,90). Ceci permet de purifier efficacement l'AH en diafiltration. Les études suivantes se concentreront alors sur la sélection des conditions opératoires nécessaires à la diafiltration.

➤ **Sélection des conditions opératoires d'ultrafiltration**

Le choix des conditions opératoires a pour objectif d'obtenir la productivité la plus élevée tout en maintenant un rendement élevé. Les conditions de séparation qui permettront un flux de perméat le plus élevé en maintenant un taux de rétention de l'AH maximal seront retenus. De nombreux facteurs influencent le flux de perméat et la rétention de l'AH. Les principaux sont les suivants :

- le seuil de coupure,
- la PTM,
- la concentration,
- la taille d'AH,
- le débit d'alimentation.

Le premier critère étudié est l'influence du débit d'alimentation sur les performances de séparation.

○ **Optimisation du débit d'alimentation**

Le débit d'alimentation (ou de recirculation) a une influence majeure sur le flux de perméat. Ceci est dû aux modifications des contraintes de cisaillement qui modifient la couche de polarisation. L'étude de l'influence du débit d'alimentation est réalisée sur quatre tailles d'AH (1,1 MDa, 2 MDa, 3 MDa et 4 MDa) à 1 g.l⁻¹ d'AH en eau osmosée. Sept débits (18, 27, 36, 45, 54, 72 et 90 ml.mn⁻¹) ont été évalués dans les limites expérimentales. La séparation a lieu sur une membrane de 100 kDa, à température ambiante, à 2,5 bar de pression transmembranaire et après stabilisation du débit par recirculation totale pendant 30 mn.

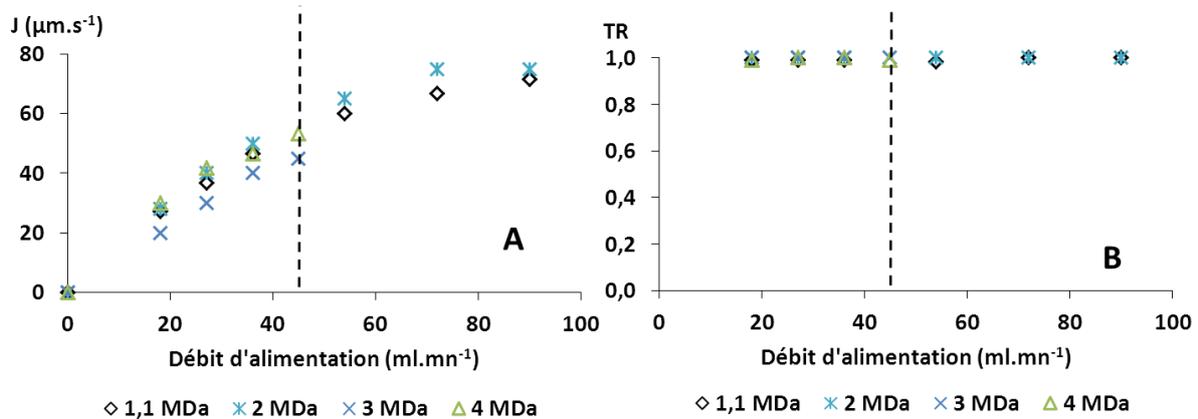


Figure 48. Influence du débit d'alimentation sur le flux de perméat (A) et le taux de rétention (B) pour différentes tailles d'AH. Ultrafiltration de solutions d'AH à 1 g.l⁻¹ sur membrane de 100 kDa. Le débit et le taux de rétention sont mesurés après 30 mn de recirculation à chaque débit d'alimentation.

Pour les tailles d'AH faibles (< 2 MDa), le flux augmente proportionnellement avec le débit d'alimentation jusqu'à se stabiliser à 75 µm.s⁻¹ (Figure 48 A). Une même tendance est observée pour les grandes tailles d'AH (> 2 MDa). Cependant, pour des débits d'alimentation supérieurs à 45 ml.mn⁻¹, la pression d'alimentation dépasse la valeur limite de tolérance de la membrane (5 bar). Par conséquent, les mesures de flux n'ont pu être réalisées. L'augmentation de la concentration en AH nécessitera également une diminution du débit d'alimentation. Les taux de rétention sont maintenus

à 1 quel soit le débit d'alimentation (Figure 48B). Le débit choisi est donc fixé à 36 ml.mn^{-1} . Celui-ci est un compromis entre les contraintes expérimentales et les performances de séparation.

○ **Sélection de la concentration et de la PTM en fonction de la taille d'AH**

L'influence de la PTM et de la concentration en fonction de la taille des AH sur le flux a été étudiée, à l'aide d'un plan d'expériences pour deux seuils de coupure (100 kDa et 1 MDa). Les domaines étudiés sont les suivants :

- ✓ PTM : 1,5 à 3,5 bar,
- ✓ taille : 2 à 4 MDa,
- ✓ concentration en AH : 0,5 à 1,5 g.l^{-1} .

Les solutions d'AH sont préparées en eau osmosée. Les taux de rétention et le flux de perméat ont été mesurés après 30 mn de recirculation totale. La séparation est réalisée à température ambiante et avec un débit d'alimentation de 36 ml.mn^{-1} .

Les tableaux 10 et 11 résument l'ensemble les résultats de l'influence de la PTM, de la taille et de la concentration en AH sur le flux de perméat et le taux de rétention obtenus pour les membranes de 1 MDa et 100 KDa respectivement.

Les coefficients de corrélation pour la modélisation du flux sont de 0,82 sur la membrane de 100 kDa et 0,63 pour celle de 1 MDa. Ils indiquent une assez bonne fiabilité de la modélisation pour celle réalisée sur la membrane de 100 kDa et modélisation de fiabilité acceptable pour la membrane de 1 MDa.

Les coefficients de corrélation pour la modélisation du taux de rétention sont de 0,84 sur la membrane de 100 kDa et 0,76 pour celle de 1 MDa. Les modèles ont une bonne fiabilité de la prédiction du taux de rétention.

Les coefficients de régression des modèles et les valeurs de probabilités (p-value) sont présentés dans les tableaux 12 et 13. Les facteurs ayant une p-value en rouge ont une influence non significative.

Les coefficients de régression des taux de rétention sont proches de zéro (Tableau 12 et Tableau 13). Ainsi, la variation des facteurs (PTM, concentration et taille d'AH) ont peu d'influence sur les taux de rétention. Aucune cohérence entre les conditions opératoires et la variation des taux de rétention n'a pu être établie. La faible variation des taux de rétention expérimentaux semble être responsable de l'absence de cohérence. Les taux de rétention des membranes sont compris entre 0,94 et 1 pour

la membrane de 100 kDa et entre 0,92 et 0,99 pour la membrane de 1 MDa (Figure 49). La recirculation en début d'UF permet d'obtenir une rétention maximale de l'AH quelles que soient les conditions opératoires. La rétention de l'AH est sensiblement meilleure avec la membrane de 100 kDa.

Tableau 10. Plan d'expériences (plan complet) de l'étude de l'influence de la PTM et de la concentration sur le taux de rétention et le flux de perméat en fonction de la taille d'AH, en ultrafiltration sur membrane de 1 MDa. L'AH est dissous dans de l'eau osmosée.

	PTM (bar)	Taille (MDa)	Concentration en AH (g.l ⁻¹)	J (μm.s ⁻¹)	Taux de rétention
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	1,5	2	0,5	32	0,92
2	2,5	2	0,5	26	0,95
3	3,5	2	0,5	45	0,97
4	1,5	3	0,5	48	0,95
5	2,5	3	0,5	47	0,98
6	3,5	3	0,5	56	0,93
7	1,5	4	0,5	45	0,93
8	2,5	4	0,5	60	0,98
9	3,5	4	0,5	43	0,87
10	1,5	2	1	26	0,94
11	2,5	2	1	24	0,97
12	3,5	2	1	35	0,98
13	1,5	3	1	27	0,99
14	2,5	3	1	40	0,99
15	3,5	3	1	43	0,97
16	1,5	4	1	25	0,98
17	2,5	4	1	45	0,98
18	3,5	4	1	30	0,96
19	1,5	2	1,5	19	0,95
20	2,5	2	1,5	23	0,98
21	3,5	2	1,5	32	0,99
22	1,5	3	1,5	16	0,99
23	2,5	3	1,5	25	0,99
24	3,5	3	1,5	37	0,98
25	1,5	4	1,5	21	0,97
26	2,5	4	1,5	35	0,99
27	3,5	4	1,5	20	0,97
28	2,5	3	1	42	0,99

Tableau 11. Plan d'expériences (plan complet) de l'étude de l'influence de la PTM et de la concentration en AH sur le taux de rétention et le flux de perméat en fonction de la taille, en ultrafiltration sur membrane de 100 kDa. L'AH est dissous dans de l'eau osmosée.

	PTM (bar)	Taille (MDa)	Concentration en AH (g.l ⁻¹)	J (μm.s ⁻¹)	Taux de rétention
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	1,5	2	0,5	49	1
2	2,5	2	0,5	49	1
3	3,5	2	0,5	60	0,96
4	1,5	3	0,5	47	1
5	2,5	3	0,5	50	0,98
6	3,5	3	0,5	60	0,94
7	1,5	4	0,5	57	0,99
8	2,5	4	0,5	65	0,94
9	3,5	4	0,5	67	0,95
10	1,5	2	1	43	1
11	2,5	2	1	40	1
12	3,5	2	1	52	0,96
13	1,5	3	1	33	0,99
14	2,5	3	1	50	0,97
15	3,5	3	1	53	0,95
16	1,5	4	1	41	0,98
17	2,5	4	1	59	0,97
18	3,5	4	1	60	0,95
19	1,5	2	1,5	27	1
20	2,5	2	1,5	27	1
21	3,5	2	1,5	39	0,99
22	1,5	3	1,5	16	0,99
23	2,5	3	1,5	40	0,99
24	3,5	3	1,5	37	0,97
25	1,5	4	1,5	19	0,99
26	2,5	4	1,5	47	0,97
27	3,5	4	1,5	42	0,97
28	2,5	3	1	50	0,97

Tableau 12. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation, par un polynôme du second degré, du flux de perméat et du taux de rétention en l'ultrafiltration de l'AH sur membrane 1 MDa en fonction de la PTM et de la concentration à différentes tailles d'AH.

	Taux de rétention		J ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Constant	1,00	0,000	1,58	0,000
X ₁	0,00	1	0,07	0,006
X ₂	-0,00	0,780	0,04	0,079
X ₃	0,02	0,000	-0,13	0,000
X ₁ * X ₁	-0,01	0,005	-2,11	0,260
X ₂ * X ₂	-0,01	0,038	-3,61	0,061
X ₃ * X ₃	-0,01	0,051	0,914	0,620
X ₁ *X ₂	-0,02	0,002	-0,04	0,151
X ₁ *X ₃	0,01	0,310	0,03	0,244
X ₂ *X ₃	0,06	0,239	-0,04	0,152

Tableau 13. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation, par un polynôme du second degré, du flux de perméat et du taux de rétention en l'ultrafiltration de l'AH sur membrane 100 kDa en fonction de la PTM et de la concentration à différentes tailles d'AH.

	Taux de rétention		J ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
Constant	0,97	0,000	48,04	0,000
X ₁	-0,01	0,000	6,24	0,000
X ₂	-0,01	0,000	3,20	0,000
X ₃	0,00	0,013	-9,57	0,000
X ₁ * X ₁	-0,00	0,536	-2,12	0,141
X ₂ * X ₂	0,00	0,308	2,18	0,130
X ₃ * X ₃	0,00	0,162	-2,51	0,0843
X ₁ *X ₂	0,00	1,000	1,12	0,279
X ₁ *X ₃	0,01	0,013	1,25	0,227
X ₂ *X ₃	0,00	0,548	-0,89	0,386

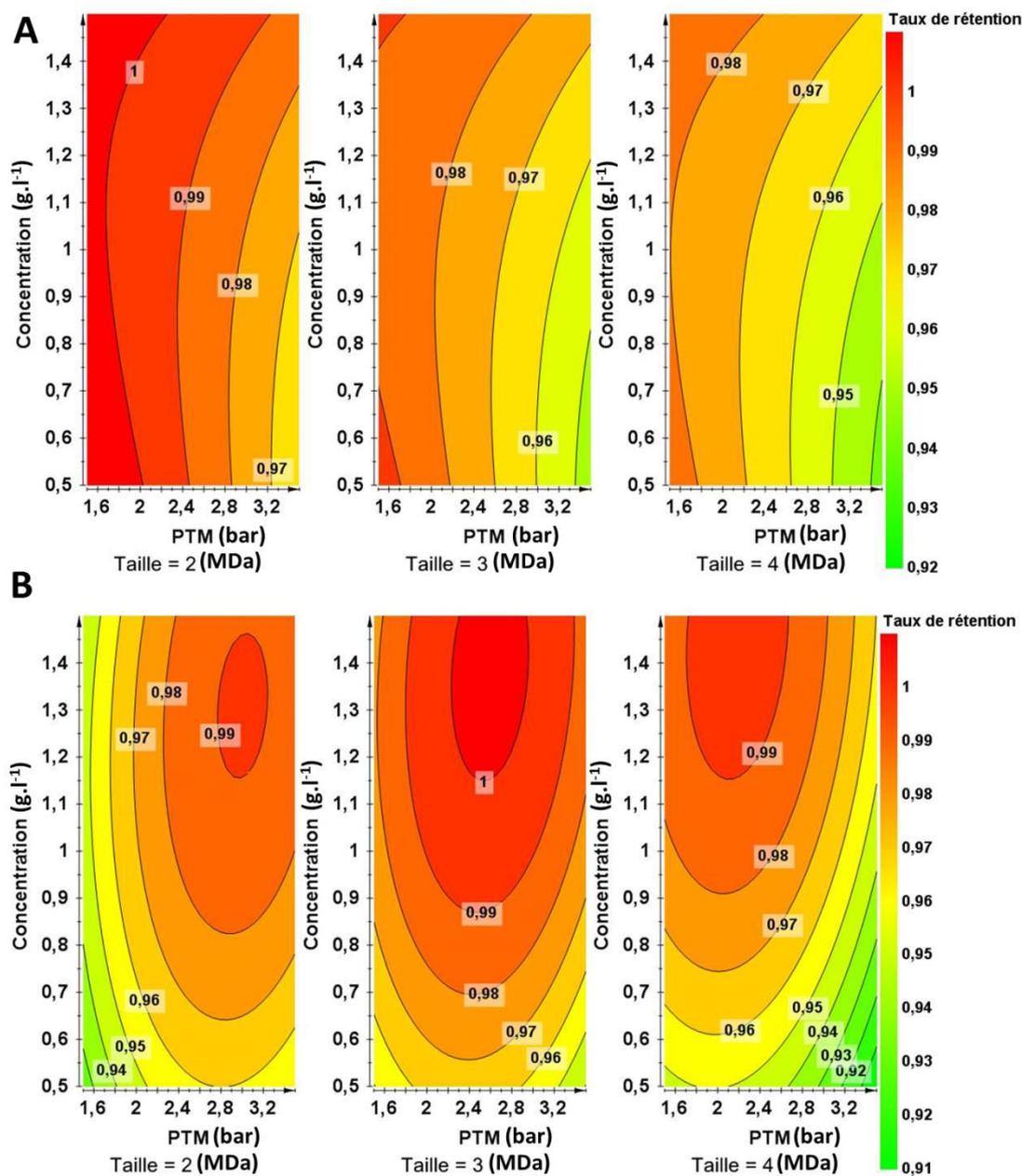


Figure 49. Influence de la PTM et de la concentration en AH en fonction de la taille sur le taux de rétention de l'AH sur membrane de 100 kDa (A) et 1 MDa (B). Les concentrations d'AH sont mesurées après 30 mn de recirculation totale. La modélisation est réalisée à partir d'un polynôme du second degré par le logiciel Modde.9.

La Figure 50 montre l'évolution du flux de perméat en fonction de la PTM, de la taille et de la concentration pour une séparation sur une membrane de 100 kDa (A) et de 1 MDa (B).

Pour les deux membranes, les profils d'évolution du flux de perméat sont les mêmes et aucune interaction entre les facteurs n'a été observée (p -value > 0,1). Plus la PTM est élevée, plus le flux de perméat est important. En effet, plus la différence de pression est importante de part et d'autre de la membrane, plus le flux est important selon la loi de Darcy. Les membranes supportent une PTM de 3 bar au maximum ; il sera donc choisi une PTM de 2,5 bar afin de préserver au mieux l'intégrité des membranes.

Moins la concentration en AH est élevée, plus le flux de perméat est élevé. La concentration en AH dans le rétentat conduit à l'augmentation de la concentration dans la couche de polarisation ce qui augmente la résistance au flux de perméat. La concentration en AH qui sera de préférence utilisée est de 1 g.l^{-1} afin de ne pas trop diluer les solutions ce qui peut poser un problème à grande échelle.

La taille présente un effet mineur sur la séparation. Cependant plus la taille est importante, plus le flux est important. Les chaînes d'AH de grande taille peuvent former un réseau plus lâche dans la couche de polarisation que les molécules de plus petite taille, du fait de leur encombrement stérique plus important. Cependant, ce paramètre n'est pas à choisir mais il est imposé par la culture bactérienne. Une légère variation du flux peut alors être attendue selon les tailles d'AH.

Le débit de perméat est plus important avec la membrane de 100 kDa qu'avec la membrane de 1 MDa. Ceci semble dû aux propriétés propres d'écoulement des membranes car les valeurs de résistance membranaire en eau des deux membranes sont de $83,6 \text{ bar.mn.ml}^{-1}$ pour la membrane de 1 MDa et de $47,7 \text{ bar.mn.ml}^{-1}$ pour la membrane de 100 kDa.

La membrane de 100 kDa présente les meilleures rétentions et productivité, elle sera donc choisie pour la séparation de l'AH par UF.

Les équations de modélisation du flux en fonction de la PTM (X_1), la concentration (X_2) et la taille d'AH (X_3) pour la membrane de 100 kDa (équation 37) et 1 MDa (équation 38) sont présentées ci-après :

$$Y = 6,24 X_1 + 3,20 X_2 - 9,57 X_3 + 48,04 \quad (\text{Equation 37})$$

$$Y = 0,07 X_1 + 0,04 X_2 - 0,13 X_3 + 1,58 \quad (\text{Equation 38})$$

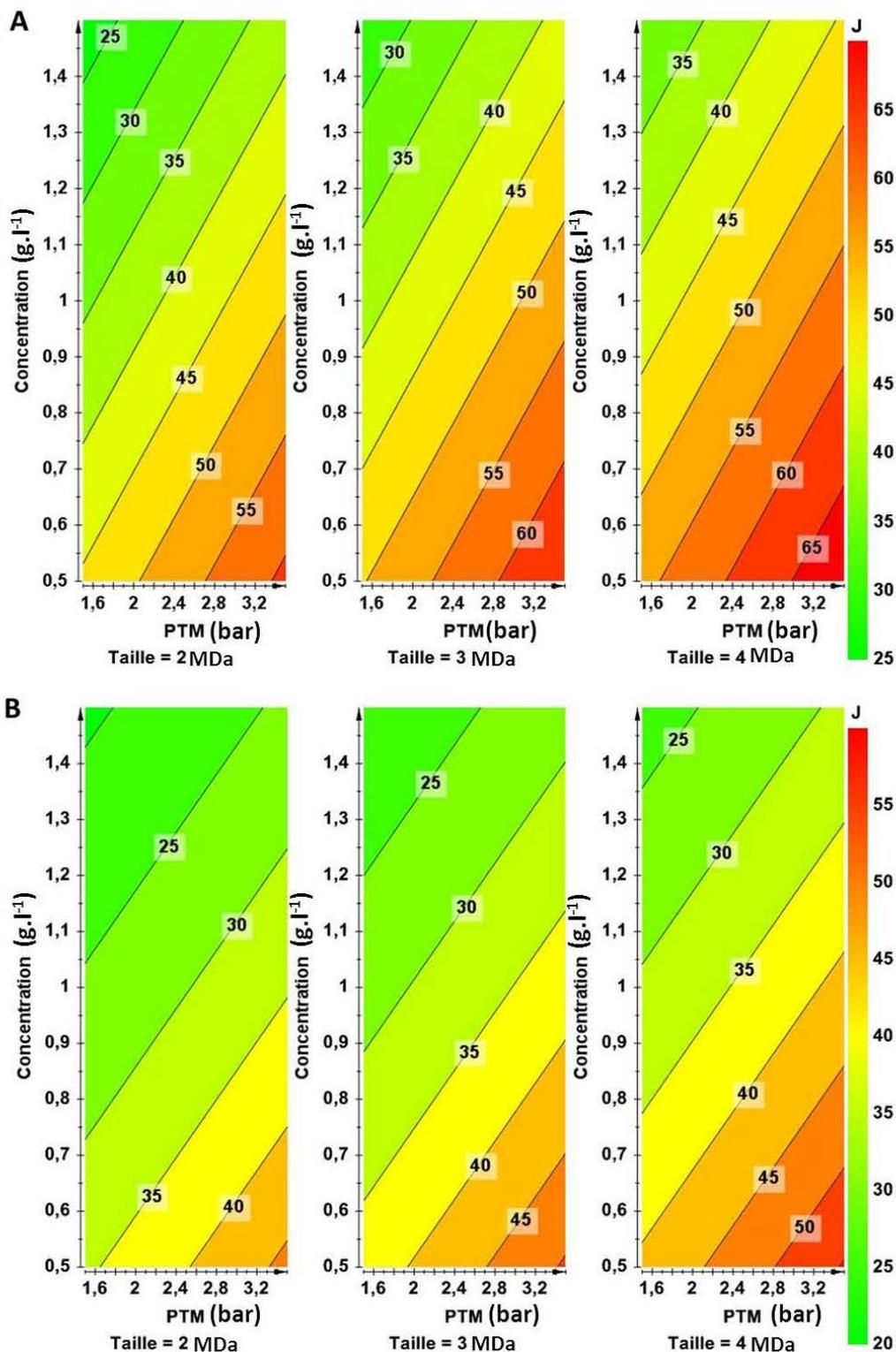


Figure 50. Influence de la PTM et de la concentration en AH en fonction de la taille sur le flux de perméat sur membrane de 100 kDa (A) et de 1 MDa (B). Le flux de perméat est mesuré après 30 mn de recirculation totale. La modélisation est réalisée à partir d'un polynôme du second degré par le logiciel Modde.9.

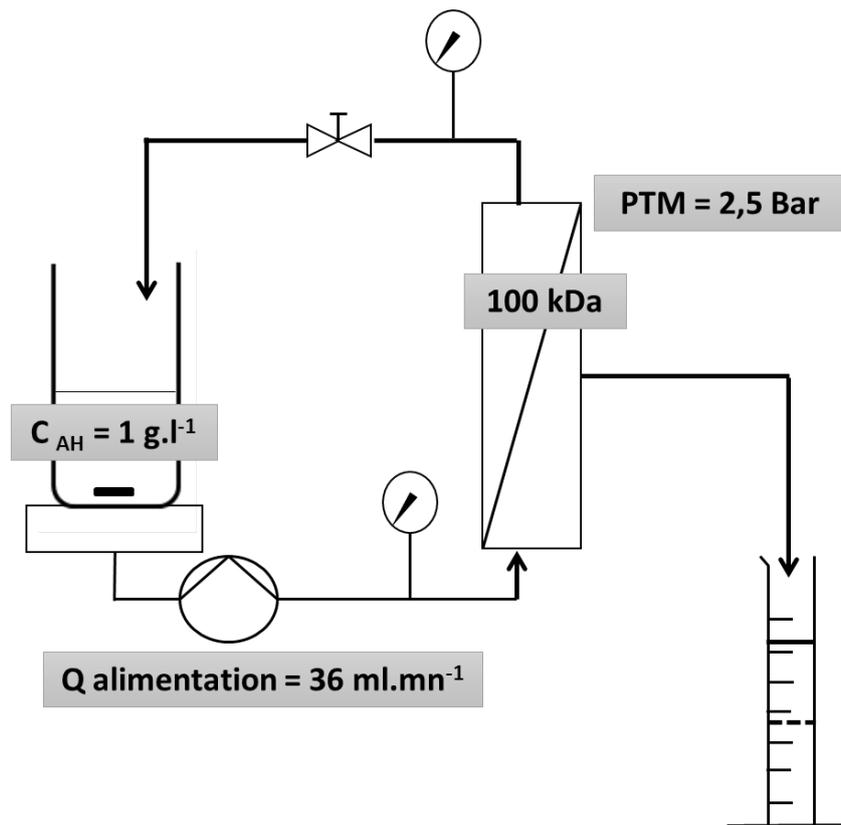


Figure 51. Récapitulatif des conditions opératoires permettant d'améliorer la rétention de l'AH et le flux de perméat d'ultrafiltration.

La sélectivité de taille par séparation membranaire n'est pas envisageable. En revanche, la purification de l'AH par diafiltration est un choix judicieux.

L'étude des paramètres opératoires de l'ultrafiltration a permis de mettre en avant les conditions permettant l'obtention du meilleur flux de perméat et taux de rétention possible. Les conditions retenues sont les suivantes :

- débit d'alimentation : 36 ml.mn^{-1}
- PTM : $2,5 \text{ bar}$
- seuil de coupure : 100 kDa
- concentration en AH : 1 g.l^{-1}
- recirculation totale de 30 mn en début d'UF.

➤ **Prédiction des performances de purification par diafiltration**

Article : **A complete study of Hyaluronic acid purification by diafiltration**

Nadia Oueslati, Pierrick Leblanc, Alice Bodin, Christelle Harscoat-Schiavo, Emmanuel Rondags, Stéphane Meunier, Romain Kapel and Ivan Marc

Keys words: Hyaluronic acid, diafiltration, tangential filtration, modeling, purification.

Abstract

The performances of hyaluronic acid (HA) purification (yield, purity, permeate flow rate and productivity) in a semi-synthetic medium composed of salts, proteins/peptides by diafiltration through a 100 kDa PES membrane were studied over 10 diavolumes (DV). The HA purity went from 3 % to almost 100 % with a yield in the retentate close to 100 % at the end of the process. The permeate flow rate showed a peculiar trend due to the influence of charged microsolute. Such a behavior has never been observed to our knowledge. On the basis the mass balance equation in DF and correlations that link the conductivity in the retentate compartment to mass transport terms associated to permeate flux equations, a simple methodology for predicting the evolution of HA yield, purity and productivity was proposed. This methodology was validated with a *Streptococcus zooepidemicus* culture medium. Differences between calculated and experimental values never exceeded 10 %.

○ **Introduction**

Hyaluronic acid (HA) is a linear and unbranched mucopolysaccharide widespread in human soft tissues. Its backbone is composed of $\beta(1-3)$ linked N-acetylglucosamine and glucuronic acid and disaccharide units are linked by $\beta(1-4)$ glycoside bonds. HA has various physical functions including lubrication, water homeostasis, filtering effects and regulation of plasma protein distribution (Fraser, Laurent, et Laurent 1997). HA is biocompatible, non-immunogenic and thus suitable for biomedical or cosmetic applications (Kogan et al., 2007; Chen et al., 2008). The worldwide demand of HA in these industrial areas goes increasing for around a decade.

Historically, HA was obtained by extraction from rooster combs. This process was time and cost consuming and induced high risk of cross contaminations. Nowadays, HA are from microbial strains of group A or D streptococci like *Streptococcus equi* cultivated in controlled bioreactors (Huang et al., 2008; Shiedlin et al., 2004; Yamada et Kawasaki, 2005).

After the production step, HA has to be separated from cells and purified from the various molecules composing the complex culture medium. To do so, precipitation assisted by organic solvent (such as ethanol (Pires et al., 2010; Smidsrød et Haug, 1967), isopropanol (Reddy et al., 2011)) or by complexation adjuvants like cetylpyridiniumchloride is classically achieved (Woolcock, 1974). However, this requires either large amounts of organic solvents or further downstream steps to remove the adjuvants.

Tangential ultrafiltration is a well-known solvent-free separation process. During this process solutes and water pass through an UF membrane under a transmembrane pressure given by a pump and a backpressure valve. The separation performances (solute of interest yield, purity and productivity) depend on permeate flux and solute retentions, that depend themselves on many factors (membrane pore size and nature, solute steric hindrance, pH, solute concentrations, permeate viscosity, transmembrane pressure, etc.). UF is a highly productive but poorly selective process. However, in the case of macrosolute (with high retention) and microsolute (with low retention) separation, a high macrosolute purity can be obtained in a diafiltration (DF) mode. In DF, permeate is collected while the retentate is recycled in the feed tank, which is also fed by fresh de-ionized water or buffer. After the production step in a bioreactor, HA are in complex mixtures composed of minerals, organic acids, aminoacids and peptides from microbial conversion of the starting culture medium. It was shown that HA produced by *Streptococcus zooepidemicus* was highly retained (> 0.9) by a 100 kDa membrane (Zhou et al., 2006). After 10 diavolumes, the overall HA yield was up to 77 % while salts and proteins were quickly eliminated (Choi et al., 2005). As a consequence, DF should be very interesting for HA purification due to the large difference in molecular weight between HA and

other components. But no complete study investigating HA separation and permeate flow rate during DF has ever been reported to our knowledge.

The aim of this study was to investigate DF performances including yield, purity and productivity for HA purification. In the first part of the study, HA purification from a semi-synthetic mixture by DF using a 100 kDa membrane was monitored. The semi-synthetic mixture was developed by combining the media used by Patil et al., 2010, Kim et al., and Nielson et al., 2009 (Kim et al., 1996; Patil et al., 2011; Nielsen et al., 2009). This medium was roughly composed of charged microsolute and aminoacids/peptides. The evolutions of HA, charged microsolute and aminoacids/peptides concentrations were monitored as well as the permeate flux. From classical mass balance and permeate flux equations, a simple methodology for predicting DF performances is proposed. Eventually, this methodology was validated with a HA production medium obtained in bioreactor using the medium and operating conditions proposed by Lai, 2011.

- **Material and methods**

- ✓ **Material**

Freeze-dried HA (2 MDa) was obtained from HLT biotechnology (Javene, France). Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), brain heart infusion (BHI), yeast extract, casein peptone, glucose, sodium dodecyl sulfate (SDS), NaHCO₃, MnSO₄ and NaC₂H₃O₂ were purchased from Sigma Corporation (St-Quentin Fallavier, France). Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄ and NaOH were procured from CarloErba (Val-de-Reuil, France). MgSO₄ was obtained from VWR Prolabo (Haascrode, Belgium) and CaCl₂ from Thermo Fischer Scientific (Leicestershire, United Kingdom).

- ✓ **Diafiltration experiments**

The filtration experiments were achieved with a tangential flow filtration system Cogent μ scale (Millipore, Molsheim, France) (Figure 52). The membrane was a planar polyethersulfone (PES) membrane (50 cm²) with a NMWCO of 100 kDa (Molsheim, Millipore, France). Both the transmembrane pressure and retentate flow rate were kept constant at 2.5 bar and 36 ml.min⁻¹ respectively. The separation was performed at room temperature. The feed tank (200 ml) was fed with fresh de-ionized water at the permeate flow rate so its volume remained constant over the whole separation. Two MDa HA at 1 g.l⁻¹ in a semi-synthetic mixture (1 g.l⁻¹MgSO₄, 10 mg.l⁻¹ MnSO₄, 2.5 g.l⁻¹ NaHCO₃, 4.5 g.l⁻¹ NaC₂H₃O₂, 4.5 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 7.75 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 2.5 g.l⁻¹ casein peptone, 7.5 g.l⁻¹ yeast extract, 10 mg.l⁻¹ CaCl₂) and HA produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Farrow and Collins (ATCC® 6580™) accordingly to Lai, 2011 (Lai 2011) were implemented. Permeate flow rates were measured and samples in retentate and permeate compartments were taken every

time 1 diavolume (200 ml) passed through the membrane for HA concentration, conductivity, aminoacids/peptides and dry matter quantification.

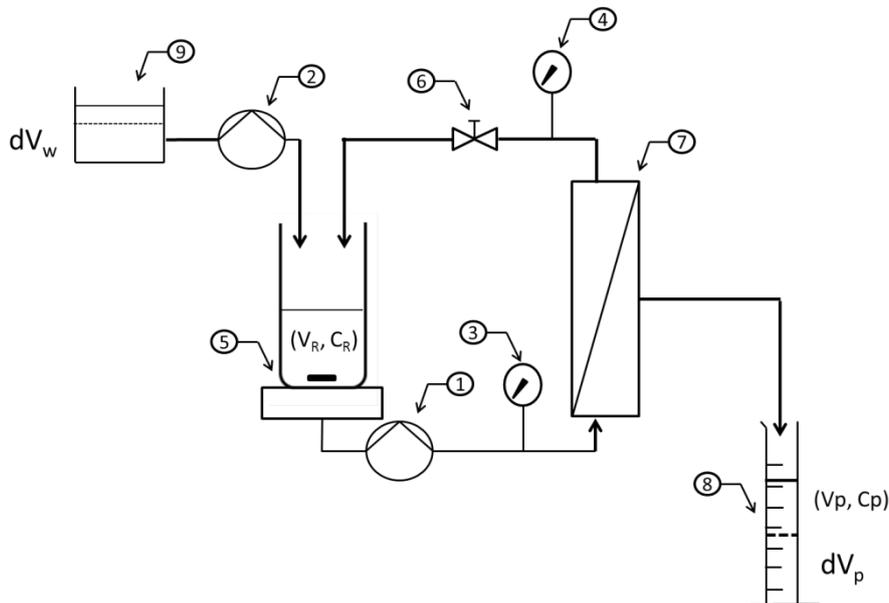


Figure 52. Schematic diagram of the membrane filtration system (1, 2: peristaltic pump; 3, 4: pressure gauge; 5: magnetic agitator; 6: valve; 7: membrane module; 8: permeate tank; 9: water tank).

✓ **HA production in bioreactor**

The HA was produced by *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* Farrow and Collins (ATCC® 6580™). The culture medium was composed of: 0.5 g.l⁻¹ MgSO₄, 2 g.l⁻¹ K₂HPO₄, 2 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 0.5 g.l⁻¹ (NH₄)₂PO₄, 50 g.l⁻¹ glucose, 10 g.l⁻¹ tryptone and 10 g.l⁻¹ yeast extract (Lai 2011). The microorganism was cultivated for about 24 h in BHI to develop the inoculum. Then, the inoculum was added to obtain 5.10⁷ cells.ml⁻¹. Fermented broths were produced in Applikon ADI 1032 stirrer controller (AppliKon biotechnology, Schiedam, the Netherlands) in 5 l bioreactor using a working volume of 4 l. The cultures were carried out for 48 h in the conditions cited by Lai et al., (2011). The cells were eliminated by frontal filtration.

✓ **Analytical methods**

- Aminoacid/ peptide quantification

The protein concentration was determined by the BCA protein assay reagent (Thermo Fischer Scientific, Leicestershire, United Kingdom). 25 µl of sample were introduced into a microplate well. 200 µl of working reagent (50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA reagent B) were added and the plate was thoroughly mixed on a plate shaker for 30 s. Then, the plate was incubated at 37 °C for

30 min and the absorbance was read at 562 nm. The protein concentrations were determined thanks to a standard curve established between 0 to 1 g.l⁻¹ with Bovine Serum Albumin (BSA).

- HA characterization

HA quantification

The CTAB reagent (2.5 g) was dissolved in 100 ml of 2 % (w/v) NaOH (Oueslati et al. 2014). 50 µl of HA standard solutions were introduced into 96 well plates, filled with 50 µl of 0.1 M phosphate buffer pH 7 and which were incubated at 37 °C for 15 min in the UV-VIS spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Scientific, Gometz-le-Châtel, France). Then, 100 µl of CTM reagent at 37 °C were added to each well plate, incubated for 10 min at 37 °C. The plates were shaken for 10 s at the beginning and at the end of this incubation. Absorbance was read at 600 nm against the blank (HA solution replaced by 0.1 M phosphate buffer pH 7) and plotted against HA concentrations. The slope of the standard curve was obtained by a linear regression for HA concentration range between 0 and 0.6 g.l⁻¹.

HA size determination

The HA integrity was determined by gel permeation chromatography-light scattering. 50 µl of HA solution at 0.5 g.l⁻¹ were injected into a GPC-LS apparatus (Malvern, Orsay, France). The GPC-LS apparatus was constituted of a pre-column, two columns (A6000M and A7000, Malvern) connected in series, a light scattering (LS) detector and a Refractive Index (RI) detector. The eluent was phosphate buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KH₂PO₄) pH 7.4 at a flow rate of 0.35 ml.min⁻¹. The universal calibration was performed with PEO-19kD (Malvern). The Dn/Dc used to determine the HA concentration was 0.147 ml.g⁻¹ (experimentally determined value).

- Charged microsolute quantification

Semi-synthetic medium and production medium containing HA can be roughly divided into 3 fractions: a fraction of charged microsolute (minerals, metabolites etc...), a fraction composed of HA and a third fraction containing aminoacids/peptides. As a consequence, for every sample, the charged solute fraction was quantified from the dry matter, HA and aminoacids/peptides as follows (equation 39):

$$(\text{Charged microsolute}) = (\text{dry matter}) - ((\text{HA}) + (\text{aa / peptides})) \quad (\text{Equation 39})$$

The dry matter was obtained by 48 h desiccation in drying oven at 105 °C of 5 ml solutions. The aminoacids /peptides and HA were determined as presented above.

- **Results and discussion**
- ✓ **Purification of HA in a semi-synthetic medium**
 - Evolution of solutes concentration in the course of DF

The purification of 2 MDa HA at 1 g.l⁻¹ included in a semi-synthetic medium with a composition close to a medium obtained at the end of a production step in a bioreactor was studied. The media contained minerals, peptone, yeast extract mainly. The overall solute composition was divided into three categories: HA (macrosolute), charged microsolute (mainly minerals/salts) and aminoacids/peptides (protein microsolute). Figure 53 shows the evolution of their relative concentrations (C/C₀) in the feed tank in the course of DF (using a 100 kDa membrane at 2.5 bar of TMP).

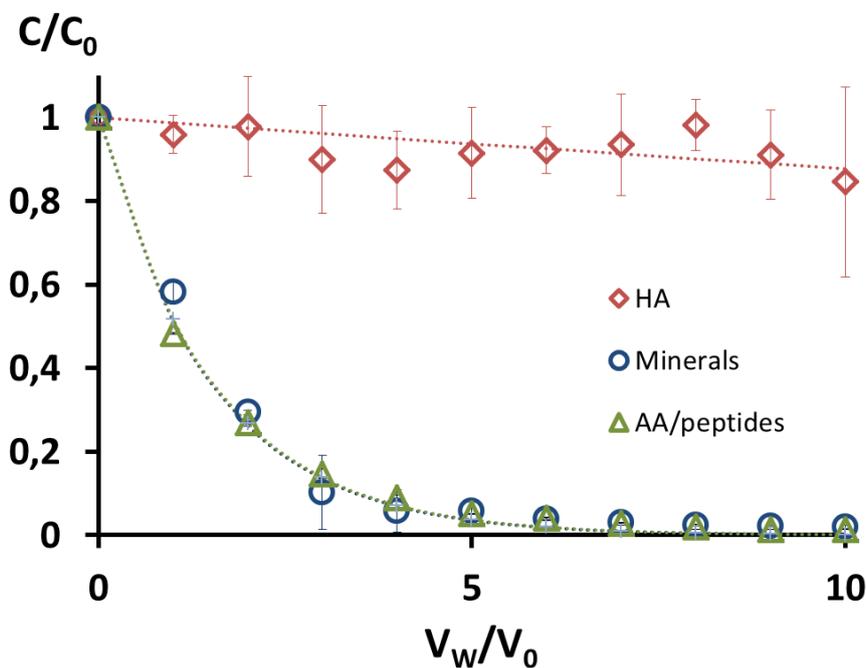


Figure 53. Relative concentration of 2 MDa HA, aminoacids/peptides and minerals in the course of DF (100 kDa PES membrane at 2.5 bar of TMP). V_w/V₀ corresponds to the number of diavolume that passed through the membrane. HA, aminoacids/peptides and minerals relative concentrations were calculated from CTM, BCA and conductivity analysis respectively. The theoretical relative concentrations are presented in dotted line.

C/C_0 of aminoacids/peptides and charged microsolute decrease drastically during the four first diavolumes while HA remains nearly constant in the retentate, mainly. This clearly indicates a high retention (R) of HA and a low R of proteins and minerals. The mass balance equation in the feed compartment (Equation 40) given below was used to calculate HA, charged and amino-acids microsolute R values (least-squares method):

$$\frac{C}{C_0} = e^{-\frac{(1-R)V_w}{V_0}} \quad \text{(Equation 40)}$$

C is the solute concentration in feed tank (g.l^{-1}), C_0 , the initial solute concentration, V_w the volume of water added to the feed tank (m^3), V_0 the initial feed tank volume (m^3) and R the retention. V_w/V_0 corresponds to the number of diavolumes that passed through the membrane.

R_{HA} , $R_{\text{protein microsolutés}}$ and $R_{\text{minerals microsolutés}}$ were 0.99, 0.34 and 0.33 respectively. R_{HA} high value was not surprising considering the large difference between membrane cut-off (100 kDa) and HA molar weight (2 MDa). This is in good accordance with retention value of 1.5 MDa (> 0.9) observed by other authors with a 100 kDa membrane at the same TMP (Zhou et al., 2006). Aminoacids/peptides and charged microsolute retentions were higher than expected. Minerals and aminoacids are both charged solutes and at pH 7, HA carboxylic groups are also charged. So, it can be assumed that the relatively high retention value of these solutes is due to electrostatic interactions with HA either in the bulk or at the polarization layer. Such interactions between minerals and salts have already been clearly shown (Mo et al., 1999). Nevertheless, even with a retention value around 0.3, aminoacids/peptides and the charged microsolutés were satisfactorily eliminated by diafiltration.

- Evolution of HA yield and purity in the course of DF

Yield and purity are two important performance criteria for the evaluation of a separation process. The evolution of HA yield and purity in the feed tank during DF are presented in Figure 54. A slight loss of HA, that reached 20 % after 10 diavolumes was observed, which is consistent with the high HA retention. The purity went increasing quickly up to 6 diavolumes near 102 % (+/- 3 %) and got stable beyond. At this point of DF, HA yield was higher than 92 % (+/- 6 %). Then, as expected, DF in these conditions was particularly efficient for HA purification.

The yield (η) of a solute is simply given by the ratio C/C_0 . Considering Eq. 41, HA yield only depends on its retention and it can be written as follows (eq. 27):

$$\eta_{\text{HA}} = e^{-\frac{(1-R_{\text{HA}})V_w}{V_0}} \quad \text{(Equation 27)}$$

The purity (P) of a solute is the ratio $C/\sum C_i$ (I being the i component in the feed tank mixture). Thus, P can be expressed as follows (equation 41):

$$P_{HA} = \frac{C_{0HA} e^{-\frac{(1-R_{HA})V_W}{V_0}}}{\sum C_{0i} e^{-\frac{(1-R_i)V_W}{V_0}}} \quad (\text{Equation 41})$$

With C_{0i} the initial solute concentration, R_i the solute retention and C_{0HA} the initial HA concentration. Beside HA, the other components are charged microsolute and aminoacids/peptides. HA purity can be calculated at any diavolume from their initial concentration and retention. Experimental HA yield and purity as a function of diavolume were compared to calculated values using equation 27 and 41 with retention and initial concentrations shown in **Table 14** (Figure 54).

Table 14. Initial concentration (C_0) and retention (R) of each component group of the mixture. R is calculated from experimental data. HA and aminoacids initial concentrations were from CTM, and BCA assays respectively. Charged microsolute are deduced by difference with dry matter concentration.

	C_0 (g.L ⁻¹)	R (-)
Aminoacids/peptides	1.57	0.34
Charged microsolute	17.07	0.33
Hyaluronic acid	1.07	0.99

Interestingly, the calculated and experimental values are similar for both performance criteria. Relative errors for HA yield and purity did not exceed 7 % and 18 % respectively. Calculated purities were slightly lower than experimental ones but at the end of the process, experimental values were above 100 % indicating a probable overestimation of HA concentration by CTM. This result indicates that the prediction of DF performances might be calculated for any culture condition and starting culture medium by a simple estimation of retention and assay of initial concentrations of HA, aminoacids/peptides and dry matter.

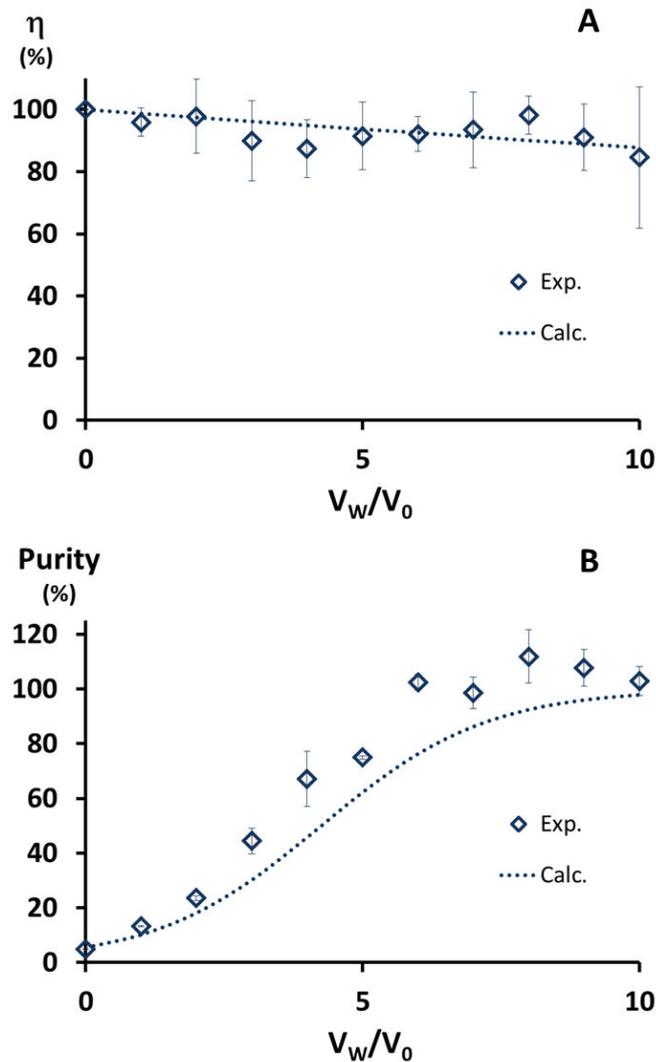


Figure 54. Yield and purity in diafiltration process versus V_w/V_0 (number of diavolumes). Theoretical and experimental yields and purities are presented in A and B respectively.

- Permeate flow rate and productivity

The third separation process performance criterion is the productivity that corresponds to the mass of HA at a given purity over the membrane area (A) and the corresponding DF duration (t_{DF}) (equation 42):

$$P_{\text{productivity}} = \frac{C_{\text{HA}} \times V_0}{t_{DF} \times A} \quad (\text{Equation 42})$$

The permeate flux changes throughout the DF time course. As a consequence, t_{DF} is expressed as (equation 43):

$$t_{DF} = \int_{V_0}^{V_w} \frac{1}{J_p \times A} \times dV_w \quad (\text{Equation 43})$$

With J_p the permeate flux (flow rate Q_p over membrane area ratio).

The permeate flux in the course of DF increases up to 8 diavolumes and gets stabilized beyond (Figure 55). This evolution is rather unusual for macromolecules/microsolute separation. Indeed, according to Yee et al (2009), the permeate flux rate should remain constant and then start decrease when fouling takes place (Yee et al., 2009). In our case, microsolute (minerals and aminoacids/peptides) have relatively high retention values. As a consequence, they participate to the polarization layer and their decreasing concentration during the process might result in an increase in the permeate flux. However, the gain observed in the course of the DF (from $14.9 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ to $37.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, i.e x 2.5) seems too high to be only explained this way.

Salts are known to influence the HA structure by shielding electrostatic repulsion of carboxyl groups in HA molecules and reducing the dimension of the molecule coils (Mo et al., 1999). Thus, the modification of the mixture composition in minerals during DF might cause a structural change of HA also impacting the permeate flux. DF of HA in deionized water and in a solution containing only the mineral part of the semi synthetic medium were achieved to check this hypothesis. Figure 55 clearly shows that the permeate flux of HA in deionized water was stable during the operation, which is the classical behavior when macrosolute are implemented. On the contrary, when HA was diafiltered with the mineral fraction of semi-synthetic medium, the flux went increasing. This clearly confirmed the impact of minerals or salts on the unusual flux evolution, probably through a modification of HA conformation that changed the polarization layer properties.

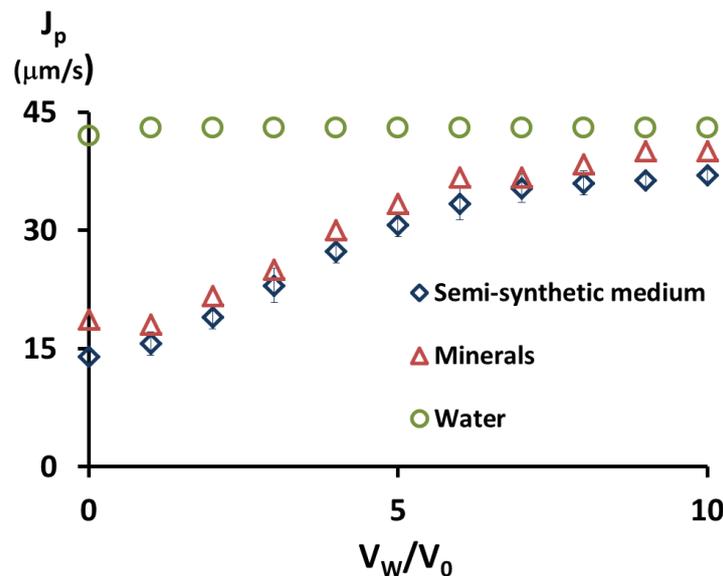


Figure 55. Permeate flow rate of HA in the time course of DF. $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ HA was introduced in semi synthetic, mineral media or water. The DF conditions were constant during the DF process (2.5 bar TMP, $36 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ feed rate and room temperature).

The permeate flux of 2 MDa HA at concentration ranging from 0.5 to 1.5 g.l⁻¹ does not increase with transmembrane pressures higher than 2,5 bar (data not shown), the HA retention is close to 1 and we neglect the influence of microsolute on the polarization layer. As a consequence, the limit flux (equation 19) can be integrated to Eq.6 and 5 for productivity calculations.

$$J_p = k \ln \left(\frac{C_w - C_p}{C_0 - C_p} \right) \quad \text{(Equation 19)}$$

Where C_w is the macrosolute concentration at the membrane surface, k a mass transfer coefficient and C_p the macrosolute concentration in at the permeate outlet (which can be neglected in the case of high retention).

The influence of minerals on C_w and k values was investigated by measuring permeate fluxes at different HA concentrations (0.5, 1 and 1.5 g.l⁻¹) and charged microsolute concentrations (0 g.l⁻¹ to 17.07 g.l⁻¹, corresponding to conductivities ranging from 0.09 to 16.78 mS.cm⁻¹, Fig. 5A). C_w and k values were calculated by regression (using equation 7) and plotted versus the conductivity (Figure 56B and 56C).

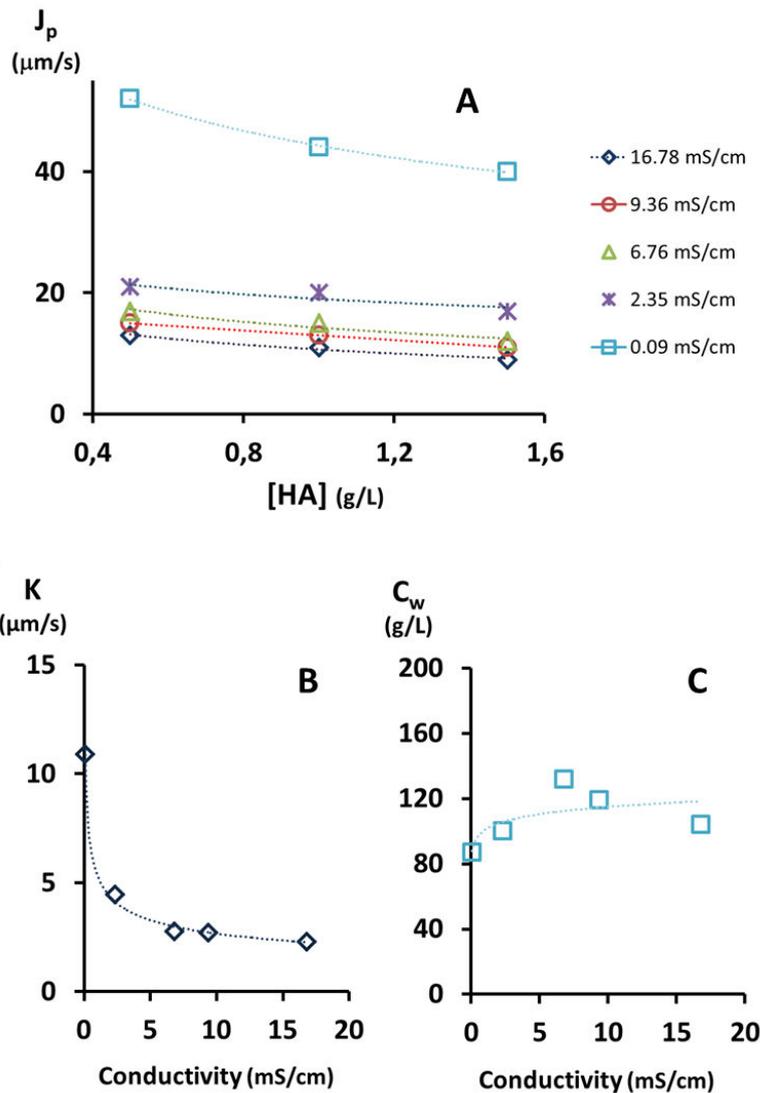


Figure 56. A- Effect of the conductivity (due to charged microsolute) on the permeate flux. B and C- The transfer coefficient k and the HA wall concentration C_w as a function of the conductivity. Coefficient values were calculated by regression from the permeate flux experiments measured at different HA concentrations and conductivities. Flux was measured after 30 min of total recirculation at 2.5 bars of PTM, $36 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ feed rate and room temperature.

k decreased largely and quickly in a conductivity range of 0 to $7.5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ and then tended to stabilize up. At the same time, a slight increase of the C_w with the conductivity was observed.

Polynomial models were deduced from the experimental evolutions of k and C_w in order to calculate the permeate flux in the course of HA DF (equation 44 and 45)

$$k = a_k \times \sigma^{b_k} \quad (\text{Equation 44})$$

$$C_w = a_{C_w} \times \sigma^{b_{C_w}} \quad (\text{Equation 45})$$

a_k , b_k , a_{C_w} , b_{C_w} are the polynomial regression coefficients for k and C_w equations respectively. Their values are presented in Table 15.

Table 15. Coefficients of the polynomial models of k and C_w

	a	b
k ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	5.4	- 0.30
C_w ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	82.7	0.17

These two equations were combined with equation 20 to give equation 46 that gives an instant J_p for a known HA concentration and conductivity.

$$J_p = (a_k \times \sigma^{b_k}) \ln \left(\frac{(a_{C_w} \times \sigma^{b_{C_w}}) - C_p}{C_0 - C_p} \right) \quad \text{(Equation 46)}$$

The evolution of conductivity during DF can be calculated using equation 40 replacing concentration terms by conductivity since it can be reasonably assumed that the composition of solutes (mainly minerals/salts responsible for the overall conductivity) does not change during the operation and using the retention of minerals.

The evolution of permeate flux using equation 46 and 40 revealed to be close to the experimental data ($R^2= 0.997$, Figure 57A) confirming the good reliability of J_p calculation. Eventually, the process productivity for a given HA purity, can be calculated as follows:

$$Productivity = \frac{V_0 \times C_{0,HA} \times e^{-(1-R_{HA}) \times \frac{V_w}{V_0}}}{\int_{V_0}^{V_w} \frac{1}{J_p} \times dV_w} \quad \text{(Equation 47)}$$

Using V_w values necessary to get the desired purity calculated from equation 41.

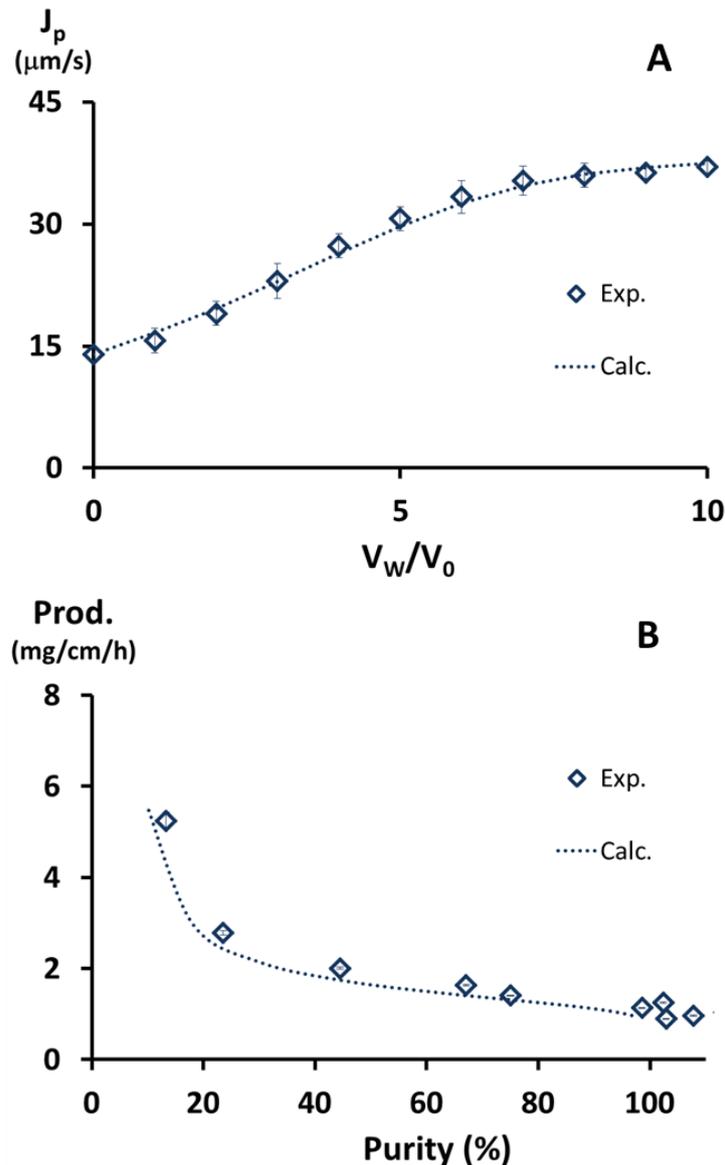


Figure 57. Semi-synthetic medium: comparison between calculated and experimental permeate fluxes, J_p , versus the number of diavolumes (A) and productivities versus purity (B) in the course of the diafiltration process.

Figure 57B compares the theoretical and experimental productivity. The theoretical values are close to the experimental data. The regression coefficient ($R^2 = 0.999$) confirms the reliability of the predictive model.

The modification of microsolute concentration has classically no impact on the limit permeate flux that only depends on the macrosolute initial concentration and the mass transport coefficients. For the purification of HA, this flux also depends on the charged microsolute concentrations that change during the operation. Such a behavior has never been observed to our knowledge. To further investigate the impact of this phenomenon on DF performances, productivities for given purities were calculated at different initial charged solute concentrations (ranging from 0 to 60 g.l⁻¹, fig 7A)

and compared with what is obtained for microsolute that would not affect the flux, i.e. aminoacids/peptides, in the same concentration range (Figure 58B). Figure 58 shows that productivities are very poor for low purities for charged microsolute compared to aminoacids/peptides. The discrepancies are more obvious at low microsolite concentrations (below 20 g.L⁻¹). Then, the differences strongly decrease with increasing purity. The differences in productivity remain significant for 95 % purity though. For high purity values, the differences are still more marked for low microsolute concentrations. The extent of the effect of microsolite concentration is more important at concentrations up to 20 g.L⁻¹ probably because beyond this value, charged molecules have no further influence on the permeate flux.

Indeed, considering the trends observed in Figure 56, mass transport coefficients k and concentrations C_w probably remain constant beyond 16.8 mS.cm⁻¹ (over 15 g.L⁻¹ of charged microsolute). The effect is very important for low purity values since the differences in permeate fluxes are particularly high for low diavolume numbers (i.e. low purities).

To summarize these results, HA yield calculation just required to know its retention and initial concentration. The calculation of purity was achieved by dividing the complex initial mixture into HA, mineral microsolute and aminoacids / peptides microsolute and applying mass balance equation to these solutes. To do that, microsolite retentions and initial concentrations were to be known. Initial concentrations were simply obtained from basic analysis of the starting mixture (BCA, CTM and dry matter weight). Retention values were deduced from concentration evolution in the course of DF but could be deduced from a quick preliminary UF experiment by measuring retentate and permeate concentrations of HA and microsolute. The permeate flux change caused by the modification of minerals concentration during DF was calculated with empirical correlations linking mineral concentrations to mass transfer coefficients k and C_w . Taking as a whole, this eventually allowed to calculate the process productivity for a given HA purity. Thereby, duration, membrane area and water or buffer amounts necessary to reach HA desired amount and pharmacopeia requirements in term of purity can be simply deduced. Furthermore, these equations can be used to predict the influence of upstream culture media optimization on downstream performances.

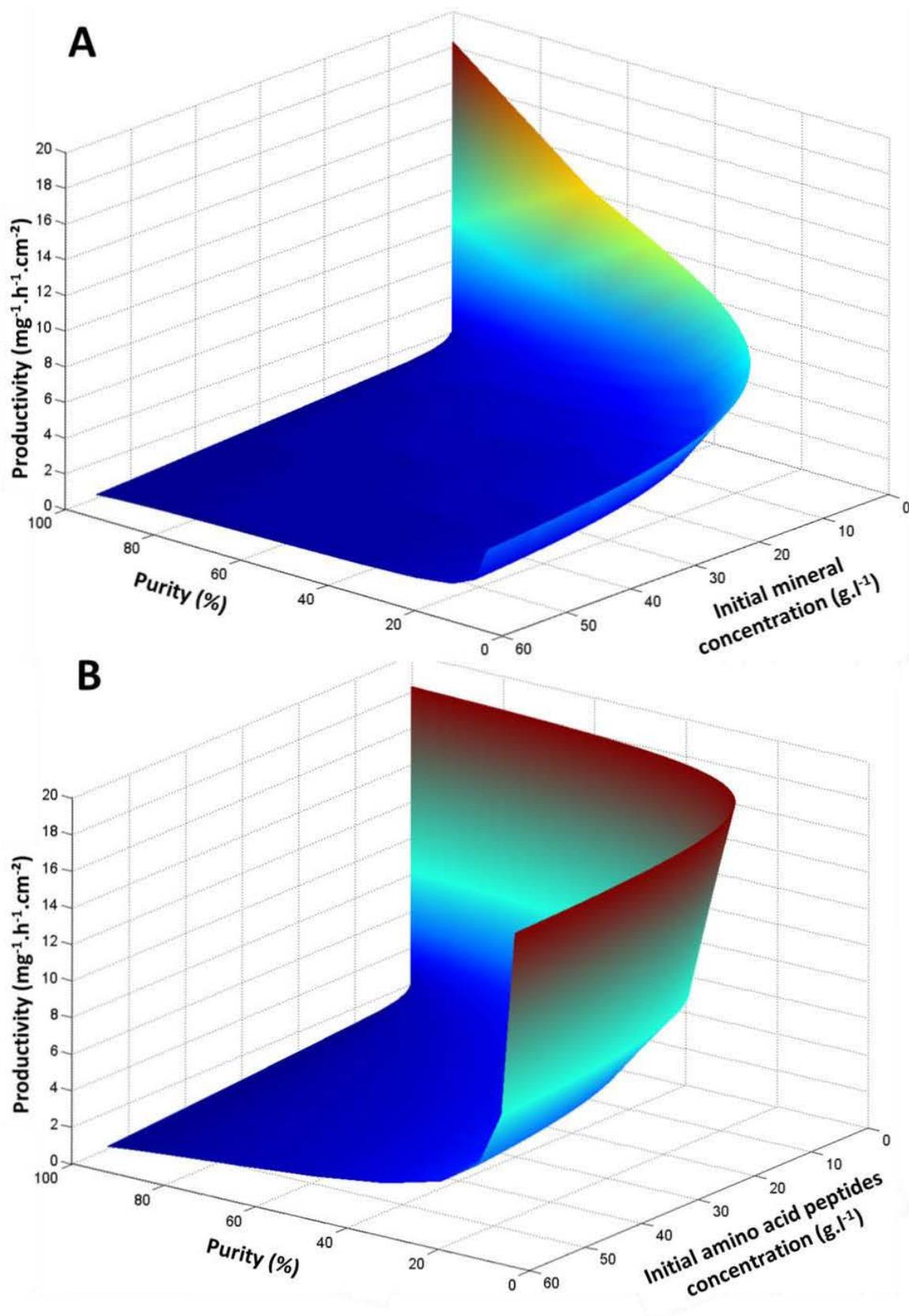


Figure 58. Impact of the initial mineral concentration (A) and aminoacids/peptide concentration (B) on the productivity calculated for purities ranging 0 to 100 %.

✓ **Validation with a mixture from an actual HA production**

HA was produced by *S. zooepidemicus* in a bioreactor from the culture medium with composition proposed by Lai, 2011. At the end of the upstream process, HA and microsolutes initial concentrations were determined and their retention (R) values were measured after 30 min of permeate and retentate recirculation in the UF conditions (2.5 bar TMP, room temperature and 36 mL.mn⁻¹ of recirculating flow rate). The initial concentrations and the retention values are presented in Table 16.

Table 16. Initial concentrations and retention values of the microsolute and HA contained in the complex HA culture medium.

<i>Solutes</i>	<i>C₀ (g.l⁻¹)</i>	<i>R (-)</i>
Aminoacids/peptides	0.99	0.01
Minerals	18.46	0.05
Hyaluronic acid	0.83	0.95

HA retention (0.95) is in good agreement with the results of the literature since a similar R value was observed with a similar membrane in the same operating conditions (Zhou et al., 2006). However, this value revealed slightly lower than expected with such a difference between solute molar size (HA 1.5 MDa) and membrane cut-off (100 kDa). The HA size and polydispersity before and after DF assessed by GPC-LALS were similar (1.5 MDa and polydispersity value of 1.5). Then, a small part of the whole HA network passed through the membrane probably under the effect of molecules produced by *S. zooepidemicus* that reduced the HA/HA cohesion.

The retention of microsolute was lower than observed with the semi-synthetic medium. Interestingly, some authors previously showed that molecules in culture medium such as peptidoglycan unit (charged positively) interact with HA (Goh, 1998) reducing the interactions (repulsion or attraction) between HA and proteins/peptides or minerals. The transmission of microsolute through the membrane would then be increased, what is observed in this case.

In any case, the yield and the purity were calculated respectively as explained above using retentions and initial concentrations in Table 16. The very good accordance between calculated and experimental data is showed in Figure 59. This clearly indicates that the methodology proposed can be applied to different mixture compositions.

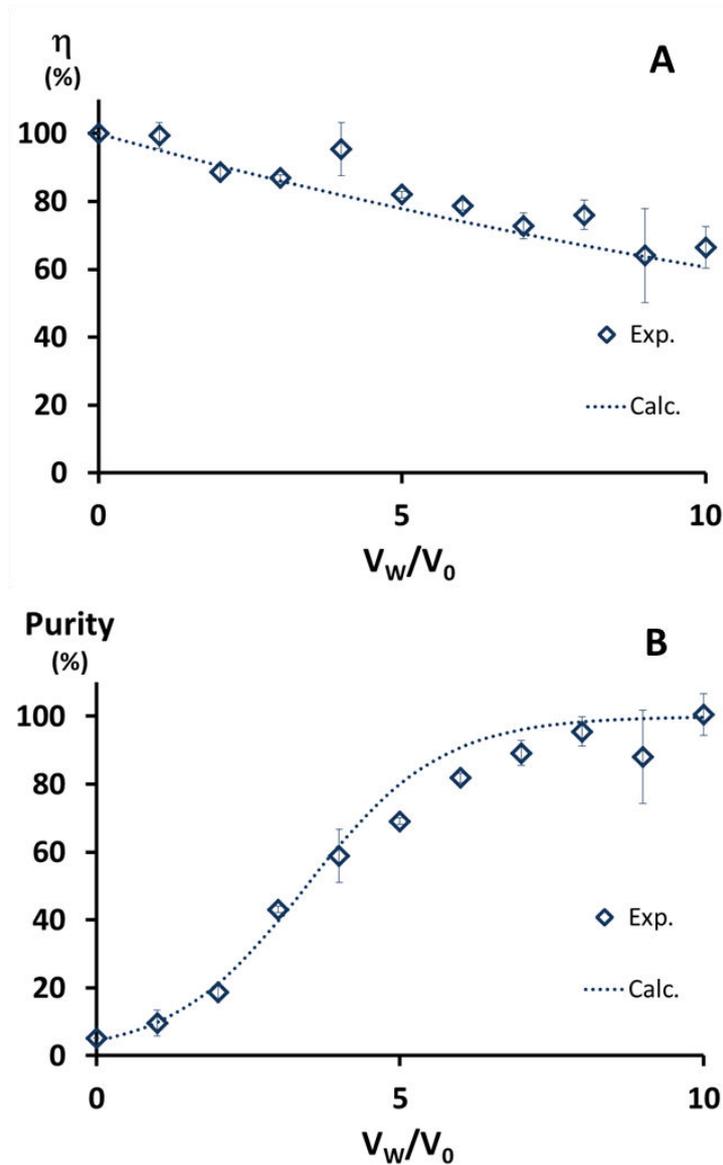


Figure 59. Natural HA mixture (microbial culture): comparison of calculated and experimental yield (A) and purity (B) versus the number of diavolumes (V_w/V_0). Permeate flow rate and productivity.

- Permeate flow rate and productivity

J and the productivity for purity ranging from 10 to 100 % were calculated. As shown in Figure 60 calculated and experimental values are very close (R^2 values over 0.999). Interestingly, this indicates that the composition of the mixture and particularly the composition of minerals did not modify much the empiric relationships proposed to calculate J and C_w . As a consequence, the methodology gives a precise estimation of DF performances.

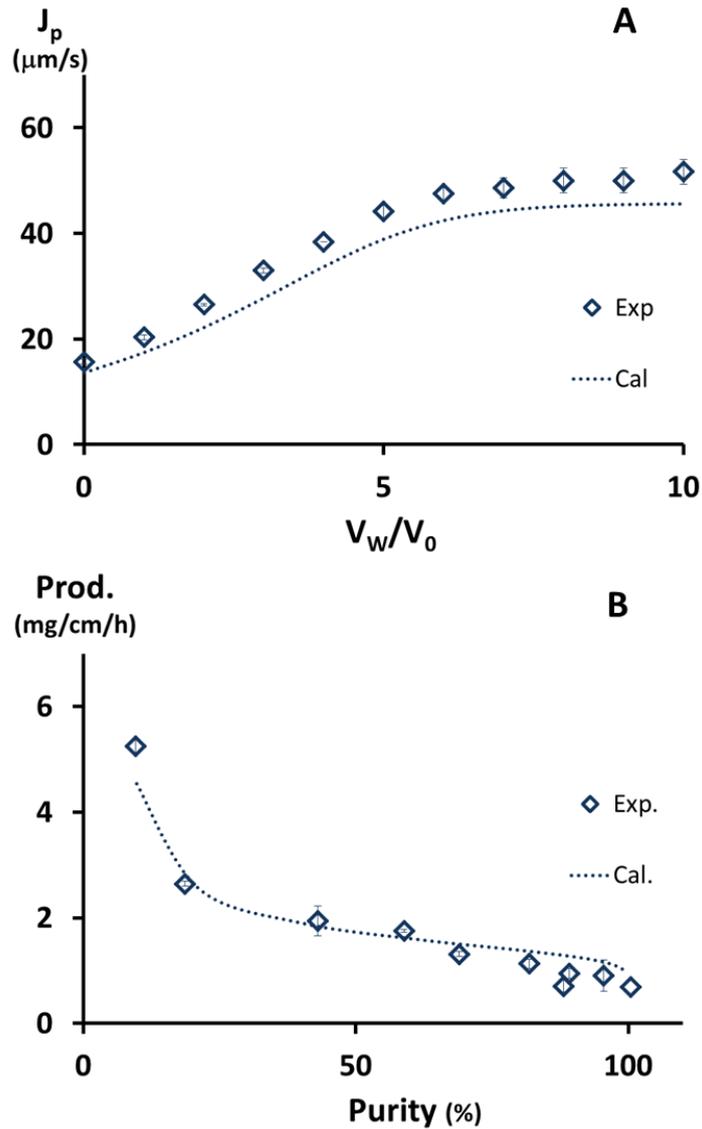


Figure 60. Comparison of the calculated and theoretical permeate flow rates versus the number of diavolumes (A) and productivity versus purity (B).

○ **Conclusion**

The evolution of the three performance criteria related to the purification of HA from a complex semi-synthetic medium was studied during diafiltration step. The results showed that in the chosen operating conditions (chosen on the basis of literature results), the diafiltration is suitable for the HA purification from a complex mixture. Indeed, a purity value near 90 % can be reached after 7 diavolumes, giving a yield higher than 90 %. The mass balance equation applied to HA, minerals and aminoacids/peptides fractions provided a satisfying estimation for HA yield and purity as a function of the water volume introduced into the feed tank.

The evolution of the permeate flux during DF was surprising since it increased during the first seven diavolumes before to get steady. The mineral fraction of the mixture revealed to be responsible for this unexpected behavior, most probably due to a modification of HA complex network structure. In this study, an empiric correlation that links the mineral fraction concentration to the mass transport coefficient k and wall concentration C_w was proposed. Thus, the prediction of the evolution of the permeate flux during DF and the calculation of the process productivity for a desired HA purity, can be simply obtained from these correlations, the evolution mass balance of minerals and the classical equation of permeate flux. To our knowledge, such a result was never reported for HA or any other biomolecule. This methodology for predicting the performance of HA purification during DF was successfully validated with a HA solution obtained by microbial culture of *S. zooepidemicus* using a standard culture medium.

➤ **Influence de la diafiltration sur les tailles d'AH (complément à l'article)**

L'AH est produit par *S. zooepidemicus* sur le milieu complexe et les conditions opératoires de Lai (2011). Après élimination des cellules à l'aide de terre de diatomée, la solution d'AH a été diafiltrée jusqu'à 10 diavolumes. La taille avant et après diafiltration a été mesurée et est présentée en Figure 61. Les tailles mesurées avant et après diafiltration se superposent. La diafiltration n'a donc pas d'influence sur la taille des AH. La taille moyenne mesurée est de 1,5 MDa avec une polydispersité de 1,5.

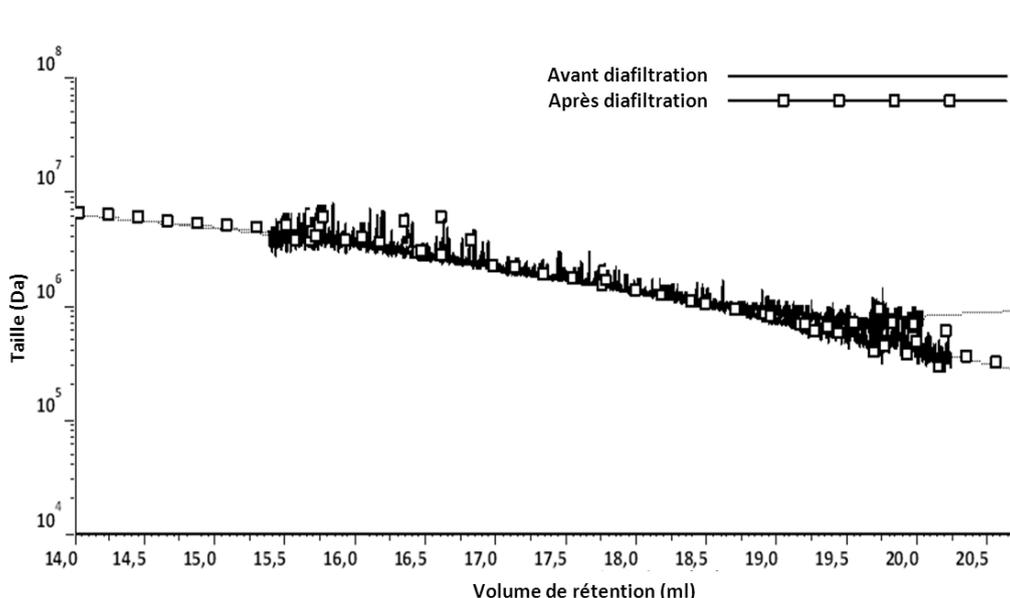


Figure 61. Influence de la diafiltration sur la taille des AH. Diafiltration à 10 diavolumes de l'AH à 1 g.l⁻¹ à température ambiante, 2,5 bar de PTM et 36 ml.mn⁻¹ de débit d'alimentation. Tailles mesurées par CES/Diffusion de la lumière. Les distributions de taille avant et après diafiltration sont superposées.

➤ **Contribution de l'article**

Les deux principaux aspects originaux développés dans cet article sont, d'une part, la prédiction de la pureté en divisant le milieu de culture en deux catégories de molécules (macromolécules et micromolécules) et d'autre par la prédiction du flux de perméat en utilisant les corrélations de coefficient de transfert et de la concentration limite au niveau de la membrane. De plus, l'implication de l'état de charge de l'AH dans le phénomène de transfert a été démontrée pour la première fois. Les résultats de toute cette démarche permettent de prédire la productivité, le rendement et la pureté en AH récupéré. Ceux-ci peuvent être utilisés afin d'agencer les étapes du procédé de purification au mieux, mais également afin d'agir en amont de la purification. De ce fait, l'utilisation d'un milieu pauvre en sels pour la production d'AH par voie microbienne permettrait d'augmenter considérablement la productivité de la diafiltration.

➤ **Identification des contaminants résiduels en fin de diafiltration**

La diafiltration permet d'atteindre le critère de pureté requis par la pharmacopée européenne. Cependant, certains composés du milieu sont particulièrement contrôlés. Il s'agit :

- des chlorures : < à 0,5 % (g de chlorure pour 100 g d'AH),
- du fer : < 80 ppm pour une solution à 25 g.l⁻¹ d'AH,
- du plomb : < 10 ppm pour une solution à 20 g.l⁻¹ d'AH,
- des endotoxines bactériennes : < 0,5 UI.mg⁻¹,
- des acides nucléiques : < 0,5 UA pour une solution à 3 g.l⁻¹ d'AH,
- des protéines : < 0,1 % (g de protéines pour 100 g d'AH).

En fin de diafiltration, ces éléments ont été recherchés afin de déterminer quel composé nécessitera une élimination ciblée. Deux milieux de culture, de compositions différentes, utilisés pour la culture de *S. zooepidemicus* ont été diafiltrés jusqu'à 10 diavolumes (4 répliqués par milieu). Les chlorures sont suivis par conductivité au même titre que les autres sels du milieu au cours de la diafiltration. Seul le milieu I présente des chlorures ($5 \cdot 10^{-4}$ M). A dix diavolumes, la conductivité des solutions est équivalente à celle de l'AH en eau (0,130 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour une solution à 1 g.l⁻¹ d'AH). De ce fait, la quasi-totalité des sels est éliminée quel que soit le milieu. Le fer et le plomb sont quantifiés par ICP-OES avant la diafiltration. Les concentrations mesurées sont inférieures aux normes de la pharmacopée européenne (7 ppm pour le fer et 3 ppm pour le plomb pour le milieu I et 3 ppm pour le fer et 6 ppm pour le plomb en moyenne en initial sur le milieu II). De plus, ils sont presque totalement éliminés au cours de la diafiltration (0,2 ppm pour le fer et plomb en final pour les deux milieux). Contrairement aux sels, fer et plomb, les quantités de protéines et d'acides nucléiques à dix diavolumes dans les

différents milieux de culture sont supérieures aux normes de la pharmacopée européenne (Figure 62). Les endotoxines bactériennes à caractère pyrogène sont des lipopolysaccharides, constituants de la paroi des bactéries à gram négatif. *S. zooepidemicus* est une bactérie à gram positif. En conséquence, le milieu ne devrait pas contenir d'endotoxines. Cependant, les endotoxines qui pourraient être retrouvées sont souvent liées à l'eau utilisée lors de la diafiltration ou aux matières premières utilisées pour la culture microbienne. La quantification des endotoxines est complexe et nécessite des précautions particulières au moment des essais afin d'en limiter l'apport extérieur notamment en utilisant de l'eau, des tubes, des cônes de pipettes apyrogènes. Tout ceci a conduit à négliger l'analyse des endotoxines tout au long du procédé de séparation/purification des AH.

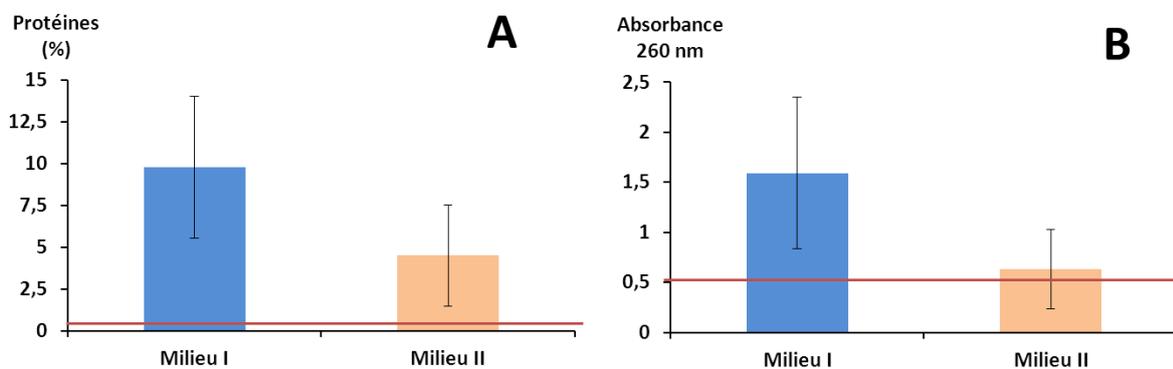


Figure 62. Positionnement de la quantité de protéines (A) et des acides nucléiques (B) à dix diavolume par rapport à la limite des normes de la pharmacopée européenne (droite rouge).

L'élimination des protéines et des acides nucléiques résiduels pourrait se faire par diafiltration en augmentant le nombre de diavolumes. Cependant, la consommation en eau peut être importante pour éliminer de faibles quantités (quelques mg.l^{-1}). D'autres méthodes de purification plus adaptées peuvent être mises en place telle l'adsorption sur charbon actif.

4.2.3.2 Purification de l'AH par adsorption sur charbon actif

L'étude de l'adsorption des protéines et des acides nucléiques est décomposée en trois parties :

- l'établissement des cinétiques d'adsorption afin de déterminer la durée d'adsorption nécessaire pour atteindre l'équilibre d'adsorption,
- l'établissement des isothermes d'adsorption et de l'influence de la température sur l'adsorption afin d'identifier le charbon actif et la température permettant les meilleures performances d'adsorption,

- l'étude de l'influence du pH et de la force ionique sur l'adsorption afin d'établir les meilleures conditions d'adsorption.

L'adsorption des acides nucléiques ainsi que des protéines est réalisée sur deux charbons actifs : ENO-PC et L3S (Ceca Arkema). Ces deux charbons se distinguent par leur mode d'activation. L'ENO-PC est activé chimiquement et le L3S est activé physiquement.

Le milieu complexe utilisé pour l'étude de l'adsorption des protéines et des acides nucléiques est composée de : 1 g.l⁻¹ de MgSO₄, 7 H₂O, 0,01 g.l⁻¹ MnSO₄, H₂O, 4,5 g.l⁻¹ NaC₂H₃O₂, 3 H₂O, 2,5 g.l⁻¹ NaHCO₃, 1,6 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 3,7 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 0,05 g.l⁻¹ CaCl₂, 7,5 g.l⁻¹ d'extrait de levure, 2,5 g.l⁻¹ peptone de caséine et 1 g.l⁻¹ AH (2 MDa).

Quelles que soit les conditions opératoires ou milieux évalués au sein de cette étude, l'AH n'est pas adsorbé sur les charbons actifs.

➤ Cinétique d'adsorption des protéines et acides nucléiques

La cinétique d'adsorption a été établie à 4 °C. Cette température permet de limiter les contaminations microbiennes et, a priori, favorise l'adsorption. La cinétique d'adsorption permet de déterminer la durée nécessaire à atteindre l'équilibre d'adsorption. Celui-ci est atteint lorsque la quantité de molécules qui s'adsorbent, est égale à la quantité de molécules qui désorbent du charbon. Le milieu complexe est utilisé pour l'établissement de la cinétique d'adsorption. 1 g.l⁻¹ de charbon actif (ENO-PC ou L3S) est ajoutée à la solution. L'adsorption est suivie pendant 6 h.

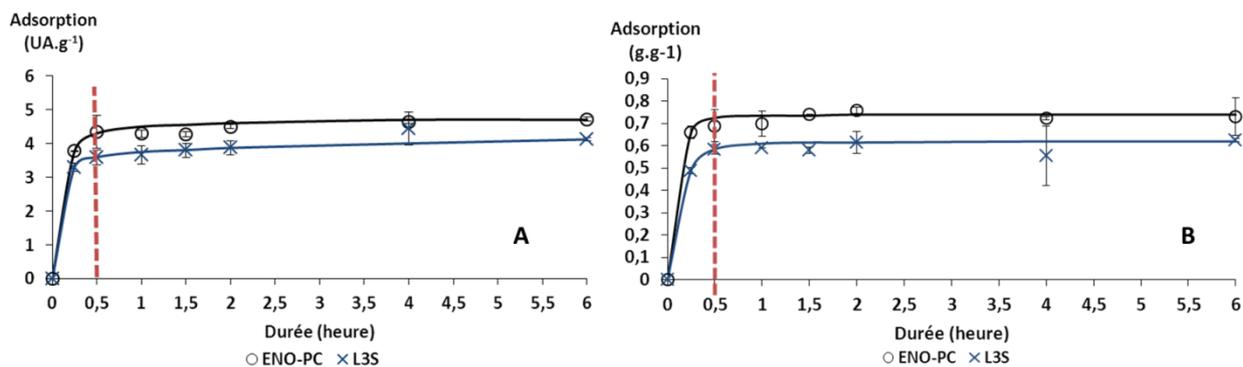


Figure 63. Cinétique d'adsorption des acides nucléique (A) et des protéines (B) sur les charbons actifs ENO-PC et L3S. 1 g.l⁻¹ de charbon actif est ajouté en milieu complexe. Après 2 h d'incubation à 4 °C le charbon actif est éliminé et la concentration en protéines ainsi que l'absorbance à 260 nm sont mesurées afin de déterminer l'adsorption.

La Figure 63 présente les cinétiques d'adsorption des acides nucléiques et des protéines pour les deux types de charbon actif. En 30 mn, l'équilibre d'adsorption est atteint quel que soit le charbon

actif. Ainsi, afin de garantir l'équilibre d'adsorption, quelles que soient les conditions opératoires, la durée d'adsorption est portée à 2 h.

➤ **Isotherme d'adsorption des acides nucléiques et protéines et influence de la température sur l'adsorption**

○ **Isotherme d'adsorption à 4°C**

Les isothermes d'adsorption ont été établies à partir du même milieu que celui utilisé pour l'établissement des isothermes d'adsorption. Six concentrations en charbon actif sont additionnées (1 g.l⁻¹, 2,5 g.l⁻¹, 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹, 15 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹) dans le milieu complexe. Après 2 h d'incubation à 4 °C, le charbon est éliminé puis les acides nucléiques et les protéines sont quantifiés afin d'établir l'isotherme d'adsorption. Chaque essai est réalisé en triplicat.

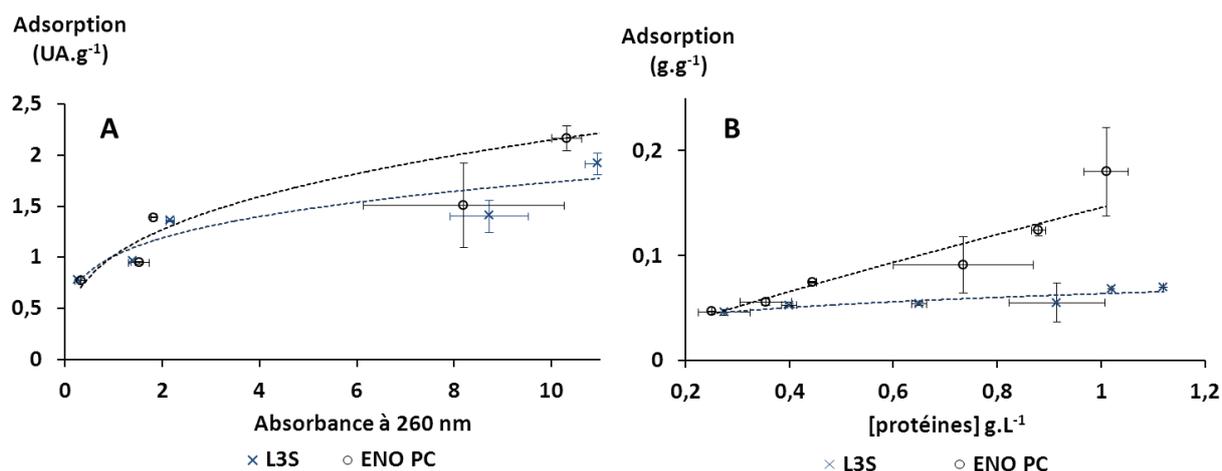


Figure 64. Isothermes d'adsorption des acides nucléiques (A) et des protéines (B) à 4 °C. Six quantités de charbon actif (ENO-PC et L3S) sont additionnées pour atteindre les concentrations de 1 g.l⁻¹, 2,5 g.l⁻¹, 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹, 15 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹. Après 2 h d'incubation à 4 °C, le charbon est éliminé et les acides nucléiques et les protéines sont quantifiés afin d'établir l'isotherme d'adsorption. Chaque essai est réalisé en triplicat.

La Figure 64 présente les isothermes d'adsorption à 4 °C des acides nucléiques et des protéines. L'adsorption des protéines et des acides nucléiques est nettement meilleure sur le charbon actif ENO-PC. Cela peut s'expliquer par la surface accessible des charbons actifs. L'ENO-PC présente une surface 1,5 fois plus élevée que le L3S. Les isothermes ont été modélisées selon l'équation de Freundlich et de Langmuir. Les coefficients de corrélation et les coefficients des équations sont présentés dans les Tableaux 17 et 18.

Tableau 17. Coefficient de la modélisation de Freundlich et Langmuir de l'adsorption des acides nucléiques.

	Freundlich			Langmuir		
	K_F	n	R^2	k_L	Q_{max}	R^2
ENO-PC	1,01	3,03	0,823	2,08	1,81	0,7056
L3S	1,01	4,35	0,891	3,38	1,57	0,7469

La modélisation des isothermes d'adsorption des acides nucléiques par l'équation de Freundlich est meilleure que celle de Langmuir.

Pour la modélisation de l'adsorption des protéines, les deux types de modélisation donnent des coefficients de corrélation similaires pour l'ENO-PC. Dans ce cas, l'équation de Langmuir sera préférée car elle permet une meilleure caractérisation des phénomènes d'adsorption. Dans le cas du L3S, la modélisation de Freundlich donne des meilleurs résultats que celle de Langmuir pour l'adsorption des protéines.

Tableau 18. Coefficient de la modélisation de Freundlich et Langmuir de l'adsorption des protéines.

	Freundlich			Langmuir		
	K_F	n	R^2	k_L	Q_{max}	R^2
ENO-PC	0,15	0,87	0,925	0,57	0,36	0,934
L3S	0,06	0,26	0,786	6,68	0,07	0,658

L'ENO-PC présente des meilleures capacités d'adsorption que le L3S. L'équation de Freundlich est utilisée pour caractériser l'adsorption des acides nucléiques et celle de Langmuir pour l'adsorption des protéines sur le charbon ENO-PC.

○ **Influence de la température sur l'adsorption**

L'influence de la température sur l'adsorption des protéines et des acides nucléiques sur le charbon actif ENO-PC a été observée. Deux températures ont été sélectionnées 4 °C et 20 °C. Les isothermes d'adsorption ont été établies de la même manière que précédemment.

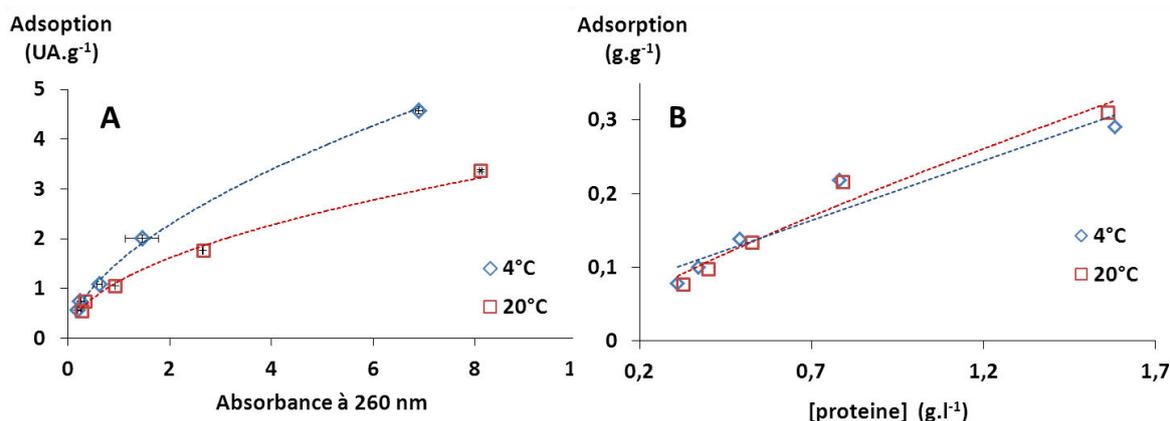


Figure 65. Influence de la température sur l'adsorption des acides nucléiques (A) et protéines (B) sur le charbon actif ENO-PC. Six quantités en charbon actif (ENO-PC et L3S) sont additionnées pour obtenir des concentrations de 1 g.l⁻¹, 2,5 g.l⁻¹, 5 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹, 15 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹. Après 2 h d'incubation à 4 °C, le charbon est éliminé et les acides nucléiques et les protéines sont quantifiés afin d'établir l'isotherme d'adsorption.

L'augmentation de la température défavorise l'adsorption des acides nucléiques (Figure 65A). En effet, l'interaction des molécules avec le charbon actif est faible. L'augmentation de la température peut apporter l'énergie nécessaire à la désorption des molécules. En revanche, l'adsorption des protéines n'est pas affectée par ce même paramètre (Figure 65B). Les interactions mises en jeu entre le charbon actif et les protéines semblent plus fortes que celles entre les acides nucléiques et le charbon actif.

La température d'adsorption est fixée à 4 °C pour garantir la fixation des protéines et des acides nucléiques.

➤ **Impact des paramètres physico-chimiques sur l'adsorption des protéines et acides nucléiques**

L'adsorption des protéines et des acides nucléiques résulte de leurs interactions (liaisons de Van der Waals, ioniques) avec la surface des charbons actifs. Ces interactions faibles peuvent être perturbées par l'environnement ionique. De ce fait, l'impact de la force ionique et du pH sur l'adsorption des protéines et acides nucléiques a été évalué.

Au cours du procédé de diafiltration la salinité du milieu évolue de celle du milieu complexe de culture microbien à celle de l'eau. Dans le cas présent, en considérant le même milieu complexe que précédemment, la salinité du milieu varie de 13 g.l⁻¹ (en début d'UF) à environ 0 g.l⁻¹ (en fin d'UF). Ces deux valeurs de salinité sont alors choisies pour évaluer l'impact de la force ionique ; elles correspondent à une force ionique respectivement élevée et faible. L'influence du pH a été évaluée

pour ces deux forces ioniques. Pour cela, le pH a été abaissé à 4 ce qui permet de protoner la molécule d'AH.

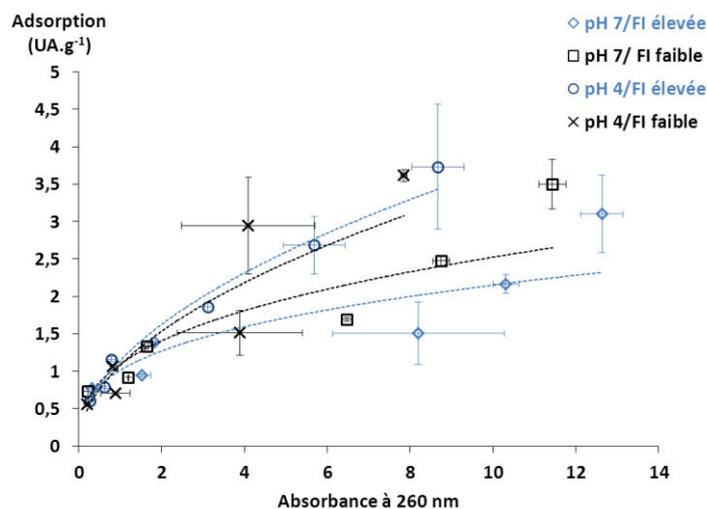


Figure 66. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'adsorption des acides nucléiques. Le milieu de force ionique élevée est un milieu complexe contenant 13 g.l⁻¹ de sels. La faible force ionique est obtenue à partir du même milieu sans les sels. Les pH des deux solutions sont également abaissés à pH 4.

La force ionique ne semble avoir qu'une faible influence sur l'adsorption des acides nucléiques (Figure 66). En revanche, la réduction du pH à 4 permet d'améliorer considérablement l'adsorption des acides nucléiques.

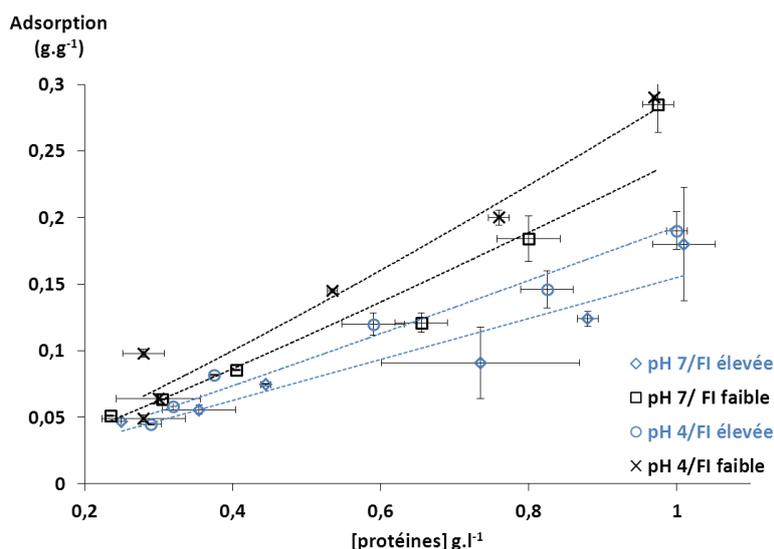


Figure 67. Influence des paramètres physico-chimiques sur l'adsorption des protéines. Le milieu de force ionique (FI) élevée est un milieu complexe contenant 13 g.l⁻¹ de sels. La faible force ionique est obtenue à partir du même milieu sans les sels. Les pH, des deux solutions, sont également abaissés à pH 4.

L'augmentation de la concentration en sels défavorise l'adsorption des protéines (Figure 67). Ce résultat est en accord avec ceux de Sekaran et al (1996). En revanche, la diminution du pH permet d'améliorer l'adsorption des protéines. Le pH modifie la charge de l'AH et des protéines ce qui peut permettre de mettre en avant de nouvelles interactions protéines /charbon actif.

Afin de favoriser l'adsorption des protéines et des acides nucléiques, il sera préférable de se placer à faible force ionique et à pH 4.

Les équations de Freundlich (équation 3.) et de Langmuir (équation 31) peuvent être utilisées pour prédire l'adsorption des acides nucléiques et protéines en condition améliorée. Les coefficients des équations sont présentés dans le Tableau 19. Ces équations sont ensuite utilisées afin de calculer la quantité de charbon actif nécessaire pour atteindre la norme de la pharmacopée européenne. L'association de celles-ci avec les équations de la modélisation des performances de diafiltration permet de trouver un compromis entre la pureté/productivité de la diafiltration et la quantité de charbon actif à ajouter.

Tableau 19. Coefficients de corrélation de l'équation de Freundlich de l'adsorption des acides nucléiques et de Langmuir de l'adsorption des protéines à pH 4 et à faible force ionique.

	Acides nucléiques			Protéines		
	K_F	n	R^2	k_L	Q_{max}	R^2
ENO-PC	1,08	0,51	0,858	0,25	0,65	0,9593

En prenant l'exemple de la purification du milieu semi-synthétique, la concentration en sels devient faible à partir de 5 volumes de diafiltration. Ainsi, le charbon actif pourrait être utilisé pour l'élimination des acides nucléiques et des protéines à partir de ce nombre de diavolumes. Le Tableau 20 présente la pureté et la productivité prédite pour chaque diavolume compris entre 5 et 10 et la quantité de charbon actif nécessaire à éliminer les protéines et les acides nucléiques.

Tableau 20. Tableau regroupant les caractéristiques de la diafiltration d'un milieu-semi synthétique et les quantités de charbon actif à ajouter afin d'éliminer les protéines et acides nucléiques résiduels.

Nombre de diavolume		5	6	7	8	9	10
Caractéristique de la diafiltration	Productivité (mg.h⁻¹.cm⁻²)	1,5	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9
	Pureté (%)	62	76	86	92	96	98
	Concentration en protéines (g.l⁻¹)	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Concentration en Sels (g.l⁻¹)	0,59	0,30	0,15	0,08	0,04	0,02
	Concentration en acide nucléique (UA)	1,5	1,07	0,76	0,54	0,38	0,27
Concentration en charbon actif à ajouter	Acides nucléiques	4,2	2,9	2,0	1,3	0,8	0,5
	Protéines	6,7	0	0	0	0	0
	Pureté après action CA	64	78	87	93	96	98

La masse de charbon actif calculé est déterminée afin d'atteindre une absorbance à 260 nm de 0,1 et une concentration en protéines de 5.10⁻³ g.l⁻¹ pour une solution d'AH à 1 g.l⁻¹ (normes de la pharmacopée divisée par deux).

Dans le cas présent, la diafiltration doit être poursuivie jusqu'à 9 diavolumes. A ce diavolume, la pureté et la concentration en protéines requises par la pharmacopée européenne sont atteintes. L'ajout de charbon actif permet d'éliminer les acides nucléiques. L'association de la diafiltration et du charbon actif permet de répondre à toutes les exigences de la pharmacopée européenne.

En résumé

L'adsorption des protéines et des acides nucléiques est réalisable en 30 mn quel que soit le charbon actif. L'adsorption des acides nucléiques et des protéines est incontestablement meilleure sur le charbon ENO-PC en raison de sa plus grande surface d'échange accessible. L'adsorption dépend des conditions opératoires. Afin de maintenir une meilleure adsorption des acides nucléiques et protéines sur l'ENO-PC, la température devra être fixée à 4 °C et le pH à 4. Une faible force ionique sera également préférée. La durée de la phase d'adsorption est fixée à 2 h pour garantir l'équilibre d'adsorption. L'AH, quelles que soit les conditions opératoires de l'adsorption, n'est pas adsorbé sur le charbon actif.

4.2.4 Séchage de l'AH

L'AH en fin de procédé de purification doit être stabilisé et conditionné. Pour cela une déshydratation de l'AH est nécessaire. L'AH est une molécule thermosensible, l'utilisation de méthodes thermiques de séchage est exclue. De ce fait, deux méthodes de séchage ont été envisagées : la lyophilisation et la précipitation de l'AH en solvant organique suivi d'un séchage en étuve. En fin de séchage, l'AH doit présenter moins de 20 % d'humidité et un aspect de poudre blanche (ou quasiment blanche) ou d'agrégat fibreux pour être conforme aux normes de la pharmacopée européenne.

4.2.4.1 Concentration par précipitation en solvant organique de l'AH/Séchage

➤ **Concentration de l'AH par précipitation en solvant organique**

L'AH est une molécule très hydrophile. C'est pourquoi, en présence de solvant organique, les chaînes d'AH se regroupent afin de minimiser leur contact avec le solvant organique. Les chaînes en se regroupant forment des agrégats qui précipitent. Les précipités d'AH peuvent alors être aisément récupérés et les résidus d'éthanol, très volatils, pourront être évaporés.

L'étude de la précipitation de l'AH est focalisée sur l'optimisation du rendement et de la pureté de l'AH précipité. Les facteurs qui influencent la précipitation de l'AH sont nombreux :

- titre en éthanol,
- concentration en AH,
- force ionique,
- pH.

La quantité de l'AH est souvent ajoutée empiriquement (2 volumes d'éthanol pour 1 volume d'AH) ce qui correspond à 60 % d'éthanol environ (J. H. Kim et al. 1996). Murata & Fukuda (2009), ont également montré que pour précipiter l'AH à des concentrations comprises entre 10 et 30 g.l⁻¹, les titres en éthanol devaient être compris entre 44 et 60 %. Pour des grandes tailles d'AH, les concentrations en AH aussi élevées ne sont pas envisageables car elles sont incompatibles avec une étape de concentration en UF. Les concentrations en AH peuvent être comprises entre 1 et 3 g.l⁻¹. Ainsi, pour garantir une précipitation de l'AH, et dans un souci de simplicité de l'expérimentation, la quantité d'AH ajoutée sera de deux volumes d'éthanol pour un volume d'AH soit environ 60 % d'éthanol. D'autres solvants de précipitation peuvent être utilisés tel l'acétone ou le méthanol. L'éthanol a l'avantage de pouvoir précipiter des concentrations en AH plus faibles.

Le titre en éthanol nécessaire pour précipiter l'AH est de 60 % (proportion 2 : 1) et les concentrations d'AH comprise entre 1 et 3 g.l⁻¹.

La force ionique et le pH sont deux paramètres qui permettent d'agir sur la structure spatiale de l'AH. Afin d'améliorer la précipitation par l'éthanol, il est nécessaire d'augmenter les interactions interchaînes ce qui permet d'améliorer le regroupement de chaînes d'AH lors de l'ajout de l'éthanol. La réduction du pH à 2,5 permet de créer ces fortes interactions interchaînes qui se traduisent par un comportement rhéologique particulier (Gatej et al., 2005). La réduction du pH est responsable de la réduction des répulsions électrostatiques ce qui permet de minimiser les molécules d'eau interchaînes. L'ajout de sels permet également de réduire la répulsion électrostatique interchaînes en construisant un bouclier électronique autour des molécules d'AH. Il en découle une structure compacte de l'AH. L'ajout de sels peut permettre d'améliorer le rendement de précipitation. Cependant, il n'est pas sans conséquence sur la pureté. La pharmacopée européenne impose que l'AH soit un sel de sodium. Ceci induit que le sel utilisé pour la précipitation doit contenir du sodium. Celui-ci ayant une influence non négligeable sur la pureté de l'AH, un sel de petite masse molaire est préféré pour minimiser son impact. Le NaCl semble un choix idéal. Des concentrations faibles comprises entre 0,1 et 0,3 M sont évaluées. Ces concentrations, même faibles, en NaCl ne permettront pas d'atteindre la pureté requise par la pharmacopée européenne. Les sels au sein du précipité devront être éliminés. Pour cela, le précipité obtenu sera placé dans des bains d'éthanol successifs jusqu'à élimination des sels piégés dans le précipité. Le nombre de bains successifs à réaliser afin d'atteindre la norme de pureté de la pharmacopée européenne doit être établi.

Le pH de la précipitation est de 2,5 et la force ionique est comprise entre 0,1 et 0,3 M. Le sel à utiliser est le NaCl.

Résultats et discussion

Les informations retrouvées dans la littérature permet de réduire le nombre de facteurs à étudier à deux pour le rendement de précipitation, la force ionique et la concentration, et à trois pour la pureté, la concentration en AH, la force ionique et le nombre de bains du précipité en éthanol pur.

L'étude de ces facteurs est réalisée à l'aide d'un plan d'expériences. Un plan composite à faces centrées est mis en place. Les domaines d'étude sont les suivants :

- la concentration en AH : 1 à 3 g.l⁻¹,
- la force ionique : 0,1 M et 0,3 M,
- le nombre de bains successifs : 0 (précipitation de l'AH uniquement) à 4.

50 ml d'AH sont ajustés à un pH de 2,5 (+/- 0,3) par de l'acide sulfurique 5 M puis 100 ml d'éthanol (96 %) sont ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante, le précipité est récupéré dans un entonnoir Büchner. L'élimination des sels piégés au sein de l'AH consiste à placer le précipité récupéré dans 50 ml d'éthanol pur pendant 2 h.

La diminution du pH à 2,5 (en présence de NaCl 0,1 M) montre un changement de comportement rhéologique visible à l'œil nu. Les interactions interchaînes, fortes à ce pH, sont telles qu'elles ne permettent pas le retrait de la sonde de pH de la solution (Figure 68). En dehors, de cette gamme de pH la solution d'AH est limpide, il en est de même en absence de sels. Cela indique que la réduction de la répulsion électrostatique, par réduction du pH et par addition de sels, favorise, de manière importante, les interactions interchaînes. La formation de cette structure permet une précipitation de l'AH en bloc. En revanche, en dehors de ces conditions, les agrégats d'AH sont diffus en solution et difficiles à séparer.

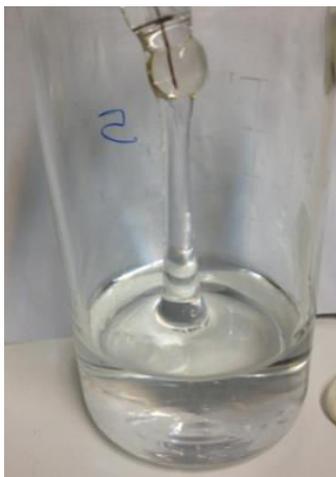


Figure 68. Impact de la composition des solutions sur les propriétés rhéologiques des solutions (2 g.l⁻¹ d'AH, 0,1 M de NaCl et pH de 2,5). La cohésion importante des chaînes d'AH empêche le retrait de la sonde de pH.

Le plan d'expériences est présenté dans le Tableau 21.

Tableau 21. Impact de la concentration en AH, de la force ionique et du nombre de bains du précipité d'AH sur la pureté de l'AH et le rendement de précipitation de l'AH.

Expérience	Concentration en AH (g.l ⁻¹)	Force ionique (M)	Nombre de bains	Rendement (%)	Pureté (%)
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂
1	1	0,1	0	0	14
2	3	0,1	0	99	76
3	1	0,3	0	0	5
4	3	0,3	0	100	49
5	1	0,1	4	0	12
6	3	0,1	4	98	97
7	1	0,3	4	0	5
8	3	0,3	4	100	94
9	1	0,2	2	0	8
10	3	0,2	2	100	80
11	2	0,1	2	93	61
12	2	0,3	2	98	22
13	2	0,2	0	100	54
14	2	0,2	4	95	92
15	2	0,2	2	92	84
16	2	0,2	2	98	65

Le coefficient de corrélation du modèle pour le rendement de précipitation est de 0,962. Ce coefficient annonce a priori une bonne modélisation. Cependant, en confrontant les valeurs prédites et modélisées, il peut être distingué deux populations de points : les rendements élevés (Figure 69 en rouge) et les faibles (Figure 69 en bleu). Cela montre que la précipitation de l'AH est une réaction du « tout au rien ». Une telle réaction ne peut être prédite, ce qui induit que les conditions opératoires permettant d'obtenir un rendement maximal choisies pour la précipitation de l'AH doivent correspondre à un point expérimental afin de garantir la précipitation de l'AH.

La modélisation de la pureté ne présente pas le même phénomène que la précipitation. Par conséquent, les valeurs prédites de pureté, quelles que soient les conditions opératoires, peuvent être utilisées puisque le modèle présente un bon coefficient de corrélation ($R^2 = 0,942$).

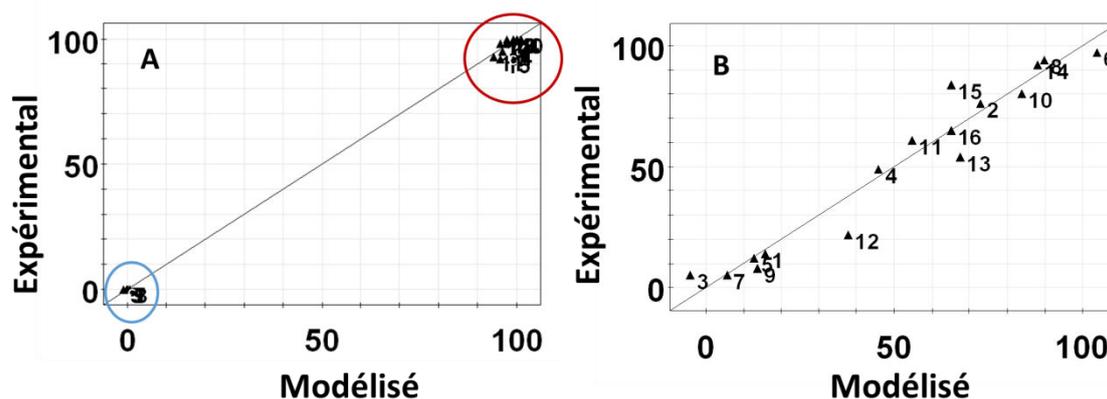


Figure 69. Diagrammes confrontant les valeurs modélisées et expérimentales du rendement (A) et de la pureté (B) obtenus pour la précipitation de l’AH à l’éthanol à différentes concentrations d’AH, force ionique mais aussi nombre de bains successives du précipité d’AH. La modélisation est réalisée par le logiciel modde.9.

Le Tableau 22 montre les coefficients de la matrice de modélisation du rendement de précipitation de l’AH et de la pureté. Les facteurs présentant une p-value en rouge n’ont pas ou peu d’influence sur la précipitation de l’AH (p-value > 0,1).

Tableau 22. Coefficients de régression et valeurs de probabilité (p-value) de la modélisation du rendement de précipitation de l’AH par l’éthanol. La modélisation est réalisée à partir d’un polynôme du second degré.

	Rendement (Y ₁)		Pureté (Y ₂)	
	Coefficient	P-value	Coefficient	P-value
constante	95,90	0,000	65,0	0,000
X ₁	49,70	0,000	35,2	0,000
X ₂	0,80	0,352	-8,5	0,090
X ₃	-0,60	0,478	10,2	0,052
X ₁ * X ₁	-46,40	0,00	-16,2	0,096
X ₂ * X ₂	-0,90	0,583	-18,72	0,062
X ₃ * X ₃	1,10	0,050	12,78	0,171
X ₁ *X ₂	0,37	0,687	-1,8	0,723
X ₁ *X ₃	-0,12	0,893	8,5	0,121
X ₂ *X ₃	0,13	0,893	3,3	0,516

Le rendement de précipitation n’est influencé que par la concentration en AH. La concentration en NaCl n’a, a priori, pas d’influence sur la précipitation. Néanmoins, des concentrations en NaCl inférieures à 0,1 M de NaCl ont été évaluées afin de confirmer ce résultat et une absence de précipitation a été montrée. De ce fait, une concentration en NaCl supérieure à 0,1 M est nécessaire

à la précipitation. Au-delà de 0,1 M de NaCl, quelle que soit la concentration, le rendement de précipitation est le même.

En ne prenant en compte que les coefficients significatifs, l'équation 48 de régression du rendement est la suivante :

$$Y_1 = 95,9 + 49,7 X_1 - 46,40 X_1^2 \quad (\text{Equation 48})$$

La Figure 70 montre l'évolution du rendement de précipitation de l'AH en fonction de la concentration en AH et de la force ionique. Une concentration en AH supérieure à 2 g.l⁻¹ est nécessaire pour une précipitation totale de l'AH.

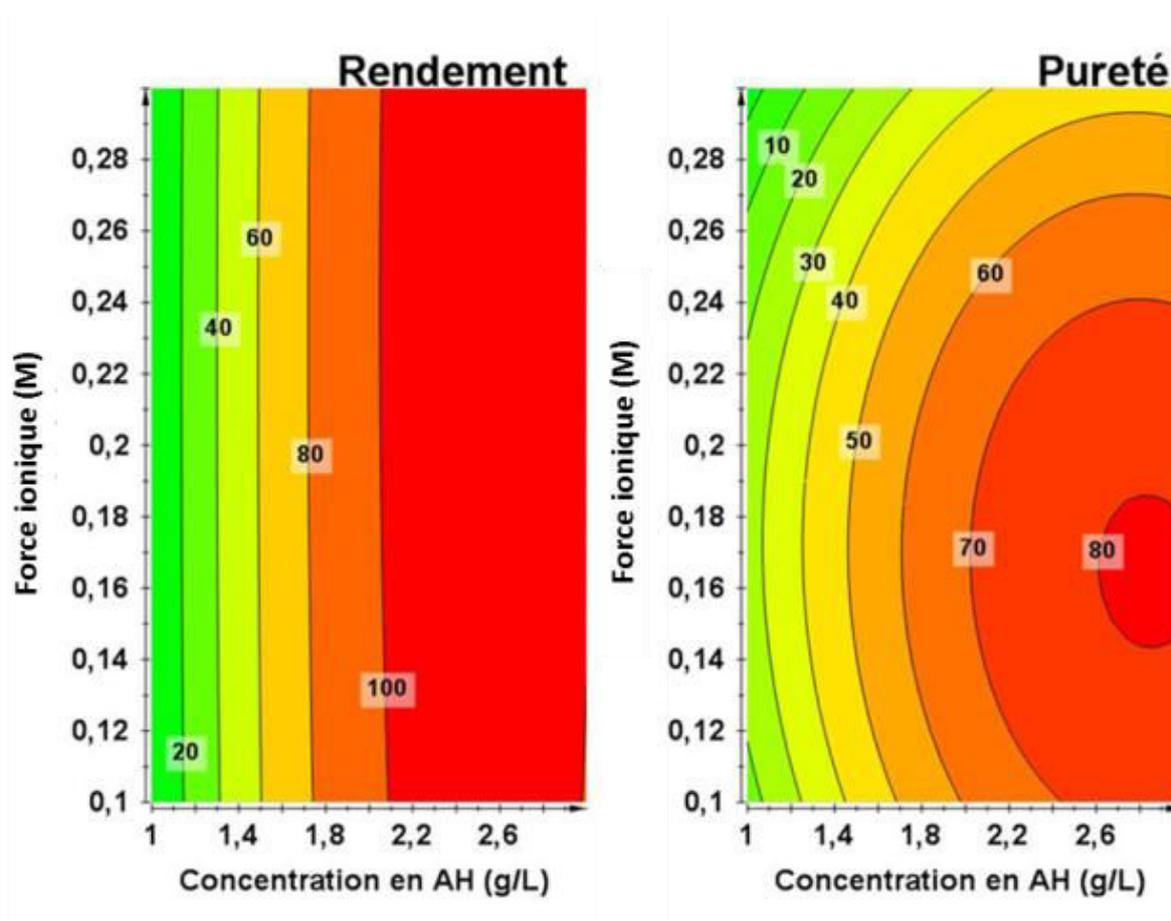


Figure 70. Influence de la force ionique et de la concentration en AH sur le rendement de précipitation et la pureté. Aucun bain du précipité n'est réalisé afin d'éliminer les sels du précipité. La modélisation est réalisée par modde.9 à partir des données du tableau 14.

La pureté dépend de la concentration en AH, de la concentration en sels et du nombre de bains. Néanmoins, la force ionique et le nombre de bains du précipité ont moins d'influence que la concentration en AH. Aucune interaction entre les facteurs n'est observée. En ne considérant que les

coefficients ayant une influence sur la pureté, l'équation 49 de prédiction de la pureté est la suivante :

$$Y_2 = 65,0 + 35,2 X_1 - 8,5 X_2 + 10,2 X_3 - 16,2 X_1^2 - 18,72 X_2^2 + 12,78 X_2^2 \quad (\text{Equation 49})$$

La Figure 70 montre l'évolution de la pureté en fonction de la concentration en sels et en AH après précipitation. La pureté est toujours inférieure à 95 %. L'AH, dans ces conditions, n'est pas conforme aux exigences de la pharmacopée européenne. Les bains du précipité d'AH en éthanol pur sont donc indispensables dans la mesure où la concentration en AH ne peut être augmentée et la concentration en sels abaissée. La Figure 71 traduit l'influence du nombre de bains du précipité d'AH en éthanol pur sur la pureté de l'AH. La pureté de l'AH augmente avec le nombre de bains du précipité d'AH. Afin d'obtenir une pureté de 100 %, il faut :

- une concentration en AH supérieure à 2,5 g.l⁻¹,
- une concentration en sels inférieure à 0,25 M,
- quatre bains successifs du précipité d'AH en éthanol pur.

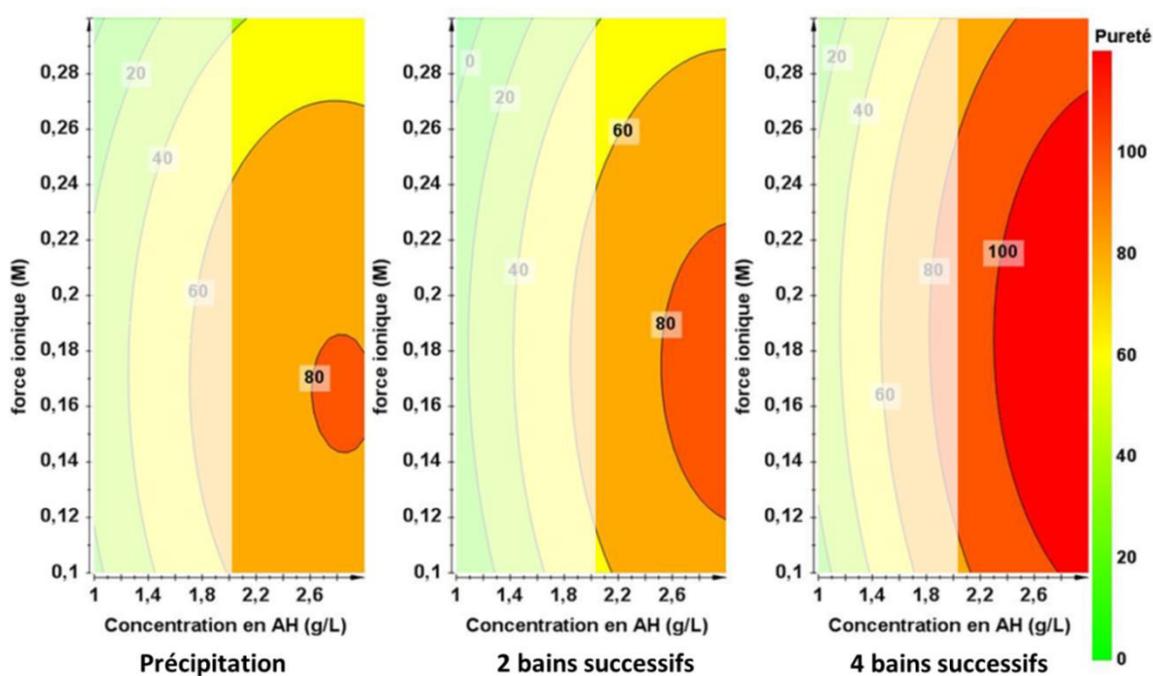


Figure 71. Influence du nombre de bains du précipité de l'AH en éthanol pur sur la pureté de l'AH. (En surimpression blanche, les rendements de précipitation inférieurs à 100 %). La modélisation est réalisée par le logiciel modde.9 à partir des données du tableau 14.

Les conditions de précipitation qui permettent de garantir un rendement maximum et une pureté élevée sont :

- 60 % d'éthanol,

- pH 2,5,
- 3 g.l⁻¹ d'AH,
- 0,1 M de NaCl,
- 4 bains successifs du précipité d'AH en éthanol pur.

L'influence de ces conditions de précipitation sur la taille des AH a été évaluée sur un AH de 1,1 MDa.

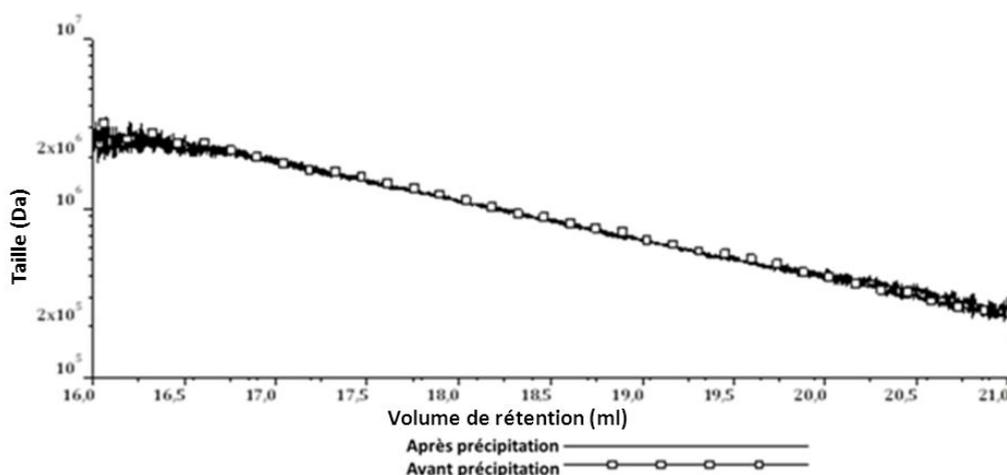


Figure 72. Influence de la précipitation sur la taille des AH (pH = 2,5, 60 % d'éthanol, 3 g.l⁻¹ d'AH et 4 bains successifs du précipité à l'éthanol). Les tailles avant et après précipitation sont mesurées par CES/Multi-détection.

Les tailles avant et après précipitation sont présentées dans la Figure 72. Elles se superposent. De plus, le Tableau 23 montre que les tailles moyennes déterminées sont similaires avant et après précipitation.

La précipitation n'altère donc pas les tailles d'AH.

Tableau 23. Impact des conditions de précipitation de l'AH à l'éthanol (pH = 2,5, 60 % d'éthanol, 3 g.l⁻¹ d'AH et 4 bains successifs du précipité à l'éthanol) sur la taille des AH.

	Mw (kDa)	VI (dl.g ⁻¹)
Avant précipitation	940	15,9
Après précipitation	944	15,1

➤ **Séchage du précipité d'AH**

L'AH, après précipitation, est placé en étuve à 37 °C pendant 24 h afin d'éliminer le solvant.

L'humidité de l'AH déshydraté après séchage a été évalué (Figure 73).

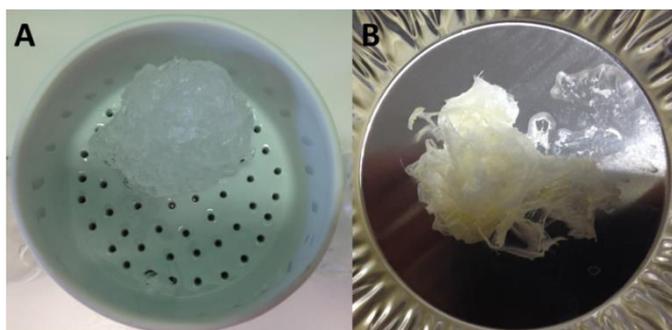


Figure 73. Précipitation de l'AH par de l'éthanol (50 ml d'AH à 3 g.l⁻¹, pH 2,5, 65 % d'éthanol, 0,1 M de NaCl, 4 bains du précipité à l'éthanol). Le précipité d'AH en fin de précipitation est présenté en A et après 24 h de séchage à 37 °C en B.

L'humidité après un séchage de 24 h à 37°C est de 9 % (+/- 1). L'AH répond donc à la norme de la pharmacopée européenne fixée à 20 %.

4.2.4.2 Séchage de l'AH par lyophilisation

La lyophilisation est un procédé alternatif de séchage de l'AH. Les solutions d'AH en eau osmosée sont placées dans des coupelles en aluminium et sont congelées puis les solutions sont lyophilisées pendant 48 h. L'humidité, après lyophilisation, a été mesurée et est en moyenne de 8 % (+/- 2,4 %). Ce qui est largement inférieur à la norme de la pharmacopée européenne (20 %). Après lyophilisation, la substance se présente sous la forme d'une mousse (Figure 74). La conformité de cette méthode de séchage réside dans l'aspect de cette mousse. Si la mousse d'AH est considérée comme agrégat fibreux, l'AH sera conforme aux normes de la pharmacopée européenne. Dans le cas contraire, l'AH n'est pas conforme.



Figure 74. Aspect de l'AH après lyophilisation.

Afin de garantir que les tailles des AH ne sont pas altérées par la lyophilisation, un AH de 2 MDa a été caractérisé avant et après lyophilisation. Le Tableau 24 récapitule ces caractéristiques. Les tailles d'AH avant et après lyophilisation sont identiques. La différence de taille entre la valeur théorique et

expérimentale peut être liée à la préparation de l'échantillon ou au fait que l'AH utilisé est « vieillissant ».

Tableau 24. Impact de la lyophilisation sur les caractéristiques de l'AH

Echantillon	Mw (MDa)	Polydispersité	VI (dl.g ⁻¹)
Avant lyophilisation	1,5	1,4	24,1
Après lyophilisation	1,5	1,3	25,6

La Figure 75 compare toutes les tailles d'AH présentes en solution avant et après lyophilisation. Les deux courbes de taille de 2 MDa avant et après lyophilisation se superposent parfaitement. De plus, le rendement de l'étape de séchage est de 100 %.

La lyophilisation est une méthode parfaitement adaptée à la déshydratation de l'AH.

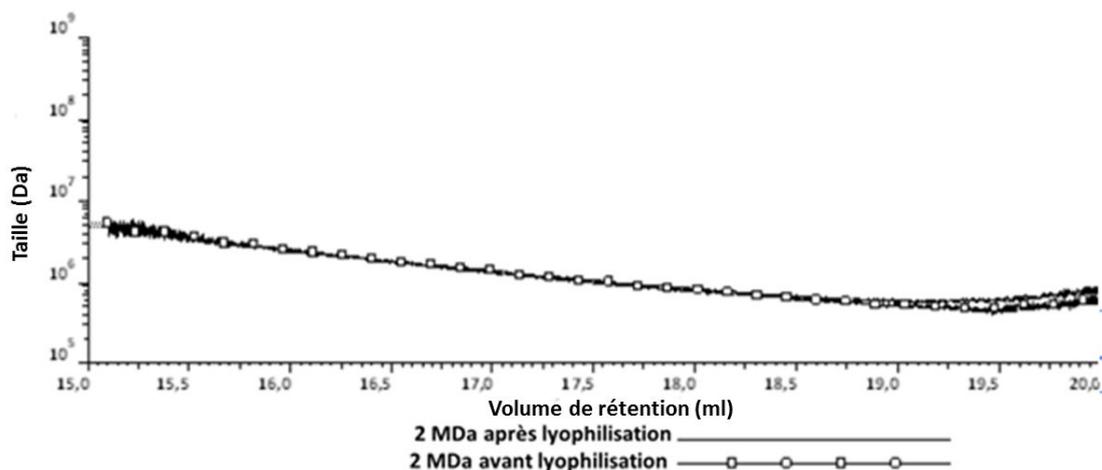


Figure 75. Comparaison des tailles avant et après lyophilisation du même AH.

En résumé

Le séchage de l'AH a été envisagé par deux méthodes : la lyophilisation ou la précipitation en solvant organique/évaporation. Ces deux méthodes permettent d'obtenir un AH déshydraté à moins de 20 % d'humidité. La norme de la pharmacopée européenne de 20 % d'humidité est atteinte quelle que soit la méthode. Les deux méthodes permettent de conserver la taille de l'AH.

Les conditions opératoires de la précipitation sont très rigoureuses. Afin d'obtenir un rendement de 100 % et une pureté excédant 95 %, il faut un pH = 2,5 ; une concentration en AH de 3 g.l⁻¹, une concentration en NaCl supérieure à 0,1 M, un titre en éthanol de 60 % (v/v) et 4 bains du précipité en éthanol pur.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

La conception d'un procédé extrapolable de purification de l'AH de grande taille issue d'une production par voie microbienne était l'objectif des travaux présentés dans cette thèse. Pour ce faire, les études ont été décomposées en deux parties :

- le développement des opérations unitaires de la purification de l'AH,
- le développement des outils d'aide à l'agencement des étapes du procédé de purification.

Dans un premier temps, des méthodes analytiques ont dû être développées afin d'évaluer les performances des méthodes séparatives. Ces études se sont concentrées sur la mise en place de méthode de quantification et de caractérisation de l'AH en milieu complexe de culture microbienne. La méthode de référence de quantification de l'AH au carbazole a été substituée par la méthode turbidimétrique au bromure de cétyltriméthylammonium (CTM) plus spécifique. Afin de garantir la fiabilité du dosage, la cinétique de réaction, la gamme de linéarité, l'impact de la taille d'AH, du pH et de l'environnement ionique ont été étudiés. Ces études ont montré une bonne fiabilité de la méthode. Seule une interférence aux ions chlorure a été mise en évidence. Une méthode permettant de nous affranchir de cette interférence a alors été proposée. La seconde méthode analytique développée est une caractérisation de la taille par la CES/Multi-détection. Cette méthode a remplacé la détermination de la taille via la mesure de viscosité intrinsèque non applicable en milieu complexe et pour de faibles volumes. La comparaison des deux méthodes de caractérisation a montré que la mesure de la taille par diffusion de la lumière était similaire à la méthode de référence (15 % d'erreur). Il a été également montré que la méthode, de référence, de la détermination de la taille est biaisée par l'utilisation d'approximations des coefficients de Marc Houwink. Ce biais conduit à une surestimation des grandes tailles d'AH (> 2 MDa).

Une fois les méthodes de suivi des performances de séparation fonctionnelles, le procédé de purification a pu être engagé.

➤ **Le développement des opérations unitaires du procédé de purification**

Le procédé de purification de l'AH a été décomposé en quatre parties :

- Extraction / séparation de la capsule d'AH des bactéries,
- séparation des cellules du milieu de culture,
- purification de l'AH par diafiltration et adsorption sur charbon actif,
- stabilisation de l'AH sous forme déshydratée.

Chaque étape a été étudiée de manière indépendante.

Extraction / séparation de la capsule bactérienne.

Deux méthodes d'extraction de la capsule ont été étudiées. La première est une extraction au SDS et la seconde au TCA. Les résultats montrent que l'AH capsulaire correspond au maximum à 7 % de l'AH totale (SDS 0,05 %). La faible quantité récupérée n'est pas suffisante pour envisager une étape d'extraction dans le procédé. En effet, l'allongement des étapes de purification afin d'éliminer le SDS conduirait probablement à la perte de ces 7 %.

Séparation des cellules du milieu de culture

La séparation des cellules du milieu de culture a été envisagée par microfiltration tangentielle et filtration frontale. La rétention des cellules et de l'AH ainsi que le flux de perméat ont été déterminés en microfiltration tangentielle. Il a été montré que l'AH présentait une rétention élevée (0,97). Afin de réduire cette rétention, du SDS a été ajouté pour perturber la cohésion interchaînes d'AH et le seuil de coupure a été augmenté afin de faciliter le passage de l'AH à travers la membrane. Une réduction de la rétention de l'AH a bien été observée cependant insuffisamment pour envisager une séparation par microfiltration tangentielle. L'étude des flux de perméat a permis de mettre en évidence la formation d'une couche de polarisation qui est responsable non seulement de la réduction de la productivité mais aussi de la rétention élevée de l'AH. En conclusion, la microfiltration a été jugé non adaptée à des solutions d'AH. La filtration frontale sur adjuvant de filtration (terre de diatomée) a montré une efficacité de séparation nettement supérieure. Aucune rétention de l'AH n'a été observée avec une élimination efficace des cellules. Une filtration sur fibre de verre en aval est tout de même nécessaire afin d'éliminer les particules résiduelles.

Purification de l'AH par diafiltration et adsorption sur charbon actif

La purification de l'AH a été envisagée par séparation membranaire. L'étude a été décomposée en deux parties :

- étude de l'impact des conditions opératoires sur la sélectivité de taille, la rétention et le flux de perméat,
- étude des performances de séparation (pureté, rendement et productivité) en diafiltration.

La séparation de deux tailles d'AH (2 MDa et 70 kDa) en mélange a été étudiée en ultrafiltration sur deux seuils de coupure (100 kDa et 1 MDa) ainsi qu'à différentes valeurs de force ionique et de pH. Il a été montré une absence de séparation de taille en UF quelles que soient les conditions. Cette absence de séparation de taille est attribuée à la formation d'une couche de polarisation à la surface des membranes qui conduit à une rétention élevée de l'AH mais empêche le passage des petites

molécules d'AH. La séparation des tailles d'AH ne peut donc pas avoir lieu en UF. Cependant, les taux de rétention élevés permettent d'envisager une purification de l'AH en diafiltration.

Les conditions opératoires de la diafiltration ont été optimisées en ultrafiltration. La PTM, le débit d'alimentation, le seuil de coupure et la concentration en AH ont été établis afin de maximiser le rendement et la productivité en considérant différentes tailles d'AH. Les conditions déterminées sont un débit d'alimentation de 36 ml.mn^{-1} , une PTM de 2,5 bar, un seuil de coupure de 100 kDa, une concentration en AH de 1 g.l^{-1} et une recirculation de 30 mn en début d'ultrafiltration. Ces conditions ont été appliquées pour étudier l'évolution des performances de séparation en diafiltration.

L'étude des performances de séparation (rendement, pureté et productivité) sur un milieu semi-synthétique en diafiltration ont montré qu'il était possible d'atteindre la norme de la pharmacopée européenne avec un rendement proche de 80 %. Il a également montré que la productivité est dépendante de la force ionique du milieu qui évolue au cours de la diafiltration.

Le suivi de différents milieux complexes de culture microbienne montre une présence de protéines et d'acides nucléiques trop importante en fin de diafiltration. Une élimination ciblée a alors été mise en place par adsorption sur charbon actif. Les cinétiques et les isothermes d'adsorption à 4 et 20 °C ont été établies sur deux charbons actifs. Il a été montré que l'équilibre d'adsorption a été atteint en 30 mn, le charbon ENO-PC présentait de meilleures performances d'adsorption que le L3S et une température basse était plus favorable à l'adsorption. L'impact de la force ionique ainsi que du pH sur l'adsorption des acides nucléiques et des protéines sur le charbon actif ENO-PC a alors été évalué. Une faible force ionique ainsi qu'un pH de 4 permettent d'améliorer l'adsorption. Les isothermes en conditions favorables d'adsorption sont ensuite utilisées pour calculer la quantité de charbon actif à ajouter afin d'atteindre la norme de la pharmacopée européenne.

Stabilisation de l'AH sous forme déshydraté

Deux méthodes de déshydratation de l'AH ont été évaluées : la lyophilisation et la précipitation de l'AH en solvant organique suivi d'un séchage en étuve.

La précipitation de l'AH a été étudiée afin de maximiser le rendement et la pureté de l'AH. Trois facteurs ont été étudiés : la concentration en AH, la force ionique et le nombre de bain d'éthanol. Les conditions opératoires qui ont alors été choisies pour maximiser le rendement et atteindre la norme de pureté de l'AH sont un pH de 2,5, un titre en éthanol de 60 %, une force ionique de 0,1 M, 3 g.l^{-1} d'AH et quatre bains d'éthanol successifs. Il a également été montré que la précipitation de l'AH était régie par une loi du tout ou rien. De ce fait, la précipitation de l'AH ne peut être prédite. L'utilisation

des conditions établies garantit la précipitation de l'AH. Le précipité est ensuite séché en étuve 24 h à 37 °C.

Les deux méthodes permettent de déshydrater l'AH à moins de 20 % d'humidité tout en maintenant l'intégrité de la molécule.

➤ **le développement des outils d'aide à l'agencement des étapes du procédé de purification**

Afin d'atteindre les exigences de la pharmacopée européenne, l'agencement des étapes du procédé de purification notamment de la diafiltration et de l'adsorption sur charbon actif, est essentiel. Un compromis entre productivité, rendement, pureté et coût doit être trouvé. Pour ce faire, les performances de séparation ont été modélisées.

Modélisation des performances de séparation en diafiltration

Le rendement de récupération de l'AH au cours de la diafiltration a été déterminé par l'application de l'équation classique de l'évolution de la concentration en diafiltration (équation 26). De même, cette équation a été utilisée pour prédire la concentration de trois classes de molécules (acides aminés / peptides, minéraux et AH) composant le milieu complexe de culture microbienne, ce qui permet de déduire la pureté. Afin de prédire la productivité, le flux de perméat doit pouvoir être calculé. Pour cela, la loi du film a été utilisée. Cependant, l'AH présente un comportement peu conventionnel en séparation. En effet, il a été montré, pour la première fois, une évolution en fonction de la force ionique des coefficients de transfert et la concentration à l'abord de la membrane. L'évolution de ces coefficients conduit à une augmentation du flux de perméat au cours de la diafiltration en raison de la réduction des sels. L'adaptation de la loi du film a permis de prédire l'évolution du flux à partir d'une mesure de la conductivité initiale. La productivité a alors pu être aisément déduite.

Modélisation des isothermes d'adsorption des protéines et acides nucléiques sur charbon actif

Les isothermes d'adsorption de Freundlich et de Langmuir ont été utilisées afin de caractériser l'adsorption des acides nucléiques et des protéines, respectivement. Ces équations permettent de déterminer les quantités en charbon actif nécessaires à éliminer les acides nucléiques et les protéines.

A partir de ces isothermes d'adsorption et des modèles établis en diafiltration, le volume de diafiltration qu'il faut atteindre avant de passer à l'adsorption sur le charbon actif peut être choisi en

Conclusion et perspectives

maximisant le rendement et la productivité et en limitant la quantité en charbon actif à additionner tout en répondant aux exigences de la pharmacopée européenne.

Les objectifs fixés ont été atteints. Un enchaînement d'opérations et de conditions opératoires permettant une purification de l'AH à partir d'un milieu de production est proposé. Ce procédé permet d'atteindre les exigences de la pharmacopée européenne tout en maintenant les propriétés biologiques de la molécule (Figure 76).

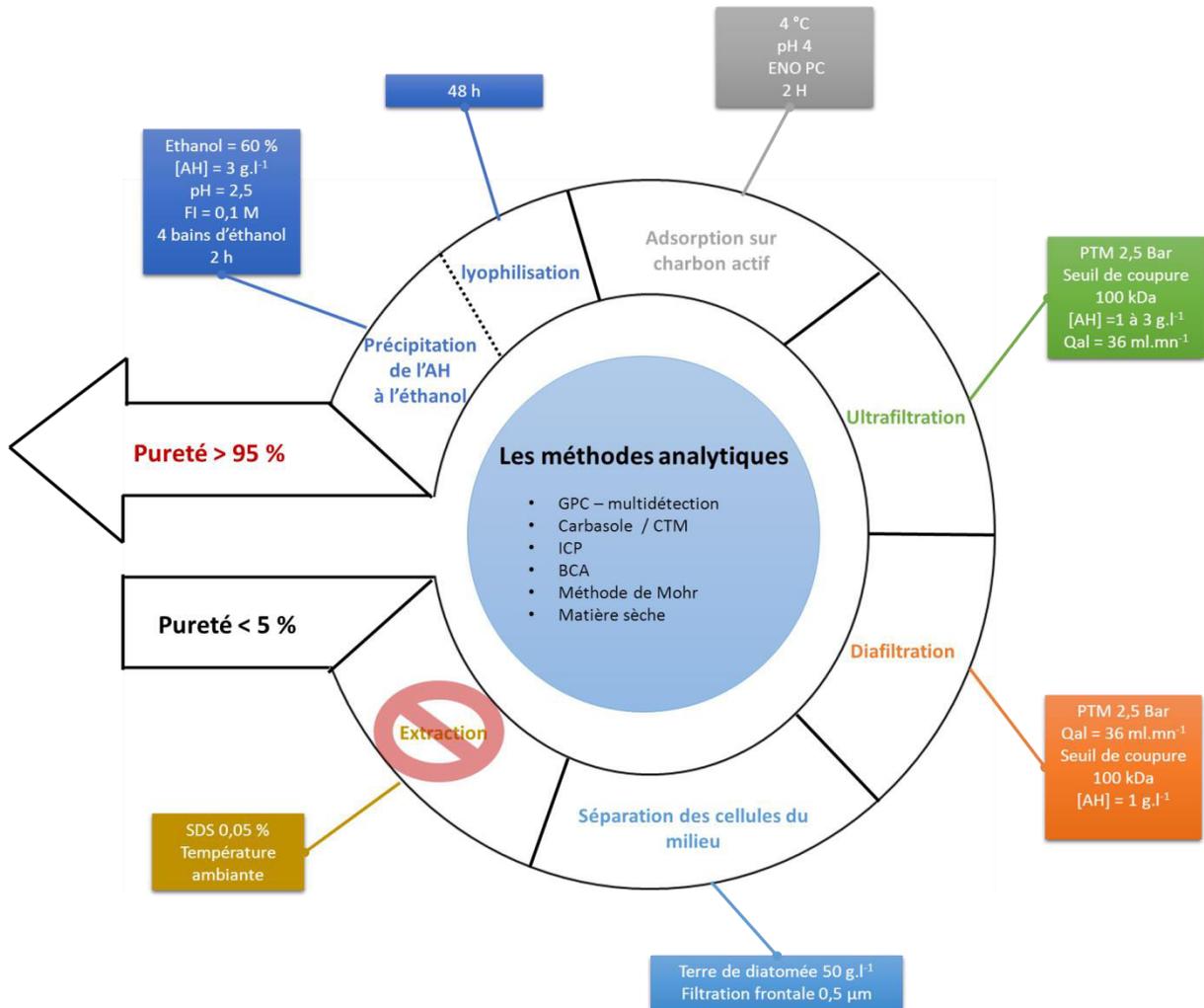


Figure 76. Récapitulatif des étapes du procédé de purification.

PERSPECTIVES

Les études ont permis de proposer un procédé de purification de l'AH de grande taille. Cependant, des améliorations peuvent y être apportées aussi bien au niveau des performances de séparation que sur les modèles d'agencement des étapes du procédé.

Amélioration des étapes du procédé de purification

Les études de la séparation des cellules du milieu de culture ont montré que la méthode la plus adaptée est la filtration sur adjuvant (terre de diatomée). Toutefois, l'optimisation des conditions opératoires n'a pas été réalisée. L'étude devra déterminer l'épaisseur de la précouche, la concentration en terre de diatomée à introduire dans le milieu de culture, la concentration en AH, la perte de charge à appliquer et le débit d'alimentation permettant d'obtenir le meilleur flux et la meilleure rétention des cellules.

Les endotoxines, du fait des nombreuses sources de contamination externes et des précautions à prendre lors de leur quantification, n'ont pas été analysées lors des études de mise en place et d'optimisation du procédé. Cependant, la pharmacopée européenne impose, lorsque l'AH est produit par des bactéries gram-positives, de démontrer que le procédé utilisé permet de limiter ou d'éliminer les composants de la paroi cellulaire à caractère pyrogène ou inflammatoire. Par conséquent, un suivi des endotoxines au cours du procédé « finalisé » de purification sera nécessaire. Des ajustements pourront alors être apportés si nécessaire.

Les paramètres de la lyophilisation peuvent être optimisés notamment le niveau de vide (5 µbar à 500 µbar), la température du produit et le temps de dessiccation. Deux paramètres devront être suivis durant cette étude, tout d'abord, l'humidité et, ensuite, la taille de l'AH.

Amélioration des outils d'agencement des étapes de purification

Les modèles de prédiction en diafiltration pourront être utilisés pour améliorer la composition du milieu de culture microbienne afin d'optimiser l'association production par voie microbienne et purification.

Afin d'améliorer l'agencement des étapes de purification, deux méthodologies peuvent être développées. La première consisterait à établir des corrélations entre les paramètres des équations relatives aux isothermes d'adsorption et les propriétés des solutions (pH et force ionique). Il sera alors possible de coupler ces équations à celles obtenues en DF. La seconde conduirait à réaliser une optimisation dynamique de l'étape de diafiltration afin de minimiser soit la durée de l'opération, soit

Conclusion et perspectives

le volume d'eau utilisé en jouant sur la mise en œuvre du système (alternance de phases de concentration et de diafiltration ou en modifiant le débit d'eau) (Krstić et al., 2004 ; Foley, 2006 ; Foley, 1999).

Une fois toutes les améliorations apportées au procédé, les études d'extrapolation pourront être mise en place. La plupart des étapes du procédé de purification ne nécessitent qu'une étude de dimensionnement. Seule l'étape de diafiltration imposera une étude en place de l'influence du débit d'alimentation sur le flux de perméat et la rétention de l'AH en raison des données non accessibles sur la géométrie des membranes de filtration.

6 REFERENCES

Ahmadpour A. et Do D.D. 1996. « The preparation of active carbons from coal by chemical and physical activation ». *Carbon* 34 (4): 471-79. doi:10.1016/0008-6223(95)00204-9.

Anderson P. et Smith, D.H. 1977. « Isolation of the Capsular Polysaccharide from Culture Supernatant of *Haemophilus Influenzae* Type B. » *Infection and Immunity* 15 (2).

Atkins E.D. et Sheehan J.K. 1973. « Hyaluronates: Relation between Molecular Conformations ». *Science* 179 (4073): 562-64.

Bansal R. C. et Goyal M. 2010. *Activated Carbon Adsorption*. CRC Press.

Barnier H. et De Bank P. 1992. « Microfiltration Tangentielle de Suspensions d'Hydroxyde de Fer Ferrique Amorphe en Milieu Fortement Salin ». *Key Engineering Materials* 61-62: 181-86. doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.61-62.181.

Bartoloni A., Norelli F., Ceccarini C., Rappuoli R. et Costantino P. 1995. « Immunogenicity of Meningococcal-B Polysaccharide Conjugated to Tetanus Toxoid or CRM197 via Adipic Acid Dihydrazide ». *Vaccine* 13 (5): 463-70. doi:10.1016/0264-410X(94)00007-A.

Bitter T. et Muir H.M. 1962. « A modified uronic acid carbazole reaction ». *Analytical Biochemistry* 4 (4): 330-34. doi:10.1016/0003-2697(62)90095-7.

Brown K.K., Ruiz L.L.C., Van De Rijn I., Greene N.D., Trump S.L., Wilson C.D. et Bryant S.A. 1994. « Method for the microbiological production of non-antigenic hyaluronic acid ».

Brown M.B. et Jones S.A. 2005. « Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 19 (3): 308-18. doi:10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x.

Brunauer S., Emmett P. H. et Teller E. 1938. « Adsorption of Gases in Multimolecular Layers ». *Journal of the American Chemical Society* 60 (2): 309-19. doi:10.1021/ja01269a023.

Carlino S. et Magnette F. 2002. « Procédé de purification d'acide hyaluronique à poids moléculaire élevé ».

Carlono S. et Magnette F. 2000. « Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid ».

Références

- Caspersen M. B., Roubroeks J.P., Qun L., Shan H., Fogh J., Dong Z.R., et Tømmeraas K. 2014. « Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state ». *Carbohydrate Polymers* 107: 25-30. doi:10.1016/j.carbpol.2014.02.005.
- Cesaretti M., Luppi E., Maccari F., et Volpi N. 2003. « A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction ». *Carbohydrate Polymers* 54 (1): 59-61. doi:10.1016/S0144-8617(03)00144-9.
- Chen J., Chen J. et Xu Z. 2008. « Rheological and Biological Characteristics of Hyaluronic Acid Derivative Modified by Polyethylene Glycol ». *Journal of Wuhan University of Technology-Mater.* 23 (5): 617-21. doi:10.1007/s11595-007-5617-x.
- Chen S.J., Chen J.L., Huang W.C. et Chen H.L. 2009. « Fermentation Process Development for Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus Zooepidemicus* ATCC 39920 ». *Korean Journal of Chemical Engineering* 26 (2): 428-32. doi:10.1007/s11814-009-0072-3.
- Chen Y.H. et Wang Q. 2009. « Establishment of CTAB Turbidimetric Method to Determine Hyaluronic Acid Content in Fermentation Broth ». *Carbohydrate Polymers* 78 (1): 178-81. doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.037.
- Cheryan M. 1986. *Ultrafiltration Handbook*.
- Choi H., Zhang K., Dionysiou D.D., Oerther D.B. et Sorial G.A. 2005. « Effect of permeate flux and tangential flow on membrane fouling for wastewater treatment ». *Separation and Purification Technology* 45 (1): 68-78. doi:10.1016/j.seppur.2005.02.010.
- Choi S., Choi W., Kim S., Lee S.Y., Noh I. et Kim C.W. 2014. « Purification and Biocompatibility of Fermented Hyaluronic Acid for Its Applications to Biomaterials ». *Biomaterials Research* 18 (1): 1-10. doi:10.1186/2055-7124-18-6.
- Chong B.F., Blank L.M, Mclaughlin R. et Nielsen N.K. 2004. « Microbial hyaluronic acid production ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (4): 341-51. doi:10.1007/s00253-004-1774-4.
- Chyka P.A., Butler A.Y. et Herman M.I. 2001. « Ferrous Sulfate Adsorption by Activated Charcoal ». *Veterinary and Human Toxicology* 43 (1): 11-13.
- Cleary P.P. et Larkin A. 1979. « Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. » *Journal of Bacteriology* 140 (3): 1090-97.
- Cywes, Colette, et Michael R. Wessels. 2001. « Group A *Streptococcus* Tissue Invasion by CD44-Mediated Cell Signalling ». *Nature* 414 (6864): 648-52. doi:10.1038/414648a.

D Eng Y., Du G.C., Li X.F., Liu D.R. et Chen J. 2007. « Pretreatment process for hyaluronan extraction based on characteristics of fermentation broth ». *Guocheng Gongcheng Xuebao/The Chinese Journal of Process Engineering* 7 (2): 380-84.

Dicker K.T., Gurski L.A., Pradhan-Bhatt S., Witt R.L., Farach-Carson M.C. et Jia X. 2014. « Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions ». *Acta Biomaterialia* 10 (4): 1558-70. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019.

Di Ferrante N. 1956. « Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity ». *The Journal of biological chemistry* 220 (1): 303-6.

Dong Y. 2013. « Method for preparing hyaluronic acid from microbial fermentation broth ».

Fabbricino M., Naviglio B., Tortora G. et d'Antonio L. 2013. « An environmental friendly cycle for Cr(III) removal and recovery from tannery wastewater ». *Journal of Environmental Management* 117 : 1-6. doi:10.1016/j.jenvman.2012.12.012.

Foley, G. 1999. « Minimisation of process time in ultrafiltration and continuous diafiltration: the effect of incomplete macrosolute rejection ». *Journal of Membrane Science* 163 (2): 349-55. doi:10.1016/S0376-7388(99)00179-9.

Foley, G. 2006. « Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration ». *Desalination* 196 (1-3): 160-63. doi:10.1016/j.desal.2005.12.011.

Fraser J.R.E., Laurent T. C. et Laurent U.B.G. 1997. « Hyaluronan: Its Nature, Distribution, Functions and Turnover ». *Journal of Internal Medicine* 242 (1): 27-33. doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x.

GAspar M.M.F., Fobe E., Feltgen E., Vanderperre R., Delleré R. et De Palmenaer R. 1989. « Acide hyaluronique préparé à partir d'une culture bactérienne ».

Goh L.T. 1998. « Fermentation Studies of Hyaluronic Acid Production by *Streptococcus Zooepidemicus* ».

Goupy J. 2001. *Introduction aux plans d'expériences*.

Gura E., Hückel M., et Müller P.J. 1998. « Specific degradation of hyaluronic acid and its rheological properties ». *Polymer Degradation and Stability* 59 (1–3): 297-302. doi:10.1016/S0141-3910(97)00194-8.

Heatley F., et Scott J.E. 1988. « A Water Molecule Participates in the Secondary Structure of Hyaluronan ». *The Biochemical Journal* 254 (2): 489-93.

Hemant P.N., Sonal T. et Bondalakunta R. 2013. « Process for the Purification of Hyaluronic Acid Salts (HA) from Fermentation Broth ».

Ho C.C. et Zydney A.L. 2000. « A Combined Pore Blockage and Cake Filtration Model for Protein Fouling during Microfiltration ». *Journal of Colloid and Interface Science* 232 (2): 389-99. doi:10.1006/jcis.2000.7231.

Hoda N., Bayram E. et Ayranci E. 2006. « Kinetic and equilibrium studies on the removal of acid dyes from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon cloth ». *Journal of Hazardous Materials* 137 (1): 344-51. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.02.009.

Horton M.R., McKee C.M., Bao C., Liao F., Farber J.M, Hodge-DuFour J., Puré E., Oliver B.L., Wright T.M. et Noble P.W. 1998. « Hyaluronan Fragments Synergize with Interferon- γ to Induce the C-X-C Chemokines Mig and Interferon-Inducible Protein-10 in Mouse Macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (52): 35088-94. doi:10.1074/jbc.273.52.35088.

Huang W.C., Chen S.J. et Chen T.L. 2008. « Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation ». *Biochemical Engineering Journal* 40 (3): 460-64. doi:10.1016/j.bej.2008.01.021.

Im J.H., Song J.M., Kang J.H. et Kang D.J. 2009. « Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach ». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 (11): 1337-44.

Iuliana G., Popa M. et Rinaudo M. 2005. « Role of the pH on Hyaluronan Behavior in Aqueous Solution ». *Biomacromolecules* 6 (1): 61-67. doi:10.1021/bm040050m.

Jagannath S. et Ramachandran K. B. 2010. « Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus* ». *Biochemical Engineering Journal* 48 (2): 148-58. doi:10.1016/j.bej.2009.09.003.

Jaroniec M. 1975. « Adsorption on heterogeneous surfaces: The exponential equation for the overall adsorption isotherm ». *Surface Science* 50 (2): 553-64. doi:10.1016/0039-6028(75)90044-8.

Jeon O., Song S.J., Lee K.J., Park M.H., Lee S.H., Hahn S.K., Kim S. et Kim B.S. 2007. « Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities ». *Carbohydrate Polymers* 70 (3): 251-57. doi:10.1016/j.carbpol.2007.04.002.

Kim H., Lee H. et Moon M.H. 2006. « Size Characterization of Sodium Hyaluronate by Field Programming Frit Inlet Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation/Multiangle Light Scattering ». *Bulletin of the Korean Chemical Society* 27 (3): 413.

Kim J.H., Yoo S.J., Oh D.K., Kweon Y.G., Park D.W., Lee C.H. et Gil G.H. 1996. « Selection of a *Streptococcus Equi* Mutant and Optimization of Culture Conditions for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid ». *Enzyme and Microbial Technology* 19 (6): 440-45. doi:10.1016/S0141-0229(96)00019-1.

Kim J.H., Yoo S.Y., Oh D.K., Kweon Y.G., Park D.W., Lee C.H. et Gil G.H. 2013. « Selection of a *Streptococcus Equi* Mutant and Optimization of Culture Conditions for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid ». *Enzyme and Microbial Technology* 19 (6): 440-45.

Kitchen J.R. et Cysyk R.L. 1995. « Synthesis and Release of Hyaluronic Acid by Swiss 3T3 Fibroblasts. » *biochemical journal* 309 : 649-656.

Kogan G., Šoltés L., Stern r. et Gemeiner P. 2007. « Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer with a Broad Range of Biomedical and Industrial Applications ». *Biotechnology Letters* 29 (1): 17-25. doi:10.1007/s10529-006-9219-z.

Kosakai M., et Yosizawa Z. 1979. « A partial modification of the carbazole method of bitter and muir for quantitation of hexuronic acids ». *Analytical Biochemistry* 93: 295-98. doi:10.1016/S0003-2697(79)80154-2.

Krstić D.M., Tekić M.N., Zavargo Z.Z., Djurić M.S. et Ćirić G.M. 2004. « Saving water in a volume-decreasing diafiltration process ». *Desalination, Desalination Strategies in South Mediterranean Countries*, 165 : 283-88. doi:10.1016/j.desal.2004.06.033.

Kweon D.K., Park N.W., Lee G.Y. et Park S.H. 2012. « A Method for Purifying Hyaluronic Acid or Salt There Of ».

Lai Z.W. 2011. « Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920 ». *African Journal of Microbiology Research* 5 (15). doi:10.5897/AJMR11.305.

Leblanc P. 2014. « Sélection et mise en oeuvre "optimale" de souche microbienne en bioréacteur pour la production d'acide hyaluronique ». Thèse, nancy: Université de Lorraine.

Liu L., Liu Y., Li J., Du G. et Chen J. 2011. « Microbial Production of Hyaluronic Acid: Current State, Challenges, and Perspectives ». *Microbial Cell Factories* 10 (1): 99. doi:10.1186/1475-2859-10-99.

Lokeshwar V.B., et Selzer M.G. 2000. « Differences in Hyaluronic Acid-Mediated Functions and Signaling in Arterial, Microvessel, and Vein-Derived Human Endothelial Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27641-49. doi:10.1074/jbc.M003084200.

Lowry K.M. et Beavers E.M. 1994. « Thermal Stability of Sodium Hyaluronate in Aqueous Solution ». *Journal of Biomedical Materials Research* 28 (10): 1239-44. doi:10.1002/jbm.820281014.

MAleki A., Kjøniksen A.L., et Nyström B.. 2008. « Effect of pH on the Behavior of Hyaluronic Acid in Dilute and Semidilute Aqueous Solutions ». *Macromolecular Symposia* 274 (1): 131-40. doi:10.1002/masy.200851418.

Matsubara C., Kajwara M., Akasaka H. et Haze S. 1991. « Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Biosynthesis of Hyaluronic Acid ». *Chemical & pharmaceutical bulletin* 39 (9): 2446-48.

Morikawa M., Ninomiya H., Sawada H., et Tatsuno K. 2009. « Manufacturing Method of Hyaluronic Acid and Its Salt ».

Mo Y., Takaya T., Nishinari K., Kubota K. et Okamoto A. 1999. « Effects of Sodium Chloride, Guanidine Hydrochloride, and Sucrose on the Viscoelastic Properties of Sodium Hyaluronate Solutions ». *Biopolymers* 50 (1): 23-34. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199907)50:1<23::AID-BIP3>3.0.CO;2-G.

Murado M.A., Montemayor M.I., Cabo M.L., Vázquez J.A. et González M.P. 2012. « Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball ». *Food and Bioproducts Processing* 90 (3): 491-98. doi:10.1016/j.fbp.2011.11.002.

Murata H. et Fukuda K. 2009. « Method for Purification of Hyaluronic Acid Salt ».

NEtzer A., et Hughes D.E. 1984. « Adsorption of copper, lead and cobalt by activated carbon ». *Water Research* 18 (8): 927-33. doi:10.1016/0043-1354(84)90241-0.

Nielsen L.K., Chen W. et Esteban S.M.S. 2009. « Production of Hyaluronic Acid ».

Oueslati N., Leblanc P., Harscoat-Schiavo C., Rondags E., Meunier S., Kapel R., et Marc I. 2014. « CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form ». *Carbohydrate Polymers*. doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.039.

PAtil K.P., Kamalja K.K., et Chaudhari B.L. 2011. « Optimization of medium components for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 using a statistical approach ». *Carbohydrate Polymers* 86 (4): 1573-77. doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.065.

Pires A.M.B., et Santana M.H.A. 2010. « Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (6): 1751-61. doi:10.1007/s12010-010-8956-6.

Pires A.M.B., Macedo A.C., Eguchi S.Y. et Santana M.H.A. 2010. « Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives ». *Bioresource Technology* 101 (16): 6506-9. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.074.

Pires A.M.B. et Santana M.H.A. 2011. « Rheological Aspects of Microbial Hyaluronic Acid ». *Journal of Applied Polymer Science* 122 (1): 126-33. doi:10.1002/app.33976.

Rangaswamy V., et Jain D.. 2008. « An Efficient Process for Production and Purification of Hyaluronic Acid from *Streptococcus Equi* Subsp. *Zooepidemicus* ». *Biotechnology Letters* 30 (3): 493-96. doi:10.1007/s10529-007-9562-8.

Reddy K.J., Karunakaran K.T. et Sambasiva Rao K.R.S. 2011. « Enhanced Hyaluronic Acid Production by a Mutant Strain, 3523-7 of *Streptococcus zooepidemicus* ». *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 5 (4): 1473-79.

SAntosh Y., Dharmendra J., Nataraj V, Velankar H., Kapat A. et Rangaswamy V. 2010. « Process for purification of high molecular weight hyaluronic acid ».

Schanté C.E., Zuber G., Herlin C. et Vandamme T.F. 2011. « Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications ». *Carbohydrate Polymers* 85 (3): 469-89. doi:10.1016/j.carbpol.2011.03.019.

Schmidt K.H., Günther E. et Courtney H.S. 1996. « Expression of Both M Protein and Hyaluronic Acid Capsule by Group A Streptococcal Strains Results in a High Virulence for Chicken Embryos ». *Medical Microbiology and Immunology* 184 (4): 169-73.

Scott J.E. 1960. « Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues ». *Methods of biochemical analysis* 8: 145-97.

Scott J.E., Cummings C., Brass A. et Chen Y. 1991. « Secondary and Tertiary Structure of Hyaluronan in Aqueous-Solution, Investigated by Rotary Shadowing Electron-Microscopy and Computer-Simulation - Hyaluronan Is a Very Efficient Network-Forming Polymer ». *Biochemical Journal* 274 : 699-705.

Sekaran G., Mariappan M. et Raghavan K.V. 1996. « Adsorption of Bovine Serum Albumin from Salt Solution onto Activated Carbon ». *Bioprocess Engineering* 15 (3): 165-69. doi:10.1007/BF00369621.

Shah M.V., Badle S.S. et Ramachandran K.B. 2013. « Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway ». *Biochemical Engineering Journal* 80 : 53-60. doi:10.1016/j.bej.2013.09.013.

Shiedlin A., Bigelow R., Christopher W., Arbabi S., Yang L., Maier R.V., Wainwright N., Childs A. et Miller R.J. 2004. « Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: Streptococcus zooepidemicus, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord ». *Biomacromolecules* 5 (6): 2122-27. doi:10.1021/bm0498427.

Smidsrød O. et Haug A. 1967. « Precipitation of Acidic Polysaccharides by Salts in Ethanol-water Mixtures ». *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* 16 (3): 1587-98. doi:10.1002/polc.5070160335.

Song J.M., Im J.H., Kang J.H. et Kang D.J. 2009. « A Simple Method for Hyaluronic Acid Quantification in Culture Broth ». *Carbohydrate Polymers* 78 (3): 633-34. doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.033.

Toole B.P., Wight T.N., et Tammi M.I. 2002. « Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4593-96. doi:10.1074/jbc.R100039200.

Torregrosa R. et Martinmartinez J. 1991. « Activation of Lignocellulosic Materials - a Comparison Between Chemical, Physical and Combined Activation in Terms of Porous Texture ». *Fuel* 70 (10): 1173-80. doi:10.1016/0016-2361(91)90238-6.

Vázquez J.A., Montemayor M.I., Fraguas J. et Murado M.A. 2010. « Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera ». *Microbial cell factories* 9: 46. doi:10.1186/1475-2859-9-46.

Washburn E.W. 1921. « The Dynamics of Capillary Flow ». *Physical Review* 17 (3): 273-83. doi:10.1103/PhysRev.17.273.

Watanabe H., Nakata K., Kimata K., Nakanishi I. et Yamada Y. 1997. « Dwarfism and Age-Associated Spinal Degeneration of Heterozygote Cmd Mice Defective in Aggrecan ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (13): 6943-47.

Weissmann B. et Meyer K. 1954. « The Structure of Hyalobiuronic Acid and of Hyaluronic Acid from Umbilical Cord 1,2 ». *Journal of the American Chemical Society* 76 (7): 1753-57. doi:10.1021/ja01636a010.

Woolcock J. B. 1974. « The capsule of *Streptococcus equi* ». *journal of general microbiology*, sect. 85.

Yamada T. et Kawasaki T. 2005. « Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches ». *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (6): 521-28. doi:10.1263/jbb.99.521.

Yee K.W.K., Wiley D.E. et Bao J. 2009. « A unified model of the time dependence of flux decline for the long-term ultrafiltration of whey ». *Journal of Membrane Science* 332 (1–2): 69-80. doi:10.1016/j.memsci.2009.01.041.

ZHou H., Ni J., Huang W. et Zhang J. 2006. « Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration ». *Separation and Purification Technology* 52 (1): 29-38. doi:10.1016/j.seppur.2006.03.011.

CONCEPTION ET OPTIMISATION D'UN PROCÉDE EXTRAPOLABLE DE PURIFICATION D'ACIDES HYALURONIQUES PRODUITS PAR CULTURE MICROBIENNE

L'acide hyaluronique (AH) est un polymère osidique aux propriétés mécaniques et biologiques d'intérêt pour le secteur de la santé et des cosmétiques. L'AH est produit à l'échelle industrielle par mise en œuvre de souches de streptocoques groupe C et D. A l'issue de la production, une part de l'AH est libre dans le milieu de culture complexe, l'autre est associée à la capsule des cellules. La purification de l'AH est délicate en raison, d'une part, de la complexité des milieux de production et, d'autre part, des exigences de la pharmacopée européenne.

L'objectif de cette thèse a été de proposer un enchaînement d'opérations et de conditions opératoires permettant une purification de l'AH à partir d'un milieu de production.

Au départ, deux méthodes analytiques originales de quantification et d'évaluation de la taille de l'AH en milieux complexes ont été mises au point afin de pouvoir évaluer les critères de performance des procédés de séparation. Ensuite, quatre opérations permettant, premièrement l'extraction, deuxièmement l'élimination des cellules productrices d'AH, troisièmement la purification, et enfin, le séchage d'AH ont été établies.

L'étude de l'extraction de la capsule d'AH assistée par SDS ou au TCA a permis d'établir que l'AH lié aux cellules ne représente que 7 % de l'AH produit. Il en a été déduit que cette étape n'est pas nécessaire. L'étude de la séparation des cellules du milieu de culture a montré que la microfiltration tangentielle n'est pas adaptée en raison, d'une part, d'une rétention trop élevée de l'AH (même avec des diamètres de pores supérieurs à 0,22 μm) et d'autre part, d'un colmatage trop rapide des membranes. Cette étape doit être réalisée par filtration frontale sur adjuvant de filtration (Célite). La purification de l'AH a été envisagée par diafiltration (DF) avec des membranes d'ultrafiltration. L'étude des conditions opératoires (PTM, débit d'alimentation, concentration en AH et seuil de coupure), par plan d'expériences, a permis de sélectionner des conditions qui maximisent le flux de perméat ainsi que la rétention d'AH. Ces conditions ont été appliquées en diafiltration au cours de laquelle les performances de séparation (rendement, pureté, productivité) ont été étudiées. Une méthodologie, basée sur les équations classiques de bilans de matière et de flux de perméat en DF, a alors été proposée. Cette démarche avait tout d'abord pour but de prédire lesdites performances en prenant en compte la composition complexe du milieu, de culture bactérienne mais aussi de faciliter l'agencement des étapes du procédé de purification. La diafiltration permet de satisfaire les exigences de pureté de la pharmacopée, mais pas les niveaux de certaines molécules (protéines et acides nucléiques). L'étude de l'adsorption de ces molécules sur charbon actif, en fonction de la température, de la force ionique, du pH et du type de charbon actif, a permis d'établir les conditions les plus favorables de l'élimination de ces molécules. Les équations classiques de modélisation des isothermes correspondant le mieux aux résultats expérimentaux ont été sélectionnées et utilisées avec les équations de performance en DF, afin d'associer au mieux ces deux étapes. Enfin, concernant le séchage de l'AH, deux méthodes, l'une par lyophilisation et l'autre par précipitation en solvant organique, ont été comparées. Ces dernières permettent d'obtenir moins de 20 % d'humidité et de conserver les propriétés des molécules d'AH.

Mots clés : Acide hyaluronique, méthode de quantification, purification, culture microbienne

CONCEPTION AND OPTIMIZATION OF AN EXTRAPOLATED PROCESS TO PURIFY HYALURONIC ACIDS BY MICROBIAL CULTURE

Hyaluronic acid (HA) is a biopolymer with mechanical and biological properties interesting the health and cosmetic areas. The industrial HA production is realized by implementation of *streptococcus* strains (group C or D). At the end of the production phase, a part of HA is free in a complex culture medium while the other remains associated to the cells in a capsule. The two main difficulties of the purification of HA lie, firstly, on the complexity of the production medium and, secondly, on the high requirements of the European Pharmacopoeia for such an application.

The aim of this thesis was to provide an appropriate sequence of separation processes and a set of operating conditions for HA purification from a complex production medium which complies with the Pharmacopoeia.

Initially, two original analytical methods for quantifying and evaluating the size of HA in complex environments have been developed in order to evaluate the performance criteria of the separation processes. Then, the HA extraction from the capsule, the elimination of cells, the purification and drying of HA were using classical separation processes and studied. The HA extraction by SDS or TCA showed that the HA bound to cells corresponds to 7 % of HA production. As a consequence, it was concluded that this step was not necessary. The cell separations from the culture medium by tangential microfiltration was unsuitable because of an excessive retention of HA (even at pore diameters higher than 0.22 μm) and a too fast membrane clogging. Good performances were observed with dead-end filtration using Celite. Then, the purification of HA by diafiltration (DF) with ultrafiltration membranes was considered. The operating conditions (PTM, feed rate, HA concentration and cutoff) allowing to maximize the permeate flow rate and the HA retention were selected from design of experiments methodology. The performances of purification by diafiltration (DF) in these conditions (yield, purity and productivity) were monitored. A method for predicting the performances according to the complex medium composition, based on the conventional mass balance equations and the DF permeate flow rate, was then proposed. This was done in order to facilitate the arrangement of the purification steps. In DF, the requirement of the pharmacopoeia in term of overall purity was obtained (> 95 %) but the proteins and nucleic acids levels were still above the threshold. This is why the adsorption of these molecules on activated carbon was studied as a function of temperature, ionic strength, pH and the type of activated carbon. The isotherm equations that better fitted the experimental data were selected and used combined to the equations of DF performances in order to find an appropriate chaining. Finally, the AH lyophilization and precipitation in organic solvent were compared. Both drying methods present less than 20 % moisture and preserve the properties of the molecule.

Key words: Hyaluronic acid, quantification method, purification, microbial culture