

III. APPROCHE EXPERIMENTALE

III.1. INTRODUCTION

Le but que nous nous sommes assigné pour ce travail est la compréhension du pouvoir moussant de la gélatine en relation avec sa nature et ses propriétés physico-chimiques.

Dans les premiers stades, nous nous sommes appliqués à mettre au point quelques techniques nécessaires à cette étude. Nous avons ainsi adapté des méthodes pour les mesures de capacité moussante, de stabilité de la mousse, pour la détermination de la distribution de masses moléculaires et de points isoélectriques, ainsi que pour les dosages d'acides gras et de phospholipides.

La partie expérimentale décrite ci-dessous traitera donc des diverses mises au point nécessaires à la sensibilité des mesures et à la reproductibilité des résultats.

Pour des raisons de clarté, le matériel et les protocoles retenus pour la caractérisation de la gélatine sont présentés au début de ce chapitre. Certaines méthodes d'analyse ont été utilisées telles quelles (dosage de la matière sèche, mesures de la viscosité, de la force en gelée, dosage des cations) ou ont subi des modifications mineures (dosage des acides gras totaux et des phospholipides) et d'autres ont nécessité une mise au point plus conséquentes (mesure du pouvoir moussant, caractérisation de la distribution de masses moléculaires et de points isoélectriques). Pour ces dernières, les raisons du choix des méthodes et leurs mises au point seront donc exposées dans le paragraphe traitant des résultats.

III.2. MATERIEL ET METHODES

3.2.1. DOSAGE DE LA TENEUR EN MATIERE SECHE

Le dosage de la matière sèche a été réalisé suivant la méthode décrite dans British Standard 757 (1975) avec les modifications suivantes : une prise d'essai de 2 grammes et un séchage à 105°C pendant 48 heures.

3.2.2. MESURE DE LA VISCOSITE DES SOLUTIONS DE GELATINE

Afin de comparer nos valeurs à celles fournies par la littérature, nous avons choisi la méthode de mesure de la viscosité des solutions de gélatine communément utilisée par les fabricants.

La viscosité des solutions de gélatine à 6,6 % p/v est mesurée avec un viscosimètre d'Ostwald à la température de 60°C ; il s'agit d'une mesure de la vitesse d'écoulement d'un fluide entre deux points. Elle est exprimée en millipoises (mP) (méthode British Standard 757, 1975). Les analyses ont été effectuées par la société PB GELATINS.

3.2.3. MESURE DE LA FORCE EN GELEE

Le choix de la mesure de la force en gelée est basé sur les mêmes critères que ceux énoncés au § 3.2.2. La force en gelée caractérise la résistance des gels à la compression : il s'agit d'une mesure de la masse nécessaire pour enfoncer de 4 mm un piston métallique de section donnée dans un gel. Elle est exprimée en grammes Bloom (g Bloom), une unité arbitraire utilisée conventionnellement par les fabricants de gélatine (méthode British Standard 757, 1975). Les analyses ont été effectuées par la société PB GELATINS.

3.2.4. MESURE DE LA CAPACITE MOUSSANTE

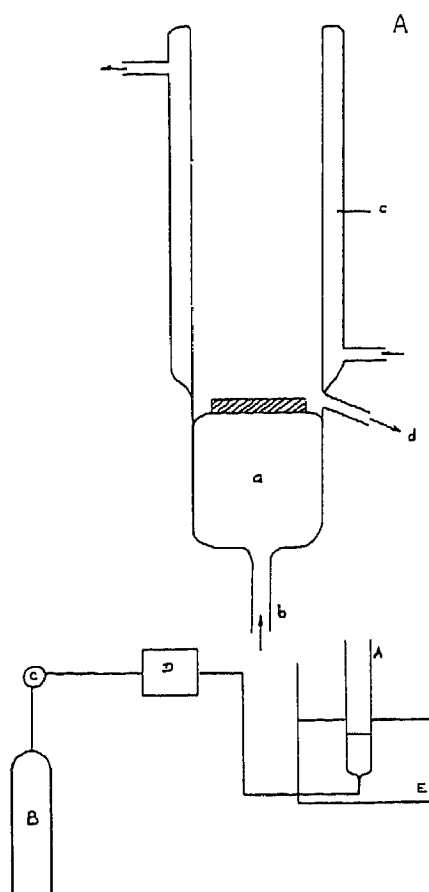
Une quantité déterminée d'azote est injectée dans une colonne à mousse, au travers d'un verre fritté. La hauteur de mousse formée est mesurée immédiatement après l'injection du gaz. Dans le cas d'une colonne de diamètre constant, le volume de la mousse formée peut être remplacé avantageusement par sa hauteur. En effet, le volume est alors défini par la relation :

$$V = \pi. R^2. H ,$$

où V = volume de la mousse ,
R = rayon de la colonne et
H = hauteur de la mousse.

- MATERIEL

- bain circulant thermostaté (Haake, E2),
- débitmètre massique calibré de 0 à 300 ml/min d'azote (Brooks 5850 TR),
- baguette de verre (évite la formation de mousse pendant l'écoulement de la solution de gélatine dans la colonne),
- trompe à vide (rinçage des bouchons rodés),
- colonne à mousse graduée, de 30 cm de hauteur et de 4 cm de diamètre intérieur munie d'un rodage B₁₄ (cf. Figure 3.1.)



A. colonne en verre :

- a. bouchon rodé muni d'un verre fritté de porosité P₃,
- b. embout permettant l'injection du gaz,
- c. double enveloppe,
- d. vidange de la colonne;

B. bonbonne d'azote;

C. détendeur (Air Liquide, HBS 300/8);

D. débitmètre massique (Brooks, 5850 TR);

E. bain thermostaté à 40°C (~ 0,5°C)

Figure 3.1. : Schéma de l'installation de mesure de la capacité moussante.

- MODE OPERATOIRE

- Préparer des dispersions de gélatine à 0,1-0,5-1-2,5-5-7,5-10-15 % p/v (valeurs corrigées en fonction de la teneur en matière sèche) dans de l'eau milli-Q (système Millipore).
- Laisser gonfler la gélatine pendant 1 heure à température ambiante avant de placer les dispersions au bain-marie à 40°C (au minimum 1 heure, transition de l'état "gel" à l'état "sol").
- Verser environ 50 ml de solution dans la colonne (purger pour amener le ménisque de la solution à une graduation arbitraire).
- Injecter de l'azote sec (Air Liquide) dans la colonne au débit de 150 ml/min pendant une durée de 30 secondes.
- La capacité moussante est déterminée en mesurant la hauteur de mousse au centre de la colonne (pour limiter les effets de bord).

Remarques :

- Avant chaque mesure, vérifier la propreté de la colonne et du fritté par la mesure de la hauteur de mousse d'une solution à 0,01 % p/v de sérum albumine bovine (A 6003 : "fatty acid free", Sigma).
- Entre chaque mesure, la colonne est rincée abondamment à l'eau chaude (~ 90°C) puis à l'eau milli-Q. Le bouchon rodé (Fig. 3.1., A.a.) est démonté de la colonne et rincé en aspirant à travers le verre fritté 250 ml d'eau milli-Q chaude (~ 90°C).
- Changer systématiquement de fritté pour tout nouvel échantillon.
- Les mesures sont effectuées en double ou en triple selon le cas et un nouveau bouchon rodé est utilisé pour chaque échantillon.
- Après une série quotidienne de mesures, la colonne et les bouchons rodés sont remplis de mélange sulfochromique. Quand les résultats obtenus avec la B.S.A. ne s'avèrent plus satisfaisants, les bouchons sont nettoyés d'abord avec une solution de

papaïne (50 mg/ml d'eau, papaïne soluble FU, USP, 6000 USP-U/mg, Merck) à température ambiante qui agit pendant une nuit puis au mélange sulfochromique.

3.2.5. MESURE DE LA STABILITE DE LA MOUSSE

La stabilité de la mousse est définie par son "temps de demi-vie", qui représente le temps nécessaire pour que le volume initial de mousse soit réduit de moitié.

Le matériel et le protocole sont identiques à ceux décrits au § 3.2.4., à l'exception du fait que la hauteur de mousse est suivie au cours du temps, jusqu'à ce qu'elle atteigne la moitié de sa valeur initiale.

3.2.6. CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION DE MASSES MOLECULAIRES DE LA GELATINE

La distribution des masses moléculaires de la gélatine est caractérisée par électrophorèse sur gel plat de polyacrylamide en présence de S.D.S. La séparation des fragments protéiques est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970), leur fixation selon la méthode de Steck et coll. (1980) et leur coloration selon celle de Morrissey (1981).

- REACTIFS

L'acrylamide (Ultrograde), le NN'-méthylènebisacrylamide (Ultrograde), le S.D.S. (Ultrograde), le persulfate d'ammonium (Ultrograde), le TEMED (Ultrograde), et les standards de masses moléculaires (HMW) sont produits par LKB-Pharmacia. L'EDTA (p.a.), l'urée (pour usages biochimiques), le carbonate de sodium anhydre (p.a.) et l'acide acétique glacial (100%) sont produits par Merck. Le glycérol (p.a.), la glycine (p.a.) et la formaldéhyde (35% p.a.) sont des produits de la marque UCB, le Tris (>99,8%) est un produit Fluka, le DTT (99%) est un produit Sigma Chemical C°, le Serva Blue G-250 (Research Grade) est un produit Serva, l'éthanol (95°G.L.) est un produit Codex et le nitrate d'argent (p.a.) est fourni par Janssen Chimica.

L'eau utilisée est filtrée sur système milli-Q (Millipore).

- MODE OPERATOIRE

- Préparation des réactifs :

- solution d'acrylamide - bisacrylamide (30 : 0,8)
- Tampon de séparation (Tris-HCl, pH 8,8) :
1,5 M Tris - 0,4% (p/v) S.D.S. - 8 mM EDTA
ajuster le pH à 8,8.
- Tampon de concentration (Tris-HCL, pH 6,8) :
0,5 M Tris - 0,4% (p/v) S.D.S. - 8 mM EDTA
ajuster le pH à 6,8
- Tampon d'échantillon :
80 mM Tris - 1% (p/v) S.D.S. - 10% (p/v) glycérol
2 mM EDTA - 1.10^{-2} % (p/v) Serva Blue G-250

Toutes ces solutions sont filtrées sur filtre Gelman Sciences Inc. (Supor-200 ; 0,2 μ m).

- Persulfate d'ammonium 10% (p/v)
- Tampon d'électrode 10x concentré :
0,25 M Tris - 1,92 M glycine - 1% (p/v) S.D.S.
ajuster le pH à 8,3 au moment de l'emploi.

- Préparation des gels :

- Avant de couler le gradient de 10 à 17 % en polyacrylamide (appareil pour former les gradients, modèle 385 de Bio-Rad), les solutions décrites dans le Tableau 3.1. sont préparées et dégazées.

CONCENTRATION	10 %	17 %
acrylamide - bisacrylamide (30 : 0,8)	4,83 ml	8,46 ml
tampon séparation pH 8,8	3,63 ml	3,63 ml
H ₂ O	6,04 ml	2,41 ml
TEMED	10 μ l	7 μ l
persulfate d'ammonium 10% (p/v)	110 μ l	80 μ l

Tableau 3.1. : Préparation des solutions nécessaires à l'élaboration du gradient de concentrations de 10 à 17 % en polyacrylamide.

- Le gel de concentration de 5 % en polyacrylamide est préparé de la façon suivante :

- acrylamide - bisacrylamide : 1,66 ml
- tampon de concentration pH 6,8 : 2,5 ml
- H₂O : 5,83 ml
- TEMED : 10 µl
- persulfate d'ammonium (10% p/v): 90 µl.

La solution est dégazée avant emploi.

- La séparation des fragments protéiques est réalisée avec une cellule d'électrophorèse de Bio-Rad (Protean II Slab Gel, dimensions du gel : 16 x 16 x 0,1 cm) dans les conditions suivantes : 120 V dans le gel tasseur, 250 V dans le gel de séparation et la durée moyenne de la migration est de 6 heures.

- Fixation :

1°) une heure dans un mélange composé de 180 ml d'éthanol, de 420 ml de H₂O et de 100 ml de formaldéhyde (35%);

2°) une heure dans un mélange composé de 125 ml d'éthanol, de 375 ml de H₂O et de 5 ml de formaldéhyde (35%).

- Rinçage : 5 fois (15 minutes au minimum) avec de l'eau milli-Q.

- Réduction : 20 minutes dans une solution aqueuse de DTT (128 ml/400 ml d'eau) à partir d'une solution stock à 15,4 mg/ml.

- Imprégnation du gel au nitrate d'argent : 20 minutes dans une solution aqueuse de nitrate d'argent (800 mg/400 ml).

- Rinçage à l'eau : 30 secondes maximum.

- Développement : dans 200 ml d'eau contenant 6 g de carbonate de sodium et 100 ml de formaldéhyde (35%).

- Arrêt de la réaction : dans une solution d'acide acétique à 2% (v/v).

- Rinçage : à l'eau.

- Les gels sont "lus" sur Ultrosan XL Laser Densitometer (LKB-Pharmacia).

3.2.7. CARACTERISATION DE LA DISTRIBUTION DE POINTS ISOELECTRIQUES DE LA GELATINE

3.2.7.1. Electrofocalisation sur gel d'acrylamide

La détermination de la distribution des pI de la gélatine est basée sur une électrofocalisation des molécules sur gel plat d'acrylamide en présence d'urée. La fixation et la coloration des protéines sont basées sur la méthode de Neuuhoff et coll. (1988).

- MATERIEL

- Appareil d'électrophorèse : LKB 2117 Multiphor (LKB-Pharmacia), dimensions du gel : 265 x 150 x 2 mm ;
- Appareil d'électrofocalisation Model 111 Mini IEF Cell (Bio-Rad) , dimensions des gels : 125 x 65 x 0,4 mm ;
- Membranes de filtration Gelman Sciences Inc. (Supor-200 ; 0,2 μ m) ;
- Gel Bonds pour acrylamide : - 265 x 150 mm (LKB-Pharmacia)
- 125 x 65 mm (Bio-Rad) ;
- Densitomètre pour la lecture des gels : Ultrosan XL Laser Densitometer (LKB-Pharmacia).

- REACTIFS

L'acrylamide (Ultrade), le NN'-méthylènebisacrylamide (Ultrade), le persulfate d'ammonium (Ultrade), le TEMED (Ultrade), les marqueurs de pI (pI 3-10), le bleu de Coomassie CBB G-250 et les ampholytes (Pharmalytes 3-10 : 40% p/v) sont fournis par LKB-Pharmacia, alors que la riboflavine-5'-posphate, les ampholytes Bio-Lyte 4-6 (40% p/v), Bio-Lyte 6-8 (40% p/v), Bio-Lyte 8-10 (40% p/v) et la résine échangeuse de cations et d'anions Mixed Bed AG 501-X8 sont fournis par Bio-Rad. Le glycérol (p.a.), le NaOH (p.a.), le TCA (p.a.), l'acide phosphorique (99% p.a.) et le sulfate d'ammonium (p.a.) sont des produits de la marque UCB. L'urée (pour usages biochimiques) est un produit Merck et le méthanol (pour HPLC) est un produit Romil Chemicals. L'eau utilisée est filtrée sur système milli-Q (Millipore).

- MODE OPERATOIRE

- Préparation des gels :

Nous avons opté pour la composition du gel décrite par Hasegawa et coll. (1988). Les concentrations en polyacrylamide utilisées sont de 4% T et 6% C, où :

- la concentration totale en polyacrylamide est définie par :

$$\%T = 100 \frac{\text{g d'acrylamide} + \text{g de bisacrylamide}}{100 \text{ ml de solution de gel}}$$

- le degré de réticulation est défini par :

$$\%C = 100 \frac{\text{g de bisacrylamide}}{\text{g d'acrylamide} + \text{g de bisacrylamide}}$$

Les grands gels (matériel de LKB-Pharmacia) sont coulés avec un mélange contenant 10,8 ml de solution d'acrylamide-bisacrylamide (23,6% T-5,9% C, désionisée en batch sur résine échangeuse d'anions et de cations puis filtrée sur 0,2 μm), 48 ml d'urée 7,5 M, 1,2 ml d'ampholytes 3-10 et 400 μl de persulfate d'ammonium 10% (p/v).

Les mini-gels (matériel de Bio-Rad) sont coulés avec un mélange contenant 1,7 ml d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide (23,6% T-5,9% C, désionisée en batch sur résine échangeuse d'anions et de cations puis filtrée sur 0,2 μm), 4,6 ml d'urée 7,5 M, 0,5 ml d'ampholytes (pI 3-10, 4-6, 6-8 et 8-10 selon le cas), 1,2 ml d'eau, 2,52 g de glycérol, 70 μl de persulfate d'ammonium (10% p/v), 50 μl de riboflavine-5'-phosphate (0,1% p/v) et 3 μl de TEMED. La polymérisation des mini-gels s'effectue sous lampe U.V. (45 min plus 15 min supplémentaires pour éliminer le monomère non polymérisé de la surface du gel).

- Préparation des échantillons :

Elle est fonction de l'expérience à réaliser.

Les échantillons sont déposés directement sur le gel, sans intermédiaire de papiers applicateurs, pour éviter qu'une fraction des échantillons ne pénètre dans le gel.

- Conditions d'électrophorèse :

Pour les grands gels, les paramètres appliqués sont consécutivement 100 V - 25 mA - 30 min, 200 V - 25 mA - 30 min, 400 V - 20 mA - 60 min, 500 V - 10 mA - 60 min et 600 V - 8 mA - 60 min.

Pour les mini-gels, ces paramètres sont 100 V - 6 mA - 1 W - 15 min, 200 V - 6 mA - 1 W - 15 min, 300 V - 5 mA - 1 W - 60 min, 400 V - 4 mA - 2 W - 60 min et 450 V - 4 mA - 2 W - 30 min.

- Fixation : 1 heure dans du TCA 20% (p/v).

- Coloration : 1 nuit dans un mélange contenant 20 % (v/v) de méthanol, 1,6 % (p/v) d'acide phosphorique, 15 % (p/v) de sulfate d'ammonium et de 0,1 % (p/v) de CBB G-250. Ce dernier a été préalablement purifié selon la méthode de Neuhoff et coll. (1988).

- Rinçage : les gels sont rincés rapidement dans une solution de méthanol à 20% (v/v).

- Fixation de la coloration : dans une solution de sulfate d'ammonium à 25 % (p/v).

3.2.7.2. Electrofocalisation sur ROTOFOR

Ce système d'électrofocalisation préparative s'effectue en phase liquide, en présence d'urée et d'ampholytes. Les compartiments de la cellule d'électrolyse permettent de récupérer 20 fractions après séparation.

Le matériel se compose d'une cellule d'électrolyse (Rotofor Cell, Bio-Rad), d'une source de tension programmable (Modèle 3000x_i, Bio-Rad) et d'un cryostat (Haake).

MODE OPERATOIRE

- Conditions du premier fractionnement :

Les échantillons de gélatine (0,5 g) sont dissouts dans 10 ml d'une solution d'urée 6M [Urée pour usages biochimiques (Merck), désionisée en batch sur résine

échangeuse d'anions et de cations, Mixed Bed AG 501-X8 (Bio-Rad)] contenant 200 µl d'ampholytes 3-10 [Pharmalytes 3-10 (40% p/v), LKB-Pharmacia] . L'eau utilisée est filtrée sur système milli-Q (Millipore).

Les solutions d'électrolyte de l'anode et de la cathode sont respectivement 0,1 M d'acide phosphorique (99% p.a., UCB) et 0,1 M d'hydroxyde de sodium (p.a., UCB).

Avant le dépôt de l'échantillon, un préfractionnement est effectué pour établir le gradient de pH. L'électrofocalisation est réalisée dans 40 ml de solution contenant 0,8 ml d'ampholytes (40% v/v), 32 ml d'urée 7,5 M, 2 g de glycérol et 5,6 ml d'eau.

L'électrofocalisation est réalisée dans les conditions suivantes :

V max. : 2000 V, I max. : 32 mA, P max. : 12 W, cte : $P = 12 \text{ W}$, pendant 75 min à 10°C.

Immédiatement après le préfractionnement, l'échantillon de gélatine est introduit dans la chambre d'électrofocalisation, le plus loin possible de la zone correspondant à son pI. Dans le cas d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (pI compris généralement entre pH 6 et 9), l'échantillon est déposé à proximité de la cathode.

Les conditions de l'essai sont identiques à celles décrites pour le préfractionnement, excepté en ce qui concerne la durée portée à 130 min. La fin de l'électrofocalisation est également définie par $V \cdot H = 2220$ Volts-heures (intégrale de temps du potentiel électrique appliqué) (Garfin, 1990).

Dès que le fractionnement est terminé, les fractions sont récoltées sous vide dans vingt tubes correspondant aux vingt cellules d'électrofocalisation. Le pH de chaque fraction récoltée est mesuré directement à l'aide d'une mini-électrode.

Estimation de la concentration en protéine dans les fractions récoltées

Nous avons procédé de manière indirecte : après électrofocalisation sur gel de polyacrylamide et lecture des gels à l'Ultrascan XL Densitometer (LKB-Pharmacia), nous avons calculé le rapport des intensités de coloration obtenues pour l'échantillon et le témoin (cf. Tableau 3.14), car les dosages colorimétriques selon la méthode de Bradford

(1976) modifiée par Duhamel et coll. (1981) possèdent un domaine de linéarité trop restreint et les mesures sont peu sensibles.

- Conditions du deuxième fractionnement :

Le deuxième fractionnement a pour but de concentrer des fractions de points isoélectriques acides et basiques afin d'effectuer, par la suite, des essais de stabilité de mousse à partir de ces isolats. Les fractions intéressantes sont mélangées et diluées dans une solution d'électrofocalisation contenant 6 M urée, 5% (p/v) glycérol et dans laquelle on n'ajoute pas d'ampholyte. Le volume final est de 55 ml. L'électrofocalisation débute sans établir au préalable le gradient de pI (préfractionnement).

Les conditions d'électrofocalisation sont les suivantes :

V max.: 2000 V, I max. : 35 mA, P max. : 12 W, P = 12 W, 10°C, 120 min., V*H = 3451 volts-heures.

Une fois l'électrofocalisation terminée, les étapes ultérieures sont identiques à celles décrites pour le premier fractionnement.

3.2.8. ANALYSE DES CATIONS

L'analyse des cations est effectuée par absorption atomique après minéralisation à l'acide chlorhydrique (British Standard 757, 1975). La teneur en cations de nos échantillons a été déterminée par la société PB GELATINS.

3.2.9. DOSAGE DES LIPIDES TOTAUX

3.2.9.1 Principe

Les acides gras totaux sont dosés sous la forme d'esters méthylés (FAME) détectés par chromatographie en phase gazeuse.

Il faut toutefois remarquer que cette méthode ne fait pas la distinction entre les différentes fractions lipidiques (acides gras libres, mono-, di- et triglycérides, glycolipides, phospholipides,...) que l'on peut rencontrer dans la gélatine.

3.2.9.2. Matériel

- Réactifs

La papaine soluble (FU, USP, 6000 USP-U/mg) et le chlorure de sodium (p.a.) sont des produits de la marque Merck, la p-aminodiphénylamine (practical grade) et le trifluorure de bore (14% p/v dans méthanol) sont des produits Sigma Chemical C°, le chloroforme (pour la spectrophotométrie, >99%), est un produit Janssens Pharmaceutica, le méthanol (pour H.P.L.C.) est un produit Romil Chemicals, le toluène (p.a.) et l'isooctane (tout pur) sont des produits UCB.

Les esters méthylés d'acides gras C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C16:0, C16:1, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:4 (cf. Abréviations) sont fournis par Alltech, l'hydrogène, l'azote et l'air sec par Air Liquide.

- Vaisselle non usuelle

- tubes A : tubes à centrifuger, fond rond, bouchon à visser muni d'un joint en téflon, verre borosilicaté, 40 mm x 140 mm (Vel),
- tubes B : tubes à réaction, fond rond, rodage femelle RN19, verre borosilicaté, 22 mm x 150 mm (Vel),
- tubes C : tubes à réaction, fond rond, bouchon à visser muni d'un joint en téflon, verre borosilicaté, 14 mm x 100 mm (Vel),

3.2.9.3. Mode opératoire

- Préparation des solutions de gélatine (5 % p/v) :

Remarque préliminaire : pour des raisons pratiques, nous avons opté pour la séparation des phases liquides (méthanol-eau, d'une part, et chloroforme, d'autre part)

par centrifugation à 4°C. Cependant, après cette opération, la masse protéique est gélifiée, ce qui nuit à une extraction correcte des lipides. Nous avons contourné ce problème en solubilisant nos échantillons dans une solution de papaïne 0,25% (p/v). L'enzyme hydrolyse la gélatine pendant une nuit à température ambiante. L'avantage de ce mode de solubilisation de la gélatine est qu'il ne dénature pas les lipides à doser ultérieurement.

Laisser gonfler dans 95 ml d'eau 5 g de gélatine (valeur corrigée en fonction de la teneur en matière sèche) pendant 1 h à température ambiante avant d'y ajouter 5 ml d'une solution de papaïne (50 mg/ml H₂O). Agiter puis placer la solution 1 h au bain-marie à 40°C. Agiter et laisser refroidir dans le bain (jusqu'à température ambiante) pendant une nuit.

- *Extraction :*

Prélever 50 ml de solution de gélatine et les verser dans le tube A. Y ajouter 25 ml de mélange chloroforme-méthanol (2:1) contenant du p-ADPA comme anti-oxydant à raison de 30 µg/l. Agiter 10 minutes à température ambiante sur une table vibrante (100 va et vient / min). Centrifuger 10 minutes à 4°C, 2000 tpm (centrifugeuse RC2-B, rotor GSA, Sorvall). Prélever la phase inférieure et verser cette phase chloroformique dans un erlenmeyer de 250 ml. L'extraction est répétée 3 fois.

- *Concentration :*

Evaporer à sec (sous courant d'azote) la totalité de l'extrait lipidique par petites fractions dans les tubes B (système de concentration Reacti-Vap, modèle 18780, Pierce).

- *Méthanolyse :*

Reprendre l'extrait par 275 µl de toluène et le transférer quantitativement dans le tube C. Rincer le tube B avec une fois 300 µl de BF₃/méthanol puis deux fois 200 µl et transférer dans le tube C. Ajouter 25 µl de standard interne (margarate de méthyle : 9,81 mg/ml isooctane) dans chaque tube C. Sceller ce dernier sous azote et le chauffer dans un bain sec pendant 2 h à 100°C. Refroidir puis ajouter 8 ml d'une solution saturée de chlorure de sodium. Agiter 1 min à la main et centrifuger 1 min à 1000 tpm (centrifugeuse de table). Injecter 1 µl de la phase toluène avec une seringue de 10 µl.

3.2.9.4. Conditions chromatographiques

- colonne : 30 m x 0,32 mm de diamètre interne, 0,25 μ m d'épaisseur du film (Nukol Supelco),
- G.C. : - Sigma 3 (Perkin Elmer),
 - détecteur F.I.D. (flamme H₂/air sec), avec P_{air} = 4600 kPa, P_{H₂} = 1600 kPa ;
 - gaz vecteur N₅₀ , P_{N₅₀} = 5800 kPa ;
- split, temps de rétention du méthane : 1,4 min.
- intégrateur : Shimadzu C-R4A (Chrompac),
- température du four :- 100°C pendant 2 min.,
 - augmentation de température de 10°C/min.,
 - palier à 190° C,
- température du détecteur : 230°C.

3.2.9.5. Etalonnage

Les acides gras analysés sont les acides caprique, caprylique, caproïque, laurique, myristique, palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, arachidique et arachidonique. L'acide gras correspondant au standard interne est l'acide margarique.

- Droites d'étalonnage :

Un microlitre de chaque mélange standard est injecté dans la colonne de manière à établir les droites d'étalonnage. Les domaines de concentrations de chaque standard sont établis après quelques essais de dosage sur différents types de gélatine (cf. Tableau 3.2.).

Les droites d'étalonnage sont du type : $Y = aX + b$.

En abscisse (X) est donnée la concentration en FAME (μ g/ μ l), tandis que l'ordonnée (Y) est donnée par la formule suivante :

$$Y = c_i \cdot S/S_i ,$$

- où - c_i = concentration de standard interne ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$),
 - S = surface du pic de FAME et
 - S_i = surface du pic de standard interne.

Les caractéristiques des droites d'étalonnage sont regroupées dans le tableau 3.2.

FAME	Domaine de concentrations ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	$F = 1/a$	r
C6:0	0 - 0,12	1,314	0,9912
C8:0	0 - 0,12	1,125	0,9989
C10:0	0 - 0,12	1,095	0,9992
C12:0	0 - 0,12	0,963	0,9971
C14:0	0 - 0,12	1,053	0,9990
C16:0	0 - 7,37	1,474	0,9992
C16:1	0 - 3,08	0,933	0,9996
C18:0	0 - 4,67	1,198	0,9987
C18:1	0 - 0,10	1,296	0,9988
C18:2	0 - 0,12	0,797	0,9997
C18:3	0 - 0,10	1,272	0,9999
C20:0	0 - 0,10	0,855	0,9987

Tableau 3.2. : Facteurs d'analyse F (inverse de la pente de la droite d'étalonnage), coefficients de corrélation (r) et domaines de linéarité couverts par les différentes droites d'étalonnage de FAME.

La Figure 3.2. représente un chromatogramme type d'un mélange standard d'esters méthylés d'acides gras.

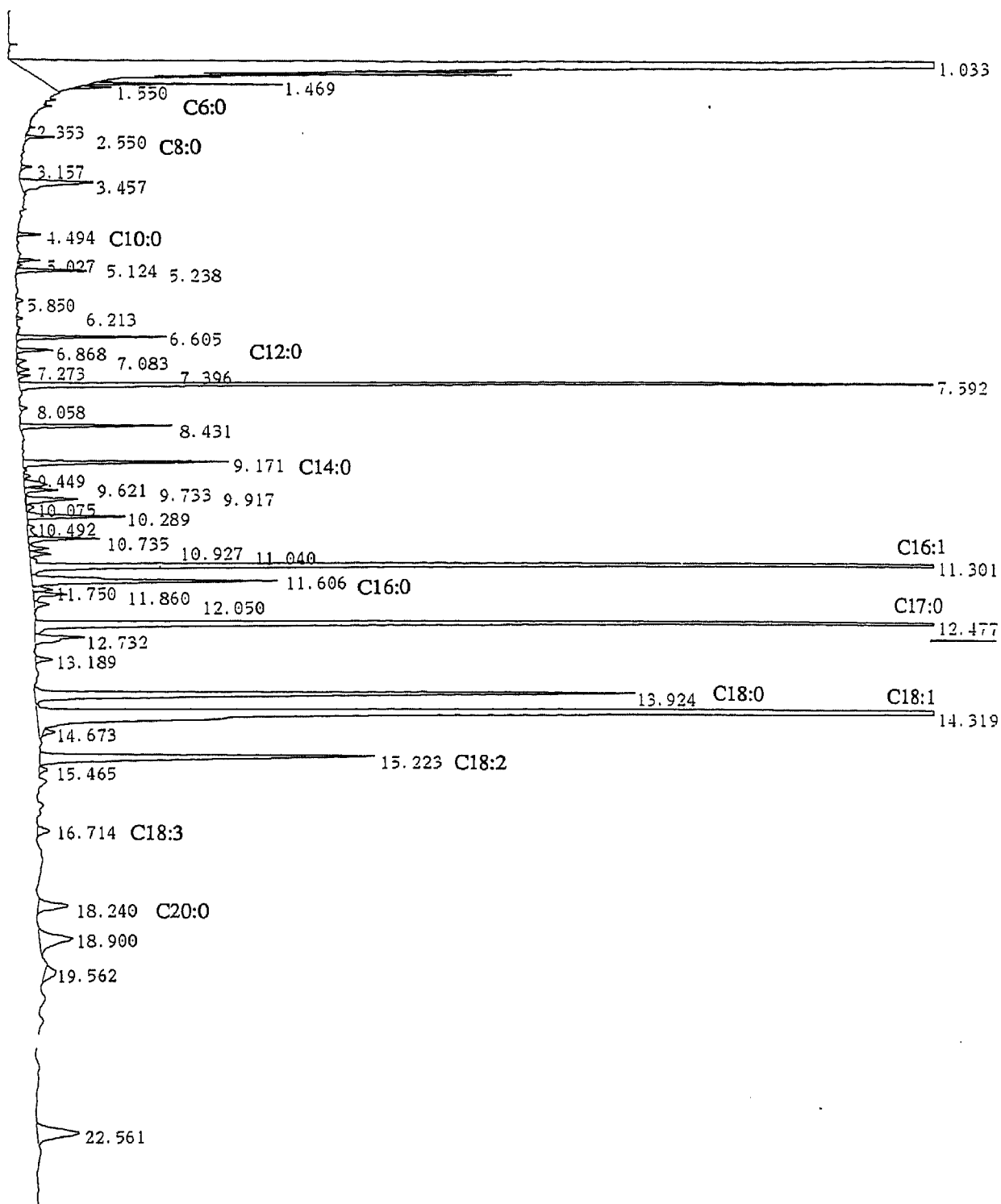


Fig. 3.2.: Chromatogramme type d'un extrait d'esters méthylés d'acides gras de gélatine extraite de couenne de porc acide.

3.2.10. DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

3.2.10.1. Principe

Les phospholipides sont dosés selon une méthode dérivée de la méthode de Bartlett (Dufour et Goffeau, 1980). Les lipides sont oxydés par l'acide perchlorique à chaud (chauffage à reflux) avec libération de phosphate minéral. L'addition de molybdate d'ammonium conduit à la formation d'acide phospho-molybdique. En présence d'agent réducteur, ce dernier se transforme en un complexe bleu dosé par colorimétrie, en mesurant la densité optique à 830 nm.

3.2.10.2. Mode opératoire

- Etalonnage

Il est réalisé à partir d'une solution à 0,5 mM de KH_2PO_4 (p.a., MERCK).

Les différents tubes bouchés (bouchon rodé) sont placés dans un bain de sable (Gerhardt), avec une inclinaison de 45° (appuyés sur un statif métallique) afin de permettre le reflux. Le bain de sable est réglé à 120°C (thermostat 100°C) et les tubes y sont maintenus pendant une nuit. Une fois les tubes refroidis, y ajouter 200 μl d'eau (désionisée sur système milli-Q, Millipore), 2,4 ml d'une solution contenant 4,4 g de molybdate d'ammonium heptahydraté (p.a., Merck) et 14 ml d'acide sulfurique concentré (p.a., UCB) par litre puis 2,4 ml d'agent réducteur [0,5 g d'Elon (Kodak) + 1,5 g NaHSO_3 (p.a., UCB)] par 500 ml. Agiter au vortex. Plonger 10 min les tubes dans un bain-marie d'eau bouillante puis les refroidir immédiatement dans un bain de glace fondante. Les laisser revenir à température ambiante avant de mesurer la coloration des solutions au spectrophotomètre (Perkin Elmer 55 B) à 830 nm. Les dosages sont réalisés en double.

- Préparation des solutions de gélatine :

Les solutions de gélatine sont préparées comme suit :

- laisser gonfler 5 g de gélatine (valeur corrigée en fonction de la teneur en matière sèche) dans 85 ml d'eau pendant 1h avant d'y ajouter 5 ml d'une solution de 50 mg/ml de papaine (papaine soluble FU, USP, 6000 USP-U/mg , Merck). Agiter puis placer la

solution 1h au bain-marie à 40°C. Agiter et laisser refroidir la solution dans le bain pendant une nuit. Le lendemain, ajouter 10 ml d'isopropanol (p.a., UCB), agiter la solution pendant une demi-heure et prélever 50 ml pour l'extraction des phospholipides.

Remarques :

a) Pour les mêmes raisons que celles citées au § 3.2.9.3., les échantillons de gélatine ont été solubilisés dans une solution de papaine à 0,25 % p/v.

b) Comme le rendement d'extraction de notre témoin L- α lysophosphatidylcholine (Sigma, référence P-5763) était médiocre ($< 5\%$ *) et les mesures peu répétables (erreurs relatives de l'ordre de 50 %), nous avons émis l'hypothèse que le prélèvement de l'échantillon était inhomogène car le phospholipide devait se concentrer préférentiellement à l'interface air/eau. Pour limiter cet effet, nous avons ajouté de l'isopropanol (p.a., UCB) à différentes concentrations (0-10-50 % v/v), homogénéisé les solutions de la série A par agitation magnétique et de la série B par sonication avant la prise d'essai. Suite à l'ajout d'isopropanol, nous avons amélioré le rendement d'extraction ($\sim 40\%$ *) et la répétabilité des mesures (erreur relative de 3 % maximum). Les valeurs obtenues étaient sensiblement identiques pour des concentrations en isopropanol de 10 et 50 % v/v, ainsi que pour les deux modes d'homogénéisation (résultats non montrés).

- Extraction et concentration

Identique à la méthode de dosage des acides gras (voir § 3.2.9.3.) , à l'exception du fait que le mélange chloroforme-méthanol ne contient pas d'antioxydant.

Les dernières traces de solvant organique sont éliminées en plaçant les tubes sur une plaque chauffante pendant 15 min (risque d'explosion avec l'acide perchlorique à chaud). Laisser refroidir les tubes.

* L'extraction de la L- α lysophosphatidylcholine s'accompagne d'un rendement médiocre. Pour estimer celui de nos échantillons de gélatine, nous avons comparé les résultats obtenus par la méthode décrite ci-dessous et par dosage du phosphore par la méthode de torche à plasma (Unité des Eaux et Forêt, U.C.L.). Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont du même ordre de grandeur.

- Minéralisation

Ajouter 400 µl d'acide perchlorique (70 % p.a., UCB), et chauffer les tubes à reflux (120°C) pendant environ 8 h (bain de sable, 100°C).

- Dosage des phospholipides

Le dosage du phosphate est réalisé de la même manière que celle décrite pour l'étalonnage. Chaque analyse est réalisée en triple, sur des échantillons indépendants.

III.3. RESULTATS

3.3.1. MISE AU POINT DES METHODES

3.3.1.1. Caractérisation des propriétés moussantes de la gélatine

1°. Choix de la méthode

a. *La capacité moussante*

La littérature nous renseigne sur diverses techniques de production et de mesure de la mousse. Chacune a ses avantages et ses inconvénients. Mais il est certain que les comparaisons entre résultats sont rendues beaucoup plus difficiles du fait du manque de concordance entre les différents modes opératoires.

En ce qui concerne les modes de production de la mousse, les techniques les plus courantes sont celles par battage, par insufflation de gaz, les aérosols et les méthodes dérivées de la méthode de Ross-Miles (Puisieux et Seiller, 1983).

Le battage permet de disperser uniformément le gaz grâce à des forces de cisaillement importantes. Cette technique peut être précise (Phillips et coll., 1987; Kitabatake et Doi, 1988 ; Wright et Hemmant, 1987). Cependant, elle peut limiter l'adsorption des protéines à l'interface. Elle n'est utilisée que pour des quantités de protéines supérieures à 1% p/v mais elle est encore efficace à 40% p/v. Si le battage est trop intense, il peut affecter la stabilité de la mousse. De plus, il est peu adapté à une étude théorique (Cheftel, 1985).

La méthode par insufflation de gaz (air, azote, CO₂) permet une distribution plus homogène de la taille des bulles. Elle est utilisée pour de faibles volumes de solution et de faibles concentrations en tensio-actif (Clark et coll., 1988). Si cette concentration est trop élevée, les résultats sont peu différenciés (Dagorn-Scaviner, 1986 ; Cheftel, 1985; Puisieux et Seiller, 1983). L'inconvénient majeur de cette technique est la difficulté de nettoyage du matériel.

Le procédé par aérosol est celui qui possède le plus d'applications industrielles. Toutefois, il est le plus coûteux au point de vue appareillage (Aubert et coll., 1986; Cheftel, 1985).

Quant aux méthodes de Ross-Miles et dérivées, elles consistent à faire tomber, d'une hauteur fixée, un volume donné de solution à tester sur la surface de la même solution. Elles ne nécessitent qu'un appareillage simple mais elles posent des problèmes de reproductibilité et de nettoyage (Puisieux et Seiller, 1983).

De toutes ces méthodes, celle par insufflation de gaz a retenu notre attention car elle s'avère la mieux appropriée pour une approche théorique de l'étude des mousses.

Les mesures de capacité moussante nous laissent également le choix entre plusieurs techniques : mesures du volume de mousse, du volume des bulles de gaz, mesure de conductivité, pesée de la mousse ou bien encore dosage de protéines.

La mesure de volume de mousse est une méthode simple, utilisée directement pour les mousses produites par insufflation de gaz ou par battage. Néanmoins, dans ce dernier cas, elle ne traduit pas les caractéristiques internes de la mousse telles que la taille des bulles ou l'épaisseur de la lamelle liquide (Dagorn-Scaviner, 1986 ; Cheftel, 1985 ; Townsend et Nakai, 1983 ; Poole et Fry, 1985 ; Shahidi et coll.; 1984).

La mesure du volume des bulles de gaz permet d'estimer la quantité de gaz incluse en moyenne dans une bulle, de même que la surface interfaciale développée (approximation). Un appareil photographique (Dagorn-Scaviner, 1986) ou une caméra (Clark et coll., 1987) sont à la base de cette mesure. La précision est donc limitée.

Dagorn-Scaviner (1986), Wright et Hemmant (1987) ainsi que Clark et coll. (1987) préfèrent effectuer des mesures de conductivité. Ceci permet d'obtenir une mesure indirecte de la fraction volumique de la phase continue (la conductivité de la lamelle liquide diffère nettement de celle de la phase gazeuse). La sensibilité est grande mais la reproductibilité n'est pas toujours satisfaisante.

L'estimation de la capacité moussante par pesée de la mousse est une méthode simple, dont la précision est de l'ordre du centième de gramme (Chen et Morr, 1985 ; Phillips et coll., 1987; Kitabatake et Doi, 1988). Toutefois, son utilisation est limitée à certaines applications.

Enfin, un dosage des protéines présentes dans la mousse devrait permettre l'estimation de la concentration en molécules responsables de la formation de la mousse (Clark et coll., 1987).

Nous avons opté pour la méthode de mesure du volume de la mousse dérivée de la méthode de Rudin (1957). Elle est décrite au § 3.2.4.

b. Stabilité de la mousse

Trois techniques sont utilisées pour mesurer la stabilité des mousses : des mesures de volume, de conductivité et de différences de pression.

Les mesures de volume peuvent être effectuées sur la mousse, le liquide et sur les bulles de gaz. La mesure du volume de la mousse au cours du temps est une méthode très simple et très répandue (Rossi et coll., 1985 ; Poole et coll., 1985 ; Townsend et Nakai, 1983 ; Shahidi et coll., 1988 ; Dagorn-Scaviner, 1986 et Cheftel, 1985). Malheureusement, elle est peu sensible pour différencier le pouvoir moussant de protéines de structure et de taille relativement semblables.

Les mesures du volume de liquide au cours du temps permettent un suivi du drainage de la phase liquide mais elles sont peu sensibles (Cheftel, 1985; Poole et coll., 1985 ; Kim et Kinsella, 1985 ; Chen et Morr, 1985).

Quant aux mesures du volume des bulles de gaz, elles permettent une approche plus réelle des phénomènes physico-chimiques se déroulant à l'interface : elles nous renseignent sur la vitesse de coalescence mais elles sont peu précises (Dagorn-Scaviner, 1986 ; Cheftel, 1985).

La mesure de conductivité est une mesure indirecte et continue des variations de volume des lamelles liquides au cours du temps. Sa reproductibilité est assez bonne. Dagorn-Scaviner (1986), Wright et Hemmant (1987) de même que Clark et coll. (1987) ont trouvé une relation positive entre les mesures de conductivité et de volume.

Les mesures de différence de pression sont liées à la réduction de l'aire interfaciale. Elles donnent une idée de la distribution des bulles de gaz ainsi que de l'effet combiné de la diffusion du gaz et du drainage (Dagorn-Scaviner, 1986). Leur principal inconvénient est qu'elles nécessitent un appareillage complexe.

Conformément à la méthode de mesure de capacité moussante décrite ci-dessus, notre choix s'est porté sur la mesure du volume de mousse au cours du temps. Sa description est donnée au § 3.2.5.

2°. Choix de la porosité des verres frittés

Plusieurs essais ont été réalisés avec différentes solutions de gélatine (0.5 % et 1 % p/v). Deux porosités ont été testées : P3 et P4. Elles correspondent respectivement à des diamètres de pores maximaux compris entre 16-40 μm et 10-16 μm . Pour toutes les mesures, l'injection d'azote dans la colonne de mousse a été réalisée à débit constant (150 ml/min). Le volume, le pH des solutions protéiques utilisées à chaque essai, de même que la température ont été maintenus constants.

Avec des verres frittés de porosité P4, la mousse prend trop de temps pour atteindre une hauteur H nécessaire et suffisante à une mesure précise. Elle s'effondre au fur et à mesure de sa formation. Un verre de porosité P3 permet d'atteindre cette hauteur. La mousse se déstabilise moins vite avant d'atteindre la hauteur H voulue.

Nous avons donc choisi d'utiliser pour la suite des manipulations des plaques de verre fritté de porosité P3.

3°. Choix du débit et du temps d'injection du gaz

Les solutions de gélatine ont été préparées à une concentration de 1% p/v, à leur pH naturel. La prise d'essai était de 25 ml, et la température de travail de 39°C.

Plusieurs débits d'azote ont été testés (90, 120, 150, 180 et 210 ml) pour deux temps d'injection (30 s et 1 min).

Pour des temps d'injection supérieurs à 30 secondes, on obtient des erreurs par défaut car la mousse se déstabilise avant la fin de l'injection.

Pour des débits inférieurs à 150 ml/min, de grosses bulles polyédriques se forment ; elles favorisent la déstabilisation de la mousse. De plus, les hauteurs de mousse mesurées sont inférieures à celles obtenues à des débits plus élevés.

Cependant, pour des débits de 180 et 210 ml/min, la distribution des bulles est beaucoup moins homogène qu'à 150 ml/min.

Nous avons donc choisi de travailler ultérieurement à un débit de 150 ml/min et d'injecter l'azote pendant 30 secondes avant de mesurer la hauteur de mousse.

4°. Calibration des verres frittés

Pour nous assurer que tous les verres frittés étaient bien équivalents, nous avons testé deux tensio-actifs de référence : le dodécyl sulfate de sodium (S.D.S.) et la sérum albumine bovine (B.S.A.).

Une solution de S.D.S. a été préparée à 1 % (p/v) dans de l'eau milli-Q. La mousse formée était assez dense mais le problème que nous avons rencontré avec ce détergent était son élimination. En effet, malgré un rinçage abondant de la colonne et du verre fritté, et malgré une attaque au mélange sulfochromique, il restait des traces de tensio-actifs. Nous obtenions alors des erreurs de mesures liées au fait que la mousse adhérait à la paroi de la colonne.

Nous avons alors essayé de calibrer notre appareillage avec de la B.S.A. Cette protéine pure est citée comme référence en termes de propriétés tensio-actives. Nous avons choisi de travailler avec une B.S.A. exempte de lipide de manière à éviter les interactions qui pourraient exister entre protéines et lipides.

Les mesures ont été réalisées avec 40 ml d'une solution de B.S.A. à 0,01 % (p/v) dans de l'eau milli-Q. Entre chaque mesure, la colonne était rincée abondamment à l'eau chaude (température > à 50°C) puis à l'eau milli-Q.

Pour nos 8 verres frittés, nous avons obtenu les résultats suivants (mesures en triple) :

numéro fritté	Hauteur mousse moyenne (cm)
1	13,5
2	13,5
3	13,6
4	13,6
5	13,5
6	13,8
7	13,3
8	13,5

Tableau 3.3. : Comparaison de la hauteur de mousse obtenue avec une solution de B.S.A. (0,01 % p/v) pour différentes plaques de verre fritté.

Pour nos mesures de capacité moussante, nous acceptons une erreur standard de 0,5 cm (en valeur absolue).

Nous pouvons dès lors considérer les frittés comme équivalents. De plus, la B.S.A. s'avère être un tensio-actif idéal comme référence pour notre étude de capacité moussante.

5°. Test de différents modes de nettoyage des frittés

Dès que nous sommes passé aux mesures du pouvoir moussant de la gélatine, nous avons été confrontés à un important problème de reproductibilité des mesures, lié vraisemblablement à l'adsorption de la gélatine dans la plaque de verre fritté. Cette adsorption se traduit par une évolution de la hauteur de mousse mesurée au fil des essais. L'écart enregistré pour un même fritté pouvait aller jusqu'à 2 cm (valeurs non montrées).

Nous avons dès lors testé plusieurs modes de nettoyage des frittés :

- le premier consiste en un nettoyage superficiel à l'eau de ville chaude (température > 50°C), sans démonter le fritté de la colonne ;
- le second comporte un nettoyage séparé du fritté à l'eau milli-Q chaude (~90°C) suivi d'un rinçage à l'alcool et à l'acétone puis un séchage sous courant d'azote.

Aucun des deux ne nous a satisfaits et, après divers essais, nous avons retenu le protocole décrit au § 3.2.4. pour régénérer les frittés dans leur état initial : elle fait intervenir de l'eau milli-Q chaude, du mélange sulfochromique et une solution de papaine. Les résultats ainsi obtenus sont donnés dans le Tableau 3.4.

BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES EXACTES
1. FACS Des Sciences
1348 LOUVAIN-LA-NEUVE Belgium

numéro fritté	Hauteur mousse (cm)	
	1 ^{er} essai	2 ^e essai
1	14,1	14,3
2	13,8	14,2
3	14,0	14,0
4	14,4	14,3
5	13,7	13,8
6	13,7	13,9
7	13,9	14,2
8	14,1	14,2

Tableau 3.4. : Comparaison de la mousse obtenue avec une solution de B.S.A. 0,01 % p/v avant et après nettoyage des frittés (Hauteur moyenne : $h_1 = 13,96$ cm, $h_2 = 14,11$ cm ; écart-type : $s_1 = 0,23$, $s_2 = 0,18$ cm)

6°. Choix de la concentration la plus adéquate pour la différenciation des gélatines

Nous avons travaillé avec un échantillonnage de départ constitué de 4 types de gélatine (os chaulé, os acide, peau chaulée, peau de porc acide), de 3 forces en gelée caractéristiques (80, 160 et 240 g Bloom). Pour chaque échantillon, nous avons testé 7 concentrations différentes (0,5-1-2,5-5-7,5-10-15 % p/v). Toutes les mesures ont été effectuées en double ou en triple.

Les résultats de capacité moussante et de stabilité que nous avons obtenus sont regroupés respectivement dans les Figures 3.3 et 3.4.

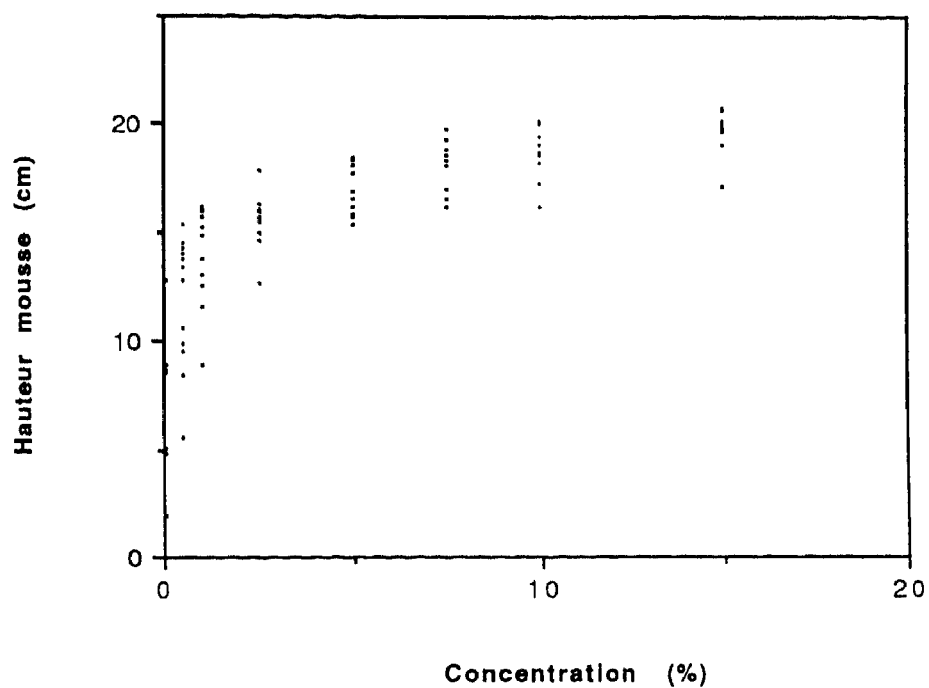


Fig. 3.3. : Relation entre la capacité moussante (hauteur de mousse) et la concentration de 12 gélamines extraites d'os chaulé, de peau chaulée, d'os acide et de couenne de porc acide (détails cf. Annexes 1-3).

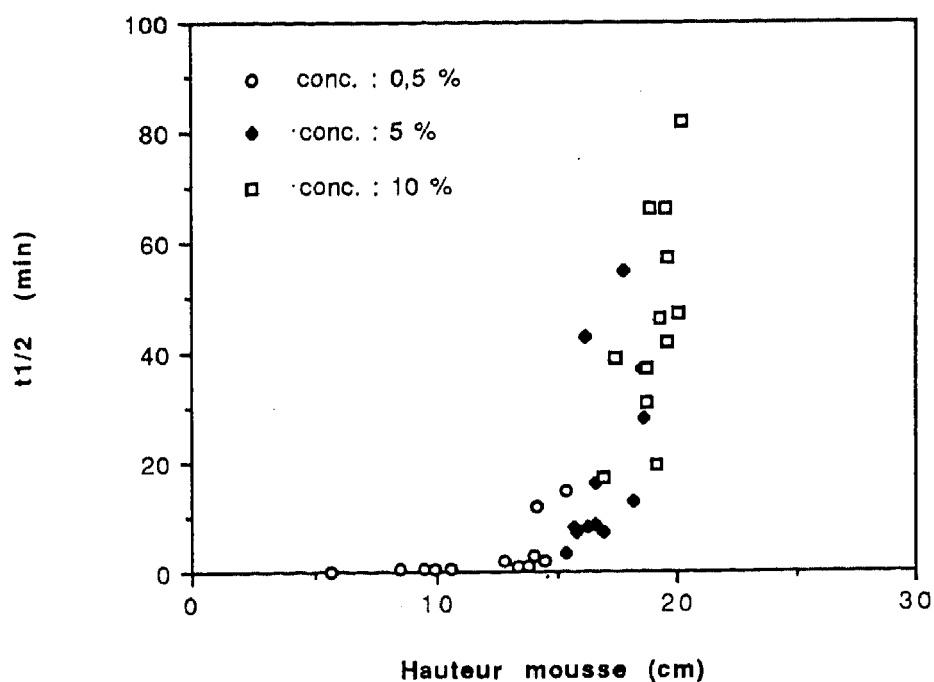


Fig. 3.4. : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la capacité moussante (hauteur de mousse) de 12 échantillons de gélatine à 3 concentrations (0.5, 5 et 10 % p/v) (détails cf. Annexes 4-10).

Il découle de la Fig. 3.3. que la capacité moussante (hauteur de mousse au temps zéro) est une fonction croissante de la concentration en gélatine. Néanmoins, les valeurs se stabilisent à partir d'une concentration de 0,5 % (p/v). Dans la suite du travail, seule cette concentration sera prise en compte.

L'analyse de la Fig. 3.4. nous montre que, d'une manière générale, une bonne stabilité de la mousse va de pair avec une bonne capacité moussante et qu'un échantillon doit être caractérisé par une capacité moussante minimale de 14 cm pour obtenir une stabilité de la mousse significative (> 10 min).

3.3.1.2. Caractérisation de la fraction protéique de la gélatine par électrophorèse

1°. Caractérisation de la distribution de masses moléculaires de la gélatine

A. Choix de la technique de séparation

Comme nous l'avons vu au § 2.2.3.2., les méthodes d'investigation pour l'étude de la distribution des masses moléculaires (D.M.M.) sont nombreuses : ultracentrifugation, osmométrie, électrophorèse sur gel, électrophorèse capillaire, chromatographie de perméation sur gel, chromatographie d'exclusion à haute pression (HPSEC), chromatographie en phase liquide à moyenne pression (FPLC).

Les techniques récentes de détermination des masses moléculaires de la gélatine décrites dans la littérature sont basées sur :

- la diffusion de lumière (Busnel et coll., 1989 ; Pezron, 1988 ; Djabourov et coll., 1988),
- la chromatographie sur gel (G.P.C.) (Tomka, 1979, 1983 ; Tavernier, 1989 ; Cole et Mc Gill, 1988 ; Busnel et coll., 1989 ; Loret et coll., 1988 ; Takahashi et coll., 1988 ; Shirai et coll., 1979 ; Von G. Chalepakis et coll., 1985) et
- l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Tomka, 1979, 1983 ; Melia et coll., 1983 ; Cole et Mc Gill, 1988 ; Shirai et coll., 1979 ; Busnel et coll., 1989 ; Von G. Chalepakis et coll., 1985 ; Aoyagi et coll., 1987a-b).

La diffusion de lumière permet de calculer la M_w absolue ainsi que la M_n , en relation avec la viscosité intrinsèque et le rayon de gyration de la molécule. Cette

technique est coûteuse par rapport aux deux autres, délicate à utiliser (problèmes de poussières, d'agréats, d'interprétation des résultats). De plus, si elle n'est pas précédée par une méthode chromatographique (ex. Chromatix), elle ne peut fournir qu'une mesure moyenne des espèces moléculaires mises en présence.

Les méthodes chromatographiques sont d'excellentes méthodes préparatives à une analyse plus fine par électrophorèse. Elles ont l'avantage d'être relativement aisées à mettre en oeuvre, rapides et fines. Il faut toutefois veiller à trouver les standards de masse les mieux appropriés.

Notre choix de méthode a été conditionné par les critères suivants :

- l'étendue de la distribution des masses moléculaires (grossièrement de >300 kdaltons pour les "microgels" à plus ou moins 20 kdaltons pour les plus petits fragments peptidiques),
- la finesse de la séparation des différentes molécules,
- la sensibilité de la méthode de détection.

En effet, si l'on se réfère à l'expérience des brasseurs pour ce qui concerne l'influence de la masse moléculaire sur la mousse de bière, nous devons disposer d'une méthode capable de séparer des fragments peptidiques de petites tailles (de l'ordre de 10 kdaltons) (cf. § 2.3.2.).

Nous avons comparé la résolution de la distribution de masses moléculaires des gélatines par F.P.L.C. et par électrophorèse SDS-PAGE (cf. Fig. 3.5). Les principales caractéristiques des deux méthodes sont résumées dans le tableau 3.5.

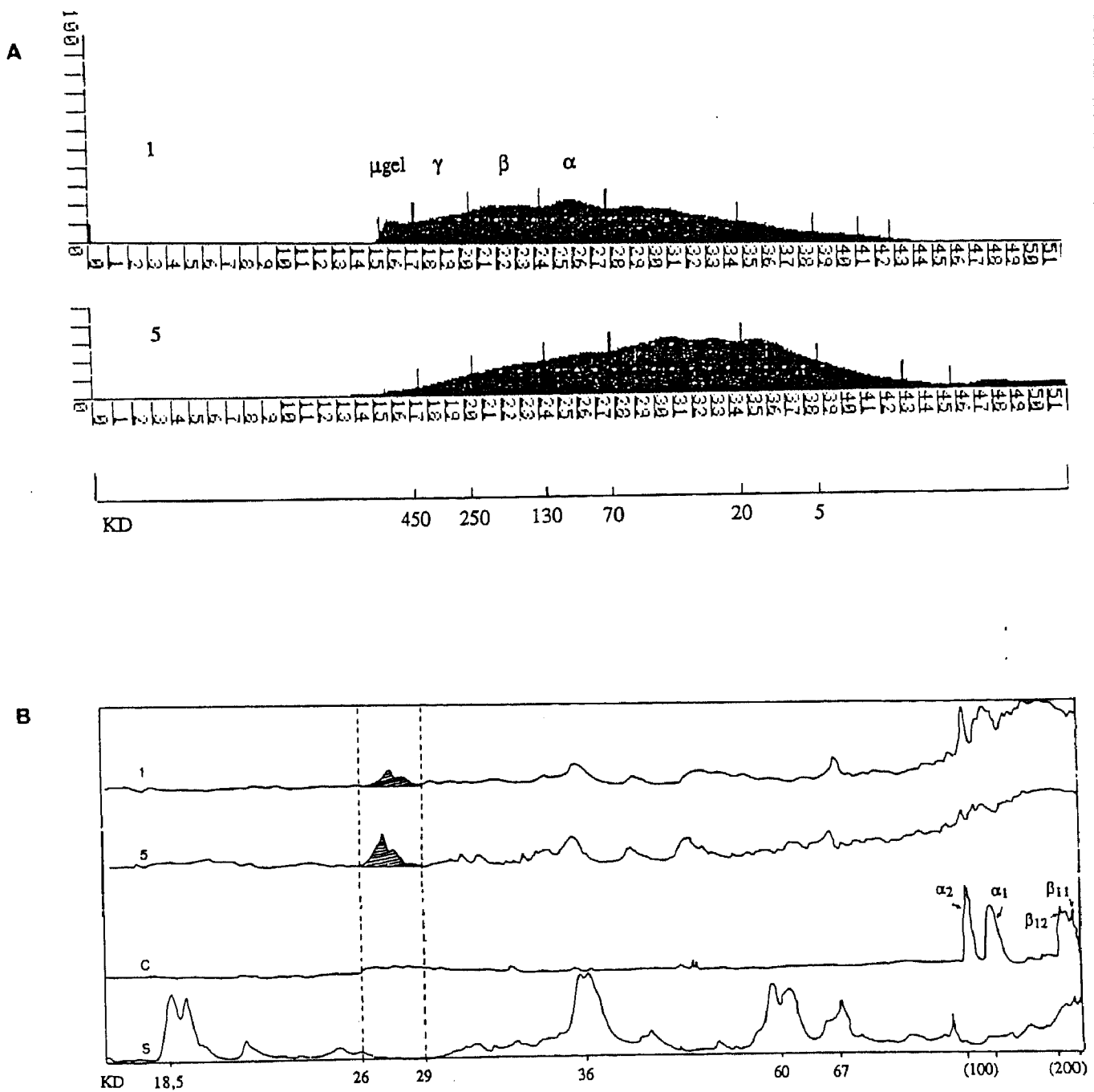


Fig. 3.5. : Comparaison des profils de distribution de masses moléculaires de deux gélatines extraites de couenne de porc acide par (A) F.P.L.C.(colonne Superose TM 6, longueur d'onde de détection : 230 nm, résultats PB Gelatins) et par (B) SDS-PAGE (cf. Fig.3.17).

Légendes : 1 : échantillon "mousse instable" CPA 4 (243 g Bloom, 35 mP), 5 : échantillon "mousse stable" CPA 2 (253 g Bloom, 32 mP), C : standard de collagène, S : standards de masses moléculaires (LKB-Pharmacia), KD : masses moléculaires exprimées en kdaltons.

METHODES	AVANTAGES	INCONVENIENTS
F.P.L.C.	- préparation des échantillons simple ;	- 1 seul échantillon à la fois ; - difficulté de séparation des différentes fractions protéiques ; - pas de relation avec les propriétés moussantes ; - choix délicat des standards les mieux adaptés à l'étude de la DMM des gélatines (cf. p. 92-93) ; - comparaison délicate des échantillons dans les mêmes conditions.
SDS-PAGE	- plusieurs échantillons à la fois, dans les mêmes conditions, y compris des standards de collagène ; - bonne séparation des différentes fractions protéiques ; - très bonne sensibilité : de l'ordre de 0,02 ng/mm ² pour une coloration au nitrate d'Ag de la plupart des protéines (Merril, 1986)	- difficulté de fixation et de coloration de la gélatine dans les gels ; - à masse moléculaire équivalente, vitesse de migration du collagène différente des autres protéines

Tableau 3.5. : Comparaison des méthodes de détermination de la D.M.M. de la gélatine par F.P.L.C.(Tavernier, 1989) et par électrophorèse SDS-PAGE.

Aussi, pour des raisons de temps d'analyse (manipulations minimales, comparaison de plusieurs échantillons dans des conditions identiques), de disponibilité de matériel, de résolution et de sensibilité de méthodes, nous avons opté pour l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

L'électrophorèse est une technique de séparation qui consiste en la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le support utilisé (gel de polyacrylamide) est relié à deux électrodes entre lesquelles une différence de potentiel est établie.

L'électrophorèse peut s'effectuer en conditions dénaturantes (en présence de S.D.S., de D.T.T. ou de 2 β -mercaptoéthanol) ou non. En conditions non dénaturantes, la migration des molécules est liée à leur charge électrique et à leur taille. Cette dernière dépend de la masse moléculaire et de la conformation des molécules dans le tampon de migration. En conditions dénaturantes, la migration des molécules est uniquement fonction de leur masse moléculaire. La présence de S.D.S. en quantité suffisante permet de répartir une densité de charges (négatives) autour de la protéine, proportionnellement à sa masse moléculaire.

Pour nous permettre de comparer les gélatines uniquement sur base de leur distribution de masses moléculaires, nous avons choisi de travailler en conditions dénaturantes.

B. Choix des tampons de réaction

Le choix des tampons d'électrophorèse doit tout d'abord s'opérer entre les systèmes à tampons continus (Furthmayr et Timpl, 1971) et les systèmes à tampons discontinus (Laemmli, 1970 ; Studier, 1973). Chacune de ces techniques est valable tant pour l'électrophorèse en tubes capillaires que sur gel plat. Cette dernière est toutefois plus facile et plus adéquate à utiliser pour comparer de nombreux échantillons entre eux et avec des standards (15 sur un même gel). De plus, ce système permet de travailler avec des gels très fins (de 0,5 mm à 1 mm d'épaisseur), dont l'avantage est d'augmenter la résolution des bandes à séparer.

Dans un système à tampon continu, le même tampon est utilisé à l'anode et à la cathode ; seule sa concentration diffère entre la phase de séparation et les chambres d'électrode.

Par opposition, dans un système discontinu, l'électrode négative trempe dans un tampon anionique à mobilité élevée et l'électrode positive baigne dans un tampon cationique.

L'avantage des systèmes discontinus sur les systèmes continus est qu'ils permettent d'obtenir des bandes protéiques plus fines (Scopes, 1982). En effet, dans les systèmes discontinus, un gel tasseur de faible porosité permet de concentrer des solutions diluées d'échantillon en une bande étroite, avant que ce dernier pénètre dans le gel de séparation proprement dit.

La comparaison des résultats obtenus par de nombreux auteurs sur la séparation de fragments protéiques de collagène ou de gélatine dans des systèmes à tampons continus (Fujii et Kühn, 1975 ; Aoyagi et coll., 1987 ; Aoyagi, 1988 ; Hayashi et Nagai, 1979 ; Furthmayr et Timpl, 1970 ; Tomka, 1979 ; Melia et coll., 1983) ou dans des systèmes à tampons discontinus (Birk et Silver, 1984 ; Aoyagi, 1988 ; Hayashi et Nagai, 1979 ; Hill et Harper, 1984 ; Von G.Chalepakakis et coll., 1985 ; Shirai et coll., 1979 ;

Shirai *et coll.*, 1979 ; Cole et Mc Gill, 1988 ; Hipps *et coll.*, 1991) nous a amenés à choisir un système à tampons discontinus pour la séparation de mélanges complexes de polypeptides, dont la distribution de masses moléculaires est étendue.

La seconde étape est le choix des tampons et de leur pH respectif. Pour les raisons qui viennent d'être exposées, nous avons opté pour le système de Laemmli (1970) ou celui de Laemmli et Favre (1973) qui s'avère efficace pour la séparation des polypeptides du collagène et de la gélatine (Miller et Rhodes, 1982 ; Birk et Silver, 1984 ; Speranza et Valentini, 1986 ; Fitzimmons *et coll.*, 1986) de même que pour la séparation de glycoprotéines de masses moléculaires comprises entre >600 000 et 14 000 daltons (Jay *et coll.*, 1990 ; Vilim et Krajickova, 1991).

C. Choix de la méthode de fixation des protéines

La fixation des fragments peptidiques du collagène ou de la gélatine est généralement réalisée dans de l'acide trichloracétique (TCA) 20% v/v (Furthmayr et Timpl, 1970 ; Von G.Chalepakakis *et coll.*, 1985 ; Aoyagi *et coll.*, 1987, Aoyagi, 1988), dans un mélange alcool - acide acétique - eau (Hayashi et Nagai, 1979 ; Miller et Rhodes, 1982) ou encore dans de l'acide acétique 7% v/v (Shirai *et coll.*, 1979 ; Cole et Mc Gill, 1988 ; Birk et Silver, 1984). Tomka (1979) de même que Melia *et coll.* (1983) n'utilisent néanmoins pas de solution de fixation car les gels sont colorés pendant l'électrophorèse.

Des essais préliminaires d'électrophorèse sur des échantillons de gélatine ont cependant montré que les fragments protéiques de la gélatine se fixent difficilement dans les gels de polyacrylamide, dans les conditions "classiques" (acide acétique - méthanol ou éthanol - eau). Les molécules diffusent dans le gel, ce qui entraîne une perte des petites masses moléculaires, une mauvaise résolution et des erreurs importantes d'estimations pour les masses moléculaires plus importantes. Il est à noter que la littérature ne fait pas mention, à notre connaissance, de ce problème.

Dans ce cadre, les travaux menés par Steck *et coll.* (1980) nous ont semblés intéressants. Ces auteurs ont montré que certaines protéines basiques ainsi que des protéines de petites masses moléculaires restent solubles dans les solutions de fixation généralement utilisées telles que l'acide acétique, l'acide trichloracétique, l'acide sulfosalicylique et/ou en combinaison avec des alcools. Si elles précipitent, les protéines

peuvent parfois se resolubiliser pendant les étapes de coloration ou de décoloration des gels de polyacrylamide. C'est la raison pour laquelle ces auteurs préconisent une étape de fixation dans du formaldéhyde. Il a pour avantage de fixer de manière définitive les protéines dans le gel, pour autant que le pH soit compris entre 3 et 10 (Bürk *et coll.*, 1983). La méthode de fixation proposée est compatible avec une coloration au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent.

Nous avons comparé quelques méthodes de fixation et de coloration avant d'effectuer notre choix. Elles sont regroupées dans le Tableau 3.7. La séparation des fragments protéiques a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970).

Suite aux résultats expérimentaux que nous avons obtenus (cf. Tableau 3.7.), nous avons opté pour la méthode de fixation des protéines au formaldéhyde proposée par Steck *et coll.* (1980) (protocole 8, Tableau 3.7.).

D. Choix de la méthode de coloration

Les colorants les plus fréquemment rencontrés dans la coloration du collagène ou de la gélatine sont l'amido black (Tomka, 1979 ; Melia *et coll.*, 1983 ; Shirai *et coll.*, 1979 ; Cole et Mc Gill, 1988), le bleu de Coomassie (Birk et Silver, 1984 ; Aoyagi, 1988 ; Vilim et Krajickova, 1991 ; Hill et Harper, 1984 ; Furthmayr et Timpl, 1970 ; Hayashi et Nagai, 1979 ; Fujii et Kühn, 1975 ; Miller et Rhodes, 1982 ; Speranza et Valentini, 1985 ; Fitzimmons *et coll.*, 1986) et le nitrate d'argent.

- Coloration à l'amido black

L'amido black est le moins sensible des trois colorants : il est six fois moins sensible que le bleu de Coomassie (Wilson, 1983). L'intensité de la coloration à l'amido black est inversement proportionnelle au point isoélectrique des protéines. Donc, la coloration des gélatines issues d'un prétraitement alcalin est plus importante que celle issue d'un prétraitement acide (Cole et Mc Gill, 1988).

Du fait de sa mauvaise sensibilité, l'amido black présente moins d'intérêt que le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent, dont les principales caractéristiques sont résumées dans le tableau 3.6.

- Coloration au bleu de Coomassie

On distingue trois types de bleu de Coomassie : le CBB R-250, le CBB G-250 et le Serva Violet 49.

Le CBB R-250 est le premier colorant triphénylméthane sulfaté introduit sur le marché. Le CBB G-250 est une forme diméthylée du colorant, de solubilité moindre que le CBB R-250, qui peut être utilisé sous forme de dispersion colloïdale. Les particules colloïdales forment des complexes sélectifs protéine-colorant qui ne pénètrent pas dans le gel. Ceci permet une coloration plus rapide des protéines et prévient le développement d'une coloration de fond (Diezel et coll., 1972). Le Serva Violet est surtout utilisé en électrofocalisation (IEF). Il permet une coloration rapide des protéines du gel sans colorer les ampholytes et est facilement décolorable (Frater, 1970 ; Radola, 1980).

La coloration au bleu de Coomassie nécessite un milieu acide pour favoriser les attractions électrostatiques entre les molécules de colorant et les groupements aminés des protéines (Merril, 1987 ; Dunn, 1987). Ces attractions ioniques et les forces de Van der Waals sont responsables de la formation d'un complexe colorant-protéine. Cependant, de telles liaisons sont totalement réversibles dans des conditions appropriées (Fazekas de St Groth, 1963). Les molécules de colorant peuvent également se lier entre elles et de ce fait, intensifier la coloration (Wilson, 1979).

Des études menées par Righetti et Chillemi (1978) sur le mode de coloration au bleu de Coomassie ont mis en évidence l'importance des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) avec lesquels les molécules de colorant s'associent. Des études menées par Tal et coll. (1985) ont confirmé cette théorie et ont clairement montré une corrélation entre l'intensité de la coloration du CBB et le nombre de résidus lysine, arginine et histidine présents dans la protéine.

On notera également que le CBB R-250 peut présenter des **effets métachromatiques** après coloration de certaines protéines comme le collagène et l'histone-1. En effet, certaines bandes électrophorétiques peuvent apparaître rougeâtres au lieu de bleues, voire rougeâtres uniquement à la périphérie (Duhamel et coll., 1980). Ces effets métachromatiques se rencontrent souvent quand des molécules de colorant s'agglomèrent (Schubert et Hamerman, 1956). Cette aggrégation de molécules de colorant peut affecter leur structure de résonnance électronique, ce qui peut entraîner une modification de la réponse suite à une excitation lumineuse. Ils sont influencés par le type de protéines, leur concentration, la température et la nature du solvant (Merril, 1987).

- Coloration au nitrate d'argent

Le mécanisme de base de la coloration des protéines au nitrate d'argent implique la réduction de l'argent ionique en argent métallique. Rabilloud (1990) a passé en revue les mécanismes de coloration à l'argent dans les gels de polyacrylamide. Les colorations à l'argent sont basées sur deux principes : le premier regroupe les méthodes alcalines et le second les méthodes acides.

Les méthodes alcalines utilisent un complexe diamine de nitrate d'argent en milieu fortement alcalin (ammoniaque et hydroxyde de sodium). Le développement de l'image est généralement réalisé en présence de formaldéhyde légèrement acidifié. Quant aux méthodes acides, le nitrate d'argent réagit en solution légèrement acide. Le développement est généralement réalisé dans des solutions de formaldéhyde à pH basique, bien que d'autres solutions de développement aient été proposées (Rabilloud, 1990).

Sans trop entrer dans les détails, la coloration à l'argent est réalisée par l'intermédiaire d'acides aminés basiques (histidine, arginine, ornithine) et soufrés (cystéine, méthionine) (Merril, 1987). Cependant, selon le milieu de réaction, d'autres peptides tels que des homopolymères de glycine, de sérine et d'acide aspartique peuvent également être sensibles à la coloration à l'argent (Heukeshoven et Dernick, 1985).

Pour le développement des gels par les méthodes alcalines, la sensibilité est limitée si un faible bruit de fond est recherché, à moins d'apporter quelques étapes d'amélioration (Rabilloud, 1990). En ce qui concerne le développement de méthodes acides, l'étape d'imprégnation a lieu en milieu faiblement acide (pH aux environs de 6), de manière à ce que se forment des liaisons entre l' Ag^+ et des groupements nucléophiles tels que $-\text{SH}$ (cystéine) ou $-\text{NH}_2$ (lysine), lesquels semblent être essentiels au succès de la coloration (Chuba et Palchaudhuri, 1986 ; Gersten et coll., 1986). Toutefois, ces liaisons semblent plus faibles dans le cas de développements basiques.

Tout comme nous l'avons vu pour le bleu de Coomassie, la coloration des protéines au nitrate d'argent est sujette à des effets métachromatiques (Merril, 1984). Ainsi, la plupart des protéines se colorent en brun ou en noir, alors que certaines lipoprotéines se colorent en bleu et certaines glycoprotéines en jaune, brun ou rouge (Goldman et coll., 1980). Ces effets de coloration dépendent de trois paramètres : de la taille des particules d'argent, de l'indice de réfraction du gel et de la distribution des particules d'argent (Merril, 1987). La concentration en protéines ainsi que la présence de

groupements aminés latéraux jouent un rôle considérable dans le développement d'effets métachromatiques. Tous ces facteurs rendent délicate l'analyse quantitative des protéines (Merril, 1987).

Le tableau 3.6. compare les caractéristiques des colorations au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.

CARACTERISTIQUES	COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE	COLORATION AU NITRATE D'ARGENT
ACIDES AMINES SENSIBLES A LA COLORATION	- Intensité de la coloration liée à la concentration en acides aminés basiques (His, Lys, Arg) (Righetti et Chilimini, 1978 ; Tal et coll., 1985); - Etablir une courbe standard pour chaque protéine.	- Intensité de la coloration liée au pourcentage d'acides aminés basiques (Arg, His) et soufrés (Cys, Met); - Choix judicieux d'une protéine standard ou standard pour chaque protéine.
EFFETS METACHROMATIQUES	- dus à la Pro (Duhamel et coll., 1980) - apparaissent à des concentrations en protéines/bande > 5µg (Merril et coll., 1984) ; - s'estompent si ajout de SDS ou d'alcool sur du TCA (12,5 %) (Duhamel et coll., 1980) et/ou si coloration à T° élevée (Miko et Schaeffer, 1978).	- éviter les surcharges protéiques : max. 2ng/mm² sinon coloration non proportionnelle à la concentration en protéines (Merril, 1984).
LINEARITE pour une gamme de concentrations	de 1 à 20 ng (Dunn et Burghes, 1983 ; Merrill et coll., 1981).	- de 1 à 30 ng (Poehling et Neuhoff, 1981) ou - de 1 à 40 ng (Merril, 1986).
SENSIBILITE	- fonction de la méthode utilisée, généralement 100 fois moins sensible que les colorations à l'AgNO₃ - 0,7 ng BSA/mm² gel = voisine de celle des colorations à l'AgNO₃ avec la méthode de Neuhoff et coll. (1985)	- généralement 100 fois plus sensible que les méthodes au bleu de Coomassie, mais fonction du protocole utilisé ; - de l'ordre de 0,02ng / mm² gel pour la plupart des protéines (Merril, 1986).
SELECTIVITE	- La présence d'une grande proportion de Pro dans le collagène est responsable de l'effet métachromatique : les bandes protéiques du collagène présentent un maximum d'absorption à 520 nm au lieu de 610 nm pour la plupart des protéines. Cet effet est affecté par la nature du solvant (Duhamel et coll., 1980). - L'intensité de la coloration au Bleu de Coomassie est inversement proportionnelle au pI des protéines, ce qui pose un problème pour les gélamines issues d'un prétraitement acide (Cole et Mc Gill, 1988). De plus, à pI constant, cette intensité diminue avec l'âge du collagène.	- Des molécules comme les histones (protéines basiques) se colorent souvent mal ou pas au nitrate d'argent. Dans ce cas, le problème peut être résolu en combinant une fixation à la formaldéhyde avec une précoloration simultanée au bleu de Coomassie. La sensibilité de la coloration est alors 10 fois inférieure à celle des protéines neutres (Irie et Sezaki, 1983).

Tableau 3.6. : Comparaison des caractéristiques des colorations au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.

Le tableau 3.7. synthétise les résultats expérimentaux que nous avons obtenus en comparant différentes méthodes de fixation et de coloration de gels de polyacrylamide (la séparation des fragments protéiques a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970)).

Nous en avons retenu la méthode de fixation des protéines au formaldéhyde proposée par Steck et coll. (1980) combinée à la méthode de coloration au nitrate d'argent de Morrissey (1981) (protocole 8).

PROTOCOLE	1	2	3	4	5	6	7	8
FIXATION	TCA 20% (p/v) 2h	TCA 20% (p/v) 2h	TCA 50% (p/v) 1 nuit LAEMMLI (1970)	glutaraldéhyde 10% (v/v) 2h	glutaraldéhyde 20% (v/v) 1 nuit HAYASHI & NAGAI (1979)	formaldéhyde STECK <u>et coll.</u> (1980) formald.(35%): EtOH : H ₂ O (14 : 26 : 60 v/v) 0,1% (p/v) CBB R-250 1h	formaldéhyde STECK <u>et coll.</u> (1980) idem protocole 6, sans CBB R-250	formaldéhyde STECK <u>et coll.</u> (1980) - formald. (35%): EtOH : H ₂ O (14 : 26 : 60 v/v) 1h - formald.(35%): EtOH : H ₂ O (1 : 25 : 75 v/v) 1h
COLORATION	non	Precim Red 0,05% (p/v) 1 nuit	CBB G-250 0,1% (p/v) dans TCA 50% (p/v) 1h à 37°C	CBB G-250 0,25% (p/v) EtOH : H ₂ O : HOAc (45 : 50 : 5 v/v) 1 nuit	0,05 g CBB G-250 dans 18 ml MeOH et 1,84 ml HOAc glacial 40 min.	formald.(35%): EtOH : H ₂ O (1 : 25 : 75 v/v) 0,1% (p/v) CBB R-250 1h	formald.(35%): EtOH : H ₂ O (1 : 25 : 75 v/v) 0,1% (p/v) Amido- Black 1h	AgNO ₃ selon la méthode de Morrissey (1981)
DECOLORATION	non	H ₂ O : MeOH : HOAc (80 : 50 : 10 v/v)	HOAc 7% (p/v)	H ₂ O : MeOH : HOAc (80 : 50 : 10 v/v)	HOAc : MeOH : H ₂ O (7,5 : 5 : 87,5 v/v)	EtOH : H ₂ O : formald.(35%) (25 : 75 : 10 v/v) 1 nuit	non	non
COMMENTAIRES	- protéines fixées sous forme de bandes blanches ; - mauvais contraste ; - difficulté photo.	pas de bande	- protéines fixées ; - bonne résolution mais bruit de fond intense.	- fixation mais mauvais contraste et mauvaise résolution.	- mauvaise résolution ; - bruit de fond intense.	- protéines fixées définitivement ; - bonne résolution ; - bon contraste ; - bruit de fond faible	- mauvaise résolution ; - bruit de fond intense.	- protéines fixées définitivement ; - très bonne résolution ; - bruit de fond faible ; - très bon contraste et très bonne sensibilité.

Tableau 3.7. : Comparaison de différentes méthodes de fixation-coloration de fragments peptidiques de la gélatine sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). La séparation des fragments protéiques a été effectué selon la méthode de Laemmli (1970)

E. Choix de la concentration en polyacrylamide

Etant donnée l'ampleur de la distribution des masses moléculaires de la gélatine (environ 600 à 15 kdaltons) (Veis, 1964 ; Tomka, 1979, 1983) et pour éviter de perdre des molécules intéressantes en fragmentant les échantillons par dialyse, ultracentrifugation différentielle ou chromatographie d'exclusion, nous avons choisi de comparer les profils électrophorétiques de gélatines de classes différentes en jouant sur le gradient de concentration en acrylamide. Nous avons ainsi préparé des gradients de concentration de 3-15% , 10-17% et une concentration constante de 8,8% d'acrylamide correspondant aux gammes de masses moléculaires respectives 600-20 k daltons, 300-10 k daltons et 300-18 k daltons.

Nous avons ainsi pu comparer les profils de distribution de masses moléculaires de gélatines issues de prétraitements identiques ou différents sur un même gel.

Un gel de 3 à 15 % d'acrylamide permet de couvrir la gamme de masses moléculaires comprise entre les "microgels" (600-300 kdaltons) et 20 kdaltons, en séparant les chaînes γ_{112} (~300 kdaltons), β_{11} et β_{12} (~200 kdaltons) ainsi que α_1 et α_2 (~100 kdaltons) (cf. Fig.3.6).

Un gel à 8,8% permet de bien séparer ces trois types de molécules, unités γ , β et α mais pas les fragments de tailles inférieures à 25 kdaltons (cf. Fig.3.7).

Cependant, ce sont les gels de 10 à 17% d'acrylamide qui nous semblent les plus indiqués pour la comparaison des profils de distribution de masses moléculaires (cf. Fig.3.8). En effet, ce gradient favorise la séparation correcte des fragments de masses comprises entre 300 et 10 k daltons. Or, ce sont les petits fragments peptidiques qui nous intéressent pour expliquer la stabilité de la mousse (cf. § 2.3.2.). Nous avons également étudié la relation entre la distribution de masses moléculaires et la force en gelée sur ce type de gel (cf. § 3.3.2.2- 2°).

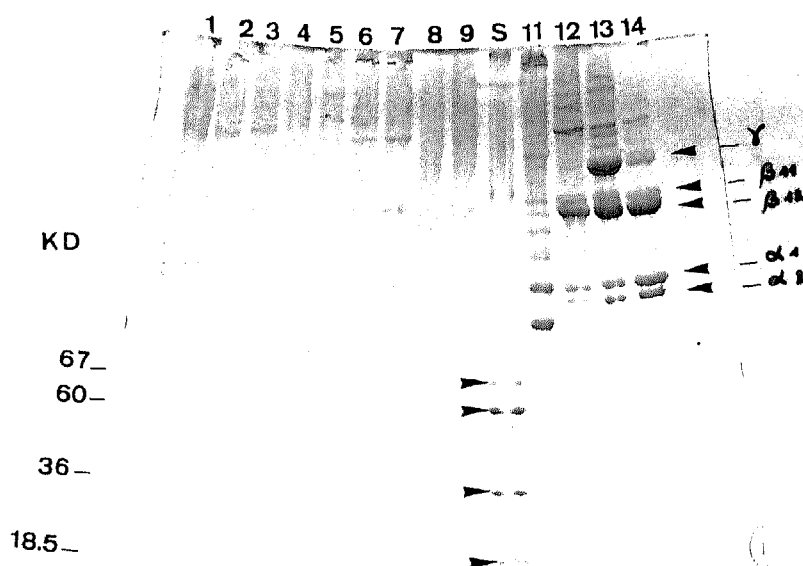


Fig.3.6. : gel de 3-15 % d'acrylamide : coloration au CBB R-250 :

- 1-2-3-4 : gélatine d'os chaulé OC 1 (dépôts de 120-80-60-40 μ g)
- 5-6-7 : gélatines de peau de taurillon de race Blanc Bleu, âgé de 28 mois, extraites au laboratoire, en milieu alcalin (40 μ g)
- 8-9 : gélatines de peau de taurillon de race Blanc Bleu, âgé de 28 mois, extraites au laboratoire, en milieu acide (40 μ g)
- S : standards de masses moléculaires (LKB-Pharmacia) (20 μ l)
- 11 : collagène Sigma "type X, acid soluble from human placenta", référence C-4407, correspondant au collagène de type III de la nomenclature (Hill et Harper, 1984) (20 μ g)
- 12 : collagène Sigma "type III, acid soluble from calf skin", référence C-3511, correspondant au collagène de type I de la nomenclature (Gallop et Seifter, 1963) (20 μ g)
- 13 -14: deux collagènes extraits au laboratoire à partir d'une peau de taurillon de race Blanc Bleu, âgé de 28 mois : respectivement un échantillon de collagène soluble dans du NaCl 1M et un échantillon soluble dans de l'acide acétique 0,5M (méthode modifiée de Miller et Rodes, 1982).

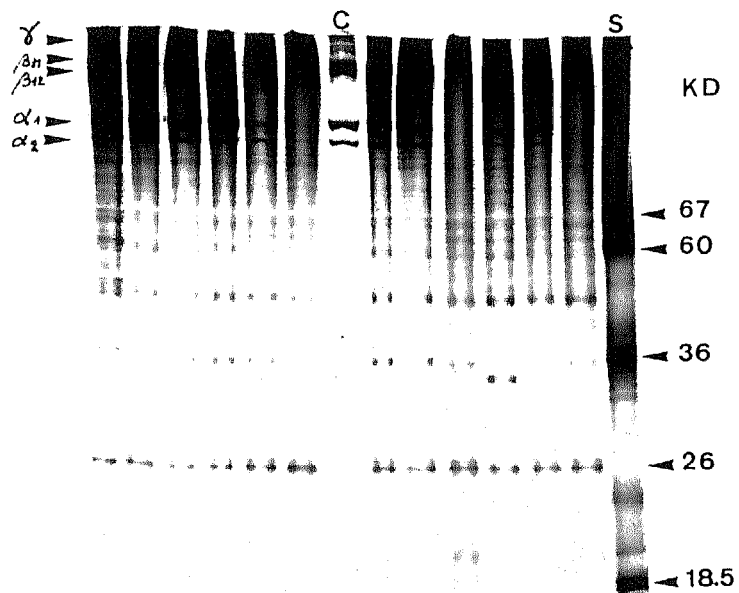
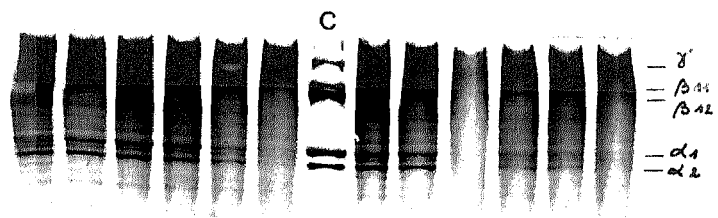


Fig.3.7. : gel à 8,8 % d'acrylamide : coloration au nitrate d'argent

- Echantillons de gélatine industrielle extraite de peau de porc acide (37,5 µg), avec de gauche à droite : CPA11, CPA12, CPA6, CPA2, CPA13, CPA14, CPA15, CPA16, CPA5, CPA17 et CPA18
- A : gélatine de peau de taurillon de race Blanc Bleu, âgé de 28 mois, extraite au laboratoire en milieu acide (37,5 µg)
- C : standard de collagène (sauf mention particulière, le collagène désigné sera désormais du collagène soluble dans de l'acide acétique 0,5M, préparé au laboratoire) (2,5 µg)

Fig.3.8. : gel de 10 à 17 % d'acrylamide : coloration au nitrate d'argent

- Echantillons de gélatine industrielle extraite de peau de porc acide (150 mg) avec de gauche à droite : CPA11, CPA12, CPA6, CPA2, CPA13, CPA14, CPA15, CPA16, CPA5, CPA17 et CPA18
- A : gélatine de peau de taurillon de race Blanc Bleu, âgé de 28 mois, extraite au laboratoire en milieu acide (150 µg)
- C : standard de collagène (2,5 µg)
- S : standard de masses moléculaires (HMW, LKB-Pharmacia) (5 µl), où KD sont les masses moléculaires exprimées en kdaltons

F. Choix des standards

Nous avons opté pour le kit de calibration de masses moléculaires HMW (LKB-Pharmacia). Le tableau 3.8. reprend les protéines standards et leur masse moléculaire correspondante en conditions dénaturantes .

PROTEINE	MASSE MOLECULAIRE (daltons)
thyroglobuline	330 000
ferritine	220 000
	18 500
albumine	67 000
catalase	60 000
lactate déshydrogénase	36 000

Tableau 3.8. : Standards protéiques de masses moléculaires

Cependant, dans les gels d'acrylamide, les molécules de collagène ne migrent pas de la même manière que les protéines standards (Furthmayr et Timpl, 1971). Il faudra donc être prudent quant à l'estimation des masses moléculaires de fragments protéiques de la gélatine car des erreurs non négligeables (5-20%) peuvent être commises. Selon Furthmayr et Timpl (1971), les propriétés électrophorétiques "anormales" du collagène par rapport aux protéines globulaires de masses équivalentes seraient liées à la structure relativement rigide du collagène (teneur élevée en Pro et HPro représentant environ un quart de la teneur totale en acides aminés), ce qui expliquerait une mobilité plus lente.

Pour cette raison, nous avons déposé sur chaque gel un standard de collagène. Nous en avons comparé quatre (Fig. 3.6.). La comparaison des profils de distribution de masses moléculaires de ces quatre types de collagène suggère que les collagènes purifiés par Sigma sont beaucoup plus dénaturés que les nôtres car ils contiennent une proportion non négligeable de fragments de masses moléculaires inférieures à 95000 daltons (chaînes α_1 et α_2).

Le collagène de type I (extrait de peau de veau) (Fig. 3.6., puit 12) ne présente pas la même distribution de masses moléculaires que le collagène de type III (extrait de placenta humain) (Fig. 3.6., puit 11). Nos résultats sont en accord avec ceux de Hayashi et Nagai (1979).

Pour les collagènes extraits de peau de veau (Sigma, type I) (Fig. 3.6., puit 12) et de taurillon (solubles dans l'acide et solubles dans le NaCl) (Fig.3.6., puits 13 et 14), les chaînes γ , $\beta 11$ et $\beta 12$ ainsi que $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont bien séparées. Il faut toutefois souligner que, bien que la masse moléculaire des chaînes $\alpha 1$ soit identique à celle des chaînes $\alpha 2$ (95000 daltons), leur mobilité relative diffère (Furthmayr et Timpl, 1971) : les chaînes $\alpha 1$ migrent plus lentement que les chaînes $\alpha 2$ (Miller et Rhodes, 1982). Cette différence est liée à la différence de leur composition en acides aminés (Balian et Bowes, 1977 ; Hayashi et Nagai, 1979) (cf. Tableau 3.9.). La vitesse de migration est une fonction croissante de la teneur en acides aminés hydrophobes ; elle est ralentie en présence d'une teneur élevée en proline (Hayashi et Nagai, 1979).

ECHANTILLON	TENEUR EN A.A. HYDROPHOBES (% MOL)	TENEUR EN A.A. HYDROPHOBES + Pro (% MOL)
$\alpha 2$	11,0	21,8
$\alpha 1$ (I)	6,9	18,3
$\alpha 1$ (III)	5,6	15,8
BSA	28,2	33,1

Tableau 3.9. : Comparaison des teneurs en acides aminés de quelques chaînes peptidiques. Les acides aminés pris en compte sont : Leu, Ile, Val, Met, Trp, Phe (d'après Hayashi et Nagai, 1979).

2°. Caractérisation de la distribution des points isoélectriques de la gélatine

A. Principe

La **focalisation isoélectrique (IEF)** est une méthode électrophorétique dans laquelle des molécules sont séparées par migration dans un gradient de pH. Lorsqu'une protéine est placée dans un milieu où le pH varie et est soumise à un champ électrique, elle migre vers l'électrode de charge opposée à sa charge nette.

Pendant sa migration à travers le gradient de pH, la protéine gagne ou perd des protons et sa mobilité décroît proportionnellement à la réduction de sa charge nette. La protéine devient immobile dans le champ électrique lorsqu'elle atteint une zone du gradient de pH où sa charge nette est nulle : elle est alors à son point isoélectrique (pI).

Le gradient de pH est généralement établi par l'intermédiaire d'électrolytes de synthèse : les **ampholytes**. Ce sont des polymères amphotériques, dont les mélanges donnent des gradients de pH stables dans une gamme déterminée. Les ampholytes commerciaux sont principalement des mélanges de polymères d'acides aminés aliphatiques et carboxyliques, de masses moléculaires comprises entre 300 et 1000 daltons. Néanmoins, certains types d'ampholytes contiennent des résidus d'acide sulfonique et phosphorique (Garfin, 1990).

B. Choix de la méthode

L'étude de la distribution des pI de la gélatine peut se réaliser par chromatographie sur gel (Maxey et Palmer, 1976 ; Rose, 1986 ; Toda, 1988-b), par électrofocalisation en tubes capillaires (Aoyagi, 1988) ou sur gel de polyacrylamide (Maxey and Palmer, 1975 ; Aoyagi, 1988 ; Hasegawa et coll., 1988) ou bien encore par électrophorèse en phase liquide (Rotofor). La chromatographie sur gel et l'électrophorèse en phase liquide sont surtout utilisées comme des méthodes préparatives, permettant une séparation aisée des fractions protéiques, alors que l'électrofocalisation en tubes capillaires ou sur gel sont des méthodes analytiques. L'IEF en tubes capillaires est intéressante pour les électrophorèses en deux dimensions.

Pour l'étude de l'influence de la distribution des pI de la gélatine sur la stabilisation de la mousse, il nous a semblé judicieux de recourir conjointement à une méthode de discrimination des échantillons sur base de leur distribution des pI par IEF

sur gel de polyacrylamide et à une méthode de séparation des fractions protéiques intéressantes par IEF en phase liquide (Bio-Rad, 1988). L'objectif de cette démarche est l'obtention de fractions moléculaires acides et basiques pour étudier leurs interactions sur la stabilisation de la mousse (cf. § 3.2.2.2.-5°).

C. Choix de la composition du milieu d'électrofocalisation

Afin d'éviter les phénomènes d'agréation ou de précipitation entre les polymères de gélatine dans les gels de polyacrylamide, Garfin (1990) préconise de préparer des gels contenant une concentration en urée de 3 à 8 M. Les solutions d'urée utilisées doivent être désionisées préalablement sur une résine échangeuse d'anions et de cations pour prévenir la carbamylation de groupements amine ou sulfhydryl de protéines (Garfin, 1990).

La composition du gel d'acrylamide pour laquelle nous avons opté a été décrite par Hasegawa et coll. (1988). En ce qui concerne l'électrofocalisation en phase liquide, nous nous sommes inspirés des protocoles décrits par Bio-Rad (1988).

D. Choix de la méthode de fixation et de coloration

L'étape de fixation est plus délicate dans le cas de l'électrofocalisation que dans celui d'une électrophorèse "classique". Il faut en effet fixer les protéines dans le gel en évitant la fixation des ampholytes car ces dernières peuvent interférer avec les protéines pendant l'étape de coloration (Garfin, 1990). Le problème peut être contourné en utilisant un colorant qui ne marque pas les ampholytes dans le gel (Frater, 1970).

Nous avons comparé plusieurs méthodes de fixation et coloration pour les gélatines (cf. Tableau 3.10.).

PROTOCOLE	1	2	3	4	5	6
FIXATION	TCA 15% (p/v) Maxey et Palmer (1975)	- 1/2h dans TCA 20% (p/v) ; - 1 nuit dans TCA 15% (p/v) ; - 15 min rinçage dans MeOH : HOAc : H ₂ O (40 : 10 : 50 v/v).	- 1/2h dans TCA 20% (p/v) ; - 1 nuit dans TCA 15% (p/v) ; - 15 min rinçage dans MeOH : HOAc : H ₂ O (40 : 10 : 50 v/v).	- 1/2h dans TCA 20% (p/v) ou 1/2h dans TCA 20% (p/v) : ac. salicilique 3,45% (p/v) ; - 1 nuit dans TCA 15% (p/v) ; - 15 min. rinçage dans MeOH : HOAc : H ₂ O (40 : 10 : 50 v/v)	1/2 h dans TCA 20% (p/v)	-1/2 h dans 20%(p/v) TCA ; - 1 nuit dans TCA 15% (p/v); - 3 rinçages d'1 h dans EtOH : HOAc : H ₂ O (10 : 5 : 85 v/v)
COLORATION	non	0,25% (p/v) CBB R-250 dans MeOH : HOAc : H ₂ O (45 : 10 : 45 v/v) 30 min.	0,25% (p/v) Serva Violet 49 dans MeOH : HOAc : H ₂ O (45 : 10 : 45 v/v) 30 min.	0,02% (p/v) CBB G-250 dans 3,5% (v/v) HClO ₄ 1 journée : Aoyagi (1988)	0,1% (p/v) CBB G-250 (purifié selon Neuhoff <i>et coll.</i> (1988)) dans 2% (p/v) H ₃ PO ₄ - 15% (p/v) sulfate d'ammonium 1 nuit : Neuhoff <i>et coll.</i> (1988)	coloration à l'Ag selon Merrill (1981) et (1990).
DECOLORATION	non	plusieurs rinçages dans MeOH: HOAc : H ₂ O (20 : 7,5 : 72,5 v/v)	plusieurs rinçages dans MeOH: HOAc : H ₂ O (20 : 7,5 : 72,5 v/v)		- rinçage dans 20% (v/v) MeOH ; - fixation de la coloration dans 20% (p/v) sulfate d'ammonium	non
COMMENTAIRES	bandes peptidiques précipitées (sous forme de bandes blanches), mauvais contraste.		bruit de fond intense, mauvais contraste pour les standards, bandes de la gélatines peu ou pas apparentes.	bruit de fond intense, mauvais contraste pour les bandes de gélatine qui sont diffuses et peu apparentes.	étape de décoloration pas nécessaire, faible bruit de fond, gélatines fixées et colorées, bon contraste.	après 3 rinçages avec 10% (v/v) EtOH : 5% (v/v) HOAc, les bandes protéiques de la gélatine disparaissent; fond du gel noir après coloration.

Tableau 3.10. : Comparaison de plusieurs méthodes de fixation-coloration pour l'étude de la distribution des pI de la gélatine.

De toutes les méthodes que nous avons utilisées, seule la méthode proposée par Neuhoﬀ *et coll.* (1988) (protocole 5, Tableau 3.10.) nous semble valable pour l'étude de la gélatine. En eﬀet, les molécules sont correctement ﬁxées dans le gel par le TCA 20% p/v dans une première étape, et par le sulfate d'ammonium 15% p/v dans une seconde étape. De plus, la coloration est améliorée par la puriﬁcation du CBB G-250, qui réagit à l'état colloïdal. Il en résulte une limitation importante de la coloration du fond du gel et une bonne stabilisation du colorant sur les bandes protéiques. Le détail de la méthode retenue est donnée au § 3.2.7.2.

E. Choix de l'endroit du dépôt de l'échantillon

Le proﬁl de distribution de pI des gélatines est inﬂuencé de manière très importante par l'endroit de dépôt de l'échantillon sur le gel. Comme aucune règle stricte n'est déﬁnie en la matière, nous avons donc comparé les proﬁls de distribution de pI pour une gélatine chaulée et une gélatine acide respectivement au centre, à un centimètre de l'anode et à un centimètre de la cathode (résultats non montrés). D'une manière générale, un dépôt voisin de l'endroit où les échantillons se focalisent freine la migration et nuit ainsi à une séparation correcte. Dans un gel de gradient de pH compris entre 4 à 10 et pour les gélatines issues d'un prétraitement acide, les échantillons déposés au centre du gel ou à 1 cm de la cathode migrent de manière presque similaire (leur séparation est correcte) mais ils ne migrent pas s'ils sont déposés à 1 cm de l'anode. Pour les échantillons de type chaulé, il semble que la meilleure migration soit celle issue d'un dépôt d'échantillon au centre du gel.

3.3.2. ETUDE DES RELATIONS EXISTANT ENTRE LES PROPRIETES MOUSSANTES DE LA GELATINE ET LEUR COMPOSITION CHIMIQUE

3.3.2.1. Classement des gélâtines sur base de leurs propriétés moussantes

Nous avons examiné la relation existant entre la stabilité de la mousse et la capacité moussante de quatre types de gélatine. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 3.11.

TYPE DE GELATINE	NOMBRE D'ECHANTILLONS : n	HAUTEUR DE MOUSSE (cm)		STABILITE MOYENNE DE LA MOUSSE : t1/2 (min)	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
- peau chaulée	14	11,9	2,4	1,5	1,3
- os chaulé	19	10,9	3,1	0,9	0,6
- os acide	22	14,3	2,0	5,7	6,3
- couenne de porc acide	71	13,3	2,6	7,2	6,6

Tableau 3.11. : Comparaison des capacités moussantes et des stabilités de la mousse de quatre types de gélatine : peau chaulée, os chaulé, os acide et couenne de porc acide ($\bar{x}$ et s représentent respectivement la moyenne et l'écart-type des valeurs mesurées).

Sur base des résultats de stabilité de la mousse que nous avons obtenus pour les quatre types de gélatine, peau chaulée, os chaulé, os acide et couenne de porc acide (cf. Figures 3.9-3.10-3.11-3.12), nous avons classé nos échantillons en deux catégories. La première regroupe les échantillons présentant une mousse stable, c'est-à-dire dont la période de demi-vie est supérieure à 5 minutes* et la seconde regroupe les échantillons présentant une mousse instable, c'est-à-dire dont la période de demi-vie est inférieure à 5 minutes.

* La valeur de 5 minutes est une valeur arbitraire basée sur les critères pratiques que nous ont fournis les utilisateurs (source PB GELATINS).

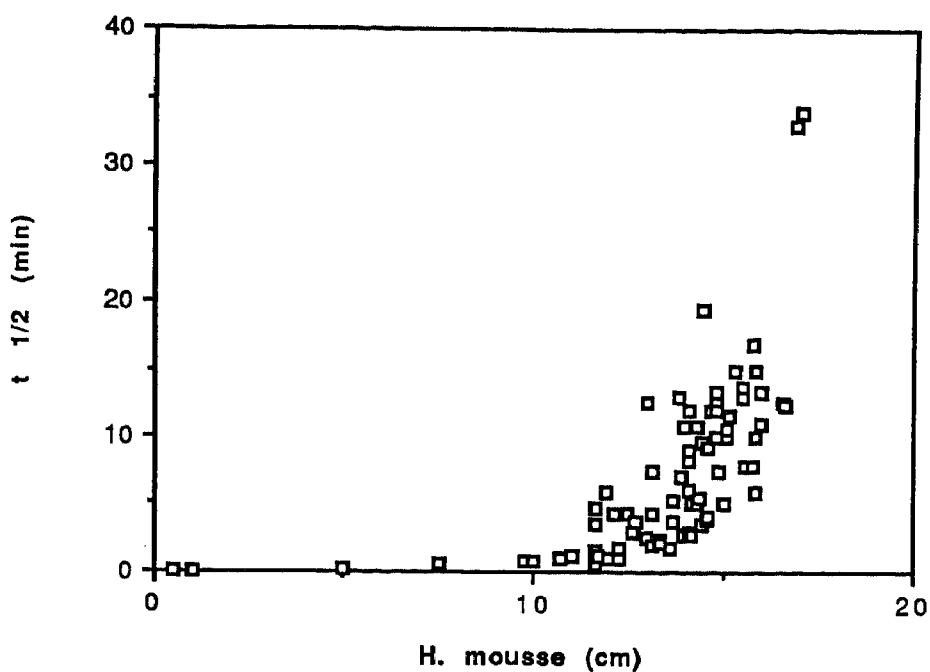


Fig. 3.9 : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la capacité moussante (hauteur de mousse H) pour les gélamines extraites de couenne de porc acide : $n=71$.

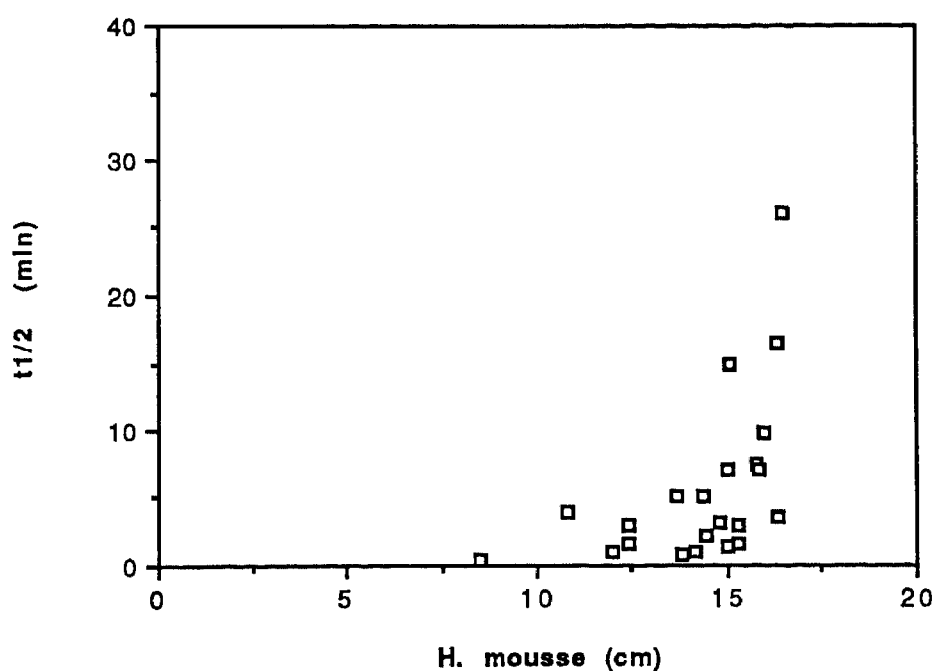


Fig. 3.10 : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la capacité moussante (hauteur de mousse H) pour les gélamines extraites d'os acide : $n=22$.

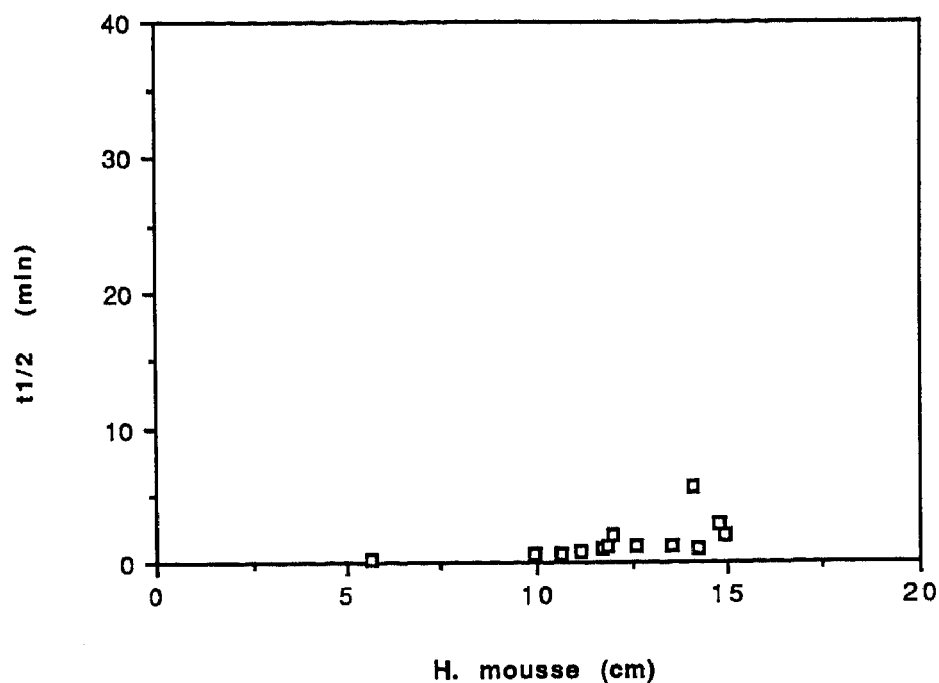


Fig. 3.11 : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la capacité moussante (hauteur de mousse H) pour les gélatines extraites de peau chaulée : $n=14$.

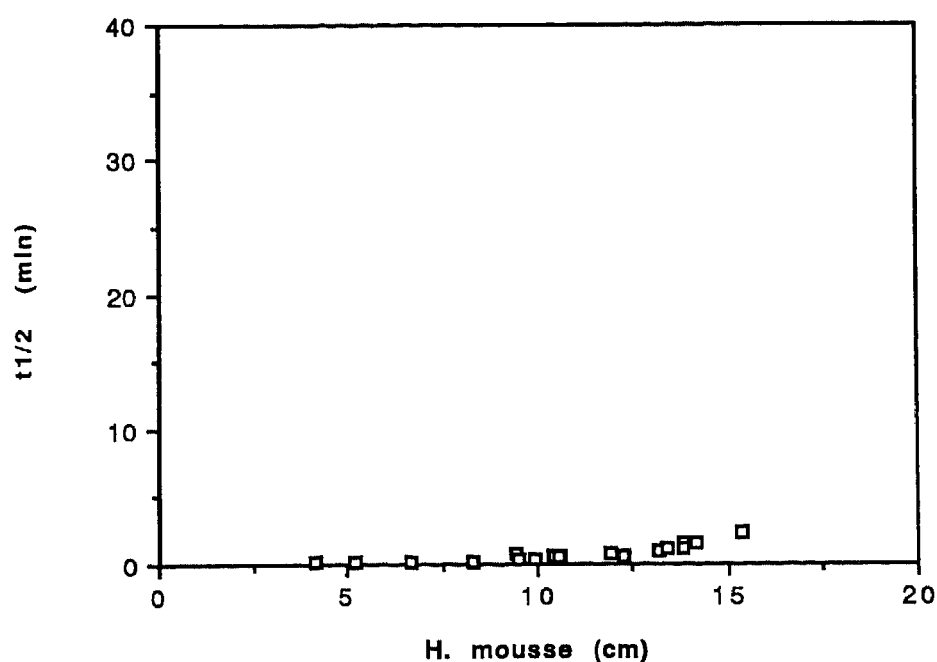


Fig. 3.12 : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la capacité moussante (hauteur de mousse H) pour les gélatines extraites d' os chaulé : $n=19$.

On remarque d'emblée que le prétraitement alcalin produit des gélatines de piètres propriétés moussantes alors que le prétraitement acide fournit, en moyenne, des gélatines de propriétés moussantes supérieures, mais dont la variabilité est importante. Les produits du prétraitement acide sont de comportement très hétérogène par rapport à ceux issus d'un procédé chaulé. Ces résultats concordent bien avec les observations industrielles.

Il faut en rechercher l'explication dans les modifications apportées à la matière première pendant le processus de prétraitement. Nous envisagerons ces modifications à deux niveaux : d'une part en étudiant les relations existant entre les propriétés moussantes et les caractéristiques protéiques de la gélatine et , d'autre part, en étudiant les relations existant entre les propriétés moussantes et les "impuretés" de la gélatine.

3.3.2.2. Etude des relations existant entre les propriétés moussantes et les caractéristiques protéiques de la gélatine.

1°. Relation entre la distribution de masses moléculaires et le prétraitement

La distribution des masses moléculaires est conditionnée par le prétraitement, acide ou chaulé, imposé à la matière première (cf. Fig. 3.13). Ainsi, cette distribution est beaucoup plus étroite dans le cas de gélatines chaulées que dans celui de gélatines acides, où l'hydrolyse des chaînes polypeptidiques est relativement importante.

Quelle que soit la méthode de mesure, la distribution de masses moléculaires des gélatines de type acide est caractérisée par une proportion plus élevée de fragments de masses moléculaires inférieures à 100 kdaltons. Quant à la distribution des masses moléculaires des gélatines de type chaulé, elle est fort semblable à celle du collagène dont ces gélatines dérivent. De telles différences seraient dues à la nature des liaisons détruites lors du prétraitement (cf. § 2.2.2.2.) (Rose, 1987).

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ceux de Aoyagi (1988) (cf. Fig 3.14.), Von G. Chalepakos et coll. (1985) et Melia et coll. (1983).

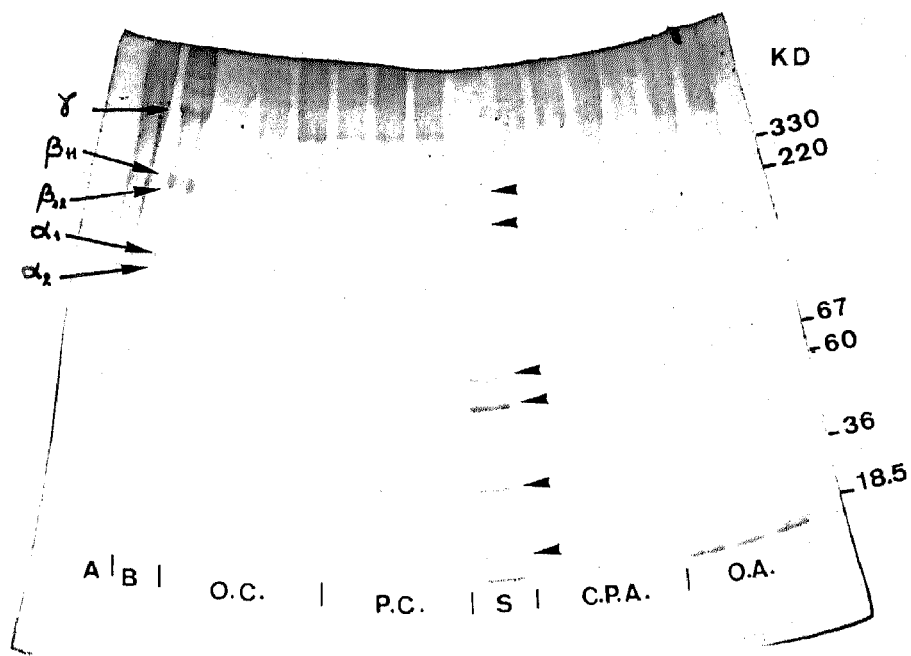


Fig. 3.13. : Comparaison des distributions de masses moléculaires de quatre types de gélatines.

De gauche à droite :

deux gélatines préparées au laboratoire à partir d'une peau de taurillon issues d'un prétraitement acide (A) et alcalin (B) ;

gélatines industrielles extraites d'os chaulé (OC 1, OC 2, OC 3), de peau chaulée (PC 1, PC 2, PC 3), de couenne de porc acide (CPA 18, CPA 17, CPA 5), et d'os acide (OA 4, OA 5, OA 6) .

Conditions opératoires : gradient de polyacrylamide de 3 à 15 %, coloration au bleu de Coomassie selon la méthode de Steck *et coll.* (1980), dépôts d'échantillons de 40 µg, S = standards de masses (LKB-Pharmacia) (10 µl).

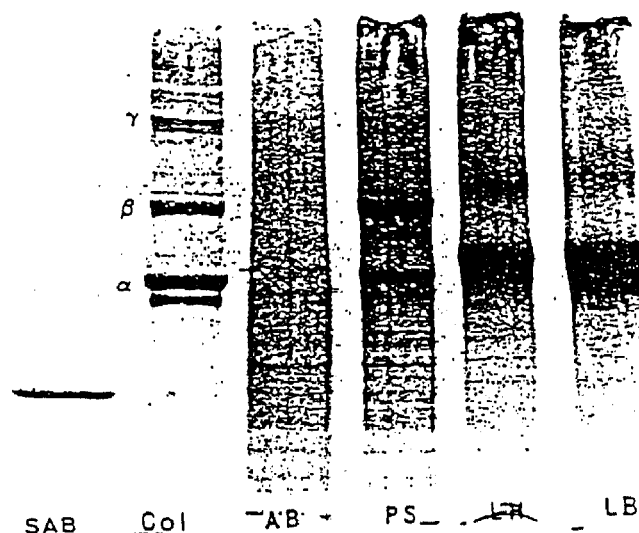


Fig 3.14. : Profils électrophorétiques de quatre types de gélatines dans le système de Laemmli .

De gauche à droite : référence Serum Albumine Bovine (B.S.A.), référence collagène de type I (Col), os acide (AB), couenne de porc acide (PS), peau chaulée (LH) et os chaulé (LB) ; d'après Aoyagi (1988).

2°. Relation entre la distribution de masses moléculaires et la force en gelée et/ou la viscosité.

La force en gelée des gélatines est liée à leur distribution de masses moléculaires. En effet, l'analyse des Fig. 3.15. et 3.16. montre clairement que les gélatines dont la force en gelée est faible sont plus dénaturées que celles dont la force en gelée est élevée.

Bien que Veis (1964) et Rose (1987) n'aient dégagé aucune relation entre la force en gelée et la distribution de masses moléculaires, les résultats de Rose (1987) suggèrent que la force des gels est favorisée par une teneur élevée (30-50% en poids) en molécules de masses supérieures à 10^5 daltons (les chaînes α et β font partie de cette catégorie). Parallèlement à la diminution de la force en gelée au fil des extractions, la proportion de chaînes α et β diminue au profit de molécules de masses moyennes inférieures à 10^5 daltons (Rose, 1987). Ces résultats semblent logiques, dans la mesure où la réticulation d'un gel est proportionnelle à la taille des polymères mis en présence (Djabourov, 1988).

L'analyse des Fig. 3.15 et 3.16. suggère également que la viscosité est une fonction décroissante de la teneur en fragments protéiques de petites tailles (inférieures à 67 kdaltons).

Bien que selon Rose (1987), la viscosité ne soit pas directement reliée à la force en gelée, nos résultats corroborent en partie ceux de Tavernier (1989). Ce dernier a calculé les relations existant entre la composition moléculaire des gélatines et la viscosité. Il en déduit que la viscosité est une fonction croissante de la teneur en composés de masses moléculaires supérieures à 300 kdaltons et une fonction décroissante de la teneur en fragments peptidiques de masses inférieures à 70 kdaltons. Cependant, selon lui, la teneur relative en chaînes α et β n'aurait que peu d'influence sur la viscosité.

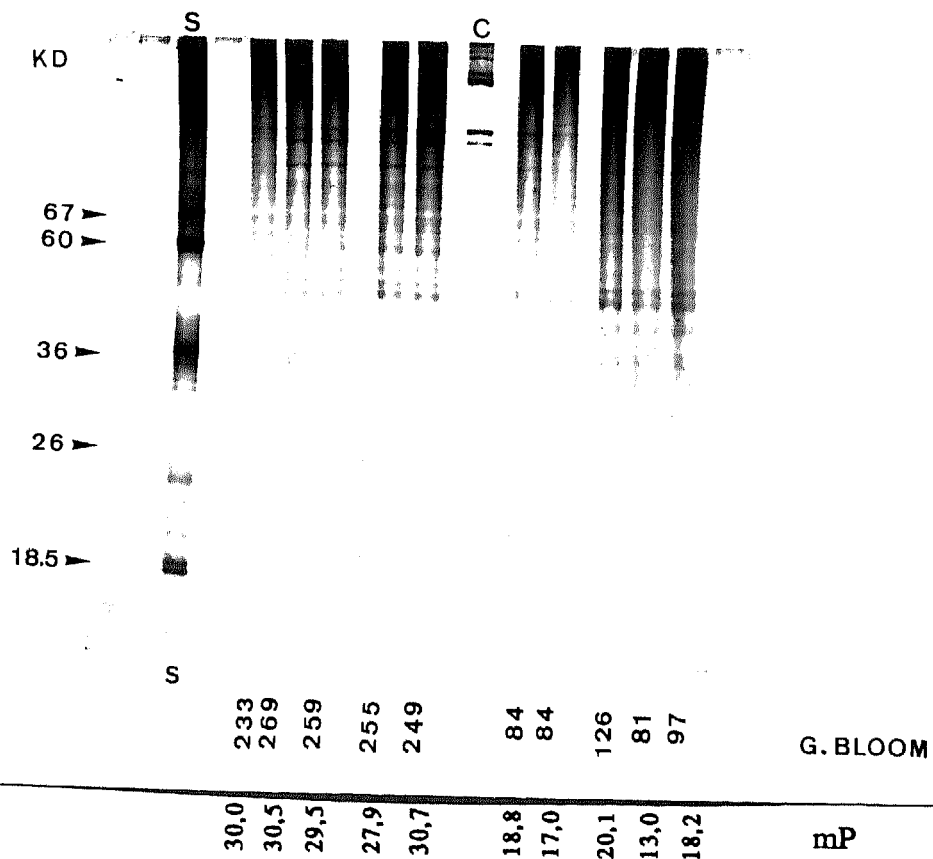
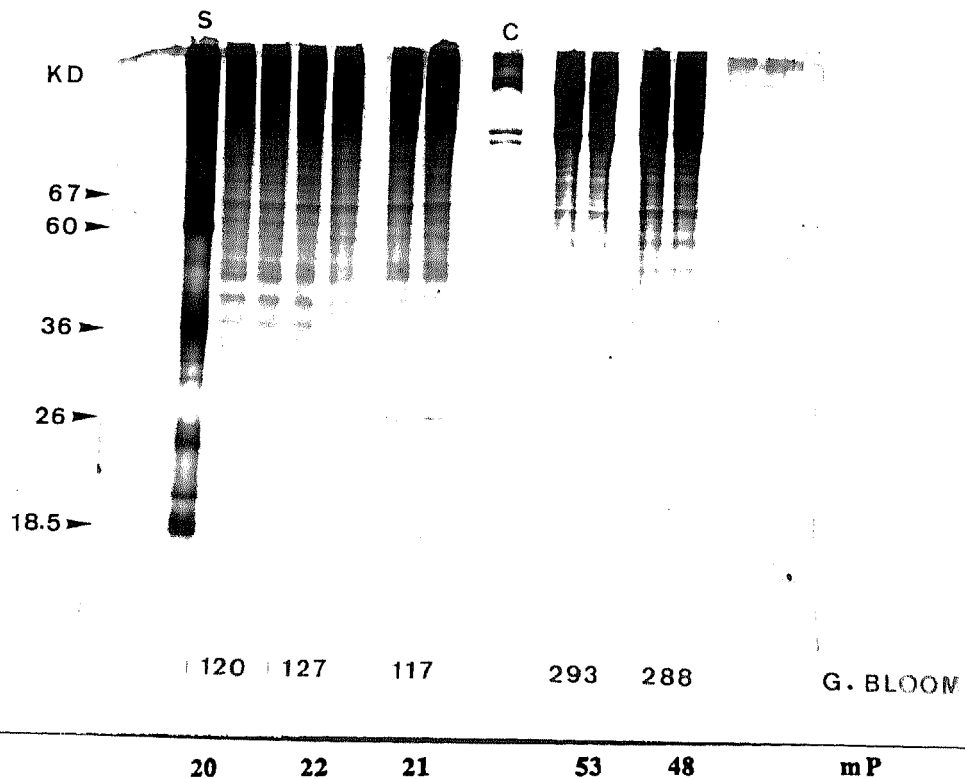


Fig. 3.15. : Comparaison des profils électrophorétiques de gélatines (extraites de couennes de porc acide) de différentes forces en gelée (g Bloom) et viscosités (mP), avec de gauche à droite : CPA 18, CPA 17, CPA 2, CPA 20 et CPA 10 (dépôts en double)

- Conditions électrophorétiques : gel de 10-17 % d'acrylamide-bisacrylamide (30:0,8), coloration au nitrate d'argent, dépôts d'échantillons : 50 µg.
- Légendes : S : standards de masses moléculaires élevées (LKB-Pharmacia) (5 µl); C : standard de collagène (2,5 µg) ; KD : masses moléculaires exprimées en kdaltons.

Fig. 3.16. : Comparaison des profils électrophorétiques de gélatines (extraites d'os acide) de différentes forces en gelée (g Bloom) et viscosité (mP), avec de gauche à droite : OA 6, OA 7, OA 8, OA 9, OA 10, OA 5, OA 4, OA 1, OA 3, OA 11

- Conditions électrophorétiques : gel de 10-17 % d'acrylamide-bisacrylamide (30:0,8), coloration au nitrate d'argent, dépôts d'échantillons : 37,5 µg.
- Légendes : S : standards de masses moléculaires élevées (LKB-Pharmacia) (5 µl); C : standard de collagène (2,5 µg) ; KD : masses moléculaires exprimées en kdaltons.

3°. Relation entre la distribution de masses moléculaires et la stabilité de la mousse.

Pour étudier la relation existant entre la D.M.M.(distribution de masses moléculaires) et la stabilité de la mousse, nous ne nous sommes intéressés qu'aux gélatines de type "couenne de porc acide", car c'est parmi cette classe d'échantillons que la variabilité des propriétés moussantes est la plus intéressante (cf. § 3.3.2.1.). Dans ce cadre, nous avons sélectionné six échantillons dont les valeurs de force en gelée et dont les teneurs en cations sont comparables. Nous en avons choisi trois fournissant une mousse stable et trois fournissant une mousse instable. La Fig. 3.17. compare les profils électrophorétiques de D.M.M. que nous avons obtenus pour ces six échantillons.

De l'analyse de la Fig. 3.17., il ressort que la surface relative du pic compris entre 26 et 29 kdaltons semble différer d'une manière significative d'un échantillon à l'autre (cf. Tableau 3.12.). Nous avons porté en graphique les surfaces relatives des six échantillons en fonction de la stabilité de la mousse qu'ils génèrent (cf. Fig. 3.18., échantillons n°1-2-3-4-5-6).

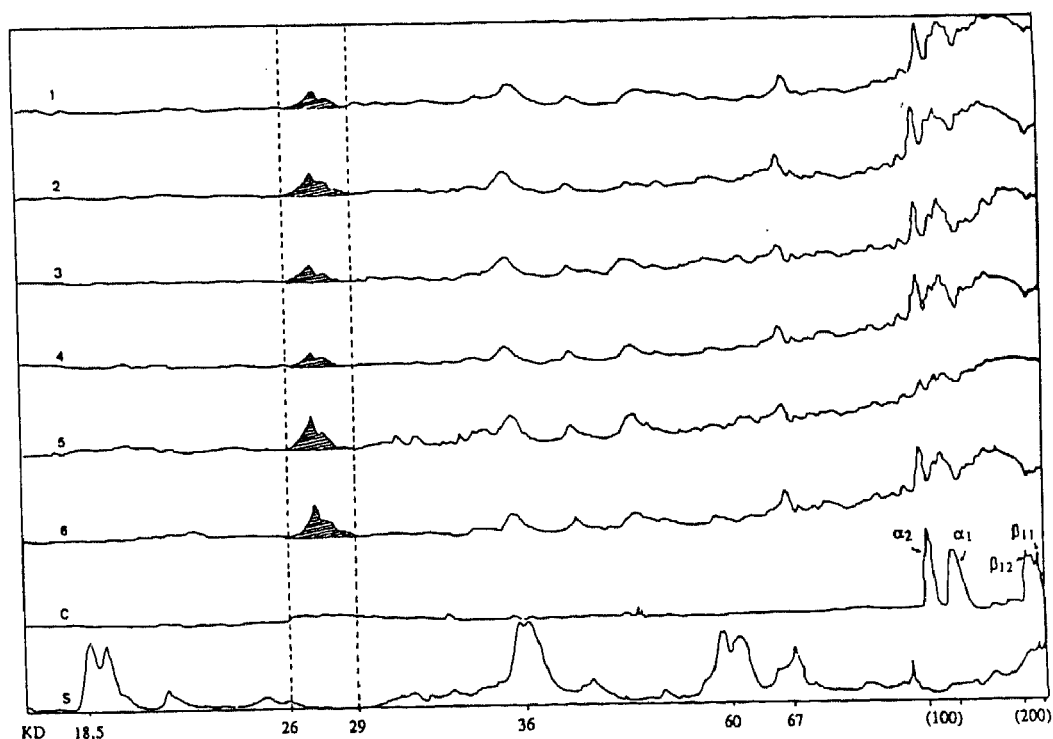


Fig. 3.17. : Comparaison des profils électrophorétiques de six gélatines extraites de couennes de porc acide.

Légende : 1: CPA 4, 2: CPA 6, 3: CPA 8, 4: CPA 7, 5: CPA 2, 6: CPA 9, C: standard de collagène (2,5 µg), S: standards de masses moléculaires (LKB-Parmacia) (5 µl), KD: masses moléculaires exprimées en kdaltons.

Conditions électrophorétiques : gel de 10-17% d'acrylamide-bisacrylamide (30:0,8), coloration au nitrate d'argent, dépôt d'échantillons : 50 µg

N°	Echantillon	t1/2 (min)	Surface relative pic 26-29 kD	FAME (ppm = $\mu\text{g/g}$)	Force en gelée (g Bloom)	Viscosité (mP)
1	CPA 4	0,8	0,3	8,8	243	35
2	CPA 7	5,0	0,6	2,8	287	40
3	CPA 8	5,0	1,3	3,1	238	34
4	CPA 6	14,8	1,1	1,0	249	44
5	CPA 9	13,0	3,1	1,9	238	32
6	CPA 2	12,0	3,4	1,1	253	32
7	CPA 8 + CPA 6 (50:50)	9,7	1,2	2,0	-	-

Tableau 3.12. : Résultats récapitulatifs de l'analyse de la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$), de la surface relative du pic de masse moléculaire comprise entre 26 et 29 kdaltons, de la teneur en lipides totaux (FAME), de la force en gelée et de la viscosité d'échantillons de gélatine extraite de couenne de porc acide.

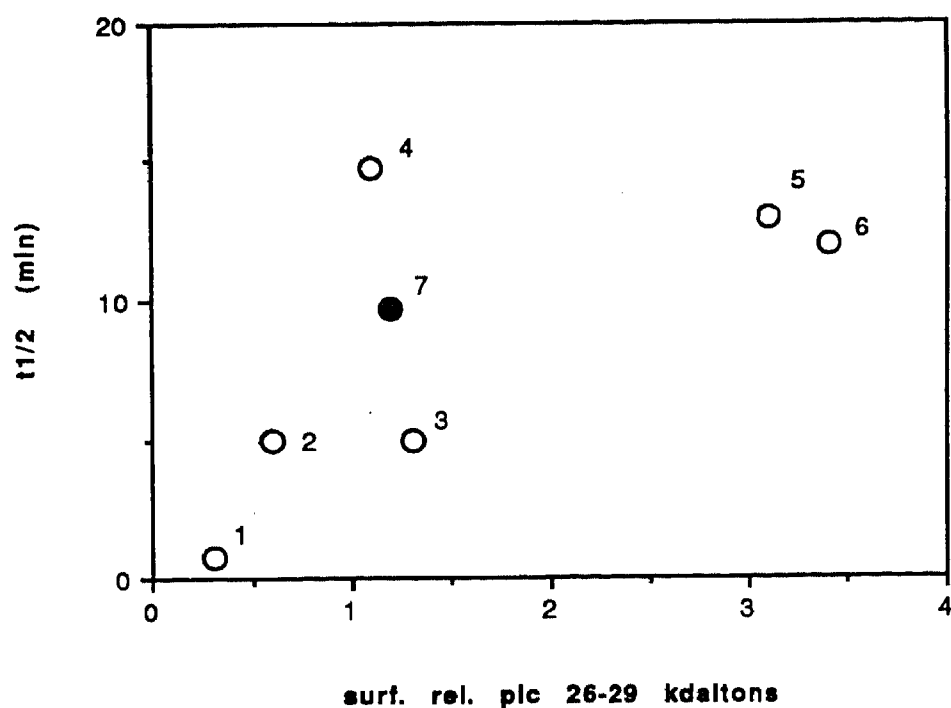


Fig. 3.18. : Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et les valeurs relatives de la surface des pics de masses moléculaires comprises entre 26 et 29 kdaltons pour des gélatines extraites de couennes de porc acide (O : échantillons "purs" de même force en gelée et ● : mélange 50:50 des échantillons n°3 et 4).

De prime abord, la stabilité de la mousse semble être une fonction croissante de la surface relative du pic compris entre 26 et 29 kdaltons. Cependant, pour des surfaces relativement semblables, l'échantillon n°3 est classé dans les "mousses instables", alors que l'échantillon n°4 est classé dans les "mousses stables".

Nous avons alors émis l'hypothèse que le paramètre "surface relative du pic compris entre 26 et 29 kdaltons" n'expliquerait pas à lui seul la stabilité de la mousse. En tant que facteur pro-mousse, il pourrait entrer en compétition avec un facteur anti-mousse tel que la teneur en lipides (sous la forme d'acides gras totaux) (cf. § 3.3.2.3.-1°). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc dosé la teneur en lipides totaux (FAME) présents dans nos échantillons (cf. Tableau 3.12.). Ne sachant pas au préalable si les différences obtenues étaient significatives ou non, nous avons mélangé en parts égales les échantillons n°3 et 4 de manière à obtenir un nouvel échantillon (n°7). Les résultats des analyses sont donnés dans le Tableau 3.12. Ils sont intermédiaires entre ceux qui correspondent aux échantillons n°3 et 4. Nous les avons portés sur le graphique 3.18. Il en ressort que les échantillons n°1-2-5-6-7 se disposent sur une courbe croissante de la stabilité de la mousse en fonction de la surface du pic compris entre 26 et 29 kdaltons.

Nous en concluons que le "système mousse" peut être expliqué par des variables pro- et anti-mousse, dont l'influence relative va dépendre de leurs valeurs respectives. De plus, comme nous l'avons vu au § 2.3.2., il existe une analogie entre le système de la mousse de bière et celui de la mousse de gélatine. Nous suggérons donc que la stabilité des mousses de gélatine dépend de la teneur en fragments peptidiques de petites tailles, signe d'une hydrolyse relativement poussée de la matière première.

4°. Relation entre la distribution des points isoélectriques et la stabilité de la mousse.

Nous avons comparé des échantillons extraits de couenne de porc acide, de force en gelée et de viscosité similaires (cf. Tableau 3.12.). L'électrofocalisation de ces six échantillons ne nous permet pas de différencier les échantillons présentant une mousse stable (CPA 9, CPA 2 et CPA 7) des échantillons présentant une mousse instable (CPA 8, CPA 6 et CPA 4) (cf. Fig. 3.19.).

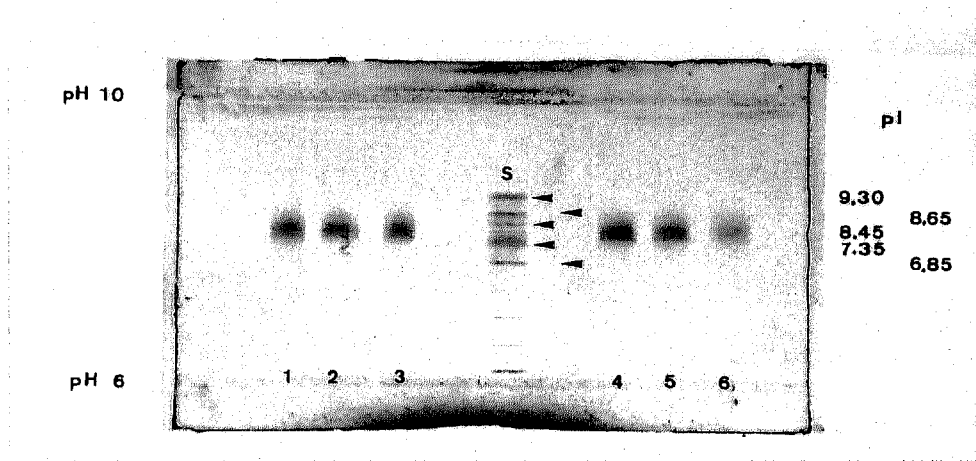


Fig. 3.19. : Comparaison de l'électrofocalisation d'échantillons de gélatine extraite de couenne de porc acide sur mini-gel (4% T - 6% C, grad pH 6-10) Le dépôt des échantillons 1-6 (5 μ g) est effectué au centre du gel.
Légendes: - gélatines "mousse stable" : 1: CPA 9, 2: CPA 2, 3: CPA 7;
- gélatines "mousse instable" : 4: CPA 8, 5: CPA 6, 6: CPA 4;
- S: standards de pI (LKB-Pharmacia) (2 μ l)

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de relation entre la distribution des points isoélectriques de la gélatine et la stabilité de la mousse. Le profil de distribution des pI est caractéristique d'un type donné de gélatine (cf. § 3.3.2.2.-4°), mais la méthode électrophorétique que nous avons utilisée ne nous permet pas de différencier des échantillons issus d'un même processus de prétraitement.

5°. Relation entre la distribution de points isoélectriques et la distribution de masses moléculaires de la gélatine.

Nous avons fractionné un échantillon de couenne de porc acide (CPA 2) (mousse stable) sur Rotofor, dans un gradient de pH compris entre 3 et 10. La distribution des pI des fractions récoltées a été mesurée sur gel de polyacrylamide (cf. Fig. 3.20). Il en ressort que les fractions de pH compris entre 7,9 et 11,5 sont enrichies en protéine par rapport aux autres (cf. Tableau 3.13). Pour les fractions mentionnées, la distribution de pI est très étendue (4,55 - 10). Il nous a semblé intéressant d'essayer de concentrer des fractions protéiques à pI faibles et élevés en effectuant un second fractionnement avec un mélange des fractions 9 à 20. Le résultat obtenu est montré à la Fig. 3.21.

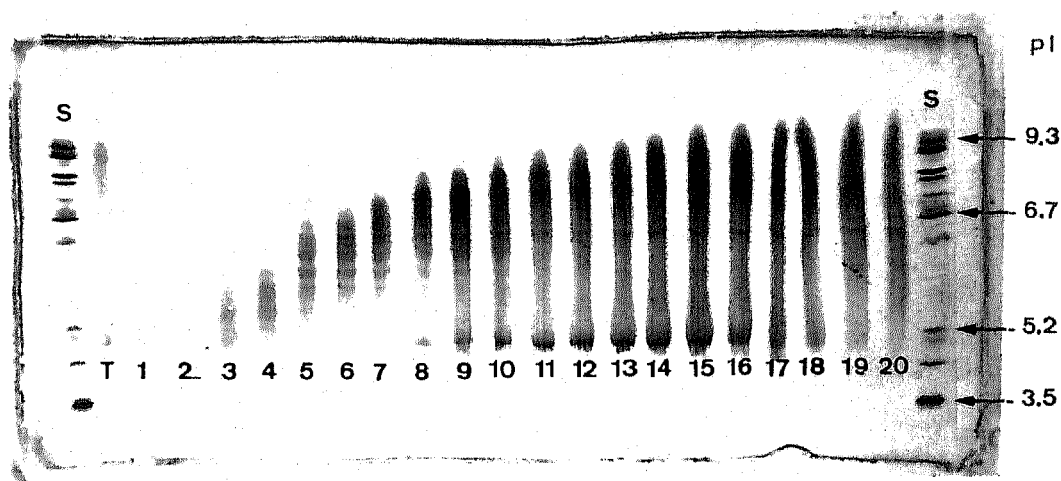


Fig. 3.20.: Profils électrophorétiques (obtenus sur grand gel : 4% T - 6% C, grad pH 3-10) des fractions d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (fractions 1-20) séparées sur Rotofor (après le 1^{er} fractionnement, grad pH : 3-10). 7,5 µl de chaque fraction et 10 µl du témoin T (échantillon non séparé, 1µg/µl) ont été déposés à 1 cm de l'anode tandis que 10 µl de standards de pI (LKB-Pharmacia, pI 3-10) ont été déposés au centre du gel.

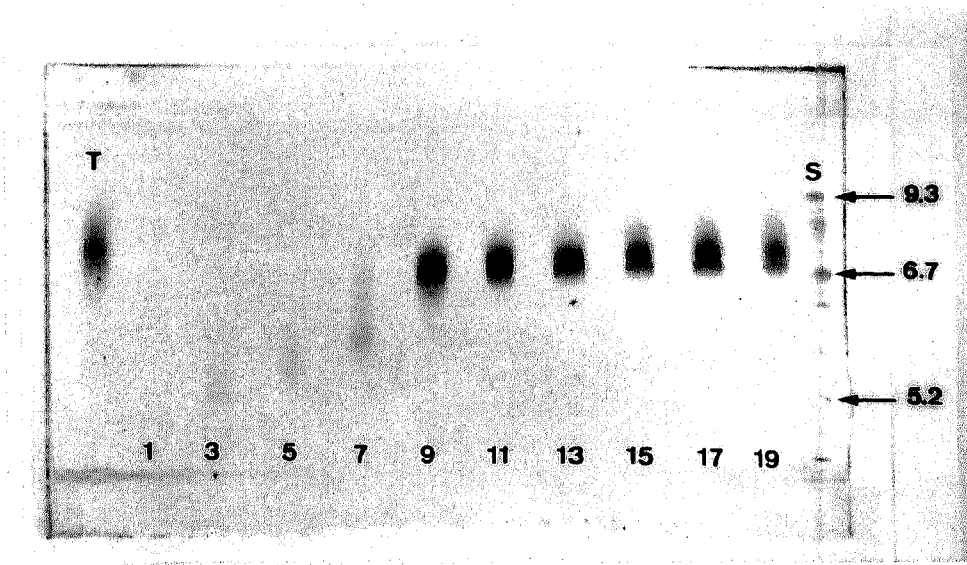


Fig. 3.21. : Profils électrophorétiques (sur mini-gel, grad pH4-10) de fractions de gélatine extraite de couenne de porc acide obtenues après deux fractionnements sur Rotofor (1° : grad pH 3-10 ; 2° : grad pH 4-10). Les échantillons (2 μ l pour la fraction 1 et 1 μ l pour les autres), le témoin T (échantillon non séparé, 5 μ g) et les standards S de pI (LKB-Pharmacia, 1 μ l) ont été déposés au centre du gel.

Fraction	1 ^{er}			2 ^e		
	pH	Surface relative	Conc.* (μ g/ μ l)	pH	Surface relative	Conc.* (μ g/ μ l)
1	3,37	0,7761	1,03	4,10	0,45752	0,214
3	5,01	0,8801	1,17	5,31	0,98272	0,919
5	6,25	1,2931	1,72	5,83	1,4292	1,336
7	7,12	1,7623	2,27	6,13	3,04108	2,843
9	7,97	3,0997	4,13	7,97	7,48624	6,999
11	8,65	3,1353	4,18	8,33	7,73428	7,231
13	9,38	3,1624	4,22	8,47	5,75276	5,379
15	10,11	3,628	4,84	8,89	6,42220	6,004
17	10,75	3,1885	4,25	8,83	7,73872	7,235
19	11,40	2,2943	3,06	9,19	7,33300	6,856

Tableau 3.13.: Résultats du fractionnement par électrofocalisation d'un échantillon de gélatine extraite de couenne de porc acide (CPA 2).

* Les concentrations des différentes fractions ont été estimées à partir des densités optiques mesurées à l'Ultrosan Lazer Densitometer (LKB-Pharmacia), par rapport au témoin déposé sur le gel.

Les fractions récoltées après le deuxième fractionnement ont été déposées sur un gel SDS-PAGE pour obtenir les distributions de masses moléculaires (cf. Fig. 3.22.). Sur base de leur profil électrophorétique, ces fractions ont été classées en trois catégories: la première regroupe les fractions 3 à 7, la seconde les fractions 9 et 11, et la troisième les fractions 13 à 19. Il semble difficile d'établir une quelconque relation entre le pI et la distribution de masses moléculaires correspondantes. Néanmoins, les fractions dont le pI est compris entre 8,5 et 9,2 présentent une distribution de masses moléculaires similaire à celle de l'échantillon témoin. Hormis peut-être la fraction 1 (pI = 4,1), les fractions de pI compris entre 5,3 et 6,1 ne représentent pas le profil type des gélatines chaulées (cf. Fig. 3.6.) car les bandes correspondant aux chaînes α et β n'apparaissent pas.

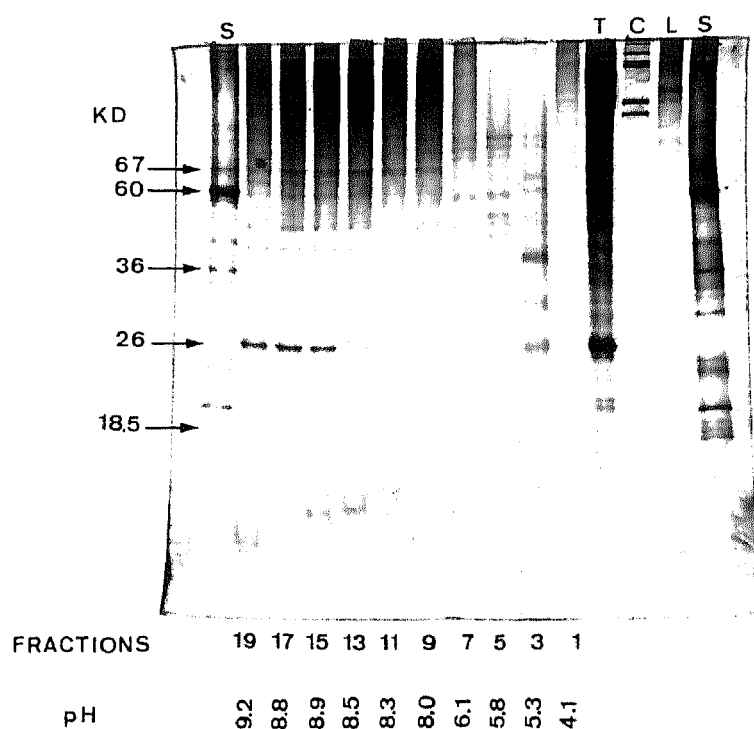


Fig. 3.22. : Distribution de masses moléculaires [grad de 10-17% acrylamide-bisacrylamide (30:0,8), coloration au nitrate d'argent] des fractions peptidiques (20 μ g) de la gélatine CPA 2, séparées au Rotofor (après deux fractionnements, gradient de pH compris entre 4 et 10).

Légendes : S : standards de masses moléculaires (Pharmacia-LKB) (3 μ l)
T : témoin CPA 2 (100 μ g)
C : collagène (2,5 μ g)
L : gélatine extraite de peau chaulée (5 μ g)
Le pH des fractions protéiques indiqué correspond au leur pI.

3.3.2.3. Etude des relations existant entre les propriétés moussantes et les caractéristiques non protéiques de la gélatine.

1°. Relation entre la stabilité de la mousse et la teneur en lipides totaux

Nous avons dosé les acides gras totaux contenus dans des échantillons de gélatine extraite de peau chaulée, d'os chaulé, d'os acide et de couenne de porc acide, représentatifs des deux classes de gélatines "mousse stable" et "mousse instable".

Il s'avère que les acides gras les plus représentés et les plus actifs sur la mousse sont les acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1), stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) (résultats non montrés). Les acides gras "courtes chaînes" (C6:0 à C12:0) de même que les acides arachidique et arachidonique se retrouvent en quantité négligeable et ne seront donc pas pris en considération dans les figures suivantes.

Nous avons examiné la relation existant entre la stabilité de la mousse et les teneurs en lipides totaux (sous la forme d'acides gras) présentes dans quatre types d'échantillons (cf. Fig. 3.23.-3.24.-3.25.-3.26.). Ils sont regroupés dans le tableau 3.14.

Type de gélatine	Nombre d'échantillons n	Stabilité de la mousse : t1/2 (min)		Teneur en lipides totaux (ppm)	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
peau chaulée	4	1,1	1,0	129,2	6,6
os chaulé	9	1,2	0,7	223,7	252,2
os acide	12	6,8	8,0	259,2	163,0
couenne de porc acide	11	15,2	10,1	17,5	17,6

Tableau 3.14. : Résultats récapitulatifs de la mesure de la stabilité de la mousse et de l'analyse de la teneur en lipides totaux (somme des acides gras de C16:0 à C18:1) pour quatre types de gélatine : $\bar{x}$ et s sont respectivement la moyenne et l'écart-type des mesures.

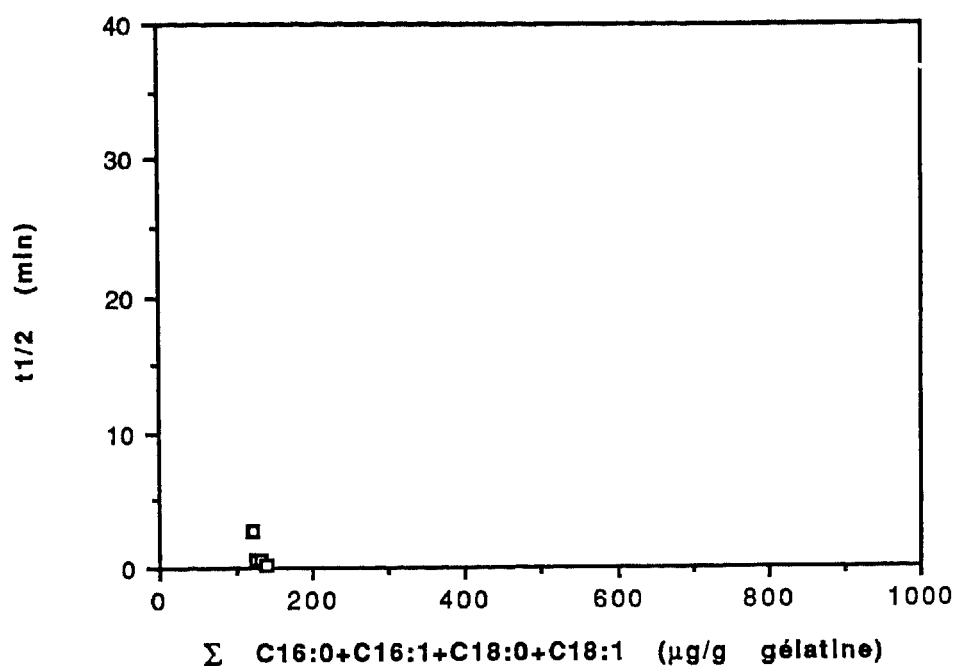


Fig. 3.23. : Gélatines extraites de peau chaulée :

relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la teneur en lipides totaux (somme Σ des acides gras de C16:0    C18:1), $n = 4$.

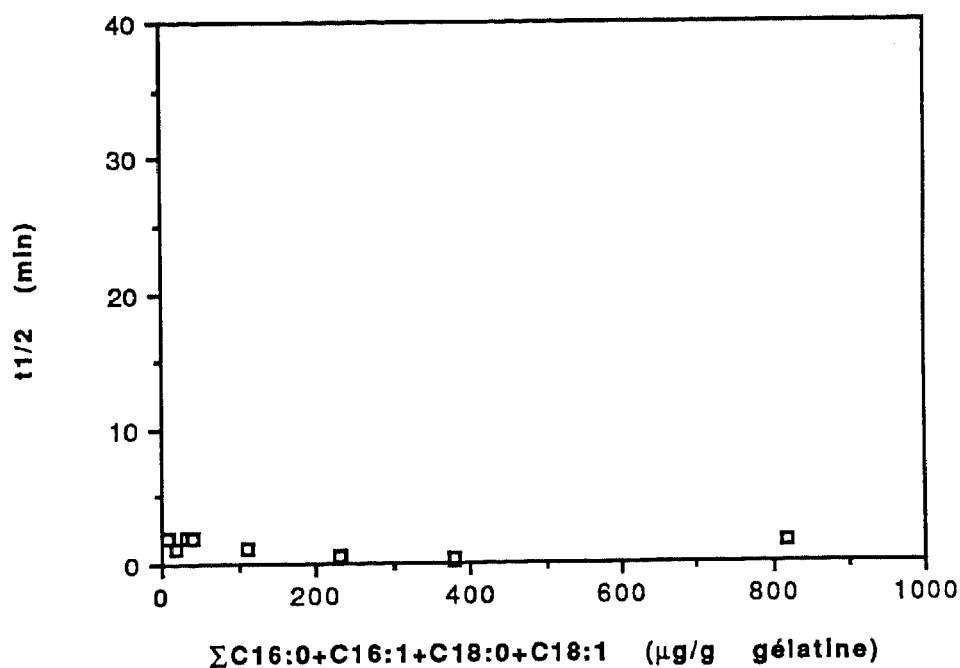


Fig. 3.24. : Gélatines extraites d'os chaulé :

relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la teneur en lipides totaux (somme Σ des acides gras de C16:0    C18:1), $n = 9$.

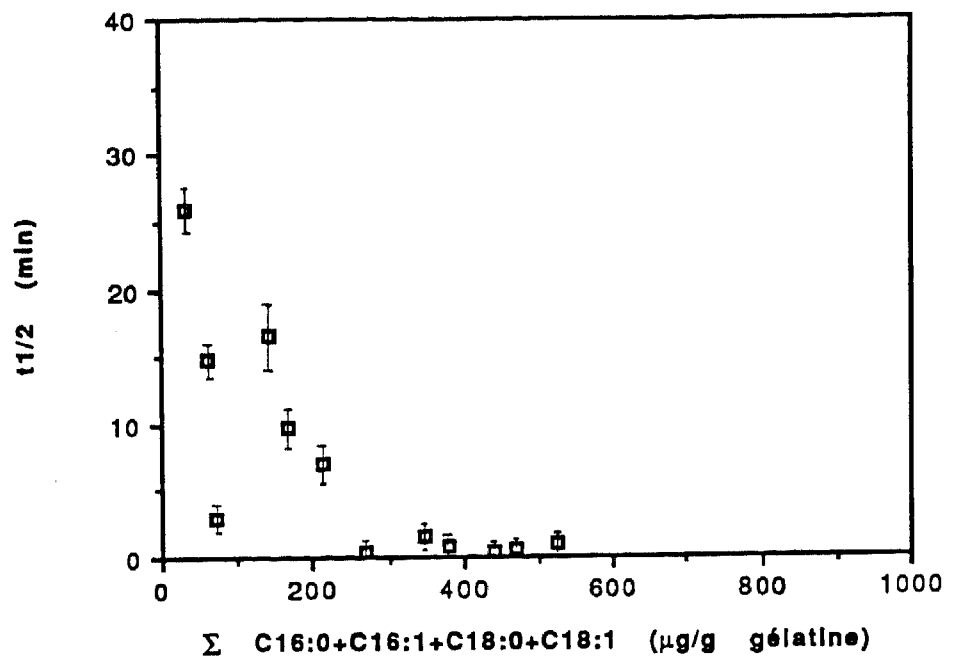


Fig. 3.25. : Gélatines extraites d'os acide :

relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la teneur en lipides totaux (somme Σ des acides gras de C16:0    C18:1), $n = 12$.

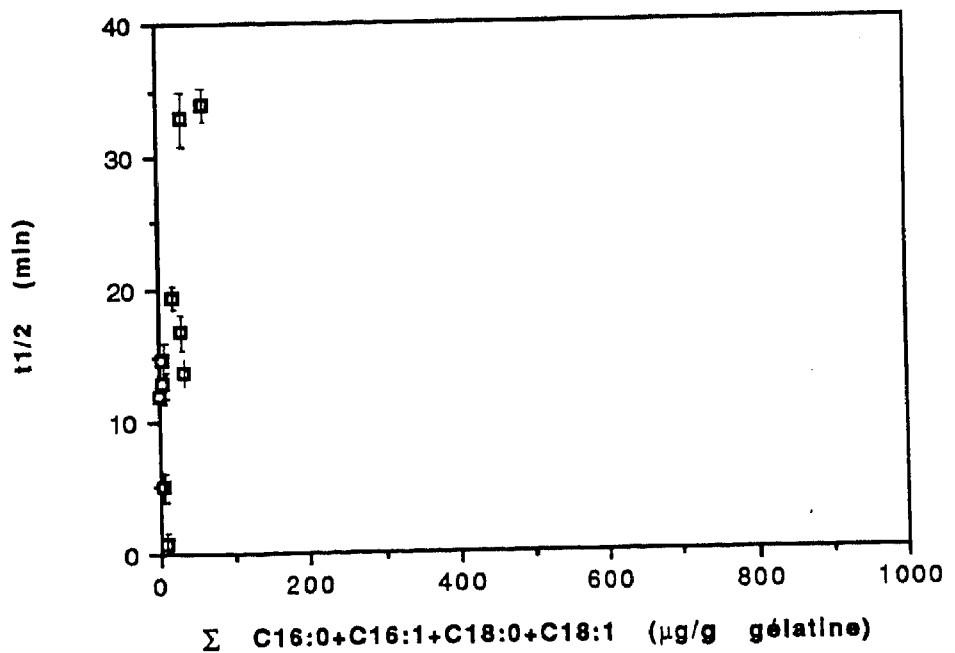


Fig. 3.26.: Gélatines extraites de couenne de porc acide :

relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la teneur en lipides totaux (somme Σ des acides gras de C16:0    C18:1), $n = 11$.

Les résultats obtenus nous permettent de conclure que les gélatines extraites d'os sont beaucoup plus riches en acides gras que les gélatines extraites de peau.

De plus, les mousses stables sont obtenues à partir de solutions de gélatines extraites de couenne de porc acide ou d'os acide, pauvres en lipides. Cependant, la stabilité des mousses préparées à partir de gélatines d'os et de peau chaulée n'est pas influencée par la teneur en acides gras.

2°. Influence de l'ajout de substances anti-mousse sur les propriétés moussantes de la gélatine.

Puisque des mousses stables peuvent être obtenues avec des gélatines issues d'un prétraitement acide et pauvres en lipides, nous avons voulu vérifier l'influence d'ajouts de ces anti-mousses sur les propriétés moussantes. Pour ce faire, nous avons ajouté à des solutions filles d'une solution de gélatine de bonne tenue de mousse, des concentrations croissantes en acide stéarique (acide gras en C18:0) et en asolectine (mélange de phospholipides extraits du soja). Ces lipides ont été incorporés sous forme d'émulsion de lipides dans de l'éthanol (par sonication), de manière à favoriser leur dispersion en phase aqueuse.

Les résultats obtenus sont repris à la Fig. 3.27. Ils montrent que, d'une part, l'ajout de 900 ppm de phospholipides (μg phospholipides/g gélatine) n'influence guère la stabilité de la mousse et, d'autre part, que cette stabilité chute d'environ un tiers lors de l'ajout de 200 ppm d'acide stéarique pour devenir nulle après l'ajout de 1800 ppm.

Il est donc possible de déstabiliser une mousse de gélatine, dont la stabilité perturberait certaines applications industrielles, en y incorporant en quantité adéquate un de ses composés lipidiques tel que l'acide stéarique.

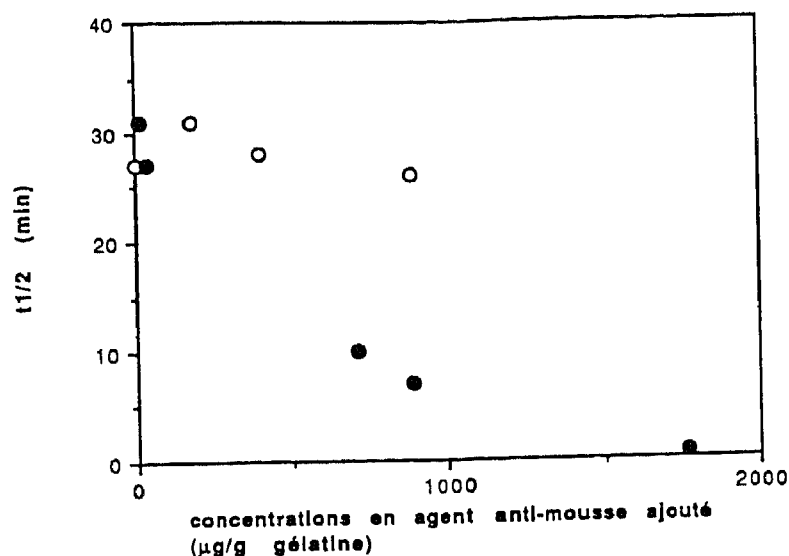


Fig. 3.27. : Influence de l'ajout de concentrations croissantes en asolectine (o) et en acide stéarique (●) sur la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (CPA 3).

3°. Influence de la teneur en phospholipides sur la stabilité de la mousse

Aucune relation n'a pu être dégagée entre la stabilité de la mousse et la teneur en phospholipides (cf. Fig. 3.28.). Bien que nous ne disposions à ce sujet d'aucune données relatives à la mousse de gélatine, nos résultats vont dans le même sens que ceux relatifs à la mousse de bière (cf. § 2.3.4.).

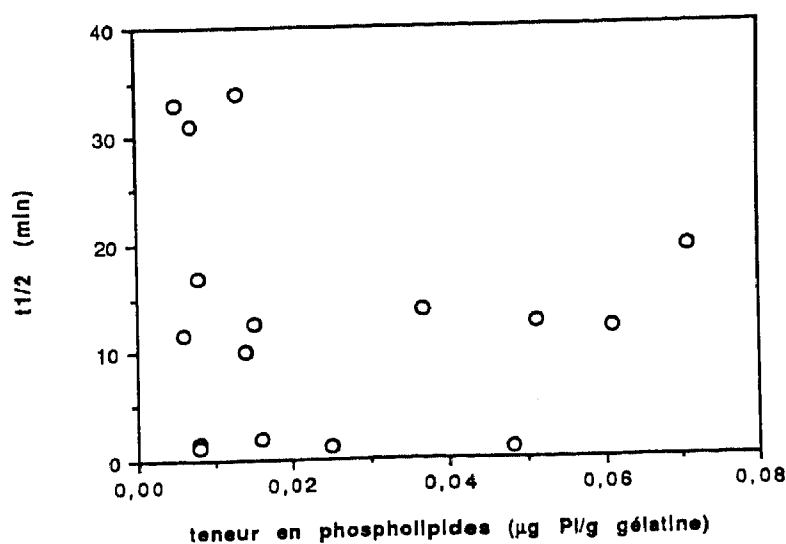


Fig. 3.28.: Relation entre la stabilité de la mousse ($t_{1/2}$) et la teneur en phospholipides (μg de phosphate inorganique P_i / g de gélatine) extraits de gélatine de couenne de porc acide.

3.3.2.4. Influence de la composition du milieu sur la stabilité de la mousse

1°. Relation entre la stabilité de la mousse et la teneur en cations.

Nous avons étudié la relation entre la stabilité de la mousse et la teneur en cations bivalents (quelle que soit leur combinaison) de gélatines extraites de couenne de porc acide (cf. Fig 3.30.). Aucune relation directe entre ces deux paramètres n'a pu être mise en évidence.

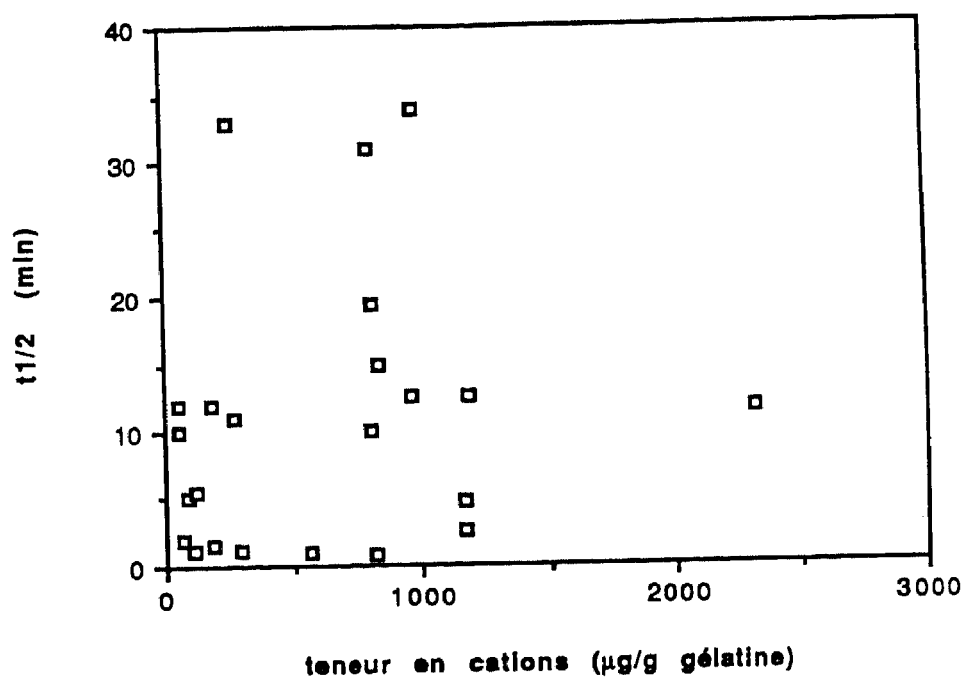


Fig. 3.30. : Relation entre la stabilité de la mousse et la teneur en cations bivalents (somme des teneurs en Ca, Cu, Mg, Fe - teneur exprimée en µg/g de gélatine) de gélatines extraites de couenne de porc acide.

2°. Influence du pH (résultats Kengue Noudem, 1993)

Nous avons comparé le comportement moussant de deux gélatines en fonction du pH (cf. Fig. 3.31) : une gélatine présentant une mousse stable dans les conditions standards (CPA 5) et une gélatine présentant une mousse instable (CPA 4). Ces deux échantillons ont été sélectionnés car leur teneur en cations est équivalente.

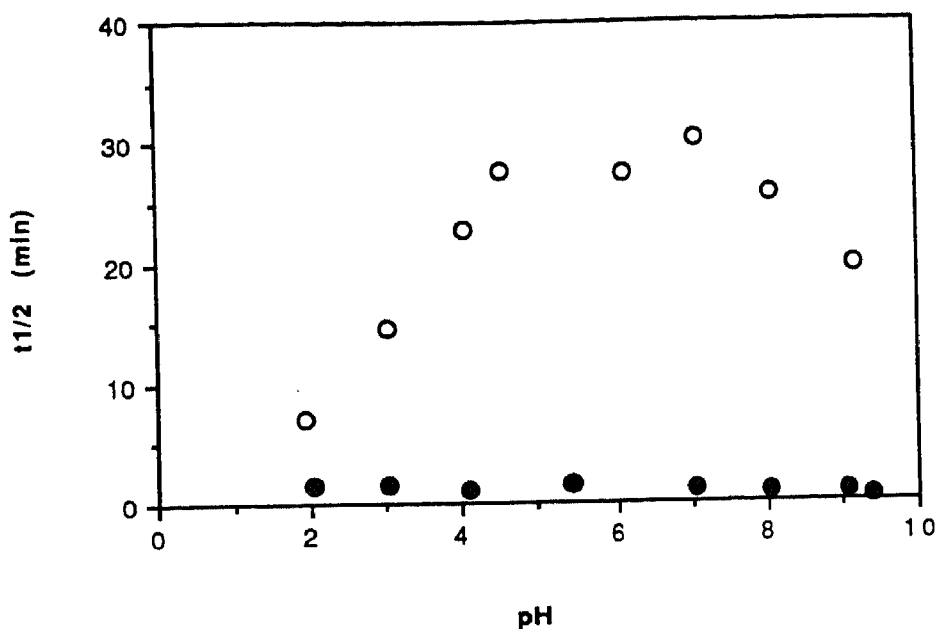


Fig. 3.31. : Influence du pH sur le comportement moussant de deux gélatines extraites de couenne de porc acide (O.: CPA 5 ; ● : CPA 4). Le pH a été ajusté par ajouts de HCl et de NaOH (0,1M).

Le pH joue un rôle important dans la stabilisation de la mousse de gélatine "stable" mais n'améliore en rien la stabilité de la mousse de gélatine "instable". En ce qui concerne l'échantillon CPA 5, la zone de pH la plus favorable à la stabilité de la mousse correspond au pH naturel de la solution.

2°. Influence de l'addition de sel

Nous avons étudié l'influence de l'ajout de sels (NaCl , CaCl_2 , CuCl_2 et Mg Cl_2) sur la stabilité de la mousse des trois gélatines sélectionnées conformément au § 3.3.2.4.- 2° : une de la catégorie "mousse stable" (CPA 5) et deux de la catégorie "mousse instable" (CPA 4 et CPA 10) (cf. Fig. 3.32-3.35).

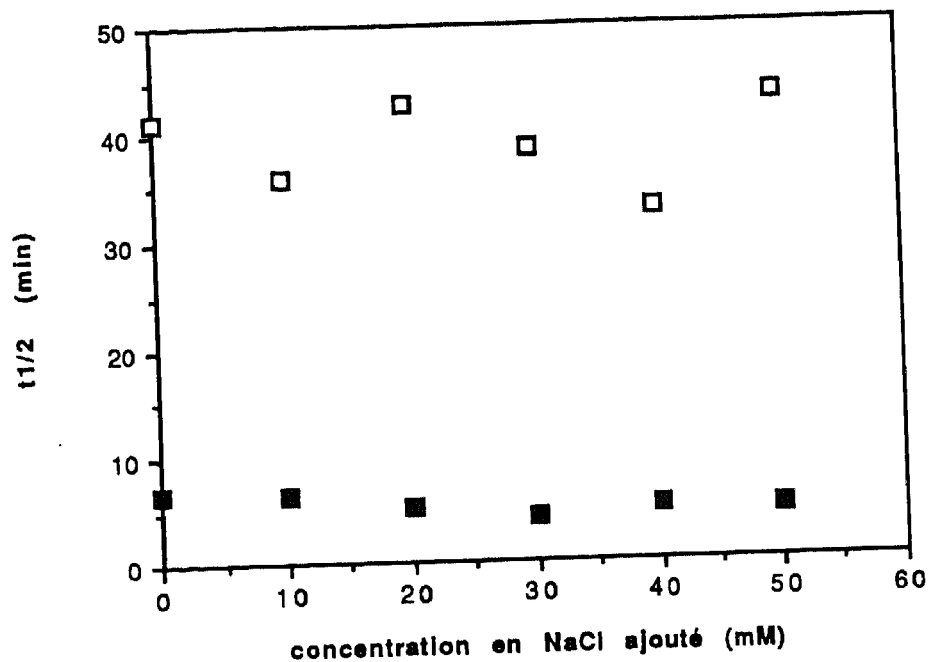


Fig. 3.32. : Influence de l'ajout de NaCl sur la stabilisation de la mousse de deux gélatines extraites de couenne de porc acide (□ : CPA 5 ; ■ : CPA 4).

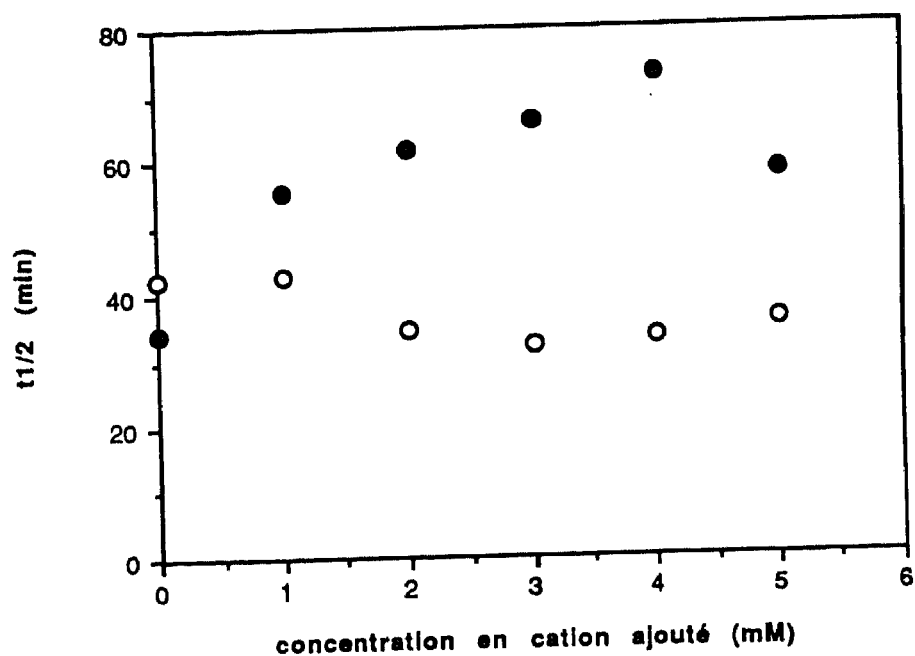


Fig. 3.33 : Influence de l'ajout de cations bivalents (● : Cu⁺⁺, ○ : Ca⁺⁺) sur la stabilisation de la mousse d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (CPA 5 , "mousse stable"). La teneur en Cu intrinsèque est de 0,5 µg / g de gélatine (soit 0,0472 . 10⁻⁴ mM).

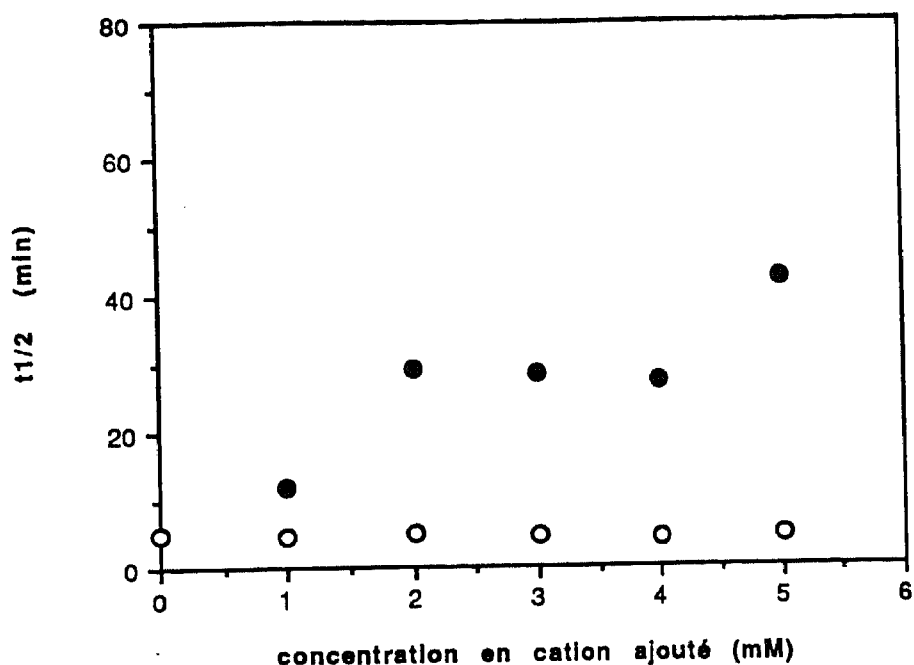


Fig. 3.34 : Influence de l'ajout de cations bivalents (● : Cu^{++} , ○ : Ca^{++}) sur la stabilisation de la mousse d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (CPA 4 , "mousse instable"). La teneur en Cu intrinsèque est de 0,7 $\mu\text{g/g}$ de gélatine (soit $0,0472 \cdot 10^{-4}$ mM en moyenne).

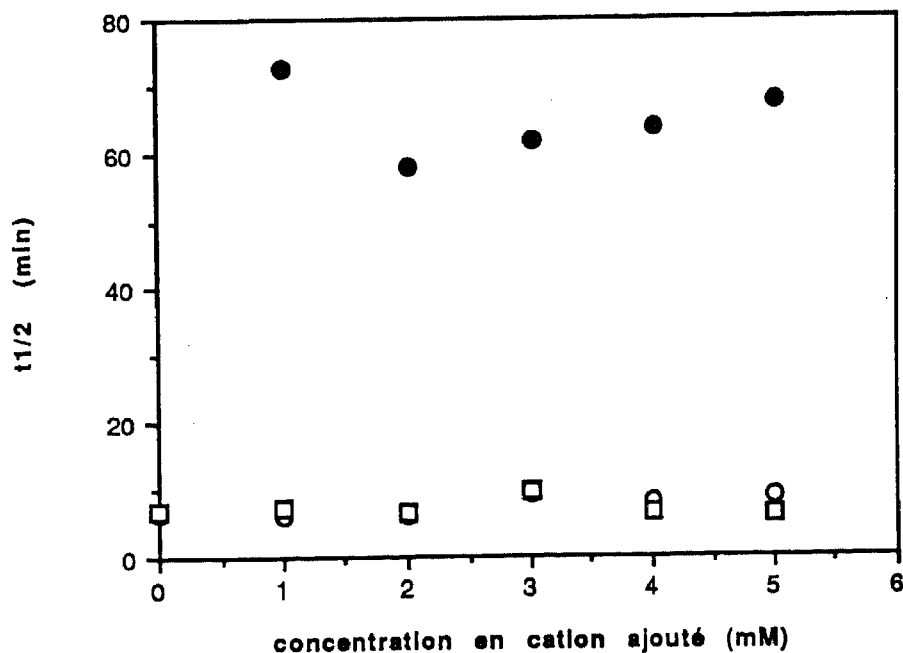


Fig. 3.35 : Influence de l'ajout de cations bivalents (● : Cu^{++} , ○ : Ca^{++} , □ : Mg^{++}) sur la stabilisation de la mousse d'une gélatine extraite de couenne de porc acide (CPA 10 , "mousse instable").

Le cation Na^+ (cf. Fig 3.32) de même que les cations bivalents Ca^{++} et Mg^{++} (cf. Fig. 3.33-3.35) ne montrent pas d'effet significatif sur la stabilité de la mousse des échantillons des deux catégories "mousse stable" et "mousse instable".

Par contre, l'ajout de cuivre sous sa forme bivalente tenderait à améliorer la stabilité de la mousse des échantillons des deux catégories (cf. Fig. 3.33-3.35). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les ions bivalents tels que le cuivre sont capables de former des complexes avec les protéines (du type complexe Cu-protéine dans la méthode de dosage de Lowry et coll., 1951), avec pour effet une augmentation de la viscosité de la lamelle liquide par encombrement stérique.