

Université de Montréal

**Réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique  
par électrophorèse capillaire, chromatographie liquide et spectrométrie de masse**

par

Isabelle Migneault

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade  
de Maître ès science (M. Sc)  
en Chimie

Avril 2004



QD

3

U54

2004

V.014



## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé  
**Réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique  
par électrophorèse capillaire, chromatographie liquide et spectrométrie de masse**

présenté par  
Isabelle Migneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Jeffrey W. Keillor : Président-rapporteur

Pr. Karen C. Waldron : Directrice de recherche

Pr. Michel J. Bertrand : Co-directeur de recherche

Pr. Pierre Thibault : Membre du jury

Mémoire accepté le : 31 / 08 / 04 .....

## SOMMAIRE

La cartographie peptidique est une technique performante permettant de détecter, dans la structure primaire d'une protéine (séquence), les altérations et les modifications post-traductionnelles des acides aminés. Elle se déroule en trois étapes : 1) la protéolyse chimique ou enzymatique, 2) la séparation et 3) l'identification/détection des fragments peptidiques, le tout de façon reproductible. La protéolyse est généralement réalisée avec la trypsine (EC 3.4.21.4), qui est l'enzyme la plus utilisée en cartographie peptidique. La séparation et l'identification/détection des peptides impliquent des techniques de pointe telles que l'électrophorèse capillaire (CZE), la chromatographie liquide (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS), ce qui permet de générer des cartes peptidiques spécifiques des protéines étudiées.

Les protocoles traditionnels de protéolyse, autant dans un gel d'électrophorèse qu'en solution, impliquent la solubilisation de l'enzyme dans un tampon de pH approprié (protéolyse homogène). La protéolyse homogène présente toutefois plusieurs inconvénients tels que des temps d'incubation longs, une perte d'activité catalytique due à l'autolyse de l'enzyme et une utilisation unique de l'enzyme. La protéolyse hétérogène, qui implique des enzymes immobilisées, apporte des avantages économiques et techniques dans le cas de protéines (substrats) dissoutes.

Parmi les différentes méthodes d'immobilisation rapportées dans la littérature, la réticulation des protéines avec le glutaraldéhyde (GA) est celle qui fait l'objet de nos recherches. Ce réactif homobifonctionnel est couramment employé parce qu'il réagit rapidement avec les amines primaires, et donc avec les protéines (enzymes). Nous avons développé une procédure d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec le GA, en étudiant tout d'abord l'influence de différents paramètres de réaction tels que le pH et la force ionique du tampon, la concentration en enzyme et en GA, le rapport enzyme:GA ainsi que le temps de réaction. Des premiers tests de cartographie peptidique par CZE et HPLC ont été effectués avec une protéine standard, la  $\beta$ -caséine, en prenant pour référence les résultats obtenus par protéolyse homogène. De plus, la reproductibilité des deux techniques analytiques (CZE et HPLC) a été évaluée. Puisque l'un des avantages de la protéolyse hétérogène est la réutilisation de l'enzyme, nous avons également testé la reproductibilité de la protéolyse. Les excellents résultats obtenus ont permis d'étendre les

recherches à la caractérisation de la trypsine immobilisée en termes de contenu en enzyme et de paramètres cinétiques. Par la suite, la trypsine immobilisée a été appliquée à la protéolyse de deux autres protéines standards, le lysozyme (protéine de petite taille comportant des ponts disulfures) et l'hémoglobine (protéine volumineuse montrant une structure quaternaire). La spectrométrie de masse a ajouté une nouvelle dimension au travail réalisé en donnant la masse des peptides et une séquence d'acides aminés associée, ce qui a permis la comparaison des performances de la trypsine immobilisée avec la trypsine libre.

*Mots-clés : réticulation, glutaraldéhyde, trypsine, cartographie peptidique, électrophorèse capillaire, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, enzyme immobilisée, protéolyse*

## ABSTRACT

Peptide mapping is a powerful technique that plays an important role in the detection of alterations and post-translational modifications of proteins. It involves three main steps: 1) chemical or enzymatic proteolysis, 2) separation and 3) detection/identification of the peptide fragments in a reproducible manner. The first step is typically carried out using trypsin (EC 3.4.21.4), the most commonly used enzyme for peptide mapping applications. The second and third steps represent the generation of the peptide map, a unique fingerprint, which is generally obtained by state-of-the-art analytical techniques such as capillary electrophoresis (CZE), liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry (MS).

Peptides are usually obtained by the action of soluble trypsin on a protein substrate, either “in-gel” or in solution (homogeneous proteolysis). Both of these homogeneous methods suffer from several drawbacks such as long incubation times, loss of catalytic activity due to enzyme autolysis and one-time use of the enzyme. Heterogeneous proteolysis with immobilized enzymes brings economical and technical advantages for dissolved proteins substrates.

Among the various enzyme immobilization methods reported in the literature, crosslinking with glutaraldehyde (GA) is the subject of this research. GA is a frequently used bifunctional reagent because of its ability to react rapidly with primary amines, and thus with proteins (enzymes). We developed an immobilization protocol for trypsin using GA, by first studying the effect of reaction parameters such as the buffer pH and ionic strength, the enzyme and GA concentrations, the enzyme-to-GA ratio and the reaction time. Peptide mapping tests with  $\beta$ -casein as standard protein were done by CZE and HPLC, using results from homogeneous proteolysis as a reference. The reproducibility of CZE and HPLC as analytical separation techniques was also evaluated. The excellent results obtained led us to extend our study to the characterization of our immobilized trypsin in terms of enzyme content and kinetic parameters. Furthermore, we used the immobilized trypsin for the proteolysis of two other standard proteins, lysozyme and hemoglobin, a small protein with disulfide bridges and a larger protein with quaternary structure, respectively. Mass spectrometry allowed further characterization through the

determination of peptide mass and amino acid sequence, and facilitated the comparison of the performance of our immobilized trypsin with the free trypsin.

*Key words: crosslinking, glutaraldehyde, trypsin, peptide mapping, capillary electrophoresis, liquid chromatography, mass spectrometry, heterogeneous proteolysis, immobilized enzyme*



## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
ABSTRACT .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES FIGURES .....	V
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	VIII
REMERCIEMENTS .....	IX
<b>Chapitre 1 : Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1.    Protéines .....	2
1.2.    Cartographie peptidique .....	3
1.3.    Objectif de l'étude et approche expérimentale .....	4
1.4.    Références .....	5
<b>Chapitre 2 : Théorie .....</b>	<b>6</b>
2.1.    Enzyme et protéolyse.....	7
2.1.1. Trypsine bovine (EC 3.4.21.4) .....	7
2.1.2. Notions d'enzymologie .....	7
2.1.3. Dénaturation des protéines .....	9
2.1.4. Protocoles traditionnels .....	10
2.1.5. Enzymes immobilisées .....	10
2.2.    Techniques d'analyse des fragments peptidiques.....	13
2.2.1. Chromatographie liquide (HPLC) .....	13
2.2.2. Électrophorèse capillaire (CZE) .....	14
2.2.3. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS).....	14
2.3.    Références .....	21
<b>Chapitre 3 : Réactif de réticulation : le glutaraldéhyde (GA).....</b>	<b>25</b>
3.1.    Abstract.....	26
3.2.    Introduction .....	27
3.3.    Chemical behavior of glutaraldehyde in aqueous solution.....	28

3.4.	Application to substances of biological interest.....	32
3.4.1.	Carbohydrates, lipids and nucleic acids .....	32
3.4.2.	Proteins: general case .....	32
3.4.3.	Enzymes .....	39
3.5.	Conclusions .....	44
3.6.	References .....	44
<b>Chapitre 4 : Partie expérimentale.....</b>		<b>50</b>
4.1.	Produits chimiques .....	51
4.2.	Instrumentation.....	51
4.2.1.	Spectrophotométrie d'absorption UV.....	51
4.2.2.	Électrophorèse capillaire .....	52
4.2.3.	Chromatographie liquide.....	53
4.2.4.	Spectrométrie de masse .....	53
4.3.	Procédures .....	53
4.3.1.	Immobilisation de la trypsine par réticulation avec le GA.....	53
4.3.2.	Protéolyse en solution (homogène) .....	54
4.3.3.	Protéolyse en phase solide (hétérogène).....	55
4.4.	Références .....	55
<b>Chapitre 5 : Étude des conditions d'immobilisation .....</b>		<b>56</b>
5.1.	Généralités.....	57
5.2.	pH et force ionique .....	58
5.3.	Rapport trypsine:GA .....	61
5.4.	Température, durée et arrêt de la réaction .....	62
5.5.	Procédure d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA .....	62
5.6.	Rendement d'immobilisation .....	63
5.7.	Utilisation de la trypsine immobilisée.....	71
5.7.1.	Reproductibilité des analyses .....	73
5.7.2.	Reproductibilité de la protéolyse.....	74
5.8.	Références .....	76

<b>Chapitre 6 : Applications de la trypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde (GA)</b> .....	<b>80</b>
6.1. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry .....	82
6.1.1. Summary.....	82
6.1.2. Introduction .....	83
6.1.3. Materials and methods.....	84
6.1.4. Results and discussion.....	89
6.1.5. Concluding remarks.....	103
6.1.6. References .....	104
6.2. Lysozyme peptide mapping by capillary zone electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry to compare trypsin immobilized by two glutaraldehyde-based methods .....	107
6.2.1. Abstract.....	107
6.2.2. Introduction .....	107
6.2.3. Materials and methods.....	109
6.2.4. Results and discussion.....	112
6.2.5. Concluding remarks.....	123
6.2.6. References .....	124
<b>Chapitre 7 : Conclusion</b> .....	<b>127</b>
7.1. Problématique.....	128
7.2. Bilan .....	128
7.3. Perspectives .....	130
Annexe A. Les 20 acides aminés naturels .....	133
Annexe B. Exemples d'agents de clivage enzymatiques et chimiques .....	137
Annexe C. Structures primaires des protéines utilisées.....	139
Annexe D. Différentes matrices MALDI pour l'analyse des protéines et des peptides....	142
Annexe E. Recherche dans les bases de données (ProFound v.4.10.5).....	144
Références des Annexes .....	146

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 5.1.</b> Conditions d'immobilisation disponibles au début du projet.....	58
<b>Tableau 5.2.</b> Effet du pH sur la précipitation de la trypsine par réaction avec GA.....	59
<b>Tableau 5.3.</b> Reproductibilité des temps de migration en CZE pour la cartographie peptidique de la $\beta$ -caséine native.....	73
<b>Tableau 5.4.</b> Conditions expérimentales développées lors de l'étude.....	76
<b>Table 6.1.1.</b> Immobilization efficiency and trypsin loading for immobilized trypsin preparations .....	89
<b>Table 6.1.2.</b> Kinetic parameters for free and immobilized trypsin preparations .....	91
<b>Table 6.1.3.</b> Reproducibility of CZE migration times for peptide maps of the same human HbA tryptic digest .....	95
<b>Table 6.1.4.</b> Chemically denaturated human HbA ( $\alpha$ -chain) peptides from free, crosslinked and CPG-linked trypsin digests .....	99
<b>Table 6.1.5.</b> Chemically denaturated human HbA ( $\beta$ -chain) peptides from free, crosslinked and CPG-linked trypsin digests .....	100
<b>Table 6.1.6.</b> Comparison of human HbA sequence coverages identified by Profound v. 4.10.5 .....	102
<b>Table 6.2.1.</b> MALDI mass data for chemically denaturated lysozyme peptides from free trypsin, GA-crosslinked trypsin and CPG-GA-trypsin digests .....	120
<b>Table 6.2.2.</b> Comparison of lysozyme sequence coverages identified by Profound v. 4.10.5 .....	122

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1.</b> Anémie à hématies falciformes .....	3
<b>Figure 1.2.</b> Principales étapes de la cartographie peptidique.....	4
<b>Figure 2.1.</b> Détermination graphique des paramètres $K_M$ et $V_{max}$ à partir de l'équation de Lineweaver-Burk .....	8
<b>Figure 2.2.</b> Classification des méthodes d'immobilisation.....	11
<b>Figure 2.3.</b> Structure du glutaraldéhyde .....	13
<b>Figure 2.4.</b> Cartographie peptidique de masse.....	15
<b>Figure 2.5.</b> Principales matrices MALDI pour l'analyse des protéines et des peptides .....	16
<b>Figure 2.6.</b> Mécanisme du processus MALDI.....	17
<b>Figure 2.7.</b> Analyseur à temps de vol (TOF).....	18
<b>Figure 3.1.</b> Summary of the possible forms of glutaraldehyde in aqueous solution .....	33
<b>Figure 3.2.</b> Schiff base (1) and Michael-type (2) reactions of glutaraldehyde with proteins .....	34
<b>Figure 3.3.</b> Crosslinking of proteins with glutaraldehyde giving a quaternary pyridinium compound .....	35
<b>Figure 3.4.</b> Reaction of dimeric cyclic glutaraldehyde with proteins under basic conditions .....	36
<b>Figure 3.5.</b> Reactions of glutaraldehyde with proteins under acidic or neutral conditions	37
<b>Figure 3.6.</b> Reaction of polymeric glutaraldehyde with proteins under basic conditions ..	37
<b>Figure 5.1.</b> Influence du ratio enzyme:GA sur la formation d'un produit insoluble dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8.....	61
<b>Figure 5.2.</b> Absorptivité molaire des chromophores (Phe, Tyr et Trp) dans les protéines.	64
<b>Figure 5.3.</b> Spectres d'absorption de la trypsine (—) et du glutaraldéhyde (----) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8.....	64
<b>Figure 5.4.</b> Réaction des aldéhydes avec le cuivre .....	65
<b>Figure 5.5.</b> Spectres de dérivée d'une bande d'absorbance gaussienne .....	67
<b>Figure 5.6.</b> Effet de la largeur de la bande (spectre d'absorption) sur l'amplitude de la dérivée .....	68

- Figure 5.7.** Spectres de 4<sup>e</sup> dérivée de la trypsine (—) et du glutaraldéhyde (----) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8..... 69
- Figure 5.8.** Droites d'étalonnage direct de la trypsine dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8, à trois longueurs d'onde : 284.8 nm (■), 288.1 nm (●) et 291.4 nm (▲). Les équations des droites sont respectivement :  $y = 4.94 \cdot 10^{-5}x - 5.60 \cdot 10^{-7}$ ,  $R^2 : 0.984$ ;  $y = 7.63 \cdot 10^{-5}x - 5.35 \cdot 10^{-7}$ ,  $R^2 : 0.997$ ;  $y = 7.23 \cdot 10^{-5}x - 1.81 \cdot 10^{-6}$ ,  $R^2 : 0.998$ . ..... 70
- Figure 5.9.** Superposition des spectres de 4<sup>e</sup> dérivée de la trypsine (—), du glutaraldéhyde (----) et du surnageant de réaction après immobilisation (—) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8..... 70
- Figure 5.10.** Carte peptidique par CZE de la protéolyse homogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8, pendant 24 h, à 37 °C et avec un rapport enzyme:substrat de 1:25. Les conditions de séparations sont celles décrites dans la partie expérimentale, Chap. 4, section 4.2.2..... 72
- Figure 5.11.** Carte peptidique par CZE de la protéolyse hétérogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8, pendant 2 h, à 37 °C. Les conditions de séparations sont celles décrites à la Fig 5.10. .... 72
- Figure 5.12.** Blanc de protéolyse hétérogène et, en médaillon, la trypsine soluble (solution fraîche), séparées dans les conditions de séparation de la Fig. 5.10..... 74
- Figure 5.13.** Reproductibilité de la protéolyse hétérogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL). Les conditions de protéolyse et de séparation des peptides sont identiques à celles de la Fig. 5.11. .... 75
- Figure 6.1.** Immobilisation de la trypsine avec GA, par liaison covalente sur CPG et par réticulation..... 81
- Figure 6.1.1.** Effect of pH on the relative enzymatic activity for free trypsin (■), GA-crosslinked trypsin (▲) and CPG-GA-trypsin (○). ..... 93
- Figure 6.1.2.** CZE peptide map of denaturated human hemoglobin (2 mg/mL) obtained after a 24-h digestion with free trypsin (enzyme:substrate = 1:25). The separation was carried out in 50 mM phosphate buffer, pH 2.5, at 15 kV..... 94
- Figure 6.1.3.** Peptide maps showing the digestion reproducibility associated with the two immobilization techniques for three separate aliquots of denaturated hemoglobin

(2 mg/mL) digested by a given batch of immobilized trypsin: (A) CZE maps using CPG-GA-trypsin, (B) CZE maps using GA-crosslinked trypsin. CZE separations were carried out sequentially under the conditions described in Fig. 6.1.2. .... 97

**Figure 6.2.1.** Electropherograms showing the peptide maps of chemically denatured lysozyme (2 mg/mL) obtained by (A) a 24 h digestion with free trypsin (enzyme:substrate = 1:25); (B) a 2 h solid-phase digestion with GA-crosslinked trypsin; (C) a 2 h solid-phase digestion with CPG-GA-trypsin. The three separations were carried out on the same day. .... 114

**Figure 6.2.2.** Chromatograms showing the peptide maps of the same three samples described in Fig. 6.2.1: (A) a 24 h digestion with free trypsin; (B) a 2 h solid-phase digestion with GA-crosslinked trypsin; (C) a 2 h solid-phase digestion with CPG-GA-trypsin. .... 116

**Figure 6.2.3.** Peptide maps showing the digestion reproducibility associated with the two immobilization techniques for 3 separate aliquots of lysozyme digested by a given batch of immobilized trypsin. (A) CZE maps using GA-crosslinked trypsin; (B) CZE maps using CPG-GA-trypsin; (C) HPLC maps using GA-crosslinked trypsin; (D) HPLC maps using CPG-GA-trypsin. .... 118

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

BAEE	Ester d'éthyle de benzoyl- <i>L</i> -arginine (Benzoyl- <i>L</i> -Arginine Ethyl Ester)
BCA	Méthode à l'acide bicinchoninique
$\alpha$ -CHCA	Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
CPG	Particules de verre poreux (Controlled pore glass)
CPG-GA-trypsin	Trypsine immobilisée avec le glutaraldéhyde sur des particules de verre poreux
CZE	Électrophorèse capillaire (Capillary zone electrophoresis)
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
Da	Dalton
DTT	Dithiothréitol
GA	Glutaraldéhyde
GA-crosslinked trypsin	Trypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (High performance liquid chromatography)
IAM	Iodoacétamide
$m/z$	Rapport masse sur charge
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
SA	Acide sinapinique
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodécylsulfate de sodium)
MS	Spectrométrie de masse (Mass spectrometry)
TAME	Ester de méthyle de <i>N</i> - $\alpha$ <i>p</i> -Tosyl- <i>L</i> -arginine ( <i>N</i> - $\alpha$ <i>p</i> -Tosyl- <i>L</i> -arginine methyl ester)
TFA	Acide trifluoroacétique
TOF	Temps de vol (Time of flight)
TPCK	L-1-Tosylamide-2-phénylméthylchlorométhyle cétone (L-1-Tosylamide-2-phenylmethylchloromethyl ketone )
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
UV	Ultraviolet



## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été financé par le Fonds FCAR (Fonds pour la Formation de chercheurs et l'aide à la recherche), aujourd'hui connu sous le nom de Fonds FRNT (Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies), et par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). Il a également été soutenu par la Commission permanente de coopération franco-québécoise 2003-2004, avec l'appui du ministère des Relations internationales du Québec et du ministère des Affaires étrangères de France (Consulat général de France à Québec).

J'aimerais remercier le Fonds FCAR, la Banque Nationale du Canada, le Département de Chimie et la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour les bourses qu'ils m'ont octroyées. J'aimerais également remercier ma directrice de recherche, le professeur Karen C. Waldron, pour son support scientifique et sa disponibilité, et mon co-directeur de recherche, le professeur Michel J. Bertrand, pour la liberté qu'il m'a accordée pour mener à terme ce projet. Je remercie le professeur William Lubell et les membres de son groupe de recherche, qui m'ont permis d'utiliser leur système chromatographique. Je remercie également le professeur Jean Rossier et toute l'équipe de spectrométrie de masse de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles (ESPCI) de Paris, qui m'ont accueillie pendant deux mois dans leur laboratoire.

Merci aux membres du groupe Waldron (Jean-Louis, Jean-François, Carl, Obayda et Michael), et plus particulièrement Catherine Dartiguenave, pour son soutien moral et scientifique, mais également pour la belle collaboration développée. Merci aux techniciens de l'atelier mécanique et électronique, en particulier Julien et Louis, et aux techniciens du laboratoire d'enseignement, Clément et Sylvie.

Je tiens à remercier ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Enfin, je remercie particulièrement Dominic, sans qui je n'aurais pas pu passer au travers de ces trois ans, pour sa patience, ses conseils, ses encouragements et sa confiance en moi.

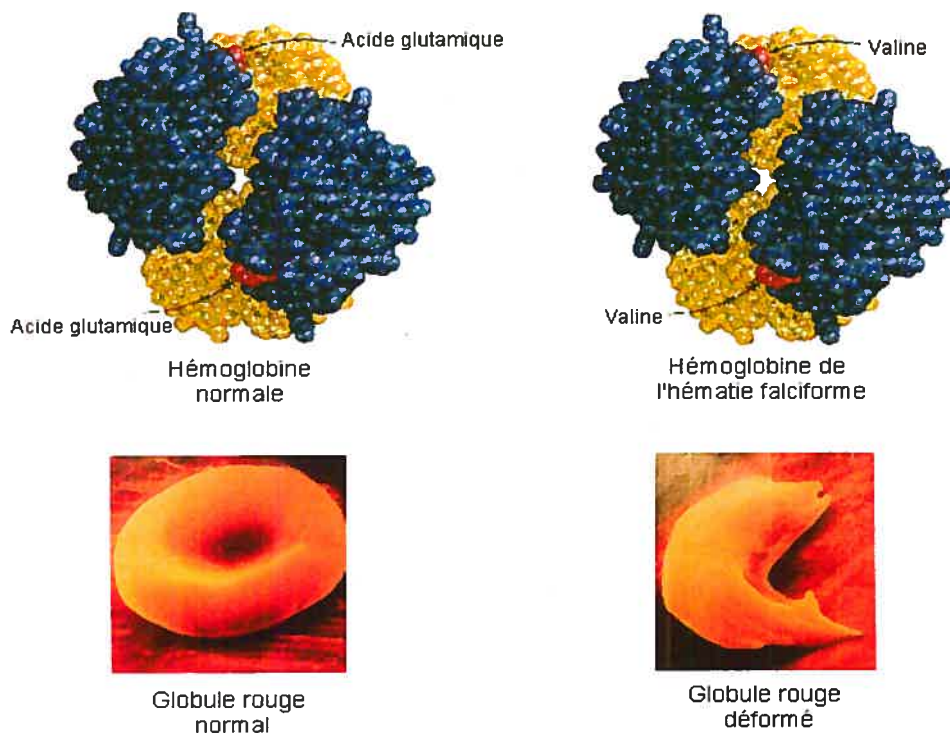
# **Chapitre 1**

## **Introduction**

## 1.1. Protéines

Les protéines constituent un groupe important et complexe de molécules biologiques qui jouent des rôles aussi diversifiés que vitaux chez les organismes vivants. En effet, elles remplissent différentes fonctions telles que le soutien (collagène et élastine), la mise en réserve d'acides aminés (ovalbumine et caséine), le transport de substances (albumine et hémoglobine), la régulation hormonale (insuline), la réception de substances (protéines membranaires), le mouvement (actine et myosine), l'immunité (lysozyme) et la catalyse (trypsine) [1]. C'est probablement en raison de cette omniprésence, mais également grâce au développement de techniques analytiques performantes telles que l'électrophorèse capillaire (CZE), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrométrie de masse (MS), que l'étude des protéines est un domaine de recherche en pleine effervescence.

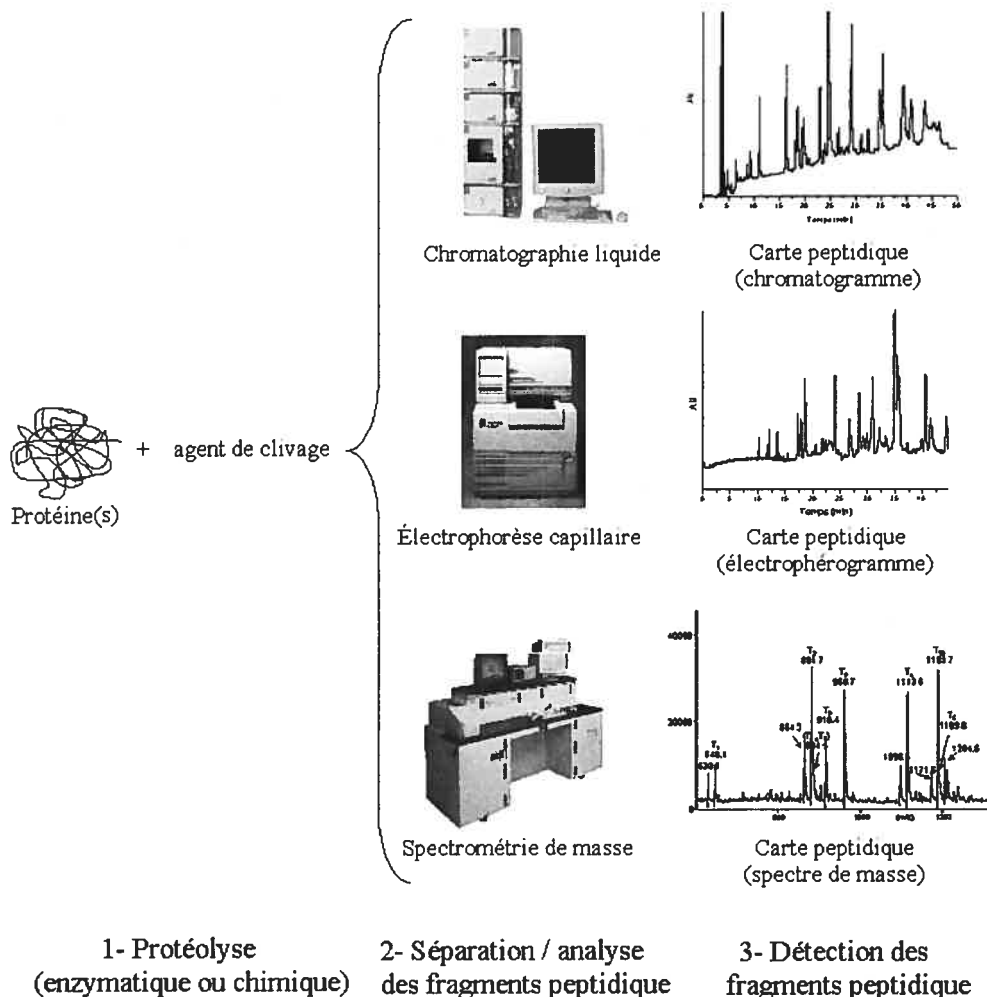
L'organisation structurale d'une protéine se subdivise en quatre niveaux : primaire (séquence unique d'acides aminés, ces derniers étant présentés à l'annexe A), secondaire (interaction entre des acides aminés situés à proximité, par le biais de ponts hydrogène et d'attractions électrostatiques), tertiaire (arrangement tridimensionnel d'une chaîne polypeptidique engendré par des interactions entre acides aminés éloignés) et quaternaire (interactions non-covalentes entre plusieurs chaînes polypeptidiques, appelées sous-unités monomériques). Les interactions entre les chaînes latérales des acides aminés sont essentielles pour promouvoir ou restreindre certaines conformations. Une simple modification de la structure primaire d'une protéine peut donc engendrer des modifications conformationnelles importantes et affecter son aptitude à remplir sa fonction dans les processus biologiques. Par exemple, l'anémie à hématies falciformes est causée par la substitution d'un seul acide aminé (Glu) par un autre (Val) dans la séquence de l'hémoglobine [2-4]. Cette mutation se traduit par une agglutination des globules rouges en raison de l'apparition d'un résidu hydrophobe à la surface de la protéine, ce qui occasionne une diminution de sa capacité de transport de l'oxygène (Fig. 1.1).



**Figure 1.1.** Anémie à hématies falciformes [5, 6]

### 1.1. Cartographie peptidique

La cartographie peptidique est l'une des plus importantes techniques utilisées pour la caractérisation structurale des protéines, autant pour détecter des altérations de la séquence d'acides aminés que des modifications post-traductionnelles [7, 8]. Elle est essentiellement qualitative et comparative, et elle se déroule en trois étapes présentées à la Fig. 1.2. La première étape est la protéolyse, qui consiste à générer des peptides à l'aide de différents agents enzymatiques [9, 10] ou chimiques [11, 12] tels que ceux présentés à l'annexe B. Les protocoles traditionnels de protéolyse utilisent des enzymes spécifiques sous forme soluble comme la trypsine, mais l'utilisation de ces enzymes sous forme immobilisée offrent plusieurs avantages tels que la réutilisation de l'enzyme et la réduction de l'autolyse, le tout en conservant une partie de l'activité catalytique.



**Figure 1.2.** Principales étapes de la cartographie peptidique [13-15]

## 1.2. Objectif de l'étude et approche expérimentale

Le présent travail de recherche vise à développer une méthode d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec le glutaraldéhyde (GA) pour la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire (CZE), chromatographie liquide (HPLC) et spectrométrie de masse (MS). Le point de départ de cette recherche consiste à évaluer l'effet de différents paramètres réactionnels sur l'immobilisation de l'enzyme, et ce, afin de déterminer des conditions de réaction favorables pour l'obtention d'un biocatalyseur actif. L'étape suivante implique la caractérisation du produit immobilisé, son utilisation pour la cartographie peptidique de protéines standards et la comparaison des cartes obtenues avec celles générées par la méthode traditionnelle utilisant l'enzyme soluble.

L'approche utilisée se subdivise en trois parties principales :

- a) une revue de la littérature, sous forme d'article scientifique, traitant du réactif d'immobilisation, le glutaraldéhyde (GA) (Chap. 3), suivie d'une partie expérimentale décrivant les réactifs et les méthodes utilisées (Chap. 4);
- b) la recherche de conditions favorables pour la préparation de la trypsine immobilisée et les premiers essais de cartographie peptidique d'une protéine standard, la  $\beta$ -caséine, par CZE et HPLC (Chap. 5);
- c) deux articles, soumis à des journaux scientifiques, qui comparent deux techniques d'immobilisation de la trypsine (réticulation avec GA et la fixation sur des particules de verre poreux) pour la cartographie peptidique.

La théorie des techniques analytiques et cinétiques utilisées durant cette étude est présentée au Chap. 2.

#### 1.4. Références

- [1] Campbell, N. A. *Biologie*; ERPI: St-Laurent (QC), 1995.
- [2] Hunt, J. A.; Ingram, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *28*, 546-549.
- [3] Ingram, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *28*, 539-545.
- [4] Ingram, V. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *36*, 402-411.
- [5] <http://www.biochem.uclac.uk/bsm/valdarprograms/pdb.defineface.html>.
- [6] <http://www.sicklecellfoundationalberta.org>.
- [7] Hancock, W. S.; Bishop, C. A.; Prestidge, R. L.; M.T.W., H. *Anal. Biochem.* **1978**, *89*, 203-212.
- [8] Garnick, R. L. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *76*, 117-130.
- [9] Geisow, M. J.; Beaven, G. H. *Biochem. J.* **1977**, *161*, 619-625.
- [10] Tarr, G. E.; Crabb, J. W. *Anal. Biochem.* **1983**, *131*, 99-107.
- [11] Gross, E. In *Methods Enzymol.*; Hirs, C. H. W., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1967; Vol. XI, pp 238-255.
- [12] Degani, Y.; Patchornik, A. *Biochemistry* **1974**, *13*, 1-11.
- [13] <http://www.appliedbiosystems.com>.
- [14] <http://www.beckman.com>.
- [15] <http://www.labmakers.com>.

## **Chapitre 2**

### **Théorie**

## 2.1. Enzyme et protéolyse

### 2.1.1. Trypsine bovine (EC 3.4.21.4)

La trypsine (EC 3.4.21.4), un membre de la famille des protéases à sérine, est l'enzyme la plus utilisée en cartographie peptidique. Son utilisation massive est motivée par son haut degré de spécificité pour les résidus Arg et Lys (clivage en C-terminal), sa grande activité spécifique, son coût relativement faible et une disponibilité commerciale à divers degrés de pureté [1, 2]. En effet, la trypsine commerciale contient généralement de faibles quantités de chymotrypsine, une enzyme qui peut générer des clivages autres qu'en C-terminal des résidus Arg et Lys. Toutefois, l'ajout d'un inhibiteur de l'activité chymotryptique appelé TPCK (L-1-Tosylamide-2-phénylméthylchlorométhyle cétone) permet de limiter le nombre de clivages autres que tryptiques [2]. Par ailleurs, comme la plupart des protéines renferment environ 10% de résidus Arg et Lys [3], la protéolyse tryptique libère des fragments de taille raisonnable pour les analyses subséquentes, soit en moyenne 10 acides aminés [4, 5]. De plus, les peptides formés sont chargés positivement, ce qui facilite leur déplacement en CZE et leur détection en spectrométrie de masse.

### 2.1.2. Notions d'enzymologie

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui augmentent la vitesse des réactions chimiques. Une enzyme qui fonctionne normalement se combine à son substrat et le transforme en produit, lequel est ensuite libéré afin que l'enzyme retrouve sa structure libre. La vitesse d'exécution de cet enchaînement dépend de l'augmentation de la concentration du produit et de la diminution de la concentration du substrat, alors que la concentration de l'enzyme demeure constante. La mesure de ces variations, en fonction du temps, sert à déterminer une vitesse de réaction. Les principaux concepts d'enzymologie sont présentés ici et pour une explication plus détaillée, se rapporter à Copeland [6].

La caractérisation cinétique des enzymes repose principalement sur la relation entre la vitesse initiale, c'est-à-dire la vitesse avant l'accumulation du produit (normalement moins de 10%), et la concentration en substrat. L'équation 1, appelée équation de Michaelis-Menten, est une description quantitative de cette relation.

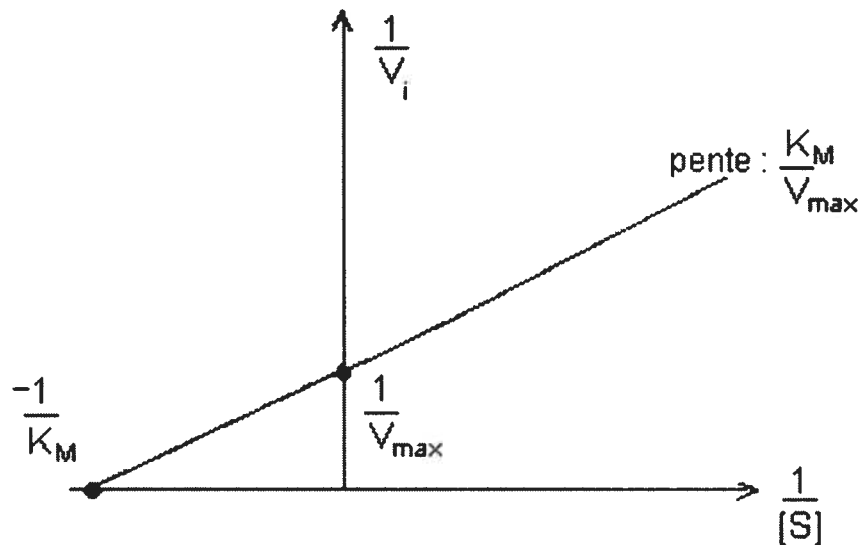


$$v_i = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Éq.1})$$

où  $v_i$  est la vitesse initiale de la réaction enzymatique ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ),  $[S]$  est la concentration en substrat ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),  $V_{\max}$  est la vitesse maximale de réaction ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) et  $K_M$  est la constante de Michaelis-Menten ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ). La transformation linéaire de l'équation 1, obtenue en prenant la réciproque des deux membres de cette équation, donne l'équation 2, connue sous le nom d'équation de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{Éq.2})$$

La représentation graphique de l'équation 2, où les valeurs de  $1/v_i$  sont représentées en fonction de celles de  $1/[S]$ , est une droite qui permet de déterminer les valeurs numériques de  $K_M$  et  $V_{\max}$  (Fig. 2.1).



**Figure 2.1.** Détermination graphique des paramètres  $K_M$  et  $V_{\max}$  à partir de l'équation de Lineweaver-Burk

$V_{\max}$  représente la vitesse maximale de la réaction, qui est atteinte lorsqu'il y a saturation de l'enzyme par le substrat, et  $K_M$  est défini comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale. La valeur de  $K_M$ , qui dépend principalement de l'enzyme, de son environnement et des conditions de réaction, est d'autant plus basse que l'enzyme est active et permet d'estimer l'affinité de

celle-ci pour son substrat. L'activité catalytique d'une enzyme est la propriété mesurée par l'augmentation de la vitesse de conversion d'une réaction chimique donnée, et ce, dans des conditions précises [7, 8]. Généralement, une unité international d'activité enzymatique (U) correspond à la transformation catalytique d'une micromole de substrat en produit par minute, dans des conditions définies (pH, force ionique, température). Les substrats les plus utilisés pour déterminer l'activité catalytique de la trypsine sont TAME (ester de méthyle de *N*- $\alpha$ -*p*-Tosyl-L-arginine) et BAEE (ester d'éthyle de benzoyl-L-arginine) puisque ce sont de petites molécules chromogénique dont la structure ressemble à celle d'un peptide. L'activité catalytique spécifique correspond à l'activité catalytique rapportée à la masse de protéine utilisée (U TAME ou BAEE/mg de protéine). L'équation 3 permet de calculer l'activité catalytique spécifique à partir des mesures expérimentales.

$$\text{Activité catalytique spécifique} = \frac{\Delta A \times V \times 10^6}{\varepsilon \times l \times \Delta t \times m} \quad (\text{Éq.3})$$

où  $\Delta A$  est la variation d'absorbance de la solution,  $\varepsilon$  est le coefficient d'absorptivité molaire ( $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $l$  est le parcours optique (cm),  $\Delta t$  est l'intervalle de temps (min),  $V$  est le volume de réaction (mL) et  $m$  est la quantité de protéine utilisée (mg).

### 2.1.3. Dénaturation des protéines

Il est reconnu que l'efficacité de la protéolyse (enzymatique ou chimique) est améliorée par une dénaturation préalable de la protéine. En effet, certaines des liaisons peptidiques peuvent être inaccessibles en raison d'un encombrement stérique causé par les structures secondaire, tertiaire ou quaternaire des protéines. L'ajout d'agents chaotropiques tels que l'urée permet de « déplier » la protéine avant la protéolyse. De plus, le risque de modifications non souhaitées est réduit au minimum lorsque que les ponts disulfures, formés entre deux résidus Cys, subissent une réduction [9]. Celle-ci est généralement effectuée avec un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT). Par la suite, à l'aide de réactifs classiques comme l'iodoacétamide (IAM), une étape de S-carbamidométhylation des résidus Cys permet de prévenir le repliement et l'agrégation de la protéine, ce qui empêche les ponts disulfures de se reformer.

#### 2.1.4. Protocoles traditionnels

Les protocoles traditionnels de protéolyse, autant dans en solution que dans un gel d'électrophorèse, impliquent l'utilisation de la trypsine solubilisée dans le milieu de réaction (protéolyse homogène). La protéolyse en solution fait généralement intervenir un rapport enzyme:protéine qui peut varier de 1:20 à 1:200 (m/m). L'utilisation de quantités minimales d'enzyme ou le recours à une enzyme dont les résidus Lys sont modifiés permettent de limiter l'autolyse de l'enzyme. L'enzyme peut également être ajoutée en plusieurs fois afin de conserver une activité catalytique élevée. L'acidification (pH <4) est la façon la plus pratique d'arrêter la protéolyse puisqu'elle permet d'ajuster le pH de l'échantillon pour les analyses subséquentes par HPLC ou CZE, tout en augmentant la solubilité des peptides [2].

La protéolyse peut être réalisée directement dans les bandes de gel lorsque des protéines sont séparées par électrophorèse sur gel mono- ou bidimensionnel [10-14]. Les bandes de gels sont d'abord lavées pour éliminer les colorants de visualisation des protéines et les tensioactifs de dénaturation. Les protéines présentes dans ces bandes sont ensuite réduites et alkylées. La trypsine est ensuite ajoutée en excès, contrairement à la protéolyse en solution, puisque l'efficacité de la digestion repose sur la quantité d'enzyme qui pénètre dans la matrice de gel [15]. L'arrêt de la protéolyse et la récupération des peptides sont effectués par contraction du gel à l'aide de solvants organiques comme l'acétonitrile.

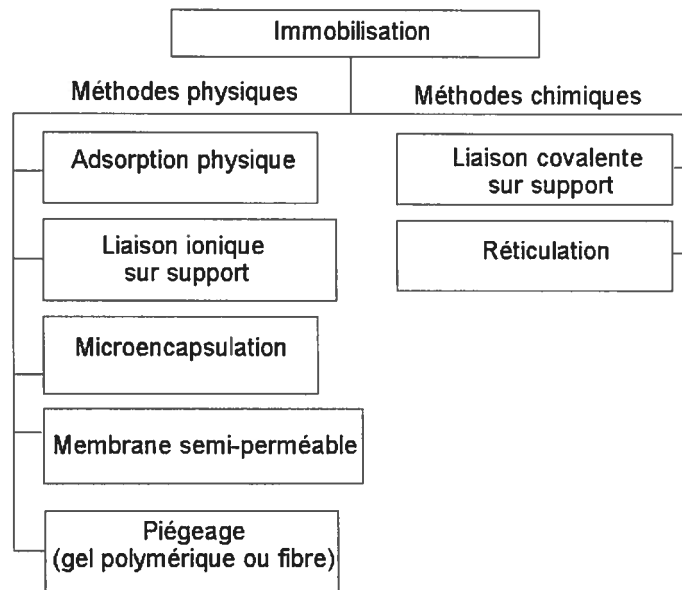
#### 2.1.5. Enzymes immobilisées

Les applications pratiques de la trypsine en milieu homogène sont limitées en raison de l'instabilité intrinsèque de l'enzyme, qui se traduit par l'autolyse. En effet, l'autolyse contribue à réduire l'activité catalytique de l'enzyme tout en ajoutant au lysat des peptides issus de l'enzyme, donc non reliés à la protéine étudiée [5], d'où une complication de l'interprétation des cartes peptidiques et une possibilité de suppression ionique en spectrométrie de masse. De plus, que ce soit lors des digestions dans des gels ou en solution, l'enzyme ne peut être réutilisée. L'immobilisation des enzymes et leur utilisation en milieu hétérogène représentent donc une alternative intéressante.

L'immobilisation d'une enzyme consiste en une restriction de ses mouvements par confinement dans une phase distincte. Ce confinement permet tout de même à l'enzyme

d'échanger avec le milieu réactionnel contenant le substrat puisque celle-ci conserve une fraction variable de son activité catalytique [16]. En 1916, Nelson et Griffin [17] ont été parmi les premiers à immobiliser une enzyme, la  $\beta$ -D-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26), par adsorption sur du charbon. Depuis ce temps, la popularité des enzymes immobilisées n'a cessé d'augmenter [18], et elles trouvent maintenant des applications dans divers domaines, notamment l'alimentation et la chimie industrielle. Elles offrent de nombreux avantages comparativement aux enzymes libres [3, 16] : (i) réduction du temps de protéolyse, (ii) récupération facile de l'enzyme par filtration ou centrifugation, (iii) réduction des coûts car possibilité de réutilisation, (iv) dans certains cas, stabilisation de l'enzyme; (v) simplification des cartes peptidiques et (vi) possibilité d'automatisation et de couplage avec des techniques de séparation.

Plusieurs méthodes d'immobilisation sont rapportées dans la littérature, et celles-ci peuvent être classées de différentes façons [16, 19, 20]. Le système de classification présenté à la Fig. 2.2 repose sur le type de liaison impliqué lors de l'immobilisation [19].



**Figure 2.2.** Classification des méthodes d'immobilisation

Cette classification sépare les méthodes d'immobilisation en deux grandes catégories : les méthodes physiques et les méthodes chimiques. Les méthodes physiques sont celles qui localisent une enzyme sans faire appel à la formation d'un lien covalent. Elles regroupent des techniques basées sur des forces physiques telles l'adsorption, la liaison ionique, la

microencapsulation et le piégeage (matrice polymérique ou fibre). L'immobilisation par adsorption fait intervenir des liaisons hydrogène et des forces d'attraction ou d'interaction hydrophobes/hydrophiles de van der Waals. Elle est possible sur des supports comme l'alumine, le gel de silice, le charbon activé ou les billes de verre. L'immobilisation par liaison ionique implique l'utilisation de résines échangeuses d'ions. Quant à la microencapsulation, elle consiste en la formation de capsules (nylon, alginate de sodium, *etc.*) dans une solution contenant l'enzyme à immobiliser. Le piégeage dans une matrice de gel, comme le polyacrylamide, se produit lorsque la polymérisation de l'acrylamide est faite en présence de l'enzyme en solution. L'enzyme se trouve alors emprisonnée dans le réseau polymérique. La préparation d'enzymes immobilisées par des méthodes physiques est généralement simple et l'activité enzymatique est peu altérée. Ces méthodes résultent en des liaisons relativement faibles, ce qui implique que les conditions de digestion (pH et force ionique) doivent être très bien contrôlées afin de limiter le relargage de l'enzyme lors de son utilisation.

Les méthodes chimiques sont celles qui engendrent la formation d'au moins un lien covalent entre les groupements fonctionnels des résidus d'une enzyme et un support fonctionnalisé insoluble dans l'eau (liaison covalente sur support) ou entre deux molécules d'enzyme (réticulation). Différents groupements peuvent participer à des liaisons covalentes tels les groupements amines, carboxyles, sulfhydryles, hydroxyles, imidazoles, phénols, thiols et indole. L'établissement de liaisons covalentes se traduit par une rigidification de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, et une rigidification trop importante peut conduire à une perte totale d'efficacité car un certain degré de plasticité est nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme [21, 22]. Cependant, lorsque l'enzyme est immobilisée avec succès de manière chimique, la stabilité opérationnelle du produit obtenu est élevée en raison de la force des liens entre les molécules d'enzyme ou avec le support [3, 21].

La réticulation, c'est-à-dire le pontage covalent à l'aide d'un réactif bi- ou polyfonctionnel, est la méthode chimique utilisée pour immobiliser la trypsine dans cette recherche. Parmi les nombreux réactifs de réticulation rapportés dans la littérature [19, 23], le glutaraldéhyde (GA) est le réactif homobifonctionnel (Fig. 2.3) le plus largement utilisé [19, 21, 24-26].



**Figure 2.3.** Structure du glutaraldéhyde

La popularité du GA est liée à sa grande réactivité avec les amines primaires, et donc avec les protéines [27]. Il permet d'obtenir des structures tridimensionnelles (agrégats) de très hautes masses moléculaires qui sont insolubles dans l'eau. L'avantage le plus important de cette méthode d'immobilisation réside dans le fait qu'elle ne nécessite qu'un seul réactif et que le produit immobilisé est presque entièrement constitué de l'enzyme [19], contrairement aux méthodes d'immobilisation impliquant un support.

## 2.2. Techniques d'analyse des fragments peptidiques

La chromatographie liquide (HPLC) et l'électrophorèse capillaire (CZE) sont deux techniques de séparation dites « orthogonales ». En effet, elles permettent de séparer des mélanges complexes, tels que ceux obtenus par protéolyse tryptique, selon deux mécanismes différents : (i) la partition, basée sur l'hydrophobicité, en HPLC et (ii) la mobilité électrophorétique, basée sur la charge et la masse, en CZE.

### 2.2.1. Chromatographie liquide (HPLC)

Le pairage d'ions est une technique chromatographique qui s'avère utile pour la séparation d'analytes ionisés ou ionisables, comme les peptides et les protéines, par chromatographie liquide à polarité de phase inversée [28]. L'agent de pairage a trois fonctions : (i) éliminer l'ionisation des groupements silanols résiduels de la phase stationnaire, (ii) ajuster le pH de la phase mobile et contrôler la charge des analytes et (iii) interagir avec les analytes pour améliorer la séparation. L'acide trifluoroacétique (TFA) est le plus utilisé en raison de sa grande volatilité, de son  $pK_a$  approprié et de sa faible absorbance aux longueurs d'onde de détection [29]. Par ailleurs, un modificateur organique tel que l'acétonitrile est également ajouté à la phase mobile afin d'ajuster sa force éluante. La plus grande partie de la surface des peptides et des protéines est exposée à la phase mobile, tandis que le reste de la molécule, appelé le « pied hydrophobe », interagit avec la phase stationnaire. Pour qu'il y ait élution, la concentration en modificateur organique doit

atteindre une valeur critique, cette valeur étant intimement liée à la composition du « pied hydrophobe ». En conséquence, une très légère modification de la séquence primaire, par exemple la substitution ou la modification d'un seul acide aminé, pourra induire une différence au point de vue chromatographique.

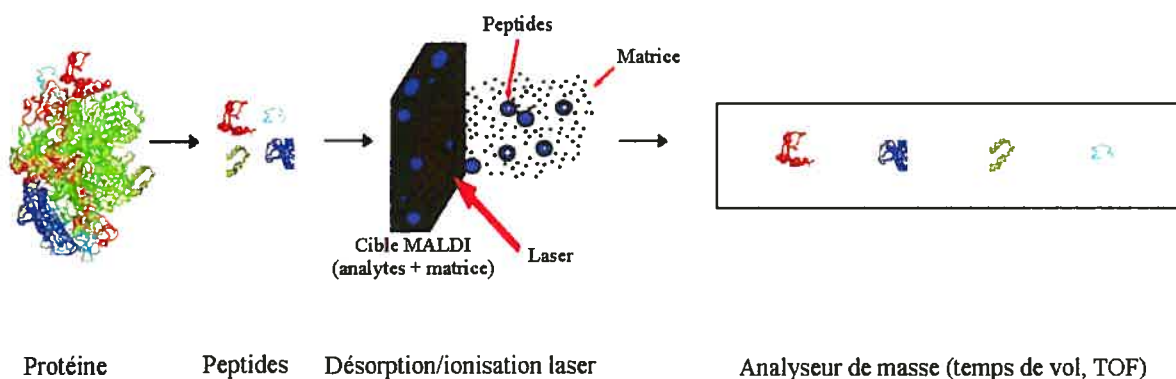
### 2.2.2. Électrophorèse capillaire (CZE)

À l'heure actuelle, l'électrophorèse capillaire (CZE) constitue l'une des techniques les plus performantes pour la séparation d'analytes chargés. Elle est très utilisée en cartographie peptidique en raison de ses nombreux avantages : (i) grande efficacité de séparation, (ii) faible consommation de solvant et d'échantillon et (iii) compatibilité avec les échantillons biologiques [30-32]. De plus, c'est une technique versatile puisqu'un simple changement de la composition du tampon permet de modifier la sélectivité de manière significative. Cependant, l'une des limitations de la CZE est sa faible limite de détection en concentration comparativement à ce qui est obtenu en HPLC, et ce, avec un détecteur UV-Vis. Celle-ci résulte des dimensions des capillaires qui restreignent le parcours optique et la capacité de charge du système. Par ailleurs, à des pH intermédiaires (entre 6 et 8), l'adsorption des peptides et des protéines sur les parois d'un capillaire non traité est un phénomène bien connu qui peut entraîner des problèmes de variabilité des temps de migration et d'élargissement des pics. Nous avons donc choisi d'utiliser un tampon préparé à partir d'un sel de phosphate de sodium monobasique, à bas pH (pH 2.5), ce qui permettait de minimiser l'interaction des peptides cationiques avec la paroi du capillaire [33-35], d'où l'obtention de bonnes séparations par CZE.

### 2.2.3. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS)

#### 2.2.3.1. *Cartographie peptidique de masse*

Depuis quelques années, la spectrométrie de masse est devenue une approche quasi incontournable pour l'étude structurale des biomolécules telles que les peptides et les protéines. La cartographie peptidique de masse, introduite par plusieurs groupes de recherche en 1993 [36, 37, 38, 39], combine la protéolyse enzymatique et l'analyse des peptides par spectrométrie de masse, le plus souvent par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à un analyseur à temps de vol (MALDI-TOF/MS) (Fig. 2.4).



**Figure 2.4.** Cartographie peptidique de masse [40, 41]

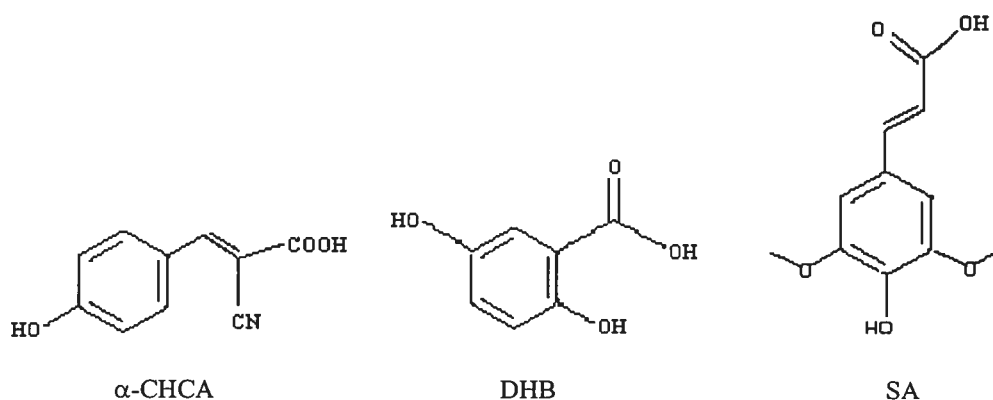
### 2.2.3.1. Technique MALDI

L'ionisation par MALDI a été développée à la fin des années 1980, parallèlement en Allemagne (Karas et Hillenkamp [42, 43]) et au Japon (Tanaka *et al.* [44]), respectivement. Cette technique a rapidement gagné en popularité en raison de sa simplicité d'utilisation et d'interprétation spectrale, sa grande sensibilité, sa faible consommation d'échantillon et sa tolérance à des quantités modérées de sels, détergents et autres additifs communs [45, 46]. La technique MALDI utilise généralement un faisceau laser pulsé à l'azote (337 nm) pour désorber et ioniser un mélange matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. La qualité du spectre de masse dépend de plusieurs facteurs tels que le choix de la matrice et sa préparation (pH et solvant), la présence de détergents, d'agents de réduction/alkylation ou de sels inorganiques, le mode de dépôt, le pH de l'échantillon et des caractéristiques propres aux analytes comme la charge, l'hydrophobicité et la solubilité) [47-49].

La matrice utilisée pour les analyses par MALDI-TOF/MS joue plusieurs rôles [50]: (i) absorber l'énergie du laser, réduisant ainsi le risque de décomposition des analytes, (ii) favoriser l'ionisation par photoexcitation ou photoionisation des molécules de matrice, suivie par un transfert de proton aux molécules de l'analyte et (iii) diluer et isoler les molécules d'analyte afin de prévenir la formation de complexes. Les composés sélectionnés comme matrice sont souvent des acides organiques (composés organiques polaires) puisque ceux-ci sont capables de co-désorber et d'engendrer l'ionisation des analytes par transfert de charge. De plus, ils doivent être de faible masse moléculaire, et ce,



dans le but de minimiser les interférences parce que l'ionisation par MALDI est généralement appliquée à des analytes de haute masse moléculaire comme les polymères et les biopolymères (les protéines et les peptides, par exemple). Les longueurs d'onde des lasers disponibles commercialement limitent aussi le nombre de composés qui peuvent servir de matrice. Les matrices les plus connues sont l'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide sinapinique (SA), dont les structures sont représentées à la Fig. 2.5. Une liste plus complète des matrices utilisées pour l'analyse des peptides et des protéines est présentée à l'annexe D.



**Figure 2.5.** Principales matrices MALDI pour l'analyse des protéines et des peptides

Actuellement, le mécanisme exact de la conversion d'énergie et de la désorption/ionisation des analytes dans par MALDI n'est pas clairement élucidé. Toutefois, le mécanisme global généralement accepté [51] est celui présenté à la Fig. 2.6.

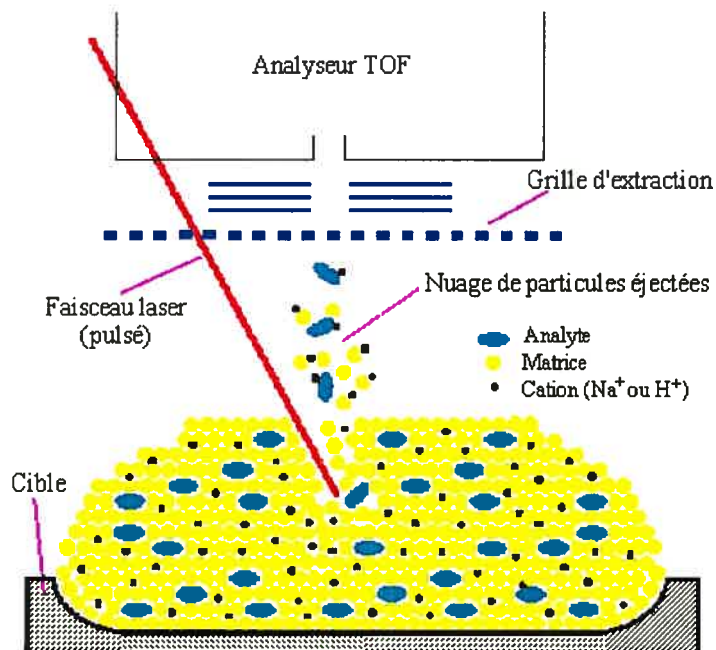


Figure 2.6. Mécanisme du processus MALDI [52]

Le mélange matrice/échantillon est habituellement constitué d'une faible concentration en échantillon ( $10^{-4}$  à  $10^{-7}$ M) et d'une concentration élevée en matrice ( $10^{-1}$ M), le tout déposé sur une cible métallique [53]. L'énergie du faisceau laser est absorbée par le mélange matrice/échantillon, qui subit alors une expansion rapide en phase gazeuse. L'ionisation des molécules d'analyte se produit majoritairement par transfert de proton entre la matrice et l'échantillon, soit avant désorption dans la phase solide, soit après désorption lors de collisions dans le nuage en expansion. L'origine des protons a été récemment étudiée par Wong *et al.* [54]. Selon les auteurs, les protons labiles de la matrice (H des groupements carboxyliques ou hydroxyliques), du solvant, voire de l'échantillon lui-même, ainsi que les protons non labiles de la matrice seraient impliqués. Les ions ainsi formés peuvent être mono- ou multichargés, mais les ions monochargés de type  $[M+H]^+$  sont généralement les plus abondants avec le mode de détection d'ions positifs. Ces ions sont accélérés dans le tube de vol par un champ électrique appliqué entre la plaque porte-échantillon et la grille d'extraction (tension accélératrice 10-25 kV).

### 2.2.3.3. Analyseur à temps de vol (TOF)

La source MALDI est généralement couplée à un analyseur à temps de vol (TOF), qui est bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser. En effet, l'ionisation MALDI tend à produire des ions de rapports  $m/z$  élevés, et l'analyseur TOF n'a pas, en théorie, de limite maximale de masse. De plus, il permet une acquisition rapide des données. L'analyseur TOF sépare les ions en fonction de leur vitesse de déplacement dans un tube de vol (Fig. 2.7).

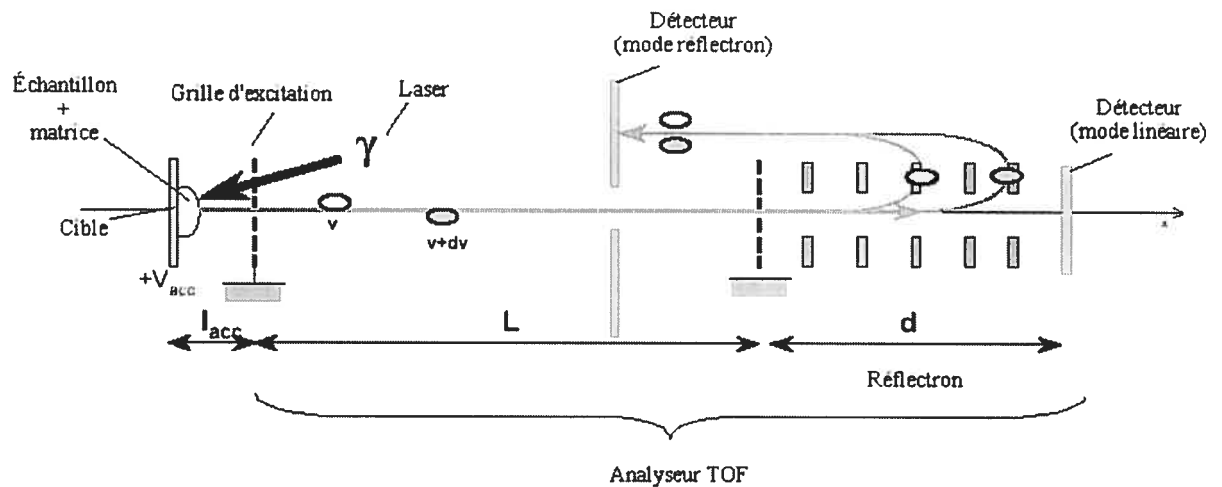


Figure 2.7. Analyseur à temps de vol (TOF) [55]

La configuration de base de l'analyseur TOF est le mode linéaire. Par un processus appelé extraction, les ions sont soumis à un champ électrique ( $V_{acc}$ ) et subissent une accélération sur une distance précise ( $l_{acc}$ ), ce qui leur confère une énergie cinétique donnée. Ils pénètrent ensuite dans une zone libre de champ, appelée tube de vol, d'une longueur ( $L$ ) de 1 à 3 m. La séparation des ions dans le tube de vol s'effectue en fonction de la vitesse acquise dans la zone d'accélération, avant d'atteindre le détecteur placé à l'autre extrémité du tube de vol. Le temps écoulé entre la formation des ions et leur arrivée au détecteur est proportionnel à la racine carrée de leur rapport  $m/z$ , ce qui signifie que les ions de petit rapport  $m/z$  atteignent le détecteur avant ceux de rapport  $m/z$  plus grand.

En théorie, tous les ions de même rapport  $m/z$  devraient atteindre le détecteur au même moment. Toutefois, la nature complexe de l'ionisation MALDI donne lieu à des distributions spatiales et cinétiques relativement importantes, ce qui limite le pouvoir de résolution d'un analyseur TOF en mode linéaire [56, 57]. L'application du réflectron,

initialement développé par Mamyrin en 1973 [58], à l'analyseur TOF a permis d'améliorer significativement les performances de ce dernier puisqu'il permet de compenser, du moins en partie, pour la distribution d'énergie cinétique. L'effet global du réflectron consiste en une focalisation temporelle de tous les ions de même rapport  $m/z$  qui avaient initialement des énergies cinétiques différentes. Le réflectron est principalement constitué d'un miroir électrostatique qui génère un champ électrique de direction opposée à la progression des ions. Les ions font donc demi-tour et sortent du réflectron avec une vitesse longitudinale dont la direction est opposée à celle de leur vitesse initiale. Un ion plus énergétique pénétrera plus profondément dans le réflectron, ce qui se traduira par un ralentissement plus important de cet ion comparativement à un ion moins énergétique. La résolution a aussi été améliorée par le développement de la technique d'extraction retardée (*delayed extraction*, DE) [59-61], c'est-à-dire l'introduction d'un délai (50 à 250 ns) entre la fin de la génération des ions par désorption/ionisation et le début de l'application du voltage d'extraction. Cette technique permet aussi de réduire les pertes d'énergie et la fragmentation engendrées par les collisions entre les analytes ionisés et le reste du nuage de particules éjectées.

#### 2.2.3.4. Dépôt de l'échantillon

La présence et l'intensité du signal généré lors de l'analyse des peptides et des protéines en MALDI sont fortement dépendantes du mode de dépôt de l'échantillon sur la cible [62]. Plusieurs modes de dépôt ont été développés : la goutte séchée (*dried-droplet method*) [42, 43], la cristallisation lente (*slow crystallisation method*) [47], la cristallisation rapide (*fast crystallisation*) [63] et l'évaporation rapide (*fast evaporation*) [12, 64]. Parmi ceux-ci, la méthode par goutte séchée, qui a été utilisée dans ce travail, est l'une des plus répandue en raison de sa simplicité et de sa tolérance modérée aux contaminants non volatils. Brièvement, elle consiste à mélanger l'échantillon avec une solution saturée de matrice constituée habituellement d'acide trifluoroacétique, d'eau et d'acétonitrile, dans un rapport 1:1, à en déposer environ 1  $\mu\text{L}$  sur une cible métallique et à laisser sécher pendant quelques minutes.

#### 2.2.3.5. Préparation des échantillons

En plus du choix de la matrice et du mode de dépôt de l'échantillon, l'environnement chimique des analytes est d'une grande importance. En effet, la présence de quantités importantes de détergents (SDS, urée, *etc.*), d'agents de réduction/alkylation (DTT, mercaptoéthanol, IAM) et d'ions inorganiques issus du tampon de digestion (phosphate, sodium, *etc.*) peut nuire à la cristallisation, et donc au processus de désorption/ionisation. Une étape préliminaire de dessalage peut alors s'avérer essentielle. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des minicolonnes [65] contenant du matériel d'extraction en phase solide. Par ailleurs, Millipore (Bedford, MA) a développé une technique de micropurification des échantillons à partir d'embouts de pipette contenant du matériel chromatographique en phase inverse (Zip Tip<sup>®</sup>) [66]. Des étapes de lavage permettent d'éliminer les composés indésirables tandis que les peptides, initialement retenus par la phase stationnaire, sont élués à l'aide d'acétonitrile et de TFA aqueux. Cette technique offre plusieurs avantages, et c'est la raison pour laquelle elle a été utilisée dans ce travail pour tous nos échantillons. En effet, comme les peptides sont fortement retenus par la phase stationnaire, il y a peu de perte d'échantillon. De plus, l'élution des peptides ne requiert que de très petits volumes de solvant, soit entre 1 et 10  $\mu\text{L}$ , ce qui permet de préconcentrer l'échantillon et d'augmenter la sensibilité des analyses MALDI.

#### 2.2.3.6. Recherche dans les bases de données

Le principe de l'identification d'une protéine par cartographie peptidique de masse, dans le cas d'un échantillon relativement homogène et ne contenant que peu de protéines (< 3), repose sur la comparaison d'une liste de masses expérimentales avec des masses théoriques contenues dans une base de données et associées à des protéines. D'autres informations sur la protéine (espèce, masse moléculaire, point isoélectrique, *etc.*) peuvent aussi être ajoutées pour diminuer le nombre de candidats. Par ailleurs, l'introduction du réflectron et de l'extraction retardée permet aujourd'hui de déterminer avec une grande exactitude (5-100 ppm) la masse des peptides, ce qui se traduit par une identification fiable d'une protéine par MALDI-TOF/MS [67, 68]. Jensen *et al.* [69] ont suggéré qu'un minimum de 5 peptides dont l'écart-type sur les masses des peptides ne dépassait pas 50 ppm et une couverture de séquence de 15% représentaient des critères valables pour l'identification d'une protéine.

Différents programmes informatiques accessibles sur le web, tels que Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>), MOWSE [39], ProFound [70] ([http://prowl.rockefeller.edu/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe)) et Mascot [71] ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF)), ont été conçus pour comparer les masses expérimentales avec les masses théoriques des bases de données. Fenyö [72] a publié un article de revue traitant des différents programmes pour la recherche dans les bases de données protéiques et de la façon d'évaluer la qualité des résultats obtenus.

### 2.3. Références

- [1] Croft, L. R. *Handbook of Protein Sequence Analysis: A Compilation of Amino Acid Sequences of Proteins with an Introduction to the Methodology*, 2 éd.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1980.
- [2] Hoff, E. R.; Chloupek, R. C. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 51-68.
- [3] Wiseman, A. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2 éd.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1985.
- [4] Haschemeyer, R. H.; Haschemeyer, E. V. *Proteins - A Guide to Study by Physical and Chemical Methods*; John Wiley & Sons: New York (NY), 1973.
- [5] Liebler, D. C. *Introduction to Proteomics. Tools for the New Biology*; Humana Press Inc.: Totowa (NJ), 2002.
- [6] Copeland, R. A. *Enzymes. A Practical Approach to Structure, Mechanism, and Data Analysis*; VCH Publishers inc.: New York (NY), 1996.
- [7] NC-IUB *Eur. J. Biochem.* **1979**, *97*, 319-320.
- [8] NC-IUB *Eur. J. Biochem.* **1979**, *104 Suppl. 1*, 1-4.
- [9] Lundblad, R. L.; Noyes, C. M. *Chemical Reagents for Protein Modification*; CRC Press: Boca Raton (FL), 1984.
- [10] Rosenfeld, J.; Capdevielle, J.; Guillemot, J. C.; Ferrera, P. *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 173-179.
- [11] Jenö, P.; Mini, T.; Moes, S.; Hintermann, E.; Horst, M. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 75-82.
- [12] Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850-858.

- [13] Jensen, O. N.; Wilm, M.; Shevchenko, A.; Mann, M. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *112*, 571-588.
- [14] Gevaert, K.; Vandekerckhove, J. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1145-1154.
- [15] Michalski, W. P.; Shiell, B. J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *383*, 27-46.
- [16] Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S. In *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*; Scouten, W. H., Ed.; John Wiley & Sons: New York (NY), 1983; Vol. 66, pp 253-391.
- [17] Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Amer. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 1109-1115.
- [18] Katchalski-Katzir, E. *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*, 471-478.
- [19] Zaborsky, O. R. *Immobilized Enzymes*; CRC Press: Cleveland (OH), 1973.
- [20] Tischer, W.; Kasche, V. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 326-335.
- [21] Monsan, P. In *Les Enzymes : Production et Utilisations Industrielles*; Durand, G., Monsan, P., Eds.; Gauthiers-Villars Bordas: Paris, 1982, pp 80-118.
- [22] Feeney, R. E.; Withaker, J. R. *Adv. Cereal Sci. Technol.* **1988**, *IX*, 21-43.
- [23] Silman, I.; Katchalski, E. *Annu. Rev. Biochem.* **1966**, *35*, 873-908.
- [24] Weetall, H. H. *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*; Marcel Dekker: New York (NY), 1975.
- [25] Walt, D. R.; Agayn, V. *Trends Anal. Chem.* **1994**, *13*, 425-430.
- [26] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: San Diego (CA), 1996.
- [27] Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y.; Okada, H. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 100-105.
- [28] Cunico, R. L.; Gooding, K. M.; Wehr, T. *Basic HPLC and CE of Biomolecules*; Bay Bioanalytical Laboratory: Richmond (CA), 1998.
- [29] Aguilar, M.-I.; Hearn, M. T. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part A, pp 3-26.
- [30] Chang, H.-T.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2947-2951.
- [31] Licklider, L.; Kuhr, W. G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4400-4407.
- [32] Shear, J. B.; Okerberg, E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1610-1613.
- [33] Rickard, E. C.; Towns, J. K. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 237-264.

- [34] Capelli, L.; Stoyanov, A. V.; Wajcman, H.; Righetti, P. G. *J. Chromatogr. A* **1997**, *791*, 313-322.
- [35] Messana, I.; Rossetti, D. V.; Cassiano, L.; Misiti, F.; Giardina, B.; Castagnola, M. *J. Chromatogr. B* **1997**, *699*, 149-171.
- [36] Henzel, W. J.; Billeci, T. M.; Stults, J. T.; Wong, S. C.; Grimley, C.; Watanabe, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5011-5015.
- [37] James, P.; Quadroni, M.; Carafoli, E.; Gonnet, G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 58-64.
- [38] Mann, M.; Hojrup, P.; Roepstorff, P. *Biol. Mass Spectrom.* **1993**, *22*, 338-345.
- [39] Pappin, D. J. C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J. *J. Curr. Biol.* **1993**, *3*, 327-332.
- [40] <http://www.ctaalliance.org/MCBI/Proteomics.html>.
- [41] <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/Presentations/Group5-01/pages/strategy.html>.
- [42] Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.
- [43] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- [44] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- [45] Nelson, R. W.; Dogruel, D.; Williams, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 627-631.
- [46] Wall, D. B.; Berger, S. J.; Finch, J. W.; Cohen, S. A.; Richardson, K.; Chapman, R.; Drabble, D.; Brown, J.; Gostick, D. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3193-3204.
- [47] Xiang, F.; Beavis, R. C. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1424-1429.
- [48] Cohen, S. L.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 31-37.
- [49] Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4160-4165.
- [50] Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- [51] Cotter, R. J. *Time-of-flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*; American Chemical Society: Washington (DC), 1997.
- [52] <http://www-methods.ch.cam.ac.uk/meth/ms/theory/maldi.html>.
- [53] Gross, J.; Strupat, K. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 470-484.



- [54] Wong, C. K. L.; So, M. P.; Chan, T.-W. D. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 223-232.
- [55] Vinh, J. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Paris, 1999.
- [56] Guilhaus, M. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30*, 1519-1532.
- [57] Mc Luckey, S. A. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 571-606.
- [58] Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. *Sov. Phys. JETP* **1973**, *64*, 82-89.
- [59] Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1998-2003.
- [60] Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044-1050.
- [61] Whittal, R. M.; Li, L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1950-1954.
- [62] Kussmann, M.; Nordhoff, E.; Rahbek-Nielsen, H.; Haebel, S.; Rossel-Larsen, M.; Jakobsen, L.; Gobom, J.; Mirgorodskaya, E.; Kroll-Kistensen, A.; Palm, L.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 593-601.
- [63] Weinberger, S. R.; Boernsen, K. O.; Finchy, J. W.; Robertson, V.; Musselan, B. D., San Francisco (CA), Proceedings of the 41<sup>st</sup> Annual ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 31 mai-5 juin 1993; 775 a-b.
- [64] Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 3281-3287.
- [65] Gobom, J.; Nordhoff, E.; Mirgorodskaya, E.; Ekman, R.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 105-116.
- [66] Pluskal, M. G. *Nature Biotechnol.* **2000**, *18*, 104-105.
- [67] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A.; Mann, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1371-1378.
- [68] Takach, E. J.; Hines, W. M.; Patterson, D. H.; Juhasz, P.; Falick, A. M.; Vestal, M. L.; Martin, S. A. *J. Prot. Chem.* **1997**, *16*, 363-369.
- [69] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4741-4750.
- [70] Zhang, W.; Chait, B. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482-2489.
- [71] Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [72] Fenyö, D. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **2000**, *11*, 391-395.

## **Chapitre 3**

**Réactif de réticulation : le glutaraldéhyde (GA)**

Malgré le succès du glutaraldéhyde (GA) comme réactif de réticulation, la majorité des procédures d'immobilisation rapportées dans la littérature ont été développées de manière empirique, sans une réelle compréhension ou même connaissance de la chimie de ce réactif. Lors du développement de notre méthode d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA, il a été difficile de trouver des articles pertinents et récents sur les aspects chimiques de GA, la plupart des références étant orientées en médecine, en histochimie, en microscopie électronique, *etc.*. Par ailleurs, plusieurs de ces articles renfermaient des informations incomplètes, voire même contradictoires, à propos de la nature multicomposante de GA en solution aqueuse et de son mécanisme de réaction avec les protéines. Nous avons donc décidé de rassembler les informations dans un article de revue, afin de donner une vision globale de GA. Cet article, accepté pour publication dans le périodique *BioTechniques*, donne une vision d'ensemble des différentes formes de GA en solution aqueuse et leur réactivité avec les groupements amines des protéines, le tout appliqué à la réticulation des enzymes.

### **Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking**

Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand and Karen C. Waldron, *BioTechniques* (accepted, August 6<sup>th</sup>, 2004).

#### **3.1. Abstract**

Glutaraldehyde possesses unique characteristics that render it one of the most effective protein crosslinking reagents. It can be present in at least thirteen different forms depending on solution conditions like pH, concentration, temperature, *etc.* Substantial literature is found concerning the use of glutaraldehyde for protein immobilization yet there is no agreement about the main reactive species that participates in the crosslinking process because monomeric and polymeric forms are in equilibrium. Glutaraldehyde may react with proteins by several means such as aldol condensation or Michael-type addition, and we show here eight different reactions for various aqueous forms of this reagent. As a result of these discrepancies and the unique characteristics of each enzyme, crosslinking procedures using glutaraldehyde are largely developed through empirical observation. The

choice of the enzyme-glutaraldehyde ratio, as well as their final concentrations, is critical because insolubilization of the enzyme must result in minimal distortion of its structure in order to retain catalytic activity. The purpose of this paper is to give an overview of glutaraldehyde as a crosslinking reagent by describing its structure and chemical properties in aqueous solution in an attempt to explain its high reactivity toward proteins, particularly as applied to the production of insoluble enzymes.

### **3.2. Introduction**

Among the many available protein crosslinking agents, glutaraldehyde has undoubtedly found the widest application in various fields such as histochemistry [1-3], microscopy [1, 4, 5], cytochemistry [6], leather tanning industry [7, 8], enzyme technology [9-13], chemical sterilization [14], biomedical [15], and pharmaceutical sciences [16]. Glutaraldehyde, a linear, 5-carbon dialdehyde, is a clear, colorless to pale straw-colored, pungent oily liquid that is soluble in all proportions in water and alcohol, as well as in organic solvents. It is mainly available as acidic aqueous solutions (pH 3-4), ranging in concentration from less than 2% to 70% (w/v). Glutaraldehyde has had great success because of its commercial availability and low cost in addition to its high reactivity. It reacts rapidly with amine groups at around neutral pH [17] and is more efficient than other aldehydes in generating thermally and chemically stable crosslinks [15]. In fact, studies of collagen crosslinking reactions with monoaldehyde (formaldehyde) and dialdehydes having chain lengths of two to six carbon atoms (glyoxal, malonaldehyde, succinaldehyde, glutaraldehyde and adipaldehyde) demonstrated that the reactivity in this series is maximized at five carbons; thus glutaraldehyde is the most effective crosslinking agent [18].

Glutaraldehyde has found widespread use for enzyme immobilization. Despite the success of this reagent, its chemistry has been quite controversial [19]. In fact, the simple structure of glutaraldehyde is not indicative of the complexity of its behavior in aqueous solution and its reactivity. Our purpose here is to review the literature on glutaraldehyde by first presenting its chemical behavior in aqueous solution and then its reactivity with proteins, focusing on its application for enzyme immobilization.

### 3.3. Chemical behavior of glutaraldehyde in aqueous solution

Knowledge of the structure and mechanism of crosslinking reagents is important for their use. However, the structure of glutaraldehyde in aqueous solution has been the subject of more debates than any of the other crosslinking reagents. In fact, glutaraldehyde structure in aqueous solution is not limited to the monomeric form (structure I, Fig. 3.1). Figure 3.1 gives an overview of the possible molecular forms of glutaraldehyde in aqueous solution based on reports covering the past 40 years [10, 20-29]. The different glutaraldehyde structures (Fig. 3.1) have been numbered as found in the literature and are discussed in chronological order.

In 1962, Aso and Aito [20, 30] studied the polymerization of glutaraldehyde using cationic catalysts and they found that a similar polymerization occurred spontaneously in aqueous solutions, at room temperature in the absence of a catalyst. The final product (structure VIII) was proposed to be a soluble tetramer or pentamer containing *ca.* one free aldehyde group per molecule formed through the intramolecular-intermolecular propagation polymerization with ring formation.

In 1968, Richards and Knowles [10] studied glutaraldehyde solutions by proton nuclear magnetic resonance (H-NMR). The NMR data (*i.e.*, types of protons and peak integrations) did not agree with those expected from dimer, cyclic dimer, trimer or bicyclic trimer only, but rather was consistent with a mixture of polymeric forms of these oligomers as well as higher polymeric species. The authors concluded that commercial solutions were largely polymeric and contained significant amounts of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (structure VI) that were able to form rings (structure VII) by loss of water molecules by aldol condensation. The structure VI represents the average structure of the unsaturated polymerized glutaraldehyde ( $\alpha,\beta$ -unsaturated compound) and Hooper [31] reported that the pendent aldehyde groups of structure VI would be scarcely hydrated since the carbonyl form is stabilized by conjugation.

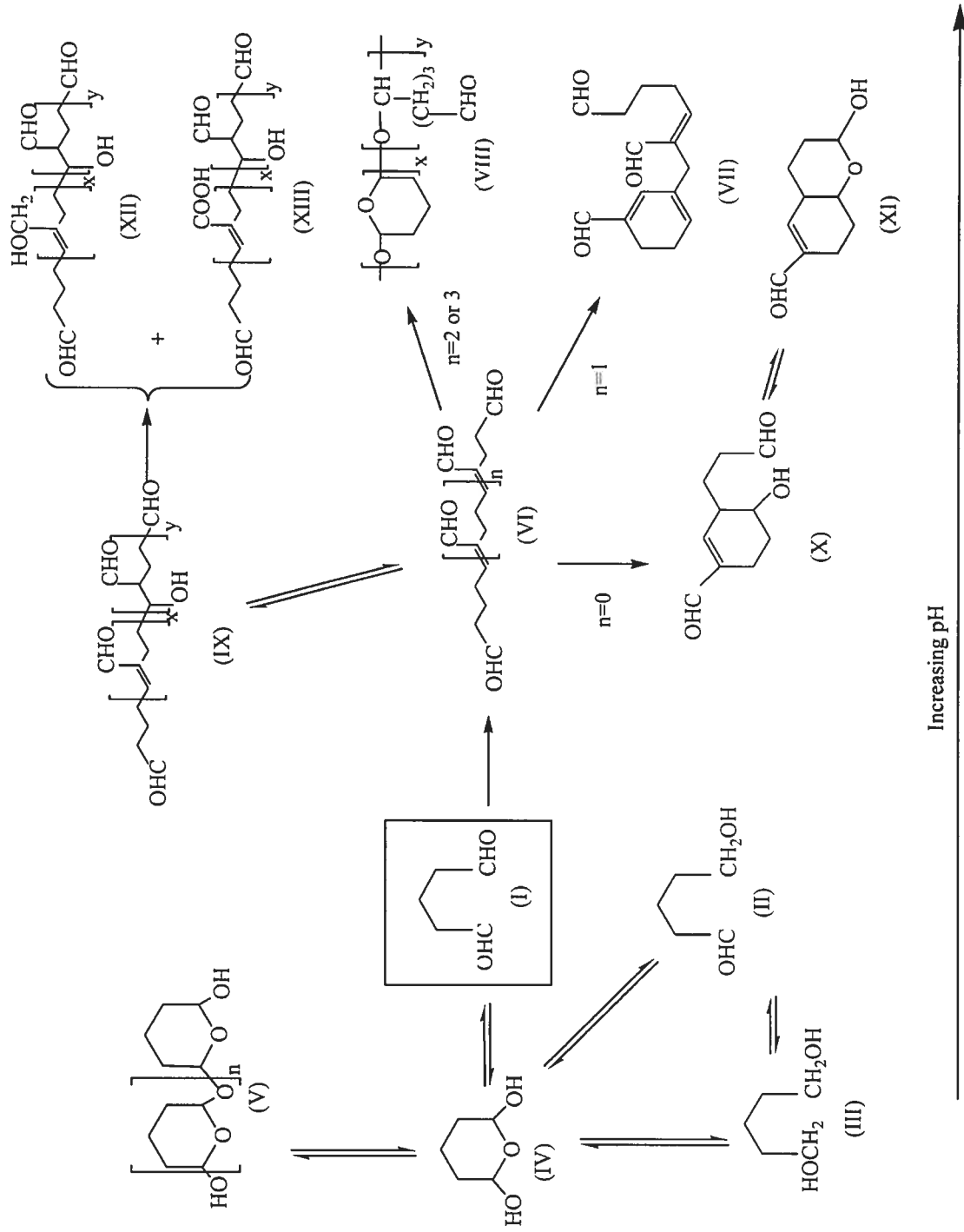


Figure 3.1.1. Summary of the possible forms of glutaraldehyde in aqueous solution

Hardy *et al.* [21], in 1969, used UV-spectrophotometry in combination with H-NMR to investigate glutaraldehyde solutions. They also found  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (structure VI) but only as a very minor component of the organic content because of the relatively weak absorbance observed at 235 nm. Furthermore, after purification of glutaraldehyde by liquid extraction with ethyl ether, these authors obtained 50% pure glutaraldehyde (structure I) with the expected H-NMR spectrum. Additional H-NMR investigations showed that purified glutaraldehyde undergoes very rapid hydration upon dissolution in water, which agreed with the results of Aso and Aito [20, 30]. Thus, Hardy *et al.* [21] postulated that glutaraldehyde monomer (structure I) existed as a mixture of hydrated forms (structures II, III and IV) in aqueous solution, all of them being in equilibria.

In their work a few years later, Korn *et al.* [22] did not find significant amounts of  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes (structure VI) by UV-spectrophotometric analysis, which was in agreement with Hardy *et al.* [21]. They proposed, after H-NMR analysis, that aqueous solutions of glutaraldehyde consisted of free glutaraldehyde (structure I), the cyclic hemiacetal of its hydrate (structure IV) and oligomers of this (structure V), all in equilibria and in different proportions as a function of the temperature. In 1974, Whipple and Ruta [32] studied aqueous glutaraldehyde using  $^{13}\text{C}$ -NMR and concluded that aqueous glutaraldehyde consisted primarily of the cyclic hemiacetal (structure IV), but they added that this form was equally distributed between two geometrical isomeric forms (*cis* and *trans*).

Monsan *et al.* [23], in 1975, confirmed, for acidic glutaraldehyde solutions, the results obtained by Hardy *et al.* [21], Korn *et al.* [22] and Whipple and Ruta [32] using gel and thin-layer chromatography, mass spectrometry (MS), H-NMR and infrared spectroscopy (IR). For glutaraldehyde solutions at neutral or slightly alkaline pH, they observed the production of molecular forms, which could precipitate. They also noted the formation of an abundant precipitate, named poly-glutaraldehyde, when sodium hydroxide was added to 25% aqueous glutaraldehyde solution to reach pH 11. MS and IR analysis allowed the identification of the solid as being the result of aldolic condensation of glutaraldehyde molecules (structures VI and/or VII).

In 1980, Margel and Rembaum [25] investigated the aldol condensation of glutaraldehyde in the pH range of 7 to 13.5. They obtained poly-glutaraldehyde and they

proposed the structure IX after spectroscopic and electrochemical analysis. They also reported that poly-glutaraldehyde may be soluble or insoluble in water, and may have different concentrations of aldehyde, hydroxyl, and carboxylic functional groups depending on the polymerization conditions, such as pH and oxygen content, leading to the structures XII and XIII.

In 1991, Tashima and Imai [27] obtained a new dimer when glutaraldehyde was treated by aqueous alkaline solution (pH 8.5). Their analyses by UV and IR suggested the existence of  $\alpha,\beta$ -unsaturated formyl and hydroxyl groups in this molecule and GC-MS analysis indicated the molecular formula  $C_{10}H_{14}O_3$  (MW: 182 g/mol). Moreover, after derivatization followed by two-dimensional NMR analysis, they proposed the structure X, in equilibrium with structure XI, for the glutaraldehyde dimer.

In 1992, Kawahara *et al.* [28] reported that most of the studies summarized above [10, 21, 23, 32] neglected possible solvent effects on the glutaraldehyde structure. In fact, water is the medium in which commercial glutaraldehyde is supplied and in which the crosslinking reaction with proteins is carried out, and glutaraldehyde was found to react with this solvent in various ways. Thus, according to Kawahara *et al.* [28], there was a considerable problem in the studies carried out by Monsan *et al.* [23] because their analyses were conducted only in organic solvent (tetrahydrofuran for gel chromatography, chloroform/acetone for thin-layer chromatography, and deuterated chloroform or carbon tetrachloride for H-NMR). In fact, the equilibrium between monomeric and polymeric glutaraldehyde in anhydrous solvents could possibly shift to the latter to produce water. Other studies showed similar problems [10, 21, 32]. For example, Richards and Knowles [10] and Hardy *et al.* [32] conducted their experiments in deuterated water ( $D_2O$ ), but exchange of deuterium for hydrogen bound to the  $\alpha$ -carbon could give erroneous results when comparing the peak intensities by H-NMR [22]. Moreover, the hydration equilibrium constants for monoaldehyde (formaldehyde) are reported to differ in  $H_2O$  and  $D_2O$  [33], and this probably occurs with glutaraldehyde. Whipple and Ruta [32] used  $^{13}C$ -NMR to analyze glutaraldehyde solutions, but direct comparison of the peak intensities is known to be not quantitative in  $^{13}C$ -NMR [34]. Thus, these observations led Kawahara *et al.* [28] to investigate the molecular structure of glutaraldehyde in aqueous solution by UV absorption and light scattering. The 70% (w/v) glutaraldehyde solution used for their study was found to contain a large quantity of polymeric species with cyclic hemiacetal structure (V). Upon



dilution, the polymerized glutaraldehyde slowly converted to monomers, thus inducing a great variation in the relative abundances of monomeric and polymeric species according to the glutaraldehyde concentration. In fact, they found that in dilute solution and in the pH range of 3 to 8, glutaraldehyde was almost monomeric, predominantly in cyclic hemiacetal form (structure IV). In 1997, the same authors [29] found that glutaraldehyde structure was similar for aqueous solutions up to 10% (w/v) and concluded that the content of  $\alpha,\beta$ -unsaturated structures (structure VI) was negligible regardless of the glutaraldehyde concentration.

In summary, several studies [10, 20-29] have shown that commercially available glutaraldehyde represents multicomponent mixtures, but knowing which of these components is the most efficient for reactions with proteins is debatable. In fact, in aqueous solution, glutaraldehyde can exist in its simplest form, a monomeric dialdehyde, but also as a dimer, trimer, and polymer. Therefore, the effectiveness of glutaraldehyde immobilization and the controversies surrounding its chemical behavior could be rationalized with the multiplicity of structures, which depends on the solution conditions.

### **3.4. Application to substances of biological interest**

#### **3.4.1. Carbohydrates, lipids and nucleic acids**

There is little information on the use of aldehydes to fix carbohydrates [35] or lipids [6]. Most lipids do not react well with glutaraldehyde, with the exception of some phospholipids that contain primary amines (*e.g.*, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine) [36]. In the case of nucleic acids, formaldehyde is by far the most effective agent for their fixation by reaction with amino groups of DNA nucleotides [37], but only little information is available on the interaction between glutaraldehyde and DNA [38].

#### **3.4.2. Proteins: general case**

Glutaraldehyde was used for the first time at the beginning of the 1960's for fixation of tissues [1], and since this time many other applications have been developed. The high reactivity of glutaraldehyde towards proteins at around neutral pH is based on the presence of several reactive residues in proteins and molecular forms of glutaraldehyde in aqueous solution, leading to many different possible reaction mechanisms. Enzyme

immobilization represents a good example to illustrate the use of glutaraldehyde as protein crosslinking reagent.

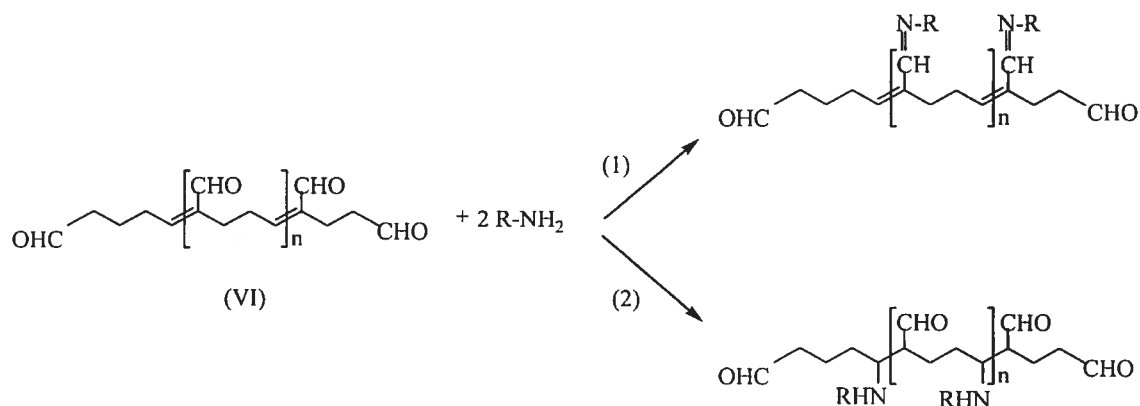
Glutaraldehyde can react with several functional groups of proteins, such as amine, thiol, phenol and imidazole [39] because the most reactive amino acid side-chains are nucleophiles. Various data on aldehyde reactivity (at pH from 2 to 11) with the following amino acids have been reported in the literature: lysine [18]; tyrosine, tryptophan and phenylalanine [40]; histidine, cysteine, proline, serine, glycine, glycyglycine and arginine [41]. These authors investigated the ability of different aldehydes to react with amino acids and they ranked the reactive moieties of the amino acids in decreasing order of reactivity as follows:  $\epsilon$ -amino,  $\alpha$ -amino, guanidinyl, secondary amine and hydroxyl groups. Avrameas and Ternynck [42] concluded that either glutaraldehyde did not react with the amine function of the guanidinyl group (arginine) or that in protein molecules the more reactive groups prevented the observation of arginine reactivity with glutaraldehyde. Okuda *et al.* [17] noted that glutaraldehyde reacted with thiol groups only in the presence of a primary amino group. Glutaraldehyde reacts reversibly with amino groups over a wide pH range ( $\geq$  pH 3), except between pH 7 to 9 where only a little reversibility is observed [17].

The crosslinking of proteins, either to a solid support (carrier) or between protein molecules (carrier-free), generally implies the  $\epsilon$ -amino group of lysyl residues [43]. The unprotonated amino groups are very reactive as nucleophilic agents [44]. It should be noted that lysyl  $\epsilon$ -amino groups have  $pK_a > 9.5$ , but it is presumed that the small percentage of amines present in their unprotonated form at lower pH is sufficient to react with glutaraldehyde, which then drives the acid-base equilibrium to deprotonation of these groups for further reaction. Most proteins contain many lysine residues, usually located on the protein surface, *i.e.*, exposed to the aqueous medium because of the polarity of the amine group. Furthermore, lysine residues are generally not involved in the catalytic site, which allows moderate crosslinking to preserve protein conformation [45] and thus biological activity [46]. As stated previously, glutaraldehyde exists in multiple forms in aqueous solution and all of these forms might be reactive towards lysine residues ( $\epsilon$ -amino group) of proteins.

In spite of the substantial amount of literature concerning the use of glutaraldehyde, there is still no agreement about the main reactive species in glutaraldehyde solutions

during the crosslinking process. Aldehydes are expected to form Schiff bases upon nucleophilic attack by the  $\epsilon$ -amino groups of lysine residues in the protein [23]. However, Schiff bases are unstable under acidic conditions and tend to break down to regenerate the aldehyde and amine. In contrast, the linkage formed by the reaction of glutaraldehyde with an amino group has shown exceptional stability at extreme pHs and temperatures, thus a simple Schiff base with both ends of monomeric glutaraldehyde has been ruled out as a mechanism for glutaraldehyde crosslinking with proteins. Several alternative mechanisms have been proposed.

Between 1968 and 1975, Richards and Knowles [10] and Monsan *et al.* [23] postulated pathways, both involving the reaction of the protein amino group with  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes formed by aldol condensation of glutaraldehyde (Fig. 3.2).



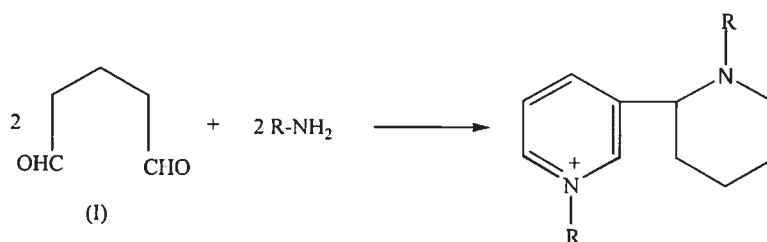
**Figure 3.2.** Schiff base (1) and Michael-type (2) reactions of glutaraldehyde with proteins

Richards and Knowles [10] proposed that the reaction involved the conjugate addition of protein amino groups to ethylenic double bonds (Michael-type addition) of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated oligomers found in the commercial aqueous solutions of glutaraldehyde that are usually used (reaction (2), Fig. 3.2). A few years later, Peters and Richards [47] showed work that supported this hypothesis because they found that in the presence of an excess of amino groups, nucleophilic addition on the ethylenic double bond was possible. Monsan *et al.* [23] proposed a slightly different mechanism in which an addition reaction occurred on the aldehydic part of the  $\alpha,\beta$ -unsaturated polymers (and poly-glutaraldehyde) to give a Schiff base (imine) stabilized by conjugation (reaction (1), Fig. 3.2).

In the early 1970s, Boucher [48, 49] proposed that monomeric glutaraldehyde was the active species involved in the crosslinking with proteins and the facility of polymeric

forms to revert to the active monomer depended upon pH, *i.e.*, the type of glutaraldehyde polymers in solution. He also considered that polymers existing in the alkaline pH range cannot revert to the monomer because time and temperature tend to favor a more irreversible polymer, in contrast to polymers that exist at acidic and neutral pH. This was supported in 1990 when Ruijgrok *et al.* [50] showed that glutaraldehyde polymers in the neutral and acidic pH range could revert easily to the monomer under the influence of heating or ultrasonic radiation.

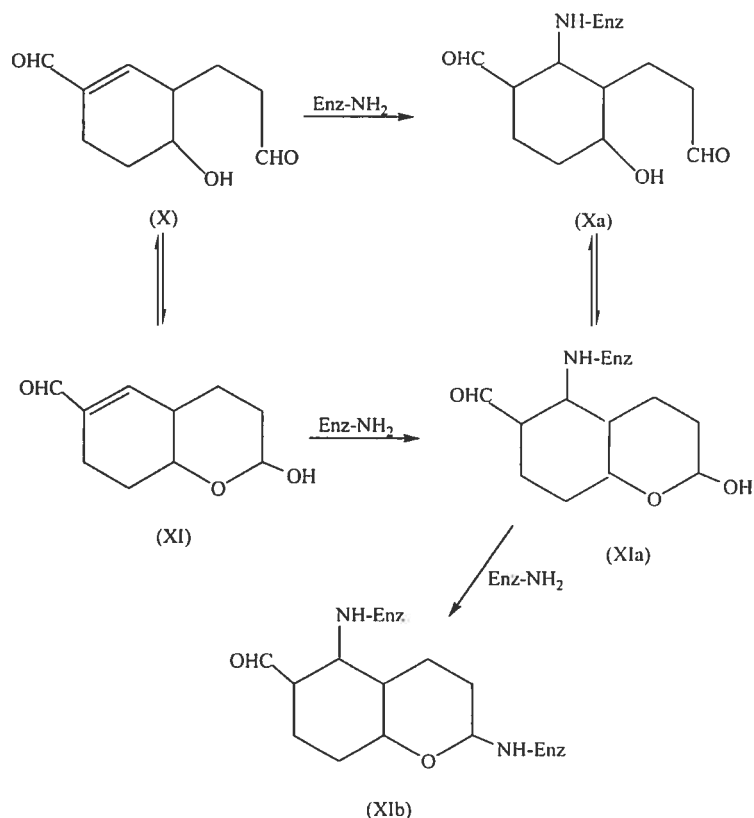
As early as 1976, Hardy *et al.* [51, 52] and Lubig *et al.* [53] argued that the reaction of glutaraldehyde with proteins was not due to  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes but may involve some dimerization in the presence of the amino group, such as the formation of quaternary pyridinium compounds (Fig. 3.3), rather than glutaraldehyde polymers reacting with amino groups.



**Figure 3.3.** Crosslinking of proteins with glutaraldehyde giving a quaternary pyridinium compound

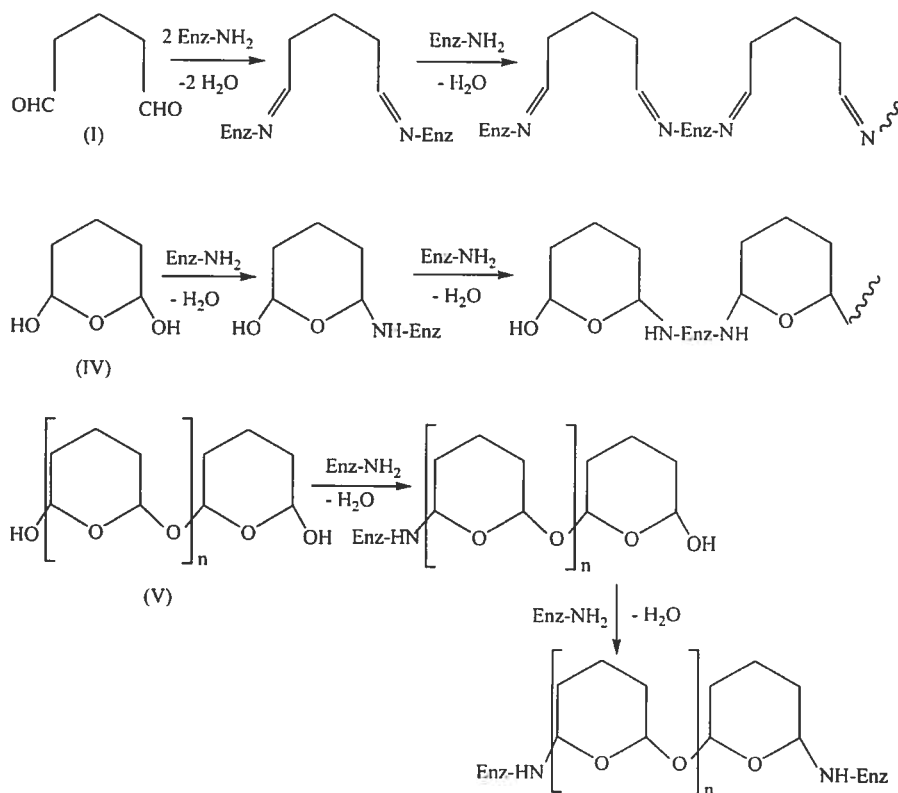
The mechanism involved could result from cyclization, dehydration and internal redox reactions of a Schiff base. Hardy *et al.* [52] reported the isolation of a pyridinium-type compound following the reaction of glutaraldehyde with amines and suggested this structure as a stable crosslink. They showed that this compound had an UV absorption maximum at 265 nm, consistent with the original observation of Bowes and Cater [18].

In 1991, Tashima and Imai [27] concluded that reaction of alkaline glutaraldehyde solutions (mixture of dimers X and XI) with proteins may involve a Michael addition to the double bonds to give (structure Xa) and (structure XIa), as shown in Fig. 3.4 (adapted from reference [19]). If these reactions occur, no reduction is necessary to stabilize the adducts. If an excess of amine is added, the compound (structure XIb) may be formed.



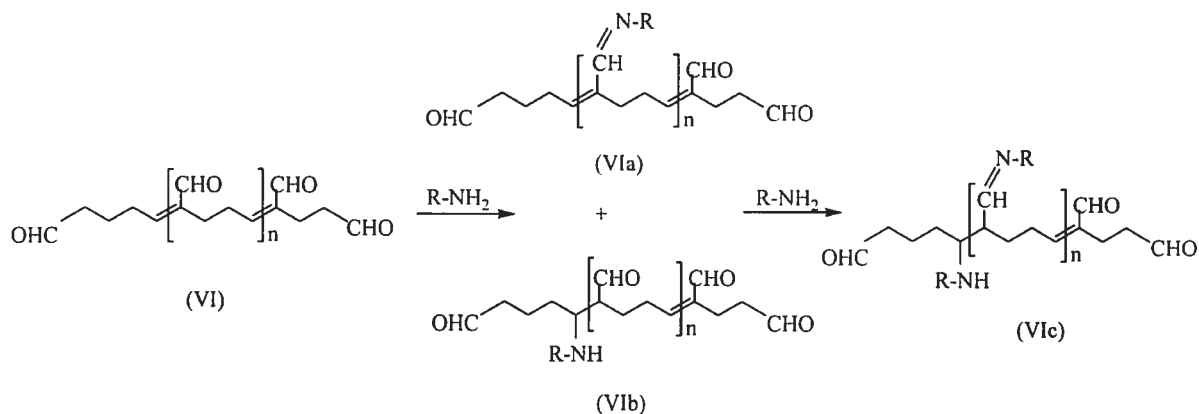
**Figure 3.4.** Reaction of dimeric cyclic glutaraldehyde with proteins under basic conditions

In 1994, Walt and Agayn [19] proposed multiple reaction products for the different glutaraldehyde structures in solution depending on the pH conditions because each form of glutaraldehyde might participate differently in crosslinking reactions with proteins. Thus, under acidic or neutral conditions, glutaraldehyde exists as a mixture of monomers (*i.e.*, free aldehyde form (I) or cyclic hemiacetal (IV)) or as a polymer (*i.e.*, cyclic hemiacetal oligomer (V)). Each of these structures would be expected to form Schiff bases upon nucleophilic attack by lysine residues in a protein as shown in Fig. 3.5. However, as previously mentioned, Schiff bases are unstable under acidic conditions and hence Schiff base formation (Eq. 1, Fig. 3.5) between a lysine amino group and free aldehyde (structure I) is not favored. It is more likely that monomeric cyclic hemiacetal (structure IV) and its multimeric form (structure V) react via reactions in Eqs. (2) and (3) of Fig. 3.5, under acidic conditions.



**Figure 3.5.** Reactions of glutaraldehyde with proteins under acidic or neutral conditions

Under basic conditions (Fig. 3.6), the reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated oligomeric aldehydes (structure VI) with amine can give two products robust to acid hydrolysis: a Schiff base (structure VIa, Fig. 3.6), which was more stable because of the conjugation of the internal aldehyde group with the C-C double bonds, and a Michael addition product (structure VIb).



**Figure 3.6.** Reaction of polymeric glutaraldehyde with proteins under basic conditions

In the presence of excess amine, a mixed product (structure VIc) is seen, which is labile to acid hydrolysis because of the disruption of resonance stabilization. Because elimination of water in the formation of Schiff bases is reversible and because prolonged exposure to buffer solutions, particularly at elevated pH, might impair binding and lead to gradual release of the enzyme, it has been proposed to reduce the double bonds of the Schiff bases by application of suitable reducing agents [19] such as sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ ) or sodium cyanoborohydride ( $\text{NaCNBH}_3$ ). In both cases, the reduction of structure VIa produces a secondary amine that is tolerant to variations in pH and is stable even in acidic conditions. Sodium cyanoborohydride is preferred because it is a milder reagent [54]. In fact, sodium borohydride does not only reduce Schiff bases, but also aldehyde groups leading to a lower yield of conjugate formation [55]. Even if the use of a reducing agent has been recommended, the necessity for reduction is not usually required [19].

In 1997, Kawahara *et al.* [29] speculated on whether proteins can catalyze the aldol condensation/polymerization of glutaraldehyde. They suggested that monomeric glutaraldehyde could be converted to polymeric forms by the action of amino groups, and that this product played a major role in the crosslinking reaction of proteins. In fact, they proposed that the polymerization of glutaraldehyde via aldol condensation proceeded in parallel with the crosslinking reaction and that the formation of a Schiff base (imine) by one glutaraldehyde molecule with one amino group enhances its aldol condensation with other glutaraldehyde molecules. The final crosslinked structure would be a linear aldol-condensed oligomer of glutaraldehyde, with several Schiff base linkages branching off. They also observed that the dehydration step following aldol condensation occurs almost completely at the glutaraldehyde monomer units containing Schiff base imine, in contrast to the glutaraldehyde units containing no Schiff base, where little dehydration occurs. Therefore, the formed Schiff base linkage eventually constitutes a conjugate system with the adjacent ethylenic double bond. Once such conjugation is formed, the resonance interaction is reported to make Schiff base linkages stable to acid hydrolysis [23].

In conclusion, the chemical nature of the reaction of glutaraldehyde with proteins is not clearly understood and the mechanisms of protein crosslinking reactions remain open to speculation. However, it seems that no single mechanism is responsible for glutaraldehyde reaction with proteins. In fact, since glutaraldehyde is present in different

forms even for specific and controlled reaction conditions, several of the possible reaction mechanisms presented above could proceed simultaneously.

#### 3.4.3. Enzymes

Immobilized enzymes are currently the subject of considerable interest because of their advantages over soluble enzymes or alternative technologies, and their applications are steadily increasing. Immobilization by covalent attachment to water-insoluble carriers via glutaraldehyde is one of the simplest and most gentle coupling methods in enzyme technology [43]. The first reported application of using a bifunctional reagent was by Zahn in the 1950's [56], which was followed by studies on the chemistry of crosslinking with glutaraldehyde for the preparation of stable protein crystals for X-ray diffraction studies [45] or for the fixation of tissue samples for microscopic investigation [57]. Later, glutaraldehyde was widely used as a mild crosslinking agent for the immobilization of enzymes, since the reaction proceeds in aqueous buffer solution under conditions close to physiological pH, ionic strength and temperature. Essentially, two methods have been used: (i) the formation of a three-dimensional network as a result of intermolecular crosslinking and (ii) the binding to an insoluble carrier (*e.g.*, nylon, fused silica, controlled pore glass, crosslinked proteins such as gelatin and bovine serum albumin, polymers with pendant amino groups).

Immobilization can be achieved for many enzymes under a wide range of conditions, which should be chosen according to the specific results required. These conditions have often been determined by trial and error because insolubilization is critically dependent on a delicate balance of factors such as the nature of the enzyme [42, 58, 59], the concentration of both enzyme [60] and reagent [58], the pH [61] and ionic strength [62] of the solution, the temperature [63] and the reaction time [64].

The nature of the enzyme, particularly its lysine content, has an effect on its insolubilization by glutaraldehyde [42, 58, 59]. Moreover, if only a small amount of enzyme is available or if extensive modification needs to be avoided, the addition of inert, lysine-rich protein, *e.g.*, bovine serum albumin, has been suggested by Broun [58].

As mentioned above, the concentrations of enzyme and glutaraldehyde must be carefully considered to obtain water-insoluble enzyme derivatives via crosslinking [60]; low concentrations of enzyme and glutaraldehyde tend to induce intramolecular



crosslinking by enhancing the probability that glutaraldehyde functional groups will react with the same enzyme molecule [60]. Thus, conditions should be chosen carefully to favor intermolecular crosslinking between enzyme molecules instead of unwanted intramolecular links, which could also be formed [58, 65, 66]. Broun [58] reported that the amount of crosslinking agent used affects the degree or extent of crosslinking. He indicated that low concentrations of glutaraldehyde were not able to form sufficient crosslinkages to effect precipitation of the enzyme. At higher concentrations, the extent of crosslinking was high enough to form a tight structure by excluding water molecules to insolubilize the enzyme derivative. Chui and Wan [67] indicated that enzymatic activity was inversely proportional to the concentration of glutaraldehyde used because extensive crosslinking may result in a distortion of the enzyme structure (*i.e.*, the active site conformation). With this distortion, accessibility and accommodation of the substrate may be reduced, thus affecting the retention of biological activity. Furthermore, the relative concentration of enzyme to glutaraldehyde should also be considered [17]. We found that crosslinking of the enzyme trypsin (EC 3.4.21.4) with glutaraldehyde could be achieved over a wide range of relative mole ratios in 50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.8 but that the time required to commence precipitation ranged from 0.5 to 120 min for enzyme:glutaraldehyde ratios of 1:500 to 1:25 respectively (unpublished data).

The reaction of glutaraldehyde with enzymes to give soluble and insoluble products has been extensively studied and the reaction was shown to be pH-dependent [39]. Jansen *et al.* [61] showed that the optimum pH for glutaraldehyde insolubilization varied from protein to protein. In fact, they observed that the pH values for the most rapid insolubilization of bovine serum albumin, soybean trypsin inhibitor, lysozyme (EC 3.2.1.17) and papain (EC 3.4.22.2) were found to be nearly the same as the isoelectric points of these proteins, whereas the formation of insoluble active chymotrypsin (EC 3.4.21.1) was most rapid at pH 6.2 (pI 8.6) and chymotrypsinogen A at pH 8.2 (pI 9.5). The existence of an optimum pH suggests the important role of the protein charge on the intermolecular crosslinking required for insolubilization. The charge on the protein may regulate crosslinking, which was maximal when the repulsive charges were minimal. Furthermore, Tomimatsu *et al.* [62] and Broun [58] concluded that the lower the ionic strength of the reaction medium, the more rapid the crosslinking of chymotrypsin. On the other hand, the choice of pH should also be taken into account regarding the reactivity of

aqueous glutaraldehyde, most immobilizations being conducted in the neutral or slightly alkaline pH range.

The influence of temperature and reaction time on insolubilization of enzymes has been reported by Broun [58]. In the early reports on enzyme immobilization, the reactions were carried out at low temperature (4°C), which was preferred for labile molecules, but the immobilization process required long reaction times (6 to 18 h) [59]. Ottesen *et al.* [63] and Bullock [35] suggested that the reaction of glutaraldehyde with lysine residues was progressive with time, probably depending on the accessibility of the  $\epsilon$ -amino groups. Currently, ambient temperature is used for glutaraldehyde immobilization of enzymes within 4 h or less [68, 69].

The catalytic activity of water-insoluble enzyme derivatives prepared using multifunctional reagents like glutaraldehyde can vary considerably [61, 63, 70] and has been shown to be dependent on the amount of crosslinking reagent used during insolubilization, as well as on other factors [71]. Moreover, the kinetic behavior of immobilized enzymes is, in many respects, different from that of free enzyme in solution [72], these differences being related to the diverse microenvironments generated by the enzymatic hydrolysis of the substrate. Kinetic properties of soluble enzymes are expressed in terms of Michaelis-Menten parameters. In the case of immobilized enzymes, apparent kinetic properties are used because the overall kinetic behavior of the enzymatic preparation is the sum of isolated contributions of each individual enzyme molecule, which can be immobilized via different amino groups leading to different exposures of the catalytic centers [73]. Our work [74] on trypsin immobilization with glutaraldehyde either by covalent attachment to aminopropyl controlled pore glass (CPG) particles or by crosslinking of trypsin in solution showed an increase in  $K_{M,app}$  (*i.e.*, a decrease in enzyme-substrate affinity) relative to free trypsin, which was more pronounced for glutaraldehyde-crosslinked trypsin compared to CPG-trypsin. Thus, according to our results, the crosslinking procedure led to a more constrained enzyme. Furthermore, the shapes of the pH-activity curves depend on the nature of the products liberated as well as on the kinetic parameters. Changes in the specificity of certain immobilized enzymes have been reported. For example, glutamic transaminase (EC 2.6.1.1) crosslinked with glutaraldehyde lost its transaminase activity but was still able to form complexes with its antibody [75].

Stabilities (thermal, chemical and mechanical) of water-insoluble enzyme derivatives have also been described [46, 76]. Most notably, thermal stability of immobilized enzymes has been shown to vary from greater down to a lesser extent relative to the native enzyme. The stability of an enzyme (protein) can typically be increased by crosslinking because intra- and intermolecular crosslinks lead to a more rigid molecule that can resist conformational changes [77]. In fact, the covalent bonds created during the crosslinking reaction are stable, even in the presence of substrate or high ionic strength solutions [59]. Moreover, pH and temperature can be varied over a wide range without dissolution or deterioration of the crosslinked crystals [78]. The crosslinking confers mechanical advantages because fragile crystals become much more sturdy and robust, so that there is much less chance of damage during handling, while remaining permeable to dissolved solutes. Among enzymes, proteases like trypsin are of great interest because of their numerous applications in many fields. However, most of the commonly used proteases are marginally stable in their soluble form, the prominent cause of their irreversible inactivation being autoproteolytic digestion. Therefore, stabilization by immobilization has been the subject of considerable research. For example, we digested denatured lysozyme using two immobilized trypsin preparations (enzyme either covalently attached to aminopropyl CPG particles or crosslinked with glutaraldehyde) and did not observe autoproteolysis [79]. Moreover, these immobilized trypsin preparations showed excellent digestion reproducibility based on liquid chromatographic and capillary electrophoretic peptide maps. Insoluble trypsin preparations were found to be considerably more stable than native trypsin in the alkaline pH range [80]. Glassmeyer and Ogle [81] reported that an insoluble trypsin preparation could be used repeatedly without loss of activity and could be left standing in pH 8 buffer at room temperature for 40 h with only a 9% loss of activity. However, the activity of insoluble trypsin preparations was completely destroyed upon incubation at 100°C in pH 8 buffer for 15 minutes [81]. Walsh *et al.* [82] described the enhanced chemical stability of crosslinked, monolayered trypsin in the presence of urea and Habeeb [70] reported a higher stability of trypsin crosslinked with glutaraldehyde during continuous use for casein digestions.

The storage stability of several water-insoluble enzyme derivatives has been examined because an insoluble enzyme derivative should retain activity for considerable periods of time to be useful. For example, Jansen and Olson [64] reported that papain

(EC 3.4.22.2) crosslinked with glutaraldehyde showed no detectable decrease in esterase activity after 5 months at 4°C. Glassmeyer and Ogle [81] stored insoluble preparations of trypsin in water at 4°C for several months and, in most cases, at most a 15% drop in activity was found. Silman and Katchalski [80] did not note a marked loss of activity after lyophilization and storage at room temperature. On the contrary, catalase (EC 1.11.1.6) crosslinked with glutaraldehyde showed a decrease of about 20% in its initial activity after 2 weeks at 4°C in aqueous solution, after which no further decrease in activity occurred after 5 months of storage [11]. Thus, storage of immobilized enzyme preparations depends on the nature of the product and should be tested for each case.

The application of chemical crosslinking is multidisciplinary, ranging from basic protein biochemistry to applied biotechnology, engineering and medicine. Since the 1960's, glutaraldehyde has been used to couple enzyme (and protein) to carriers such as cellulosic materials [83], aminoalkylsilylated glass [84], polyacrylhydrazide [85], phenalanyl-lysine coated polystyrene beads [86] and polyethyleneimine treated magnetite [87]. Immobilized enzymes are also used in biosensors [88], chromatographic packings and detectors [89], on-line solid-phase reactors [90] and in the field of medical diagnostics and therapy [91].

There is an on-going interest in carrier-free immobilized enzymes, such as crosslinked enzyme crystals (CLECs) [45, 92], crosslinked dissolved enzymes (CLEs) [64, 70, 74] and crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) [93]. CLECs results from the chemical stabilization of the crystalline lattice of enzyme molecules by glutaraldehyde, forming highly concentrated immobilized enzyme particles, which can be lyophilized and stored for a long time at room temperature. CLEs are obtained by the crosslinking of dissolved enzymes, which leads to enzymes with enhanced thermostability. CLEAs were synthesized in a simple and effective way by physical aggregation of the enzyme penicillin G acylase (penicillin amidohydrolase, EC 3.5.1.11) using a precipitant (*e.g.*, *tert*-butyl alcohol), followed by chemical crosslinking with glutaraldehyde.

A different utilization of glutaraldehyde's crosslinking ability, first reported in the late 1970s, is related to the preparation of microspheres for a variety of immunological and therapeutic applications [24]. Glutaraldehyde was used for the preparation of microspheres from proteins (*e.g.*, gelatin) or alginate because of its excellent fixative properties. Gelatin

microspheres have been widely evaluated as drug carriers [94]. Unfortunately, gelatin dissolves rather rapidly in aqueous environments, making the use of this polymer difficult for the production of controlled and/or long-term delivery systems [95]. Thus, the use of a crosslinking procedure that leads to the formation of non-soluble networks within the microsphere wall is required to reduce dissolution and premature drug release [96]. Sodium alginate microspheres have been crosslinked with glutaraldehyde in the presence of calcium chloride [67] and applications of alginate microspheres have been reported in medicine [97] as well as in agriculture [98].

### 3.5. Conclusions

The success of glutaraldehyde as a crosslinking agent is a result of its multicomponent nature, where several forms are present in equilibrium in the reagent solution at a given pH. However, the exact molecular composition of glutaraldehyde solutions, as well as which component is the most reactive, is debatable despite plenty of knowledge. As a result, the reaction mechanism of glutaraldehyde with protein amino groups is not clearly understood, as illustrated by the large number of mechanisms reported in the literature and summarized in this review. No single mechanism seems to be responsible for glutaraldehyde crosslinking with proteins. All reported forms of glutaraldehyde exhibit the ability to react and crosslink proteins, leading to the formation of a broad range of conjugates. A fairly rigid control of reaction conditions is needed to achieve efficient insolubilization of each different enzyme due to their structural variability. Nonetheless, the resulting enzyme derivatives generally show good stability and thus can be reused. Although partial enzyme inactivation due to chemical modification is often unavoidable, in most cases enough catalytic activity is retained. More work is needed to provide additional information on the structure of these crosslinked products.

### 3.6. References

- [1] Sabatini, D. D.; Bensch, K.; Barnett, R. J. *J. Cell. Biol.* **1963**, *17*, 19-58.
- [2] Anderson, P. J. *J. Histochem. Cytochem.* **1967**, *15*, 652-661.
- [3] Hopwood, D. *Histochemie* **1967**, *11*, 289-295.
- [4] Hayat, M. A. *Fixation for Electron Microscopy*; Academic Press: New York (NY), 1981.

- [5] Kiernan, J. A. *Microsc. Today* **2000**, 00-1, 8-12.
- [6] Hopwood, D. *Histochem. J.* **1972**, 4, 267-303.
- [7] Fein, M. L.; Harris Jr, E. H.; Naghski, J.; Filachione, E. M. *J. Amer. Leather Chem. Ass.* **1959**, 54, 488-502.
- [8] Filachione, E. M.; Fein, M. L.; Harris Jr., E. H. *J. Amer. Leather. Chem. Ass.* **1964**, 59, 281-292.
- [9] Quioco, F. A.; Richards, F. M. *Biochem.* **1966**, 5, 4062-4076.
- [10] Richards, F. M.; Knowles, J. R. *J. Mol. Biol.* **1968**, 37, 231-233.
- [11] Schejter, A.; Bar-Eli, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 136, 325-330.
- [12] Fishman, S. N.; Chodorov, B. I.; Volkenstein, M. V. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 225, 1-10.
- [13] Monsan, P. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1978**, 5, 1-11.
- [14] Gorman, S. P.; Scott, E. M.; Russell, A. D. *J. Appl. Bacteriol.* **1980**, 48, 161-190.
- [15] Nimni, M. E.; Cheung, D.; Strates, B.; Kodama, M.; Sheikh, K. *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21, 741-771.
- [16] Gosselin, R. E.; Hodge, H. C.; Smith, R. P.; Gleason, M. N. *Clinical Toxicology of Commercial Products*, 4th ed.; The William and Wilkins & Co.: Baltimore (MD), 1976.
- [17] Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y.; Okada, H. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, 71, 100-105.
- [18] Bowes, J. H.; Cater, C. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, 168, 341-352.
- [19] Walt, D. R.; Agayn, V. *Trends Anal. Chem.* **1994**, 13, 425-430.
- [20] Aso, C.; Aito, Y. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1962**, 35, 1426.
- [21] Hardy, P. M.; Nicholls, A. C.; Rydon, H. N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1969**, 10, 565-566.
- [22] Korn, A. H.; Fearheller, S. H.; Filachione, E. M. *J. Mol. Biol.* **1972**, 65, 525-529.
- [23] Monsan, P.; Puzo, G.; Mazarguil, H. *Biochimie* **1975**, 57, 1281-1292.
- [24] Rembaum, A.; Margel, S.; Levy, J. *J. Immunol. Methods* **1978**, 24, 239-250.
- [25] Margel, S.; Rembaum, A. *Macromol.* **1980**, 13, 19-24.
- [26] Tashima, T.; Kawakami, U.; Harada, M.; Sakata, T.; Satoh, N.; Nakagawa, T.; Tanaka, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 4169-4180.

- [27] Tashima, T.; Masahiro, I.; Kuroda, T.; Yagi, S.; Terumichi, N. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 694-697.
- [28] Kawahara, J.; Ohmori, T.; Ohkubo, T.; Hattori, S.; Kawamura, M. *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 94-98.
- [29] Kawahara, J.; Ishikawa, K.; Uchimaru, T.; Takaya, H. In *Polymer Modification*; Swift, G., Carraher Jr., C. E., Bowman, C. N., Eds.; Plenum Press: New York (NY), 1997, pp 119-131.
- [30] Aso, C.; Aito, Y. *Makromol. Chem.* **1962**, *58*, 195-203.
- [31] Hooper, D. L. *J. Chem. Soc. B* **1967**, 169-170.
- [32] Whipple, E. B.; Ruta, M. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1666-1668.
- [33] Gruen, L. C.; McTigue, P. T. *J. Chem. Soc.* **1963**, 5217-5223.
- [34] Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th ed.; John Wiley & Sons: New York (NY), 1981.
- [35] Bullock, G. R. *J. Microsc.* **1984**, *133*, 1-15.
- [36] Russell, A. D.; Hopwood, D. *Prog. Med. Chem.* **1976**, *13*, 271-301.
- [37] Hopwood, D. *Histochem. J.* **1975**, *7*, 267-276.
- [38] Adami, R. C.; Rice, K. G. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 739-746.
- [39] Habeeb, A. F. S. A.; Hiramoto, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 16-26.
- [40] Hopwood, D.; Callen, C. R.; McCabe, M. *Histochem. J.* **1970**, *2*, 137-150.
- [41] Alexa, G.; Chisalita, D.; Chirita, G. *Rev. Tech. Ind. Cuir.* **1971**, *63*, 5-6; 9-14.
- [42] Avrameas, S.; Ternynck, T. *Immunochem.* **1969**, *6*, 53-66.
- [43] Weetall, H. H. *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 602A-604A.
- [44] Guisán, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1988**, *10*, 375-382.
- [45] Quioco, F. A.; Richards, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1964**, *52*, 833-839.
- [46] Avrameas, S. *Immunochem.* **1969**, *6*, 43-52.
- [47] Peters, K.; Richards, F. M. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 523-551.
- [48] Boucher, R. M. G. *Amer. J. Hosp. Pharm.* **1972**, *29*, 661-672.
- [49] Boucher, R. M. G. *Amer. J. Hosp. Pharm.* **1974**, *31*, 546-557.
- [50] Ruijgrok, J. M.; Boon, M. E.; De Wijn, J. R. *Histochem. J.* **1990**, *22*, 389-393.
- [51] Hardy, P. M.; Nicholls, A. C.; Rydon, H. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 958-962.

- [52] Hardy, P. M.; Hughes, G. J.; Rydon, H. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 2282-2288.
- [53] Lubig, R.; Kusch, P.; Roper, K.; Zahn, H. *Monatsh. Chem.* **1981**, *112*, 1313-1323.
- [54] Jentoft, N.; Dearborn, D. G. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4359-4365.
- [55] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: San Diego (CA), 1996.
- [56] Zahn, H. *Angew. Chem.* **1955**, *67*, 561-572.
- [57] Robertson, E. A.; Schultz, R. L. *J. Ultrastruct. Res.* **1970**, *30*, 275-287.
- [58] Broun, G. B. In *Methods Enzymol.*; Mosbach, K., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1976; Vol. XLIV, pp 263-280.
- [59] Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S. In *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*; Scouten, W. H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1983; Vol. 66, pp 253-391.
- [60] Zaborsky, O. R. *Immobilized Enzymes*; CRC Press: Cleveland, 1973.
- [61] Jansen, E. F.; Tomimatsu, Y.; Olson, A. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *144*, 394-400.
- [62] Tomimatsu, Y.; Jansen, E. F.; Gaffield, W.; Olson, A. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36*, 51-64.
- [63] Ottesen, M.; Svensson, B. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* **1971**, *38*, 171-185.
- [64] Jansen, E. F.; Olson, A. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *129*, 221-227.
- [65] Bano, B.; Saleemuddin, M. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **1980**, *17*, 12-17.
- [66] Gupta, M. N. In *Biocatalyst design for stability and specificity ACS Symposium Series*; Himmel, M. E., Georgiou, G., Eds.; Am. Chem. Soc.: Washington D.C., 1993, pp 307-324.
- [67] Chui, W. K.; Wan, L. S. *J. Microencapsulation* **1997**, *14*, 51-61.
- [68] Krogh, T. N.; Berg, T.; Hojrup, P. *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 153-162.
- [69] Tomer, S.; Dorsey, J. G.; Berthod, A. *J. Chromatogr. A* **2001**, *923*, 7-16.
- [70] Habeeb, A. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264-268.
- [71] Herzog, V.; Fahimi, H. D. *J. Cell. Biol.* **1974**, *60*, 303-311.
- [72] Mattiasson, B.; Mosbach, K. In *Methods in Enzymol.*; Mosbach, K., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1976; Vol. XLIV, pp 335-353.
- [73] Regan, D. L.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, *XVI*, 333-343.



- [74] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Vinh, J.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1367-1378.
- [75] Patramani, I.; Katsiri, K.; Pistevou, E.; Kalogeratos, T.; Pavlatos, M.; Evangelopoulos, A. E. *Eur. J. Biochem.* **1969**, *11*, 28-36.
- [76] Broun, G.; Selegny, E.; Avrameas, S.; Thomas, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *185*, 260-262.
- [77] Torchilin, V. P.; Maksimenko, A. V.; Smirnov, V. N.; Berezin, I. V.; Klibanov, A. M.; Martinek, K. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *522*, 277-283.
- [78] Quioco, F. A. In *Methods Enzymol.*; Mosbach, K., Ed.; Academic Press: New York, 1976; Vol. XLIV, pp 546-558.
- [79] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Vinh, J.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Anal. Chem.*, (submitted) **2004**.
- [80] Silman, I.; Katchalski, E. *Annu. Rev. Biochem.* **1966**, *35*, 873-908.
- [81] Glassmeyer, C. K.; Ogle, J. D. *Biochem.* **1971**, *10*, 786-792.
- [82] Walsh, K. A.; Houston, L. L.; Kenner, R. A. In *Structure - Function Relationships of Proteolytic Enzymes*; Desnuelle, P., Neurath, H., Ottesen, M., Eds.; Academic Press: New York (NY), 1970, pp 56.
- [83] Lilly, M. D.; Hornby, W. E.; Crook, E. M. *Biochem. J.* **1966**, *100*, 718-723.
- [84] Robinson, P. J.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *242*, 659-661.
- [85] Rapatz, E.; Travnicek, A.; Fellhofer, G.; Pittner, F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1988**, *19*, 223-234.
- [86] Wood, W. G.; Gadow, A. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1983**, *21*, 789-797.
- [87] Dekker, R. F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *22*, 289-310.
- [88] Badea, M.; Curulli, A.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron* **2003**, *18*, 689-698.
- [89] Guerrieri, A.; Palmisano, F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2875-2882.
- [90] Bartolini, M.; Andrisano, V.; Wainer, I. W. *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 331-340.
- [91] Chandran, P.; Thakur, M.; Pundir, C. S. *J. Biotechnol.* **2001**, *85*, 1-5.
- [92] St Clair, N. L.; Navia, M. A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314-7316.
- [93] Cao, L.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1361-1364.
- [94] Tabata, Y.; Hijikata, S.; Muniruzzaman, M.; Ikada, Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10*, 79-94.

- [95] Esposito, E.; Cortesi, R.; Nastruzzi, C. *Biomater.* **1996**, *17*, 2009-2020.
- [96] Leo, E.; Vandelli, M. A.; Cameroni, R.; Forni, F. *Int. J. Pharm.* **1997**, *155*, 75-82.
- [97] Wan, L. S. C.; Heng, P. W. S.; Chan, L. W. *J. Microencapsulation* **1992**, *9*, 309.
- [98] Kulkarni, A. R.; Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Dave, A. M.; Mehta, M. H. *J. Controlled Release* **2000**, *63*, 97-105.

# **Chapitre 4**

## **Partie expérimentale**

#### 4.1. Produits chimiques

Toutes les protéines utilisées (lysozyme de poulet,  $\beta$ -caséine bovine et hémoglobine humaine), incluant la trypsine bovine (traitée avec l'inhibiteur TPCK; activité : 12 700 unités BAEE $\cdot$ mg<sup>-1</sup>; lot : 092K0537), le phosphate de sodium monobasique monohydraté, le bicarbonate d'ammonium, l'acide borique, l'iodoacétamide (IAM), le *N*- $\alpha$ -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), le chlorure de sodium, la glycine, l'urée et l'hydroxyde de sodium proviennent de chez Sigma (St-Louis, MO, USA). Le glutaraldéhyde (solution aqueuse 25%, m/v), l'acide phosphorique et le dithiothréitol (DTT) proviennent de chez Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (Tris) et le TFA ont été achetés chez Fluka (Oakville, ON, Canada). L'acétonitrile (grade HPLC) provient de chez VWR International Ltd. (Montréal, QC, Canada). L'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA), purifié par recristallisation dans l'éthanol, et l'acide formique proviennent de chez Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). Le phosphate de sodium dibasique heptahydraté a été acheté chez Les produits chimiques Omega (Lévis, QC, Canada) et l'acide chlorhydrique provient de chez Anachemia (Montréal, QC, Canada).

L'eau utilisée pour préparer toutes les solutions a été distillée et purifiée par filtration/déionisation avec un système multi-cartouche commercialisé par Millipore (Milford, MA, USA). La filtration des éluants de chromatographie liquide a été réalisée en utilisant des filtres en nylon Whatman de 0.45  $\mu$ m de chez VWR International. Le tampon d'électrophorèse a été filtré avec des filtres en nylon de 0.2  $\mu$ m (Chromatographic Specialties, Brockville, ON, Canada). Le capillaire (non modifié, silice fondue, 50  $\mu$ m i.d., 363 $\mu$ m o.d.) utilisé en électrophorèse provient de chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les tubes de microcentrifugation (0.6, 1.5 et 2.0 mL) proviennent de chez Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). Les Zip Tips<sub>C18</sub><sup>®</sup> utilisés lors des analyses en spectrométrie de masse proviennent de chez Millipore (St-Quentin-en-Yvelines, France).

#### 4.2. Instrumentation

##### 4.2.1. Spectrophotométrie d'absorption UV

Le contenu en protéine (enzyme immobilisée), les paramètres cinétiques et le profil pH-activité de la trypsine ont été déterminés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary100 Bio

UV/Vis Spectrophotometer de chez Varian (St-Laurent, QC, Canada) contrôlé par le logiciel Cary WinUV<sup>®</sup>. Le contenu en enzyme a été évalué par spectrophotométrie différentielle de 4<sup>e</sup> dérivée en mesurant les différences d'absorbance du mélange réactionnel, et ce, avant et après l'immobilisation. Pour ce faire, le surnageant et toutes les solutions de lavages ont été conservés pour quantifier la trypsine non liée. Les mesures ont été prises entre 280 et 300 nm, à une vitesse de balayage de 10 nm/min (temps d'intégration : 0.6 s; intervalle de données : 0.1 nm). Les spectres de 4<sup>e</sup> dérivée ont été calculés à l'aide de l'algorithme de Savitsky-Golay [1] inclus dans le logiciel (filtre : 15 points; intervalle de données : 0.3 nm). Toutes les mesures ont été faites en triplicata.

L'activité catalytique de la trypsine (libre et immobilisée) a été déterminée en calculant la vitesse initiale d'hydrolyse de différentes concentrations en substrat chromogénique (TAME) [2]. Pour ce faire, l'absorbance du produit d'hydrolyse, le *N*- $\alpha$  *p*-tosyl L-arginine (TA), a été mesurée à 247 nm à différents temps de la réaction. Les mesures ont été prises à 25 °C dans une solution tampon 50 mM de tampon Tris-HCl, à pH 8, dans un volume réactionnel de 1.5 mL. Les vitesses initiales correspondantes ont été calculées à partir de la loi de Beer-Lambert ( $\epsilon_{247}$  : 540 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, [3]), selon l'équation 3 du Chap. 2. Les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir des graphes de Lineweaver-Burk (voir Fig. 2.1, Chap. 2). L'effet du pH sur l'activité de la trypsine (libre et immobilisée) a été évalué avec le substrat TAME pour des pH de 7 à 9 (tampon 50 mM, phosphate or Tris-HCl). Les vitesses initiales ont été rapportées comme des pourcentages de l'activité maximale mesurée.

#### 4.2.2. Électrophorèse capillaire

Les électrophérogrammes ont été obtenus avec le système P/ACE<sup>™</sup> MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) contrôlé par le logiciel 32 Karat (version 5.0) et muni d'un détecteur UV. Toutes les séparations ont été réalisées à 25°C, dans un capillaire d'une longueur totale de 60 cm (50 cm au détecteur), par application d'un voltage de 15 kV. Le tampon de séparation était constitué de phosphate de sodium monobasique 50 mM dont le pH était ajusté à 2.5 avec de l'acide phosphorique. Avant utilisation, le tampon était filtré à l'aide de filtres à seringues en Nylon de 0.2  $\mu$ m. Le capillaire était rincé avec du NaOH 0.1 M, de l'eau, du HCl 0.1M et ensuite le tampon de séparation avant

chaque analyse. Les injections (~5 nL) étaient faites par application d'une pression à l'entrée du capillaire (0.5 psi × 5 s) et les peptides étaient détectés à 200 nm.

#### 4.2.3. Chromatographie liquide

Les chromatogrammes ont été obtenus avec un système chromatographique Hitachi D-7000 (Hitachi, San Jose, CA, USA). La colonne utilisée était de marque Jupiter n-octadecylsilane (C18), 250 x 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). L'élution était faite par gradient à un débit de 1 mL/min, en utilisant l'éluant A, constitué de 0.1% (v/v) TFA dans l'eau et l'éluant B, constitué de 0.08% (v/v) TFA dans l'acétonitrile. Les éluants étaient filtrés sous vide avec des membranes filtrantes en Nylon de 0.45 µm avant utilisation. Le volume d'échantillon injecté était de 20 µL et la détection était faite à 200 nm.

#### 4.2.4. Spectrométrie de masse

L'acide  $\alpha$ -cyano-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA), en solution saturée dans un mélange constitué d'acétonitrile et de 0.1% TFA aqueux, a été utilisé comme matrice pour les analyses MALDI. Les échantillons ont été préalablement purifiés et préconcentrés en utilisant des Zip Tips<sub>C18</sub><sup>®</sup> et les dépôts ont été faits par la méthode de la goutte séchée (0.5 µL de échantillon et 0.5 µL de la solution de matrice). Les spectres MALDI ont été acquis sur un appareil de marque Voyager DE-STR Biospectrometry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) équipé d'un laser N<sub>2</sub> à 337 nm, en mode positif, entre m/z 650 et 4000. Le voltage d'accélération était de 20 kV. Le mode réflectron a été utilisé en combinaison avec l'extraction retardée (210 ns). Tous les spectres résultent d'une moyenne d'impulsions laser et ont été traités avec le logiciel Data Explorer<sup>™</sup> version 4.0.0.0 (Applied Biosystems). Les couvertures de séquence ont été obtenues avec le moteur de recherche ProFound version 4.10.5 [4, 5].

### 4.3. Procédures

#### 4.3.1. Immobilisation de la trypsine par réticulation avec le GA

La méthode d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec le glutaraldéhyde est basée sur les travaux de Habeeb [6] et sur des recherches préliminaires effectuées dans

le laboratoire du professeur Michel J. Bertrand [7]. Une étude des conditions d'immobilisation a permis de développer la méthode présentée au Chap. 5, cette dernière ayant été utilisée pour obtenir les résultats présentés sous forme d'articles au Chapitre 6. Brièvement, la trypsine est diluée dans un tampon phosphate 50 mM, de pH 6.8. Une solution aqueuse de GA est ajoutée goutte-à-goutte à la solution d'enzyme, sous agitation douce. Après quelques minutes, un solide blanchâtre apparaît et la solution contenant le précipité est laissée au repos pendant 2 h. La solution est ensuite centrifugée pendant 2 min à 3000 rpm et le surnageant est récupéré et conservé pour déterminer le rendement d'immobilisation par spectrophotométrie UV (4<sup>e</sup> dérivée). La préparation enzymatique est lavée avec le tampon d'immobilisation, ensuite avec le tampon contenant 500 mM de NaCl et finalement avec le tampon seul. Toutes les solutions de lavage sont récupérées pour détecter la présence de trypsine liée de façon non covalente. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 mL d'une solution de glycine 200 mM et laissée au repos pendant 3 h. Le mélange est centrifugé, lavé avec le tampon d'immobilisation et ensuite avec de l'eau. L'enzyme immobilisée est conservée dans l'eau, à 4°C, jusqu'à utilisation.

#### 4.3.2. Protéolyse en solution (homogène)

Les digestions homogènes de lysozyme et d'hémoglobine ont été faites en suivant la procédure décrite par Stone et Williams [8], avec quelques modifications. Brièvement, la protéine (8 mg/mL) est dissoute dans 800  $\mu$ L de tampon bicarbonate d'ammonium 400 mM (pH 8) contenant 8 M d'urée, ensuite réduite avec 120  $\mu$ L de DTT 45 mM (15 min, 50°C) et alkylée, pendant 15 minutes et à l'obscurité, avec 120  $\mu$ L d'une solution de 100 mM d'iodoacétamide. Avant la digestion, la solution de protéine est diluée à 2 mg/mL avec le tampon de digestion (bicarbonate d'ammonium, 50 mM pH 8). Comme la  $\beta$ -caséine est une protéine sans pont disulfure et dont la configuration est ouverte, aucune dénaturation préalable n'est nécessaire [9]. Une solution de trypsine est ajoutée pour obtenir un rapport massique final enzyme:protéine de 1:25. La digestion est effectuée dans un tube à microcentrifugation, à 37°C, pendant 24 h et sous agitation douce. Les digestions sont arrêtées par acidification avec 15  $\mu$ L d'acide chlorhydrique concentré. Les digestats sont ensuite analysés directement par CZE. Pour les analyses par HPLC et

MALDI, les échantillons sont préalablement séchés et resolubilisés soit dans l'éluant A (HPLC), soit dans une solution à 1% d'acide formique (MALDI).

#### 4.3.3. Protéolyse en phase solide (hétérogène)

Les digestions hétérogènes sont faites à partir des solutions de protéines préparées ci-dessus, dans des tubes à microcentrifugation, à 37°C et sous agitation douce dans un tampon bicarbonate d'ammonium, 50 mM et de pH 8, pendant 2 ou 4 h selon la protéine. Les digestions sont arrêtées par centrifugation à 3000 rpm (2 min), et le surnageant (le digestat) est analysé après acidification, comme décrit précédemment. L'enzyme immobilisée est rincée plusieurs fois avec le tampon de digestion avant la réutilisation.

#### 4.4. Références

- [1] Savitzky, A.; Golay, M. J. E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627-1639.
- [2] Hummel, B. C. W. *Can. J. Biochem.* **1959**, *37*, 1393-1399.
- [3] Dekker, R. F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1989**, *22*, 289-310.
- [4] Zhang, W.; Chait, B. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482-2489.
- [5] [http://prowl.rockefeller.edu/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe).
- [6] Habeeb, A. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264-268.
- [7] Abouchakra, H. Communications personnelles.
- [8] Stone, K. L.; Williams, K. R. In *A Practical Guide to Protein and Peptides Purification for Microsequencing*; Matsudaira, P., Ed.; Academic Press: San Diego (CA), 1993, pp 43-69.
- [9] Bonneil, E. Thèse de doctorat, Université de Montréal, Montréal, 2000.



## **Chapitre 5**

### **Étude des conditions d'immobilisation**

### 5.1. Généralités

Une technique d'immobilisation doit être simple, reproductible, peu dispendieuse et limiter le relargage de la molécule d'intérêt. De plus, les conditions d'immobilisation doivent être relativement douces, en particulier pour les protéines biologiquement actives telles que les enzymes, afin de prévenir une perte totale d'activité enzymatique [1]. En effet, les enzymes sont souvent des molécules fragiles. Le maintien de leur activité biologique, qui est intimement liée à leur conformation, dépend de plusieurs facteurs tels que le pH et la force ionique du milieu, la température et la présence d'agents dénaturants. De manière générale, les conditions extrêmes pouvant mener à une dénaturation doivent être évitées et l'environnement « naturel » de l'enzyme doit être simulé autant que possible [2].

L'élaboration d'une méthode d'immobilisation repose souvent sur l'empirisme, et il est difficile d'échapper à de laborieuses séries d'expériences afin de déterminer l'influence des différents paramètres de réaction. L'immobilisation d'une enzyme (trypsine) en solution par réticulation avec GA a été rapportée en 1967 par Habeeb [3]. Par la suite, plusieurs groupes de recherche ont fait des études sur l'effet de différents paramètres de réaction et ont développé des procédures pour l'immobilisation d'autres enzymes telles que l' $\alpha$ -chymotrypsine (EC 3.4.21.1), la subtilisine (EC 3.4.21.62), la papaine (EC 3.4.22.2), la catalase (EC 1.11.1.6), la glucose oxydase (EC 1.1.3.4), le lysozyme (EC 3.2.1.17) et plusieurs autres [4-10].

Des études sur la préparation d'enzymes immobilisées par réticulation avec GA [2, 6, 8, 11] ont montré que l'insolubilisation était dépendante de facteurs tels que les concentrations en enzyme et en GA, le pH et la force ionique de la solution, la température et le temps de réaction. Le Tableau 5.1 regroupe les conditions d'immobilisation de la trypsine utilisées par Habeeb [3] et celles développées lors de travaux de recherche préliminaires effectués par un étudiant au doctorat dans le laboratoire du Pr. Michel J. Bertrand [12].

**Tableau 5.1.** Conditions d'immobilisation disponibles au début du projet

<b>Paramètre</b>	<b>Habeeb [3]</b>	<b>Travaux préliminaires [12]</b>
Composition du tampon	Acétate de sodium (pH 5) Phosphate de sodium (pH 6,7* et 8*)	Acétate de sodium (pH 8)
Molarité du tampon (mM)	100	200
Concentration en trypsine (mg/mL)	48	28
Concentration en GA (% m/v)	2	11
Rapport molaire trypsine:GA	1 :100	1 :1000
Température (°C)	25	25
Temps d'immobilisation (h)	2	4

\*Addition de sulfate d'ammonium nécessaire pour qu'il y ait apparition d'un précipité

Ce chapitre présente l'amélioration d'une procédure d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA, à partir des conditions présentées dans le tableau 5.1 et de recherches bibliographiques complémentaires, et la détermination du contenu en trypsine du produit obtenu.

## 5.2. pH et force ionique

L'effet du pH sur la réaction de GA avec la trypsine a été étudié. Les immobilisations ont été effectuées avec des concentrations finales en trypsine et en GA respectivement de 28 mg/mL et 11% (m/v). Les tampons utilisés, dont la concentration était 200 mM, sont l'acide phosphorique (pH 2), l'acide formique (pH 4), l'acide acétique/acétate de sodium (pH 5), le citrate de sodium (pH 6), le phosphate de sodium

monobasique/dibasique (pH 6,8, 7 et 8) et l'acide borique (pH 8,5, 9 et 10). Les observations qualitatives, présentées dans le Tableau 5.2, ont consisté à déterminer le temps requis pour l'apparition d'un précipité visible à l'œil nu et la coloration de ce dernier.

**Tableau 5.2.** Effet du pH sur la précipitation de la trypsine par réaction avec GA

pH	Temps de précipitation (min)	Observations
2.0	--	Pas de produit insoluble Solution claire
4.0	--	
5.0	150	Produit insoluble blanc
6.0	2	Produit insoluble légèrement rose
6.8	< 2	
7.0	< 2	
8.0	< 2	
8.5	< 2	Produit insoluble jaune
9.0	--	Pas de produit insoluble Solution jaune
10.0	--	

Au début des années 1970, Fortes [13] a noté que lors de la réaction de GA avec un acide aminé ou une protéine, la solution devenait de plus en plus acide. Cette observation laisse donc présumer que GA réagit avec les groupements amines non protonnés, déplaçant ainsi l'équilibre acide-base en faveur de ces derniers. Ce déplacement d'équilibre favorise également la libération de protons, d'où la nécessité d'utiliser un tampon afin de conserver un pH constant pendant toute la durée de la réaction.

Le Tableau 5.2 montre qu'en milieu acide (pH 2-4) ou basique (pH 8,5-10), la réaction entre la trypsine et GA ne produit pas de précipité, et ce, même après plusieurs jours. De plus, la coloration des solutions diffère selon le pH, passant d'incolore (pH acide) à jaune (pH basique). La coloration jaune, observée à pH basique, pourrait être attribuée à la présence de liaisons doubles d'un système conjugué tel que les polymères de GA

produits par condensation aldolique [14]. Par ailleurs, il semble exister un intervalle de pH qui permet d'obtenir la trypsine sous forme insoluble, soit entre 5 et 8.5, et ce, sans addition de sulfate d'ammonium comme décrit dans la procédure de Habeeb [3]. En effet, Habeeb n'obtenait pas de produit insoluble à des pH 7 et 8 sans addition de ce réactif, qui permet entre autre d'augmenter le force ionique, mais son rôle n'est pas totalement compris. Dans notre cas, la concentration de trypsine, de GA et le rapport trypsine:GA n'étaient pas les mêmes que dans la procédure de Habeeb, et Broun [2] a souligné que ces paramètres pouvaient engendrer des différences de comportement lors de la réaction des protéines avec GA.

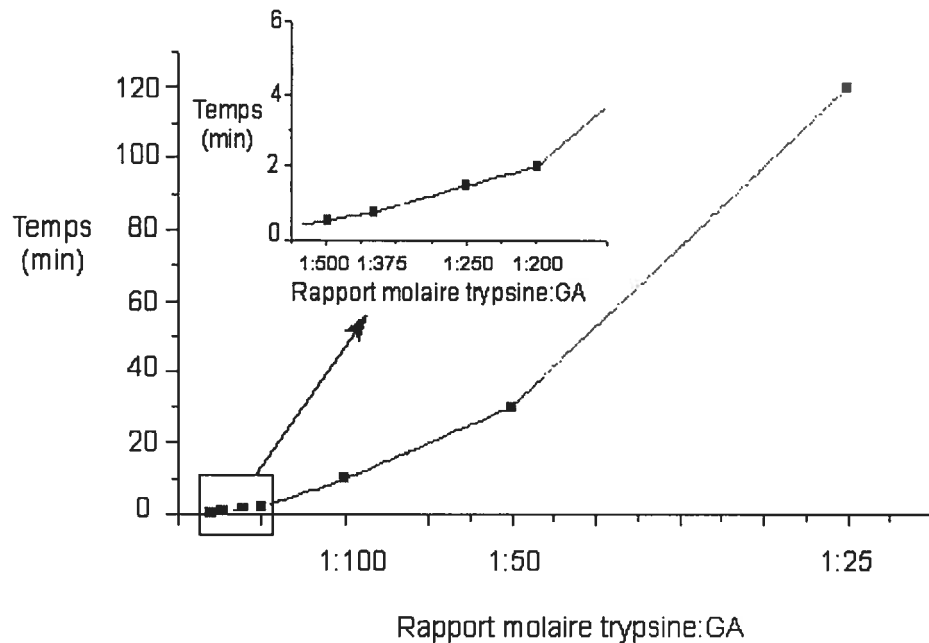
Nous avons constaté que la vitesse d'apparition d'un précipité était reliée au pH. En effet, la réaction d'insolubilisation était plus rapide lorsque, dans notre cas, le pH passait de 5 à 8.5. Cette augmentation de vitesse d'insolubilisation en fonction du pH avait déjà été remarquée par Jansen et Olson [6] pour la papaine. Par ailleurs, la trypsine est une enzyme active sur une gamme de pH entre 7.5 et 8.5 [15]. Dans la plupart des protocoles rapportés dans la littérature, l'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA est réalisée dans un milieu aqueux tamponné à pH 6.8-7.0 [5, 9, 10]. Nous avons opté pour un tampon phosphate de sodium puisque les différentes espèces de phosphate (mono-, di- ou tribasique) permettent de préparer des tampons peu dispendieux, sans danger et couvrant une grande gamme de pH [16]. Le choix final du pH (pH 6.8) a été fait pour favoriser la réaction d'insolubilisation de la trypsine, tout limitant l'autolyse de l'enzyme.

Nous avons noté une augmentation du temps nécessaire pour l'apparition d'un précipité visible à l'œil nu lorsque la molarité du tampon passait de 50 à 200 mM. Cette observation est en accord avec les résultats de Tomimatsu *et al.* [11] pour l'immobilisation de l' $\alpha$ -chymotrypsine, une enzyme de la même famille que la trypsine et avec une grande similarité de séquence. Selon les auteurs, ces résultats sont contraires à l'effet attendu concernant l'augmentation de la concentration en sel. Celle-ci devrait diminuer les interactions répulsives entre des molécules de même charge, et donc augmenter la vitesse d'insolubilisation. Toutefois, les effets de charge sont plus complexes dans le cas des protéines puisque celles-ci présentent de nombreux groupements ionisés, plus ou moins près les uns des autres, qui lui confèrent une charge nette globale. Par conséquent, la distribution de ces groupements ionisés pourrait être plus importante que la charge nette globale de la protéine, ce qui expliquerait l'effet de la concentration du tampon sur la

réaction d'insolubilisation. Les auteurs ont conclu que la diminution de la vitesse d'insolubilisation de la chymotrypsine, lors de l'augmentation de la force ionique, serait due à une diminution des forces attractives entre les molécules d'enzyme, ce raisonnement pouvant également s'appliquer au cas de la trypsine. Nous avons donc opté pour un tampon phosphate dont la molarité était de 50 mM.

### 5.3. Rapport trypsine:GA

Selon Hopwood [17-19], il n'y aurait pas de réticulation significative en-deça d'une concentration critique en GA ou en protéine. L'effet du rapport trypsine:GA sur la réaction de GA avec la trypsine a donc été étudié. Les immobilisations ont été effectuées dans un tampon phosphate 50 mM, pH 6.8, avec des rapports molaires trypsine:GA entre 1:25 et 1:500, ce qui correspond à des concentrations finales en GA entre 0.03 à 0.60% (m/v)<sup>1</sup>. La Fig. 5.1 représente le temps requis pour l'apparition d'un précipité visible à l'œil nu en fonction du rapport molaire trypsine:GA.



**Figure 5.1.** Influence du ratio enzyme:GA sur la formation d'un produit insoluble dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8

<sup>1</sup> Les quantités molaires de GA ont été calculées selon la forme I de la Fig. 3.1 (voir Chap. 3)

Comme le montre la Fig. 5.1, plus la quantité de GA dans le milieu réactionnel est importante, plus la réaction est rapide. Toutefois, l'immobilisation par réticulation est une méthode chimique et il faut limiter les changements conformationnels des molécules de trypsine afin de conserver l'activité catalytique de l'enzyme [1]. Les réactions de réticulation avec GA sont généralement réalisées avec des concentrations en glutaraldéhyde variant entre 0.2 et 1% (m/v) [5, 16, 20-24], ce qui correspond, dans nos conditions, à des rapports entre 1:200 et 1:500. Par ailleurs, des concentrations faibles en GA tendent à générer de plus faibles rendements de conjugaison et résultent en des produits moins stables [25], le tout en des temps beaucoup plus longs. Nous avons donc opté pour un rapport molaire trypsine:GA d'environ 1:250, ce rapport ayant été utilisé avec succès pour la trypsine par Chui et Wan [10] il y a un peu plus de 5 ans.

#### **5.4. Température, durée et arrêt de la réaction**

Nous avons choisi d'effectuer l'immobilisation de la trypsine à température ambiante pendant 2 h, et ce après avoir consulté la littérature (voir Chapitre 3, section 3.5.3) En effet, selon Jansen *et al.* [8], le temps nécessaire pour la réaction entre une protéine et GA varie généralement entre 1 et 3 h, à température ambiante, même si un précipité est visible après 10-30 minutes. Par ailleurs, les réactions de réticulation avec GA doivent être arrêtées par des inhibiteurs aminés tels que Tris ou de petites molécules (lysine, glycine), afin d'obtenir des préparations stables et d'éviter les réactions secondaires [2]. Nous avons opté pour la glycine, comme suggéré par Power et Russell [26].

#### **5.5. Procédure d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA**

La procédure d'immobilisation décrite dans cette section a été développée à partir des résultats obtenus dans les sections précédentes et des protocoles expérimentaux de la littérature. Elle consiste à ajouter 0.200 mL d'une solution-mère de trypsine (1.3 mM) à 1.640 mL de tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8. Ensuite, il faut ajouter, goutte-à-goutte et sous agitation douce, 0.235 mL d'une solution aqueuse de GA 2.5%. En quelques minutes, un précipité blanchâtre apparaît et la réaction est laissée au repos pendant 2 h, à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée pendant 2 min à 3000 rpm et le surnageant est récupéré et conservé pour déterminer le rendement

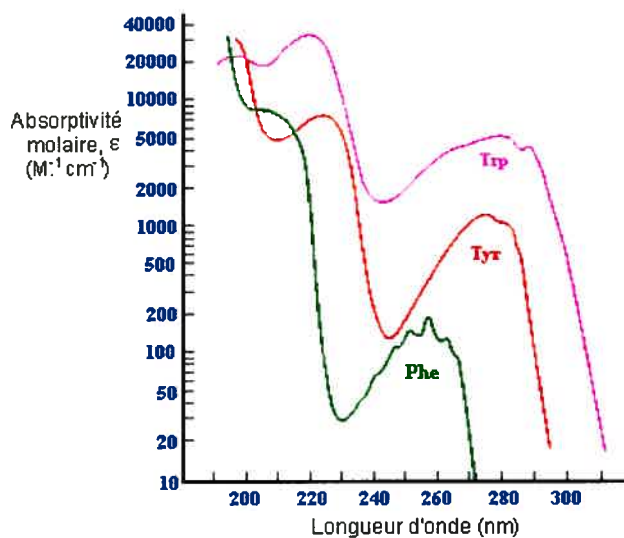
d'immobilisation par spectrophotométrie UV (4<sup>e</sup> dérivée). La préparation enzymatique est lavée avec le tampon d'immobilisation (3 × 1 mL), ensuite avec le tampon contenant 500 mM de NaCl (3 × 1 mL) et finalement avec le tampon seul (3 × 1 mL). Toutes les solutions de lavage sont récupérées pour détecter la présence de trypsine liée de façon non covalente. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 mL d'une solution de glycine 200 mM et en laissant réagir pendant 3h. Le mélange est centrifugé, lavé avec le tampon d'immobilisation (3 × 1 mL) et ensuite avec de l'eau (3 × 1 mL). L'enzyme immobilisée est conservée dans l'eau, à 4°C, jusqu'à utilisation.

### 5.6. Rendement d'immobilisation

Le rendement d'immobilisation, défini comme le pourcentage de trypsine présente dans le produit immobilisé après la réticulation avec GA, peut être déterminé de manière directe ou indirecte. La quantification directe consiste à doser l'enzyme dans le produit immobilisé tandis que la quantification indirecte est basée sur la différence entre la quantité initiale de trypsine ajoutée dans le milieu réactionnel et ce qui est récupéré dans le surnageant (y compris les lavages) après immobilisation. Nous avons opté pour une quantification indirecte puisque les méthodes les plus fréquemment utilisées sont rapides et bien établies. Les principales méthodes indirectes sont la mesure de l'absorbance à 280 nm [27], la méthode de Biuret [28], la méthode de Lowry [29], la méthode de Bradford [30] et la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) [31].

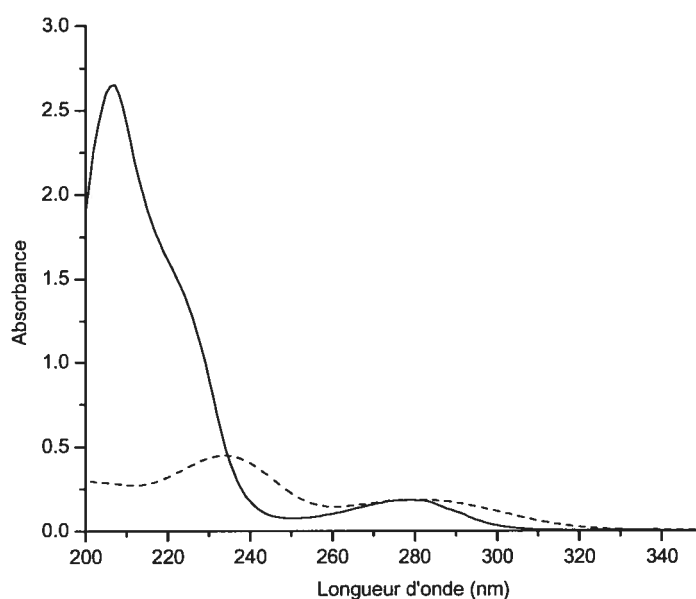
Les protéines montrent une absorptivité molaire caractéristique près de 280 nm, et dans le cas de protéines pures, cette absorptivité molaire fournit l'une des méthodes de dosage les plus simples et les plus exactes [32]. Cette bande d'absorption est attribuée aux transitions  $\pi-\pi^*$  des acides aminés aromatiques, soit Trp, Tyr et Phe [33]. Comme l'absorptivité molaire de Phe est relativement faible dans cette zone, sa contribution est généralement ignorée [32]. En raison de leur plus faible symétrie moléculaire, les absorptivités molaires de Tyr et Trp sont plus élevées à leurs longueurs d'onde d'absorption maximales respectives (Fig. 5.2), soit 275 et 278 nm [34].





**Figure 5.2.** Absorptivité molaire des chromophores (Phe, Tyr et Trp) dans les protéines [35]

La mesure de l'absorbance à 280 nm a donc été la première méthode que nous avons testée pour quantifier la trypsine résiduelle après immobilisation par réticulation avec GA. La Fig 5.3 représente une superposition des spectres d'absorption de la trypsine (0.15 mg/mL) et du glutaraldéhyde (0.3%) dans le tampon d'immobilisation, soit le phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8.



**Figure 5.3.** Spectres d'absorption de la trypsine (—) et du glutaraldéhyde (----) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8

Comme le montre la Fig. 5.3, la mesure de l'absorbance à 280 nm comme méthode de dosage de la trypsine en présence de glutaraldéhyde est difficilement applicable puisque le réactif d'immobilisation, ajouté en excès lors de la réaction, montre une large bande d'absorption dans cette région. Par ailleurs, il est également impossible d'évaluer la concentration en trypsine par mesure de l'absorbance des liens peptidiques, qui se situe entre 190 et 220 nm puisque le glutaraldéhyde absorbe également dans cette région.

Il existe plusieurs méthodes colorimétriques pour le dosage des protéines, les plus populaires étant la méthode de Biuret [28], la méthode de Lowry [29], la méthode de Bradford (bleu de Coomassie) [30] et la méthode BCA [31]. Sapan *et al.* [36] ont publié une revue de littérature critique concernant ces méthodes. Brièvement, la méthode de Biuret est basée sur la formation d'un complexe coloré à la suite de la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les liens peptidiques, en solution alcaline. La méthode de Lowry est une amplification de la réaction de Biuret. En plus de la réduction du cuivre par les liens peptidiques, la coloration de la solution est intensifiée par le réactif de Folin-Ciocalteu [37], qui réagit avec les chaînes latérales des résidus Tyr et Trp pour donner un complexe qui absorbe à la même longueur d'onde. La méthode de Bradford implique l'interaction d'un colorant, le bleu de Coomassie G-250, avec les protéines, plus particulièrement avec les résidus Arg et Lys [38, 39]. La méthode BCA est une variante de la méthode de Lowry. Elle consiste à détecter les ions  $\text{Cu}^+$ , générés lors de la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  par les protéines, par formation d'un chélate avec l'acide bicinchoninique (complexe absorbant à 562 nm).

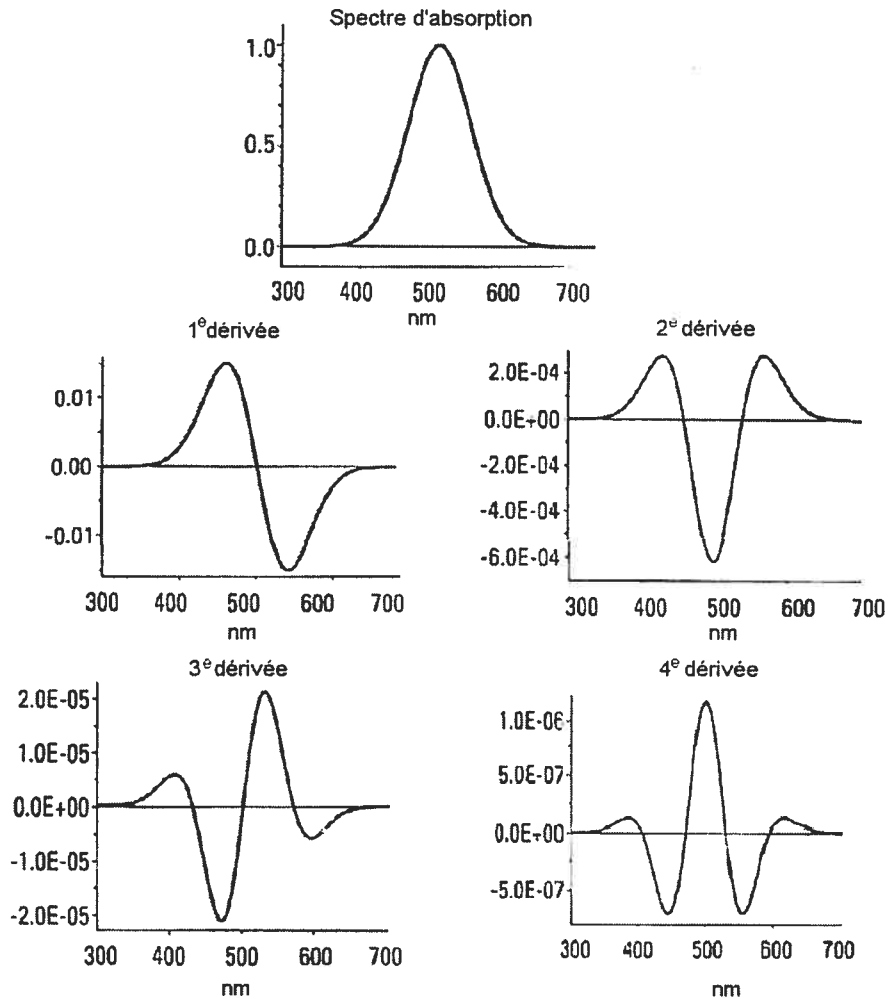
Les méthodes de Biuret, Lowry et BCA impliquent l'utilisation de cuivre. Toutefois, un test qualitatif pour détecter la présence d'aldéhydes est la réaction avec la liqueur de Fehling. Cette solution est constituée d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  en solution alcaline, et présence d'aldéhydes, un précipité rouge-brique d'oxyde de cuivre est formé (Fig. 5.4). La quantification indirecte de la trypsine par ces trois méthodes, en présence d'un dialdéhyde tel que GA, n'était donc pas possible.



**Figure 5.4.** Réaction des aldéhydes avec le cuivre

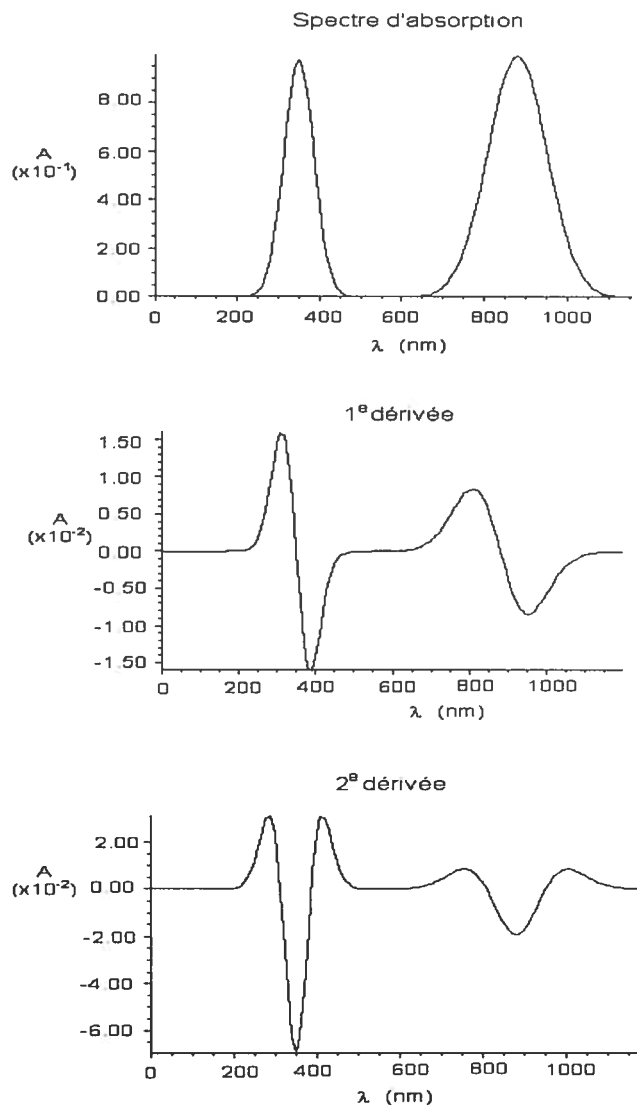
La méthode de Bradford, quant à elle, présente un inconvénient majeur, puisqu'elle fournit une réponse variable selon la nature de la protéine [40, 41]. Même si plusieurs modifications de la méthode originale ont été proposées afin de diminuer cette variabilité [42-44], la trypsine demeure encore l'une des protéines qui donne une réponse faible avec le bleu de Coomassie. La quantification indirecte de la trypsine, après immobilisation par réticulation avec GA, étant difficilement réalisable par les méthodes colorimétriques généralement utilisées pour le dosage des protéines, nous nous sommes tournés vers la spectrophotométrie différentielle.

La spectrophotométrie différentielle, qui se traduit par la différentiation d'une courbe expérimentale, a été introduite au début des années 1950 [45, 46]. Les spectres de dérivées sont générés par le calcul de la différence entre l'absorption d'un échantillon à une longueur d'onde donnée,  $A(\lambda)$  et celle du même échantillon à une longueur d'onde déplacée d'un intervalle fini ( $\Delta\lambda$ ),  $A(\lambda + \Delta\lambda)$ , et ce jusqu'à atteindre l'ordre de dérivée ( $n$ ) souhaité. Chaque valeur différentielle ainsi obtenue est assignée à la longueur d'onde à mi-chemin entre  $\lambda$  et  $(\lambda + \Delta\lambda)$ , soit  $(\lambda + \Delta\lambda)/2$ . Comme la dérivée correspond à la pente du signal original, la dérivée sera soit positive (signal croissant), négative (signal décroissant) ou nulle (au maximum d'absorption). La différentiation d'un spectre d'absorption est généralement effectuée par le logiciel contrôlant les spectrophotomètres modernes. La plupart des logiciels utilisent l'algorithme de Savitsky-Golay [47], qui génère des spectres dont l'allure dépend de l'ordre de la dérivée. En effet, pour le maximum d'absorption d'un spectre, la dérivée d'ordre impair correspond à un passage par zéro, tandis que la dérivée d'ordre pair correspond à une valeur extrême (minimum ou maximum), comme le montre la Fig. 5.5.



**Figure 5.5.** Spectres de dérivée d'une bande d'absorbance gaussienne [48]

Une propriété importante de la différentiation d'un spectre d'absorption est l'effet de la largeur du pic sur l'amplitude de la dérivée. En effet, la spectrophotométrie différentielle permet de distinguer un pic d'absorption large d'un autre, plus étroit. La Fig. 5.6 montre deux pics de même amplitude dans le spectre d'absorption original et l'effet successif de deux ordres de différentiation.

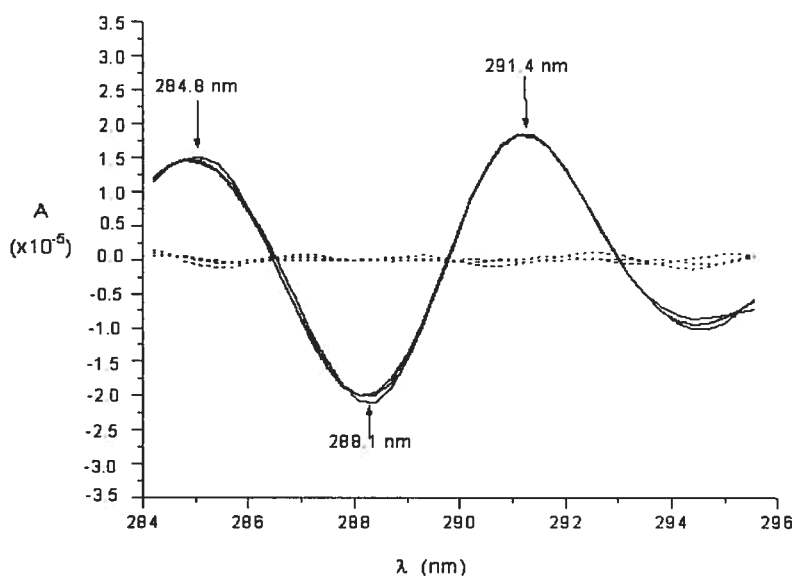


**Figure 5.6.** Effet de la largeur de la bande (spectre d'absorption) sur l'amplitude de la dérivée [49]

Comme il est possible de le constater, un pic large donne, après différentiation, une amplitude plus faible que celle obtenue pour un pic étroit, cet effet s'amplifiant lorsque que l'ordre de la différentiation croît. De façon générale, l'amplitude d'un pic gaussien dérivé d'un ordre  $n$  est inversement proportionnel à la  $n^{\text{ème}}$  puissance de la largeur de ce pic [48, 50]. Étant donné la différence significative entre les largeurs de bandes des spectres d'absorption de la trypsine et du glutaraldéhyde (Fig. 5.3), la spectrophotométrie différentielle était donc une approche viable pour le dosage de la trypsine en présence de GA, sans avoir à séparer les deux composés. Nous avons opté pour la spectrophotométrie de 4<sup>e</sup> dérivée puisque celle-ci représente le meilleur compromis entre une augmentation de

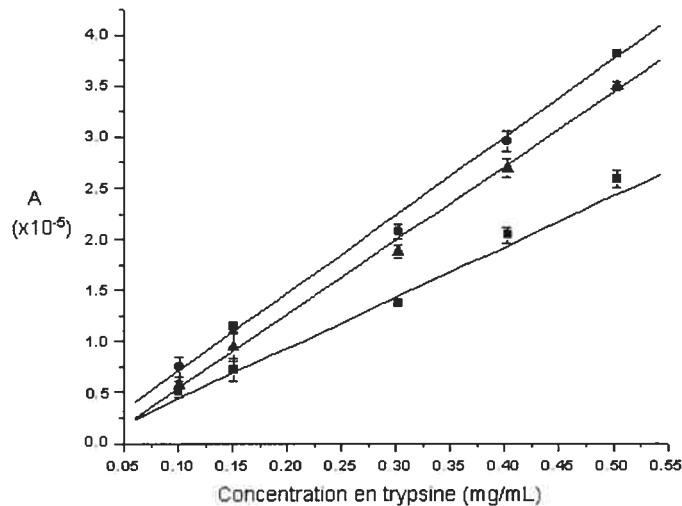
la résolution et une diminution du rapport signal-sur-bruit qui accompagne les spectres de dérivée de plus haut ordre. Cette technique avait initialement été développée pour étudier séparément les résidus Trp et Tyr, dont les bandes d'absorption montraient un chevauchement [51]. Par la suite, elle a été appliquée à la quantification des protéines en présence de composés cellulaires non protéiques (les acides nucléiques, par exemple) [52] et à la détermination du nombre de résidus Trp et Tyr dans les protéines [53, 54].

La Fig. 5.7 montre les spectres respectifs de 4<sup>e</sup> dérivée de la trypsine et de GA, ceux-ci ayant été pris en triplicata pour s'assurer de la reproductibilité des analyses.



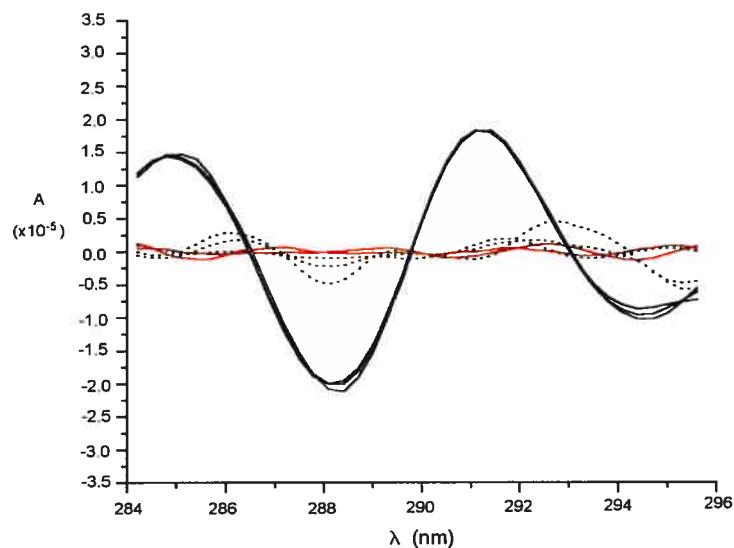
**Figure 5.7.** Spectres de 4<sup>e</sup> dérivée de la trypsine (—) et du glutaraldéhyde (---) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8

Comme il est possible de le constater, GA n'interfère plus dans le dosage de la trypsine. La trypsine peut donc être quantifiée à trois longueurs d'onde, soit 284.8 nm, 288.1 nm et 291.4 nm. En principe, les ordres pairs peuvent être utilisés d'une manière quantitative parce que l'intensité des extrêmes (minimum ou maximum) obéit à la loi de Beer-Lambert et varie linéairement avec la concentration [51], comme le confirme les excellents résultats d'étalonnage qui ont été obtenus pour la trypsine (Fig. 5.8).



**Figure 5.8.** Droites d'étalonnage direct de la trypsine dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8, à trois longueurs d'onde : 284.8 nm (■), 288.1 nm (●) et 291.4 nm (▲). Les équations des droites sont respectivement :  $y = 4.94 \cdot 10^{-5}x - 5.60 \cdot 10^{-7}$ ,  $R^2 : 0.984$ ;  $y = 7.63 \cdot 10^{-5}x - 5.35 \cdot 10^{-7}$ ,  $R^2 : 0.997$ ;  $y = 7.23 \cdot 10^{-5}x - 1.81 \cdot 10^{-6}$ ,  $R^2 : 0.998$ .

Les droites d'étalonnage de la trypsine montrent une très bonne linéarité aux trois longueurs d'onde d'analyse. La Fig. 5.9 représente un exemple de l'analyse du surnageant pour détecter et quantifier la trypsine après la réaction d'immobilisation avec GA.



**Figure 5.9.** Superposition des spectres de 4<sup>e</sup> dérivée de la trypsine (—), du glutaraldéhyde (----) et du surnageant de réaction après immobilisation (—) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8

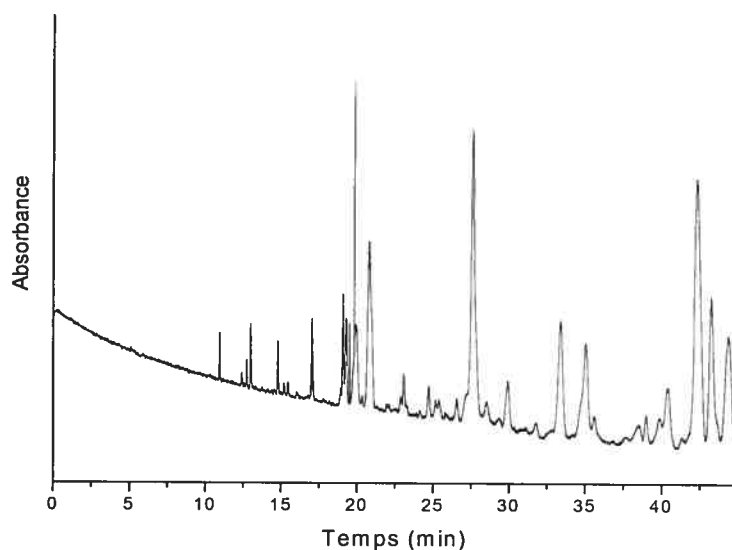
D'après la Fig. 5.9, on peut estimer qu'il ne reste plus de trypsine dans le surnageant après la réaction d'immobilisation ou que la quantité restante est sous la limite de détection de cette méthode spectrophotométrique. Des résultats similaires sont également obtenus après analyse des volumes de tampon (avec et sans NaCl) utilisés pour laver le produit immobilisé, ce qui nous permet de croire que le rendement d'immobilisation de la méthode d'immobilisation par réticulation avec GA présentée dans ce chapitre est au moins supérieur à 95%.

### **5.7. Utilisation de la trypsine immobilisée**

Après avoir déterminé le rendement d'immobilisation de la procédure développée, nous avons utilisé la trypsine immobilisée pour la protéolyse d'une protéine standard, la  $\beta$ -caséine. La  $\beta$ -caséine, comme les autres membres de la famille des caséines, est une protéine bien caractérisée [55]. Elle représente l'un des quatre constituants majeurs des caséines du lait, ce qui équivaut à 25-35% des caséines totales. Elle est constituée de 209 acides aminés (poids moléculaire entre 23 000 et 24 000 Da), dont 5 résidus Ser phosphorylés, et en solution aqueuse, elle ne montre que très peu de structure secondaire ou tertiaire [56]. En raison des caractéristiques intéressantes de la  $\beta$ -caséine, nous avons choisi cette protéine afin de tester la trypsine immobilisée par réticulation avec GA.

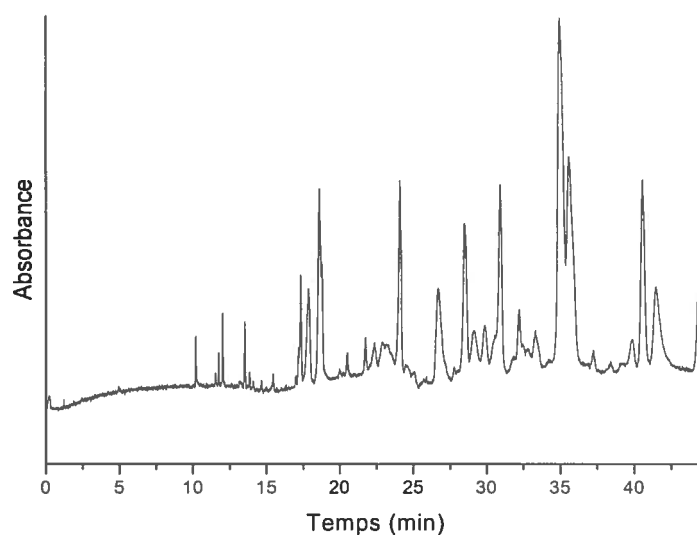
La protéolyse homogène (trypsine soluble) de la  $\beta$ -caséine native a été effectuée dans un tube à microcentrifugation et les peptides ont été séparés par CZE (Fig. 5.10). Cette carte peptidique sera utilisée comme référence pour comparer les résultats provenant de la protéolyse hétérogène utilisant la trypsine immobilisée. Une protéolyse tryptique idéale de la  $\beta$ -caséine devrait donner 14 peptides. Toutefois, la Fig. 5.10 montre plus de pics que le nombre attendu. Malheureusement, la trypsine peut contenir des impuretés, ce qui peut occasionner des clivages autres que tryptiques ou la génération de peptides contenant un site de coupure. Par ailleurs, Bonneil [57] a proposé que la présence d'isoformes de la  $\beta$ -caséine, en plus des pics d'autolyse de la trypsine, pourrait être responsable des pics supplémentaires puisque la  $\beta$ -caséine vendue commercialement est pure à environ 90%.





**Figure 5.10.** Carte peptidique par CZE de la protéolyse homogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8, pendant 24 h, à 37 °C et avec un rapport enzyme:substrat de 1:25. Les conditions de séparations sont celles décrites dans la partie expérimentale, Chap. 4, section 4.2.2.

La Fig. 5.11 représente la protéolyse hétérogène obtenue avec la trypsine immobilisée.



**Figure 5.11.** Carte peptidique par CZE de la protéolyse hétérogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM, pH 8, pendant 2 h, à 37 °C. Les conditions de séparations sont celles décrites à la Fig 5.10.

La Fig. 5.11 montre que la trypsine immobilisée permet d'obtenir une carte peptidique de la  $\beta$ -caséine en seulement 2 h, comparativement à la protéolyse homogène qui peut demander jusqu'à 24 h. Il est également possible de constater que la carte peptidique de la Fig. 5.11 contient elle aussi plus de pics que prévu, ce qui peut supporter l'hypothèse de Bonneil sur l'origine de ceux-ci.

### 5.7.1. Reproductibilité des analyses

La cartographie peptidique est intimement liée à la reproductibilité du système analytique utilisé pour la séparation des peptides puisqu'une simple variation des temps de rétention pourrait être interprétée comme une modification de la composition en acides aminés d'une protéine. Cette réalité pose donc des exigences considérables non seulement à l'expérimentateur, mais aussi à l'appareil et aux conditions d'analyse. En effet, le tampon doit être préparé avec soin, la température doit être stable et le capillaire doit être correctement conditionné. Par ailleurs, nous avons opté pour un tampon d'analyse de faible pH afin de minimiser l'adsorption des peptides sur les parois du capillaire et de diminuer les variations du flux électro-osmotique. Le Tableau 5.3 regroupe les résultats obtenus pour trois analyses successives du même digestat.

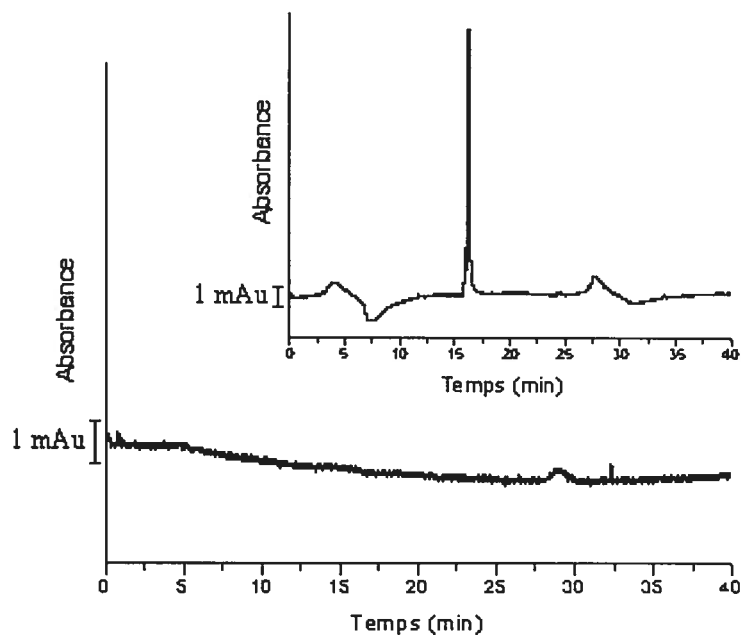
**Tableau 5.3.** Reproductibilité des temps de migration en CZE pour la cartographie peptidique de la  $\beta$ -caséine native

Temps de migration moyen (min)	Écart-type relatif (%)	Temps de migration moyen (min)	Écart-type relatif (%)
10.45	0.19	27.12	0.62
11.77	0.20	29.35	0.63
12.09	0.21	30.59	0.72
12.30	0.26	31.17	0.59
13.49	0.15	32.51	0.69
13.92	0.28	33.57	0.72
17.69	0.27	34.32	0.73
17.85	0.35	36.25	0.83
18.42	0.33	36.63	0.83
19.12	0.42	38.33	0.75
21.03	0.43	42.36	0.93
22.41	0.45	42.92	0.97
24.77	0.53		
Écart-type relatif moyen : 0.5 % (n=3)			

Le Tableau 5.3 montre que nous avons obtenu un écart-type relatif moyen de 0.5%, ce qui représente une excellente reproductibilité des temps de migration, et ce, même si ce sont les données brutes (temps non corrigés) qui ont été considérés.

### 5.7.2. Reproductibilité de la protéolyse

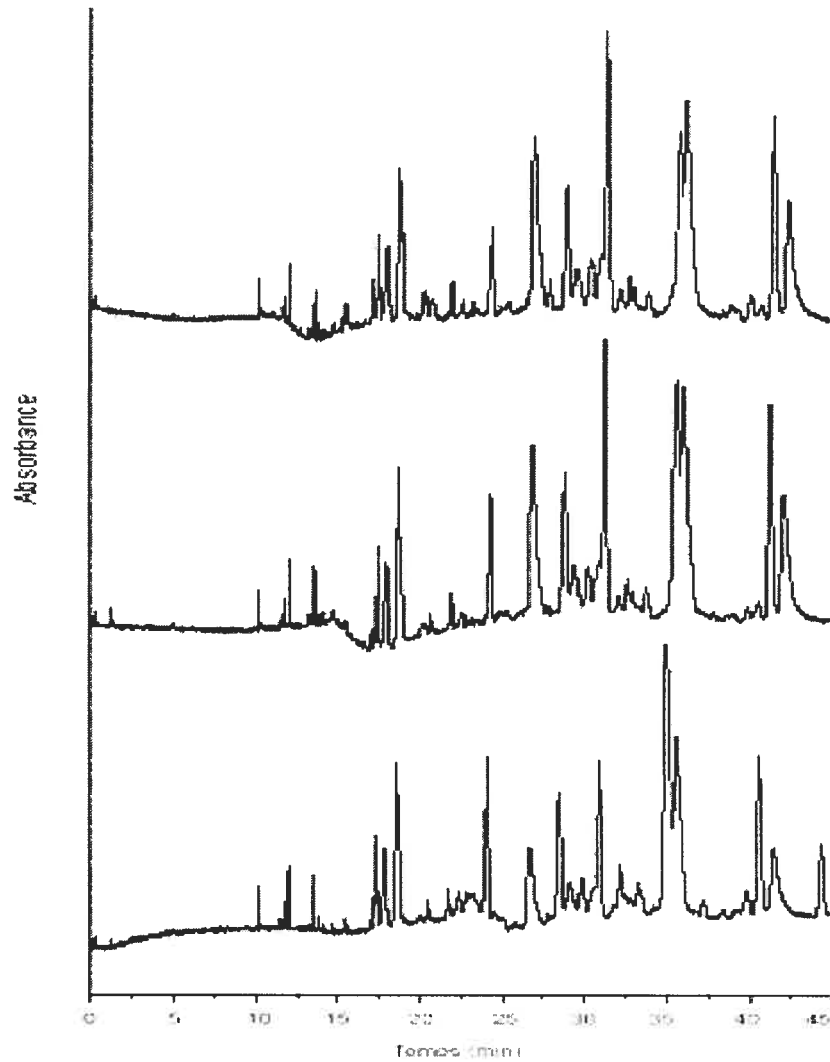
L'utilisation des enzymes immobilisées possède l'avantage d'augmenter la concentration en enzyme par rapport à la concentration en substrat, tout en minimisant l'autolyse de l'enzyme [58]. Nous avons donc effectué un blanc de protéolyse (Fig. 5.12), c'est-à-dire une protéolyse sans substrat, afin de détecter la présence potentielle de pics d'autolyse.



**Figure 5.12.** Blanc de protéolyse hétérogène et, en médaillon, la trypsine soluble (solution fraîche), séparées dans les conditions de séparation de la Fig. 5.10.

La Fig. 5.12 montre que le blanc de protéolyse ne contient pas de trypsine, ni de pic résultant de l'autolyse de celle-ci, ce qui signifie que les pics observés dans les cartes peptidiques proviennent bien de la protéolyse de la  $\beta$ -caséine (et potentiellement de ses isoformes).

La reproductibilité de protéolyse de la trypsine immobilisée a été vérifiée en effectuant trois protéolyses consécutives de solutions de  $\beta$ -caséine (2 mg/mL) avec la même préparation enzymatique (Fig. 5.13)



**Figure 5.13.** Reproductibilité de la protéolyse hétérogène de la  $\beta$ -caséine native (2 mg/mL). Les conditions de protéolyse et de séparation des peptides sont identiques à celles de la Fig. 5.11.

La Fig. 5.13 montre que la trypsine immobilisée génère de façon reproductible des peptides lors de la protéolyse de la  $\beta$ -caséine. Comme les résultats obtenus pour cette protéine étaient très encourageants, nous avons décidé de poursuivre les recherches avec la procédure d'immobilisation développée, dont les principaux paramètres sont résumés dans le Tableau 5.4.

**Tableau 5.4.** Conditions expérimentales développées lors de l'étude

<b>Paramètres</b>	
Composition du tampon	Phosphate de sodium (pH 6.8)
Molarité du tampon (mM)	50
Concentration en trypsine (mg/mL)	3
Concentration en GA (% m/v)	0.3
Rapport molaire trypsine:GA	1 :250
Température (°C)	25
Temps d'immobilisation (h)	2

Le chapitre qui suit est divisé en deux parties, soit deux articles soumis à des journaux scientifiques. Ces articles comparent deux méthodes d'immobilisation de la trypsine avec GA, soit par réticulation et par fixation sur des particules CPG, pour la protéolyse de deux protéines standards.

### 5.8. Références

- [1] Monsan, P. In *Les Enzymes : Production et Utilisations Industrielles*; Durand, G., Monsan, P., Eds.; Gauthiers-Villars Bordas: Paris, 1982, pp 80-118.
- [2] Broun, G. B. In *Methods Enzymol.*; Mosbach, K., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1976; Vol. XLIV, pp 263-280.
- [3] Habeeb, A. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264-268.
- [4] Ogata, K.; Ottesen, M.; Svendsen, I. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *159*, 403-405.
- [5] Avrameas, S.; Ternynck, T. *Immunochem.* **1969**, *6*, 53-66.
- [6] Jansen, E. F.; Olson, A. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, *129*, 221-227.

- [7] Schejter, A.; Bar-Eli, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *136*, 325-330.
- [8] Jansen, E. F.; Tomimatsu, Y.; Olson, A. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *144*, 394-400.
- [9] Bano, B.; Saleemuddin, M. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **1980**, *17*, 12-17.
- [10] Chui, W. K.; Wan, L. S. *J. Microencapsulation* **1997**, *14*, 51-61.
- [11] Tomimatsu, Y.; Jansen, E. F.; Gaffield, W.; Olson, A. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, *36*, 51-64.
- [12] Abouchakra, H. Communications personnelles.
- [13] Fortes, P. A. G. In *Probes Struct. Funct. Macromol. Membranes*; Chance, B., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1971, pp 279-282.
- [14] Monsan, P.; Puzo, G.; Mazarguil, H. *Biochimie* **1975**, *57*, 1281-1292.
- [15] Carrey, E. A. In *Protein Structure : a Practical Approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: Oxford (UK), 1990, pp 117-144.
- [16] Bullock, G. R. *J. Microsc.* **1984**, *133 Pt 1*, 1-15.
- [17] Hopwood, D. *Histochemie* **1969**, *17*, 151-161.
- [18] Hopwood, D. *Histochemie* **1970**, *24*, 50-64.
- [19] Hopwood, D. *Histochem. J.* **1972**, *4*, 267-303.
- [20] Avrameas, S. *Immunochem.* **1969**, *6*, 43-52.
- [21] Ford, D. J.; Radin, R.; Pesce, A. J. *Immunochem.* **1978**, *15*, 237-243.
- [22] Jeanson, A.; Cloes, J. M.; Bouchet, M.; Rentier, B. *Anal. Biochem.* **1988**, *172*, 392-396.
- [23] Kawahara, J.; Ohmori, T.; Ohkubo, T.; Hattori, S.; Kawamura, M. *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 94-98.
- [24] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: San Diego (CA), 1996.
- [25] Briand, J. P.; Muller, S.; van Regenmortel, M. H. *J. Immunol. Methods* **1985**, *78*, 59-69.
- [26] Power, E. G. M.; Russel, A. D. *J. Appl. Bacteriol.* **1990**, *69*, 261-268.
- [27] Taylor, J. F. *The Isolation of Proteins*; Academic Press: New York (NY), 1953.
- [28] Gornall, A. G.; Bardawill, C. J.; David, M. M. *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751-766.
- [29] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.

- [30] Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [31] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermansen, G. T.; Malia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- [32] Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry. Part II : Techniques for the study of biological structure and function*; Freeman: San Francisco (CA), 1980.
- [33] Aitken, A.; Learmonth, M. In *The Protein Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Humana Press: Totowa (NJ), 1996, pp 3-6.
- [34] Creighton, T. E. *Proteins, Structures and Molecular Properties*; Freeman: New York (NY), 1983.
- [35] <http://www.food.rdg.ac.uk/online/fs460/lecture6/lecture6.html>.
- [36] Sapan, C. V.; Lundblad, R. L.; Price, N. C. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 99-108.
- [37] Folin, O.; Ciocalteu, V. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 627-650.
- [38] Compton, S. J.; Jones, C. G. *Anal. Biochem.* **1985**, *151*, 369-374.
- [39] Congdon, R. W.; Muth, G. W.; Splittgerber, A. G. *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 407-413.
- [40] Pierce, J.; Suelter, C. H. *Anal. Biochem.* **1977**, *81*, 478-480.
- [41] van Kley, H.; Hale, S. M. *Anal. Biochem.* **1977**, *81*, 485-487.
- [42] Read, S. M.; Northcote, D. H. *Anal. Biochem.* **1981**, *116*, 53-64.
- [43] Friedenauer, S.; Berlet, H. H. *Anal. Biochem.* **1989**, *178*, 263-268.
- [44] Stoscheck, C. M. *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 111-116.
- [45] Morrison, J. D. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 1767.
- [46] Giese, A. T.; French, C. S. *Appl. Spectrosc.* **1955**, *9*, 78-96.
- [47] Savitzky, A.; Golay, M. J. E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627-1639.
- [48] Owen, T. *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy : A Primer*; Hewlett Packard: Waldbronn (Allemagne), 1996.
- [49] <http://www.wam.umd.edu/~toh/spectrum/Differentiation.html>.
- [50] Padros, E.; Dunach, M.; Morros, A.; Sabés, M.; Manosa, J. *Trends Biochem. Sci.* **1984**, *9*, 508-510.
- [51] Talsky, G.; Mayring, L.; Kreuzer, H. *Angew. Chemie* **1978**, *17*, 785-799.

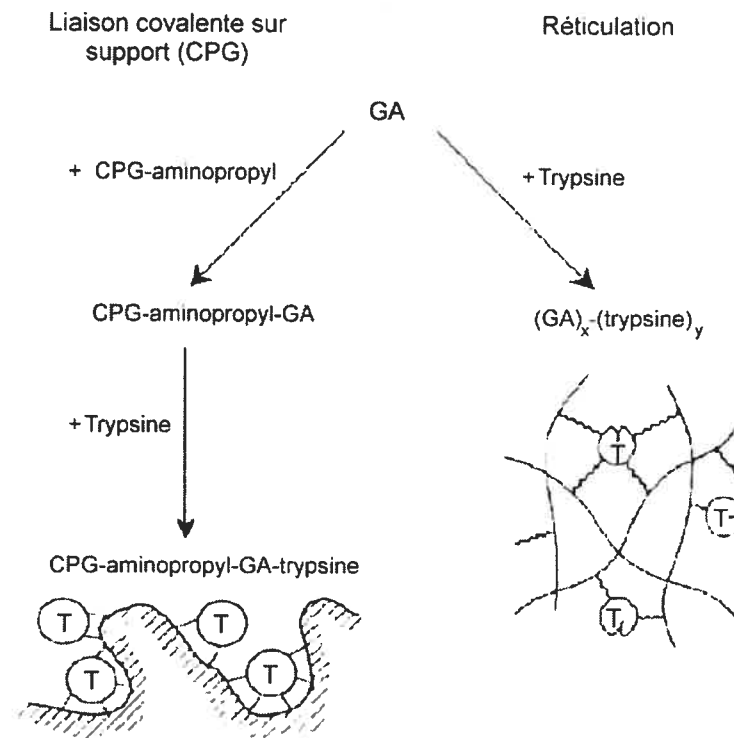
- [52] Wilson, C.; Matthews, F.; Greasham, R. L.; Will, M.; Copeland, R. A. *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 141-145.
- [53] Fletouris, D. J.; Botsoglou, N. A.; Papageorgiou, G. E.; Mantis, A. J. *J. AOAC Int.* **1993**, *76*, 1168-1173.
- [54] Bray, M. R.; Carriere, A. D.; Clarke, A. J. *Anal. Biochem.* **1994**, *221*, 278-284.
- [55] Swaisgood, H. E. In *Advanced Dairy Chemistry: Proteins*; Fox, P. F., Ed.; Elsevier Appl. Sci.: London (UK), 1992, pp 63-96.
- [56] Ribadeau-Dumas, B.; Brignon, G.; Grosclaude, F.; Mercier, J.-C. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *25*, 505-514.
- [57] Bonneil, E. Thèse de doctorat, Université de Montréal, Montréal, 2000.
- [58] Craft, D.; Li, L. *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 537-547.



## **Chapitre 6**

**Applications de la trypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde (GA)**

Les deux principales méthodes d'immobilisation d'enzymes utilisant GA (Fig. 6.1) sont la réticulation, qui est le sujet de ce mémoire, et la liaison covalente sur un support tel que des particules de verre poreux (CPG), qui fait l'objet de recherches dans le laboratoire du Pr. Karen Waldron [1].



**Figure 6.1.** Immobilisation de la trypsine avec GA, par liaison covalente sur CPG et par réticulation

L'utilisation d'un support pour l'immobilisation d'une enzyme est attribuée à Nelson et Griffin, qui immobilisèrent la première enzyme en 1916 [2]. Par ailleurs, l'immobilisation par liaison covalente sur un support est la méthode la plus répandue et la plus étudiée [3]. Nous avons donc décidé de comparer la méthode d'immobilisation par réticulation que nous avons développée avec celle impliquant des liaisons covalentes sur CPG. Le premier article de ce chapitre est surtout axé sur la caractérisation des enzymes immobilisées par les deux méthodes, tout en montrant son application pour la cartographie peptidique d'une protéine standard, l'hémoglobine humaine normale (HbA) retrouvée chez l'adulte. Nous avons opté pour cette protéine puisque, contrairement à la  $\beta$ -caséine, HbA est une protéine plus volumineuse (environ 64 kDa) qui possède une structure quaternaire. En ce qui

concerne le second article, il représente plutôt une application de la trypsine immobilisée par les deux méthodes pour la cartographie peptidique d'une autre protéine standard, le lysozyme de poulet. Cette petite protéine (14.3 kDa) a été choisie en raison de sa protéolyse tryptique facile après la réduction/alkylation de ses 4 ponts disulfures.

### **6.1. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry**

Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Joëlle Vihn, Michel J. Bertrand and Karen C. Waldron, *Electrophoresis* **2004**, .25 (9), 1367-1378.

#### 6.1.1. Summary

Stabilization of proteolytic enzymes, especially by immobilization, is of considerable interest because of their potential applications in medicine and the chemical and pharmaceutical industries. We report here a detailed comparison of two procedures for trypsin immobilization using the same homobifunctional agent, glutaraldehyde, for the purpose of peptide mapping. These methods include covalent coupling either to controlled pore glass (solid support) or via a crosslinking reaction (without any solid support). The immobilized trypsin preparations were characterized by the determination of immobilization efficiency, which ranged from 68 to more than 95%, and measurement of apparent kinetic parameters toward a synthetic peptide-like substrate. Batch digestions of whole denaturated human normal adult hemoglobin (HbA) were performed to obtain peptide maps by capillary zone electrophoresis (CZE). Migration time reproducibility of the CZE maps was excellent, with a mean relative standard deviation of 1.5%. Moreover, the two immobilized enzyme preparations showed excellent reproducibility for repeated digestions. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-mass spectrometry was also used for peptide mass mapping of denaturated HbA digested using the two immobilized trypsin preparations. Even though the two immobilized trypsin preparations do not behave identically, similar sequence coverages of 57% and 61% (for the two HbA chains merged) were achieved for the support-based and crosslinked trypsin preparations, respectively.

### 6.1.2. Introduction

Hemoglobin is a 64 kDa globular protein that transports oxygen in human blood from the lungs to the tissues of the body. In its native form, 97% of normal adult hemoglobin (HbA) exists as a noncovalent tetramer composed of two  $\alpha$ -chains (each with 141 residues) and two  $\beta$ -chains (each with 146 residues) [4]. Hemoglobin disorders arise due to structural changes in the chains and are responsible for a number of disease states. Essentially, several types of structural modifications may occur in abnormal hemoglobin such as amino acid substitution, deletion of an amino acid and elongation of a chain. Moreover, single amino acid substitution causes ~95% of globin structural abnormalities [5]. Peptide mapping is a powerful tool used in protein characterization because it provides a unique “fingerprint” that can be used for comparison and thus determination of small differences between individual proteins.

Peptide mapping typically employs HPLC with UV-detection to detect peptides by their elution times. During the last 15 years, CZE has become a complementary method because of its different selectivity for separating peptides and its advantages such as high resolution and efficiency [6, 7]. More recently, mass spectrometry (MS) is the method of choice for rapid peptide mapping because it leads to the identification of proteins [8-11]. The first step in peptide mapping involves the chemical and/or enzymatic treatment of a protein resulting in the formation of peptide fragments. This is followed by their reproducible separation and detection. Trypsin is the most commonly used endoprotease due to its highly specific cleavage (C-terminal side of Arg and Lys residues) resulting in a limited number of medium-sized tryptic peptides. However, when carried out in solution, tryptic digestions present disadvantages like quick loss of catalytic activity, autoprolysis, long incubation time, and single use. Immobilized enzymes are thus of great interest because of their possible reusability and easy removal from the digestion medium. Immobilized enzymes are defined as enzymes with restricted mobility, including enzyme modification into a water-insoluble form by a suitable technique [3]. Many immobilization methods are reported in the literature [12]. Among the arsenal of reagents used for this purpose, glutaraldehyde (GA) is often chosen because of its ability to react rapidly with primary amines, and thus with proteins [3, 13]. Even though the reaction

mechanism of GA with amines is not fully understood and still the subject of debate [14], this fact is generally transparent to most practitioners of protein immobilization [15, 16].

The versatility of GA allows its use for the two different immobilization techniques presented in this work: (i) linkage of the enzyme onto a solid support, *e.g.*, controlled pore glass (CPG), and (ii) intermolecular crosslinking of enzyme molecules without any solid support. Characterization of the immobilized trypsin preparations was achieved by the determination of enzyme content, kinetic parameters, and pH-activity profile. Because peptide mapping is a comparative technique, we assessed the reproducibility of CZE as an analytical technique as well as the digestion reproducibility of the immobilized enzyme preparations with HbA as protein standard. Moreover, MALDI-TOF-MS data were examined and used to compare the batch digestions made with CPG-GA-trypsin, GA-crosslinked trypsin, and soluble (free) trypsin.

### 6.1.3. Materials and methods

#### 6.1.3.1. Chemicals

HbA and TPCK-treated trypsin (bovine pancreas; 12 700 *N*- $\alpha$  benzoyl-L-arginine ethyl ester units, U BAEE, per mg) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. Glycine, aminopropylated CPG (80-120 mesh, 700 Å average pore size, 35 m<sup>2</sup>/g specific surface area), iodoacetamide, sodium chloride, sodium hydroxide, monobasic sodium phosphate, ammonium bicarbonate, *N*- $\alpha$  *p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME), sodium cyanoborohydride (NaCNBH<sub>3</sub>), and urea were from Sigma-Aldrich.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), purified by recrystallization from ethanol, and formic acid (FA) were purchased from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). Glutaraldehyde (25% w/v aqueous solution), phosphoric acid and dithiothreitol (DTT) were from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were purchased from Fluka (Oakville, ON, Canada). Dibasic sodium phosphate was obtained from Omega Chemicals (Lévis, QC, Canada). Acetonitrile (ACN) was purchased from VWR (Montréal, QC, Canada). ZipTip<sup>®</sup><sub>C18</sub> microextraction pipet tips were obtained from Millipore (St-Quentin-en-Yvelines, France). Hydrochloric acid was from Anachemia (Montréal, QC, Canada). Microcentrifuge tubes (0.6, 1.5, and 2.0 mL) were bought from Fisher Scientific (Nepean,

ON, Canada). Fused-silica (f.s.) capillary tubing was obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). In-house distilled water was purified by passing it through a multi-cartridge Millipore water filtration/deionization system (Milford, MA, USA) before use.

#### 6.1.3.2. Procedures

##### *CZE separations*

CZE peptide maps were obtained on a P/ACE™ MDQ System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) with a 60 cm long (50 cm to the detector) uncoated fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  ID, 360  $\mu\text{m}$  OD). The background electrolyte (BGE) was 50 mM monobasic sodium phosphate titrated to pH 2.5 with phosphoric acid. The capillary was flushed sequentially with 0.1 M NaOH, water, 0.1 M HCl, and then with BGE between runs. Injection of *ca.* 5 nL was accomplished by pressure at 0.5 psi (3.4 kPa) for 5 s. Peptides were separated at 15 kV (25  $\mu\text{A}$ ) at 25 °C and detected by UV absorption at 200 nm.

##### *Mass Spectrometry*

Dried hemoglobin digests were reconstituted in *ca.* 30  $\mu\text{L}$  1 % FA then desalted using ZipTips. The ZipTip loaded with *ca.* 10  $\mu\text{L}$  of digest was subjected to washing steps with 1 % FA (3  $\times$  4  $\mu\text{L}$ ) to remove unadsorbed components (*e.g.*, denaturing agents and buffer salts) followed by a two-step elution of the adsorbed peptides from the tip in: (i) 4  $\mu\text{L}$  50:50 v/v ACN:1 % FA, then (ii) 4  $\mu\text{L}$  80:20 v/v ACN:1 % FA. Prior to analysis by MALDI, eluted peptides were lyophilized and reconstituted with 5  $\mu\text{L}$  1 % FA and diluted 30-fold with 0.1 % TFA. The MALDI matrix used was 10 mg/mL recrystallized CHCA in a solution of 2:1 v/v ACN:0.1 % TFA. A 9:1 v/v matrix/analyte mixture (1  $\mu\text{L}$ ) was spotted on the MALDI target and allowed to air-dry. Spectra were acquired using external calibration in positive ion mode using a Voyager DE-STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a 337 nm N<sub>2</sub> laser. Data processing was performed with Data Explorer™ software package (Applied Biosystems). Sequence coverage for mass maps was obtained using ProFound version 4.10.5 [17, 18], one of the many available sequence database search engines.

*Covalent binding on CPG (solid support immobilization technique)*

TCPK-treated trypsin was covalently coupled to the CPG support using a modification of the GA coupling procedures described by Jiang [16] and Oh [19], as follows. Fifty mg of aminopropylated CPG particles were shaken with 1.500 mL 1 % GA diluted in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, for 2 h at room temperature. The activated carrier thus obtained was washed with the same buffer ( $3 \times 0.5$  mL) and treated with 15  $\mu$ L trypsin solution (0.1 mM trypsin in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 8.4) containing 10 mM NaCNBH<sub>3</sub> and allowed to react for 3 h at room temperature with gentle shaking. The trypsin-loaded particles were then washed with the pH 7.0 buffer to which 500 mM NaCl was added ( $3 \times 0.5$  mL), and then buffer only ( $3 \times 0.5$  mL). The reaction supernatant and all wash solutions were recovered for determination of noncovalently bound trypsin. Next, the free (*i.e.*, unreacted) aldehyde groups on the support were deactivated by treatment with 1.500 mL of 200 mM glycine for 1 h. The particles were then washed again as above. The CPG-GA-trypsin particles were stored at 4°C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0.

*Crosslinking (supportless immobilization technique)*

The method used for trypsin immobilization by crosslinking with GA is based on Habeeb's work [15], with modifications as follows. To 1.640 mL of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, was added 0.200 mL of freshly prepared 1.3 mM aqueous trypsin solution. Next, 0.235 mL of 2.5% GA diluted in the same buffer was added dropwise as the solution was being stirred. After a few minutes, a yellowish solid formed and the reaction was allowed to stand at room temperature for 2 h. The mixture was then centrifuged for 2 min at 3000 rpm and the supernatant (containing excess GA and perhaps some noncovalently bound trypsin) was removed for analysis of trypsin content. The immobilized enzyme preparation was washed with the immobilization buffer ( $3 \times 1$  mL), followed by buffer solution containing 500 mM NaCl ( $3 \times 1$  mL) and then buffer alone ( $3 \times 1$  mL). All wash solutions were recovered for determination of unbound trypsin. The reaction was stopped by addition of 1.000 mL of 200 mM glycine and allowed to stand for 3 h at room temperature. The mixture was washed with buffer ( $3 \times 1$  mL) and then water

(3 × 1 mL) to remove traces of unbound glycine. The GA-crosslinked trypsin was stored at 4°C in water until its use.

#### *Quantification of immobilized trypsin*

The total protein content of immobilized trypsin preparations was evaluated using a Cary 100 Bio UV/Vis Spectrophotometer (Varian, St-Laurent, QC, Canada) with Cary WinUV<sup>®</sup> software. For both enzyme immobilization procedures, the difference between initial amount of trypsin in the reaction medium (*i.e.*, at time zero) and any trypsin recovered after the immobilization reaction (*i.e.*, in the supernatant and washes) was measured. For the CPG covalent binding technique, direct absorbance measurements at 280 nm were used to quantify trypsin. For the crosslinking technique, fourth derivative UV-spectrophotometry was needed because of interference from the absorbance of GA. Fourth derivative measurements were made at room temperature in a 1.5 mL quartz cuvette *versus* immobilization buffer as the reference, scanning from 300 to 280 nm (scan rate: 10 nm/min, average time: 0.6 s, data interval: 0.1 nm). Fourth derivative spectra were calculated with the Savitsky-Golay algorithm [20] included in the software. For the two immobilized trypsin preparations, enzyme content was calculated as the ratio of the mass of immobilized trypsin (from the immobilization efficiency) to the mass of the dried, solid product.

#### *Determination of apparent kinetic properties of trypsin*

The esterase activity of trypsin (free and immobilized) was determined according to the procedure of Hummel [21] by measuring the initial rate of hydrolysis of the chromogenic substrate TAME, at 25°C. [The concentrations of substrate used ranged from  $5 \times 10^{-5}$  to  $7 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-3}$  M and  $2 \times 10^{-4}$  to  $1 \times 10^{-3}$  M for free, CPG-GA- and crosslinked trypsin, respectively.] The number of micromoles of substrate hydrolyzed per minute was determined from the change in absorbance at 247 nm using a molar extinction coefficient ( $\epsilon_{247}$ ) of  $540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [22]. Assays were carried out in a reaction volume of 1.5 mL in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, for 20 min maximum. By definition, one international unit (U) of proteolytic activity is the quantity of enzyme that catalyses the transformation of one micromole of substrate into product per minute under standard assay conditions. The Michaelis-Menten kinetic parameters (*i.e.*, Michaelis constant,  $K_M$  and



maximum effective velocity,  $V_{\max}$ ) were calculated from Lineweaver–Burk double reciprocal plots.

#### *Determination of the pH-activity profile*

The optimum pH conditions were determined for the substrate TAME by evaluating the activity at several pH values over the range 7-8.5 in 50 mM buffer (sodium phosphate or Tris-HCl). Initial velocities were measured and reported as a percentage of the maximum activity recorded.

#### *Homogeneous tryptic digestion*

Solution-phase (homogeneous) tryptic digestion was performed following the procedure described by Stone and Williams [23], with slight modifications. Briefly, 8 mg HbA was dissolved in 0.800 mL 400 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, containing 8 M urea, then reduced with 0.120 mL 45 mM DTT and alkylated with 0.120 mL 100 mM iodoacetamide. Prior to digestion, the protein solution was diluted to 2 mg/mL, trypsin was added to give a final enzyme-to-protein ratio of 1:25 w/w and digestion proceeded at 37°C for 24 h with gentle stirring. The digestion was stopped by acidification to pH <4 with hydrochloric acid and the digest was analyzed directly by CZE. For MALDI analysis, the samples were vacuum-dried and redissolved in 1% FA.

#### *Solid-phase tryptic digestions*

Human HbA was chemically denatured as described above and digestions were run in batch at pH 8.0 in 50 mM ammonium bicarbonate (for the GA-crosslinked trypsin) or 50 mM Tris-HCl buffer (for the CPG-GA-trypsin) for 4 h at 37°C with gentle stirring. Digestions were stopped by centrifugation at 3000 rpm for 2 min, at which point the supernatants (the digests containing the peptide fragments) were collected and analyzed by CZE after acidification to pH <4. The enzyme preparations were rinsed several times with buffer before reuse. Blank digestions were performed under identical conditions by incubation of the enzyme preparations with buffer only. For MALDI analysis, the samples were vacuum-dried and redissolved in 1% FA.

#### 6.1.4. Results and discussion

Glutaraldehyde, which reacts rapidly with amino groups of proteins, was used to immobilize trypsin by two different chemical methods. However, the availability of trypsin amino groups is a function of the orientation of trypsin with respect to GA at any given moment in solution. Therefore, the immobilization efficiency (*i.e.*, yield of bound enzyme) and the retained activity, both of which are highly dependent on the immobilization procedure, must be determined to characterize the resulting immobilized enzymes.

##### 6.1.4.1. Enzyme content

The protein content of the two trypsin preparations and the immobilization efficiency (Table 6.1.1) represent values obtained after investigation of several immobilization conditions such as temperature, duration of reaction, buffer composition, buffer pH, rate of stirring, ratio of trypsin-to-GA or to CPG-GA, *etc.*, to rapidly give an active enzyme.

**Table 6.1.1.** Immobilization efficiency and trypsin loading for immobilized trypsin preparations

<b>Immobilized enzyme preparation</b>	<b>Immobilization efficiency (%)</b>	<b>Trypsin content (mg/g solid preparation)</b>
GA-crosslinked trypsin	> 95 <sup>a)</sup>	25.0
CPG-GA-trypsin	68	4.9

<sup>a)</sup> Unbound trypsin, present at less than 5%, was difficult to quantify accurately by our method.

The major differences between the two immobilization methods include: (i) the presence or absence of a solid support, (ii) the number of steps used for the immobilization process (one for crosslinking and two for the CPG method), (iii) the immobilization pH, and (iv) the use of a reducing agent in the CPG method. Several reasons motivated our choice of CPG as a solid support for the covalent binding procedure: its high surface area for derivatization and thus for enzyme-substrate contact; its inertness to changing conditions (except at very alkaline pH); its robustness, allowing high-pressure perfusion of substrate

for its use in an enzyme microreactor format, which we previously described for CPG-diisothiocyanate-trypsin [24].

Because the immobilization of trypsin on CPG particles implies two steps, which allows the elimination of excess dissolved GA before addition of the enzyme, the amount of immobilized trypsin is simply determined by the difference in absorbance at 280 nm of the enzyme solution before and after the immobilization process [16]. However, with the crosslinking method, GA stays in solution and its absorbance near 280 nm interferes in the direct reading of protein absorbance. This difficulty was circumvented by measuring the fourth-derivative UV spectrum instead [25, 26].

The reaction of GA with proteins is generally carried out at around neutral pH [27]. We also found good yields of immobilized product at pH 6.8 for the crosslinking technique. In the case of trypsin immobilization onto aminopropyl CPG, activation of the support with GA was conducted at neutral pH whereas protein coupling was carried out at an elevated pH (pH 8.4) to promote nucleophilic attack and improve immobilization, as maintained by Walt and Agayn [14].

The formation of a Schiff base by elimination of water is a proposed mechanism of reaction of GA with primary amines. This is known to be reversible and could lead to gradual release of enzyme during prolonged exposure to buffer solutions, particularly at elevated pH. Therefore, reduction of Schiff base double bonds using a suitable reducing agent like  $\text{NaCNBH}_3$  has been proposed in order to produce a stable secondary amine that can tolerate pH variations. However, Walt and Agayn [14] indicated that a reducing agent is usually not required and might prove disadvantageous for the particular application, so it was not included in our crosslinking procedure.

Table 6.1.1 shows that the GA-crosslinking procedure was essentially quantitative. The lower immobilization efficiency for covalent binding on CPG (68%) could be limited by: (i) the fewer reactive groups compared to the crosslinking method as GA is already bound to CPG when trypsin is added; (ii) masking of several reactive groups by a single trypsin molecule; (iii) potential inaccessibility of reactive groups to the enzyme if a GA polymer network forms in the particle pores. Regardless of total protein loading, it is important to determine the kinetic properties of the immobilized trypsin preparations.

#### 6.1.4.2. Kinetic properties of immobilized trypsin

Kinetic properties of soluble enzymes are expressed in terms of Michaelis-Menten parameters ( $K_M$  and  $V_{max}$ ). In the case of immobilized enzymes, apparent kinetic properties ( $K_{M,app}$  and  $V_{max,app}$ ) are used because the overall kinetic behavior of the enzymatic preparation is the sum of isolated contributions of each individual enzyme molecule, which can be immobilized *via* different amino groups leading to different exposure of the catalytic centers [28]. Table 6.1.2 shows the kinetic characterization of free and immobilized trypsin preparations.

**Table 6.1.2.** Kinetic parameters for free and immobilized trypsin preparations

Trypsin	$K_M$ or $K_{M,app}$ ( $\mu M$ )	$V_{max}$ or $V_{max,app}$ ( $\mu M/min$ )	Specific activity	
			U TAME/mg protein	U BAEE/mg protein <sup>a)</sup>
Free	61	54	200	11 500
GA-crosslinked trypsin	1 100	205	0.05	3
CPG-GA-trypsin	180	84	26	1 500

<sup>a)</sup> BAEE units are reported for comparison to commercial products. 1 U TAME = 57.5 U BAEE.

Typical  $K_M$  values for free trypsin-catalyzed cleavages of low-molecular-weight chromogenic substrate are reported to be in the range of 100-200  $\mu M$  [29]. We obtained a  $K_M$  value of 61  $\mu M$  for free trypsin, which was in good agreement with 50  $\mu M$  reported by Simpson and Haard [30]. For both immobilized trypsin preparations, we observed an increase in  $K_{M,app}$  (*i.e.*, a decrease in enzyme-substrate affinity) relative to free trypsin, especially for GA-crosslinked trypsin<sup>1</sup>. This increase in  $K_M$ , generally observed in the literature for immobilized trypsin, is proposed to be related to the substrate and/or carrier charge, to diffusion effects, and in some cases, to tertiary changes in enzyme conformation [31]. According to our results, the crosslinking procedure led to a more constrained

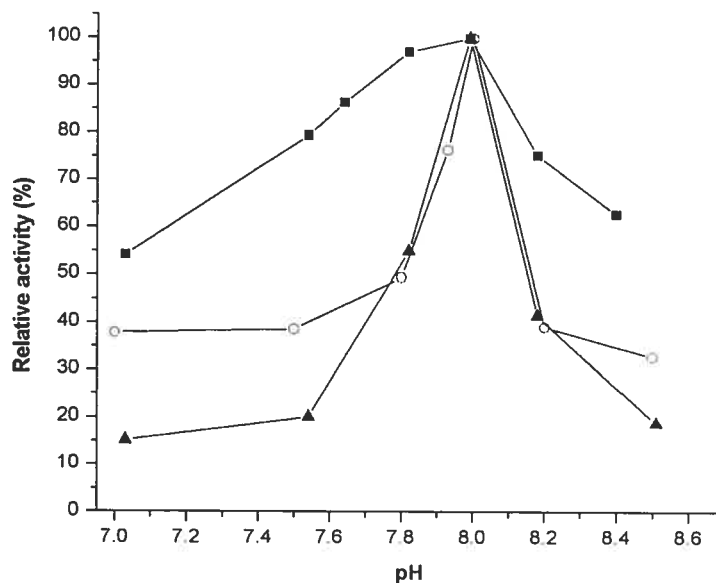
<sup>1</sup> [It should be noted that the latter  $K_M$  was determined under experimental conditions where the concentration of substrate was limited to values below  $K_M$ , decreasing the precision of the measure.]

enzyme.  $V_{\max,app}$  was higher for the two immobilized enzyme preparations compared to free enzyme (Table 6.1.2), [which could be explained by the fact that the concentration of enzyme used in GA-crosslinked trypsin experiments was over ten thousand-fold higher than in the the CPG-GA- and free trypsin experiments].

Specific activity, reported per milligram of trypsin rather than per milligram of solid, allows the comparison of enzyme performance among the two immobilized and the free forms. Mild conditions were used in both immobilization procedures to preserve enzymatic activity as best as possible, but a decrease in activity is often observed in chemical immobilizations [32]. We calculated specific activities of 0.05 U TAME/mg (or 3 U BAEE/mg) and 26 U TAME/mg (or 1 500 U BAEE/mg) for GA-crosslinked trypsin and CPG-GA-trypsin, respectively, compared to 200 U TAME/mg (or 11 500 U BAEE/mg) for free trypsin. This wide variability in specific activity could partially be the result of the random orientation of a given trypsin molecule based on the amino acid residue(s) serving as the site(s) of attachment to the solid matrix. If attachment is close to the active site of the enzyme molecule, its activity may be partially or totally lost due to steric effects and hindrance of enzyme mobility. Moreover, the differences seen in Table 6.1.2 could originate from mass transfer effects in the pores of either CPG or the GA-crosslinked trypsin network. This could be verified for the covalent attachment method by using nonporous particles as the solid support, although the surface area of such supports is low.

#### 6.1.4.3. pH-activity profile

All enzymes have an optimal pH (or pH range) at which they show a maximum reaction rate. Immobilization modifies the microenvironment of enzyme molecules to different extents depending on several factors like the enzyme itself and the immobilization method and conditions, which could induce a shift of the optimum pH of the enzyme. Thus, as each case is particular, optimum pH should be determined. We therefore investigated immobilized trypsin activity toward TAME over the pH range 7.0 to 8.5 at 25°C (Fig. 6.1.1), and essentially no difference in the optimal pH of 8.0 was observed.



**Figure 6.1.1.** Effect of pH on the relative enzymatic activity for free trypsin (■), GA-crosslinked trypsin (▲) and CPG-GA-trypsin (○).

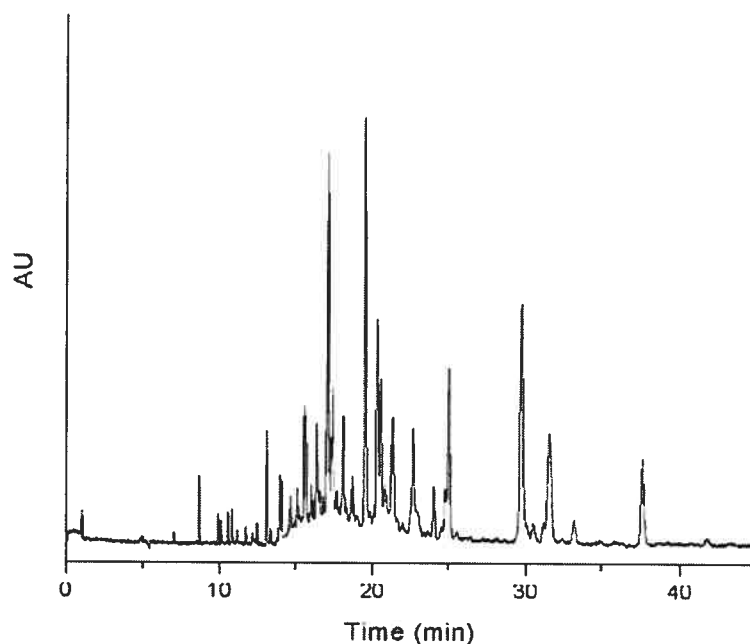
On the other hand, Fig. 6.1.1 shows that our GA-immobilized forms of trypsin displayed a narrower optimal pH range than the soluble (free) enzyme. This observation was in agreement with that of Chapman and Hultin for subtilisin BPN' [33]. However, the pH-activity behavior of immobilized enzymes depends on several factors such as the enzyme itself, the type of support, *etc.*, and thus our observations cannot be generalized to include all immobilized enzymes.

#### 6.1.4.4. Hemoglobin peptide mapping by CZE

Peptide mapping involves developing specific maps for each unique protein such that enough peptides are detected to make the map meaningful. Therefore, addition of denaturing and/or disulfide bridge breaking agents for reduction and alkylation during sample preparation are used to increase the accessibility of protein substrate cleavage sites to the proteolytic enzyme. While native human HbA has no disulfide bridges, enzymatic treatment of the protein leaves an uncleaved portion called “hydrophobic core” region [34, 35]. The reduction/alkylation step solves this problem.

### *Traditional solution digestion approach*

Digestion of denatured human HbA with soluble trypsin was carried out in batch without prior separation of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains. The resulting peptides were separated by CZE and the corresponding peptide map is depicted in Fig. 6.1.2.



**Figure 6.1.2.** CZE peptide map of denatured human hemoglobin (2 mg/mL) obtained after a 24-h digestion with free trypsin (enzyme:substrate = 1:25). The separation was carried out in 50 mM phosphate buffer, pH 2.5, at 15 kV.

Sharp peak shapes with good resolution are obtained, thus indicating proper selection of the composition and pH of BGE. In an ideal trypsin digestion of human HbA, the two chains (each containing 11 lysine and 3 arginine residues) are expected to produce 29 fragments (27 peptides and 2 amino acids). However, CZE peptide maps show more than the expected number of peaks, *i.e.*, 31 instead of 27. Unfortunately, even highly purified proteases are far from perfect enzymes and either missed cleavages or nonspecific cleavages can occur. In addition, the human HbA standard was not purified before use and traces of other proteins may be present, therefore this map is considered as a reference for our study.

### *Reproducibility of CZE analysis*

Reproducibility in migration time is paramount to the successful application of peptide mapping as a comparative technique. For CZE, adsorption of proteins and peptides on the capillary wall is a serious problem that can lead to variable migration times, band broadening and peak tailing, especially for separations at the intermediate pH range. The low pH separation buffer used for mapping helped minimize interactions between the cationic peptides and bare silica capillary thus preventing these problems [36, 37]. Table 6.1.3 demonstrates the stability of our CZE separation conditions, for three analyses of the same digest (2 mg/mL human HbA) made on the same day.

**Table 6.1.3.** Reproducibility of CZE migration times for peptide maps of the same human HbA tryptic digest

Mean migration time (min)	RSD (%)	Mean migration time (min)	RSD (%)
8.66	0.69	18.14	1.55
9.91	0.77	18.72	1.63
10.09	0.79	19.50	1.60
10.56	1.04	20.26	1.56
10.88	1.07	20.50	1.64
11.78	1.25	20.64	1.36
12.49	1.46	21.31	1.40
13.12	1.43	22.64	1.63
13.86	1.02	23.92	1.54
14.10	1.51	24.78	1.69
14.68	1.10	25.11	2.28
15.13	1.34	29.74	2.17
15.58	1.17	30.41	1.60
15.67	1.48	30.90	1.79
16.34	1.23	31.49	1.69
17.05	1.22	33.00	1.63
17.29	1.38	37.68	2.71
17.41	1.33		
<b>Mean RSD: 1.5% (n=3)</b>			

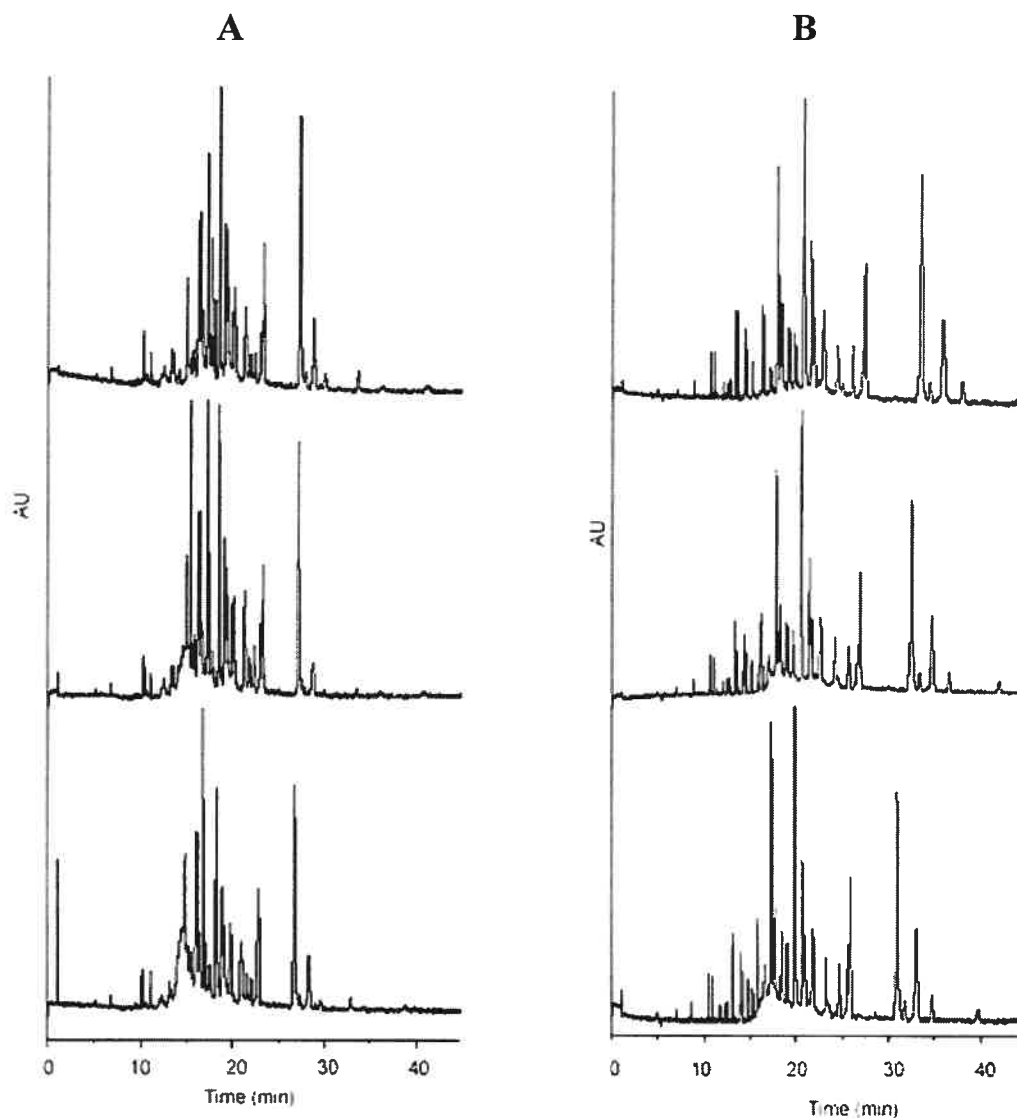
Mean migration time RSD was of 1.5%, as a result of careful consideration to temperature and capillary wall equilibration with buffer before each separation. The migration times presented in Table 6.1.3 are raw data. Reproducibility could be improved slightly by normalizing the migration times using two peak method [38], although the effect is less dramatic at low pH were the electroosmotic flow is essentially nil, so this was not done.



*CZE peptide maps of hemoglobin for solid-phase trypsin preparations*

Knowing that our CZE-based peptide maps of human HbA can attain at best 1.5% mean migration time RSD, the digestion reproducibility of the two immobilized trypsin preparations was evaluated by comparison of peptide maps from three different digestions made with the same batch of immobilized trypsin. Three aliquots (1.5 mL) of 2 mg/mL denaturated human HbA were digested for 4 h under the same conditions (pH and temperature). The solid-phase digestions were stopped by centrifugation and supernatants (digests) were collected. The three 4-h digestions, which were carried out on the same day, were stored at -20°C until their mapping by CZE (Fig. 6.1.3) could be made consecutively. The digests were analyzed by CZE after acidification with HCl (Fig. 6.1.3) in order to be directly comparable with the soluble tryptic digest.

The difference in elution windows between Fig. 6.1.3A and B could be due to the unequal ionic strengths of the sample solutions after acidification. In fact, the digests obtained with the two immobilized enzyme preparations required different amounts of acid to bring the sample pH below 4, otherwise anti-stacking effects resulting in peak broadening were observed for CPG-GA-trypsin digests. The amount of acid added also affected the baseline stability of the peptide maps in Fig. 6.1.3, showing a broad feature at *ca.* 15 min. This baseline disturbance seemed to increase with each consecutive separation; free trypsin digests were mapped first (Fig. 6.1.2), followed by GA-crosslinked digests (Fig. 6.1.3B), and then CPG-GA-trypsin digests (Fig. 6.1.3A). This was not due to a GA leaching from immobilized enzyme preparations because the free trypsin map showed the same feature. A blank separation (*i.e.*, BGE only) showed no baseline disturbance. Furthermore, each individual separation was carried out using fresh BGE to avoid potential contamination. Even with stronger washings (1M NaOH) between runs, no improvement (flat baseline) was observed. Thus, the maps in Fig. 6.1.3 represent a compromise between the extent of sample acidification (peak shape) and peptide visualization.



**Figure 6.1.3.** Peptide maps showing the digestion reproducibility associated with the two immobilization techniques for three separate aliquots of denatured hemoglobin (2 mg/mL) digested by a given batch of immobilized trypsin: (A) CZE maps using CPG-GA-trypsin, (B) CZE maps using GA-crosslinked trypsin. CZE separations were carried out sequentially under the conditions described in Fig. 6.1.2.

In terms of digestion reproducibility, each immobilized trypsin preparation gave almost identical electrophoretic peptide maps, which supports the use of our immobilized trypsin preparations as an effective tool to generate peptide fragments. The narrower elution window for CPG-GA-trypsin gives the impression that this digest contains less peptides than the GA-crosslinked. However, it is difficult to evaluate the real number of peaks because of the baseline disturbance at *ca.* 15 min. Overall, the two solid-phase

trypsin preparations were able to produce in 4 h a digest similar to that carried out in solution phase in 24 h based on similar major peak patterns presented in Fig 6.1.3. Furthermore, the possibility of autodigestion of trypsin was monitored for the two immobilized enzymes by doing a blank digestion (*i.e.*, no hemoglobin). The resulting peptide maps (data not shown) showed that autoproteolysis of immobilized trypsin was negligible. These encouraging results justify our continuing studies to evaluate the longevity, effective shelf life and peptide recovery for each immobilized trypsin preparation.

#### *Peptide mass mapping by MALDI-TOF-MS*

Peptide mass mapping using MALDI-MS is a powerful method for the identification of known, purified proteins [11] because of its inherent simplicity, mass accuracy, sensitivity, and relatively high sample throughput [39]. This approach involves genomic or proteic database searching with the set of measured peptide masses from the mapped digest and often leads to identification of the parent protein [40, 41]. Sample preparation is crucial to produce good quality peptide maps by MALDI, so recrystallized CHCA was used to minimize matrix cluster formation [42] and samples were desalted using ZipTip microextraction pipet tips.

Tryptic digestion of a protein results in a mixture of peptides of different physicochemical characteristics. With complete and specific digestion, almost all human HbA tryptic peptides have masses of less than 3000 Da. However, 12 of the 29 expected fragments (for the two HbA chains together) have masses <900 Da where MALDI mass assignment is difficult because of interfering matrix ions [43]. In addition, low-mass or highly polar peptides can be lost during ZipTip sample preparation. With the exception of  $m/z$  147.11 Da, none of the other tryptic fragments of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of human HbA overlap in mass. Therefore, 17 tryptic fragments will have  $[M + H]^+$  ions between 900 and 3000 and thus are expected to be seen in MALDI mass spectrum. Tables 6.1.4 and 6.1.5 compare the observed peptides, along with their calculated masses, for human HbA digestions carried out for 24 h and 4 h with free and immobilized trypsin preparations, respectively. The cysteine-containing peptides were increased in mass by 57 Da per cysteine residue due to the treatment of the protein with iodoacetamide prior to digestion to form carbamidomethyl-modified cysteines (CAM).

**Table 6.1.5.** Chemically denaturated human HbA ( $\beta$ -chain) peptides from free, crosslinked and CPG-linked trypsin digests

Theoretical [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Position <sup>a)</sup>	MC <sup>b)</sup>	Sequence	Free trypsin			GA-crosslinked trypsin			CPG-GA-trypsin		
				Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. <sup>c)</sup> (Da)	Mass acc. <sup>d)</sup> (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)
147.11	66-66	0	K									
246.18	60-61	0	VK									
319.14	145-146	0	YH									
412.23	62-65	0	AHGK									
932.52	9-17	0	SAVTALWGK				932.53	0.01	11			
952.51	1-8	0	VHLTPEEK									
1126.56	96-104	0	LHVDPENFR	1126.54	-0.02	18						
1149.67	133-144	0	VVAGVANALAHK				1149.70	0.03	26			
1274.73	31-40	0	LLVVYPWTQR	1274.77	0.04	31	1274.78	0.05	40	1274.77	0.04	31
1314.66	18-30	0	VNVDEVGGEALGR	1314.71	0.05	38	1314.71	0.05	38	1314.70	0.04	30
1378.70	121-132	0	EFTPPVQAAAYQK				1378.72	0.02	15			
1421.67	83-95	0	GTFATLSELHC DK				1421.66	-0.01	7			
1478.69	83-95	0	GTFATLSELHC DK									
1669.89	67-82	0	VLGAFSDGLAHL DNLK	1669.92	-0.03	18	1669.89	0.00	0	1669.92	0.03	18
1776.99	105-120	0	LLGNVLCVLAH HFGK	1777.02	0.03	17				1777.01	0.02	11
1797.99	66-82	1	KVLGFS DGLAHL DNLK	1798.01	0.02	11				1798.01	0.02	11
2058.95	41-59	0	FFESFGDLSTPD AVMG NPK	2059.00	0.05	24	2059.00	0.05	24	2059.00	0.05	24
2228.17	9-30	1	SAVTALWGKVN VDEV GGEALGR							2228.25	0.08	36
2586.24	83-104	1	GTFATLSELHC DKLLHV DPENFR	2586.33	0.09	35				2586.38	0.14	54

Masses in bold are the most intense peaks in the spectra. a)-d) as in Table 6.1.4

**Table 6.1.4.** Chemically denaturated human HbA ( $\alpha$ -chain) peptides from free, crosslinked and CPG-linked trypsin digests

Theoretical [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Position <sup>a)</sup>	MC <sup>b)</sup>	Sequence	Free trypsin			GA-crosslinked trypsin			CPG-GA-trypsin		
				Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. <sup>c)</sup> (Da)	Mass acc. <sup>d)</sup> (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)
147.11	61-61	0	K									
288.20	91-92	0	LR									
338.18	140-141	0	YR									
398.21	57-60	0	GHGK									
461.27	8-11	0	TNVK									
532.29	12-16	0	AAWGK									
729.41	1-7	0	VLSPADK									
818.44	93-99	0	VDPVNFK									
1071.55	32-40	0	MFLSFPTTK	1071.56	-0.01	9	1071.61	0.06	56	1071.52	-0.03	28
1087.55	32-40	0	MFLSFPTTK							1087.57	0.02	17
1087.63	MSO 32 91-99	1	LRVDPVNFK	1087.65	-0.02	18	1087.63	0.00	0	1087.57	-0.06	55
1252.71	128-139	0	FLASVSTVLTSK	1252.74	-0.03	24	1252.78	0.07	56	1252.73	0.02	16
1529.73	17-31	0	VGAHAGEYGAEAL ER	1529.78	-0.05	33	1529.78	0.05	33	1529.78	0.05	33
1833.89	41-56	0	TYFPFDLSHGSAQ VK	1833.92	-0.03	16	1833.93	0.04	22	1833.93	0.03	22
2996.49	62-90	0	VADALTNAAVAHVVD DMNPALSALSDDLH AHK	2996.58	-0.09	30						
3024.63	100-127 CAM 104	0	LLSHCLLVTLAAHL PAEFTPAVHASLDK	3024.68	-0.05	16						

Masses in bold are the most intense peaks in the spectra.

<sup>a)</sup> CAM: Carbamidomethylation of cysteines; MSO: Methionine sulfoxide;

<sup>b)</sup> MC: number of missed cleavages;

<sup>c)</sup> Deviation by comparison to theoretical masses;

<sup>d)</sup> Mass accuracy evaluated by the ratio of the difference between observed and theoretical masses to the corresponding theoretical mass x 10<sup>6</sup>, expressed in ppm

MALDI analysis showed that nine peptides in common were seen for the three digestions, among which five were the most intense peaks in the spectra ( $m/z$  1529 and 1833 for the  $\alpha$ -chain;  $m/z$  1274, 1314 and 1669 for the  $\beta$ -chain). As expected, no peptides weighing less than 900 Da were seen. Despite their similarities, there are some noteworthy differences between the data sets. For example, solution-phase and CPG-GA-trypsin digestions produced more partial cleavages (missed cleavages) than GA-crosslinked trypsin digestion, especially in the  $\beta$ -chain. Digestions were performed with *ca.* 20, 350 and 1 400 U BAEE for GA-crosslinked trypsin, CPG-GA-trypsin and free trypsin, respectively, based on the calculated activities and protein loading for the two enzymatic preparations. Even though the GA-crosslinked trypsin was the least active, fewer missed cleavages suggests that more enzyme was accessible and/or in a favorable orientation for digestion. In the case of free trypsin, missed cleavages could be due to the loss of catalytic activity related to autodigestion. For CPG-GA-trypsin, one explanation for missed cleavages could arise from the stirring employed during the batch digestions, which had to be gentle enough to avoid breaking up the CPG particles but sufficient to obtain their good dispersion in the digestion medium. However, the CPG particles were quite heavy and tended to clump together over the course of the digestion, leading to a reduced surface of contact between the immobilized enzyme and substrate. Conversely, the crosslinked trypsin preparation was lighter and thus well suspended in the reaction medium thereby increasing the surface of contact. These differences in behavior affected the accessibility of the substrate to the trypsin and the resulting digestion capability of the two immobilized trypsin preparations.

Partial digestion, (*i.e.*, fragments with missed cleavages) can be a useful property as it introduces some redundancies into the mapping. Furthermore, partially digested fragments contain some of the small peptides that would otherwise be lost due to matrix background. For example, the two peptides at  $m/z$  288 and 818 of human HbA  $\alpha$ -chain were not seen individually in the three digestion techniques, but were recovered by detection of the peptide at  $m/z$  1087 (one missed cleavage site). For CPG-GA-trypsin, the missed cleavage in human HbA  $\beta$ -chain at  $m/z$  2228 included peptides at  $m/z$  932, which was not seen, and  $m/z$  1314.

Of the 29 possible human HbA tryptic peptides, those at  $m/z$  1252, 1478 (CAM modification of 1421), 1776 (CAM modification of 1719) and 3024 (CAM modification of 2697) are typically difficult to detect by MS, regardless of the ionization method employed [44], because these last three are insoluble once cleaved from the protein and precipitate [34, 35]. The peptide at  $m/z$  1776 was observed for free and CPG-GA-trypsin (but not with GA-crosslinked trypsin) and the peptide at  $m/z$  3024 was seen with free-solution digestion only, but their intensities were very weak. Furthermore, the presence of an acidic residue (*i.e.*, Asp or Glu) on either side of the basic residues (*e.g.*, Arg or Lys) has been reported to reduce significantly the rate of cleavage [45]. Thus, the peptide at  $m/z$  1252 (fragment 128-139), which results from hydrolysis of a bond preceded by Asp<sub>126</sub> (Lys<sub>127</sub>-Phe<sub>128</sub>), should be difficult to observe due to its precipitation with the peptide at  $m/z$  3024 (fragment 100-127) if the cleavage does not occur [34]. However, we are able to observe the peptide at  $m/z$  1252 in each of our digests.

The recent introduction of delayed extraction (also known as time-lag focusing) [46-48] in combination with a reflectron has dramatically improved resolution and allows high mass accuracy (5-100 ppm) [49], making unambiguous protein identification attainable. Our results from Tables 6.1.4 and 6.1.5 shown mean mass accuracies (for the three digestions) of 25 ppm (0.04 Da), which was excellent because only external calibration was used. In order to assess the degree of confidence associated with identifying a protein, it is important to consider not only the number of peptide peaks that can be assigned to expected digestion products, but also the sequence coverage (*i.e.*, the fraction of amino acid residues assigned), both being listed in Table 6.1.6.

**Table 6.1.6.** Comparison of human HbA sequence coverages identified by Profound v. 4.10.5

Sequence coverage	Trypsin					
	Free		GA-crosslinked		CPG-GA-	
	$\alpha$ -chain	$\beta$ -chain	$\alpha$ -chain	$\beta$ -chain	$\alpha$ -chain	$\beta$ -chain
% of amino acids	84	65	43	79	43	71
Number of peptides	7	8	5	8	5	8

A minimum of five peptides matched with a maximum allowed mass deviation of 50 ppm and a sequence coverage of at least 15% were suggested by Jensen *et al.* [40] as criteria for an unambiguous protein match. Sequence coverage greater than 43 % with five peptides ( $\alpha$ -chain) and over 70 % with eight peptides ( $\beta$ -chain), demonstrated that peptide mass fingerprinting with solid-phase trypsin allowed reliable identification of hemoglobin and, in our case, with better results than using free trypsin for the human HbA  $\beta$ -chain (65% with 8 peptides). For  $\alpha$ -chain, the lower sequence coverages for solid-phase digestions could partially be due to the handling of the digests. In fact, solid-phase digestion includes a step of centrifugation to separate the supernatant (digest) from the immobilized trypsin. As previously pointed out, one of the missing peptides (at  $m/z$  3024), becomes insoluble after having been cleaved, and thus could have been lost during centrifugation. Alternatively, it could have been lost during ZipTip desalting or have been poorly crystallized with CHCA matrix. It is generally accepted that the quality of MALDI spectra is related to the sample/matrix preparation conditions and the apparent lack of peptide at  $m/z$  3024 could also be due to incomplete scanning of the entire sample spot on the target plate.

#### 6.1.5. Concluding remarks

In summary, immobilized trypsin shows great potential compared to free (soluble) enzyme, whether bound to a solid support (CPG-GA-trypsin) or without using a support (GA-crosslinked trypsin). Even if the process of immobilization initially lowers enzymatic activity, the insoluble trypsin retained the ability to hydrolyse a small substrate (TAME) as well as a protein like denaturated hemoglobin, without prior separation of the chains. Our CZE conditions were found to be highly reproducible despite a baseline disturbance. Trypsin autolysis was suppressed and digestion time reduced. The enzyme could be easily separated from the digestion medium, allowing its reutilization and therefore its use in microreactor format. The two immobilized enzymes demonstrated excellent digestion reproducibilities and generated enough peptides detected by MALDI with good mass accuracies (*ca.* 25 ppm or 0.04 Da). This allowed reliable identification of human hemoglobin with sequence coverages better than 70 % for the  $\beta$ -chain and 43 % for the  $\alpha$ -chain.



*This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada and the France-Québec Permanent Commission for Scientific Cooperation. I. Migneault acknowledges graduate scholarships from Quebec Funds for Research in Nature and Technology, from the National Bank of Canada and from the Université de Montréal. We thank H. Hamad for his preliminary studies on immobilized trypsin and Prof. J. Pelletier for helpful advice on enzyme kinetics. We would also like to thank Prof. J. Rossier (Neurobiology Laboratory, ESPCI/CNRS UMR 7637, Paris, France) for advice and the use of his group's MALDI-TOF mass spectrometer.*

#### 6.1.6. References

- [1] Dartiguenave, C., Communications personnelles.
- [2] Nelson, J. M.; Griffin, E. G. *J. Amer. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 1109-1115.
- [3] Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S. In *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*; Scouten, W. H., Ed.; John Wiley & Sons: New York (NY), 1983; Vol. 66, pp 253-391.
- [4] Lee, T. D.; Rahbar, S. In *Mass Spectrometry of Peptides*; Desiderio, D. M., Ed.; CRC Press: Boca Raton (FL), 1991, pp 257-274.
- [5] Shackleton, C. H. L.; Witkowska, H. E. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 29A-33A.
- [6] Castagnola, M.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Valeria, D. *J. Chromatogr.* **1991**, *572*, 51-58.
- [7] Rickard, E. C.; Towns, J. K. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 237-264.
- [8] Pappin, D. J. C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J. *Curr. Biol.* **1993**, *3*, 327-332.
- [9] Gatlin, C. L.; Kleemann, G. R.; Hays, L. G.; Link, A. J.; Yates III, J. R. *Anal. Biochem.* **1998**, *263*, 93-101.
- [10] Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [11] Quadroni, M.; James, P. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 664-677.
- [12] Tischer, W.; Wedekind, F. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 95-126.
- [13] Zaborsky, O. R. *Immobilized enzymes*; CRC Press: Cleveland (OH), 1973.
- [14] Walt, D. R.; Agayn, V. *Trends Anal. Chem.* **1994**, *13*, 425-430.
- [15] Habeeb, A. F. *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, *119*, 264-268.

- [16] Jiang, H.; Zou, H.; Wang, H.; Ni, J.; Zhang, Q.; Zhang, Y. *J. Chromatogr. A* **2000**, *903*, 77-84.
- [17] [http://prowl.rockefeller.edu/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe).
- [18] Zhang, W.; Chait, B. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482-2489.
- [19] Oh, S.; Catignani, G. L.; Swaisgood, H. E. *J. Agric. Food Chemistry* **1993**, *41*, 1337-1342.
- [20] Savitzky, A.; Golay, M. J. E. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627-1639.
- [21] Hummel, B. C. W. *Can. J. Biochem.* **1959**, *37*, 1393-1399.
- [22] Decker, L. A. In *Worthington Enzyme Manual*; Decker, L. A., Ed.; Worthington Biochem. Corp.: Freehold, 1977, pp 215-224.
- [23] Stone, K. L.; Williams, K. R. In *A Practical Guide to Protein and Peptides Purification for Microsequencing*; Matsudaira, P., Ed.; Academic Press: San Diego (CA), 1993, pp 43-69.
- [24] Bonneil, E.; Mercier, M.; Waldron, K. C. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *404*, 29-45.
- [25] Padros, E.; Dunach, M.; Morros, A.; Sabés, M.; Manosa, J. *Trends in Biochemical Science* **1984**, *9*, 508-510.
- [26] Lüthi-Peng, Q.; Puhan, Z. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 227-234.
- [27] Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y.; Okada, H. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 100-105.
- [28] Regan, D. L.; Dunnill, P.; Lilly, M. D. *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, *16*, 333-343.
- [29] Ascenzi, P.; Menegatti, E.; Guarneri, M.; Bortolotti, F.; Antonini, E. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2483-2490.
- [30] Simpson, B. K.; Haard, N. F. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **1984**, *62*, 894-900.
- [31] Weetall, H. H. *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 602A-604A.
- [32] Srere, P. A.; Uyeda, K. In *Methods Enzymol.*; Mosbach, K., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1976; Vol. XLIV, pp 11-19.
- [33] Chapman, J. D.; Hultin, H. O. *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, *XVII*, 1783-1795.
- [34] Wada, Y.; Matsuo, T.; Sakurai, T. *Mass Spectrom. Rev.* **1989**, *8*, 379-434.
- [35] Shackleton, C. H. L.; Falick, A. M.; Green, B. N.; Witkowska, H. E. *J. Chromatogr.* **1991**, *562*, 175-190.
- [36] Messana, I.; Rossetti, D. V.; Cassiano, L.; Misiti, F.; Giardina, B.; Castagnola, M. *J. Chromatogr. B* **1997**, *699*, 149-171.

- [37] Capelli, L.; Stoyanov, A. V.; Wajcman, H.; Righetti, P. G. *J. Chromatogr. A* **1997**, *791*, 313-322.
- [38] Li, X. F.; Ren, H. J.; Le, X. C.; Qi, M.; Ireland, I. D.; Dovichi, N. J. *J. Chromatogr. A* **2000**, *869*, 375-384.
- [39] Fenselau, C. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 661A-665A.
- [40] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4741-4750.
- [41] Yates III, J. R. *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1-19.
- [42] Keller, B. O.; Li, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 88-93.
- [43] Biemann, K. *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 977-1010.
- [44] Houston, C. T.; Reilly, J. P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3397-3404.
- [45] Allen, G. *Sequencing of Proteins and Peptides*; Elsevier/North-Holland: Amsterdam, 1981.
- [46] Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1998-2003.
- [47] Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044-1050.
- [48] Whittall, R. M.; Li, L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1950-1954.
- [49] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A.; Mann, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1371-1378.

## 6.2. Lysozyme peptide mapping by capillary zone electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry to compare trypsin immobilized by two glutaraldehyde-based methods

Isabelle Migneault, Catherine Dartiguenave, Joëlle Vihn, Michel J. Bertrand and Karen C. Waldron, soumis à *Anal. Chem.* (27 février 2004).

### 6.2.1. Abstract

Peptide mapping employs specific proteolytic enzymes, *e.g.*, trypsin, to reproducibly create peptide fragments from a protein. Enzyme immobilization offers advantages like reusability, ease of automation, microfluidics integration, rapid protein digestion, and reduction of autodigestion that leads to interference with analyte peptides. Glutaraldehyde (GA) is a well-known immobilization reagent because of its ability to react with primary amines and thus with proteins. Due to its versatility, we used GA to immobilize trypsin by two different techniques: covalent attachment to controlled pore glass (CPG) particles and direct reticulation (crosslinking). The two immobilized trypsin preparations were tested for digestion reproducibility and compared with solution-phase (soluble trypsin) digestion of chemically denatured lysozyme. Reproducibility of capillary zone electrophoresis and liquid chromatography as analytical techniques for peptide mapping was excellent, with average relative standard deviation in elution time under 0.6 and 0.3%, respectively. Electrophoretic and chromatographic peptide maps of lysozyme digested by the two GA-immobilized trypsin preparations showed a high degree of similarity. Corresponding MALDI-TOF spectral data were examined and compared for the two solid-phase digestion methods. Lysozyme sequence coverages were 64 and 66% for the GA-crosslinked trypsin and CPG-GA-trypsin, respectively, versus 34% for solution-phase digestion with soluble trypsin.

### 6.2.2. Introduction

Applications of peptide mapping are numerous, such as in the primary structure verification of proteins produced by recombinant DNA technology [1] and in the detection of post-translational modifications [2]. Peptide mapping consists of enzymatic [3, 4] or chemical cleavage [5, 6] of proteins into a number of smaller, discrete peptide fragments that are separated and detected to give a unique fingerprint of the protein. Trypsin is the

most widely used proteolytic enzyme in proteomic studies because this well-characterized serine protease displays several advantages over other cleavage agents: it has a well-defined specificity (cleavage at the carboxy terminal side of arginine and lysine residues), a high specific activity and is available in affordable quantities with high purity [2, 7]. Liquid chromatography (HPLC) has been the most popular separation technique for generating peptide maps because of its robustness and reproducibility [2, 8, 9], even though long separation times are needed to obtain good resolution, columns are expensive and solvent consumption is high. Capillary zone electrophoresis (CZE), a complementary technique to chromatography, is increasingly attractive because of its simplicity, aqueous—thus friendly—environment for biomolecules, speed, high separation efficiency and low consumption of solvent and sample [10-13], although detection sensitivity is not as good as with HPLC. More recently, mass spectrometry (MS) has become the method of choice for rapid peptide mass mapping and thus protein identification [14-18] due to its high resolution and good detection sensitivity. A soft ionization method like matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS is well-suited to the investigation of biomolecules, such as tryptic peptide fingerprints of isolated proteins.

Immobilized enzymes, defined as enzymes with restricted mobility, include enzyme modified to a water-insoluble form by a suitable technique [19]. They have been in use for almost 40 years but are currently the subject of renewed interest because they possess certain advantages over soluble enzymes or alternative technologies. They are reusable and easier to manipulate than soluble enzymes because they can be separated from the digestion medium by filtration or centrifugation. They also present a significant time saving for digestion, limited enzyme autolysis and ability of continuous operation in bioreactors [19, 20]. With the growing need of high throughput and better sensitivity for protein characterization, immobilized proteolytic enzymes are attractive because miniaturized enzyme reactors are easy to fabricate and their flow-through design permits automation, reduced sample handling and rapid digestion [21, 22]. Immobilization can be achieved by chemical means, in which at least one covalent bond is formed between an amino acid residue and a functionalized support or between two or more enzyme molecules using a crosslinking agent, or by physical means via encapsulation in a sol-gel [23]. Covalent methods lead to immobilized enzymes with high operational stability because of their resilience to disruption by substrate or salt solutions [24]. Among the

considerable number of agents available for covalent immobilization of enzymes described in the literature [25, 26], glutaraldehyde (GA) has found widespread use and is the most commonly employed linking reagent [27-30]. In fact, this homobifunctional molecule had great success because of its commercial availability, low cost and ease of use. It reacts rapidly with  $-NH_2$  groups at neutral pH [31], however its chemical nature in aqueous solution and the reaction mechanisms of its different possible forms have been the subject of much debate [32].

We previously immobilized trypsin by two different GA-based chemical methods [33]— intermolecular crosslinking and covalent fixation to the insoluble carrier aminopropylated controlled pore glass (CPG)— for the eventual construction of a home-made microreactor system. In this paper, we compare the performance of the two immobilized trypsin preparation for the digestion of chemically denatured lysozyme. Because peptide mapping is a comparative technique, we assess the reproducibility of CZE and HPLC as analytical separation tools and also the digestion reproducibility of the two immobilized enzyme preparations for the substrate lysozyme. Moreover, MALDI-TOF MS data were examined and used to compare the digestions made with solution-phase trypsin, CPG-GA-trypsin and GA-crosslinked trypsin.

### 6.2.3. Materials and methods

#### 6.2.3.1. Reagents

Lysozyme (chicken egg-white), TPCCK-treated trypsin (bovine pancreas; 12,700 U BAEE/mg, Lot : 07K7251) were used without further purification, aminopropyl CPG (80-120 mesh, 700 Å average pore size, 35 m<sup>2</sup>/g specific surface area), iodoacetamide, *N*- $\alpha$  *p*-tosyl L-arginine methyl ester (TAME) and sodium cyanoborohydride (NaCNBH<sub>3</sub>) were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). *Alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), used after purification by recrystallization from ethanol, was purchased from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). Glutaraldehyde (25% w/v, aqueous solution) and dithiothreitol (DTT) were from Aldrich (Milwaukee, WI). ZipTip<sup>®</sup> C<sub>18</sub> microextraction pipet tips were obtained from Millipore (St-Quentin-en-Yvelines, France).

#### 6.2.3.2. CZE analysis

CZE peptide maps were obtained on a P/ACE™ MDQ System (Beckman Coulter, Fullerton, CA) equipped with a UV-detector at 200 nm. All separations were performed at 25 °C in bare f.s. capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) of 50 µm i.d., 360 µm o.d., 60 cm total length and 50 cm effective length with applied voltage of 15 kV. The background electrolyte (BGE) separation buffer was 50 mM sodium phosphate, pH 2.5. The capillary was rinsed with 0.1 M NaOH, water, 0.1 M HCl and finally with BGE between each separation. Injection of *ca.* 5 nL was accomplished by application of a differential pressure of 0.5 psi for 5 s at the inlet end of the capillary.

#### 6.2.3.3. HPLC analysis

Peptides maps were obtained on an Hitachi D-7000 chromatographic system (Hitachi, San Jose, CA) using a Jupiter n-octadecylsilane (C18) column (Phenomenex, Torrance, CA) with dimensions of 250 mm x 4.6 mm. Gradient elution was performed using 0.1% (v/v) TFA in water (eluent A) and 0.08% (v/v) TFA in acetonitrile (eluent B). The gradient used was from 5 to 35% B over 35 min and the mobile phase flow rate was set at 1 mL/min. The injection volume was 20 µL and the detection wavelength was 200 nm.

#### 6.2.3.4. MALDI-TOF MS analysis

*Alpha*-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix was prepared fresh as a saturated solution in 50:50 ACN:0.1% TFA. Dried lysozyme digests were reconstituted in *ca.* 30 µL 1% FA, desalted using ZipTips®. The loaded ZipTip® were subjected to washing steps with 1 % FA (3 × 4 µL) to remove unadsorbed components (*e.g.*, denaturing agents) followed by a step-type elution of the peptides from the tip in 4 µL 50:50 (v/v) ACN:1 % FA then 4 µL 80:20 (v/v) ACN:1 % FA. Prior to spotting on the MALDI target by the dried-droplet method, the dried, de-salted samples were re-dissolved in 5 µL 1% FA. The MALDI spectra were collected on a time-lag focusing MALDI-TOF (reflector positive mode) Voyager DE-STR Biospectrometry workstation (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipped with a 337 nm N<sub>2</sub> laser. Sequence coverage for mass maps was obtained using the ProFound database search engine [34, 35], version 4.10.5.

#### 6.2.3.5. Trypsin immobilization procedures

##### *Covalent binding onto CPG particles (solid support immobilization technique)*

The covalent coupling of TPCCK-treated trypsin to aminopropyl CPG particles and characterization of the product are described in detail in Migneault *et al.*[33]. Briefly, aminopropyl CPG particles were shaken with 1% GA diluted in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, for 2 h at room temperature. An aliquot of 0.1 mM TPCCK-treated trypsin solution was added to the activated support in 50 mM phosphate buffer, pH 8.4 containing 10 mM NaCNBH<sub>3</sub> and allowed to react for 3 h at room temperature with gentle shaking. Then unreacted aldehyde groups of the CPG-GA support were deactivated by treatment with 200 mM glycine for 1 h. The CPG-GA-trypsin particles were washed and stored at 4°C in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The protein content of the particles was determined to be 4.9 mg/g support by UV-spectrophotometry. The specific activity of CPG-GA-trypsin was determined using TAME assay [36] and expressed as 25.8 U TAME/mg protein (1483.8 U BAEE/mg protein) or 126.5 U TAME/g support (7270.8 U BAEE/g support).

##### *Crosslinking technique (supportless immobilization technique)*

Immobilization of trypsin by crosslinking with GA and characterization of the product are described in detail in Migneault *et al.* [33]. Briefly, a 2.5% aqueous GA solution was added drop-wise, while stirring, to a 0.16 mM TPCCK-treated trypsin solution in 50 mM phosphate buffer, pH 6.8. After a few minutes, a yellowish solid formed and the reaction was allowed to proceed without stirring at room temperature for 2 h. After centrifugation (2 min, 3000 rpm) and washing to remove excess GA and non-covalently bound trypsin, the reaction was stopped by addition of 200 mM glycine, and let stand for 3 h at room temperature. The mixture was washed and stored at 4 °C in water until utilisation. The protein content of the dried preparation was determined to be 25 mg/g solid by UV-spectrophotometry. The specific activity of GA-crosslinked trypsin was determined and expressed as 0.054 U TAME/mg protein (3.1 U BAEE/mg protein) or 1.3 U TAME/g solid (77.5 U BAEE/g solid).



#### 6.2.3.6. Enzymatic digestions

##### *Homogeneous tryptic digestion*

Solution-phase (homogeneous) tryptic digestion was performed following the procedure described by Stone and Williams [37], with slight modifications. Prior to digestion, lysozyme was chemically denatured as follows: the protein substrate (8 mg/mL) was dissolved in 400 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 8.0, containing 8 M urea, then reduced with 45 mM DTT at 50 °C for 15 min and alkylated with 100 mM iodoacetamide at 25 °C for 15 min. The protein solution was diluted to 2 mg/mL before the digestion. Trypsin was added to give a final enzyme-to-protein ratio of 1:25 (w/w) and hydrolysis proceeded at 37 °C for 24 h with gentle stirring. The digestion was stopped by acidification with concentrated HCl and the digest was analyzed directly by CZE. For HPLC and MALDI analysis, the samples were vacuum-dried and re-dissolved in water/TFA buffer (eluent A) and 1% FA, respectively.

##### *Solid-phase tryptic digestions*

Lysozyme was denatured as described above and digestions (2 mg/mL) were performed in batch in 50 mM buffer, pH 8.0 (ammonium bicarbonate for GA-crosslinked trypsin and Tris-HCl for CPG-GA-trypsin) for 2 h at 37 °C with gentle stirring. Digestions were stopped by centrifugation at 3000 rpm for 2 min, at which point the supernatants (digests containing the peptide fragments) were collected and analyzed directly by CZE. The immobilized trypsin preparations were rinsed several times with buffer before reuse. Blank digestions were performed by incubation of the enzyme preparations with buffer only, under identical conditions. For HPLC and MALDI analysis, samples were vacuum-dried and re-dissolved in water/TFA buffer (eluent A) and 1% FA, respectively.

#### 6.2.4. Results and discussion

Routinely, protein digestion by soluble trypsin is performed either “in-gel” on a protein isolated by 1D- or 2D-gel electrophoresis or in solution on protein mixtures (*e.g.*, cell extracts). Both of these solution-phase methods suffer from long incubation times, loss of catalytic activity, single use of the enzyme, and trypsin autolysis that leads to interfering background peptides during chromatographic separations and ion suppression during mass mapping. Immobilized enzymes can alleviate the drawbacks of soluble enzymes, providing

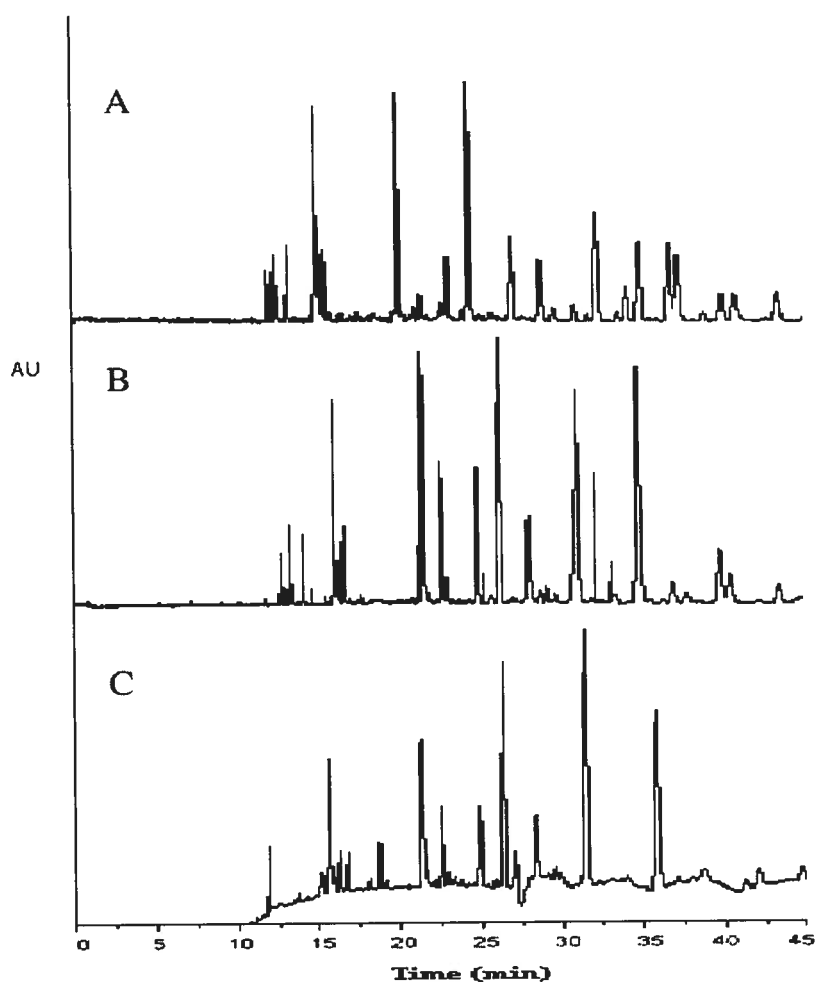
economical and technical advantages. Covalent attachment of trypsin to a solid support is, in theory, the most stable method of immobilizing a protein. We have investigated two procedures for trypsin immobilization using the same homobifunctional agent, glutaraldehyde: by covalent coupling to CPG particles (solid support method) and by crosslinking (supportless method), which formed a solid product.

Lysozyme was used in the peptide mapping studies to compare the GA-immobilized trypsin preparations. Lysozyme is a small, well-characterized 14.3 kDa protein containing 4 disulfide bridges, readily digested by trypsin after denaturation and reduction/alkylation. Fourteen peptides and a few individual amino acids are the expected products of tryptic digestion, although the amino acids are not detected at 200 nm for the electrophoretic and chromatographic studies.

#### 6.2.4.1. Comparison of CZE peptide maps of lysozyme with free and immobilized trypsin preparations

Lysozyme (2 mg/mL) was digested in batch format using a traditional (soluble trypsin) procedure (Fig. 6.2.1A), GA-crosslinked trypsin (Fig. 6.2.1B) and CPG-GA-trypsin (Fig. 6.2.1C) digestions. The resulting peptide products were separated by CZE, according to net charge-to-Stokes's radius ratio. Fig. 6.2.1 shows that baseline separations are achieved and sharp peak shapes are obtained, indicating good resolution and efficiency. The soluble trypsin digestion (Fig. 6.2.1A) was considered as a reference for our study. CZE peptide maps in Fig. 6.2.1 showed more peaks than expected. The possibility of autodigestion of trypsin was monitored for the two immobilized trypsin preparations by doing a blank digestion (*i.e.*, no lysozyme). The resulting peptide maps (data not shown) suggested that autoproteolysis of immobilized trypsin was negligible and therefore not the source of extra peaks. Unfortunately, even highly purified proteases are far from perfect enzymes and either missed cleavages or non-specific cleavages can occur, and thus may be responsible for the extra peaks seen. Overall, the two immobilized trypsin preparations were able to produce in 2 h a digest similar to that carried out in the solution phase in 24 h based on similar major peak patterns present in the three maps in Fig 6.2.1, even though a fairly high substrate concentration was used (100  $\mu$ M). This concentration was chosen to test the immobilized trypsin preparations, so there would be no detection issues for CZE

and HPLC. Studies using reduced substrate concentrations are currently underway to address the sensitivity needed for many proteomics applications.



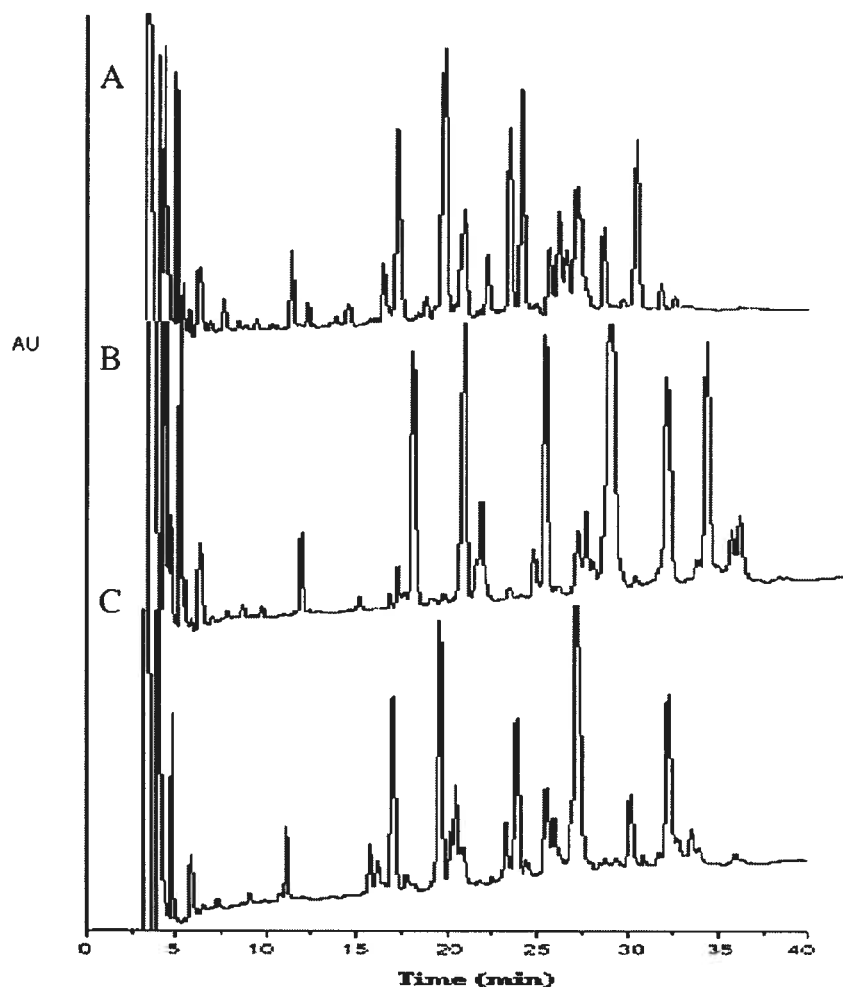
**Figure 6.2.1.** Electropherograms showing the peptide maps of chemically denatured lysozyme (2 mg/mL) obtained by (A) a 24 h digestion with free trypsin (enzyme:substrate = 1:25); (B) a 2 h solid-phase digestion with GA-crosslinked trypsin; (C) a 2 h solid-phase digestion with CPG-GA-trypsin. The three separations were carried out on the same day.

A comparison of the electropherograms from the two solid-phase digests (Figs. 6.2.1B and 6.2.1C) reveals closer resemblances, although some differences are noteworthy. In fact, peaks between 10 and 13 minutes are missing in the CPG-GA-trypsin digestion (Fig. 6.2.1C), but two additional peaks are found at 18.7 and 27.1 min. These differences are not due to poor reproducibility of the CZE separations, as described in section 3.3, but may be a result of differences in trypsin activity of the immobilized trypsin products. For example, based on the calculated activities and protein loading for the two

enzymatic preparations, Fig. 6.2.1B shows digestion of lysozyme by *ca.* 20 U BAEE (GA-crosslinked trypsin) whereas Fig. 6.2.1C represents *ca.* 350 U BAEE (CPG-GA-trypsin). In addition, during batch digestion, stirring was gentle enough to avoid breaking up the CPG particles, but sufficient to obtain their dispersion to start with. However, progressively over the 2-h digestion period, the relatively heavy CPG particles tended to clump together on one side of the reaction tube whereas the lighter crosslinked product was almost uniformly suspended in the reaction solution at all times. This behavior affects the accessibility of the substrate to the trypsin and renders the surface of contact quite different for the two types of immobilized enzyme. Furthermore, if we consider the 3 maps in Fig 6.2.1, it seems that GA-crosslinked trypsin gives an “intermediate” digestion pattern compared to soluble trypsin (Fig. 6.2.1A) and CPG-GA-trypsin (Fig. 6.2.1C). During the first 25 min of migration time, Fig. 6.2.1B resembles Fig. 6.2.1A the most, whereas it looks more like Fig. 6.2.1C at later migration times. This could possibly be due to the presence of non-covalently bound trypsin trapped within the polymeric network of GA-crosslinked trypsin, even though the immobilized product was well washed before its use. This means that some of the GA-crosslinked trypsin could behave as soluble enzyme, although in a restricted capacity.

#### 6.2.4.2. Comparison of HPLC peptide maps of lysozyme with free and immobilized trypsin preparations

HPLC analysis was carried out using the conventional procedure for peptide mapping by ion-pair (*e.g.*, either with trifluoroacetic acid or acetic acid) liquid chromatography (HPLC) on C18 stationary phase with a water-acetonitrile gradient. The selectivity reversed-phase HPLC results from the relative polarity of the peptide side chain. Fig. 6.2.2 shows the chromatographic peptide maps of denatured lysozyme digested by soluble trypsin (Fig. 6.2.2A), GA-crosslinked trypsin (Fig. 6.2.2B) and CPG-GA-trypsin (Fig. 6.2.2C).



**Figure 6.2.2.** Chromatograms showing the peptide maps of the same three samples described in Fig. 6.2.1: (A) a 24 h digestion with free trypsin; (B) a 2 h solid-phase digestion with GA-crosslinked trypsin; (C) a 2 h solid-phase digestion with CPG-GA-trypsin.

Fig. 6.2.2 shows that baseline separations and good peak shape are achieved for most of the more intense peaks, indicating a good choice of separation conditions. The complete resolution of all peptides derived from a given enzymatic digestion is difficult to achieve because no single chromatographic (or electrophoretic) method has the resolving power sufficient to separate all components when the peptide mixture is very complex. The resolving power of HPLC is known to be lower than for CZE, but the use of a peptide map as a qualitative tool does not require the accurate quantification of the individual peptide peaks so partially resolved peaks are acceptable.

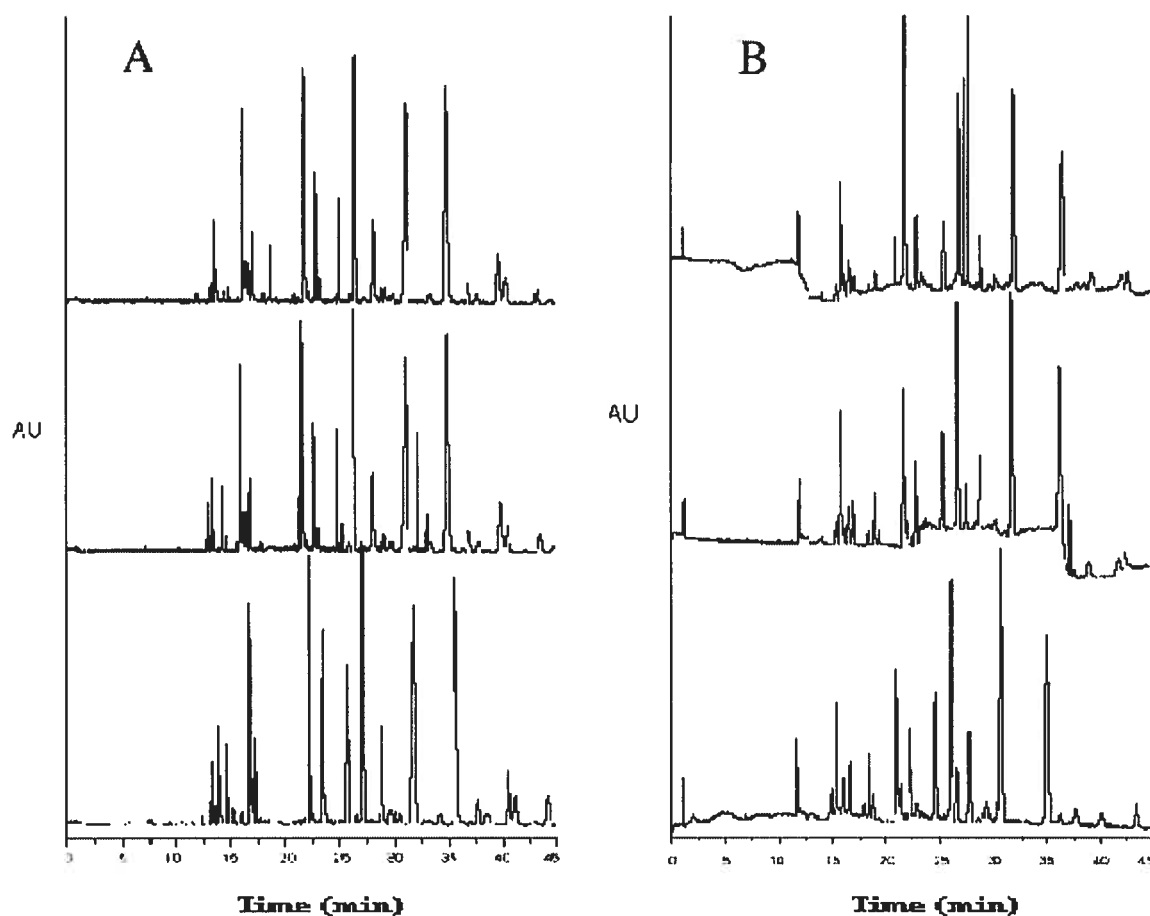
Because of the different separation mechanism of HPLC compared with CZE, the order of elution of peptides is different, *e.g.*, reversed-phase HPLC is selective for hydrophobic differences in peptides while CZE selectivity depends strongly on analyte charge. Fig. 6.2.2 shows that almost the same peak pattern was obtained for the three digestions, although some extra peaks were observed for solution-phase digestion. In fact, in Fig. 6.2.2A, at least 2 more peaks, at 12.2 and 22.2 min, are seen compared to maps generated by the immobilized enzymes. For the two solid-phase digestions, the peak profiles are quite similar except the 2 peaks at 8.1 and 14.2 min, which are missing for CPG-GA-trypsin (Fig. 6.2.2C) compared to GA-crosslinked trypsin (Fig. 6.2.2B). Moreover, the observations made for CZE-based peptide maps regarding the physical properties of the enzyme preparations and the possibility of trypsin entrapment, seem to be in the same direction.

#### 6.2.4.3. Reproducibility of CZE and HPLC elution times in lysozyme peptide maps

Reproducibility is paramount to the successful application of peptide mapping as a comparative technique, so a high degree of elution time reproducibility is required. For CZE, adsorption of proteins and peptides on the capillary wall is a serious problem, which can lead to variable migration times, band broadening and tailing, especially for separations at the intermediate-pH range. Therefore, a low pH separation buffer was employed to ensure minimum interaction between the cationic peptides and neutral wall of the bare silica capillary, as well as to profit from slight  $pK_a$  differences in the terminal carboxylate group that help separated peptides having similar structures. To test the stability of our CZE separation conditions, three analyses of the same digest (2 mg/mL lysozyme) were performed over a period of 24 h. Migration time reproducibility was 0.6% RSD for all peaks, as a result of careful consideration to temperature, washing protocols and capillary wall equilibration with buffer before each separation. In the case of HPLC, many factors in addition to separation conditions can affect reproducibility like column and instrument performance [38]. For example, the separation of tryptic digests is highly dependent on gradient reproducibility [39]. To test gradient reproducibility, three aliquots of the same tryptic digest of lysozyme were analyzed. A mean RSD of less than 0.3% for all peaks was observed. Thus, both CZE and HPLC methods showed excellent

performance for peptide mapping applications as demonstrated by the high elution time reproducibility.

Digestion reproducibility of immobilized trypsin preparations by CZE and HPLC. Knowing that CZE- and HPLC-based peptide maps can attain at best 0.6% and 0.3% mean elution times RSD respectively, the digestion reproducibility of the two immobilized trypsin preparations was evaluated by comparison of peptide maps from three different digestions made with the same batch of immobilized trypsin. Three aliquots (1.5 mL) of 2 mg/mL lysozyme were digested for 2 h under the same conditions (pH and temperature). The three 2-h digestions, which were carried out on the same day, were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until their analyses by CZE (Figs. 6.2.3A and B) and HPLC (Figs. 6.2.3C and D) could be made consecutively on the same day.



**Figure 6.2.3.** Peptide maps showing the digestion reproducibility associated with the two immobilization techniques for 3 separate aliquots of lysozyme digested by a given batch of immobilized trypsin. (A) CZE maps using GA-crosslinked trypsin; (B) CZE maps using CPG-GA-trypsin; (C) HPLC maps using GA-crosslinked trypsin; (D) HPLC maps using CPG-GA-trypsin.

Repeated use of both immobilized trypsin preparations for lysozyme digestion gave almost identical electrophoretic (Figs. 6.2.3A and B) and chromatographic (Figs. 6.2.3C and D) peptide maps. These results, combined with the excellent mean RSD values, suggest that any observed differences between Figs. 6.2.1A, B and C are not related to the analysis or digestion reproducibilities, but arise instead from differences in enzyme behavior due to the immobilization processes (*e.g.*, substrate accessibility to bound trypsin). Immobilized trypsin preparations show slower rates of denaturation or inactivation compared to soluble enzymes, which often quickly lose their catalytic activity that can lead to a lack of reproducibility in the peptide map. We are currently evaluating the longevity and effective shelf life of each immobilized trypsin preparation.

#### 6.2.4.4. Comparison of MALDI-TOF mass maps of lysozyme digested with soluble and immobilized trypsin preparations

Photometric detection in peptide mapping provides a fingerprint of the parent protein, which can only be compared to a protein standard, whereas MS allows detailed characterization because the exact masses of the peptide fragments and thus protein identification. Comparison of experimental mass spectral data with theoretically computed masses derived from genomic and proteic databases give information about the probability of the correct identification of a protein.

Tryptic digestion of a protein results in a mixture of peptides of different physicochemical characteristics, which means not all peptides are detected by MS, when traditional sample preparation techniques are used. Moreover, MALDI-TOF spectra suffer from chemical noise namely due to matrix-related background peaks in the lower mass range ( $m/z < 900$  Da). As a result, 5 of the 14 expected peptides for lysozyme (top section of Table 6.2.1) can not be considered in the evaluation of the performance of the immobilized trypsin preparations. For the 9 remaining peptides that fall within the scanned mass range, Table 6.2.1 (bottom section) shows the observed masses and the accuracy of these results with respect to the theoretically computed masses for soluble and immobilized trypsin preparations.



**Table 6.2.1. MALDI mass data for chemically denatured lysozyme peptides from free trypsin, GA-crosslinked trypsin and CPG-GA-trypsin digests**

Theoretical [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Position	MC <sup>b</sup>	Sequence	Free trypsin		GA-crosslinked trypsin		CPG-GA-trypsin						
				Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. <sup>c</sup> Mass acc. <sup>d</sup> (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)	Observed [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Dev. (Da)	Mass acc. (ppm)			
132.10	129-129	0	L											
147.11	97-97	0	K											
147.11	1-1	0	K											
175.12	14-14	0	R											
307.14 <sup>a</sup>	115-116	0	CK											
289.16	113-114	0	NR											
392.17 <sup>a</sup>	126-128	0	GCR											
478.28	2-5	0	VFGR											
517.27	67-73	0	TPGSR											
874.42	15-21	0	HGLDNYR											
893.42 <sup>a</sup>	6-13	0	CELAAMK											
993.40 <sup>a</sup>	62-68	0	WWCNDGR	993.41	0.01	10	993.41	0.01	10	993.37	-0.03	30		
1045.54	117-125	0	GTDVQAWIR	1045.56	0.02	19	1045.56	0.02	19	1045.51	-0.03	29		
1325.63	22-33	0	GYSLGNWVCAAK											
1333.67 <sup>a</sup>	115-125	1	CKGTDVQAWIR							1333.65	-0.02	15		
1428.65	34-45	0	FESNFNTQATNR	1428.70	0.05	35	1428.68	0.03	21	1428.64	-0.01	7		
1675.80	98-112	0	IVSDGNGMNAWVA WR				1675.85	0.05	30	1675.83	0.03	18		
1753.84	46-61	0	NTDGGTDYGILQNSR	1753.89	0.05	29	1753.89	0.05	29	1753.87	0.03	17		
1803.90	97-112	1	KIVSDGNGMNAWVA WR							1803.93	0.03	17		
2508.19	74-96	0	NLCNIPCSALLSSDIT ASVNCNAK				2508.32	0.13	52	2508.31	0.12	48		

<sup>a</sup> Carbamidomethylated peptides;<sup>b</sup> MC: number of missed cleavages;<sup>c</sup> Deviation by comparison to theoretical masses; <sup>d</sup> Mass accuracy (ppm) evaluated by the ratio of the difference between observed and theoretical masses to the corresponding theoretical mass x 10<sup>6</sup>.

Table 6.2.1 shows that 6 of the 9 theoretical peptides expected were found for the two immobilized trypsin preparations, plus 2 masses corresponding to peptides having a single missed cleavage site at a lysine residue for CPG-GA-trypsin digestion. Two of the three undetected peptides are lysine-terminated ( $m/z$  893 and 1325). In fact, MALDI peptide mass fingerprints of tryptic digests are known to be dominated by peptides containing C-terminal arginine residues. Krause *et al.* [40] demonstrated that, compared to arginine, it is difficult to observe lysine-terminated peptides because they are inherently less sensitive for mass detection. Moreover, it is known that in MALDI spectra of complex mixtures, the presence of low-mass ion signals in high abundance can have a negative effect on the detection of higher mass ions. For example, the most intense signals in our mass maps were for peptides at  $m/z$  1675 and 1428 for the two immobilized trypsin preparations and the soluble trypsin, respectively. Thus a manual search was necessary to find the peptide at  $m/z$  2508. On the other hand, sample preparation by ZipTip<sup>®</sup>, which is required to eliminate interfering compounds like denaturing agents and salts, can lead to loss of small or polar peptides that do not effectively adsorb to the C18 phase. This may explain why we did not see the peptide at  $m/z$  874, which is small and polar. Amongst the two immobilized trypsin preparations, the GA-crosslinked trypsin seems to digest lysozyme more completely compared to CPG-GA-trypsin, for which 2 peptides containing missed cleavage sites were observed. This difference would unlikely be due to the unequal number of units of trypsin (*e.g.*, specific activity) added to the two digestion mixtures because this was *ca.* 20 times higher for the CPG-GA-trypsin. Moreover, the concentration of substrate was identical as well as the digestion time, temperature and buffer pH for the two immobilized trypsin preparations. It is unlikely an effect of the composition of the digestion buffer used because we observed very poor digestions using CPG-GA-trypsin in ammonium bicarbonate versus in Tris-HCl. The different extents of digestion might be explained by the physical properties of the two enzymatic preparations (the lighter GA-crosslinked trypsin compared to the heavier CPG-GA-trypsin), which affect their ability to interact with the substrate as noted previously for the electropherograms in Fig. 6.2.1.

By comparing mass spectral data for the solution-phase versus solid-phase digestions, similar results were found, except for peptide at  $m/z$  1675, which was not detected in the soluble trypsin digest. This disappearance was surprising, but probably not due to the digestion itself because peak profiles either by CZE or HPLC were almost the

same for soluble versus immobilized trypsin preparations. For the MALDI-TOF mapping technique, co-crystallization of sample and matrix can lead to possible crystal inhomogeneity and the apparent lack of certain peptides.

Peptide mass fingerprinting is an important tool for protein identification by matching the measured tryptic peptide fragment masses to theoretical values calculated from protein databases (*e.g.*, column 1 of Table 6.2.1). Determination of primary sequence coverage (Table 6.2.2), expressed as the percentage of total amino acid residues of lysozyme accounted for and as the number of peptides seen in the mass spectrum was performed using ProFound, one of the many available sequence databases search engines.

**Table 6.2.2.** Comparison of lysozyme sequence coverages identified by ProFound v. 4.10.5

Sequence coverage	Trypsin		
	Free	GA-crosslinked	CPG-GA-
% of amino acids	34	64	66
Number of peptides	4	6	8

Table 6.2.2 gives a false impression of the performance of the 3 tryptic digestion techniques. Whereas digestion with CPG-GA-trypsin seems to generate the most (*i.e.*, 8) peptides, 2 of these are peptides containing one missed cleavages each, in which one extra amino acid and the peptide at  $m/z$  307 are recovered to give 66% sequence coverage. For GA-crosslinked trypsin digestion, 6 peptides are found, leading to 64% sequence coverage. On the other hand, 4 peptides were detected with 34% sequence coverage for soluble trypsin, probably as a result of inhomogeneous co-crystallization during sample preparation. Moreover, the top section of Table 6.2.1 represents 16% of the amino acid sequence of lysozyme, which leads to very small peptides or amino acids not seen by MALDI-TOF analysis. In fact, the CHCA matrix used for MALDI-TOF sample preparation presents high background noise in the range of  $m/z$  650-900, which can potentially bury one more low-mass peptides, like peptide at  $m/z$  874.

Currently, instruments using the delayed extraction principle [41-44] and reflectron allow high mass accuracy of 5 to 100 ppm for identification of proteins [45]. A minimum of five peptides matched with a maximum allowed mass deviation of 50 ppm and a

sequence coverage of at least 15% were suggested by Jensen *et al.* [46] as criteria for an unambiguous protein match. Our results from Tables 6.2.1 and 6.2.2, showing mean mass accuracies (for the immobilized enzyme digestions) of better than 25 ppm and mean sequence coverage of 65%, demonstrate that peptide mass fingerprinting with both solid-phase trypsin preparations allowed reliable identification of lysozyme and, in our case, with better results than using soluble trypsin.

#### 6.2.5. Concluding remarks

Trypsin immobilization with GA, either by crosslinking or linking to an insoluble carrier (CPG), is a powerful strategy for peptide mapping studies. It enables the preparation of reliable and catalytically active enzyme preparations that can be used for fast digestion of proteins of dissolved protein substrates. CZE and HPLC are two orthogonal separation procedures that resolve mixtures based on two completely different separation mechanisms. Thus, the combination of these techniques for the analysis of highly complex peptide mixtures appears worthwhile. MALDI MS provides an extra dimension of information that is invaluable for identifying the peptides and confirming protein identity. Our results demonstrated excellent reproducibilities (RSD of less than 1%) for separation conditions and instrument performances of CZE and HPLC as analytical techniques. Furthermore, repeated use of the immobilized enzymes produced similar peak pattern, thus indicating good digestion reproducibility and the possibility of their effective application as analytical tool in peptide mapping. Our current research is now focused on evaluating the long-term efficiency of immobilized trypsin preparations, the digestion of other proteins and the transfer to microreactor format, for their application in proteomics.

#### **Acknowledgement**

*This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Council of Canada and the France-Québec Permanent Commission for Scientific Cooperation. I. Migneault acknowledges graduate scholarships from the Quebec Funds for Research in Nature and Technology, from the National Bank of Canada and from the Université de Montréal. We thank H. Hamad for his preliminary studies on immobilization techniques.*

*We also thank Prof. J. Rossier (Neurobiology Laboratory, ESPCI, Paris, France) for advice and the use of his group's MALDI-TOF mass spectrometer.*

#### 6.2.6. References

- [1] Nadler, T.; Blackburn, J.; Mark, N.; Gordon, N.; Regnier, F. E.; Vella, G. J. *Chromatogr. A* **1996**, *743*, 91-98.
- [2] Hoff, E. R.; Chloupek, R. C. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 51-68.
- [3] Geisow, M. J.; Beaven, G. H. *Biochem. J.* **1977**, *163*, 477-484.
- [4] Tarr, G. E.; Crabb, J. W. *Anal. Biochem.* **1983**, *131*, 99-107.
- [5] Gross, E. In *Methods Enzymol.*; Hirs, C. H. W., Ed.; Academic Press: New York (NY), 1967; Vol. XI, pp 238-255.
- [6] Degani, Y.; Patchornik, A. *Biochem.* **1974**, *13*, 1-11.
- [7] Croft, L. R. *Handbook of Protein Sequence Analysis*; John Wiley & Sons: New York (NY), 1980.
- [8] Leadbeater, L.; Ward, F. B. *J. Chromatogr.* **1987**, *397*, 435-443.
- [9] Judd, R. C. In *Methods Enzymol.*; Deutscher, M. P., Ed.; Academic Press: San Diego (CA), 1990; Vol. 182, pp 613-626.
- [10] Castagnola, M.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Valeria, D. *J. Chromatogr.* **1991**, *572*, 51-58.
- [11] Chang, H.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2947-2951.
- [12] Hynek, R.; Kasicka, V.; Kucerova, Z.; Kas, J. *J. Chromatogr. B* **1996**, *681*, 37-45.
- [13] Rickard, E. C.; Towns, J. K. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 237-264.
- [14] Mann, M. *J. Prot. Chem.* **1994**, *13*, 506-507.
- [15] Gatlin, C. L.; Kleemann, G. R.; Hays, L. G.; Link, A. J.; III., Y. J. *Anal. Biochem.* **1998**, *263*, 93-101.
- [16] Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- [17] Quadroni, M.; James, P. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 664-677.
- [18] Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437-473.

- [19] Kennedy, J. F.; Cabral, J. M. S. In *Solid Phase Biochemistry: Analytical and Synthetic Aspects*; Scouten, W. H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1983; Vol. 66, pp 253-391.
- [20] Cheetham, P. J. S. In *Handbook of Enzyme Biotechnology*; Wiseman, A., Ed.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1985, pp 54-142.
- [21] Peterson, D. S.; Rohr, T.; Svec, F.; Frechet, J. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4081-4088.
- [22] Jin, L. J.; Ferrance, J.; Sanders, J. C.; Landers, J. P. *Lab on a Chip* **2003**, *3*, 11-18.
- [23] Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 388-393.
- [24] Kennedy, K. F.; White, C. A. In *Handbook of Enzyme Biotechnology*; Wiseman, A., Ed.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1985, pp 147-207.
- [25] Zaborsky, O. R. *Immobilized Enzymes*; CRC Press: Cleveland, 1973.
- [26] Monsan, P. In *Les enzymes : Production et Utilisations Industrielles*; Durand, G., Monsan, P., Eds.; Gauthiers-Villars Bordas: Paris, 1982, pp 80-118.
- [27] Richards, F. M.; Knowles, J. R. *J. Mol. Biol.* **1968**, *37*, 231-233.
- [28] Nakagawa, T.; Izawa, K.; Yagi, S.; Shibukawa, A.; Tanaka, H.; Tashima, T.; Imai, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2463-2466.
- [29] St Clair, N. L.; Navia, M. A. *J. Amer. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7314-7316.
- [30] Wong, S. S.; Wong, L. J. C. *Enzyme and Microb. Technol.* **1992**, *14*, 866-874.
- [31] Okuda, K.; Urabe, I.; Yamada, Y.; Okada, H. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *71*, 100-105.
- [32] Walt, D. R.; Agayn, V. *Trends Anal. Chem.* **1994**, *13*, 425-430.
- [33] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Vinh, J.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1367-1378.
- [34] [http://prowl.rockefeller.edu/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe).
- [35] Zhang, W.; Chait, B. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2482-2489.
- [36] Hummel, B. C. W. *Can. J. Biochem.* **1959**, *37*, 1393-1399.
- [37] Stone, K. L.; Williams, K. R. In *A Practical Guide to Protein and Peptides Purification for Microsequencing*; Matsudaira, P., Ed.; Academic Press: San Diego (CA), 1993, pp 43-69.
- [38] Chloupek, R. C.; Battersby, J. E.; Hancock, W. S. In *High Performance Liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and*

*Conformation*; Mant, C. T., Hodges, R. S., Eds.; CRC Press: Boca Raton (FL), 1991, pp 825-833.

- [39] Hoff, E. R. *LCGC* **1989**, *7*, 320-326.
- [40] Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P. R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4160-4165.
- [41] Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1998-2003.
- [42] King, T. B.; Colby, S. M.; Reilly, J. P. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1995**, *145*, L1-L7.
- [43] Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044-1050.
- [44] Whittal, R. M.; Li, L. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1950-1954.
- [45] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A.; Mann, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 1371-1378.
- [46] Jensen, O. N.; Podtelejnikov, A. V.; Mann, M. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4741-4750.

# **Chapitre 7**

## **Conclusion**



## 7.1. Problématique

La cartographie peptidique est une importante technique de caractérisation des protéines. Elle implique des procédures analytiques qui mènent à une séparation reproductible d'un ensemble de peptides, ceux-ci étant caractéristiques d'une protéine donnée. La technique classique utilise la trypsine soluble, qui présente plusieurs inconvénients tels que l'autolyse de l'enzyme, un long temps d'incubation et une utilisation unique de l'enzyme. Les enzymes immobilisées, dont les applications ne cessent de croître, font de nos jours l'objet d'un intérêt considérable en cartographie peptidique. En effet, elles offrent plusieurs avantages techniques et économiques comparativement aux enzymes solubles. Par conséquent, le présent travail de recherche avait pour but le développement d'une méthode d'immobilisation de la trypsine, par réticulation avec le glutaraldéhyde (GA), pour la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire (CZE), chromatographie liquide (HPLC) et spectrométrie de masse (MS).

## 7.2. Bilan

Au cours de cette recherche, nous avons développé une méthode d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec le glutaraldéhyde (GA). Étant donné les difficultés rencontrées lors des recherches bibliographiques sur le sujet, nous avons entrepris de rassembler le maximum d'informations sur GA dans une revue de la littérature, présentée au Chapitre 3. Cette revue nous a permis de constater que le succès de GA était relié à sa nature multicomposante en solution aqueuse et que son mécanisme de réaction avec les protéines était encore sujet à spéculation. Par ailleurs, elle nous a donné des lignes directrices afin d'orienter le développement de notre méthode d'immobilisation.

Le Chapitre 5 était dédié à la recherche de conditions favorables pour la préparation de trypsine immobilisée par réticulation avec GA et à un premier essai de cartographie peptidique par CZE. Nous avons tout d'abord réalisé une étude de quelques conditions d'immobilisation, notamment le tampon et le rapport trypsine:GA. Nous avons cherché à déterminer un tampon (pH et force ionique) et un rapport trypsine:GA qui favorisaient une insolubilisation rapide de la trypsine. Le phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8, et un rapport trypsine:GA de 1:250 se sont avérés être des choix appropriés, et ce, compte tenu de nos observations et des protocoles rapportés dans la littérature. En ce qui a trait aux autres conditions d'immobilisation (température, durée et arrêt de la réaction), nous nous

sommes rapportés à la littérature. Nous avons ensuite tenté d'évaluer le rendement d'immobilisation de la procédure développée, ce qui n'a pas été chose facile en raison de l'interférence engendrée par la présence de GA. Toutefois, nous avons été en mesure de déterminer, par spectrophotométrie différentielle, que notre procédure d'immobilisation était quantitative. En effet, plus de 95% de la trypsine était immobilisée par réticulation avec GA, comparativement à 68% pour l'immobilisation sur CPG (voir Chapitre 6). Finalement, nous avons testé notre enzyme immobilisée par un premier essai de protéolyse, réalisé avec une protéine standard, la  $\beta$ -caséine. Les premières cartes ont été générées par CZE, qui a démontré une excellente reproductibilité des temps de migration (écart-type relatif moyen de 0.5%). Par ailleurs, les cartes obtenues par protéolyse hétérogène sont comparables à celles obtenues par protéolyse homogène (trypsine soluble). La trypsine immobilisée a aussi montré une excellente reproductibilité de protéolyse puisque trois protéolyses consécutives ont donné des cartes similaires. Par ailleurs, au même titre que d'autres méthodes d'immobilisation, nous n'avons pas observé d'autolyse de l'enzyme immobilisée, ce qui représente un avantage considérable puisque les cartes générées représentent réellement les peptides appartenant à la protéine étudiée.

Le Chapitre 6 a présenté deux applications de cartographie peptidique de protéines standards par la trypsine immobilisée, présentées sous forme d'articles soumis à des journaux scientifiques. Ces articles ont permis de comparer l'immobilisation par réticulation avec le GA et la fixation sur un support (CPG). Le premier article permettait de comparer les deux méthodes d'immobilisation en termes de rendement d'immobilisation et de caractérisation cinétique, et de les appliquer à la cartographie peptidique de l'hémoglobine humaine normale (HbA). Les résultats montrent que l'immobilisation par réticulation donne un rendement d'immobilisation supérieur à la fixation sur un support, mais que l'activité enzymatique spécifique du produit immobilisé est beaucoup plus faible. Toutefois, les deux enzymes immobilisées conservent la capacité de générer des mélanges peptidiques à partir de HbA, et les cartes peptidiques obtenues par CZE montrent des profils de pics similaires et comparables à ceux obtenus par protéolyse homogène. Par ailleurs, les cartes peptidiques de masse permettent d'identifier la protéine dans les bases de données puisque les masses des peptides sont obtenues avec une bonne exactitude (*ca.* 25 ppm ou 0.04 Da). Le second article traitait de l'application de la trypsine immobilisée pour la cartographie peptidique du lysozyme de poulet par CZE et MALDI,

mais également par HPLC. D'excellents résultats ont également été obtenus, autant pour la reproductibilité des techniques d'analyse (CZE et HPLC) que pour celle de la protéolyse, et ce, pour les deux techniques d'immobilisation. Les cartes peptidiques de masse ont aussi permis d'identifier le lysozyme dans les bases de données, de la même façon que pour HbA. Par conséquent, l'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA, au même titre que celle obtenue par fixation sur CPG, représente une alternative intéressante à la protéolyse homogène.

Globalement, les conditions que nous avons choisies pour immobiliser la trypsine avec GA ont permis d'obtenir un biocatalyseur capable de générer un mélange de peptides spécifiques de la protéine étudiée, et ce, de façon reproductible. Par ailleurs, nous avons caractérisé le produit immobilisé en terme de contenu en enzyme par spectrophotométrie différentielle (UV), ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été rapporté dans la littérature. De plus, nous n'avons pas observé d'autolyse ou de relargage de l'enzyme immobilisée. D'autre part, les conditions de séparation que nous avons utilisées, autant en CZE qu'en HPLC, ont également démontré qu'il était possible d'obtenir des cartes peptidiques reproductibles.

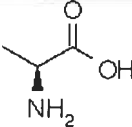
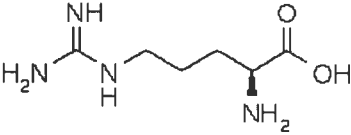
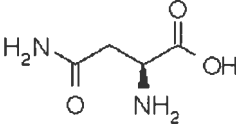
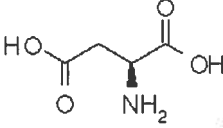
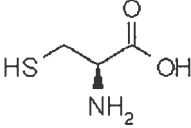
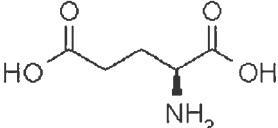
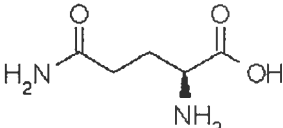
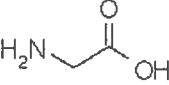
### **7.3. Perspectives**

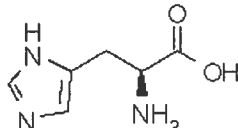
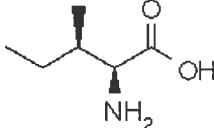
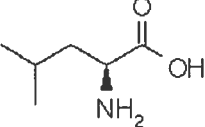
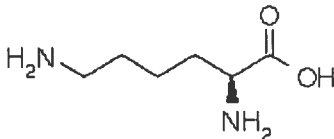
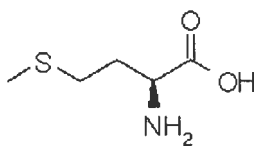
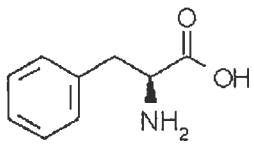
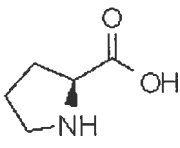
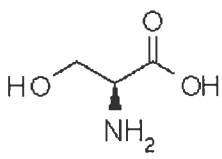
Les résultats obtenus montre que nous avons atteint l'objectif fixé au départ, soit le développement d'une méthode d'immobilisation de la trypsine par réticulation avec GA. Nous avons fait une première caractérisation de l'enzyme immobilisée concernant le rendement d'immobilisation (contenu en enzyme de la préparation) et le comportement cinétique (activité résiduelle et pH optimum). Il serait maintenant intéressant de poursuivre la caractérisation pour déterminer la température optimale pour la protéolyse puisque certains auteurs ont remarqué un déplacement vers des valeurs plus élevées, et ce, probablement en raison de la stabilisation de l'enzyme. Par ailleurs, nous avons déjà déterminé que trois protéolyses donnaient des cartes reproductibles, et il faudrait tenter de déterminer la stabilité opérationnelle de la trypsine immobilisée, c'est-à-dire le nombre de protéolyses qui peuvent être effectuées avec la même préparation enzymatique. De plus, il faudrait évaluer la stabilité de stockage, c'est-à-dire déterminer si des pertes d'activité sont notables sur une période de temps donné.

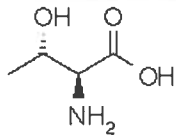
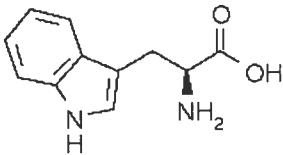
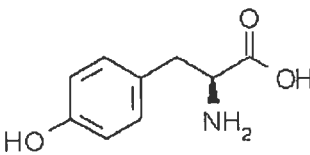
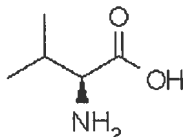
D'un autre côté, il serait intéressant de développer un microréacteur enzymatique, ce dernier pouvant être incorporé dans un système en-ligne. En effet, les microréacteurs montrent plusieurs avantages tels que l'utilisation de petites quantités d'échantillon et la possibilité d'automatiser une grande partie du processus de protéolyse et d'analyse des peptides. Par ailleurs, l'immobilisation par réticulation avec GA pourrait être appliquée à d'autres enzymes, en particulier celles qui sont très dispendieuses, en prenant avantage de la réutilisation potentielle des enzymes immobilisées.

## **Annexe A**

## Annexe A. Les 20 acides aminés naturels [1]

Acide aminé	Abréviation	Structure	Masse moyenne (Da)
Alanine	Ala (A)		71.1
Arginine	Arg (R)		156.2
Asparagine	Asn (N)		114.1
Acide aspartique	Asp (D)		115.1
Cystéine	Cys (C)		103.1
Acide glutamique	Glu (E)		129.1
Glutamine	Gln (Q)		128.1
Glycine	Gly (G)		57.0

Acide aminé	Abréviation	Structure	Masse moyenne (Da)
Histidine	His (H)		137.1
Isoleucine	Ile (I)		113.2
Leucine	Leu (L)		113.2
Lysine	Lys (K)		128.2
Méthionine	Met (M)		131.2
Phénylalanine	Phe (F)		147.2
Proline	Pro (P)		97.1
Sérine	Ser (S)		87.1

Acide aminé	Abréviation	Structure	Masse moyenne (Da)
Thréonine	Thr (T)		101.1
Tryptophane	Trp (W)		186.2
Tyrosine	Tyr (Y)		163.2
Valine	Val (V)		99.1



## **Annexe B**

## Annexe B. Exemples d'agents de clivage enzymatiques et chimiques [2]

Type	Nom de l'agent	Spécificité
Enzyme	Trypsine (EC 3.4.21.4)	Extrémité C-terminale des résidus Arg et Lys
	Chymotrypsine (EC 3.4.21.1)	Extrémité C-terminale des résidus Tyr, Phe, Trp, Leu
	Lys-C (EC 3.4.21.50)	Extrémité C-terminale de Lys
	Glu-C (EC 3.4.21.19)	Extrémité C-terminale de Glu et Asp
	Asp-N (3.4.24.33)	Extrémité N-terminale de Asp et acide cystéique
	Arg-C (3.4.21.35)	Extrémité C-terminale de Arg
	Clostripaine (3.4.22.8)	Extrémité C-terminale de Arg
Réactif chimique	Bromure de cyanogène (CNBr)	Extrémité C-terminale de Met
	Acide dilué	Asp et Pro
	Acide 2-nitro-5-thio-cyanobenzoïque	Extrémité N-terminale de Cys
	Acide <i>o</i> -iodosobenzoïque	Extrémité C-terminale de Trp et Tyr

## **Annexe C**

## Annexe C. Structures primaires des protéines utilisées

### Trypsine bovine [3, 4]

IVGGYTCGAN	TVPYQVSLNS	GYHFCGGSLI	NSQYVVSAAH	CYKSGIQVRL
GEDNINVVEG	NEQFISASKS	IVHPSYNSNT	LNNDIMLIKL	KSAASLNSRV
ASISLPTSCA	SAGTQCLISG	WGNTKSSGTS	YPDVLKCLKA	PILSNSSCKS
AYPGQITSNM	FCAGYLQGGK	DSCQGDSGGP	VVCSGKLQGI	VSWGSGCAQK
NKPGVYTKVC	NYVSWIKQTI	ASN		

Ponts disulfures : 7-137; 25-41; 109-210; 116-183; 148-162; 173-197

### $\beta$ -caséine bovine [5]

RELEELNVPG	EIVESLSSSE	ESITRINKKI	EKFQSEEQQQ	TEDELQDKIH
PFAQTQSLVY	PFPGPINSL	PQNIPPLTQT	PVVVPPFLQP	EVMGVSKVKE
AMAPKHKEMP	FPKYVPEPFT	ESQSLTLTDV	ENLHLPLPLL	QSWMHQPHQP
LPPTVMFPPQ	SVLSLSQSKV	LPVPQKAVPY	PQRDMPIQAF	LLYQEPVLGP
VRGPFPIIV				

### Lysozyme de poulet [6]

KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS
TDYGILQINS	RWWCNDGRTP	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS
DGNMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGRL		

Ponts disulfures : 6-127; 30-115; 64-80; 76-94

**Hémoglobine humaine adulte (HbA) [7]****Chaîne  $\alpha$** 

VLSPADKTNV	KAAWGKVGAI	AGEYGAEALE	RMFLSFPTTK	TYFPDFDLSH
GSAQVKGHGK	KVADALTNV	AHVDDMPNAL	SALSDLHAHK	LRVDPVNFKL
LSHCLLVTLA	AHLPAEFTPA	VHASLDKFLA	SVSTVLTSKY	R

**Chaîne  $\beta$** 

VHLTPEEKSA	VTALWGKVVN	DEVGGEALGR	LLVVYPWTQR	FFESFGDLST
PDAVMGNPKV	KAHGKKVLGA	FSDGLAHLDN	LKGTFTLSE	LHCDKLHVDP
ENFRLLGNVL	VCVLAHHFGK	EFTPPVQAAY	QKVVAGVANA	LAHKYH

## **Annexe D**

### Annexe D. Différentes matrices MALDI pour l'analyse des protéines et des peptides

Nom	Abréviation	$\lambda$	Référence
Acide caféique	CA	337 nm	[8]
Acide nicotinique	NA	266 nm	[9]
Acide sinapinique (acide 3.5-diméthoxy-4-hydroxy-cinnamique)	SA	337 nm	[8]
Acide férulique (acide 4-hydroxy-3-methoxy-benzoïque)	FA	337 nm	[8]
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	DHB	337 nm	[10]
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique	$\alpha$ -CHCA	337 nm	[11]
Acide 5-méthoxysalicylique	MSA	337 nm	[12]
2,6-dihydroxyacétophénone	DHAP	337 nm	[13]
Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)-benzoïque	HABA	337 nm	[14]
Acide indole-3-pyruvique	IPA	355 nm	[15]

## **Annexe E**



## **Annexe E. Recherche dans les bases de données (ProFound v.4.10.5)**

Pour lancer une recherche avec un logiciel tel que ProFound, dont le formulaire est présenté à la page suivante, quatre types d'informations sont nécessaires, celles-ci portant sur : (i) la protéine elle-même, (ii) la protéolyse, (iii), les modifications subies par la protéine et (iv) les données de masse. L'origine de la protéine (catégorie taxonomique) est habituellement connue, alors que la masse molaire et le point isoélectrique peuvent être obtenus lors de la purification par électrophorèse sur gel mono- ou bidimensionnel. Par ailleurs, l'expérimentateur a choisi lui-même l'agent de clivage utilisé lors de la protéolyse et peut spécifier que les peptides contiennent un nombre maximum de sites de coupure. De plus, il peut également définir l'agent qui a été utilisé pour modifier la protéine et sélectionner des modifications (complètes ou partielles) telles que l'oxydation de résidus Met, qui est fréquemment rencontrée lors des manipulations. Les masses expérimentales sont obtenues lors du traitement des spectres de masse, et en spécifiant une tolérance de masse plus ou moins élevée, il est possible de faire varier le nombre de candidats lors de l'identification d'une protéine.

ProFound - Peptide Mapping [Long Form] Version 4.10.5  
The Rockefeller University Edition

Address: http://prowl.rockefeller.edu/profound\_bin/WebProFound.exe?FORM=1

<b>General</b>	<b>Digest Chemistry</b>
Sample ID: <input type="text"/>	Allow maximum: <input type="text" value="1"/> missed cleavages
Database: <input type="text" value="NCBI nr (2004/08/01)"/>	<input checked="" type="radio"/> Pre-defined: Enzyme: <input type="text" value="Trypsin"/>
Taxonomic Category: <input type="text" value="Memmeia"/>	<input type="radio"/> User-defined: Cleave Site(s): <input type="text" value="Arginine (Arg,R)"/> <input type="text" value="Alanine (Ala,A)"/> <input type="text" value="Asparagine (Asn,N)"/>
Search for: <input type="text" value="single protein only"/>	Cleave at: <input type="radio"/> N Terminal <input checked="" type="radio"/> C Terminal
Protein Mass: <input type="text" value="0"/> - <input type="text" value="20"/> kDa	Do not cleave near: <input type="text" value="Arginine (Arg,R)"/> <input type="text" value="Alanine (Ala,A)"/> <input type="text" value="Asparagine (Asn,N)"/>
Protein pI: <input type="text" value="0"/> - <input type="text" value="14"/>	Coupled Modification (Ex.-CH4S): <input type="text"/>
Report Top: <input type="text" value="10"/> Candidates	
Questions? Please write to <a href="#">ProFound</a>	
What's new about ProFound?	
<b>Modifications</b>	
<input checked="" type="radio"/> Complete Modification(s): <input type="text" value="4-vinyl-pyridine (Cys)"/> <input type="text" value="Acrylamide (Cys)"/> <input type="text" value="Iodoacetamide (Cys)"/> <input type="text" value="Iodoacetic acid (Cys)"/>	<input type="radio"/> Partial Modification(s): <input type="text" value="Acrylamide (C)"/> <input type="text" value="Iodoacetamide (C)"/> <input type="text" value="Iodoacetic acid (C)"/> <input type="text" value="Nitration (*)"/> <input type="text" value="Oxidation (H)"/>
<b>User-defined:</b>	
<b>Modification 1</b> Site(s): <input type="text" value="Arginine (Arg,R)"/> <input type="text" value="Alanine (Ala,A)"/> <input type="text" value="Asparagine (Asn,N)"/> <input type="text" value="Aspartic acid (Asp,D)"/> <input type="text" value="Cysteine (Cys,C)"/>	<b>Modification 2</b> Site(s): <input type="text" value="Arginine (Arg,R)"/> <input type="text" value="Alanine (Ala,A)"/> <input type="text" value="Asparagine (Asn,N)"/> <input type="text" value="Aspartic acid (Asp,D)"/> <input type="text" value="Cysteine (Cys,C)"/>
Formula (Ex. +HPO3): <input type="text"/>	Formula (Ex. +O2): <input type="text"/>
Type: <input checked="" type="radio"/> Complete <input type="radio"/> Partial	Type: <input checked="" type="radio"/> Complete <input type="radio"/> Partial
<b>Masses</b>	
<b>Average Masses:</b> <input type="text"/>	<b>Monoisotopic Masses:</b> <input type="text" value="847.586"/> <input type="text" value="861.216"/> <input type="text" value="877.152"/> <input type="text" value="893.120"/> <input type="text" value="906.584"/>
Mass tolerance for average data: +/- <input type="text" value="1"/>	Mass tolerance for monoisotopic data: +/- <input type="text" value="0.1"/>
Tolerance unit: <input checked="" type="radio"/> Da <input type="radio"/> % <input type="radio"/> ppm	Charge state: <input type="radio"/> M <input checked="" type="radio"/> MH+
<input type="button" value="Identify Protein"/> <input type="button" value="Extra Settings"/> <input type="button" value="Example"/> <input type="button" value="Reset Form"/>	

## Références des Annexes

- [1] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochimie*; DeBoeck Université: Paris, 1998.
- [2] Hoff, E. R.; Chloupek, R. C. In *Methods Enzymol.*; Karger, B. L., Hancock, W. S., Eds.; Academic Press: San Diego (CA), 1996; Vol. 271 Part B, pp 51-68.
- [3] Huber, R.; Kukla, D.; Bode, W.; Schwager, P.; Bartels, K.; Deisenhofer, J.; Steigeman, W. *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 73-101.
- [4] Bode, W.; Schwager, P. *J. Mol. Biol.* **1975**, *98*, 693-717.
- [5] Ribadeau-Dumas, B.; Brignon, G.; Grosclaude, F.; Mercier, J.-C. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *25*, 505-514.
- [6] Canfield, R. E. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2698-2707.
- [7] Braunitzer, G.; Gehring-Muller, R.; Hilschmann, N.; Hilse, K.; Hobom, G.; Rudloff, V.; Wittmann-Liebold, B. *Hops. Manage.* **1961**, *325*, 283-286.
- [8] Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 432-435.
- [9] Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, *78*, 53-68.
- [10] Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1991**, *111*, 89-102.
- [11] Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 156-158.
- [12] Gusev, A. I.; Wilkinson, W. R.; Proctor, A.; Hercules, D. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1034-1041.
- [13] Gorman, J. J.; Ferguson, B. L.; Nguyen, T. B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 529-536.
- [14] Juhasz, P.; Costello, C. E.; Biemann, K. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 399-409.
- [15] Bai, J.; Liang, X.; Liu, Y.-H.; Zhu, Y.; Lubman, D. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10*, 839-845.

