

Université de Montréal

**Marquage fluorescent des protéines pour étudier les enzymes
protéolytiques solubles et immobilisées par la cartographie peptidique
électrophorétique**

Par

Shao Ming Gan

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

Juin 2010

© Shao Ming Gan, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Marquage fluorescent des protéines pour étudier les enzymes
protéolytiques solubles et immobilisées par la cartographie peptidique
électrophorétique**

Présenté par
Shao Ming Gan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Thibault : président-rapporteur

Karen C. Waldron : directrice de recherche

Dominic Rochefort : membre du jury

SOMMAIRE

La cartographie peptidique est une méthode qui permet entre autre d'identifier les modifications post-traductionnelles des protéines. Elle comprend trois étapes : 1) la protéolyse enzymatique, 2) la séparation par électrophorèse capillaire (CE) ou chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) des fragments peptidiques et 3) l'identification de ces derniers. Cette dernière étape peut se faire par des méthodes photométriques ou par spectrométrie de masse (MS). Au cours de la dernière décennie, les enzymes protéolytiques immobilisées ont acquis une grande popularité parce qu'elles peuvent être réutilisées et permettent une digestion rapide des protéines due à un rapport élevé d'enzyme/substrat. Pour étudier les nouvelles techniques d'immobilisation qui ont été développées dans le laboratoire du Professeur Waldron, la cartographie peptidique par CE est souvent utilisée pour déterminer le nombre total de peptides détectés et leurs abondances. La CE nous permet d'avoir des séparations très efficaces et lorsque couplée à la fluorescence induite par laser (LIF), elle donne des limites de détection qui sont 1000 fois plus basses que celles obtenues avec l'absorbance UV-Vis. Dans la méthode typique, les peptides venant de l'étape 1) sont marqués avec un fluorophore avant l'analyse par CE-LIF. Bien que la sensibilité de détection LIF puisse approcher 10^{-12} M pour un fluorophore, la réaction de marquage nécessite un analyte dont la concentration est d'au moins 10^{-7} M, ce qui représente son principal désavantage. Donc, il n'est pas facile d'étudier les enzymes des peptides dérivés après la protéolyse en utilisant la technique CE-LIF si la concentration du substrat protéique initial est inférieure à 10^{-7} M. Ceci est attribué à la dilution supplémentaire lors de la protéolyse. Alors, afin d'utiliser le CE-LIF pour évaluer l'efficacité de la digestion par enzyme immobilisée à faible concentration de substrat, nous proposons d'utiliser des substrats protéiques marqués de fluorophores pouvant être purifiés et dilués.

Trois méthodes de marquage fluorescent de protéine sont décrites dans ce mémoire pour étudier les enzymes solubles et immobilisées. Les fluorophores étudiés pour le marquage de protéine standard incluent le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA), la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) et l'ester de 6-carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE). Le FAMSE est un excellent réactif puisqu'il se conjugue rapidement avec les

amines primaires des peptides. Aussi, le substrat marqué est stable dans le temps. Les protéines étudiées étaient l' α -lactalbumine (LACT), l'anhydrase carbonique (CA) et l'insuline chaîne B (INB). Les protéines sont digérées à l'aide de la trypsine (T), la chymotrypsine (CT) ou la pepsine (PEP) dans leurs formes solubles ou insolubles. La forme soluble est plus active que celle immobilisée. Cela nous a permis de vérifier que les protéines marquées sont encore reconnues par chaque enzyme. Nous avons comparé les digestions des protéines par différentes enzymes telles la chymotrypsine libre (*i.e.*, soluble), la chymotrypsine immobilisée (*i.e.*, insoluble) par réticulation avec le glutaraldéhyde (GACT) et la chymotrypsine immobilisée sur billes d'agarose en gel (GELCT). Cette dernière était disponible sur le marché. Selon la chymotrypsine utilisée, nos études ont démontré que les cartes peptidiques avaient des différences significatives selon le nombre de pics et leurs intensités correspondantes. De plus, ces études nous ont permis de constater que les digestions effectuées avec l'enzyme immobilisée avaient une bonne reproductibilité. Plusieurs paramètres quantitatifs ont été étudiés afin d'évaluer l'efficacité des méthodes développées. La limite de détection par CE-LIF obtenue était de $3,0 \times 10^{-10}$ M (S/N = 2,7) pour la CA-FAM digérée par GACT et de $2,0 \times 10^{-10}$ M (S/N = 4,3) pour la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre. Nos études ont aussi démontrées que la courbe d'étalonnage était linéaire dans la région de travail ($1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M) avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0,9991.

Mots clés : α -Lactalbumine, Anhydrase carbonique, Insuline chaîne B, Naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA), Fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC), Ester de 6-carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE), Marquage fluorescent, Enzymes immobilisées, Glutaraldéhyde (GA), Cartographie peptidique, Électrophorèse capillaire (CE), Fluorescence induite par laser (LIF)

ABSTRACT

Peptide mapping is a routine method for identifying post-translational modifications of proteins. It involves three steps: 1) enzymatic proteolysis, 2) separation of the peptide fragments by capillary electrophoresis (CE) or high performance liquid chromatography (HPLC), 3) identification of the peptide fragments by photometric methods or mass spectrometry (MS). During the past decade, immobilized enzymes for proteolysis have been gaining in popularity because they can be reused and they provide fast protein digestion due to the high ratio of enzyme-to-substrate. In order to study new immobilization techniques developed in the Waldron laboratory, peptide mapping by CE is frequently used, where the total number of peptides detected and their abundance are related to enzymatic activity. CE allows very high resolution separations and, when coupled to laser-induced fluorescence (LIF), provides excellent detection limits that are ≥ 1000 times lower than with UV-Vis absorbance. In the typical method, the peptides produced in step 1) above are derivatized with a fluorophore before separation by CE-LIF. Although the detection sensitivity of LIF can approach 10^{-12} M for a highly efficient fluorophore, a major disadvantage is that the derivatization reaction requires analyte concentrations to be approx. 10^{-7} M or higher. Therefore, it is not feasible to study enzymes using CE-LIF of the peptides derivatized after proteolysis if the initial protein substrate concentration is $< 10^{-7}$ M because additional dilution occurs during proteolysis. Instead, to take advantage of CE-LIF to evaluate the efficiency of immobilized enzyme digestion of low concentrations of substrate, we propose using fluorescently derivatized protein substrates that can be purified then diluted.

Three methods for conjugating fluorophore to protein were investigated in this work as a means to study both soluble and immobilized enzymes. The fluorophores studied for derivatization of protein standards included naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA), fluoresceine-5-isothiocyanate (FITC) and 6-carboxyfluorescein N-succinimide ester (FAMSE). The FAMSE was found to be an excellent reagent that conjugates quickly with primary amines and the derivatized substrate was stable over time. The studied substrates were α -lactalbumin (LACT), carbonic anhydrase (CA) and insulin chain-B (INB). The CE-LIF peptide maps were generated from digestion of the fluorescently derivatized substrates

by trypsin (T), chymotrypsin (CT) or pepsin (PEP), either in soluble or insoluble forms. The soluble form of an enzyme is more active than the immobilized form and this allowed us to verify that the conjugated proteins were still recognized as substrates by each enzyme. The digestion of the derivatized substrates with different types of chymotrypsin (CT) was compared: free (*i.e.*, soluble) chymotrypsin, chymotrypsin cross-linked with glutaraldehyde (GACT) and chymotrypsin immobilized on agarose gel particles (GELCT), which was available commercially. The study showed that, according to the chymotrypsin used, the peptide map would vary in the number of peaks and their intensities. It also showed that the digestion by immobilized enzymes was quite reproducible. Several quantitative parameters were studied to evaluate the efficacy of the methods. The detection limit of the overall method (CE-LIF peptide mapping of FAM-derivatized protein digested by chymotrypsin) was 3.0×10^{-10} M (S/N = 2.7) carbonic anhydrase using insoluble GACT and 2.0×10^{-10} M (S/N = 4.3) CA using free chymotrypsin. Our studies also showed that the standard curve was linear in the working region (1.0×10^{-9} - 1.0×10^{-6} M) with a correlation coefficient (R^2) of 0.9991.

Keywords : α -Lactalbumin, Carbonic anhydrase, Insulin chain B, Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA), Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC), 6-carboxyfluorescein N-succinimidyl ester (FAMSE), Fluorescent conjugation, Immobilized enzymes, Glutaraldehyde (GA), Peptide mapping, Capillary electrophoresis (CE), Laser induced fluorescence (LIF)

Table des matières

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Cartographie peptidique	1
1.2 Enzymes protéolytiques	1
1.3 Électrophorèse capillaire de zone (CZE)-Fluorescence induite par laser (LIF)	3
1.3.1 Électrophorèse capillaire de zone.....	3
1.3.2 Fluorescence induite par laser (LIF) pour la CE	4
1.4 Marquage fluorescent pour la cartographie peptidique.....	6
1.5 Objectif du projet de maîtrise	11
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE	13
2.1 Schéma de méthodologie	13
2.2 Matériel	14
2.3 Solutions tampons	16
2.3.1 Solutions tampons pour le marquage fluorescent et pour l'élution.....	16
2.3.2 Solutions tampons pour la séparation par CE	16
2.3.3 Solutions tampons pour la digestion enzymatique.....	16
2.4 Marquage avec des fluorophores.....	17

2.4.1 Marquage avec le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA).....	17
2.4.2 Marquage avec la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC).....	18
2.4.3 Marquage avec l'estér de 6-carboxyfluorescéine succinimidyl (FAMSE)	19
2.5 Purification des substrats marqués	21
2.5.1 Purification par SEC	22
2.5.2 Purification par une membrane d'ultrafiltration	23
2.6 Mesures spectroscopiques des substrats marqués	24
2.6.1 Instrumentation	25
2.6.2 Mesure des spectres d'absorption	25
2.6.3 Mesure des spectres de fluorescence.....	26
2.6.4 Mesure des spectres de masse (LC-MS)	28
2.7 Digestions enzymatiques.....	28
2.7.1 Enzymes solubles : trypsine, chymotrypsine et pepsine	29
2.7.2 Enzymes immobilisées : trypsine, chymotrypsine et pepsine.....	33
2.8 Cartographies peptidiques par CE.....	38
2.8.1 Instruments.....	38
2.8.2 Électrophérogramme de protéine marquée par CE	38
2.8.3 Cartographie peptidique par CE.....	39
3. <i>RÉSULTATS ET DISCUSSION</i>.....	43
3.1 Préparation et caractérisation des substrats protéiques marqués	43
3.1.1 Lactalbumine-NDA.....	43
3.1.2 Anhydrase carbonique-FITC.....	46

3.1.3 Anhydrase carbonique-FAM.....	55
3.1.4 D-phénylalanine-FAM.....	66
3.2 Immobilisation des enzymes.....	68
3.2.1 Trypsine.....	68
3.2.2 Chymotrypsine.....	68
3.3 Digestion et cartographie peptidique des dérivés NDA.....	70
3.4 Digestion et cartographie peptidique des dérivés FITC.....	72
3.4.1 Effet du temps de digestion.....	72
3.4.2 Effet de la concentration du substrat.....	75
3.4.3 Limite de détection de la méthode.....	77
3.5 Digestion et cartographie peptidique des dérivés FAM.....	78
3.5.1 Effet des paramètres d'analyse par CE-LIF.....	78
3.5.2 Effet du temps de digestion.....	82
3.5.3 Effet du rapport enzyme:substrat.....	83
3.5.4 Effet de la concentration du substrat.....	85
3.5.5 Effet de l'immobilisation des enzymes sur les cartes peptidiques de CA-FAM.....	87
3.5.6 Reproductibilité de la méthode.....	92
3.5.7 Limite de détection de la méthode.....	98
3.5.8 Validation de la méthode.....	100
3.5.9 Comparaison avec une procédure commerciale pour préparer les dérivés FAM.....	101
3.5.10 Carte peptidique de l'insuline chaîne B-FAM.....	102
4. CONCLUSIONS.....	106
4.1 Marquage des protéines.....	106

4.2 Digestions	107
4.3 Cartographie peptidique	108
4.4 Limitations de la méthode	108
4.5 Développements futurs	109
<i>5. RÉFÉRENCES</i>	<i>110</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>117</i>

Liste des tableaux

Tableau 2.1 Résumé des solutions dont le spectre d'absorption a été obtenu, ainsi que leur référence.....	26
Tableau 2.2 Paramètres pour mesurer le spectre de fluorescence.....	27
Tableau 2.3 Le gradient d'élution dans la colonne Poroshell 300SB-C8 pour les mesures par LC-MS	28
Tableau 2.4 Paramètres de digestion chymotrypsique de l'anhydrase carbonique marquée en fonction de sa concentration.....	31
Tableau 2.5 Sommaire des méthodes étudiées en fonction du substrat.....	42
Tableau 3.1 Résultat LC-MS de CA non modifiée (voir fig. A-5 → A-9 de l'annexe)	48
Tableau 3.2 Résultats MS pour la CA-FAM (voir figs. A-10 → A-23 de l'annexe)	62
Tableau 3.3 Recouvrement de produit après la purification par SEC/ultrafiltration	64
Tableau 3.4 Assignation probable des fragments peptidiques (fig. 3.16) de la LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre à pH 8,22 selon le rapport Z/Mr théorique.....	72
Tableau 3.5 Peptides tryptiques théoriques de la CA-FAM à pH 6,90	89
Tableau 3.6 Peptides pepsiques théoriques de la CA-FAM	91
Tableau 3.7 Reproductibilité des temps de migration en CZE pour la carte peptidique de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre	93
Tableau 3.8 Reproductibilité des temps de migration et des hauteurs des pics en CE pour la carte peptidique de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-8}$ M) digérée par GACT	98
Tableau 3.9 Assignation des fragments peptidiques de l'insuline chaîne B digérée par la trypsine.....	103
Tableau 3.10 Assignation des fragments peptidiques de l'insuline chaîne B digérée par GACT (fig. 3.39b). L'étoile montre le site de marquage avec le FAM.....	105

Liste des figures

Figure 1.1 Schéma de l'appareil de détection de fluorescence par laser [27].....	6
Figure 2.1 Réaction de NDA avec une protéine en présence de CN^- en solution basique donnant le produit 1-cyano-2-protéine-alkyl-benzisoindole.....	17
Figure 2.2 Réaction de FITC avec une protéine en solution basique donnant la protéine fluorescéine thiocarbamyl.....	18
Figure 2.3 Marquage de protéine avec le 6-FAMSE en solution basique donnant la protéine-6-FAM.....	19
Figure 2.4 Réactions d'une enzyme avec trois différentes formes chimiques du GA en solution acide ou neutre [59].....	34
Figure 3.1 Les spectres fluorescents de la LACT-NDA. a) Spectre d'excitation émis à 480 nm; b) Spectre d'émission excité à 410 nm.....	45
Figure 3.2 L'électrophérogramme de la LACT-NDA brute analysée dans un tampon borate 0,15 M pH 8,22. a) LACT-NDA brute, b) le blanc du marquage.....	46
Figure 3.3 Réaction d'hydrolyse de la FITC en solution basique donnant les produits secondaires suivants : la fluorescéine amine et la difluorescéine thiourée.....	50
Figure 3.4 Spectre d'absorption de la CA-FITC.....	52
Figure 3.5 Analyse par CE-UV. Électrophérogrammes analysés dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. a) CA; b) CA-FITC brute, FITC en excès; c) CA-FITC purifiée par SEC; (où bl = pic venant du blanc; Imp = impureté; EOF = composés neutres; HCO_3^- est un constituant du tampon de marquage).....	53
Figure 3.6 Analyse par CE-LIF. Électrophérogramme de la CA-FITC avant et après la purification par SEC/ultrafiltration, analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FITC brute; b) CA-FITC purifiée. (où bl = pic venant du blanc, NaHCO_3 -FITC).....	55
Figure 3.7 Réaction de l'hydrolyse de FAMSE en solution basique donnant le produit secondaire : la carboxyfluorescéine.....	56
Figure 3.8 Spectre d'absorption de 5(6)-FAMSE ($2,0 \times 10^{-5}$ M) dans l'acétonitrile.....	57

Figure 3.9 Spectre d'absorption de la CA-FAM brute.....	58
Figure 3.10 Spectre d'absorption de la CA-FAM purifiée.	59
Figure 3.11 Spectre de fluorescence de la CA-FAM et du blanc (NaHCO ₃ -FAM) dans une solution NaOH 0,010 M. a) Spectre d'excitation de la CA-FAM; b) Spectre d'émission de la CA-FAM; c) Spectre d'excitation du blanc; d) Spectre d'émission du blanc.....	60
Figure 3.12 Électrophérogrammes CE-UV analysés dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. a) CA, b) CA-FAM brute; c) CA-FAM purifiée. (où bl est le pic venant du blanc; Imp : impureté; EOF : composé neutre; HCO ₃ ⁻ : constituant du tampon de marquage, C _{CA} = 2,0×10 ⁻⁵ M.)	65
Figure 3.13 Électrophérogramme de la CA-FAM brute et purifiée analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FAM purifiée; b) CA-FAM brute. (C _{CA} = 1,0×10 ⁻⁷ M, bl : blanc)	66
Figure 3.14 Courbe de stabilité du dérivé D-Phe-FAM, analysée dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. La hauteur du pic (en RFU) est représentée en fonction du temps écoulé depuis le début de la réaction de marquage. Les barres d'erreurs sont les écart-types de trois mesures.....	67
Figure 3.15 Image de la chymotrypsine réticulée par le glutaraldéhyde (GACT) obtenu par un appareil photo numérique au microscope.	70
Figure 3.16 Analyse CE-UV de la LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon borate 0,15 M pH 8,22. a) LACT-NDA digérée par la chymotrypsine; b) le blanc de la digestion. EOF : flux électroosmotique.....	71
Figure 3.17 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h; e) 4 h.	73
Figure 3.18 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par GELCT (CA:Enz = 1:1,3, calculé [enzyme libre] équivalente selon information de Princeton) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h e) 4 h.....	74

Figure 3.19 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par GACT (CA:Enz =1:80) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 4 h.	75
Figure 3.20 Cartes peptidiques CE-LIF de la CA-FITC digérée pendant 4 h par GACT et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 en fonction de la concentration du substrat : a) $C_{CA-FITC} = 1,0 \times 10^{-6}$ M (CA:Enz = 1:2,7); b) $C_{CA-FITC} = 1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:Enz = 1:27).	76
Figure 3.21 Cartes peptidiques CE-LIF en fonction de la concentration de la CA-FITC digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) $1,0 \times 10^{-6}$ M (CA:CT = 10:1); b) $1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:CT = 1:1); c) $1,0 \times 10^{-8}$ M (CA:CT = 1:17), montrée aussi avec un agrandissement de c.	77
Figure 3.22 Électrophérogrammes CE-LIF des peptides de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre et analysée à différents pH et à différentes concentrations de tampon : a) Phosphate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,90; b) Phosphate 0,10 M pH 6,90; c) Phosphate 0,10 M pH 7,20; d) Phosphate 0,10 M pH 7,50; e) Borate 0,10 M pH 9,28. Le voltage appliqué était de 24 kV pour les cinq séparations.	79
Figure 3.23 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre en fonction de l'injection électrocinétique et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90, avec un voltage appliqué de 24 kV. Injection : a) 10 kV pendant 5 s; b) 10 kV pendant 10 s; c) 5 kV pendant 25 s.	80
Figure 3.24 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre en fonction du potentiel appliqué et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 : a) 20 kV; b) 22 kV; c) 24 kV; d) 26 kV; e) 28 kV; f) 30 kV.	81
Figure 3.25 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM en fonction du temps de digestion (Rapport massique CA:CT _{libre} = 1:1) analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h; e) 4 h; f) 24 h.	83
Figure 3.26 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-7}$ M) digérée pendant 24 h par la chymotrypsine libre en fonction du rapport massique CA:CT et analysée dans	

un tampon 0,10 M pH 6,90. CA:CT (poids/poids) : a) 1:1; b) 10:1; c) 20:1, d) 40:1; e) 60:1; f) 120:1.....	84
Figure 3.27 Graphique de l'intensité du pic majeur (à 9,3 min) de la fig. 3.26 en fonction du rapport CA:CT.	85
Figure 3.28 Cartes peptidiques en fonction de la concentration de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) $1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:CT = 1:1); b) $1,0 \times 10^{-8}$ M (CA:CT = 1:17); c) $1,0 \times 10^{-9}$ M (CA:CT = 1:1667).....	86
Figure 3.29 Agrandissement de la fig. 3.28c.	86
Figure 3.30 Comparaison de la digestion par trois formats de chymotrypsine : soluble (c et d), insoluble par réticulation (b) et insoluble par liaison sur billes d'agarose (a). Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par le même niveau d'activité pour la chymotrypsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée pendant 4 h par GELCT; (CA:Enz = 1:1,4); b) digérée pendant 4 h par GACT, CA:Enz = 1:83); c) digérée pendant 4 h par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4); d) digérée pendant 24 h par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4).	88
Figure 3.31 Comparaison des Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la trypsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée pendant 4 h par GAT (CA:Enz = 1:250); b) digérée pendant 24 h par la trypsine libre (CA:Enz = 10:1).	90
Figure 3.32 Électrophérogramme de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-6}$ M) digérée par la pepsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée par GELPEP pendant 1 h (CA:Enz = 1:2,7); b) digérée par GELPEP pendant 2 h (CA:Enz = 1:2,7); c) digérée par GELPEP pendant 3 h (CA:Enz = 1:2,7); d) digérée par GELPEP pendant 4 h (CA:Enz = 1:2,7); e) digérée par la pepsine libre pendant 24 h (CA:Enz = 10:1).	92
Figure 3.33 Cartes peptidiques CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-7}$ M) digérée par la chymotrypsine et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 1 ^{re} marquage; b) 2 ^{ième} marquage; c) 3 ^{ième} marquage.....	95

Figure 3.34 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-8}$ M) digérée par GACT (CA:CT = 1:83) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 1^e aliquote de GACT; b) 2^e aliquote de GACT; c) 3^e aliquote de GACT..... 97

Figure 3.35 Limite de détection et de digestion - Électrophérogrammes CE-LIF analysés dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FAM digérée par GACT pendant 4 h à $3,0 \times 10^{-10}$ M, injection 0,5 psi, 50 s; $V_{inj} = 44$ nL; b) CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble pendant 24 h à $2,0 \times 10^{-10}$ M, injection 0,5 psi, 50 s, $V_{inj} = 44$ nL; c) CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble pendant 24 h à $1,0 \times 10^{-11}$ M et séchée et redissoute dans l'eau à $1,0 \times 10^{-9}$ M pour l'analyse. 99

Figure 3.36 Courbe d'étalonnage de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. $y = 0,0072x - 0,0658$, $R^2 = 0,9991$. 100

Figure 3.37 Comparaison des cartes peptidiques CE-LIF de CA marquée avec le FAMSE pendant 1 h et pendant 24 h, digérée par la chymotrypsine (libre et immobilisée) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) marquée pendant 1 h et digérée par GACT pendant 4 h; b) marquée pendant 24 h et digérée par GACT pendant 4 h; c) marquée pendant 1 h et digérée par la chymotrypsine pendant 24 h; d) marquée pendant 24 h et digérée par la chymotrypsine pendant 24 h..... 102

Figure 3.38 Carte peptidique de l'INB-FAM digérée par la trypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. 103

Figure 3.39 Carte peptidique de l'INB-FAM digérée par la chymotrypsine libre et par GACT et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée par la chymotrypsine libre pendant 24 h; b) digérée par GACT pendant 4 h. 104

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
bl	Blanc
BTEE	N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester
C	Concentration
CA	Anhydrase carbonique
CAS	Chemical Abstracts Service
CAT	Catalogue
CE	Électrophorèse capillaire
CPG	Particules de verre poreux (Controlled pore glass)
CT	Chymotrypsine
CZE	Électrophorèse capillaire de zone «Capillary Zone Electrophoresis »
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNA	Acide désoxyribonucléique
D-Phe	D-phénylalanine
DTAF	Fluorescéine dichlorotriazine
DTT	Dithiothréitol
EC	Enzyme Commission
EN	Enzyme
EN/S	Enzyme sur substrat
EOF	Fluide électro-osmotique
FAMSE	Ester de carboxyfluorescéine N-succinimidyl
FITC	Fluorescéine-5-isothiocyanate
GA	Glutaraldéhyde
GACT	Chymotrypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde
GAT	Trypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde
GELCT	Chymotrypsine immobilisée par liaison covalente sur billes d'agarose en gel
GELPEP	Pepsine immobilisée par liaison covalente sur billes d'agarose en gel
HOMO	Orbitale moléculaire haute occupée
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ID	Diamètre interne
INB	Insuline chaîne B
ITC	Isothiocyanate
LACT	α -Lactalbumine
LC-TOF	Chromatographie liquide–Temps d'envol « Liquid chromatography time-of-flight »

L_d	Longueur au détecteur
LIF	Fluorescence induite par Laser
L_t	Longueur totale
LUMO	Orbitale moléculaire basse vacante
MS	Spectrométrie de masse
MWCO	Membrane d'ultrafiltration « Molecule weight cut-off »
NDA	Naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde
OD	Diamètre externe
OPA	o-phthalaldéhyde
PDA	Détecteur à barrette de diodes
PEP	Pepsine
pI	Point isoélectrique
P_{inj}	Pression d'injection
R	Résolution
S/N	Signal/bruit « Signal to noise ratio »
SC	Chlorite sulfonyl
SCX	Résine échangeuse de cation (acide fort) « Strong cation exchange »
SE	Ester succinimidyl
SEC	Chromatographie d'exclusion moléculaire « Size Exclusion Chromatography »
T	Trypsine
t_{inj}	Temps d'injection
TLCK	1-Chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone HCl
TPCK	N-p-tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl cétone
U	Unité
V_{inj}	Volume injecté
W	Tryptophane
Y	Tyrosine

Remerciements

Ce travail de recherche a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG).

J'aimerais remercier le Département de Chimie et la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour les bourses qu'ils m'ont octroyées.

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, le professeur Karen C. Waldron, de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son groupe de recherche et pour sa patience et son support scientifique. J'aimerais remercier également le professeur Joëlle Pelletier et les membres de son groupe de recherche, qui m'ont permis d'utiliser leur centrifugeuse. J'aimerais aussi remercier le professeur Dominic Rochefort et les membres de son groupe de recherche, qui m'ont permis d'employer leur spectrophotomètre et pour leurs discussions scientifiques. Je souhaite également remercier Karine Venne pour les études sur les spectres de masse, ainsi que Sylvie et Clément, les techniciens du laboratoire d'enseignement, pour les études sur la spectrofluorimétrie.

Un grand merci aux membres du groupe Waldron (Shu Yang, Marie-Christine, Quynh Vy, Navneet, Georgiana et Fatima), surtout Shu Yang, Quynh Vy, Marie-Christine et Fatima pour leur belle collaboration.

Finalement, je tiens à remercier ma femme et ma fille pour leur soutien et pour leurs encouragements pendant ces trois ans.

1. Introduction générale

1.1 Cartographie peptidique

La cartographie peptidique joue un rôle important dans le domaine de la science bioanalytique [1-4]. Elle est une méthode éprouvée pour caractériser une protéine. Cette dernière est digérée par une enzyme protéolytique, telle que la trypsine (T) ou la chymotrypsine (CT), pour former des fragments peptidiques. Puis, ces fragments sont séparés et détectés générant ainsi une «carte» unique et caractéristique à la protéine de départ, appelée «carte peptidique». Cette carte nous aide à voir rapidement si la protéine est modifiée par rapport à la séquence anticipée selon l'information génomique. Elle agit aussi comme une étape préliminaire au séquençage de la protéine par spectrométrie de masse (MS) [5-7].

Pour obtenir la carte peptidique, deux techniques sont généralement employées, soit la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou l'électrophorèse capillaire (CE). Cette dernière se classe parmi les meilleures techniques de séparation en phase liquide grâce à sa haute efficacité. Elle a donc été choisie dans le cadre de ce projet.

1.2 Enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont des enzymes qui clivent par hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines. La plupart des enzymes protéolytiques clivent préférentiellement une chaîne peptidique à des positions précises, en fonction de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site d'hydrolyse. Dans certains cas, cette spécificité est faible, mais dans d'autres cas, elle peut être très sélective. Par exemple, la trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques du côté carboxy-terminal des résidus basiques (Lys, Arg). La chymotrypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques du côté carboxy-terminal des résidus aromatiques (Tyr, Trp, Phe), ainsi que les résidus Met et Leu dans une moindre mesure. Par contre, la pepsine coupe (moins sélectivement) un

polypeptide du côté carboxy-terminal des résidus Phe, Leu et Glu. Ces trois enzymes protéolytiques sont employées pour ce projet.

Généralement, les enzymes solubles sont appliquées pour les digestions protéolytiques. Cependant, la diffusion d'une enzyme libre en milieu homogène augmente son autolyse ce qui contribue à réduire l'activité catalytique de l'enzyme et produit des fragments peptidiques de l'enzyme elle-même compliquant l'interprétation des cartes peptidiques. De plus, l'enzyme soluble ne peut pas être réutilisée parce que la séparation des produits est trop laborieuse et coûteuse. Donc, l'immobilisation d'enzyme et son application en milieu hétérogène sont avantageuses.

L'immobilisation d'enzyme consiste en une restriction de ses mouvements par confinement dans une phase distincte. Plusieurs méthodes d'immobilisation sont rapportées dans la littérature. Selon le type de liaison impliquée lors de l'immobilisation, il y a deux méthodes principales : la première est la méthode physique et la deuxième est la méthode chimique. La méthode physique consiste à lier l'enzyme à un support par des forces physico-chimiques telles que l'adsorption [8, 9], la liaison ionique [10], la microencapsulation [11], la membrane semi-perméable et le piégeage. Elle consiste aussi à immobiliser l'enzyme sur un support SCX (Résine échangeuse de cation, acide fort) [12].

La méthode chimique consiste à former une liaison covalente de l'enzyme sur un support [13-15] ou à former une réticulation [14, 16, 17]. Elle provoque la formation d'au moins un lien covalent entre les groupements fonctionnels des résidus d'enzyme et un support fonctionnalisé insoluble dans l'eau ou entre deux molécules d'enzyme (la réticulation). La méthode de réticulation est utilisée dans cette étude pour rendre insoluble (*i.e.*, pour immobiliser) la trypsine et la chymotrypsine. Le glutaraldéhyde (GA) est le réactif de réticulation le plus commun [16-18] et a donc été utilisé dans cette étude.

Récemment, Kim *et al.* ont développé une nouvelle méthode qui combine la méthode physique et la méthode chimique [19]. Ils ont immobilisé la chymotrypsine et la lipase dans des silices méso poreux et méso cellulaires par adsorption d'enzyme suivie d'une réticulation avec le GA.

Beaucoup de travaux précédents du groupe Waldron concernaient l'immobilisation de la trypsine et la caractérisation de microréacteurs à base de trypsine [16, 20]. La détection des peptides fluorescents est choisie pour ce projet parce qu'elle est très sensible et permet de détecter des traces de protéines [21, 22].

1.3 Électrophorèse capillaire de zone (CZE)-Fluorescence induite par laser (LIF)

1.3.1 Électrophorèse capillaire de zone

La CE est une technique de séparation qui est effectuée dans un capillaire de silice, sous l'influence d'un champ électrique fort. Lorsqu'un mélange est séparé par CE, les constituants chargés positivement ou négativement se déplacent avec des vitesses apparentes variables selon leur rapport charge sur masse (Z/Mr). Ils se séparent dans le temps sous l'effet de deux facteurs principaux appelés la mobilité électrophorétique et la mobilité électro-osmotique. En CE, l'écoulement de la solution n'a pas un profil parabolique tel que celui de la chromatographie liquide, il a plutôt un profil plat dans le capillaire. Ce profil plat diminue donc la diffusion radiale et l'élargissement des pics durant le processus de séparation. Par ailleurs, le capillaire a un diamètre interne très faible, de 50-75 μm généralement, permettant une diffusion efficace de la chaleur. Les séparations par CE sont donc beaucoup plus efficaces ($N > 10^5$ à 10^6 plateaux théoriques) que celles par HPLC. La CE est donc une technique complémentaire à l'HPLC. En plus, c'est aussi une technique importante pour les séparations des petits ions, des peptides, des protéines et des acides nucléiques [23]. Elle a plusieurs avantages tels qu'une haute efficacité, des limites de détections basses, des temps d'analyse courts, des plus faibles quantités d'échantillon nécessaires pour une grande variété d'applications. De plus, cette technique s'effectue en milieu aqueux avec des solvants organiques moins coûteux et toxique que ceux utilisés en HPLC [5, 24, 25]. Il y a plusieurs modes de CE dont le plus simple et le plus connu en analyse biochimique, particulièrement pour les peptides [25], est la CE de zone (CZE). Cette dernière a été donc utilisée comme technique de séparation pour ce projet.

En CE, il y a deux modes principaux d'injection : l'injection électrocinétique et l'injection hydrodynamique. L'injection électrocinétique consiste à injecter un échantillon dans le capillaire en appliquant un champ électrique. Elle a des désavantages : la quantité injectée pour chaque analyte est variable et celle pour l'espèce ayant la plus grande mobilité sera plus importante. Ceci influencera l'allure de la carte peptidique. L'injection hydrodynamique se produit par application d'une pression positive ou négative par rapport à la solution de l'échantillon. Elle permet d'injecter le même volume d'échantillon pour chaque analyse et est plus reproductible. Le mode par pression a été employé dans le cadre du projet.

Si la solution injectée ne contient que l'analyte et l'eau, la conductivité de la zone d'échantillon est inférieure à celle du tampon de séparation. Sachant que le champ électrique est inversement proportionnel à la conductivité, le champ électrique de la zone de l'échantillon est donc supérieur à celui du tampon au début de la séparation. Grâce au champ électrique élevé, les molécules de l'échantillon sont accélérées vers l'interface entre la zone d'échantillon et le tampon. Dès qu'elles y arrivent, elles migrent plus lentement sous l'effet d'un champ électrique plus faible et elles sont alors focalisées [25]. Ceci a pour but d'augmenter la hauteur des pics et la sensibilité de détection. Cette technique a été employée dans ce projet.

1.3.2 Fluorescence induite par laser (LIF) pour la CE

La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule survenant suite à l'absorption d'un photon. Cette transition est immédiatement suivie d'une émission spontanée de photon donnant lieu à l'émission fluorescente. La sensibilité en fluorimétrie est souvent 1000 fois supérieure à celle que l'on connaît en absorption UV/visible [26]. Généralement, pour une étude de carte peptidique en CE, la méthode de détection est l'absorbance UV parce qu'elle est la plus simple, rapide et économique [4, 16]. En effet, les fragments peptidiques contiennent des liaisons peptidiques qui absorbent à 200 nm. Cependant, en CE, la cellule de détection est une courte section du capillaire où la couche protectrice de polyimide est retirée. Le trajet optique à travers le capillaire n'est que de 50 μm environ. Ceci limite son application lors de l'analyse des protéines présentes à de

très faibles concentrations. En fait, la limite de détection par UV atteint plutôt 10^{-6} M en CE [7]. Malgré ces désavantages, la détection UV a été utilisée pour déterminer le rendement de marquage dans ce projet.

La fluorescence induite par laser est une technique avec laquelle un substrat est excité avec une impulsion laser. La limite de détection par LIF peut atteindre 10^{-9} M en CE [7]. L'intensité de la fluorescence I_f est proportionnelle à la puissance du faisceau incident de la source I_0 selon l'équation 1.1 où Φ_f est le rendement de fluorescence (le ratio du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés), ϵ est le coefficient d'absorption molaire, «l» est l'épaisseur de la cuve et «c » est la concentration moléculaire de la substance.

$$I_f = 2,3\Phi_f I_0 \epsilon l c \quad (1.1)$$

Pour une longueur d'onde donnée λ , un laser est plus puissant qu'une lampe et la focalisation de ce laser est très bonne. Il en résulte que la puissance radiante incidente est élevée et cela entraîne une forte intensité de la fluorescence. Par ailleurs, le laser consiste en des photons de même fréquence, de même phase et de même direction de propagation. Cette propriété lui permet d'avoir une grande pureté spectrale et permet aussi à son énergie de pouvoir être concentrée dans un faible volume de la région de détection du capillaire. De plus, la fluorescence est habituellement mesurée à un angle de 90° par rapport à l'incidence de la lumière d'excitation afin d'éviter les interférences pour la lumière d'excitation transmise. Alors, la ligne de base est très faible et il donne un excellent rapport de S/N. C'est pourquoi la détection LIF est 1000 fois plus sensible que la détection UV. La détection LIF a donc été utilisée dans notre projet.

La fig. 1.1 présente la configuration de détection LIF [27] de l'appareil Beckman Coulter CE. Selon cette configuration, il est possible d'employer parallèlement deux lasers afin de mesurer simultanément la fluorescence à deux longueurs d'ondes différentes. Malheureusement, l'instrument disponible au laboratoire ne possède que le laser à argon ionisé ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm, laser 1 à la fig. 1.1) et qu'un seul filtre d'émission à 520 nm et c'est ce type de configuration qui a été utilisée lors des mesures de fluorescence en CE.

Quant au type de fluorescence en CE-LIF, il y en a deux, soit une fluorescence native [28], soit une fluorescence des molécules marquées. La première provient de l'excitation des peptides contenant les acides aminés aromatiques, soit le tryptophane (W), soit la tyrosine (Y) dont la longueur d'onde d'excitation est de 275 nm. Elle est la méthode la plus simple et peut atteindre une limite de détection sous les micromolaires. Cependant, le coût et la courte durée de vie du laser ultraviolet diminuent sa popularité. Pour sa part, la fluorescence par marquage a pour but de permettre une détection sélective et sensible. Pour ce faire, un substrat doit être marqué avec un fluorophore lui permettant d'être excité à des longueurs d'onde correspondant au laser. Ce type de fluorescence a été utilisé au cours de ce projet.

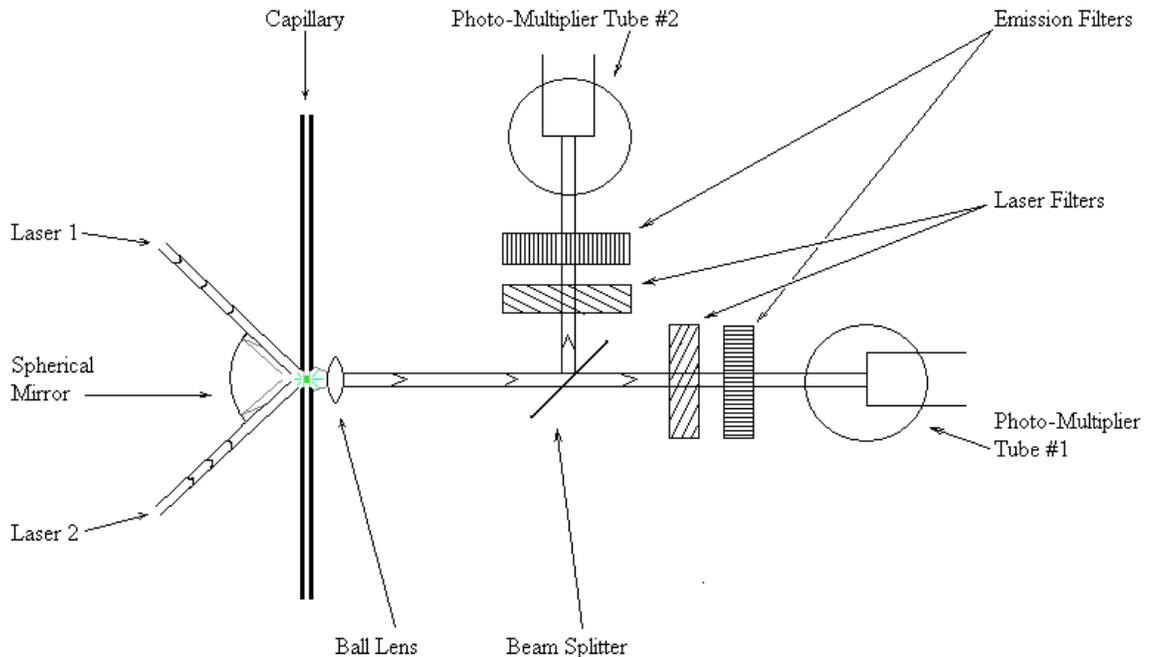


Figure 1.1 Schéma de l'appareil de détection de fluorescence par laser [27]

1.4 Marquage fluorescent pour la cartographie peptidique

Le marquage fluorescent de protéines et d'autres biopolymères est une technique puissante dans les domaines de la biochimie et de la médecine. Les groupes réactifs des

protéines incluent les amines (des lysines et des groupes de l' α -amine N-terminal), les thiols (des cystéines), les groupements -OH (des tyrosines, des sérines et des thréonines) et les acides carboxyliques (des acides aspartiques et glutamiques) [29]. Alors, plusieurs types de marqueurs fluorescents peuvent être choisis [30, 31]. Le marquage via les groupements amines est le plus fréquemment utilisé. Malgré que certaines protéines ne comptent pas de groupe d' α -amine N-terminal libre (Par exemple, le cytochrome C et l'ovalbumine possèdent un N-terminus acétylé), la plupart de protéines comptent une amine au N-terminal libre et la lysine est souvent présente en grande quantité dans une protéine. Par exemple, l' α -lactalbumine compte 12 lysines. De plus, le groupement amine est un nucléophile puissant lorsque le pH est supérieur à 8.0 ($pK_a(\text{Lys}) = 9,18$) et il réagit facilement avec plusieurs réactifs en formant une liaison stable (voir l'équation 1.2 où R représente un groupement fluorescent et X représente un groupe partant).

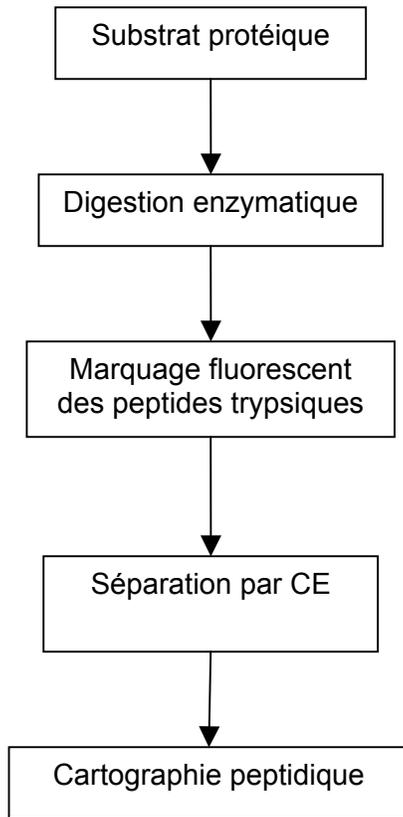


Il y a cinq types principaux de marqueurs fluorescents qui réagissent avec le groupement amine [32] : les esters de succinimidyl (SE), les isothiocyanates (ITC), les chlorures de sulfonyl (SC), les esters de tétra-fluorophényl et les o-dicarboxaldéhydes d'arènes (Par exemple, l'o-phthalaldéhyde (OPA) et l'anphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA)). Parmi ces cinq types de marqueurs, l'OPA a été utilisé en premier pour le marquage de peptides [22, 33]. Néanmoins, le dérivé de NDA est plus stable et son efficacité quantique de fluorescence est 3 fois plus élevée que celle de l'OPA [34]. Zhang et Sun ont étudié l'histamine et l'histidine par CE-LIF en utilisant le marquage précolonne avec le NDA [35] et ont obtenu une limite de détection de $5,5 \times 10^{-9}$ et $3,8 \times 10^{-9}$ M. Pour leur part, Robert *et al.* ont marqué la noradrénaline à une concentration de 10^{-9} M avec le NDA [36]. Ye *et al.* ont fait des marquages post-colonnes avec le NDA pour étudier des protéines et des peptides par CE-LIF avec une limite de détection de l'ordre de 8 à 32×10^{-9} M [6, 37]. Ye *et al.* ont fait un marquage post-colonne de l' α -lactalbumine et de la β -caséine avec le NDA. Ils ont montré une carte peptidique de la β -caséine marquée [37]. Ces résultats nous ont encouragés à choisir le NDA pour préparer les substrats marqués. Cependant, nous avons constaté que le dérivé NDA n'était pas stable dans le temps. Au cours de la décennie précédente, les scientifiques ont de plus en plus utilisé la fluorescéine-5-isothiocyanate

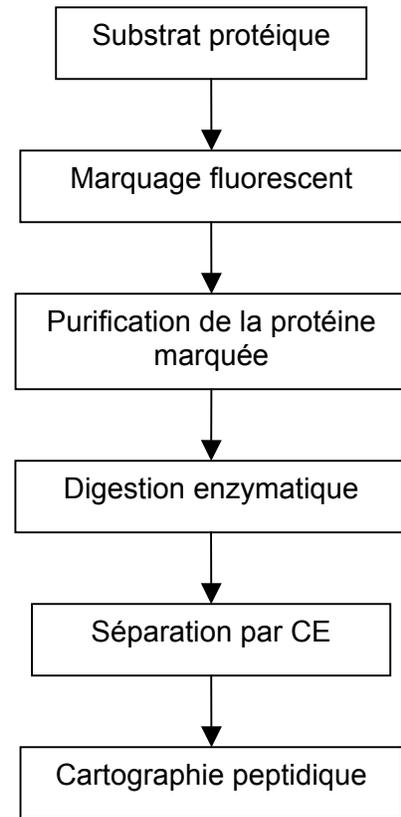
(FITC) et l'ester de carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE) pour marquer les groupements amines. Par exemple, Lau *et al.* ont marqué des acides aminés aux concentrations nanomolaires avec le FAMSE [38]. Banks et Paquette ont marqué les groupements amines de la myoglobine avec trois fluorophores communs, soit la FITC, la fluorescéine dichlorotriazine (DTAF) et le FAMSE [39]. Ils ont montré que la myoglobine marquée avec le FAMSE était le dérivé le plus stable des trois. Alfonso *et al.* ont marqué la phosphodiesterase avec l'ester succinimidyl de carboxyfluorescéine [40]. Gu et Whang ont utilisé le FAMSE pour marquer le baclofen et ont obtenu une limite de marquage de 10nM (la concentration minimale de l'analyte pour le marquage) [41]. Kremser *et al.* ont marqué quatre protéines virales dans le rhinovirus humain avec la FITC à pH 10,0 [1]. La FITC est un marqueur plus connu grâce à sa compatibilité avec la détection LIF du laser commercial d'argon ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) [1, 42-46].

Il y a deux méthodes pour obtenir une carte peptidique par CE-LIF : la méthode conventionnelle, le marquage fluorescent après la digestion du substrat et la nôtre, le marquage fluorescent avant la digestion du substrat. Leurs procédures sont présentées comme suit.

Cartographie traditionnelle des peptides par CE-LIF



Notre méthode de cartographie des peptides par CE-LIF



L'avantage de la méthode traditionnelle est évident : le substrat est digéré sous sa forme native et a une meilleure chance d'être digéré complètement. La limitation de la méthode traditionnelle repose sur le fait que les peptides tryptiques doivent avoir des concentrations supérieures à environ 100 nM pour être marqués efficacement avec un fluorophore. Cela limite la concentration minimale de substrat à digérer pour caractériser la partie digestive. Dans le cas de l'enzyme immobilisée en microréacteur, il faut coupler un préconcentrateur à une chambre de mélange pour effectuer le marquage si les peptides présentent une concentration inférieure à 100 nM, ce qui peut présenter un désavantage [37, 47]. Par contre, l'avantage de notre méthode est plus évident : elle est plus simple et donne une carte peptidique concise et sans interférence. Elle permet aussi de faire une digestion ou un marquage fluorescent de substrat ayant une concentration inférieure à 100 nM. Néanmoins, elle a aussi des désavantages tels qu'un marquage non homogène du substrat

lorsque le nombre de groupements fonctionnels (-NH₂) augmente selon Banks et Paquette [48] et le risque que l'enzyme ne reconnaisse plus le substrat modifié. Le marquage multiple qui donne des dérivés ayant un différent nombre de fluorophore (eg. non homogène) est provoqué par la grande taille de fluorophore et le marquage incomplet de la cible. Il donne un mélange de produits complexes qui sont différents en nombre et en orientation spatial du groupement fluorescent. Par exemple, le marquage d'une protéine ayant 6 amines primaires peut mener à 63 produits uniques couvrant la gamme de 1 à 6 groupements fluorophores par molécule de protéine. En effet, trois fluorophores peuvent être distribués dans 20 façons différentes à travers les 6 amines. De plus, l'autre désavantage de cette méthode est que les fragments ayant des sites non marqués ne peuvent pas être détectés par LIF. Malgré les désavantages du marquage aléatoire avant la digestion, celui-ci nous permet d'utiliser une concentration élevée du substrat, qui peut être purifié et ensuite dilué, pour caractériser les enzymes immobilisée par CE-LIF.

Quant à la purification du substrat marqué, il y a plusieurs méthodes possibles. Parmi ces dernières, la chromatographie d'exclusion moléculaire (SEC, «*Size Exclusion Chromatography*») a été choisie pour cette étude. Elle est aussi appelée filtration sur gel ou tamisage moléculaire. Cette technique de séparation repose sur la taille des molécules à séparer [49]. Elle est une méthode de séparation de macromolécules à l'état natif et sans dénaturation. Aussi, elle est largement employée dans la dernière étape de purification de protéines et permet généralement d'estimer la masse molaire de protéines natives [50, 51]. Sa phase stationnaire est constituée de billes poreuses de polysaccharides modifiées ayant comme nom commercial «SephadexTM». Les petites molécules peuvent facilement pénétrer dans les billes car leur diamètre est inférieur à celui des pores du gel de Sephadex, alors que les grosses molécules ne peuvent pas en raison de leur grande taille, et sont exclues du gel. Elles ont donc un trajet plus court à parcourir pour arriver à la sortie de la colonne et sont éluées en premier. Les petites molécules sont éluées ensuite car elles ont une plus grande distance à parcourir [50]. Il y a deux types de colonnes Sephadex, l'une est une colonne de centrifugation [44] et l'autre une colonne normale [48]. Ces deux types de colonnes ont été employés lors de notre étude. L'efficacité de séparation de ces types de colonne ne pouvait pas atteindre 100 % à cause de la limitation de la SEC conventionnelle, donc l'ultrafiltration a été utilisée. Cette dernière a permis de concentrer le substrat

protéique marqué et d'enlever les petites molécules telles que l'excès de marqueur fluorescent, des traces de produits secondaires et des sels dans l'échantillon.

Dans ce projet, le NDA, ($\lambda_{\text{ex}} = 410 \text{ nm}$), la FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) et le FAMSE ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) ont été utilisés comme chromophores de réactif aminé pour des essais de marquage fluorescent. L' α -lactalbumine (LACT), la D-phénylalanine (D-Phe), l'insuline chaîne B (INB) et l'anhydrase carbonique (CA) ont été utilisées comme substrats. Au début du projet, le NDA a été choisi pour marquer la LACT. Cependant, nous avons constaté que le dérivé NDA n'était pas très stable dans le temps et qu'il avait une faible solubilité dans l'eau. Tous cela a affecté le résultat de la digestion protéolytique. Il a donc été abandonné. Puis, la FITC a été utilisée pour faire quelques études et enfin le FAMSE a été testé et désigné comme étant le meilleur pour ce projet.

Il faut remarquer que dans ce mémoire, la limite instrumentale de détection en CE-LIF est la concentration minimale de l'analyte qui peut être injectée directement dans le capillaire sans préconcentration. Cette limite correspond aussi à un rapport signal/bruit de 3:1. Elle peut atteindre une concentration de 10^{-12} M si le fluorophore a une grande absorptivité molaire et un rendement quantique approchant 1,0. Celle-ci se distingue de la limite de détection de la méthode totale (incluant la réaction de marquage, la digestion enzymatique et la détection des peptides) qui indique pour sa part la concentration minimale de la protéine du départ, avant son marquage (eg. selon le schéma à la p.9). La limite de marquage est généralement la concentration minimale de l'analyte qui peut être marqué et ensuite détecté par CE-LIF en donnant un pic visible ayant aussi un rapport signal/bruit de 3:1.

1.5 Objectif du projet de maîtrise

Les cancers constituent une menace pour la santé. Beaucoup d'entre eux sont associés à la présence d'une enzyme, par exemple, l'anhydrase carbonique (CA) IX. Cette dernière est toujours présente au niveau de trace dans une cellule de tumeur. Alors, l'analyse de cette trace de l'enzyme devient un sujet d'intérêt dans le domaine clinique [52]. La cartographie peptidique par CE ou par MS est une excellente méthode pour déterminer les

concentrations de cette enzymes dans les échantillons biologiques. En fait, É. Bonneil [20], un ancien membre de notre groupe de recherche, a développé un microréacteur tryptique pour faire la cartographie peptidique de la β -caséine, une protéine de masse similaire à la CA, par CE-UV. Ces travaux préliminaires ont suscités des recherches sur le développement et l'application de microréacteur [53, 54, 55] et aussi sur le développement d'autres méthodes d'immobilisation de trypsine. Par exemple, I. Migneault, un membre de notre groupe, a immobilisé la trypsine par réticulation avec le GA [16]. H. Hamad et C. Dartiguenave (membres de notre groupe) ont développé des méthodes pour immobiliser la trypsine sur les billes de verre [56]. Ils ont obtenu des résultats encourageants sur le microréacteur et sur les enzymes immobilisées. Cependant, ils ont utilisé plutôt la détection UV-vis. Ce mode de détection a pour désavantage d'avoir une limite de détection assez élevée. Il empêche donc les études sur le microréacteur enzymatique avec les protéines aux niveaux de traces.

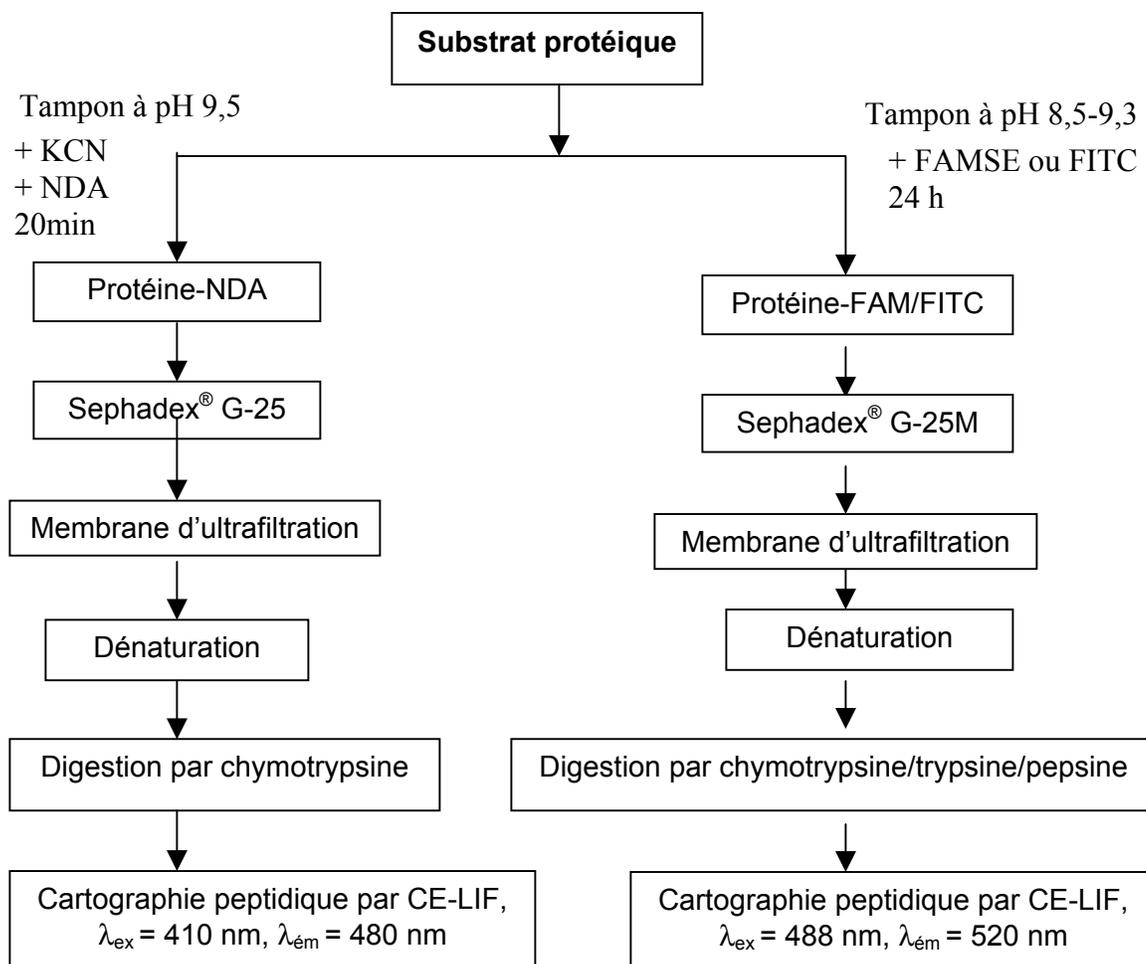
Afin de mieux caractériser les enzymes immobilisées en microréacteur, il faut que la détection des fragments peptidiques n'empêche pas les études sur le microréacteur enzymatique. Alors, ce projet a pour but de développer une méthode de marquage fluorescent du substrat et d'évaluer la performance des enzymes solubles et immobilisées par la cartographie peptidique électrophorétique avec la détection LIF. Cette approche est plus efficace que le marquage fluorescent des peptides tryptiques suite à une digestion enzymatique. L'évaluation des caractéristiques des microréacteurs enzymatiques, en particulier les microréacteurs fabriqués par réticulation dans un capillaire, était effectuée par Q. V. Nguyen, un autre membre de notre groupe de recherche. Tous nos travaux visent l'application future de microréacteur dans le milieu clinique.

2. Partie expérimentale

Cette partie du mémoire décrit les méthodes et réactifs utilisés lors de notre étude et comprend huit éléments : 1) le schéma de notre méthodologie globale, 2) le matériel utilisé, 3) la préparation des tampons et des solutions, 4) les détails sur les marquages avec des fluorophores, 5) les techniques de purification des substrats marqués, 6) les mesures spectroscopiques des substrats marqués pour vérifier les réactions de marquage, 7) les digestions enzymatiques des substrats marqués et 8) la cartographies peptidique par CE-LIF.

2.1 Schéma de méthodologie

Les étapes importantes du projet consistent à un marquage fluorescent, une séparation SEC par colonne Sephadex suivie d'une purification par membrane d'ultrafiltration (MWCO, «*Molecular Weight Cut-Off* »), une immobilisation d'enzyme, une digestion protéolytique et enfin de la cartographie peptidique par CE. Ces étapes sont présentées dans le schéma ci-dessous.



2.2 Matériel

Les substrats : la D-phénylalanine (D-Phe, ≥ 98 %, CAS : 673-06-3), l' α -lactalbumine du lait de bovin Type I (LACT, ≥ 85 %, CAS : 9051-29-0), l'anhydrase carbonique de l'érythrocytes de bovin (CA, 98 %, CAS : 9001-03-0; pI 6,40) et l'insuline Chaîne B oxydée du pancréas de bovin (INB, ≥ 80 %, CAS : 30003-72-6) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Montréal, Québec, Canada).

Les fluorophores : le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA, CAS : 7149-49-7) a été acheté chez Fluka (Montréal, Québec, Canada). L'isomère I de fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC, ≥ 90 %, CAS : 3326-32-7), l'ester de 5(6)-carboxyfluorescéine N-succinimidyl (5(6)-FAMSE, ≥ 90 %, CAS : 117548-22-8) et l'ester de 6-carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE, CAS : 92557-81-8) ont été achetés chez

Sigma-Aldrich (Montréal, Québec, Canada). La trousse de Fluoro-Spin 498 pour le marquage de protéine et leur purification a été achetée chez EMP Biotech GmbH (Berlin, Allemagne) sauf que le composant 1, soit le 5(6)-FAMSE, a été remplacé par le 6-FAMSE.

Les enzymes : l' α -chymotrypsine du pancréas de bovin traitée avec TLCK type VII (CT, CAS : 9004-07-3, EC : 3.4.21.1), la pepsine du muqueuse gastrique de porc (PEP, CAS : 9001-75-6, EC : 3.4.23.1) et la trypsine du pancréas de bovin traitée avec TPCK (T, CAS : 9002-07-7, EC : 3.4.21.4) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Montréal, Québec, Canada). La chymotrypsine immobilisée par liaison covalente sur billes d'agarose en gel (GELCT) provient de chez Princeton Séparation Inc. (Freehold, USA) et la pepsine immobilisée sur billes d'agarose provient de chez Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, USA).

Les autres produits chimiques : le cyanure de potassium (KCN) a été acheté chez Anachemia (grade réactif A.C.S.), le borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), l'acide borique (H_3BO_3), le phosphate dibasique de sodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), le phosphate monobasique de sodium (NaH_2PO_4), le carbonate de sodium (Na_2CO_3), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3), l'acide phosphorique (H_3PO_4), le diméthylformamide (DMF), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'iodoacétamide, le dithiothréitol (DTT), la glycine (Gly), la solution aqueuse d'hydroxylamine (50 %) (NH_2OH) et le glutaraldéhyde (GA) ont tous été obtenus de Sigma-Aldrich (Montréal, Québec, Canada). L'eau distillée a été purifiée par un système Milli-Q (Bedford, MA, USA) et a été utilisée dans la préparation de tous les tampons et échantillons.

Les matériaux : les colonnes PD-10 de Sephadex[®] G-25M ont été achetées chez Pharmacia Biotech. (Uppsala, Suède). Les dispositifs d'ultrafiltration par centrifugation Centricon[®] YM-3 (MWCO YM-3) ont été achetés chez Millipore (Bedford, MA, USA). Les membranes de dialyse en cellulose régénérée de Spectra/Por[®] 6 (MWCO 1000) ont été achetées chez Spectrum Laboratoires Inc (Ottawa, Ontario, Canada). La colonne ZORBAX Poroshell 300SB-C8 (ID = 2,1 mm; L = 75 mm; $d_p = 5 \mu\text{m}$) a été achetée chez Agilent Technologies (Mississauga, Ontario, Canada). Le tube en verre (L = 67 cm, ID = 6 mm, OD = 9 mm) pour la colonne de Sephadex a été fabriqué par le souffleur de verre du

Département de chimie de l'Université de Montréal. Les capillaires (ID = 50 μm , OD = 360 μm) provient de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

2.3 Solutions tampons

2.3.1 Solutions tampons pour le marquage fluorescent et pour l'élution

Une solution mère de NaHCO_3 0,400 M a été préalablement préparée avec de l'eau déionisée et ensuite le tampon bicarbonate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 9,50 a été préparé à partir de cette solution stock. Tout d'abord, une dilution a été faite à $5,0 \times 10^{-2}$ M et puis le pH de la solution a été mesuré avec un pH-mètre et ajusté à 9,50 avec une solution de NaOH 4 M. Le tampon bicarbonate 0,10 M pH 9,30 a été préparé de la même façon. Le tampon bicarbonate 0,10 M pH 8,47 a été fait simplement en diluant la solution mère à 0,10 M sans ajustement de pH. L'éluant de SEC était la solution bicarbonate diluée à $1,0 \times 10^{-2}$ M (pH de 8,47).

2.3.2 Solutions tampons pour la séparation par CE

Le tampon borate 0,15 M pH 8,22 a été préparé à partir de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ et de l'acide borique. Le tampon borate 0,10 M pH 9,28 (I = 0,30 M) a simplement été préparé à partir de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sans ajustement de pH. Le tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 (I \geq 0,60 M, la quantité du NaOH n'était pas incluse) a été préparé par mélange de 275,0 mL d'une solution de Na_2HPO_4 0,20 M et de 225,0 mL d'une solution de NaH_2PO_4 0,20 M dans un ballon jaugé de 1000 mL en y ajoutant de l'eau déionisée jusqu'au trait de jauge. Son pH a été ajusté avec du NaOH 1 M.

2.3.3 Solutions tampons pour la digestion enzymatique

Le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80 a été préparé avec de l'acide borique en ajustant son pH à 7,80 avec du NaOH 0,10 M. Le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 8,00 a été préparé de la même façon. Le tampon phosphate $2,9 \times 10^{-3}$ M pH 2,60 était simplement une solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) $2,9 \times 10^{-3}$ M.

2.4 Marquage avec des fluorophores

Le marquage fluorescent le plus commun consiste à une réaction de fluorophore avec le groupement amine primaire (l'amine N-terminal et/ou l'amine de la chaîne latérale de lysine). Étant donné les nombreux groupements amines primaires dans une protéine, un mélange de produits fluorescents peut être généré à partir d'un seul analyte à cause du marquage à des sites différents. Heureusement, toutes ces possibilités de marquage ne sont pas observées. Les produits ayant différent nombre de marqueur fluorescent peuvent être séparés par CE [48]. Les parties suivantes décrivent les principes de marquages avec le NDA, la FITC et le FAMSE, ainsi que leur protocole de réaction.

2.4.1 Marquage avec le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA)

Le NDA est un chromophore bien connu pour marquer les acides aminés. Dans notre essai, il a été utilisé pour marquer l' α -lactalbumine (LACT). Selon la fig. 2.1, le groupement amine primaire réagit avec le NDA en présence de cyanure de potassium en milieu basique [57]. Le protocole de marquage avec le NDA est présenté ci-dessous.

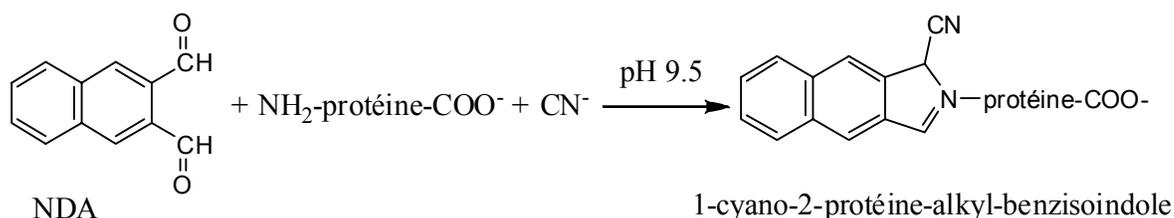


Figure 2.1 Réaction de NDA avec une protéine en présence de CN^- en solution basique donnant le produit 1-cyano-2-protéine-alkyl-benzisindole.

Une solution mère de LACT 9,93 mg/mL a été fraîchement préparée dans le tampon NaHCO_3 $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 9,50. Un mélange a été tout d'abord préparé en mélangeant à l'aide d'un agitateur vortex 30 μL de LACT 9,93 mg/mL avec 6 μL de solution aqueuse de KCN 0,20 M. Une solution toute fraîche de NDA $7,1 \times 10^{-2}$ M a ensuite été préparée dans l'ACN. Puis, un volume de 16 μL de la solution de NDA a été ajouté à la solution de LACT

sous agitation du vortex. La réaction de marquage se déroulait à température ambiante pendant 20 min à l'obscurité.

2.4.2 Marquage avec la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC)

La FITC est le fluorophore qui était utilisé le plus fréquemment pour marquer une protéine dans le passé. Dans notre essai, elle a été employée pour marquer l'anhydrase carbonique (CA) selon la fig. 2.2.

Les groupements amines primaires, l' α -amine et l' ϵ -amine dans une protéine, sont des bons nucléophiles qui peuvent attaquer le groupement isothiocyanate de FITC en formant un produit thiocarbamylé à pH 9,0-9,5 (fig. 2.2). La protéine marquée est assez stable [46, 58].

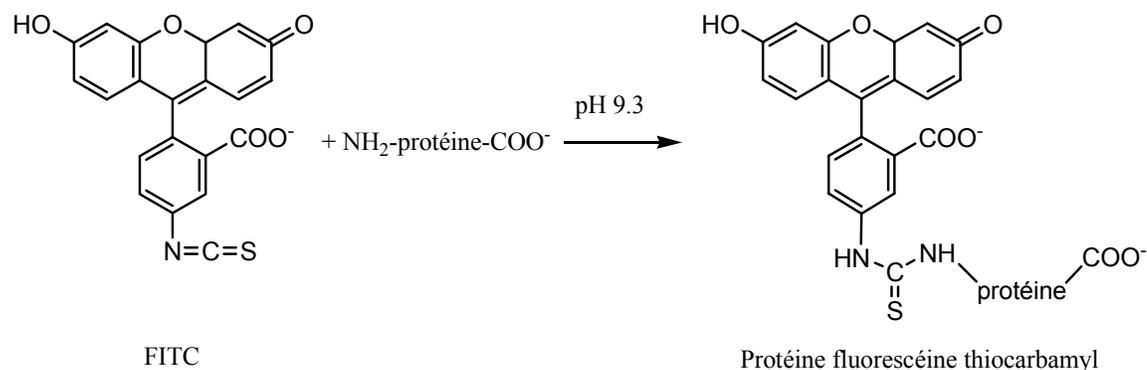


Figure 2.2 Réaction de FITC avec une protéine en solution basique donnant la protéine fluorescéine thiocarbamyl.

Une solution fraîche de CA 10,0 mg/mL ($3,44 \times 10^{-4}$ M) a été préparée en dissolvant 12,4 mg de CA dans 1,217 mL de tampon bicarbonate 0,10 M pH 9,30. Une solution mère de FITC $2,00 \times 10^{-2}$ M a été préparée juste avant la réaction de marquage en dissolvant 14,9 mg de FITC dans 1,727 mL de DMSO. Le marquage de CA avec la FITC a été réalisé en triplicata. Une solution de 100 μ L de CA (10,0 mg/mL) a été diluée avec l'ajout de 26 μ L de tampon NaHCO₃ (0,10 M pH 9,30) afin d'obtenir un volume de 126 μ L. Dans cette solution 74 μ L de FITC $2,00 \times 10^{-2}$ M ont été ajoutés goutte à goutte en mélangeant sur

le vortex. La réaction de marquage se déroulait à température ambiante (22 °C) pendant 24 h à l'obscurité. Elle a ensuite été arrêtée par l'addition de 37 µL de solution aqueuse d'hydroxylamine 2,0 M, suivie d'un repos de 2 h. Le blanc de marquage a été préparé de façon similaire en remplaçant la solution de CA par le tampon bicarbonate. Enfin, le mélange de la réaction de marquage a été purifié par filtration sur une colonne Sephadex® G-25, qui sera décrite dans la section 2.5.

2.4.3 Marquage avec l'ester de 6-carboxyfluorescéine succinimidyl (FAMSE)

L'ester de 6-carboxyfluorescéine succinimidyl (FAMSE ou 6-FAMSE) est un fluorophore similaire à la FITC. Cependant, il est activé par l'ester succinimidyl afin de créer une liaison covalente (liaison amide) avec la protéine à coupler. Ceci permet une meilleure réactivité à plus faible concentration que la FITC [38] et aussi d'être plus facilement attaqué par le groupement amine primaire à pH 8,3-9,0 (fig. 2.3) et rend le dérivé plus stable. La réaction de marquage avec le FAMSE est montrée dans la fig. 2.3. Dans notre essai, le FAMSE a été employé pour marquer la D-phénylalanine (D-Phe), l'insuline chaîne B (INB) et l'anhydrase carbonique (CA).

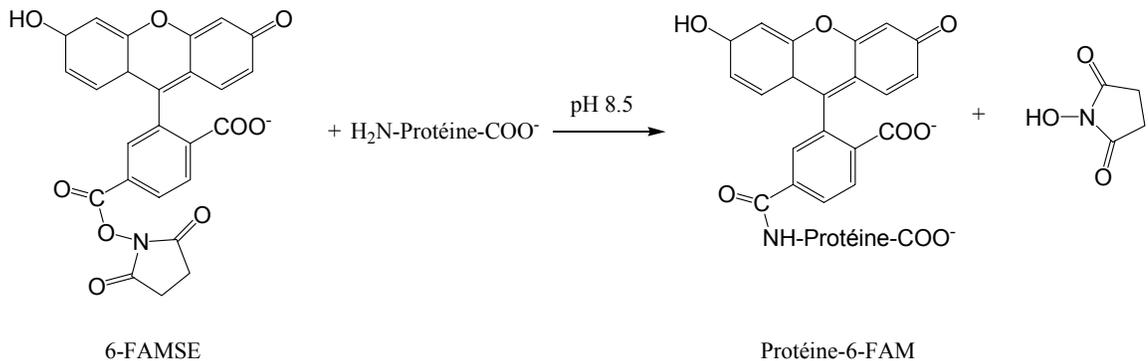


Figure 2.3 Marquage de protéine avec le 6-FAMSE en solution basique donnant la protéine-6-FAM.

2.4.3.1 D-Phénylalanine marqué avec le FAMSE

Pour faire une étude de stabilité sur un substrat marqué par FAMSE, la D-phénylalanine a été choisie. Pour ce faire, une solution mère de D-phénylalanine $1,0 \times 10^{-2}$ M a été préparée en dissolvant 2,0 mg de D-Phe dans 1,210 mL de tampon bicarbonate 0,10 M pH 8,47. Les solutions (2,00 mL pour chacune) de D-Phe à $1,0 \times 10^{-6}$ M, à $1,0 \times 10^{-8}$ M, à $1,0 \times 10^{-9}$ M et $1,0 \times 10^{-10}$ M ont été préparées par dilution successive.

Une solution de FAMSE $2,0 \times 10^{-2}$ M a été préparée juste avant la réaction. Elle a été faite en dissolvant 6,7 mg de FAMSE dans 708 μ L de solvant DMSO (diméthylsulfoxyde) anhydre, puis diluée à $1,0 \times 10^{-2}$ M avec le DMSO. Pour éviter la photodécomposition, toutes les fioles contenant la solution de FAMSE ont été emballées dans du papier aluminium. Dans un tube Eppendorf de 2 mL, le marquage de D-Phe avec le FAMSE se déroulait en mélangeant 1000 μ L de D-Phe $1,0 \times 10^{-6}$ M avec 1 μ L de FAMSE $1,0 \times 10^{-2}$ M. Le blanc de ce marquage a été préparé en suivant la même procédure en remplaçant la solution de D-Phe par la solution tampon (1000 μ L, NaHCO_3 0,10 M pH 8,47). Puis, des prélèvements de 20 μ L chacun ont été faits à 2 h, à 4 h, à 6 h, à 8 h, à 10 h, à 12 h, à 24 h, à 72 h (3 j) et à 16 j et ont directement été analysés par CE-LIF dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28 afin d'évaluer la stabilité de D-Phe-FAM. De la même façon, trois autres marquages ont été effectués avec trois solutions de 1000 μ L chaque de D-Phe à $1,0 \times 10^{-8}$ M, à $1,0 \times 10^{-9}$ M et à $1,0 \times 10^{-10}$ M en les mélangeant avec 1 μ L chaque de FAMSE $1,0 \times 10^{-2}$ M. Ces marquages se déroulaient sur 24 h. Ensuite, un prélèvement de 20 μ L a été effectué et analysé par CE-LIF afin de déterminer la limite de marquage.

2.4.3.2 Insuline chaîne B marquée par le FAMSE

Le marquage de l'insuline chaîne B a suivi la même étape que celle de CA avec FITC (voir la partie 2.4.2). Une solution de 100 μ L d'insuline chaîne B 10,0 mg/mL ($2,87 \times 10^{-3}$ M dans la solution de NaHCO_3 0,10 M pH 8,47) a été diluée avec 35 μ L de NaHCO_3 0,10 M et puis, la coloration s'effectuait lors de l'ajout de 66 μ L de FAMSE $2,0 \times 10^{-2}$ M. Après 24 h, la réaction a été arrêtée par l'addition de 33 μ L d'hydroxylamine 2,0 M, suivie d'un

repos de 2 h. Ensuite, le mélange de la réaction de marquage a été purifié par filtration sur une colonne Sephadex[®] G-25.

2.4.3.3 Anhydrase carbonique (CA) marquée par le FAMSE

Le marquage de CA avec FAMSE a suivi le même protocole que celui avec la FITC (voir la partie 2.4.2) sauf que le tampon bicarbonate utilisé était une solution de NaHCO₃ 0,10 M pH 8,47 au lieu de pH 9,30.

Pour fin de comparaison, nous avons évalué les résultats obtenus avec une méthode commerciale (1 h de marquage avec une colonne de centrifugation) par rapport à la nôtre (24 h de marquage avec une colonne normale). Pour ce faire, deux échantillons ont été préparés par ces deux méthodes en même temps. Les protocoles de la méthode commerciale ont été obtenus de la compagnie EMP Biotech GmbH (Allemagne) en utilisant leurs matériels sauf que le 5(6)-FAMSE (*e.g.* le mélange des isomères) a été remplacé par le 6-FAMSE. Les étapes expérimentales sont résumées ci-dessous.

Tout d'abord, une solution de 100 µL de CA 10,0 mg/mL (solution NaHCO₃ 0,10 M pH 8,47) a été transférée dans un tube de réaction (composant 5) et une solution de 20 µL de NaHCO₃ 1,0 M y a été ajoutée. Par la suite, une solution de 74 µL de FAMSE 2,0×10⁻² M (solvant DMSO) a été ajoutée en agitant le mélange, puis laissé à l'obscurité pendant 1 h. Ce dernier a reposé pendant 1 h à température ambiante en emballant le tube dans du papier aluminium. Après 1 h de marquage, la réaction a été arrêtée par l'addition de 10 µL d'hydroxylamine 2,0 M pour 30 min. Ensuite, le mélange de la réaction de marquage a été purifié par la colonne de centrifugation.

2.5 Purification des substrats marqués

Le mélange réactionnel de marquage contenait les substrats marqués ainsi que des produits secondaires qui avaient les mêmes caractéristiques fluorescentes. Afin de réduire la contribution des interférences associées aux produits secondaires, il fallait donc les

enlever. Nous avons utilisé la chromatographie d'exclusion moléculaire (SEC) et l'ultrafiltration (la technologie membranaire).

2.5.1 Purification par SEC

a. Préparation de colonne

Une colonne Sephadex[®] G-25M a été préparée en suivant le protocole décrit par Sauterer [50] en utilisant un tube en verre fait maison. Avant de remplir la colonne, un petit bout de laine de verre y a été introduit afin d'empêcher la phase stationnaire de sortir et puis, la colonne a été bloquée par un bouchon. Après le remplissage de la colonne avec l'eau déionisée, environ 13 g de billes de polysaccharides, Sephadex[®] G-25M, y ont été introduites, à l'aide d'un entonnoir, sous forme d'un gel obtenu par mouillage avec de l'eau correspondant à environ 18 mL de billes. Lorsque le Sephadex s'écoulait jusqu'au tiers de la colonne, le bouchon à la base de colonne a été enlevé pour laisser couler le tampon, jusqu'à ce que la couche de Sephadex ait atteint un niveau désiré (3,5 cm à partir de l'entrée supérieure). Le remplissage des billes de polysaccharides a été fait en frappant délicatement la colonne à l'aide d'un objet léger. La hauteur de la phase stationnaire était de 60 cm après l'ajustement et la surface de Sephadex a été recouverte d'un filtre en verre. Finalement, la colonne a été équilibrée par gravité avec l'éluant de NaHCO₃ 1,0×10⁻² M pendant 1 h.

b. Introduction d'échantillon

Avant l'introduction de l'échantillon, le bouchon a été enlevé pour laisser couler l'éluant. Dès que la surface de l'éluant avait atteint la couche de Sephadex, la sortie de la colonne a été bloquée. Puis, un volume de 250 µL d'échantillon brut (*e.g.* le mélange après marquage) y a été ajouté par micropipette sans toucher le filtre en verre avec le bout de la pipette. L'introduction de l'échantillon s'effectue lorsque le bouchon à la base de colonne est retiré.

c. Éluion

Dès que l'échantillon a été introduit complètement dans la phase stationnaire, l'éluant a été ajouté à la colonne. Ensuite, à l'aide d'une lampe UV, nous avons seulement recueilli la première fraction contenant la protéine marquée et ayant la fluorescence verte avec des fioles de 2 mL. Le volume de fraction collectée était environ de 6 mL en tout.

Quant à la méthode commerciale, une colonne de centrifugation a été utilisée au lieu de la colonne Sephadex en verre. La phase stationnaire était aussi Sephadex[®] G-25. Les étapes de la purification par colonne de centrifugation sont résumées ci-dessous.

Tout d'abord, une durée de 1 h d'hydratation des deux colonnes de centrifugation a été réalisée par l'ajout de 800 µL de solution de NaHCO₃ 0,10 M, puis, les colonnes ont été séchées pendant deux minutes en utilisant une centrifugeuse à 750 G. Une quantité de 68 µL de mélange de marquage a été introduite dans chaque colonne, suivie d'une centrifugation à 750 G pendant 2 min pour enlever la protéine marquée. Cette dernière fut élue dans un volume de 68 µL et 70 µL.

2.5.2 Purification par une membrane d'ultrafiltration

L'efficacité de séparation par SEC ne pouvait pas atteindre 100 %. Les solutions recueillies contenaient encore des traces de produits secondaires qui avaient les mêmes caractéristiques fluorescentes que la protéine marquée. Ils n'étaient pas favorables à notre étude. Donc, il fallait les enlever par ultrafiltration. Les échantillons de LACT-NDA brute, de CA-FITC brute et de CA-FAM brute ont été purifiés et concentrés avec des colonnes d'ultrafiltration Centricon[®] (YM-10 pour LACT-NDA et YM-3 pour CA-FITC et CA-FAM) en suivant le protocole «a» ci-dessous. Pour sa part, l'INB-FAM brute a été purifiée par une membrane à dialyse de Spectra 6 (protocole «b» ci-dessous).

a. Centrifugation avec une membrane d'ultrafiltration (MWCO)

Une centrifugation pour une protéine marquée a été suivie selon le protocole suivant. Après l'insertion d'un tube à filtre MWCO dans un flacon à filtration, la solution recueillie (2 mL maximum) a été ajoutée dans le tube et scellée avec un film. Ensuite, le tube à filtre

MWCO a été placé dans une centrifugeuse GS-6R et centrifugé à une vitesse de 5900 G pendant 1 h à 5 °C afin d'éliminer les sels et les produits secondaires ayant des masses molaires inférieures à 3000 Da. Pour récupérer la protéine marquée, le flacon de retentât a été placé sur le réservoir d'échantillon, inversé et centrifugé à 900 G pendant 2 min. Finalement, la fiole de retentât a été enlevée et scellée.

b. Dialyse par une membrane à dialyse

Après le rinçage d'un boudin à dialyse (10 cm de Spectra 6, MWCO 1000) avec de l'eau déionisée, un bout du boudin a été fermé à l'aide de pince à dialyse et le sac à dialyse a été rincé avec de l'eau déionisée pour éliminer les contaminants extérieurs. La solution recueillie de 300 µL de l'INB-FAM brute a été ajoutée au boudin et l'autre bout du boudin a été fermé en utilisant une autre pince. Le sac à dialyse a été déposé dans un bécher de 1000 mL qui contient de l'eau déionisée. Le liquide de contre dialyse a été agité pendant 24 h à ~15 °C (l'eau déionisée était changée chaque 4 h) afin d'éliminer les petites molécules (masse molaire <1000 Da) dans la solution à dialyser. La solution dialysée a été transférée dans une fiole de 2 mL pour la concentrer par Speed Vac.

Finalement, le volume de retentât a été mesuré par une micropipette de 1000 µL. Après avoir été purifiés, les échantillons concentrés ont été séparés en plusieurs petits volumes (100 µL) dont l'un a été conservé à 4 °C pour des essais le lendemain. Les autres ont été emballés dans du papier d'aluminium et stockés dans le congélateur (-20 °C).

2.6 Mesures spectroscopiques des substrats marqués

Pour caractériser les substrats marqués, leurs spectres d'absorption, de masse et de fluorescence ont été mesurés. Dans cette partie, les expériences globales sur les échantillons non digérés seront présentées. Elles comprennent les mesures des spectres d'absorption, de fluorescence et de masse.

2.6.1 Instrumentation

Trois instruments ont été employés dans cette partie : le spectrophotomètre d'absorption UV (Nicolet Évolution E100 de Thermo Electron Corporation), le spectrofluorimètre (Luminescence Spectromètre de Perkin-Elmer) et le spectromètre de masse couplé à la chromatographie liquide (LC-MSD TOF d'Agilent Technologies).

2.6.2 Mesure des spectres d'absorption

Les spectres d'absorption ont été effectués en déposant une cellule d'échantillon dans la position 1 et une cellule de sa référence dans la position «Référence». La cellule en quartz a eu un chemin optique de 1,00 cm. Un balayage a été fait de 200 nm à 600 nm à une vitesse de 1200 nm/min en utilisant le mode d'absorbance avec une bande passante de 2 nm et un intervalle d'acquisition de 1 nm. Chaque mesure a été faite en triplicata.

Les informations sur les solutions à analyser par spectrophotométrie sont résumées dans le tableau 2.1. La préparation des solutions était faite comme suit:

CA-FITC

Pour obtenir une solution de CA-FITC à $5,0 \times 10^{-6}$ M pour la mesure de spectre d'absorption, une série de dilution a été effectuée. Tout d'abord, une solution de CA-FITC à $4,0 \times 10^{-5}$ M a été préparée par dilution de 100 μ L de la solution mère de CA-FITC à $3,1 \times 10^{-4}$ M dans 678 μ L d'eau déionisée. Ensuite, Un volume de 500 μ L de la solution de CA-FITC à $4,0 \times 10^{-5}$ M a été mélangé avec 1500 μ L de l'eau déionisée pour donner une solution à $1,0 \times 10^{-5}$ M. Finalement, la solution de CA-FITC à $5,0 \times 10^{-6}$ M a été préparée par dilution de 250 μ L de CA-FITC à $1,0 \times 10^{-5}$ M avec 250 μ L d'eau déionisée. L'eau déionisée a servi de référence.

5(6)-FAMSE

Une solution mère de 5 μ L de 5(6)-FAMSE $2,01 \times 10^{-2}$ M (dans le DMSO) a été diluée avec 4995 μ L d'acétonitrile pour donner une solution de FAMSE à $2,0 \times 10^{-5}$ M. Un mélange de 5 μ L de DMSO et de 4995 μ L d'acétonitrile a été préparé pour servir de référence.

CA-FAM

Une solution de 375 μL de CA-FAM brute $4,0 \times 10^{-5}$ M a été diluée avec 1125 μL d'eau déionisée pour donner une concentration finale de $1,0 \times 10^{-5}$ M. Sa référence a été faite à partir du blanc original (377 μL de NaHCO_3 0,10 M + 223 μL de DMSO + 112 μL de NH_2OH 2,0 M). À 600 μL du blanc original ont été ajoutés 1,576 mL d'eau déionisée afin d'obtenir le blanc pour la CA-FAM brute $4,0 \times 10^{-5}$ M. À 1,875 mL de ce dernier ont été ajoutés 5,625 mL d'eau déionisée afin d'obtenir le blanc pour la CA-FAM brute $1,0 \times 10^{-5}$ M.

Une solution aqueuse de 250 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-5}$ M a été diluée avec 350 μL d'eau déionisée pour obtenir une solution de CA-FAM à $4,0 \times 10^{-6}$ M. L'eau déionisée a servi de référence.

Tableau 2.1 Résumé des solutions dont le spectre d'absorption a été obtenu, ainsi que leur référence

Échantillon	Concentration (M)	Référence
CA-FITC	$5,0 \times 10^{-6}$	H_2O pure
5(6)-FAMSE	$2,0 \times 10^{-5}$	0,10 % (v/v) de DMSO dans l'acétonitrile
CA-FAM brute	$1,0 \times 10^{-5}$	3,7 % (v/v) de NaHCO_3 (0,10 M), 2,2 % (v/v) de DMSO et 1,1 % (v/v) de $\text{NH}_2\text{-OH}$
CA-FAM purifiée	$4,0 \times 10^{-6}$	H_2O pure

2.6.3 Mesure des spectres de fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été obtenus avec le spectrophotomètre de Perkin Elmer. La cellule en quartz a un chemin optique de 1,00 cm. Les paramètres pour mesurer le spectre de fluorescence sont présentés dans le tableau 2.2

Tableau 2.2 Paramètres pour mesurer le spectre de fluorescence

Composé	Nom d'acquisition	Balayage		Émission à (nm)	Excitation à (nm)
		de (nm)	à (nm)		
LACT-NDA	Spectre d'excitation	340	460	480	
	Spectre d'émission	440	600		410
CA-FAM ou NaHCO ₃ -FAM	Spectre d'excitation	400	505	518	
	Spectre d'émission	509	600		495
Fente d'excitation : 6,0 nm; Fente d'émission : 7,0 nm; Vitesse de balayage : 100 nm/min.					

Les échantillons analysés par le spectrofluorimètre étaient la LACT-NDA $1,0 \times 10^{-8}$ M (aqueuse), la CA-FAM $1,0 \times 10^{-8}$ M dans le NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ M et le blanc (NaHCO₃-FAM) pour la CA-FAM $1,0 \times 10^{-8}$ M. Leur préparation est décrite ci-dessous.

LACT-NDA

Une solution de 10 μ L de LACT-NDA $1,0 \times 10^{-5}$ M a été diluée avec 10,00 mL d'eau déionisée jusqu'à obtention d'une solution de LACT-NDA à $1,0 \times 10^{-8}$ M.

CA-FAM

Une solution aqueuse de 21 μ L de CA-FAM $9,6 \times 10^{-7}$ M a été diluée avec 1979 μ L de NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ M pour donner une solution de CA-FAM à $1,0 \times 10^{-8}$ M.

Blanc

Une solution de 20 μ L du NaHCO₃-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M a été diluée avec 1980 μ L de NaOH $1,0 \times 10^{-2}$ M pour donner une solution à $1,0 \times 10^{-8}$ M.

2.6.4 Mesure des spectres de masse (LC-MS)

Une solution aqueuse à 1,0 µg/µL de CA ou de CA-FAM a été préparée dans l'eau déionisée afin d'être analysée par MS. Le protocole détaillé est le suivant : une solution de 200 µL de CA 1,2 µg/µL a été diluée avec 32 µL d'eau déionisée pour donner une solution à 1,0 µg/µL. De la même façon, une solution de 200 µL de CA-FAM 1,1 µg/µL a été diluée avec 24 µL d'eau pour donner une solution à 1,0 µg/µL. Leur séparation a été réalisée par LC-MSD TOF Agilent muni d'une colonne de Poroshell 300SB-C8. L'éluant A était la solution aqueuse d'acide formique 0,1 % et l'éluant B était l'acétonitrile (ACN) sans acide formique. Une fois que la colonne a été équilibrée avec la phase mobile (A : 85 %; B : 15 %) pendant 20 min, un volume de 2 µL d'échantillon est injecté. La séparation s'est faite avec le gradient présenté dans le tableau 2.3. Après avoir été séparées, les molécules ont été ionisées à 350 °C par électronébulisation à l'extrémité de capillaire avec un potentiel positif de 4000 volts. La détection a été effectuée en faisant un balayage de 110 à 2500 m/z.

Tableau 2.3 Le gradient d'élution dans la colonne Poroshell 300SB-C8 pour les mesures par LC-MS

Temps (min)	Éluant B (%)	Débit (µL/min)
0	15	300
20	90	300
21	90	300
21,1	15	300
30	15	300

2.7 Digestions enzymatiques

Pour obtenir une carte peptidique, les substrats marqués et purifiés peuvent être digérés par plusieurs enzymes. Dans notre cas, leur digestion a été effectuée par la chymotrypsine, par la trypsine et par la pepsine. Ces enzymes étaient soit solubles, soit immobilisées. La

partie 2.7.1 présente les digestions par enzymes libres (solubles) et la partie 2.7.2 présente les digestions par des enzymes immobilisées.

Les substrats protéiques choisis pour notre étude étaient l' α -lactalbumine du lait bovin (LACT), l'anhydrase carbonique de l'érythrocyte bovin (CA) et l'insuline chaîne B oxydée du pancréas bovin (INB).

2.7.1 Enzymes solubles : trypsine, chymotrypsine et pepsine

2.7.1.1 Digestion par la chymotrypsine (CT)

(i) LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre

Une solution de 350 μ L de LACT-NDA purifiée ($4,0 \times 10^{-5}$ M) a été mélangée avec 200 μ L de tampon NH_4HCO_3 $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 8,50 et 4 μ L de solution DTT à $4,5 \times 10^{-2}$ M à 37 °C pendant 15 min pour réduire les ponts disulfures de la lactalbumine. L'alkylation des groupements -SH a été effectuée en ajoutant 4 μ L d'iodoacétamide à 0,10 M pendant 40 min à 22 °C. Finalement, la solution traitée a été centrifugée à une vitesse de 7000 r/min et concentrée à 66 μ L avec membrane YM-10 de MWCO.

Une solution de 33 μ L de LACT-NDA dénaturée de $1,7 \times 10^{-4}$ M a été diluée 4 fois en ajoutant 99 μ L de tampon NH_4HCO_3 $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 7,90 afin d'obtenir un volume total de 132 μ L. Une digestion de LACT-NDA a été faite par la chymotrypsine libre (3 μ L \times 5,0 mg/mL) à 37 °C pendant 24 h avec un rapport de LACT:CT 16:1. La concentration finale de la LACT-NDA pour la digestion était de $4,2 \times 10^{-5}$ M. Après 24 h de digestion, un volume de 20 μ L de digestat a été prélevé pour l'analyse par CE.

(ii) CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre

Comparaison d'une digestion de 4 h et 24 h

Cet essai avait pour but de comparer la différence entre une digestion de 4 h et une de 24 h par la chymotrypsine libre. Une solution de 50 μ L de CA-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M a été diluée avec 431 μ L de tampon borate de sodium $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80. Un volume de 20 μ L

de chymotrypsine 0,050 mg/mL a été ajouté à cette solution pour donner un volume final de 500 μ L. La digestion de CA-FAM s'est déroulée à 37 °C pendant 4 h. Après 4 h de digestion, le digestat a été congelé à l'aide de glace sèche et gardé à -20 °C afin d'être analysé avec celui venant de la digestion de 24 h. L'autre digestion a été effectuée pendant 24 h en suivant le même protocole.

Étude de la variation du rapport enzyme:substrat (E:S)

Une solution stock de CA-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M a été préparée dans le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80. À partir de cette solution, six solutions de $1,0 \times 10^{-7}$ M chacune (volume final de 500 μ L) ont été préparées avec le tampon borate afin de faire une série de digestions par la chymotrypsine libre avec des rapports CA-FAM:CT de 1:1, 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 et 120:1. Après 24 h de digestion, un volume de 20 μ L de digestat a été prélevé dans chaque solution pour l'analyse par CE-LIF. Ces digestions ont été arrêtées au moyen de congélation sur la glace sèche et leurs digestats ont été gardés dans le congélateur.

Étude de la reproductibilité du marquage de CA avec FAMSE selon les digestions

Un volume de 0,6 μ L de chymotrypsine libre 1,0 mg/mL (CA:CT = 1:1 (poids/poids)) a été ajouté à 200 μ L de chacune des trois solutions à $1,0 \times 10^{-7}$ M de CA-FAM (dans le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80). Après avoir été agités par vortex, les trois mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 24 h avec agitation périodique. Après 24 h de digestion, un volume de 20 μ L de digestat a été prélevé de chaque préparation pour l'analyse par CE-LIF.

Courbe d'étalonnage, limite de détection et limite de digestion

Pour étudier la linéarité de la courbe d'étalonnage et pour déterminer la limite de détection et la limite de digestion (ceci est la concentration minimale de substrat nécessaire pour obtenir un bon signal après digestion), une série de solutions de CA-FAM ont été préparées selon les paramètres décrits dans le tableau 2.4. Leurs digestions ont été effectuées à 37 °C pendant 24 h à l'aide de chymotrypsine soluble dans un tampon borate de pH 7,80. Par la suite, un volume de 20 μ L de digestat a été prélevé dans chaque solution

pour l'analyse par CE-LIF dans la même séquence. Sachant que la limite instrumentale de détection était bien supérieure à 10^{-11} M, l'échantillon de CA-FAM digérée à $1,0 \times 10^{-11}$ M (#11 du tableau 2.4) a été séché par Speed Vac et redissous dans l'eau déionisée afin d'obtenir une solution à $1,0 \times 10^{-9}$ M pour l'analyse.

Tableau 2.4 Paramètres de digestion chymotrypsique de l'anhydrase carbonique marquée en fonction de sa concentration

Essai	Concentration finale (M)	Volume final (μ L)	Volume (μ L) pris pour préparation de digestion		
			CA-FAM 10^{-7} M (pH 7,80)	tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80	CT (1,0 mg/mL)
1	$1,0 \times 10^{-6}$	100			0,3
2	$1,0 \times 10^{-7}$	200	200		0,6
3	$8,0 \times 10^{-8}$	200	160	39	0,6
4	$6,0 \times 10^{-8}$	200	120	79	0,6
5	$1,0 \times 10^{-8}$	1000	100	895	5
6	$6,0 \times 10^{-9}$	1000	60	935	5
7	$2,0 \times 10^{-9}$	2000	40	1950	10
8	$1,0 \times 10^{-9}$	2000	20	1970	10
9	$2,0 \times 10^{-10}$	10000	20	9930	50
10	$1,0 \times 10^{-10}$	10000	10	9940	50
11	$1,0 \times 10^{-11}$	15000	1,5	14924	75

Comparaison des méthodes de marquage suite à la digestion par la chymotrypsine libre

Cet essai permettait de comparer la différence entre un marquage de 1 h avec la trousse commerciale et celui de 24 h par notre méthode à l'aide de la digestion par la chymotrypsine libre. Dans la partie 2.7.2.7, des digestions par la chymotrypsine immobilisée seront présentées.

Une solution de 20 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-5}$ M marquée pendant 24 h par notre méthode a été diluée avec 174 μL de tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 8,00. Un volume de 6 μL de chymotrypsine 0,10 mg/mL a été ajouté à cette solution pour donner un volume final de 200 μL . Puis, la digestion s'est déroulée à 37 °C pendant 24 h. Avec le même protocole de digestion, une solution de 20 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-5}$ M marquée pendant 1 h avec la trousse commerciale a été digérée en même temps. Après 24 h de digestion, un volume de 20 μL de chaque digestat a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF.

(iii) INB-FAM digérée par la chymotrypsine libre

Un volume de 0,7 μL de chymotrypsine soluble 0,10 mg/mL a été ajouté à 200 μL d'INB-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M (dans le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80) pour obtenir un mélange ayant un rapport INB:CT 10:1 (poids/poids). Ce mélange a été incubé à 37 °C pendant 24 h. Après 24 h de digestion, un volume de 20 μL de digestat a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF. Son résultat a été comparé avec les digestions par GACT (voir la partie 2.7.2.8).

2.7.1.2 Digestion par la trypsine (T)

La procédure et les paramètres de digestion de CA-FAM par la trypsine libre ou immobilisée étaient identiques à ceux des digestions faites au tableau 2.4 sauf que le tampon employé était le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 8,00, au lieu de $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80.

Une digestion d'INB-FAM par la trypsine libre a été effectuée avec le même protocole que la partie 2.7.1.1(iii) sauf que le borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 8,00 a été utilisé pour remplacer le tampon $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80.

2.7.1.3 Digestion par la pepsine (PEP)

Des digestions des substrats CA-FAM et INB-FAM par la pepsine libre ou immobilisée ont été effectuées dans la solution d'acide phosphorique (H_3PO_4) $2,9 \times 10^{-3}$ M pH 2,60. Les autres conditions de digestions sont indiquées dans les figures correspondantes de la section 3.5.5.

2.7.2 Enzymes immobilisées : trypsine, chymotrypsine et pepsine

Cette partie traite d'une technique de réticulation et d'une digestion par enzyme immobilisée, c'est-à-dire, insoluble. Le protocole «maison» [16] d'immobilisation pour trypsine et pour chymotrypsine avec le glutaraldéhyde, GA, sera présenté. Pour sa part, la chymotrypsine immobilisée sur gel (GELCT) a été achetée chez Princeton Séparation Inc. Enfin, la pepsine immobilisée sur billes d'agarose (GELPEP) a été obtenue de Pierce Biotechnologie Inc.

2.7.2.1 Technique de réticulation avec le glutaraldéhyde (GA)

La réticulation est une technique d'immobilisation d'enzymes. Elle ne repose pas sur la formation de liaison chimique avec la matrice de support. Au contraire, elle est réalisée par formation de liens intermoléculaires entre les molécules d'enzymes en employant des réactifs multi- ou bi-fonctionnels dont le GA est un exemple typique. Des réactions de réticulation et le protocole d'immobilisation sont décrits ci-après.

Selon Migneault *et al.*, dans une solution aqueuse, le GA existe sous plusieurs formes dont trois (structure I : monomère, structure IV : forme d'hydrate et structure V : oligomère) sont montrés dans la fig 2.4. Après dilution, l'oligomère (V) peut se transformer rapidement à la forme d'hydrate (IV) et puis à la forme monomère (I). Toutes ces formes du GA peuvent réagir avec des groupements amines des enzymes pour former des réticulations [59]. Les réactions de ces molécules peuvent comporter différentes réactions

d'addition/élimination selon les différentes formes chimiques du GA en solution (fig. 2.4). Elles peuvent continuer en formant une chaîne.

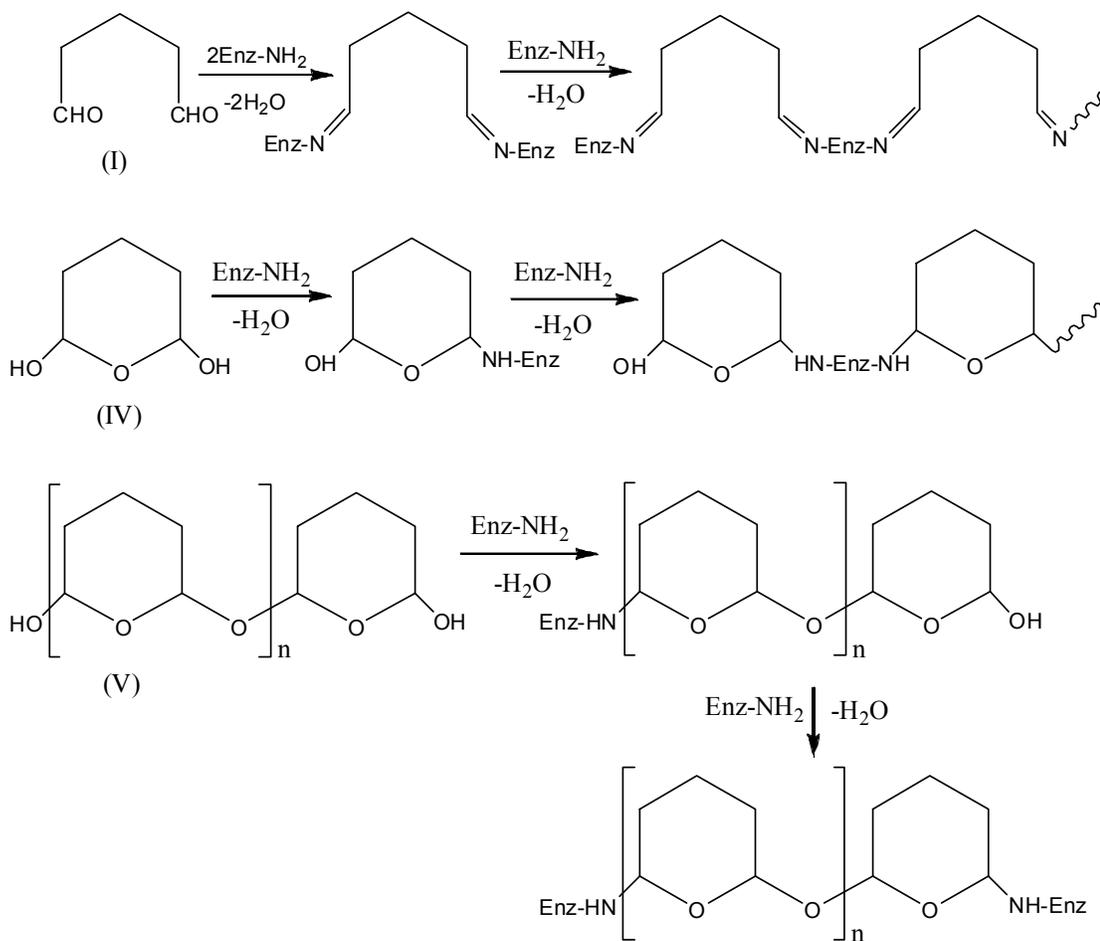


Figure 2.4 Réactions d'une enzyme avec trois différentes formes chimiques du GA en solution acide ou neutre [59].

2.7.2.2 Protocole de réticulation avec le glutaraldéhyde

Dans notre essai, les enzymes à immobiliser par réticulation sont la trypsine et la chymotrypsine. Le protocole d'immobilisation s'est inspiré du travail de Migneault [16] et décrit brièvement ci-dessous.

Un volume de 200 μL de solution aqueuse fraîchement préparée de trypsine $1,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ a été ajouté dans 1,640 mL de tampon phosphate de sodium $5,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ pH 6,80.

Puis, un volume de 235 μL de GA 2,5 % (v/v), dilué préalablement dans le même tampon, y a été ajouté goutte à goutte en agitant. Quelques minutes plus tard, un solide jaune apparaissait. La réaction de réticulation se déroulait à température ambiante pendant 2 h sans agitation. Son mélange a été ensuite centrifugé pendant 2 min à une vitesse de 3000 r/m et le surnageant, qui contenait l'excès de GA et de trypsine non réticulée, a été enlevé pour analyser la teneur en trypsine restante. L'enzyme réticulée a été lavée 3 fois avec 1,00 mL de tampon d'immobilisation, suivie par 3 volumes de NaCl $5,0 \times 10^{-2}$ M ($3 \times 1,00$ mL) et enfin, par 3 volumes de tampon phosphate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,80 ($3 \times 1,00$ mL). Toutes les solutions de lavage ont été collectées ensemble afin de déterminer la quantité de trypsine non réticulée. Ensuite, les groupements actifs résiduels de GA ont été désactivés par addition de 1,00 mL de glycine 0,20 M. La réaction de désactivation se déroulait pendant 3 h à température ambiante. Son mélange a été lavé 3 fois avec le tampon phosphate ($3 \times 1,00$ mL) et 3 fois avec l'eau déionisée ($3 \times 1,00$ mL) pour enlever la glycine non combinée. Finalement, la trypsine immobilisée par le GA a été conservée dans l'eau déionisée à 4 °C jusqu'à son utilisation.

L'immobilisation de chymotrypsine par le GA a été réalisée avec le même protocole.

2.7.2.3 Rendement d'immobilisation par le glutaraldéhyde

Le rendement d'immobilisation par le GA a été déterminé en suivant le protocole de Migneault *et al.* [16]. Brièvement, le contenu en enzyme restante après la réaction de réticulation a été déterminé à l'aide d'un spectrophotomètre Cary100 Bio UV/Vis de Varian par spectrophotométrie différentielle. Les différences de 4^e dérivée d'absorbance du mélange réactionnel avant et après l'immobilisation ont été mesurées. Pour ce faire, le surnageant et toutes les solutions de lavages ont été conservés pour quantifier l'enzyme 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^e dérivée ont été calculés à l'aide de l'algorithme de Savitsky-Golay inclus dans le logiciel Cary Win UV (filtre : 15 points; intervalle de donnée : 0,3 nm). Toutes les mesures ont été faites en triplicata.

2.7.2.4 Reproductibilité de la digestion par GACT

Les études suivantes ont été effectuées avec le substrat marqué CA-FAM, sauf si indiqué autrement. Pour la première digestion, une solution de 50 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-7}$ M (tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80) a été diluée avec 410 μL du même tampon pour obtenir un volume de 460 μL . Puis, un volume de 40 μL d'une suspension de GACT 3,1 mg/mL a été ajouté (CA:CT = 1:863, $C_{\text{CA}} = 1,0 \times 10^{-8}$ M). La digestion a été réalisée à 37 °C pendant 4 h avec agitation périodique à des intervalles de 15 min. Après 4 h de digestion, la solution a été enlevée avec une micropipette, suite à la centrifugation. Cette solution digérée était gardée dans le congélateur. La fiole a été lavée trois fois par l'eau déionisée (3 \times 500 μL) afin qu'elle puisse être utilisée pour d'autres digestions.

La deuxième digestion a été réalisée avec le même protocole que la première digestion sauf que 40 μL de GACT ont été remplacés par 40 μL d'eau déionisée puisque la GACT était réutilisée.

La troisième digestion a été faite de la même façon que la deuxième digestion. Ensuite, les trois solutions digérées ont été analysées par CE-LIF dans une même séquence.

2.7.2.5 Limite de détection de la méthode de digestion par GACT

Pour évaluer la limite de détection de la méthode de digestion du substrat marqué par GACT, une solution de 3 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-7}$ M a été diluée à concentration finale de $3,0 \times 10^{-10}$ M en ajoutant 897 μL de tampon borate 0,10 M pH 7,80 et 100 μL de GACT 3,1 mg/mL. La digestion a été réalisée à 37 °C pendant 4 h. Puis, un volume de 20 μL de digestat a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF.

2.7.2.6 Comparaison de digestions par trois types de chymotrypsine

Pour comparer trois types de chymotrypsine, nous avons réalisé trois digestions du substrat CA-FAM à l'aide de GELCT (produit de Princeton Séparation), de GACT (produit fabriqué maison) et de chymotrypsine libre. La quantité de chymotrypsine a été ajustée pour donner un même niveau d'activité. Les protocoles de digestions sont décrits ci-dessous.

(i) Une solution de 50 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M a été diluée avec 411 μL de tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80 et puis, un volume de 39 μL de GELCT 0,50 mg/mL a été ajouté pour donner un volume final de 500 μL et une concentration finale de $1,0 \times 10^{-7}$ M.

(ii) Une solution de 50 μL de CA-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M a été diluée avec 413 μL de tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80 et puis, un volume de 38 μL de GACT 3,1 mg/mL a été ajouté pour donner aussi une concentration finale de $1,0 \times 10^{-7}$ M.

(iii) La digestion par la chymotrypsine libre est telle que présentée dans la partie 2.7.1.1 (ii).

Ces digestions chymotrypsiques ont été réalisées à 37 °C pendant 4 h. Après 4 h de digestion, un volume de 20 μL de chaque digestat a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF.

2.7.2.7 Comparaison entre la méthode commerciale (marquage de 1 h) et la nôtre (marquage de 24 h) avec la digestion par la chymotrypsine immobilisée

Deux digestions du substrat CA-FAM (marquée pendant 1 h ou pendant 24 h) $1,0 \times 10^{-6}$ M ont été réalisées à 37 °C pendant 4 h à l'aide de GACT. Les solutions à digérer ont été préparées de la façon suivante : dans une fiole de 500 μL , 20 μL d'échantillon $1,0 \times 10^{-5}$ M, suivi de 165 μL de tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80 et de 15 μL d'une suspension de la GACT 3,1 mg/mL ont été ajoutés à l'aide d'une micropipette pour obtenir une solution de 200 μL à une concentration finale de $1,0 \times 10^{-6}$ M. Après 4 h de digestion, leur digestat a été centrifugé et leur surnageant a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF au même moment que ceux de la digestion par la chymotrypsine libre (voir partie 2.7.1.1 (ii)).

2.7.2.8 Digestion du substrat INB-FAM par GACT

Une solution de 200 μL d'INB-FAM $1,0 \times 10^{-6}$ M (dans le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80) a été digéré par GACT (2 μL , 0,31 mg/mL, INB:CT = 1:2,7) à 37 °C pendant 4 h. Après 4 h de digestion, un volume de 20 μL de digestat a été prélevé pour l'analyse par CE-LIF en même temps que celui obtenu par la chymotrypsine libre (voir la partie 2.7.1.1 (iii)).

2.8 Cartographies peptidiques par CE

Cette partie traite des analyses par CE, elle inclut deux parties principales dont l'une est l'électrophérogramme de la protéine marquée par CE et l'autre est la cartographie peptidique par CE.

2.8.1 Instruments

Il y avait deux instruments CE employés au cours de cette étude : le HP^{3D}CE™ d'Agilent Technologies et le P/ACE™ MDQ de Beckman Coulter. L'Agilent CE était muni d'un détecteur à barrette de diodes (PDA) et le capillaire installé avait une longueur totale de 48,5 cm, une longueur de détection de 40,0 cm et un diamètre interne (ID) de 50 µm. Il pouvait être couplé au détecteur LIF de Picometrics Ltée. muni d'un laser diode de 410 nm. Le logiciel ChemStation™ d'Agilent Technologies a permis le contrôle de l'instrument CE et l'acquisition/traitement des données. Dans cette étude, le détecteur PDA était utilisé pour analyser la LACT-NDA par absorption UV. Le Beckman CE était muni d'un détecteur PDA, d'un détecteur d'absorption UV à longueur d'onde variable, et d'un détecteur LIF ayant un laser Ar⁺ à 488 nm et les filtres d'émission permettant de mesurer la fluorescence à 520 nm. Le logiciel 32 Karat™ de Beckman-Coulter a permis le contrôle de l'instrument et l'acquisition/traitement des données. Le capillaire installé dans le Beckman CE avait une longueur totale de 60,0 cm, une longueur de détection de 49,8 cm et un ID de 50 µm. Cet instrument a été utilisé pour analyser la CA et son marquage en employant les détecteurs UV et LIF.

2.8.2 Électrophérogramme de protéine marquée par CE

Dans les analyses par CE, une fenêtre de détection (~3 mm) a été faite en brûlant la couche de polyimide. De plus, un nouveau capillaire était toujours conditionné avec une solution de NaOH 1,0 M pendant 30 min, puis lavé avec le tampon pendant 20 min, puis l'eau déionisée pendant 5 min et séché à l'air afin d'être employé le lendemain.

(i) Lactalbumine-NDA

Une solution de 20 μL de LACT-NDA brute $3,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ a été analysée par l'Agilent CE. Les conditions d'analyses étaient les suivantes : tampon borate 0,15 M pH 8,22, détection UV 200 nm, voltage de +20 kV, $E = 412 \text{ V/cm}$, $I = 128 \mu\text{A}$, pression d'injection de 50 mbar et temps d'injection de 3 s, donc le volume injecté était de 5 nL.

(ii) Anhydrase carbonique-FITC

Une solution de 20 μL de CA $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, une solution de 20 μL de CA-FITC brute $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ et une solution de 20 μL de CA-FITC $1,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ ont été analysées par le Beckman CE dans une même séquence. Leur séparation a été réalisée à 24 kV dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28 en utilisant la détection UV à 200 nm. Leur injection a été effectuée en appliquant une pression de 0,5 psi durant 20 s, correspondant à un volume injecté de 18 nL.

Deux autres séparations de CA-FITC ($1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$) brute et purifiée ont été réalisées à 30 kV dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 en utilisant la détection LIF. L'injection a été faite en appliquant une pression de 0,5 psi pendant 10 s (9 nL injectés).

(iii) Anhydrase carbonique-FAM

En suivant le protocole précédent, les échantillons de CA ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) et ceux de CA-FAM brute ($2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) et purifiée ($1,8 \times 10^{-5} \text{ M}$) ont été analysés par CE-UV. Les échantillons de CA-FAM ($1,0 \times 10^{-7} \text{ M}$) bruts et purifiés ont été analysés par CE-LIF.

2.8.3 Cartographie peptidique par CE

2.8.3.1 Détection par absorption UV

Une solution de 20 μL de LACT-NDA $4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$ digérée par la chymotrypsine libre et une solution du blanc de digestion ont été analysés par l'Agilent CE à 20 kV ($E = 412 \text{ V/cm}$) dans un tampon borate 0,15 M pH 8,22. La pression d'injection était de 50 mbar et le temps d'injection était de 3 s (5 nL injectés).

2.8.3.2 Détection par LIF

À cause de la panne du détecteur LIF de Picometrics (excitation à 410 nm) couplé à l'Agilent CE, la LACT-NDA n'a jamais été analysée par CE-LIF. Donc, les échantillons analysés par CE-LIF étaient ceux marqués avec la FITC et avec le FAMSE, y compris la CA-FITC brute, purifiée et digérée, la D-Phe-FAM, l'INB-FAM digérée et la CA-FAM brute, purifiée et digérée.

(i) Effet des paramètres d'analyse par CE-LIF

Les essais du choix des paramètres de séparation ont été effectués à 24 kV (sauf pour le choix du voltage pour la séparation) avec un volume injecté de 9 nL (10 s, 0,5 psi). La concentration, le pH et la composition du tampon sont les paramètres étudiés. Le volume d'échantillon (duquel les injections ont été faites) pour les analyses était toujours de 20 µL.

Concentration du tampon de séparation

La CA-FAM $9,8 \times 10^{-7}$ M a été analysée dans le tampon phosphate pH 6,90 à $5,0 \times 10^{-2}$ M et 0,10 M pour évaluer l'effet de la concentration du tampon (*i.e.* sa force ionique) sur électrophérogramme.

pH du tampon de séparation

La CA-FAM $9,8 \times 10^{-7}$ M a été analysée dans le tampon phosphate 0,10 M à pH 6,90, 7,20 et 7,50, et aussi que dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28 pour évaluer l'effet du pH du tampon sur l'électrophérogramme.

Effet du mode d'injection

La CA-FAM $9,8 \times 10^{-7}$ M a été analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 avec une injection par électromigration à 10 kV pendant 5 et 10 s ainsi qu'à 5 kV pendant 25 s pour évaluer l'effet du mode d'injection sur l'électrophérogramme.

Effet du potentiel de séparation

Pour évaluer l'effet du voltage de séparation sur électrophérogramme, l'analyse de la CA-FAM $9,8 \times 10^{-7}$ M a été effectuée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 à 20, 22, 24, 26, 28 et 30 kV.

(ii) Méthode d'analyse

Les paramètres pour la méthode d'analyse présentés dans le tableau A-1 (en annexe) ont été utilisés avec le Beckman CE lors de cette étude. Les conditions d'analyse étaient comme suit : 1) Injection hydrostatique : $p = 0,5$ psi, $t = 10$ s, $V_{inj} = 9$ nL; 2) Tampon de séparation : phosphate 0,10 M pH 6,90 ($I = 0,60$ M); 3) Voltage : $V = 30$ kV, $I = 142$ μ A; 5) Capillaire : $L_t = 60,0$ cm, $L_d = 49,8$ cm, $ID = 50$ μ m; 6) Excitation : 488 nm; Émission : 520 nm.

(iii) Procédure générale de séparation

La procédure générale de séparation suivait les étapes suivantes : a) Les fioles ont été remplies avec un tampon de séparation (phosphate de sodium 0,10 M pH 6,90), l'eau déionisée, une solution de NaOH 0,10 M et du MeOH; b) Un volume de 20 μ L d'échantillon à analyser a été prélevé (*i.e.* du mélange de marquage, de digestion, etc.) et versé dans une fiole d'échantillon (les prélèvements des échantillons sont décrits respectivement dans chacune des parties précédentes). c) Le tampon de séparation et les échantillons à analyser ont été dégazés avec un bain à ultrasons. d) Toutes les fioles au-dessus ont été mises dans le plateau de fioles selon le programme d'analyse et ensuite placées dans le Beckman CE pour démarrage.

Un sommaire de toutes les combinaisons d'étude est présenté dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 Sommaire des méthodes étudiées en fonction du substrat

Substrat ^a	Fluorophore ^b	Avant digestion	Méthode de digestion ^c							Méthode d'analyse ^d
			Enzymes libres			Enzymes immobilisées				
			T	CT	PEP	GAT	GACT	GELCT	GELPEP	
LACT	NDA	✓								Fluor., Abs.
		✓		✓						CE-UV
CA	FITC	✓								Fluor., Abs.
		✓								CE-UV
		✓		✓		✓	✓	✓		CE-LIF
	FAMSE	✓								Fluor., Abs. TOF-MS
		✓								CE-UV
		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	CE-LIF
INB	FAMSE		✓	✓			✓		CE-LIF	
Phe	FAMSE	✓							CE-LIF	

^a LACT : l' α -lactalbumine, CA : l'anhydrase carbonique; INB : l'insuline chaîne B; Phe : D-phenylalanine.

^b NDA : le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde; FITC : la fluorescéine-5-isothiocyanate; FAMSE le 6-carboxyfluorescéine N-succinimidyl.

^c T : la trypsine; C : la chymotrypsine; PEP : la pepsine; GAT : la trypsine réticulé avec le glutaraldéhyde; GACT : la chymotrypsine réticulé avec le glutaraldéhyde; GELCT; la chymotrypsine immobilisée sur les billes d'agarose; GELPEP; la pepsine immobilisés sur les billes d'agarose.

^d Fluor : la fluorescences moléculaire; Abs : l'absorbance moléculaire dans l'UV/Vis; CE-UV : l'électrophorèse capillaire avec détection par absorbance UV; CE-LIF : l'électrophorèse capillaire avec détection par la fluorescence induite par laser; TOF-MS : le temps d'envol spectrométrie de masse.

3. Résultats et Discussion

Cette partie présente les résultats obtenus au cours de cette étude et comprend 5 parties : 1) Préparation et caractérisation des substrats protéiques marqués; 2) Immobilisation des enzymes; 3) Digestion et cartographie peptidique des dérivés NDA; 4) Digestion et cartographie peptidique des dérivés FITC; 5) Digestion et cartographie peptidique des dérivés FAM.

3.1 Préparation et caractérisation des substrats protéiques marqués

Dans cette partie, les résultats suivants sont discutés : les spectres de fluorescence des substrats marqués (LACT-NDA et CA-FAM), le spectre de masse de CA et CA-FAM, les spectres d'absorption et les électrophérogrammes des protéines marquées et l'étude de stabilité de D-Phe-FAM.

3.1.1 *Lactalbumine-NDA*

3.1.1.1 *Marquage avec le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA)*

Le NDA est très sensible aux nucléophiles. En fait, Montigny *et al.* ont constaté que le pH optimal du tampon est de 9,5 pour le marquage de l'amine avec le NDA [34]. Nous avons donc préparé une solution de protéine à pH 9,5 avant l'ajout du KCN.

Quant à son type, le borate de sodium est le plus souvent cité dans la littérature [34, 35, 57, 60, 61]. Cependant, nous avons trouvé que l'échantillon brut venant du tampon NaHCO₃ a donné moins de bruit de fond sur un électrophérogramme. Le NaHCO₃ a donc été choisi pour notre tampon. L'acétonitrile (ACN) est dite meilleur que le diméthylformamide (DMF) pour dissoudre le substrat marqué avec le NDA. L'ordre d'addition des réactifs est très important lors du marquage. Le CN⁻ est toujours ajouté dans la solution de protéine avant l'addition de NDA, afin de minimiser la probabilité de

condensation de benzoïne. Si le NDA est ajouté avant le CN⁻, la protéine n'est pas marquée [60, 62].

Il est connu que le marquage avec le NDA se produit rapidement. Donc, une durée de 20 min de réaction était suffisante. De plus, le ratio molaire CN⁻:NDA était de 1:1 au lieu d'avoir un excès de CN⁻ [35]. Dans ces conditions, le ratio molaire NDA:-NH₂ de 2:1 à 3:1 est favorable pour le marquage. Nous avons constaté qu'un ratio molaire élevé (>3:1) a causé davantage de produits secondaires. Montigny *et al.* ont indiqué que le dérivé, l'amine-NDA, était plus stable que l'amine-OPA ($t_{1/2} = 1,5$ h) [34]. En effet, il y avait moins de 10 % de dégradation d'amine-NDA après 10 h. Selon Manica *et al.*, une photodégradation de l'isoindole se fait rapidement soit dans les premières deux minutes et très lentement par la suite [63]. Le marquage a donc été fait à l'abri de la lumière.

Au début de notre étude, le substrat employé pour être marqué avec le NDA était l' α -lactalbumine (LACT). Cette dernière contient 142 résidus dont 12 lysines (K), une arginine (R), 8 cystéines (C), 6 phénylalanines (F), 4 tyrosines et 4 tryptophanes. Sa masse molaire est de 16427 Da et son point isoélectrique, pI est de 4,80. La LACT est une protéine globulaire ayant la structure primaire suivante:

MMSFVSLLLV ¹⁰	GILFHATQAE ²⁰	QLTKCEVFRE ³⁰	LKDLKGYGGV ⁴⁰
SLPEWVCTTF ⁵⁰	HTSGYDTQAI ⁶⁰	VQNNNSTEYG ⁷⁰	LFQINNKIWC ⁸⁰
KDDQNPSSN ⁹⁰	ICNISCDFL ¹⁰⁰	DDDLTDDIMC ¹¹⁰	VKKILDKVGI ¹²⁰
NYWLAHKALC ¹³⁰	SEKLDQWLCE ¹⁴⁰	KL	

3.1.1.2 Spectre de fluorescence

Le spectre de fluorescence de la LACT-NDA (fig. 3.1) a été effectué avec les paramètres utilisés pour le Picometrics, par exemple, excitation à 410 nm et émission à 480 nm). Cependant, la fig. 3.1 a montré que la longueur d'onde maximale d'excitation était de 420 nm et celle d'émission était de 490 nm. Ces valeurs sont en accord avec celles présentées par Zhang *et al.* [35, 64]. Cependant, la longueur d'onde maximale d'émission est très différente de celle trouvée par Ye *et al.*, qui ont rapporté une longueur d'onde

maximale d'émission de 540 nm pour l'albumine de sérum bovin marquée avec le NDA [37].

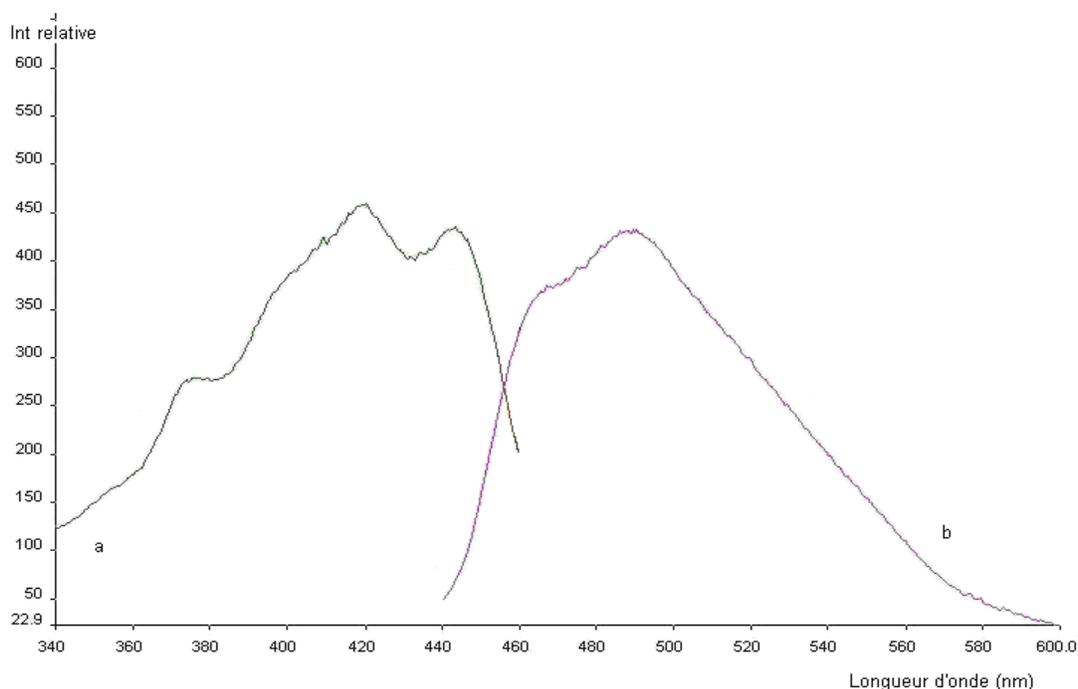


Figure 3.1 Les spectres fluorescents de la LACT-NDA. a) Spectre d'excitation émis à 480 nm; b) Spectre d'émission excité à 410 nm.

3.1.1.3 Électrophérogramme de la LACT-NDA brute par CE-UV

La fig. 3.2 montre l'injection du produit marqué avec le NDA avant les étapes de purification. Le grand pic ayant une largeur de demi hauteur ($W_{1/2}$) de 1,75 min entre 15 et 20 min est le produit marqué, soit la LACT-NDA. La largeur du pic est associée à la distribution des groupements amines modifiés. Cette distribution devrait aussi se refléter sur le temps de migration et le nombre de pic présent. En fait, un marquage multiple peut provoquer un changement de conformation de protéine. Ce qui influence les mobilités et cause différents temps de migration. Cependant, la technique CE ne peut pas séparer ces dérivés multiples. Surtout, pour une protéine ayant le même nombre de groupes amines modifiés, par exemple, une molécule de protéine ayant 13 groupes amines et ayant 5 fluorophores liés aura 1287 possibilités de structures moléculaires différentes mais toutes avec le même rapport de Z/Mr. La CE est impossible de résoudre. De même, Craig *et al.*

ont démontré que la largeur de pic augmentait avec le temps de réaction [65]. En plus, lorsque les résidus lysine sont marqués avec le NDA, ils deviennent neutres et hydrophobes. Alors, le marquage avec le NDA provoque un grand changement de propriétés physiques tel qu'une baisse de solubilité du substrat protéique, une variation de son point isoélectrique, une diminution de la mobilité de la protéine et une augmentation de la taille de molécule. Dans notre cas, les produits marqués avec de nombres différents de molécules de NDA ne pouvaient pas être séparés à pH 8,22.

Les résultats de digestion du substrat LACT-NDA sont présentés dans la section 3.3.

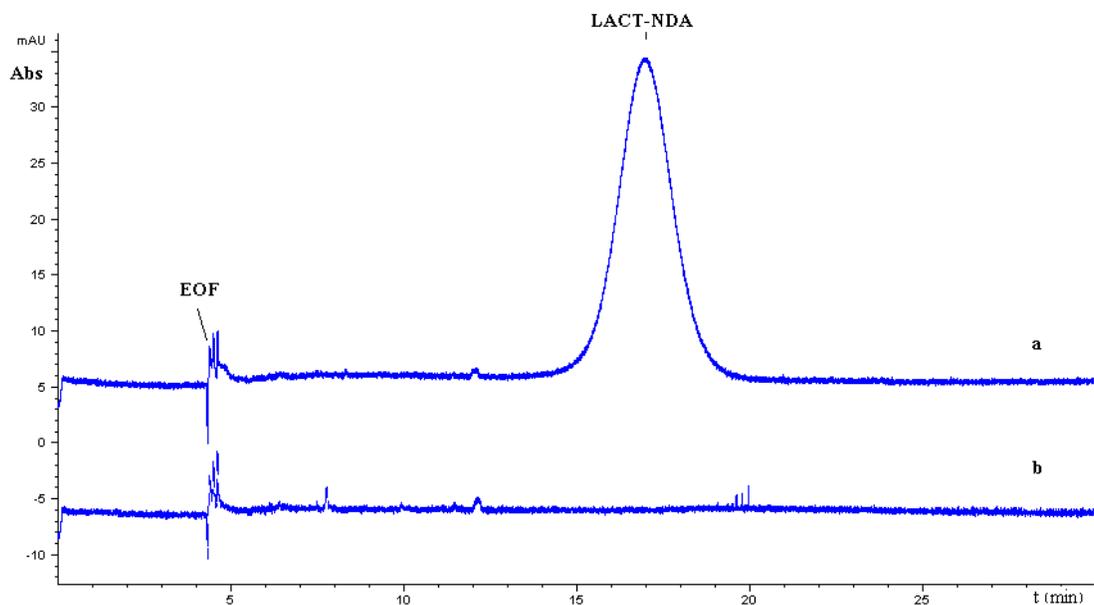


Figure 3.2 L'électrophérogramme de la LACT-NDA brute analysée dans un tampon borate 0,15 M pH 8,22. a) LACT-NDA brute, b) le blanc du marquage.

3.1.2 Anhydrase carbonique-FITC

3.1.2.1 Spectre de masse de l'anhydrase carbonique

L'anhydrase carbonique (CA) était le deuxième substrat protéique choisi pour notre étude. Elle est une métalloenzyme de zinc présente dans les animaux, les plantes et chez certains microorganismes. Elle permet de catalyser l'hydratation réversible du CO_2 en HCO_3^- (équation 3.1).



Plusieurs isoenzymes de CA sont produites dans différents organismes. La plus connue est le type II [66]. Elles sont constituées d'une chaîne polypeptidique unique d'environ 260 acides aminés et par un atome de zinc indispensable à leur activité catalytique. Leur masse molaire est d'environ 30 kDa. Dans notre étude, le substrat à marquer était la CA érythrocytaire bovine. Cette dernière est constituée de 259 acides aminés et sa structure primaire a été bien étudiée par Filippi-Poveau *et al.* et par Sciaky *et al.* [67, 68]. Elle compte 18 lysines et 9 arginines. Sa masse molaire est de 29024 Da et son amine terminale est méthylée. Sa séquence primaire est présentée ci-dessous.

Méthylé-SHHWGYGKHN¹⁰ GPEHWHKDFP²⁰ IANGERQSPV³⁰ DIDTKAVVQD⁴⁰
 PALKPLALVY⁵⁰ GEATSRMVN⁶⁰ NGHSEFNVEYD⁷⁰ DSQDKAVLKD⁸⁰
 GPLTGTYRLV⁹⁰ QHFHWGSSD¹⁰⁰ DQGSEHTVDR¹¹⁰ KKYAAELHLV¹²⁰
 HWNTKYGDFG¹³⁰ TAAQQPDGLA¹⁴⁰ VVGVLKVD¹⁵⁰ ANPALQKVLD¹⁶⁰
 ALDSIKTKGK¹⁷⁰ STDFPNFDPG¹⁸⁰ SLLPNVLDYW¹⁹⁰ TYPGSLTTPP²⁰⁰
 LLESVTWIVL²¹⁰ KEPISVSSQQ²²⁰ MLKFRTLNFN²³⁰ AEGPELLML²⁴⁰
 ANWRPAQPLK²⁵⁰ NRQVRGFPK²⁵⁹

Le produit fourni par Sigma contenait 6 composés dont la CA (29024,88 Da) était la plus abondante selon notre analyse par MS (tableau 3.1). Les cinq autres composants correspondaient à des traces d'impuretés provenant des fragments peptidiques qui ne pouvaient pas être enlevés pendant la procédure de purification de protéine. La pureté selon le fournisseur était de 98 %. La CE pouvait presque séparer la CA et ses cinq impuretés, ce qui est présenté plus loin à la fig. 3.5 (a).

Tableau 3.1 Résultat LC-MS de CA non modifiée (voir fig. A-5 → A-9 de l'annexe)

Temps de rétention (min)	6,017	6,017	5,431	5,306	6,017	5,8 à 9,7
Masse observée (Da)	12898,17	13810,86	15591,82	17129,4	19335,96	29024,88
Intensité relative	très faible	très faible	moyen	moyen	Faible	Forte
Identification ^a	frag-12898Da	frag-13811Da	frag-15592Da	frag-17129Da	frag-19336Da	CA

^a frag-12898Da à frag-19336Da : fragments d'impureté ayant des masses observées de 12898 à 19336 Da.

3.1.2.2 Marquage fluorescent avec la fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC)

La FITC est un fluorophore qui marque les groupements amines primaires. Elle est le fluorophore le plus fréquemment utilisé pour conjuguer des protéines. Konescni et Kilar ont constaté que la concentration minimale de transferrine qui a été utilisée dans la conjugaison et a donné une coloration satisfaisante avec un bon signal (la limite de marquage) était de 0,13 μ M et que la limite de détection de la transferrine-(FITC)_n par CE-LIF était de 0,13 nM [44]. Wu et Dovichi ont obtenu une limite de détection du niveau picomolaire [69]. Cependant, le marquage avec la FITC s'est toujours déroulé à une concentration élevée de réactif, car il est lent et dépend de la concentration en substrat. Le marquage de la protéine avec la FITC se produit aussitôt que la FITC est attaquée par le réactif nucléophile, soit la lysine ou l'amine terminale de la protéine, en formant un dérivé fluorescéine thiocarbonyl [48] (fig. 2.2).

Selon la revue de Brinkley, un tampon bicarbonate de sodium et un tampon borate (0,1 M pH 8,0-9,5) sont adéquats pour un marquage de groupements amines [30], mais on a obtenu que le premier tampon donnait un meilleur rendement [70, 71] et donc il est celui que nous avons choisi. La chimie de marquage est lente et a besoin d'une amine primaire déprotonée. C'est pourquoi le marquage avec la FITC doit être effectué à haut pH (*i.e.* >9).

Théoriquement, plus le pH est élevé, plus la proportion de lysine déprotonée est élevée, donc plus le marquage est favorable. Selon Lau *et al.* la vitesse de réaction est d'ordre secondaire à l'amine et à la FITC [38]. Cependant, l'hydrolyse de la FITC est catalysée en milieu basique (fig. 3.3). Un compromis permettant de satisfaire la vitesse de réaction tout en minimisant l'hydrolyse de la FITC a été obtenu à pH 9-9,5. D'ailleurs, la constante de marquage de l'amine (k_D) et celle de l'hydrolyse de la FITC (K_H) sont assez similaires. À pH 9, la concentration d' OH^- est de 10^{-5} M. Pour une amine de 10^{-6} M, l'hydrolyse de la FITC devient un mécanisme dominant de la déplétion de la FITC [38]. Notre compromis de pH a donc été choisi à 9,30 avec un tampon bicarbonate de sodium 0,10 M.

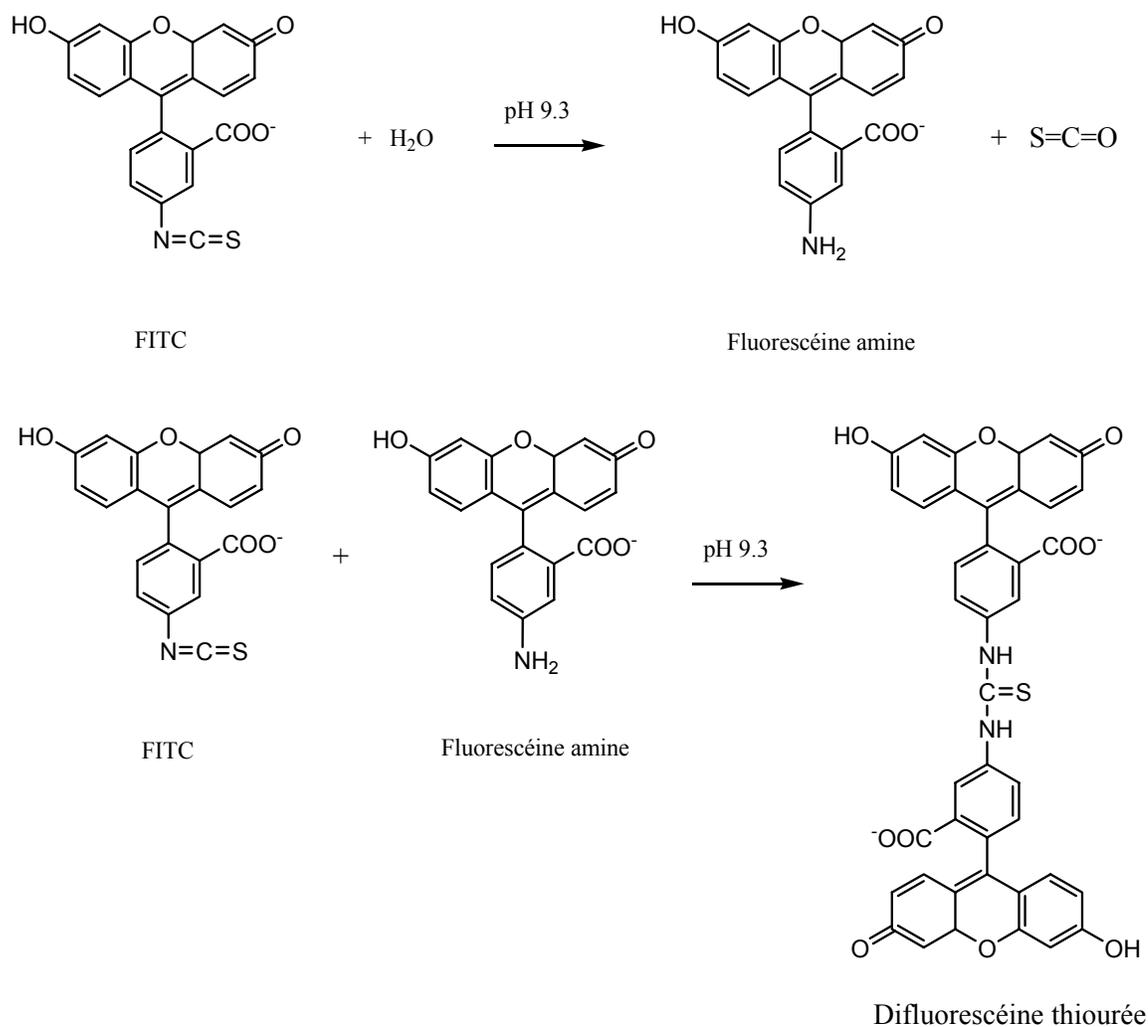


Figure 3.3 Réaction d'hydrolyse de la FITC en solution basique donnant les produits secondaires suivants : la fluorescéine amine et la difluorescéine thiourée.

Selon Konecsni et Kilar, le rendement de marquage est proportionnel à la concentration de substrats et de fluorophores [44]. Donc, pour augmenter la sensibilité de la méthode, une solution plus concentrée a été choisie pour les deux. La concentration finale du substrat était de 5,0 mg/mL (CA $1,7 \times 10^{-4}$ M) et celle du fluorophore (soit FAMSE ou soit FITC) était de $7,4 \times 10^{-3}$ M dans le mélange de marquage. Même si Lau *et al.* ont montré que la limite de marquage était de 10^{-9} M [38], la concentration adéquate pour un marquage de protéines était de 1~5 mg/mL généralement afin d'augmenter le rendement de produits [30]. Lorsque la concentration de substrat est de $1,3 \times 10^{-7}$ M, le marquage est satisfaisant et

donne un bon signal [44]. La limite de concentration pour le marquage n'était pas déterminée dans cette étude parce qu'elle ne faisait pas partie de l'objectif. Le ratio molaire fluorophore à protéine est un autre facteur qui affecte le rendement de marquage et l'augmentation du ratio molaire fluorophore/protéine peut améliorer le rendement du dérivé. Cependant, nous avons observé que les groupements amines n'étaient pas marqués complètement avec un grand excès de fluorophore. Ce phénomène est principalement dû à la complexité de la structure de la protéine où un résidu voisin à une lysine pouvant nuire au marquage complet ou modifier la réactivité de l'amine primaire impliquée [72]. En plus, un grand excès de fluorophore produit plus de produits secondaires qui causent des problèmes dans la procédure de purification par SEC. Alors, le compromis du ratio molaire fluorophore/-NH₂ a été obtenu entre 1,5/1 et 2,5/1 (mol/mol). Dans notre cas, le ratio molaire fluorophore/-NH₂ utilisé était donc de 2,4/1 (mol/mol). Ceci correspond à un rapport de 43:1 fluorophore: protéine pour le CA qui a 18 groupements de lysine.

Quant au temps de réaction, selon Dabek-Zlotorzynska *et al.*, le marquage avec la FITC donnait un meilleur rendement pendant 24 h à 21 °C [71]. Molina et Silva ont constaté que le marquage avec la DTAF (5-(4,6-dichlorotriazinylamino) fluorescéine), qui est un analogue du FAMSE, donnait un rendement maximal pendant 2 h de réaction [70]. Dans notre cas, une durée de réaction de 24 h a été choisie.

3.1.2.3 Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption de la CA-FITC est présenté dans la fig. 3.4. L'absorption de la lumière UV autour de 280 nm est une caractéristique de la protéine (voir fig. A-4). Dans notre cas, le maximum se situe à 274 nm. Elle est renforcée grâce à la conjugaison de la CA avec la FITC. La structure de la fluorescéine thiocarbonyl (fig. 2.2) est un grand système conjugué ayant quatre cycles aromatiques. Ces dernières absorbent la lumière bleu-vert (480-490 nm) et donnent la couleur orange. Deux absorptions caractéristiques de la CA-FITC se trouvent à 458 nm et 482 nm. Alors, la CA-FITC peut être excitée à 488 nm (laser à argon ionisé) en produisant une fluorescence verte.

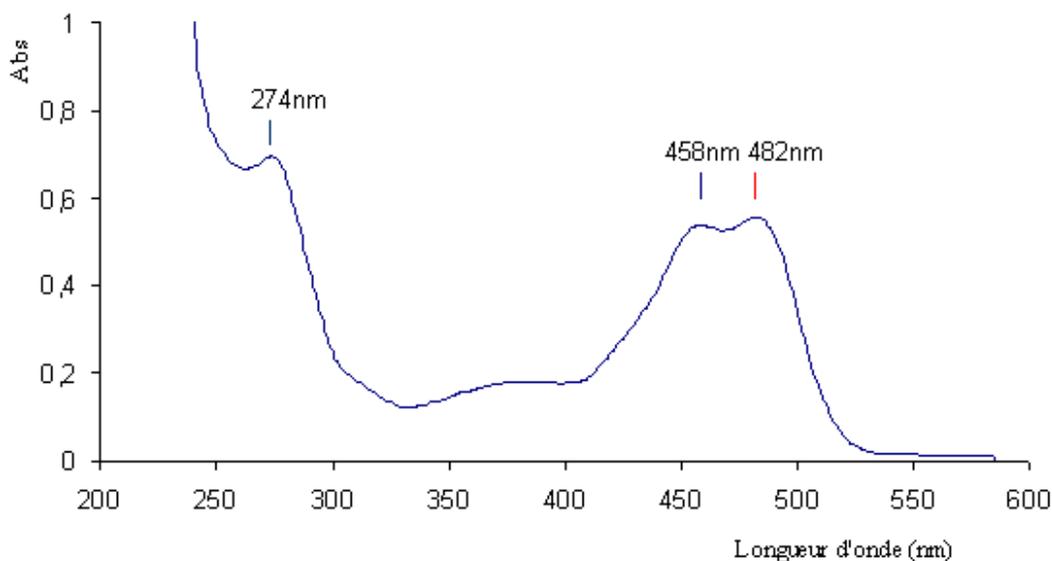


Figure 3.4 Spectre d'absorption de la CA-FITC.

3.1.2.4 Électrophérogramme par CE-UV

L'analyse CE-UV de CA et CA-FITC a été faite pour une quantité injectée de 10 ng dans 18 nL (fig. 3.5). L'électrophérogramme de la CA (fig. 3.5a) montre que la CA et les impuretés migrent après le flux électroosmotique (EOF, à 4.01 min) dans un tampon borate pH 9,28. En effet, le pI de la CA est de 6,40 et donc la CA (pic à 4,61 min) possède une charge négative à pH 9,28. Dans notre cas, les impuretés sont aussi chargées négativement et elles sont observées dans l'électrophérogramme (fig. 3.5a) à 4,69, 4,74, 4,80, 4,86 et 4,92 min. Ceci répond aux résultats du spectre MS de la CA. Selon l'intensité relative du signal MS (tableau 3.1), les trois pics électrophorétiques les plus intenses qui sont à 4,74, 4,80 et 4,92 min, correspondent fort probablement aux fragments impurs ayant des masses molaires respectives de 15591,82, 17129,40 et 19335,96 Da. Les deux pics à faibles intensités aux temps 4,86 et 4,92 min pourraient être des impuretés de 12898,17 et 13810,86 Da.

Un blanc de la réaction de marquage avec la FITC (*e.g.* CA absente) a montré plusieurs pics secondaires ayant des charges négatives ainsi qu'un grand pic neutre

(électrophérogramme non montré) permettant d'identifier les produits secondaires dans la fig. 3.5b.

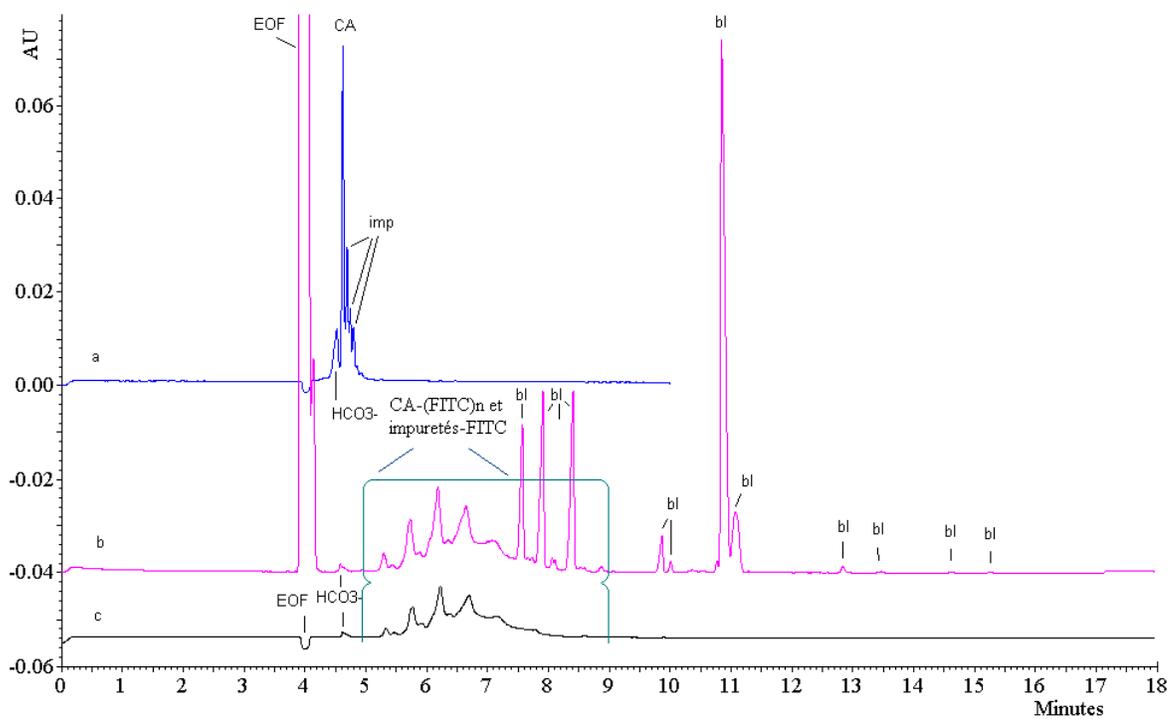


Figure 3.5 Analyse par CE-UV. Électrophérogrammes analysés dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. a) CA; b) CA-FITC brute, FITC en excès; c) CA-FITC purifiée par SEC; (où bl = pic venant du blanc; Imp = impureté; EOF = composés neutres; HCO_3^- est un constituant du tampon de marquage).

Selon la fig. 2.2, lorsqu'une protéine est marquée avec un équivalent de FITC, elle acquiert une charge de $\Delta q = -1$. Lorsqu'elle est marquée avec n équivalents de FITC, elle devient chargée par $\Delta q = -n$. Alors, dû à la présence des produits marqués avec différents nombres de fluorophores, l'ordre de sortie sera : la protéine-(FITC)₁, la protéine-(FITC)₂, la protéine-(FITC)₃...la protéine-(FITC)_n. Banks et Paquette ont séparé la myoglobine-(FITC)₁ jusqu'à la myoglobine-(FITC)₈ [48]. Dans notre cas, le marquage a été fait avec un ratio molaire de 43:1 (fluorophore:protéine) pendant 24 h au lieu de 10:1 pendant 1 h dans le cas de Banks et Paquette [48] et nous avons vu sept pics au lieu de huit pics. Il est difficile de déterminer si le nombre de pic est associé aux impuretés dérivées ou à la distribution du nombre de FITC ajouté à la CA dans notre cas puisque les impuretés ayant

une masse molaire supérieure à 3 kDa n'ont pas été enlevées par une colonne d'ultrafiltration Centricon[®] YM-3. Les pics entre 5 à 9 min de l'électrophérogramme de la fig. 3.5c sont les dérivés multiples, CA-(FITC)_n, et les impuretés-FITC. L'allure d'électrophérogramme de CA-FITC et de CA-FAM est très différente (voir fig. 3.5c et fig.3.12c). Ceci révèle que la sélectivité de réaction de marquage avec la FITC et avec le FAMSE est vraiment différente. En effet, l'activité chimique de FITC est plus faible que celle de FAMSE. La sélectivité de FITC est donc plus élevée que celle de FAMSE [39, 48]. C'est pour cette raison qu'on peut voir 5 pics plus élevés dans la fig. 3.5c.

Les trois électrophérogrammes (fig. 3.5a-c) représentent la même concentration théorique de CA ($2,0 \times 10^{-5}$ M). Cependant, on remarque que l'aire des pics de la CA-FITC de la fig. 3.5c est inférieure à celle de la fig. 3.5b, ceci est causé par une perte de produits lors de la purification par SEC suivie de l'ultrafiltration. Plusieurs facteurs dont l'un est l'adsorption sur la membrane YM-3 causent possiblement la perte de produits lors de la séparation/purification. Nous avons déterminé le rendement de la CA-FITC (*i.e.*, l'efficacité du processus de purification SEC/ultrafiltration) en faisant une comparaison de l'aire total en dessous d'électrophérogramme entre 5,1 et 8,9 min avant et après la purification. L'analyse a été faite en triplicata et le rendement en CA-FITC est de $(94 \pm 4) \%$ ($P = 0,95$, $t = 4,303$) avec un écart-type de 0,002. La perte de tous les produits n'est donc que de 2~10 %.

3.1.2.5 Électrophérogramme par CE-LIF

L'analyse CE-LIF de CA-FITC a été faite pour une quantité injectée de 26 pg dans 9 nL (fig. 3.6). Les électrophérogrammes d'une solution de $1,0 \times 10^{-7}$ M de CA-FITC (brute et purifiée) analysés par CE-LIF à pH 6,90 (fig. 3.6) ont une allure différente de ceux analysés à pH 9,28 par CE-UV (fig. 3.5). On ne voit qu'une bande pour la CA-FITC et les impuretés-FITC pourtant claire et très différente. Cette bande ressemble à celle de la transferrine-FITC analysée par Konecni et Kilar [44]. Les dérivés qui correspondent à différents nombres de FITC ajoutés ne sont pas séparés à pH 6,90 dans le tampon phosphate 0,10 M. Par contre, ils peuvent être séparés à pH 9,28 dans un tampon borate 0,10 M selon Banks et Paquette [48]. Cependant, les peptides-FITC ne sont pas bien

séparées à 9,28, mais bien séparées à pH 6,90 (voir la section 3.5.1.1). La fig. 3.6b montre que les pics de produits secondaires (marqué «bl») sont dominants avant la purification par SEC/ultrafiltration. Cependant, ils sont enlevés par la purification. Il faut aussi rappeler que la détection par LIF est beaucoup plus sensible que la détection par absorption UV-Vis et donc les pics du blanc, qui sont fluorescents, ont des intensités élevées.

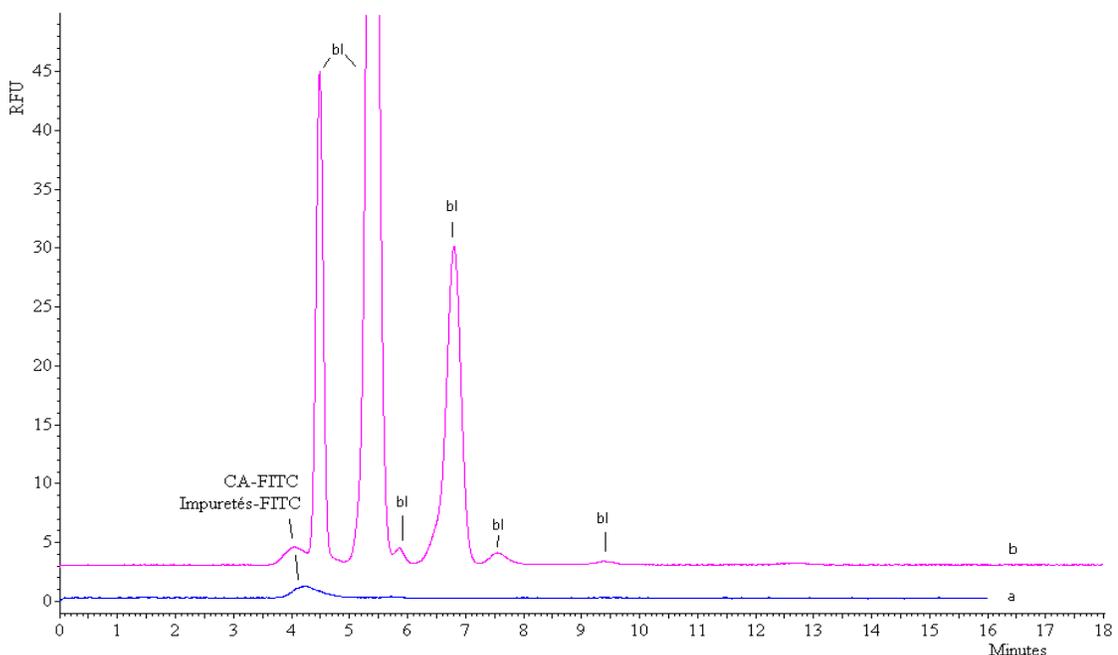


Figure 3.6 Analyse par CE-LIF. Électrophérogramme de la CA-FITC avant et après la purification par SEC/ultrafiltration, analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FITC brute; b) CA-FITC purifiée. (où bl = pic venant du blanc, NaHCO_3 -FITC).

3.1.3 Anhydrase carbonique-FAM

3.1.3.1 Marquage fluorescent avec l'ester de 6-carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE)

Banks et Paquette ont constaté que le substrat marqué avec le FAMSE était plus stable que celui marqué avec la FITC [39]. Étant donné que l'hydrolyse de FAMSE est catalysée par OH^- (fig. 3.7), le rendement de marquage décroît lorsque le pH est supérieur à 9,0 selon Becker *et al.* [73]. En conséquence, un compromis sur les conditions expérimentales pour

minimiser l'hydrolyse de FAMSE a été trouvé à pH 9 à 9,5 [38]. Cependant, plusieurs auteurs ont constaté qu'un pH de 8,50 était suffisant pour le marquage avec le FAMSE [30, 39, 70], car ce dernier était plus sensible à l'eau à pH élevé. Même à ce pH, où il y a ~90 % des groupements amines de la lysine de CA chargés positivement (*i.e.* $pK_{a,lysine} \sim 10$), l'ajout de FAMSE semble avoir provoqué immédiatement un déplacement de l'équilibre acide-base dans le sens de la déprotonation de la lysine. En effet, nous avons vu un niveau assez élevé de marquage de la CA. D'ailleurs, l'effet de cage de solvant garde l'activité de FAMSE. En plus, le ratio molaire de FAMSE sur amine (FAMSE/-NH₂) est 2,4/1(mol/mol) et la concentration de FAMSE au départ est assez élevée (10⁻⁴ M). Ceci permet le marquage avec le FAMSE de se réaliser facilement.

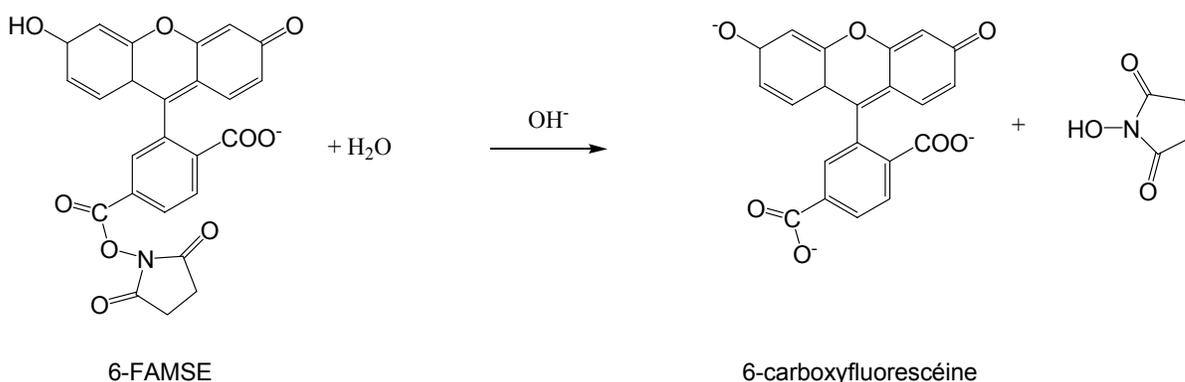


Figure 3.7 Réaction de l'hydrolyse de FAMSE en solution basique donnant le produit secondaire : la carboxyfluorescéine.

3.1.3.2 Spectre d'absorption

Le 5(6)-FAMSE est un mélange d'isomères de 5-FAMSE et 6-FAMSE. Leurs propriétés physiques sont similaires. Donc, le spectre d'absorption de 5(6)-FAMSE peut représenter celui de 6-FAMSE, ce dernier produit étant trop cher pour seulement mesurer un spectre d'absorption. La fig. 3.8 montre le spectre d'absorption de 5(6)-FAMSE où la bande caractéristique de FAMSE se trouve autour de 236 nm. La bande d'absorption maximale autour de 274 nm est une caractéristique des cycles aromatiques de FAMSE.

Entre 400 nm et 528 nm, il y a aussi un maximum à 460 nm. Cette absorption résulte de l'hydrolyse de FAMSE par des traces d'eau dans le DMSO. En effet, le fluorophore FAMSE est très sensible à l'eau (voir fig. A-2 spectre d'absorption de 5(6)-FAMSE dans l'eau après 2 min de préparation) et le DMSO absorbe facilement l'humidité de l'air.

Le mélange de marquage contient plusieurs produits tels que la CA-FAM, le FAM-H₂O et le FAM-NH₂OH. Aucune bande caractéristique n'est observée à cause de la superposition partielle de toutes les espèces du mélange ayant les différents sites de marquage (voir fig. 3.9). La fig. 3.9 ressemble beaucoup au spectre d'absorption du blanc (voir fig. A-3 en annexe). Cela indique qu'il y a beaucoup de produits secondaires provoqués par l'hydrolyse de FAMSE dans le mélange. En effet, un grand excès de FAMSE a été employé lors du marquage pour assurer un bon rendement de marquage de la protéine.

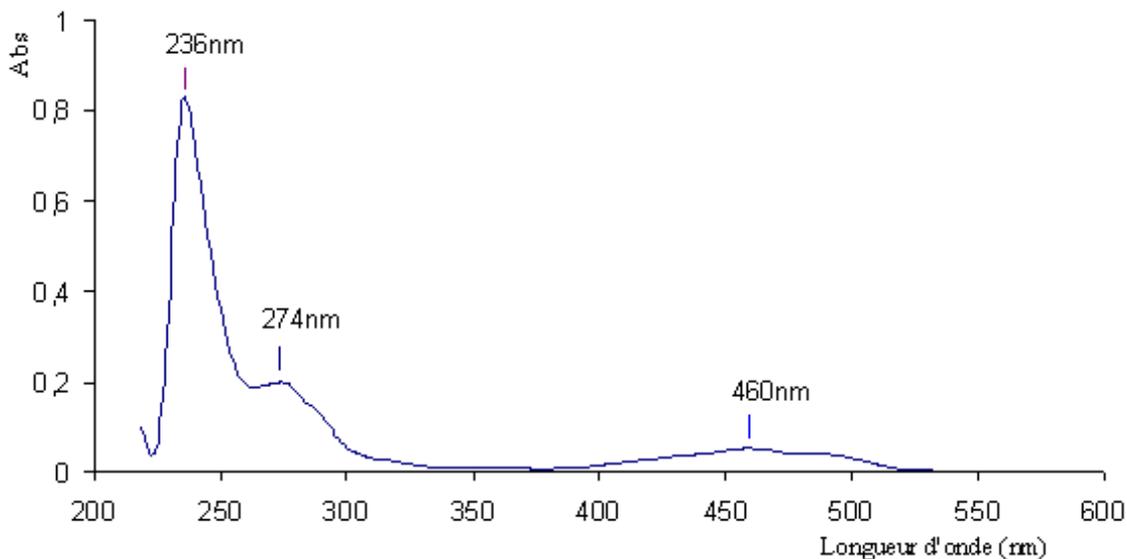


Figure 3.8 Spectre d'absorption de 5(6)-FAMSE ($2,0 \times 10^{-5}$ M) dans l'acétonitrile.

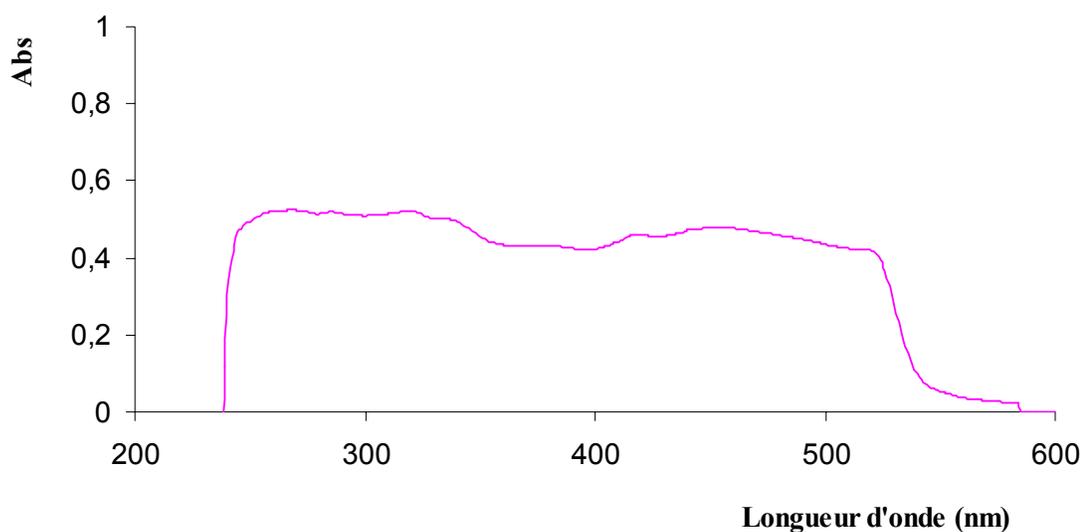


Figure 3.9 Spectre d'absorption de la CA-FAM brute.

Selon la fig. 3.10 (et la fig. A-2), le spectre d'absorption de la CA-FAM purifiée (fig. 3.10) est similaire à celui de FAMSE-H₂O lorsque la concentration de produit secondaire est faible (voir fig. A-2, le spectre d'absorption de 5(6)-FAM-H₂O mesuré après 2 min de préparation). Après avoir enlevé les produits secondaires, il y a deux pics caractéristiques dans la région de la lumière visible dont l'un est à 459 nm et l'autre à 483 nm (voir fig. 3.10). Ces deux pics représentent la transition $n \rightarrow \pi^*$. La longueur d'onde 488 nm du laser à argon ionisé peut donc être utilisée pour exciter des molécules de la CA-FAM afin qu'ils émettent de la fluorescence pour une analyse CE-LIF.

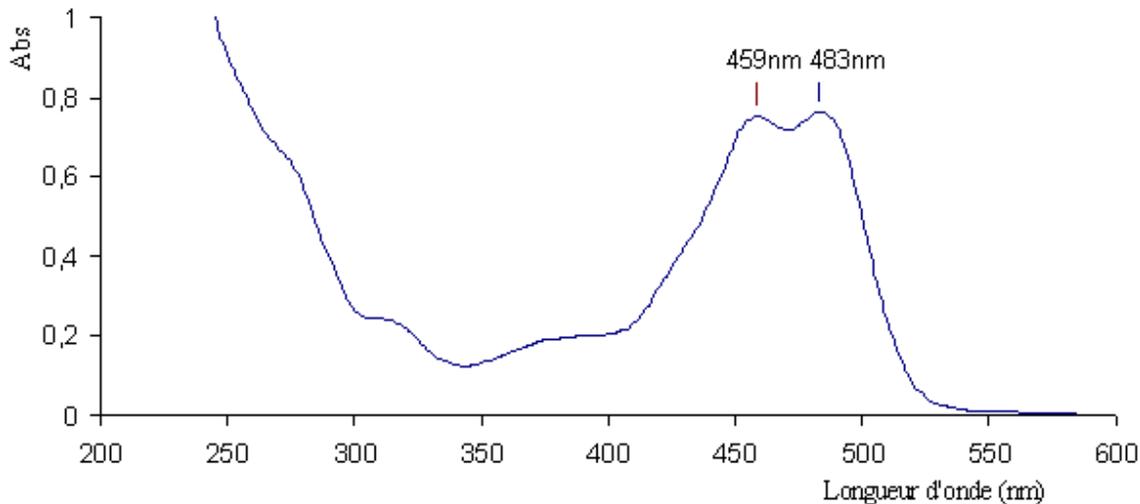


Figure 3.10 Spectre d'absorption de la CA-FAM purifiée.

3.1.3.3 Spectre de fluorescence

La fig. 3.11 présente un spectre de fluorescence de la CA-FAM et celui du blanc ($\text{NaHCO}_3\text{-FAM}$). Les échantillons ont été préparés dans une solution NaOH 0,10 M afin d'obtenir une intensité de fluorescence plus forte. En effet, lorsque le pH est supérieur à 11, le groupement -OH sur un cycle aromatique (pK_a 10,5) est hydrolysé et forme un oxygène chargé. Cette dernière étant un électro-donneur, elle renforce le rendement quantique de fluorescence [26]. Sur la fig. 3.11, on voit que la longueur d'onde maximale pour exciter la CA-FAM est de 495 nm (courbe a) et pour émettre la fluorescence, elle est à 519 nm (courbe b). Le P/ACETM MDQ CE Système couplé au Laser Module à 488 nm est donc adéquat pour ce composé.

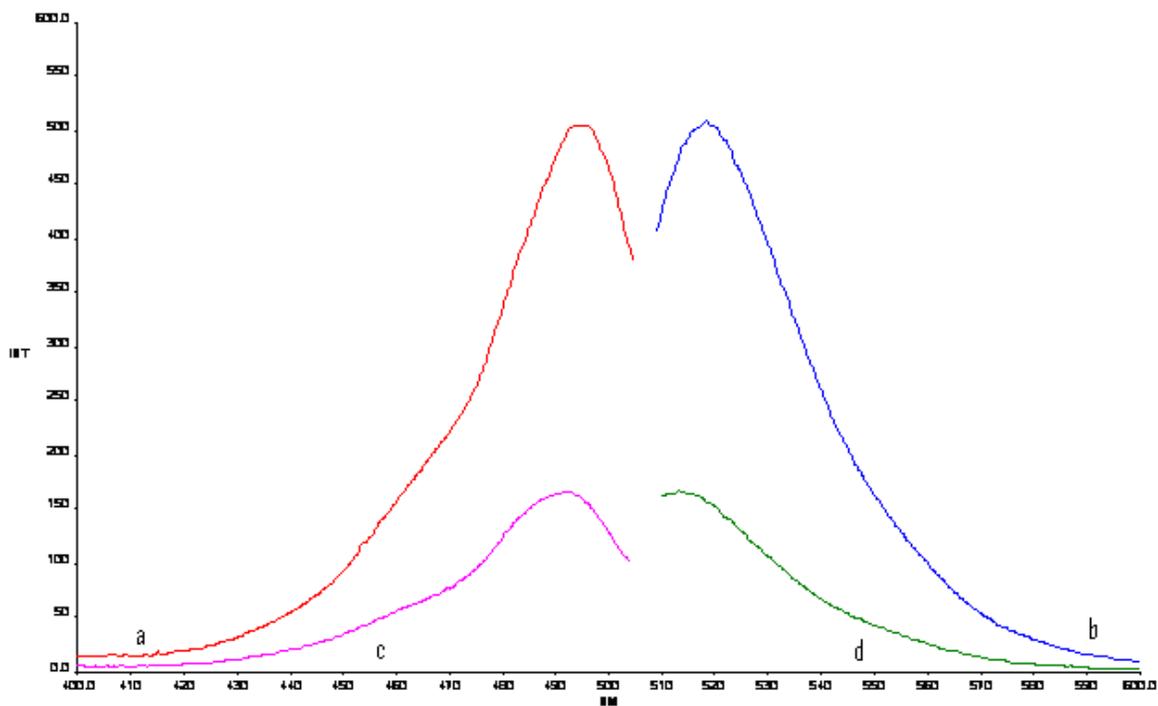


Figure 3.11 Spectre de fluorescence de la CA-FAM et du blanc (NaHCO₃-FAM) dans une solution NaOH 0,010 M. a) Spectre d'excitation de la CA-FAM; b) Spectre d'émission de la CA-FAM; c) Spectre d'excitation du blanc; d) Spectre d'émission du blanc.

3.1.3.4 Spectre de masse

Selon les résultats MS de la CA-FAM purifiée (tableau 3.2), la CA n'a pas été marquée à 100 % dans notre cas puisqu'il y a un signal observé à 29024 Da correspondant à la masse de CA. La concentration de CA non marquée doit être au moins inférieure ou égale à 10^{-9} M puisque Lau *et al.* ont constaté que la limite de marquage était de 10^{-9} M pour le marquage d'acide aminé avec le FAMSE [38]. Le rendement de marquage de CA avec le FAMSE pouvait atteindre plus de 99 % dans notre cas. Cependant, la limite réelle de marquage sera déterminée dans un travail futur. Les résultats MS de la CA-FAM révèlent aussi que le fluorophore ne marque pas seulement un site lorsqu'il y a 18 sites disponibles sur la chaîne peptidique de la CA. Ils soutiennent aussi l'opinion du groupe de Banks, qui mentionne qu'il est impossible de marquer tous les sites disponibles même avec un grand excès de chromophore. Ceci est principalement causé par la complexité de la structure du polypeptide où les résidus voisins peuvent causer un encombrement stérique ou changer la réactivité du groupement amine primaire [72]. C'est pourquoi, dans notre cas, on ne trouve pas les pics pour les dérivées de CA-(FAM)₁₄, CA-(FAM)₁₅, CA-(FAM)₁₆, CA-(FAM)₁₇ et CA-(FAM)₁₈ même si la CA a 18 sites possibles (18 lysines) de marquage. En réalité, la plupart des dérivés semblent faire partie de CA-(FAM)₃ à CA-(FAM)₁₁. Une très faible partie correspond à CA-(FAM)₁₂ et CA-(FAM)₁₃.

Tableau 3.2 Résultats MS pour la CA-FAM (voir figs. A-10 → A-23 de l'annexe)

Nombre du FAM (n)	CA-(FAM) _n ^a			frag-17129Da- (FAM) _n ^a			frag-15592Da-(FAM) _n ^a		
	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)	I	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)	I	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)	I
0	29024,88	29024,47	S	17129,40	N		15591,82	N	
1	29383,18	N		17487,70	N		15950,12	N	
2	29741,48	N		17846,00	N		16308,42	N	
3	30099,78	30099,53	S	18204,30	N		16666,72	16666,03	W
4	30458,08	30457,79	S	18562,60	N		17025,02	17024,70	S
5	30816,38	30816,09	S	18920,90	N		17383,32	17382,86	S
6	31174,68	31174,13	S	19279,20	19279,26	S	17741,62	17741,18	S
7	31532,98	31532,20	S	19637,50	N		18099,92	N	
8	31891,28	31890,49	S	19995,80	19995,8	S	18458,22	N	
9	32249,58	32248,84	S	20354,10	N		18816,52	N	
10	32607,88	32067,22	S	20712,40	N		19174,82	N	
11	32966,18	32965,06	S	21070,70	N		19533,12	N	
12	33324,48	33323,59	W	21429,00	N		19891,42	N	
13	33682,78	33678,02	W	21787,30	N		20249,72	N	
14	34041,08	N		22145,60	N		20608,02	N	
15	34399,38	N		22503,90	N		20966,32	N	
16	34757,68	N		22862,20	N		21324,62	N	
17	35115,98	N		23220,50	N		21682,92	N	
18	35474,28	N		23578,80	N		22041,22	N	

^a CA-(FAM)_n : CA marquée avec n molécules de FAMSE; frag-17129Da-nFAM : l'impureté ayant une masse molaire de 17129 Da marquée avec n molécules de FAMSE; frag-15592Da-(FAM)_n : l'impureté ayant une masse molaire de 15592 Da marquée avec n molécules de FAMSE; I : Intensité; N : non détecté; S : Forte; W : Faible.

Étant donné que l'ultrafiltration sur une membrane de YM-3 ne peut pas enlever des molécules ayant une masse molaire supérieure à 3 kDa, les impuretés ayant une masse molaire supérieure à 3 kDa ont été détectées telles que montrées dans le tableau 3.2. Parmi ces impuretés (voir tableau 3.1), la frag-12898 Da (impureté ayant une masse molaire de 12898 Da), la frag-13811Da (impureté ayant une masse molaire de 13811 Da) et la frag-19336 Da (impureté ayant une masse molaire de 19336 Da) ne sont pas marquées. Par

contre, la frag-17129Da est marquée avec 6 FAM et 8 FAM et la frag-15592 Da est marquée avec 3 FAM, 4 FAM, 5 FAM et 6 FAM. Ces impuretés sont donc des polypeptides ayant plusieurs lysines. Leurs présences dans nos échantillons n'affectent pas les cartes peptidiques parce que le pourcentage des impuretés est de 2 %. Alors, si la concentration de la CA pour la digestion est de $1,0 \times 10^{-7}$ M, celle des impuretés sera de 8,7 à $9,5 \times 10^{-10}$ M. Ceci est proche de la limite de détection par CE-LIF.

3.1.3.5 *Électrophérogrammes par CE-UV*

L'électrophérogramme de la CA est présenté dans le chapitre précédent (fig.3.5a). L'analyse CE-UV de CA et CA-FAM a été faite pour une quantité injectée de 10 ng dans 18 nL (fig. 3.12). Ayant plus de charge négative, la CA-(FAM)_n migre après la CA. Selon les résultats MS de la CA-FAM (tableau 3.2), il y a plusieurs fluorophores liés à la CA, allant de CA-(FAM)₃ à CA-(FAM)₁₃. Le marquage donne donc un mélange plus complexe de CA-FAM provenant de la distribution différente des n groupements FAM sur les 18 lysines de la CA. Cependant, notre méthode de séparation par CE ne peut pas toutes les séparer, c'est pourquoi on obtient une large bande irrégulière entre 6,1 à 9,5 min (fig. 3.12c). Cette bande est associée aux dérivés multiples, CA-(FAM)_n et les impuretés-FAM. Sur l'électrophérogramme de la fig. 3.12b, on ne voit plus le pic de la CA non dérivée. Cela indique que la concentration de la CA non dérivée restante après le marquage est en dessous de la limite de détection par UV même si la CA était encore détectée par MS (fig. A-13 en annexe). Il y a 10 pics attribués aux produits d'hydrolyse du FAMSE dans l'échantillon brut (fig. 3.12b, pics étiquetés bl). Cependant, ils sont enlevés par purification par SEC suivi de l'ultrafiltration sur membrane.

Sur la fig. 3.12 b et c, on remarque que l'aire de la bande de la CA-FAM est légèrement différente avant et après la purification. Cela est dû à une perte de produits lors de la purification. Plusieurs facteurs dont l'un est l'adsorption sur la membrane d'ultrafiltration causent la perte de la CA-FAM. Cette dernière a été déterminée au moyen de comparaison de l'aire totale en dessous de la bande de la CA-FAM avant et après la purification. Son résultat est de 4 à 8 % tel que présenté dans le tableau 3.3.

Il est important de souligner que toutes les analyses par CE-UV ont été faites pour une injection durant 20 s avec 0,5 psi ($V_{\text{injecté}} = 18 \text{ nL}$) tandis que celles par CE-LIF ont été faites pour une injection durant 10 s avec 0,5 psi ($V_{\text{injecté}} = 9 \text{ nL}$), sauf si indiqué autrement. Étant donné la haute limite de détection par CE-UV, nous avons préparé des échantillons de concentration plus élevée de CA, soit de $2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, pour les analyses par CE-UV. La quantité de CA injectée dans les analyses par CE-UV de la fig. 3.12 est 400 fois plus élevée que celle dans les analyses par CE-LIF de la fig. 3.13 (26 pg). Il faut aussi souligner que la concentration de CA pour le marquage était importante, soit de $3,44 \times 10^{-4} \text{ M}$. Cependant, dans nos études sur les enzymes immobilisées, les concentrations de CA et des peptides chymotrypsiques se situent au-dessous de la limite de détection par CE-UV. Liu *et al.* ont montré que la détectabilité de protéines par fluorescence détection était 2400-6200 fois meilleur que celle détecté par UV à 280 nm, 170-300 fois meilleur que celle détecté par UV à 214 nm et 150-420 fois meilleur que celle mesurée avec leur fluorescence native [74].

Tableau 3.3 Recouvrement de produit après la purification par SEC/ultrafiltration

Essai	1 ^e	2 ^e	3 ^e	Moyenne	Écart-type	Intervalle ^a
CA-FAM	94 %	96 %	96 %	96 %	1 %	93 %–99 %

^a Pour un niveau de confiance de $P = 0,95$; $t = 4,303$.

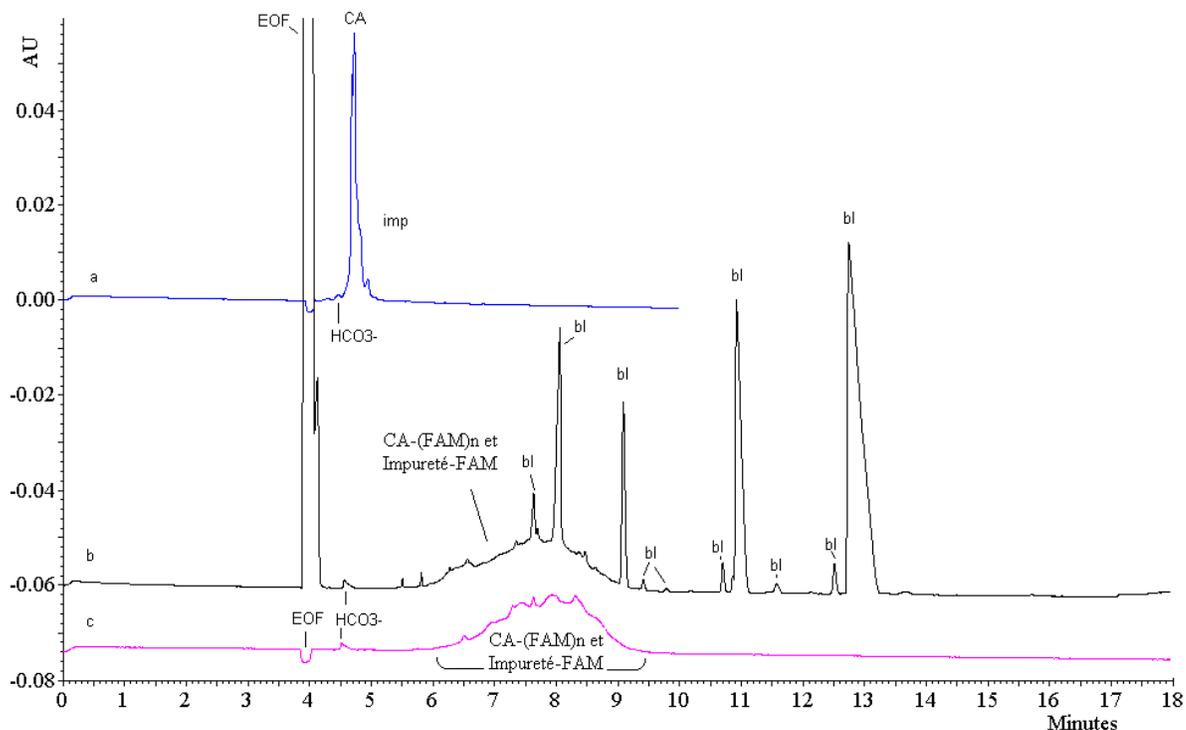


Figure 3.12 Électrophérogrammes CE-UV analysés dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. a) CA, b) CA-FAM brute; c) CA-FAM purifiée. (où bl est le pic venant du blanc; Imp : impureté; EOF : composé neutre; HCO_3^- : constituant du tampon de marquage, $C_{CA} = 2,0 \times 10^{-5}$ M.)

3.1.3.6 Électrophérogrammes par CE-LIF

L'analyse CE-LIF de CA-FAM a été faite pour une quantité injectée de 26 pg dans 9 nL (fig. 3.13). Elle permet de constater que l'échantillon purifié (fig. 3.13a), malgré le manque de résolution de ces dérivés, est assez propre pour faire une cartographie peptidique avec une basse concentration de substrat car les pics interférents (*i.e.* les produits secondaires qui éluent entre 7,7 et 20 min à la fig. 3.13b) sont enlevés par l'étape de purification. On remarque que l'allure du pic de la CA-FAM brute et purifiée est différente. En effet, l'échantillon brut contient le solvant organique, DMSO, qui peut diminuer l'intensité de la fluorescence et modifier le temps de migration. Au centre de l'électrophérogramme de la fig. 3.13a, il y a deux pics plus intenses à 8,4 et 9,0 min. Selon les résultats MS (voir fig. A-14), ces deux pics pourraient correspondre à la CA-(FAM)₇ et la CA-(FAM)₈. Cela veut dire que la plus grande population de dérivés est celle

représentant la moitié des 18 lysines de la CA sont marquées. Dans ce cas, les dérivés marqués avec différents nombre de groupements FAM ne sont pas résolus dans la séparation. Cependant, ils peuvent être mieux séparés dans un tampon phosphate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,90 (voir fig. A-28).

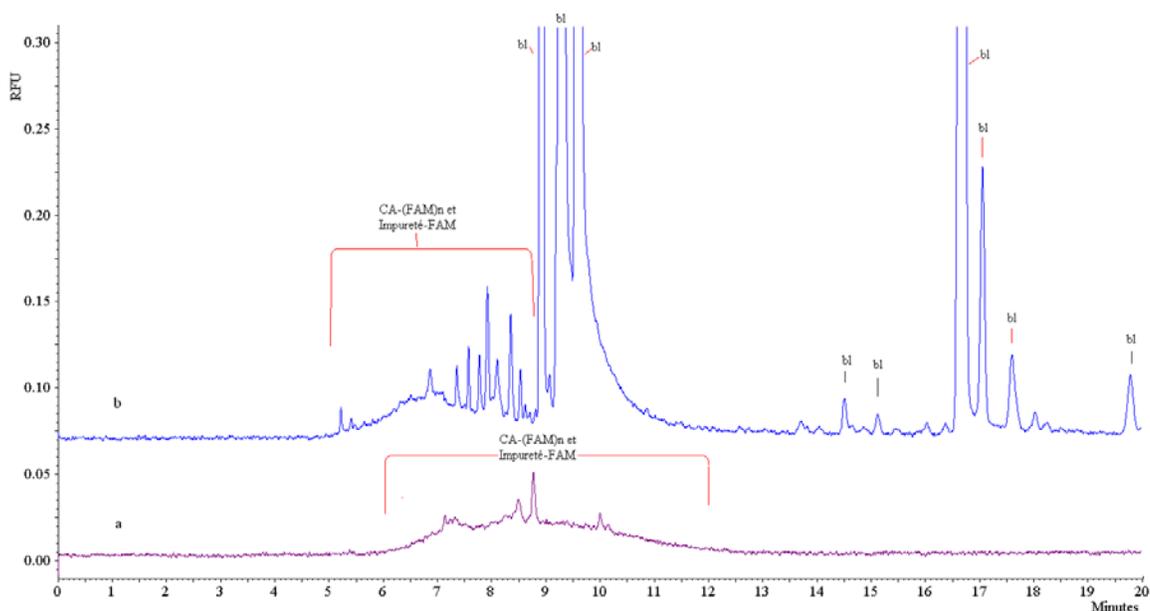


Figure 3.13 Électrophérogramme de la CA-FAM brute et purifiée analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FAM purifiée; b) CA-FAM brute. ($C_{CA} = 1,0 \times 10^{-7}$ M, bl : blanc)

3.1.4 D-phénylalanine-FAM

Le pKa du groupement α -amine de Phe est de 9,1. À pH 8,50, la conjugaison entre la D-Phe et le fluorophore FAMSE se réalise rapidement. L'étude de stabilité du dérivé D-Phe-FAM (fig. 3.14) montre que le rendement de marquage de D-Phe avec le 6-FAMSE atteint son maximum après 8 h de réaction. Après ce temps, l'intensité du pic (en RFU) commence à diminuer. Il est stable après 72 h de réaction. Le point à 24 h est anormal probablement à cause d'une erreur d'injection en CE. Un phénomène semblable a aussi été observé par Molina et Silva [70]. Banks et Paquette ont étudié les conjugaisons de trois marqueurs fluorescents, soit la FITC, le FAMSE et la DTAF (fluorescéine dichlorotriazine) avec la myoglobine et la L-lysine [39]. Ils ont constaté que le dérivé avec le FAMSE était

plus stable. Ils ont aussi montré que l'électrophérogramme du substrat marqué avec le FAMSE demeurerait inchangé lorsqu'il était incubé à 37 °C pendant 10 jours.

La limite de détection pour le marquage de D-Phe avec le FAMSE a été vérifiée au moyen d'analyses d'échantillons de marquages avec la D-Phe à $1,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-9}$ M et $1,0 \times 10^{-10}$ M. Le résultat montre que la limite est de $1,0 \times 10^{-9}$ M avec un rapport S/N de 2,2. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Lau *et al.* [38].

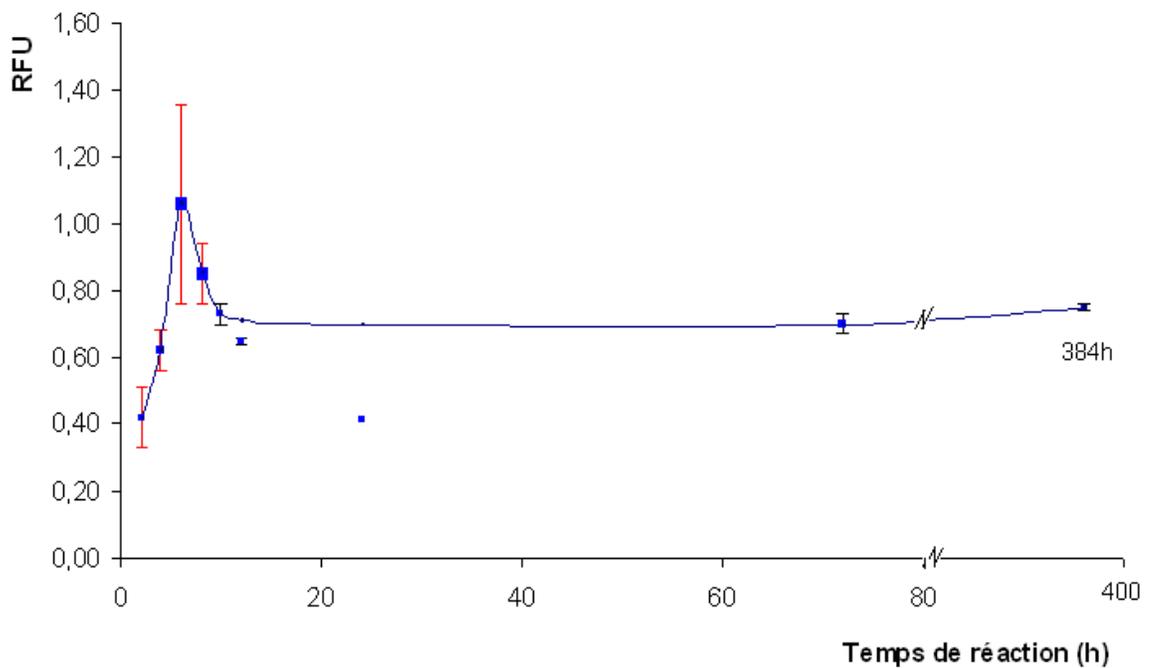


Figure 3.14 Courbe de stabilité du dérivé D-Phe-FAM, analysée dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28. La hauteur du pic (en RFU) est représentée en fonction du temps écoulé depuis le début de la réaction de marquage. Les barres d'erreurs sont les écart-types de trois mesures.

3.2 Immobilisation des enzymes

3.2.1 Trypsine

Le GA est un réactif bifonctionnel. Sa popularité est liée à sa grande réactivité envers les amines primaires des protéines et donne aussi des agrégats qui ont des structures tridimensionnelles (fig. 2.4). Ces agrégats ont de très hautes masses molaires et sont insolubles dans l'eau. Plusieurs facteurs affectent l'immobilisation des enzymes, tels que la nature de l'enzyme, la concentration de l'enzyme et du réactif, le pH et la force ionique de la solution et enfin la température et le temps de réaction. Une faible concentration d'enzymes et de GA augmente la probabilité des groupements fonctionnels du GA à réagir avec la même molécule protéique produisant ainsi une réticulation intramoléculaire. Donc, les conditions d'immobilisation doivent être bien choisies pour favoriser la réticulation intermoléculaire entre les molécules protéiques au lieu de la réticulation intramoléculaire. Mohapatra et Hsu ont indiqué que la réticulation intramoléculaire dominait pendant les premières minutes et causait un blocage ou de la destruction des sites actifs des molécules [17]. Ils ont aussi remarqué que la vitesse de réticulation intramoléculaire augmentait avec l'accroissement de la concentration de GA. Migneault *et al.* a indiqué qu'une faible concentration de réactif (GA) n'était pas suffisante pour former un agrégat insoluble et qu'une concentration de réactif plus élevée était nécessaire pour la réticulation [75]. On a aussi souligné que l'activité enzymatique était inversement proportionnelle à la concentration de GA parce que l'importance de la réticulation pouvait causer une déformation de la structure de l'enzyme. Cette déformation réduit l'association d'enzymes à substrat et affecte l'activité catalytique de l'enzyme. Migneault *et al.* a aussi trouvé que la réticulation de la trypsine par le GA pouvait être réalisée avec un rapport molaire de 1:250 (Enzyme:GA) pendant 2 h à 22 °C dans un tampon phosphate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,80 [16, 59].

3.2.2 Chymotrypsine

Selon Jansen *et al.*, l'optimisation du pH d'insolubilité par le GA varie d'une enzyme à l'autre [76]. Ils ont observé que ce pH devait s'approcher du point isoélectrique (pI) de l'enzyme et que la formation de la chymotrypsine insoluble active était plus rapide à pH 6,2.

Dans cette étude, la réticulation de la chymotrypsine avec le GA a été réalisée à pH 6,80 et a donné un rendement d'immobilisation de 89,7 % (inférieur à celui de Migneault (95 %) pour la trypsine) [16]. Le rendement était évalué par spectrophotométrie différentielle avec le 4^e dérivée en mesurant les différences d'absorbance du mélange réactionnel à 291,4 nm avant et après l'immobilisation [16]. La fig. 3.15 montre une photo numérique de quelques mg de chymotrypsine réticulée par le GA (GACT). Le produit d'enzymes réticulées par le GA (GAT et GACT, pour la trypsine et la chymotrypsine, respectivement) est un précipité mouillé qui ressemble à un gel. Avant le prélèvement, il faut broyer vigoureusement le précipité afin de prélever une certaine quantité de GACT (ou GAT) pour effectuer une digestion à partir d'une suspension du précipité dans l'eau.

Les résultats de la digestion par la GACT (voir la fig. 3.19 et 3.30b) montrent qu'elle fonctionne bien avec les substrats, soit la CA-FITC et la CA-FAM. Par ailleurs, il est préférable de déterminer la condition optimale où la plus haute activité de la chymotrypsine immobilisée, le GACT, peut être obtenue.

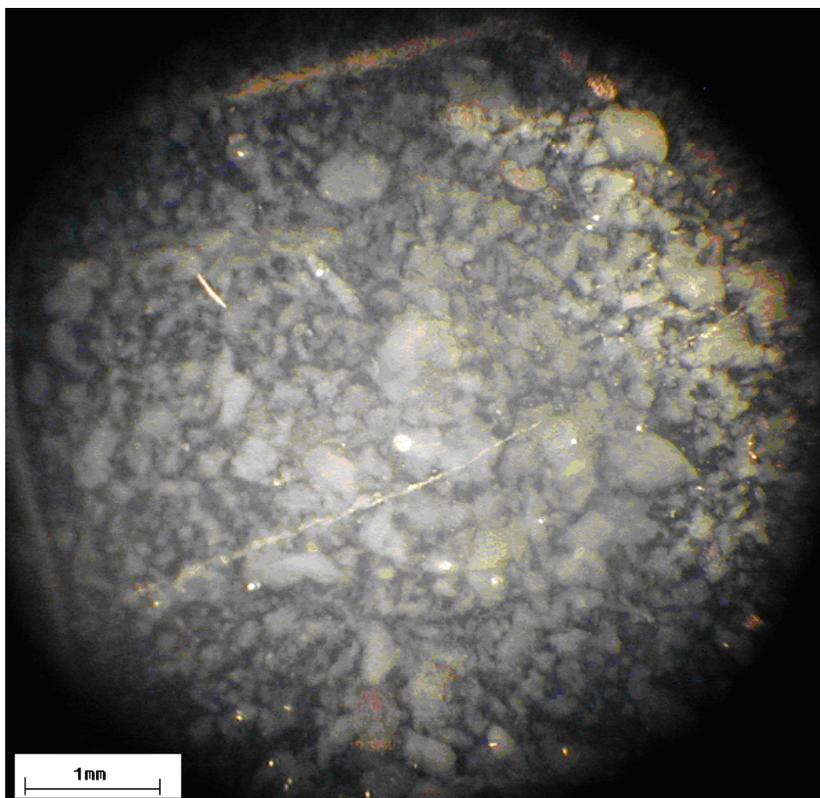


Figure 3.15 Image de la chymotrypsine réticulée par le glutaraldéhyde (GACT) obtenu par un appareil photo numérique au microscope.

3.3 Digestion et cartographie peptidique des dérivées NDA

Dans notre cas, la trypsine n'est pas adéquate pour l'étude de cartographie peptidique puisqu'elle ne reconnaît plus les lysines marquées par le NDA selon nos études préliminaires. De plus, la lactalbumine (LACT) ne contient qu'une arginine selon sa séquence présentée dans la partie 3.1.1.1. La chymotrypsine a donc été choisie. Elle est une endoprotéase ayant une masse molaire de 25 kDa, 241 résidus et un pI de 8,75. Elle clive les peptides sélectivement du côté de l'acide carboxylique terminal des résidus de phénylalanine (Phe), tryptophane (Trp) et tyrosine (Tyr) et parfois de leucine (Leu) et méthionine (Met) [77, 78]. La lactalbumine est une protéine globulaire ayant quatre ponts disulfures. Avant la digestion, la dénaturation est faite par incubation avec le DTT à 37 °C pendant 15 min, suivie d'une alkylation par l'iodoacétamide. La fig. 3.16 montre des pics

de fragments de la LACT-NDA dénaturée et digérée par la chymotrypsine libre avec un rapport massique de 10:1 substrat:enzyme à pH 7,90 dans un tampon bicarbonate d'ammonium. Selon les données de la banque génomique d'Expasy, il devrait y avoir 13 peptides chymotrypsiques avec une possibilité de 67 % de digestion aux sites désirés [79]. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse à pH 2,50 (l'électrophérogramme de la LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon phosphate $5,5 \times 10^{-2}$ M pH 2,50 n'est pas montré). Les pics présentés dans la fig. 3.16a sont assignés dans le tableau 3.4, selon le calcul de Z/M_r théorique. Les fragments peptidiques sont chargés négativement à pH 8,22, ils migrent donc après le flux électro-osmotique (EOF). L'absorptivité molaire est plus faible que prévue, cela est probablement dû à la faible solubilité de la LACT-NDA et donne des signaux peu abondants.

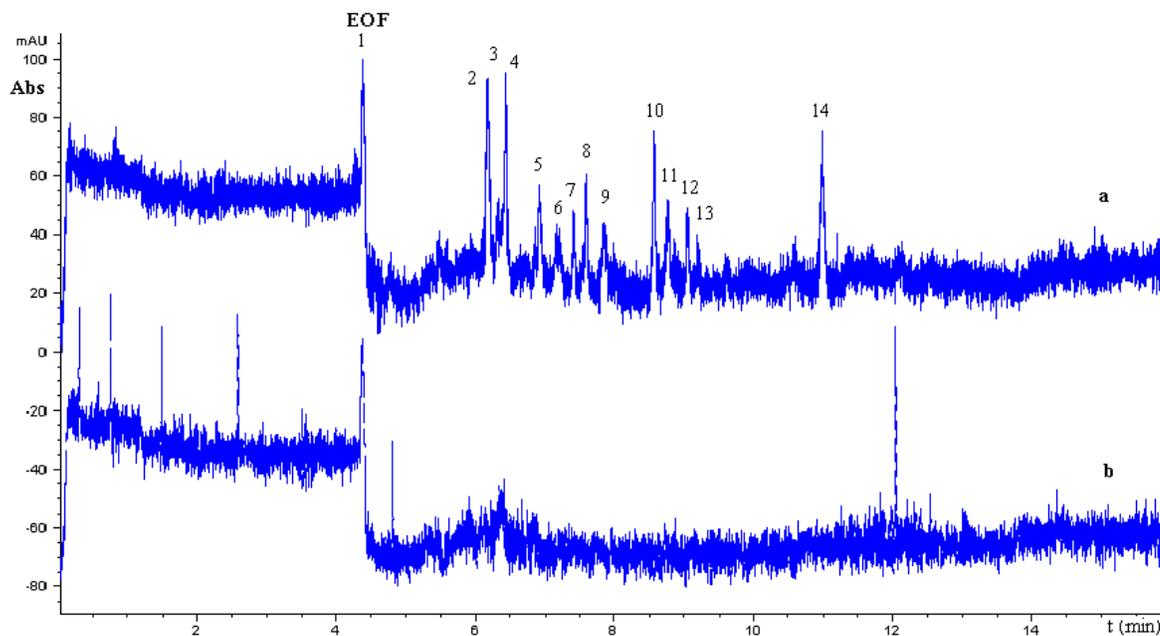


Figure 3.16 Analyse CE-UV de la LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon borate 0,15 M pH 8,22. a) LACT-NDA digérée par la chymotrypsine; b) le blanc de la digestion. EOF : flux électroosmotique.

Tableau 3.4 Assignation probable des fragments peptidiques (fig. 3.16) de la LACT-NDA digérée par la chymotrypsine libre à pH 8,22 selon le rapport Z/Mr théorique.

Ordre de sortie	Z/Mr ^a (mol/g/mol)	T (min)	Fragments
1	0	4,41	(EOF)
2	$-2,70 \times 10^{-4}$	6,19	GLFQINNKIW-(NDA) ₁
3	$-3,54 \times 10^{-4}$	6,32	VSLLLVGILF
4	$-5,87 \times 10^{-4}$	6,44	HTSGY
5	$-6,06 \times 10^{-4}$	6,95	VCTTF
6	$-9,49 \times 10^{-4}$	7,20	RELKDLKGY-(NDA) ₂
7	$-1,12 \times 10^{-3}$	7,43	LAHKALCSEKLDQW-(NDA) ₂
8	$-1,18 \times 10^{-3}$	7,63	CKDDQNPHSSNICNISCDF-(NDA) ₂
9	$-1,26 \times 10^{-3}$	7,88	HATQAEQLTKCEVF-(NDA) ₁
10	$-1,45 \times 10^{-3}$	8,57	(NDA) ₁ -MMSF
11	$-1,63 \times 10^{-3}$	8,77	GGVSLPEW
12	$-1,64 \times 10^{-3}$	9,05	LCEKL-(NDA) ₁
13	$-1,87 \times 10^{-3}$	9,20	LDDDLTDDIMCVKKILDKVGINYW-(NDA) ₃
14	$-2,13 \times 10^{-3}$	11,0	DTQAIVQNNDSTEY

^a Z/Mr : Z = nombre de charge de molécule (mol), Mr : Masse molaire de molécule (g/mol).

3.4 Digestion et cartographie peptidique des dérivés FITC

3.4.1 Effet du temps de digestion

3.4.1.1 Digestion par la chymotrypsine libre (CT)

Les cartes peptidiques de la CA-FITC digérée par la chymotrypsine libre avec un rapport massique de 1:1,4 CA:Enz pour des périodes de 30 min à 4 h sont présentées à la figure 3.17. Selon les résultats, on constate que la digestion de 30min est satisfaisante pour la cartographie peptidique de la CA-FITC, puisqu'il n'y a pas de grandes différences dans le nombre de pics de ces cinq électrophérogrammes. D'ailleurs, une digestion d'un temps plus court peut diminuer la quantité de produits d'hydrolyse de dérivés non désirés (par

exemple, pic à 12,3 min de la figure 3.17a. Banks et Paquette ont observé un pic d'hydrolyse après 2 jours de repos à 20 °C [39]. Dans notre cas, le pic d'hydrolyse est observé après 1 h à 37 °C (pic à 12 min de la figure 3.17b). Donc, la digestion par la chymotrypsine libre pendant ≤ 1 h est recommandée.

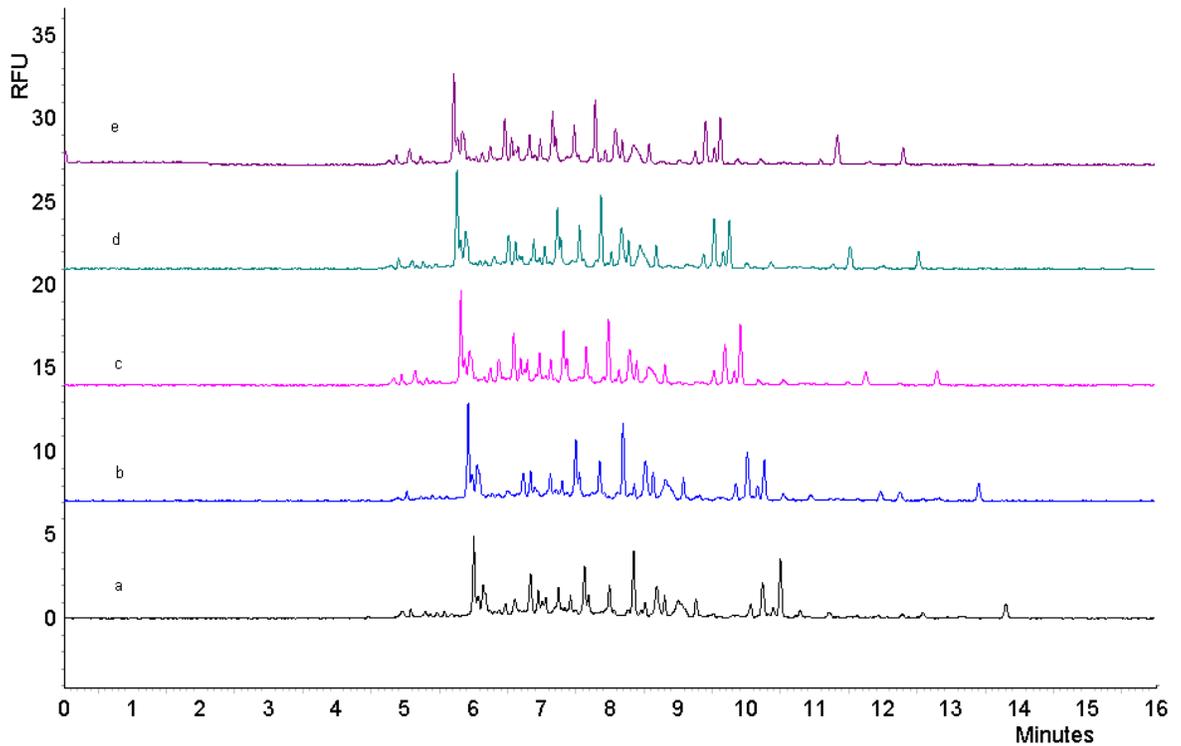


Figure 3.17 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h; e) 4 h.

3.4.1.2 Digestion par la chymotrypsine immobilisée sur gel d'agarose (GELCT)

Le produit commercial de chymotrypsine insoluble était testé avec notre substrat marqué. La fig. 3.18b montre qu'une digestion de 1 h n'est pas suffisante pour la GELCT, tandis que celle faite pendant 1 h par la chymotrypsine libre ayant près que même rapport de CA:Enz a donné un meilleur résultat (voir fig. 3.17b). Cela indique que les contacts entre les molécules d'enzyme (GELCT) et de substrat ne sont pas suffisants ou l'activité d'enzyme (GELCT) est faible. C'est probablement à cause de la perte d'activité enzymatique après l'immobilisation. Pour la chymotrypsine immobilisée (GELCT), il

fallait environ 3 h de digestion (fig. 3.18d) pour obtenir de bons résultats. D'ailleurs, une bonne agitation mécanique est très importante pour une digestion hétérogène.

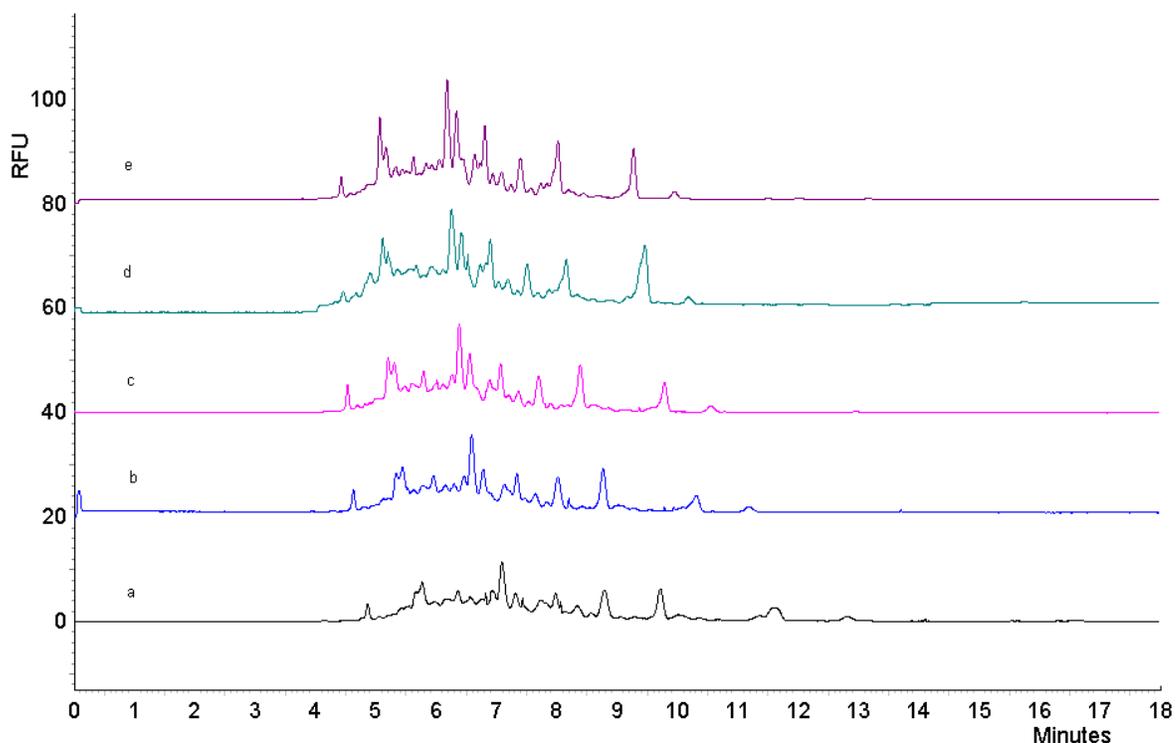


Figure 3.18 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par GELCT (CA:Enz = 1:1,3, calculé [enzyme libre] équivalente selon information de Princeton) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h e) 4 h.

3.4.1.3 Digestion par la chymotrypsine réticulée par le glutaraldéhyde (GACT)

La fig. 3.19 montre l'électrophérogramme de la CA-FITC digérée par GACT pendant 1 h, où le résultat n'a pas été satisfaisant car très peu de peptides chymotrypsiques ont été observés. Par contre, celui de la CA-FITC digérée pendant 4 h était satisfaisant. Cependant, la dégradation devient importante pour une durée de 2 h de la digestion (fig. 3.19c, pic à 10,6 min). Pour diminuer l'impact de la dégradation, une bonne agitation mécanique est nécessaire pour augmenter les contacts entre les particules de GACT et les molécules de substrat pour avoir un meilleur rendement de digestion enzymatique.

Après avoir comparé les résultats de la fig. 3.17, de la fig. 3.18 et de la fig. 3.19, nous concluons que la digestion par enzyme libre pendant 1 h est meilleure parce qu'elle peut éviter la dégradation.

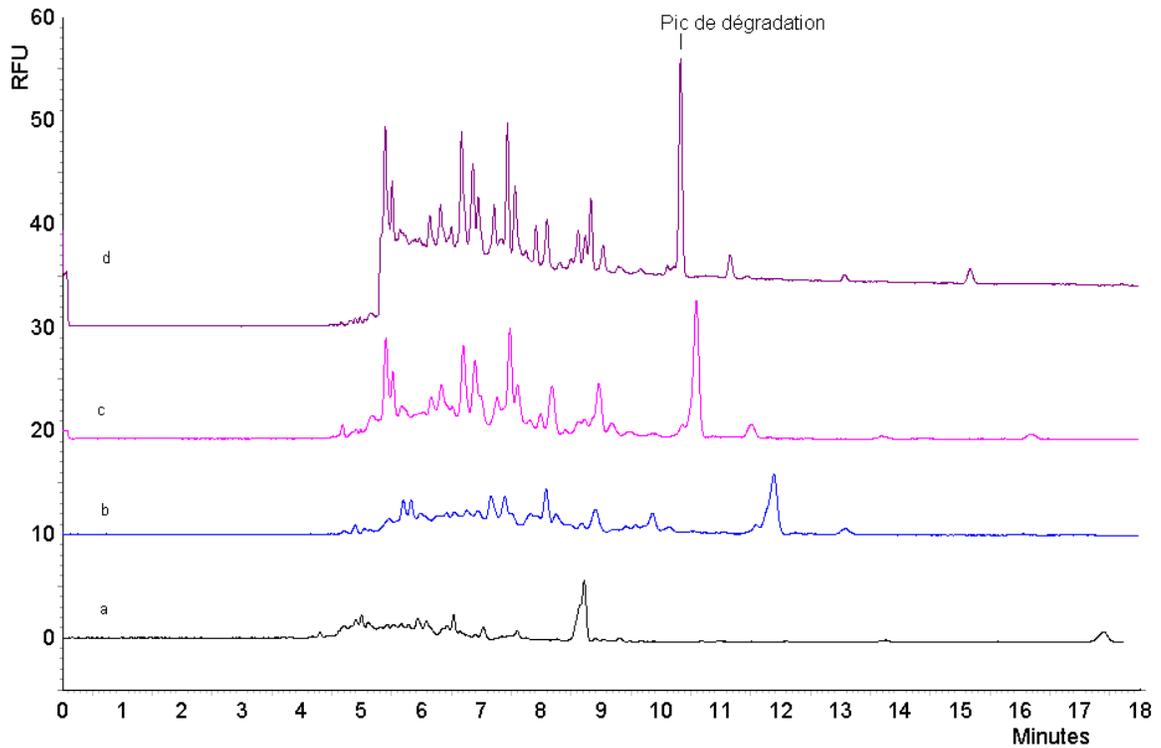


Figure 3.19 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FITC digérée par GACT (CA:Enz = 1:80) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. Temps de digestion : a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 4 h.

3.4.2 Effet de la concentration du substrat

3.4.2.1 Digestion par la chymotrypsine réticulée par le glutaraldéhyde (GACT)

La fig. 3.20 montre la carte peptidique de la CA-FITC digérée par GACT avec différentes concentrations de substrat CA et différents rapports CA:Enz. Certainement, plus la concentration de substrat est élevée, plus la concentration finale des fragments peptidiques est grande, même si les rapports CA:CT sont ajustés pour compenser les différences de concentrations. Malheureusement, les pics chymotrypsiques sont difficiles à assigner seulement par le rapport Z/M_r calculé parce que plusieurs clivages ne s'effectuent

pas à tous les sites. Pour assigner ces pics, il faut coupler la CE à MS qui n'est pas encore disponible à un niveau satisfaisant dans notre laboratoire.

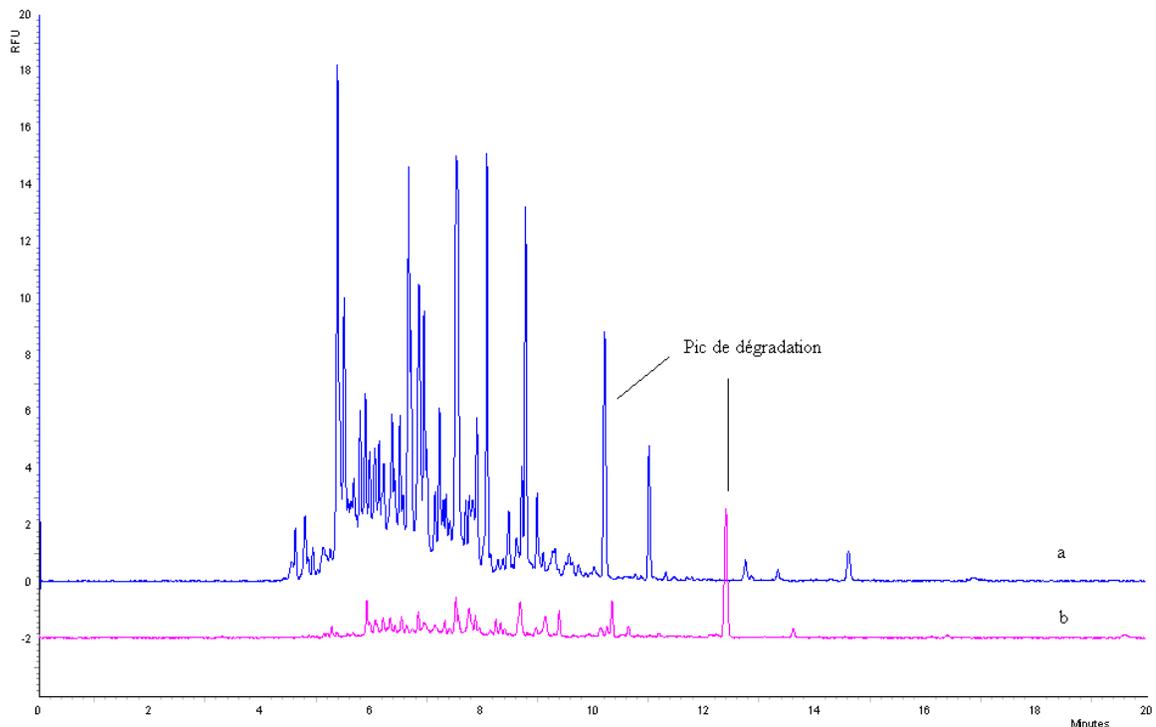


Figure 3.20 Cartes peptidiques CE-LIF de la CA-FITC digérée pendant 4 h par GACT et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 en fonction de la concentration du substrat : a) $C_{CA-FITC} = 1,0 \times 10^{-6}$ M (CA:Enz = 1:2,7); b) $C_{CA-FITC} = 1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:Enz = 1:27).

3.4.2.2 Digestion par la chymotrypsine libre (CT)

La fig. 3.21 présente trois cartes peptidiques de la CA-FITC pour trois concentrations (de $1,0 \times 10^{-6}$ M à $1,0 \times 10^{-8}$ M) du substrat digéré par la chymotrypsine. Il était important de garder le rapport d'enzyme/substrat supérieur à 1, lorsque la concentration de substrat était inférieure à 10^{-7} M, afin d'avoir suffisamment d'interactions entre les molécules d'enzymes et celles du substrat. Les pics de dégradation notés sur la figure ont été vérifiés avec la digestion du substrat à une concentration de $1,0 \times 10^{-10}$ M. À ce moment là, un seul pic est observé et il provient de la dégradation de la CA-FITC. Cependant, la CA-FITC demeure stable pendant 2 semaines dans le congélateur (-20 °C), et ne commence qu'à se dégrader

lorsqu'elle est entreposée à 22 °C pendant 20 min. La préparation des échantillons pour la digestion doit donc être faite le plus rapidement possible après le marquage.

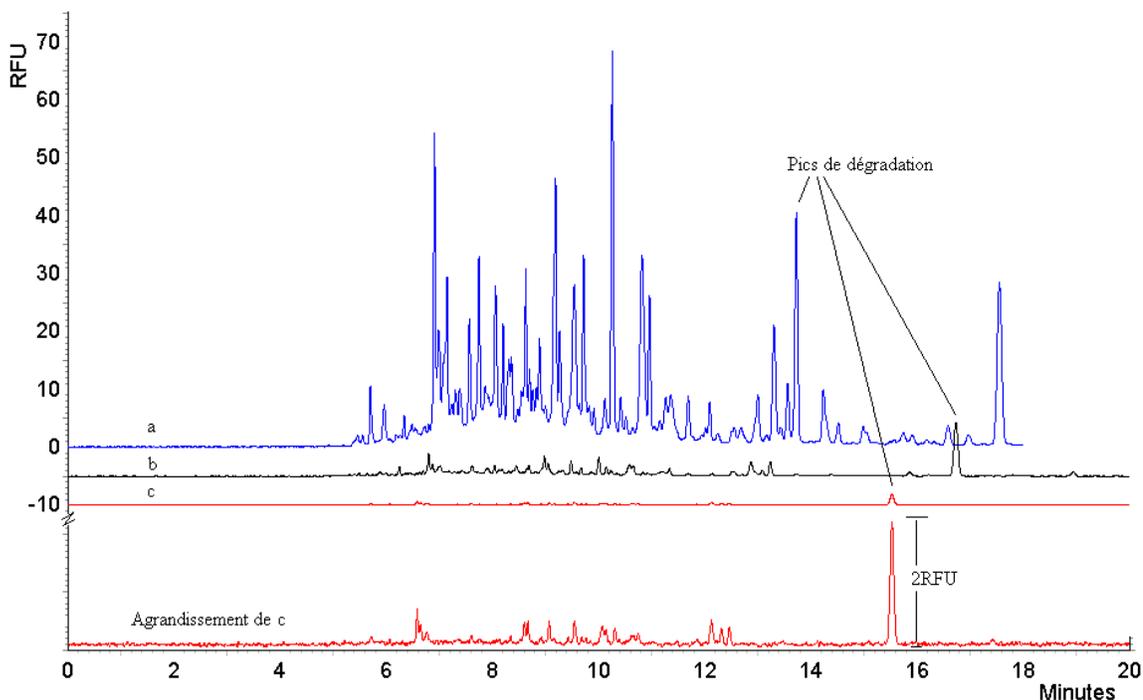


Figure 3.21 Cartes peptidiques CE-LIF en fonction de la concentration de la CA-FITC digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) $1,0 \times 10^{-6}$ M (CA:CT = 10:1); b) $1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:CT = 1:1); c) $1,0 \times 10^{-8}$ M (CA:CT = 1:17), montrée aussi avec un agrandissement de c.

3.4.3 Limite de détection de la méthode

Pour trouver la limite de détection, une série d'échantillons (CA-FITC) de $1,0 \times 10^{-7}$ M à $1,0 \times 10^{-10}$ M ont été digérés par la chymotrypsine libre ou immobilisée avec un grand rapport de Enz:CA suivi par leur analyse en triplicata. Sauf lorsque le laser était à faible intensité dû à un problème technique de l'appareil CE de Beckman, on obtenait une limite de détection acceptable avec un faible volume d'injection, soit de 41nL (0,5 psi, 50 s) : pour le marquage de la CA avec la FITC, la limite de détection par CE-LIF pour la digestion de la CA-FITC par la chymotrypsine libre pendant 24 h était de $5,0 \times 10^{-10}$ M (CA)

avec un facteur S/N de 2,4 et de $5,0 \times 10^{-10}$ M (CA) avec un facteur S/N de 2,0 pour la digestion de la CA-FITC par GACT pendant 4 h.

3.5 Digestion et cartographie peptidique des dérivés FAM

L'ester de carboxyfluorescéine N-succinimidyl (FAMSE) était le troisième fluorophore utilisé pour marquer les groupements amines. Ses propriétés spectroscopiques sont presque identiques à celles de la FITC. Il se conjugue au groupement amine en produisant une liaison amide (fig. 2.3). Cette dernière est plus stable que la liaison thio-urée formée par une conjugaison de FITC avec un groupement amine (fig. 2.2). Il est donc de plus en plus populaire dans le marquage fluorescent de biomolécules [39]. Lau *et al.* ont constaté que la limite de marquage d'acides aminés avec le FAMSE était de 10^{-9} M [38] et Chang et Wang ont trouvé que la limite de détection pour le gabapentin dans le plasma était de $4,8 \times 10^{-9}$ M [80]. Grâce à sa meilleure performance de marquage par rapport aux autres fluorophores, les dérivés FAM ont fait parti d'un plus grand nombre d'études de paramètres expérimentaux.

3.5.1 Effet des paramètres d'analyse par CE-LIF

3.5.1.1 Effet du pH, du tampon et de la concentration sur la séparation des peptides

La fig. 3.22 présente l'influence de la concentration (a et b) et du pH (b à e) de solutions tampons sur la séparation des peptides chymotrypsiques. Les électrophérogrammes aux figs. 3.22a et 3.22b montrent que les fragments sortent plus vite et donnent une mauvaise résolution lorsque la concentration du tampon phosphate (pH 6,90) baisse de 0,10 M à $5,0 \times 10^{-2}$ M en raison de la plus faible force ionique du tampon. L'épaisseur de la double couche est plus diffuse, le flux électro-osmotique est plus grand et la vitesse des fragments est donc plus élevée. Cela a pour effet de diminuer la résolution entre deux pics. Par contre, les pics des fragments sont bien séparés dans un tampon phosphate 0,10 M à pH 6,90 (fig. 3.22b). Quand le pH du tampon phosphate (0,10 M) est élevé à 7,30 et à 7,50, certains pics sont superposés et le temps d'analyse est plus long. Malgré la petite augmentation du EOF avec le pH, les peptides ont un caractère plus

anionique et donc migrent plus lentement (figs. 3.22c et d). Quant au pH 9,28 (tampon borate 0,10 M), le nombre de pics baisse beaucoup et la séparation est moins bonne. Donc, le tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 a été choisi pour la séparation des peptides de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine.

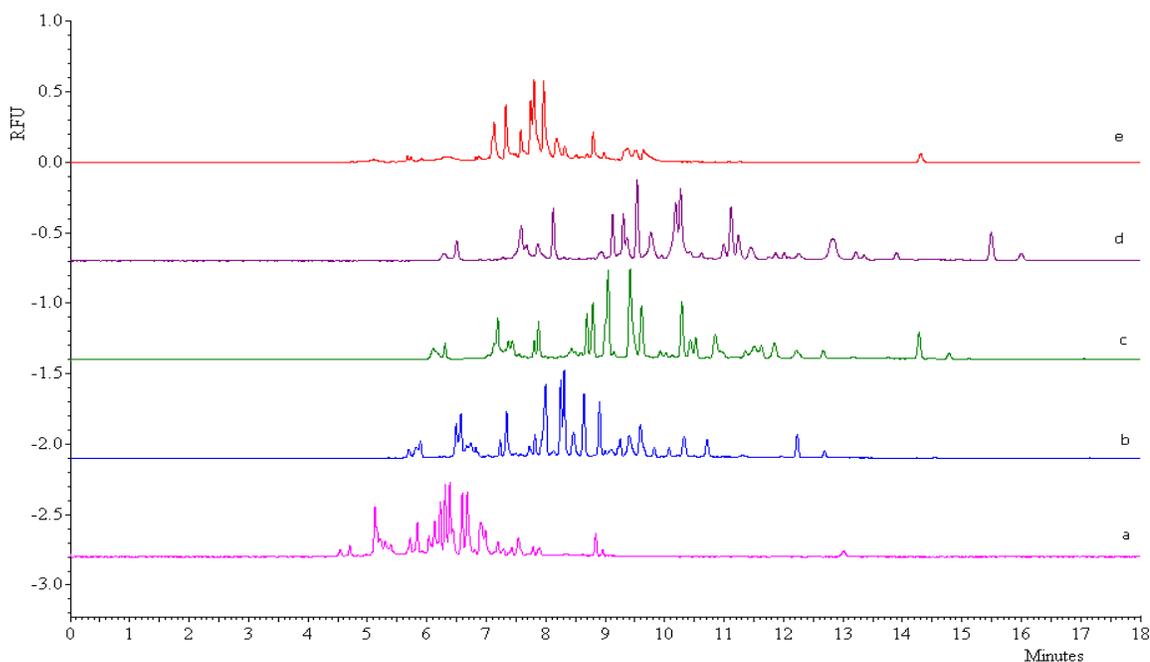


Figure 3.22 Électrophérogrammes CE-LIF des peptides de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre et analysée à différents pH et à différentes concentrations de tampon : a) Phosphate $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,90; b) Phosphate 0,10 M pH 6,90; c) Phosphate 0,10 M pH 7,20; d) Phosphate 0,10 M pH 7,50; e) Borate 0,10 M pH 9,28. Le voltage appliqué était de 24 kV pour les cinq séparations.

3.5.1.2 Effet du mode d'injection

Le mode d'injection par électromigration est très simple et c'est la technique la plus importante employée pour améliorer la limite de détection en CE. Malheureusement, il est influencé par le type d'échantillon et d'analyte. L'analyte ayant la mobilité électrophorétique la plus élevée est toujours injecté avec une quantité plus importante [81]. Dans notre cas, la mobilité de fragments qui correspondent aux deux pics entre 6,5 et 6,7 min est plus élevée que celle des autres fragments pendant l'injection (voir fig. 3.23c). Entre les électrophérogrammes a, b et c de la fig. 3.23, on trouve que le b est le plus

représentatif. Cependant, une comparaison rigoureuse entre l'électrophérogramme de la fig. 3.23b et celui de la fig. 3.22b (injection hydrostatique) révèle que l'injection hydrostatique donne une meilleure carte peptidique avec 29 pics pour la CA-FAM digérée par la chymotrypsine par rapport à 25 pics quand l'injection a été faite par électromigration. En conséquent, l'injection d'échantillon a été faite par pression hydrostatique dans nos études.

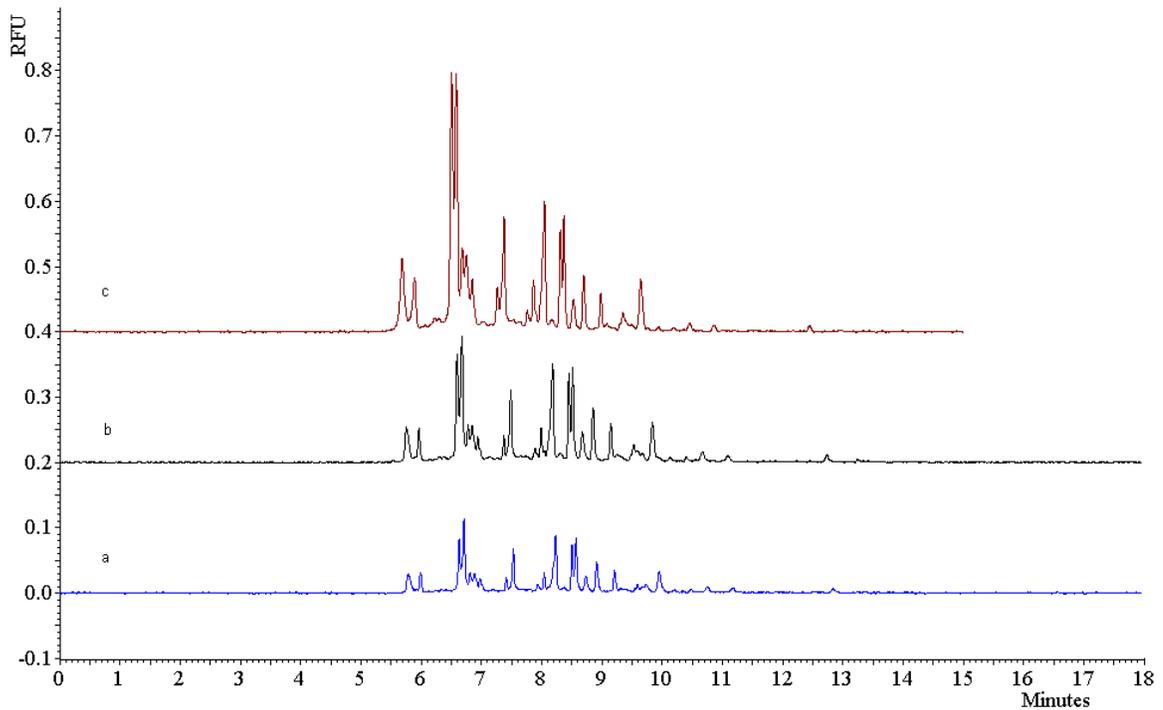


Figure 3.23 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre en fonction de l'injection électrocinétique et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90, avec un voltage appliqué de 24 kV. Injection : a) 10 kV pendant 5 s; b) 10 kV pendant 10 s; c) 5 kV pendant 25 s.

3.5.1.3 Effet du potentiel appliqué

La fig. 3.24 montre la séparation des peptides de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine en fonction du potentiel appliqué. On remarque qu'au fur et à mesure que le potentiel augmente, les fragments sortent du capillaire de plus en plus vite comme attendu. En effet, le champ électrique est proportionnel au potentiel appliqué aux extrémités du capillaire et la vitesse électrophorétique et électro-osmotique sont proportionnelles au champ électrique [25]. Par conséquent, la vitesse de migration du fragment augmente avec

l'augmentation du potentiel. On remarque aussi que les deux pics à 12 min de la fig. 3.24a sont superposés tandis qu'ils sont mieux résolus dans la fig. 3.24e (vers 7 min). En effet, l'efficacité de la séparation augmente avec le potentiel appliqué en CE et la résolution est proportionnelle à la racine carrée de l'efficacité [26]. Enfin, ils ont été bien séparés à 30 kV (vers 6,5 min; fig. 3.24f).

En conséquent, les conditions optimales de séparation sont l'injection hydrostatique, un tampon phosphate ayant une concentration de 0,10 M, un pH de 6,90 et un voltage de séparation de 30 kV.

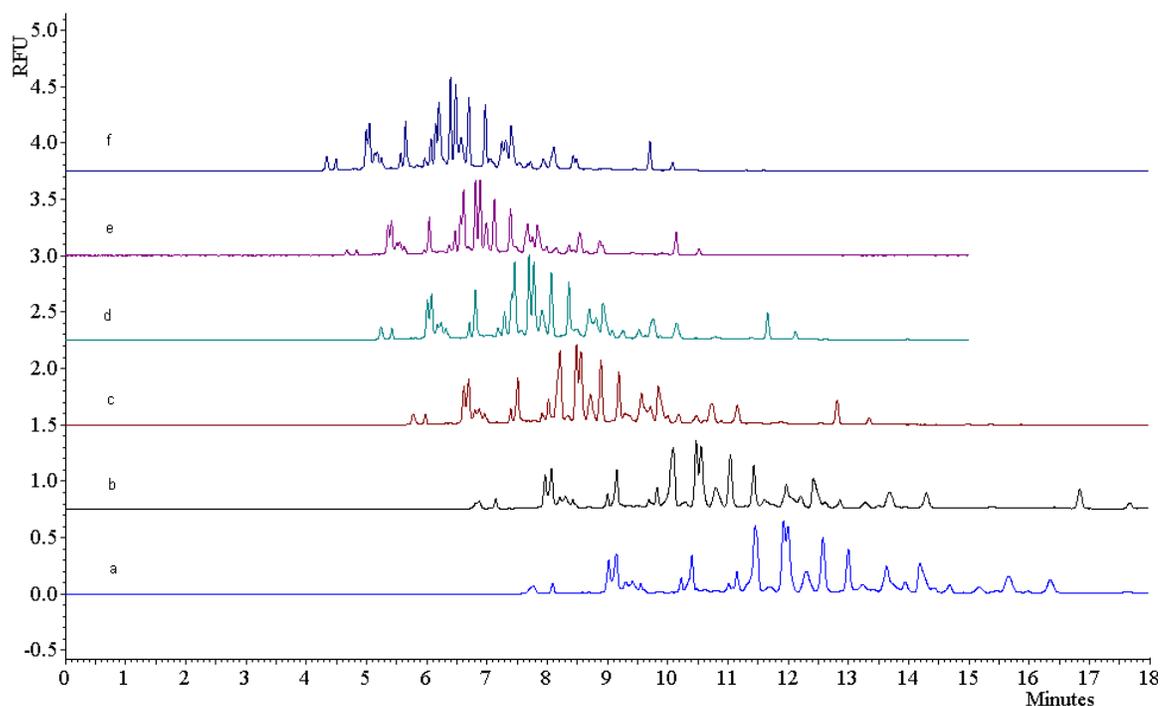


Figure 3.24 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre en fonction du potentiel appliqué et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90 : a) 20 kV; b) 22 kV; c) 24 kV; d) 26 kV; e) 28 kV; f) 30 kV.

3.5.2 Effet du temps de digestion

Bien que l'activité enzymatique soit meilleure dans un tampon qui contient le Tris [82], il est fortement recommandé de ne pas utiliser le Tris-HCl surtout à faible concentration du substrat (*i.e.*, à $\leq 10^{-6}$ M) parce que l'ion Cl^- peut désactiver la fluorescence. Dans notre cas, le tampon borate $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 7,80 a été choisi pour la digestion par la chymotrypsine et celui $1,0 \times 10^{-3}$ M pH 8,00 a été choisi pour la digestion par la T. Puisque la force ionique peut aussi affecter l'intensité de fluorescence, la concentration de tampon ne doit être faible. Une concentration de $1,0 \times 10^{-3}$ M était suffisante, étant déjà 1000 fois plus élevée que l'analyte à 10^{-6} M. On pourrait aussi utiliser l'eau déionisée ajustée au pH désiré avec du NaOH dilué.

L'augmentation du temps de digestion, favorise le clivage du substrat et l'intensité fluorescente des pics correspondants. Les cartes peptidiques dépendent du temps de digestion et révèlent qu'une digestion de 1 h par la chymotrypsine libre est suffisante pour une carte peptidique caractéristique (fig. 3.25b). Celle-ci étant similaire à celles obtenues pour des digestions de 2 h, 3 h, 4 h et 24 h sauf l'intensité des pics qui était différente. Cependant, si on veut faire une étude quantitative, il est recommandé de faire une digestion de 24 h afin d'augmenter la sensibilité de la méthode. Pour une analyse rapide, la digestion de 30 min est acceptable pour le CA-FAM.

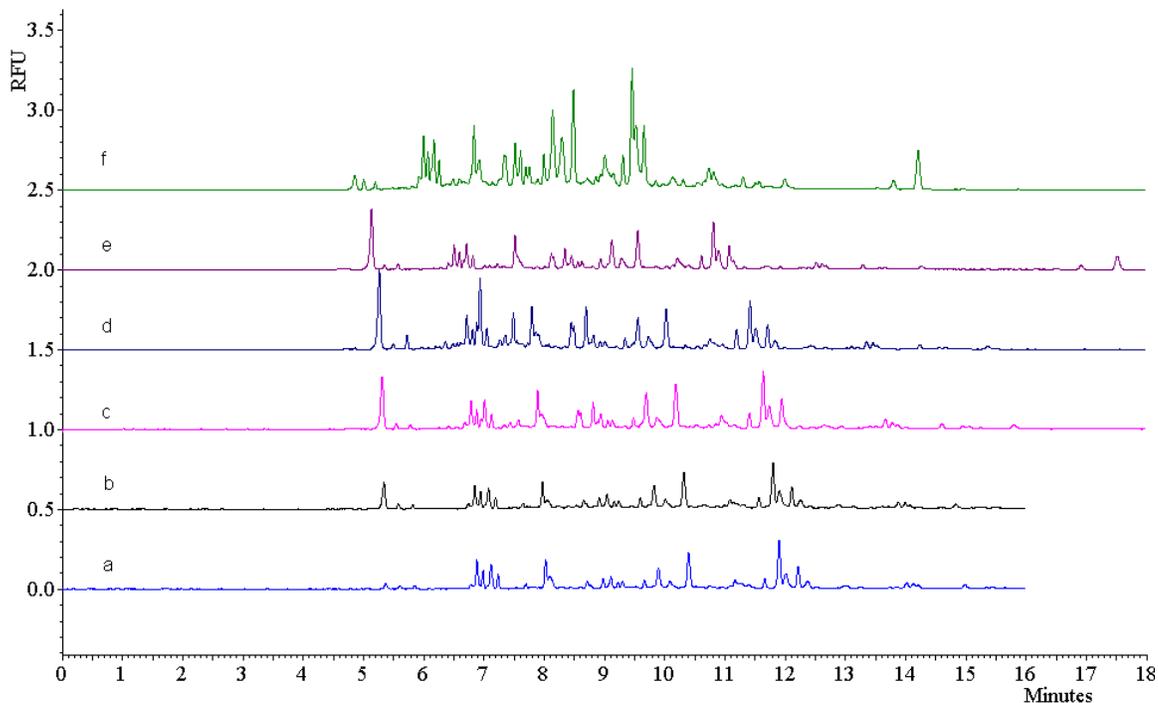


Figure 3.25 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM en fonction du temps de digestion (Rapport massique CA:CT_{libre} = 1:1) analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 30 min; b) 1 h; c) 2 h; d) 3 h; e) 4 h; f) 24 h.

3.5.3 Effet du rapport enzyme:substrat

L'enzyme est un biocatalyseur, donc une quantité adéquate d'enzyme est nécessaire pour une digestion rapide. La fig. 3.26 montre que les hauteurs du pic diminuent avec une diminution de la proportion d'enzyme dans le rapport CA:CT. Le pic à 9,3 min de la fig. 3.26a a été sélectionné pour tracer la courbe qui représentait le rendement de digestion en fonction du rapport CA:CT (voir fig. 3.27). La courbe de la fig. 3.27 démontre que le rendement de digestion diminue avec l'augmentation du rapport CA:CT pour une concentration de CA de $1,0 \times 10^{-7}$ M. Le meilleur rapport CA/Enz est de 1:1 selon le temps désiré, surtout lorsque le substrat est présent en faible concentration (*i.e.* 10^{-7} M).

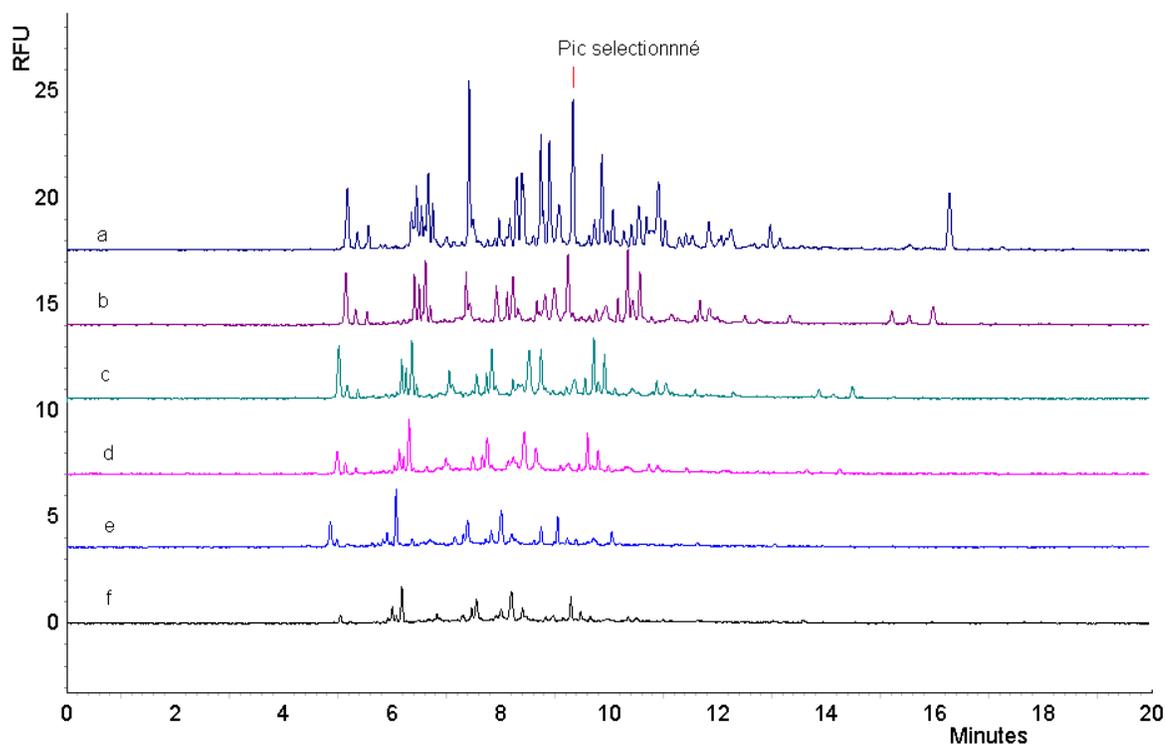


Figure 3.26 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-7}$ M) digérée pendant 24 h par la chymotrypsine libre en fonction du rapport massique CA:CT et analysée dans un tampon 0,10 M pH 6,90. CA:CT (poids/poids) : a) 1:1; b) 10:1; c) 20:1, d) 40:1; e) 60:1; f) 120:1.

Cependant, pour un substrat à 10^{-6} M, la digestion réalisée avec un rapport 10:1 en CA:Enz donne un résultat satisfaisant pour notre étude. Lorsque le substrat est en très faible concentration ($\leq 10^{-8}$ M), il faut augmenter la proportion en enzyme versus le substrat pour que l'enzyme puisse interagir avec le substrat dans une solution donnée. Dans notre cas, on a gardé la même concentration d'enzyme libre, soit 0,0050 mg/mL pour un rapport CA:Enz de 1:17 (p/p) pour la digestion de $1,0 \times 10^{-8}$ M CA-FAM.

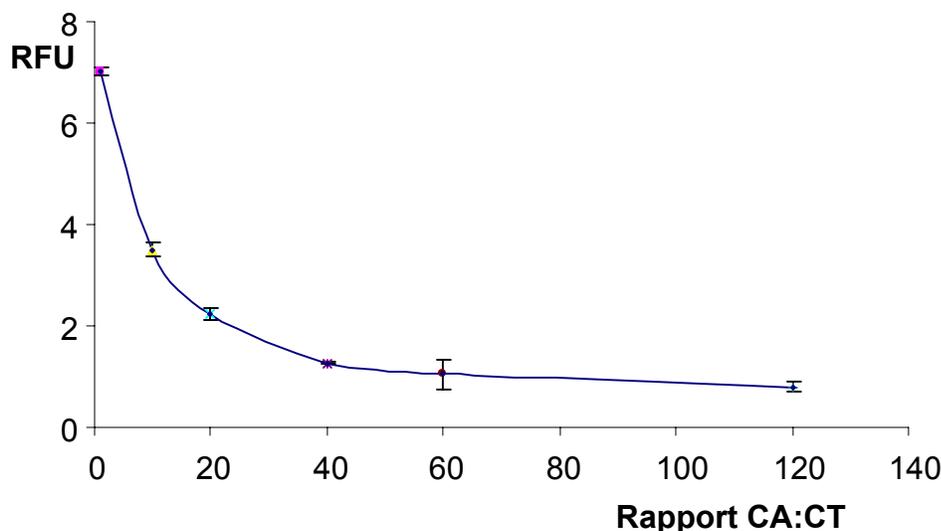


Figure 3.27 Graphique de l'intensité du pic majeur (à 9,3 min) de la fig. 3.26 en fonction du rapport CA:CT.

3.5.4 Effet de la concentration du substrat

La fig. 3.28 présente une série d'électrophérogrammes de la CA-FAM $1,0 \times 10^{-7}$ M, $1,0 \times 10^{-8}$ M et $1,0 \times 10^{-9}$ M digérée par la chymotrypsine libre pendant 24 h et la fig. 3.29 est un agrandissement de l'électrophérogramme c de la fig. 3.28. On remarque que le rapport des hauteurs des pics de l'électrophérogramme à $1,0 \times 10^{-8}$ M et à $1,0 \times 10^{-9}$ M ne diffère pas par un facteur de 10 comme attendu. Ceci est expliqué par une panne de l'appareil pendant notre étude. La fin de vie du tube d'argon produisait des émissions plus faibles qui diminuaient directement l'intensité de fluorescence surtout en faible concentration. Selon la fig. 3.29, le nombre de plateaux théoriques pour le pic à 7,57 min est de $4,40 \times 10^5$ plateaux/m et celui pour le pic à 7,72 min est de $5,36 \times 10^5$ plateaux/m. La résolution entre ces deux pics est de 2,03. L'efficacité de séparation est donc suffisamment élevée pour séparer des fragments peptidiques par CE-LIF.

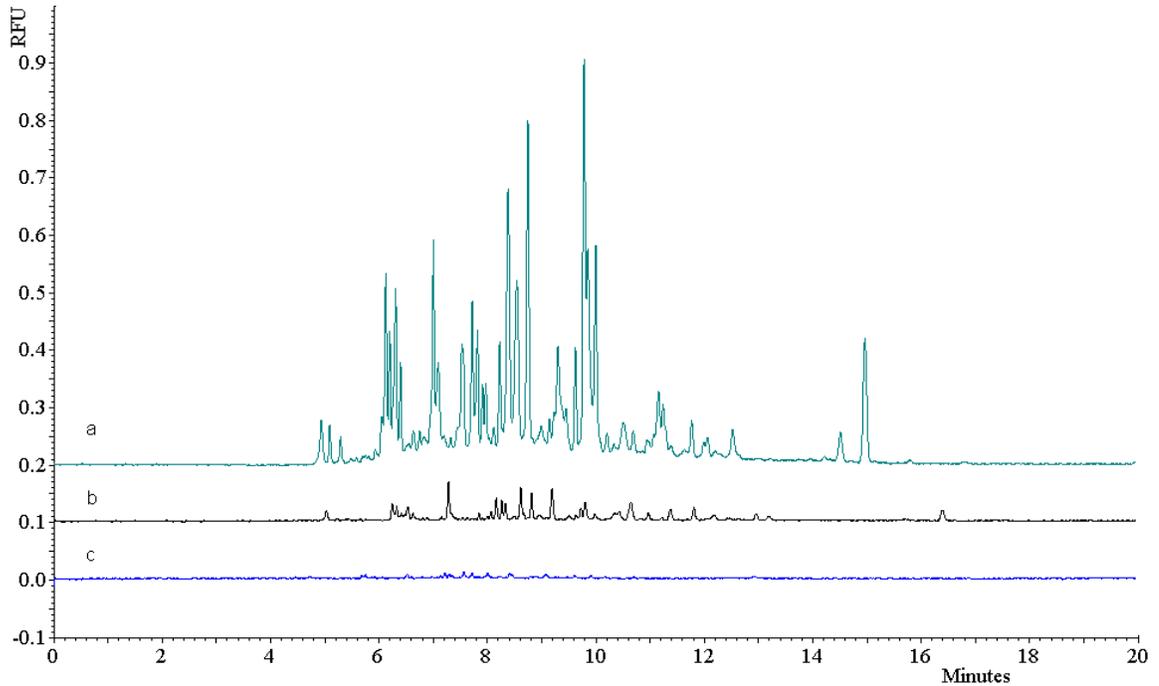


Figure 3.28 Cartes peptidiques en fonction de la concentration de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) $1,0 \times 10^{-7}$ M (CA:CT = 1:1); b) $1,0 \times 10^{-8}$ M (CA:CT = 1:17); c) $1,0 \times 10^{-9}$ M (CA:CT = 1:1667).

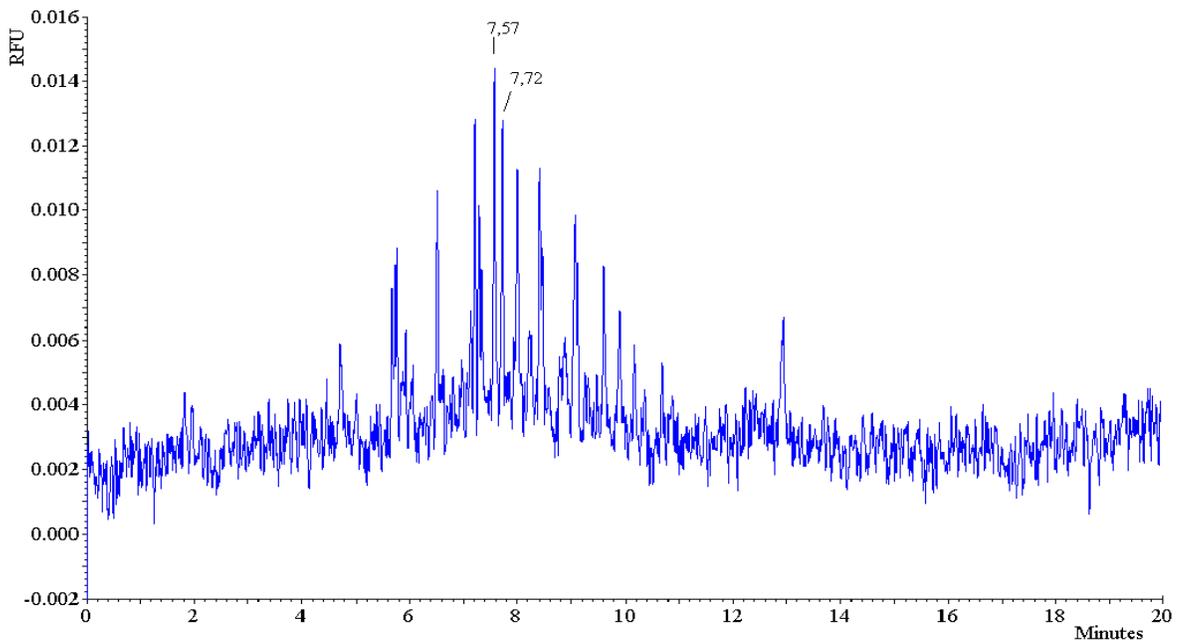


Figure 3.29 Agrandissement de la fig. 3.28c.

3.5.5 Effet de l'immobilisation des enzymes sur les cartes peptidiques de CA-FAM

3.5.5.1 Cartes peptidiques obtenues par trois types de chymotrypsine

Trois types de chymotrypsine ont été employés dans notre étude. Le premier était la chymotrypsine libre (CT). Son activité était de 163,2 U BTEE/mg (U : unité, BTEE : N-benzoyl-L-tyrosine éthyl ester, définition d'unité : une unité de chymotrypsine hydrolysera 1,0 μmol du BTEE par minute à pH 7,8 à 25 °C (1,0 $\mu\text{mol}/\text{min}$)), donnée de Q.V. Nguyen [83]. Le deuxième est la chymotrypsine immobilisée par GA de façon artisanale (GACT). Son activité était de 2,74 U BTEE/mg (donnée de Nguyen). Le troisième est la chymotrypsine immobilisée par liaison covalente sur billes d'agarose en gel (GELCT). Son activité était ajustée par le fournisseur à un niveau de 1 μL de suspension de gel ayant une équivalence de 0,5 μg de chymotrypsine native (*i.e.*, soluble). Les résultats des digestions par ces trois types de chymotrypsine sont un peu différents même si on a gardé les mêmes unités d'activité pour les trois formats d'enzymes. Parmi ces trois types de chymotrypsine, la GACT donnait le meilleur résultat. Le résultat de la digestion de 4 h par la chymotrypsine libre (fig. 3.30c) est moins bon que celui de 4 h par GACT (fig. 3.30b). En effet, une enzyme libre a toujours un problème d'autodigestion dans une solution adéquate, conséquemment son activité diminue parce que la concentration d'enzyme active diminue dans le temps. Selon Migneault *et al.*, la procédure de réticulation force l'enzyme à rester dans une conformation plus contraignante et donc, la vitesse de conversion du substrat en produit est souvent plus rapide [16]. D'un autre côté, une diminution de l'activité est presque toujours observée en immobilisation chimique. Dans notre cas, l'activité de GACT était de 2,74 U BTEE/mg et celle de chymotrypsine libre était de 163,2 U BTEE/mg. Une large variabilité d'activité spécifique résulte, partiellement, de l'orientation aléatoire du site résiduel aminé servant à l'attachement sur une matrice solide. Si l'attachement est près du site actif de l'enzyme, l'activité sera perdue partiellement ou totalement à cause de l'encombrement stérique et de la mobilité réduite de l'enzyme. La différence entre la carte peptidique par GACT (fig. 3.30b) et celle par GELCT (fig. 3.30a) provient des différences en transfert de masse dans les pores du réseau d'agarose par rapport au réseau réticulé GACT. Entre la carte peptidique par la chymotrypsine libre pendant 4 h (fig. 3.30c) et celle pendant 24 h (fig. 3.30d), il y avait moins de différence que

prévue. C'est probablement à cause du grand rapport d'enzyme (CA:Enz était de 1:1,4). L'utilisation d'une grande proportion en enzyme permet la digestion de presque toutes les molécules après 4 h.

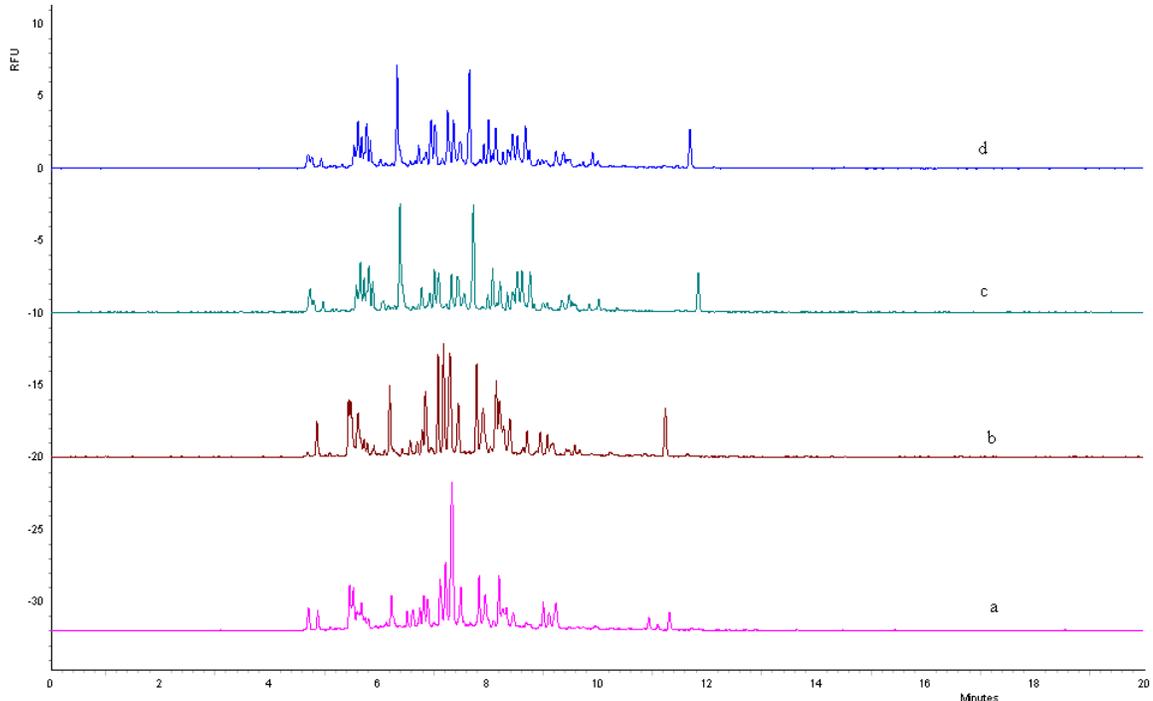


Figure 3.30 Comparaison de la digestion par trois formats de chymotrypsine : soluble (c et d), insoluble par réticulation (b) et insoluble par liaison sur billes d'agarose (a). Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par le même niveau d'activité pour la chymotrypsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée pendant 4 h par GELCT; (CA:Enz = 1:1,4); b) digérée pendant 4 h par GACT, CA:Enz = 1:83); c) digérée pendant 4 h par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4); d) digérée pendant 24 h par la chymotrypsine libre (CA:Enz = 1:1,4).

3.5.5.2 Cartes peptidiques obtenues par la trypsine réticulée

La trypsine (T) est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lys, K ou Arg, R) engage sa fonction acide. En fait, la CA n'a que 9 arginines et 18 lysines dont la moitié au moins sont marquées par le FAMSE selon les études MS. Il y a donc moins de site de clivage tryptique que chymotrypsique. C'est la raison pour laquelle la digestion par la trypsine donne moins de pics que celle par

la chymotrypsine (fig. 3.33b). Si la trypsine ne coupe qu'au côté C-terminal de l'Arg, on pourrait idéalement obtenir 9 fragments dont 6 seraient fluorescents (tableau 3.5, pics 4 à 9 où les résidus K sont en gras). Parmi ces 6 fragments, il y en a deux dont la fluorescence est forte et peuvent correspondre aux fragments 5 et 7 parce qu'ils n'ont qu'une lysine pouvant être conjuguée avec le FAMSE. Si un fragment contient deux ou plusieurs fluorophores, l'intensité totale de fluorescence sera plus faible à cause de l'auto-extinction interne (un phénomène où d'autres fluorophores absorbent la fluorescence émise par d'autre) sur la même chaîne peptidique. Dans notre cas, il est difficile de désigner ces fragments, car les lysines ne sont pas marquées complètement selon les résultats MS. Pour les désigner, il faudra coupler la CE avec la MS, ce qui n'était pas disponible pendant cette étude.

Tableau 3.5 Peptides tryptiques théoriques de la CA-FAM à pH 6,90

Ordre de sortie	Z/Mr ^a (mol/g/mol)	Fragments
1	$5,54 \times 10^{-3}$	R
2	$2,40 \times 10^{-3}$	QVR
3	$-5,38 \times 10^{-4}$	LVQFHFHWGSSDDQGSEHTVDR
4	$-5,84 \times 10^{-4}$	CH ₃ CO-SHHWGYGKHNGPEHWHKDFPIANGER
5	$-5,86 \times 10^{-4}$	TLNFNAEGEPELLMLANWRPAQPLK N R
6	$-1,17 \times 10^{-3}$	K KYAAELHLVHWNT K YGDFGTAAQQP D GLAVVGVFL K VGDANPALQ K VLDALDSI K T K G K STDFPNFDPG S LLP NVL D YWTYPGSLTTP L LESVTWIVL K E P ISVSSQ Q ML K FR
7	$-1,29 \times 10^{-3}$	GF P K
8	$-1,30 \times 10^{-3}$	QSPVDIDT K AVVQDPAL K PLALVYGEATSR
9	$-1,31 \times 10^{-3}$	MVN N GH S FNVEYDDSQ D KAVL K DG P L T GT Y R

^a Z/Mr : Z = nombre de charge de molécule (mol), Mr : Masse molaire de molécule (g/mol).

La carte peptidique de la fig. 3.31a représente la CA-FAM digérée par GAT. On remarque qu'il y a un déplacement de l'EOF entre les deux cartes de la fig. 3.31. C'est à

cause du mauvais contrôle du pH durant l'analyse à pH 6,90. D'ailleurs, la digestion faite par GACT était de 4 h au lieu de celle faite pendant 24 h par la trypsine libre.

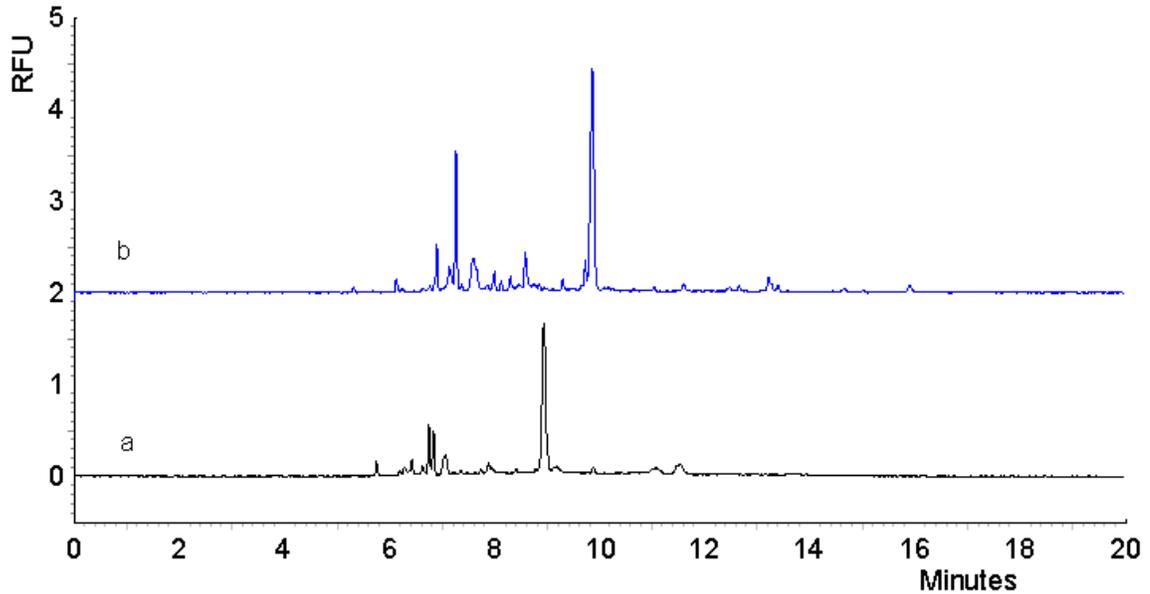


Figure 3.31 Comparaison des Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM digérée par la trypsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée pendant 4 h par GAT (CA:Enz = 1:250); b) digérée pendant 24 h par la trypsine libre (CA:Enz = 10:1).

3.5.5.3 Cartes peptidiques obtenues par la pepsine immobilisée

La pepsine est une endopeptidase qui n'est active qu'à pH acide. Elle coupe un polypeptide du côté C-terminal des résidus Phe (F), Leu (L) et Glu (E) [84]. Mais, selon le site génomique d'Expasy, elle peut aussi couper une protéine du côté C-terminal de Trp (W), de Gln (Q), d'Ala (A) et de Tyr (Y) [85]. Alors, les sites de coupures sont nombreux. Le tableau 3.6 montre les fragments fluorescents possibles lorsque la pepsine ne coupe qu'au C-terminal de Phe, de Leu et de Glu. La fig. 3.32 montre les cartes peptidiques obtenues par la pepsine immobilisée sur gel et libre. Pour identifier correctement tous les pics sur les cartes peptidiques, il faut coupler la CE avec la MS. En absence de cet outil et

après avoir fait une comparaison, on conclut qu'une heure de digestion par pepsine immobilisée est satisfaisante pour caractériser la CA-FAM.

Tableau 3.6 Peptides pepsiques théoriques de la CA-FAM

Ordre de sortie	Z/Mr ^a (mol/g/mol)	Fragments
1	$7,05 \times 10^{-4}$	KNRQVRGF
2	$-7,08 \times 10^{-4}$	CH ₃ CO-SHHWGYG K HNGPE
3	$-7,67 \times 10^{-4}$	H W H K D F
4	$-9,18 \times 10^{-4}$	V H W N T K Y G D F
5	$-1,22 \times 10^{-3}$	H T V D R K K Y A A E
6	$-1,23 \times 10^{-3}$	Q K V L
7	$-1,34 \times 10^{-3}$	R Q S P V D I D T K A V V Q D P A L
8	$-1,46 \times 10^{-3}$	K P L
9	$-1,57 \times 10^{-3}$	K V G D A N P A L
10	$-1,60 \times 10^{-3}$	K F
11	$-1,73 \times 10^{-3}$	P K
12	$-1,82 \times 10^{-3}$	D S I K T K G K S T D F P N F
13	$-2,30 \times 10^{-3}$	K D G P L
14	$-2,68 \times 10^{-3}$	Y D D S Q D K A V L
15	$-3,23 \times 10^{-3}$	K E

^a Z/Mr : Z = nombre de charge de molécule (mol), Mr : Masse molaire de molécule (g/mol).

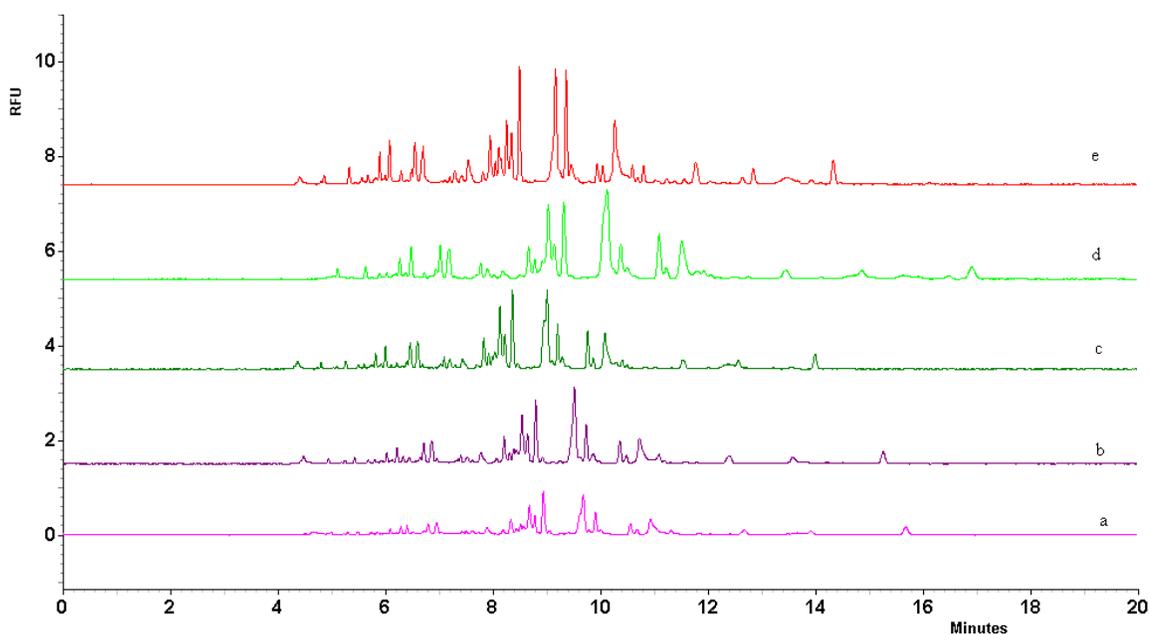


Figure 3.32 Électrophérogramme de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-6}$ M) digérée par la pepsine immobilisée et libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée par GELPEP pendant 1 h (CA:Enz = 1:2,7); b) digérée par GELPEP pendant 2 h (CA:Enz = 1:2,7); c) digérée par GELPEP pendant 3 h (CA:Enz = 1:2,7); d) digérée par GELPEP pendant 4 h (CA:Enz = 1:2,7); e) digérée par la pepsine libre pendant 24 h (CA:Enz = 10:1).

3.5.6 Reproductibilité de la méthode

3.5.6.1 Reproductibilité d'analyse électrophorétique

La cartographie peptidique est intimement liée à la reproductibilité du système analytique. La reproductibilité du temps de migration est le paramètre le plus important pour l'utilisation de la cartographie peptidique comme technique comparative. En CZE, l'adsorption de protéines et de peptides sur la paroi du capillaire est un problème important qui cause un temps de migration variable, un élargissement des pics et une traînée du pic, surtout avec un pH intermédiaire (pH 3,5-pH 8,0). Dans notre cas, le pH employé, 6,90, fait partie de cet intervalle de pH, donc il fallait préparer le tampon soigneusement. La moindre petite variation du pH de tampon de séparation affecte directement la reproductibilité de l'analyse. En effet, l'ordre de grandeur du flux électro-osmotique est directement relié à la charge présente sur la paroi du capillaire, donc directement relié au pH. La mobilité électro-

osmotique, μ_{eof} , est moins stable entre pH 3,5 et 8,0 [86]. D'ailleurs, le capillaire doit être bien conditionné. La fig. A-28 en annexe représente trois analyses successives du même échantillon et leurs temps de migration sont saisis et regroupés dans le tableau 3.7 où les données brutes et non corrigées sont présentées. Le tableau 3.7 montre que nous avons obtenu un écart-type relatif moyen de 0,12 % représentant une excellente reproductibilité du temps de migration.

Tableau 3.7 Reproductibilité des temps de migration en CZE pour la carte peptidique de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre

Temps de migration moyen (min) ^a	Écart-type relatif (%)	Temps de migration moyen (min)	Écart-type relatif (%)
4,58	0,04	7,28	0,11
4,68	0,00	7,39	0,11
4,84	0,04	7,56	0,12
5,29	0,06	7,94	0,15
5,52	0,09	8,04	0,13
5,59	0,08	8,18	0,14
5,67	0,06	8,30	0,14
5,75	0,06	8,45	0,15
5,87	0,06	8,58	0,13
5,95	0,08	8,83	0,14
6,04	0,08	9,35	0,15
6,24	0,05	9,67	0,15
6,29	0,10	9,82	0,17
6,42	0,08	10,07	0,42
6,63	0,04	10,23	0,19
6,78	0,08	11,42	0,19
6,86	0,10	11,68	0,23
6,93	0,13	12,19	0,22
7,17	0,11		
		Écart-type relatif moyen (%) (n = 3)	0,12

^a n = 3 injections

Les cartes peptidiques provenant de la digestion faite par la chymotrypsine ont été plus complètes que celles obtenues par la trypsine. La chymotrypsine peut couper du côté C-terminal du tryptophane (Trp, W), de la tyrosine (Tyr, Y), de la phénylalanine (Phe, F) et parfois de la leucine (Leu, L) et de la méthionine (Met, M). La CA compte 7 tryptophanes, 8 tyrosines, 11 phénylalanines, 26 leucines et 3 méthionines. En plus, il y a beaucoup de possibilités dans le marquage avec le FAMSE puisque les 18 lysines de la CA ne sont pas complètement marquées (tableau 3.2). Donc, il est impossible de désigner ces pics par CE-LIF. Pour les désigner, il faut les analyser par CE-MS (CE couplé à un spectromètre de masse). Par contre, notre objectif n'est pas d'identifier spécifiquement les pics mais d'utiliser les cartes peptidiques pour fin de comparaison entre deux différentes conditions de digestion ou fabrication de microréacteur enzymatique.

3.5.6.2 Reproductibilité du marquage

La reproductibilité du marquage a été évaluée en comparant les cartes peptidiques de la CA marquée en triplicata avec le FAMSE. Pour ce faire, le calcul des écart-types a été fait pour quatre pics choisis de la fig. 3.33 b et c. Le résultat montre qu'elle est relativement reproductible avec une moyenne d'écart-type relative de 9,6 % sur la hauteur du pic. L'échantillon du premier marquage (fig. 3.33a) a été congelé et décongelé une vingtaine de fois pour d'autres essais. Il a été donc dégradé. C'est pourquoi les signaux sont plus faibles, surtout pour le pic à 6,0 min et celui à 6,7 min. Alors, pour éviter la dégradation, il est fortement recommandé de diviser les dérivés en de petites aliquotes. Après 4 mois de stockage dans le congélateur (-20 °C), aucun pic de dégradation comme celui de dégradation de la CA-FITC n'a été observé. La CA-FAM est donc stable à -20 °C pendant quelques mois. L'autre facteur important qui affecte la reproductibilité de marquage est la qualité du FAMSE. Puisque le FAMSE est très sensible à l'eau, le nombre d'ouverture du bouchon de la bouteille de FAMSE influence fortement la qualité de FAMSE. Pour sa part, la FITC perd son efficacité après quatre ouvertures. Donc, pour le FAMSE, il est recommandé de faire des aliquotes.

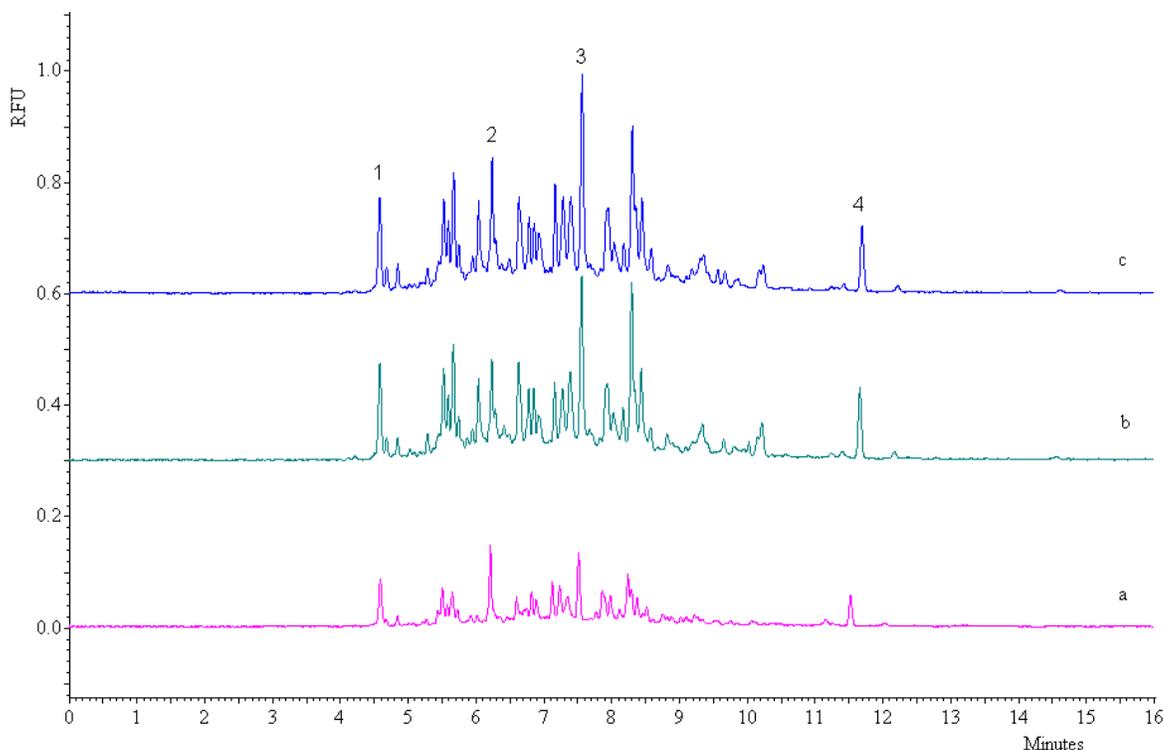


Figure 3.33 Cartes peptidiques CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-7}$ M) digérée par la chymotrypsine et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 1^{re} marquage; b) 2^{ième} marquage; c) 3^{ième} marquage.

3.5.6.3 Reproductibilité de la protéolyse

Comme mentionné dans l'introduction, l'avantage de l'utilisation des enzymes immobilisées est 1) de minimiser l'autolyse de l'enzyme, 2) de permettre sa réutilisation et 3) de faciliter l'automatisation. Migneault *et al* ont constaté que les enzymes immobilisées par GA et par CPG-GA n'ont pas subi une autolyse détectable [16, 75]. Ils ont aussi montré que les digestions par les enzymes immobilisées par GA et par CPG-GA sont reproductibles lorsqu'on effectue trois protéolyse consécutives du même échantillon avec la même préparation enzymatique.

La fig. 3.34 présente la reproductibilité de la digestion de la CA-FAM (trois aliquotes de $1,0 \times 10^{-8}$ M) par trois aliquotes de GACT. On a choisit 10 pics sur chaque électrophérogramme pour évaluer la reproductibilité du temps de migration et de la hauteur du pic. Les données saisies et le résultat sont présentés dans le tableau 3.8. La

reproductibilité du temps de migration est de 1,5 % (moyenne d'écart-type relative). En comparaison avec celle du tableau 3.7, elle est 10 fois plus élevée. En effet, Ses analyses effectuées à pH 6,90 se trouvent dans la région moins stable (pH 3,5~8,0) de la mobilité électro-osmotique [86]. En plus, dans cette région de pH, l'adsorption de peptides sur la paroi du capillaire pourrait causer une variation du temps de migration. Quant à la reproductibilité de la hauteur du pic, elle est de 19 % (moyenne d'écart-type relative). Plusieurs facteurs affectent ce résultat, incluant l'adsorption sur la paroi du capillaire. Par exemple, une mauvaise reproductibilité du temps de migration peut donner une reproductibilité insatisfaisante de l'aire du pic parce que ce dernier est fonction de la vitesse linéaire de l'analyte au moment qu'il passe au détecteur. Une intensité instable du laser affecte fortement l'intensité de fluorescence surtout pour une faible concentration telle 10^{-8} M. Malheureusement, la pression d'argon du laser semblait être faible durant cet essai. Tous ces aspects influencent la précision du système CE-LIF. Cependant, on admet que la méthode utilisée pour les prises de GACT (*i.e.*, un volume connu d'une suspension hétérogène) influence aussi le manque de précision. Une autre possibilité est liée à la différence de l'agitation manuelle entre ces trois digestions hétérogènes. Une digestion en 10^{-7} M avec une agitation rigoureuse aurait réglé ce problème si l'appareil avait bien fonctionné.

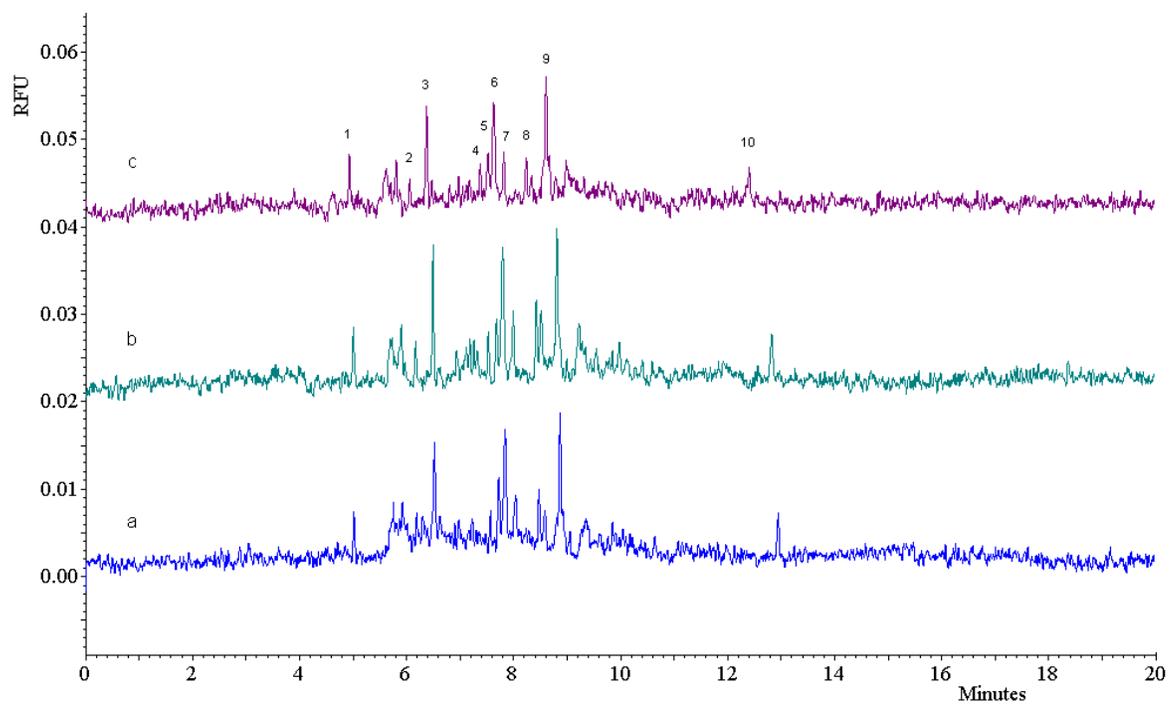


Figure 3.34 Électrophérogrammes CE-LIF de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-8}$ M) digérée par GACT (CA:CT = 1:83) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) 1^e aliquote de GACT; b) 2^e aliquote de GACT; c) 3^e aliquote de GACT.

Tableau 3.8 Reproductibilité des temps de migration et des hauteurs des pics en CE pour la carte peptidique de la CA-FAM ($1,0 \times 10^{-8}$ M) digérée par GACT

	pic	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Temps (min)	GACT1	5,02	6,19	6,52	7,57	7,72	7,84	8,04	8,47	8,87	12,95
	GACT2	5,01	6,17	6,50	7,53	7,69	7,80	7,99	8,43	8,81	12,82
	GACT3	4,93	6,06	6,38	7,35	7,53	7,63	7,82	8,24	8,61	12,41
	Moyenne	4,99	6,14	6,47	7,48	7,65	7,76	7,95	8,38	8,76	12,73
Écart-type relative (%) (n = 3)		0,92	1,2	1,2	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5	1,7	2,2
Moyenne d'écart-type relative (%)		1,5									
Hauteur de pic (RFU)	GACT1	0,0049	0,0035	0,0096	0,0042	0,0058	0,0109	0,0046	0,0062	0,0128	0,0045
	GACT2	0,0063	0,0045	0,0162	0,0068	0,0083	0,0144	0,0074	0,0089	0,0154	0,0057
	GACT3	0,0062	0,0039	0,0111	0,0040	0,0058	0,0116	0,0058	0,0063	0,0145	0,0042
	Moyenne	0,0058	0,0040	0,0123	0,0050	0,0066	0,0123	0,0059	0,0070	0,0142	0,0048
Écart-type relative (%) (n = 3)		13	13	28	31	22	15	24	21	10	17
Moyenne d'écart-type relative (%)		19									

3.5.7 Limite de détection de la méthode

3.5.7.1 Limite de détection instrumentale pour le CE-LIF

Un de nos objectifs secondaires de recherche était de trouver une méthode de modification chimique pour détecter une protéine à l'état de trace. La limite de détection par CE-LIF est présentée sur la fig. 3.35a et b et a été obtenue en effectuant des digestions en solutions très diluées avec un grand rapport Enz:CA et en analysant directement leurs digestats avec un volume injecté de 44 nL ($0,5 \text{ psi} \times 50 \text{ s}$). La limite de détection a été calculée à $3,0 \times 10^{-10}$ M (CA) avec un facteur S/N de 2,7 pour la séparation par CE-LIF de la CA-FAM digérée par GACT pendant 4 h (fig. 3.35a) et de $2,0 \times 10^{-10}$ M (CA) avec un facteur S/N de 4,3 pour celle de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre pendant 24 h (fig. 3.35b). Cette dernière est encore une carte peptidique lisible.

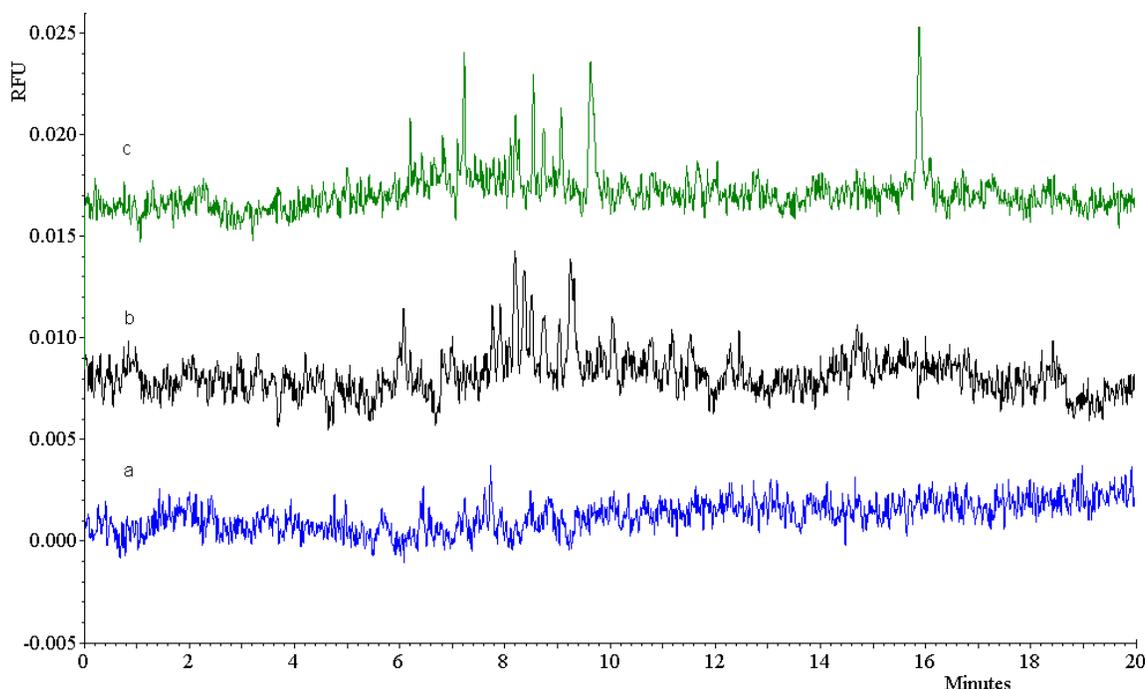


Figure 3.35 Limite de détection et de digestion - Électrophérogrammes CE-LIF analysés dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) CA-FAM digérée par GACT pendant 4 h à $3,0 \times 10^{-10}$ M, injection 0,5 psi, 50 s; $V_{inj} = 44$ nL; b) CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble pendant 24 h à $2,0 \times 10^{-10}$ M, injection 0,5 psi, 50 s, $V_{inj} = 44$ nL; c) CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble pendant 24 h à $1,0 \times 10^{-11}$ M et séchée et redissoute dans l'eau à $1,0 \times 10^{-9}$ M pour l'analyse.

3.5.7.2 Limite de digestion

Quant à la limite de digestion, elle est la concentration minimale de substrat nécessaire pour obtenir un bon signal après digestion. Dans notre cas, la concentration la plus basse de CA-FAM que nous avons utilisée pour une digestion de 24 h par la chymotrypsine libre était de $1,0 \times 10^{-11}$ M. Après la digestion, le digestat a été séché et redissous dans l'eau déionisée pour obtenir une solution à $1,0 \times 10^{-9}$ M de CA-FAM pour l'analyse par CE-LIF. L'injection a été fait par une pression de 0,5 psi pendant 10 s et le volume injecté était de 9 nL. La concentration à $1,0 \times 10^{-11}$ M représentait la limite de digestion de notre méthode. Cependant en théorie on peut aller plus bas. Il est important que la concentration d'enzyme soit gardée à un certain niveau lorsqu'un substrat est présent au niveau de traces. Chaque

carte peptidique de la fig. 3.35 a été analysée en triplicata et la reproductibilité de notre méthode était excellente avec un écart-type relatif de 8,9 %.

3.5.8 Validation de la méthode

Pour valider la méthode étudiée, huit solutions de la CA-FAM ayant les concentrations de $1,0 \times 10^{-9}$ M, $2,0 \times 10^{-9}$ M, $6,0 \times 10^{-9}$ M, $1,0 \times 10^{-8}$ M, $6,0 \times 10^{-8}$ M, $8,0 \times 10^{-8}$ M, $1,0 \times 10^{-7}$ M et $1,0 \times 10^{-6}$ M ont été digérées par la chymotrypsine libre pendant 24 h. Ensuite, les digestats ont été analysés en triplicata le même jour. La fig. 3.28 présente trois cartes peptidiques de la CA-FAM digérée de $1,0 \times 10^{-7}$ à $1,0 \times 10^{-9}$ M. Le pic qui correspond au pic à 8,74 min de la fig. 3.28a a été choisi pour tracer une courbe d'étalonnage. Cette dernière est présentée à la fig. 3.36. La région ($1,0 \times 10^{-9}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ M) de travail est linéaire avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0,9991.

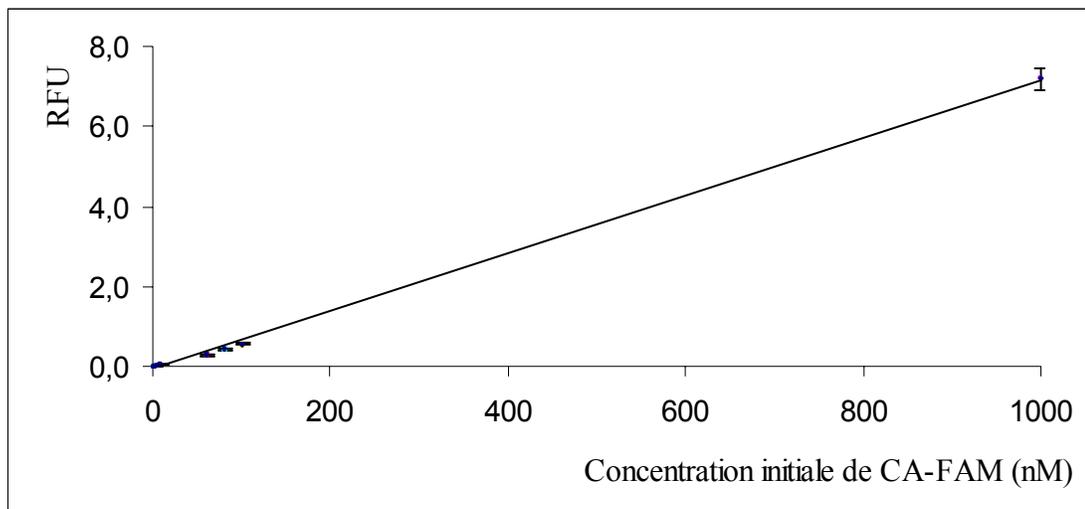


Figure 3.36 Courbe d'étalonnage de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine soluble et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. $y = 0,0072x - 0,0658$, $R^2 = 0,9991$.

3.5.9 Comparaison avec une procédure commerciale pour préparer les dérivés FAM

La trousse de Fluoro-Spin 498 pour marquage de protéines et pour purification est très facile d'emploi. La méthode utilisée dans cette trousse est aussi tout simplement décrite dans la littérature [40]. La préparation des échantillons est plus rapide surtout à l'étape de purification, qui est très simple à effectuer. En tout, la méthode commerciale a pris moins de temps que la nôtre. Ses cartes peptidiques et les nôtres sont obtenues en effectuant respectivement les deux marquages, les digestions et les analyses en même temps. Elles sont présentées à la fig. 3.37 où l'échantillon de marquage de 1 h était utilisé dans les séparations a et c, celui de 24 h était utilisé dans les cas b et d où a et b étaient digérés par GACT tandis que c et d étaient digérés par la chymotrypsine libre. Après la comparaison, une différence a été observée entre le marquage de 1 h et celui de 24 h. Sur les cartes peptidiques de marquage de 1 h, il manque un pic à $\sim 7,2$ min. Les autres différences reposent sur la hauteur des pics dues aux digestions homogènes et hétérogènes. Ceci dit, le marquage de 1 h a été jugé satisfaisant pour une carte peptidique caractéristique. Les deux inconvénients de la trousse Fluoro-Spin 498 sont le prix du réactif et la nécessité de substituer l'isomère 5(6)-FAMSE par le 6-FAMSE.

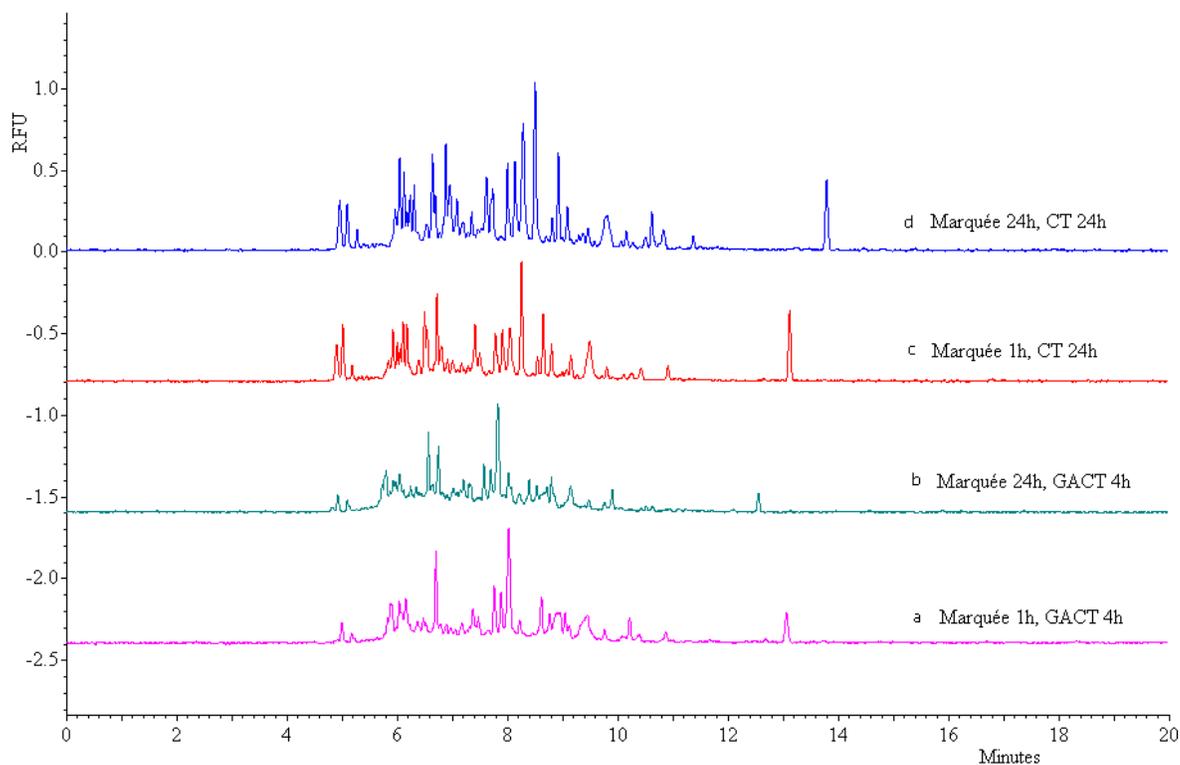


Figure 3.37 Comparaison des cartes peptidiques CE-LIF de CA marquée avec le FAMSE pendant 1 h et pendant 24 h, digérée par la chymotrypsine (libre et immobilisée) et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) marquée pendant 1 h et digérée par GACT pendant 4 h; b) marquée pendant 24 h et digérée par GACT pendant 4 h; c) marquée pendant 1 h et digérée par la chymotrypsine pendant 24 h; d) marquée pendant 24 h et digérée par la chymotrypsine pendant 24 h.

3.5.10 Carte peptidique de l'insuline chaîne B-FAM

L'insuline chaîne B, qui est disponible sous sa forme oxydée, provient du pancréas bovin et a une masse molaire de 3495,89 Da. Elle compte 30 résidus et sa séquence est la suivante :

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys(SO₃H)-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys(SO₃H)-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

Elle n'a que deux groupements amines primaires disponibles pour le marquage dont l'un est le N-terminal et l'autre est la lysine. Le N-terminal est plus facilement marqué à pH

8,50. En effet, il peut être marqué à pH 7,80 [30]. Les deux groupements amines de l'insuline chaîne B sont donc tous marqués à pH 8.50 dans notre cas. La trypsine peut couper au C-terminal de l'arginine (R) et de la lysine (K). Cependant, elle ne reconnaît plus la lysine lorsque cette dernière est modifiée avec un fluorophore. Donc, la trypsine ne coupe qu'à R en donnant deux fragments, comme démontré à la fig. 3.38. Après avoir calculé le Z/Mr, ces deux fragments sont assignés dans le tableau 3.9 où l'étoile montre le site de conjugaison du fluorophore.

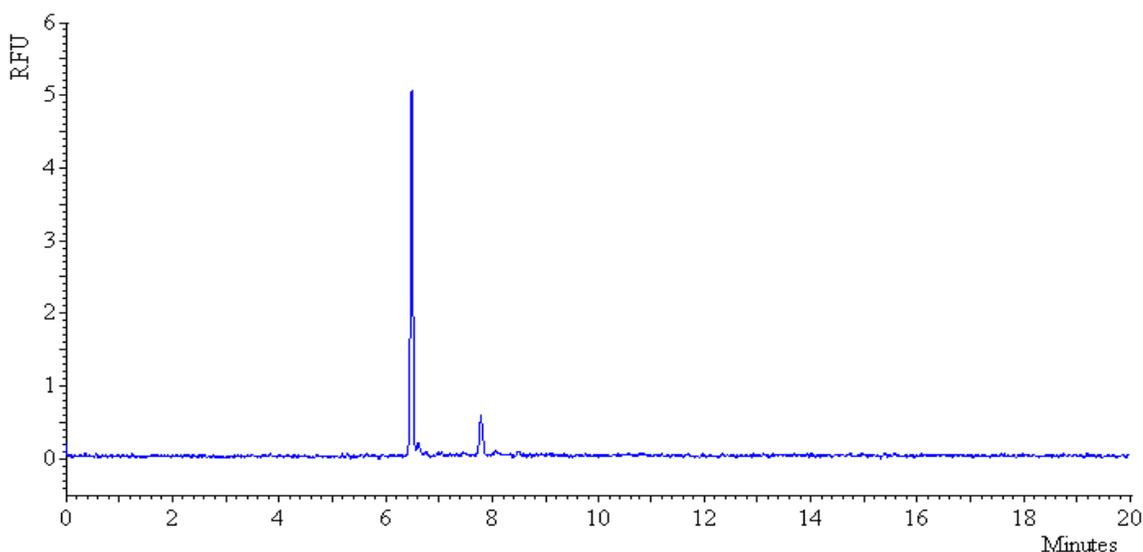


Figure 3.38 Carte peptidique de l'INB-FAM digérée par la trypsine libre et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90.

Tableau 3.9 Assignment des fragments peptidiques de l'insuline chaîne B digérée par la trypsine

Temps de migration (min)	Z/Mr ^a (mol/g/mol)	Fragment tryptique
6,5	$-8,08 \times 10^{-4}$	GFFFYTPK [*] A
7,8	$-1,33 \times 10^{-3}$	*FVNQHLC(SO ₃ H)GSHLVEALYLVC(SO ₃ H)GER

^a Z/Mr : Z = nombre de charge de molécule (mol), Mr : Masse molaire de molécule (g/mol).

Quant à la carte peptidique d'INB-FAM digérée par la chymotrypsine, elle est plus compliquée, car cette enzyme peut couper aux acides aminés W, Y et F ainsi qu'à la leucine (L) comme site de digestion secondaire. Selon les données d'Expasy [87] et en permettant les coupures après ces 4 résidus, on devait voir trois fragments fluorescents. Notre résultat (fig.3.39) correspond aux données de banque génomique d'Expasy, car nous avons obtenu 3 pics principaux. Ces derniers sont assignés dans le tableau 3.10. Les autres petits pics sur l'électrophérogramme proviennent peut-être d'impuretés.

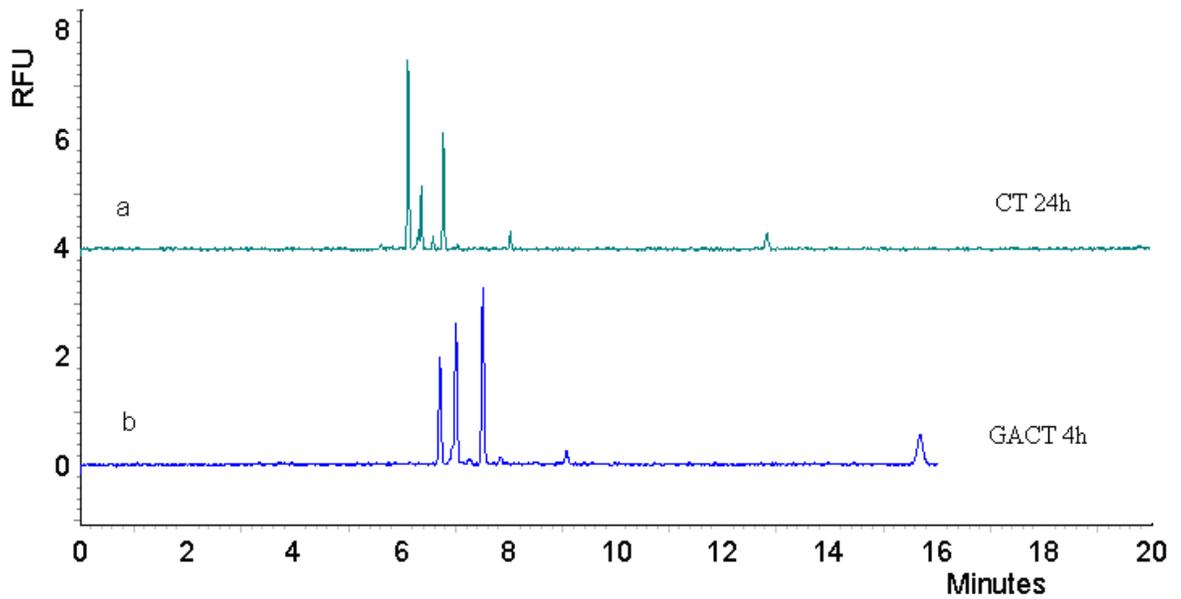


Figure 3.39 Carte peptidique de l'INB-FAM digérée par la chymotrypsine libre et par GACT et analysée dans un tampon phosphate 0,10 M pH 6,90. a) digérée par la chymotrypsine libre pendant 24 h; b) digérée par GACT pendant 4 h.

Tableau 3.10 Assignation des fragments peptidiques de l'insuline chaîne B digérée par GACT (fig. 3.39b). L'étoile montre le site de marquage avec le FAM.

Temps de migration (min)	Z/Mr ^a (mol/g/mol)	Fragment chymotrypsique
6,7	$-1,30 \times 10^{-3}$	*FVNQHL
7,0	$-2,59 \times 10^{-3}$	TPK*A
7,5	$-3,83 \times 10^{-3}$	*F

^a Z/Mr : Z = nombre de charge de molécule (mol), Mr : Masse molaire de molécule (g/mol).

4. Conclusions

Dans ce mémoire, trois marqueurs fluorescents ont été étudiés pour trois polypeptides et un acide aminé. Les substrats protéiques marqués ont été digérés par diverses enzymes solubles ou immobilisées et leurs digestats ont tous été analysés par CE-LIF. La méthode de marquage avec la FITC et celle avec le FAMSE sont suffisamment bonnes pour être mises en pratique telles quelles. En effet, la limite de détection obtenue par CE-LIF est satisfaisante et la concentration minimale de substrat avec laquelle nous avons travaillé pour la digestion est vraiment encourageante lorsqu'on prend en considération le fait qu'une protéine marquée de fluorophore n'est pas un substrat naturel pour ces enzymes. Les méthodes développées pourraient donc être utilisées pour un dosage des traces de protéines présentes dans un échantillon. Les avantages des projets de recherche du groupe Waldron sont qu'ils permettent de caractériser et d'évaluer la performance d'un microréacteur enzymatique.

4.1 Marquage des protéines

Les trois méthodes de marquage étudiées utilisaient un des fluorophores suivants : le NDA, la FITC et le FAMSE. Parmi ces trois méthodes, le marquage avec le NDA n'a pas été poursuivi à cause d'un important problème de solubilité. Pour régler ce problème, on pourrait modifier le pourcentage de solvant organique DMSO. La méthode de marquage avec la FITC a été modifiée de celle de Lau *et al.* [38]. Elle est donc au point et peut être utilisée pour marquer des protéines utilisées en évaluation de microréacteur. Malgré que le dérivé FITC ne soit pas suffisamment stable pour un entreposage à long terme et pour une longue digestion, la FITC est utilisée fréquemment pour marquer des biomolécules [1, 44]. Après avoir comparé la stabilité du substrat marqué fluorescent, nous concluons que le marquage employant le FAMSE est le meilleur, puisque le dérivé FAM est très stable dans le temps. Le marquage avec le FAMSE est donc au point et peut d'être employé pour marquer des protéines, car il est basé sur la méthode de Banks *et al.* [39]. Les conditions de marquage telles que le tampon et le ratio fluorophore/-NH₂ sont identiques à celles de la

méthode routinière commerciale (la trousse de marquage Fluospin 498) [40]. Cependant, le temps de marquage et la colonne Sephadex utilisée pour la purification sont différents. En résumé, le FAMSE est le plus approprié pour marquer une protéine pour étudier les enzymes protéolytiques par la cartographie peptidique. Il est aussi approprié pour marquer les protéines à l'état de trace.

4.2 Digestions

Les enzymes immobilisées ont montré des performances supérieures par rapport à celles solubles. Elles étaient très efficaces et reproductibles. Parmi les enzymes employées, nous avons trouvé que la chymotrypsine (CT) avait une meilleure performance par rapport à la trypsine et que la digestion par GACT était plus efficace. En effet, la reproductibilité de la digestion par GACT était de 19 % en moyenne ($n = 3$) sur la hauteur de pic et de 1,5 % sur le temps de migration. Ce dernier résultat est semblable à la reproductibilité obtenue par Migneault *et al.* et par Bonneil *et al.* [16, 20]. Par contre, ils n'ont pas donné les informations de reproductibilités sur l'aire de pic. La GACT était bien reproductible et il serait pertinent de l'utiliser pour fabriquer un microréacteur. La digestion par GACT et la chymotrypsine libre ne nous permettait pas d'avoir des cartes peptidiques de la CA à des concentrations inférieures à $2,0-3,0 \times 10^{-10}$ M. Cette concentration est de 200000 fois plus basse que celle de la méthode développée par Bonneil *et al.* ($4,0 \times 10^{-5}$ M) [20]. Cependant, lorsque la digestion par la chymotrypsine libre a été effectuée à une concentration de $1,0 \times 10^{-11}$ M et le digestat a été concentré à $1,0 \times 10^{-9}$ M par évaporation du solvant pour l'analyse, une carte peptidique acceptable a été obtenue. Les résultats obtenus nous encouragent à faire une étude plus approfondie pour trouver la limite réelle de digestion, qui serait de l'ordre du picomolaire. En résumé, la reproductibilité et la sensibilité de l'enzyme immobilisée sont satisfaisantes pour effectuer une analyse qualitative et quantitative des traces de protéines.

Il serait intéressant de fabriquer des microréacteurs avec des billes de GACT ou de CPG-CT.

4.3 Cartographie peptidique

Les cartes peptidiques ont été obtenues par la digestion des substrats marqués fluorescents en utilisant trois types d'enzymes. La carte peptidique du substrat LACT-NDA n'a pas été mise au point à cause de problèmes de solubilité et de stabilité. Les cartes peptidiques du substrat CA-FITC se font préférentiellement avec une digestion rapide, afin de diminuer l'impact de l'hydrolyse du dérivé FITC. La reproductibilité d'analyse par CE-LIF est excellente avec un écart-type moyen relatif de 0,12 % sur le temps de migration. Ce résultat est meilleur que celui obtenu par Migneault *et al.* (1,5 %) [16]. En effet, une telle reproductibilité permet d'obtenir des cartes peptidiques de substrats ayant des concentrations de $1,0 \times 10^{-7}$ à $1,0 \times 10^{-9}$ M. Elle permet aussi d'obtenir la limite de détection de $3,0 \times 10^{-10}$ M (S/N = 2,7) pour la digestion par GACT et de $2,0 \times 10^{-10}$ M (S/N = 4,3) pour la digestion par la chymotrypsine libre. Par comparaison à la littérature, Becker *et al.* ont obtenu une limite de détection de $0,9 \times 10^{-10}$ M pour la séparation CE-LIF [73]. La nôtre est environ 2 fois plus élevée donc assez proche. D'autre part, notre méthode montre une courbe d'étalonnage linéaire allant de $1,0 \times 10^{-6}$ à $1,0 \times 10^{-9}$ M. Tous ces éléments valident la méthode développée. Étant très efficace et très sensible, la méthode développée est suffisamment bonne pour être utilisée dans l'identification de protéines avec une carte peptidique.

Il serait intéressant d'avoir des cartes peptidiques par CE-MS afin d'améliorer l'identification et la sélectivité de la méthode.

4.4 Limitations de la méthode

Parmi les trois méthodes de marquage étudiées dans ce projet, celle avec le NDA possédait des problèmes de solubilité et de stabilité. Le substrat marqué n'était pas très adéquat pour une longue digestion. Le marquage fluorescent avec la FITC était encore satisfaisant pour l'étude par carte peptidique même si le dérivé FITC n'était pas très stable dans le temps. La carte peptidique contenait souvent un pic de dégradation, lorsque la digestion était effectuée pendant une durée de plus d'une heure. La conjugaison

fluorescente avec le FAMSE s'est révélée être une excellente méthode. Les détections du substrat CA-FAM jusqu'à $1,0 \times 10^{-10}$ M démontrent que l'enzyme et donc un microréacteur peuvent caractériser les protéines à cette concentration.

4.5 Développements futurs

Pendant cette étude, la trypsine et la chymotrypsine ont été immobilisées sur des billes de CPG-aminopropylée par le 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide méthiodide (EDC) en utilisant la méthode de Hussein [56] et plusieurs microréacteurs ont été fabriqués avec ces billes en verre. Les microréacteurs fonctionnaient et des cartes peptidiques ont été obtenues. Cependant, on a rencontré un problème lorsque la protéine marquée s'adsorbait sur les billes pendant la digestion à cause d'interactions avec les particules. Cela affectait donc la limite de détection de la méthode. Une étude plus approfondie de la méthode d'immobilisation sur les billes de verre devra être faite dans un travail futur. Aussi, on pourrait fabriquer des microréacteurs avec des billes d'agarose ou avec une enzyme immobilisée par GA, car ils ne causent pas d'adsorption non spécifique de la protéine. Mais, c'est un défi!

Une autre étude plus approfondie des conditions de réticulation et de la cinétique de GACT devra être faite dans un travail futur, afin de déterminer les conditions de réticulation où l'activité de la GACT serait la meilleure. La limite de marquage de notre méthode devra ensuite être déterminée. En plus, la limite de détection devra être vérifiée par un microréacteur. Pour ce faire, il faut tout d'abord résoudre le problème d'adsorption de la protéine sur la phase solide dans le microréacteur. Un marquage en colonne couplée à un microréacteur en colonne pourrait aussi être étudié dans un travail futur.

On pourrait continuer ce projet avec CE-MS et éliminer l'étape de marquage. Ceci permettrait de bien définir la structure des peptides. Cependant, il est possible que la limite de détection par MS ne soit pas plus basse que celle de LIF.

5. Références

1. Kremser, L., et al., *Fluorescence Labeling of Human Rhinovirus Capsid and Analysis by Capillary Electrophoresis*. Anal. Chem., 2004. **76**: p. 4175-4181.
2. Heiger, D., R. Grimm, and M. Herold, *Peptide Mapping and Analysis Using Capillary Electrophoresis*, in *Agilent Technologies*. 1993, Agilent Technologies Inc.: Mississauga CA.
3. Puri, R.K. and D.O. Toft, *Peptide Mapping Analysis of the Avian Progesterone Receptor*. J. Biol. Chem., 1986. **261**(12): p. 5651-5657.
4. Cobb, K.A. and M.V. Novotny, *Peptide Mapping of Complex Proteins at the Low-Picomole Level with Capillary Electrophoretic Separations*. Anal. Chem., 1992. **64**(8): p. 879-886.
5. Cobb, K.A. and M. Novotny, *High-Sensitivity Peptide Mapping by Capillary Zone Electrophoresis and Microcolumn Liquid Chromatography, Using Immobilized Trypsin for Protein Digestion*. Anal. Chem., 1989. **61**(20): p. 2226-2231.
6. Ye, M., et al., *On-line protein digestion and peptide mapping by capillary electrophoresis with post-column labeling for laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2004. **25**: p. 1319–1326.
7. Yang, Z. and S.C. Beale, *Investigation of Chemical Modification of Peptide Amine Groups for Compatibility with Fluorescent Labeling and Capillary Electrophoresis*. J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech., 1998. **21**(11): p. 1591-1611.
8. Fadnavis, N.W., et al., *Highly Efficient “Tight Fit” Immobilization of α -Chymotrypsin in Mesoporous MCM-41: A Novel Approach Using Precursor Immobilization and Activation*. Biotechnol. Prog., 2003. **19**(2): p. 346-351.
9. Suzawa, V.M., et al., *Suspended and Immobilized Chymotrypsin in Organic Media: Structure-Function Relationships Revealed by Electron Spin Resonance Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 1995. **117**(32): p. 8435-8440.
10. Wang, H., S. Liu, and Y. Wang, *Immobilization of Chymotrypsin with Interpolymer Complexes of P(TM- co-AAm)/PAA*. J. Appl. Polym. Sci., 2001. **81**(8): p. 2013-2018.
11. Goto, M., C.J. Medeiros, and T.A. Hatton, *Novel liquid immobilized chymotrypsin as nanostructural bioreactor units*. Biotechnol. Tech., 1997. **11**(3): p. 141-143.
12. Ethier, M., et al., *The Proteomic Reactor: A Microfluidic Device for Processing Minute Amounts of Protein Prior to Mass Spectrometry Analysis*. J. Proteome Res., 2006. **5**: p. 2754-2759.
13. Porter, D.H., H.E. Swaisgood, and G.L. Catignani, *Characterization of an Immobilized Digestive Enzyme System for Determination of Protein Digestibility*. J. Agric. Food Chem., 1984. **32**(2): p. 334-339.

14. Tao, G. and S. Furusaki, *Synthesis of Porous Polymer Carrier and Immobilization of α -Chymotrypsin*. Polym. J., 1995. **27**(2): p. 111-121.
15. Hall, C.E., D. Datta, and E.A.H. Hall, *Parameters which influence the optimal immobilisation of oxidase type enzymes on methacrylate copolymers as demonstrated for amperometric biosensors*. Anal. Chim. Acta, 1996. **323**: p. 87-96.
16. Migneault, I., et al., *Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry* Electrophoresis, 2004. **25**: p. 1367-1378.
17. Mohapatra, S.C. and J.T. Hsu, *Time Dependent Behaviour of the Cross-linking Reaction of α -Chymotrypsin with Glutaraldehyde*. Biotechnol. Tech., 1994. **8**(1): p. 13-16.
18. Anonyme, *Crosslinking Reagents-Technical Handbook*. 2007, Pierce Biotechnology Inc.: Rockford USA. p. 1-48.
19. Kim, M.I., et al., *Crosslinked Enzyme Aggregates in Hierarchically-Ordered Mesoporous Silica: A Simple and Effective Method for Enzyme Stabilization*. Biotechnol. Bioeng., 2007. **96**(2): p. 210-218.
20. Bonneil, E., M. Mercier, and K.C. Waldron, *Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis*. Analytica Chimica Acta, 2000. **404**: p. 29-45.
21. Albin, M., et al., *Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis: Evaluation of Derivatizing Reagents and Techniques*. Anal. Chem., 1991. **63**(5): p. 417-422.
22. Coble, P.G. and A.T. Timperman, *Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor*. J. Chromatogr. A, 1998. **829**: p. 309-315.
23. Nerurkar, M.M., et al., *Selective fluorogenic derivatization of a peptide nucleic acid trimer with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde*. J. Pharm. Biomed. Anal., 1997. **15**: p. 945-950.
24. Prata, C., et al., *Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**: p. 4129-4138.
25. Watzig, H. and S. Gunter, *Capillary Electrophoresis – A High Performance Analytical Separation Technique*. Clin Chem Lab Med, 2003. **41**(6): p. 724-738.
26. Rouessac, F. and A. Rouessac, *Analyse chimique -Méthodes et techniques instrumentales modernes*. 5 ed. 2000, Paris: DUNOD. 430.
27. Anonyme, *User's Guide for 32 Karat - Software Version 4.0*. 2000, Beckman-Coulter Inc.: Fullerton USA. p. 92.
28. Paquette, D.M., et al., *Capillary electrophoresis with laser-induced native fluorescence detection for profiling body fluids*. J. Chromatogr. B, 1998. **714**: p. 47-57.
29. Anonyme, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 2008, Molecular Probes Inc.: Carlsbad USA.

30. Brinkley, M., *A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Cross-Linking Reagents*. *Bioconjugate Chem.*, 1992. **3**(1): p. 2-13.
31. Meanst, G.E. and R.E. Feeney, *Chemical Modifications of Proteins: History and Applications*. *Bioconjugate Chem.*, 1990. **1**(1): p. 2-12.
32. Anonyme, *Amine-Reactive Probes*. 2005, Molecular Probes Inc.: Carlsbad USA.
33. Saito, K., et al., *Determination of Polyamines in Foods by Liquid Chromatography with On-Column Fluorescence Derivatization*. *Anal. Sci.*, 1992. **8**: p. 675-680.
34. Montigny, P.d., et al., *Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide Ion: A Rationally Designed Fluorogenic Reagent for Primary Amines*. *Anal. Chem.*, 1987. **59**(8): p. 1096-1101.
35. Zhang, L.-Y. and M.-X. Sun, *Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection*. *J. Chromatogr. A*, 2004. **1040**: p. 133-140.
36. Robert, F., et al., *Capillary Zone Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection for the Determination of nanomolar Concentration of Noradrenaline and Dopamine: Application to Brain Microdialysate Analysis*. *Anal. Chem.*, 1995. **67**(11): p. 1838-1844.
37. Ye, M., et al., *Post-column fluorescence derivatization of proteins and peptides in capillary electrophoresis with a sheath flow reactor and 488 nm argon ion laser excitation*. *J. Chromatogr. A*, 2004. **1022**: p. 201–206.
38. Lau, S.K., et al., *Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidyl ester for fluorescence detection in capillary electrophoresis*. *J. Chromatogr. A*, 1998. **809**: p. 203-210.
39. Banks, P.R. and D.M. Paquette, *Comparison of Three Common Amine Reactive Fluorescent Probes Used for Conjugation to Biomolecules by Capillary Zone electrophoresis*. *Bioconjugate Chem.*, 1995. **6**(4): p. 447-458
40. Alfonso, C., et al., *Quantification of yessotoxin using the fluorescence polarization technique and study of the adequate extraction procedure*. *Anal. Biochem.*, 2005. **344**: p. 266–274.
41. Gu, Y.-S. and C.-W. Whang, *Capillary electrophoresis of baclofen with argon-ion laser-induced fluorescence detection*. *J. Chromatogr. A*, 2002. **972**: p. 289–293.
42. Relf, O.-W., et al., *Fluorescein Isothiocyanate-Labeled Protein G as an Affinity Ligand in Affinity/Immunocapillary Electrophoresis with Fluorescence Detection*. *Anal. Chem.*, 1994. **66**(22): p. 4027-4033.
43. Anonyme, *Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) for biochemistry and for fluorescence microscopy*, in *Microscopy*. 2004, Merck KGaA Inc.: Darmstadt Germany. p. 1.

44. Konecni, T. and F. Kilar, *Monitoring of the conjugation reaction between human serum transferrin and fluorescein isothiocyanate by capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A, 2004. **1051**: p. 135–139.
45. Majima, E., et al., *Specific Labeling of the Bovine Heart Mitochondrial Phosphate Carrier with Fluorescein 5-Isothiocyanate*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(13): p. 9792–9799.
46. Schnaible, V. and M. Przybylski, *Identification of Fluorescein-5-Isothiocyanate-Modification Sites in Proteins by Electrospray-Ionization Mass Spectrometry*. Bioconjugate Chem., 1999. **10**(5): p. 861-866.
47. Krull, I.S., et al., *Labeling reactions applicable to chromatography and electrophoresis of minute amounts of proteins*. J. Chromatogr. B., 1997. **699**: p. 173-208.
48. Banks, P.R. and D.M. Paquette, *Monitoring of a conjugation reaction between fluorescein isothiocyanate and myoglobin by capillary zone electrophoresis*. J. Chromatogr. A., 1995. **693**: p. 145-154.
49. Barth, H.G., B.E. Boyes, and C. Jackson, *Size Exclusion Chromatography and Related Separation Techniques*. Anal. Chem., 1998. **70**(12): p. 251R-278R.
50. Sauterer, R.A. and J. Jones, *A Rapid, Simple & Inexpensive Experiment in Gel Filtration Chromatography*. Amer. Biol. Teacher, 2000. **62**(8): p. 602-607.
51. Salplachta, J., P. Rehulka, and J. Chmelik, *Identification of proteins by combination of size-exclusion chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests*. J. Mass Spectrom., 2004. **39**: p. 1395-1401.
52. Bui MH, et al., *Carbonic anhydrase IX is an independent predictor of survival in advanced renal clear cell carcinoma: implications for prognosis and therapy*. Clin Cancer Res., 2003. **9**(2): p. 802-811.
53. Jiang, Y. and C.S. Lee, *On-line coupling of micro-enzyme reactor with micro-membrane chromatography for protein digestion, peptide separation, and protein identification using electrospray ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 2001. **924**: p. 315–322.
54. Temporini, C., et al., *Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs*. J. Chromatogr. A, 2006. **1120**: p. 121-131.
55. Calleri, E., et al., *Trypsin-Based Monolithic Bioreactor Coupled On-Line with LC/MS/MS System for Protein Digestion and Variant Identification in Standard Solutions and Serum Samples*. J. Proteome Res., 2005. **4**: p. 481-490.
56. Hamad, H., *Études des méthodes d'immobilisation d'enzyme (trypsine) sur un support soide pour la cartographie peptidique par microréacteur (mémoire de maîtrise)*, in Département de chimie. 2003, Université de Montréal: Montréal. p. 90.

57. Chiu, D.T., et al., *Probing Single Secretory Vesicles with Capillary Electrophoresis*. Sci., 1998. **279**: p. 1190-1193.
58. Little, M.J., et al., *Single-label fluorescent derivatization of peptides*. Anal. Chim. Acta, 1997. **339**: p. 279-288.
59. Migneault, I., et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. BioTechniques, 2004. **37**(5): p. 790-802.
60. Roach, M.C. and M.D. Harmony, *Determination of Amino Acids at Subfemtomole Levels by High-Performance Liquid Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection*. Anal. Chem., 1987. **59**(3): p. 411-415.
61. Gilman, S.D. and A.G. Ewing, *Analysis of Single Cells by Capillary Electrophoresis with On-Column Derivatization and Laser-Induced Fluorescence Detection*. Anal. Chem., 1995. **67**(1): p. 58-64.
62. Dong, Q., et al., *Method of intracellular naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization for analysis of amino acids in a single erythrocyte by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection*. J. Chromatogr. A, 2002. **959**: p. 269-279.
63. Manica, D.P., et al., *Analysis of the stability of amino acids derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry*. Anal. Biochem., 2003. **322**: p. 68-78.
64. Tsai, C.-H., H.-M. Huang, and C.-H. Lin, *Violet light emitting diode-induced fluorescence detection combined with on-line sample concentration techniques for use in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2003. **24**: p. 3083-3088.
65. Craig, D.B. and N.J. Dovichi, *Multiple Labeling of Proteins*. Anal. Chem., 1998. **70**: p. 2493-2494.
66. Hay, R.W., *Bio-inorganic Chemistry*. 1984, England: Ellis Horwood Limited.
67. Filippi-Foveau, D., et al., *Structure primaire de l'anhydrase carbonique érythrocytaire bovine CI: I. - Peptides tryptiques* Biochimie, 1976. **58**(9): p. 1057-1070.
68. Sciaky, M., et al., *Structure primaire de l'anhydrase carbonique érythrocytaire bovine CI: II.- Séquence complète*. Biochimie, 1976. **58**(9): p. 1071-1082.
69. Wu, S. and N.J. Dovichi, *High-sensitivity fluorescence detector for fluorescein isothiocyanate derivatives of amino acids separated by capillary zone electrophoresis*. J. Chromatog., 1989. **480**: p. 141-155.
70. Molina, M. and M. Silva, *Analytical potential of fluorescein analogues for ultrasensitive determinations of phosphoruscontaining amino acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 1096-1103.

71. Dabek-Zlotorzynska, E. and W. Maruszak, *Determination of dimethylamine and other low-molecular-mass amines using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. J. Chromatogr. B, 1998. **714**: p. 77-85.
72. Banks, P.R., *Fluorescent derivatization for low concentration protein analysis by capillary electrophoresis*. Trends anal. chem., 1998. **17**(10): p. 612-622.
73. Becker, A., et al., *Simultaneous analysis of sulfur-containing excitatory amino acids using micellar electrokinetic chromatography with diode array and laser-induced fluorescence detection*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 2457-2464.
74. Liu, H., et al., *Homogeneous fluorescent derivatization of large proteins*. J. Chromatogr. A, 2001. **927**: p. 77-89.
75. Migneault, I., *Réticulation de la trypsine avec le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique par électrophorèse capillaire, chromatographie liquide et spectrométrie de masse (mémoire de maîtrise)*, in *Département de Chimie*. 2004, Université de Montréal: Montréal. p. 146.
76. Tomimatsu, Y., et al., *Physical chemical observations on the α -chymotrypsin glutaraldehyde system during formation of an insoluble derivative*. J. Colloid Interface Sci, 1971. **36**(1): p. 51-64.
77. Anonyme, *α -Chymotrypsin TLCK Treated from bovine pancreas*. 2008, Sigma-Aldrich Inc.
78. Anonyme. *chymotrypsin*. 2008 [cited 2008 0403]; Available from: <http://www.worthington-biochem.com/CHY/default.html>.
79. ExPASy. *Peptide Cutter*. 2008 [cited 2008 0403]; Available from: <http://www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>.
80. Chang, S.Y. and F.-Y. Wang, *Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and acetonitrile stacking technique*. J. Chromatogr. B, 2004. **799**: p. 265–270.
81. Dasgupta, P.K. and K. Surowiec, *Electromigration Injection from a Small Loop in Capillary Electrophoresis* Anal. Chem., 1996. **68**(23): p. 4291-4299.
82. Voyksner, R.D., D.C. Chen, and H.E. Swaisgood, *Optimization of immobilized enzyme hydrolysis combined with high-performance liquid chromatography/thermospray mass spectrometry for the determination of neuropeptides* Anal. Biochem., 1990. **188**(1): p. 72-81.
83. Nguyen, Q.V., *Développement d'un microréacteur à base d'enzyme protéolytique réticulée par le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique (mémoire de maîtrise)*, in *Département de chimie*. 2008, Université de Montréal: Montréal. p. 118.
84. Anonyme. *Pepsin from porcine gastric mucosa*. 2008 [cited 2008 0403]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/P6887>.
85. ExPASy. *CAH2_BOVIN (P00921) by pepsin*. 2008 [cited 2008 0403]; Available from: <http://www.expasy.org/cgi-bin/peptide-mass.pl>.

86. Beaudoin, M.-È., *Développement de méthodes de séparation des oligosaccharides de chitine et de chitosane par électrophorèse capillaire (mémoire de maîtrise)*, in *Département de chimie*. 2005, Université de Montréal: Montréal. p. 116.
87. Expasy. *Peptide Cutter Insulin*. 2008 [cited 2008 0403]; Available from: <http://www.expasy.org/cgi-bin/peptidecutter/peptidecutter.pl>.

Annexes

Tableau A-1 Méthode de séparation par CE-LIF sur le Beckman Coulter P/ACE MDQ

	Temps (min)	Événement	Valeur	Durée	Fiole d'entrée ^a	Fiole de sortie ^b	Information	Solution de BI et de BO
1		Attendre		0,1 min	BI : A5	BO : A1		Méthanol
2		Attendre		0,1 min	BI : A1	BO : A1		H ₂ O
3		Rincer-Pression	50,0 psi	2,5 min	BI : A3	BO : A3		NaOH 0,10 M
4		Attendre		0,1 min	BI : A1	BO : A1		H ₂ O
5		Rincer-Pression	50,0 psi	2,5 min	BI : A2	BO : A2		H ₂ O
6		Rincer-Pression	50,0 psi	2,5 min	BI : A4	BO : A4		Tampon
7		Injecter-Pression	0,5 psi	10,0 sec	SI : B1	BO : A4		Échantillon
8		Injecter-Pression	0,5 psi	5,0 sec	BI : E1	BO : A4		Tampon
9		Attendre		0,03 min	BI : E1	BO : A5		Tampon
10	0,00	Séparer-Voltage	30,0 kV		BI : B1	BO : B1	0,17 min rampe, polarité normale ^c	pH 6,90 Phosphate 0,10 M
11	0,01	Autozéro		20,0 min				
12	20,01	Terminer						

^a BI = buffer inlet; A5 = position A5 dans l'auto échantillonneur.

^b BO = buffer outlet.

^c Le voltage est appliqué par un rampe linéaire de 0 à 30 kV sur 0,17 min.

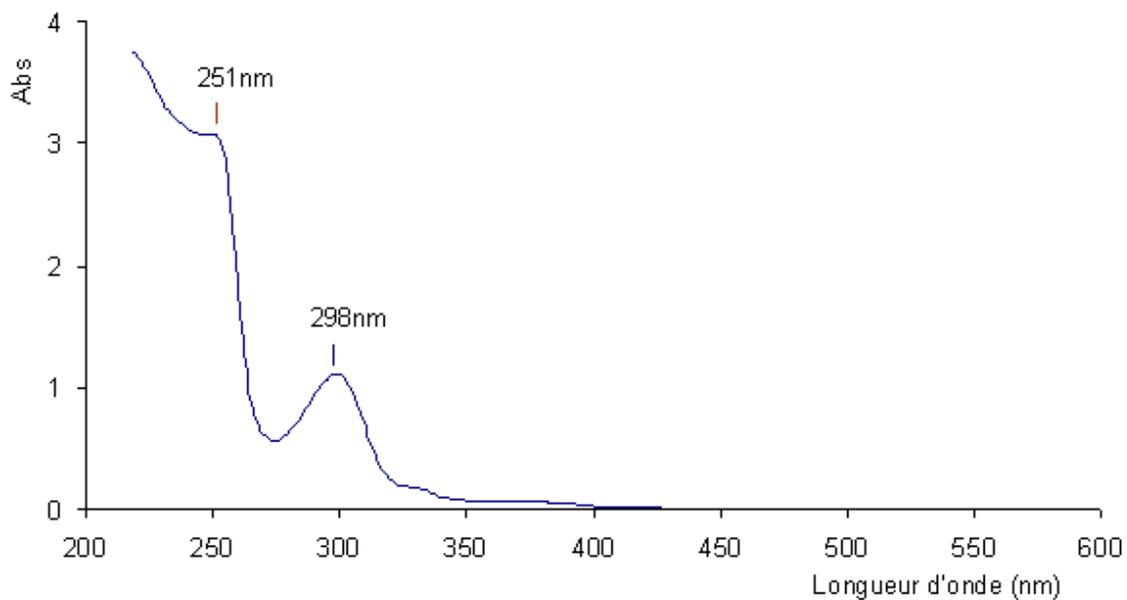


Figure A-1 Spectre d'absorbance du DMSO, la référence est l'eau déionisée.

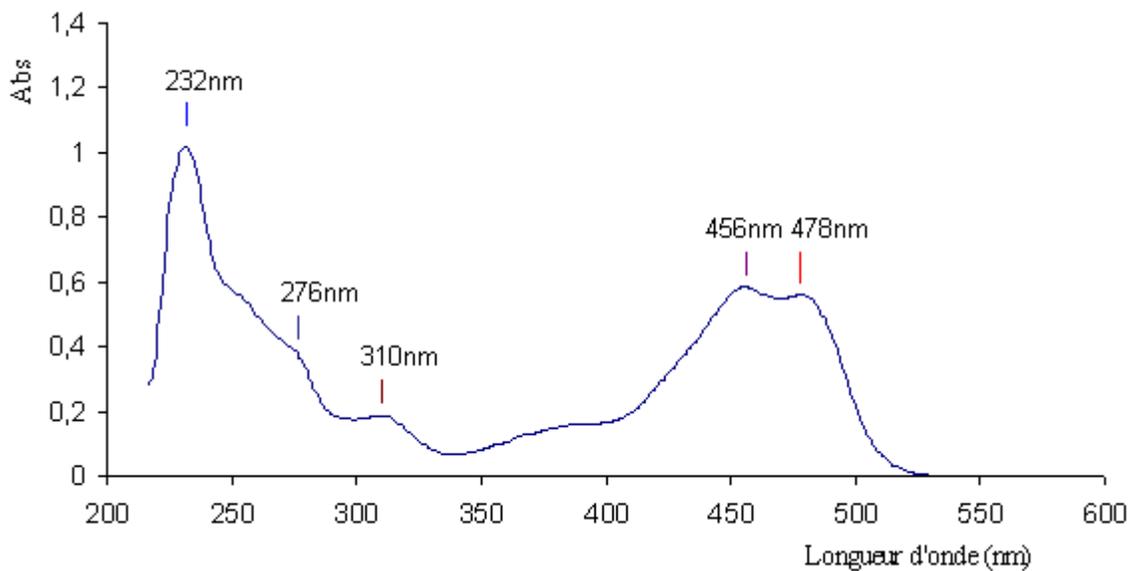


Figure A-2 Spectre d'absorbance du 5(6)-FAMSE dans l'eau après 2 min de préparation. La référence est 0,10 % (v/v) de DMSO dans l'eau déionisée.

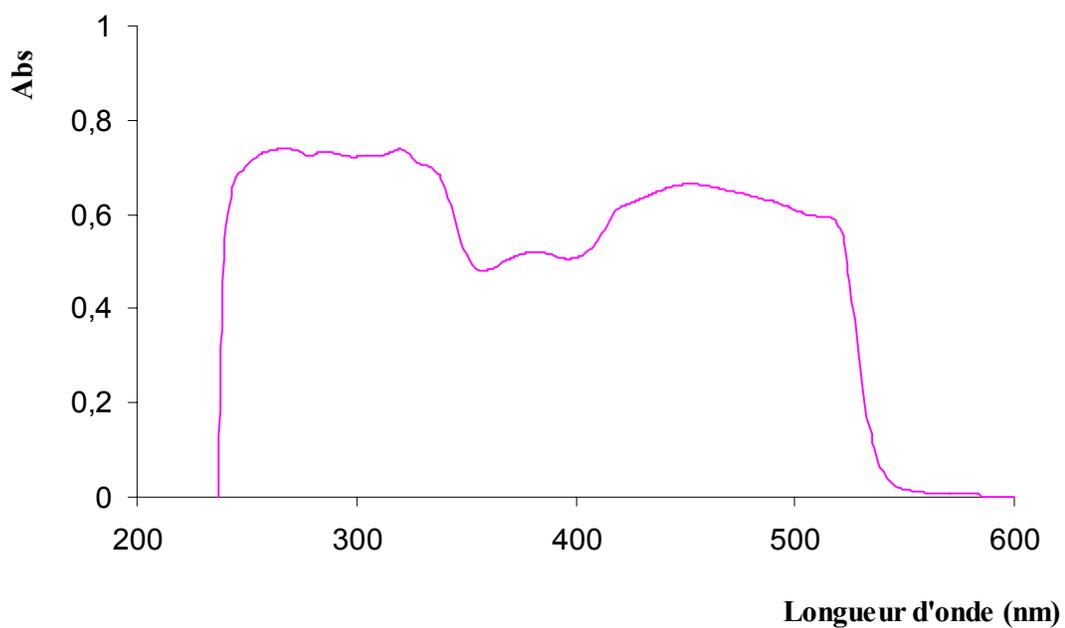


Figure A-3 Spectre d'absorbance du NaHCO₃-FAM, La composition de référence est 16 % (v/v) de NaHCO₃ (0,10 M), 2,3 % (v/v) de DMSO et 1,1 % (v/v) de NH₂-OH.

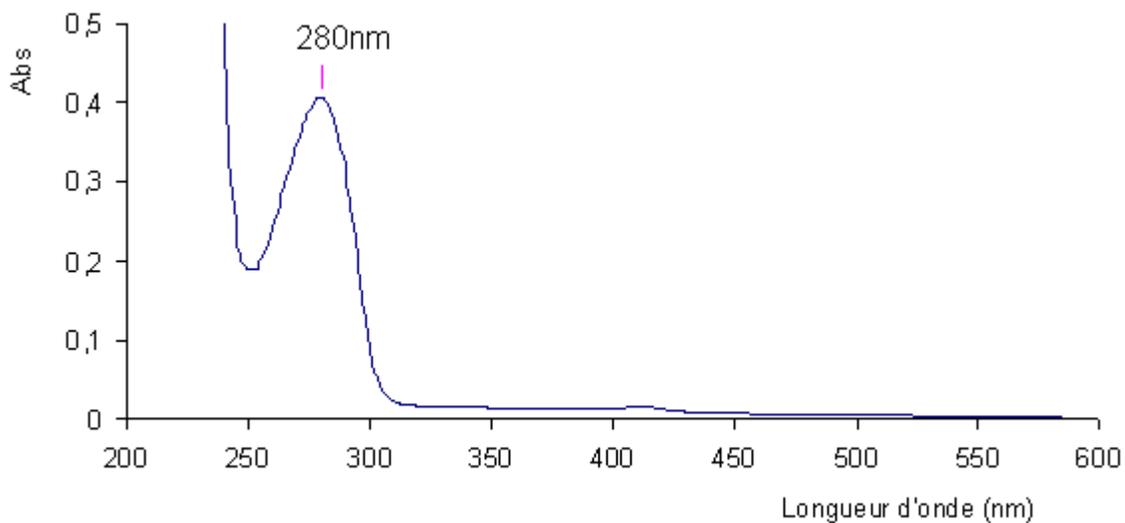


Figure A-4 Spectre d'absorbance de la CA ($1,0 \times 10^{-5}$ M), la référence est une solution de NaHCO₃ 0,10 M.

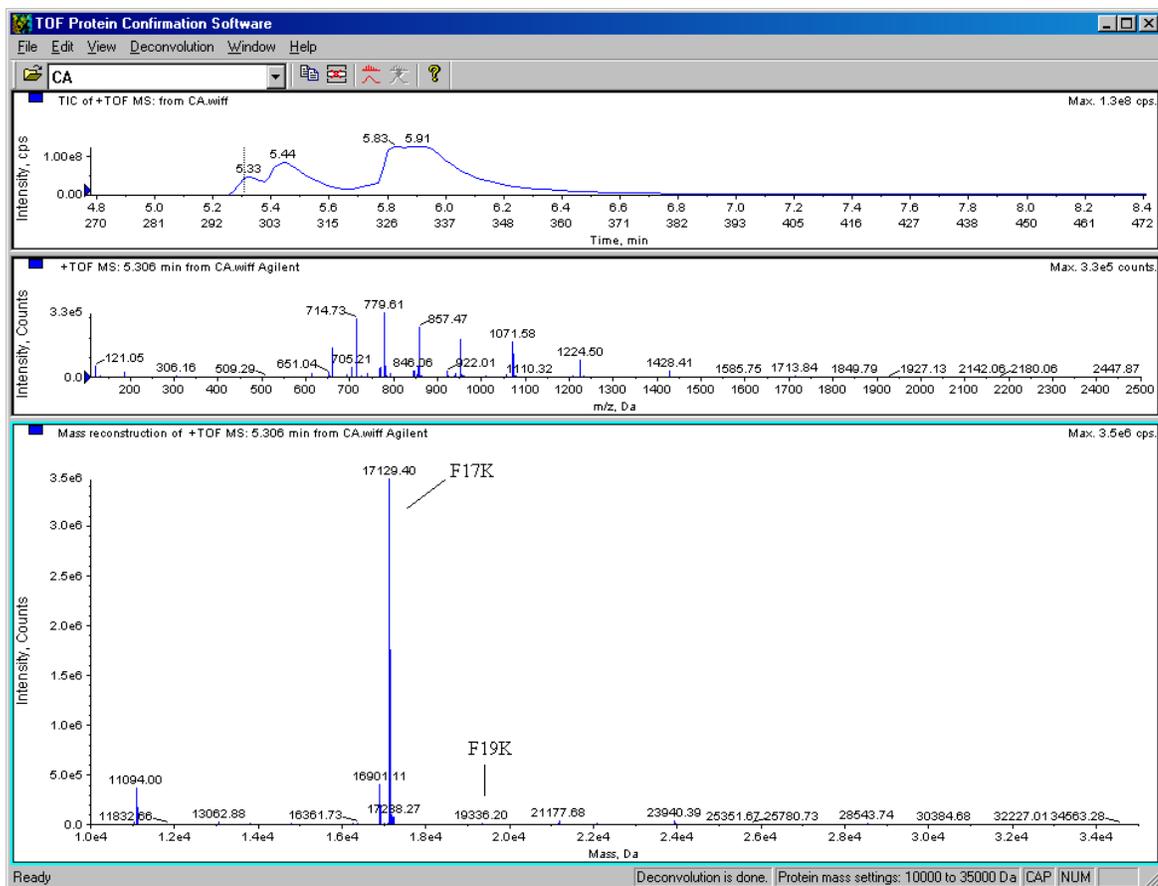


Figure A-5 Analyse LC-MS (ESI) de la CA. Haut : profil ionique total, milieu spectre MS à 5,306 min et bas : profil moléculaire obtenu à partir du spectre ESMS.

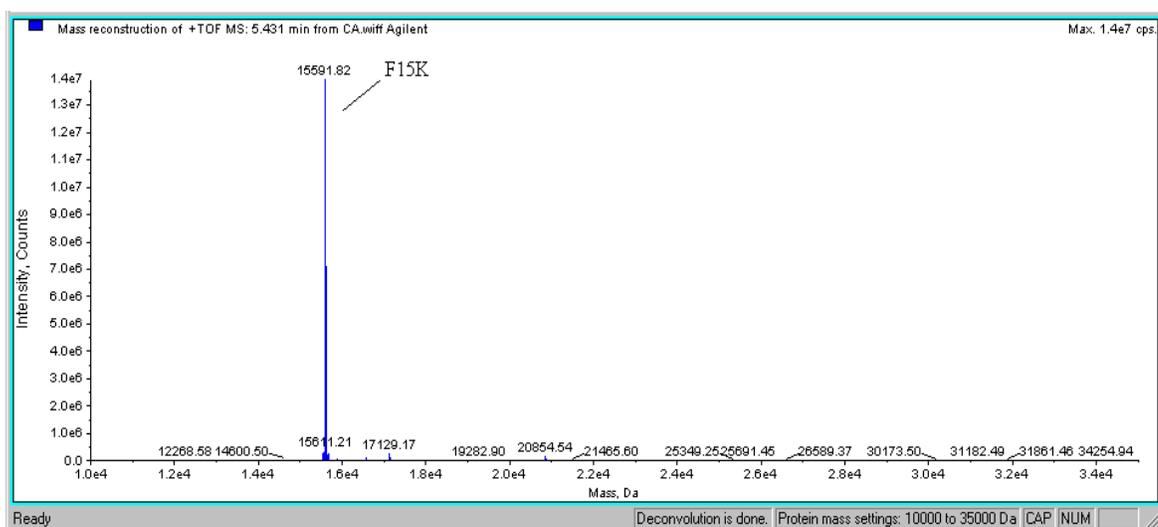


Figure A-6 Profil moléculaire de la CA obtenu à partir du spectre ESMS à 5,431 min.

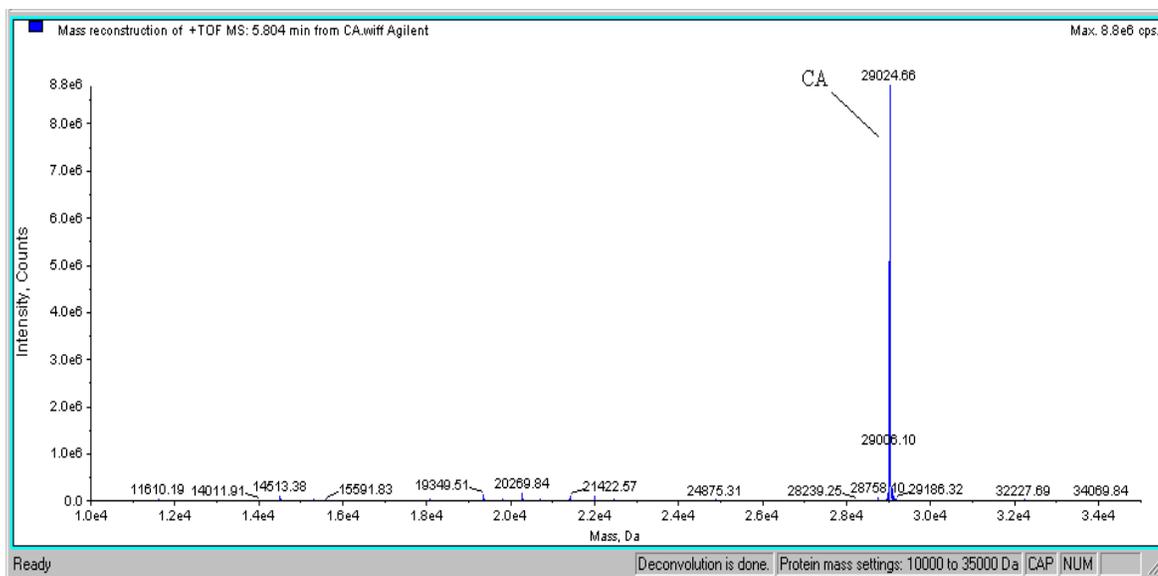


Figure A-7 Profil moléculaire de la CA obtenu à partir du spectre ESMS à 5,804 min.

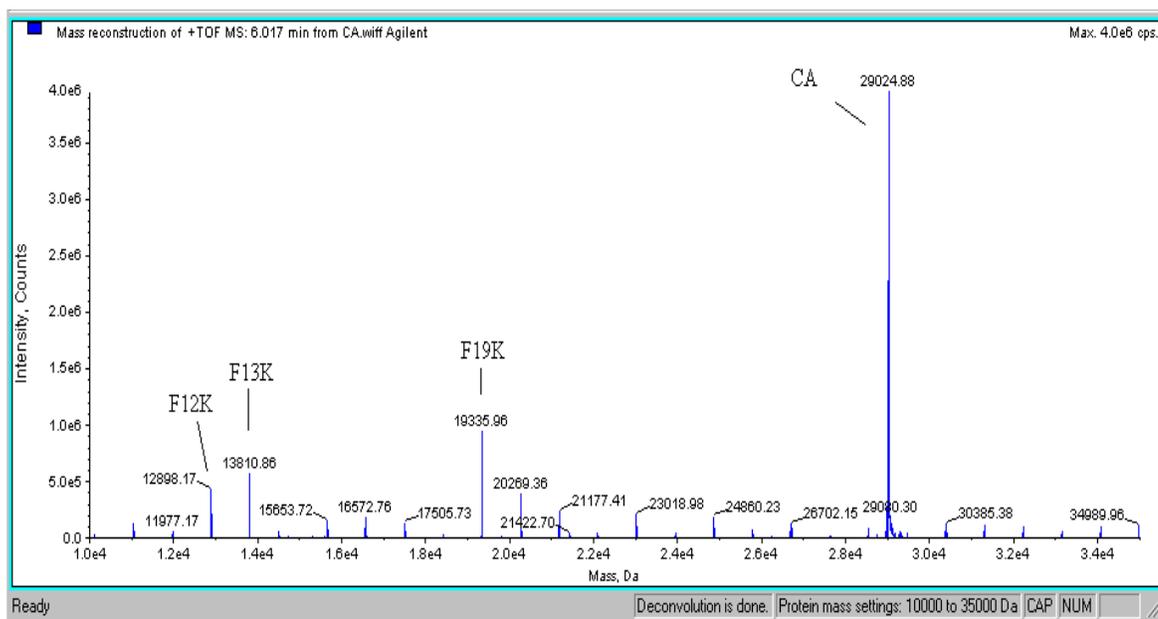


Figure A-8 Profil moléculaire de la CA obtenu à partir du spectre ESMS à 6,017 min.

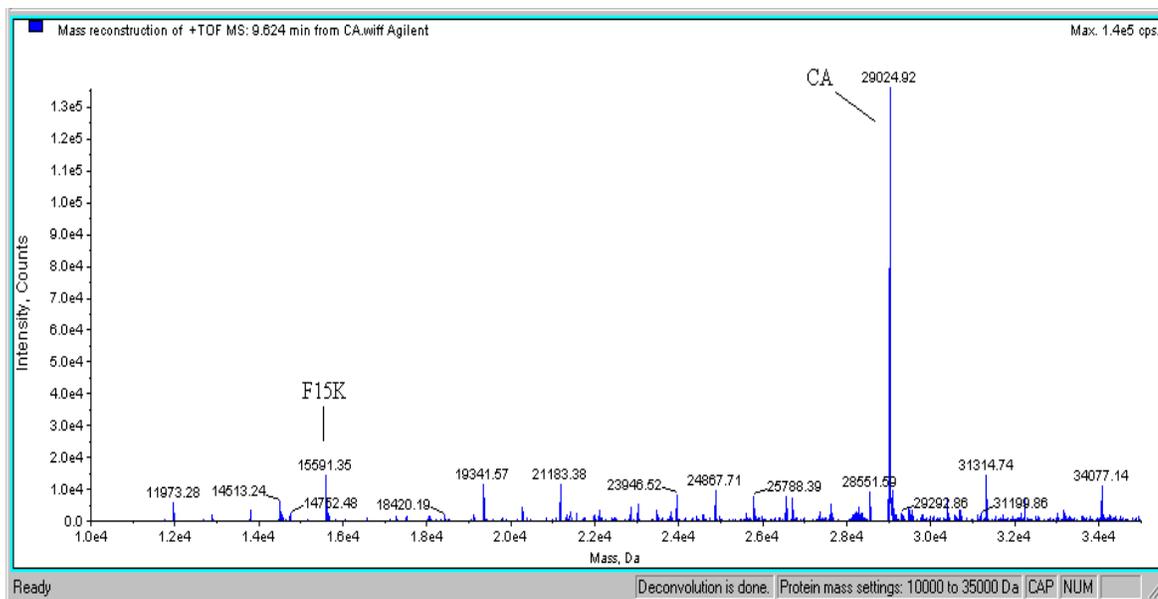


Figure A-9 Profil moléculaire de la CA obtenu à partir du spectre ESMS à 9,624 min.

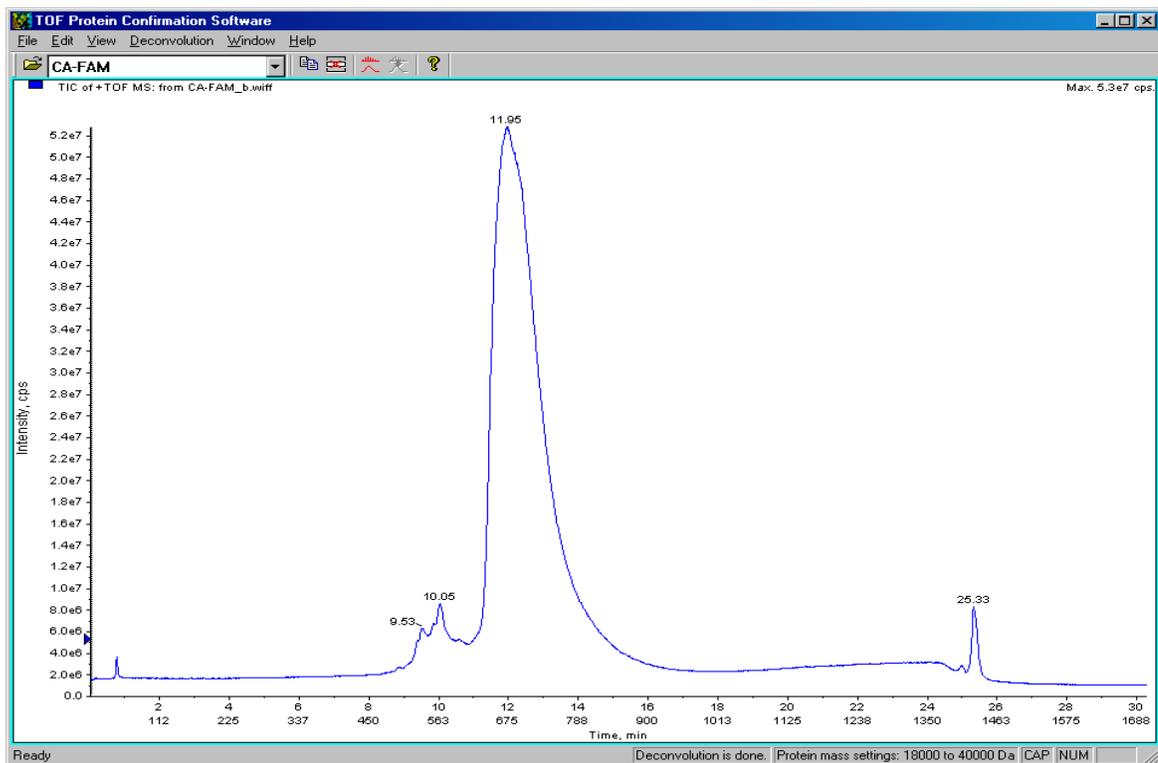


Figure A-10 Chromatogramme (HPLC-MS) de balayage de la CA-FAM.

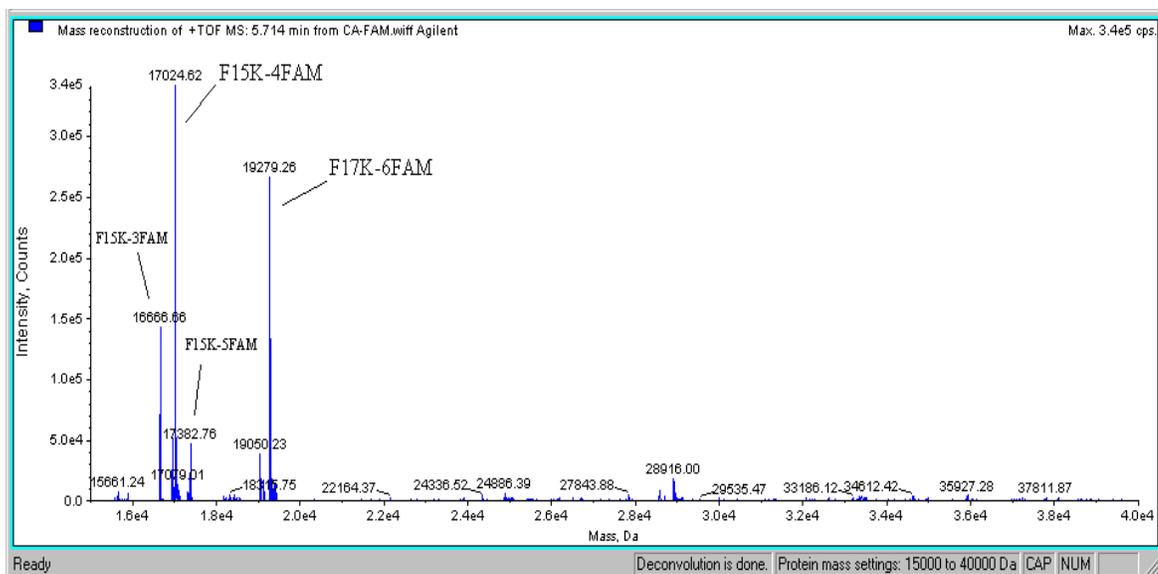


Figure A-11 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 5,714 min.

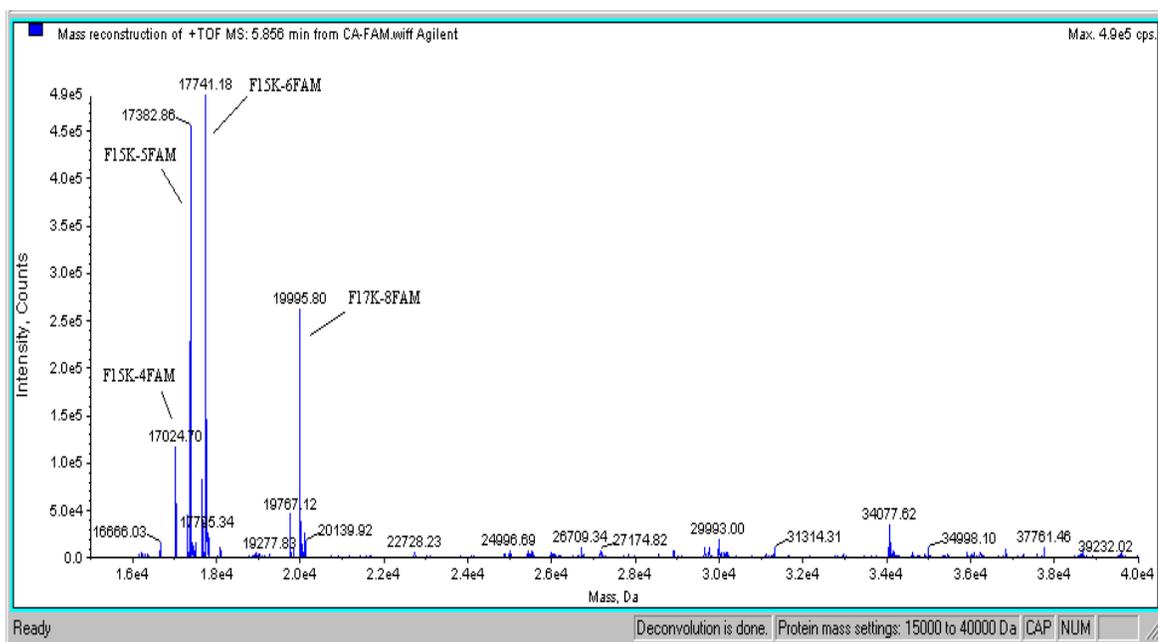


Figure A-12 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 5,856 min.

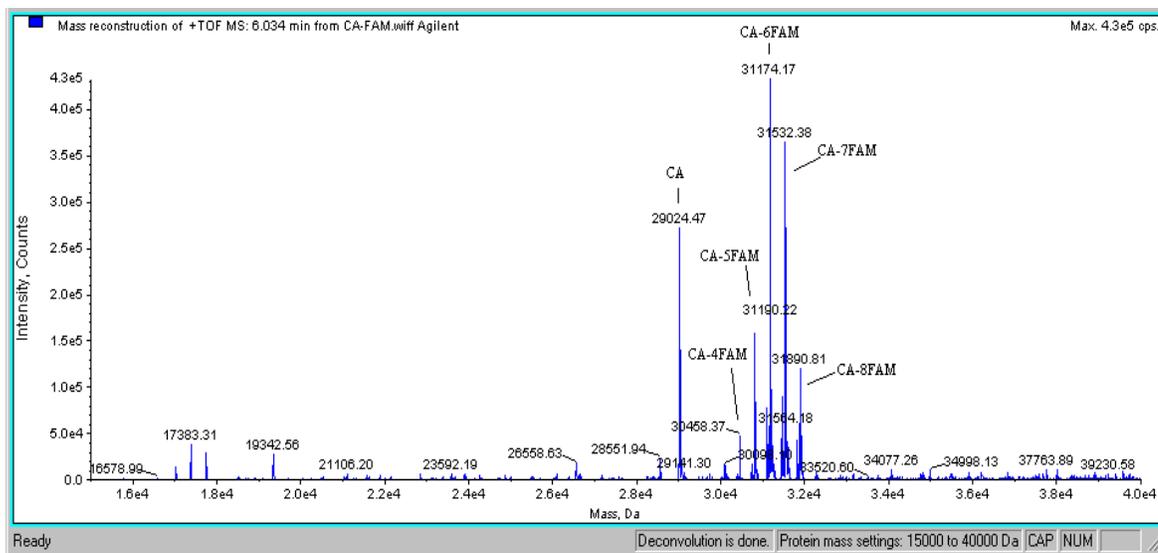


Figure A-13 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 6,034 min.

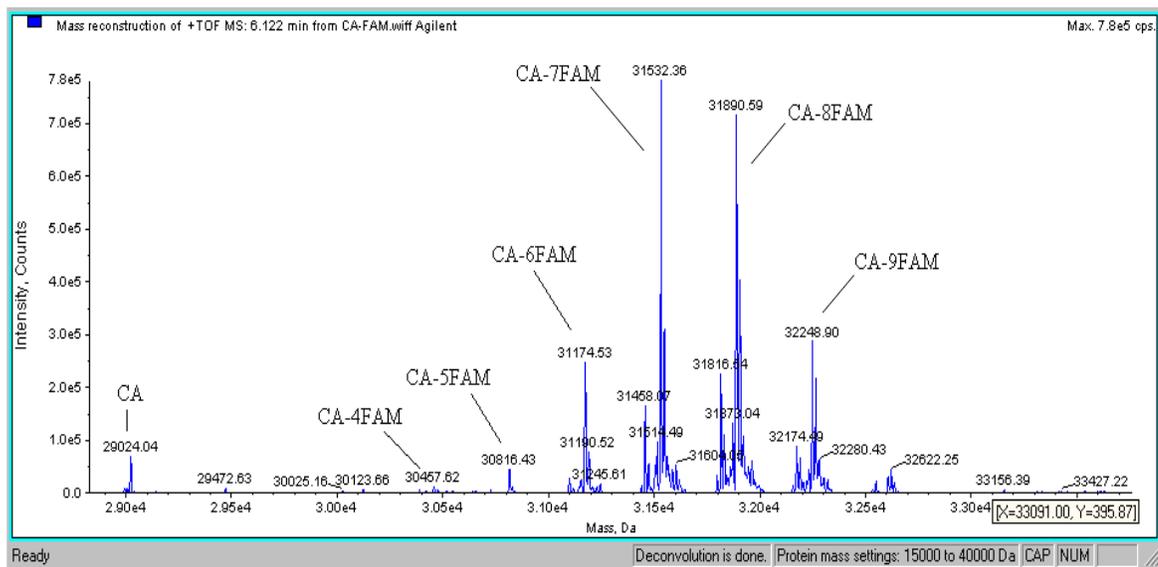


Figure A-14 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 6,122 min.

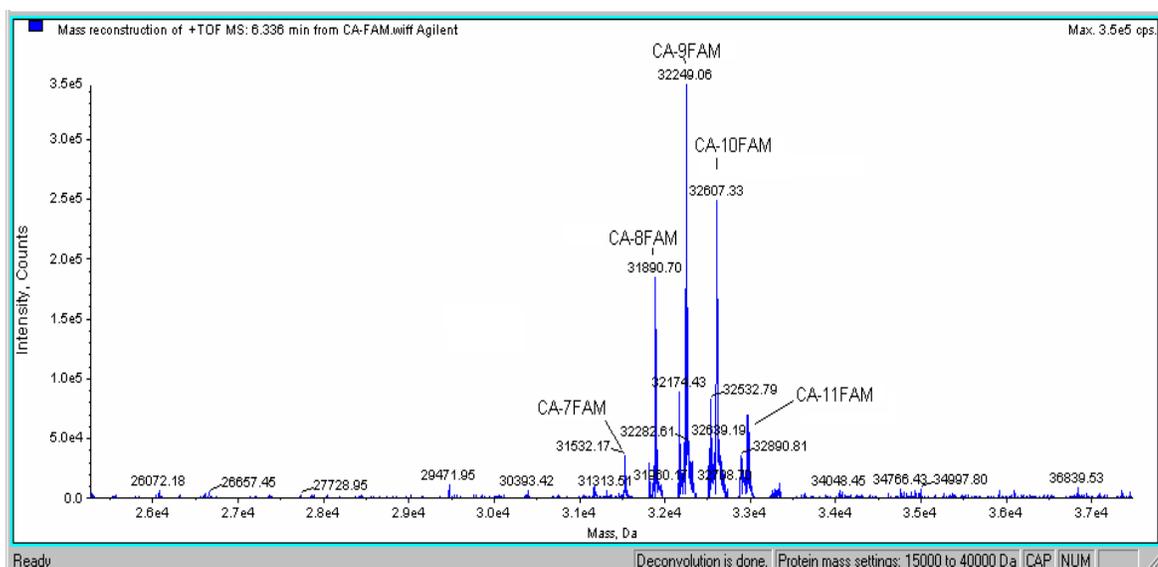


Figure A-15 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 6,336 min.

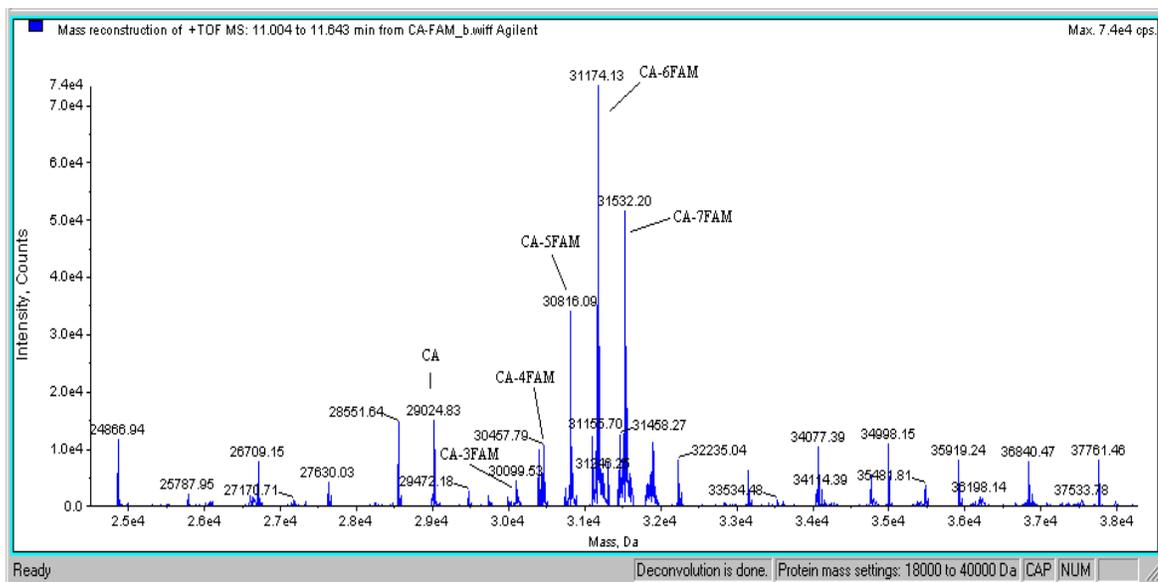


Figure A-16 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 11,004 min.

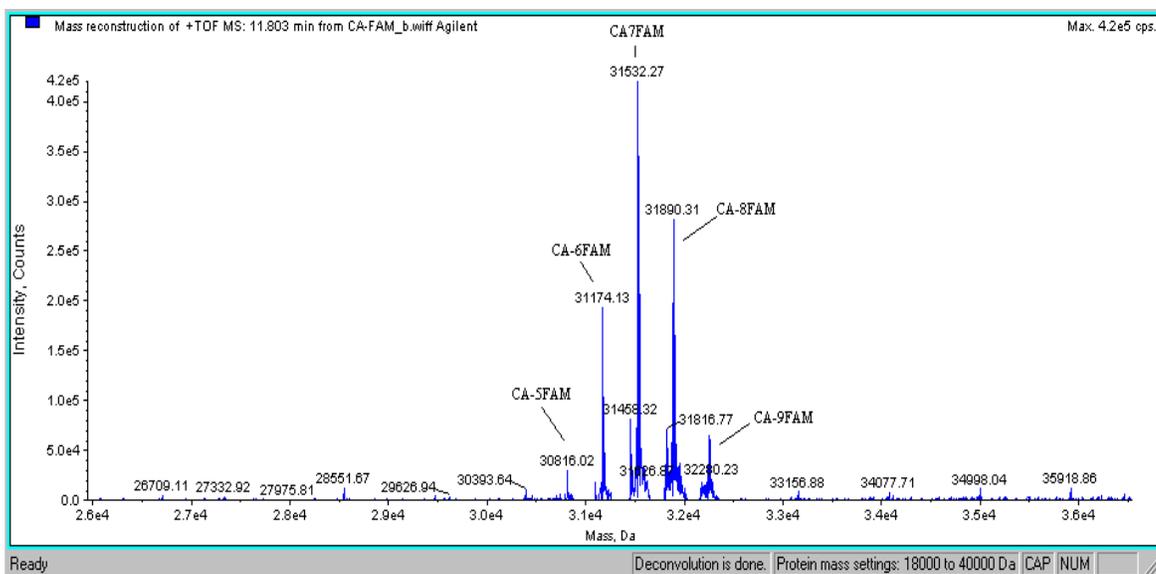


Figure A-17 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 11,803 min.

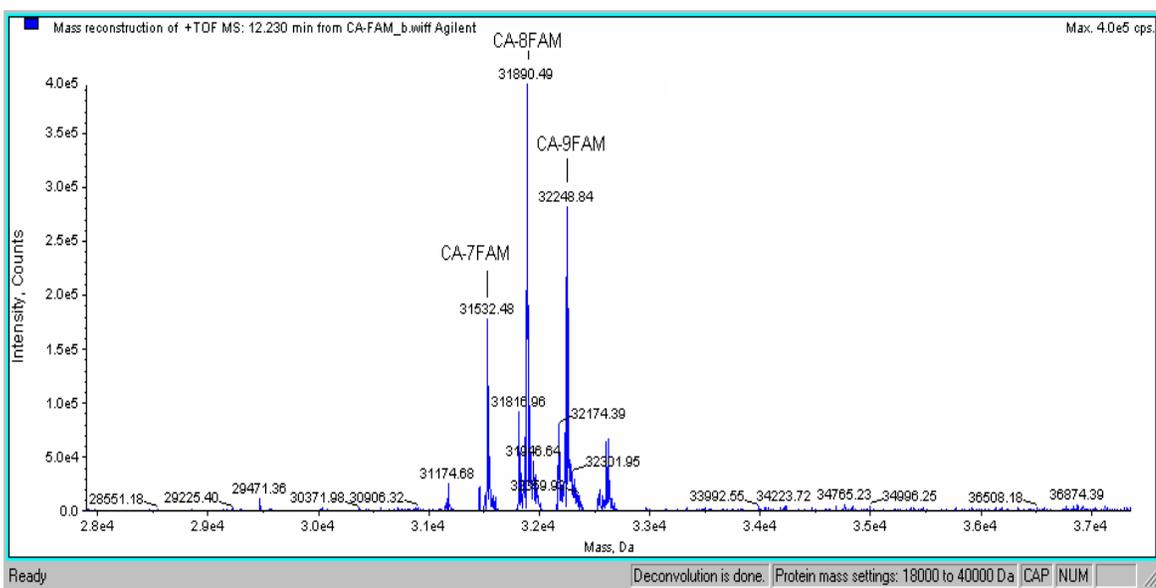


Figure A-18 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 12,230 min.

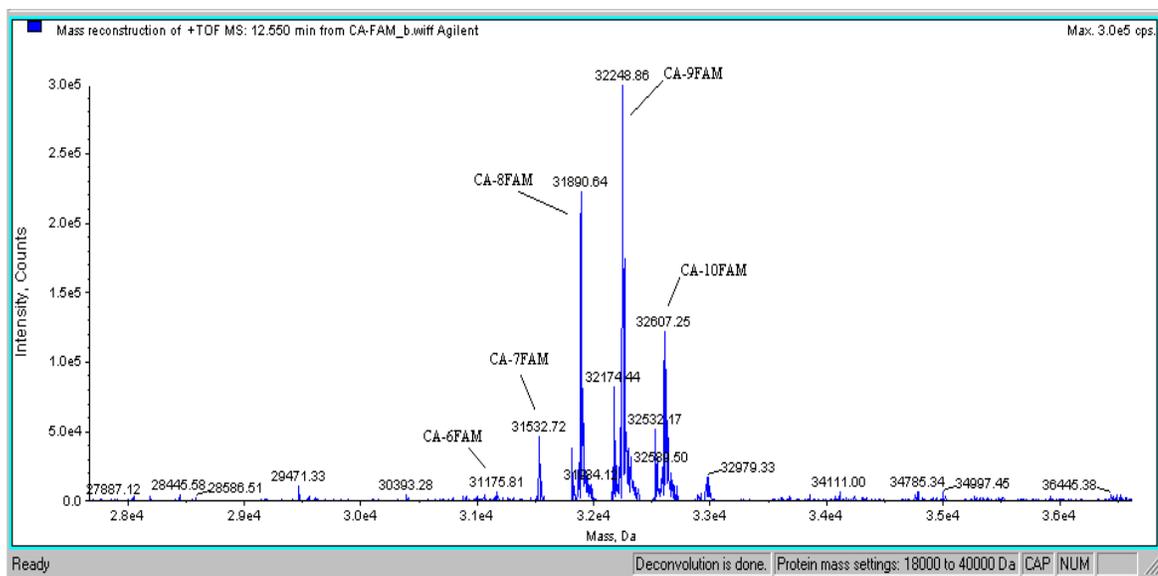


Figure A-19 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 12,550 min.

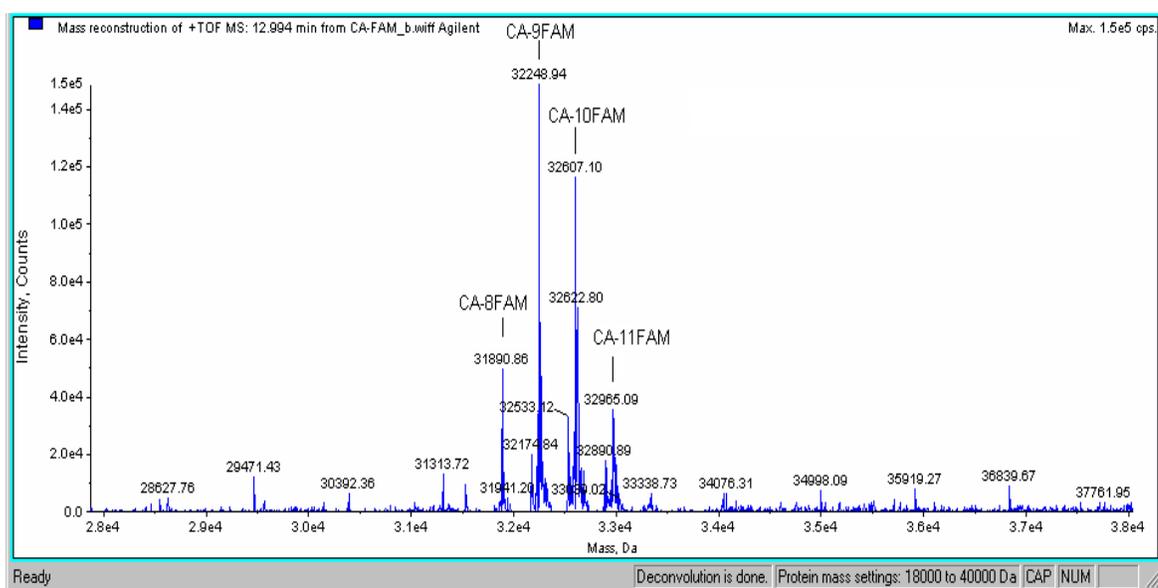


Figure A-20 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 12,994 min.

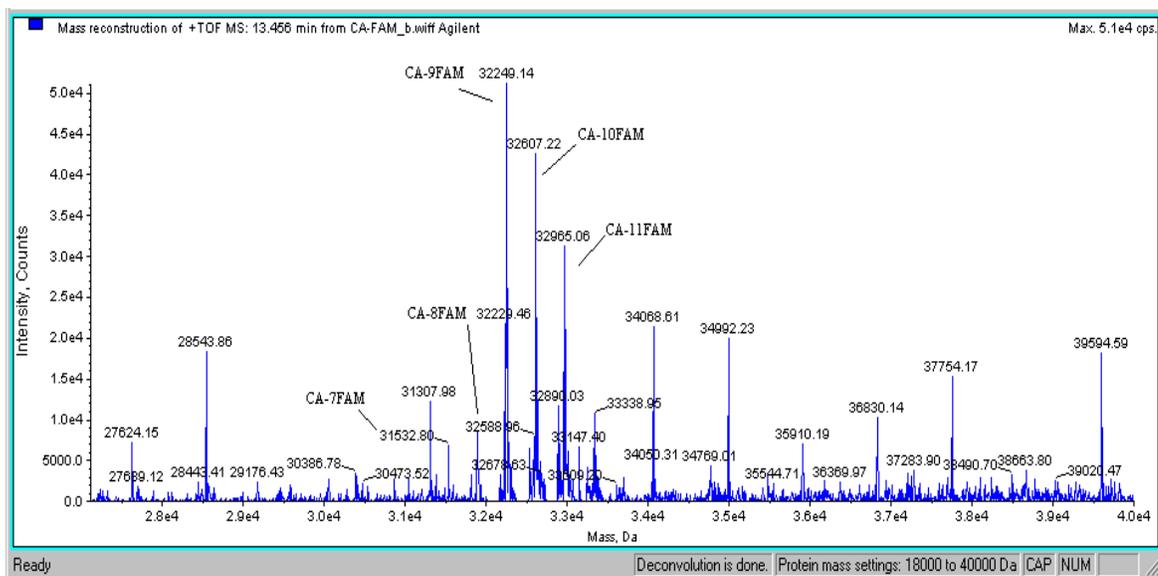


Figure A-21 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 13,456 min.

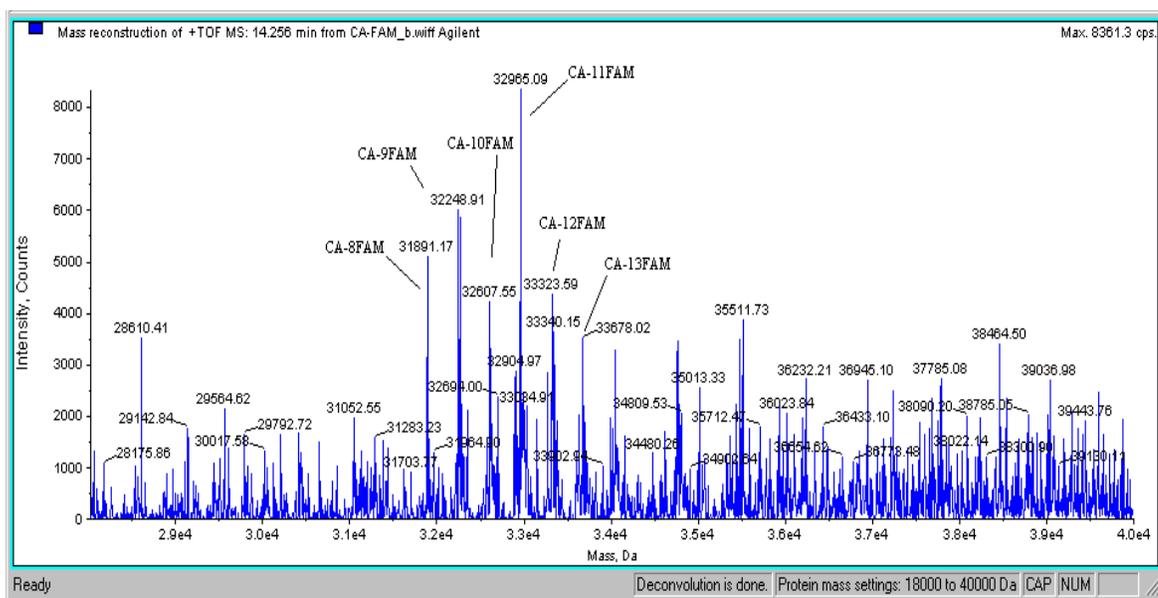


Figure A-22 Profil moléculaire de la CA-FAM obtenu à partir du spectre ESMS à 14,256 min.

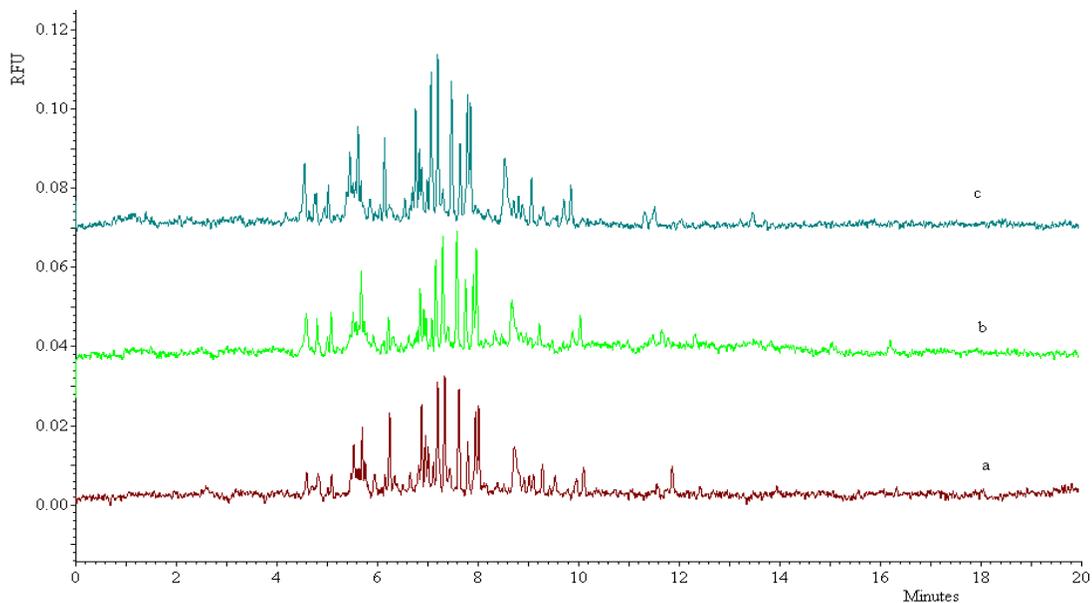


Figure A-23 Étude de reproductibilité de la digestion de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre (CA:CT = 0,06:1) –Électrophérogrammes CE-LIF de peptides chymotrypsiques analysés le même jour dans un tampon phosphate de sodium 0,10 M pH 6,90. a) 1^{ière} digestion; b) 2^{ième} digestion; c) 3^{ième} digestion.

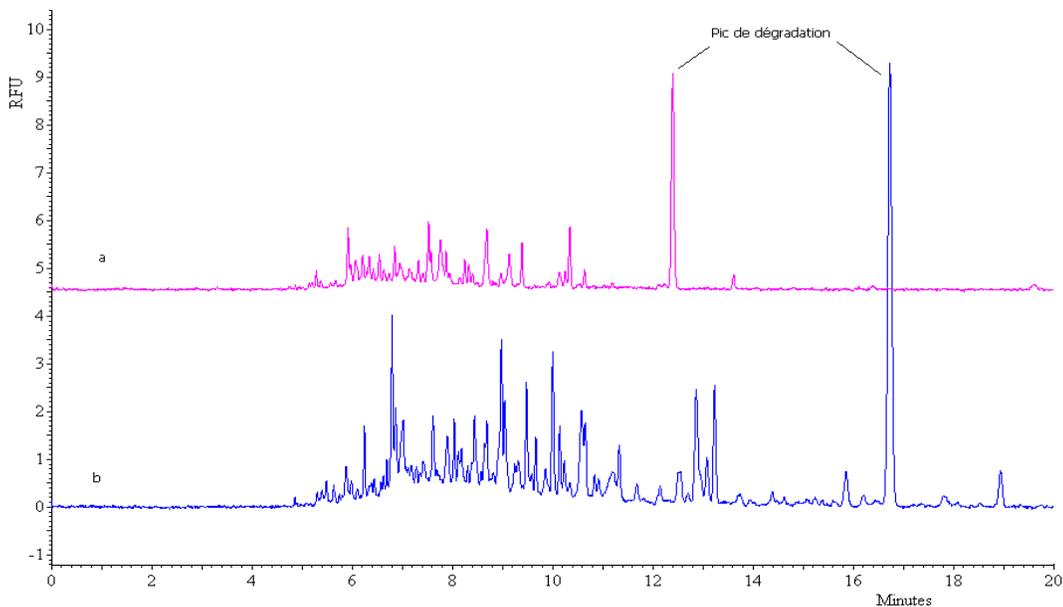


Figure A-24 Étude de digestion de la CA-FITC digérée par GACT et chymotrypsine libre -Électrophérogrammes CE-LIF de peptides chymotrypsiques analysés dans un tampon phosphate de sodium 0,10 M pH 6,90. a) digérée par GACT pendant 4 h; b) digérée par la chymotrypsine libre pendant 24 h.

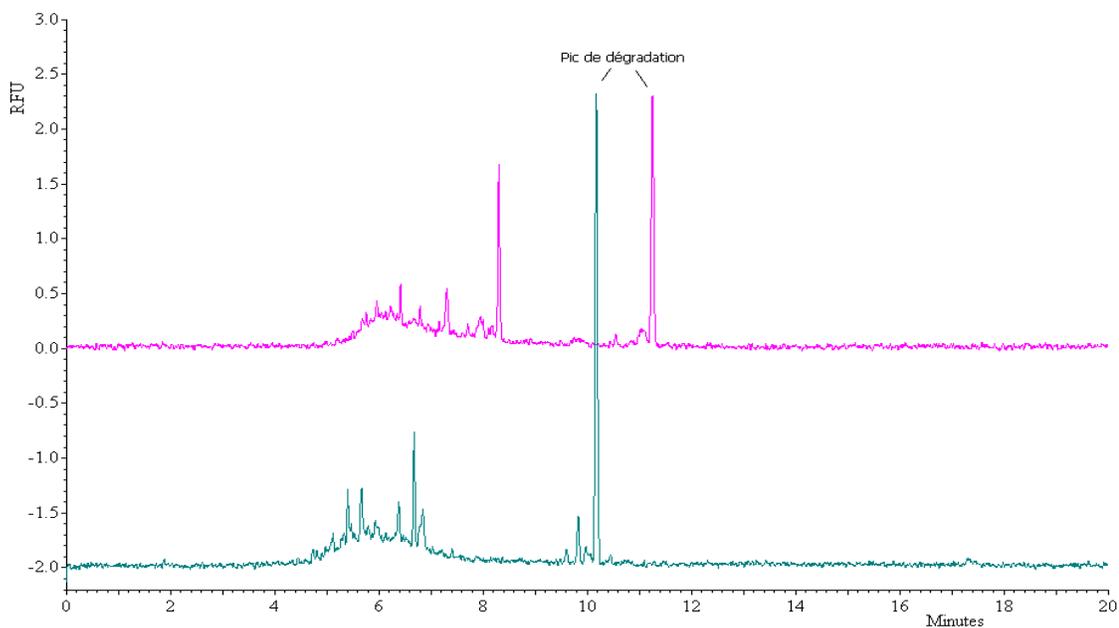


Figure A-25 Étude de digestion de la CA-FITC digérée par GAT - Électrophérogrammes CE-LIF de peptides tryptiques analysés dans un tampon phosphate de sodium 0,10 M pH 6,90. a) digérée par GAT pendant 4 h; b) digérée par la trypsine libre pendant 24 h.

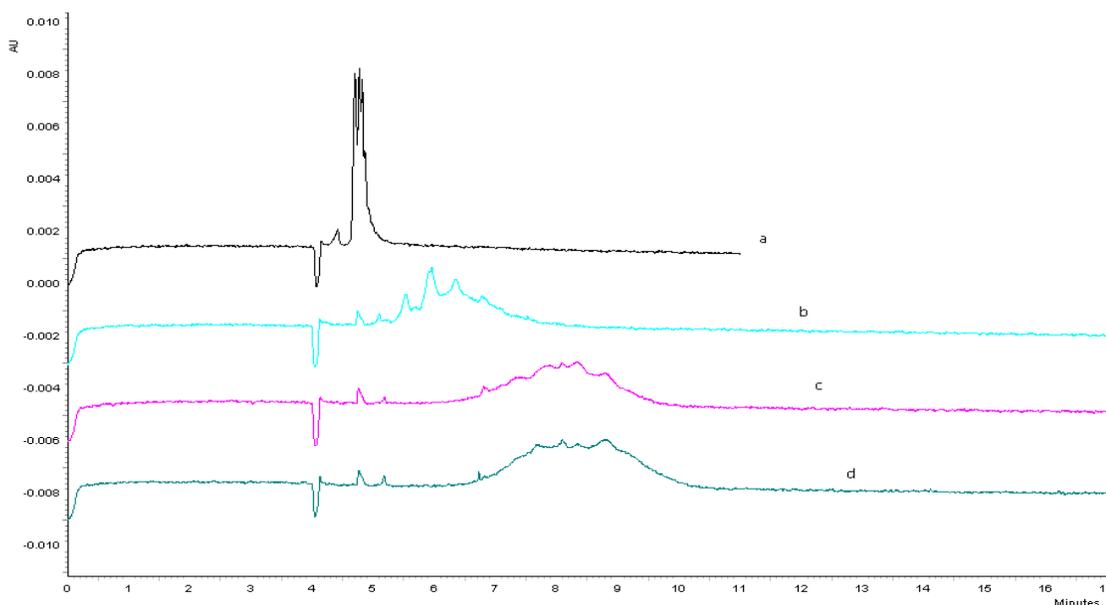


Figure A-26 Étude de marquage de la CA avec 5(6)-FAMSE -Électrophérogrammes analysés à 24 kV dans un tampon borate 0,10 M pH 9,28; (a) l'anhydrase carbonique (CA); (b) CA-10FAM, (c) CA-32FAM, (d) CA-43FAM.

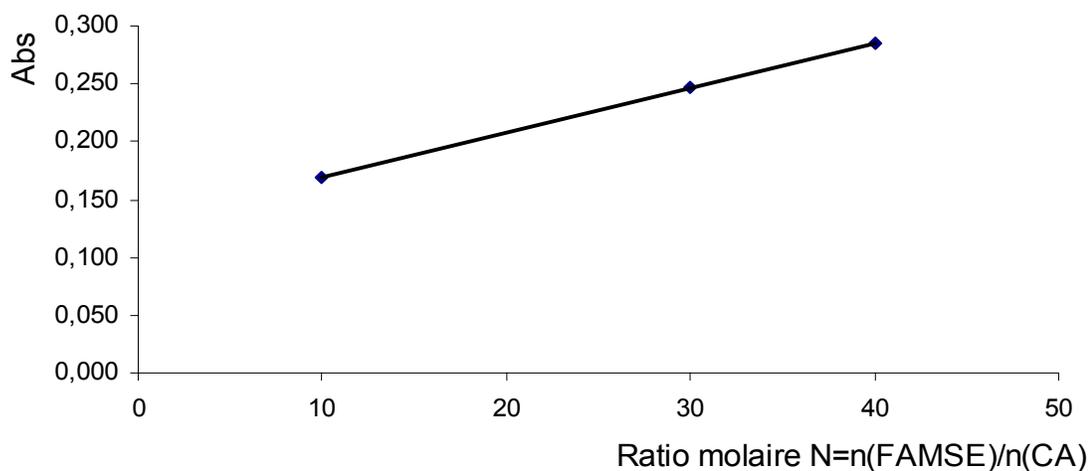


Figure A-27 Étude de marquage de la CA avec FAMSE- Graphique de l'absorbance de CA-(N)FAM à $\lambda = 495\text{nm}$ en fonction du ratio molaire N ($n_{\text{FAMSE}}/n_{\text{CA}}$), Un mélange aqueux de NaHCO_3 , de DMSO et de $\text{NH}_2\text{-OH}$ servait du blanc.

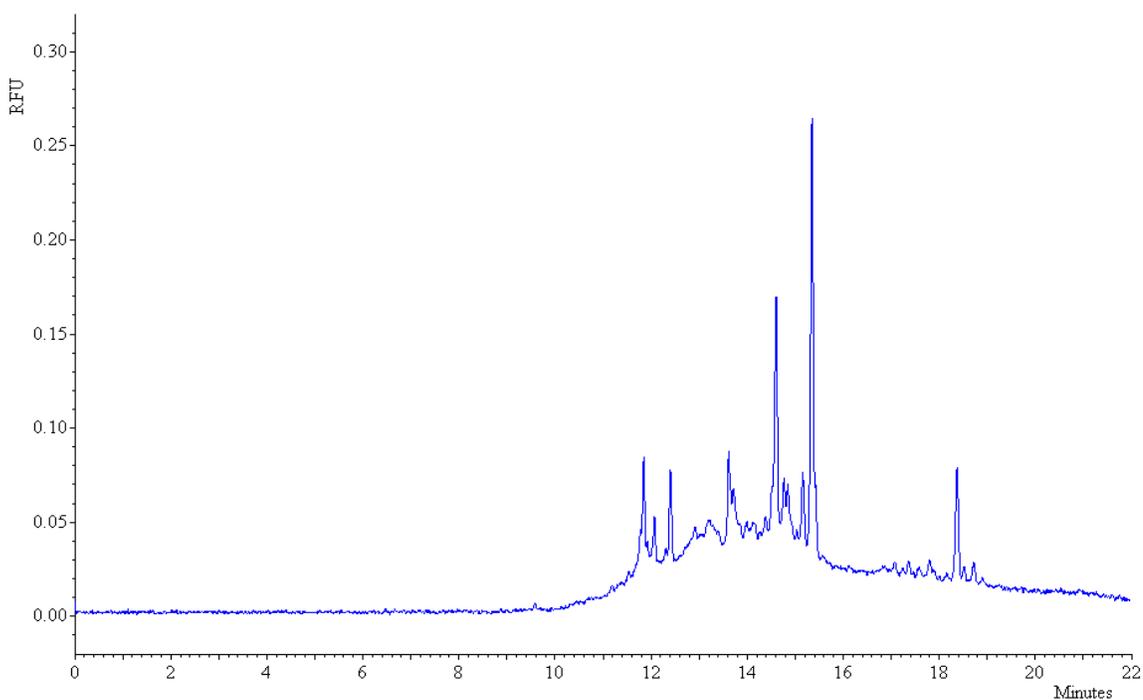


Figure A-28 Analyse CE-LIF des produits de marquage de la CA-(FAM)_n ($n = 2, 3, \dots, 13$ possible) à 24 kV dans un tampon phosphate de sodium $5,0 \times 10^{-2}$ M pH 6,90 (Électrophérogramme obtenu pour une séquence d'injection, malheureusement, ayant le flux électro-osmotique non stable)

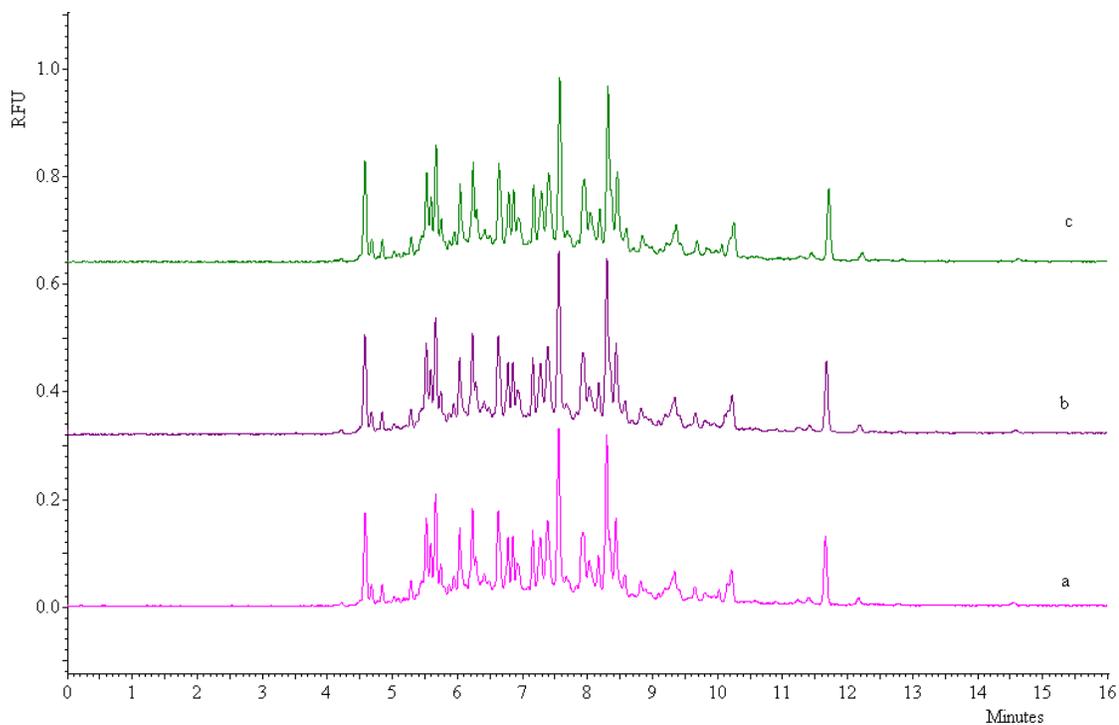


Figure A-29 Étude de reproductibilité de l'analyse de la CA-FAM digérée par la chymotrypsine libre (CA:CT = 1:1) –Électrophérogrammes CE-LIF de peptides chymotrypsiques analysés dans un tampon phosphate de sodium 0,10 M pH 6,90. a) 1^{ère} analyse; b) 2^{ème} analyse; c) 3^{ème} analyse.