



HAL
open science

Stratégie analytique combinant électrophorèse capillaire et ICP/MS pour la caractérisation des cibles biologiques de l'uranium

Thi Ngoc Suong Huynh

► **To cite this version:**

Thi Ngoc Suong Huynh. Stratégie analytique combinant électrophorèse capillaire et ICP/MS pour la caractérisation des cibles biologiques de l'uranium. Chimie analytique. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONT052 . tel-01552072

HAL Id: tel-01552072

<https://theses.hal.science/tel-01552072>

Submitted on 30 Jun 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale Sciences Chimiques
et Biologiques pour la Santé (ED168)
Et de l'unité de recherche Service de Biologie et
Toxicologie Nucléaire (DSV/CEA Marcoule)

Spécialité : **Chimie Analytique**

Présentée par **Thi Ngoc Suong HUYNH**

**Stratégie analytique combinant
électrophorèse capillaire et ICP/MS
pour la caractérisation
des cibles biologiques de l'uranium**

Soutenue le 1^{er} décembre 2015 devant le jury composé de

Mme. Pascale DELANGLE, Chercheur, CEA Grenoble

Rapporteur

M. Luc DENOROY, Directeur de recherche CNRS, CRNL Lyon

Rapporteur

M. Hervé COTTET, Professeur, Université de Montpellier

Examinateur

Mme. Agnès HAGEGE, Chargée de recherche CNRS

Directrice de thèse



Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire (SBTN), Direction des Sciences du Vivant (DSV), CEA Marcoule.

*Dans un premier temps je tiens à remercier les chefs de service **M. Eric Ezan** et **M. Pierre Chagvardieff** pour avoir accepté de financer ces travaux et m'avoir donné les meilleures conditions de travail pour réaliser ma thèse. Je tiens également à remercier **Mme. Nathalie Schildknecht**, directrice de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) de Lyon pour m'avoir accueillie pendant les six derniers mois de mon doctorat.*

*Je remercie également les **Dr. Luc Denoroy**, directeur de recherche CNRS et **Dr. Pascale Delangle**, chercheur CEA, d'avoir accepté d'être rapporteurs, ainsi que le **Pr. Hervé Cottet**, professeur à l'université de Montpellier II, d'être examinateur, qui ont consacré une partie de leur temps à évaluer ma thèse.*

*Je souhaite adresser tout particulièrement mes remerciements les plus sincères au **Dr. Agnès Hagège**, ma directrice de thèse, pour sa gentillesse, son humour, sa grande disponibilité, ses connaissances scientifiques et ses précieux conseils à mon égard. Merci d'avoir eu confiance en moi, de m'avoir laissé une grande liberté dans mon sujet de recherche, et d'avoir été à mes côtés dans tous les moments un peu plus difficiles de ma thèse mais également dans ma vie personnelle. Pour moi, elle représente bien plus qu'une directrice de thèse, elle est mon mentor sans qui jamais je n'aurais pu mener à bien ma thèse comme je l'ai fait.*

*Je remercie les membres de mon comité de thèse : les **Pr. Hervé Cottet** et **Dr. Béatrice Alpha-Bazin** d'avoir suivi l'avancement de ma thèse, et de m'avoir donné de précieux conseils pour résoudre les problèmes scientifiques et techniques auxquels j'ai été confrontée.*

*Je remercie le **Dr. Claude Vidaud**, responsable du projet BioMUrOs pour ses conseils et les discussions scientifiques que nous avons eues autour de l'uranium.*

*Un grand merci à ma responsable de master **Pr. Claire Demesmay** de m'avoir encouragée à réaliser cette thèse.*

*Merci également à mon maître de stage de master, le **Dr. Luc Denoroy**, de m'avoir appris les bases de l'électrophorèse capillaire. Je le remercie pour ses encouragements pendant mon*

stage, mais aussi tout au long de ma thèse à chaque fois que nous nous sommes croisés dans le cadre d'un séminaire ou d'un congrès.

*Je souhaite remercier vivement **Christian Basset** de m'avoir appris la purification des protéines par SEC. Je le remercie pour sa bonne humeur, sa passion des protéines, sa disponibilité et ses conseils pour la « Sacrée Chou » (je ne sais pas où il a trouvé le surnom).*

*Je souhaite remercier également le **Dr. Joseph Chamieh**, maître de conférences à l'université de Montpellier II qui m'a aidée à réaliser le greffage des capillaires neutres. Joseph, je t'offre avec grand plaisir les derniers capillaires pour le souvenir! (^.^)*

*Un grand merci au **Dr. Christine Almunia** et au **Dr. Béatrice Alpha-Bazin** pour leurs sourires et pour les discussions scientifiques et personnelles que nous avons eues ensemble.*

Je tiens également à remercier tout le personnel du SBTN, et plus particulier Marie-Anne Roncato, Cédric Pisani, Océane Ducos Anglade, Isabelle George, Sandra Laloi, Sabrina Masméjean, Erica Hartmann, Sarah Le-Hir, Emie Durighello, François Allain, Jean-Paul Madeira, Céline Guigue, Laetitia Pinto, Mickael Mege, Yasmina Tayeb, Olivier Averseng, Yves Brignon, Charles Marchetti, Michaël Odorico, Francine Roux, Anne Chappaz, Wei Liu, Damien Joulié, Charline Le Goff, Marion Gris, Esther Le Toquin et Ali Younes qui m'ont soutenue et qui ont partagé avec moi les moments aussi bons que difficiles au SBTN pendant mes trois années de thèse.

Merci également à tous les membres du « planning gâteaux » qui m'ont fait découvrir le sucré français tous les vendredis soirs. Merci aussi aux membres du « mardi à thème » qui m'obligeaient à chercher au fond de mon placard tous les mardis matins pour tenter de trouver une tenue à peu près dans le thème (« aussi farfelus les uns que les autres !! » comme Isabelle l'a dit.). Merci également à mes copains de cantine pour le projet « apprendre 5 mots français par jour » où j'ai pu apprendre plein de mots spéciaux en français.

Merci à mes co-voitureurs : Erica, Sarah, Océane, surtout toi Cédric pour nos moments inoubliables dans la voiture où l'on se racontait tout et n'importe quoi.

Merci à ma copine Josiane Saade de m'avoir soutenue pendant le master II et aussi pendant ma thèse. Merci aussi aux « jeunes » de l'ISA avec qui j'ai partagé des moments agréables au cours de nos déjeuners tous ensemble.

Un grand merci à mes amis vietnamiens à Avignon, grâce à eux les 10 000 km me séparant de chez moi étaient un peu raccourcis. Merci pour les nouvelles années que nous avons fêtées ensemble et pour tous nos repas vietnamiens, un peu nostalgiques, que nous faisons presque tous les week-ends.

Aucun mot n'est assez fort, en français ou en vietnamien, pour exprimer tout l'amour et toute la reconnaissance que je porte à ma famille : à mes parents et à mon frère qui me soutiennent inconditionnellement, et bien sûr à toi, mon mari, de m'avoir accompagnée durant les 7 dernières années et de rester à mes côtés pendant toutes les années à venir.

Con yêu cả nhà nhiều nhiều lắm!

Je dédie cette thèse à mon père.

Con luôn luôn rất tự hào về Ba.

Bagnols-sur-Cèze, le 1^{er} décembre 2015.

Table des matières

Remerciements	iii
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xv
Abréviations et symboles	xvii
Introduction générale	1
Chapitre 1. Bibliographie	5
1.1. Uranium et toxicité	5
1.2. Stratégies analytiques utilisées pour la recherche des cibles biologiques de l'uranium	7
1.1.1. Stratégie « bottom-up »	8
1.2.1.1. <i>Méthodes spectrométriques</i>	9
1.2.1.2. <i>Méthodes calorimétriques</i>	12
1.2.1.3. <i>Méthodes séparatives</i>	13
1.2.1.4. <i>Méthodes de recherche de nouvelles cibles protéiques</i>	18
1.1.2. Stratégie « top-down »	20
1.3. Présentation de 3 cibles potentielles majeures de l'uranium : la transferrine (TF), la féтуine-A (FET) et l'ostéopontine (OPN)	32
1.1.3. Transferrine (TF)	33
1.1.4. Féтуine-A (FET)	35
1.1.5. Ostéopontine (OPN)	37
Chapitre 2. Mise en place du couplage CE-ICP/MS	41
2.1. Introduction au couplage CE-ICP/MS	42
2.1.1. Electrophorèse capillaire (CE)	42
2.1.2. Spectrométrie de masse à plasma induit (ICP/MS)	42
2.1.3. Couplage CE-ICP/MS	44
2.1.3.1. <i>Types des nébuliseurs</i>	44
2.1.3.2. <i>Interface entre la CE et l'ICP/MS</i>	46
2.2. Mise en place du couplage CE-ICP/MS au laboratoire	49
2.2.1. Appareillage	49

2.2.2.	Paramètres de l'interface	50
2.2.2.1.	<i>Niveau du liquide additionnel</i>	51
2.2.2.2.	<i>Position de l'extrémité du capillaire dans le nébuliseur</i>	55
2.2.3.	Effet de dilution dans le couplage CE-ICP/MS.....	56
2.3.	Conclusion	59
Chapitre 3. Optimisation des conditions d'analyse en CE-ICP/MS des complexes protéine-uranium		61
3.1.	Phénomènes de sorption dans les capillaires de silice.....	62
3.1.1.	Phénomène d'adsorption de l'uranium sur la paroi du capillaire de silice.....	62
3.1.1.1.	<i>Effet de matrice observé en ICP/MS</i>	63
3.1.1.2.	<i>Etude dans un capillaire de silice</i>	64
3.1.2.	Phénomène d'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire de silice.....	65
3.1.3.	Modification de la surface du capillaire pour minimiser l'adsorption de l'uranium libre ...	68
3.1.3.1.	<i>Méthode de détermination de l'EOF</i>	69
3.1.3.2.	<i>Greffage dynamique par le CTAB</i>	70
3.1.3.3.	<i>Greffage multi-couches : polybrène/ dextran sulfate/ polybrène (PB/DS/PB)</i>	73
3.1.3.4.	<i>Greffage par l'hydroxypropyl cellulose</i>	74
3.1.3.5.	<i>Capillaire neutre Ncap</i>	77
3.1.3.6.	<i>Capillaire greffé cystéine</i>	78
3.1.3.7.	<i>Comparaison des capillaires vis-à-vis de la sorption de l'uranium</i>	78
3.2.	Influence des conditions de voltage et de pression sur la dissociation des complexes protéine-U	81
3.2.1.	Influence du voltage	82
3.2.2.	Influence de la pression.	84
3.3.	Influence des conditions de séparation sur la répartition de l'uranium	86
3.3.1.	Répartition de l'uranium en fonction du pH	86
3.3.2.	Influence de la force ionique des électrolytes	89
3.3.3.	Influence de la nature du capillaire.....	91
3.3.3.1.	<i>Détermination des conditions de séparation</i>	91
3.3.3.2.	<i>Comparaison des deux capillaires : silice et HPC</i>	94
3.4.	Reproductibilité de la méthode d'analyse.....	96
3.5.	Conclusion	99
Chapitre 4. Étude de cibles protéiques de l'uranium		101
4.1.	Protocole expérimental de détermination de l'affinité des protéines par CE-ICP/MS. .	102
4.2.	Etude de l'affinité de l'uranium pour des protéines individuelles	102

4.2.1.	Interaction entre transferrine (TF) et uranium	102
4.2.1.1.	<i>Quantification du Fe dans la TF</i>	102
4.2.1.2.	<i>Interaction TF – uranium</i>	103
4.2.2.	Interaction entre féтуine-A (FET) et uranium	105
4.2.2.1.	<i>Détermination des conditions d'équilibre</i>	105
4.2.2.2.	<i>Capacité de fixation d'uranium de la FET</i>	106
4.2.3.	Interaction entre ostéopontine (OPN) et uranium	107
4.2.3.1.	<i>Affinité des différentes « formes » de l'OPN pour l'uranium</i>	107
4.2.3.2.	<i>Impact des phosphorylations de l'OPN</i>	109
4.2.3.3.	<i>Capacité de fixation d'uranium de l'OPN</i>	112
4.3.	Effet des carbonates sur la formation des complexes d'uranyle avec les protéines sériques	113
4.3.1.	Étude du système FET / bicarbonate	114
4.3.2.	Étude du système TF / bicarbonate	117
4.4.	Étude compétitive avec FET	119
4.4.1.	Étude compétitive OPN / FET	119
4.4.2.	Étude compétitive TF / FET	122
4.5.	Conclusion	123
Chapitre 5.	Application du couplage CE-ICP/MS au criblage des protéines cibles de l'uranium	125
5.1.	Influence des métaux présents dans le sang sur les complexes protéine-uranium	126
5.1.1.	Préparation des échantillons	127
5.1.2.	Méthode d'analyse	127
5.1.3.	Résultats	127
5.2.	Influence de l'uranium sur l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par OPN et FET	132
5.2.1.	Préparation des échantillons	134
5.2.2.	Méthodes d'analyse	134
5.2.2.1.	<i>Analyse directe en ICP/MS</i>	134
5.2.2.2.	<i>Diffusion dynamique de la lumière (DLS)</i>	135
5.2.2.3.	<i>Couplage CE-ICP/MS</i>	135
5.2.3.	Résultats	135
5.2.3.1.	<i>Inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par OPN et FET</i>	135
5.2.3.2.	<i>Influence de l'uranium sur le rôle d'inhibiteur de précipitation des protéines</i>	137
5.2.3.3.	<i>Étude de la taille des particules protéine-Ca-P</i>	139

5.2.3.4. <i>Mise en évidence des interactions protéine-uranium en présence de Ca-P</i>	140
5.2.4. Conclusion.....	142
5.3. Analyse d'un sérum humain en présence d'uranium	142
5.3.1. Préparation des échantillons	143
5.3.2. Méthodes d'analyses.....	143
5.3.3. Résultats	144
5.3.3.1. <i>Détermination de la mobilité électrophorétique des protéines sériques en CE-UV</i> . 144	
5.3.3.2. <i>Analyse d'un sérum humain en présence de l'uranium en CE-ICP/MS</i>	146
5.3.3.3. <i>Analyse de mélanges standards de protéines sériques</i>	149
5.3.4. Conclusion.....	151
Conclusion générale et perspectives	153
Références bibliographiques	157
Annexes	173
Annexe 1 : Purification de FET	173
Annexe 2 : Préparation de l'ostéopontine (OPN)	174
A2.1. Purification de l'OPN	174
A2.2. Stabilité de l'OPN	175
Annexe 3 : Liste de communications scientifiques orales et écrites durant cette thèse	178

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Comparaison des différents modes de détermination des constantes de complexation protéine/métal par électrophorèse capillaire. ⁶⁵	17
Tableau 2.1 : Différents types de nébuliseurs utilisés en ICP/MS.	45
Tableau 2.2 : Influence de la position du capillaire dans le nébuliseur sur l'analyse du DMSO 1 % dans l'eau.	56
Tableau 3.1 : Concentrations micellaires critiques (CMC) du CTAB dans différents milieux.	71
Tableau 3.2 : Mobilités électroosmotiques et électrophorétiques calculées lors des analyses de FET 10 µM en présence de CTAB dans l'électrolyte.	72
Tableau 3.3 : Protocole de greffage par PB/DS/PB, adapté de [171].	73
Tableau 3.4 : Résolution des protéines dans le capillaire neutre d'HPC.	76
Tableau 3.5 : Tableau récapitulatif des différents greffages du capillaire.	79
Tableau 3.6 : Dispersion des pics FET-U en ICP/MS dans chaque condition d'analyse de la figure 3.16.	85
Tableau 3.7 : Résolution du couple FET-U/ OPN-U en fonction de la pression assistant le voltage de séparation.	92
Tableau 3.8 : Reproductibilité des analyses du mélange protéines-uranium dans le capillaire de silice et dans le capillaire recouvert par l'HPC.	98
Tableau 4.1 : Quantification par ICP/MS du fer présent dans les différentes transferrines commercialisées.	103
Tableau 4.2 : Répartition de l'uranium pour les différentes formes de l'OPN.	109
Tableau 4.3 : Phosphorylations des OPNs mesurées en ICP/MS.	110
Tableau 4.4 : Répartition de l'uranium dans les formes déphosphorylées de l'OPN.	112
Tableau 4.5 : Constantes d'équilibre impliquant l'uranium et le carbonate en solution aqueuse.	114
Tableau 5.1 : Constantes de solubilité (formation d'hydroxydes) et de complexation avec le TRIS.	126
Tableau 5.2 : Mobilités électrophorétiques des 11 protéines sériques en CE-UV.	145
Tableau 5.3 : Résultats obtenus dans les analyses du sérum – uranium en CE-ICP/MS.	147

Abréviations et symboles

A

A1AH : α 1-acide glycoprotéine
 A2MG : α 2- macroglobuline
 Abs : absorbance
 ACE : électrophorèse capillaire d'affinité
 AFM : microscopie à force atomique :
 APA 1 : apolipoprotéine
 ATF : apotransferrine

B

BGE : électrolyte de séparation

C

Ca-P : phosphate de calcium
 CD : dichroïsme circulaire
 CE : électrophorèse capillaire
 CERU : céruloplasmine
 CMC : Concentration micellaire critique
 CO3: complément 3
 CO4: complément 4
 CPP : particule de calciprotéines
 CTAB : bromure
 d'hexadécyltriméthylammonium

D

DLS : diffusion dynamique de la lumière
 DMSO : diméthylsulfoxyde
 DS : sulfate de dextran
 dP-eOPN : ostéopontine déphosphorylée
 dP-fOPN : fragment de l'ostéopontine
 déphosphorylé
 DSC : calorimétrie différentielle à balayage

E

ESI : ionisation par electrospray
 EOF : flux électroosmotique
 EXAFS : spectroscopie d'absorption des
 rayons X

F

FA : analyse frontale
 FET : fétuine ou α -2-HS-glycoprotéine
 fOPN : fragment de l'ostéopontine

H

HAP : hydroxyapatite
 HD : méthode de Hummel Dreyer
 HEMO : hémopexine
 HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine
 éthane sulfonique
 HPC : hydroxypropyl cellulose
 HPLC : chromatographie liquide à haute
 performance
 HSA : albumine du sérum humain
 HTF : holotransferrine

I

ICP/MS : spectrométrie de masse à ionisation
 par plasma
 i.d. : diamètre interne
 IgG : immunoglobuline G
 IMAC : chromatographie d'affinité pour un
 métal immobilisé
 IRTF : infra-rouge à transformée de Fourier
 ITC : titration calorimétrique isotherme

L

LCST : température critique inférieure de solubilité

O

o.d. : diamètre externe

OPN (ou eOPN) : ostéopontine

P

PB : polybrène

R

RMN : résonance magnétique nucléaire

RSD : erreur relative

S

SEC : chromatographie d'exclusion stérique

SPR : résonance plasmonique de surface

T

TBP : tributylphosphine

TF : transferrine

TFR : récepteur de la transferrine

TRIS : trishydroxyméthylaminométhane

U

UV : ultra-violet

V

VACE : électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance

VP : méthode des pics de vacance

Symboles

k_w : vitesse d'échange d'eau des métaux

L_t : longueur totale du capillaire

L_d : longueur du capillaire jusqu'au détecteur

μ_{eo} : mobilité électroosmotique

μ_{ep} : mobilité électrophorétique

R_s : résolution

$t_{1/2}$: temps de demi-vie

Introduction générale

Le rôle des métaux dans l'organisme est un vaste domaine d'étude qui revêt un intérêt considérable compte tenu de ses multiples enjeux. On estime en effet que plus d'un tiers des protéines sont associées à des métaux qui sont fixés dans leurs sites actifs ou jouent le rôle d'éléments structuraux. L'action des métaux peut être étendue au rôle des métaux exogènes dans l'organisme, qu'ils soient purement toxiques ou à visée diagnostique et thérapeutique. La caractérisation des complexes protéine/métal par un ensemble de techniques constitue un des champs d'investigation mais il est nécessaire de ne pas s'affranchir du contexte cellulaire pour améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires. La sélectivité d'une protéine pour un métal est en effet un aspect essentiel de la vie des organismes qui prend en compte non seulement la protéine impliquée mais aussi toute une cascade de systèmes de sélection tels que le passage membranaire ou le recours à des protéines chaperonnes, pour n'en citer que quelques-uns. Par conséquent, les outils analytiques développés doivent maintenant prendre en compte la complexité du système biologique. C'est à cet aspect que s'adresse la métallomique, science jeune dans le monde des techniques « omiques », qui s'est largement développée les quinze dernières années.

Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au cas de l'uranium. Sa présence dans l'environnement est naturelle mais résulte aussi d'activités humaines liées à l'industrie du nucléaire, à l'exploitation minière et à l'utilisation d'engrais phosphatés. D'autre part, la guerre de Golfe de 1990-1991 a conduit à l'apparition chez les vétérans de cette guerre d'un syndrome caractérisé par de nombreux symptômes décrits dans plusieurs publications^{1,2} : fatigue, déficit cognitif, confusion, ataxie, douleur neuropathique centrale, problème de peau, perte de contrôle de muscle, etc. Bien que l'implication de l'uranium ne soit pas réellement avérée, la polémique qui s'est instaurée autour de l'utilisation d'uranium appauvri a provoqué une réelle prise de conscience quant au manque de données concernant la toxicité chimique de l'uranium et les mécanismes liés à son action dans le corps humain. L'importance de réaliser des études spécifiques est d'autant plus cruciale qu'il n'existe pas d'analogues structuraux de ce métal. Depuis le milieu des années 90, on constate donc une augmentation constante du nombre de publications liées à cette thématique. Cependant leur nombre reste encore très limité.

Nous nous proposons donc de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans le transport et l'accumulation de l'uranium dans le corps humain en développant une méthode analytique basée sur le couplage CE-ICP/MS qui prendra en compte la complexité

des échantillons biologiques. En effet, ce couplage possède de multiples avantages en combinant notamment la bonne capacité de séparation de l'électrophorèse capillaire dans des conditions peu ou pas dénaturantes, les très faibles volumes d'échantillon nécessaires (quelques dizaines de nl) et le pouvoir de détection sensible, sélectif et multi-élémentaire de l'ICP/MS. Ces caractéristiques devraient permettre l'analyse d'échantillons complexes contenant plusieurs protéines ou/et plusieurs métaux.

L'objectif de cette thèse est donc de développer le couplage CE-ICP/MS et d'évaluer son application au criblage des protéines cibles de l'uranium dans les fluides biologiques.

La première partie de la thèse portera sur le bilan succinct des connaissances actuelles de la toxicité et des protéines cibles de l'uranium. Une partie consacrée aux méthodologies analytiques mises en œuvre dans le domaine de la métallomique y sera associée, avec une focalisation sur le cas de l'uranium. Leurs avantages et inconvénients seront discutés et illustrés au travers d'applications récentes dans le domaine.

Nous aborderons ensuite les arguments conduisant au choix instrumental du couplage CE-ICP/MS. L'interfaçage n'étant pas une option commerciale, nous détaillerons les aspects techniques importants de sa mise en place en laboratoire. Les paramètres du couplage seront optimisés afin d'avoir un système analytique reproductible, efficace et automatisé.

Le troisième chapitre consistera en une étude des conditions de séparation des complexes protéine-métal en électrophorèse capillaire. L'enjeu est de trouver les conditions d'analyse (pH et force ionique de l'électrolyte, voltage, pression et nature de capillaire) permettant de minimiser l'adsorption du métal et des protéines sur la surface du capillaire, d'avoir une résolution de séparation acceptable tout en conservant les complexes protéine-uranium, de l'injection jusqu'à la détection. Cette évaluation sera donc basée sur la quantification relative de complexes entre l'uranium et des protéines standards mais aussi les résolutions de séparation obtenues.

La quatrième partie portera sur la validation du couplage basée sur l'étude des interactions entre l'uranium et des protéines dont la constante d'affinité est connue: transferrine (TF), féтуine (FET) et ostéopontine (OPN). Les études seront réalisées soit à partir de solutions de protéines individuelles, soit sur des mélanges impliquant deux partenaires potentiels de l'uranium. La comparaison entre les résultats obtenus avec ceux dans la bibliographie permettra d'évaluer l'applicabilité de cette technique dans l'étude des complexes protéine-métal ainsi que ses atouts.

Le dernier chapitre sera consacré à l'analyse d'échantillons plus complexes. Son but sera de donner une vision claire et impartiale de ses atouts mais aussi de ses faiblesses et du

chemin qu'il reste à parcourir dans le domaine de la métallomique. Le potentiel de la détection multi-élémentaire de l'ICP/MS sera exploité par l'étude de l'influence des métaux de transition sur la complexation entre uranium et protéines. L'influence de la formation de complexes avec l'uranium sur le rôle des protéines (FET et OPN) en tant qu'inhibiteurs de la précipitation du phosphate de calcium sera étudiée en utilisant d'une approche multi-technique: ICP/MS, DLS et CE-ICP/MS. Enfin, l'aspect séparatif et le potentiel du couplage CE-ICP/MS dans la recherche des cibles protéiques de l'uranium dans les fluides biologiques seront évalués par des analyses réalisées directement sur un sérum humain.

Chapitre 1. Bibliographie

1.1. Uranium et toxicité

L'uranium est un métal présent dans l'environnement de façon naturelle mais résulte aussi d'activités humaines (industrie du nucléaire, exploitation minière, engrais phosphatés, etc).

Dans les sols, la concentration d'uranium naturel est en moyenne de 3 µg/g (Etats-Unis).³ Dans les eaux, l'uranium est peu concentré, de l'ordre de quelques µg/l.⁴ Il existe cependant des zones où la concentration naturelle dans l'eau est très importante. Ainsi en Norvège, elle est de 20 - 28 µg/l en moyenne et peut atteindre 750 µg/l.^{5,6} L'utilisation des engrais phosphatés contribue à l'augmentation de ces concentrations, non seulement dans les eaux et les sols mais aussi dans l'alimentation. Ainsi, on a relevé en Serbie une accumulation annuelle de l'uranium dans les sols de 10 g U/ha.⁷ A Pujab, en Inde, sa concentration maximale dans l'eau peut atteindre 212 µg/l.⁸ La contribution de l'alimentation à la dose journalière d'uranium absorbée par l'homme a été estimée de 0,9 – 1,5 µg/jour pour l'alimentation et 1,2 µg/jour pour l'eau (ATSDR, 2013).³ Selon WHO, la limite recommandée dans l'eau est de 30 µg/l (2011)⁴ et l'adsorption tolérable orale chez l'homme est de 1 µg/kg/jour (2011)⁴. Ansoborlo *et al.*⁹ soulignent d'ailleurs que l'uranium représente un cas unique, pour lequel ces valeurs ont été significativement augmentées sur une période de moins de 15 ans.

Il existe trois isotopes naturels: ²³⁴U (0,0054 %), ²³⁵U (0,7110 %) et ²³⁸U (99,2836%) dont les temps de demi-vie sont de 2,46.10⁵ ans, de 7,04.10⁸ ans et de 4,47.10⁹ ans respectivement, mais aussi de nombreux isotopes artificiels (²³²U, ²³³U, ²³⁶U, etc). L'uranium possède donc à la fois une toxicité chimique et radiochimique, dépendant de chaque isotope, ²³⁴U (le moins abondant) et ²³⁵U étant les plus radioactifs. ²³⁸U est un émetteur α et ses particules possèdent donc un faible pouvoir de pénétration. La radiotoxicité sera donc considérée comme prépondérante dans des échantillons enrichis en ²³⁵U.

Les voies de contamination de l'uranium sont l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané. Les mécanismes d'accumulation et de transport vers les organes cibles de l'uranium sont encore méconnus. Après passage dans le sang, l'uranium est excrété par voie urinaire (55 – 60 %) et s'accumule principalement dans les os (10 – 15 %), les reins (12 – 25 %) et les muscles (5 %) ^{10,11} mais l'uranium peut traverser les barrières cutanées, digestives et cérébrales.¹² Dans les reins, les tubules proximaux sont considérés comme les cibles principales.³ L'uranium s'y

accumule sous forme d'un précipité avec le phosphate intracellulaire ou sous forme soluble avec le carbonate.¹³ Une augmentation de l'albumine, de l'alpha-1-antiprotéinase, de la sérotransferrine, du facteur de croissance EGF et de la protéine de fixation de la vitamine D a été observée dans les urines des rats exposés par l'uranium.¹⁴ L'uranium induit également une diminution de la concentration de l'ostéopontine, de l'HSP90, de la protéine 14.3.3, de l'HMGB1 dans les cellules rénales HK2^{15,16} et de l'ostéopontine dans l'urine humaine¹⁷. Sur les cellules épithéliales bronchiques humaines, le potentiel cancérigène de l'uranium a été avancé.¹⁸⁻²⁰ Dans une autre étude, il a été démontré qu'une augmentation du taux de la TNF α excrétée par les macrophages peut être induite par l'uranium.²¹ Quant à l'os, plusieurs auteurs ont montré que l'uranium inhibe la différenciation et le fonctionnement des ostéoblastes.²²⁻²⁴ Il s'accumule dans l'os en remplaçant le calcium.²⁵ Très récemment, Arzuaga *et al.*²⁶ ont détaillé, dans leur article de revue, l'influence de l'uranium sur la croissance et l'homéostasie de l'os et indirectement sur la synthèse de vitamine D (Figure 1.1).

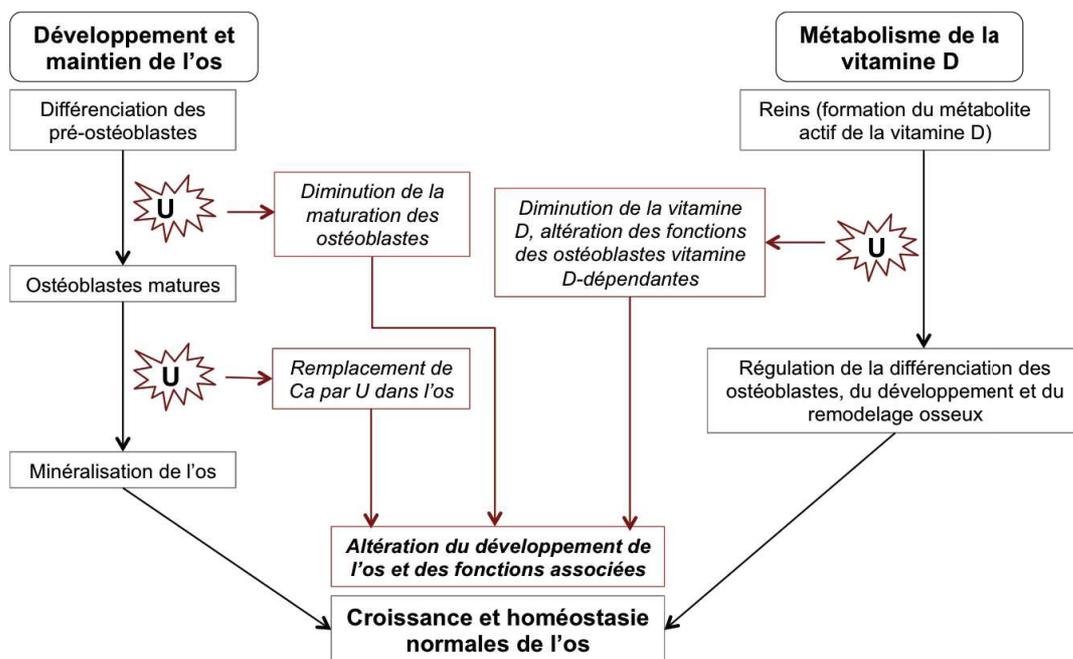


Figure 1.1 : Mode d'action de l'uranium dans la perturbation du développement de l'os.²⁶

Plusieurs agents décorporants ont été élaborés mais très peu ont atteint la phase clinique en raison, soit de leur toxicité élevée, soit de leur faible spécificité. A titre d'exemple, Taran *et al.*²⁷ ont synthétisé et sélectionné 23 agents chélatants présentant une affinité pour l'uranium et les ont testés *in vivo* chez les rats. Parmi eux, 11 ont provoqué l'altération de la biodistribution de l'uranium en induisant son accumulation dans le foie. Cependant, le meilleur candidat peut diminuer sa rétention et augmenter l'excrétion d'environ de 10 % de l'uranium injecté. Parmi les agents décorporants chimiques testés en phase clinique

recensés par Fattal *et al.*,²⁸ on peut citer le 3,4,3-LI(1,2-HOPO) en phase clinique 1, développé par Durbin *et al.*,^{29,30} et l'EHBP (acide 1-hydroxyéthane 1,1'-diphosphonique) (Didronel®) déjà utilisé dans le traitement de l'ostéoporose en phase clinique³¹. Récemment, le CBMIDA (acide catéchol- 3,6-bis (méthyliminodiacétique)) a démontré son efficacité chez le rat,³² et a été utilisé avec succès dans le traitement d'un patient de 12 ans contaminé par l'uranium³³. Enfin, le « design » et la synthèse des molécules bio-inspirées (peptides, protéines, anticorps) affines à l'uranium est un axe en plein développement et pourrait permettre de répondre à cette problématique.³⁴⁻³⁷

1.2. Stratégies analytiques utilisées pour la recherche des cibles biologiques de l'uranium

L'élucidation des mécanismes conduisant à la toxicité de l'uranium et donc au développement d'agents décorporants, nécessite de disposer d'informations au niveau moléculaire. Il est donc crucial de déterminer et de caractériser les protéines participant au transport et à l'accumulation de l'uranium chez l'homme.

Les études sont consacrées à l'identification des cibles protéiques de l'uranium (et des métaux en général) sont encore trop rares. Les stratégies analytiques se subdivisent en deux catégories (Figure 1.2) :

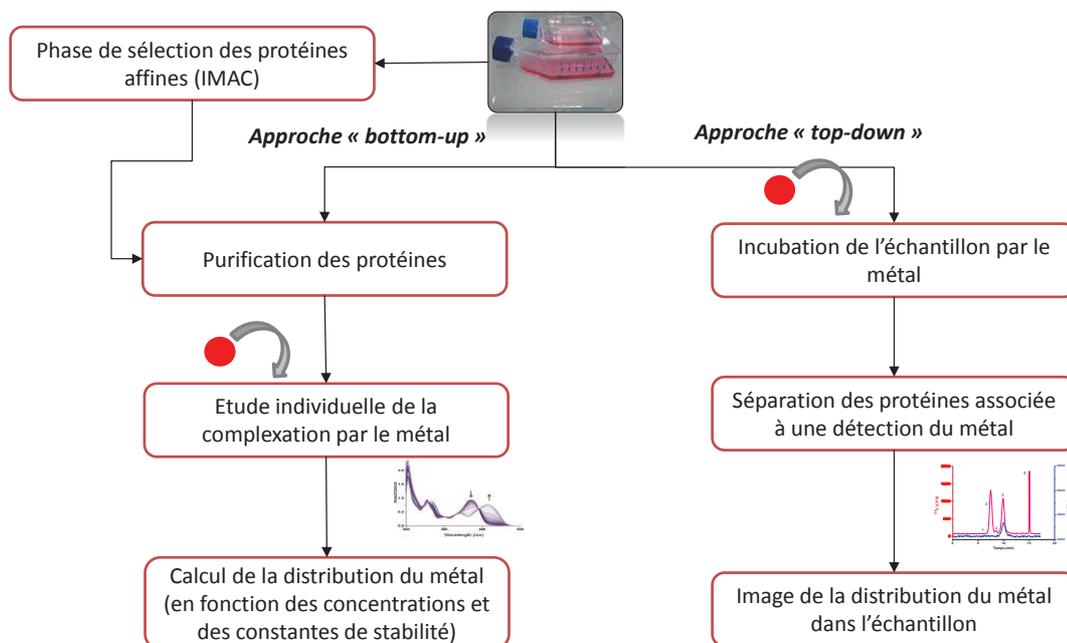


Figure 1.2 : Stratégies analytiques utilisées dans l'identification des protéines cibles du métal.

- les approches «bottom-up» où l'affinité de chaque protéine pour le métal et l'altération de ses fonctions sont étudiées de manière individuelle. Pour cela, l'établissement des interactions protéine-métal est réalisé **après** purification des protéines. Ces approches sont utilisées pour caractériser les complexes de protéines suspectées ou préalablement identifiées comme étant des cibles pertinentes du métal.
- les approches « top-down » où les cibles des métaux sont déterminées directement à partir du milieu biologique et où ce milieu est donc **préalablement** incubé en présence du métal. L'objectif de ces approches est le criblage et l'identification des cibles protéiques à partir d'échantillons complexes, étape indispensable, notamment quand la composition de ces échantillons n'est que partiellement connue.

Ces deux stratégies sont complémentaires dans l'élucidation des mécanismes moléculaires.

1.1.1. Stratégie « bottom-up »

Les approches «bottom-up» permettent d'obtenir une caractérisation fine des complexes nécessaire à la compréhension de la toxicité des métaux (i.e. stœchiométrie, constantes de complexation, structure des complexes). Leur utilisation en spéciation est néanmoins possible via une modélisation à partir des constantes d'affinité mais reste difficile car chronophage et onéreuse.

Ces approches font appel à des familles de techniques différentes :

- les méthodes spectrométriques, qui vont mesurer les changements des propriétés physicochimiques spécifiques entre espèces libres et complexes. Parmi celles-ci, on peut citer la spectrométrie UV-Visible, la fluorescence, la spectrométrie de masse, la résonance plasmonique de surface (SPR), le dichroïsme circulaire, etc.
- les méthodes calorimétriques, qui fournissent des informations sur la thermodynamique des interactions protéine-métal.
- les méthodes séparatives, qui conservent l'équilibre de complexation (dialyse à l'équilibre, électrophorèse d'affinité, etc.), ou qui travaillent hors équilibre en séparant espèces libres et espèces liées. A ce dernier groupe appartiennent notamment l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation.

La Figure 1.3 représente les gammes de concentrations de travail requises par les principales techniques analytiques directes pour étudier l'uranium.³⁸

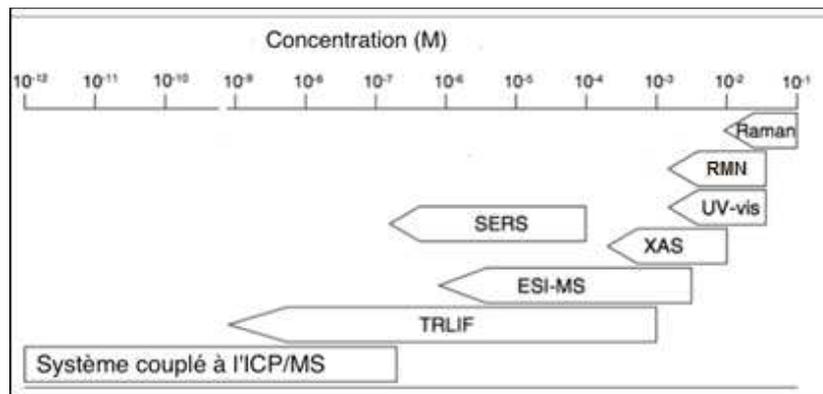


Figure 1.3 : Techniques analytiques directes utilisées pour étudier l'uranium et gammes de concentrations accessibles.³⁸

RMN : résonance magnétique nucléaire, SERS : spectroscopie Raman exaltée de surface , XAS : spectroscopie d'absorption de rayons X, TRLIF : spectroscopie de fluorescence induite par laser résolue dans le temps.

1.2.1.1. Méthodes spectrométriques

Les méthodes spectrométriques peuvent se diviser en deux sous-groupes :

- les méthodes permettant de déterminer la stoechiométrie et/ou les constantes de complexation : UV-visible, fluorescence, spectrométrie de masse, résonance plasmonique de surface (SPR).
- les méthodes offrant des informations structurales (conformation ou structure secondaire) : dichroïsme circulaire (CD), infrarouge (IR), résonance magnétique nucléaire (RMN), spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS).

Spectrométries UV-visible et fluorescence

Les spectres UV-vis ou de fluorescence sont caractéristiques des transitions électroniques que subissent les solutés lors de l'absorption d'un rayonnement lumineux. Deux approches peuvent être envisagées : soit l'étude des modifications des spectres réalisés lors de l'excitation (UV) ou lors de la désexcitation (fluorescence), caractéristiques de la formation des complexes métalliques, soit l'analyse quantitative à longueur d'onde fixe.

L'UV-vis a été largement exploité pour l'étude d'interaction des métaux avec les sites de liaison du fer de TF. Le spectre de cette protéine montre en effet une bande aux alentours de 280 nm, caractéristique des transitions $\pi - \pi^*$ des acides aminés aromatiques. L'interaction des métaux affectant directement les résidus tyrosine présents dans le site d'interaction, le déplacement de longueur d'onde du maximum pourra être utilisé pour les titrages. De nombreux exemples sont donnés dans la revue de Sun et al.³⁹ consacrée à cette protéine.

Ainsi la formation du complexe TF : U 1 :2 a été mise en évidence via un changement en absorption à 400 nm représentant l'ion uranyl et à 242 nm représentant la coordination tyrosine-uranium.^{40,41} Dans une autre étude, Wan *et al.*⁴² ont exploité les caractéristiques des porphyrines pour étudier la complexation de l'uranium avec le cytochrome b_5 à 405 - 415 nm (bande Soret) qui représente l'environnement de coordination de l'hème-Fe(III).

La spectrométrie de fluorescence est la technique de prédilection dans les études impliquant l'uranium malgré les phénomènes de quenching observés avec cet élément. De nombreux auteurs ont utilisé la fluorescence induite par laser résolue dans le temps (TRLIF) pour déterminer les constantes de complexation entre uranium et des protéines telles que transferrine,^{40,43} albumine,^{40,43} métallothionéine,⁴³ ferritine,⁴³ fétuine,⁴⁴ cytochromes b_5 et c ,^{42,45} acétylcholine esterase,⁴⁶ vitellogénine⁴⁶.

Résonance plasmonique de surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (SPR) permet la mesure de l'interaction d'un ligand avec un « récepteur » immobilisé sur une surface. Dans cette technique, l'un des deux solutés (protéine ou métal) est immobilisé sur la surface et l'autre va se fixer sur la surface grâce à l'affinité.

Un des avantages de cette technique est de permettre l'accès à une large gamme des constantes de complexation. De plus, elle consomme très peu d'échantillon et de temps d'expérience, notamment grâce à l'utilisation de supports greffés commercialisés. Cependant, le principal biais de cette méthode est la nécessité d'immobilisation d'un des solutés qui conduit à l'étude d'une interaction qui ne reflète pas toujours l'interaction en solution.

L'immobilisation du métal conduit à la possibilité de criblage de nombreuses protéines avec une puce unique. Différentes techniques d'immobilisation de ce métal ont été envisagées (chélatant, anticorps, etc). Bernaudat et Büllow ont utilisé la SPR dans le criblage de l'affinité des protéines lactate-déshydrogénases marquées par des histidines avec le Ni^{2+} .⁴⁷ En utilisant une puce commerciale, greffée en surface par l'acide nitrilotriacétique (NTA), sur lequel l'ion Ni^{2+} a été immobilisé, un protocole rapide (quelques minutes/mesure) a été établi pour déterminer les constantes de dissociation entre métal et protéines individuelles. De la même façon, différents supports greffés commercialisés ont été utilisés pour immobiliser des nanoparticules d'oxydes métalliques (TiO_2 , CeO_2 , Al_2O_3) et déterminer leur affinité vis-à-vis de HSA et du fibrinogène.⁴⁸ Dans le cas de l'uranium, Averseng *et al.*^{44,49} ont récemment proposé une méthode originale permettant de déterminer l'affinité des protéines pour l'uranium via la détermination de la concentration d'uranium libre à l'équilibre. Ce dernier est

immobilisé via des interactions avec un anticorps spécifique greffé sur la surface et sa concentration est mesurée de façon indirecte par interaction avec DCP (acide 1,10-phénanthroline-2,9 dicarboxylique). Cette méthode a été appliquée à la détermination des constantes de dissociation des 13 protéines sériques les plus abondantes avec l'uranium.

Dans la configuration inverse, le système permet de cribler l'affinité de nombreux métaux pour une protéine unique. Ainsi, l'immobilisation de l'apo-métallothionéine (apo-MT) sur la surface a permis la détermination de son affinité de la protéine vis-à-vis de Cd^{2+} ,⁵⁰ Hg^{2+} ,⁵⁰ et Cu^+ (issu de la réduction de Cu^{2+} , accompagnée de l'oxydation partielle de MT)⁵¹.

Spectrométrie de masse

Mises à part les méthodes spectroscopiques précédentes, la spectrométrie de masse moléculaire a également utilisée. Cette méthode permet de distinguer les protéines de leurs complexes grâce à leur différence en m/z. L'ESI/MS en particulier fournit une ionisation douce qui permet de conserver les complexes non-covalents. De nombreux exemples de son utilisation ont été récapitulés par Vogiatzis *et al.*⁵² Dans le domaine plus spécifique des interactions protéine/métal, on recense dans la bibliographie la mise en évidence d'un complexe CH_3Hg^+ / métallothionéine ($\text{Zn}_7\text{MT-2}$),⁵³ ou encore Zn^{2+} / ubiquitine⁵⁴.

Son utilisation reste cependant limitée pour le moment à la mise en évidence de complexes avec les protéines et la détermination des stœchiométries. En effet, l'accès aux constantes de complexation passe dans ce cas par la quantification des différentes espèces. Celles-ci (protéine et complexes) possédant des efficacités de vaporisation et d'ionisation différentes, la quantification sera difficile.⁵⁵ De plus, la formation d'adduits avec les anions inorganiques présents dans l'échantillon va introduire un biais supplémentaire dans la quantification.⁵⁶ Enfin, la spectrométrie de masse des protéines entières est en pleine expansion mais pose encore des problèmes de détection, compte-tenu des masses moléculaires importantes et des hétérogénéités dues aux modifications post-traductionnelles.

A notre connaissance, aucune étude n'a utilisé cette technique pour mettre en évidence l'interaction d'une protéine avec l'uranium.

Dichroïsme circulaire (CD), infrarouge (IR), résonance magnétique nucléaire (RMN), spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS)

Le dichroïsme circulaire (CD), l'infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie d'absorption de rayons X (XAS) peuvent fournir des informations structurales sur les complexes protéine-uranium. Alors que le dichroïsme circulaire détecte

principalement les modifications de la structure secondaire des protéines dues à la complexation, l'infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie d'absorption de rayons X peuvent offrir une information directe sur les sites d'interaction (groupements fonctionnels impliqués par exemple).

Le dichroïsme circulaire est utilisé comme méthode complémentaire des méthodes de détermination des constantes de complexation afin d'avoir l'information de conformation des complexes. Ainsi, la fixation de CH_3Hg^+ sur les liaisons $-\text{SH}$ d'une métallothionéine induit la disparition des domaines α et β de la protéine et donc sa destructuration.⁵³ L'hypothèse de l'implication des ponts disulfure dans la fixation de l'uranium à la fétuine a également été avancée.⁴⁴ Le CD a également confirmé l'implication du site actif de l'hème et des acides aminés aromatiques dans le complexe cytochrome c –uranium.⁴²

La RMN permet la détermination des propriétés structurales et dynamiques des molécules biologiques au travers de l'examen des déplacements chimiques et des temps de relaxation de certains noyaux comme ^1H , ^{13}C , ^{15}N , qui dépendent spécifiquement de l'environnement. Une revue récente met en avant ses avantages dans l'étude des interactions des métaux avec les domaines solubles non structurés des protéines.⁵⁷ Si elle a été utilisée pour étudier l'interaction entre l'uranium et de petites molécules telles que le carbonate,⁵⁸ l'iminodiacétate (IDA)⁵⁹ et l'oxydiacétate (ODA)⁵⁹, aucune étude n'a été réalisée sur des complexes protéine-uranium. Ceci pourrait s'expliquer par les quantités importantes d'échantillon nécessaires en RMN.³⁸

La complémentarité de ces techniques peut être illustrée au travers de deux exemples : le premier aboutissant à la caractérisation des sites d'interaction de la transferrine avec l'uranium au moyen de la combinaison des données obtenues en UV-vis, infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et dichroïsme circulaire (CD),⁴⁰ le second combinant fluorescence (TRLFS), l'absorption de rayons X et l'infrarouge (ATR-FTIR) pour déterminer le site de complexation de l'uranium dans le peptide de l'ostéopontine « pSDEpSDE».⁶⁰

1.2.1.2. Méthodes calorimétriques

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la titration calorimétrique isotherme (ITC) sont deux approches calorimétriques utilisées pour étudier les interactions protéine-métal. Alors que la première est utilisée pour quantifier la participation des métaux à la stabilité des protéines, la seconde permet le calcul direct des paramètres thermodynamiques de l'interaction. Le grand avantage de ces techniques est l'accès aux informations thermodynamiques fondamentales liées aux complexes (i.e. constante d'affinité,

stœchiométrie mais également enthalpie (ΔH), entropie (ΔS) et énergie libre de Gibbs (ΔG) de l'interaction).

Une revue de D.E. Wilcox⁶¹ détaille l'application de l'ITC dans le domaine des interactions protéine-métal, jusqu'en 2008. Récemment, l'ITC a été utilisée pour comparer l'affinité entre deux anti-tumoraux, Au (III) et Ga (III), avec l'albumine.⁶² Les résultats obtenus sont en accord avec les études réalisées en UV-Vis et en fluorescence et montrent que l'Au (III) a une affinité pour l'HSA supérieure à celle du Ga (III) de deux ordres de grandeur. De la même façon, cette technique a été utilisée pour démontrer l'augmentation de l'affinité de l'albumine pour Zn^{2+} par addition de groupements carboxylate en surface.⁶³ Quant à l'uranium, Safi *et al.*⁶⁰ ont utilisé cette méthode pour déterminer l'interaction entre le peptide « pSDEpSDE » de l'ostéopontine avec l'uranium. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur des systèmes protéine-uranium.

Peu d'études ont été réalisées en DSC. Celle-ci a néanmoins été utilisée pour étudier la stabilité du complexe TF-uranium. Les résultats indiquent de très faibles modifications de la stabilité du complexe et une conformation proche de celle de la forme apo de la protéine.⁴⁰

1.2.1.3. Méthodes séparatives

Dialyse à l'équilibre (ED)

La dialyse à l'équilibre est la méthode séparative la plus simple utilisée dans l'étude de l'interaction entre un métal et une protéine. Cette technique implique deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, c'est-à-dire perméable aux ions métalliques et imperméable aux macromolécules (protéines et complexes protéine-métal). Après un temps d'équilibre, la concentration du métal libre est déterminée dans un des compartiments pour déduire la constante de complexation.

Cependant, cette technique est généralement chronophage, au moins 12 h pour une expérience. Cependant, il existe des systèmes offrant des surfaces d'échange plus importantes, permettant de réduire les temps d'équilibre à 3 – 4 h (RED Device de Thermo-Fisher, Multi-Equilibrium Dialyzer de Harvard). De plus, l'adsorption non-spécifique du métal sur la membrane, le changement de volume dû à la pression oncotique et l'effet Donnan à cause de la charge des protéines peuvent fausser les mesures.

Cette méthode permet d'étudier la stœchiométrie, la constante d'affinité et également la compétition entre métaux dans l'affinité avec la protéine. En effet, Carter et Hausinger⁶⁴ ont récemment utilisé un dispositif rapide de dialyse à l'équilibre pour étudier simultanément

l'interaction entre Ni^{2+} et Zn^{2+} avec la protéine MBP-UreD purifiée de *Klebsiella aerogenes*. Une stœchiométrie de 2,5 Ni^{2+} par protéine avec une constante de dissociation de 50 μM , soit 10 fois moins forte que celle avec le Zn^{2+} , a été déterminée.

Ultrafiltration et ultracentrifugation

L'ultrafiltration met en jeu des membranes identiques à celles utilisées en dialyse et permet la séparation des protéines (et de leurs complexes) des métaux en appliquant une pression sur la membrane afin d'augmenter la perméabilité des petites molécules. Il en découle des inconvénients identiques à ceux de la dialyse à l'équilibre, tels que l'adsorption non spécifique des espèces sur la membrane et l'effet Donnan.

L'ultracentrifugation, quant à elle, est basée sur la séparation des solutés selon leur masse moléculaire à l'aide d'une force centrifuge : métal libre dans le surnageant et protéine, complexe protéine-métal dans la partie sédimentée. Comme l'utilisation d'une membrane n'est pas nécessaire, les inconvénients liés à celle-ci sont évités. Cependant, la concentration du métal libre dans le surnageant peut être affectée par plusieurs phénomènes physiques : sédimentation, rétrodiffusion et viscosité. De plus, l'équipement est plus coûteux que ceux nécessaires à la dialyse ou à l'ultrafiltration. Enfin, le principal inconvénient de ces techniques est la perturbation de l'équilibre de complexation.

Actuellement, très peu d'études ont utilisé cette technique dans l'étude des interactions protéine-métal. Schmidt et al.⁵⁶ ont utilisé l'ultrafiltration avec une membrane d'exclusion par taille pour étudier l'effet du tampon utilisé en électrophorèse sur gel sur l'interaction entre lysozyme et Zn (II) ou Cu (II). Les auteurs ont montré que la protéine a perdu son affinité avec les métaux en présence du tampon utilisé en 1D-SDS-PAGE et de la solution de coloration à l'argent.

Il faut aussi noter que dans ces techniques comme dans le cas de la dialyse à l'équilibre, la détermination de la concentration du métal libre est cruciale pour le calcul des constantes d'affinité. Pour cela, les techniques analytiques doivent être sensibles dans la gamme de concentrations du métal utilisée. A titre d'exemple, la limite de détection de l'uranium en ICP/MS est de l'ordre du ng/l .

Méthodes chromatographiques et électrophorèse capillaire

Les méthodes séparatives analytiques permettent la détermination de constantes de complexation. Si la chromatographie peut être utilisée dans ce but, l'électrophorèse capillaire a pris une importance considérable dans ce domaine, qui conduit à supplanter la

chromatographie. Ceci peut notamment s'expliquer par les volumes engagés qui limitent la consommation de protéine et par les temps d'analyse plus faibles.

On peut diviser ces techniques en fonction de la configuration choisie : analyse frontale (injection d'un créneau d'échantillon) et analyse de zone (injection d'une faible quantité d'échantillon). Dans cette seconde configuration, plusieurs approches sont possibles : analyse d'affinité, méthode de Hummel et Dreyer (HD), méthode de vacance des pics (VP), méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance (VACE).

- **Analyse frontale** : elle est basée sur la séparation du métal par rapport à la protéine et au complexe protéine-métal. Un grand volume de mélange protéine-métal incubé est introduit dans le capillaire rempli du tampon (soit 10 - 20% de volume effectif du capillaire). Cette quantité est assez grande afin de maintenir l'équilibre lors de la séparation. La dissociation des complexes est donc suffisamment faible pour qu'elle puisse être négligée. La méthode est adaptée pour que la protéine et le complexe migrent dans une même zone et soient suffisamment séparés du métal libre. La mesure de la hauteur du plateau du métal libre conduit à la concentration du dernier.
- **Electrophorèse capillaire d'affinité** : elle est l'une des méthodes les plus simples et les plus fréquemment utilisées pour l'estimation des constantes d'interaction en électrophorèse capillaire. Elle consiste à conditionner le capillaire avec un électrolyte contenant un des deux solutés (souvent le métal) à différentes concentrations, et à injecter un faible volume de l'autre (souvent la protéine). S'il y a complexation, un déplacement du pic correspondant au composé injecté et par conséquent, une variation de sa mobilité électrophorétique apparente seront observés. Cette variation de mobilité électrophorétique observée peut être reliée aux constantes de complexation des différents complexes, à leur mobilité électrophorétique propre ainsi qu'à la concentration du composé présent dans l'électrolyte. Un des avantages majeurs de cette méthode est qu'il n'est pas nécessaire de connaître avec précision la concentration du soluté injectée.
- **Méthode de Hummel et Dreyer (HD)** : Elle utilise le même dispositif expérimental que l'électrophorèse d'affinité. S'il y a complexation, un pic positif correspondant au composé injecté sera observé ainsi qu'un pic négatif, correspondant à celui présent dans l'électrolyte, résultant de la consommation de celui-ci lors de la formation du complexe. La variation de l'aire de ce dernier pic est alors proportionnelle à la quantité de ligand lié et peut être déterminée soit par étalonnage externe, soit par étalonnage interne, ce qui permet la détermination de constantes d'affinité.
- **Méthode de vacance des pics (VP)** : Cette méthode consiste à injecter l'électrolyte de fond dénué de métal et de protéine dans une série d'électrolytes contenant ces deux espèces, dont l'une des deux est en concentration variable. La complexation engendre

l'apparition d'un pic de vacance, observé pour l'espèce suivie, dont la variation d'aire sera proportionnelle à la concentration en ligand libre dans le mélange protéine/métal présent dans le capillaire.

- **Electrophorèse capillaire d'affinité et de vacance (VACE)** : De façon similaire, l'électrophorèse d'affinité et de vacance utilise le même dispositif expérimental que la méthode du pic vacant. Si la mobilité du ligand et la mobilité de l'analyte sont différentes, deux pics négatifs sont alors observés sur l'électrophérogramme, l'un correspondant au déficit en ligand, l'autre au déficit en analyte. La variation de mobilité électrophorétique des pics de vacance peut être corrélée aux constantes de complexation.

Le Tableau 1.1 récapitule la configuration, les avantages et les inconvénients des différents modes de détermination des constantes en électrophorèse capillaire dans le cas spécifique de l'étude des interactions entre protéine et métal, adapté de l'article de revue de Vuignier *et al.*⁶⁵

Tableau 1.1 : Comparaison des différents modes de détermination des constantes de complexation protéine/métal par électrophorèse capillaire.⁶⁵

	Analyse frontale	Analyse de zone			
		ACE	HD	VP	VACE
Configuration	 Grand volume d'injection				
Comment obtenir K	[L _{Libre}] : hauteur de plateau	Changement de μ de composé injecté	[L _{Lié}] : aire de pic	[L _{Libre}] : aire de pic	Changement de μ d'un de deux composés
Avantages et inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Possibilité d'analyse de cinétique lente et rapide - Études de multiples équilibres - Information stœchiométrique - Facilité d'obtention du pourcentage d'association 	<ul style="list-style-type: none"> - [L] exacte non requise - Pureté de l'échantillon non requise - [P] >> [L] - Information stœchiométrique non obtenue - Difficulté d'études de multiples équilibres 	<ul style="list-style-type: none"> - Facilité d'études de multiples équilibres - Information stœchiométrique - Facilité d'obtention pourcentage d'association - Pureté de l'échantillon non requise 	<ul style="list-style-type: none"> - Quantités de P et L plus importantes que dans les autres approches - Absorption d'électrolyte faible : faible sensibilité - Absorption d'électrolyte haute: saturation de détecteur - Facilité d'obtention du pourcentage d'association (pour VP) - Pureté de l'échantillon non requise 	
Information obtenue	K_1, n_1, K_2, n_2	K_1, K_2 (difficile)	K_1, n_1, K_2, n_2	K_1	K_1, n_1, K_2, n_2
Condition	$\mu_{PL} = \mu_P$ mais $\mu_L \neq \mu_P, \mu_{PL}$	$\mu_{PL} \neq \mu_L$	$\mu_{PL} \neq \mu_L$	$\mu_{PL} \neq \mu_P$ ou μ_L	$\mu_{PL} \neq \mu_P$ ou μ_L
Cinétique d'association	Lente et rapide	Rapide	Rapide	Rapide	Rapide

(P : Protéine ; L : Ligand ; PL : Complexe ; K : Constante d'affinité ; n : nombre de sites d'affinité ; K_1, n_1 : première constante d'affinité et nombre de sites associés ; K_2, n_2 : deuxième constante d'affinité et nombre de sites associés ; μ_P, μ_L, μ_{PL} : mobilités de la protéine, du ligand et du complexe protéine-ligand respectivement).

Parmi les applications les plus récentes, l'ACE a été utilisée pour déterminer l'affinité pour 28 métaux: Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} , La^{3+} , Pd^{2+} , Ir^{3+} , Ru^{3+} , Rh^{3+} , Pt^{2+} , Pt^{4+} , Os^{3+} , Au^{3+} , Au^+ , Ag^+ , Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , V^{3+} , MoO_4^{2-} et SeO_3^{2-} de l'albumine bovine, l'ovalbumine, la lactoglobuline et la myoglobine individuellement,^{66,67} et celle du composant-P amyloïde humain pour Mg^{2+} et Ca^{2+} ⁶⁸. Concernant l'uranium, l'ACE a été utilisée en couplage CE-ICP/MS pour déterminer les constantes de complexation par l'équipe d'Aupiais.⁶⁹⁻⁷¹ Toutefois, ces travaux ne s'adressent qu'à des petites molécules chimiques (i.e. oxalate).

1.2.1.4. Méthodes de recherche de nouvelles cibles protéiques

L'étude sans a priori des protéines impliquées dans une interaction avec un métal représenterait un travail titanesque et coûteux. La plupart des méthodes ci-dessus ont été utilisées sur des protéines dont l'affinité pour le métal était avérée ou suspectée. De nouvelles cibles pertinentes sont encore à découvrir mais il est nécessaire de trouver des méthodes permettant de limiter le champ d'investigation. Parmi elles, l'IMAC semble la plus pertinente et connaît une grande popularité.

Affinité pour un métal immobilisé (IMAC) :

L'affinité pour un métal immobilisé (IMAC) a d'abord été utilisée pour la purification des protéines,^{72,73} mais aussi récemment dans le criblage des cibles protéiques du métal⁷⁴⁻⁷⁶. Dans cette méthode, le métal est immobilisé sur la phase stationnaire grâce à un agent de chélation. Les protéines complexant le métal sont alors retenues sur la phase stationnaire. La grande majorité des applications concerne la purification de protéines marquées par des tags histidine et de ce fait, affines de métaux Cu^{2+} ou Ni^{2+} . Dans ce cas, la phase stationnaire la plus utilisée est de type silice greffée par un agent chélatant, l'acide iminodiacétique (IDA) le plus souvent. La phase mobile utilisée la sélection possède souvent un caractère alcalin afin d'augmenter la capacité de fixation des protéines sur le métal. L'élution des protéines retenues se fait alors (i) soit par abaissement du pH (pH = 4), (ii) soit par introduction d'un compétiteur (imidazole), (iii) soit par relargage du métal immobilisé par l'intermédiaire d'un chélatant de type EDTA. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de reconditionner la colonne avec le métal avant sa ré-utilisation.⁷⁷

Cependant, il faut noter que l'immobilisation du métal sur le support ne reflète pas son état en solution. D'une part, son manque de liberté ne lui permettra pas d'atteindre les sites enfouis dans les protéines, d'autre part l'utilisation d'un chélatant pour son immobilisation restreint le nombre d'interactions restantes. Enfin, on peut penser que des protéines de très

forte affinité pourront déplacer le métal et être éluées. Comme toutes les approches « bottom-up », elle ne prend pas compte les barrières sélectives du système vivant.

En l'absence de phases commerciales dédiées à l'uranium, l'utilisation originale de billes de Duolite C467 a été publiée. Cette phase a été utilisée dans la sélection des protéines cibles potentielles de l'uranium dans le sérum,⁷⁴ et les cellules HK-2 (64 protéines)⁷⁵. Malgré la non-spécificité de certains complexes observée en présence du fer, cette méthode peut permettre *a priori* de sélectionner les protéines cibles potentielles de l'uranium avant leur caractérisation par les méthodes conventionnelles énumérées ci-dessus.

De façon plus anecdotique on peut citer :

- les méthodes de fractionnement poussé qui consistent à séparer les protéines en un nombre important de fractions qui seront sélectionnées au vu de leur affinité pour le métal. Dans le cas de l'uranium, Vidaud *et al.*⁷⁸ ont ainsi utilisé la chromatographie 2D off-line (SEC et IEC) pour fractionner un sérum humain. Chaque fraction obtenue a ensuite été incubée en présence d'uranium et analysée par fluorescence ou par ICP/MS. Les protéines provenant des fractions contenant le plus d'uranium ont ensuite été identifiées par gel 2D-MALDI/TOF et leur affinité pour l'uranium a ensuite été validée sur chaque protéine individuellement Cette méthode a permis de déterminer 10 nouvelles protéines cibles potentielles de l'uranium. Cette méthode est néanmoins très consommatrice de temps et surtout d'échantillon.
- les méthodes « omiques » qui consistent à sélectionner les protéines pertinentes en fonction de leur expression en présence de métal. L'effet de l'uranium sur un organisme ou des cellules vivantes après exposition a été évalué par la transcriptomique et la protéomique. Plusieurs études relatent leur utilisation dans l'étude de la toxicité de l'uranium sur les reins,^{15,16} les poumons,^{19,20} etc. De nouvelles protéines impliquées dans ces processus peuvent être identifiées, soit directement, soit par analyse de la dérégulation des gènes. L'avantage de ces méthodes est de prendre en compte toute la complexité du système biologique. Toutefois toutes les protéines identifiées ne sont pas forcément cibles du métal (ex : protéines de stress).

1.1.2. Stratégie « top-down »

Les approches analytiques les plus fréquemment développées dans le domaine de la métalloprotéomique font classiquement appel aux techniques de couplages. Elles sont utilisées dans la sélection pertinente des cibles du métal dans les échantillons biologiques en tenant compte de la diversité des phénomènes de complexation mis en jeu et des barrières sélectives du métal dans l'organisme vivant, avant l'étude des interactions individuelles.

Les techniques de couplage consistent en une/plusieurs technique(s) séparative(s) couplée(s) à un/plusieurs détecteur(s) spécifique (s) du métal ou du complexe protéine-métal. Si les détections par la spectrométrie de masse élémentaire (ICP/MS) et/ou moléculaire (ESI/MS) restent les détections de choix pour les métaux et les protéines, côté séparation, deux tendances ont été recensées. La première favorise la résolution de séparation, offerte par les gels d'électrophorèse 2D par exemple, la seconde privilégie le maintien de l'intégrité des complexes, notamment par l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique ou de l'électrophorèse capillaire.

Ces approches visent à déterminer les protéines cibles directement à partir des milieux biologiques. Le système de sélectivité des métaux *in vivo* dans l'organisme est donc pris en compte.⁷⁹ Cependant, la principale difficulté consiste à trouver un compromis entre sélectivité de séparation des espèces et maintien de l'intégrité des complexes. La sélection du système de séparation (couple phase stationnaire/phase mobile notamment) constitue un des points essentiels. Nous avons donc discuté cette problématique dans l'article de revue présenté ci-après et récapitulé les applications de ces couplages à l'étude des interactions protéine-métal.



Separative techniques for metalloproteomics require balance between separation and perturbation

Agnès Hagège^{a,b,*}, Thi Ngoc Suong Huynh^b, Marc Hébrant^{c,d}

^a CNRS, UMR 7265, CEA/DSV/iBEB, 13108 St., Paul Les Durance, France

^b Laboratoire d'Etude des Protéines Cibles, CEA/DSV/iBEB/SBTN, BP 17171, 30207 Bagnols sur Cèze Cedex, France

^c LCPME, Université de Lorraine, UMR 7565, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

^d CNRS, LCPME, UMR 7565, 405 rue de Vandoeuvre, 54600 Villers-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Chromatography
Dissociation
Electrophoresis
Identification
Metal-binding protein
Metallic complex
Metalloproteomics
Metal-protein complex
Perturbation
Separation

ABSTRACT

Metal-binding proteins play a crucial role in biological systems and associated metals display many critical functions, so many analytical tools have been developed to identify metal-protein complexes. However, identification of metal-protein complexes remains challenging since it addresses non-covalently bound species that may dissociate during analysis, due to their separation from their medium or to the interactions implicit in the separation. Many strategies, usually involving separation techniques coupled with elemental detection, have been investigated to overcome technical issues that hamper the identification and the characterization of metal-protein complexes. This review focuses on the separation techniques used in this field and their impact on dissociation of metal-protein complexes. We discuss metal losses induced by both the separation system and disequilibrium effects.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	64
2. Metal losses induced by specific impact of different separation systems	66
2.1. Gel electrophoresis	67
2.2. Size-exclusion chromatography and capillary electrophoresis	70
2.3. Reversed-phase liquid chromatography (RPLC)	70
2.4. Ion exchange	70
2.5. Separation materials	71
3. Metal losses inherent to a separation process	71
3.1. Dilution effects	71
3.2. Disequilibrium effects	71
4. Conclusion	72
References	72

Abbreviations: AN-PAGE, Anodal native polyacrylamide gel electrophoresis; BN-PAGE, Blue native polyacrylamide gel electrophoresis; BSA, Bovine serum albumin; CA, Carbonic anhydrase; CE, Capillary electrophoresis; DCT1, Divalent cation transporter 1; ESI/MS, Electrospray ionization/mass spectrometry; HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography; HSA, Human serum albumin; HSAB, Hard and soft acids and bases principle; ICP-AES, Inductively coupled plasma/atomic emission spectroscopy; ICP-MS, Inductively coupled plasma/mass spectrometry; IEC, Ion-exchange chromatography; IEF, Isoelectric focusing; IPG, Immobilized pH gradient; LA, Laser ablation; PAGE, Polyacrylamide gel electrophoresis; PIXE, Particle-induced X-ray emission; RPLC, Reversed-phase liquid chromatography; SDS, Sodium dodecylsulfate; SEC, Size-exclusion chromatography; SOD, Superoxide dismutase; Tf, Transferrin; UHPLC, Ultra-high-performance liquid chromatography.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0) 4 66 79 19 88; Fax: +33 (0) 4 66 79 19 05.

E-mail address: agnes.hagege@cea.fr (A. Hagège).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.013>

0165-9936/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It has been estimated that more than one third of proteins are associated with metals in living organisms [1] and their identification is a key step for elucidation of the metal-dependent biological mechanisms.

Metals, when involved in proteins, display many critical functions (structural, regulatory or functional). Multi-electron reactions or oxygen transport often require metals that undergo redox changes (e.g., Cu and Fe). Other processes, such as hydrolytic reactions, are realized in the presence of metalloproteins where the metal acts as a Lewis acid catalyst (e.g., Zn). Metals may also contribute to the three-dimensional structure of proteins, which is critical for

substrate recognition. A well-known example is the role of Zn in Zn fingers, whose geometry allows the formation of folded parts of proteins that are essential for recognition by DNA. As a consequence, besides these proteins, a large number of proteins are devoted to the uptake, the transport and the storage of metals. All these proteins play a crucial role in biological systems, so the binding of an unexpected metal can have dramatic consequences. While *in-vivo* metal misincorporation in an enzyme site appears to occur rarely [2], the transport of undesirable metals seems to be reported more often [3,4].

Metal trafficking is a very important function for living organisms. How a protein selects the right metal, especially a weakly-binding one, is indeed the result of highly controlled processes.

Coordination chemistry is of course central to understand this selection [5,6]. It obviously depends on the intrinsic properties of the metal (i.e., charge, ion radius, electronic structure and the resulting Lewis acid character). Metals are classified as hard, borderline and soft acids (Fig. 1) according to their polarizability, radius, and oxidation state. As predicted by the hard and soft acids and bases principle (HSAB) developed by Pearson [7], hard acids prefer hard bases and soft acids prefer soft bases. The affinity of a hard acid for a hard base is mostly electrostatic, whereas the interaction between a soft acid and soft base is mostly covalent.

For transition metals, the Irving–Williams series ($Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+}$), which describes the selectivity sequence, irrespective of the nature of the coordinated ligand, is largely evoked to explain the affinities of proteins for divalent metals [8]. This statement is often illustrated by the complex formation with 1,2-diaminoethane, essentially due to electrostatic effects and variations of ligand-field-stabilization energy [9].

Selectivity also depends on the protein-binding site, as largely exemplified by Dudev and Lim [10]. Selectivity is affected by numerous factors, such as binding site geometry, nature of the binding ligands, and localization (solvent exposed or buried sites). Moreover, as in the well-known case of the Fe^{3+} -transferrin complex stabilized by carbonate ions [11], some metal-protein complexes are known to imply more than two partners.

However, in many cases, a protein alone is unable to select the right metal and prevent adventitious displacements by other metals. It has been pointed out that selectivity cannot be explained only by binding constants and coordination geometries but is also achieved by the fine control of metal availability [12]. Mechanisms used by cells to regulate metal concentrations have been

discussed by several authors [3,13–17]. The free-metal concentration is adapted through the action of both metal transporters and storage proteins. These proteins are regulated in turn by metal sensors controlling the transcription of their coding genes.

Moreover, in some cases, the selectivity of metal insertion can be enhanced by protein-protein interactions (e.g., in ligand-exchange reactions involving chaperones) [18].

Apart from disorders caused by essential metals, such as copper in Menkes and Wilson diseases, interactions of metal ions with proteins have also been studied in the context of increasing metal exposure due to anthropogenic activities. Essential metal-transport proteins, such as DCT1, may be used by toxic metals to enter cells [4]. Other proteins, usually not devoted to receiving metals, have the capacity to bind metal ions (e.g., to cysteine-containing sites, leading to an inhibition of their activity). As an example, the inhibition of DNA-decatenation activity of topoisomerase II was recently attributed to cadmium binding to cysteines [19]. These issues were recently reviewed by Ba et al. [3].

More recently, metal-containing compounds emerged in medicine, not only as drugs (e.g., compounds for chemotherapy based on Ru or Pt) but also in medical imaging (e.g., gadolinium complexes used as contrast agents in magnetic resonance imaging), as recently reviewed [20].

Interactions of proteins with metallodrugs (e.g., based on Pt or Ru) have been investigated to provide information about the transport route or deactivation pathways for these drugs. The importance of such studies in the design of “next generation” metal-based drugs, targeting a specific pathway was even mentioned by Groessl and Hartinger [21].

Metal speciation in biological media can be regarded as the result of numerous competitive reactions involving not only proteins but also small ligands (e.g., carbonate, citrate, phosphate, and lipids) and other essential metals (Fig. 2). This statement has opened a new field of investigation, dedicated to metals associated with proteins, also called metalloproteomics. In other words, metalloproteomics should be understood as the description of the whole set of metal-containing proteins of an organism at a given time.

Both bottom-up and top-down strategies have been used in the metalloproteomics field [22]. In bottom-up strategies, analysis of both metal content and function of metalloproteins is conducted after a purification step. Several approaches have been considered for the determination of metal-protein interactions from the point of view of structure, thermodynamics or kinetics. The methods often involve the use of UV and fluorescence spectroscopies or

<p>Hard acids (H^+), Li^+, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sc^{3+}, La^{3+}, Ce^{4+}, Gd^{3+}, Lu^{3+}, UO_2^{2+}, Cr^{3+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+}, Ga^{3+}</p>	<p>Borderline acids Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Rh^{3+}, Ir^{3+}, Ru^{3+}, Sn^{2+}, Pb^{2+}</p>	<p>Soft acids Pd^{2+}, Pt^{2+}, Pt^{4+}, Cu^+, Ag^+, Au^+, Cd^{2+}, Hg^+, Hg^{2+}</p>
<p>Hard bases Carboxylates, Alcohols, Carbonates, Sulphates, Phosphates, Primary amines</p>	<p>Borderline bases Imidazole, Pyridine</p>	<p>Soft bases Thiols, Thioethers</p>

Fig. 1. Classification of common metals and ligands according to the hard and soft acids and bases principle (HSAB).

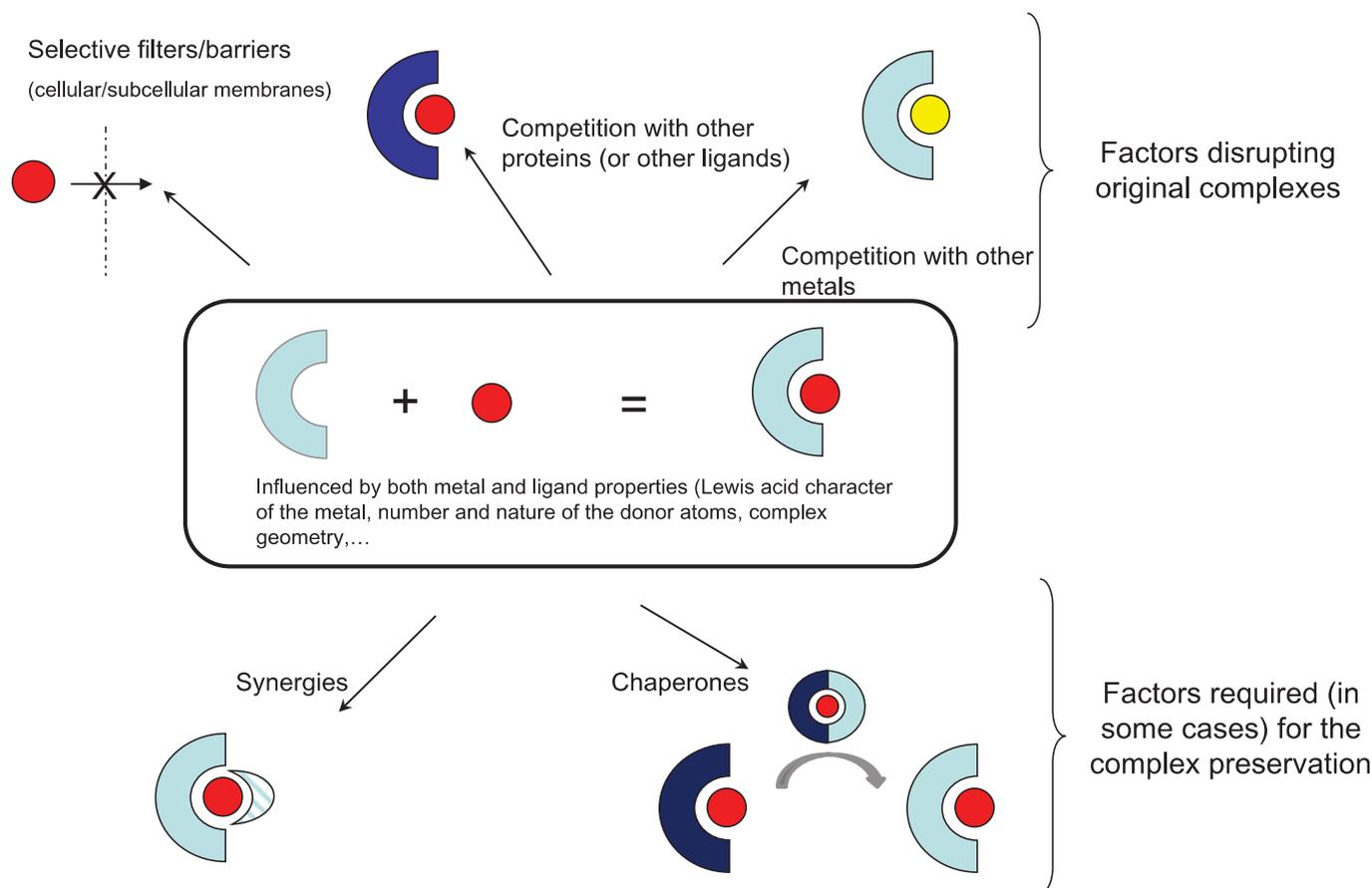


Fig. 2. Exemplary factors affecting the formation of a given metal-protein complex (non-exhaustive view).

isothermal calorimetry [23]. More recently, mass spectrometry (MS) methods and affinity capillary electrophoresis (CE) rapidly developed in the biomolecular interaction field [24]. Whilst these methods characterize the metal-protein complexes, their use in metal speciation is precluded since they would be prohibitively time-consuming and expensive due to the complexity of the biological medium and would require comprehensive knowledge of the identities and the concentrations of all the proteins involved.

Considering the huge complexity of biological media, many efforts have been devoted to the development of complementary top-down strategies based on analytical tools that would be able to identify metal targets directly in these media.

For that purpose, coupling of separation techniques with powerful detection systems – elemental (e.g., ICP-AES and ICP-MS) and molecular (e.g., ESI/MS) – has often been adopted [25–27]. Elemental detection is required for the sensitive detection of the metal and molecular detection for the identification of the related protein. The separation and detection techniques used in this field have been described from a theoretical point of view [28].

A literature overview over the period 2000–14 demonstrated the diversity of approaches used on either standard solutions or real samples (Tables 1 and 2). The key point is the separation step. Moreover, as can be seen in Tables 1 and 2, two-dimensional (2D) separations are often preferred for complex samples.

A large variety of separation techniques, including chromatographic and electrophoretic separation processes, have been investigated for metal speciation in biological media. Reviews focused on applications of the most popular approaches in the field of metal-binding proteins have been published [i.e., gel electrophoresis (GE)

[27,60], CE [61,62] and size-exclusion chromatography (SEC) [63]]. The combination of multiple dimensions, 2D-GE or multidimensional liquid chromatography (LC), was also discussed by Barnett et al. [64].

The main challenge is to bypass the contradistinction that lies between the objective of characterizing these metal-protein complexes in a medium relevant to their biological action and the separation of the entities from the intracellular environment that maintains them. Obviously, the more labile the metallic complex, the harder the challenge may be. Indeed, whereas some metal-protein complexes remain intact under separation steps, others are prone to dissociation, so the separation steps or methods developed have to provide sufficient resolution in the least perturbing conditions and the minimum separation time.

We propose here an overview of not only the impact of medium or separation phases in the first part of this review, but also the factors inherent to any separation (i.e., time and dilution) on the dissociation of the metal-protein complexes in the second part.

2. Metal losses induced by specific impact of different separation systems

Metal-protein interactions can be considered as a network of multiple interactions maintaining both the protein in a suitable configuration for complexation and the metal in the binding site. The separative methods should endeavor not to interfere with these networks, so it is necessary to wonder about the applicability of the methods classically used for separation of proteins. Indeed, the

Table 1
Overview of analytical methods used in studies of metal-protein interactions

	Investigated metal(s)		Separation method (experimental conditions)	Detection	Incubation conditions (if any)	Ref.
HSA	Zn	1D	CE (silica capillary, 40 mM TRIS-HCl at pH 7.4)	ICP-AES	4 h at pH 7.4 (100 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl)	[29]
CA, BSA, holoTf, ceruloplasmin	Cd, Co, Ni	1D	CE (silica capillary, 25 mM borate buffer at pH 9)	ICP-MS	2 h at pH 6.5 metal/protein ratio = 1	[30,31]
HSA	organotin	1D	CE (silica capillary, 10 mM phosphate – 100 mM NaCl buffer at pH 7.4)	ICP-MS	12h at pH 7.4 and 37°C HSA 1 µM + Sn 1 mg/L	[32]
SOD, thyroglobulin	Cu, Zn (SOD) I (thyroglobulin)	1D	native PAGE (25 mM TRIS, 192 mM glycine) or denaturing PAGE (25 mM TRIS, 192 mM Tricine, 0.1% (w/v) SDS)	laser ablation ICP-MS	–	[33]
SOD	Cu, Zn	1D	non-denaturing IEF (pH 3.9–5.1 and 4–7)	PIXE and LA-ICP-MS	–	[34]
SOD, CA, holoTf, BSA, myoglobin, cytochrome c, hemoglobin	Fe, Cu, Zn	1D	native PAGE (TRIS/glycine buffer) or denaturing PAGE (MES/SDS buffer)	laser ablation ICP-MS	–	[35]
copper proteins (SOD, azurin, plastocyanin and CuA, a binuclear copper protein)	Cu	1D	SEC (Sephadex G25, 150 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl, pH 7.4) or Anion exchange: (20 mM TRIS, pH 8.5/1 M NaCl, 20 mM TRIS, pH 8.5)	ICP-MS	–	[36]
HSA, holoTf	Ga	1D	CE (silica capillary, 10 mM ammonium bicarbonate, pH 7.4)	ICP-MS	at pH 7.4 (25 mM NaHCO ₃ , 4 mM Na ₂ HPO ₄ , 100 mM NaCl) 50 µM Tf + 20 µM Ga (Ga(NO ₃) ₃ or KP46)	[37]
SOD, CA, BSA, myoglobin, cytochrome c, hemoglobin	Fe, Cu, Zn	2D	denaturing-IEF (9 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 20 mM DTT and 1.25% v/v carrier ampholytes, pH 3–10) or non-denaturing-IEF (30% w/v sucrose and 1.25% v/v carrier ampholytes, pH 3–10) SEC (Superdex, 50 mM TRIS, pH 7.4)	ICP-MS	–	[38]

conditions used for separation were not originally elaborated for metal-speciation analysis.

Although leading to better separation efficiencies, denaturing conditions have often been criticized, since the loss of tertiary structure may not give information about metal affinity for native proteins and may even induce loss of metal [14,33,52].

Moreover, the stability of metal-protein complexes often depends on the physicochemical parameters and conditions of the medium (e.g., ionic strength and pH). Mobile phase can then adversely affect metalloproteomics analyses.

Whatever the separation technique, the control of pH is of fundamental importance for several reasons. pH changes alter the charges that stabilize the protein structure and may lead to denaturation. Moreover, an acidic pH causes metal release by proton/metal competition. However, an alkaline pH increases metal hydrolysis due to the increasing amount of hydroxide ions. This reaction can be considered a competing reaction and may lead to metal precipitation. Moreover, any complexing ligand in the mobile phase should be avoided, so as not to affect metal distribution by competition.

In a similar way, stationary phases strongly adsorbing metals can be expected to have a critical effect.

It is often difficult to figure out the involvement of one or the other component of the separation system in the dissociation of protein-metal complexes.

GE techniques [35] and isoelectric focusing (IEF) conditions [38] were systematically compared for a given set of metal-protein complexes. In chromatography-based separations, only one paper compares various systems for the dissociation of small arsenic-glutathione complexes [65].

From this point of view, we next present general considerations regarding the most used separation techniques.

2.1. Gel electrophoresis

2D-GE is very popular in the protein-separation field. It usually separates first by charge, using IEF, followed by molecular mass, using a separation gel on the basis of polypeptide length (SDS-PAGE). The combination of these two dimensions often reaches a high resolution. Some studies on real biological samples have been performed by transferring classical methods used for proteomics to metalloproteomics [i.e., combining classical 2D-GE with laser-ablation ICP-MS (LA-ICP-MS) for detection of metals [40,49,66]].

However, denaturation is expected to lead to the disruption of metal-binding sites. Consequently, the use of SDS and other denaturing agents was shown to induce partial or total loss of metal from metalloproteins, such as superoxide dismutase (SOD), carbonic anhydrase (CA), cytochrome C or holotransferrin (holoTf) [35]. Similar results concerning the influence of SDS were found on uranyl-binding proteins from renal cells by Frelon et al. [40], who reported two different causes for the loss of uranyl during the separation steps:

- (1) loss of anionic or neutral low-molecular-weight complexes during the first dimension using IEF; and,
- (2) loss of uranium due to the denaturing conditions used in SDS-PAGE.

With the aim of preserving the three-dimensional structure of the protein, so-called native or non-denaturing 1D-PAGE was very often used. Different alternatives have been proposed, [i.e., native-PAGE, blue native (BN)-PAGE, in which Coomassie Brilliant Blue dye provides the charges to the protein complexes, and anodal native (AN)-PAGE, performed with a basic buffer].

However, careful choice of the buffer is important. Indeed, copper and zinc losses were shown to occur in the presence of glycine

Table 2
Overview of analytical methods used in the study of metal-protein interactions in biological samples

	Investigated metal(s)		Separation method (experimental conditions)	Detection	Incubation conditions (if any)	Ref.
Serum	Ti	1D	SEC (Superdex, 2 mM bicarbonate, 0.2 mM citrate, pH 7.4). or Anion exchange (20 mM TRIS, pH 7.4/20 mM TRIS, 250 mM ammonium acetate, pH 7.4)	ICP-MS	12 h at pH 7.4 and 37°C Serum + 62 µM Ti (citrate form)	[39]
Protein extracts from renal tissue	U	2D	denaturing -gel electrophoresis	LA-ICP-MS	drinking water supplemented with depleted uranium (40 mg/L) or protein extracted doped with 2.5–5 ng/mg protein (10 mM KH ₂ PO ₄ , 40 mM Na ₂ HPO ₄ , 0.01 mM EDTA pH 7.5)	[40]
Cytosolic fractions from lamb liver	Fe, Cu, Zn	2D	denaturing-IEF (9 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 20 mM DTT and 1.25% v/v carrier ampholytes, pH 3–10) or non-denaturing-IEF (30% w/v sucrose and 1.25% v/v carrier ampholytes, pH 3–10) SEC (Superdex, 50 mM TRIS pH 7.4)	ICP-MS	–	[38]
Blood samples	Cu	1D	SEC (silica, 200 mM NH ₄ NO ₃)	ICP-MS	–	[41]
Rabbit plasma samples	Cu, Zn, Fe	1D	SEC (Superdex, Phosphate-buffered saline buffer, pH 7.4)	ICP-AES	–	[42,43]
Human Plasma	Pt	1D	SEC (Superdex, Phosphate-buffered saline buffer, 150 mM, pH 7.4)	ICP-AES	Plasma incubated at 37°C in the presence of Cis-Pt (0.04 mg/mL) or CarboPt (0.23 mg/mL) for 5 min, 3 h and 24 h.	[44]
Cell lysates of <i>Helicobacter pylori</i>	Bi	1D	PAGE (TRIS/glycine, pH 8.3; 50 mM NH ₄ NO ₃ elution buffer)	ICP-MS	cultured overnight in the presence of colloidal bismuth subcitrate (20 mg.mL ⁻¹)	[45]
<i>E coli</i> soluble protein extract	Cu, Zn, Fe	2D	native-native PAGE (IPG pH 3-11 and 4-7 + Blue native PAGE)	Autoradiography	cultured overnight in radioisotopically supplemented media aerobically at 37°C	[46,47]
<i>P. furiosus</i> soluble protein extract	Mo, W	2D	native-native PAGE (IPG pH 3-11 and 4-7 + Blue native PAGE)	Autoradiography	cultured overnight in radioisotopically supplemented media anaerobically at 90°C	[47]
Porcine liver extracts	Mn	2D	SEC (TSK, TRIS-HCl 10 mM, pH 7.4) CE (10 mM borate buffer, pH 8.3)	ICP-MS	–	[48]
Proteins from a human brain sample	Cu, Zn	2D	denaturing-IEF (8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) carrier ampholytes 4-7, 15 mM DTT) IPG strips 4-7 SDS-PAGE	LA-ICP-MS	–	[49]
Metal-binding proteins in <i>E. Coli</i>	Zn, Cd	1D	PAGE (25 mM TRIS 192 mM glycine pH 8.3)	LA-ICP-MS	cultured in a medium supplemented with zinc sulfate (1.5 mM) or cadmium chloride (0.75 mM)	[50]
Metallothioneins from liver homogenate	Cu, Zn, Cd, Hg	1D	HILIC (amide column, 5 mM acetonitrile – 5 mM ammonium acetate, pH 5.5 -Gradient mode 10% to 65% aqueous phase)	ICP-MS	–	[51]
Cytosolic fraction of crayfish digestive glands	U	1D	non-denaturing IEF (IPG pH 3-10)	LA-ICP-MS	Animals exposed for 10 days to depleted uranium nitrate concentrations (0–2.5 µmol L ⁻¹)	[52]

(continued on next page)

Table 2 (continued)

	Investigated metal(s)		Separation method (experimental conditions)	Detection	Incubation conditions (if any)	Ref.
Soluble protein extract from soybean seeds	Co, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn	2D	SEC (Superdex, 100 mM ammonium acetate, pH 7.2) Anion exchange (10 mM TRIS, pH 7.4/10 mM TRIS, 500 mM ammonium acetate)	ICP-MS		[53]
Protein extract from <i>F. acidiphilum</i>	Fe, Zn, Mg, Mo, Ca, Hg, Cu, Ni	2D	Non denaturing PAGE (IPG pH 3-10 and + non denaturing polyacrylamide gel)	ICP-MS	–	[14]
Lipid-free pine nut samples	Mn	2D	SEC (Superdex, 50 mM TRIS, pH 8.0) Anion exchange (10 mM ammonium acetate, pH 6.3 for 3 min/0.5 mM NaOH for 11 min/10 mM NaOH for 8 min)	ICP-MS	–	[54]
<i>Synechococcus sp.</i> cell lysates	Fe, Ni, Mn, Co	2D	SEC (hydrophilic synthetic polymer, 20 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 8.0) Anion exchange (20 mM TRIS, pH 8.0/0.1 to 2.0 M NaCl (step gradient))	ICP-MS	grown at 22°C under constant light on a seawater-based medium supplemented with Fe, Ni, Mn, Co, Zn, Mo.	[55]
<i>Synechocystis</i> cell lysates	Mn, Cu	2D	Anion exchange (50 mM TRIS, pH 8.8/0.1 to 1.0 M NaCl (step gradient)) SEC (TSK, 10 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 7.5)	ICP-MS	grown at 28°C under constant light on a BG-11 medium	[56]
Cytosolic fraction of rat tissues	Cu, Zn, Cd	2D	SEC (Superdex, 30 mM Tris-HCl/20 mM of β -mercaptoethanol buffer) RPLC (C8 column, 5 mM acetate buffer (pH 6.0)/5 mM acetate buffer (pH 6.0 in water-acetonitrile (50:50, v/v). Gradient mode 10% to 16% hydroorganic phase) or CE (silica capillary, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5)	ICP-MS	Animals were subcutaneously injected a dose from 0.1 to 1 mg Cd (in the form of CdCl ₂) per kg of body weight per day during a total period of 12 days.	[57]
Plasma proteins from a patient suffering from cancer	Ru	2D	SEC (BioAssist G3SWXL, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) Anion exchange (4 mM TRIS, 30 mM NaCl pH 10–20 mM TRIS, 500 mM NaCl pH 10, gradient mode)	ICP-MS	Infusion combining the administration of 3 × 200 mg KP1019 (Ru compound) on days 1, 4, 8, 11, 15, and 18.	[58]
Plasma proteins from a patient suffering from cancer	Ru	1D	CE (polybrene-coated capillary, 50 mM formic acid, pH 2.7)	ICP-MS	Infusion combining the administration of 3 × 200 mg KP1019 (Ru compound) on days 1, 4, 8, 11, 15, and 18 Incubation with 0.1 mM KP1019 for 3h in a 10 mM phosphate buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.4	[37]
Plasma and serum proteins						
Cytoplasmic extract of <i>P. furiosus</i> , <i>E. Coli</i> and <i>S. solfataricus</i>	53 metals	>2D	Extensive fractionation (anion exchange, size exclusion, hydroxyapatite, hydrophobic interaction, SDS-PAGE)	ICP-MS	grown at 90°C on a medium supplemented with lead, uranium, rhodium, ruthenium and chromium	[59]

in native 1D-PAGE separation of albumin and SOD, due to the formation of copper and zinc-glycine complexes [33,35,67]. Although this phenomenon might be expected for copper, which is solvent-accessible in SOD, it was more surprising for zinc, which is considered to be located in a buried site of this protein [68] (i.e. avoiding fast dissociation). Tricine was consequently often proposed as an alternative.

Comparison of different PAGE separation modes using SOD and alcohol dehydrogenase demonstrated that other factors, such as current intensity, can cause metal release. This study also showed that the use of non-denaturing conditions was not sufficient to maintain the integrity of all the metal-protein complexes. Indeed, whereas both AN-PAGE and BN-PAGE allowed the detection of Zn and Cu in SOD, BN-PAGE was the only way to detect Zn present in alcohol dehydrogenase, whether it is catalytic or structural [67].

The IEF step remains a problem [64]. This separation mode was also found to induce metal losses. Since the solubility of a protein around its isoelectric point (pI) may be reduced, especially in non-denaturing conditions, partial protein loss by precipitation is also expected. The use of native IEF (i.e., through immobilized pH gradients) was proposed and the recovery of native copper-containing proteins was monitored via the autoradiography of ^{64}Cu [46]. IEF in the absence of chaotropic agents (urea or thiourea) was evaluated on a mixture of proteins, including SOD, CA, BSA, cytochrome C and myoglobin, and compared to denaturing IEF [38]. It was shown that both conditions preserved potentially intact complexes, such as metalloproteins containing Cu and Zn. However, isotope-exchange experiments revealed that Zn complexes were significantly more labile than Cu complexes. Xu et al. also reported the loss of ~50% of metals (Fe, Co, Zn, Cd and U), these losses being attributed to diffusion of the metals in the cover fluid used to prevent gel drying [52].

Sevenco et al. proposed the so-called MIRAGE approach, based on the joint use of 2D native–native PAGE separation of proteins and autoradiography [47]. This was applied to the investigation Cu, Zn and Fe metalloproteomes of *E. coli*.

Apart from the separation system itself, we should note that the exposure of metal–protein complexes to stains (e.g., Coomassie Blue stain or silver) was often reported to result in the unsurprising loss of the protein-bound metal [33,35,67]. This implies that metal detection (usually using LA-ICP-MS) has to be performed before staining and thus requires a scanning mode for the whole gel, since proteins can hardly be located on gels without staining.

2.2. Size-exclusion chromatography and capillary electrophoresis

Although SEC and CE are very different separation techniques, they have a lot of similarities regarding analysis of metal-protein complexes. We expect SEC and CE to maintain even not very stable metal-protein complexes, since these separations are based on the hydrodynamic volume of the molecules and the friction/charge ratio, respectively, so interactions between the complexes and a stationary phase are not required for the separation. Moreover, adsorption on the solid surfaces of the system is undesirable for the separation to be univocal. These separation techniques have been successfully applied to the analysis of interactions between proteins and xenobiotics [44,63,69–71].

In the case of metalloprotein analysis, SEC was considered to preserve bound metals. This separation method was established as very appropriate for metalloproteomics studies and is often used as a reference method [35,38].

However, complexation was demonstrated with buffers typically used in SEC. All buffers can potentially interact with metals via their basic form. Phosphates are known to form complexes with several metal ions. As a consequence, so-called biological buffers,

such as Good's buffers, were often preferred to phosphate-based buffers. However, TRIS is known to bind well to metal ions. HEPES, PIPES and analogous zwitterionic buffers also interact with metal ions, albeit less strongly (e.g., HEPES and MOPS were shown to induce zinc and iron releases from plasma metalloproteins in SEC, which were attributed to their complexation properties) [42].

Despite this problem, the versatility of CE and SEC, which require no specific conditions for the electrolyte or the mobile phase, respectively, remains one of the main advantages. The composition can therefore theoretically be chosen not to interfere with the metal speciation (which implies the knowledge of the binding constants of metals with all the constituents) or to reflect as closely as possible the medium being studied. As a consequence, many studies were performed using a pH of 7.4, close to the physiological pH, in SEC [38,39,43,48,53,56] or CE [29,32,37,57].

Although SEC and CE are inherently limited with regard to resolution, they can constitute one potential separation dimension.

A further advantage of SEC over other chromatographic methods, pointed out by Michalke and Nischwitz [72], is that, in the total absence of adsorption on the stationary phase, all compounds elute between the exclusion and the permeation volumes, so alleviating the risk of incomplete recovery of the species.

2.3. Reversed-phase liquid chromatography (RPLC)

RPLC is very popular for separating peptides, generally prior to MS, but is used to a lesser extent for separating entire proteins.

Very few papers dealt with the use of RPLC for metal-protein interaction studies with the exception of metallothionein isoforms [51].

RPLC was reported for use in the analysis of cytosolic fractions from different organs of mice but limited to the Cu-binding 7–10 kDa fraction collected after SEC [73].

No study directly investigated the loss of metal due to interactions between metalloproteins and stationary phases, despite conformational changes in proteins being reported as a result of their interactions with RPLC stationary phases [74].

In a study concerning the involvement of metallothioneins in the mercury metabolism in marine mammals, Pedrero et al. mentioned that the Hg–metallothionein complex dissociated dramatically during the RPLC-ICP-MS analysis, whereas it remained intact during HILIC separation in the presence of large amounts of acetonitrile [75]. Similarly, Polec et al. reported the elution of practically all the metals in the void volume during the RP separation of the metallothionein SEC fraction in the case of rat-kidney analysis [57].

Moreover, many types of chromatographic separation (e.g., RP and HILIC) involve solvents that can potentially alter the state of the protein (e.g., by breaking hydrogen bonds or weakening hydrophobic interactions, thereby changing its stability and metal-binding capabilities).

2.4. Ion exchange

Ion-exchange chromatography (IEC) is a powerful separation mode leading to high separation efficiencies, which are achieved through establishing both solute-stationary phase and solute-mobile phase interactions. Among the various combinations of separation modes used in proteomics, the combination cation-exchange x RP is certainly the most widely applied, often after a tryptic digestion step. In the field of metalloproteomics, cation-exchange seems to be avoided, since most separations are carried out in acidic media (see metal/ H^+ competitions evoked above).

Anion exchange is by far the most popular [36,39,53–56,58,59]. It was successfully combined with SEC for the bidimensional

fractionation of complex samples [54–56], the study of interactions of a metal-based anticancer drug with plasma proteins [75] or even more extensive fractionation schemes [53].

However, using IEC induces the risk of metal displacement from the protein by competition with not only the mobile phase but also the stationary phase, as revealed by Sanz-Medel et al. [76]. For example, the analysis of Ti-bound proteins using a strong anion exchanger (quaternary ammonium) exhibited a significantly lower Ti-Tf complex recovery [39] than in SEC (which was still far from 100%). Such low recoveries were attributed to dissociation of the Ti-Tf complex while passing the stationary phase of the column during the salt gradient.

In the analysis of pine-nut samples, the presence of Mn^{2+} was reported after the ion-exchange separation of a 7–10 kDa size-exclusion fraction [54]. However, this might indicate dissociation of Mn species due to kinetics effects, as discussed in the paragraph 3.2.

2.5. Separation materials

Irrespective of the separation mode, separation materials can also provide a distorted view of real metal-protein complexes, although they are not directly involved in the separation process (by irreversible binding of plasma proteins or metal adsorption to the stationary phase).

To analyze protein recovery, direct SEC analysis of plasma was performed at pH 7.4, using various SEC stationary phases (Sephacryl S-500, Superose 6 prep grade, and Superdex 200 prep grade) by Manley et al. [43]. Protein sorption was found to be negligible, allowing excellent protein recovery ($99 \pm 1\%$).

However, silica-based materials are far from inert toward metallic cations and numerous metals may adsorb onto fused-silica capillary walls and stationary phases. In that case, the small silica surface/volume ratio of fused-silica capillaries, compared to stationary phases used in chromatography, represents an indisputable advantage. Silica-based columns used in IEC were reported to retain a significant amount of Al [76]. El Balkhi et al. [41] also suggested a possible contribution of residual silanols to explain the dissociation of weakly bound Cu to albumin and ceruloplasmin during SEC.

However, silica is not the only material to suffer this lack of inertness toward cations, and very early studies also demonstrated that Sephacryl columns may adsorb Zn^{2+} [77].

Arias-Borrego et al. calculated the Mn mass balance after each chromatographic step and found an SEC recovery of 53% using a Superdex column [54].

Undesirable adsorption, hydrophobic and ion-exchange interactions during SEC separations were also mentioned by Sarmiento-González et al. [39] to explain dissociation of the Ti-transferrin complex on Superdex columns (cross-linked agarose and dextran) and the Mn-transferrin complex observed on a TSK-HW column (hydroxylated methacrylic resin) [48].

3. Metal losses inherent to a separation process

3.1. Dilution effects

Due to the mass action law, complexation equilibrium may be displaced by dilution. The longer the separation, the higher the dilution (at least by diffusion) with two consequences: lower concentrations to detect and unavoidable increase of the dissociation upon dilution. A report of an experimental demonstration is available [78]. Dissociation upon chromatographic dilution (i.e., broadening of the Gaussian peak during elution) is more pronounced for 1:2 complexes than for 1:1 complexes, unless either lability is very low or the protein is in large excess in the elution zone of the complex.

3.2. Disequilibrium effects

Disequilibrium effects might affect the determination of metal-protein complexes when dealing with separation techniques. Indeed, as separation occurs, proteins and metals are no longer in equilibrium and complexes may start to dissociate, so the integrity of metal-protein complexes during the separation is an important factor.

However, this deleterious effect should be as small as possible for metalloproteomics studies. Classification according to water-exchange rates in the hydration shell of the metal ion [79] was used by several authors to assess the lability of metallic complexes as a function of the metal [80,81]. However, this fast exchange rate dramatically decreases when metals are bound to multidentate chelates, as in the case of metalloporphyrins. It should also be noticed that some metalloproteins contain deeply buried metallic sites that prevent metal exchange, as illustrated by the case of Mn^{2+} -cupin A [56]. This kinetic inertness is probably due to the solvent being inaccessible to the metal-coordination sphere because of the protein shielding.

In the case of solvent-exposed sites, one can benefit from the model proposed by Sonke and Salters [80]. To discuss their CE results, they proposed a simplified diagram describing the stability fields of metallic complexes as a function of both the thermodynamic constant for a 1:1 stoichiometry complex (β) and the rate constant of water molecule in the hydration shell of the metal ion (k_w) [80]. Fig. 3 [adapted from [80]] takes into account the half-lives of metal-protein complexes in the range of the typical separation times achievable using modern techniques. Fig. 3 shows that the time allowed for the separation depends on not only the stability constant of the metal-protein complex but also the dissociation rate that is greatly influenced by the nature of the metal, so, for a given separation technique, a copper complex may appear as labile as a nickel one, despite its higher thermodynamic stability. Moreover, complexes with chromium are easily observable, even for very low thermodynamic constants, thanks to their slow water-exchange kinetics. In other words, the concept of “lability” is directly related to the observation technique.

Dissociation was also investigated as a function of the ligand nature. Using ion-pair RP chromatography, Yan et al. studied the retention behavior of different cadmium complexes representing a broad range of stability constants [83]. A classification of the species into inert, moderately labile, and labile species was proposed as a function of their $\log \beta_{\text{CdL}}$ (arbitrarily greater than 16, 8–16, and less than 8, respectively), thus implying that the β_{CdL} variation should be mainly attributable to the dissociation constant.

This phenomenon was exploited in CE (NECEEM: non-equilibrium CE of equilibrium mixtures) to obtain both thermodynamic and kinetic data in a single experiment, as exemplified by the complexation of organotin compounds by human serum albumin [32].

The exchange kinetics must be slow, compared to the time required for the separation, to obtain an individual peak for each species without interconversion between the metal ion and the metal-protein complex, so decreasing the analysis time should be also regarded as a strategy to favor the detection of metal-protein complexes. From this point of view, recent advances in HPLC, such as UHPLC and monolithic stationary phases, could favorably supplement the set of separation methods. Moreover, methods requiring long separation columns for technical or analytical reasons negatively impact the relative abundance of metallic complexes. This is often the case with commercial CE instruments, which often require the use of long capillaries (>60 cm) to be coupled with external detectors [29–32,37,48]. Moreover, lack of selectivity between the various proteins imposes the use of longer columns to increase the resolution.

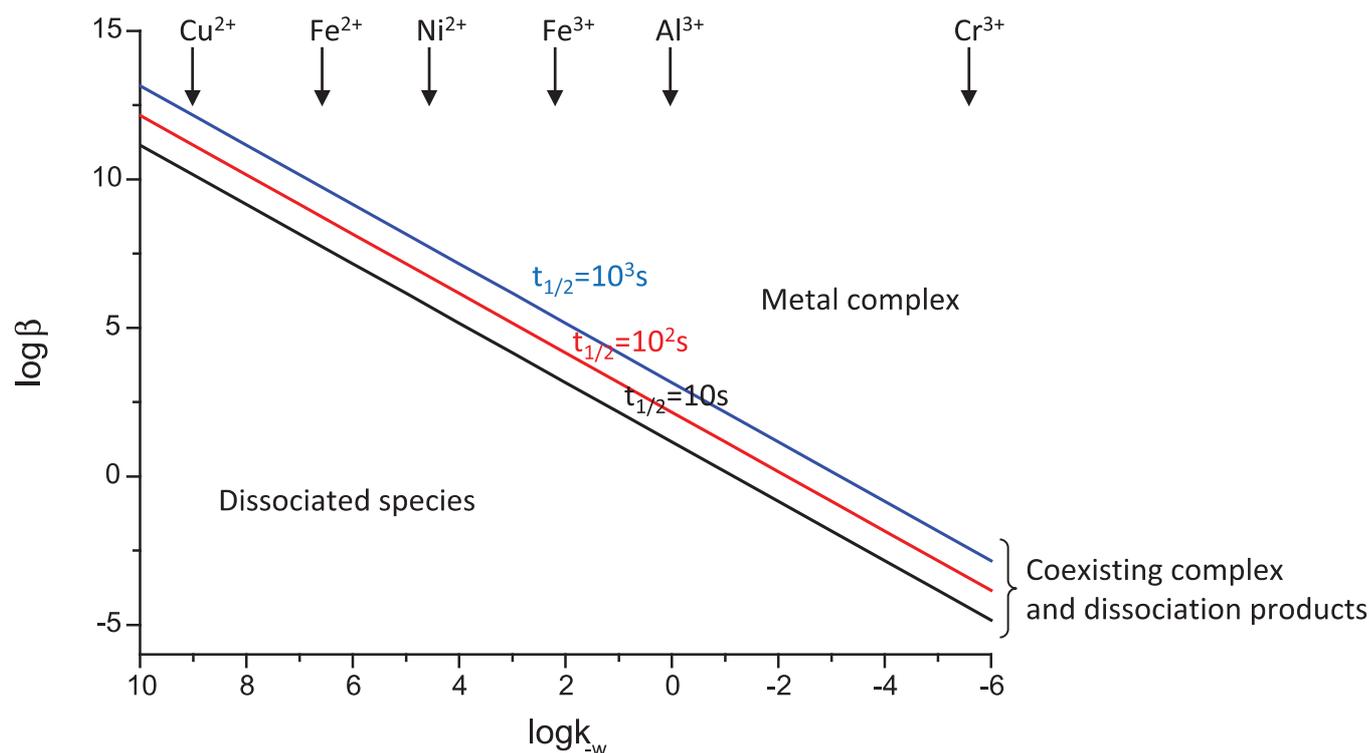


Fig. 3. Stability fields of protein-metal complexes during a separation, adapted from [80]. Characteristic ions are positioned relatively to the abscissa scale at their known substitution rates [82].

However, separation modes exhibiting a poor selectivity in the separation of proteins from their metallic complexes should be preferred. Indeed, when dissociation occurs, the released metal is back in the presence of free proteins, which act to maintain the equilibrium. From that point of view, SEC and CE were often chosen, since metal complexation rarely alters significantly the initial charge and mass of the protein and, as a consequence, both free proteins and metal-protein complexes remain in the same zone.

4. Conclusion

Metalloproteomics is an expanding research field, addressing the fate of metals both toxic and essential for protein functions in living organisms. Metal binding is probably the result of dramatic selections evolved by the organism and should therefore be studied using complex samples.

Separation techniques coupled to both elemental and molecular MS are now recognized as essential tools for that purpose. Historically, two different trends developed, the first favoring the separation efficiency offered by 2D-GE, and the other favoring the metal-protein integrity by using soft SEC. The potential of other techniques is now also considered. CE, particularly, was recently suggested for use in the future as “a standard approach” in that field [61]. A 2D-separation scheme using SEC in a first dimension and CE in a second was proposed by Quintana et al. to analyze Mn species in liver extracts [48].

Since there is no miracle separation technique to date, all of them having advantages and drawbacks, one should be aware of their limitations. The detection of some metal-protein complexes is insufficient to claim the non-intrusive character of a separative method in metal speciation. The choice of separation method probably depends on the protein. Indeed, only purely covalently bound heteroatoms can be detected quantitatively, whatever the separation method. This

is the case for seleno-proteins or iodo-proteins. Metalloproteins and metallothioneins can often be preserved in mild conditions, whereas identification of proteins that intrinsically bind metals transiently remains a challenge.

References

- [1] J.A. Ibers, R.H. Holm, Modeling coordination sites in metalloproteins, *Science* 209 (1980) 223–235.
- [2] V.C. Culotta, M. Yang, T.V. O'Halloran, Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 747–758.
- [3] L.A. Ba, M. Doering, T. Burkholz, C. Jacob, Metal trafficking: from maintaining the metal homeostasis to future drug design, *Metallomics* 1 (2009) 292–311.
- [4] N. Ballatori, Transport of toxic metals by molecular mimicry, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 689–694.
- [5] S.J. Lippard, J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994.
- [6] R.R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*, Elsevier, Oxford, 2008.
- [7] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533–3539.
- [8] H. Irving, R.J.P. Williams, The stability of transition-metal complexes, *J. Chem. Soc.* (1953) 3192–3210.
- [9] J.E. Huheey, E.A. Keiter, R.L. Keiter, *Inorganic Chemistry—Principles of Structure and Reactivity*, 1st ed., Harper Collins College Publishers, New York, 1993, pp. 454–455.
- [10] T. Dudev, C. Lim, Competition among metal ions for protein binding sites: determinants of metal ion selectivity in proteins, *Chem. Rev.* 114 (2014) 538–556.
- [11] H. Sun, H. Li, P.J. Sadler, Transferrin as a metal ion mediator, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2817–2842.
- [12] S. Tottey, D.R. Harvie, N.J. Robinson, Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones, *Acc. Chem. Res.* 38 (2005) 775–783.
- [13] W. Maret, Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins, *Metallomics* 2 (2010) 117–125.
- [14] M. Ferrer, O.V. Golyshina, A. Beloqui, P.N. Golyshin, K.N. Timmis, The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein dominated, *Nature* 445 (2007) 91–94.
- [15] K.J. Waldron, J.C. Rutherford, D. Ford, N.J. Robinson, Metalloproteins and metal sensing, *Nature* 460 (2009) 823–830.

- [16] K.J. Waldron, N.J. Robinson, How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?, *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2009) 25–35.
- [17] D.P. Giedroc, A.I. Arunkumar, Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches, *Dalton Trans.* (2007) 3107–3120.
- [18] A.C. Rosenzweig, Metallochaperones: bind and deliver, *Chem. Biol.* 9 (2002) 673–677.
- [19] X. Wu, J.C. Yalowich, B.B. Hasinoff, Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II, cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 833–838.
- [20] K.D. Mjos, C. Orvig, Metalloids in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4540–4563.
- [21] M. Groessl, C.G. Hartinger, Anticancer metallodrug research analytically painting the "omics" picture-current developments and future trends, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1791–1808.
- [22] W. Shi, M.R. Chance, Metalloproteomics: forward and reverse approaches in metalloprotein structural and functional characterization, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2011) 144–148.
- [23] D.E. Wilcox, Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: an overview of recent studies, *Inorganica Chim. Acta* 361 (2008) 857–867.
- [24] Z. Chen, S.G. Weber, Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 738–748.
- [25] R. Lobinski, J.S. Becker, H. Haraguchi, B. Sarkar, Metallomics: guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 493–504.
- [26] A. Prange, D. Proffrock, Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 372–389.
- [27] S.R. Haider, B.L. Sharp, H.J. Reid, On-line coupling of gel electrophoresis and inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1793–1808.
- [28] J.S. Garcia, C.S. de Magalhães, M.A.Z. Arruda, Trends in metal-binding and metalloprotein analysis, *Talanta* 69 (2006) 1–15.
- [29] B. Deng, Y. Wang, P. Zhu, X. Xu, X. Ning, Study of the binding equilibrium between Zn(II) and HSA by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 683 (2010) 58–62.
- [30] J. Chamoun, A. Hagège, Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma/mass spectrometry for metal/protein interactions analysis by using large volume stacking with polarity switching, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 1030–1034.
- [31] J. Chamoun, A. Hagège, Contribution of hyphenated CE-ICP/MS in metal/protein interactions studies, *Radiochim. Acta* 93 (2005) 659–664.
- [32] J. Sun, B. He, Q. Liu, T. Ruan, G. Jiang, Characterization of interactions between organotin compounds and human serum albumin by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 93 (2012) 239–244.
- [33] M.S. Jiménez, M.T. Gomez, L. Rodriguez, L. Martinez, J.R. Castillo, Some pitfalls in PAGE-LA-ICP-MS for quantitative elemental speciation of dissolved organic matter and metalomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 699–707.
- [34] S. Chevreux, S. Roudeau, A. Frayssé, A. Carmona, G. Devès, P.L. Solari, et al., Multimodal analysis of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels, *Biochimie* 91 (2009) 1324–1327.
- [35] A. Raab, B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection, *Electrophoresis* 30 (2009) 303–314.
- [36] S. Hann, C. Obinger, G. Stingeder, M. Paumann, P.G. Furtmüller, G. Koellensperger, Studying metal integration in native and recombinant copper proteins by hyphenated ICP-DRC-MS and ESI-TOF-MS capabilities and limitations of the complementary techniques, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1224–1231.
- [37] M. Groessl, A. Bytzeck, C.G. Hartinger, The serum protein binding of pharmacologically active gallium(III) compounds assessed by hyphenated CE-MS techniques, *Electrophoresis* 30 (2009) 2720–2727.
- [38] B. Pioselli, C. Munro, A. Raab, C.L. Deitrich, K. Songsrirote, J. Feldmann, et al., Denaturing and non-denaturing microsolution isoelectric focussing to mine the metalloproteome, *Metallomics* 1 (2009) 501–510.
- [39] A. Sarmiento-González, J. Ruiz Encinar, A.M. Cantarero-Roldán, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, HPLC-ICPMS and stable isotope-labeled approaches to assess quantitatively Ti(IV) uptake by transferrin in human blood serum, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8702–8711.
- [40] S. Frelon, O. Guipaud, S. Mounicou, R. Lobinski, O. Delissen, F. Paquet, *In vivo* screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney, *Radiochim. Acta* 97 (2009) 367–373.
- [41] S. El Balkhi, J. Poupon, J.-M. Trocello, F. Massicot, F. Woimant, O. Laprèvote, Human plasma copper proteins speciation by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. Solutions for columns calibration by sulfur detection, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6904–6910.
- [42] E.Z. Jahromi, W. White, Q. Wu, R. Yamdagni, J. Gailer, Remarkable effect of mobile phase buffer on the SEC-ICP-AES derived Cu, Fe and Zn-metalloproteome pattern of rabbit blood plasma, *Metallomics* 2 (2010) 460–468.
- [43] S.A. Manley, S. Byrns, A.W. Lyon, P. Brown, J. Gailer, Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn-specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography – inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 61–74.
- [44] M. Sooriyaarachchi, A. Narendran, J. Gailer, Comparative hydrolysis and plasma protein binding of cis-platin and carboplatin in human plasma in vitro, *Metallomics* 3 (2011) 49–55.
- [45] L. Hu, T. Cheng, B. He, L. Li, Y. Wang, Y.-T. Lai, et al., Identification of metal-associated proteins in cells by using continuous-flow gel electrophoresis and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 4916–4920.
- [46] A.-M. Sevenco, G.C. Krijger, M.W.H. Pinkse, P.D.E.M. Verhaert, W.R. Hagen, P.-L. Hagedoorn, Development of a generic approach to native metalloproteomics: application to the quantitative identification of soluble copper proteins in *Escherichia coli*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 631–640.
- [47] A.-M. Sevenco, W.R. Hagen, P.-L. Hagedoorn, Microbial Metalloproteomes explored using MIRAGE, *Chem. Biodivers.* 9 (2012) 1967–1980.
- [48] M. Quintana, A.D. Klouda, A. Gondikas, M. Ochsenkühn-Petropoulou, B. Michalke, Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CZE-ICP-MS), *Anal. Chim. Acta* 573–574 (2006) 172–180.
- [49] J.S. Becker, M. Zoriy, J.S. Becker, C. Pickhardt, E. Damoc, G. Juhacz, et al., Determination of phosphorus-, copper-, and zinc-containing human brain proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5851–5860.
- [50] M.R.B. Binet, R. Ma, C.W. McLeod, R.K. Poole, Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in *Escherichia coli* by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 318 (2003) 30–38.
- [51] V. Adam, I. Fabrik, T. Eckschlager, M. Stiborova, L. Trnkova, R. Kizek, Vertebrate metallothioneins as target molecules for analytical techniques, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 409–418.
- [52] M. Xu, S. Frelon, O. Simon, R. Lobinski, S. Mounicou, Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium-protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1063–1072.
- [53] L.R.V. Mataveli, M. Fioramonte, F.C. Gozzo, M.A.Z. Arruda, Improving metallomics information related to transgenic and non-transgenic soybean seeds using 2D-HPLC-ICP-MS and ESI-MS/MS, *Metallomics* 4 (2012) 373–378.
- [54] A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera, J.L. Gomez-Ariza, Speciation of manganese binding to biomolecules in pine nuts (*Pinus pinea*) by two-dimensional liquid chromatography coupled to ultraviolet and inductively coupled plasma mass spectrometry detectors followed by identification by electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 3053–3060.
- [55] J.P. Barnett, D.J. Scanlan, C.A. Blindauer, Fractionation and identification of metalloproteins from a marine cyanobacterium, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3371–3377.
- [56] S. Tottey, K.J. Waldron, S.J. Firbank, B. Reale, C. Bessant, K. Sato, et al., Protein-folding location can regulate manganese binding versus copper- or zinc-binding, *Nature* 455 (2008) 1138–1142.
- [57] K. Polec, M. Perez-Calvo, O. Garcia-Arribas, J. Szpunar, B. Ribas-Ozonas, R. Lobinski, Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2002) 197–206.
- [58] M. Sulyok, S. Hann, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, G. Stingeder, G. Koellensperger, Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 856–863.
- [59] A. Cvetkovic, A.L. Menon, M.P. Thorgersen, J.W. Scott, F.L. Poole II, F.E. Jenney Jr., et al., Microbial metalloproteomes are largely uncharacterized, *Nature* 466 (2010) 779–782.
- [60] A. Sussulini, J.S. Becker, Combination of PAGE and LA-ICP-MS as an analytical workflow in metallomics: state of the art, new quantification strategies, advantages and limitations, *Metallomics* 3 (2011) 1271–1279.
- [61] A.R. Timerbaev, Element speciation analysis using capillary electrophoresis: twenty years of development and applications, *Chem. Rev.* 113 (2013) 778–812.
- [62] X.-B. Yin, Y. Li, X.-P. Yan, CE-ICP-MS for studying interactions between metals and biomolecules, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 554–565.
- [63] J.L. Gómez-Ariza, E.Z. Jahromi, M. González-Fernández, T. García-Barrera, J. Gailer, Liquid chromatography-inductively coupled plasma-based metallomic approaches to probe health-relevant interactions between xenobiotics and mammalian organisms, *Metallomics* 3 (2011) 566–577.
- [64] J.P. Barnett, D.J. Scanlan, C.A. Blindauer, Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3311–3322.
- [65] A. Raab, A.A. Meharg, M. Jaspars, D.R. Genney, J. Feldmann, Arsenic-glutathione complexes – their stability in solution and during separation by different HPLC modes, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 183–190.
- [66] J.S. Becker, M. Zoriy, U. Krause-Buchholz, J.S. Becker, C. Pickhardt, M. Przybylski, et al., In-gel screening of phosphorus and copper, zinc and iron in proteins of yeast mitochondria by LA-ICP-MS and identification of phosphorylated protein structures by MALDI-FT-ICR-MS after separation with two-dimensional gel electrophoresis, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1236–1243.
- [67] M.S. Jimenez, L. Rodriguez, M.T. Gomez, J.R. Castillo, Metal-protein binding losses in proteomic studies by PAGE-LA-ICP-MS, *Talanta* 81 (2010) 241–247.
- [68] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase, *J. Mol. Biol.* 160 (1982) 181–217.
- [69] A.R. Timerbaev, K. Pawlak, S.S. Aleksenko, L.S. Foteeva, M. Matczuk, M. Jarosz, Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs, *Talanta* 102 (2012) 164–170.
- [70] A.R. Timerbaev, K. Pawlak, C. Gabbiani, L. Messori, Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1120–1138.

- [71] A.K. Bytek, C.G. Hartinger, Capillary electrophoresis methods in the development of metal-based therapeutics and diagnostics: new methodology and applications, *Electrophoresis* 33 (2012) 622–634.
- [72] B. Michalke, V. Nischwitz, Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid – current methods and results: a review, *Anal. Chim. Acta* 682 (2010) 23–36.
- [73] M. González-Fernández, T. García-Barrera, A. Arias-Borrego, J. Jurado, C. Pueyo, J. López-Barea, et al., Metallomics integrated with proteomics in deciphering metal-related environmental issues, *Biochimie* 91 (2009) 1311–1317.
- [74] J.L.M. McNay, E.J. Fernandez, Protein unfolding during reversed-phase chromatography: I. Effect of surface properties and duration of adsorption, *Biotechnol. Bioeng.* 76 (2001) 224–232.
- [75] Z. Pedrero, L. Ouerdane, S. Mounicou, R. Lobinski, M. Monperrus, D. Amouroux, Identification of mercury and other metals complexes with metallothioneins in dolphin liver by hydrophilic interaction liquid chromatography with the parallel detection by ICP-MS and electrospray hybrid linear/orbital trap MS/MS, *Metallomics* 4 (2012) 473–479.
- [76] A. Sanz-Medel, A.B. Soldado Cabezuelo, R. Milačič, T. Bantan Polak, The chemical speciation of aluminium in human serum, *Coord. Chem. Rev.* 228 (2002) 373–383.
- [77] R. Cornelis, J. de Kimpe, Elemental speciation in biological fluids, invited lecture, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 945–950.
- [78] G. Weber, Investigation of the stability of metal species with respect to liquid chromatographic separations, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 346 (1993) 639–642.
- [79] M. Eigen, Fast elementary steps in chemical reaction mechanisms, *Pure Appl. Chem.* 6 (1963) 97–115.
- [80] J.E. Sonke, V.J.M. Salters, Disequilibrium effects in metal speciation by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS); theory, simulations and experiments, *Analyst* 129 (2004) 731–738.
- [81] R.F. Carbonaro, A.T. Stone, Speciation of chromium(III) and cobalt(III)(amino) carboxylate complexes using capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 77 (2005) 155–164.
- [82] L. Helm, A.E. Merbach, Inorganic and bioinorganic solvent exchange mechanisms, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1923–1959.
- [83] H. Yan, L. Yang, Q. Wang, Evaluation of cadmium species lability using ion-pair reversed phase HPLC coupled on-line with inductively coupled plasma, *Talanta* 84 (2011) 187–292.

Dans le cas de l'uranium, peu d'études ont été réalisées. Les premiers travaux dans ce domaine ont été réalisés par Scapolan *et al.*⁸⁰ Ces auteurs ont utilisé l'électrophorèse capillaire, à pH 10 afin d'analyser un sérum humain en présence d'uranium. Les résultats postulent que l'élargissement du pic de l'albumine observé en UV en présence d'uranium pourrait être attribué à la formation d'un complexe HSA-U. Malgré les interrogations des auteurs eux-mêmes sur la mise en évidence d'un tel complexe, ce travail démontre la possibilité d'utilisation de l'électrophorèse capillaire dans le criblage direct des cibles protéiques dans le sérum. Becker *et al.*⁸¹ ont utilisé l'électrophorèse sur gel 2D couplée et une détection par ablation laser -ICP/MS pour détecter les fractions protéiques contenant de l'uranium dans des échantillons de cerveau humain. L'utilisation d'une méthodologie similaire sur des cellules rénales a démontré la perte de l'uranium dans les conditions dénaturantes requises en SDS-PAGE.⁸² Chez un organisme aquatique *Procambarus clarkii* exposé à l'uranium, la même équipe a montré par utilisation du couplage SEC-ICP/MS, que l'uranium se répartit dans plusieurs fractions protéiques sans toutefois les identifier.⁸³ L'utilisation conjointe de l'ICP/MS et l'ESI/MS-MS après séparation par électrophorèse sur gel - 1D non dénaturant a révélé la présence de 42 protéines cibles potentielles de l'uranium dans le cytosol des glandes digestives de cet animal.⁸⁴

1.3. Présentation de 3 cibles potentielles majeures de l'uranium : la transferrine (TF), la féтуine-A (FET) et l'ostéopontine (OPN)

En 1968, l'étude de Chevari et Likhner sur la distribution de l'uranium dans le sang par α – autoradiographie a montré que ce métal se répartit de la façon suivante : 20 - 25 % dans la fraction liée aux érythrocytes, 30 – 33 % dans la fraction protéique et 47 – 50 % complexé à des ions inorganiques.⁸⁵ Compte tenu de l'abondance de l'albumine (HSA) et de la transferrine (TF) dans le sérum, celles-ci ont alors été considérées comme les cibles les plus importantes de l'uranium. Montavon *et al.*,⁴¹ sur la base des constantes de complexation de HSA, TF et des carbonates déterminées en fluorescence, ont proposé une distribution de l'uranium de 65 % avec CO_3^{2-} (dont 1 % de di- et 64 % de tri-carbonate) et de 35 % avec les protéines sériques (dont 28 % pour l'albumine (HSA) et 7 % pour la TF). De nombreux travaux se sont intéressés à ces deux protéines et ont montré une affinité de TF pour l'uranium plus importante que celle de HSA.^{41,43,49} Plus récemment, l'étude de Basset *et al.*⁴⁴ a démontré que la féтуine (FET) est la cible la plus importante de l'uranium dans le sang, parmi les 13 protéines sériques les plus abondantes. D'autre part, un des organes cibles

majeurs de l'uranium est l'os. Plusieurs études ont suspecté l'implication de l'ostéopontine,^{15,17} mais c'est seulement récemment que Qi *et al.*⁸⁶ ont montré la très forte affinité de l'ostéopontine pour ce métal ($K_d = 3,6 \pm 1,3$ nM).

L'ensemble de ces résultats nous a conduits à sélectionner 3 protéines d'intérêt majeur : TF, FET et OPN. Une présentation de ces trois protéines cibles de l'uranium chez l'homme est détaillée dans la partie qui suit. Ces trois protéines vont être utilisées tout au long de la thèse comme protéines de référence.

1.1.3. Transferrine (TF)

La transferrine est une glycoprotéine qui transporte le fer (III) dans le corps humain. Elle est la seule source de fer connue pour la synthèse de l'hémoglobine. Avec son récepteur (TFR), elle assure également l'approvisionnement de la plupart du fer (III) nécessaire au fonctionnement des cellules.

De masse molaire environ 80000 Da, elle est constituée de deux domaines qui diffèrent légèrement, notamment de par leurs extrémités C- terminale et N- terminale.⁸⁷ Ces deux extrémités sont elles-mêmes subdivisées en deux sous-domaines qui constituent les sites de fixation spécifiques de l'ion ferrique (Fe^{3+}) avec des constantes de stabilité très importantes K_1 de $4,7 \cdot 10^{20} M^{-1}$ et K_2 de $2,4 \cdot 10^{19} M^{-1}$ à pH 7,4 à pression de CO_2 atmosphérique.^{88,89} L'interaction a lieu via quatre acides aminés: deux tyrosines, une histidine et un acide aspartique, la sphère de coordination du fer étant complétée par le carbonate, dont l'action synergique a été démontrée.⁹⁰⁻⁹⁴

La complexation du fer s'accompagne d'un changement de conformation de la protéine, de l'état « ouvert » en absence de fer à l'état « fermé » en présence de fer (Figure 1.4). Ce changement de conformation induit par la complexation joue un rôle crucial dans la reconnaissance de TF par TFR.

L'affinité de la protéine vis-à-vis du fer dépend du pH du milieu.^{88,93,95} En effet, l'interaction entre TF et ion ferrique (III) est favorisée entre pH 7,5 et 10, la dissociation n'a lieu, elle, qu'à partir de pH 6,5 de façon partielle et totalement à pH 4,5.⁹⁶

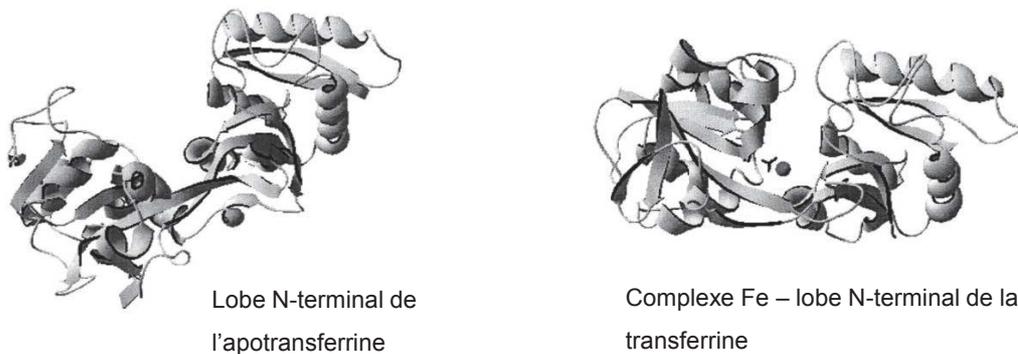


Figure 1.4 : Structure du lobe N-terminal de la transferrine avec ou sans ion ferrique ⁹⁴

Dans le corps humain, la transferrine existe sous quatre formes: apotransferrine (sans fer lié), monoferrique (un fer dans le lobe N-terminal ou C-terminal) et holotransferrine (diferrique).⁹⁷ Sa concentration sérique est de l'ordre de 25 - 50 μM avec environ 30 % des sites de fixation saturés par le fer.^{87,98,99} Dans le sérum, la forme monoferrique du lobe N-terminal est prédominante malgré sa constante d'affinité apparente plus faible.^{100,101} D'après Bali *et al.*,¹⁰⁰ à pH 5,6 (pH des endosomes), en absence de TFR, la dissociation du fer du lobe N-terminal est plus rapide que celle de celui situé dans le lobe C-terminal. Par contre, lorsque TF est complexée à son récepteur, le lobe C-terminal libère le fer bien plus rapidement alors que la cinétique de libération du fer situé dans le lobe N-terminal n'est affectée que dans des proportions moindres. Hémadi *et al.*¹⁰² ont montré par des études *in vitro* qu'à pH 5,6, la vitesse de libération du fer du lobe C-terminal est au moins 200 fois plus rapide en présence du récepteur de TF, alors que cette augmentation de vitesse n'est que de 17 environ pour le fer du lobe N-terminal.

Plusieurs études ont montré que la transferrine peut complexer *in vivo* différents métaux et ainsi assurer le transport de métaux essentiels, tels que le manganèse (vraisemblablement sous sa forme Mn^{3+}),⁹¹ de métaux à potentiel thérapeutique et diagnostique : titane (Ti^{4+}),⁹¹ vanadium VO^{2+} (V^{4+}),^{91,103} chrome (Cr^{3+}),⁹¹ gallium (Ga^{3+}),⁹⁴ indium(In^{3+}),⁹⁴ thallium(Tl^{3+}),⁹⁴ ou de métaux toxiques comme l'aluminium (Al^{3+})^{91,94}.

Sur la base des premiers travaux réalisés dans le domaine de la toxicologie de l'uranium, TF est également considérée comme une cible particulièrement importante de l'uranium (UO_2^{2+}).^{17,18} De ce fait, ses propriétés de complexation ont été largement étudiées. La constante d'affinité a été estimée entre 10^7 et 10^{13} M^{-1} .^{41,43,49,104} La stoechiométrie du complexe entre apotransferrine et U a été déterminée de 2 U par protéine et les sites de fixation sont les sites de fixation du fer. Un modèle de structure du complexe TF-U a été proposé sur la base d'études réalisées en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).⁴⁰ La Figure 1.5 montre une fixation de l'uranium impliquant 2 tyrosines et au moins un oxygène issu d'un groupement carboxylate, l'histidine ne participant pas à cette fixation, contrairement à ce qui a été observé dans le cas du le fer. Associées à des données

obtenues en dichroïsme circulaire et en DSC, ces études conduisent à l'hypothèse d'une conformation partiellement ouverte du complexe TF-U. Ce résultat est d'une importance majeure pour la toxicologie de l'uranium car la conséquence de ce changement de conformation est une reconnaissance par le récepteur TFR défavorisée, ce qui laisse à penser que l'uranium n'est vraisemblablement pas délivré aux organes cibles via TF.

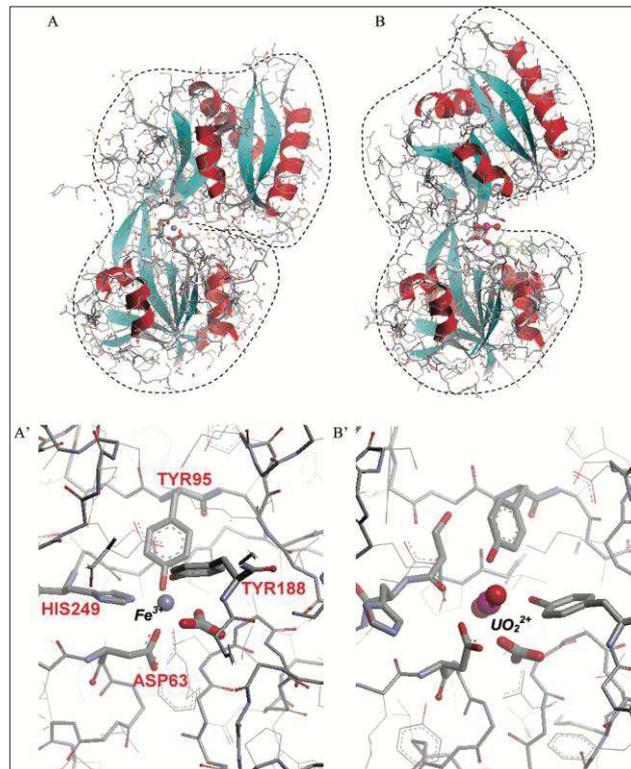


Figure 1.5 : Modèle de structure TF-métal proposé par Vidaud *et al.*⁴⁰
A, A'- TF-Fe ; B, B'- TF-U.

1.1.4. Féтуine-A (FET)

La féтуine-A (FET) ou $\alpha 2$ HS-glycoprotéine est une glycoprotéine humaine de 48 kDa synthétisée dans le foie et sécrétée dans le sang pour être ensuite transportée jusqu'au squelette.¹⁰⁵ Elle est l'une des protéines non collagéniques principales de la matrice organique de l'os.¹⁰⁶ Etant de la superfamille des protéines cystatine qui inhibent l'activité de protéases à cystéine, la FET se divise en trois domaines: deux domaines de type cystatine et un domaine C-terminal. Le premier domaine de type cystatine est très riche en résidus acides, donc chargé négativement (Figure 1.6).^{105,107} Il est impliqué dans l'interaction avec le calcium et le facteur de croissance transformant β (TGF- β). Après clivage protéolytique, FET se retrouve constituée de deux chaînes polypeptidiques (une grande chaîne de 321 acides aminés côté N-terminal et une petite, côté C-terminal, comprenant 24 acides aminés) liées de façon covalente par des ponts disulfure.¹⁰⁵

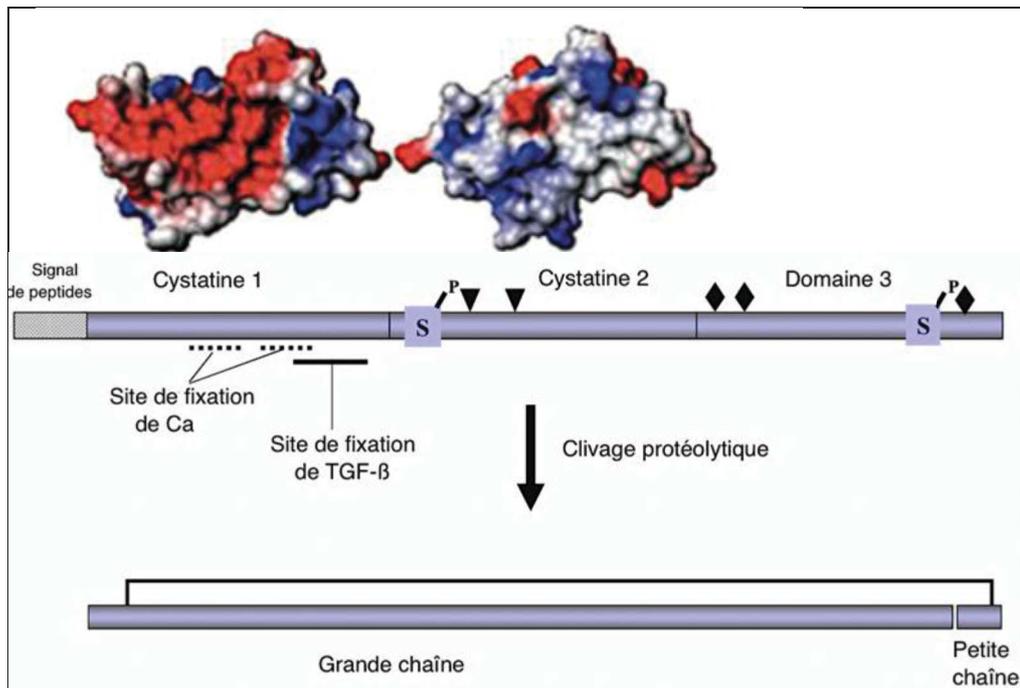


Figure 1.6 : Schéma des trois domaines structuraux et des modifications post-traductionnelles de la FET.^{105,107}

Charge de la protéine négative en rouge, positive en bleu

S : sites de phosphorylation (sérines) ; ▼ : sites de N-glycosylation ; ◆ : sites de O-glycosylation.

La concentration de FET est la plus élevée dans le sang des embryons de 23 - 30 semaines où elle atteint 0,7 – 1,3 mg/ml, et diminue dans le sang adulte où elle est de 0,4 - 0,9 mg/ml.^{108,109} Sa concentration élevée dans le sang fœtal suggère l'importance de son impact physiologique dans la formation des tissus chez le fœtus et le prématuré.¹⁰⁸

Après sa découverte en 1944 par Pederson,¹¹⁰ cette protéine a fait l'objet de nombreuses études de par son rôle important dans plusieurs processus physiologiques ou pathologiques. De nombreuses études semblent démontrer que la FET participe à l'ostéogénèse, en fixant le calcium et la cytokine TGF-β,^{111,112} mais aussi à l'inhibition de la calcification en formant des particules de calcioprotéine^{105,107,112,113}. La diminution de sa concentration a été observée dans la phase d'inflammation aigüe chez les patients atteints de maladies neurodégénératives comme la sclérose en plaques. Elle pourrait être un candidat prometteur pour le contrôle des traitements de la maladie.¹⁰⁵ Cependant, plusieurs études ont montré que sa concentration est augmentée dans les cas d'obésité et qu'elle induit une résistance à l'insuline en inhibant son récepteur.^{105,114}

Des études réalisées en SPR par Basset *et al.*⁴⁴ ont récemment démontré pour la première fois que la FET est la cible protéique la plus importante de l'uranium dans le sérum. Malgré le fait que la structure des sites de fixation avec l'uranium ne soit pas encore déterminée, les mêmes auteurs ont montré via les spectres UV et dichroïsme circulaire (CD) un impact de la fixation de l'uranium sur le résidu tyrosine et le pont disulfure du domaine I de la protéine. Ils

ont également proposé la présence de trois sites de fixation d'uranium pour cette protéine (deux de forte affinité (constante d'affinité $K_d = 30 \pm 8$ nM) et un de faible affinité ($K_d = 9 \pm 2$ μ M)). La Figure 1.7 représentant la distribution de l'uranium parmi 13 protéines sériques les plus abondantes, calculée via leur constante d'affinité individuelle déterminée en SPR et leur concentration, montre que la FET fixe 80 % de l'uranium lié aux protéines.

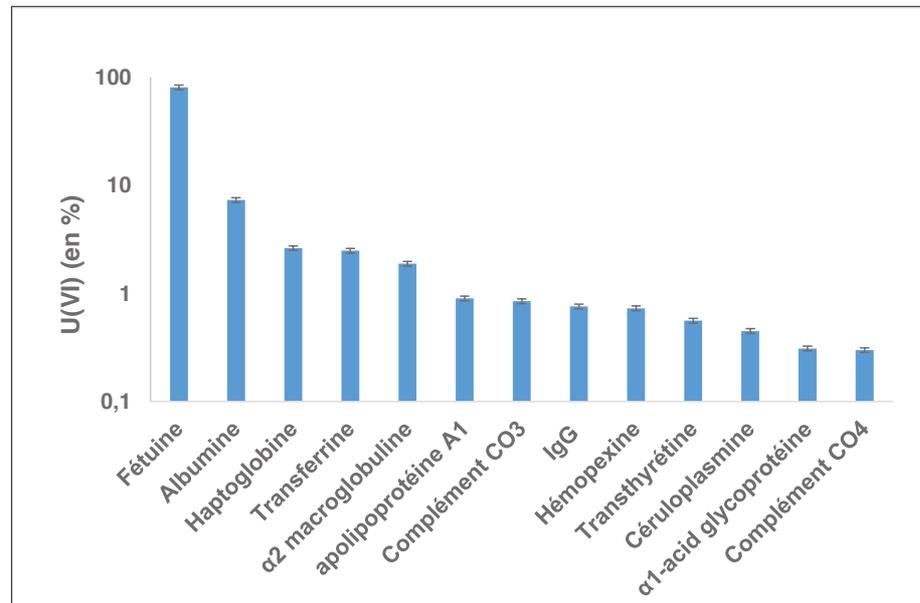


Figure 1.7 : Distribution calculée de l'uranium parmi les 13 protéines sériques les plus abondantes en SPR.⁴⁴

1.1.5. Ostéopontine (OPN)

L'OPN est une protéine de type SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) contenant environ 300 acides aminés dont de nombreux acides aspartiques et glutamiques.¹¹⁵ C'est une des protéines les plus abondantes de la matrice osseuse mais on la retrouve également dans différents organes (rein, cerveau, glandes mammaires, etc.) et est sécrétée dans divers fluides biologiques tels que le sang, le lait ou l'urine.¹¹⁶

L'OPN se caractérise par une grande flexibilité structurale (intrinsically disordered protein (IDP)) sous forme d'une molécule ouverte en grande partie sans structure secondaire¹¹⁷ et de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation et le traitement protéolytique. Alors que l'OPN humaine possède 36 sites de phosphorylation (34 phosphosérines, 2 phosphothréonines), 5 O-glycosylations sur la thréonine mais pas de N-glycosylation sur l'asparagine,¹¹⁸ l'OPN bovine présente, elle, 28 sites de phosphorylation (27 phosphosérines et 1 phosphothréonine) et 3 sites de O-glycosylation¹¹⁹. Le modèle de structure de l'OPN humaine proposé par Kazanecki *et al.*¹²⁰ dans la Figure 1.8 présente sa flexibilité avec les différents sites de phosphorylation et de glycosylation.

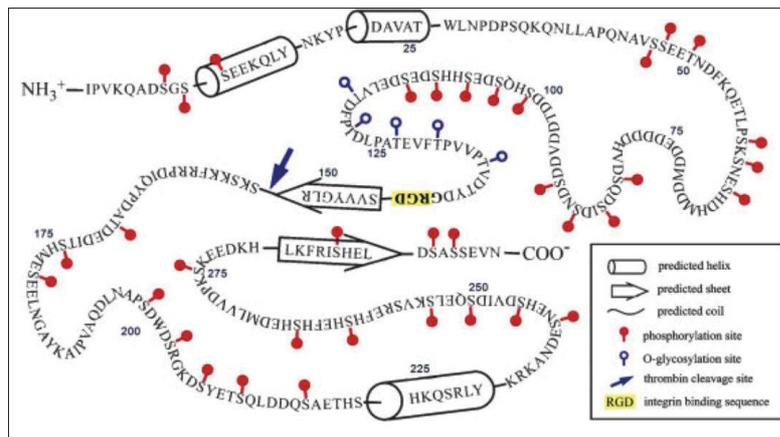


Figure 1.8 : Modèle de structure de l'OPN humaine proposé par Kazanecki *et al.*¹²⁰

L'OPN joue un rôle important dans l'homéostasie de l'os, la vascularisation, le système immunitaire, etc.¹²⁰⁻¹²³ Ses fonctions physiologiques variées sont assurées par l'interaction avec plusieurs récepteurs de surface (intégrines) via la zone arginine-glycine-aspartate (RGD) et mais aussi par l'intermédiaire d'autres domaines d'adhérence cellulaire.¹²¹ L'interaction avec l'hydroxyapatite est réalisée via une zone poly-aspartate.¹²⁰ L'OPN est ainsi impliquée dans l'adhérence des cellules osseuses, la fonction des ostéoclastes et la minéralisation de la matrice. De plus, sa concentration élevée en cas d'inflammation chronique, de maladies auto-immunes et dans plusieurs types de cancers démontre son rôle dans le système immunitaire. En effet, elle est spécialement localisée dans la zone de cellules inflammatoires¹²² et induit l'activation, la migration et la fixation des leucocytes et des macrophages sur les sites inflammatoires.¹²¹

Cette protéine a une grande capacité de fixation des ions Ca^{2+} (jusqu'à 50 Ca^{2+} par protéine).¹²⁴ Klänning *et al.*¹²⁵ ont récemment montré qu'elle possédait 10 sites de fixation de Ca^{2+} constitués par les résidus acides de cette protéine ($\text{Kd} = (25 \pm 11) \text{ nM}$) et indépendants du taux de phosphorylation. De plus, l'OPN participe au phénomène physiologique d'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium¹²⁶ et de l'oxalate de calcium¹²⁷. Cependant, plusieurs études ont démontré que cette capacité est diminuée pour la protéine déphosphorylée.^{123,128}

Une étude de Prat *et al.*¹⁷ a montré, pour la première fois, une corrélation entre la présence d'uranium dans le corps humain et l'ostéopontine. En effet, la surexposition à l'uranium des ouvriers du site nucléaire de Malvesi, Aude, France (30 $\mu\text{g/l}$ d'U dans l'urine) engendre une diminution considérable de l'OPN dans leurs urines, attribuée à un stress sur le gène SPP1, codant pour cette protéine. Plus récemment, la forte affinité de cette protéine pour l'uranium a été démontrée.⁸⁶ Selon les travaux de Safi *et al.*, alliant spectroscopies, thermodynamique et calcul théorique, une structure du site de fixation de l'uranium dans un peptide mimant

l'OPN a été proposée. Le complexe formé est un complexe de sphère interne via un atome d'oxygène provenant d'un groupe phosphoryle et deux atomes d'oxygène d'un groupe carboxyle.⁶⁰ La sphère de coordination est complétée par deux molécules d'eau, présentée dans la Figure 1.9. Une comparaison des spectres EXAFS obtenus avec ce peptide et l'OPN permet de faire l'hypothèse d'environnements de coordination de l'uranium similaires dans ces deux molécules.

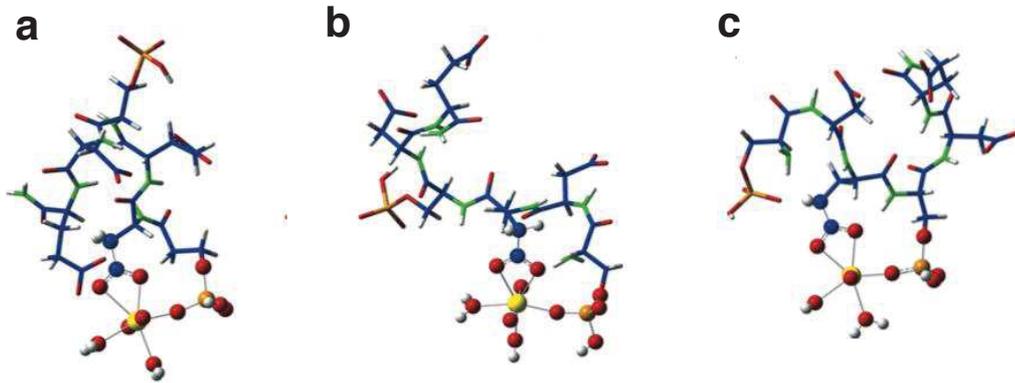


Figure 1.9 : Modèles théoriques obtenus par calcul DFT des sites de fixation possibles de l'uranium par le peptide pSDEpSDE.⁶⁰

Qi *et al.*⁸⁶ ont mesuré en SPR des constantes d'affinité pour l'uranium (Kd) de l'OPN humaine entière, de l'OPN bovine entière et du fragment majoritaire de l'OPN bovine de $(3,6 \pm 1,3)$ nM, $(3,0 \pm 1,2)$ nM et (30 ± 2) nM respectivement. La stœchiométrie proposée est de 6 U par protéine. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que la déphosphorylation conduit à des affinités environ 60 à 100 fois et 10 à 15 fois plus faibles pour l'OPN bovine entière et son fragment respectivement.

Chapitre 2. Mise en place du couplage CE-ICP/MS

Le couplage CE-ICP/MS a été utilisé pour la première fois en 1995 par Olesik *et al.*¹²⁹ Depuis 20 ans, il a largement été développé et a démontré de grands avantages dans le domaine de l'analyse des métaux. De nombreuses revues et articles scientifiques détaillent son utilisation dans des applications aussi variées que la spéciation,^{130,131} l'analyse de métalloprotéines,¹³²⁻¹³⁴ la détermination de constantes de complexation,^{70,135,136} ou encore l'analyse de nanoparticules métalliques^{137,138}. Ce couplage combine l'efficacité de séparation de l'électrophorèse capillaire à la sensibilité de détection et la spécificité multi-élémentaire de l'ICP/MS. Dans le but d'identifier et de caractériser les protéines cibles de l'uranium dans les fluides biologiques, ce couplage CE-ICP/MS semble être un outil très puissant, qu'il semble intéressant d'étudier, et dont l'intégration à l'ensemble des techniques analytiques utilisées pour répondre à cette thématique doit être envisagée.

Cependant, le couplage CE-ICP/MS est difficile à mettre en place, principalement en raison de l'incompatibilité des débits entre la CE et l'ICP/MS. En effet, le débit des analytes issus dans la CE est de 50 – 600 nl/min tandis que les systèmes d'introduction de l'échantillon en ICP/MS nécessitent classiquement des débits d'échantillon compris entre 100 et 1000 µl/min (en fonction du type de nébuliseur). L'électrophorèse capillaire tirant son efficacité de l'absence d'écoulement laminaire, des différences de débit conduisent donc à une détérioration des efficacités de séparation. De plus, pour minimiser l'élargissement de pic et donc conserver l'efficacité de séparation en CE, les volumes extra-capillaire doivent être les plus faibles possible. D'autre part, le principe même de l'électrophorèse capillaire nécessite la fermeture du circuit électrique entre les deux extrémités du capillaire. L'interface entre les deux appareils est donc le point-clé du système, qui devra résoudre les problèmes cités ci-dessus.

Dans ce chapitre, nous exposerons les arguments qui nous ont conduits à ce choix instrumental ainsi que les différentes options recensées dans la bibliographie pour réaliser le couplage CE-ICP/MS. Dans un second temps, la mise en place de ce couplage au laboratoire sera détaillée notamment l'optimisation des paramètres influant sur l'aspiration et les conséquences de cette optimisation.

2.1. Introduction au couplage CE-ICP/MS

2.1.1. Electrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse capillaire a été choisie comme technique de séparation et ce, en raison de plusieurs de ses avantages :

- sa capacité de séparation des molécules de taille variée, chargées négativement ou positivement en une seule analyse rapide,
- l'absence de phase stationnaire et donc d'interaction avec les analytes qui pourrait modifier l'intégrité des complexes protéine-métal,
- la large gamme de choix d'électrolytes possibles (nature, force ionique et également pH) ; Ainsi, des conditions d'analyse douces (proches des conditions physiologiques) et compatibles avec la préservation de l'intégrité des complexes protéine-métal pourront être utilisées.
- sa faible consommation d'échantillon, nécessaire dans le cas d'échantillons biologiques,
- sa facilité de la manipulation et son automatisation.

Une description détaillée de l'appareillage d'électrophorèse capillaire est présentée dans un article intitulé « Electrophorèse capillaire – Appareillage » dans la collection Techniques de l'ingénieur, présenté en annexe 3.

2.1.2. Spectrométrie de masse à plasma induit (ICP/MS)

L'ICP/MS a été choisi pour ses capacités de détection très sensible, spécifique et multi-élémentaire. Cette technique permet la quantification des éléments à l'état de traces et les limites de détection sont de l'ordre du ng/l, en fonction des éléments.

Sa résolution en masse dépend du type d'analyseur. Les analyseurs les plus utilisés sont le quadripôle et le secteur magnétique. Le premier peut distinguer deux masses voisines différant de 0,5 u.m.a., ce qui conduit à un pouvoir de résolution en masse ($m/\Delta m$) de 300 - 500. Le secteur magnétique a un pouvoir de résolution plus important, d'environ 10000. De plus, les limites de détection sont 5 à 10 fois plus faibles qu'avec un analyseur quadripolaire.¹³⁹ Cependant, l'analyseur à haute résolution est plus coûteux et plus difficile à mettre en œuvre que l'analyseur quadripolaire.

Les interférences spectrales sont l'une des principales difficultés rencontrées dans l'utilisation de l'ICP/MS lorsque ce dernier est incapable de distinguer des éléments ayant des m/z proches (inférieurs de 0,1 - 0,2 u.m.a.). Parmi ces dernières, on peut trouver :

- des interférences isobariques. Il s'agit de deux éléments ayant un isotope de même

masse. Ces interférences dépendent de l'abondance relative des isotopes de l'élément interféré et de l'élément interférant.

- des interférences polyatomiques, par formation d'adduits moléculaires avec les éléments présents dans la matrice en grande quantité (par ex : Na, Cl, pour les échantillons chargés en NaCl, C pour les échantillons à forte composante organique, etc.) ou constituant le plasma, tels que Ar, O, H, N (argides : $M\text{Ar}^+$, oxydes : MO^+ , hydroxydes : MOH^+), ou encore dues à la présence d'oxydes réfractaires. Les interférences polyatomiques sont souvent rencontrées pour des rapports m/z allant de 40 à 80.
- des interférences dues aux ions doublement chargés (M^{2+}), qui affectent les éléments dont le potentiel de deuxième ionisation est inférieur à celui de l'argon. Il en résulte une baisse de sensibilité de l'ion monovalent et la génération d'interférences à $m/2$.

Pour résoudre ce type d'interférences, plusieurs solutions peuvent être envisagées :

- (i) l'utilisation d'isotopes non interférés.
- (ii) l'utilisation d'un analyseur haute résolution à secteur magnétique.
- (iii) l'utilisation d'un plasma froid, c'est-à-dire dont la puissance est de 700 W au lieu des 1500 W habituels, afin d'obtenir un plasma moins énergétique et d'un débit de nébulisation plus élevé, qui induit un plus faible temps de séjour des espèces dans le plasma. Ceci permet donc de réduire l'ionisation des espèces dont le potentiel de première ionisation est élevé. Cependant, dans ces conditions, le plasma est souvent instable, donc peu reproductible et la sensibilité de détection réduite.
- (iv) l'utilisation d'une cellule de réaction et/ou de collision:
 - La collision permet d'éliminer les ions polyatomiques en utilisant un gaz de collision inerte (He le plus souvent) et en discriminant l'énergie cinétique des espèces polyatomiques (discrimination physique). Les ions polyatomiques ayant une section efficace de collision plus grande que les ions monoatomiques, l'énergie cinétique qu'ils perdront par collision sera plus importante. Par conséquent, l'adjonction d'une barrière énergétique bien choisie permettra l'élimination des ions polyatomiques, ceux-ci sortant de la cellule de collision avec une énergie plus faible que les ions monoatomiques.¹⁴⁰
 - la réaction, par utilisation d'un gaz tel que O_2 , H_2 , etc., permet la formation d'autres espèces non interférentes (discrimination chimique). Ces réactions en phase gazeuse sont de différents types : transfert de charge, transfert d'atome ou dissociation. Elles peuvent impliquer indifféremment l'ion à analyser ou l'ion interférent.

L'utilisation conjointe d'un gaz de réaction et d'un gaz de collision constitue également une solution efficace afin d'éliminer ce type d'interférences.¹⁴¹

A noter également l'existence d'interférences dues aux effets de matrice qui proviennent de l'analyse de matrices très concentrées dont le nombre important d'ions dans le plasma crée un effet d'espacement de charges (répulsion mutuelle des charges positives et donc défocalisation du faisceau d'ions). Pour éliminer ces interférences, on procède généralement à une dilution des échantillons.

Dans notre étude, l'élément principalement étudié est l'uranium ($m/z = 238$). Avec son abondance relative naturellement de 99,28 % et l'absence d'interférences spectrales observées avec cet élément, un analyseur quadripolaire suffit. Cependant, l'accès aux autres éléments souvent présents dans les échantillons biologiques n'est pas sans difficulté compte-tenu des multiples interférences. Parmi eux, on peut citer le fer ^{56}Fe (91,66 %) dont le principal interférant $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ nécessiterait une résolution de 2500, le soufre avec l'isotope ^{32}S (95,02 %) pour lequel la résolution devrait être supérieure à 1800 pour se distinguer d' $^{16}\text{O}_2^+$, $^{63}\text{Cu}/^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$ requerrait $R > 2800$, $^{31}\text{P}/^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $R > 970$ ou encore le calcium avec l'isotope ^{40}Ca : (96,97 %) dont la séparation de l'isobare $^{40}\text{Ar}^+$ demanderait une résolution de 192500. Ces interférences ont été minimisées par l'utilisation de la cellule de collision (He). A l'exception des interférences comme $^{40}\text{Ar}^+ / ^{40}\text{Ca}^+$, la grande majorité de ces interférences peuvent être éliminées par l'utilisation d'un secteur magnétique ou d'une cellule de collision/réaction.

2.1.3. Couplage CE-ICP/MS

Comme nous l'avons énoncé dans l'introduction, le principal problème du couplage provient de l'incompatibilité des débits entre électrophorèse capillaire et ICP/MS. Le nébuliseur se trouve par conséquent être un des éléments cruciaux de ce couplage et ne pourra être dissocié de l'interface.

2.1.3.1. Types des nébuliseurs

En ICP/MS, l'introduction de l'échantillon liquide dans le plasma se fait par conversion en aérosol à l'aide d'un gaz inerte (argon). Le système comprend généralement un nébuliseur, qui va générer l'aérosol, et une chambre de nébulisation, qui va permettre l'élimination des gouttelettes les plus grosses. Leur choix conditionne l'efficacité de la nébulisation, donc le transfert des analytes jusqu'au plasma et par là-même la sensibilité de détection.

Les développements en matière de conception de nébuliseurs se sont focalisés sur la réduction des débits d'introduction de l'échantillon et ont conduit à l'élaboration de systèmes dont l'efficacité de nébulisation est plus importante tout en maintenant une bonne stabilité de celle-ci. Ces améliorations sont dictées d'une part, par la nécessité d'améliorer les limites de détection, l'efficacité de nébulisation étant liée au débit d'introduction, d'autre part, par le

souci constant de réduire les volumes d'échantillons.

Dans le cas du couplage CE-ICP/MS, ces développements prennent tout leur sens car ils minimisent également les rapports entre le débit de sortie de la CE et celui d'introduction dans l'ICP/MS. Cependant, il est nécessaire de remarquer qu'en travaillant avec un nébuliseur opérant à faible débit, ce dernier doit être contrôlé strictement car une petite variation de débit du nébuliseur peut engendrer une instabilité du courant électrique ainsi que des variations importantes des facteurs de dilution, et influence donc la reproductibilité du système. Il faut également noter que dans ces conditions, le couplage CE-ICP/MS tolérera moins les sels de l'électrolyte de la CE, le choix de l'électrolyte sera donc limité.

Les différents types de nébuliseurs ainsi que leurs caractéristiques sont présentés dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Différents types de nébuliseurs utilisés en ICP/MS.

Type de nébuliseur	Débit de l'échantillon (µl/min)	Efficacité de nébulisation	Auto-aspiration
Nébuliseurs concentriques			
Classique	500 - 4000	1 - 4 %	oui
Micronébuliseur (Micromist)	50 - 600	2 - 50 % (en fonction du débit)	oui
Nébuliseur de haute efficacité	10 - 1000	10 - 20 %	oui
Nébuliseurs à injection directe			très faible
<i>DIN, DIHEN</i>	50-100	Environ 100 %	
<i>DS-5</i>	5 - 10	Environ 100 %	
MCN100	10 - 30	50 - 100 %	très faible
Nébuliseur ultrasonique	500 - 2500	Environ 20 %	non
Nébuliseur à capillaire oscillant	1 - 2000	Environ 100 % à faible débit	non
Nébuliseur à flux parallèles (Mira Mist)	1 - 9	Environ 100 %	non

Récemment, Schaumlöffel et coll. ont développé au laboratoire un nanonébuliseur (nDS-200e) travaillant à un débit de 50 à 4000 nl/min, appliqué au couplage nanoLC-ICP/MS sans ajout de liquide additionnel.¹⁴²

L'interface entre deux appareils doit s'adapter à chaque type de nébuliseur. Dans le couplage CE-ICP/MS, mis à part les nébuliseurs créés par les laboratoires, les principaux nébuliseurs commerciaux actuellement utilisés sont de type MicroMist,^{136,143-145} Mira Mist,^{70,71,146-148} ou DS-5 (interface CEI-100)¹⁴⁹⁻¹⁵³.

2.1.3.2. Interface entre la CE et l'ICP/MS

Le 'design' de l'interface est crucial pour surmonter les difficultés techniques du couplage CE-ICP/MS dont les plus importantes sont l'élimination du flux laminaire au sein du capillaire et le maintien de la stabilité du courant électrique. Deux interfaces sont actuellement commercialisées : l'interface CEI100 (CETAC), fonctionnant avec un nébuliseur DS-5 et l'interface Mira Mist CE (Burgener), fonctionnant avec un nébuliseur Mira Mist. Néanmoins, compte-tenu du coût de ces systèmes et de leur difficulté de mise en œuvre, la plupart des couplages sont actuellement réalisés grâce à des interfaces développées directement dans les laboratoires.

Les interfaces décrites dans la bibliographie peuvent être classées en deux catégories :

- Interfaces sans ajout de liquide additionnel.
- Interfaces avec ajout de liquide additionnel.

Interfaces sans liquide additionnel

La première interface utilisée pour le couplage CE-ICP/MS a été décrite par Olesik *et al.*¹²⁹ Il s'agit d'une interface sans ajout de liquide additionnel afin d'éviter la dilution. Les limites de détection atteintes avec ce couplage sont de l'ordre du nM. Pour ce faire, la surface externe du capillaire a été recouverte par une fine couche d'argent (sur 4 à 5 cm de longueur) afin de créer un contact électrique avec l'électrolyte dans le capillaire. La Figure 2.1 représente le schéma de cette interface dans un nébuliseur microconcentrique. Ce dernier a été associé à une chambre de nébulisation faite sur mesure afin d'optimiser l'efficacité de transfert des analytes. Malgré la restriction du nébuliseur par le capillaire, les auteurs ont néanmoins constaté une auto-aspiration de 2 µl/min. Le débit de la CE étant de 50 nL/min, l'apparition d'un flux laminaire dans le capillaire et le contact électrique difficile à assurer ont contribué à limiter son utilisation.

Cette option, longtemps abandonnée, a été récemment réintroduite par G. Jiang et coll. qui ont proposé l'utilisation de nébuliseurs initialement développés pour l'électrospray.^{154,155} Cependant, l'ajout d'un liquide additionnel à 4 - 5 µl/min est toujours nécessaire afin de maintenir la stabilité de la nébulisation. Il pourra donc être applicable au couplage CE-ICP/MS en adaptant la configuration de façon à ajouter une électrode. La commercialisation du futur nanonébuliseur à électrode intégrée est néanmoins toujours attendue en ICP/MS pour faciliter ce type d'interfaçage, ce qui permettrait d'améliorer les limites de détection tout en conservant un système stable et robuste.

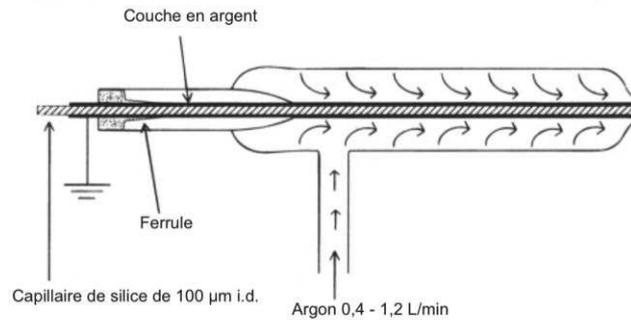


Figure 2.1 : Schéma d'une interface sans solution additionnelle.¹²⁹

Interfaces avec liquide additionnel

Afin de surmonter les problèmes rencontrés avec l'interface précédente, l'ajout d'un liquide additionnel au niveau de l'interface a été envisagé. Ce liquide permet non seulement de créer un contact électrique à l'extrémité du capillaire, entre l'électrolyte dans le capillaire et la deuxième électrode, et donc de fermer le circuit électrique, mais également de compenser le débit du nébuliseur dans l'ICP/MS. La configuration la plus courante est celle de type croix (Figure 2.2), où la deuxième électrode en Pt ou en acier inoxydable est connectée à la terre, et le liquide additionnel ajouté de façon coaxiale.

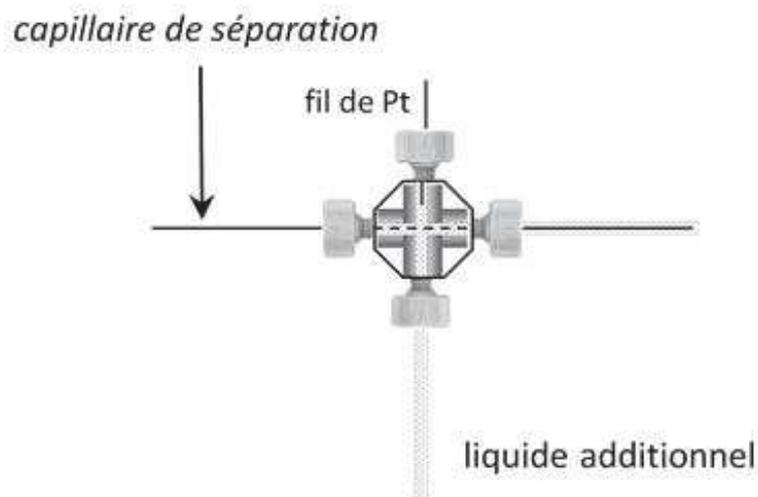


Figure 2.2 : Schéma d'une interface avec liquide additionnel.

Le liquide additionnel peut être introduit soit par une pompe, soit par auto-aspiration. Cette deuxième option présente le grand avantage d'adapter le débit du liquide additionnel en fonction de l'aspiration exercée par le nébuliseur, ce qui permet de supprimer les phénomènes de succion et de refoulement du liquide au sein du capillaire. Ce type d'interface est bien adapté aux nébuliseurs capables d'auto-aspiration (cf Tableau 2.1). Dans les autres cas, une pompe additionnelle est nécessaire pour maintenir un débit de liquide additionnel stable.

Quant au liquide additionnel, il doit être conducteur et compatible avec l'ICP/MS, en d'autres termes souvent volatil comme $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (les solvants organiques qui provoquent l'instabilité du plasma étant à éviter) mais aussi ne créant pas d'interférences avec les éléments à analyser. Les électrolytes classiques utilisés en CE tels que les tampons borate ou phosphate ne peuvent être utilisés car ils provoquent le bouchage du nébuliseur, des dépôts dans la torche à plasma et la dégradation des performances de l'ICP/MS. Prange *et al.*¹⁵⁶ ont montré que l'utilisation d' HNO_3 dilué (1 % dans leur cas) comme liquide additionnel évite la présence de sels en quantités importantes dans le plasma sans effet négatif sur la migration des analytes en CE. Ceci s'explique par le fait que dans la majorité des configurations utilisées, l'EOF est dirigé vers la cathode située à l'interface. Dans ce cas, la migration des protons ne modifie pas le pH de l'électrolyte.

Par ailleurs, l'utilisation d'un liquide additionnel permet d'élargir le choix des électrolytes utilisables en CE. Le liquide additionnel diluant l'électrolyte à la sortie du capillaire, il conduit donc à la diminution des effets de matrice dus à cet électrolyte. Ce n'est pas le cas en HPLC-ICP/MS où l'ajout du liquide additionnel n'est pas nécessaire ou à très faible débit.

Les limites de détection obtenues en CE sont généralement plus importantes, d'environ deux ordres de grandeur par rapport à celles obtenues en HPLC, à cause des faibles volumes d'injection (de l'ordre du nl).^{131,157} Cependant, en couplage avec l'ICP/MS, les limites de détection classiquement obtenues sont de 10^{-7} – 10^{-9} M. Dans le but de diminuer ces limites de détection, Lu *et al.*¹⁵⁸ ont appliqué une pression négative à l'entrée du capillaire pour compenser la succion du nébuliseur, permettant l'utilisation du liquide additionnel à très bas débit. Cependant, l'application d'une pression négative de manière précise est difficile à réaliser et la stabilité du courant électrique reste problématique car le contact électrique entre l'électrolyte dans le capillaire et l'électrode n'est pas facilement assuré. Une autre alternative permettant l'amélioration des limites de détection consiste à ajouter une étape de préconcentration par « stacking » des analytes avant séparation. La faisabilité de cette préconcentration en CE-ICP/MS a été démontrée sur un mélange de métalloprotéines.¹⁵⁹ De ce fait, le volume d'injection peut être augmenté de 10 fois, sans perte de résolution notable, et les limites de détection sont environ 6 fois plus faibles. Cependant, il faut noter que cette stratégie est difficile à mettre en œuvre.

2.2. Mise en place du couplage CE-ICP/MS au laboratoire

2.2.1. Appareillage

L'électrophorèse capillaire utilisée est un système P/ACE MDQ (Beckman-Coulter, AB Sciex, USA), piloté par le logiciel de 32 Karat™ version 8.0. Les capillaires utilisés (Photon Lines, St-Germain-en-Laye, France) sont en silice fondue et recouverts d'une couche mince de polyimide et de dimensions : 64 cm x 75 µm i.d. x 375 µm o.d. (dans certains cas, une longueur de capillaire de 84 cm a été utilisée et celle-ci sera précisée dans le texte). La température dans le capillaire est maintenue constante et égale à 25°C à l'aide d'un liquide de refroidissement. La détection est réalisée en UV, par création d'une fenêtre de détection, réalisée à 10 cm d'une des extrémités du capillaire, à différentes longueurs d'onde (200 ou 214 nm). Les électrophérogrammes en UV sont acquis à une fréquence de 16 Hz.

L'ICP/MS est un système Agilent 7700 équipé d'un analyseur quadripolaire et d'une cellule de collision à l'hélium. Le système d'introduction de l'échantillon comprend un nébuliseur Micromist aspirant à un débit de 400 µl/min et une chambre de nébulisation de Scott. Les débits optimaux d'argon utilisés sont les suivants : débit du gaz plasmagène : 15 l/min, débit du gaz auxiliaire : 0,9 l/min, débit du gaz de nébulisation : 1 l/min.

L'interfaçage entre l'électrophorèse capillaire et l'ICP/MS a été réalisé au laboratoire grâce à un système permettant l'introduction d'un liquide additionnel. Le schéma de ce couplage CE-ICP/MS est présenté dans la Figure 2.3.

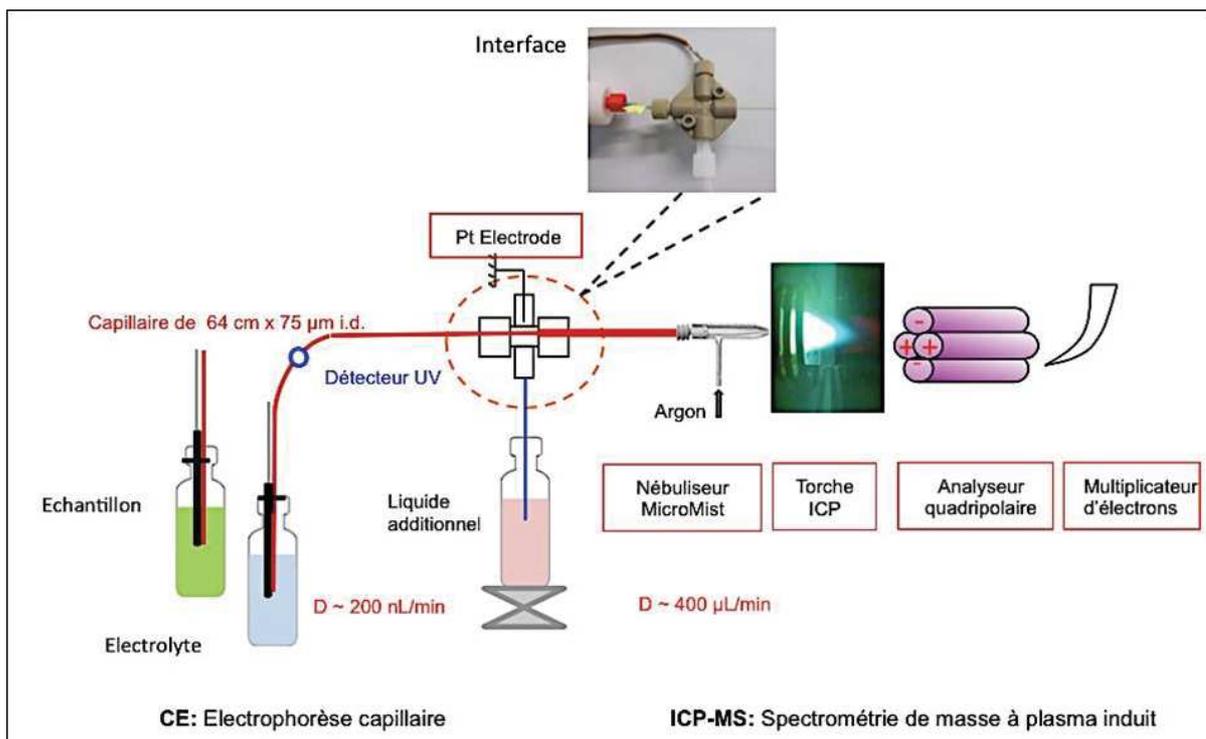


Figure 2.3 : Schéma du couplage CE-ICP/MS utilisé au laboratoire.

L'interface est constituée d'un raccord 4 voies en PEEK, traversé par le capillaire ; une électrode de Pt, connectée à la terre, est insérée perpendiculairement dans la 3^{ème} voie et le liquide additionnel ajouté par la dernière voie. Le liquide additionnel est introduit dans le nébuliseur par auto-aspiration. La connexion entre l'interface et le nébuliseur est réalisée à l'aide d'un tube en téflon. Une pompe péristaltique supplémentaire est utilisée pour réapprovisionner le système en liquide additionnel et maintenir un niveau identique de liquide dans le réservoir pendant toute la durée des analyses.

Une double détection a été réalisée: une détection UV, à 10 cm de l'extrémité d'injection, pour visualiser les analytes absorbant dans l'UV (les protéines dans notre cas) et une détection ICP/MS à 64 cm pour détecter les éléments (uranium principalement). Afin d'avoir un système totalement automatisé, une connexion électrique a été réalisée entre les deux appareils permettant leur communication. Ceci permet notamment d'assurer le démarrage simultané de la CE et de l'ICP/MS par l'intermédiaire d'un signal de déclenchement.

2.2.2. Paramètres de l'interface

Après le choix approprié du nébuliseur, du type d'interface et du système d'introduction du liquide additionnel, l'efficacité de la séparation devra être conservée en éliminant les phénomènes d'aspiration et de refoulement au niveau de l'interface. Ceci nécessite le réglage des paramètres suivants :

- 1) Hauteur des deux extrémités du capillaire pour contrôler le phénomène de siphonnage. De par la géométrie des deux systèmes commercialisés, l'introduction dans l'ICP/MS est plus haute que celle de la CE. Il est donc nécessaire de mettre à niveau les deux appareils. Nous avons donc ajusté la hauteur de la CE par rapport à l'ICP/MS en la surélevant de 7,5 cm.
- 2) Choix du tube de jonction entre l'interface et le nébuliseur : Ce connecteur influence fortement les capacités d'auto-aspiration du nébuliseur. Il doit avoir un diamètre suffisant pour permettre l'introduction du liquide additionnel nécessaire au nébuliseur. De ce fait, chaque type de nébuliseur doit avoir un connecteur adapté. Dans notre cas, la jonction choisie est un tube en téflon de 1,59 mm i.d., 3,16 mm o.d. et 7,3 cm de long.
- 3) Débit du liquide additionnel : Il faut régler le débit de liquide afin que les phénomènes d'aspiration et de refoulement au sein du capillaire soient minimisés voire supprimés.
- 4) Position du capillaire à l'entrée du nébuliseur : Si le capillaire est trop proche du tube central étroit du nébuliseur, il obture le passage du liquide additionnel et le phénomène de succion devient ainsi important et provoque la détérioration des séparations. Par contre, si le capillaire est situé trop loin, il y a création d'un volume mort important, ce qui conduit à un élargissement des pics, et par conséquent une diminution de la résolution

(de l'efficacité) de la séparation.¹³⁰

Dans les paragraphes qui suivent, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation du débit de liquide additionnel, de la position du capillaire à l'entrée du nébuliseur mais également sur la dilution des analytes éventuellement provoquée par ce couplage avant la détection.

2.2.2.1. Niveau du liquide additionnel

L'acide nitrique HNO_3 1 mM a été choisi comme liquide additionnel afin de favoriser l'ionisation des analytes dans l'ICP/MS. Il faut noter que dans l'optique d'une séparation des protéines, la concentration de cet acide ne peut être augmentée sans risque de précipitation de celles-ci. Comme nous l'avons dit précédemment, dans les capillaires de silice, le flux électroosmotique est dirigé vers la cathode. Lorsqu'un voltage positif est appliqué, les protons ne migrent donc pas vers l'entrée du capillaire. Par conséquent, l'introduction d'acide nitrique à la sortie du capillaire n'affecte pas la séparation située en amont. Dans les séparations réalisées dans des capillaires neutres et pour lesquelles un voltage négatif a été appliqué, l'acide nitrique a été remplacé par le TRIS 5 mM à pH 7,4 pour éviter toute modification du pH pendant la séparation. L'erbium (Er^{3+}) 3 nM a été ajouté dans la solution d' HNO_3 1 mM pour vérifier la stabilité de la nébulisation dans le système en suivant sa détection à $m/z = 166$, avec un temps d'acquisition de 0,1 s/point.

Le niveau de liquide additionnel nécessaire au bon fonctionnement en auto-aspiration a été déterminé. Celui-ci a été mesuré à partir de la hauteur H décrite dans le schéma de la Figure 2.4.

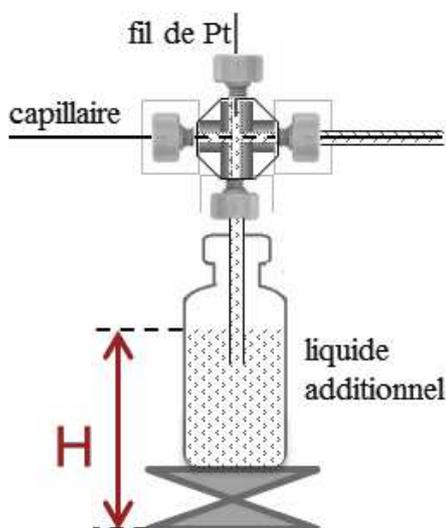


Figure 2.4 : Schéma de l'interface utilisée pour le couplage CE-ICP/MS.

Influence sur la stabilité du courant

Afin de déterminer le niveau de liquide pour lequel les effets d'aspiration et de refoulement dans le capillaire seront minimisés voire supprimés, une méthode simple et rapide, basée sur la mesure de l'intensité du courant, a été appliquée. Celle-ci nécessite l'utilisation d'un liquide additionnel ayant une conductivité différente de celle de l'électrolyte, l'acide nitrique 1 mM dans notre cas. Après réalisation du couplage, le capillaire de silice (64 cm x 75 μ m i.d.) de la CE a été rempli par une solution de TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4, une de ces extrémités restant immergée dans cette même solution. Puis, un voltage de 20 kV (avec un temps de rampe de 18 s) a été appliqué soit immédiatement, soit après 10 min et le courant a été enregistré 24 s après l'application de ce voltage.

L'évaluation de l'aspiration et du refoulement est basée sur la comparaison des intensités des courants mesurées immédiatement et après 10 min d'attente.

- Si le niveau du liquide additionnel est trop élevé, cela engendre un débit de liquide additionnel supérieur à celui nécessaire au nébuliseur. Il y a alors refoulement d'acide nitrique au sein du capillaire pendant 10 min et on constate une diminution du courant électrique.
- Si le débit du liquide est trop faible, il y a aspiration de l'électrolyte contenu dans le capillaire et le contact électrique n'est plus assuré. Toutefois, pour des débits de liquide additionnel proches de la valeur optimale, le capillaire étant immergé dans l'électrolyte, ce dernier est renouvelé progressivement et le courant ne change donc pas après de 10 min.

La comparaison de ces intensités permet donc de détecter sans ambiguïté un refoulement mais pas une aspiration modérée. La plus petite hauteur H pour laquelle la valeur du courant reste constante ou varie faiblement entre les mesures à 0 et 10 min est la position optimale où les phénomènes de succion et de refoulement sont supprimés.

La Figure 2.5 représente le courant mesuré lorsqu'on applique un voltage immédiatement après avoir rempli le capillaire par l'électrolyte et après 10 min d'attente en fonction du niveau de liquide additionnel.

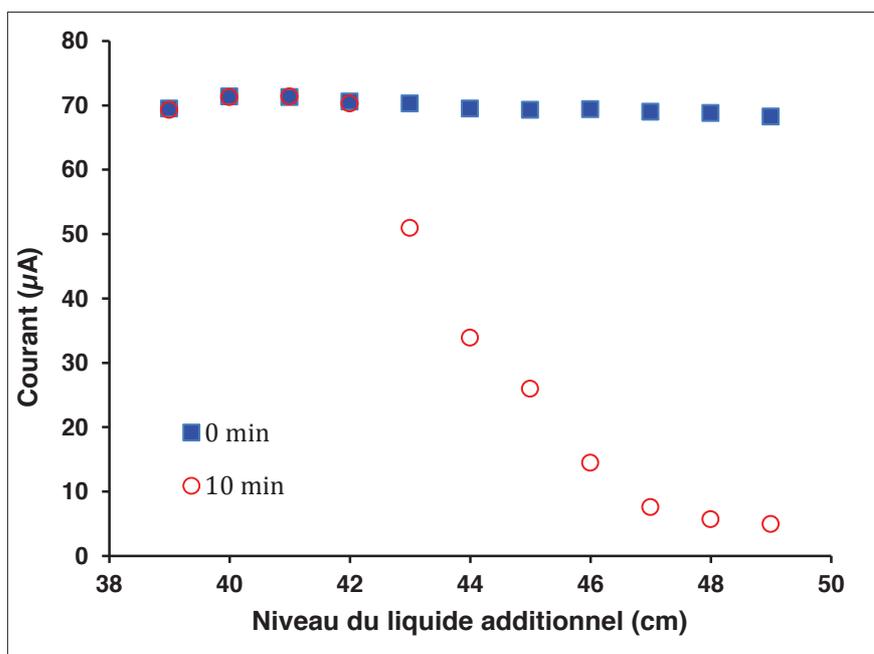


Figure 2.5 : Courant électrique à 24 s en fonction du niveau de liquide additionnel. Temps d'équilibration du système : 0 e 10 min.

Conditions : capillaire de silice (64 cm x 75 µm i.d.), électrolyte : TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4, voltage de 20 kV. Liquide additionnel : HNO₃ 1 mM.

Pour des hauteurs comprises entre 39 cm et 49 cm, le courant reste stable quelle que soit la hauteur lorsqu'on applique immédiatement le voltage. Par contre, après 10 min, le courant reste stable uniquement pour des hauteurs comprises entre 39 cm et 42 cm puis diminue progressivement, indiquant un refoulement dans le capillaire. On peut en conclure qu'une hauteur de liquide additionnel de 42 cm est la position la plus adaptée. Cette valeur correspond à une hauteur de liquide additionnel inférieure de 8 cm à la sortie du capillaire.

Influence sur la quantité injectée en CE-ICP/MS

Un second phénomène lié directement à l'effet d'aspiration exercé par le nébuliseur concerne la quantité d'échantillon injectée. Nous avons donc comparé les quantités injectées dans les deux systèmes CE-UV en absence de détecteur externe et CE-UV dans le cas du couplage CE-ICP/MS.

Pour cela, nous avons utilisé une solution de DMSO 0,1 % dans l'électrolyte. Un capillaire silice de 64 cm x 75 µm i.d. comportant une fenêtre de détection UV située à 10 cm de l'extrémité d'injection a été utilisé dans les deux systèmes. Des conditions d'injection et de séparation identiques ont été choisies : injection : 0,3 psi pendant 5 s ; séparation : 5 kV ; électrolyte : borate 30 mM à pH 9,2. La détection UV à 10 cm a été réalisée à 200 nm et la surface de pic obtenue pour le DMSO a été corrigée par son temps de migration. Dans le cas du couplage CE-ICP/MS, le liquide additionnel est constitué d'une solution d'erbium (Er³⁺) 3 nM dans HNO₃ 1 mM afin de contrôler la stabilité de la nébulisation.

La Figure 2.6 montre l'influence du niveau de liquide additionnel sur la quantité injectée ainsi que sur le temps de migration du DMSO dans le cas du couplage CE-ICP/MS pour différentes hauteurs H et en comparaison de ceux obtenus en CE-UV.

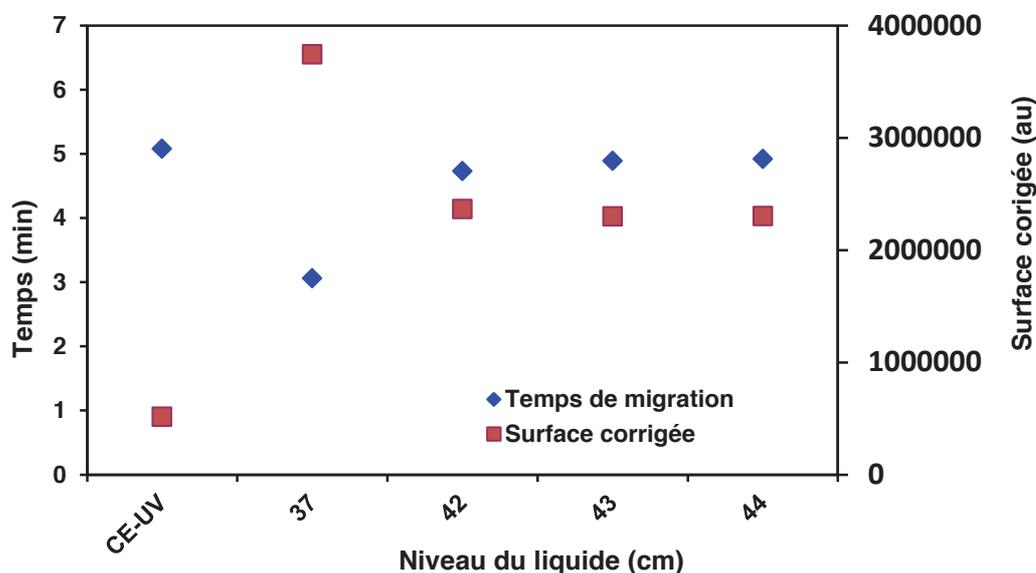


Figure 2.6 : Influence du niveau de liquide additionnel sur la quantité injectée et le temps de migration du DMSO en absence et en présence de couplage à l'ICP/MS.

CE-UV correspond aux résultats obtenus dans le système sans couplage. 37, 42, 43, 44 : correspondent aux résultats obtenus dans le système CE-ICP/MS pour différentes hauteurs H (cm).

Échantillon: DMSO 0,1 % dans l'électrolyte.

Injection 0,3 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice L_d / L_t 10 / 64 cm x 75 μ m i.d., borate 30 mM à pH 9,2, 5 kV à 25°C.

Détection : UV à 200 nm. Liquide additionnel : HNO_3 1 mM.

On remarque que la quantité d'injection et le temps de migration obtenus en couplage CE-ICP/MS varient avec la hauteur de liquide additionnel. En effet, pour une hauteur de liquide additionnel où l'aspiration a été démontrée ($H = 37$ cm), la surface corrigée (et donc le volume d'injection) est 7,3 fois plus importante et le temps de migration est 1,7 fois plus court que ceux obtenus en CE-UV. Pour des hauteurs de liquide comprises entre 42 cm et 44 cm, si le temps de migration est comparable à celui mesuré en CE-UV, la surface du DMSO est environ 4,5 fois plus importante.

Bien que ce phénomène de sur-injection de l'échantillon en CE-ICP/MS, observé même au niveau optimisé de liquide additionnel ($H = 42$ cm), ne soit pas encore expliqué, il démontre l'existence vraisemblable d'une aspiration au moment de l'injection. Une conséquence supplémentaire de ce phénomène est la nécessité de contrôler strictement le niveau du liquide additionnel au cours de l'analyse et entre les analyses, afin d'assurer une bonne répétabilité de la quantité injectée.

2.2.2.2. Position de l'extrémité du capillaire dans le nébuliseur

La position de l'extrémité du capillaire dans le nébuliseur est un paramètre crucial dans l'optimisation du couplage. Comme nous l'avons expliqué précédemment, un compromis entre aspiration (position du capillaire trop avancée dans le nébuliseur) et augmentation du volume mort (capillaire trop éloigné) doit être trouvé.

Dans ces expériences, la distance entre l'extrémité du capillaire et le tube central du nébuliseur « d » est décrite dans la Figure 2.7. La position 0 est définie comme celle juste à l'entrée du tube central étroit du nébuliseur. Plus le capillaire est éloigné de ce tube, plus la valeur de « d » augmente.

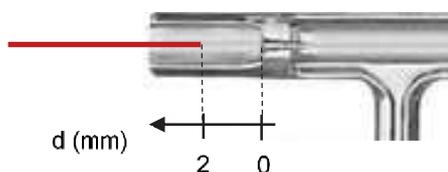


Figure 2.7 : Schéma montrant la position du capillaire de l'électrophorèse dans le nébuliseur.

Nous avons donc évalué l'influence de deux positions du capillaire ($d = 0$ et $d = 2$ mm) sur le temps de migration, la surface et la hauteur du pic de DMSO, et ce pour deux niveaux de liquide additionnel : $H = 42$ cm et $H = 44$ cm.

Pour cela, une solution de DMSO 1 % dans l'eau a été injectée à 0,5 psi pendant 4 s, puis la séparation a été réalisée à 20 kV et 25°C en utilisant un électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4. Le DMSO a été détecté en ICP/MS à $m/z = 34$ (acquisition 5 s/point) en activant la cellule de collision à l'hélium ($D_{\text{He}} = 8,5$ l/min) pour diminuer les interférences polyatomiques : $^{15}\text{N}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$.

Les caractéristiques de la séparation issues des électrophérogrammes obtenus pour ces différentes expériences sont récapitulées dans le Tableau 2.2.

Tableau 2.2 : Influence de la position du capillaire dans le nébuliseur sur l'analyse du DMSO 1 % dans l'eau.

Injection 0,5 psi – 4 s, Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 µm i.d., TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4, 20 kV à 25°C, Détection : ICP/MS m/z = 34 , (D_{He} = 8,5 ml/min). Liquide additionnel : HNO₃ 1 mM.

Niveau du liquide additionnel	H = 42 cm		H = 44 cm	
	d = 2 mm	d = 0 mm	d = 2 mm	d = 0 mm
t (min)	8,83	8,83	9,18	8,95
S (au)	88375	162197	124622	175278
h (CPS)	4381	12362	4455	9884
Largeur ($\omega_{1/2}$, min)	0,357	0,196	0,462	0,349

On remarque que pour le niveau de liquide optimisé (H = 42 cm), si aucun changement du temps de migration n'est observé en passant de d = 2 mm à d = 0 mm, la surface, la hauteur et la largeur de pic à mi-hauteur sont nettement améliorées de 1,8 fois ; 2,8 fois et 1,8 fois respectivement. Le temps de migration restant inchangé pour les deux positions du capillaire, l'aspiration semble donc identique au cours de la séparation. On constate cependant une augmentation de la surface en position 0, indiquant soit une augmentation de l'aspiration à l'injection, soit une diminution de la dilution dans l'interface (si elle a une influence). Le volume mort post-colonne est minimisé pour d = 0, ce qui conduit à une dispersion moindre. L'augmentation de la hauteur, et donc l'amélioration de la sensibilité, est une conséquence directe de ces deux phénomènes.

On observe la même tendance pour un niveau de liquide additionnel fixé à 44 cm. Cependant, les temps de migration sont plus longs et les largeurs de pic plus importantes que ceux obtenus dans le cas de H = 42 cm. Pour ce niveau, il y a refoulement du liquide additionnel dans le capillaire, ce qui retarde la migration du DMSO et augmente sa dispersion.

Nous avons donc choisi une position du capillaire dans le nébuliseur située à 0 mm du tube central.

2.2.3. Effet de dilution dans le couplage CE-ICP/MS

L'effet de dilution a été évalué par la mesure du rapport des surfaces du pic en ICP/MS et en UV. Il faut bien noter que ce dernier est influencé non seulement par le facteur de dilution théorique (rapport des débits entrant dans l'ICP/MS et sortant de la CE) mais aussi par l'efficacité de nébulisation du nébuliseur.

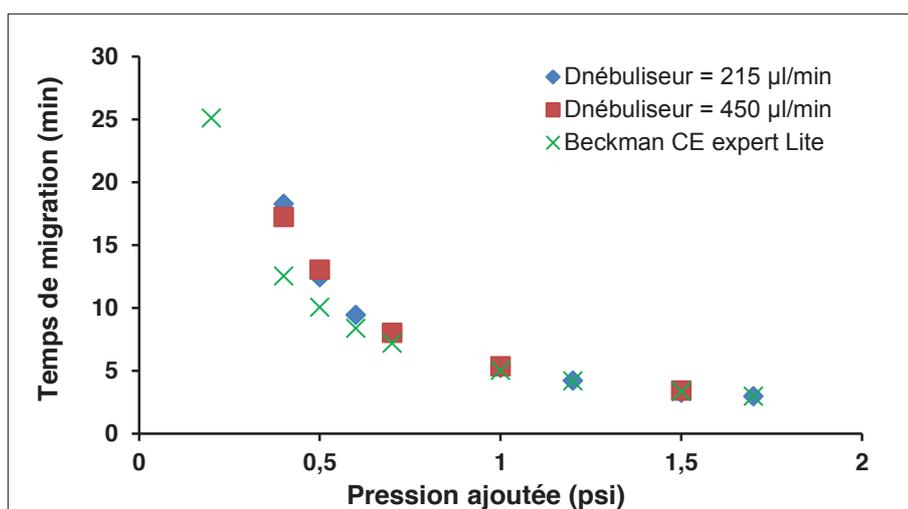
Pour changer ce rapport de débits, nous avons envisagé deux options:

- soit un changement du débit entrant dans l'ICP/MS par utilisation des nébuliseurs opérant à différents débits,
- soit un changement du débit sortant de la CE par variation du voltage ou de la pression de séparation.

Nous avons utilisé deux nébuliseurs Micromist présentant des débits d'auto-aspiration différents : 215 $\mu\text{l}/\text{min}$ et 450 $\mu\text{l}/\text{min}$. Dans les deux cas, le niveau de liquide additionnel a été fixé à 42 cm et l'introduction du liquide a été effectuée par auto-aspiration. Le DMSO (1% dans l'eau) a été choisi comme molécule standard et un capillaire neutre (silice recouvert d'HPC) de 64 cm x 75 μm i.d. a été utilisé afin d'éviter tout phénomène d'adsorption. Pour ces deux nébuliseurs, la séparation a été réalisée dans un électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 sous un voltage de - 30 kV en appliquant une pression supplémentaire variant de 0,4 à 1,7 psi. Le DMSO a été détecté à $m/z = 34$ (5 s/point) en activant la cellule de collision à l'hélium ($D = 8,5$ l/min). Pour chaque pression appliquée, le débit issu de la CE a été calculé à partir du temps de migration du DMSO. La surface en UV a été corrigée par le temps de migration du pic et a été utilisée afin de contrôler la constance des quantités injectées.

La Figure 2.8 représente le temps de migration du DMSO à différentes pressions appliquées dans le système (a) et le rapport de surfaces entre les deux détections en fonction du temps de migration (b).

a



b

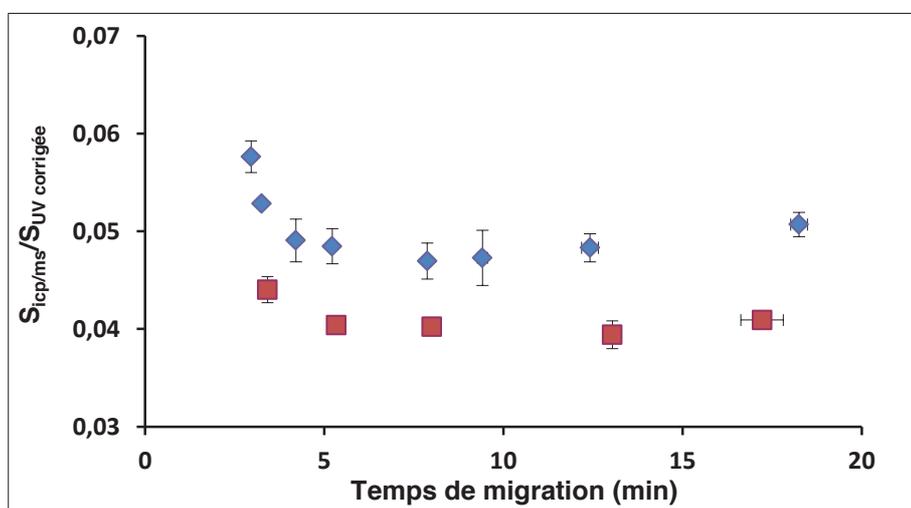


Figure 2.8 : Temps de migration du DMSO à différentes pressions appliquées (a), rapport de surfaces entre deux détections en fonction du temps de migration (b).

Échantillon: DMSO 1 % dans l'eau.

Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation dans un mélange d'électrolyte Tris 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, sous le voltage de - 30 kV + (x) psi à 25°C, capillaire neutre recouvert par HPC 64 cm x 75 µm i.d.

Détection : ICP/MS m/z = 34 (5 s/p), mode collision par He (D_{He} = 8,5 ml/min). Liquide additionnel : TRIS 5 mM, pH 7,4.

On remarque que, quel que soit le nébuliseur utilisé, aucun changement du temps de migration n'est observé (Figure 2.8 a). Pour un nébuliseur donné, le temps de migration du DMSO est modifié par application d'une pression à l'entrée de capillaire, qui conduit à un changement du débit de l'électrolyte. Ce dernier varie uniquement avec la pression appliquée à l'entrée du capillaire et est très proche de la valeur estimée par le logiciel CE Expert Lite de Beckman Coulter. Ceci confirme bien l'avantage de l'introduction du liquide additionnel par auto-aspiration qui permet d'adapter le débit du liquide à l'effet de suction exercé par le nébuliseur.

La comparaison des rapports de surface obtenus avec les deux nébuliseurs illustre bien

l'amélioration de l'efficacité de nébulisation à plus faible débit. Toutefois, l'amélioration obtenue avec le nébuliseur opérant à 215 $\mu\text{l}/\text{min}$ (x 1,2 environ) est inférieure à celle prédite par la théorie (x 1,8). L'augmentation de la pression au cours de la séparation ne conduit à aucun changement du rapport des surfaces (Figure 2.8 b), à l'exception des résultats obtenus pour les temps de migration courts (inférieurs de 3 min) où on observe une légère augmentation du rapport de surfaces, mais dont la significativité n'est pas démontrée. Ceci montre que la sensibilité de détection dans l'ICP/MS semble indépendante du facteur de dilution. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par A. Varenne et coll.¹⁶⁰ en CE-ESI/MS, qui ont également conclu à une influence plus faible de la dilution sur la sensibilité de détection que celle attendue par le seul examen du rapport des débits. Nous avons donc choisi de travailler avec le nébuliseur à 450 $\mu\text{l}/\text{min}$ en raison de la stabilité des rapports de surface sur une large gamme de facteurs de dilution.

2.3. Conclusion

Nous avons mis en place un couplage CE-ICP/MS à interface avec liquide additionnel, totalement automatisé. Suite à l'optimisation des paramètres du couplage de CE-ICP/MS, nous avons donc choisi de travailler dans les conditions suivantes :

- Position du système de CE de + 7,5 cm par rapport de la celle de l'ICP/MS.
- Liquide additionnel choisi : HNO_3 1 mM contenant de l'erbium (Er^{3+}) 3 nM comme marqueur de stabilité de la nébulisation pour le capillaire de silice, et TRIS 5 mM à pH 7,4 pour le capillaire neutre.
- Hauteur du réservoir de liquide additionnel : 42 cm.
- Pompe péristaltique réglée au même débit que celui d'introduction du liquide additionnel pour maintenir le niveau du liquide dans le réservoir.
- Position du capillaire : $d = 0$ mm.

Ces conditions permettent de limiter les phénomènes d'aspiration et de refoulement dus aux différences de débits entre la CE et l'ICP/MS. Toutefois, nous avons observé que si les temps de migration ne semblent pas affectés par ce couplage, les quantités injectées sont, elles, environ 4,5 fois plus importantes.

Chapitre 3. Optimisation des conditions d'analyse en CE-ICP/MS des complexes protéine-uranium

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, l'identification des complexes protéine – uranium reste un défi analytique important malgré le nombre de méthodes envisagées et développées afin de résoudre ce problème. En effet, ces complexes sont de nature non-covalente et subissent une dissociation durant toute analyse impliquant une technique séparative. Il est donc nécessaire de trouver des conditions d'analyse douces afin de conserver les complexes pendant la séparation. Dans le but d'étudier les potentialités du couplage CE-ICP/MS dans l'analyse des complexes protéine-uranium, nous avons envisagé les différents phénomènes à partir de l'injection jusqu'à la détection qui peuvent altérer la distribution du métal parmi les protéines. Deux phénomènes majeurs ont été recensés :

- les effets de dissociation des complexes causés par (i) l'interaction avec les silanols de surface des capillaires, entraînant une adsorption de l'uranium et des protéines, (ii) la dilution des complexes, et (iii) la dissociation de ces mêmes complexes due aux conditions de déséquilibre induites par le processus de séparation.
- les écarts de milieu (composition, pH, force ionique) entre l'échantillon et l'électrolyte sélectionné pour la séparation qui vont affecter directement la répartition du métal entre les protéines.

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'influence de l'électrolyte (pH et force ionique), du type de greffage de la surface du capillaire et de l'application d'un voltage et/ou une pression sur l'adsorption de l'uranium et la dissociation des complexes pendant la séparation. Des conditions d'analyse optimales seront choisies et la reproductibilité du système sera évaluée.

3.1. Phénomènes de sorption dans les capillaires de silice

3.1.1. Phénomène d'adsorption de l'uranium sur la paroi du capillaire de silice

En milieu aqueux, l'uranium est majoritairement présent sous forme d'ion uranyl (UO_2^{2+}). Des études ont montré que sa spéciation est affectée par le pH ainsi qu'en témoigne la Figure 3.1 présentant les espèces solubles de l'uranium ($1 \mu\text{M}$) par modélisation à l'aide du logiciel JChess (Ecole de Mines).

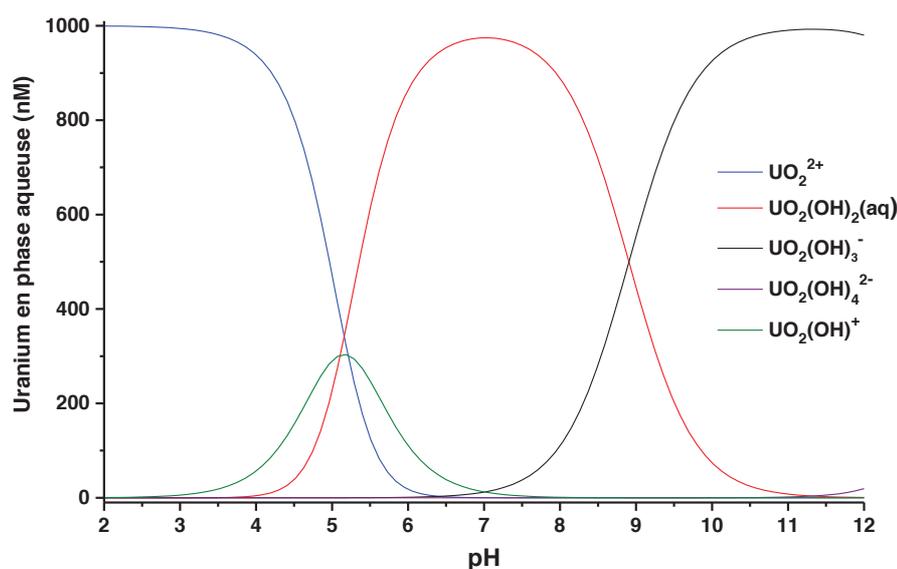


Figure 3.1 : Répartition des espèces solubles de l'uranium $1 \mu\text{M}$ en fonction du pH dans un milieu libre en CO_2 (calculée grâce au logiciel JChess).

Dans une large gamme de pH allant de 1 à 8, celui-ci est majoritairement sous forme cationique ou neutre. Les silanols de la paroi du capillaire de silice sont quant à eux chargés négativement. Cette ionisation a lieu à partir de pH 2 et augmente progressivement jusqu'à pH 8 - 9, où les silanols sont entièrement ionisés ($\text{pK}_{\text{a silanol}} \approx 4-6$).¹⁶¹ Plusieurs études ont démontré l'adsorption de l'uranium sur la surface de la silice. Selon Zhao *et al.*,¹⁶² l'adsorption est réalisée via la formation de complexes de surface SiO_2UO_2 ($\log K = -4,8 \pm 0,2$). A partir de pH 5, il y aurait apparition de la forme $\text{SiO}_2\text{UO}_2(\text{OH})^-$ ($\log K = -10,2 \pm 0,3$). Sylwester *et al.*¹⁶³ ont quant à eux montré que cette adsorption semble avoir lieu via la formation d'un complexe de sphère interne bidente. Une possible formation de complexes de surface polynucléaires est proposée pour des pH proches de la neutralité.

Une adsorption de l'uranium sur la paroi du capillaire de silice est donc attendue. Celle-ci est fortement préjudiciable au maintien des complexes lors de la séparation. Par conséquent, nous avons étudié l'influence des différents types d'électrolytes de séparation, et des capillaires sur ce phénomène d'adsorption.

Afin d'évaluer l'influence de l'électrolyte sur la sorption de l'uranium dans le couplage CE-ICP/MS, différents électrolytes ont été testés : acide nitrique 5 %, acétate de sodium 100 mM à pH 5, borate de sodium 50 mM à pH 7,5, HEPES 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4, TRIS 50 mM, NaCl 5mM à pH 7,4, bicarbonate de sodium 1 mM à pH 7,2 et carbonate de sodium 1 mM à pH 10,6.

3.1.1.1. Effet de matrice observé en ICP/MS

Dans un premier temps, l'effet de matrice sur la détection de l'uranium par ICP/MS a été étudié par analyse directe d'une solution d'uranium 50 nM dans ces différents milieux. Pour chacune de ces solutions, l'uranium a été quantifié à l'aide d'un étalonnage réalisé en HNO₃ 5 %. Les résultats, présentés dans la Figure 3.2, récapitulent les concentrations apparentes mesurées dans les différents milieux. Ceux-ci indiquent que la sensibilité de détection est beaucoup plus faible dans les électrolytes que dans l'acide. Cette différence s'explique notamment de par l'utilisation de matrices chargées en sels qui provoquent la suppression de l'ionisation de l'uranium au profit d'ions majeurs s'ionisant plus facilement (Na⁺ par exemple).

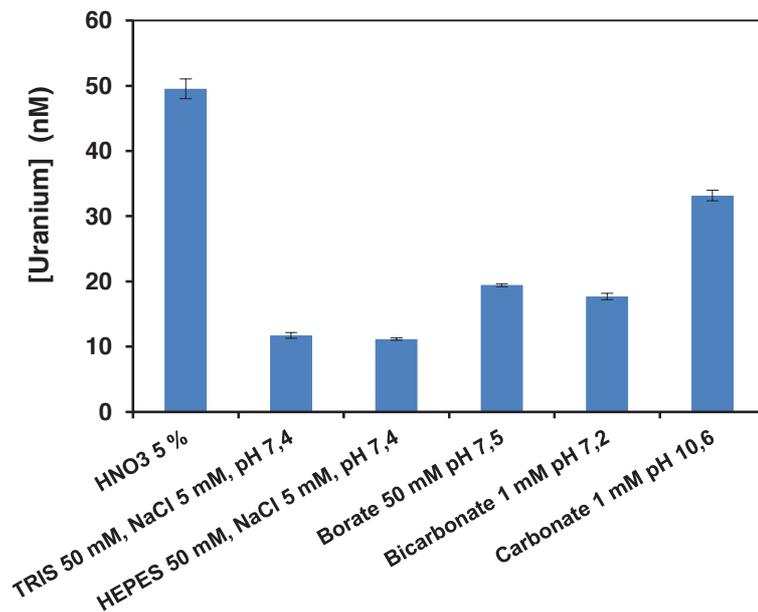


Figure 3.2 : Comparaison des effets de matrice dus à l'utilisation de différents électrolytes par analyse directe en ICP/MS.

3.1.1.2. Etude dans un capillaire de silice

Chaque solution d'uranium 50 nM, obtenue par dilution dans l'électrolyte d'une solution mère d'uranium 50 μ M dans HNO₃ 0,05 %, a été injectée de façon continue dans le capillaire de silice (84 cm x 75 μ m i.d.) sous une pression de 5 psi. Pour toutes ces expériences, l'acide nitrique 5 % a été ajouté au niveau de l'interface en tant que liquide additionnel afin de s'affranchir des effets de matrice observés précédemment lors de la détection en ICP/MS.

La Figure 3.3 présente les courbes de percée obtenues dans les différentes conditions et montre une influence importante des électrolytes sur la sorption de l'uranium.

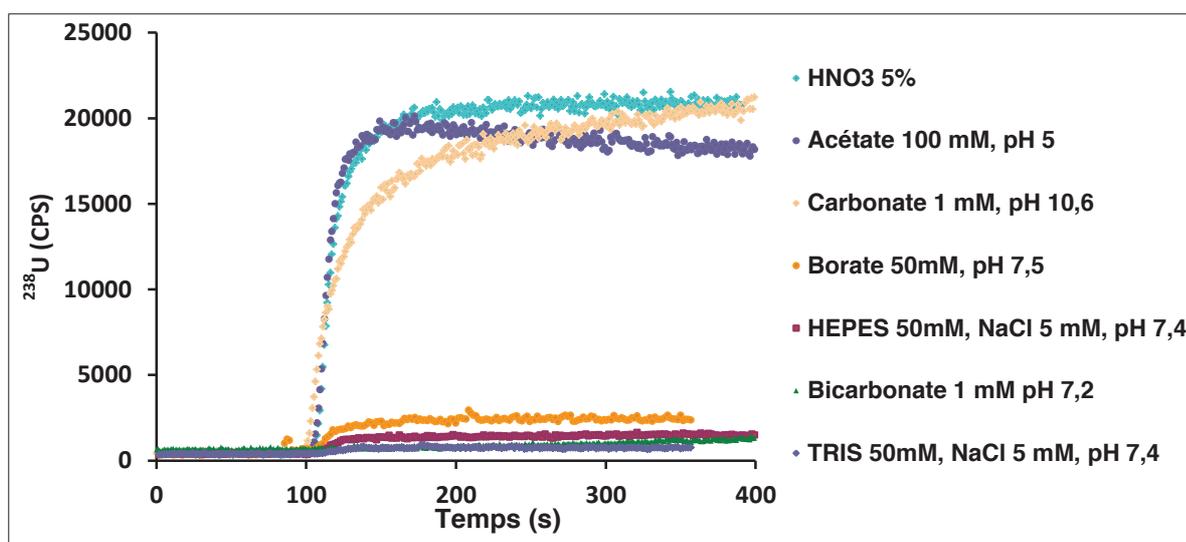


Figure 3.3 : Influence des électrolytes sur le signal de l'uranium en couplage CE-ICP/MS.

On constate deux types de comportement très différents :

- une absence de sorption ou une sorption modérée : C'est le cas en milieu acide nitrique où les silanols du capillaire sont protonés (acide nitrique 5 %). L'uranium, présent sous forme cationique, n'est donc pas ou peu adsorbé sur la paroi du capillaire. Un comportement similaire est observé en milieu d'acétate de sodium 100 mM à pH 5. Ceci peut s'expliquer par la formation d'un complexe prédominant chargé négativement : $[\text{UO}_2(\text{OAc})_3]^-$ ($\log = 6,95$),¹⁶⁴ dû à l'utilisation d'une concentration très importante (100 mM) d'acétate de sodium, qui empêche l'adsorption de l'uranyle sur la paroi du capillaire. Cette forte diminution de l'adsorption de l'uranium sur la surface de silice en présence d'acétate a d'ailleurs déjà été montrée par Zhao *et al.*¹⁶² Dans le cas du carbonate 1 mM à pH 10,6, on observe une augmentation progressive du signal de l'uranium jusqu'au niveau de celui obtenu en acide nitrique. Ceci semble indiquer une sorption de l'uranium dans cet électrolyte. Toutefois, celle-ci reste limitée vraisemblablement en raison de la formation du complexe $\text{UO}_2(\text{CO}_2)_3^{4-}$.

- une sorption importante : A l'exception des 3 électrolytes précédents, toutes les courbes de percée présentent un léger retard et une intensité du signal de l'uranium au plateau très faible, ce qui semble indiquer un phénomène d'adsorption très significatif de l'uranium sur la paroi des capillaires de silice avec absence de saturation de sites. Ceci pourrait indiquer la formation d'un précipité d'uranium en surface de capillaire. De plus, il faut noter que ce phénomène a lieu pour tous les électrolytes à pH 7-7,5. Cette hypothèse est confortée par les études réalisées en EXAFS par Sylwester *et al.*¹⁶³ et en XPS par A. Froideval *et al.*¹⁶⁵ sur l'adsorption de l'uranium sur la surface de la silice. Ces études suggèrent la formation d'oligomères polynucléaires ou de précipités de type schoepite à la surface à des pH proches de la neutralité.

En conclusion, l'adsorption de l'uranium dans les capillaires de silice est inévitable. Cela nécessite donc de trouver des conditions pour minimiser le plus possible ce phénomène. Nous avons envisagé deux solutions : (i) modifier la surface du capillaire afin de diminuer le taux de silanols et (ii) moduler la nature de l'électrolyte de séparation (force ionique et pH) afin d'induire des compétitions, tout en conservant les complexes protéine-uranium pendant la séparation.

3.1.2. Phénomène d'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire de silice

Le phénomène d'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire de silice de la CE est décrit dans plusieurs études. Nous avons donc testé l'adsorption des trois protéines cibles potentielles de l'uranium : d'abord FET et TF, puis OPN dans le capillaire.

Dans un premier temps, des mélanges de FET et TF 0,05 – 1 mg/ml dans TRIS 5 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 ont été injectés à 0,3 psi pendant 2 s dans un capillaire de silice L_t/L_d 20/30 cm x 75 μ m i.d. Le marqueur neutre DMSO 0,1 % dans l'électrolyte a été injecté à 0,3 psi pendant 2 s. La séparation a été réalisée dans l'électrolyte TRIS 5 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 à 10 kV, à 25°C et la détection UV à 200 nm. Un rinçage inter-analyse par l'électrolyte de séparation a été réalisé à 20 psi pendant 2 min. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 3.4 et les courbes de corrélation entre les concentrations des protéines et la surface de pics sont présentées dans la Figure 3.5.

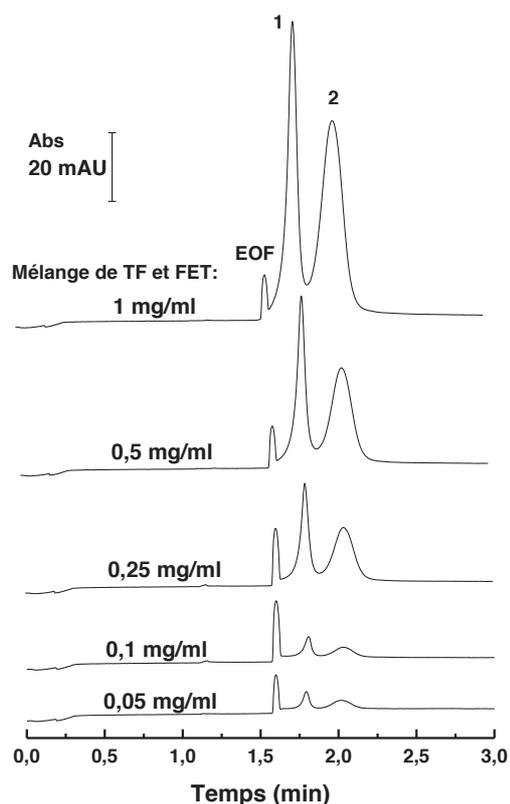


Figure 3.4 : Electrophérogammes des analyses des mélanges de TF et FET dans un capillaire de silice. 1- TF, 2- FET.

Echantillons : mélange TF, FET de 0,05 – 1 mg/ml pour chaque protéine dans un mélange TRIS 5 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4.
 Injection : 0,3 psi – 2 s du marqueur neutre DMSO 0,1 % puis de l'échantillon.
 Séparation : capillaire de silice L₁/l₂ 20/30 cm x 75 µm i.d., électrolyte de séparation de TRIS 5 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, 10 kV à 25°C.
 Détection UV à 200 nm.

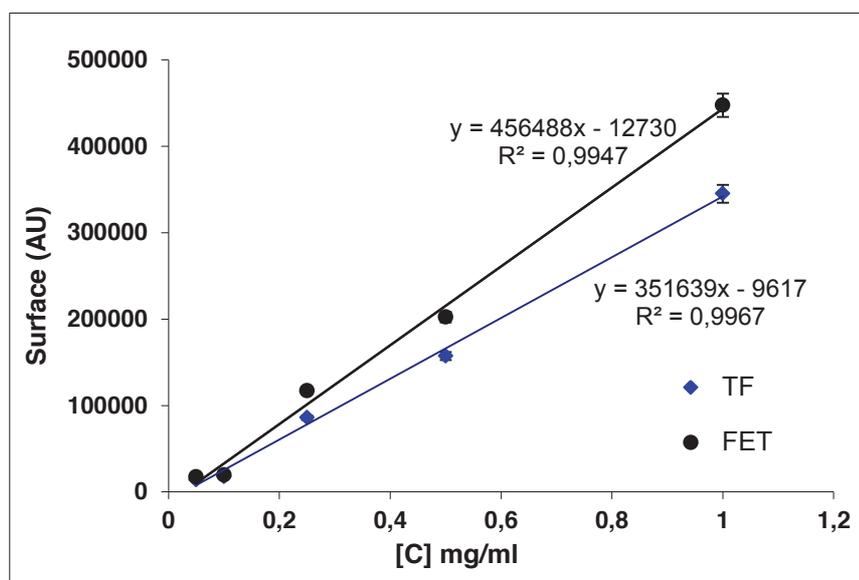


Figure 3.5 : Linéarité de la réponse en surface de pic pour FET et TF.

On note de bonnes corrélations entre les concentrations des protéines et la surface des pics correspondants ($R^2 = 0,995$ pour FET et $R^2 = 0,997$ pour TF). Ceci démontre que l'adsorption de ces deux protéines sur le capillaire est négligeable dans ces conditions d'analyse.

Pour OPN, nous n'avons pas réalisé d'études détaillées du phénomène d'adsorption. En fait, cette protéine est difficilement détectée en UV à cause de son faible coefficient d'extinction massique ($0,21 \text{ l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 280 nm) et de sa migration tardive dans les conditions d'analyse en capillaire de silice, due à sa charge négative importante. Cependant, elle migre plus rapidement dans les capillaires neutres sous voltage négatif. Nous avons donc réalisé l'analyse d'un mélange de trois protéines TF 30 μM , FET 10 μM , OPN 10 μM dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4 avec un capillaire neutre (plus de détails dans la partie 3.1.3.5 « capillaire neutre N-cap »). La Figure 3.6 présente les électrophérogrammes : analyse 1 dans le capillaire neutre N-cap et analyse 2 dans le même capillaire ayant perdu 20 % de son greffage.

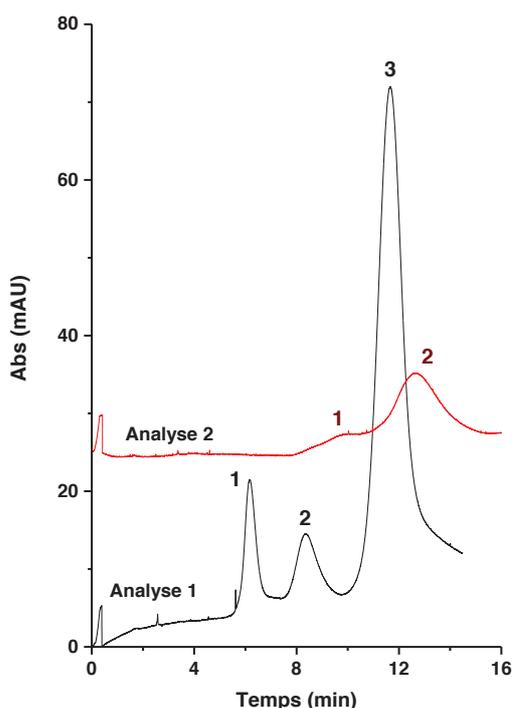


Figure 3.6 : Electrophérogrammes des analyses d'un mélange d'OPN, TF et FET.
Analyse 1 : dans un capillaire neutre, Analyse 2 : dans le même capillaire, avec une perte du greffage de 20 %. 1- OPN, 2- FET, 3- TF.

Échantillon TF 30 μM , FET 10 μM , OPN 10 μM dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4.

Injection de l'échantillon : 0,5 psi- 10 s.

Séparation : capillaire N-cap Lt/Ld 54/64 cm x 50 μm i.d., électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4, - 28 kV + 0,4 psi, à 25°C.

Détection : UV à 214 nm.

Il faut noter dans l'analyse 2, l'absence de pic attribué à TF (pic 3) car le temps de migration de celle-ci est supérieur à 16 min. Une comparaison qualitative des deux

électrophérogrammes montre que l'apparition de silanols à la surface du capillaire semble conduire à une diminution très importante de la hauteur et de la surface corrigée du pic attribué à OPN. En comparaison, celles du pic attribué à FET sont moindres. Ceci pourrait indiquer que la présence des silanols (20 % à cause de la perte du greffage) induit une adsorption de l'OPN mais pas de la FET à la surface du capillaire. Cependant, il est nécessaire de réaliser plus d'expériences avant de confirmer cette hypothèse, qui devra néanmoins être prise en compte par la suite.

3.1.3. Modification de la surface du capillaire pour minimiser l'adsorption de l'uranium libre

Afin de diminuer le taux de silanols à la surface du capillaire, nous avons testé différentes modifications de la surface des capillaires, neutres ou positives, par recouvrement dynamique, immobilisation ou greffage.

5 types de capillaires greffés ont été testés :

- des capillaires présentant une charge de surface positive : capillaire recouvert de CTAB, capillaire multi-couches polybrène/ dextran sulfate/ polybrène afin de favoriser la répulsion électrostatique entre l'uranyle et la surface du capillaire.
- des capillaires neutres : capillaire neutre Ncap commercialisé par la société Beckman Coulter, capillaire recouvert d'HPC immobilisée thermiquement, afin d'éliminer les silanols de surface.
- un capillaire dont la surface a été greffée de façon covalente par la cystéine possédant une charge de surface globalement neutre (zwitterion), fourni par le laboratoire des Techniques Séparatives de l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon.

Les capillaires ont été évalués selon les critères suivants : (i) l'adsorption de l'uranium, (ii) l'adsorption des protéines sur le capillaire et (iii) la stabilité du greffage ou du revêtement après les analyses de protéines et après le rinçage par l'acide nitrique 1 mM utilisé pour la désorption de l'uranium. Il faut aussi noter qu'à pH 7,4, toutes les protéines étudiées sont chargées négativement et l'uranium est chargé positivement. Il nous faut donc de trouver un compromis entre les deux premiers critères.

Les capillaires utilisés sont de diamètre de 75 μm , à l'exception du capillaire Ncap (50 μm i.d) et du capillaire multi-couches polybrène/dextran sulfate/polybrène (50 ou 75 μm i.d). Les longueurs des capillaires sont L_t/L_d : 50/ 60 cm en CE-UV (à l'exception des capillaires Ncap et HPC de 54/64 cm) et 64 cm en CE-ICP/MS quel que soit le type de revêtement. L'efficacité des greffages ou revêtements de surface des capillaires, leur stabilité ainsi que

l'adsorption des protéines (en absence du métal) ont d'abord été testées en CE-UV via la mesure de la mobilité électroosmotique.

L'adsorption de l'uranium a été évaluée en couplage CE-ICP/MS. Une solution d'uranium 1 μM obtenue par dilution dans l'eau d'une solution standard d'uranium à 1000 mg/l dans HNO_3 4 % a été injectée à 0,5 psi pendant 6 s puis l'élution de l'uranium a été réalisée dans des conditions dépendantes du type de capillaire.

3.1.3.1. Méthode de détermination de l'EOF

La mobilité électroosmotique a été mesurée en utilisant la méthode de Williams et Vigh décrite dans la Figure 3.7.¹⁶⁶ Pour les capillaires de 75 μm i.d., l'injection a été réalisée à une pression de 1 psi pendant 12 s, la séparation hydrodynamique à 1 psi pendant 60 s et la séparation électrophorétique pendant 180 s sous un voltage de + 7 kV pour les capillaires dont la surface était présumée chargée positivement et de - 25 kV pour les capillaires neutres. Quant au capillaire de 50 μm i.d., des conditions identiques ont été utilisées mise à part la pression appliquée (de 2 psi au lieu de 1 psi). Une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 a été utilisée comme électrolyte de séparation dans toutes les expériences, sauf dans le cas du capillaire de Ncap où un électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4 a été utilisé. Le DMSO 0,1 % dans l'électrolyte de séparation a été utilisé comme marqueur neutre. La détection a été réalisée en UV à 200 nm.

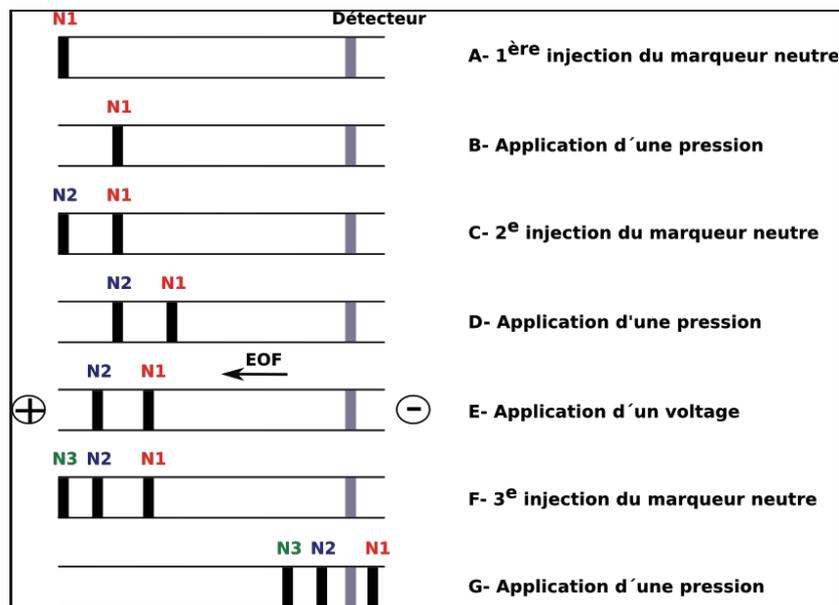


Figure 3.7 : Méthode de détermination de l'EOF selon Williams et Vigh.¹⁶⁶
 (Schéma représentant le cas particulier de la détermination de l'EOF dans un capillaire dont la surface est chargée positivement.)

La mobilité électroosmotique (μ_{eo}) est déterminée par :

$$\mu_{eo} = \frac{L_{eo}L_t}{V_{prog} (t_{migr} - t_{ramp-up}/2 - t_{ramp-down}/2)} \quad (3.1)$$

où :

- L_t : Longueur total du capillaire.
- V_{prog} , t_{migr} : voltage et temps appliqués pendant la séparation électrophorétique
- $t_{ramp-up}$, $t_{ramp-down}$: temps nécessaires pour que le voltage atteint soit celui programmé et pour le voltage revienne à zéro respectivement.
- L_{eo} : distance où le marqueur neutre migre grâce au flux électroosmotique. Elle est calculée par :

$$L_{eo} = [(t_{N3}-t_{N2})-(t_{N2}-t_{N1})] \frac{L_d}{t_{N3} + \frac{t_{inj}}{2} - t_r} \quad (3.2)$$

où t_{N1} , t_{N2} , t_{N3} : temps de migration du marqueur neutre de la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} injection respectivement.

L_d : longueur du capillaire jusqu'à la détection.

t_{inj} : temps d'injection du marqueur neutre.

t_r : temps de latence entre la fin d'une injection et le début de l'acquisition du signal.

3.1.3.2. Greffage dynamique par le CTAB

Le CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) est un tensioactif très utilisé pour le recouvrement positif dynamique des capillaires de silice. Il peut être adsorbé à la surface sous forme monomérique, d'hemi-micelle, voire même de micelle en fonction de sa concentration, du pH et de la force ionique de l'électrolyte.^{167,168,167,168}

Un capillaire de silice a été préconditionné par des rinçages successifs de 5 min à l'eau, NaOH 0,5 M, puis de nouveau à l'eau sous une pression de 20 psi. Un greffage dynamique a ensuite été réalisé par percolation d'une solution de CTAB de concentration variable dans un mélange TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 en appliquant une pression de 10 psi pendant 1,5 h. La mobilité électroosmotique obtenue en fonction de la concentration du surfactant CTAB dans chaque condition est présentée dans la Figure 3.8.

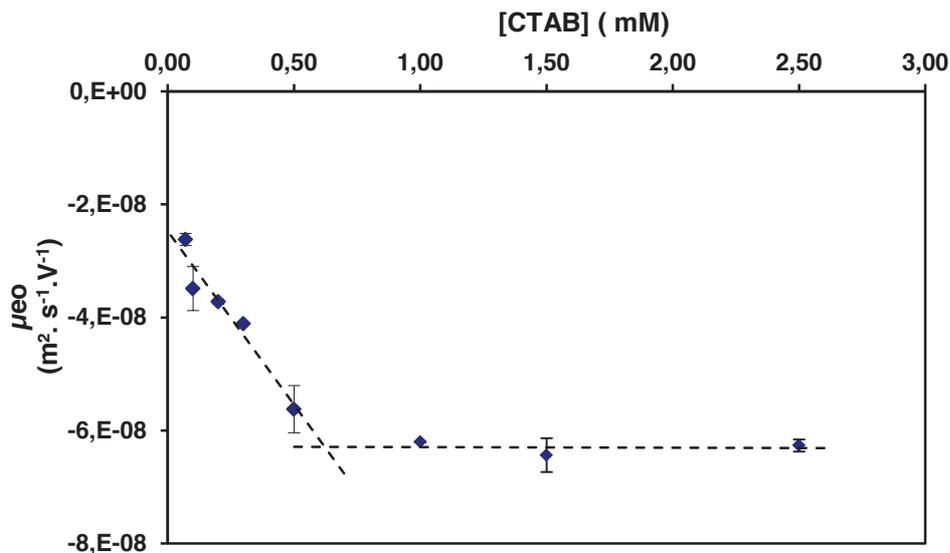


Figure 3.8 : Mobilité électroosmotique en fonction de la concentration de CTAB

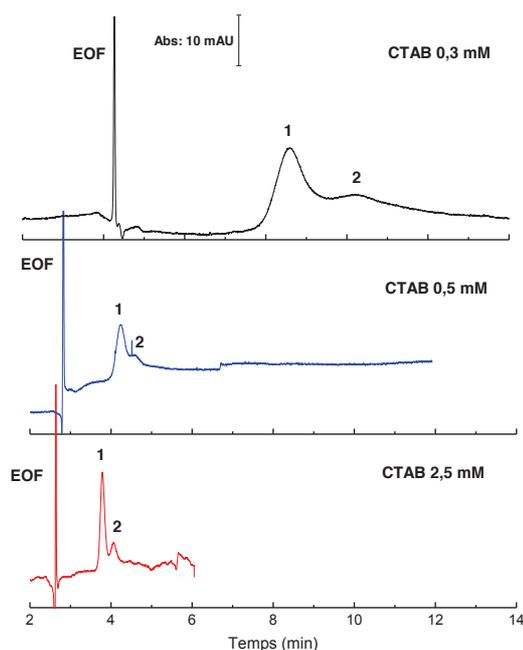
Electrolyte : CTAB 0,07 mM – 2,5 mM dans un mélange TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4.

On remarque que quelle que soit la concentration de CTAB dans l'électrolyte, la surface du capillaire est chargée positivement, ce qui se traduit par une mobilité électroosmotique négative. Celle-ci augmente, en valeur absolue, pour atteindre un plateau à $-(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à partir de 0,7 mM de CTAB dans l'électrolyte. Ceci semble être en accord avec la formation de micelles à la surface du capillaire, comme cela a été observé par AFM par C.A. Lucy et coll.¹⁶⁸ Bien que la CMC dépende de l'électrolyte utilisé, cette valeur est proche de celles reportées dans la bibliographie. A titre indicatif, ces valeurs sont récapitulées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Concentrations micellaires critiques (CMC) du CTAB dans différents milieux.

Electrolyte	CMC (mM)
Eau	0,93
10 mM H ₃ BO ₃ , 10 mM Na ₂ BO ₃ , pH 9.0	0,75
20 mM créatinine, 4 mM acide nicotinique ,pH 5,5	0,6 ¹⁶⁹
Phosphate 10 mM, pH 7,0	0,2 ^{167,168}
TRIS 16 mM, HCl 16 mM, pH 7,0	0,4 ¹⁷⁰

Afin de tester ce capillaire dans l'analyse des protéines, nous avons préparé une solution de FET 10 μM (utilisée sans traitement préalable) dans un électrolyte de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. L'injection a été réalisée à 0,3 psi pendant 5 s dans le capillaire de 50/60 cm x 75 μm i.d. et la séparation à -30 kV à 25°C. Trois électrolytes de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 contenant différentes concentrations de CTAB, 0,3 mM, 0,5 mM et 2,5 mM, ont été utilisés. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 3.9.



**Figure 3.9 : Séparations par CE d'un échantillon de fétuine dans un capillaire modifié par greffage dynamique au CTAB.
1- FET, 2- impureté.**

Échantillon: FET 10 μM dans un mélange de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4.

Injection de marqueur neutre DMSO 0,1% 0,3 psi – 3 s, puis de l'échantillon : 0,3 psi – 5 s, Séparation : Capillaire de silice Lt/Ld 50/60 cm x 75 μm i.d Electrolyte : CTAB 0,3 mM / 0,5 mM / 2,5 mM dans le mélange de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 KV, à 25°C.

Détection : UV à 200 nm.

Les mobilités électroosmotiques et électrophorétiques calculées dans chaque condition d'analyse sont présentées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Mobilités électroosmotiques et électrophorétiques calculées lors des analyses de FET 10 μM en présence de CTAB dans l'électrolyte.

[CTAB] (mM)	μ_{eo} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	μ_{ep} FET ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	μ_{ep} impureté ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
0,3	$-(3,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	$(1,92 \pm 0,02) \cdot 10^{-8}$	$(2,21 \pm 0,01) \cdot 10^{-8}$
0,5	$-(5,86 \pm 0,07) \cdot 10^{-8}$	$(1,97 \pm 0,01) \cdot 10^{-8}$	$(2,27 \pm 0,01) \cdot 10^{-8}$
2,5	$-(6,25 \pm 0,08) \cdot 10^{-8}$	$(1,98 \pm 0,02) \cdot 10^{-8}$	$(2,24 \pm 0,03) \cdot 10^{-8}$

On constate, sur la Figure 3.9, que les électrophérogrammes présentent tous deux pics correspondant à la protéine (1) et à une impureté (2), ce qui a été confirmé par la suite par une purification de la protéine par SEC (voir le chromatogramme de la purification de FET en annexe 1). Pour ces deux composés, quelles que soient les conditions, les mobilités électrophorétiques calculées sont positives et indépendantes de la concentration en CTAB : $(1,92 \pm 0,02) \cdot 10^{-8}$ à $(1,98 \pm 0,02) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour la FET et $(2,21 \pm 0,01) \cdot 10^{-8}$ à $(2,24 \pm 0,03) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour son impureté. Ceci signifie qu'il y a vraisemblablement interaction

par formation de paires d'ions entre la protéine, chargée négativement à pH 7,4, et le CTAB, chargé positivement. L'introduction de ce type d'interaction dans le procédé de séparation semble *a priori* préjudiciable au maintien des interactions protéine/uranium. De plus, aucun signal correspondant à l'uranium n'est détecté pendant la mise sous voltage dans les conditions de séparation des protéines, ni après rinçage des capillaires par l'électrolyte. Seul un rinçage par HNO₃ 1 mM conduit à l'élution de l'uranium.

3.1.3.3. Greffage multi-couches : polybrène/ dextran sulfate/ polybrène (PB/DS/PB).

Afin d'éviter la présence de surfactant dans l'électrolyte, qui peut interagir avec le complexe protéine-uranium pendant la séparation, nous avons testé un capillaire positif multi-couches PB/DS/PB.

Le protocole de greffage présenté dans le Tableau 3.3 est adapté de celui décrit par Haselberg *et al.*¹⁷¹ Il faut noter le temps total de 160 min nécessaire à ce greffage.

Tableau 3.3 : Protocole de greffage par PB/DS/PB, adapté de [171].

N°	Solution	Pression	Temps
1	NaOH 0.5 M	10 psi	15 min
2	Eau	10 psi	5 min
3	Solution de PB 10% (w/v)	5 psi (50 µm i.d.) ou 4 psi (75 µm i.d.)	30 min
4	Eau	10 psi	10 min
5	Solution de DS 0.5% (w/v)	5 psi (50 µm i.d.) ou 4 psi (75 µm i.d.)	45 min
6	Eau	10 psi	10 min
7	Solution de PB 10% (w/v)	5 psi (50 µm i.d.) ou 4 psi (75 µm i.d.)	30 min
8	Eau	10 psi	10 min
9	BGE	10 psi	5 min

Une mobilité électroosmotique de $-(3,30 \pm 0,05) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le capillaire de 50 µm i.d. et $-(4,20 \pm 0,01) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le capillaire de 75 µm i.d. a été mesurée. Ce greffage a démontré sa stabilité en ne montrant pas de modification de cette mobilité après 4 jours de conservation du capillaire dans l'eau.

La séparation d'un mélange de 3 protéines (TF 30 µM, FET 8 µM, OPN 8 µM) a été réalisée sur ce type de capillaire (L_t/L_d 50 /60 cm x 50 µm i.d.) dans l'électrolyte de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 en CE-UV. L'injection a été réalisée à 0,3 psi pendant 6 s pour le marqueur neutre DMSO 0,1 %, puis à 1 psi pendant 6 s pour l'échantillon, la séparation sous un voltage de - 30 kV et la détection à 214 nm. Aucune protéine n'a été observée après 20 min de séparation. Après 5 analyses du mélange de protéines, une inversion de l'EOF a été

observée, la mobilité électroosmotique mesurée étant alors de $9,8 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ceci peut s'expliquer soit par une disparition progressive de la couche de polybrène, soit par une adsorption des protéines chargées négativement sur la surface positive du capillaire.

Un nouveau greffage du capillaire a été réalisé et utilisé pour l'analyse de la TF 30 μM , qui possède la charge globale la moins négative des trois protéines testées. L'électrophérogramme obtenu, présenté dans la figure 3.10, montre une bosse correspondant à la TF, qui migre après l'EOF. Ceci confirme l'adsorption des protéines sur ce capillaire positif, ce phénomène étant d'autant plus remarquable pour FET et OPN que pour TF. De plus, seul un rinçage par HNO_3 1 mM conduit à l'élution de l'uranium. Suite à ce rinçage, la mobilité électroosmotique est inversée et prend la valeur de $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui montre que le greffage est détruit après rinçage par l'acide.

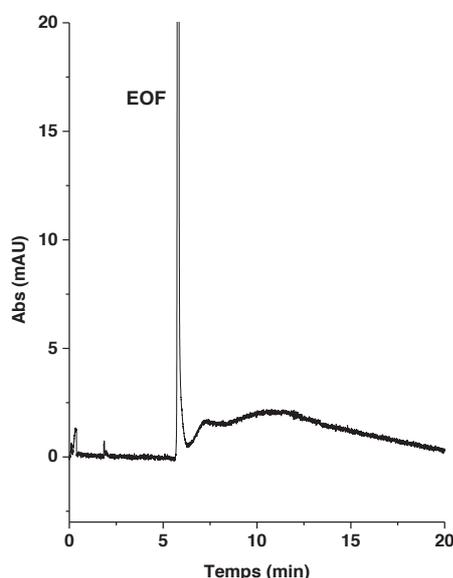


Figure 3.10 : Séparation d'un échantillon de TF dans un capillaire multi-couche PB/DS/PB.

Échantillon TF 30 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4.

Injection de marqueur neutre DMSO 0,1% 0,3 psi – 6 s, puis de l'échantillon : 1 psi – 6 s.

Séparation dans l'électrolyte : Capillaire greffé par PB/DS/PB, Lt/Ld 50/60 cm x 50 μm i.d., TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 KV, à 25°C.

Détection : UV à 214 nm.

3.1.3.4. Greffage par l'hydroxypropyl cellulose

L'hydroxypropyl cellulose (HPC) est un dérivé de la cellulose qui possède une température critique inférieure de solubilité (Lower critical solution temperature, LCST) de 45°C.¹⁷² Autrement dit, à température inférieure à 45°C, ce polymère est soluble et au-dessus de cette température, il devient insoluble. Plusieurs auteurs ont utilisé l'HPC pour recouvrir la surface des silanols du capillaire.^{173–176}

Le protocole utilisé nous a été fourni par l'équipe de H. Cottet et est adapté du protocole développé par Shen et Smith.^{173,174} Une solution d'HPC 0,05 g/ml dans l'eau a été percolée dans le capillaire à 50 $\mu\text{l/h}$ pendant 2 h à l'aide d'un pousse-seringue. Le capillaire a ensuite été chauffé sous courant d'azote à 2 bar selon le programme de température suivant : 60°C pendant 10 min, puis augmentation à 140°C avec un gradient de 5°C/min et enfin 140°C pendant 20 min.

La mobilité électroosmotique obtenue, de $(5 \pm 2) \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, montre que le taux de recouvrement de surface du capillaire est presque de 100 %. Par comparaison, la μ_{eo} calculée avec le capillaire de silice avant modification est de $(6,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; la réduction de la μ_{eo} est donc de 99,2 %. L'absence de mobilité électroosmotique peut être confirmée en appliquant soit un voltage positif, soit un voltage négatif par comparaison des résultats obtenus. Les électrophérogrammes de la Figure 3.11 correspondent aux analyses réalisées sous un voltage de - 25 kV et de + 25 kV. Les résultats montrent que les trois pics de marqueur neutre sont parfaitement superposés, ce qui indique que la mobilité électroosmotique est nulle ou extrêmement faible dans ce capillaire.

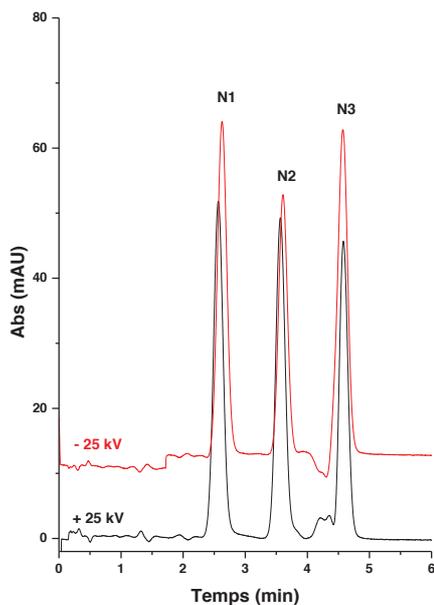
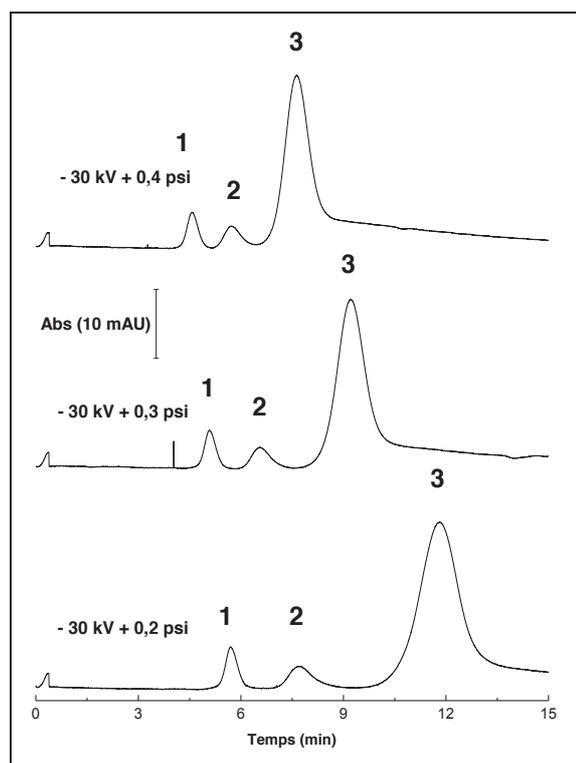


Figure 3.11 : Détermination de l'EOF selon la méthode de Williams et Vigh dans un capillaire recouvert par l'HPC, sous un voltage de - 25 kV ou de + 25 kV.

Nous avons utilisé un capillaire recouvert par de l'HPC (L_t/L_d 54 /64 cm x 75 μm i.d) pour analyser le même mélange de 3 protéines que dans le cas précédent (TF 30 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM dans l'électrolyte de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4). L'injection a été réalisée à 0,3 psi pendant 5 s, la séparation sous un voltage de - 30 kV assisté par une pression allant de 0,2 à 0,4 psi et la détection à 214 nm. Les électrophérogrammes correspondant à ces analyses sont présentés dans la Figure 3.12.



**Figure 3.12 : Séparation d'un mélange de trois protéines dans un capillaire recouvert par l'HPC.
1-OPN, 2- FET, 3- TF**

Échantillon TF 30 μ M, FET 8 μ M, OPN 8 μ M dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4.

Injection de l'échantillon : 0,3 psi – 5 s.

Séparation dans l'électrolyte : Capillaire recouvert par l'HPC, Lt/Ld 54/64 cm x 75 μ m i.d., TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 KV + 0,2 psi/ 0,3 psi/ 0,4 psi, à 25°C.

Détection : UV à 214 nm.

Dans ces conditions, la résolution a été calculée selon la formule suivante :

$$R_S = 1,18 (t_2 - t_1) / (\omega_{1/2,1} + \omega_{1/2,2}) \quad (3.3)$$

où : t_1, t_2 sont les temps de migration de deux pics consécutifs,
 $\omega_{1/2,1}, \omega_{1/2,2}$: les largeurs à mi-hauteur associées à ces pics,
 et est présentée dans le Tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Résolution des protéines dans le capillaire neutre d'HPC.

Conditions de séparation	$R_{s_{1,2}}^*$	$R_{s_{2,3}}^*$
- 30 kV + 0,2 psi	2,1 \pm 0,1	2,49 \pm 0,01
- 30 kV + 0,3 psi	1,92 \pm 0,09	2,15 \pm 0,04
- 30 kV + 0,4 psi	1,5 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2

* : n = 2.

De façon attendue, la résolution diminue avec l'augmentation de la pression assistant le voltage de séparation. Nous avons obtenu une bonne séparation des protéines avec des

résolutions supérieures à 1,5 pour les deux couples de protéines lors de séparations sous un voltage de - 30 kV assisté par une pression inférieure ou égale de 0,4 psi.

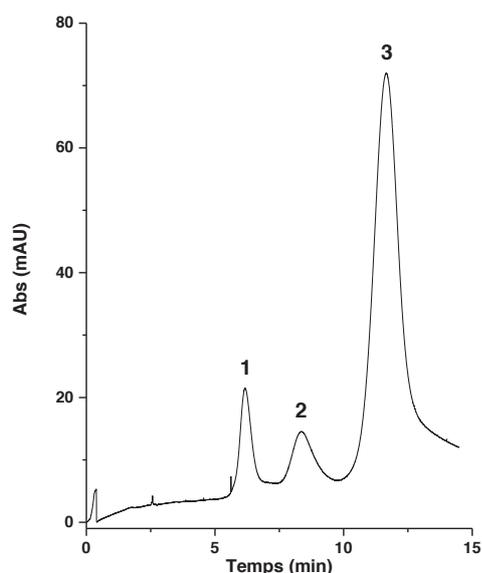
Afin de vérifier la stabilité du greffage de ce capillaire, une nouvelle détermination de la mobilité électroosmotique a été réalisée après les séparations. Cette dernière n'a pas été modifiée et la variation des temps de migration des protéines est de moins de 0,14 % pour l'OPN, 0,22 % pour la FET et 1,5 % pour la TF. Il ne semble donc pas y avoir d'adsorption des protéines dans ce capillaire.

Cependant, ici encore on constate une sorption de l'uranium sur le capillaire qui nécessite un rinçage par HNO₃ 1 mM.

3.1.3.5. Capillaire neutre Ncap

Le capillaire neutre Ncap (Ld/Lt = 54/64 cm x 50 µm i.d.) a également été testé dans l'analyse des protéines. L'injection du mélange de trois protéines (TF 30 µM, FET 10 µM, OPN 10 µM dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4) a été réalisée à 0,5 psi pendant 10 s, la séparation sous le voltage de - 28 kV assisté par une pression de 0,4 psi.

L'électrophérogramme correspondant à l'analyse est présentée dans la Figure 3.13. Celui-ci montre une séparation de trois protéines comparable à celle obtenue dans le capillaire d'HPC. Cependant, après 10 analyses de protéines, on constate une apparition de mobilité électroosmotique ($1,38 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) indiquant que le greffage a été partiellement détruit. Le coût de ce capillaire, associé à sa longévité modérée, nous a conduits à écarter cette solution.



**Figure 3.13 : Séparation d'un mélange de trois protéines dans le capillaire N-cap.
1-OPN, 2- FET, 3- TF.**

Échantillon TF 30 μ M, FET 10 μ M, OPN 10 μ M dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4.

Injection de l'échantillon : 0,5 psi- 10 s,

Séparation : capillaire N-cap Lt/Ld 54/64 cm x 50 μ m i.d., électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4, - 28 kV + 0,4 psi, à 25°C.

Détection : UV à 214 nm.

3.1.3.6. Capillaire greffé cystéine

Dans le cas du capillaire greffé par la cystéine ($L = 43$ cm), le capillaire étant très fragile, nous avons uniquement testé l'adsorption de l'uranium par injection directe à l'aide d'un pousse-seringue et détection par ICP/MS. L'injection de l'uranium a été réalisée à un débit de 18 μ l/h pendant 1 min, puis le rinçage a été effectué par le tampon à ce même débit. Après 60 min, aucun signal correspondant à l'uranium n'a été détecté, vraisemblablement en raison de la sorption de celui-ci sur le capillaire.

3.1.3.7. Comparaison des capillaires vis-à-vis de la sorption de l'uranium

Le Tableau 3.5 résume l'ensemble de ces résultats en termes de mobilité électroosmotique, d'adsorption et de stabilité du greffage. Les résultats montrent qu'aucun des capillaires testés ne permet d'éliminer la sorption de l'uranium. Même pour les capillaires présentant un taux de recouvrement de presque 100 % et pour les capillaires (dont la charge de surface est positive), on constate que l'uranium ne peut être élué en l'absence d'acide.

Tableau 3.5 : Tableau récapitulatif des différents greffages du capillaire.

Capillaire	Type de greffage μ_{eo} ($m^2.V^{-1}.s^{-1}$)	Adsorption		Stabilité du greffage/revêtement
		de l'uranium	des protéines	
Silice	$\mu_{eo} = (6,2 \pm 0,2). 10^{-8}$	Oui. L' U_{libre} ne sort qu'après un rinçage acide.	Pas d'adsorption pour TF et FET. OPN semble être affectée par le phénomène d'adsorption.	-
CTAB	Greffage dynamique $\mu_{eo} = - (6,3 \pm 0,1). 10^{-8}$	Oui. L' U_{libre} ne sort qu'après un rinçage acide.	Non. Electrophérogrammes reproductibles.	Greffage dynamique, nécessité de reconditionner le capillaire avant chaque analyse et de conserver le CTAB dans l'électrolyte pendant la séparation (risque d'interaction avec les analytes).
PB/DS/PB	Greffage multi-couche $\mu_{eo} = - (4,20 \pm 0,01). 10^{-8}$	Oui. L' U_{libre} ne sort qu'après un rinçage acide.	Oui. Les protéines (FET, OPN) ne sortent pas du capillaire, le pic de TF migre sous la forme d'une bosse.	Greffage détruit par le rinçage par l'acide nitrique.
Ncap	Greffage neutre	nd*	Non. Electrophérogrammes reproductibles.	Greffage détruit partiellement après 10 analyses de protéines, la mobilité électroosmotique est passée à $1,38.10^{-8} m^2.V^{-1}.s^{-1}$.
Cystéine	Greffage de type « zwitterion »	Oui. L' U_{libre} ne sort qu'après un rinçage acide.	nd**	Capillaire très fragile. Greffage détruit par le rinçage à l'acide.
HPC	Greffage thermique $\mu_{eo} = (5 \pm 2). 10^{-10}$	Oui. L' U_{libre} ne sort qu'après un rinçage acide.	Non. Electrophérogrammes reproductibles et pas de modification de la μ_{eo} par adsorption des protéines.	Greffage très stable (> 180 rinçages à l'acide)

nd : non déterminée, * : l'expérience n'a pas été réalisée à cause de l'instabilité du greffage, ** : l'expérience n'a pas été réalisée à cause de la fragilité du capillaire.

Par la suite, nous avons donc choisi de travailler avec les capillaires de silice et ceux d'HPC compte tenu de leur facilité de manipulation et de leur stabilité même après rinçage par l'acide. Toutefois, ces capillaires n'inhibent pas totalement la sorption de l'uranium. En conséquence, nous avons donc choisi d'introduire une étape de lavage acide à la fin de chaque analyse et utilisé l'acide HNO_3 1 mM pour éluer l'uranium sorbé dans le capillaire.

Afin de vérifier l'efficacité d'un tel rinçage, après analyse d'échantillons contenant de l'uranium, nous avons injecté des blancs contenant uniquement l'électrolyte (TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4) puis procédé à une séparation – 30 kV + 0,3 psi pendant 10 min, un rinçage par l'électrolyte de 5 psi pendant 2 min et puis un rinçage par l'acide sous 5 psi pendant 3 min dans le capillaire neutre d'HPC (64 cm x 75 μm i.d.).

L'électrophérogramme dans la Figure 3.14 montre la présence d'un pic d'uranium systématiquement élué avec l'acide. Afin d'estimer la concentration de cet uranium résiduel, celui-ci a été quantifié par rapport de la surface totale de l'U dans l'échantillon de complexe de forte affinité FET-U dans le même milieu (10 μM FET : 1 μM U, incubé à 37°C pendant 2 h). Ceci conduit à une concentration de 7,8 nM (RSD = 3,7 %, n = 3). Il faut toutefois noter que cette concentration est relativement faible et conduit pour un échantillon de concentration initiale en uranium de 1 μM , à une perte au cours de rinçage de 0,78%.

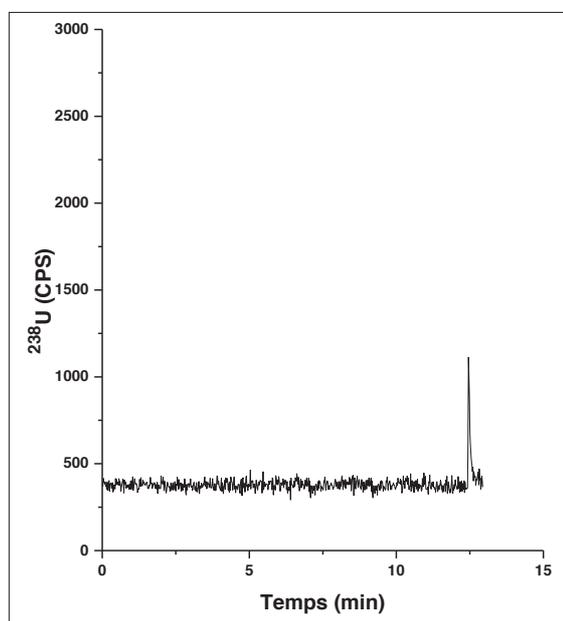


Figure 3.14 : Analyse d'un blanc (électrolyte seul) en couplage CE-ICP/MS.

Injection d'électrolyte : 0,5 psi – 5 s, séparation : capillaire d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, -30 kV + 0,3 psi, à 25°C. Détection : ICP/MS à $m/z = 238$.

3.2. Influence des conditions de voltage et de pression sur la dissociation des complexes protéine-U

Le temps de migration est un facteur important qui peut jouer sur la dissociation des complexes protéine-uranium si la cinétique de dissociation est plus rapide ou du même ordre de grandeur que le temps d'analyse. En effet, toute étape de séparation induit des conditions de déséquilibre qui peuvent conduire à la dissociation des complexes.

Sonke et Salters ont proposé une estimation de la stabilité de ces complexes pendant la séparation, à partir des temps de demi-vie.¹⁷⁷ Celui-ci est fonction de la constante de stabilité de ces complexes et de la vitesse d'échange d'eau des métaux. Dans la bibliographie, la constante cinétique associée à cet échange d'eau pour l'uranium ou les complexes uranium-ligand est comprise entre 10^5 s^{-1} et $1,3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ La Figure 3.15 représente les droites correspondant à différents temps de demi-vie de ces complexes, représentatifs des temps de séparation classiquement rencontrés dans le couplage CE-ICP/MS.

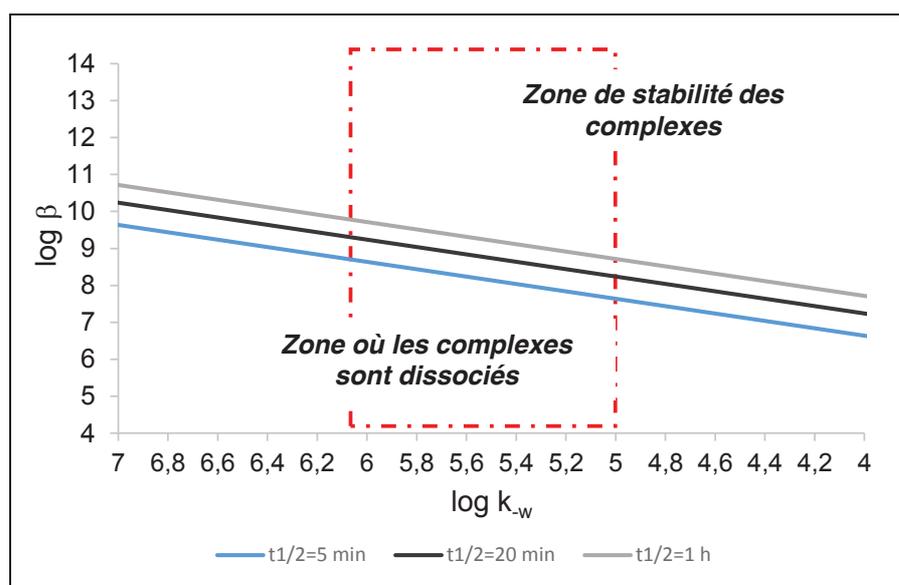


Figure 3.15 : Courbe présentant les temps de demi-vie des complexes U-ligand, adapté de [177].

zone concernant l'uranium

Cette figure permet de prédire les zones de stabilité des complexes avec l'uranium, pour des temps de demi-vie choisis dans la gamme de temps d'analyse. Ainsi, pour des temps d'analyse de 20 min, on aura :

- des complexes pour lesquels la dissociation est négligeable, pour des $\log \beta$ supérieurs à 9,5,
- des complexes qu'on ne pourra pas détecter pour des $\log \beta$ inférieurs à 8,

- une zone intermédiaire comprise entre ces deux valeurs où l'on détectera des complexes dont la concentration sera affectée par la dissociation.

Cependant, ces mêmes auteurs montrent que dans le cas de macrocycles polydentes, cette dissociation était vraisemblablement plus lente car ces macrocycles et leurs complexes métalliques possèdent des mobilités électrophorétiques presque identiques et migrent de ce fait dans la même zone. Ceci est également le cas du système protéine/uranium. Il apparaît néanmoins intéressant de chercher à limiter le temps d'analyse pour accéder à des complexes moins stables. En électrophorèse capillaire, pour des conditions d'électrolyte identiques, la réduction du temps de migration peut être réalisée de trois façons différentes : (i) en diminuant la longueur du capillaire, (ii) en augmentant le champ électrique ou (iii) en appliquant une pression qui s'additionnera au voltage durant la séparation sous voltage.

Compte tenu des contraintes technologiques liées aux appareils dont nous disposons, la longueur minimale de capillaire utilisable est de 64 cm. En conséquence, nous avons opté pour cette longueur dans la suite de ce chapitre. Nous avons donc évalué l'influence du temps de migration sur le complexe FET-U en faisant varier soit le voltage, soit la pression ajoutée au cours de la séparation. Dans tous les cas, un compromis entre temps d'analyse et pouvoir résolutif est nécessaire pour séparer les complexes protéine-uranium.

3.2.1. Influence du voltage

L'application d'un voltage entraîne une dissociation des complexes induite par la différence de mobilité électrophorétique entre le complexe, l'uranium et la protéine. Cependant, l'augmentation du voltage de séparation induit également un temps d'analyse plus court qui minimise le temps de dissociation des complexes. Il est donc intéressant d'étudier l'influence de ce paramètre sur la dissociation des complexes protéine-uranium.

L'influence du voltage de séparation sur la dissociation du complexe FET-U a été étudiée dans un capillaire de silice. Pour cela, un échantillon de FET 10 μM et U 1 μM à pH 7,4 dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, incubé à 37°C pendant 2 h a été utilisé pour cette étude. L'injection a été réalisée dans un capillaire de silice (64 cm x 75 μm i.d.) à 0,5 psi pendant 5 s. Le voltage compris entre 10 kV à 30 kV (n = 2 pour chaque condition) a été appliqué lors de la séparation, ce qui conduit à des temps de migration du complexe allant de 4,5 min à 13 min.

Les électrophérogrammes correspondant à ces analyses sont présentés sur la Figure 3.16 et le pourcentage du complexe FET-U dans chaque condition d'analyse est présenté dans la Figure 3.17.

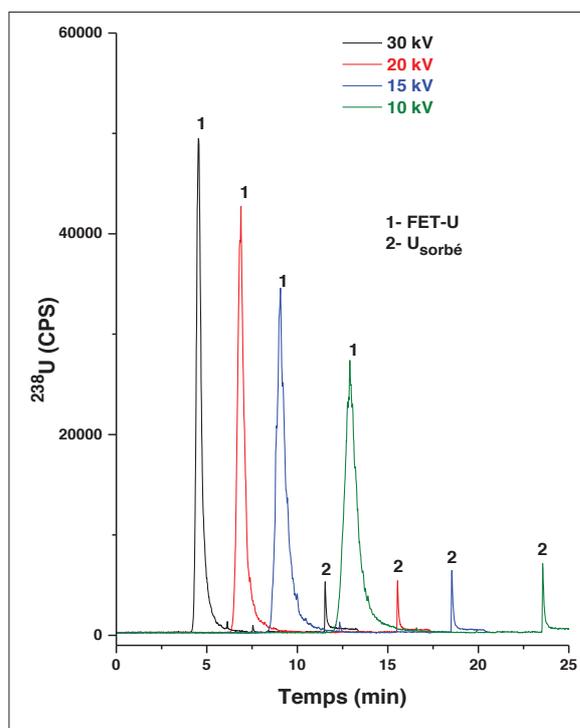


Figure 3.16 : Electrophorégrammes d'analyse du complexe FET-U en fonction du voltage de séparation.

Échantillon: FET 10 μM et U 1 μM dans un milieu TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, incubé à 37°C / 2 h.

Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, voltage : 10 - 30 KV, à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : HNO_3 1 mM.

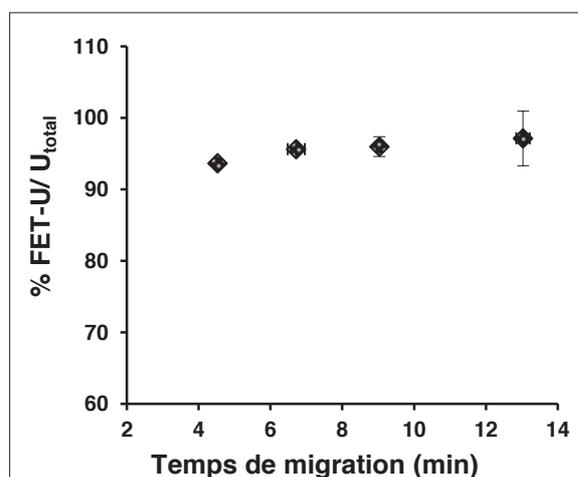


Figure 3.17 : Pourcentage de FET-U en fonction du temps de migration modifié par changement du voltage.

Les résultats indiquent que, dans la gamme de temps de migration étudiée (jusqu'à 14 min de séparation), il n'y a pas de phénomène de dissociation considérable du complexe FET-U. En effet, le pourcentage de complexe FET-U est de $(95 \pm 4) \%$ ($n = 8$), quel que soit le

voltage de séparation. Ceci indique que la séparation sous l'effet du champ électrique n'influence pas la dissociation du complexe. Ceci peut s'expliquer par deux raisons:

- FET possède une forte affinité pour l'uranium (voir chapitre 4), elle est donc située dans la zone de stabilité des complexes, compte-tenu de son temps de demi-vie estimé (présenté dans la Figure 3.13).
- la présence d'un excès de FET libre migrant dans la même zone que le complexe, permettant donc de minimiser la dissociation éventuelle.

On remarque cependant que les variations du pourcentage de complexe sont plus importantes quand le temps de migration est élevé.

Ceci montre que les conditions d'analyse en CE sont très douces, donc compatibles avec le maintien de complexes non-covalents, plus labiles que les autres espèces organométalliques. Toutefois cette affirmation n'est valable que pour des complexes possédant des constantes d'affinités relativement élevées et une mobilité électrophorétique identique à celle de l'entité libre.

3.2.2. Influence de la pression.

Le deuxième moyen d'accélérer la séparation est d'appliquer une pression additionnelle au voltage pendant la séparation. L'application d'une pression est souvent incontournable lorsqu'on utilise des capillaires neutres. En effet, en l'absence de mobilité électroosmotique, les protéines migrent très lentement du fait de leur faible mobilité électrophorétique (de l'ordre de $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,4). Contrairement à la séparation sous voltage, l'application d'une pression conduit au déplacement de tous les analytes dans le même sens. Le phénomène de dissociation du complexe est donc lié ici à l'élargissement des pics, dû à l'écoulement de Poiseuille, qui engendre une dispersion supplémentaire des pics. De plus, la pression induit une diminution de la résolution de pics dans la séparation d'un mélange d'analytes.

Pour étudier l'influence de la pression de séparation sur le maintien des complexes d'uranium, nous avons utilisé le complexe FET-U en évaluant la dispersion de pic due à la pression.

Pour cela, un échantillon identique au précédent : FET 10 μM et U 1 μM à pH 7,4 dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, a été incubé à 37°C pendant 4 h avant d'être analysé dans un capillaire neutre d'HPC (64 cm x 75 μm i.d.). L'injection a été réalisée à 0,5 psi pendant 5 s. La séparation a été réalisée sous un voltage de - 30 kV assisté par pression variant de 0,3 psi à 1 psi.

La Figure 3.18 représente les électrophérogrammes des analyses obtenus.

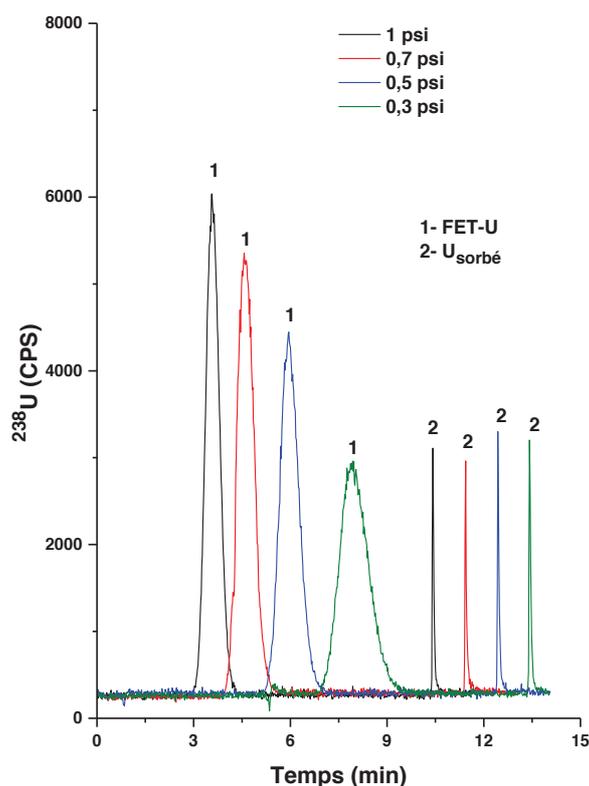


Figure 3.18 : Influence du temps de migration sur la dissociation du complexe FET-U dans le capillaire neutre d'HPC.

Échantillon : FET 10 μM et U 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, incubé à 37°C / 2 h.
 Injection 0,5 psi – 5 s
 Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte : Tris 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, (- 30 KV + 0,3 – 1 psi) à 25°C.
 Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : TRIS 5 mM à pH 7,4

On observe en ICP/MS un pic correspondant au complexe FET-U à différents temps de migration (allant de 3,5 min à 8,1 min) et un pic correspondant à l'uranium sorbé. Plus le temps de migration augmente, plus le pic de FET-U en ICP/MS est large et faible en hauteur. La dispersion en volume de pic FET-U en ICP/MS, calculée dans chaque condition, est présentée dans le Tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Dispersion des pics FET-U en ICP/MS dans chaque condition d'analyse de la figure 3.16.

Pression	1 psi	0,7 psi	0,5 psi	0,3 psi
t_m (min)	3,5 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	8,1 \pm 0,3
Dispersion en volume (σ_v^2 , nl ²)	36703	31286	26453	28339

On constate que pour de fortes pressions, plus la pression est importante, plus le temps est court, plus il y a de la dispersion. Ceci semble dû à un effet Poiseuille dans le capillaire induit par la pression. Cependant, à 0,3 psi, on constate une augmentation de dispersion qui pourrait s'expliquer par un effet prépondérant de la diffusion moléculaire des composés (protéine/complexe) pour les temps de migrations les plus élevés.

La Figure 3.19 représente le pourcentage du complexe FET-U en fonction du temps de migration correspondant à ces analyses dans le capillaire neutre. On remarque que les

variations sur le pourcentage du complexe sont plus importantes quand la pression est plus importante. Compte tenu de cette incertitude, on constate que le pourcentage de FET-U reste identique (95 ± 2 , $n = 11$), quel que soit le temps de migration. Ceci démontre qu'aucune dissociation supplémentaire du complexe FET-U ne semble avoir lieu lorsque la pression varie.

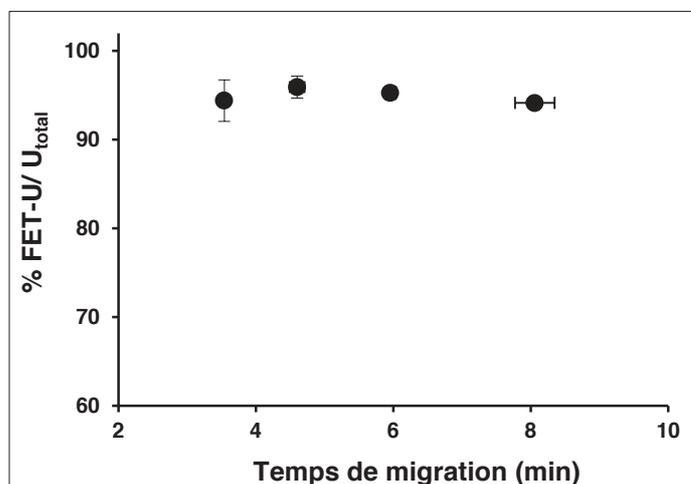


Figure 3.19 : Influence du temps de migration, modulé par la pression de séparation, sur le pourcentage de complexe FET-U dans un capillaire neutre d'HPC.

3.3. Influence des conditions de séparation sur la répartition de l'uranium

3.3.1. Répartition de l'uranium en fonction du pH

Nous avons étudié l'influence du pH de l'électrolyte sur la distribution de l'uranium. Le but de cette étude était d'évaluer la possibilité de travailler avec un électrolyte basique, afin de s'éloigner de la zone de pH où le maximum de sorption a été observé. D'un point de vue analytique ceci présente également l'avantage d'opérer dans une gamme de pH où la mobilité électroosmotique est stable. Ceci n'est toutefois possible que si la modification du pH de l'électrolyte n'induit pas de modification de la distribution de l'uranium ou une modification contrôlée.

Trois protéines, annoncées comme cibles potentielles de l'uranium dans la bibliographie (fétuine (FET), transferrine (TF) et ostéopontine (OPN)) ont été choisies pour évaluer ce phénomène. Une description détaillée de ces trois protéines est présentée dans le chapitre 1.

Un mélange de TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM a été réalisé dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 proche du pH physiologique puis incubé en présence d'U 1 μM à 37°C pendant 4 h, à l'aide d'un thermomixer Effendorf. L'échantillon a ensuite été analysé en couplage CE-ICP/MS avec trois électrolytes différents : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 et à pH 8,0 et borate de sodium 15 mM, NaCl 5 mM à pH 9,2. Pour ce faire, un capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d. a été utilisé. Après injection de l'échantillon à 0,5 psi pendant 5 s, la séparation a été réalisée à 25 kV et 25°C en présence des différents électrolytes. Après migration de la dernière protéine, le capillaire a été rincé d'abord par l'électrolyte (5 psi pendant 2 min) pour éluer d'éventuelles espèces migrant tardivement, puis par une solution d'acide nitrique 1 mM (5 psi pendant 3 min) pour éluer l'uranium sorbé. La détection ICP/MS a été réalisée à $m/z = 238$ pour détecter uniquement les espèces contenant de l'uranium.

Pour chaque électrolyte, la répartition de l'uranyle entre les différentes espèces a été calculée de la façon suivante :

$$\% U_{\text{espèce } i} = \frac{A_{\text{espèce } i}}{\sum_{j=0}^n A_{\text{espèce } j}} \quad (3.4)$$

où $A_{\text{espèce},i}$ représente la surface du pic mesurée en ICP/MS à $m/z = 238$, pour chaque forme d'uranium.

La Figure 3.20 représente la répartition de l'uranium dans le mélange en fonction du pH de l'électrolyte utilisé pour la séparation.

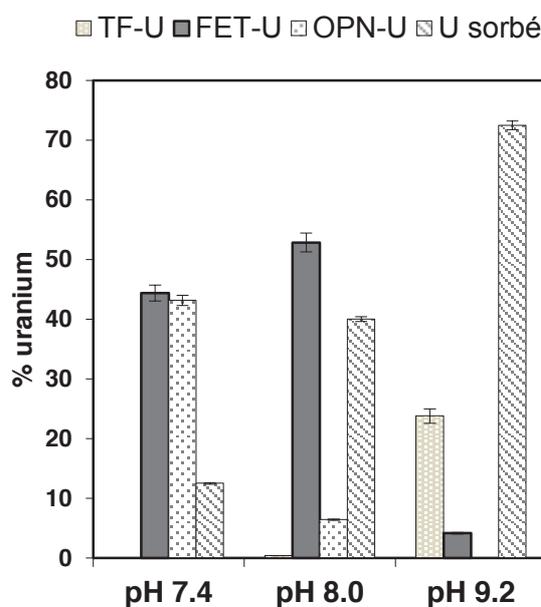


Figure 3.20 : Influence du pH de l'électrolyte de séparation sur la répartition de l'uranium

Échantillon: TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM à pH 7,4, incubé en présence d'U 1 μM à 37°C / 4 h.

Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., séparation dans le tampon : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, (pH 7,4, et pH 8), Borate 15 mM, NaCl 5 mM (pH 9,2), 25 kV à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$.

On remarque que le pH de l'électrolyte influence fortement la répartition de l'uranium.

D'une part, il affecte fortement le pourcentage d'uranium lié aux protéines. En effet, à pH 7,4, l'uranium est complexé par les protéines FET et OPN à plus de 85 %, l'uranium restant étant sorbé sur le capillaire. Quand le pH de l'électrolyte augmente de 7,4 à 9,2, la sorption de l'uranium augmente considérablement au détriment des complexes FET-U et OPN-U qui, eux, diminuent fortement. Ceci est vraisemblablement dû à l'augmentation du taux de silanols de surface qui entrent en compétition avec les protéines pour la complexation de l'uranium.

D'autre part, les variations de pH affectent la répartition de l'uranium entre les protéines. Chaque protéine adopte un comportement différent et l'optimum de complexation de l'U se situe à un pH différent pour chacune d'entre elles. Ainsi, dans la gamme de pH étudiée, une augmentation du pH conduit systématiquement à une diminution du complexe OPN-U dans le mélange : Celui-ci diminue de $(43 \pm 1) \%$ à pH 7,4 à $(6,4 \pm 0,2) \%$ à pH 8, puis n'est plus observé dans l'électrophérogramme réalisé à pH 9,2. Quant au complexe FET-U, il augmente légèrement quand le pH augmente jusqu'à pH 8, de $(44 \pm 1) \%$ à $(52 \pm 2) \%$, puis diminue, de façon analogue au complexe OPN-U, pour atteindre $(4,2 \pm 0,1) \%$ à pH 9,2. A contrario, il faut noter l'apparition progressive d'un complexe TF-U de pH 8,0 à pH 9,2, de $(0,4 \pm 0,2) \%$ à $(23,7 \pm 0,8) \%$. Ces résultats pourraient refléter la contribution de plusieurs phénomènes en compétition :

- la formation d'espèces hydroxylées de l'uranium (Figure 3.1) due à l'augmentation du pH,
- une affinité apparente de certaines protéines pour l'uranium, exacerbée par l'augmentation de ce même pH. Dans le cas de TF et FET, on peut penser que l'augmentation du pH va conduire à une augmentation du nombre de sites disponibles pour la complexation de l'uranium (diminution de la concentration en H_3O^+). De plus dans le cas de la TF, le carbonate est connu pour jouer le rôle d'anion synergique. En absence de carbonate ajouté, la complexation sera donc réalisée à des valeurs de pH plus importantes. Ceci a notamment été démontré dans le cas de la formation de complexes TF-Cm.¹⁸¹ Par contre, dans le cas de l'OPN, on peut vraisemblablement faire l'hypothèse d'une complexation de l'uranium par les groupements phosphate, dont l'ionisation est peu affectée par ce changement de pH.
- une sorption préférentielle de certains complexes sur les silanols, dont le taux augmente avec le pH. Bien qu'à notre connaissance aucune étude ne relate la sorption d'OPN sur la silice, son adhérence à de nombreux supports a été publiée.¹⁸² Sur une surface négative, celle-ci pourrait être médiée par la complexation avec l'uranium.

Une étude réalisée par Lavoie *et al.*¹⁸³ sur des cellules de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* a également souligné la complexité des effets de pH sur l'internalisation de l'uranium. Ainsi, ces auteurs ont constaté une augmentation de l'uranium lié à la surface des cellules lorsque le pH varie de 5 à 7. Cependant, ils ont attribué la plus grande sensibilité des cellules à l'uranium intracellulaire observée à pH 5 à une plus grande complexation de l'uranium avec les protéines et enzymes cytosoliques à ce pH.

En conclusion, quelles que soient les hypothèses, il apparaît que des variations de pH vont avoir des effets diverses sur les protéines, qui nécessiteraient une compréhension préalable du mode de complexation de celles-ci afin de les appréhender. Pour conserver la distribution de l'U, la première condition sera donc d'imposer un pH de l'électrolyte proche de celui de l'échantillon et donc, dans notre cas, de travailler avec un électrolyte de séparation dont le pH est voisin de 7,4.

3.3.2. Influence de la force ionique des électrolytes

Comme nous venons de le voir, le choix du pH n'est pas sans conséquence sur la distribution de l'uranium. Nous avons donc choisi un pH d'électrolyte de 7,4 et étudié l'influence de la force ionique sur cette distribution. Dans ce but, un mélange identique de TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM et d'U 1 μM en solution dans un milieu TRIS 50 mM, NaCl 5 mM à pH 7,4 a été analysé, dans différents électrolytes en faisant varier soit la concentration en NaCl (5-35 mM), soit la concentration en TRIS (10 - 50 mM). Les autres conditions d'analyse sont identiques à celles utilisées dans le cas précédent. La Figure 3.21 représente les électrophérogrammes correspondant à ces analyses.

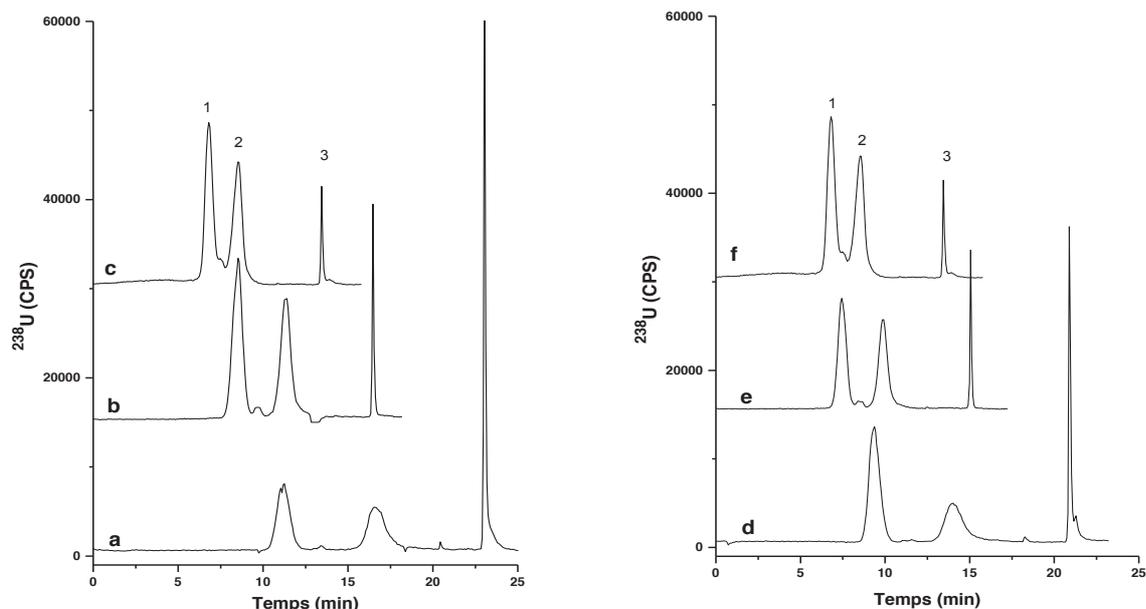


Figure 3.21 : Influence de la composition de l'électrolyte sur la séparation de trois protéines en présence d'uranium.

Échantillon: TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM dans TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, à pH 7,4 incubé en présence d'U 1 μM à 37°C / 4 h.

Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., Electrolyte (a-c): TRIS 50 mM/ 20 mM/ 10 mM respectivement et NaCl 5 mM à pH 7,4, (d-f) : TRIS 10 mM et NaCl 25 mM/ 15 mM/ 5 mM respectivement à pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$.

De façon attendue, plus la force ionique augmente, plus le temps de migration des espèces augmente car la mobilité électroosmotique diminue. La Figure 3.22 montre la répartition de l'U en fonction des différents électrolytes utilisés.

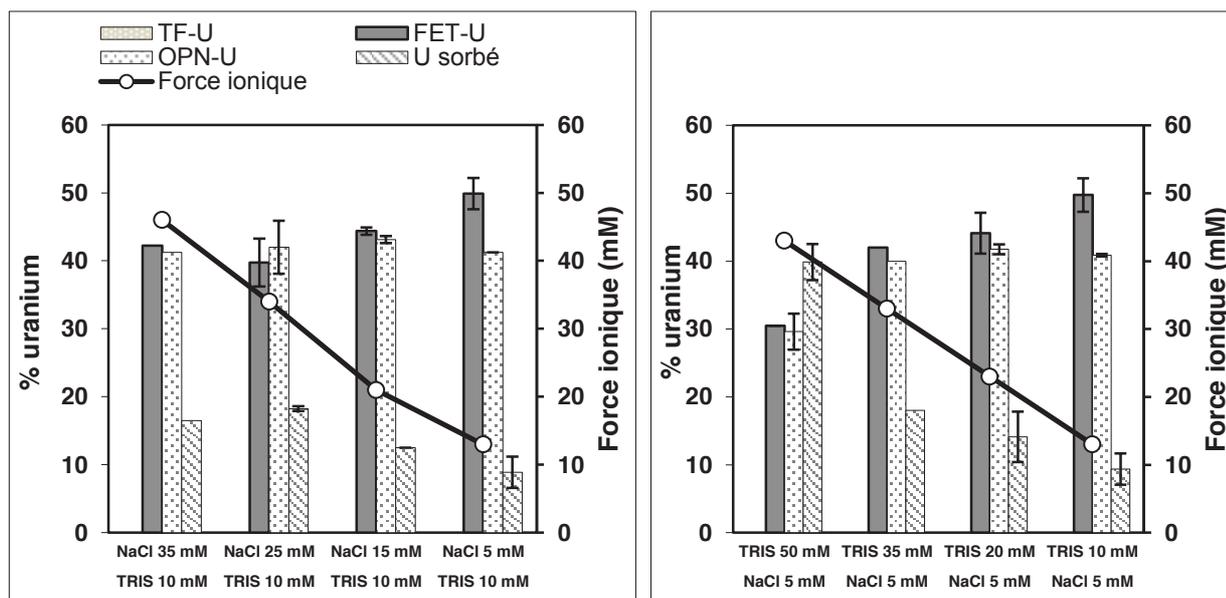


Figure 3.22 : Influence de la force ionique de l'électrolyte de séparation sur la répartition de l'uranium.

Comme nous l'avons vu précédemment, à ce pH, seules FET et OPN complexent l'uranium. La répartition entre ces deux protéines reste identique quelle que soit la force ionique : aux alentours de $(52 \pm 2) : (48 \pm 2)$. Ceci semble démontrer que TRIS et NaCl n'altèrent pas la distribution de l'uranium parmi les protéines et que la dissociation de ces deux complexes est similaire. On constate que plus le temps de migration augmente, plus les complexes se dissocient, ce qui se traduit par une augmentation de l'U sorbé sur le capillaire. Toutefois, cette dissociation ne peut être attribuée à des effets cinétiques, comme nous l'avons vu dans le paragraphe 3.2. Ainsi, Pathak et Choppin¹⁸⁴ ont montré une influence de la force ionique sur la sorption de l'uranium réalisée en batch à pH 2,6 sur des gels de silice. Une augmentation de l'adsorption de l'uranium a été démontrée quand la force ionique du milieu augmente, contrairement à ce qui est observé dans le cas d'Eu³⁺ où la compétition des ions Na⁺ pour les sites de l'adsorption entre en jeu. Cependant, aucune explication n'a été proposée. Il faut également noter qu'une concentration en TRIS de 50 mM semble avoir un effet dissociant non négligeable, ne nous permettant pas d'exclure une interaction TRIS/U.

Nous avons donc choisi de travailler avec un électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 de force ionique modérée qui permet des séparations rapides (moins de 15 min) tout en maintenant des concentrations suffisantes en sel pour conserver à la fois l'intégrité des protéines et une bonne capacité tampon de l'électrolyte pour le TRIS.

3.3.3. Influence de la nature du capillaire

Nous avons choisi de comparer la répartition de l'uranium obtenue en utilisant les deux capillaires retenus dans le paragraphe : silice et HPC.

3.3.3.1. Détermination des conditions de séparation

Dans un premier temps, les conditions de séparation ont été déterminées. Pour le capillaire de silice, en l'absence d'influence du voltage sur la dissociation, un voltage maximal (dont la chaleur produite par effet Joule peut cependant être dissipée) a été utilisé. Pour le capillaire recouvert par HPC, l'influence de la pression ajoutée au voltage de séparation sur la résolution des complexes de l'uranium dans le mélange de protéines a été étudiée. Un échantillon contenant TF 32 μ M, FET 8 μ M et fOPN 13,5 μ M et dans le TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, a été incubé à 37°C pendant 4 h en présence d'U 1 μ M. La séparation a ensuite été réalisée dans un capillaire neutre (HPC) sous un voltage de - 30 kV en présence d'une pression additionnelle variant de 0,1 à 0,4 psi. La Figure 3.23 représente les électrophérogrammes des analyses en CE-ICP/MS La résolution entre les deux complexes est présentée dans le Tableau 3.7.

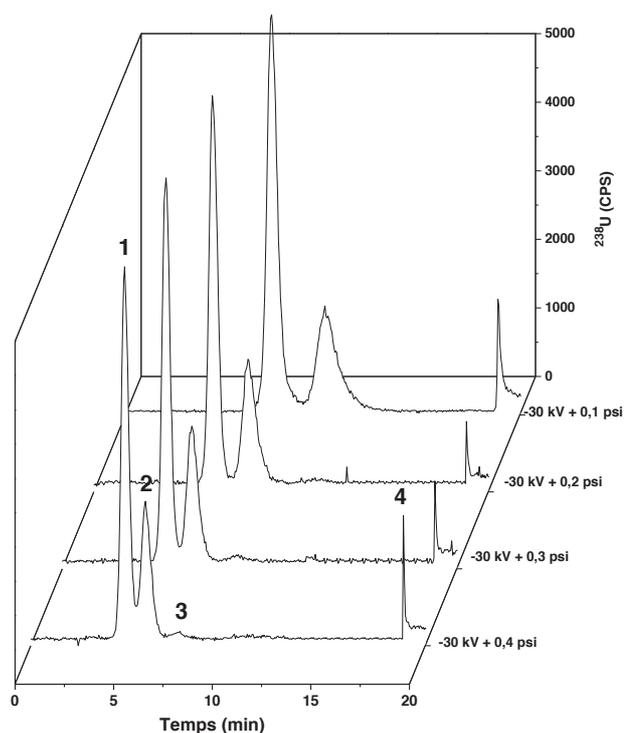


Figure 3.23 : Séparations du mélange TF, FET, OPN en présence de l'uranium dans un capillaire d'HPC. 1 OPN-U, 2 FET-U, 3 TF-U -, 4 U_{sorbé}

Échantillon: TF 32 μ M, FET 8 μ M, OPN 13,5 μ M et U 1 μ M dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, incubé à 37°C / 4 h

Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μ m i.d., électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, (- 30 KV + 0,1 – 0,4 psi) à 25°C.

Détection : ICP/MS à m/z = 238. Liquide additionnel : TRIS 5 mM à pH 7,4.

Tableau 3.7 : Résolution du couple FET-U/ OPN-U en fonction de la pression assistant le voltage de séparation.

Conditions de séparation	- 30 kV			
	0,1 psi	0,2 psi	0,3 psi	0,4 psi
R_s FET-U/OPN-U	1,76	1,71	1,42	1,24

En accord avec la théorie, plus la pression ajoutée est importante, plus on gagne en temps d'analyse mais plus on perd en résolution (1,76 avec une séparation de -30 kV + 0,1 psi et 1,24 avec une séparation de -30 kV + 0,4 psi). En comparant avec les résolutions obtenues en CE-UV, celles-ci sont légèrement plus faibles malgré une plus grande longueur effective du capillaire de séparation (64 cm contre 54 cm). Ceci peut s'expliquer par un volume d'injection de l'échantillon plus important en couplage CE-ICP/MS qu'en CE-UV (cf chapitre 2). Cependant, on note que sous un voltage de - 30 kV assisté par une pression allant jusqu'à de 0,2 psi, une bonne séparation des complexes protéine-uranium est obtenue ($R_s > 1,5$).

Dans chaque condition, le pourcentage d'uranium correspondant à chaque complexe protéine-uranium a été calculé suivant l'équation (3.4) et les résultats sont présentés sur la Figure 3.24. On constate que le pourcentage des complexes ne varie pas de façon considérable en changeant la pression appliquée : $(28 \pm 2) \%$ pour FET-U et $(67 \pm 2) \%$ pour OPN-U.

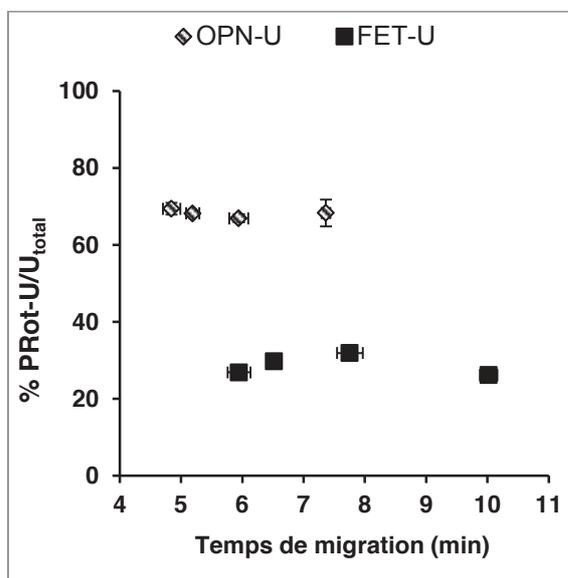


Figure 3.24 : Influence du temps de migration sur le maintien des complexes protéine-U.

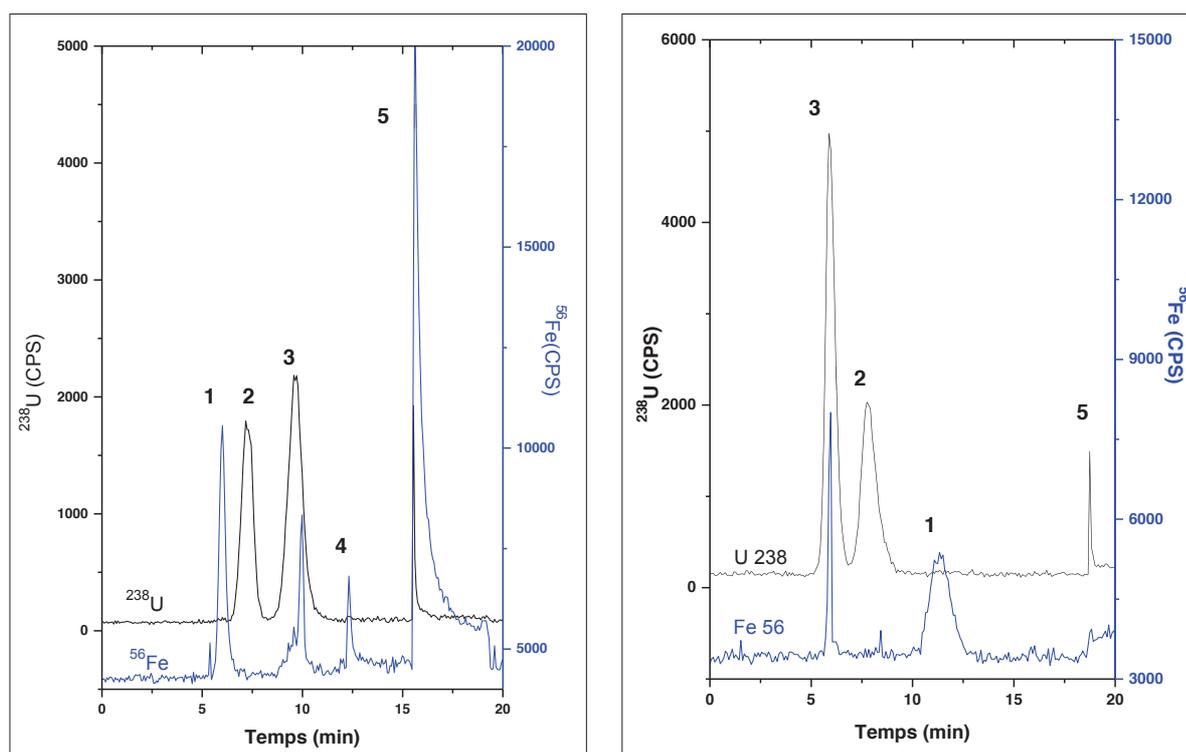
Par ailleurs, il faut noter qu'à partir de 0,2 psi de pression ajoutée dans la séparation, un très faible pourcentage de complexe TF-U ($1,5 \pm 0,1$) % est observé dans le mélange (Figure 3.23), ce qui n'est pas le cas pour le capillaire de silice. Ceci pourrait s'expliquer par une plus faible affinité de la TF vis-à-vis de l'uranium que celles de FET et de OPN, mais aussi par :

- la dissociation du complexe pendant la séparation. En effet, la courbe de temps de demi-vie de complexe ligand-uranium dans la Figure 3.15 montre que si un ligand a une constante d'affinité avec l'uranium telle que $\log \beta$ inférieur à 8, les variations de temps de migration occasionnées par le changement de la pression assistant le voltage pourraient influencer la quantité de complexe observée.
- la dispersion du complexe pendant la séparation. Plus le temps de migration augmente, plus la dispersion par diffusion est élevée, ce qui conduit à la dilution de l'analyte jusqu'à la détection. Les complexes seront donc invisibles à la détection ICP/MS (au-dessous des limites de détection, environ 10 nM) pour les temps de migration importants.
- l'absence ou la diminution du taux de silanols dans le capillaire d'HPC. Les silanols présents en quantité très importante participent à la compétition avec TF dans la complexation de l'uranium dans le capillaire de silice où TF-U n'a pas été observé, alors même avec son temps de migration plus court.

Nous avons donc choisi de travailler à -30 kV + 0,2 psi pour ce type d'échantillon afin de minimiser le temps d'analyse tout en conservant une bonne résolution de séparation ($R_s = 1,71$).

3.3.3.2. Comparaison des deux capillaires : silice et HPC

Nous avons donc comparé la répartition de l'uranium sur un capillaire de silice et sur un capillaire neutre recouvert d'hydroxypropylcellulose. Pour cela, un échantillon des trois protéines identique au précédent (TF, FET et OPN en présence d'uranium 1 μM) a été utilisé. L'injection a été réalisée à 0,5 psi pendant 5 s. La séparation a été réalisée à 25 kV dans le capillaire de silice et à un voltage de -30 kV assisté par une pression de 0,2 psi dans le capillaire neutre d'HPC. La détection en ICP/MS a été réalisée à m/z 238 (1 s/point) pour l'uranium et $m/z = 56$ (2 s/point) pour le fer en ajoutant un débit d'hélium de 4,3 ml/min dans la cellule de collision. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés dans la Figure 3.25.



**Figure 3.25 : Séparation du mélange de protéines avec l'uranium dans le capillaire de silice (à gauche) et dans le capillaire neutre d'HPC (à droite).
Pic correspondant à : 1- TF, 2-FET, 3- OPN, 4- espèce éluée lors du rinçage par l'électrolyte, 5- espèce éluée lors du rinçage par acide.**

Échantillon: TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 13,5 μM et U 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, incubé à 37°C / 4 h.
Injection 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., + 25 kV (à gauche), capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., - 30 kV + 0,2 psi (à droite), électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 56$ et 238, mode de collision He : $D_{\text{He}} = 4,3$ ml/min. Liquide additionnel : TRIS 5 mM à pH 7,4.

On remarque que le temps de migration de l'OPN passe de 10 min dans le capillaire de silice à 6 min dans le capillaire neutre alors que celui de la FET passe, lui, de 7 min à 7,5 min. Contrairement à ce qui a été montré dans la Figure 3.21, le complexe TF-U n'a pas été observé dans l'électrophérogramme réalisé dans le capillaire d'HPC car l'utilisation de la collision en ICP/MS conduit à une augmentation des limites de détection.

Pour chaque capillaire, le pourcentage des espèces en uranium correspondant à ces analyses a été calculé suivant l'équation (3.4) et les résultats sont présentés dans la Figure 3.26.

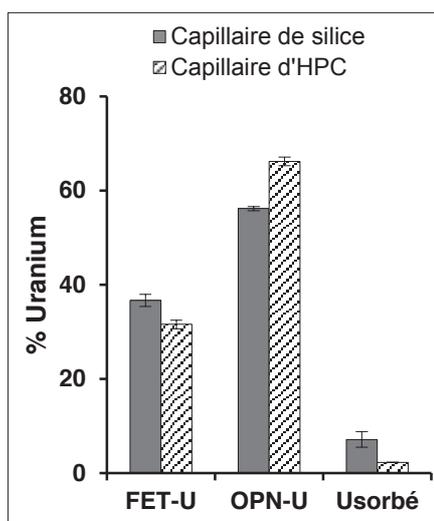


Figure 3.26 : Comparaison des distributions de l'uranium obtenues par analyses dans un capillaire de silice et dans un capillaire neutre d'HPC.

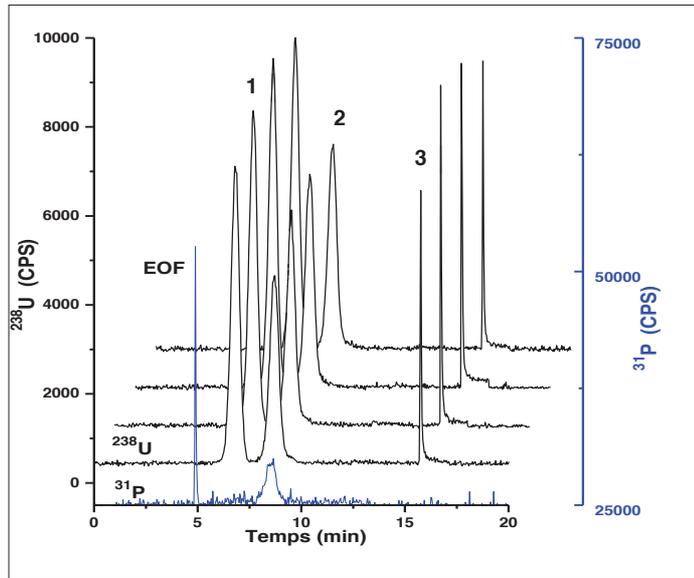
Une faible diminution de l'U sorbé (de 6 ± 1 % à $1,1 \pm 0,2$ %) est observée sur le capillaire d'HPC mais pas une inhibition totale. Bien que les 2 protéines cibles de l'uranium soient toujours les mêmes, FET et OPN, la répartition de l'uranium entre ces deux protéines est altérée. Si la proportion d'uranium complexé à FET reste pratiquement identique : (36 ± 2) % dans le capillaire de silice et (32 ± 1) % dans le capillaire HPC, celle d'uranium complexé à OPN varie d'environ 10 %: (56 ± 1) % dans le capillaire de silice et (67 ± 1) % dans le capillaire HPC. Ceci pourrait s'expliquer en faisant l'hypothèse d'une sorption préférentielle des complexes OPN-U sur les silanols. La diminution de ces derniers par recouvrement par l'HPC conduit donc à une diminution du pourcentage d'uranium sorbé au profit de celui d'OPN-U.

En conclusion, la répartition de l'uranium semble donc affectée par la nature du capillaire mais le couplage permet néanmoins de fournir une première image de cette répartition. Il faut également noter sur ces électrophérogrammes, la présence de fer dans la TF, ce qui est attendu, mais aussi dans l'OPN.

3.4. Reproductibilité de la méthode d'analyse

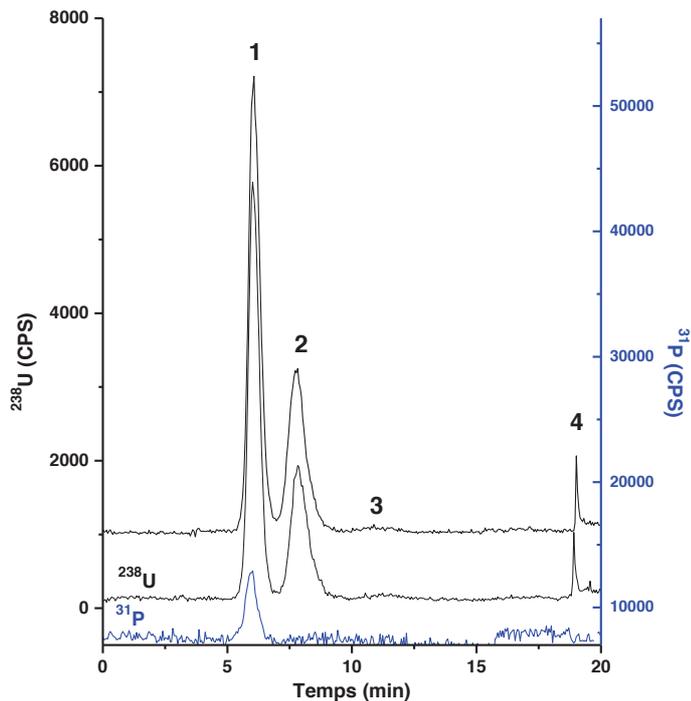
La reproductibilité des analyses a été vérifiée sur un mélange de trois protéines TF 32 μM , FET 8 μM et fOPN 8 μM en présence d'uranium 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH à 7,4. Le mélange a été injecté à 0,5 psi pendant 5 s. La séparation a été réalisée dans un capillaire de silice (64 cm, 75 μm i.d.) sur trois jours différents à raison d'au moins trois analyses par jour à 25 kV. L'électrolyte de séparation et l'acide nitrique utilisé pour éluer l'uranium sorbé ont été renouvelés à chaque analyse. Grâce aux possibilités de détection multi-élémentaire de ICP/MS, les signaux obtenus à $m/z = 238$ (1 s/point) et $m/z = 31$ (2 s/point) ont été enregistrés simultanément. La détection de ^{31}P permet à la fois de repérer le pic correspondant à l'OPN et de mesurer la mobilité électrophorétique. Cette dernière a été déterminée grâce à l'injection de TBP 0,01 % dans DMSO 2 % (0,3 psi pendant 3 s), utilisé comme marqueur neutre. Pour le capillaire recouvert par l'HPC, un mélange de trois protéines TF 32 μM , FET 8 μM et fOPN 13,5 μM en présence d'uranium 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH à 7,4 a été analysé sous un voltage de - 30 kV assisté par une pression de 0,2 psi. Toutes les autres conditions sont identiques à celles utilisées avec le capillaire de silice.

La Figure 3.27 illustre les séparations obtenues pour ce mélange. La détection de l'uranium confirme l'absence de complexe TF-U et la présence de deux complexes FET-U et OPN-U qui contiennent respectivement (54 ± 1) % et (37 ± 1) % de l'uranium total ainsi que celle d'uranium non complexé par les protéines. Les répétabilités intra-jour et inter-jour en mobilité électrophorétique ainsi qu'en pourcentage d'uranium (équation 3.4) ont été calculées et sont récapitulées dans le Tableau 3.8. Les résultats montrent que les variations sur trois jours sont inférieures à 3 % pour les pourcentages d'uranium complexé aux protéines et de 4 % dans le cas des mobilités électrophorétiques dans le capillaire de silice. Quant au capillaire d'HPC (Figure 3.28 et Tableau 3.8), les variations des pourcentages d'uranium sont inférieures à 3 % et celles des temps de migration inférieures à 2 %. Ceci démontre la bonne reproductibilité des analyses des complexes protéine-uranium en couplage CE-ICP/MS.



**Figure 3.27 : Séparations du mélange de trois protéines TF, FET et OPN en présence d'uranium dans un capillaire de silice.
1- FET-U, 2-OPN-U, 3-U_{sorbé}.**

Échantillon: TF 32 μ M, FET 8 μ M, fOPN 8 μ M et U 1 μ M à pH 7,4, incubé à 37°C / 4 h.
Injection : TBP 0,01 % dans DMSO 2 % à 0,3 psi – 3 s, puis échantillon à 0,5 psi – 5 s.
Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μ m i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C, Détection : ICP/MS à m/z = 238 et 31.



**Figure 3.28 : Séparations du mélange de trois protéines TF, FET et OPN en présence d'uranium dans un capillaire recouvert d'HPC.
1- OPN-U, 2- FET-U, 3- TF-U, 4- U_{sorbé}.**

Échantillon: TF 32 μ M, FET 8 μ M, fOPN 13,5 μ M et U 1 μ M à pH 7,4, incubé à 37°C / 4 h.
Injection : 0,5 psi – 5 s.
Séparation : capillaire d'HPC 64 cm x 75 μ m i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 kV + 0,2 psi à 25°C, Détection : ICP/MS à m/z = 238 et 31.

Tableau 3.8 : Reproductibilité des analyses du mélange protéines-uranium dans le capillaire de silice et dans le capillaire recouvert par l'HPC.

Echantillon : TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 8 μM et U 1 μM à pH 7,4 pour le capillaire de silice
 et TF 32 μM , FET 8 μM , fOPN 13,5 μM et U 1 μM à pH 7,4 pour le capillaire recouvert par l'HPC.
 Conditions d'analyses détaillées dans les Figures 3.27 et 3.28.

Espèces	Capillaire de silice								Capillaire d'HPC	
	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Moyenne sur 3 jours		n = 2	
	n	4	3	3	3	3	3	3	Surface (%)	t (min)
	Surface (%)	μep ($10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Surface (%)	μep ($10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Surface (%)	μep ($10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Surface (%)	μep ($10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Surface (%)	t (min)
FET-U	54,3 ± 0,1	-1,52 ± 0,04	51,9 ± 0,7	-1,53 ± 0,04	54,1 ± 0,1	-1,52 ± 0,01	54 ± 1	-1,52 ± 0,05	31,9 ± 0,9	7,7 ± 0,1
OPN-U	37,9 ± 0,2	-2,39 ± 0,05	37,9 ± 0,4	-2,46 ± 0,05	36,6 ± 0,7	-2,46 ± 0,05	37 ± 1	-2,41 ± 0,06	67 ± 1	5,9 ± 0,1
U_{libre}	7,8 ± 0,2	-*	10,3 ± 0,3	-*	9,2 ± 0,6	-*	9 ± 2	-*	1,1 ± 0,2	-*

* : la mobilité électrophorétique n'est pas mesurable car l'U est élué par l'acide nitrique en rinçage.

3.5. Conclusion

L'élaboration d'une méthode permettant l'analyse de complexes protéine-U reste une problématique complexe.

D'un point de vue théorique, l'augmentation du temps de migration (en faisant varier soit le voltage, soit la pression) est susceptible d'affecter le maintien des complexes protéine-uranium. En première approximation, des calculs basés sur la constante d'échange de l'eau de la sphère d'hydratation de l'uranium montrent que l'analyse de ces composés n'est applicable que si les complexes ont une constante d'affinité supérieure à $10^{9,5} \text{ M}^{-1}$. Des précautions supplémentaires sont nécessaires lors de l'analyse de complexes dont les constantes sont comprises entre 10^8 et $10^{9,5} \text{ M}^{-1}$.

Dans notre cas, aucune variation significative du pourcentage d'uranium complexé à FET n'a été observée, vraisemblablement en raison de la forte affinité de cette protéine. Cependant, l'importance de ce paramètre pourrait revêtir toute son importance pour les protéines ayant une faible affinité. Des études supplémentaires doivent être entreprises pour confirmer cette hypothèse.

La détermination de conditions de séparation permettant de refléter au mieux la distribution de l'uranium dans les échantillons est soumise à de nombreuses exigences :

- d'une part, le pH de l'électrolyte doit être choisi proche de celui de l'échantillon,
- d'autre part, l'existence inévitable d'équilibres secondaires (comme la sorption de l'uranium), ne doit pas affecter préférentiellement certains complexes. Ainsi, s'il semble possible de travailler dans un capillaire de silice pour certaines protéines, les complexes OPN-U semblent être sorbés préférentiellement sur les silanols et un recours à un capillaire HPC est alors nécessaire.

La distribution de l'uranium dans un mélange de protéines sera préférentiellement établie en présence d'un excès de protéine. Nous avons choisi de travailler avec l'électrolyte de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 dans le capillaire de silice ou recouvert par HPC. Les conditions de séparation choisies sont un voltage de 25 kV dans le capillaire de silice et de -30 kV assisté par une pression de 0,2 psi dans le capillaire d'HPC. L'uranium sorbé sur le capillaire a été élué par un rinçage par HNO_3 1 mM à 5 psi en fin de séparation. Avec ces deux jeux de conditions, les erreurs relatives sur les surfaces de pic et sur les mobilités électrophorétiques sont inférieures à 4 %, démontrant ainsi la reproductibilité d'un tel couplage.

Chapitre 4. Étude de cibles protéiques de l'uranium

L'obtention de données thermodynamiques fiables décrivant les interactions protéine-uranium fait actuellement l'objet de nombreuses publications. Les méthodes spectroscopiques (UV, fluorescence, dichroïsme circulaire) ont démontré tout leur intérêt dans ce domaine. Cependant, les volumes d'échantillons nécessaires (de l'ordre de plusieurs dizaines de μl) limitent ces études à des protéines disponibles en quantités importantes. De plus, les temps d'analyse ne sont généralement pas envisageables pour des études systématiques. Récemment, Averseng *et al.*⁴⁹ ont développé une méthode basée sur une reconnaissance de l'uranium libre par un anticorps et sa détection en SPR qui permet de réduire considérablement les temps d'analyse. Elle a de ce fait été appliquée avec succès à l'étude de l'affinité pour l'uranium d'une quinzaine de protéines sériques.

Dans son format électrophorèse capillaire d'affinité, l'électrophorèse capillaire est une technique qui connaît un grand succès dans la mesure des constantes de stabilité, compte tenu des faibles volumes d'échantillons requis et de son automatisation. Elle a été appliquée à de nombreux systèmes : métal/ligand, métal/biomolécule, protéine/médicament. Cependant, dans l'étude qui nous intéresse, elle apparaît peu applicable. En effet, dans une configuration où les différences de mobilité électrophorétique entre métal et complexe métallique seraient mises à profit, la consommation de protéine deviendrait trop importante. Dans la configuration inverse, nous avons montré que protéine et complexe métallique possèdent des mobilités électrophorétiques similaires voire identiques.

L'objectif du chapitre est donc d'envisager l'utilisation du couplage CE-ICP/MS dans ce domaine et de l'appliquer aux études de trois protéines cibles potentielles de l'uranium : la féтуine-A (FET), la transferrine (TF) et l'ostéopontine (OPN). Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction de l'uranium avec chacune de ces protéines prises individuellement. Dans le cas de l'OPN, une part importante de ce travail concerne la purification de cette protéine qui est détaillée dans l'annexe 2. Nous avons ensuite réalisé des études compétitives entre différentes protéines et petites molécules afin de comparer leur affinité avec l'uranium et valider ainsi la méthode par couplage CE-ICP/MS.

4.1. Protocole expérimental de détermination de l'affinité des protéines par CE-ICP/MS.

Compte tenu des études réalisées dans les chapitres précédents, les séparations ont été réalisées soit dans des capillaires de silice fondue, soit dans des capillaires recouverts par de l'HPC. En l'absence de mention supplémentaire dans les paragraphes suivants, les séparations ont été réalisées dans les conditions suivantes :

- Les échantillons ont été injectés à 0,5 psi pendant 5 s.
- Dans les capillaires de silice (64 cm x 75 µm i.d.), les séparations ont été réalisées en présence d'un électrolyte composé de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 à 25 kV et 25°C. Dans les capillaires neutres (64 cm x 75 µm i.d.), les séparations sont réalisées en présence de ce même électrolyte mais à - 30 kV avec une pression de 0,2 psi et 25°C.
- La détection a été réalisée en UV à 10 cm, pour détecter les protéines, et en ICP/MS à 64 cm à $m/z = 238$ pour détecter les espèces contenant l'uranium, à laquelle on a adjoint soit une détection à $m/z = 56$ pour le fer, soit une détection à $m/z = 31$ pour le phosphore. Dans le cas de la détection simultanée du fer, la cellule de collision à l'hélium (4,3 ml/min) a été activée afin d'éliminer les interférences à $m/z = 56$ dues à la présence d'ions polyatomiques : $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ et $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$. Dans le cas de la détection du phosphore, elle a été désactivée pour ne pas détériorer la limite de détection.
- L'interface avec l'ICP/MS a été décrite dans le chapitre 2. Lors de l'utilisation des capillaires de silice, le liquide additionnel est constitué d' HNO_3 1mM, avec les capillaires neutres, il a été remplacé par du TRIS 5 mM, pH 7,4.

4.2. Etude de l'affinité de l'uranium pour des protéines individuelles

4.2.1. Interaction entre transferrine (TF) et uranium

4.2.1.1. Quantification du Fe dans la TF

La transferrine humaine est commercialisée par Sigma-Aldrich sous trois formes : apotransferrine (ATF), transferrine partiellement saturée et holotransferrine (HTF). Pour contrôler la concentration en Fe dans chaque lot de protéine, nous avons réalisé une quantification de ce dernier par ICP/MS.

Pour cela, les trois protéines ont chacune été dissoutes dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 à partir des protéines commercialisées pour atteindre la concentration de 50 μM pour l'holotransferrine et 100 μM pour les deux autres. Les solutions de protéines ont été filtrées à 0,45 μm avant utilisation. La concentration des protéines a été calculée à partir de leur absorbance UV à 280 nm avec un coefficient d'extinction massique $\epsilon_{(\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1})} = 1,106$. Les protéines ont ensuite diluées dans l'acide nitrique 1 mM avant l'analyse en ICP/MS. La courbe d'étalonnage du Fe a été réalisée à partir de solutions standards de 10 à 100 $\mu\text{g/l}$ dans HNO_3 1 mM à $m/z = 54$ et $m/z = 56$ ($R^2 = 0,9999$ et $0,9998$ respectivement) en mode de collision par l'hélium (4,3 ml/min).

Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.1. Ceux-ci confirment l'absence de fer dans « l'apotransferrine », l'occupation d'un tiers des sites dans « la transferrine » et la quasi-saturation de l'ensemble des sites dans « l'holotransferrine ».

Tableau 4.1 : Quantification par ICP/MS du fer présent dans les différentes transferrines commercialisées.

Protéine	[Fe] / [Protéine]
Apotransferrine (ATF)	0,075 \pm 0,007
Transferrine	0,68 \pm 0,01
Holotransferrine (HTF)	1,80 \pm 0,05

Afin de représenter au mieux la TF présente dans le sérum, nous avons donc choisi de travailler avec la transferrine dont les sites de fer sont partiellement occupés. Cette protéine a été utilisée sans aucune purification préalable à l'exception d'une dialyse à 10 kDa dans un milieu identique au milieu de dissolution à 4°C pendant une nuit.

4.2.1.2. Interaction TF – uranium

Une étude de l'interaction entre la transferrine et l'uranium a été réalisée par incubation de 32 μM de TF en présence de 1 μM d'U dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 à 37°C, à l'aide d'un thermomixer EppendorfTM avec une agitation de 500 rpm, pendant 4 h, temps déterminé comme suffisant pour atteindre l'équilibre par des essais préalables. Montavon *et al.*⁴¹ ont quant à eux utilisé un temps d'équilibre de 20 min à température ambiante (23 \pm 2) °C, Michon *et al.*⁴³ un temps de 1 h à (22 \pm 1) °C et Hémadi *et al.*⁹⁹ un temps de 1 h pour la formation du complexe mononucléaire 1U-TF (site du C-lobe) et de 5 h pour celle du complexe binucléaire 2U-TF à (25 \pm 0,5) °C. L'analyse du mélange a été réalisée dans un capillaire de silice (64 cm x 75 μm i.d.) La détection a été réalisée en UV à 214 nm à 10 cm de l'extrémité du capillaire pour détecter la protéine (Figure 4.1 a) et en

ICP/MS à $m/z = 238$ pour l'U et 56 pour le Fe, à 64 cm, pour détecter le complexe TF-U (Figure 4.1 b).

A l'exception du pic correspondant à l'uranium sorbé élué en fin de séparation, on constate la présence d'un second pic d'uranium migrant à 7,2 min. Ce pic correspond à une/des espèce(s) qui contient(nent) la protéine, puisque le temps de migration théorique de celle-ci à 64 cm a été calculé à partir des données UV comme étant de 7,1 min. De plus, grâce à la détection multi-élémentaire, on constate la présence de fer à ce même temps de migration. Ceci nous permet de conclure sans ambiguïté à la formation d'un complexe TF-U. Dans les conditions où le rapport de TF : U est de 32, la TF fixe 35,7 % de l'uranium, soit avec l'apotransferrine, soit par échange avec le cation ferrique, soit par formation d'un complexe binucléaire. Toutefois, il n'est pas possible de privilégier une de ces hypothèses par rapport aux autres au seul examen de ces données. Il est à noter que deux pics supplémentaires contenant du fer sont obtenus par rinçage post-séparation avec l'électrolyte (pic 2) et avec HNO_3 1 mM (pic 3), qui pourraient correspondre à une espèce très négative du fer et au fer sorbé respectivement. Il est à noter que ces pics apparaissent lors de chaque analyse de TF, même en l'absence de formation d'un complexe avec un autre métal (cf Chapitre 5).

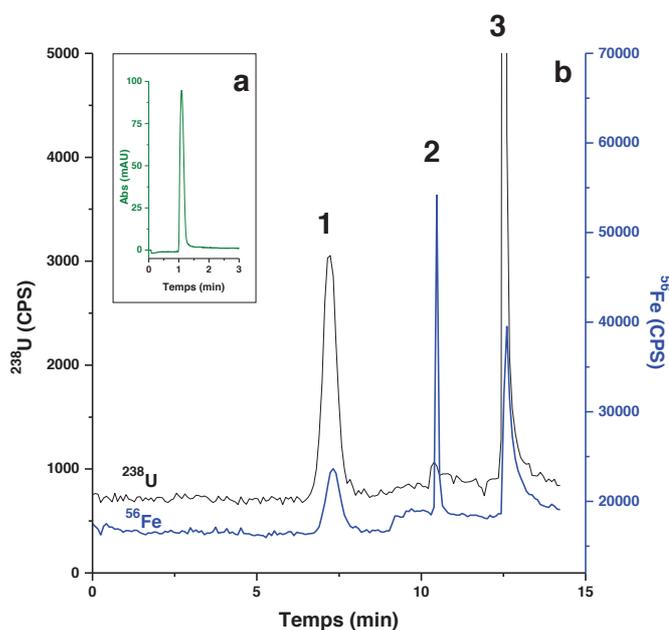


Figure 4.1 : Analyse du complexe TF – U en CE-ICP/MS.

1- TF-U ; 2- Fe élué par rinçage à l'électrolyte, 3-U_{sorbé} et Fe_{sorbé} élués par rinçage avec HNO_3 .

Échantillon: TF 32 μM , U 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, à pH 7,4 incubé 37°C / 4 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d. électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : UV à 214 nm (a), ICP/MS à $m/z = 238$; 56 (b). Liquide additionnel : HNO_3 1 mM.

4.2.2. Interaction entre fétuine-A (FET) et uranium

La fétuine commercialisée par Sigma-Aldrich nécessite une purification afin de recueillir uniquement la fraction correspondant à la fétuine A. Cette étape est détaillée en Annexe 1.

4.2.2.1. Détermination des conditions d'équilibre

Préalablement à toute expérience, nous avons déterminé le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de formation du complexe FET-U. Pour ce faire, des échantillons de FET 11 μM et d'uranium 0,15 μM en présence de bicarbonate 100 μM à pH 7,4 ont été incubés à température ambiante et à 37°C, pendant différents temps d'incubation. Les résultats présentés dans la Figure 4.2 représentent la variation du pourcentage de complexe en fonction du temps d'incubation.

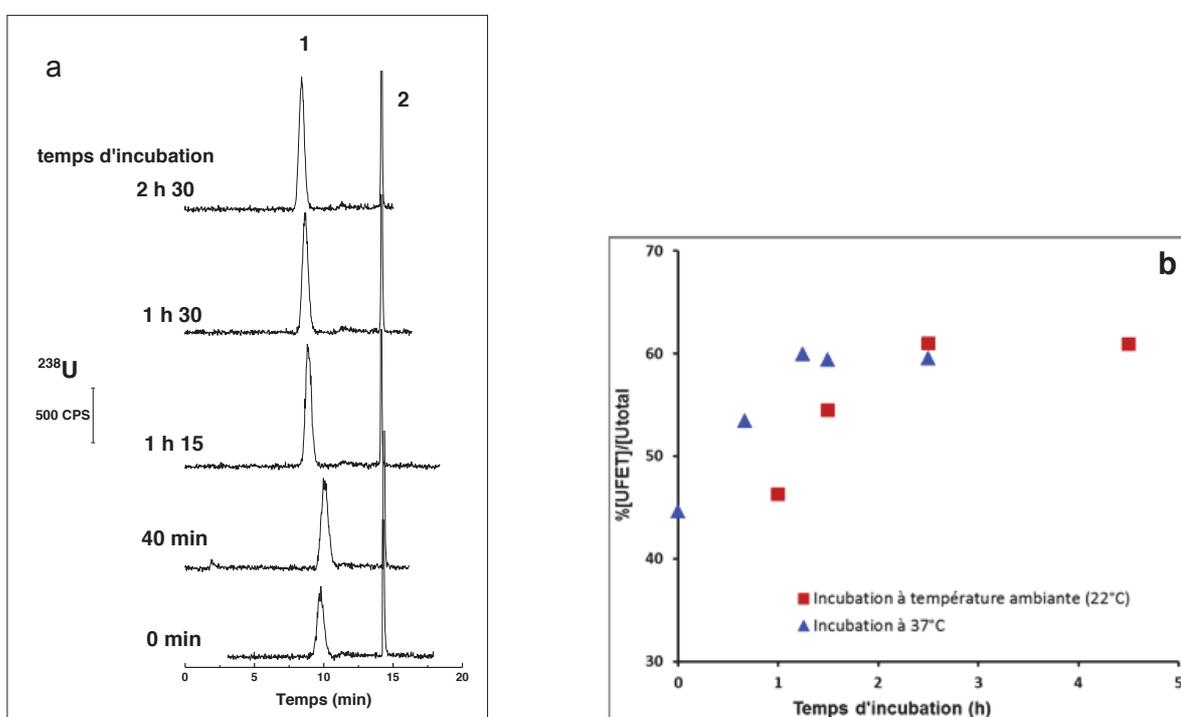


Figure 4.2 : Cinétique de formation du complexe FET-U.

(a) Séparation des différents mélanges d'incubation par CE-ICP/MS, (b) Pourcentage de complexe formé en fonction du temps d'incubation. 1- FET-U, 2- Usorbé.

Échantillon: FET 11 μM , U 0,15 μM et HCO_3^- 100 μM dans TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4, incubé pendant différents temps d'incubation.

Injection : 0,5 psi – 12 s.

Séparation : capillaire de silice 85 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4, 28 kV + 0,5 psi, à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : HNO_3 1 mM.

On constate qu'à température ambiante, il est nécessaire de procéder à 2 h 30 d'incubation pour être à l'équilibre et voir le pourcentage de complexe atteindre un plateau. Une accélération de la cinétique par augmentation de la température d'incubation à 37°C permet

d'atteindre l'équilibre en 1 h 15 min. Pour la suite de nos études, nous avons donc choisi des conditions d'incubation à 37°C pendant 2 h.

4.2.2.2. Capacité de fixation d'uranium de la FET

Afin d'étudier la capacité de fixation d'uranium de la FET, différents aliquots contenant 8 μM FET ont été incubés en présence de concentrations variables en U (0,2 – 16 μM) dans une solution TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 à 37°C pendant 2 h. Les échantillons ont été analysés avec un capillaire neutre d'HPC (64 cm x 75 μm i.d).

La Figure 4.3 présente les électrophérogrammes obtenus pour des échantillons présentant différentes concentrations en U ainsi que les concentrations en FET-U et U sorbé en fonction de la concentration initiale en U.

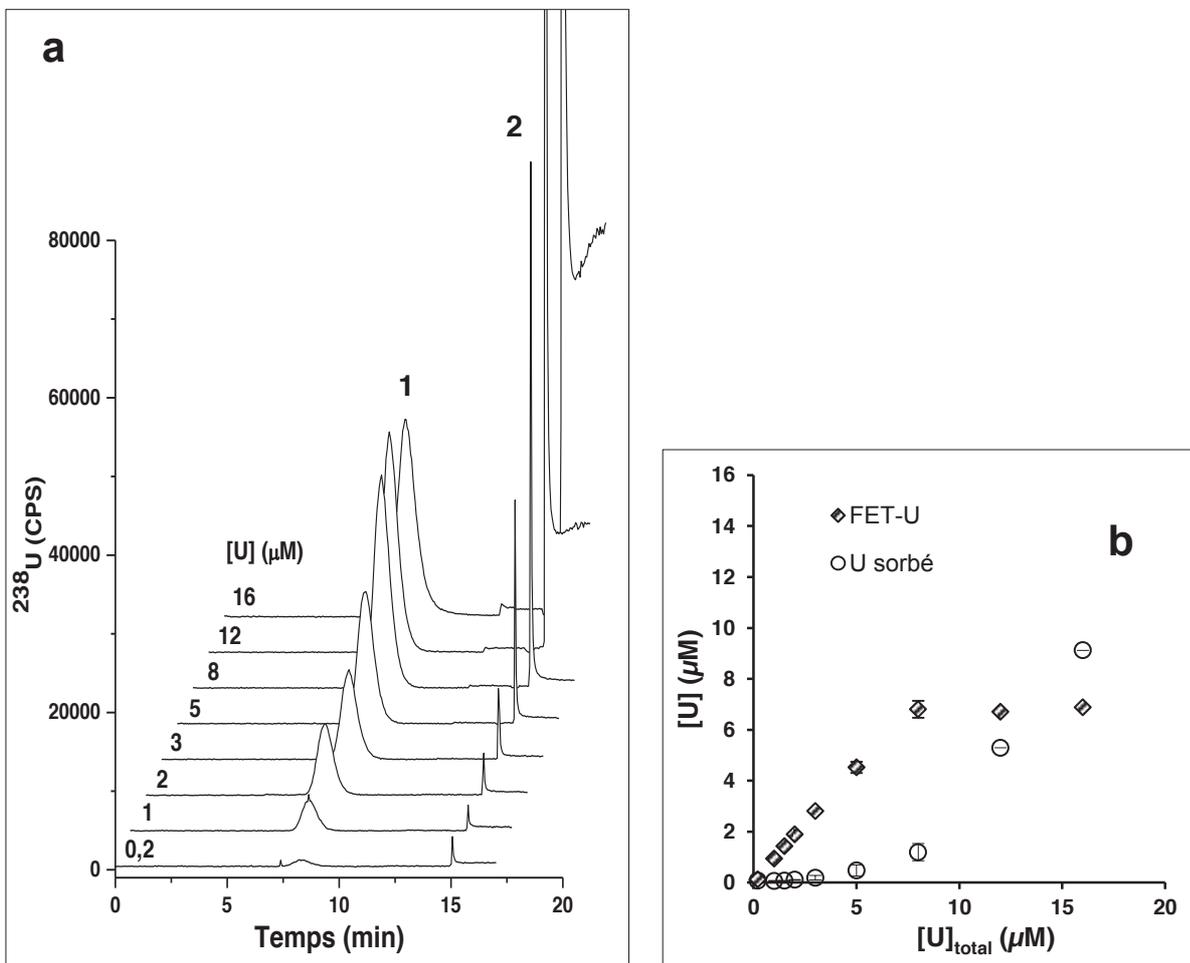


Figure 4.3 : Influence de la concentration initiale en uranium sur la formation du complexe FET-U. (a) Séparation CE-ICP/MS des différents mélanges d'incubation, (b) concentration des espèces d'U.

1- FET-U, 2- U sorbé-

Échantillons: FET 8 μM et U à différentes concentrations à pH 7,4, incubés à 37°C / 2 h.
Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 kV + 0,2 psi à 25°C.
Détection : ICP/MS à m/z = 238. Liquide additionnel : TRIS 5 mM, pH 7,4.

On constate que jusqu'à 8 μM d'U, une augmentation de la concentration initiale en uranium conduit à une augmentation du complexe FET-U en solution. Cette formation est quasi-quantitative, indiquant la forte affinité de FET pour U. Cependant, à partir de 8 μM d'uranium (où le rapport $[\text{FET}]_0 : [\text{U}]_0 = 1 : 1$), la concentration en complexe reste identique et seul l'U sorbé augmente, indiquant soit la saturation des sites de la FET présentant une affinité pour l'uranium et donc, une stoechiométrie 1 :1 des complexes formés, soit la présence de sites labiles supplémentaires qui ne pourraient être vus en CE-ICP/MS compte-tenu de la dissociation.

4.2.3. Interaction entre ostéopontine (OPN) et uranium

L'ostéopontine bovine (OPN) Lacprodan®OPN-10 a été fournie par Arla Foods Ingredients, Aarhus, Danemark. Selon les informations transmises par cette société, l'échantillon contient 15 % d'OPN entière (eOPN) et 85 % de son fragment le plus grand (fOPN). La présence de plusieurs fragments dans l'échantillon d'OPN nous a conduits à envisager son instabilité *in vitro*. Ainsi, la purification de cette protéine ainsi que l'étude de sa stabilité ont été réalisées et sont décrites en annexe 2.

4.2.3.1. Affinité des différentes « formes » de l'OPN pour l'uranium

L'affinité pour l'uranium de l'OPN et de ses produits de dégradation a été étudiée. L'eOPN, l'eOPN décongelée, la fOPN et la fraction P4 (voir Figure A2.1, Annexe2) ont été incubées 37°C / 2 h en présence d'U (8 : 1) dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4. Ces échantillons ont été analysés dans un capillaire de silice vierge. Le TBP 0,01 % dans le DMSO 2 % a été utilisé comme marqueur neutre pour mesurer l'EOF.

La Figure 4.4 représente les électrophorégrammes obtenus pour les différents composés issus de la purification de l'OPN en présence d'uranium. Les mobilités électrophorétiques calculées pour eOPN-U, fOPN-U et P4-U sont de $(-2,47 \pm 0,07) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(-2,43 \pm 0,03) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $(-2,92 \pm 0,07) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivement. Ceci montre une co-migration de eOPN et fOPN et indique qu'on ne pourra pas détecter ce clivage dans ces conditions. La présence de ^{31}P confirme que eOPN et fOPN (Figure 4.4 a, b et c) sont hyperphosphorylés tandis que la fraction P4 n'est que peu ou pas phosphorylée (Figure 4.4 d). Les pourcentages de complexes présentés dans le Tableau 4.2 montrent que les protéines eOPN et fOPN présentent une affinité comparable pour l'uranium (les pourcentages des deux complexes protéine-uranium étant de $(82,1 \pm 0,9) \%$ et $(86,8 \pm 0,9) \%$ respectivement), plus importante que celle de la fraction P4 ($18 \pm 1 \%$). Dans l'échantillon d'eOPN décongelée, on note la présence d'une impureté qui fixe $(10,2 \pm 0,3) \%$ de l'uranium

(Figure 4.4 b). Ceci confirme la dégradation de cette protéine après une conservation à -20°C pendant 2 ans.

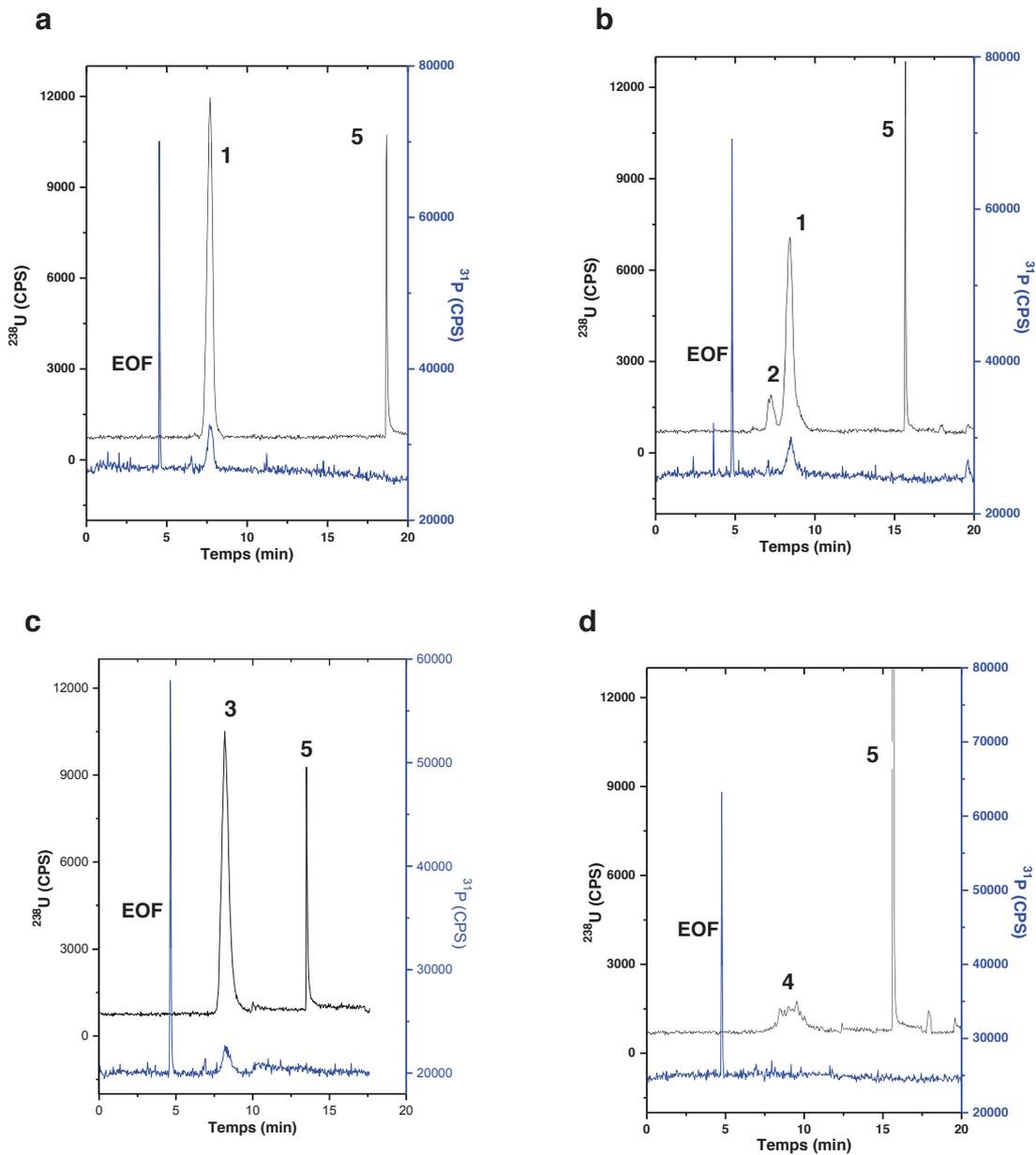


Figure 4.4 : Electrophérogrammes des différentes « formes » de l'OPN en présence de l'uranium.
 1- eOPN-U, 2-composé issu de la dégradation de l'eOPN congelée-U, 3- fOPN-U, 4- OPN P4-U, 5-U_{sorbé}.

Échantillons: eOPN 8 μM (a), eOPN décongelée 8 μM (b), fOPN 8 μM (c), fraction P4 8 μM (d) en présence de l'U 1 μM dans un mélange TRIS 10 mM et NaCl 15 mM, pH 7,4 incubés 37°C / 2 h.

Injection : marqueur neutre TPB 0,01 % dans le DMSO 2% 0,3 psi – 3 s, échantillon 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d, électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : ICP/MS à m/z = 31 et 238. Liquide additionnel : HNO₃ 1 mM.

Tableau 4.2 : Répartition de l'uranium pour les différentes formes de l'OPN.

Echantillons	% Prot-U	% Sous-produit-U	% U _{sorbé}
eOPN 8 μ M, U 1 μ M	82,1 \pm 0,9	-	17,9 \pm 0,9
eOPN décongelée 8 μ M, U 1 μ M	72 \pm 3	10,2 \pm 0,3	18 \pm 2
fOPN 8 μ M, U 1 μ M	86,8 \pm 0,9	-	13,2 \pm 0,9
OPN P4 8 μ M, U 1 μ M	18 \pm 1	-	82 \pm 1

En conclusion, eOPN apparaît comme une protéine instable. Même si nous avons montré qu'elle résiste aux conditions d'incubation, sa conservation est difficile. Cependant, fOPN possède de nombreuses similitudes avec eOPN. En particulier, il possède la plupart des phosphorylations présentes dans la protéine entière (23 \pm 1 pour fOPN et 25 \pm 1 pour eOPN, Tableau 4.3 présenté dans les pages suivantes) et une très forte affinité pour l'uranium, comparable à celle d'eOPN. Pour la suite de nos études, fOPN a donc été utilisé en raison de sa stabilité.

4.2.3.2. Impact des phosphorylations de l'OPN

Afin d'étudier l'impact de la phosphorylation de l'OPN sur son affinité avec l'uranium, l'OPN et son fragment principal ont été déphosphorylés à l'aide de la protéine Lamda phosphatase (Lamda PPase 100000 U, Biolabs). Avant utilisation, l'enzyme a été diluée par 2 dans le tampon préconisé par le distributeur (NEbuffer, MnCl₂). Elle a été ajoutée à la protéine (eOPN ou fOPN dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) à raison de 10 U d'enzyme / nmol phosphate présent dans la protéine et le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min. Un nouvel ajout de 5 U d'enzyme / nM phosphate a ensuite été réalisé, suivi d'une nouvelle incubation à 37°C pendant 15 min.

Les protéines déphosphorylées ont été purifiées par SEC. Les conditions ont été décrites préalablement dans l'annexe 2. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure 4.5. Pour des volumes d'élution compris entre 7,9 ml et 9,4 ml, des fractions de 0,5 ml ont été collectées et concentrées par centrifugation avec un filtre de cut-off à 10 kDa, puis conservées au congélateur à - 20°C.

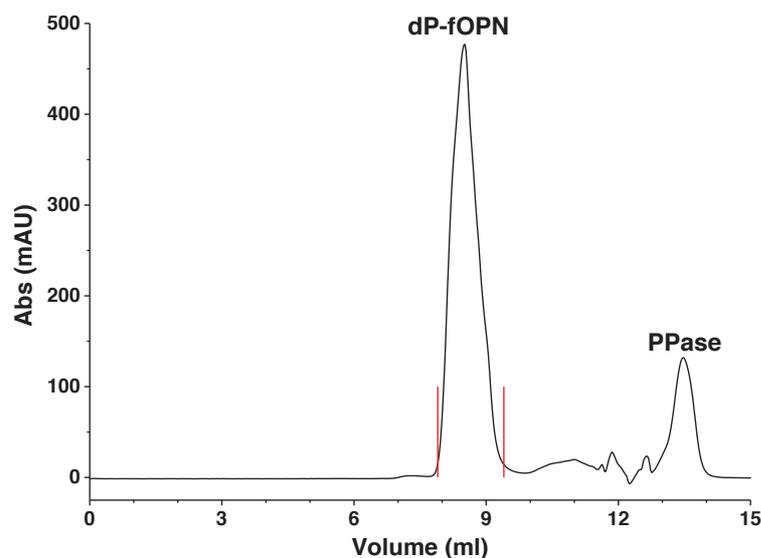


Figure 4.5 : Chromatogramme de la purification de fOPN déphosphorylé par SEC.

Conditions chromatographiques : Injection : 150 μ l, colonne : SEC-3 (7,8 mm i.d. x 30 cm, 3 μ m).
 Tampon d'éluion : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4, débit : 1 ml/min.
 Détection : UV à 280 nm.

Le taux de phosphorylation des OPNs a été mesuré par quantification du phosphore en ICP/MS. Des essais préalables ont montré une précipitation des solutions concentrées d'OPN dans HNO_3 1mM. Les protéines ont donc été minéralisées dans un mélange d'acide nitrique ultra-pur et de peroxyde d'hydrogène (100 μ l solution de protéine : 300 μ l HNO_3 : 200 μ l H_2O_2) à 76°C pendant la nuit avant analyse. Après minéralisation, les échantillons ont été dilués dans HNO_3 1mM avant l'analyse en ICP-MS. Une courbe d'étalonnage du phosphore dans une gamme allant de 20 $\mu\text{g/l}$ à 150 $\mu\text{g/l}$ a été réalisée dans HNO_3 1mM ($R^2 = 0,9999$).

Les résultats dans le Tableau 4.3 montrent que l'eOPN possède 25 phosphorylations, ce qui est en accord avec les études précédentes,^{119,127} et que le fragment porte la majorité de ces phosphorylations (23 ± 1 contre 25 ± 1 phosphorylations). De plus, même si la déphosphorylation n'est pas totale, elle est efficace car le nombre de phosphorylations a fortement diminué : de (25 ± 1) à (5 ± 1) pour l'eOPN et de (23 ± 1) à ($6,8 \pm 0,4$) pour le fOPN.

Tableau 4.3 : Phosphorylations des OPNs mesurées en ICP/MS.

Protéine	eOPN	fOPN	dP-eOPN	dP-fOPN
Phosphore/Protéine	25 ± 1	23 ± 1	5 ± 1	$6,8 \pm 0,4$

Les OPNs déphosphorylées ont été utilisées pour étudier l'impact de la phosphorylation sur l'affinité de l'OPN pour l'uranium. Des mélanges de dP-fOPN et U (8 :1) et dP-eOPN et U (20 :1) ont été réalisés dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, à pH 7,4 et incubés

à 37°C pendant 2 h. Les échantillons ont ensuite été analysés en CE-ICP/MS. L'analyse du complexe dP-fOPN-U a été réalisée dans un capillaire neutre d'HPC et celle du complexe dP-eOPN dans un capillaire de silice à 25 kV.

Les électrophérogrammes de la Figure 4.6 représentent l'analyse des complexes formés entre dP-fOPN (a)/ dP-eOPN (b) et l'uranium. L'absence de signal de phosphore dans les deux électrophorégrammes confirme la diminution du nombre de phosphorylations dans les protéines. Pour les deux mélanges, les pics correspondant aux complexes sont beaucoup plus larges que ceux de leurs homologues phosphorylés et semblent dédoublés, ce qui semble indiquer une déphosphorylation inhomogène.

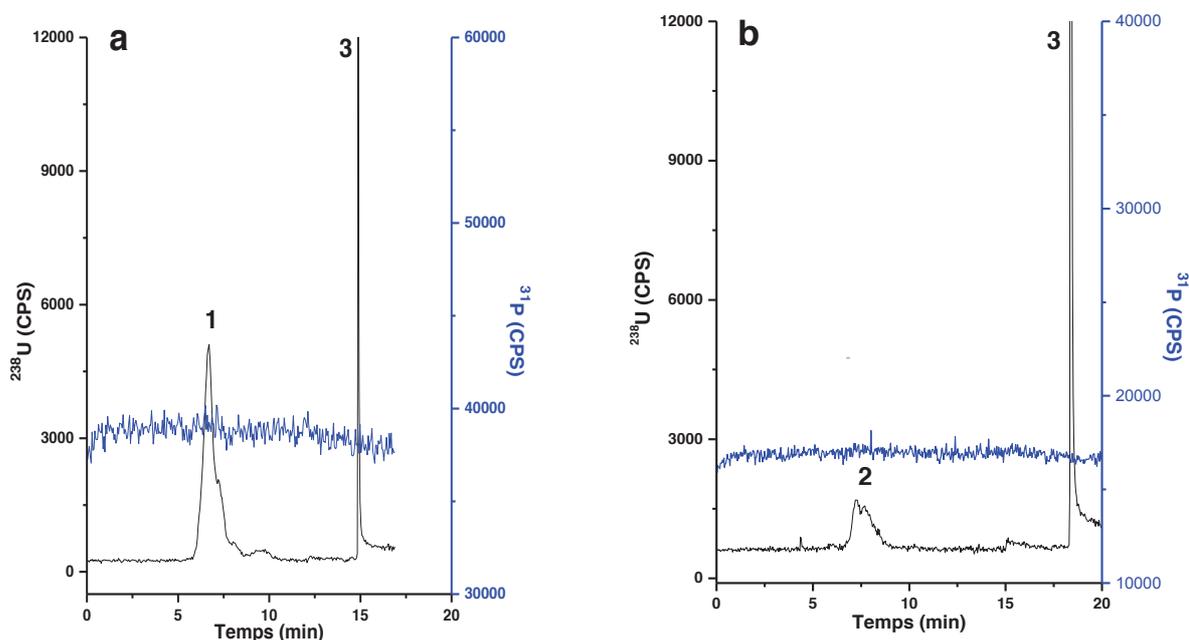


Figure 4.6 : Analyse des complexes dP-fOPN-U (a) et dP-eOPN-U (b) par CE-ICP/MS.
1-dP-fOPN-U, 2-dP-eOPN-U, 3- $U_{\text{sorbé}}$.

Échantillons: (a) : dP-fOPN 8 μM / (b) dP-eOPN 20 μM en présence de l'U 1 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 incubés 37°C / 2 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : a) : capillaire neutre d'HPC, -30 kV + 0,2 psi à 25°C, (b) capillaire de silice, 25 kV à 25°C, électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4.

Détection : ICP/MS à $m/z = 31$ et 238. Liquide additionnel : (a) HNO_3 1 mM ; (b) TRIS 5 mM à pH 7,4.

La distribution de l'uranium calculée dans les échantillons est récapitulée dans le Tableau 4.4. En présence d'une concentration de 8 μM , dP-fOPN contient (77 ± 1) % de l'U alors que le fragment non déphosphorylé contient ($86,8 \pm 0,9$) % de l'U dans les mêmes conditions. Ceci dénote une diminution de l'affinité avec la réduction du nombre de phosphorylations mais celle-ci reste néanmoins faible. En revanche, aucune affinité pour l'U de dP-eOPN n'a été observée dans ces conditions et une augmentation de la concentration à 20 μM a été nécessaire pour observer une complexation de (12 ± 2) % de l'U par celle-ci. Ceci démontre dans ce cas une influence remarquable des phosphorylations dans le cas de l'eOPN. Même

si nous n'avons encore aucune explication à proposer pour ce phénomène, il est intéressant de noter que Qi *et al.*⁸⁶ ont observé une tendance identique et une diminution de l'affinité pour l'uranium après la déphosphorylation de 60 à 100 fois pour eOPN et 10 à 15 fois pour fOPN.

Tableau 4.4 : Répartition de l'uranium dans les formes déphosphorylées de l'OPN.

Echantillons	% Prot-U	% U _{sorbé}
dP-eOPN 20 μ M, U 1 μ M	(12 \pm 2) %	(88 \pm 2) %
dP-fOPN 8 μ M, U 1 μ M	(77 \pm 1) %	(23 \pm 1) %

4.2.3.3. Capacité de fixation d'uranium de fOPN

Afin d'étudier la capacité de fixation d'uranium de fOPN, des solutions de fOPN 13,5 μ M dans TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, ont été incubées à 37°C pendant 2 h en présence de concentrations croissantes d'uranium (0,2 μ M à 16 μ M). Les analyses ont été réalisées dans des conditions identiques à celles décrites dans le paragraphe 4.2.2.2. Dans ce cas, l'utilisation d'un capillaire neutre est incontournable, afin de s'affranchir de la sorption présumée de l'OPN.

La Figure 4.7 représente les électrophérogrammes obtenus pour ces différents mélanges ainsi que les concentrations en uranium libre et lié à la protéine.

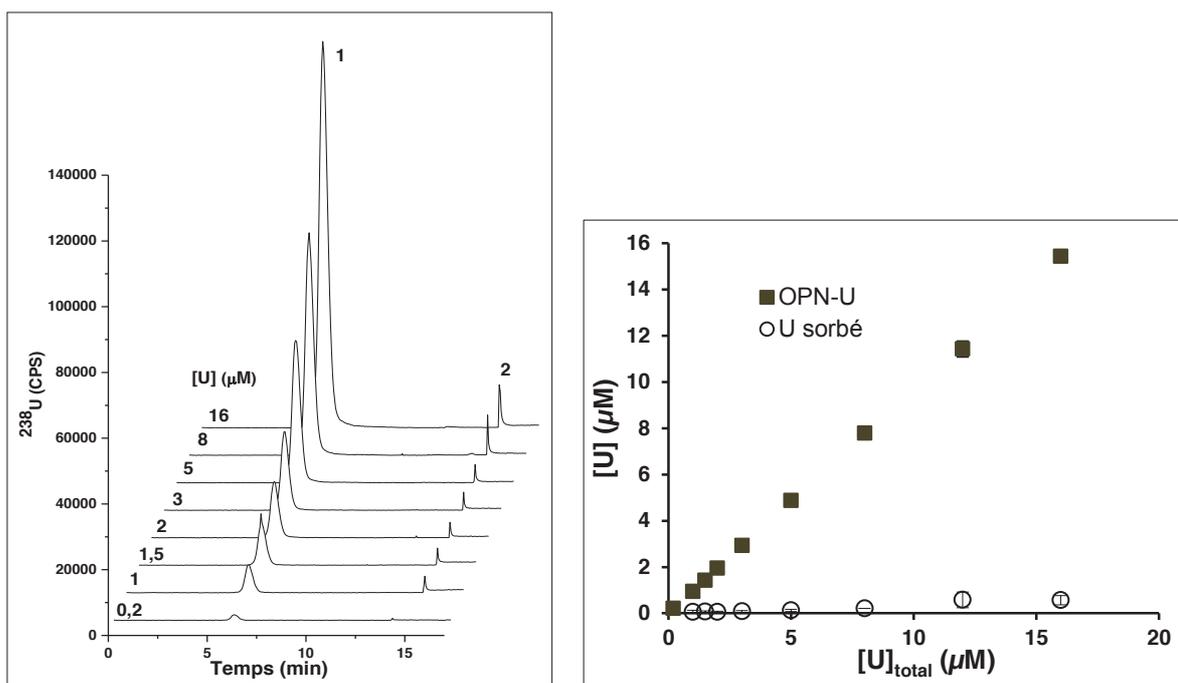


Figure 4.7 : Analyse des complexes entre fOPN et uranium par CE-ICP/MS (gauche) et courbe représentant les concentrations des espèces en uranium des différentes espèces dans chaque condition (droite).

1- fOPN-U, 2- $\text{U}_{\text{sorbé}}$

Échantillons: fOPN 13,5 μM et U 0,2 – 16 μM dans TRIS 10 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4, incubés à 37°C / 2 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 kV + 0,2 psi à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : TRIS 5 mM, pH 7,4.

Ces résultats montrent que sur toute la gamme de concentration, la concentration en uranium complexé par fOPN augmente de façon linéaire avec la concentration en uranium total, et ce avec une pente voisine de 1. Cependant, contrairement à FET, on n'observe pas de saturation des sites lorsque la concentration en uranium atteint celle de la protéine. Ceci démontre que cette protéine a plusieurs sites de forte affinité pour l'uranium, ce qui est en accord avec l'étude de Qi *et al.*⁸⁶

4.3. Effet des carbonates sur la formation des complexes d'uranyle avec les protéines sériques

Le sang contient 20 – 25 mM de carbonate total dont la forme majoritaire est le bicarbonate (HCO_3^-). Plusieurs études démontrent la complexation entre l'uranium et le carbonate.^{185–187}

Le Tableau 4.5 récapitule les constantes d'équilibre impliquant l'uranium et le carbonate en solution aqueuse.

Tableau 4.5 : Constantes d'équilibre impliquant l'uranium et le carbonate en solution aqueuse.

	log K (Force ionique = 0)	Référence
$\text{UO}_2^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})^+ + \text{H}^+$	-5.25	[188]
$\text{UO}_2^{2+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2^{2+}(\text{OH})_2 + 2 \text{H}^+$	-12.15	[188]
$\text{UO}_2^{2+} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})_3^- + 3 \text{H}^+$	-20.25	[188]
$\text{UO}_2^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)$	9.94	[188]
$\text{UO}_2^{2+} + 2 \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$	16.61	[188]
$\text{UO}_2^{2+} + 3 \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	21.84	[188]
$2 \text{UO}_2^{2+} + \text{CO}_3^{2-} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{UO}_2)_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_3 + 3 \text{H}^+$	-0.86	[188]
$\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	-6.38	[189]
$\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$	-10.32	[189]

Il faut bien noter qu'en atmosphère non contrôlée, compte-tenu de la pression partielle de CO_2 ($p_{\text{CO}_2 \text{ atmosphérique}} = 3,6 \cdot 10^{-4}$), la concentration de bicarbonate en solution aqueuse est d'environ 200 μM à pH 7,4. De plus, le bicarbonate est connu comme étant un anion synergique dans la fixation sur TF des métaux tels que le Fe^{3+} ,⁹⁰⁻⁹⁴ le VO^{2+} ,¹⁰³ et l' UO_2^{2+} ,^{40,41,99} l' Al^{3+} ,⁹⁴ le Ga^{3+} ,⁹⁴ l' In^{3+} ,⁹⁴ et le Tl^{3+} .⁹⁴

Nous avons choisi d'étudier son influence dans l'interaction entre les protéines du sérum et l'uranium afin de déterminer son rôle mais aussi de l'utiliser comme ligand de référence pour évaluer l'affinité relative des protéines. FET et TF ont été utilisées pour étudier ce phénomène.

4.3.1. Étude du système FET / bicarbonate

Nous avons donc réalisé différents échantillons de FET présentant des concentrations croissantes en bicarbonate.

Le bicarbonate a été ajouté à des concentrations variant de 0 à 67 mM dans un échantillon composé de FET 10 μM et d'U 150 nM, dans TRIS 50 mM et NaCl 5 mM, pH 7,4. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 2 h. La séparation a été réalisée dans un capillaire de silice (64 cm x 75 μm i.d). La Figure 4.8 représente les électrophérogrammes de FET-U en présence de concentrations croissantes en bicarbonate ainsi que l'évolution de la concentration en complexe.

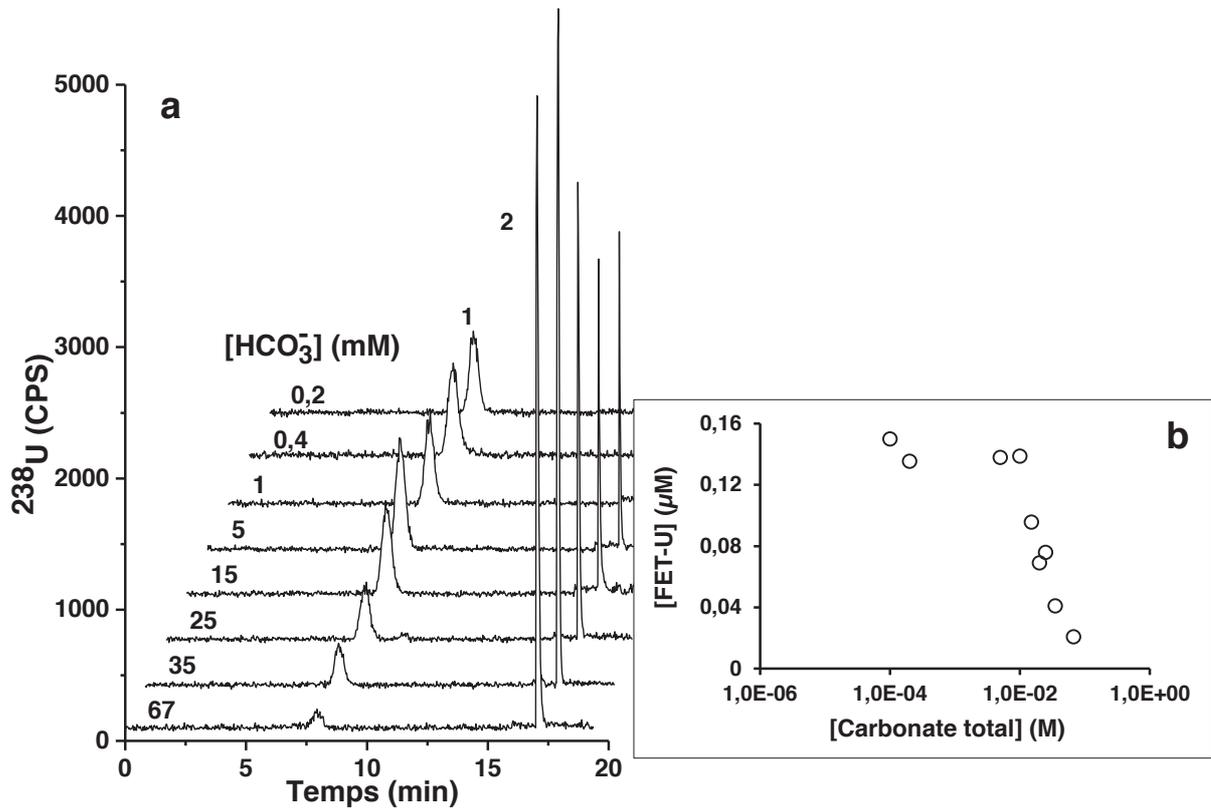


Figure 4.8 : Influence de la concentration en carbonate sur la formation du complexe FET-U
(a) analyses des complexes FET-U par CE-ICP/MS et (b) courbe présentant la concentration de complexe dans chaque condition.
 1- FET-U, 2- $U_{\text{sorbé}}$.

Échantillons: FET 10 μM et U 0,15 μM , HCO_3^- 0,2 – 67 mM, dans TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, à pH 7,4, incubés à 37°C / 2 h.
 Injection : 0,5 psi – 5 s.
 Séparation : capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d , électrolyte TRIS 50 mM, NaCl 5 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C.
 Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : HNO_3 1 mM.

Les résultats montrent que jusqu'à 10 mM de bicarbonate, la concentration en uranium lié à FET reste stable. Au-delà de cette concentration, on observe une décroissance de cette concentration attribuée au rôle compétiteur du bicarbonate vis-à-vis de l'uranium. Ces résultats montrent qu'en présence d'une concentration de bicarbonate de 22 mM, similaire à celle présente dans le sérum, 50 % de l'uranium total reste complexé à la fétuine.

En nous basant sur les résultats obtenus au paragraphe 4.2.2.2, nous avons, dans un premier temps, examiné l'hypothèse de la formation d'un complexe binaire de stœchiométrie de 1 :1. Dans ce cas, l'interaction entre FET et uranium peut être décrite par l'équilibre suivant :



et la constante associée K_1 :

$$K_1 = \frac{[FET(UO_2^{2+})]}{[FET][UO_2^{2+}]} \quad (4.2)$$

Avec un tel modèle, nous avons déterminé K_1 comme étant la constante conduisant au meilleur ajustement entre les données expérimentales et les données théoriques générées par le logiciel JChess (Ecole des Mines) en utilisant les constantes d'équilibre présentées dans le Tableau 4.5. Dans ces conditions, on obtient $\log K_1 = 13,6 \pm 0,3$. Ceci est bien supérieur à la constante calculée à partir des études réalisées en résonance plasmonique de surface (SPR)⁴⁴: $\log K_1 = 11,4 \pm 0,3$, comme l'illustre la Figure 4.9.

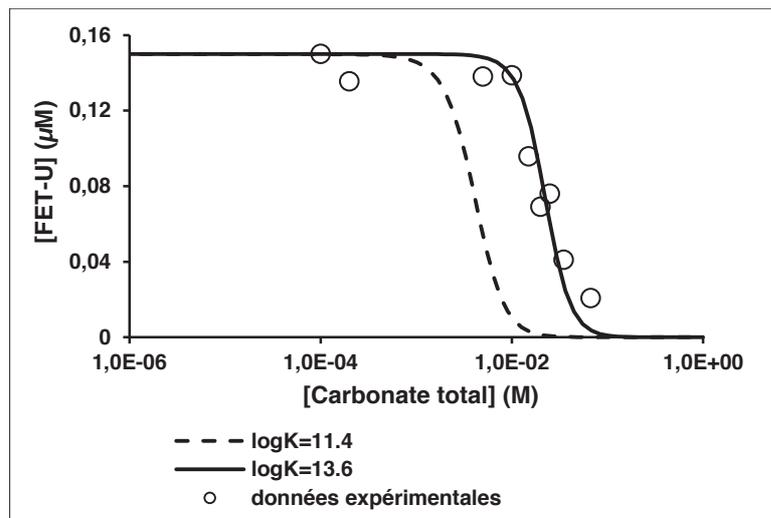


Figure 4.9 : Modélisation de la concentration du complexe FET-U en fonction de la concentration du carbonate pour $\log K_1 = 11,4$ et $13,6$.

Nous avons donc envisagé la formation d'un complexe ternaire impliquant le carbonate selon l'équilibre (4.3) :



$$K_2 = \frac{[FET(UO_2^{2+})(CO_3^{2-})]}{[FET(UO_2^{2+})][CO_3^{2-}]} \quad (4.4)$$

La formation de tels complexes ternaires uranium – protéine/peptide et carbonate a déjà été démontrée dans le cas de de TF,⁴⁰ d'HSA^{41,190} mais aussi dans le cas de peptides.¹⁹¹

En prenant en compte les deux équilibres (4.1) et (4.3) et en utilisant $\log K_1 = 11,4$ pour le premier équilibre, le meilleur ajustement entre données théoriques et données expérimentales a été obtenu pour $\log K_2 = 7,4 \pm 0,1$.

La Figure 4.10 représente la répartition de l'uranium obtenue avec ces constantes dans une solution de FET 10 μM , U 0,15 μM en présence de bicarbonate, à pH 7,4. Les résultats montrent que le complexe $\text{FET}(\text{UO}_2^{2+})$ ne se forme majoritairement qu'en présence d'une très faible concentration de bicarbonate ($< 110 \mu\text{M}$), puis le complexe $\text{FET}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})$ devient majoritaire pour une concentration en bicarbonate comprise entre 110 μM et 24 mM et atteint maximum avec une concentration de bicarbonate de 3 mM. A partir de 24 mM de bicarbonate, la forme $(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3^{4-}$ est majoritaire et le carbonate devient un compétiteur de la protéine vis-à-vis de la complexation de l'uranium. Cette proposition est en accord avec les études réalisées en SPR en présence d'une faible concentration de bicarbonate.⁴⁴ Elle semble également indiquer que dans le sérum en présence de 20 à 25 mM de bicarbonate, le complexe ternaire $\text{FET}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})$ et le complexe $(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3^{4-}$ seraient les formes prédominantes de l'uranium et que FET complexerait 50 % de l'uranium en absence de tout autre équilibre.

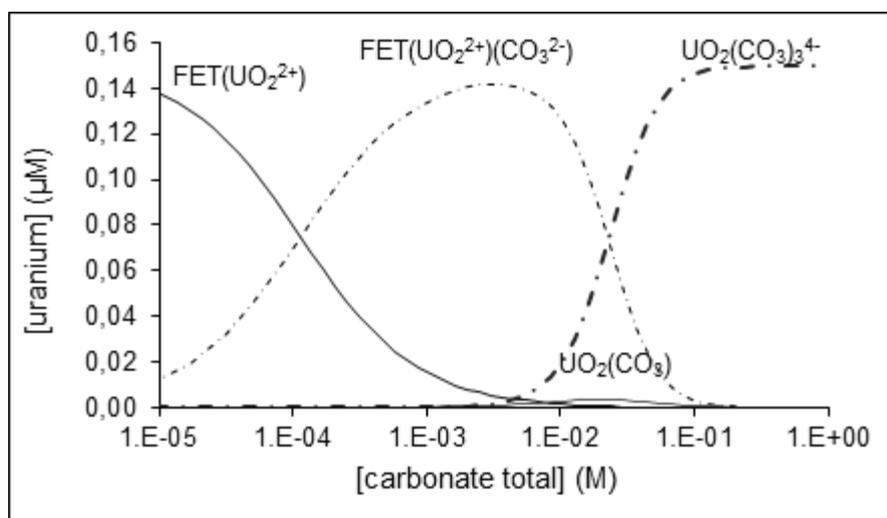


Figure 4.10 : Spéciation de l'uranium en présence de FET et de bicarbonate. $\log K_1 (\text{FET}(\text{UO}_2^{2+})) = 11,4$ et $\log K_2 (\text{FET}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})) = 7,4$.

4.3.2. Étude du système TF / bicarbonate

De façon similaire à l'étude entreprise dans le cas de FET, nous avons étudié le système TF/bicarbonate.

Pour cela, nous avons réalisé des échantillons contenant 32 μM de TF et 1 μM d'uranium en présence de concentrations croissantes en bicarbonate dans un mélange de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4 et incubé ces échantillons durant 4 h à 37°C. Les conditions d'analyse sont identiques à celles décrites dans le paragraphe 4.2.1.2.

La Figure 4.11 montre les électrophérogrammes obtenus pour ces échantillons ainsi que la courbe représentant le pourcentage d'uranium lié à TF en fonction de la concentration initiale en bicarbonate. On constate une fixation maximale de l'uranium sur la protéine correspondant à 40 % de l'uranium initial. Ce faible pourcentage est vraisemblablement dû à une sorption compétitive de l'uranium sur les silanols. La formation d'un complexe ternaire avec le carbonate a vraisemblablement lieu jusqu'à une concentration de 300 μM . Au-delà de cette concentration, la fixation de l'uranium par TF diminue rapidement pour être totalement annihilée à une concentration de 4 mM de bicarbonate, où on n'observe plus de complexe TF-U. Ce phénomène a également été observée en fluorescence par Montavon *et al.*⁴¹, à savoir la formation d'un complexe ternaire à faible concentration en carbonate puis le rôle de compétiteur joué par celui-ci à des concentrations plus importantes. De plus, il faut noter qu'une diminution de moitié du complexe TF-U correspond à une concentration en bicarbonate de 1,2 mM environ.

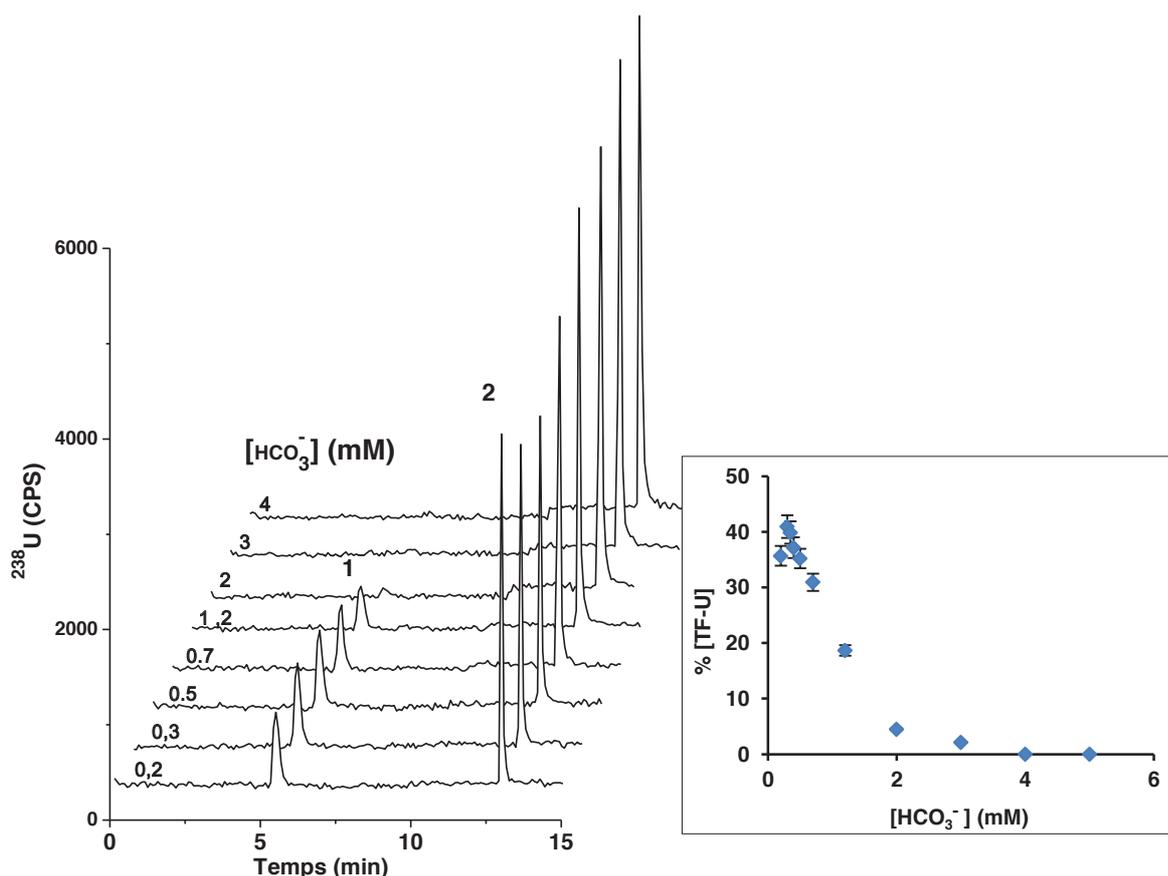


Figure 4.11 : Analyse des complexes TF-U en présence de bicarbonate par CE-ICP/MS et courbe représentant le pourcentage d'uranium impliqué dans ce complexe.

1- TF-U, 2- U_{sorbé}.

Échantillons: TF 32 μM , U 1 μM , HCO₃⁻ de 0,2 – 5 mM, à pH 7,4, incubés 37°C / 4 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation Capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : ICP/MS à m/z = 238. Liquide additionnel : HNO₃ 1 mM.

Cependant, un traitement des données identique à celui réalisé dans le cas de FET n'est pas possible, et ce pour plusieurs raisons :

- une complexité due à TF : cette protéine possède à priori deux sites de complexation de l'uranium dont les constantes ont été rapportées comme différant d'un log, quel que soit le métal. De plus, dans le sang, nous avons vu que les sites de cette protéine étaient partiellement occupés par des ions ferriques. Ces ions interviennent donc dans les équilibres impliquant TF et le carbonate,
- une complexité due à la plus faible affinité de TF pour l'uranium : En effet, si on peut s'affranchir relativement aisément des interactions avec les silanols de surface en présence de protéines complexant fortement l'uranium, ce n'est plus le cas pour TF. De plus, avec un tel système analytique, il n'est pas possible de faire la part entre uranium lié aux carbonates et uranium sorbé à la surface,
- les concentrations en bicarbonate, pour lesquelles une diminution notable du pourcentage de complexe est observée, sont inférieures au mM et de ce fait, difficiles à maintenir précisément en atmosphère non contrôlée.

4.4. Étude compétitive avec FET

Le rôle synergique du carbonate, mis en évidence dans les paragraphes ci-dessus ne permet pas d'utiliser ce ligand comme compétiteur afin de déterminer les constantes d'affinité des différentes protéines. Nous avons donc choisi d'utiliser FET pour jouer ce rôle.

4.4.1. Étude compétitive OPN / FET

Nous avons donc réalisé une étude compétitive entre OPN et FET afin de comparer leur affinité vis-à-vis de l'uranium. Différentes solutions contenant 1 μM d'uranium, 13,5 μM de fOPN et FET en concentrations croissantes ont été réalisées dans un mélange de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. Après incubation 2 h à 37°C, l'analyse de ces solutions a été réalisée en CE-ICP/MS. Les conditions d'analyse étaient identiques à celles décrites dans le paragraphe 4.2.2.2. Les électrophérogrammes obtenus ainsi que la répartition de l'uranium entre les différentes espèces sont présentés dans la Figure 4.12. On constate que pour que 50 % de l'uranium se fixe sur FET, il est nécessaire d'avoir une concentration de FET 1,18 fois plus importante que celle de fOPN. A partir de cette donnée, on peut donc estimer la constante globale de formation du complexe OPN(UO_2^{2+}), telle que :

$$\log K_{1,\text{fOPN}} = \log K_{1,\text{FET}} - \log [\text{fOPN}]/[\text{FET}]_{50}. \quad (4.5)$$

où $[FET]_{50}$ représente la concentration de FET nécessaire à une répartition équimolaire de l'uranium entre les deux protéines.

Dans ce cas, $\log K_{1,fOPN} = 11,5 \pm 0,3$ et fOPN présente donc une affinité pour l'uranium très similaire à celle de FET.

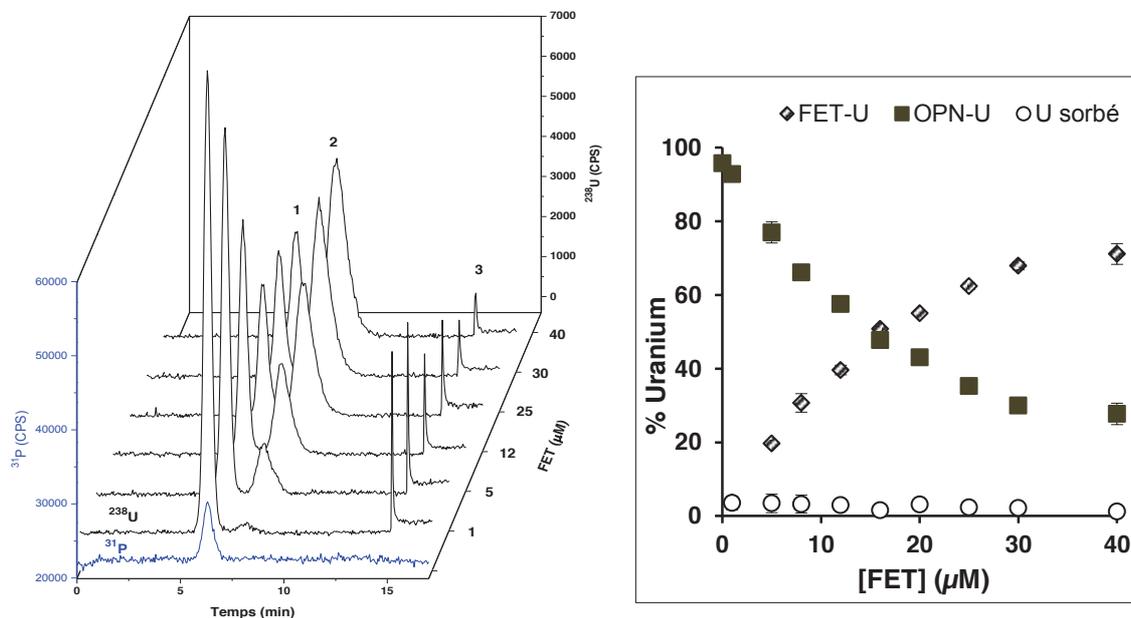


Figure 4.12 : Analyse des complexes fOPN-U en présence de FET en concentrations croissantes et courbe représentant le pourcentage d'uranium impliqué dans les différentes espèces.

1- fOPN-U, 2- FET-U, 3- U_{sorbé}.

Échantillons: fOPN 13,5 μM , et FET à différentes concentrations à pH 7,4, incubés en présence d'U 1 μM à 37°C / 2 h. Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 kV + 0,2 psi à 25°C.

Détection : ICP/MS à $m/z = 31$ et 238. Liquide additionnel : TRIS 5 mM, pH 7,4.

Comme nous l'avons vu au paragraphe 4.2.3.3, l'OPN possède au moins deux sites présentant une forte affinité pour l'uranium. Afin de mettre en évidence le rôle de ces sites, une étude de l'influence de la concentration en uranium a été réalisée en présence de ces deux protéines : FET 8 μM et fOPN 13,5 μM , pour des concentrations d'uranium supérieures aux concentrations en protéines (0 - 16 μM). Les complexes ont été identifiés par leur temps de migration, celui impliquant fOPN-U étant conforté par la présence simultanée de ^{31}P et ^{238}U dans les électrophorégrammes de la Figure 4.13.

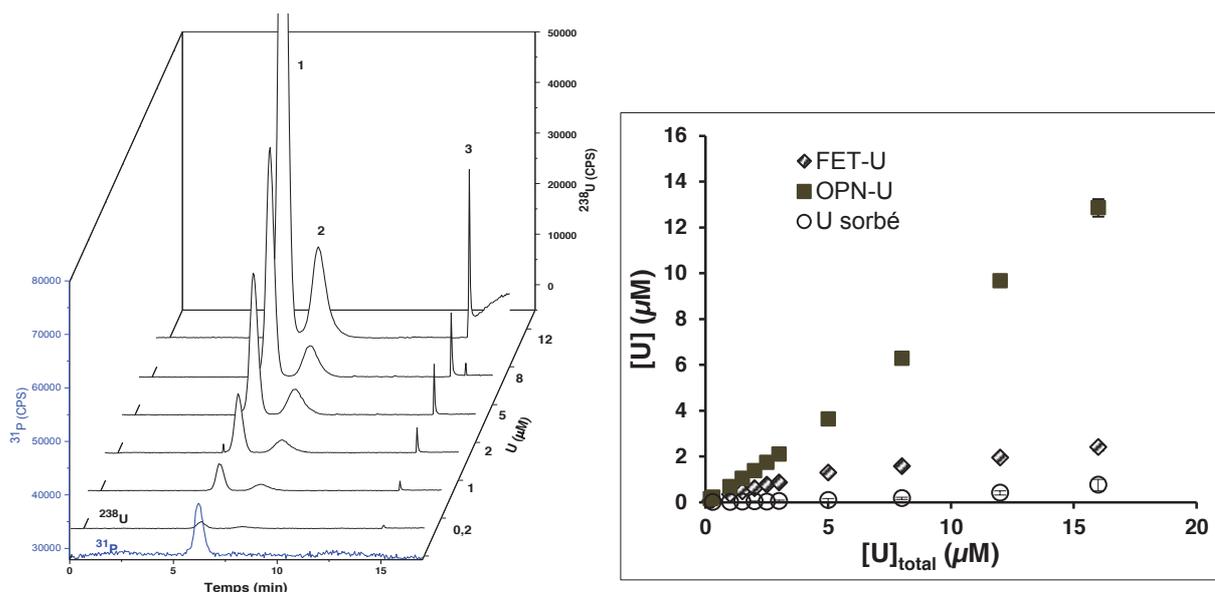


Figure 4.13 : Analyse des complexes fOPN-U et FET-U en présence d'uranium en concentrations croissantes.

1- fOPN-U, 2- FET-U, 3- U_{sorbé}.

Échantillons : mélanges de fOPN 13,5 μM, FET 8 μM et U à différentes concentrations à pH 7,4, incubés à 37°C / 2 h.
Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : capillaire neutre d'HPC 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, - 30 kV + 0,2 psi à 25°C.
Détection : ICP/MS à m/z = 31 et 238. Liquide additionnel : TRIS 5 mM, pH 7,4.

A faible concentration en uranium, les concentrations en U dans les protéines croissent de façon linéaire avec la concentration initiale en U. La distribution en U entre fOPN et FET est de l'ordre de 2 :1, ce qui est en accord avec des constantes d'affinité similaire et un rapport de concentration fOPN : FET de 13,5 : 8. A partir de 5 μM d'uranium, la courbe FET-U = f(U) tend à s'infléchir. A contrario, le pourcentage d'U lié à fOPN devient fortement prépondérant et atteint 85 % pour une concentration initiale en U de 16 μM. Une première tentative de modélisation réalisée par comparaison avec la distribution calculée par JChess conduit aux constantes d'équilibre : $\log K_{1,FET} = 11,4$, $\log K_{1,fOPN} = 11,5$ et $\log K_{2,fOPN} = 12,5$, dont les deux dernières constantes correspondant aux deux équilibres suivants :



Même si $\log K_{2,fOPN}$ ne représente qu'une estimation, compte tenu du nombre d'expériences réalisées, il semble raisonnable de conclure que la présence d'un uranium complexé induit une augmentation de l'affinité de la protéine d'un facteur 10 lors de la complexation du 2^{ème} uranium. Une telle coopérativité positive a déjà été observée avec des protéines/peptides présentant une affinité pour Ca^{2+} , comme HRP¹⁹² ou la calmoduline¹⁹³.

4.4.2. Étude compétitive TF / FET

Une étude identique a été réalisée afin de déterminer l'affinité de TF pour l'uranium. FET a été ajoutée à différentes concentrations dans des échantillons contenant TF 32 μM et U 1 μM dans un mélange TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. L'incubation a été réalisée pendant 4 h à 37°C pour atteindre l'équilibre. Les conditions d'analyse ont été conservées identiques à celles du paragraphe 4.2.1.2.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 4.14.

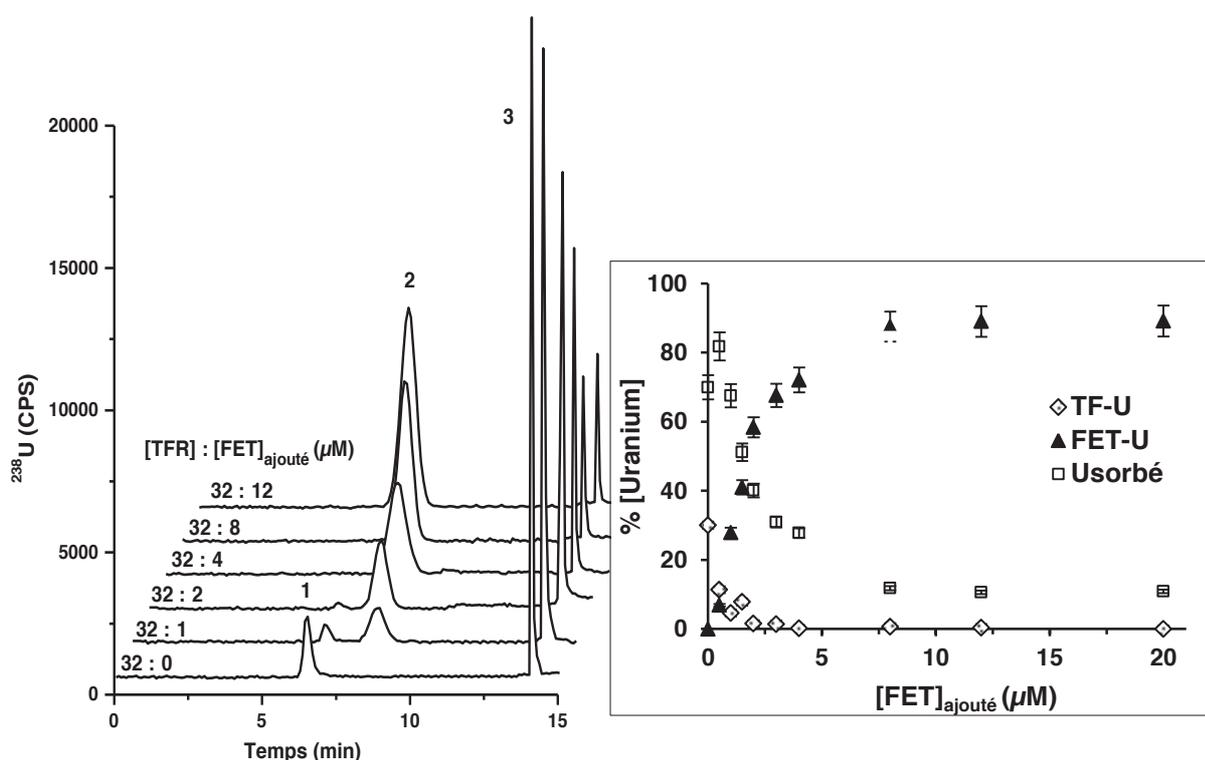


Figure 4.14 : Analyse de la compétition entre TF et FET vis-à-vis de l'uranium et courbe représentant le pourcentage d'uranium impliqué dans les complexes.

1- TF-U, 2- FET-U, 3- Usorbé.

Échantillons: TF 32 μM , U 1 μM , FET de 0 à 12 μM , à pH 7,4 incubés 37°C / 4 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation capillaire de silice 64 cm x 75 μm i.d., électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : ICP/MS à m/z = 238. Liquide additionnel : HNO₃ 1 mM.

Les résultats indiquent que le complexe TF-U diminue rapidement et ce, dès de faibles concentrations en FET. A partir de 4 μM FET (pour 32 μM TF), plus aucun complexe TF-U n'est observé sur les électrophérogrammes. De plus, en absence de FET, seuls 35 % de l'uranium sont fixés sur la transferrine. Ceci confirme une fois encore la plus faible affinité de TF pour l'uranium. Dans ce cas aussi, l'accès à la constante de complexation semble difficile. En absence de FET, l'implication des silanols de surface dans la répartition de l'uranium avec cette protéine n'est pas négligeable. Contrairement aux études réalisées avec

OPN, dès l'ajout de faibles quantités de FET, la concentration en TF-U chute très rapidement, ce qui conduit à une imprécision des mesures plus importantes (variations fortes, faibles concentrations). L'obtention de données plus précises devra se faire au détriment des quantités de TF utilisées. De manière identique à ce qui a été entrepris précédemment, on constate qu'il faut une concentration en FET environ 20 fois plus faible que celle de TF pour complexer 50 % de l'uranium total. Ceci conduit $\log K_{1,TF} = 9,7 \pm 0,4$. Cette valeur reste néanmoins très hypothétique (la concentration d'uranium sorbé étant issue de la dissociation du complexe TF-U) et doit donc être prise comme une estimation de la constante.

4.5. Conclusion

En conclusion, le couplage CE-ICP/MS a démontré son intérêt dans la comparaison de l'affinité entre des protéines ou plusieurs formes d'une protéine (cas de l'OPN). Ainsi, à partir d'expériences simples et rapides, un premier classement par ordre d'affinité peut être proposé.

L'étude de l'interaction entre protéine individuelle et uranium montre que FET a un site de forte affinité pour l'uranium alors qu'OPN possède plusieurs sites. La comparaison des électrophérogrammes obtenus pour OPN et ses produits de dégradation montre que les affinités pour l'uranium de la protéine entière et de son grand fragment sont comparables, et que le taux de phosphorylation joue un rôle d'important dans la formation des complexes avec l'uranium.

De plus, la détermination des constantes de complexation via des études compétitives a permis de valider cette méthode en la comparant à d'autres méthodes plus conventionnelles. L'utilisation de compétiteurs permet de s'affranchir de la spéciation complexe de l'uranium à pH 7,4. Les résultats montrent que cette méthode est applicable pour les complexes peu labiles tels que FET-U et OPN-U ou même labiles tels que TF-U et carbonate-U en s'affranchissant de l'effet des silanols et des conditions d'analyse sur la distribution de l'uranium. Les constantes de complexation ont été calculées : $\log_{K1} \text{ FET-U} = 11,4 \pm 0,3$, $\log_{K1} \text{ fOPN-U} = 11,5 \pm 0,3$ et $\log_{K2} \text{ fOPN-U} = 12,5$. Le deuxième site de l'OPN semble montrer un effet coopératif du premier site dans l'affinité pour l'uranium. Quant à TF, qui forme un complexe d'affinité modérée avec l'uranium, la détermination de sa constante de complexation reste difficile à cause de la compétition non négligeable des silanols de surface du capillaire. Cependant, par l'analyse en compétition de FET et TF, sa constante de complexation a été estimée de $\log_{K1} \text{ TF-U} = 9,7 \pm 0,4$. Les résultats obtenus sont validés par des études précédentes réalisées en SPR et avec des méthodes spectroscopiques.^{44,49,86}

Il faut aussi noter que la rapidité des analyses (environ 20 min), leur automatisation, et la consommation très faible d'échantillon (environ 100 pmol par analyse) font également partie des grands avantages de cette méthode.

Chapitre 5. Application du couplage CE-ICP/MS au criblage des protéines cibles de l'uranium

Comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents, le maintien des interactions protéine-uranium tout au long de la séparation se fera au détriment de l'efficacité de séparation. Nous avons cependant montré que le couplage CE-ICP/MS permet d'obtenir des informations importantes sur la répartition de l'uranium à partir de mélanges simples : distribution parmi les protéines, constantes d'affinité, compétition ou synergie avec des petits ligands, etc.

La question qui se pose maintenant est de savoir si l'utilisation d'un tel outil peut être extrapolée à des mélanges complexes. En d'autres termes, la séparation par électrophorèse capillaire devra-t-elle être utilisée en association avec d'autres modes de séparation tels que la chromatographie d'exclusion stérique ?

Il faut également noter qu'un des grands avantages de ce couplage est la possibilité, en une seule séparation, d'avoir un accès direct à la répartition d'un ou plusieurs métaux dans un mélange de protéines. Ceci est possible grâce au caractère multi-élémentaire de la détection par ICP/MS. L'objectif est donc aussi d'exploiter le couplage CE-ICP/MS pour répondre à des problématiques liées à la compétition entre les métaux.

Dans cette optique, le chapitre qui suit sera divisé en deux parties distinctes :

- une partie consacrée à l'exploitation du caractère multi-élémentaire de l'ICP/MS pour étudier la présence simultanée de l'uranium et d'autres éléments pour l'occupation des sites. Pour ce faire, nous travaillerons sur le mélange des trois protéines, TF, FET et fOPN, étudié tout au long de cette thèse en présence ou non d'autres métaux,
- une partie consacrée à l'exploitation du potentiel séparatif de la CE pour étudier les compétitions entre protéines vis-à-vis de l'uranium dans le cas d'un fluide biologique, le sérum.

5.1. Influence des métaux présents dans le sang sur les complexes protéine-uranium

L'objectif de cette partie est d'exploiter le potentiel multi-élémentaire du couplage CE-ICP/MS dans l'étude simultanée de la complexation de l'uranium et des métaux essentiels présents dans le sérum avec les trois protéines : TF, FET, OPN.

Quatre métaux : le fer (II), le cuivre (II), le zinc (II) et le cobalt (II) à différents rapports de concentrations ont été individuellement étudiés en présence d'uranium. La concentration de ces métaux dans le sang est de 9 – 27 μM pour le fer,¹⁹⁴ de 11,6 – 14,1 μM pour le cuivre,¹⁹⁵ de 88 – 104 μM pour le zinc,¹⁹⁵ et inférieure à 15 nM pour le cobalt^{195,196}. Les concentrations que nous avons choisies se situent dans les gammes de concentrations rencontrées dans le sang, à l'exception de la concentration en cobalt utilisée qui est environ 1000 fois plus importante.

Les produits de solubilité de ces métaux sont récapitulés dans le tableau 5.1. Malgré le fait que le Fe (II) ne soit présent de façon prédominante que dans le milieu intracellulaire et non dans les fluides extracellulaires,¹⁹⁷ il a été choisi dans ces expériences en raison de sa meilleure solubilité (par rapport au Fe (III)) *in vitro* à pH physiologique (7,4). Cependant, en présence d'oxygène, Fe (II) est facilement oxydé en ion ferrique, la solution mère a donc été faite extemporanément dans l'eau. La limite de solubilité n'est atteinte pour aucun de ces éléments à ce pH, à l'exception du cuivre. Cependant, dans ce dernier cas, aucune précipitation n'a été observée, vraisemblablement en raison de sa complexation par le TRIS pour former $\text{Cu}(\text{TRIS})^{2+}$ (Tableau 5.1).¹⁹⁸

Tableau 5.1 : Constantes de solubilité (formation d'hydroxydes) et de complexation avec le TRIS.

Métaux	K_{sp}	Références	$K_{\text{M:TRIS}}$	Références
Co^{2+}	10^{-15}	[¹⁹⁹]	$10^{1,73}$	[¹⁹⁸]
Cu^{2+}	$2,2 \cdot 10^{-20}$	[¹⁹⁹]	$10^{4,05}$	[¹⁹⁸]
Fe^{2+}	$8 \cdot 10^{-16}$	[¹⁹⁹]	-	-
Fe^{3+}	$1,6 \cdot 10^{-37}$	[²⁰⁰]	-	-
Zn^{2+}	$2,3 \cdot 10^{-15}$	[²⁰⁰]	$10^{1,94}$	[¹⁹⁸]

5.1.1. Préparation des échantillons

Des solutions mères de FeCl_2 à 150 μM dans l'eau, CuCl_2 à 75 μM et ZnCl_2 à 500 μM dans HNO_3 1 mM ont été préparées à partir des sels commercialisés par Sigma-Aldrich. La solution mère de cobalt a été obtenue par dilution dans l'eau d'une solution standard de CoCO_3 1000 $\mu\text{g/l}$ dans HNO_3 4 % (PlasmaCAL, SCP Science).

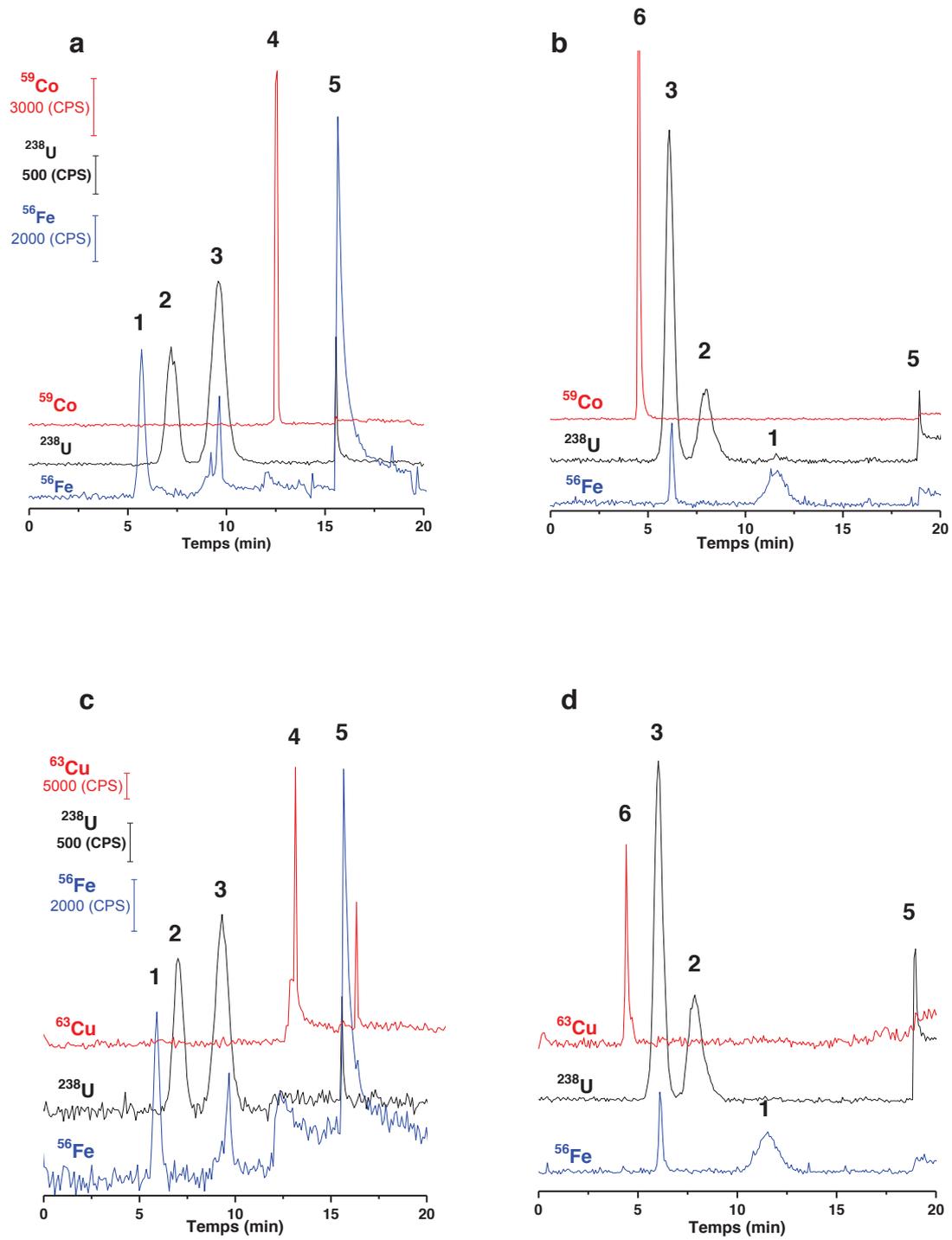
Des mélanges de trois protéines comprenant TF 32 μM , FET 8 μM et fOPN 13,5 μM ont été réalisés dans une solution de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. L'uranium a été ajouté à ces mélanges de façon à obtenir une concentration finale de 1 μM . Une solution de Fe (II), Cu (II), Co (II) ou Zn (II) a été ajoutée à ces échantillons afin d'atteindre une concentration finale en métal de 30 μM , 15 μM , 10 μM et 100 μM respectivement, ce qui correspond à des rapports de concentrations uranium : métal de 1 :30, 1 :15, 1 :10 et 1 :100 respectivement. L'incubation a ensuite été réalisée à 37°C pendant 4 h.

5.1.2. Méthode d'analyse

Les analyses des différentes solutions ont été réalisées par CE-ICP/MS soit dans un capillaire de silice, soit dans un capillaire recouvert par l'HPC (64 cm x 75 μm i.d.). La mobilité électroosmotique a été mesurée par injection d'un marqueur neutre à 0,2 psi pendant 3 s (TBP 0,01 % dans le DMSO 2 %). Les échantillons ont été injectés à 0,5 psi pendant 5 s. La séparation a été réalisée à 25°C, à 25 kV pour le capillaire de silice, et - 30 kV + 0,2 psi pour le capillaire recouvert par l'HPC, en utilisant un électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. Après la séparation (12 min dans le capillaire de silice et 16 min dans le capillaire recouvert par l'HPC), des rinçages successifs par l'électrolyte (5 psi, 2 min), puis HNO_3 1 mM (5 psi, 2 min) ont été réalisés. La détection en ICP/MS a été effectuée à m/z = 31 pour le phosphore, 56 pour le fer, 59 pour le cobalt, 63 pour le cuivre, 64 pour le zinc, 238 pour l'uranium (1 s/point pour chaque élément, à part du fer : 2 s/point) et 166 pour l'erbium (0,1 s/point), en utilisant la collision par l'He ($D_{\text{He}} = 4,3$ ml/min) afin d'éliminer les interférences polyatomiques. Le liquide additionnel utilisé est fonction de la nature du capillaire : HNO_3 1 mM pour le capillaire de silice et TRIS 5 mM à pH 7,4 pour le capillaire recouvert par l'HPC.

5.1.3. Résultats

La Figure 5.1 représente les électrophérogrammes du mélange des trois protéines en présence d'uranium et de chacun des métaux de transition dans le capillaire de silice (a,c,e,g) et dans le capillaire recouvert par l'HPC (b,d,f,h).



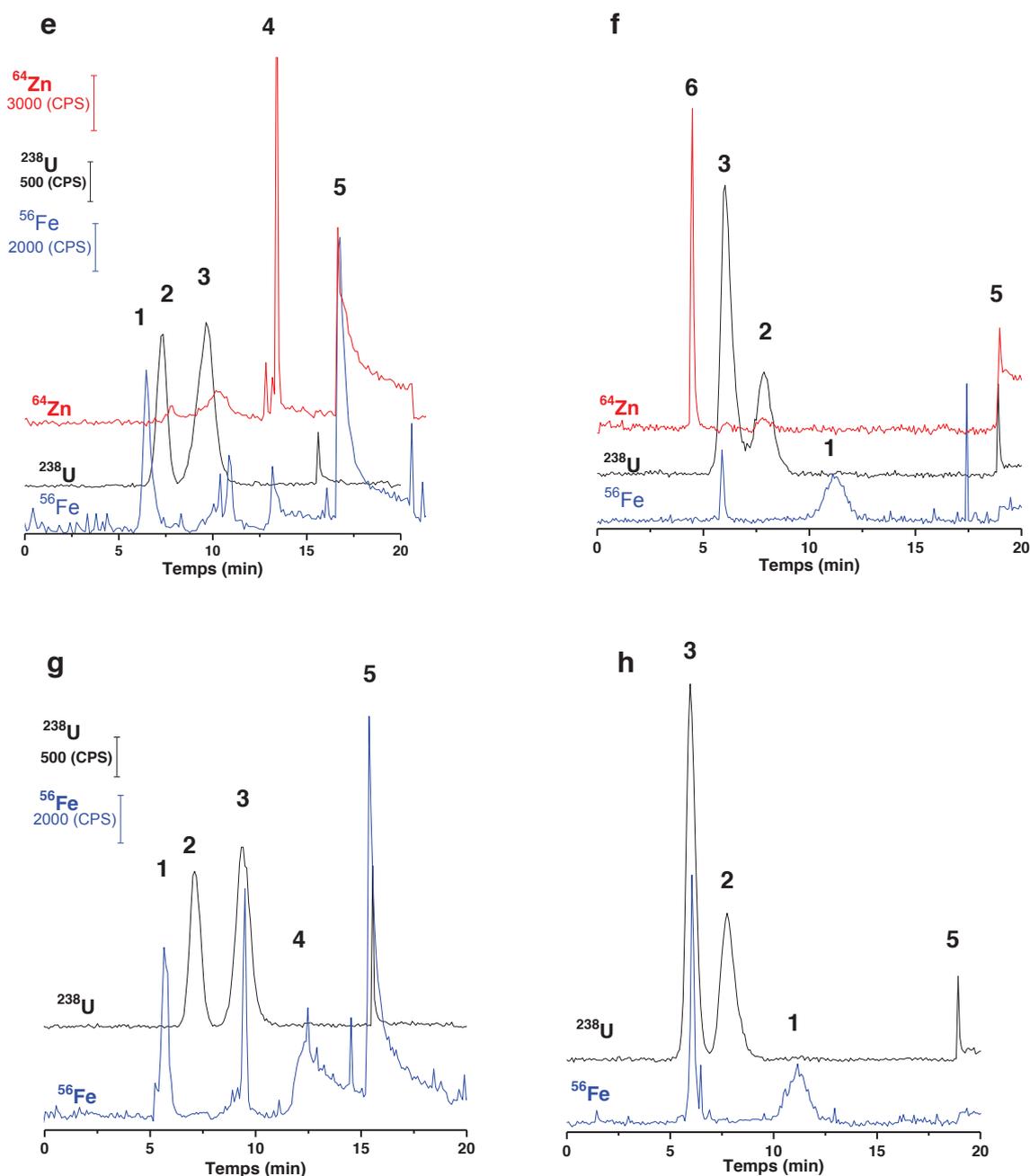


Figure 5.1 : Electrophorégrammes des analyses d'un mélange de protéines - uranium en présence de chacun des métaux essentiels.

Pics correspondant au : 1- TF, 2- FET, 3- OPN, 4- espèces éluées par un rinçage avec l'électrolyte, 5- espèces éluées par un rinçage à l'acide, 6- métal sous forme anionique.

Échantillons: TF 32 μM , FET 8 μM , OPN 13,5 μM , U 1 μM et Co 10 μM (a,b), Cu 15 μM (c,d), Zn 100 μM (e,f), Fe 30 μM (g,h) dans le mélange de TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, incubés à 37°C / 4 h.

Injection : 0,5 psi – 5 s.

Séparation : électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 ; (a, c, e, g) : 25 kV à 25°C dans le capillaire de silice (64 cm x 75 μm i.d.), liquide additionnel : HNO_3 1 mM ; (b, d, f, h) : - 30 kV + 0,2 psi à 25°C dans le capillaire recouvert par l'HPC (64 cm x 75 μm i.d.), liquide additionnel : TRIS 5 mM à pH 7,4.

Détection : ICP/MS à m/z = 238 ; 64 ; 63 ; 59 ; 56 en mode de collision ($D_{\text{He}} = 4,3$ ml/min).

La Figure 5.2 représente la répartition de l'uranium entre les protéines correspondant à chacune des conditions.

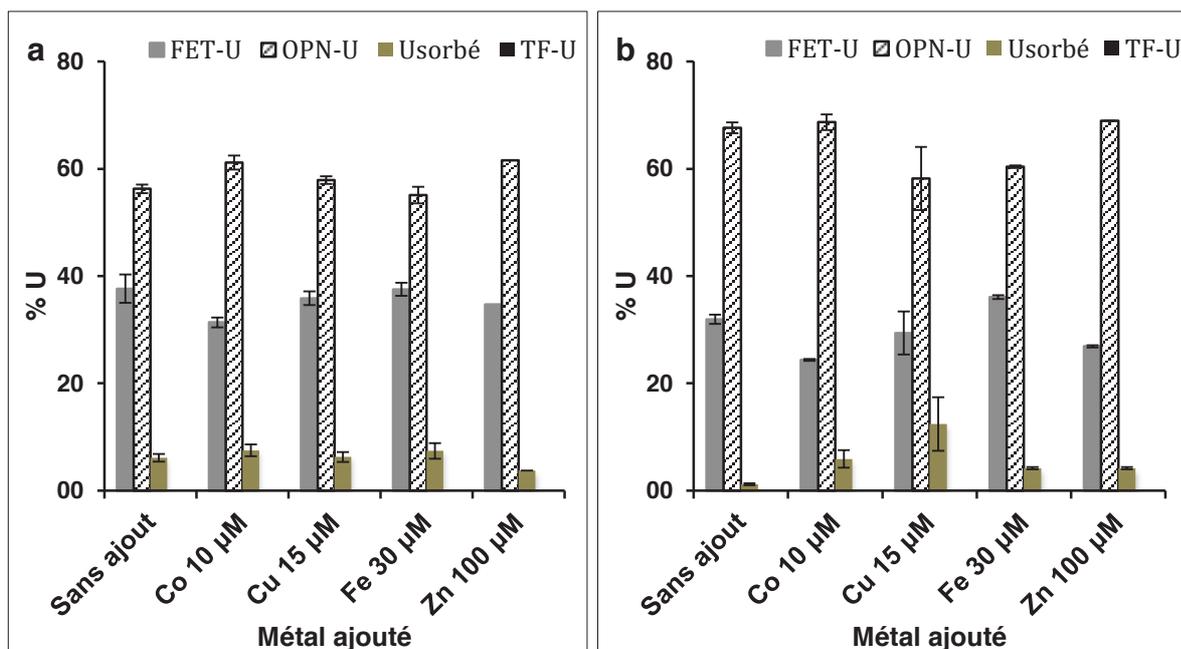


Figure 5.2 : Répartition de l'uranium parmi TF, FET et fOPN en présence des métaux essentiels. (a) dans le capillaire de silice, (b) dans le capillaire recouvert par l'HPC (n = 2).

Dans tous les cas, on constate que l'incubation en présence de métaux de transition n'altère que peu ou pas la distribution de l'uranium, à l'exception du taux d'uranium sorbé qui prend des valeurs proches dans les deux capillaires en présence d'autres métaux.

Ainsi que nous l'avons observé dans le chapitre 3, l'ordre de migration des espèces est inversé sur les deux capillaires. Les électrophérogrammes montrent la présence d'une espèce métallique anionique dans les échantillons contenant Co, Cu, Zn (pic 4, élué suite à un rinçage par l'électrolyte dans le capillaire de silice ou pic 6, dont la migration est la plus rapide sous un voltage négatif dans le capillaire neutre).

Dans le cas du cobalt et du cuivre, aucune espèce métallique impliquant une protéine n'est détectée. Il faut toutefois noter qu'une absence du pic protéine-métal ne signifie pas forcément une absence de complexation. Il est en effet possible que :

- la concentration en complexe soit inférieure à la limite de détection ; ceci est d'autant plus vrai que le cuivre et le cobalt sont présents à des concentrations au moins 7 fois inférieures à celle du zinc,
- ou encore que le taux de dissociation de ce même complexe soit non négligeable au regard du temps d'analyse ; ceci est notamment vrai pour le cuivre dont les complexes peuvent apparaître environ 500 fois moins stables que ceux du zinc du fait de leur plus grande labilité. En effet, comme nous avons vu dans le chapitre 3, les métaux ayant une constante d'échange d'eau élevée ($\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{UO}_2^{2+}$) sont considérés comme formant des complexes d'autant plus labiles.¹⁷⁷

De plus, en présence de Co, le pourcentage de complexe FET-U diminue de $(7 \pm 4) \%$ dans le capillaire de silice et de $(8 \pm 2) \%$ dans le capillaire neutre. Cette modification pourrait signifier une compétition du Co avec l'uranium. Dans le cas du cuivre, aucune différence nette dans la répartition de l'uranium n'a été observée.

Dans le cas de l'incubation en présence de zinc, on constate une fixation, bien que faible, de ce dernier sur FET et OPN (Figure 5.1 e, f). Cependant, les deux pics attribués à fOPN-Zn et FET-Zn, diffèrent en sensibilité et en rapport de surface de pic dans les deux types de capillaire. Malgré cette différence encore inexpliquée entre les deux capillaires, les résultats montrent que le zinc présente une affinité pour les deux protéines FET et fOPN à un rapport de concentration Zn : protéine de 10, qui ne semble cependant pas affecter la distribution de l'uranium parmi les protéines.

Dans tous les cas, il faut également noter la présence d'un complexe TF-Fe attendu mais aussi celle d'un complexe OPN-Fe dont la formation provient vraisemblablement de la dissociation du complexe TF-Fe lors de l'incubation. De plus, alors que le pic de fer correspondant TF ne varie pas en intensité en présence de Fe (II), la surface de celui correspondant à fOPN augmente dans les deux types de capillaire. Ceci semble confirmer la spécificité des sites de TF pour les ions ferriques alors que fOPN semble fixer indifféremment Fe (II) et Fe (III).

En conclusion, le couplage CE-ICP/MS permet de détecter simultanément le devenir de plusieurs éléments (3 dans notre cas) sans altérer la séparation, compte tenu du temps de réponse du détecteur. Les métaux envisagés étant des métaux de transition, leur ajout à une concentration de 10 fois à 100 fois plus importante que celle de l'uranium ne conduit pas à des variations de la répartition de l'uranium entre les trois protéines supérieures à 11 %. Cependant, des expériences complémentaires associées à un traitement statistique seraient nécessaires pour conclure quant à l'influence réelle de ces métaux sur la répartition de l'uranium. Cet aspect multi-élémentaire pourra être mis à profit dans l'étude de la compétition avec les métaux durs, notamment Ca^{2+} , Fe^{3+} chélaté, etc. pour confirmer la spécificité de l'interaction entre l'uranium et les protéines.

5.2. Influence de l'uranium sur l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par OPN et FET

Comme nous l'avons rapidement vu dans la présentation des protéines faite dans le chapitre 1, FET et OPN jouent un rôle important dans l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium (Ca-P).

Leur mode d'action diffère. FET semble agir comme un véritable inhibiteur de la précipitation en maintenant les cristaux de phosphate de calcium en suspension. Des études structurales réalisées *in vitro* ont montré la formation de colloïdes fétuine - phosphate de calcium, appelés particules de calciprotéine (CPPs) ou encore complexe fétuine-minéral. La formation de ces nanoparticules FET-Ca-P se fait en deux étapes dont une représentation a été proposée par Jahnen-Dechent *et al.*¹⁰⁷ (Figure 5.3). Dans un premier temps, FET forme des agglomérats primaires sphériques (30 – 150 nm) avec le phosphate de calcium, composés d'un noyau de clusters de phosphate de calcium non structurés. Ces particules grossissent rapidement pour conduire à des agglomérats secondaires composés de cristaux de Ca-P entourés par une couche de protéines.

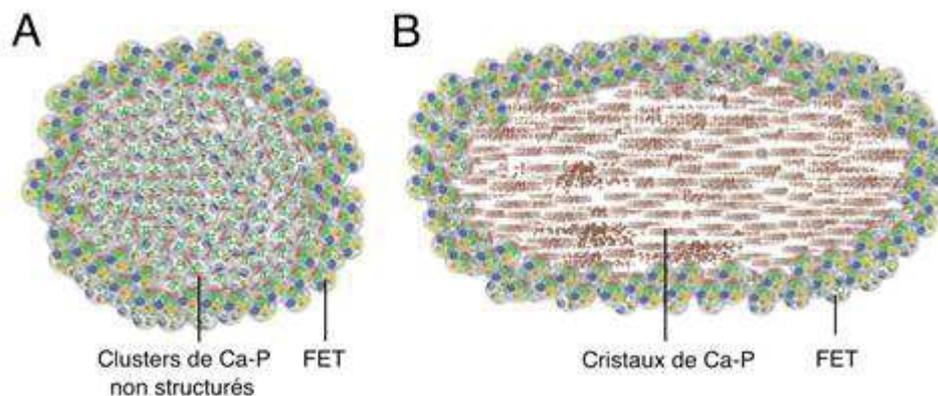


Figure 5.3 : Formation d'agglomérats primaires (a) et secondaires (b) de nanoparticules FET-Ca-P.¹⁰⁷

Quant à l'OPN, son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. Cette protéine possède une capacité de fixation des ions Ca^{2+} très importante (jusqu'à 50 Ca^{2+} par protéine).¹²⁴ Des études *in vitro* ont montré que l'OPN ou des peptides synthétiques représentant des régions poly-aspartate de l'OPN agissent comme des inhibiteurs de la nucléation mais aussi de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. Ainsi, plusieurs études ont étudié l'inhibition de la cristallisation de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,¹²⁸ et $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hydroxyapatite, HAP)^{123,201} lors de l'ajout de peptides de l'OPN correspondant aux séquences 93-106 (DDVDDpTDDpSHQpSDE),^{201,128} 65-80 (pSHDHMDDDDDDDDGD)¹²³ et 220-235 (pSHEpSTEQSDAIDpSAEK)¹²³. Ces auteurs ont proposé un mécanisme où l'OPN se lierait à la surface des nanoparticules de phosphate de calcium via des interactions

entre groupements carboxylate/phosphate et Ca^{2+} , ce qui retarderait donc la formation de cristaux de HAP (Figure 5.4). D'autres auteurs suggèrent que l'adsorption de l'OPN à la surface de l'hydroxyapatite est réalisée via les groupements phosphate par remplacement des ions orthophosphate du réseau cristallin, empêchant ainsi les dépôts supplémentaires de phosphate de calcium.²⁰²

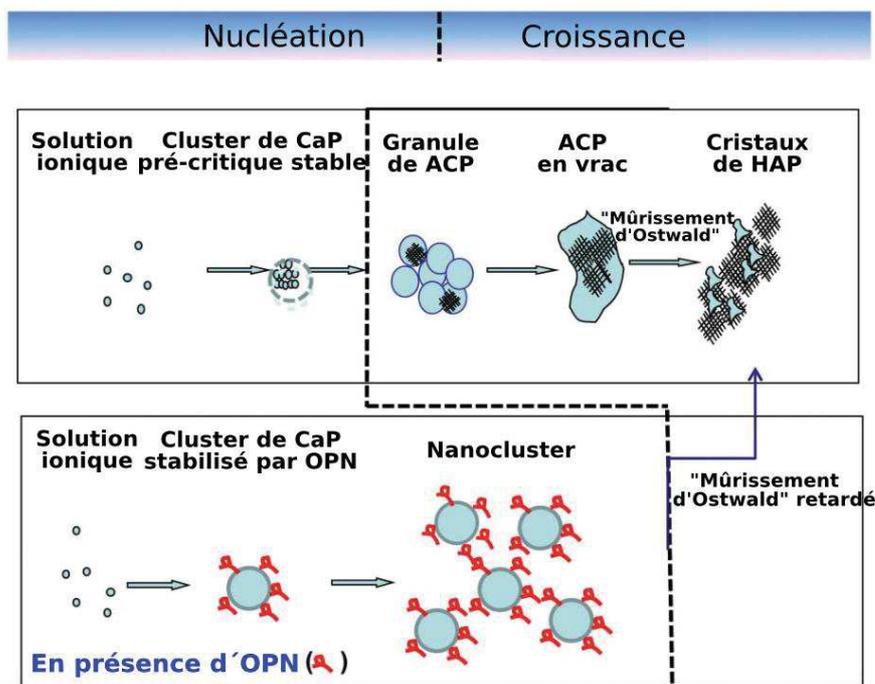


Figure 5.4 : Mécanisme de formation *in vitro* de nanoparticules Ca-P-OPN.^{201,203}

Nous avons confirmé dans le chapitre précédent, la très forte affinité de FET et fOPN pour l'uranium ($\log_{K1} f_{\text{FET-U}} = 11,4 \pm 0,3$, $\log_{K1} f_{\text{OPN-U}} = 11,5 \pm 0,3$, $\log_{K2} f_{\text{OPN-U}} = 12,5$). L'uranium possède cependant des propriétés de coordination similaires à celles du calcium : interactions avec des atomes donneurs durs, géométries de coordination similaires, etc. On peut donc envisager que la complexation de l'uranyle par ces protéines modifie leur interaction avec le calcium et/ou phosphate de calcium.

L'objectif de cette partie est d'étudier l'influence de ce métal sur l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par ces deux protéines. Nous montrerons que le couplage CE-ICP/MS se révèle dans ce cas un outil intéressant à utiliser en complément de méthodes plus classiques telles que l'analyse quantitative par ICP/MS et DLS pour résoudre ce problème.

5.2.1. Préparation des échantillons

Des solutions mères de chlorure de calcium (CaCl_2) 50 mM, d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) 50 mM et de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) 50 mM ont été préparées à partir des produits commercialisés par Sigma-Aldrich dans un tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4. Le pH de la solution d'hydrogénophosphate de sodium a ensuite été ajusté jusqu'à pH 7,4 par ajout de dihydrogénophosphate de sodium. La solution mère d'uranium 50 μM a été préparée dans l'eau à partir d'une solution standard d'uranium à 1000 mg/l dans HNO_3 4 %. Les solutions mères des protéines ont été obtenues par purification ou dialyse dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 à une concentration finale de 67 μM , 177 μM , 220 μM et 96 μM pour eOPN, fOPN, FET et TF respectivement.

Les échantillons ont ensuite été préparés par ajout de chacun des solutés dans l'ordre suivant : la protéine d'abord, puis l'uranium (si il en y a), puis CaCl_2 et enfin $(\text{Na,H})\text{NaHPO}_4$.

Dans toutes les expériences, les concentrations en CaCl_2 et en $(\text{Na,H})\text{NaHPO}_4$ ont été fixées à 5 mM. La TF 32 μM a été utilisée comme protéine standard. Les protéines ont été testées à différentes concentrations allant de 0,13 à 8 μM pour FET, de 0,2 μM à 13,5 μM pour fOPN et de 0,4 μM à 13,3 μM pour eOPN. L'uranium a été ajouté en concentrations croissantes allant de 0 à 16 μM , ce qui correspond à un changement de pH de 7,4 à 7,0. Les échantillons ont été incubés à 37°C sous une agitation de 500 rpm pendant 2 h ou 24 h. Les surnageants des échantillons ont été récupérés après une centrifugation à 10000 rpm pendant 2 min. Ils ont ensuite été analysés, en ICP/MS, en DLS et en couplage CE-ICP/MS.

5.2.2. Méthodes d'analyse

5.2.2.1. Analyse directe en ICP/MS

Les courbes d'étalonnage de P et Ca de 30 $\mu\text{g/l}$ à 500 $\mu\text{g/l}$ dans HNO_3 1 mM ont été réalisées en activant la collision à l'hélium ($D_{\text{He}} = 4,3$ ml/min, $R^2 = 0,9993$ et $R^2 = 1$ respectivement) par détection à $m/z = 31$ et $m/z = 44$ respectivement. La courbe d'étalonnage de l'U de 1 à 10 $\mu\text{g/l}$ a été réalisée dans HNO_3 1 mM à $m/z = 238$ ($R^2 = 0,9999$).

Pour la quantification de Ca et de P, les surnageants ont été dilués directement dans HNO_3 1 mM. Pour la quantification de l'uranium, les échantillons ont été minéralisés dans le mélange HNO_3 65 % et H_2O_2 30 % (100 μl échantillon : 500 μl HNO_3 : 500 μl H_2O_2) à 76°C pendant une nuit avant dilution 40 fois dans HNO_3 1 mM.

5.2.2.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des particules a été mesurée dans les surnageants des échantillons incubés à 37°C pendant 2 h en présence de fOPN ou FET. Les échantillons (65 µl) ont été placés dans des cuves jetables. Les expériences ont été réalisées grâce à un goniomètre Zetasizer Nano ZS équipé d'un laser à argon émettant à 633 nm. L'angle de détection est fixe et de 173°. La viscosité et les indices de réfraction du milieu (eau) et du matériau ont été fixés à 0,8872 cp, 1,330, et 1,45 respectivement. La mesure de chaque échantillon a été réalisée à 25°C à raison de 3 scans par mesure, le résultat correspondant à la moyenne de 11 mesures.

5.2.2.3. Couplage CE-ICP/MS

Les expériences ont été réalisées dans un capillaire de silice (64 cm x 75 µm i.d.). Chaque échantillon a été injecté sous 0,5 psi pendant 5 s. L'électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4 a été renouvelé pour chaque analyse. La séparation a été réalisée à 25°C et à 25 kV. Après la séparation (16 min), un rinçage a été réalisé, consistant en une étape de rinçage sous 5 psi pendant 2 min par l'électrolyte, puis 5 psi pendant 3 min par HNO₃ 1 mM. Le liquide additionnel utilisé est HNO₃ 1 mM en présence d'Er³⁺ 3 nM. La détection en ICP/MS a été réalisée à m/z = 31 pour le phosphore, 44 pour le calcium et 238 pour l'uranium (acquisition 1 s/point pour chaque élément), en activant la cellule de collision à l'hélium (D_{He} = 4,3 ml/min) afin d'éliminer les interférences polyatomiques.

5.2.3. Résultats

5.2.3.1. Inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par OPN et FET

Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration minimale de chaque protéine suffisante pour inhiber la précipitation du phosphate de calcium. TF (32µM) a été utilisée comme référence car elle a été rapportée comme n'ayant aucune influence sur ce phénomène de précipitation.⁴⁴

La Figure 5.5 représente les concentrations en calcium et en phosphore mesurées dans les surnageants par ICP/MS.

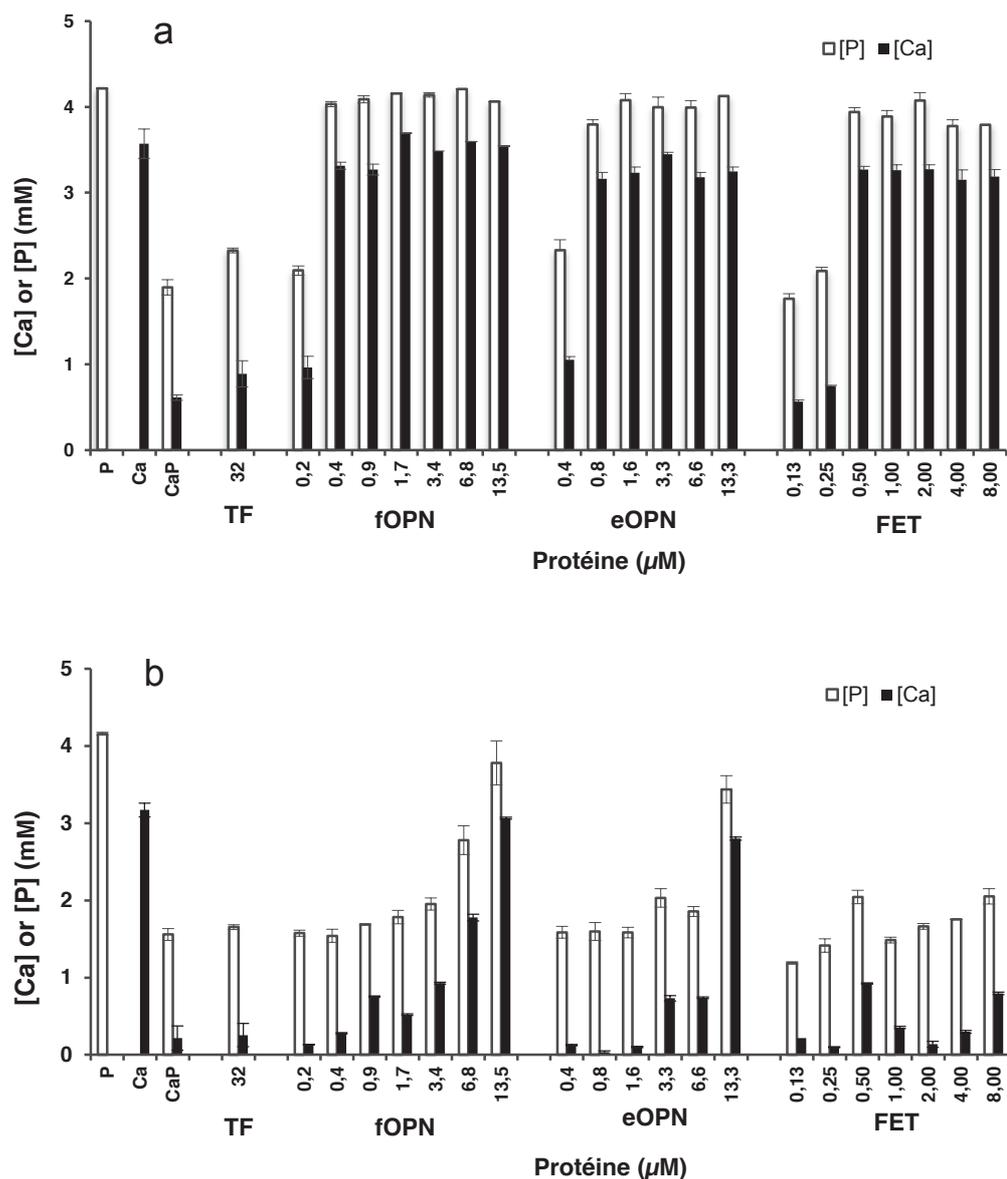


Figure 5.5 : Concentrations de calcium et de phosphore dans les surnageants déterminées par ICP/MS en fonction de la concentration des protéines.

(a) : incubation à 37°C pendant 2 h, (b) : incubation à 37°C pendant 24 h.

Les résultats confirment que TF n'a pas d'influence sur la précipitation. On constate que les concentrations de calcium et de phosphate en solution sont de $(0,9 \pm 0,2)$ mM et de $(2,33 \pm 0,03)$ mM respectivement, proches de celles obtenues en absence de toute protéine. Ceci conduit à l'hypothèse de la formation d'un précipité de stoechiométrie Ca : P 1,35 attribuée à de l'octacalcium phosphate ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Par contre, à partir d'une concentration de fOPN de 0,4 μM, d'eOPN de 0,8 μM et de FET de 0,5 μM, les protéines inhibent totalement la précipitation à 37°C à 2 h, concentrations environ 10000 fois moins importantes que celles de CaCl_2 et de $(\text{Na},\text{H})\text{NaHPO}_4$). Ceci confirme l'efficacité de ces protéines dans l'inhibition de la précipitation. Cette capacité d'inhibition est totalement conservée à 24 h pour l'OPN (eOPN et fOPN), mais seulement à

des concentrations supérieures ou égales à 13 μM . Les résultats montrent que le fragment fOPN a la même capacité *in vitro* que la protéine entière. La concentration minimum de fOPN nécessaire pour inhiber la précipitation semble même plus faible que celle d'eOPN (0,4 μM contre 0,8 μM). Ceci est possiblement dû à l'instabilité de l'eOPN *in vitro* déjà discutée dans l'annexe 2. Ce n'est pas le cas de FET qui perd toute sa capacité d'inhibition à 24 h. Cette action transitoire de FET a déjà été démontrée par plusieurs équipes.²⁰⁴⁻²⁰⁶

5.2.3.2. Influence de l'uranium sur le rôle d'inhibiteur de précipitation des protéines

A partir des résultats précédents, nous avons choisi de travailler avec fOPN 13,5 μM , représentant de l'OPN, et FET 8 μM pour étudier l'influence de l'uranium sur cette propriété. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 2 h et 24 h pour chacune des deux protéines. L'uranium 1 μM et 5 μM a également été ajouté à un échantillon de phosphate de calcium en absence de protéine et 1 μM dans un échantillon contenant aussi TF. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 5.6.

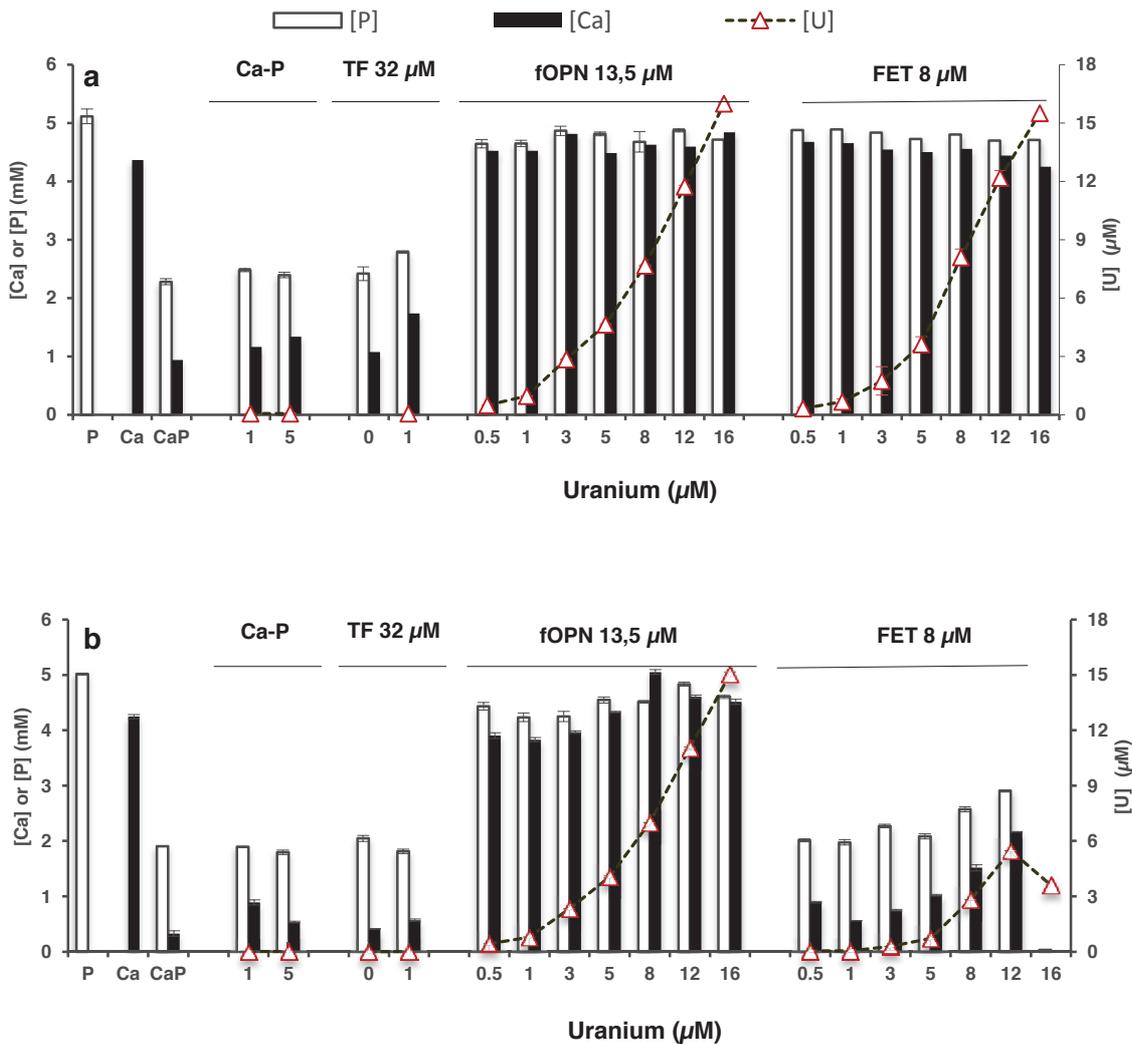


Figure 5.6 : Concentrations de calcium, de phosphore et d'uranium dans les surnageants des échantillons en présence d'un excès du phosphate de calcium en fonction de la concentration initiale d'uranium.

(a) : incubation à 37°C pendant 2 h, (b) : incubation à 37°C pendant 24 h.

On constate qu'en absence de FET ou d'OPN, avec ou sans TF, la précipitation de phosphate de calcium est identique à celle observée en l'absence d'uranium. Aucune présence d'uranium n'est d'ailleurs détectée dans les surnageants, ce qui implique également la précipitation de l'uranium.

En présence de FET ou de fOPN, aucune modification significative de la concentration du calcium et du phosphore dans les surnageants n'est observée en présence de concentrations croissantes en uranium. Ceci démontre que l'uranium n'a aucun effet sur l'activité d'inhibition de précipitation du phosphate de calcium de FET jusqu'à 2 h et de fOPN jusqu'à 24 h. Il faut également noter que la totalité de l'uranium reste en solution et ce, quelle que soit la concentration en protéine. Pour des concentrations inférieures à la stoechiométrie des complexes protéine :U (par ex, concentration en uranium < 8μM dans le cas de FET), on peut simplement faire l'hypothèse de la formation de complexes protéine-U. Par contre à des

concentrations supérieures, l'uranium reste soluble en présence d'ions phosphate malgré les faibles constantes de solubilité de l'orthophosphate d'uranium $(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\log K_{\text{solubilité}} = -48,48 \pm 0,16$)²⁰⁷ et de l'autunite $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\log K_{\text{solubilité}} = -48,36 \pm 0,03$)²⁰⁸. Le cas de l'uranium à 16 μM en présence de FET 8 μM illustre bien ce fait, une stœchiométrie 1: 1 des complexes ayant été montrée dans le chapitre 4. Ceci semble indiquer que FET inhibe également la précipitation de ces formes d'uranium.

De façon similaire à ce qui a été observé précédemment, FET perd cette capacité après 24 h à 37°C. Dans ce cas, il semble également que la solubilité de l'uranium soit affectée. Ainsi les concentrations en solution sont inférieures aux concentrations attendues (8 μM). Il semble donc dans ce cas qu'une partie de l'uranium ait précipité sous forme de phosphate d'uranium.

5.2.3.3. Étude de la taille des particules protéine-Ca-P

Nous avons ensuite étudié la taille des particules en présence et en absence d'uranium. Le diamètre hydrodynamique de ces particules a été mesuré en DLS. Les résultats présentés dans la Figure 5.7 sont représentatifs d'au moins de 98,5 % de la population des particules en solution.

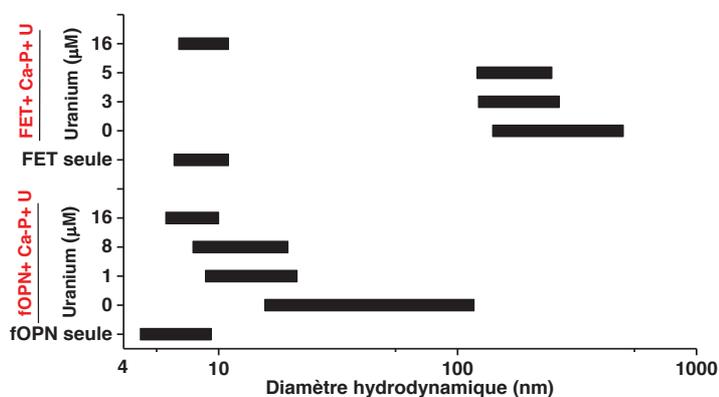


Figure 5.7 : Diamètre hydrodynamique des particules protéine-Ca-P pour des concentrations en uranium croissantes.

Les protéines seules fOPN et FET ont une taille moyenne de (7 ± 2) nm et (9 ± 2) nm respectivement, caractéristique de la taille des protéines en solution. En présence de phosphate de calcium, on constate une augmentation de la taille des particules en solution, environ 9 fois la taille de la protéine dans le cas de fOPN, et 38 fois pour FET. Ceci pourrait s'expliquer par une différence dans les mécanismes d'inhibition de la précipitation de Ca-P par ces deux protéines. En effet, comme nous l'avons décrit succinctement au début de ce paragraphe, les clusters formés entre FET et phosphate de calcium grossissent rapidement pour former des agglomérats secondaires de taille hydrodynamique supérieure à 150 nm.¹⁰⁷

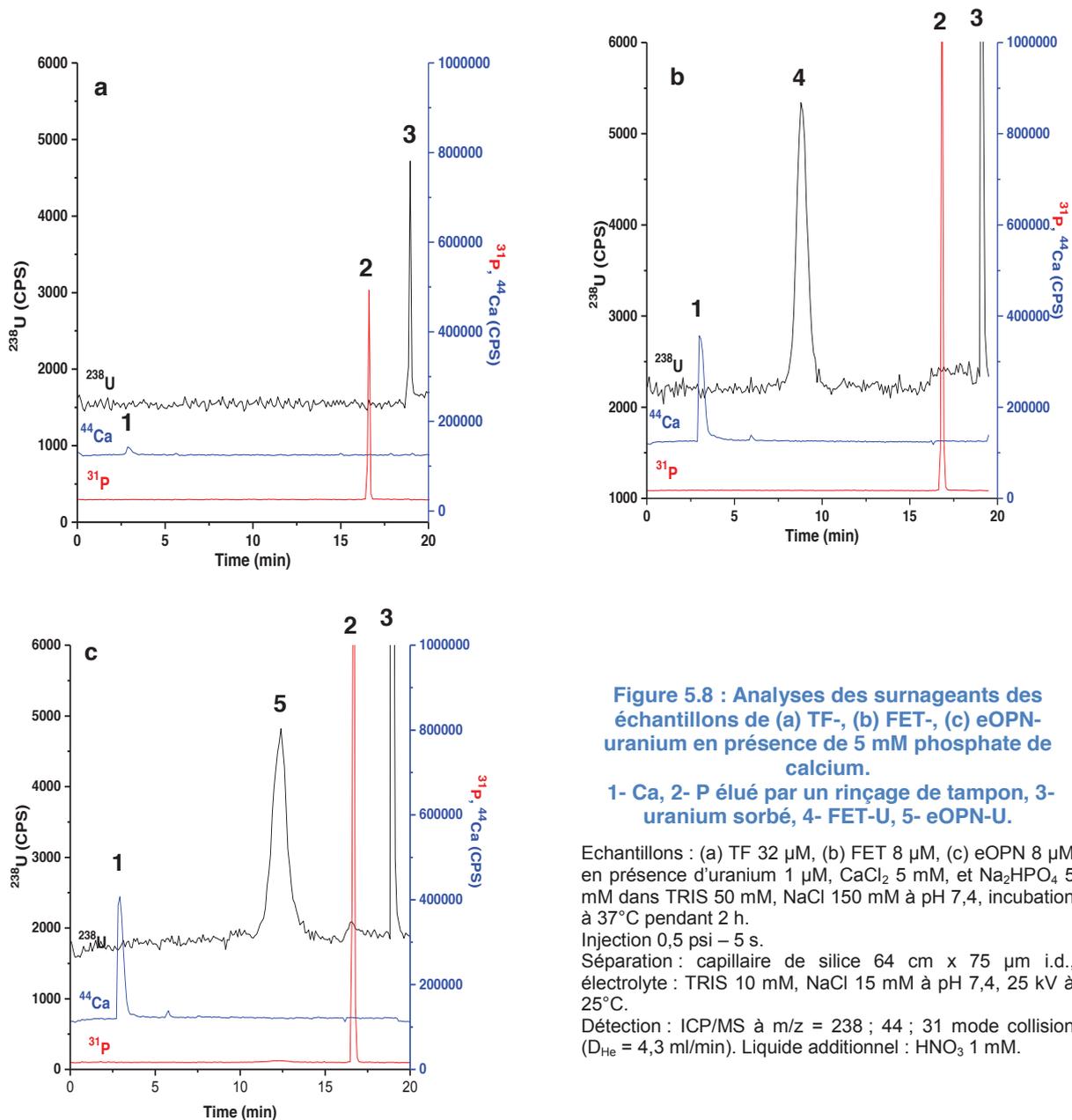
Par contre, OPN a également une action inhibitrice de la croissance des cristaux d'hydroxyapatite. On peut donc raisonnablement penser que les clusters formés seront de taille moins importante.

En présence d'uranium, on remarque que, quand la concentration de ce dernier augmente de 0 à 16 μM , le diamètre hydrodynamique des particules diminue progressivement dans le cas de l'OPN pour aboutir à des particules de taille proche de celle de la protéine. Ces résultats semblent montrer que la présence d'uranium a un effet retard, concentration — dépendant, sur l'agrégation des particules.

Dans le cas de FET, l'analyse des résultats est plus compliquée compte tenu de l'action transitoire de FET à cette concentration. L'addition d'uranium semble également influencer la taille des particules de la même manière que dans le cas d'OPN, exception faite du cas où la concentration en uranium est de 16 μM , la taille des particules mesurée redevenant comparable à celle des protéines seules. A noter que cette expérience est difficilement comparable à celles réalisées en ICP/MS car les échantillons ont été conservés 24h à 4°C avant analyse. On peut cependant ici faire l'hypothèse que l'effet inhibiteur de la protéine ne soit pas altéré par la complexation de l'uranium sauf à forte concentration (16 μM) où le système de particules de calcioprotéines se trouve brusquement déstabilisé.

5.2.3.4. Mise en évidence des interactions protéine-uranium en présence de Ca-P

Nous avons ensuite voulu voir si l'interaction de l'uranium et chaque protéine individuelle en présence d'un excès de phosphate de calcium était conservée ou si l'uranium restait en solution sous forme de particules stabilisées par les protéines. Pour ce faire, un mélange d'uranium et des protéines testées individuellement : TF 32 μM , FET 8 μM , eOPN 8 μM en présence d'un excès de phosphate de calcium (5 mM) a été réalisé dans le tampon : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4. La Figure 5.8 représente les électrophérogrammes obtenus en CE-ICP/MS pour les différents mélanges.



Une analyse qualitative de ces électrophérogrammes montre que les concentrations en P, Ca, et U sont beaucoup plus faibles dans la solution contenant TF que dans les deux autres solutions. Les surfaces des pics de Ca, de P et de U total de l'échantillon contenant la TF qui ne représente que $(6,5 \pm 0,5)$ % pour Ca, (36 ± 4) % pour P et $(4,2 \pm 0,5)$ % pour U des surfaces obtenues dans les échantillons contenant FET / eOPN. Ceci confirme les résultats obtenus en analyse directe par ICP/MS, à savoir une précipitation importante de ces éléments dans les échantillons contenant TF, contrairement à ceux contenant FET et eOPN. En présence d'une concentration en phosphate 150 fois plus importante que celle de la protéine, l'uranium n'est plus complexé par TF (figure 5.8 a). Par contre, (59 ± 3) % de l'uranium est complexé par FET et (58 ± 3) % par l'eOPN, ce qui est en accord avec les pourcentages d'uranium complexé par ces protéines en absence de phosphate de calcium

dans un milieu TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4. Il semble donc que l'interaction entre FET/eOPN et le phosphate de calcium n'interfère pas avec celle de l'uranium et que les sites impliqués soient différents. Ceci confirme également qu'à cette concentration (1 μM), l'uranium en solution se trouve lié à la protéine et non pas sous forme de phosphate d'uranyle.

A noter qu'aucun signal de calcium ou de phosphore n'a été observé dans les complexes FET- ou eOPN-U. Le calcium migre sous forme cationique en début d'électrophérogramme ($\mu\text{ep} = (3,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), le phosphate présentant une très forte densité de charge négative, sort pendant l'étape de rinçage du tampon à 16 min. Ceci semble montrer que les particules de Ca-P avec les protéines ont été dissociées lors de la dilution importante occasionnée par l'injection ou pendant la séparation.

5.2.4. Conclusion

L'étude de la précipitation du phosphate de calcium nous a permis d'intégrer le couplage CE-ICP/MS dans une approche multi-techniques. Nous avons ainsi montré de manière quantitative l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par FET et OPN ainsi que l'action transitoire de ces protéines, grâce à l'utilisation de l'ICP/MS. De plus, nous avons montré que la présence d'uranium ne semble pas modifier cette action. Cependant, les études en DLS révèlent que l'action d'inhibition de la croissance des cristaux de l'OPN est, elle, altérée par la présence d'uranium, et ce de manière concentration-dépendante. Enfin, par couplage CE-ICP/MS, nous avons montré que dans ces systèmes, à faible concentration en uranium (rapport protéine : uranium 8 : 1), l'uranium est solubilisé par formation d'un complexe avec les protéines et non par séquestration d'un précipité d'autunite ou d'orthophosphate d'uranyle par ces dernières. Des expériences complémentaires, notamment à plus forte concentration en uranium, devront être réalisées pour compléter ce travail.

5.3. Analyse d'un sérum humain en présence d'uranium

Le sérum est un milieu complexe qui contient des protéines, des peptides, des petits ions organiques, etc. L'analyse de sérum est classiquement réalisée à pH 10 (notamment avec le système Paragon CZETM 2000), ce qui est incompatible avec le maintien des interactions protéine-uranium.^{209,210} Le but de cette partie est d'évaluer le couplage CE-ICP/MS dans l'analyse de ce type d'échantillon en présence d'uranium.

5.3.1. Préparation des échantillons

Les protéines : transferrine (TF), α 2- macroglobuline (A2MH), albumine (HSA), fétuine-A (FET), apolipoprotéine (APA1) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Lyon, France), l'hémopexine (HEMO) chez BioMac GmbH (Leipzig, Allemagne), les compléments 3 (CO3) et 4 (CO4) chez BiosPacific (Emeryville, Ca, US), l' α 1-acide glycoprotéine (A1AH) chez Fluka Sigma-Aldrich, (Lyon, France), l'immunoglobuline G humaine (IgG) et la céruloplasmine (CERU) chez Calbiochem (Merck Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France). Toutes les protéines ont une pureté supérieure à 98 % et ont été dialysées dans l'électrolyte (TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4) à l'aide d'une membrane de 10 kDa (à l'exception de la FET purifiée par SEC, cf annexe 1) avant leur utilisation. Pour déterminer leur mobilité électrophorétique, chaque protéine a ensuite subi si nécessaire une dilution supplémentaire dans l'électrolyte pour atteindre la concentration désirée avant analyse. Les concentrations utilisées sont présentées dans le Tableau 5.2. Le sérum humain est un pool de serums issu de la collecte sur des volontaires sains sans ajout d'anticoagulant ou traitement par le citrate (PPA GmbH, Pasing, Autriche).

Pour les expériences visant à déterminer les cibles de l'uranium, le sérum humain a été dilué 10 fois, 5 fois et 4 fois dans l'eau et incubé en présence d'uranium 1 μ M. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 4 h. Les mélanges de protéines standards (1) : TF 12 μ M, HSA 200 μ M, A1AH 6 μ M et (2) : TF 12 μ M, FET 4 μ M, A1AH 6 μ M ont été réalisés dans l'électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4. Les conditions d'incubation sont identiques à celles utilisées précédemment (37°C pendant 4 h).

Un marqueur neutre a été utilisé afin de déterminer la mobilité électroosmotique. En CE-UV : DMSO 0,1 % obtenu par dilution dans l'électrolyte de DMSO (Sigma-Aldrich) a été utilisé. En CE-ICP/MS, celui-ci a été remplacé par le TBP (Sigma-Aldrich) 0,01 % dans le DMSO 2 %.

5.3.2. Méthodes d'analyses

Deux types de capillaire, silice ou neutre recouvert par l'HPC (L_d / L_t 54 / 64 cm x 75 μ m i.d. en CE-UV, et L_d / L_t 64 / 64 cm x 75 μ m i.d. en CE-ICP/MS), ont été utilisés. Une injection de marqueur neutre à 0,2 psi pendant 3 s suivie par l'injection de l'échantillon à 0,5 psi pendant 5 s a été réalisée. La séparation a été réalisée à 25°C, à 25 kV pour le capillaire de silice et – 30 kV + 0,2 psi pour le capillaire recouvert par l'HPC, et à pH 7,4 grâce à l'électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM. Le liquide additionnel du couplage CE-ICP/MS utilisé est fonction de la nature du capillaire : HNO₃ 1 mM pour le capillaire de silice et TRIS 5 mM à pH 7,4 pour le capillaire recouvert par l'HPC. La détection a été réalisée en UV à 214 nm, et en ICP/MS à

$m/z = 31$ pour le phosphore (détection du marqueur neutre) et $m/z = 238$ pour l'uranium avec une acquisition à 1 s/point pour chaque élément.

5.3.3. Résultats

5.3.3.1. Détermination de la mobilité électrophorétique des protéines sériques en CE-UV

Tout d'abord, chacune des 11 protéines a été analysée en CE-UV afin de mesurer sa mobilité électrophorétique. Le Tableau 5.2 récapitule les informations disponibles pour ces protéines (masse molaire, concentration dans le sérum, affinité pour l'uranium), ainsi que les concentrations que nous avons utilisées et les mobilités électrophorétiques obtenues en CE-UV. Les résultats montrent qu'à pH 7,4, toutes les protéines testées sont chargées négativement, avec des mobilités électrophorétiques variant entre $-2,6 \cdot 10^{-9}$ et $-2,0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ avec $\text{RSD} \leq 5 \%$ ($n = 2$). Ces valeurs de mobilités électrophorétiques étant très proches les unes des autres, il est à prévoir que le système CE dans ces conditions ne permettra pas d'obtenir une bonne séparation pour toutes les protéines sériques. En effet, la séparation des protéines à pH 7,4 en absence de surfactant est souvent peu efficace. A titre d'exemple, dans le travail de Matczuk *et al.*¹³⁸ concernant l'étude des interactions entre nanoparticules d'or et protéines dans un sérum dilué 1000 fois en utilisant le couplage CE-ICP/MS, le nombre de plateaux obtenu est d'environ de 3300. Dans notre cas, le nombre maximal de plateaux obtenus pour les protéines intactes en CE-UV est de 5000. La séparation de protéines ayant des mobilités électrophorétiques différant de 15 % (ex : HSA/FET) nécessiterait un nombre de plateaux d'environ 10000-12000 pour compenser la faible sélectivité.

Tableau 5.2 : Mobilités électrophorétiques des 11 protéines sériques en CE-UV.

Protéine	C (μM)*	Masse molaire (g/mol)*	pI*	Kd (M) Protéine -U**	C _{utilisée en CE} (μM)***	μ_{ep} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)***	RSD μ_{ep} (%)***
IgG	66 - 100	150000	6	$2,00 \cdot 10^{-5}$	60	$-2,61 \cdot 10^{-9}$	4,0
TF	25 - 50	80000	6,18	$2,80 \cdot 10^{-6}$	12,5	$-8,66 \cdot 10^{-9}$	5,0
CO4	1,0 – 2,6	193000	6,6	$1,10 \cdot 10^{-6}$	12	$-9,40 \cdot 10^{-9}$	5,1
HEMO	9 - 22	51600	-	$4,00 \cdot 10^{-6}$	9	$-1,07 \cdot 10^{-8}$	1,3
CO3	3 - 7	187000	6,02	$1,10 \cdot 10^{-6}$	7,5	$-1,08 \cdot 10^{-8}$	2,1
APA1	29 - 68	30800	5,56	$1,00 \cdot 10^{-5}$	30	$-1,15 \cdot 10^{-8}$	1,1
A2MG	9 - 24	163000	6,03	$1,65 \cdot 10^{-6}$	14,3	$-1,35 \cdot 10^{-8}$	4,4
HSA	500 - 800	66500	5,9	$1,70 \cdot 10^{-5}$	15	$-1,44 \cdot 10^{-8}$	2,3
FET	8 - 18	48000	6,9	$3,00 \cdot 10^{-8}$	8	$-1,68 \cdot 10^{-8}$	0,4
CERU	1,5 – 4,5	134000	5,4	$1,15 \cdot 10^{-5}$	7,8	$-1,84 \cdot 10^{-8}$	4,0
A1AH	14 – 34	40800	4,93	$1,50 \cdot 10^{-6}$	11,4	$-1,98 \cdot 10^{-8}$	5,0

* Données issues de la base de données UniProtKB/Swiss-Prot.

** Données obtenues par Basset *et al.* en SPR en se basant sur l'hypothèse simplifiée de l'existence d'un équilibre unique : $\text{Prot} + \text{UO}_2^{2+} \rightleftharpoons \text{Prot-UO}_2^{2+}$.⁴⁴

*** Données obtenues en CE-UV dans ce travail : injection : marqueur neutre DMSO 0,1 % (0,2 psi – 3 s) suivi par l'échantillon (0,5 psi – 5 s), séparation dans l'électrolyte TRIS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,4, 25 kV à 25°C, capillaire de silice $L_d / L_t = 54 / :4 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ i.d, détection : UV à 214 nm.

La Figure 5.9 a représente la distribution de ces 11 protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique et de leur concentration dans le sérum et la Figure 5.9 b, l'électrophorégramme d'une analyse d'un sérum humain dilué 10 fois dans l'eau. On constate une bonne adéquation entre la répartition des protéines et l'électrophorégramme obtenu. On confirme également que la résolution est insuffisante dans le cas de tels échantillons.

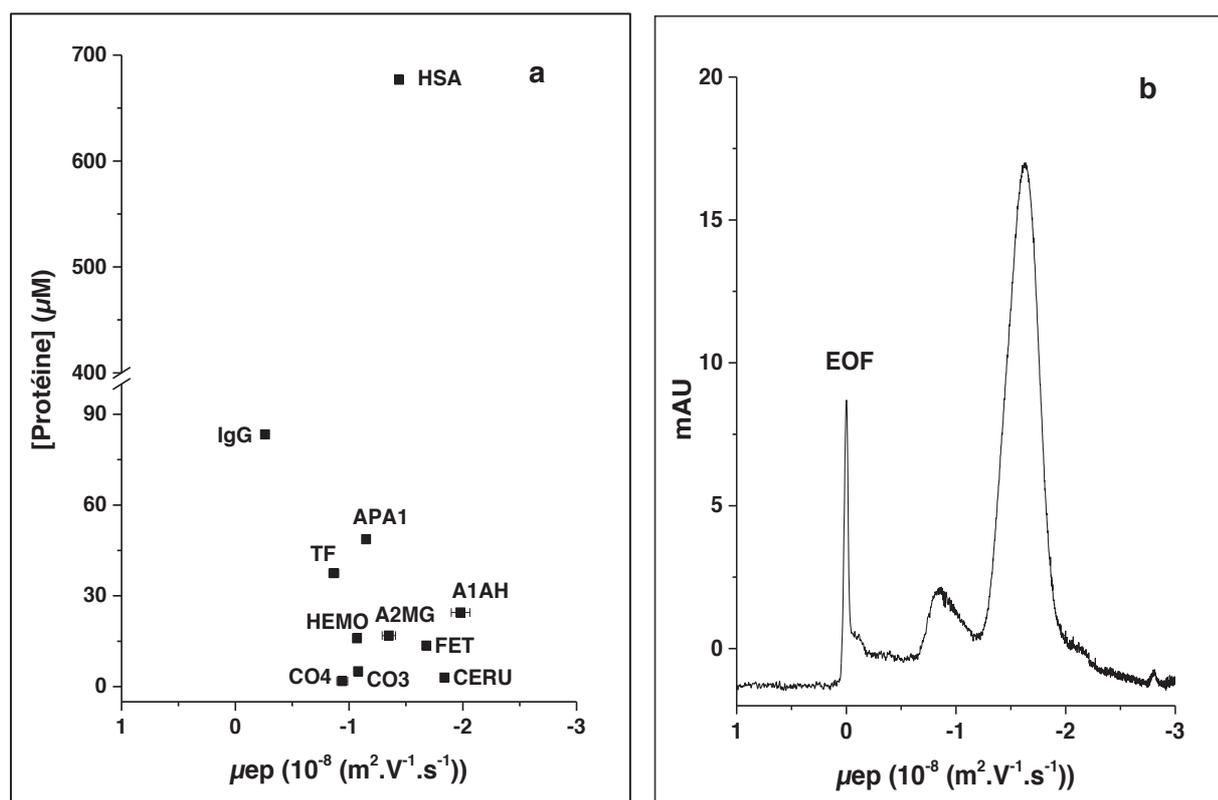


Figure 5.9 : (a) Répartition de 11 protéines sériques en fonction de leur mobilité électrophorétique et de leur concentration dans le sérum (b) Analyse d'un sérum humain dilué 10 fois en CE-UV.

Injection : DMSO 0,1 % à 0,2 psi – 3 s, suivie par l'injection de l'échantillon à 0,5 psi – 5 s.
Séparation : capillaire de silice (L_d / L_t : 54 / 64 cm x 75 μm i.d.), électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, 25 kV à 25°C.
Détection : UV à 214 nm.

5.3.3.2. Analyse d'un sérum humain en présence de l'uranium en CE-ICP/MS

En présence d'échantillons contenant de fortes concentrations en protéines, une adsorption de ces protéines à la surface du capillaire doit être envisagée. Afin de vérifier la présence d'une telle adsorption durant la séparation, des échantillons de sérum à différentes dilutions (10 fois, 5 fois et 4 fois dans l'eau) ont été incubés pendant 4 h à 37°C en présence d'uranium 1 μM , en utilisant soit un capillaire de silice, soit un capillaire neutre recouvert par de l'HPC. La figure 5.10 représente les électrophorégrammes dans les deux types de capillaire.

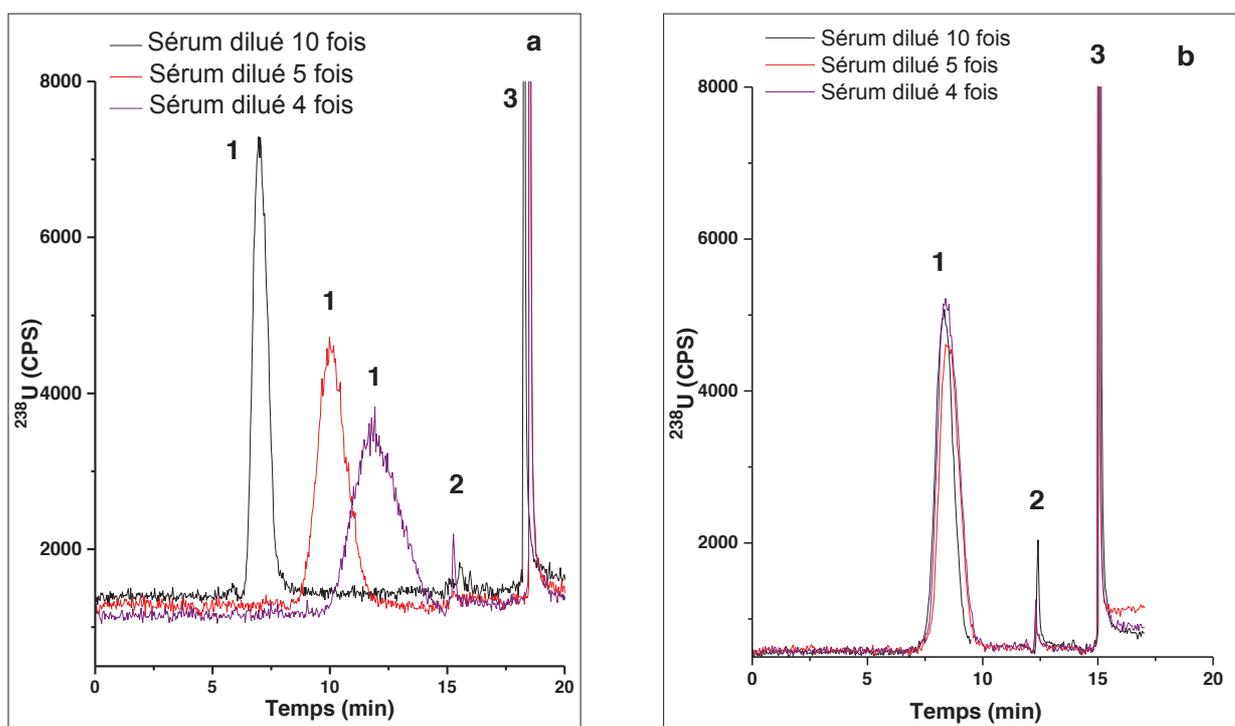


Figure 5.10 : Analyse des sérums humains à différents facteurs de dilution en présence d'uranium en CE-ICP/MS (a) dans le capillaire de silice et (b) dans le capillaire neutre d'HPC. 1- pic correspondant aux complexes protéines-uranium, 2- au rinçage par l'électrolyte, 3- au rinçage par l'acide nitrique.

Échantillons: sérums dilués dans l'eau en présence d'U à 1 μM , incubés 37°C / 4 h.

Injection : TBP 0,01 % dans le DMSO 2 % à 0,2 psi - 3 s, suivi par l'injection de l'échantillon à 0,5 psi - 5 s.

Séparation : (a) capillaire de silice (64 cm x 75 μm i.d.) 25 kV à 25°C, (b) capillaire recouvert par l'HPC (64 cm x 75 μm i.d.) - 30 kV + 0,2 psi à 25°C ; électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4.

Détection : ICP/MS à $m/z = 238$. Liquide additionnel : (a) HNO_3 1 mM ; (b) TRIS 5 mM à pH 7,4.

Quelle que soit la dilution, on observe la présence d'un pic unique de protéine complexant l'uranium. Le Tableau 5.3 récapitule les temps de migration, les mobilités électrophorétiques ainsi que les pourcentages de complexes protéine-uranium obtenus pour ces différentes dilutions.

Tableau 5.3 : Résultats obtenus dans les analyses du sérum – uranium en CE-ICP/MS.

Dilution	Capillaire de silice			Capillaire neutre d'HPC	
	t_m (min)	μ_{ep} ($\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	% Prot-U	t_m (min)	% Prot-U
10 fois*	7,2 ± 0,3	$(-1,69 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	64 ± 5	8,40 ± 0,08	64 ± 2
5 fois*	11 ± 1	$(-1,72 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	65 ± 6	8,37 ± 0,04	78 ± 3
4 fois*	11,8 ± 0,1	$(-1,86 \pm 0,2) \cdot 10^{-8}$	71 ± 4	8,390	80,3 ± 0,2

* n = 2

Les résultats montrent que le temps de migration du pic protéine(s)-U diminue dans le capillaire de silice lorsque la dilution augmente. Ceci semble caractériser une adsorption des protéines sur le capillaire de silice, qui a pour conséquence une diminution de la mobilité électroosmotique par masquage des silanols. Cependant, on constate qu'à partir d'une dilution de 5, la mobilité électrophorétique reste constante. Pour des dilutions moins importantes, on observe des variations de 10 % dans le capillaire de silice, ce qui constitue une variation acceptable pour des analyses d'échantillons biologiques. A titre d'exemple, une variation de 20 % de la mobilité électrophorétique du liposome de cisplatine (de $-1,48 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $-1,79 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) en présence de 0 à 50 % de plasma a été observée dans les analyses en CE-ICP/MS en utilisant un capillaire de silice par Nguyen *et al.*¹⁴⁷ Ce phénomène d'adsorption n'est pas observé sur le capillaire neutre d'HPC où les temps de migration restent constants quelle que soit la dilution.

On constate néanmoins que la dilution des échantillons conduit à une diminution de la proportion de complexe conformément à la loi d'action de masse. Les pourcentages de complexe sont de $(64 \pm 5) \%$ dans le capillaire de silice et de $(64 \pm 2) \%$ dans le capillaire neutre d'HPC pour l'échantillon de sérum dilué 10 fois et de $(71 \pm 4) \%$ et $(80 \pm 1) \%$ pour l'échantillon dilué 4 fois. Des essais réalisés avec des solutions de FET $10 \mu\text{M}$ et $5 \mu\text{M}$ incubées en présence d'uranium $1 \mu\text{M}$ ont montré que les pourcentages de complexe FET-U sont de $(95 \pm 4)\%$ et $(80 \pm 5)\%$ respectivement.

La Figure 5.11 représente les électrophorégrammes issus de l'analyse d'un sérum dilué 5 fois en présence d'uranium en CE-UV (en noir) et en CE-ICP/MS (en bleu). Les électrophorégrammes sont présentés en fonction de la mobilité électrophorétique calculée à partir du temps de migration des analytes dans les deux systèmes afin de s'affranchir des variations de mobilité électroosmotique et de faciliter la correspondance entre les deux détections.

Comme nous l'avons annoncé plus haut, le système n'est pas assez résolutif pour séparer l'ensemble des protéines sériques et on constate en UV uniquement la présence de 3 groupes de protéines globalement négatives, un groupe de mobilités comprises entre 0 et $-5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, un groupe de mobilités comprises entre $-7 \cdot 10^{-9}$ et $-1,3 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et enfin un groupe de mobilités comprises entre $-1,4$ et $-2,2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les résultats montrent que l'uranium semble lié aux protéines de ce dernier groupe.

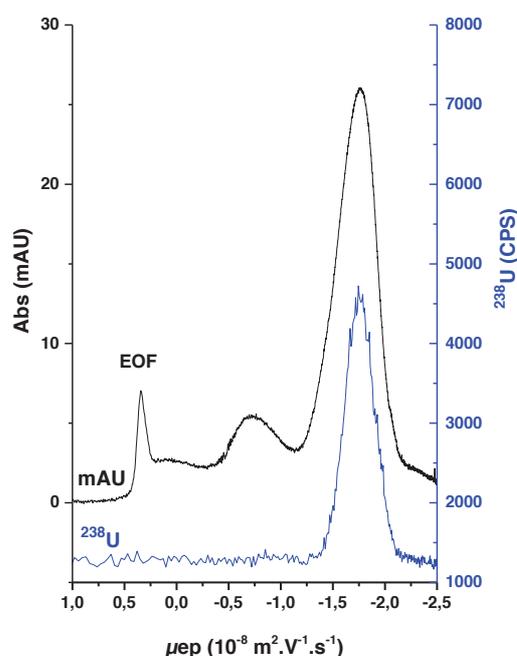


Figure 5.11 : Analyses d'un sérum humain incubé en présence d'uranium en CE-UV (en noir) et en CE-ICP/MS (en bleu)

Échantillon: sérum dilué 5 fois dans l'eau en présence d'U à $1 \mu\text{M}$.

Injection : TBP 0,01 % dans le DMSO 2 % à 0,2 psi - 3 s, suivi par l'injection de l'échantillon à 0,5 psi - 5 s.

Séparation : capillaire de silice (CE-UV : L_d/L_t 54 / 64 cm x $75 \mu\text{m}$ i.d. et CE-ICP/MS : 64 cm x $75 \mu\text{m}$ i.d.) électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, 25 kV à 25°C .

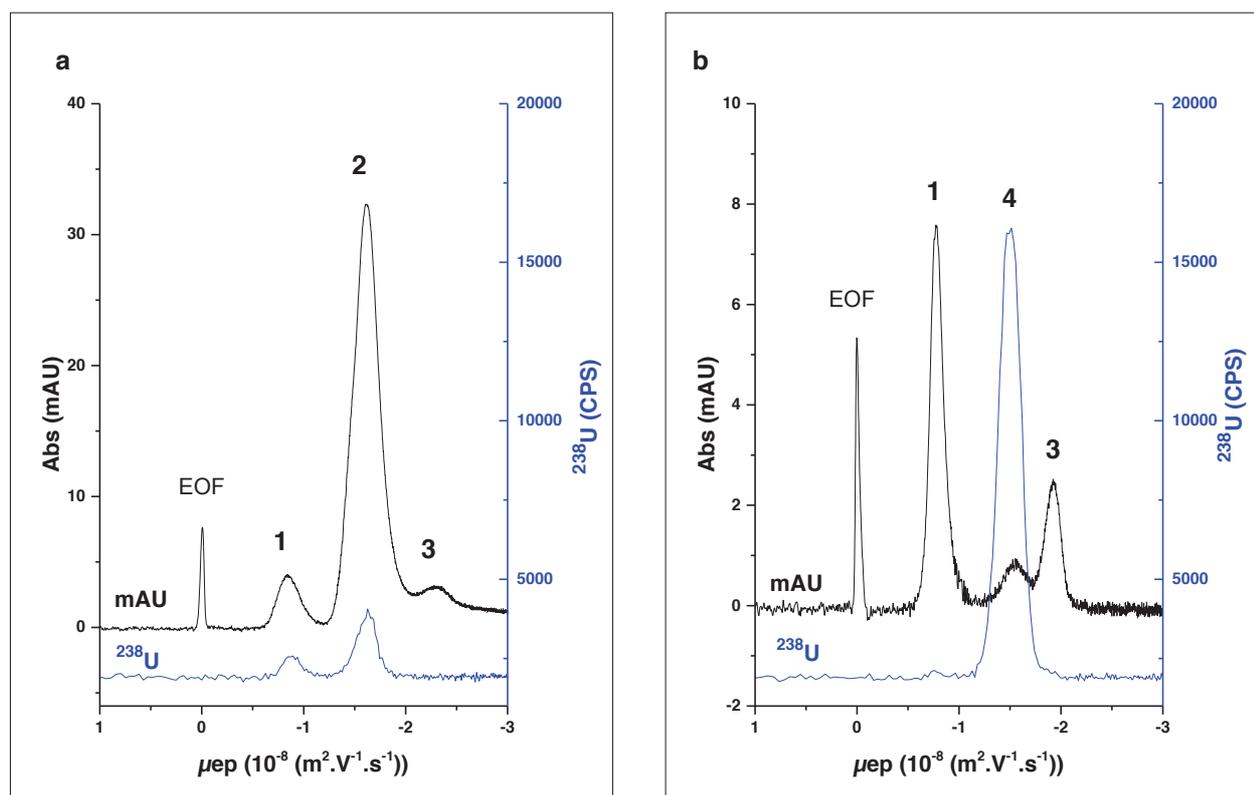
Détection : UV à 214 nm, ICP/MS à $m/z = 238$ (1 s/point) ; 31 (1 s/point). Liquide additionnel HNO_3 1 mM.

5.3.3.3. Analyse de mélanges standards de protéines sériques

Afin de tenter une identification des protéines liées à l'uranium dans le sérum et en absence d'un détecteur de spectrométrie de masse moléculaire, nous avons réalisé des mélanges standards de protéines. Parmi les 11 protéines sériques répertoriées dans le Tableau 5.2, nous avons choisi 3 protéines : HSA, A1AH et FET dont les mobilités électrophorétiques sont comprises dans la gamme -1.4 et $-2,2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. CERU a été écartée en prenant en compte sa concentration et sa constante d'affinité, publiée par C.Basset *et al.*⁴⁴ Bien qu'ayant une mobilité électrophorétique supérieure à la gamme de mobilités où se situe(nt) la(les) cible(s) de l'uranium, TF a été rajoutée comme protéine de référence. Cependant, dans les conditions d'analyse que nous avons utilisées, il y a co-migration entre HSA et FET et nous avons donc réalisé deux mélanges standards de protéines dont les concentrations sont proportionnelles à celles dans le sérum. Le premier mélange contient TF $12 \mu\text{M}$, HSA $200 \mu\text{M}$, A1AH $6 \mu\text{M}$ et U $1 \mu\text{M}$, et dans le deuxième, HSA $200 \mu\text{M}$ est remplacé par FET $4 \mu\text{M}$.

La Figure 5.12 représente les électrophérogrammes de ces deux mélanges de protéines standards en présence d'uranium à la fois en CE-UV (en noir) et en CE-ICP/MS (en bleu). Dans la Figure 5.12 a, la trace en uranium montre que dans le mélange de TF, HSA et

A1AH, ($2,6 \pm 0,2$) % de l'uranium est complexé par TF et (12 ± 2) % par HSA. Aucun complexe avec A1AH n'a été détecté. Il faut noter que si le rapport de concentrations entre HSA et TF est de 16, le rapport des concentrations de leurs complexes respectifs est seulement de 5. Ceci reflète bien la plus forte affinité de TF pour l'uranium, par rapport à celle de HSA. Lorsque HSA est remplacée par FET à une concentration 50 fois plus faible (Figure 5.12 b), la totalité de l'uranium fixé aux protéines, (71 ± 2) %, est fixé par FET. On ne détecte plus le complexe TF-U.



**Figure 5.12 : Analyse de deux mélanges protéines standards en présence de l'uranium en CE-UV (en noir) et en CE-ICP/MS (en bleu).
1- TF, 2- HSA, 3- A1AH, 4- FET.**

Échantillons: (a) TF 12 μM , HSA 200 μM , A1AH 6 μM et U 1 μM , (b) TF 12 μM , FET 4 μM , A1AH 6 μM et U 1 μM incubés 37°C/4 h.

Injection : TBP 0,01 % dans le DMSO 2 % à 0,2 psi - 3 s, suivi par l'injection de l'échantillon à 0,5 psi - 5 s.

Séparation : capillaire de silice (CE-UV : L_d / L_t 54 / 64 cm x 75 μm i.d. et CE-ICP/MS : 64 cm x 75 μm i.d.) électrolyte : TRIS 10 mM, NaCl 15 mM à pH 7,4, 25 kV à 25°C.

Détection : UV à 214 nm, ICP/MS à $m/z = 238$ (1 s/point) ; 31 (1 s/point). Liquide additionnel HNO_3 1 mM.

La Figure 5.13 représente les électrophérogrammes superposés des deux mélanges de protéines standards et du sérum dilué 5 fois en utilisant la détection de l'uranium par ICP/MS. Les résultats montrent que ce dernier électrophérogramme est très proche de celui du mélange contenant FET. Il semble donc que la FET soit clairement la principale cible de l'uranium. Cependant, nous ne pouvons exclure une participation de l'albumine à la complexation de l'uranium. Ceci démontre la nécessité d'envisager l'utilisation d'un détecteur de spectrométrie de masse moléculaire pour identifier les protéines liées à l'uranium.

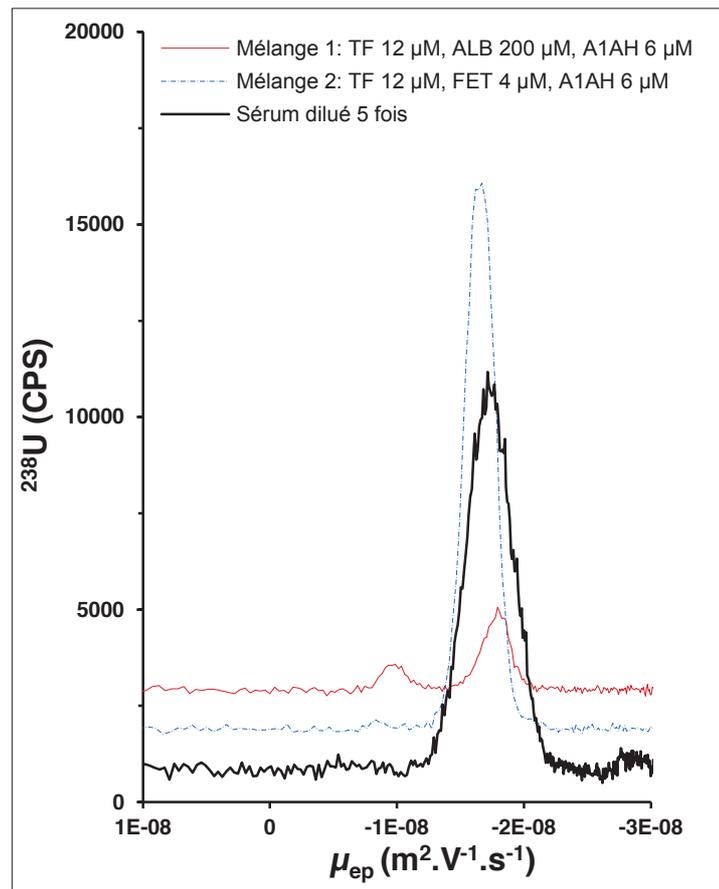


Figure 5.13 : Comparaison des électrophorogrammes obtenus lors de l'analyse des deux mélanges de protéines standards et du sérum dilué 5 fois en présence d'uranium en CE-ICP/MS.

Conditions d'analyse identiques à celles des Figures 5.11 et 5.12.

5.3.4. Conclusion

Nous avons montré que l'analyse d'un sérum humain est possible en CE-ICP/MS par simple dilution des échantillons. Bien que le système souffre d'un manque évident de résolution, la comparaison des électrophorogrammes avec ceux obtenus pour différents mélanges de protéines standards apporte une preuve supplémentaire de l'importance de FET dans la complexation de l'uranium dans le sang. Cependant, l'ICP/MS ne permet pas l'identification univoque de ces protéines et le recours à un couplage avec la spectrométrie de masse moléculaire devra être envisagé.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était de concevoir un outil analytique capable de contribuer aux études sur la toxicité de l'uranium en déterminant les protéines cibles de l'uranium. Ceci impliquait de prendre en compte la nature dynamique du métalloprotéome de l'uranium et donc le travail sur des échantillons biologiques complexes. Nous avons choisi de développer un couplage CE-ICP/MS et d'évaluer son apport dans le criblage de protéines cibles de l'uranium.

Un couplage CE-ICP/MS a donc été mis en place au laboratoire, dont l'interface repose sur l'ajout de liquide additionnel. Celle-ci a été optimisée afin de limiter les phénomènes d'aspiration et de refoulement dus à la différence de débits entre la CE et l'ICP/MS. Toutefois une aspiration résiduelle à l'injection conduit à l'injection de volumes 4,5 fois plus importants qu'en CE-UV. L'analyse de mélanges de protéines préalablement incubés en présence d'uranium montre que les erreurs relatives sur les surfaces de pic et sur les mobilités électrophorétiques n'excèdent pas 5 %, témoignant de la reproductibilité de ce couplage.

Dans le cas de l'uranium, en l'absence de tout phénomène de compétition, la théorie prévoit que la dissociation peut être négligée pour des complexes possédant des constantes de formation supérieures à $10^{9,5} \text{ M}^{-1}$. Ceci est illustré par le cas de FET où aucune modification significative du complexe n'a été observée lors de séparations de durées variables, grâce à sa forte affinité.

Nos études ont démontré que les conditions d'analyse sont un des points-clés, lorsqu'on s'intéresse à des espèces non-covalentes. Ainsi, le choix du pH de l'électrolyte, en particulier, est dicté par le pH de l'échantillon. Un des verrous persistant à l'heure actuelle est la non-existence de capillaires inertes vis-à-vis de l'uranium et/ou des protéines. Ainsi, nous avons montré la sorption d'environ 6 à 10 % de l'uranium lors de l'injection d'une solution 1 μM de ce métal en présence de protéines très affines. De plus, une adsorption préférentielle de l'OPN semble exister dans ce type de capillaire. L'utilisation de capillaires neutres recouverts d'HPC semble plus prometteuse grâce à la diminution du taux des silanols. Toutefois, l'adsorption de l'uranium à la surface de ces capillaires n'est pas totalement inhibée (1 à 2 % dans les mêmes conditions).

La méthode analytique a ensuite été validée par des études concernant l'interaction de l'uranium avec trois protéines cibles de l'uranium, recensées dans la bibliographie : la

transferrine, la fétuine et un fragment de l'ostéopontine. Les études individuelles sur ces protéines montrent que FET possède un site de forte affinité pour l'uranium tandis que fOPN possède plusieurs sites. Des études compétitives ont été réalisées afin de déterminer les constantes d'affinité pour l'uranium de ces différentes protéines.

L'utilisation d'un compétiteur tel que le carbonate, dont les constantes de complexation avec l'uranium sont connues, a permis de déterminer les constantes de complexation avec FET. Cette étude a mis en évidence l'existence de deux espèces : un complexe $FET(UO_2^{2+})$, $\log_{K1}{}_{FET-U} = 11,4 \pm 0,3$, et un complexe $FET(UO_2^{2+})(CO_3^{2-})$, $\log_{K2}{}_{FET-U} = 7,4 \pm 0,1$, en fonction des concentrations en carbonates présentes dans le milieu. Grâce à ces constantes, FET a, à son tour, été utilisée comme compétiteur dans les études de complexation de l'uranium par fOPN et TF. Dans le cas de fOPN, la constante de complexation relative à la formation d'un complexe 1 :1 a été calculée comme étant $\log_{K1}{}_{fOPN-U} = 11,5 \pm 0,3$. Les résultats montrent l'existence d'un second site d'affinité dont la constante a été évaluée, $\log_{K2}{}_{fOPN-U} = 12,5$, et semble indiquer une coopérativité inter-site. Quant à TF-U qui forme un complexe d'affinité modérée avec l'uranium, dont l'existence est affectée par la compétition des silanols de surface du capillaire, la constante de complexation a été estimée en première approximation : $\log_{K1}{}_{TF-U} = 9,7 \pm 0,4$. Ceci ne représente néanmoins qu'un ordre de grandeur. Ces résultats sont en avec ceux obtenus par Vidaud *et al.* notamment en SPR, et confirment l'applicabilité de cette méthode dans l'étude des complexes non-covalents de l'uranium.

Les atouts d'un tel couplage sont sa rapidité, l'utilisation de faibles volumes mais aussi la facilité d'interprétation des résultats. Ceux-ci ont été illustrés au travers de trois applications différentes.

Le potentiel de la détection multi-élémentaire de l'ICP/MS a été démontré dans l'étude de l'influence des métaux présents dans le sang sur la complexation de l'uranium par les protéines en détectant simultanément trois métaux. Les résultats montrent qu'avec des concentrations en métal 10 à 100 fois supérieures à celle de l'uranium, la répartition de l'uranium entre les trois protéines n'est que peu altérée. Les protéines ne perdent pas plus de 11 % de l'uranium initialement complexé. On note toutefois l'aptitude de ces protéines à fixer des métaux de transition, en faibles quantités cependant. Ainsi la présence de complexes FET-Zn, OPN-Zn et OPN-Fe a été détectée. Dans ce dernier cas, il faut signaler que la présence de fer dans l'OPN a été détectée lors de l'addition de Fe(II) à l'échantillon mais aussi en présence de TF-Fe, ce qui semble montrer la capacité de l'OPN à fixer indifféremment Fe (II) et Fe (III).

La seconde problématique traitée concerne l'inhibition de la précipitation du phosphate de calcium par FET et OPN. L'influence de l'uranium sur cette propriété commune à ces deux protéines a été étudiée. Pour cela, nous avons mis en place une méthodologie basée sur

l'utilisation conjointe de différentes techniques : mesure des concentrations en solution par ICP/MS, évaluation de la taille des agrégats par DLS et détection de la formation de complexes protéine-U par CE-ICP/MS. La présence de l'uranium a été démontrée comme n'ayant aucun effet sur la précipitation du phosphate de calcium. Cependant, on note une diminution de la taille des particules en solution. Le couplage CE-ICP/MS montre le maintien de complexe protéine-uranium en présence d'une concentration en calcium 5000 fois plus importante que celle de l'uranium, information non accessible par les autres méthodes utilisées.

Enfin, l'analyse d'un sérum humain par simple dilution des échantillons démontre le grand potentiel du couplage CE-ICP/MS dans la détermination des protéines cibles de l'uranium dans les fluides biologiques. Bien que le système souffre d'un manque de résolution, l'utilisation de mélanges de protéines standards démontre que la FET est la cible la plus importante de l'uranium dans le sang, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par les études réalisées en SPR. Ces analyses sont relativement rapides (moins de 20 min), complètement automatisées et consomment peu d'échantillon (100 pmol).

En conclusion, ce couplage CE-ICP/MS constitue certainement une alternative complémentaire à l'ensemble de techniques séparatives utilisées dans la recherche des cibles de l'uranium dans les fluides biologiques. Toutefois, l'adjonction d'une détection spectrométrie de masse moléculaire à ce couplage se révèle incontournable pour identifier sans ambiguïté les protéines cibles de l'uranium. Si cet outil ne possède pas la résolution suffisante à l'analyse d'échantillons réels, il pourra cependant être intégré dans un dispositif séparatif multi-dimensionnel, impliquant par exemple la chromatographie d'exclusion stérique afin de gagner en sélectivité. Il faut cependant noter que dans le cas particulier de l'uranium, l'élaboration de supports inertes est d'une importance cruciale.

Afin de contribuer à la compréhension des mécanismes d'action de l'uranium, la méthode pourra également être appliquée à l'analyse d'un sérum déplété des protéines majeures, afin d'avoir un accès aux protéines les moins abondantes, ou à d'autres types de fluides biologiques (urine, liquide cébrospinal, etc.) pour élargir le domaine de recherche des cibles protéiques de l'uranium. Il faut aussi noter que cette technique est applicable dans la recherche des cibles protéiques d'autres métaux et des nanoparticules métalliques grâce au détecteur multi-élémentaire d'ICP/MS.

Références bibliographiques

1. Moffett, K., Crosson, B., Spence, J. S., Case, K., Levy, I., Gopinath, K., Shah, P., Goyal, A., Fang, Y., Briggs, R. W., Hart, J., Moore, A. & Haley, R. W. Word-finding impairment in veterans of the 1991 Persian Gulf War. *Brain Cogn.* **98**, 65–73 (2015).
2. Patocka, J., Honegr, J. & Soukup, O. Gulf war syndrome – a syndrome or not? *Toxin Rev.* **34**, 43–52 (2015).
3. *Toxicological profile for Uranium*. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2013).
4. WHO. Uranium in Drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. 1–21 (2012).
5. Frengstad, B., Skrede, A. K. M., Nord, B., Banks, D., Krog, J. R. & Siewers, U. The chemistry of Norwegian groundwaters: III. The distribution of trace elements in 476 crystalline bedrock groundwaters, as analysed by ICP-MS techniques. *Sci. Total Environ.* **246**, 21–40 (2000).
6. Kurttio, P., Auvinen, A., Salonen, L., Saha, H., Pekkanen, J., Mäkeläinen, I., Väisänen, S. B., Penttilä, I. M. & Komulainen, H. Renal effects of uranium in drinking water. *Environ. Health Perspect.* **110**, 337–342 (2002).
7. Stojanovic, M., Mrdakovic Popic, J., Stevanovic, D. & Martinovic, L. J. Phosphorus fertilizers as a source of uranium in Serbian soils. *Agron. Sustain. Dev.* **26**, 179–183 (2006).
8. Alrakabi, M., Singh, G., Bhalla, A., Kumar, S., Kumar, S., Srivastava, A., Rai, B., Singh, N., Shahi, J. S. & Mehta, D. Study of uranium contamination of ground water in Punjab state in India using X-ray fluorescence technique. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **294**, 221–227 (2012).
9. Ansoborlo, E., Lebaron-Jacobs, L. & Prat, O. Uranium in drinking-water: A unique case of guideline value increases and discrepancies between chemical and radiochemical guidelines. *Environ. Int.* **77**, 1–4 (2015).
10. Fisenne, I. M., Perry, P. M. & Harley, N. H. Uranium in Humans. *Radiat Prot Dosim.* **24**, 127–131 (1988).
11. Gorden, A. E. V., Xu, J., Raymond, K. N. & Durbin, P. Rational Design of Sequestering Agents for Plutonium and Other Actinides. *Chem. Rev.* **103**, 4207–4282 (2003).
12. Dublineau, I., Petitot, F., Lestaevel, P. & Mabondzo, A. in *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine* (Lavoisier, France, 2009).
13. Carrière, M., Proux, O., Milgram, S., Thiebault, C., Avoscan, L., Barre, N., Den Auwer, C. & Gouget, B. Transmission electron microscopic and X-ray absorption fine structure spectroscopic investigation of U repartition and speciation after accumulation in renal cells. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 655–662 (2008).

14. Malard, V., Gaillard, J.-C., Bérenguer, F., Sage, N. & Quéméneur, E. Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1794**, 882–891 (2009).
15. Prat, O., Bérenguer, F., Steinmetz, G., Ruat, S., Sage, N. & Quéméneur, E. Alterations in gene expression in cultured human cells after acute exposure to uranium salt: Involvement of a mineralization regulator. *Toxicol. In Vitro* **24**, 160–168 (2010).
16. Prat, O., Berenguer, F., Malard, V., Tavan, E., Sage, N., Steinmetz, G. & Quemeneur, E. Transcriptomic and proteomic responses of human renal HEK293 cells to uranium toxicity. *Proteomics* **5**, 297–306 (2005).
17. Prat, O., Ansoborlo, E., Sage, N., Cavadore, D., Lecoix, J., Kurttio, P. & Quemeneur, E. From cell to man: Evaluation of osteopontin as a possible biomarker of uranium exposure. *Environ. Int.* **37**, 657–662 (2011).
18. Xie, H., LaCerte, C., Thompson, W. D. & Wise, J. P. Depleted Uranium Induces Neoplastic Transformation in Human Lung Epithelial Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 373–378 (2010).
19. LaCerte, C., Xie, H., Aboueissa, A.-M. & Wise, J. P. Particulate depleted uranium is cytotoxic and clastogenic to human lung epithelial cells. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **697**, 33–37 (2010).
20. Malard, V., Prat, O., Darrouzet, E., Bérenguer, F., Sage, N. & Quéméneur, E. Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium. *Proteomics* **5**, 4568–4580 (2005).
21. Gazin, V., Kerdine, S., Grillon, G., Pallardy, M. & Raoul, H. Uranium induces TNF α secretion and MAPK activation in a rat alveolar macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **194**, 49–59 (2004).
22. Milgram, S., Carrière, M., Malaval, L. & Gouget, B. Cellular accumulation and distribution of uranium and lead in osteoblastic cells as a function of their speciation. *Toxicology* **252**, 26–32 (2008).
23. Milgram, S., Carrière, M., Thiebault, C., Malaval, L. & Gouget, B. Cytotoxic and phenotypic effects of uranium and lead on osteoblastic cells are highly dependent on metal speciation. *Toxicology* **250**, 62–69 (2008).
24. Milgram, S., Thiebault, C., Carriere, M., Malaval, L. & Gouget, B. Speciation governs chemical toxicity and cellular accumulation of lead on rat osteoblastic bone cells. *Toxicol. Lett.* **164**, S197–S198 (2006).
25. Rodrigues, G., Arruda-Neto, J. D. T., Pereira, R. M. R., Kleeb, S. R., Geraldo, L. P., Primi, M. C., Takayama, L., Rodrigues, T. E., Cavalcante, G. T., Genofre, G. C., Semmler, R., Nogueira, G. P. & Fontes, E. M. Uranium deposition in bones of Wistar rats associated with skeleton development. *Appl. Radiat. Isot.* **82**, 105–110 (2013).
26. Arzuaga, X., Gehlhaus, M. & Strong, J. Modes of action associated with uranium induced adverse effects in bone function and development. *Toxicol. Lett.* **236**, 123–130 (2015).
27. Sawicki, M., Lecerclé, D., Grillon, G., Le Gall, B., Sérandour, A.-L., Poncy, J.-L., Bailly, T., Burgada, R., Lecouvey, M., Challeix, V., Leydier, A., Pellet-Rostaing, S., Ansoborlo, E. & Taran, F.

- Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for in vitro and in vivo uranium(VI) chelation. *Eur. J. Med. Chem.* **43**, 2768–2777 (2008).
28. Fattal, E., Tsapis, N. & Phan, G. Novel drug delivery systems for actinides (uranium and plutonium) decontamination agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **90**, 40–54 (2015).
29. Abergel, R. J., Durbin, P. W., Kullgren, B., Ebbe, S. N., Xu, J., Chang, P. Y., Bunin, D. I., Blakely, E. A., Bjornstad, K. A., Rosen, C. J., Shuh, D. K. & Raymond, K. N. Biomimetic Actinide Chelators: An Update on the Preclinical Development of the Orally Active Hydroxypyridonate Decorporation Agents 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2- HOPO). *Health Phys.* **99**, 401–407 (2010).
30. Durbin, P. W., Kullgren, B., Xu, J. & Raymond, K. N. New agents for in vivo chelation of uranium(VI): efficacy and toxicity in mice of multidentate catecholate and hydroxypyridinonate ligands. *Health Phys.* **72**, 865–879 (1997).
31. Fukuda, S. Chelating agents used for plutonium and uranium removal in radiation emergency medicine. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2765–2770 (2005).
32. Fukuda, S., Ikeda, M., Nakamura, M., Yan, X. & Xie, Y. Efficacy of oral and intraperitoneal administration of CBMIDA for removing uranium in rats after parenteral injections of depleted uranium. *Radiat. Prot. Dosimetry* **133**, 12–19 (2009).
33. Pannu, T. S. Uranium-Toxicity and Uranium- Induced Osteosarcoma Using A New Regimen and Surgery : A First-Time Experience. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, RD01–RD03 (2015).
34. Lebrun, C., Starck, M., Gathu, V., Chenavier, Y. & Delangle, P. Engineering Short Peptide Sequences for Uranyl Binding. *Chem. - Eur. J.* **20**, 16566–16573 (2014).
35. Pardoux, R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Delangle, P., Guilloreau, L., Adriano, J.-M. & Berthomieu, C. Modulating Uranium Binding Affinity in Engineered Calmodulin EF-Hand Peptides: Effect of Phosphorylation. *PLoS One* **7**, e41922 (2012).
36. Zhou, L., Bosscher, M., Zhang, C., Özçubukçu, S., Zhang, L., Zhang, W., Li, C. J., Liu, J., Jensen, M. P., Lai, L. & He, C. A protein engineered to bind uranyl selectively and with femtomolar affinity. *Nat. Chem.* **6**, 236–241 (2014).
37. Reisser-Rubrecht, L., Torne-Celer, C., Rénier, W., Averseng, O., Plantevin, S., Quéméneur, E., Bellanger, L. & Vidaud, C. High-affinity uranyl-specific antibodies suitable for cellular imaging. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 349–357 (2007).
38. May, C. C., Worsfold, P. J. & Keith-Roach, M. J. Analytical techniques for speciation analysis of aqueous long-lived radionuclides in environmental matrices. *TrAC* **27**, 160–168 (2008).
39. Sun, H., Li, H. & Sadler, P. J. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chem. Rev.* **99**, 2817–2842 (1999).
40. Vidaud, C., Gourion-Arsiquaud, S., Rollin-Genetet, F., Torne-Celer, C., Plantevin, S., Pible, O., Berthomieu, C. & Quéméneur, E. Structural Consequences of Binding of UO_2^{2+} to Apotransferrin: Can This Protein Account for Entry of Uranium into Human Cells? *Biochemistry* **46**, 2215–2226 (2007).

41. Montavon, G., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Repinc, U. & Morgenstern, A. Spectroscopic study of the interaction of U(VI) with transferrin and albumin for speciation of U(VI) under blood serum conditions. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 1609–1616 (2009).
42. Wan, D., Liao, L.-F., Zhao, M.-M., Wu, M.-L., Wu, Y.-M. & Lin, Y.-W. Interactions of uranyl ion with cytochrome b 5 and its His39Ser variant as revealed by molecular simulation in combination with experimental methods. *J. Mol. Model.* **18**, 1009–1013 (2012).
43. Michon, J., Frelon, S., Garnier, C. & Coppin, F. Determinations of Uranium(VI) Binding Properties with some Metalloproteins (Transferrin, Albumin, Metallothionein and Ferritin) by Fluorescence Quenching. *J. Fluoresc.* **20**, 581–590 (2010).
44. Basset, C., Averseng, O., Ferron, P.-J., Richaud, N., Hagège, A., Pible, O. & Vidaud, C. Revision of the Biodistribution of Uranyl in Serum: Is Fetuin-A the Major Protein Target? *Chem. Res. Toxicol.* **26**, 645–653 (2013).
45. Sun, M.-H., Liu, S.-Q., Du, K.-J., Nie, C.-M. & Lin, Y.-W. A spectroscopic study of uranyl-cytochrome b5/cytochrome c interactions. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **118**, 130–137 (2014).
46. Coppin, F., Michon, J., Garnier, C. & Frelon, S. Fluorescence Quenching Determination of Uranium (VI) Binding Properties by Two Functional Proteins: Acetylcholinesterase (AChE) and Vitellogenin (Vtg). *J. Fluoresc.* **25**, 569–576 (2015).
47. Bernaudat, F. & Bülow, L. Rapid evaluation of nickel binding properties of His-tagged lactate dehydrogenases using surface plasmon resonance. *J. Chromatogr. A* **1066**, 219–224 (2005).
48. Canoa, P., Simón-Vázquez, R., Popplewell, J. & González-Fernández, Á. A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance. *Biosens. Bioelectron.* **74**, 376–383 (2015).
49. Averseng, O., Hagège, A., Taran, F. & Vidaud, C. Surface Plasmon Resonance for Rapid Screening of Uranyl Affine Proteins. *Anal. Chem.* **82**, 9797–9802 (2010).
50. Zhang, Y., Xu, M., Wang, Y., Toledo, F. & Zhou, F. Studies of metal ion binding by apo-metallothioneins attached onto preformed self-assembled monolayers using a highly sensitive surface plasmon resonance spectrometer. *Sens. Actuators B Chem.* **123**, 784–792 (2007).
51. Xin, Y., Gao, Y., Guo, J., Chen, Q., Xiang, J. & Zhou, F. Real-time detection of Cu²⁺ sequestration and release by immobilized apo-metallothioneins using SECM combined with SPR. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 369–375 (2008).
52. Vogiatzis, C. G. & Zachariadis, G. A. Tandem mass spectrometry in metallomics and the involving role of ICP-MS detection: A review. *Anal. Chim. Acta* **819**, 1–14 (2014).
53. Xu, M., Yang, L. & Wang, Q. Chemical interactions of mercury species and some transition and noble metals towards metallothionein (Zn7MT-2) evaluated using SEC/ICP-MS, RP-HPLC/ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Metallomics* **5**, 855 (2013).

54. Arena, G., Fattorusso, R., Grasso, G., Grasso, G. I., Isernia, C., Malgieri, G., Milardi, D. & Rizzarelli, E. Zinc(II) Complexes of Ubiquitin: Speciation, Affinity and Binding Features. *Chem. - Eur. J.* **17**, 11596–11603 (2011).
55. Chen, Z. & Weber, S. G. Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *TrAC* **27**, 738–748 (2008).
56. Schmidt, A.-C., Störr, B. & Kummer, N.-A. Influence of one- and two-dimensional gel electrophoresis procedure on metal–protein bindings examined by electrospray ionization mass spectrometry, inductively coupled plasma mass spectrometry, and ultrafiltration. *Talanta* **85**, 1118–1128 (2011).
57. De Ricco, R., Potocki, S., Kozłowski, H. & Valensin, D. NMR investigations of metal interactions with unstructured soluble protein domains. *Coord. Chem. Rev.* **269**, 1–12 (2014).
58. Mizuoka, K., Grenthe, I. & Ikeda, Y. Structural and Kinetic Studies on Uranyl(V) Carbonate Complex Using ^{13}C NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* **44**, 4472–4474 (2005).
59. Jiang, J., Renshaw, J. C., Sarsfield, M. J., Livens, F. R., Collison, D., Charnock, J. M. & Eccles, H. Solution Chemistry of Uranyl Ion with Iminodiacetate and Oxydiacetate: A Combined NMR/EXAFS and Potentiometry/Calorimetry Study. *Inorg. Chem.* **42**, 1233–1240 (2003).
60. Safi, S., Creff, G., Jeanson, A., Qi, L., Basset, C., Roques, J., Solari, P. L., Simoni, E., Vidaud, C. & Den Auwer, C. Osteopontin: A Uranium Phosphorylated Binding-Site Characterization. *Chem. - Eur. J.* **19**, 11261–11269 (2013).
61. Wilcox, D. E. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica Chim. Acta* **361**, 857–867 (2008).
62. Sarioglu, O. F., Ozdemir, A., Karaboduk, K. & Tekinay, T. Comparative serum albumin interactions and antitumor effects of Au(III) and Ga(III) ions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **29**, 111–115 (2015).
63. Xie, B., Dong, X., Wang, Y. & Sun, Y. Multifunctionality of Acidulated Serum Albumin on Inhibiting Zn^{2+} -Mediated Amyloid β -Protein Fibrillogenesis and Cytotoxicity. *Langmuir* **31**, 7374–7380 (2015).
64. Carter, E. L. & Hausinger, R. P. Characterization of the *Klebsiella aerogenes* Urease Accessory Protein UreD in Fusion with the Maltose Binding Protein. *J. Bacteriol.* **192**, 2294–2304 (2010).
65. Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.-L., Carrupt, P.-A. & Martel, S. Drug–protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 53–66 (2010).
66. Redweik, S., Xu, Y. & Wätzig, H. Precise, fast, and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis: Part 1: Performance: CE and CEC. *Electrophoresis* **33**, 3316–3322 (2012).
67. Alhazmi, H. A., Nachbar, M., Albishri, H. M., El-Hady, D. A., Redweik, S., El Deeb, S. & Wätzig, H. A comprehensive platform to investigate protein–metal ion interactions by affinity capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **107**, 311–317 (2015).

68. Heegaard, N. H. H., He, X. & Blomberg, L. G. Binding of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and heparin by human serum amyloid P component in affinity capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 2609–2615 (2006).
69. Brunel, B., Philippini, V., Mendes, M. & Aupiais, J. Actinide oxalate complexes formation as a function of temperature by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Radiochim. Acta* **103**, (2015).
70. Petit, J., Geertsen, V., Beaucaire, C. & Stambouli, M. Metal complexes stability constant determination by hyphenation of capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry: The case of 1:1 metal-to-ligand stoichiometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 4113–4120 (2009).
71. Petit, J., Aupiais, J., Topin, S., Geertsen, V., Beaucaire, C. & Stambouli, M. Stability constants determination of successive metal complexes by hyphenated CE-ICPMS. *Electrophoresis* **31**, 355–363 (2010).
72. Cheung, R. C. F., Wong, J. H. & Ng, T. B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1411–1420 (2012).
73. Block, H., Maertens, B., Priestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. & Schäfer, F. in *Methods in Enzymology* **463**, 439–473 (Elsevier, 2009).
74. Basset, C., Dedieu, A., Guérin, P., Quéméneur, E., Meyer, D. & Vidaud, C. Specific capture of uranyl protein targets by metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A* **1185**, 233–240 (2008).
75. Dedieu, A., Bérenguer, F., Basset, C., Prat, O., Quéméneur, E., Pible, O. & Vidaud, C. Identification of uranyl binding proteins from human kidney-2 cell extracts by immobilized uranyl affinity chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1216**, 5365–5376 (2009).
76. Kung, C.-C. S., Huang, W.-N., Huang, Y.-C. & Yeh, K.-C. Proteomic survey of copper-binding proteins in Arabidopsis roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **6**, 2746–2758 (2006).
77. Chaga, G. S. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**, 313–334 (2001).
78. Vidaud, C., Dedieu, A., Basset, C., Plantevin, S., Dany, I., Pible, O. & Quéméneur, E. Screening of Human Serum Proteins for Uranium Binding. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 946–953 (2005).
79. Ba, L. A., Doering, M., Burkholz, T. & Jacob, C. Metal trafficking: from maintaining the metal homeostasis to future drug design. *Metallomics* **1**, 292–311 (2009).
80. Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C. & Madic, C. Uranium speciation in biological medium by means of capillary electrophoresis and time-resolved laser-induced fluorescence. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **226**, 145–148 (1997).
81. Becker, J. S., Zoriy, M., Becker, J. S., Pickhardt, C., Damoc, E., Juhacz, G., Palkovits, M. & Przybylski, M. Determination of Phosphorus-, Copper-, and Zinc-Containing Human Brain Proteins by LA-ICPMS and MALDI-FTICR-MS. *Anal. Chem.* **77**, 5851–5860 (2005).

82. Frelon, S., Guipaud, O., Mounicou, S., Lobinski, R., Delissen, O. & Paquet, F. In vivo screening of proteins likely to bind uranium in exposed rat kidney. *Radiochim. Acta* **97**, 367–373 (2009).
83. Frelon, S., Mounicou, S., Lobinski, R., Gilbin, R. & Simon, O. Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere* **91**, 481–490 (2013).
84. Xu, M., Frelon, S., Simon, O., Lobinski, R. & Mounicou, S. Non-denaturing isoelectric focusing gel electrophoresis for uranium–protein complexes quantitative analysis with LA-ICP MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1063–1072 (2014).
85. Chevari, S. & Likhner, D. Complex Formation of Natural Uranium in Blood. *Med. Radiol.* **13**, 53–57 (1968).
86. Qi, L., Basset, C., Averseng, O., Quéméneur, E., Hagège, A. & Vidaud, C. Characterization of UO_2^{2+} binding to osteopontin, a highly phosphorylated protein: insights into potential mechanisms of uranyl accumulation in bones. *Metallomics* **6**, 166–176 (2014).
87. Welch, S. in *Transferrin: the iron carrier* 65–69 (CRC Press, 1992).
88. Aisen, P., Leibman, A. & Zweier, J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**, 1930–1937 (1978).
89. Aisen, P. & Listowsky, I. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 357–393 (1980).
90. Mizutani, K., Toyoda, M. & Mikami, B. X-ray structures of transferrins and related proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 203–211 (2012).
91. Vincent, J. B. & Love, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 362–378 (2012).
92. Kurokawa, H., Mikami, B. & Hirose, M. Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **254**, 196–207 (1995).
93. Jeffrey, P. D., Bewley, M. C., MacGillivray, R. T. A., Mason, A. B., Woodworth, R. C. & Baker, E. N. Ligand-induced conformational change in transferrins: Crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin. *Biochemistry* **37**, 13978–13986 (1998).
94. Harris, W. R. & Messori, L. A comparative study of aluminum (III), gallium (III), indium (III), and thallium (III) binding to human serum transferrin. *Coord. Chem. Rev.* **228**, 237–262 (2002).
95. Lieu, P. T., Heiskala, M., Peterson, P. A. & Yang, Y. The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **22**, 1–87 (2001).
96. Chung, M. Structure and function of transferrin. *Biochem. Educ.* **12**, 146–154 (1984).
97. Bernat, I. in *Iron metabolism* 81 (Springer, 1983).
98. Kasvosve, I. & Delanghe, J. Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status. *Clin Chem Lab Med* **40**, 1014–1018 (2002).

99. Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T. & El Hage Chahine, J.-M. Can Uranium Be Transported by the Iron-Acquisition Pathway? Ur Uptake by Transferrin. *J. Phys. Chem. B* **115**, 4206–4215 (2011).
100. Bali, P. K. & Aisen, P. Receptor-modulated iron release from transferrin: differential effects on N-and C-terminal sites. *Biochemistry* **30**, 9947–9952 (1991).
101. Williams, J. & Moreton, K. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin human serum. *Biochem J* **185**, 483–488 (1980).
102. Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T. & El Hage Chahine, J.-M. The Mechanism of Iron Release from the Transferrin-Receptor 1 Adduct. *J. Mol. Biol.* **358**, 1125–1136 (2006).
103. Sanna, D., Garribba, E. & Micera, G. Interaction of VO^{2+} ion with human serum transferrin and albumin. *J. Inorg. Biochem.* **103**, 648–655 (2009).
104. Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C. & Madic, C. Uranium (VI)-transferrin system studied by time-resolved laser-induced fluorescence. *Radiat Prot Dosim* **79**, 505–508 (1998).
105. Mori, K., Emoto, M. & Inaba, M. Fetuin-A: a multifunctional protein. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discov.* **5**, 124–146 (2011).
106. Triffitt, J. T., Gebauer, U., Ashton, B. A. & Owen, M. E. Origin of plasma $\alpha 2$ HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* **262**, 226–227 (1976).
107. Jahnen-Dechent, W., Heiss, A., Schafer, C. & Ketteler, M. Fetuin-A Regulation of Calcified Matrix Metabolism. *Circ. Res.* **108**, 1494–1509 (2011).
108. Häusler, M., Schäfer, C., Osterwinter, C. & Jahnen-Dechent, W. The physiologic development of fetuin-a serum concentrations in children. *Pediatr. Res.* **66**, 660–664 (2009).
109. Dickson, I. R., Bagga, M. & Paterson, C. R. Variations in the serum concentration and urine excretion of $\alpha 2$ HS-glycoprotein, a bone-related protein, in normal individuals and in patients with osteogenesis imperfecta. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 16–20 (1983).
110. Pederson, K. O. Fetuin, a new globulin isolated from serum. *Nature* **154**, 575 (1944).
111. Binkert, C., Demetriou, M., Sukhu, B., Szveras, M., Tenenbaum, H. C. & Dennis, J. W. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J. Biol. Chem.* **274**, 28514–28520 (1999).
112. Brylka, L. & Jahnen-Dechent, W. The Role of Fetuin-A in Physiological and Pathological Mineralization. *Calcif. Tissue Int.* **93**, 355–364 (2013).
113. Heiss, A., DuChesne, A., Denecke, B., Grotzinger, J., Yamamoto, K., Renne, T. & Jahnen-Dechent, W. Structural Basis of Calcification Inhibition by 2-HS Glycoprotein/Fetuin-A: Formation of colloidal calciprotein particles. *J. Biol. Chem.* **278**, 13333–13341 (2003).
114. Mathews, S. T., Chellam, N., Srinivas, P. R., Cintron, V. J., Leon, M. A., Goustin, A. S. & Grunberger, G. $\alpha 2$ -HSG, a specific inhibitor of insulin receptor autophosphorylation, interacts with the insulin receptor. *Mol Cell Endocrinol* **164**, 87–98 (2000).

115. Oldberg, A., Franzén, A. & Heinegard, D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 8819–8823 (1986).
116. Singh, K., Deonaraine, D., Shanmugam, V., Senger, D. R., Mukherjee, A. B., Chang, P.-L., Prince, C. W. & Mukherjee, B. B. Calcium-binding properties of osteopontin derived from non-osteogenic sources. *J. Biochem.* **114**, 702–707 (1993).
117. Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. & Fedarko, N. S. Flexible Structures of SIBLING Proteins, Bone Sialoprotein, and Osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 460–465 (2001).
118. Christensen, B., Nielsen, M. S., Haselmann, K. F., Petersen, T. E. & Sørensen, E. S. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters: identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. *Biochem. J.* **390**, 285 (2005).
119. Sørensen, E. S., Petersen, T. E. & Højrup, P. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: Identification of twenty-eight phosphorylation and three O-glycosylation sites. *Protein Sci.* **4**, 2040–2049 (1995).
120. Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J. & Denhardt, D. T. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J. Cell. Biochem.* **102**, 912–924 (2007).
121. Giachelli, C. M. & Steitz, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* **19**, 615–622 (2000).
122. Scatena, M., Liaw, L. & Giachelli, C. M. Osteopontin: A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation and Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2302–2309 (2007).
123. Azzopardi, P. V., O’Young, J., Lajoie, G., Karttunen, M., Goldberg, H. A. & Hunter, G. K. Roles of Electrostatics and Conformation in Protein-Crystal Interactions. *PLoS One* **5**, e9330 (2010).
124. Chen, Y., Bal, B. S. & Gorski, J. P. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J. Biol. Chem.* **267**, 24871–24878 (1992).
125. Kläning, E., Christensen, B., Sørensen, E. S., Vorup-Jensen, T. & Jensen, J. K. Osteopontin binds multiple calcium ions with high affinity and independently of phosphorylation status. *Bone* **66**, 90–95 (2014).
126. Evrard, S., Delanaye, P., Kamel, S., Cristol, J.-P., Cavalier, E. & others. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin. Chim. Acta* **438**, 401–414 (2015).
127. Hunter, G. K., Grohe, B., Jeffrey, S., O’Young, J., Sorensen, E. S. & Goldberg, H. A. Role of Phosphate Groups in Inhibition of Calcium Oxalate Crystal Growth by Osteopontin. *Cells Tissues Organs* **189**, 44–50 (2009).

128. Li, S., Wu, S., Nan, D., Zhang, W. & Wang, L. Inhibition of Pathological Mineralization of Calcium Phosphate by Phosphorylated Osteopontin Peptides through Step-Specific Interactions. *Chem. Mater.* **26**, 5605–5612 (2014).
129. Olesik, J. W., Kinser, J. A. & Olesik, S. V. Capillary Electrophoresis Inductively Coupled Plasma Spectrometry for Rapid Elemental Speciation. *Anal. Chem.* **67**, 1–12 (1995).
130. Kannamkumarath, S. S., Wrobel, K., Wrobel, K., B'Hymer, C. & Caruso, J. A. Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. *J. Chromatogr. A* **975**, 245–266 (2002).
131. Andrei R. Timerbaev. Element Speciation Analysis Using Capillary Electrophoresis: Twenty Years of Development and Applications. *Chem. Rev.* **113**, 778–812 (2013).
132. Prange, A. & Pröfrock, D. Application of CE–ICP–MS and CE–ESI–MS in metalloproteomics: challenges, developments, and limitations. *Anal. Bioanal. Chem.* **383**, 372–389 (2005).
133. Timerbaev, A. R., Pawlak, K., Aleksenko, S. S., Foteeva, L. S., Matczuk, M. & Jarosz, M. Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs. *Talanta* **102**, 164–170 (2012).
134. Yin, X.-B., Li, Y. & Yan, X.-P. CE-ICP-MS for studying interactions between metals and biomolecules. *TrAC* **27**, 554–565 (2008).
135. Timerbaev, A. R. & Keppler, B. K. Capillary electrophoresis of metal-based drugs. *Anal. Biochem.* **369**, 1–7 (2007).
136. Varenne, F., Bourdillon, M., Meyer, M., Lin, Y., Brellier, M., Baati, R., Charbonnière, L. J., Wagner, A., Doris, E., Taran, F. & Hagège, A. Capillary electrophoresis–inductively coupled plasma-mass spectrometry hyphenation for the determination at the nanogram scale of metal affinities and binding constants of phosphorylated ligands. *J. Chromatogr. A* **1229**, 280–287 (2012).
137. Timerbaev, A. R. Role of mass spectrometry in the development and medicinal implementation of metal-based nanoparticles. *J. Anal. Chem.* **70**, 1031–1046 (2015).
138. Matczuk, M., Anecka, K., Scaletti, F., Messori, L., Keppler, B. K., Timerbaev, A. R. & Jarosz, M. Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: a case study of gold nanoparticles. *Metallomics* **7**, 1364–1370 (2015).
139. Robert, T. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*. (CRC Press, 2013).
140. Vanhaecke, F. & Degryse, P. *Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS*. (2012).
141. Brennetot, R., Pierry, L., Atamyan, T., Favre, G. & Vailhen, D. Optimisation of the operating conditions of a quadrupole ICP-MS with hexapole collision/reaction cell for the analysis of selenium-79 in spent nuclear fuel using experimental designs. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1350 (2008).
142. Rappel, C. & Schaumlöffel, D. Improved nanonebulizer design for the coupling of nanoHPLC with ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1963 (2010).

143. Li, Y., Liu, J.-M., Xia, Y.-L., Jiang, Y. & Yan, X.-P. CE with on-line detection by ICP-MS for studying the competitive binding of zinc against cadmium for glutathione. *Electrophoresis* **29**, 4568–4574 (2008).
144. Yang, G., Xu, X., Wang, W., Xu, L., Chen, G. & Fu, F. A new interface used to couple capillary electrophoresis with an inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation analysis. *Electrophoresis* 2862–2868 (2008).
145. Sun, J., He, B., Liu, Q., Ruan, T. & Jiang, G. Characterization of interactions between organotin compounds and human serum albumin by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **93**, 239–244 (2012).
146. Claveranne-Lamolère, C., Aupiais, J., Lespes, G., Frayret, J., Pili, E., Pointurier, F. & Potin-Gautier, M. Investigation of uranium–colloid interactions in soil by dual field-flow fractionation/capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Talanta* **85**, 2504–2510 (2011).
147. Nguyen, T. T. T. N., Østergaard, J., Stürup, S. & Gammelgaard, B. Metallomics in drug development: characterization of a liposomal cisplatin drug formulation in human plasma by CE–ICP–MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1845–1854 (2013).
148. Nguyen, T. T. T. N., Østergaard, J., Stürup, S. & Gammelgaard, B. Determination of platinum drug release and liposome stability in human plasma by CE-ICP-MS. *Int. J. Pharm.* **449**, 95–102 (2013).
149. Groessl, M., Bytzek, A. & Hartinger, C. G. The serum protein binding of pharmacologically active gallium(III) compounds assessed by hyphenated CE-MS techniques. *Electrophoresis* **30**, 2720–2727 (2009).
150. Sonke, J. E. & Salters, V. J. M. Capillary electrophoresis–high resolution sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1159**, 63–74 (2007).
151. Aleksenko, S. S., Matczuk, M., Lu, X., Foteeva, L. S., Pawlak, K., Timerbaev, A. R. & Jarosz, M. Metallomics for drug development: an integrated CE-ICP-MS and ICP-MS approach reveals the speciation changes for an investigational ruthenium(iii) drug bound to holo-transferrin in simulated cancer cytosol. *Metallomics* **5**, 955 (2013).
152. Qu, H., Mudalige, T. K. & Linder, S. W. Capillary Electrophoresis/Inductively-Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Development and Optimization of a High Resolution Analytical Tool for the Size-Based Characterization of Nanomaterials in Dietary Supplements. *Anal. Chem.* **86**, 11620–11627 (2014).
153. Qu, H., Mudalige, T. K. & Linder, S. W. Arsenic Speciation in Rice by Capillary Electrophoresis/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Enzyme-Assisted Water-Phase Microwave Digestion. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3153–3160 (2015).
154. Liu, L., He, B., Yun, Z., Sun, J. & Jiang, G. Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface. *J. Chromatogr. A* **1304**, 227–233 (2013).

155. Liu, L., Yun, Z., He, B. & Jiang, G. Efficient Interface for Online Coupling of Capillary Electrophoresis with Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry and Its Application in Simultaneous Speciation Analysis of Arsenic and Selenium. *Anal. Chem.* **86**, 8167–8175 (2014).
156. Prange, A. & Schaumlöffel, D. Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1329–1332 (1999).
157. Álvarez-Llamas, G., Fernández de laCampa, M. del R. & Sanz-Medel, A. ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis. *TrAC* **24**, 28–36 (2005).
158. Lu, Q., Bird, S. M. & Barnes, R. M. Interface for Capillary Electrophoresis and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **67**, 2949–2956 (1995).
159. Chamoun, J. & Hagège, A. Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry for metal/protein interactions analysis by using large volume stacking with polarity switching. *J. Anal. At. Spectrom.* **20**, 1030 (2005).
160. Mokaddem, M., Gareil, P., Belgaied, J.-E. & Varenne, A. New insight into suction and dilution effects in CE coupled to MS via an ESI interface. II - Dilution effect. *Electrophoresis* **30**, 1692–1697 (2009).
161. Landers, J. P. *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. (CRC Press, 2008).
162. Zhao, Y. J., Wei, Y. Z., Florence, M. B. & Gregory, L. Role of acetic acid on U (VI) sorption on silica. *Nucl. Sci. Tech.* **26**, S10313 (2015).
163. Sylwester, E. R., Hudson, E. A. & Allen, P. G. The structure of uranium (VI) sorption complexes on silica, alumina, and montmorillonite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **64**, 2431–2438 (2000).
164. Möser, C., Kautenburger, R. & Beck, H. P. Complexation of europium and uranium by humic acids analyzed by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry: CE and CEC. *Electrophoresis* **33**, 1482–1487 (2012).
165. Froideval, A., Del Nero, M., Barillon, R., Hommet, J. & Mignot, G. pH dependence of uranyl retention in a quartz/solution system: an XPS study. *J. Colloid Interface Sci.* **266**, 221–235 (2003).
166. Williams, B. A. & Vigh, G. Fast, accurate mobility determination method for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **68**, 1174–1180 (1996).
167. Lucy, C. A. & Underhill, R. S. Characterization of the cationic surfactant induced reversal of electroosmotic flow in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **68**, 300–305 (1996).
168. Baryla, N. E., Melanson, J. E., McDermott, M. T. & Lucy, C. A. Characterization of Surfactant Coatings in Capillary Electrophoresis by Atomic Force Microscopy. *Anal. Chem.* **73**, 4558–4565 (2001).
169. Martin-Jouet, M., Hagège, A. & Leroy, M. J. F. Migration of (hydroxy) carboxylic acids in coelectroosmotic capillary electrophoresis: Influence of the electrolyte composition. *J. Chromatogr. A* **946**, 255–263 (2002).

170. Dworschak, A. & Pyell, U. Widening of the elution window in micellar electrokinetic chromatography with cationic surfactants: I. Selection of surfactant, variation of pH and addition of organic modifiers or inorganic metal salts. *J. Chromatogr. A* **848**, 387–400 (1999).
171. Haselberg, R., de Jong, G. J. & Somsen, G. W. Capillary electrophoresis–mass spectrometry of intact basic proteins using Polybrene–dextran sulfate–Polybrene-coated capillaries: System optimization and performance. *Anal. Chim. Acta* **678**, 128–134 (2010).
172. Furusawa, K. & Tagawa, T. Adsorption behavior of water soluble polymers with lower critical solution temperature. *Colloid Polym. Sci.* **263**, 353–360 (1985).
173. Shen, Y. & Smith, R. D. High-Resolution Capillary Isoelectric Focusing of Proteins Using Highly Hydrophilic-Substituted Cellulose-Coated Capillaries. *J. Microcolumn Separations* 135–141 (2000).
174. Shen, Y., Berger, S. J., Anderson, G. A. & Smith, R. D. High-Efficiency Capillary Isoelectric Focusing of Peptides. *Anal. Chem.* **72**, 2154–2159 (2000).
175. Oukacine, F., Quirino, J. P., Garrelly, L., Romestand, B., Zou, T. & Cottet, H. Simultaneous Electrokinetic and Hydrodynamic Injection for High Sensitivity Bacteria Analysis in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **83**, 4949–4954 (2011).
176. Marie, A.-L., Przybylski, C., Gonnet, F., Daniel, R., Urbain, R., Chevreux, G., Jorieux, S. & Taverna, M. Capillary zone electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyzing qualitative and quantitative variations in therapeutic albumin. *Anal. Chim. Acta* **800**, 103–110 (2013).
177. Sonke, J. E. & Salters, V. J. M. Disequilibrium effects in metal speciation by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry (CE-ICP-MS); theory, simulations and experiments. *The Analyst* **129**, 731 (2004).
178. Frei, V. & Wendt, H. Fast Ionic Reactions in Solution VIII. The Fission and Formation Kinetics of the Dimeric Isopolybase $(\text{UO}_2\text{OH})^{2+}$. *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **74**, 593–599 (1970).
179. Gangopadhyay, S. & Banerjee, R. N. Complexation of Uranium(VI) by Salicylate and Substituted Salicylates: A Kinetic Study. *Transit. Met. Chem.* **10**, 325–328 (1985).
180. Farkas, I., Bányai, I., Szabó, Z., Wahlgren, U. & Grenthe, I. Rates and Mechanisms of Water Exchange of UO_2^{2+} (aq) and $\text{UO}_2(\text{oxalate})\text{F}(\text{H}_2\text{O})_2^-$. *Inorg. Chem.* **39**, 799–805 (2000).
181. Bauer, N. & Panak, P. J. Influence of carbonate on the complexation of Cm(III) with human serum transferrin studied by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS). *New J Chem* **39**, 1375–1381 (2015).
182. Malmström, J., Shipovskov, S., Christensen, B., Sorensen, E. S., Kingshott, P. & Sutherland, D. S. Adsorption and enzymatic cleavage of osteopontin at interfaces with different surface chemistries. *Biointerphases* **4**, 47–55 (2009).
183. Lavoie, M., Sabatier, S., Garnier-Laplace, J. & Fortin, C. Uranium accumulation and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is modulated by pH: Acidification increases cell sensitivity to uranium. *Environ. Toxicol. Chem.* **33**, 1372–1379 (2014).

184. Pathak, P. N. & Choppin, G. R. Kinetics and thermodynamics of uranium(VI) sorption on hydrous silica. *Radiochim. Acta* **95**, 507–512 (2007).
185. Blakec, C. A., Colemank, F., Brownd, B., Hill, G., Lowrie, S. R. & Schmit, J. M. Studies in the Carbonate-Uranium System. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 5978–5983 (1956).
186. Khopkar, S. M. & Anil, K. D. Anion exchange studies of uranium(VI) in sulphate and carbonate solutions separation from mixtures. *Analytica Chimica Acta* 147–151 (1960).
187. Carroll Susan A. & Bruno Jordi. Mineral-Solution Interactions in the U(VI)-CO₂-H₂O System. *Radiochim. Acta* **52-53**, 187–194 (1991).
188. Guillaumont, R., Fanghanel, T., Fuger, J., Grenthe, I., Neck, V., Palmer, D. A. & Rand, M. H. *Update on the chemical thermodynamics of uranium, neptunium and plutonium*. (Elsevier, 2013).
189. Chang, R. in *Chemistry* (McGraw Hill, 2012).
190. Vanhorn, J. & Huang, H. Uranium(VI) bio-coordination chemistry from biochemical, solution and protein structural data. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 765–775 (2006).
191. Huang, H., Chaudhary, S. & Van Horn, J. D. Uranyl–Peptide Interactions in Carbonate Solution with DAHK and Derivatives. *Inorg. Chem.* **44**, 813–815 (2005).
192. Nazari, K., Kelay, V., Mahmoudi, A. & Hashemianzadeh, S. M. Binding of Divalent Metal Ions to Calcium-Free Peroxidase: Thermodynamic and Kinetic Studies. *Chem. Biodivers.* **9**, 1806–1822 (2012).
193. Beccia, M. R., Sauge-Merle, S., Lemaire, D., Bremond, N., Pardoux, R., Blangy, S., Guilbaud, P. & Berthomieu, C. Thermodynamics of Calcium binding to the Calmodulin N-terminal domain to evaluate site-specific affinity constants and cooperativity. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**, 905–919 (2015).
194. Espósito, B. P., Epsztejn, S., Breuer, W. & Cabantchik, Z. I. A Review of Fluorescence Methods for Assessing Labile Iron in Cells and Biological Fluids. *Anal. Biochem.* **304**, 1–18 (2002).
195. Schultze, B., Lind, P. M., Larsson, A. & Lind, L. Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **74**, 143–148 (2014).
196. Langton, D. J., Sidaginamale, R. P., Joyce, T. J., Natu, S., Blain, P., Jefferson, R. D., Rushton, S. & Nargol, A. V. The clinical implications of elevated blood metal ion concentrations in asymptomatic patients with MoM hip resurfacings: a cohort study. *BMJ Open* **3**, e001541 (2013).
197. McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E., Mudaly, M., Richardson, C., Barlow, D., Bomford, A., Timothy J. Peters, Raja, K. B., Shirali, S., Hediger, M. A., Farzaneh, F. & Simpson, R. J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **291**, 1755–1759 (2001).
198. Fischer, B. E., Haring, U. K., Tribolet, R. & Sigel, H. Metal Ion/Buffer Interactions Stability of Binary and Ternary Complexes Containing 2-Amino-2(hydroxymethyl)-~l, 3-propanediol (Tris) and Adenosine 5'-Triphosphate (ATP). *Eur J Biochem* **94**, 523–530 (1979).
199. Patnaik, P. *Handbook of inorganic chemicals*. (McGraw-Hill, 2003).

200. Clark, R. W. & Bonicamp, J. M. The Ksp-solubility conundrum. *J. Chem. Educ.* **75**, 1182 (1998).
201. Li, S. & Wang, L. Phosphorylated osteopontin peptides inhibit crystallization by resisting the aggregation of calcium phosphate nanoparticles. *CrystEngComm* **14**, 8037–8043 (2012).
202. George, A. & Veis, A. Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition. *Chem. Rev.* **108**, 4670–4693 (2008).
203. Yang, X., Wang, L., Qin, Y., Sun, Z., Henneman, Z. J., Moradian-Oldak, J. & Nancollas, G. H. How Amelogenin Orchestrates the Organization of Hierarchical Elongated Microstructures of Apatite. *J. Phys. Chem. B* **114**, 2293–2300 (2010).
204. Young, J. D., Martel, J., Young, L., Wu, C.-Y., Young, A. & Young, D. Putative Nanobacteria Represent Physiological Remnants and Culture By-Products of Normal Calcium Homeostasis. *PLoS One* **4**, e4417 (2009).
205. Wu, C.-Y., Martel, J., Young, D. & Young, J. D. Fetuin-A/Albumin-Mineral Complexes Resembling Serum Calcium Granules and Putative Nanobacteria: Demonstration of a Dual Inhibition-Seeding Concept. *PLoS One* **4**, e8058 (2009).
206. Jahnen-Dechent, W., Schäfer, C., Ketteler, M. & McKee, M. D. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J. Mol. Med.* **86**, 379–389 (2008).
207. Sandino, A. & Bruno, J. The solubility of $(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (S) and the formation of U (VI) phosphate complexes: Their influence in uranium speciation in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**, 4135–4145 (1992).
208. Gorman-Lewis, D., Shvareva, T., Kubatko, K.-A., Burns, P. C., Wellman, D. M., McNamara, B., Szymanowski, J. E. S., Navrotsky, A. & Fein, J. B. Thermodynamic Properties of Autunite, Uranyl Hydrogen Phosphate, and Uranyl Orthophosphate from Solubility and Calorimetric Measurements. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7416–7422 (2009).
209. Larsson, A. & Hansson, L.-O. Plasma protein fractions in healthy blood donors quantitated by an automated multicapillary electrophoresis system. *J. Chromatogr. Sci.* **44**, 479–483 (2006).
210. Bossuyt, X., Lissoir, B., Mariën, G., Maisin, D., Vunckx, J., Blanckaert, N. & Wallemacq, P. Automated serum protein electrophoresis by Capillarys®. *Clin. Chem. Lab. Med.* **41**, 704–710 (2003).

Annexes

Annexe 1 : Purification de FET

La fétuine-A a été purifiée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à partir de la protéine de fœtus bovin commercialisée par Sigma-Aldrich (Figure A1.1). Une solution de FET à 8,6 mg/ml dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4 a été injectée grâce à une boucle de 3 ml. La séparation a été réalisée sur une colonne préparative de G3000SW (21,5 mm i.d. x 30 cm, 13 μ m) au moyen d'une élution isocratique du tampon utilisé pour l'injection à un débit de 4 ml/min. Des fractions de 1 ml allant de 59 ml jusqu'à 66 ml d'élution et correspondant à la protéine, selon les travaux de Basset *et al.*⁴⁴, ont été collectées et concentrées par centrifugation avec un filtre présentant un cut-off à 10 kDa, puis conservées au congélateur à - 20 °C avant utilisation.

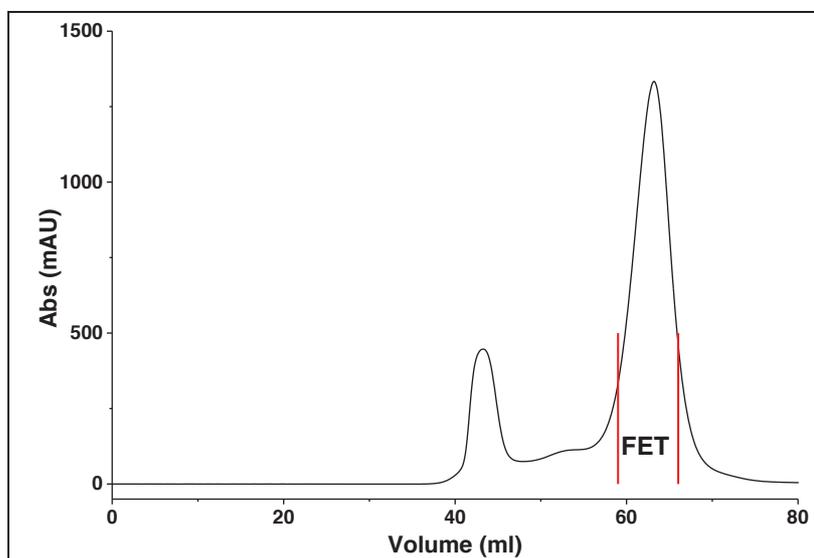


Figure A1.1 : Chromatogramme de la purification de FET par SEC.

Echantillon : FET 8,6 mg/ml dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4.
Conditions chromatographiques : injection : 3 mL, colonne : G3000SWn TSK gel, 21,5 mm i.d. x 30 cm, 13 μ m,
tampon d'élution : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4, débit : 4 ml/min.
Détection : UV à 280 nm.

Annexe 2 : Préparation de l'ostéopontine (OPN)

A2.1. Purification de l'OPN

L'ostéopontine bovine (OPN) Lacprodan®OPN-10 a été fournie par Arla Foods Ingredients, Aarhus, Danemark. Selon les informations transmises par cette société, l'échantillon contient 15 % d'OPN entière (eOPN) et 85 % de son fragment le plus grand (fOPN).

L'OPN a donc été purifiée par SEC. Un échantillon de 5 mg/ml dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4 a été injecté (1 ml) puis séparé sur une colonne préparative G3000SW (21,5 mm i.d. x 30 cm, 13 µm). L'élution a été réalisée en mode isocratique avec le même tampon à un débit de 4 ml/min. Le chromatogramme correspondant à la purification de l'OPN est présenté dans la Figure A2.1.

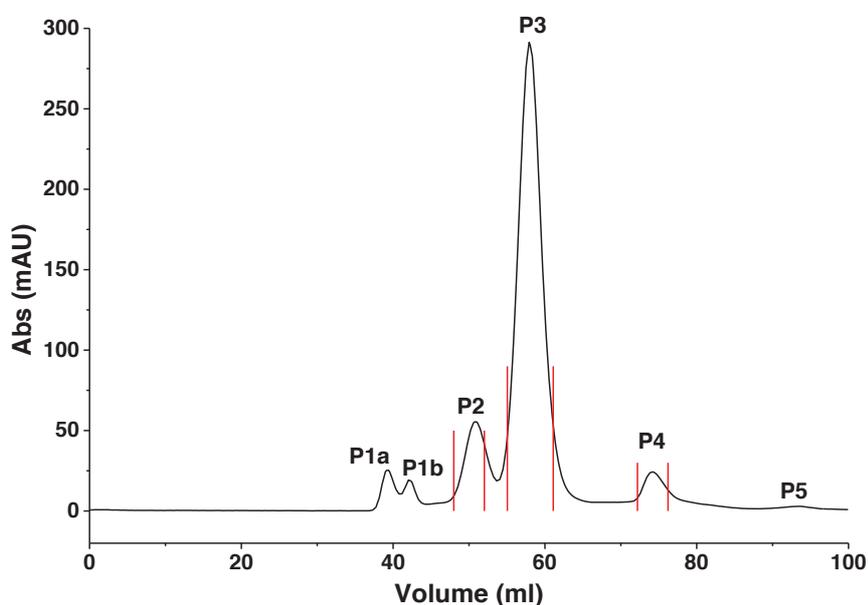


Figure A2.1 : Chromatogramme de la purification d'OPN par SEC.

Echantillon : OPN 5 mg/ml dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4.

Conditions chromatographiques : injection : 1 mL, colonne : G3000SWn TSK gel, 21,5 mm i.d. x 30 cm, 13 µm, tampon d'élution : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, débit : 4 ml/min.

Détection : UV à 280 nm.

On obtient différentes fractions (nommées P1 - P5 par ordre d'élution) correspondant vraisemblablement à des composés issus de la dégradation de l'OPN. Selon les travaux de Qi *et al.*⁸⁶, la fraction P2 correspond à la protéine entière et P3 à son fragment le plus grand. Les composés les plus abondants P2 (48 ml - 51 ml), P3 (55 ml - 60 ml) et P4 (72 ml - 76 ml) (si on considère des coefficients d'extinction molaires équivalents) ont été collectés et concentrés par centrifugation avec un filtre de cut-off à 10 kDa, pour être soit utilisés directement, soit conservés au congélateur à - 20 °C. Les concentrations des protéines ont été déterminées en UV à 280 nm en utilisant les coefficients d'extinction massique ($\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) utilisés par Qi *et al.*⁸⁶, 0,21 pour eOPN et 0,42 pour fOPN. Quant à P4, nous

avons pris le même coefficient d'extinction que celui d'eOPN (0,21) afin d'estimer sa concentration. Nous avons donc obtenu 27,4 mg eOPN purifiée, 126,3 mg fOPN purifié et 14,3 mg P4 purifiée.

A2.2. Stabilité de l'OPN

La présence de plusieurs fragments dans l'échantillon d'OPN nous a conduits à envisager son instabilité *in vitro*. Nous avons donc étudié la stabilité de l'OPN entière (eOPN) et de son fragment majeur (fOPN) dans les conditions d'incubation utilisées pendant les essais de complexation avec l'uranium.

Pour cela, un échantillon de eOPN 1,6 mg/ml et un échantillon de fOPN 1,6 mg/ml dans le tampon TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4 ont été analysés par SEC avant et après incubation à 37 °C pendant 2 h. Une colonne de SEC-3 (7,8 mm i.d. x 30 cm, 3 µm) avec une boucle d'injection de 150 µl a été utilisée. L'élution a été réalisée en mode isocratique avec le tampon utilisé pour l'injection, à un débit de 1 ml/min. La détection d'UV a été réalisée à 280 nm. Préalablement, une solution d'OPN non purifiée à 2,5 mg/ml a été injectée afin de vérifier la séparation dans ces conditions d'analyse. Le chromatogramme, présenté dans la Figure A2.2, est comparable à celui obtenu avec la colonne préparative (Figure A2.1). eOPN et fOPN ont été identifiés par des analyses individuelles de ces protéines purifiées, et les fractions restantes ont été dénommées P1', P4' et P5'.

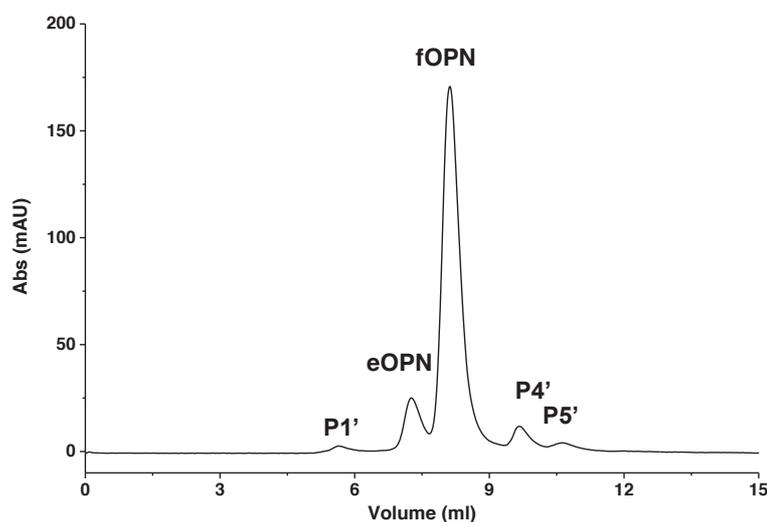


Figure A2.2 : Analyse d'un échantillon d'OPN non purifiée par SEC.

Echantillon : OPN 2,5 mg/ml dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4.
Conditions chromatographiques : injection : 150 µl, colonne : SEC-3 (7,8 mm i.d. x 30 cm, 3 µm), tampon d'élution : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4, débit : 1 ml/min.
Détection : UV à 280 nm.

La Figure A2.3 représente les chromatogrammes obtenus pour eOPN et fOPN avant et après incubation. Les résultats montrent que l'étape d'incubation *in vitro* à 37 °C pendant 2 h n'induit aucun clivage de l'eOPN et de son fragment. Cependant, il faut bien noter que si

fOPN est présent sous la forme d'un pic unique dans le chromatogramme, le pic d'eOPN présente un épaulement représentant environ 10 % de fOPN, ce qui semble révéler une purification insuffisante de l'eOPN.

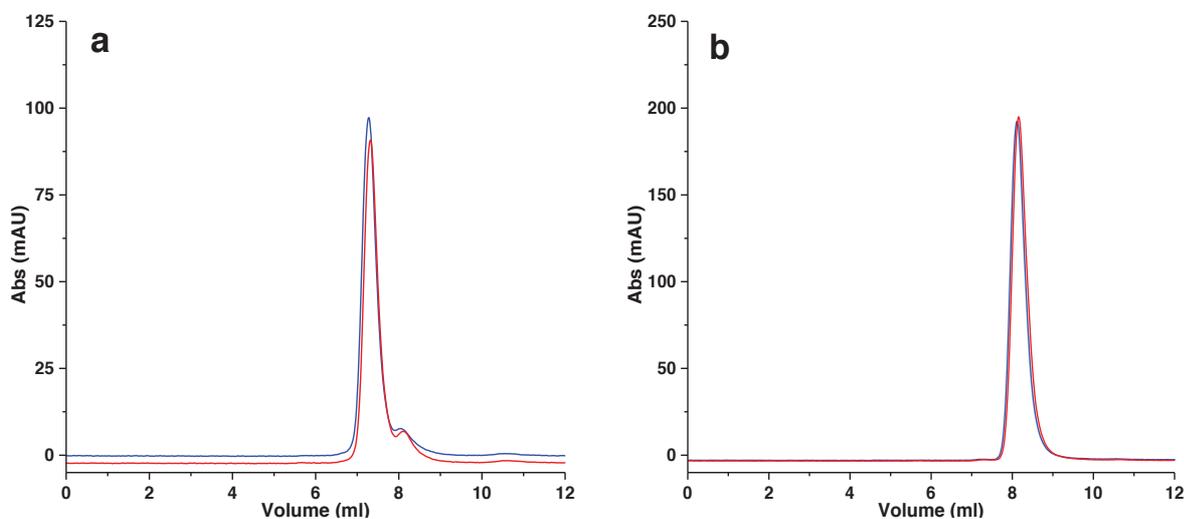


Figure A2.3 : Chromatogrammes d'eOPN (a) et de fOPN (b) avant (—) et après incubation (---) 2h à 37°C.

Echantillons : eOPN 1,6 mg/ml (a), fOPN 1,6 mg/ml (b) dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7
 Conditions chromatographiques : Injection : 150 μ l, colonne : SEC-3 (7,8 mm i.d. x 30 cm, 3 μ m), tampon d'élution : TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4, débit : 1 ml/min.
 Détection : UV à 280 nm.

Nous avons également envisagé l'étude de la stabilité à long terme afin d'envisager la conservation de cette protéine. Pour ce faire, un aliquot d'eOPN conservé à - 20 °C pendant deux ans a été analysé et les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour un échantillon d'eOPN récemment purifiée. Le chromatogramme de la Figure A2.4 montre l'augmentation importante de l'épaulement correspondant à fOPN ainsi que l'apparition d'un pic correspondant à P5' par analogie avec le chromatogramme présenté dans la Figure A2.2. En conclusion, l'eOPN n'est pas stable *in vitro*. Il est donc nécessaire de l'utiliser immédiatement après purification pour éviter tous les clivages possibles.

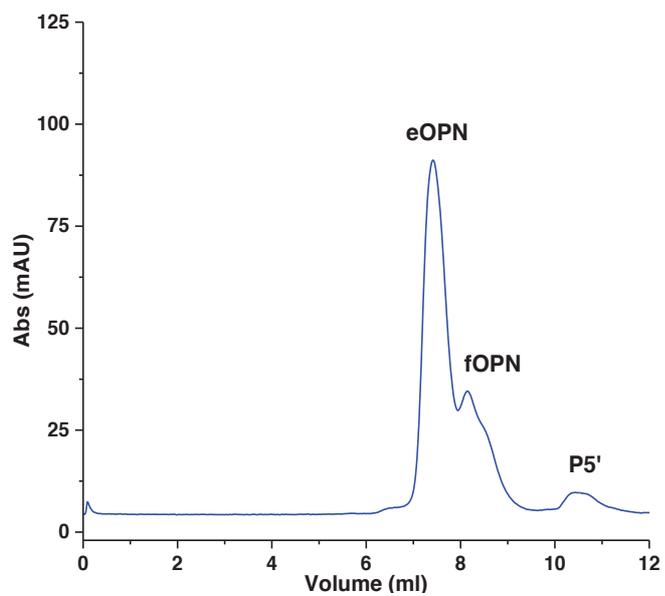


Figure A2.4 : Chromatogramme d'eOPN purifiée et conservée à – 20 °C pendant 2 ans.

Echantillon : eOPN décongelée 1,6 mg/ml dans TRIS 50 mM, NaCl 150 mM à pH 7,4.
Conditions chromatographiques identiques à celles de la Figure A2.2.

Annexe 3 : Liste de communications scientifiques orales et écrites durant cette thèse

A3.1. Revue et articles scientifiques :

- T.N.S. Huynh, D. Bourgeois, C. Basset, C. Vidaud & A. Hagège. Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions, *Electrophoresis*, **36** (2015), 1374-1382.
- A. Hagège, T.N.S. Huynh & M. Hébrant. Separative techniques for Metalloproteomics: searching for a balance between separation and perturbation, *TrAC*, **64** (2015) 64–74.
- A. Hagège & T.N.S. Huynh. Électrophorèse capillaire – Appareillage. *Techniques de l'Ingénieur*, **p3366**, 1-17 (2013).

A3.2. Communications orales :

- “Application du couplage CE-ICP/MS à la métalloprotéomique: Séparation de protéines cibles de l’uranium”, **Thi Ngoc Suong Huynh**, Christian Basset, Claude Vidaud, Agnès Hagège, SEP2015, 31 mars – 2 avril 2015, Paris, France.
- “CE – ICP-MS for screening proteins targeted by uranium”, **Thi Ngoc Suong Huynh**, Olivier Averseng, Christian Basset, Claude Vidaud, Agnès Hagège, MSB 2014, 27 avril – 1er mai 2014, Pécs, Hongrie.
- “Analytical strategies based on ICP/MS and ESI/MS for the characterization of uranium biological targets”, DSV/CEA PhD student meeting, 13 - 15 octobre 2013, Ile de Porquerolles, France.
- Chairman dans la session “Innovating for diagnosis and therapy”, DSV/CEA PhD student meeting, 13 - 15 octobre 2013, Ile de Porquerolles, France.

A3.3. Posters :

- “Criblage de protéines cibles de l’uranium grâce au couplage CE – ICP/MS”, **Thi Ngoc Suong Huynh**, Olivier Averseng, Claude Vidaud, Agnès Hagège, SEP2013, 4 – 7 juin 2013, Paris, France.

Électrophorèse capillaire

Appareillage

par **Agnès HAGÈGE**

Chargée de recherche CNRS à l'Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, UMR 7265 CNRS-CEA-Aix-Marseille II et SBTN, CEA Marcoule

et **Thi Ngoc Suong HUYNH**

*Diplômée de la faculté de pharmacie de Hô Chi Minh-ville (Vietnam)
Doctorante au Service de Biochimie et de Toxicologie Nucléaire, CEA Marcoule*

Cet article est la réédition actualisée de l'article [P 3 366] paru en 2003 rédigé par Myriam TAVERNA, Isabelle LE POTIER et Philippe MORIN.

1. Aperçu général	P 3 366v2	- 2
2. Séparation	—	3
2.1 Supports de séparation	—	3
2.1.1 Capillaires	—	3
2.1.2 Pucés	—	3
2.2 Générateurs de haute tension.....	—	4
2.3 Thermorégulation	—	4
3. Injection	—	5
3.1 Injection hydrodynamique	—	5
3.2 Injection électrocinétique	—	5
3.3 Préconcentration par <i>stacking</i>	—	5
4. Détection	—	6
4.1 Détection optique	—	7
4.1.1 UV	—	7
4.1.2 Fluorescence.....	—	7
4.2 Détection électrochimique	—	8
4.2.1 Conductimétrie.....	—	8
4.2.2 Ampérométrie	—	8
4.3 Spectrométrie de masse.....	—	8
4.3.1 Spectrométrie de masse moléculaire.....	—	9
4.3.2 Spectrométrie de masse élémentaire ICP-MS	—	10
5. Conclusion	—	10
Pour en savoir plus	Doc. P 3 366v2	

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative basée sur la migration d'espèces chargées dans un champ électrique, en fonction de leur mobilité électrophorétique.

Elle ne nécessite que de très petites quantités d'échantillon et offre comme avantage une grande efficacité de séparation mais également un faible coût de fonctionnement associé à un faible volume de déchets générés.

Elle est aujourd'hui reconnue comme une technique séparative à part entière et intégrée à de nombreuses plateformes d'analyse dans les domaines pharmaceutique, biomédical, environnemental... et est applicable à la séparation de composés très variés, allant des petits ions inorganiques aux macromolécules biologiques (sucres, protéines, ADN...).

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Une part importante de son implantation est due à son appareillage relativement simple, ne présentant que peu de parties mobiles, la rendant de ce fait adaptée à une miniaturisation. Grâce à ces caractéristiques, son intégration au sein de laboratoires sur puce a suscité un engouement considérable dans le domaine de l'analyse.

Par ailleurs, les développements instrumentaux sans cesse réalisés ont permis d'accroître ses performances et ses possibilités. À ce titre, le **couplage avec la spectrométrie de masse** peut être considéré comme une avancée déterminante dans l'expansion de cette technique.

Le but de cet article est de donner un aperçu global de l'appareillage utilisé en électrophorèse capillaire et d'en détailler les principaux composants et de mentionner les configurations les plus utilisées et les nombreuses évolutions, notamment dans le domaine de la détection. Une part importante est consacrée à la miniaturisation de cette technique.

Cet article fait partie d'une série dédiée à l'électrophorèse capillaire :

- « électrophorèse capillaire. Principe » [P 3 365] ;
- « électrophorèse capillaire. Appareillage » [P 3 366] ;
- « électrophorèse capillaire. Applications » [P 3 367].

Liste des abréviations	
Sigle	Définition
C ⁴ D	détecteur de conductivité par couplage capacitif sans contact
CE	électrophorèse capillaire
ESI	ionisation par électrospray
ICP	ionisation par plasma induit
LASER	amplification de lumière par émission stimulée de rayonnement
LED	diode électroluminescente
LIF	fluorescence induite par laser
MALDI	ionisation/désorption par laser assistée par une matrice
MS	spectrométrie de masse
PMT	photomultiplicateur
UV	ultra-violet

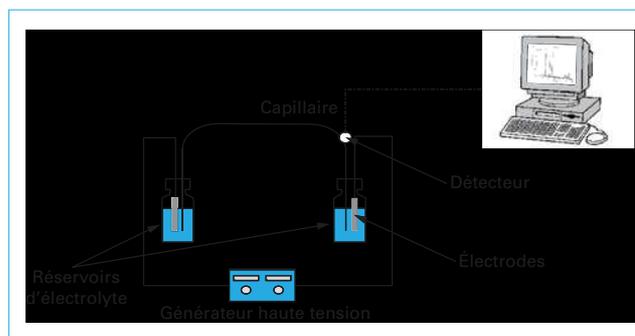


Figure 1 - Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire

deux électrodes, plongeant également dans ces réservoirs et alimentées par un **générateur de haute tension**, d'un **système d'injection des échantillons** (§ 3) et d'un **système de détection**, optique la plupart du temps (figure 1).

Ces appareils n'ont depuis cessé d'évoluer. Les possibilités de couplage à des détecteurs externes ont multiplié le champ des détections possibles. Parmi celles-ci, on peut notamment citer la spectrométrie de masse.

Les années 2000 sont, quant à elles, marquées par la miniaturisation de ces systèmes et l'amélioration de la durée des séparations, désormais réduite à quelques secondes. Comme nous le verrons par la suite, ce changement d'échelle implique pour certaines étapes une conception totalement différente.

Le principe de séparation repose sur la migration d'espèces chargées dans un champ électrique. Parmi ses atouts, on peut citer :

- sa grande flexibilité ; de nombreux modes de séparation sont possibles (électrophorèse de zone, électrophorèse sur gel, chromatographie électrocinétique, micellaire ou non, focalisation isoélectrique...) qui sont accessibles par simple changement de la composition de l'électrolyte ;
- son faible coût de fonctionnement ; notamment dû au faible coût des capillaires, comparé à celui des colonnes chromatographiques et à son automatisation par rapport à l'électrophorèse sur gel, qui permet une diminution considérable du coût de main-d'œuvre imputé à une séparation.

1. Aperçu général

L'**électrophorèse capillaire CE** (*Capillary Electrophoresis*) occupe une place particulière dans le panel des techniques séparatives et peut être considérée sous de nombreux aspects comme une technique hybride entre la chromatographie et l'électrophorèse sur gel.

Depuis les premiers travaux réalisés par Hjerten [1] dans des capillaires de 0,3 mm de diamètre interne, cette technique a pris un essor considérable avec l'utilisation de capillaires de diamètres plus réduits (75 µm) grâce aux travaux de Jorgenson *et al.* [2] au début des années 1980, qui ont rendu possible le développement d'appareils commerciaux.

Ces appareils sont des systèmes totalement intégrés, généralement constitués d'un **capillaire de séparation** dont les extrémités sont immergées dans des réservoirs contenant un électrolyte, de

Enfin, dans son format micropuce, on peut encore citer :

- sa portabilité ;
- sa rapidité, notamment par les possibilités de multiplexage qu'offrent ces supports.

Une étude détaillée [3] fournit, à l'aide de nombreux exemples, une comparaison objective entre l'électrophorèse capillaire, l'électrophorèse sur gel et la chromatographie (nanochromatographie) basée sur différents critères tels que la vitesse, la flexibilité, la portabilité, le volume d'échantillon, la sensibilité, la répétabilité ou encore le coût.

2. Séparation

2.1 Supports de séparation

Comme son nom l'indique, les séparations sont en général réalisées dans des canaux de dimensions capillaires. Les supports classiques sont généralement des tubes de silice fondue mais plus récemment les puces se sont développées et constituent une véritable avancée, notamment en termes de rapidité d'analyse (figure 2).

2.1.1 Capillaires

Les capillaires sont le plus souvent constitués de silice fondue, revêtus d'une couche de polyimide afin d'en assurer la flexibilité. Leurs dimensions sont en général comprises entre 10 et 100 cm de longueur et 20 à 75 μm de diamètre interne.

Ce type de capillaire est utilisé dans de nombreuses applications. Néanmoins, certaines études mentionnent l'intérêt de capillaires qui vont différer de par leur géométrie, la nature du revêtement externe ou encore celle de leur surface interne.

Ainsi, des **capillaires à section carrée ou rectangulaire** ont été utilisés en raison de leur meilleure capacité à dissiper la chaleur et des plus faibles distorsions optiques engendrées par les surfaces planes mais leur emploi reste anecdotique.

Des **revêtements externes** autres que le polyimide tels que les fluoropolymères (Téflon[®]AF) permettent de disposer de capillaires totalement transparents aux UV. Ce type de capillaire est devenu très

populaire avec le développement des techniques électrochromatographiques et permet la synthèse de la phase stationnaire directement *in situ* par des réactions de polymérisation photo-initiées.

La **surface interne des capillaires de silice** est constituée de **silanols** dont l'ionisation permet de générer un flux électroosmotique dirigé vers l'anode. Ce dernier joue un rôle primordial dans le processus de séparation et doit être optimisé afin d'améliorer la sélectivité, de réduire les temps d'analyse mais aussi d'éliminer l'adsorption de certains composés à la surface de ces silanols. Une des options consiste à greffer chimiquement ces silanols. Différents protocoles ont été élaborés en fonction de la nature du greffon.

Ceux-ci ne sont pas détaillés dans cet article mais le lecteur pourra se référer à deux articles, l'un traitant plus spécifiquement du greffage par le polyacrylamide linéaire [5], l'autre présentant un panorama plus général du greffage par les polymères [6].

Certains d'entre eux sont disponibles commercialement. Pour ne citer que les plus courants :

- capillaires neutres (greffés par du polyacrylamide ou du polyvinylalcool) ;
- capillaires chargés positivement (greffés par des polymères présentant des groupements ammonium quaternaire) ;
- capillaires présentant une charge de surface réduite par des greffons alkyle, diol.

D'autres capillaires en polytétrafluoroéthylène (Téflon) ou perfluoroalkoxy (Teflon-PFA) peuvent être utilisés en raison de leur surface non polaire qui devrait présenter des capacités de sorption des ions métalliques et des molécules multichargées plus faibles.

2.1.2 Puces

La géométrie des systèmes sur puce diffère quelque peu de celle des capillaires. Dans le cas des systèmes les plus simples, la configuration adoptée est une géométrie en forme de croix, représentée sur la figure 2b. Cette géométrie présente deux avantages :

- d'une part, pallier l'absence de passeur d'échantillons en entrée du capillaire de séparation ;
- d'autre part, permettre l'injection de volumes d'échantillons définis comme nous le verrons dans le paragraphe 3.

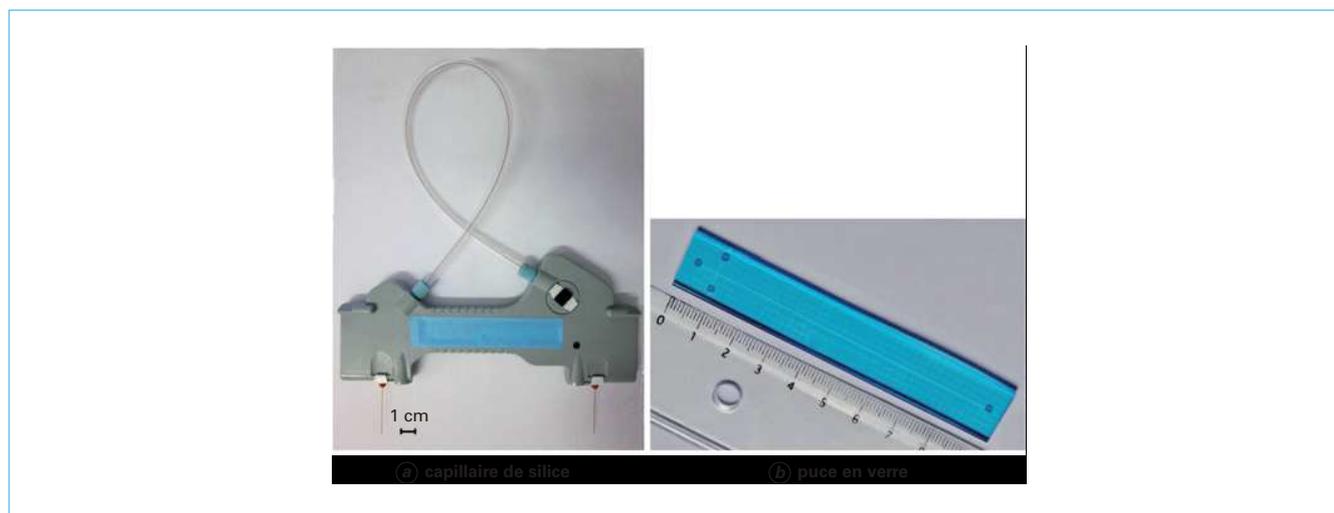


Figure 2 – Supports de séparation utilisés en électrophorèse capillaire (doc. S. Huynh, A. Hagège)

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Cependant, l'évolution des techniques de gravure permet d'envsager des géométries plus complexes, notamment des puces multicanaux permettant la séparation en parallèle d'un nombre élevé d'échantillons.

Les substrats utilisés pour la fabrication sont principalement en verre ou en polymère.

P. Tabeing consacre un chapitre de son « Introduction à la microfluidique » [7] aux divers procédés de microfabrication. Un aperçu en est donné dans les paragraphes qui suivent mais de nombreuses sociétés proposent à la vente des puces de géométrie prédéfinie ou dont le design peut être modulé à façon.

2.1.2.1 Technologie de fabrication pour les puces en verre

Les supports en verre sont généralement réalisés en utilisant les techniques photolithographiques. La réalisation de tels supports comprend trois grandes étapes principales.

La première étape consiste à **déposer une couche de résine photosensible sur le substrat de verre** dont l'épaisseur est contrôlée généralement par ajustement de la viscosité de la résine et de la vitesse de rotation lors du dépôt.

La seconde étape, appelée **développement**, consiste alors à exposer cette résine à la lumière au travers d'un masque dont le tracé conditionne les fonctionnalités de la future puce. Si la résine photosensible est dite positive alors les zones exposées à la lumière deviennent solubles dans l'agent développeur ; dans le cas d'une résine négative, ces mêmes zones deviendront insolubles (figure 3).

La dernière étape est l'étape de **gravure du support**. Elle consiste à attaquer les zones non protégées par la résine. Deux techniques de gravure sont généralement mises en œuvre :

- la gravure par voie humide, réalisée grâce à des solutions aqueuses généralement acides (HF), mais aussi basiques (KOH) dont le choix est fonction du support à graver mais aussi de la géométrie des cavités que l'on souhaite créer. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre mais souvent isotrope ;
- la gravure par voie sèche, qui utilise un plasma ionique et permet soit une attaque physique, soit une attaque chimique du support ou encore une combinaison des deux.

2.1.2.2 Technologie de fabrication pour les puces en polymère

De nombreux polymères peuvent être théoriquement utilisés mais le **polydiméthylsiloxane PDMS**, de formule semi-développée $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, tend à supplanter les autres, notamment grâce à sa transparence aux UV qui permet l'utilisation des détecteurs optiques.

Un de ses avantages sur le verre ou le silicium est la possibilité d'un coût de production beaucoup moins onéreux des puces qui pourrait faire de celles-ci des appareils jetables.

Les techniques de fabrication les plus utilisées sont :

- l'ablation laser, qui permet de casser les liaisons covalentes des chaînes de polymère et d'éjecter les fragments, créant ainsi des cavités. Comme dans la technologie dite « dure », utilisée pour le silicium et le verre, l'utilisation d'un masque permet d'obtenir le tracé voulu. De nombreux polymères sont sensibles à l'ablation laser, malheureusement, le procédé même compromet la possibilité d'une production massive de puces ;
- la technologie dite « plastique », qui tend progressivement à remplacer les autres au vu de ses nombreux avantages.

Cette dernière comporte deux étapes. La première consiste à réaliser un négatif de la puce que l'on souhaite obtenir. Ce négatif peut être réalisé en verre, silicium ou résine en utilisant les procédés vus précédemment (§ 2.1.2.1 et 2.1.2.2). La seconde étape consiste à répliquer le gabarit ainsi obtenu par moulage, matriçage ou injection. Cette étape dure entre quelques secondes et quelques heures selon le procédé choisi.

Cependant, le PDMS est relativement hydrophobe et les solvants polaires comme l'eau ont du mal à pénétrer dans les canaux. L'oxydation du PDMS à l'aide d'un plasma, conduisant à la formation de groupements silanols en surface, permet de lui conférer une bonne mouillabilité. Cette modification n'est cependant pas permanente et le PDMS retrouve son hydrophobie au contact de l'air. Il peut cependant être fonctionnalisé, notamment *via* des trichlorosilanes.

2.2 Générateurs de haute tension

Le générateur permet d'imposer une différence de potentiel entre les deux électrodes de platine, situées à chaque extrémité du capillaire. Cette différence de potentiel est essentielle, non seulement lors de la séparation, mais aussi lors de certains types d'injection (§ 3.2). Les gammes de tension et de puissance requises pour les générateurs de haute tension diffèrent selon l'échelle à laquelle la séparation est réalisée. Le choix du générateur dépend donc du format choisi (capillaire ou puce). En format capillaire, la gamme de tension varie entre 0 et ± 30 kV pour des courants générés de l'ordre de 300 μA , alors que celle-ci varie entre 0 et ± 3 kV pour des courants de 100 μA environ dans le cas des puces.

Ainsi, même si les tensions utilisées sont très élevées, les courants générés sont trop faibles pour mettre en danger la vie de l'opérateur. Cependant, les courants de fuite sont la principale cause de bruit de fond et peuvent sérieusement endommager les circuits électroniques internes.

Le choix le plus judicieux pour des raisons de fiabilité mais aussi de sécurité est l'utilisation d'un générateur à double polarité. Ce type de générateur équipe la majorité des instruments commercialisés modernes.

Pour plus de détails, le lecteur pourra consulter la référence [8] qui dresse un inventaire détaillé des générateurs de haute tension à la fois commerciaux et développés dans les laboratoires de recherche.

2.3 Thermorégulation

Les courants générés lors de l'application d'un voltage dans un capillaire conduisent à un échauffement (encore appelé effet Joule) du capillaire et de l'électrolyte. Les transferts de chaleur avec les parois du capillaire vont conduire à une température plus élevée au centre du capillaire. Ce gradient de température est préjudiciable à la séparation et il est donc nécessaire de dissiper cette chaleur. Le mode classique est l'utilisation de la convection forcée faisant appel soit à des liquides (en général des hydrocarbures halogénés), soit à de l'air. Les liquides possèdent en général une meilleure capacité d'absorption de la chaleur et sont d'une plus grande souplesse d'utilisation, notamment lors de couplages externes (§ 4.3) mais l'air présente des avantages en termes de sécurité.

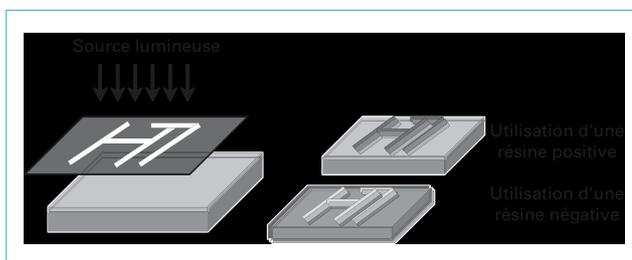


Figure 3 - Fabrication des puces : étape de développement

Dans les puces, il est communément admis que les conséquences de l'effet Joule sont moins prononcées [9].

3. Injection

La technique d'injection idéale doit combiner plusieurs caractéristiques :

- refléter la composition de l'échantillon ;
- permettre l'injection de volumes variables. En effet, si afin de minimiser l'élargissement de bande, les volumes injectés doivent être inférieurs à 2 % du volume total du canal de séparation, il est parfois nécessaire d'accroître ces volumes pour augmenter la sensibilité de détection ;
- ne pas perturber l'échantillon en vue d'analyses multiples.

Deux modes d'injection sont classiquement utilisés : l'injection hydrodynamique et l'injection électrocinétique. Ces deux modes d'injection sont en général disponibles dans les appareils commerciaux.

3.1 Injection hydrodynamique

Ce mode d'injection est particulièrement utilisé en électrophorèse capillaire standard car il est indépendant de la nature des composés.

Dans ce cas, l'injection hydrodynamique consiste à plonger une des extrémités du capillaire dans l'échantillon puis à imposer une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire, par surpression à l'entrée, dépression à la sortie ou encore siphonnage.

Le volume d'échantillon injecté est régi par l'équation de Poiseuille et dépend de la différence de pression, du temps d'application de cette différence de pression mais aussi des dimensions du canal de séparation (longueur et diamètre) et de celles de l'échantillon (viscosité) :

$$V_{inj} = \frac{\Delta P r^4 t_{inj}}{8 \eta L} \quad (1)$$

- avec V_{inj} volume d'échantillon injecté,
 ΔP différence de pression appliquée,
 t_{inj} temps d'application de cette différence de pression,
 d et L diamètre et longueur du canal de séparation,
 η viscosité de l'échantillon.

Habituellement, les différences de pression appliquées sont de l'ordre de 1 à 4 kPa et ce, pendant quelques secondes (3 à 10 s environ), ce qui conduit à l'injection de volumes de l'ordre de 1 à 50 nL.

Certains constructeurs proposent des petits logiciels (CE Expert Lite – Beckman, par exemple) permettant le calcul rapide de ces volumes injectés.

Dans le cas des puces, l'injection hydrodynamique requiert la plupart du temps la mise en place de dispositifs complexes. De nombreuses variantes sont proposées pour utiliser ce mode d'injection [10] :

- maintien du réservoir échantillon à une hauteur supérieure à celle des autres réservoirs ;
- inclinaison de la puce ;
- utilisation d'une membrane déformée par un actionneur électromagnétique ;
- utilisation de pousse-seringue.

Cependant, ces dispositifs restent très marginaux.

3.2 Injection électrocinétique

L'injection électrocinétique consiste à appliquer une tension qui va permettre l'introduction des solutés par migration, après avoir plongé ici encore une des extrémités du capillaire dans l'échantillon.

Les solutés migrant à des vitesses différentes, les quantités injectées de chaque soluté sont différentes. De plus, elles dépendent également de la matrice de l'échantillon. On ne peut dans ce cas plus parler de volume d'injection de l'échantillon mais de quantités injectées, et ce pour chacun des solutés. Celles-ci peuvent être calculées à partir de la relation suivante :

$$Q_{inj,i} = (\mu_{ep,i} + \mu_{eo}) \varepsilon_0 d^2 CV_{inj} / 4L \quad (2)$$

- avec $Q_{inj,i}$ quantité injectée du soluté i ,
 $\mu_{ep,i}$ et C_i mobilité électrophorétique et concentration du soluté,
 μ_{eo} mobilité électroosmotique,
 d et L diamètre et longueur du canal de séparation,
 V tension appliquée pendant le temps t_{inj} .

Ce mode d'injection est incontournable si les échantillons sont très visqueux ou si le capillaire est rempli par un gel (**électrophorèse capillaire sur gel**) ou une phase solide (**électrochromatographie**).

C'est également le mode d'injection de prédilection dans les puces en raison de sa simplicité de conception, ne nécessitant ni pompe, ni actionneur. En électrophorèse capillaire, l'injection se fait directement dans le capillaire de séparation en remplaçant l'électrolyte d'entrée par l'échantillon pendant la durée de cette étape. Contrairement aux dispositifs classiques, les systèmes d'injection sur puce sont le plus souvent composés de deux canaux orthogonaux, l'un reliant l'échantillon à la poubelle et le second, constituant le canal de séparation. L'injection dans les puces est alors réalisée en deux étapes. Une première étape de chargement qui s'effectue dans le canal perpendiculaire au canal de séparation et une seconde étape d'injection proprement dite où l'échantillon est transféré dans le canal de séparation (figure 4).

Deux modes d'injection sont particulièrement utilisés : l'injection pincée (figure 4a) et l'injection dite « flottante » (figure 4b). Dans le cas de l'**injection pincée**, les volumes d'injection ne sont pas modulables et sont déterminés par le volume de la zone d'intersection entre le canal d'injection et celui de séparation. Cependant, l'injection pincée peut permettre une injection peu discriminante des différents solutés ainsi que l'illustre l'encadré de la figure 4. Dans le cas de l'**injection flottante**, les volumes peuvent être modulés, mais ce, au détriment de la représentativité de la zone échantillon injectée dont la composition est biaisée par rapport à la composition initiale. Afin de pallier ce problème, un troisième mode d'injection, dit **gated**, a été développé (figure 4c). Bien que permettant à la fois l'injection de volumes variables et une assez bonne représentation de la composition initiale des échantillons, ce mode d'injection est relativement complexe à mettre en œuvre et reste peu utilisé.

3.3 Préconcentration par *stacking*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation de capillaires de faible diamètre a permis le développement de la technique. Une des conséquences directes en est que les volumes injectés doivent être extrêmement faibles car le volume de la zone échantillon n'est pas sans conséquence sur l'efficacité de séparation. Ce problème est encore accru lorsque l'on utilise des puces dont les canaux de séparation sont très courts.

Une option pour pallier ce problème est la préconcentration des échantillons.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

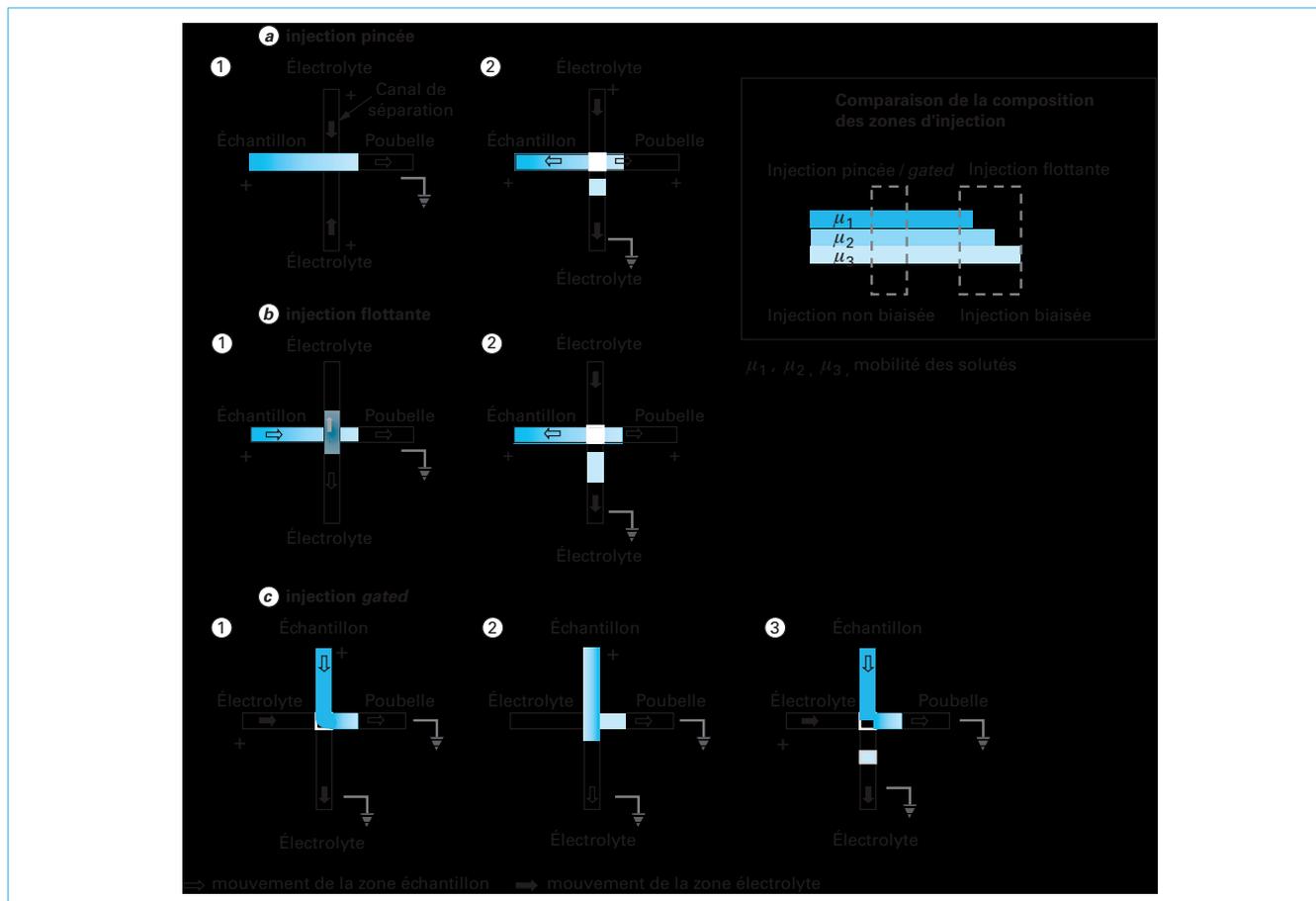


Figure 4 – Schéma des différents modes d'injection utilisés en électrophorèse capillaire sur puce

Cet aspect ne relève pas à proprement parler du domaine de l'appareillage. Cependant, il peut être considéré comme un moyen d'augmenter la sensibilité de détection et de s'affranchir de l'utilisation de détecteurs plus puissants.

Nous nous focalisons uniquement sur le *stacking* des échantillons, méthode de préconcentration la plus courante et basée sur les principes de l'électrophorèse. Nous ne traitons ici ni des autres méthodes, qu'elles soient électrophorétiques, telles que l'isotachophorèse ou la focalisation isoélectrique, ou encore basées sur d'autres principes, telles que l'extraction sur phase solide, ni des préconcentrations réalisées en amont de l'analyse par électrophorèse.

Différents articles traitant de l'ensemble des options possibles peuvent être consultés [11] [12].

La préconcentration par empilement d'échantillon, (*stacking*), réalisée par amplification de champ est sans conteste la technique de préconcentration en ligne la plus simple. Elle n'est cependant applicable que si la conductivité de l'échantillon est inférieure à celle de l'électrolyte. Dans ce cas, lors de l'application d'une tension (que ce soit lors d'une injection électrocinétique ou en début de séparation), le champ électrique dans la zone échantillon est plus important que dans le reste du capillaire. Ainsi, les

analytes migrent très rapidement dans cette zone puis se trouvent ralentis dans la zone frontière, subissant ainsi une concentration.

Dans un capillaire, celle-ci peut être mise en œuvre directement sur les instruments classiques, sans aucune modification. En format micropuce, le défi est de contrôler le gradient de champ électrique qui va s'établir dans la zone échantillon.

Une alternative, souvent mentionnée sous le terme d'amplification du champ électrique à l'injection, consiste à injecter un créneau d'eau entre l'échantillon et l'électrolyte, générant ainsi un champ électrique très élevé dans cette zone.

4. Détection

La détection est un des aspects les plus critiques de l'électrophorèse capillaire. Les limitations en sensibilité inhérentes à chaque mode de détection sont encore exacerbées par les minuscules volumes injectés (quelques nanolitres pour un capillaire et quelques picolitres pour une puce).

En format capillaire, la détection standard est la détection UV, alors qu'avec les puces, on utilise couramment la fluorescence induite par laser. Cependant, de nombreux efforts ont été entrepris dans ce domaine afin d'améliorer la détection elle-même (sensibi-

lité, accès à plus d'informations sur la nature des solutés...) mais aussi pour la rendre compatible avec la miniaturisation. Les voies explorées sont nombreuses mais nous n'évoquons dans ce paragraphe que les modes de détection les plus couramment associés à l'électrophorèse capillaire.

4.1 Détection optique

Si la plupart des appareils commerciaux utilisant des capillaires sont équipés de détecteurs UV, voire de détecteurs de fluorescence laser, ce dernier mode de détection est sans conteste le plus populaire lorsque l'on travaille avec des puces.

L'utilisation de détecteurs sensibles est primordiale en électrophorèse capillaire car la détection est réalisée directement sur le capillaire, ce qui permet de s'affranchir des volumes morts mais induit des volumes de cellules de détection extrêmement faibles.

En effet, dans la plupart des cas, la fenêtre de détection est réalisée par combustion de la gaine de polyimide du capillaire lui-même, à quelques centimètres de l'extrémité de sortie.

À titre d'exemple, le trajet optique est alors de 59 μm pour un capillaire de 75 μm de diamètre interne.

Pour augmenter la sensibilité de détection, des capillaires présentant une bulle ou une géométrie en forme de Z au niveau de la fenêtre de détection ont été envisagés mais n'ont connu que peu de succès en raison du faible gain occasionné et d'une fragilité accrue.

La détection des composés peut alors être réalisée selon deux méthodes :

- soit par détection directe des espèces présentant un chromophore (ou un fluorophore) ;
- soit par détection indirecte : celle-ci est réalisée sans modification de l'appareillage, par simple ajout dans l'électrolyte d'une substance ionique (appelée co-ion) présentant un chromophore (ou un fluorophore) de même charge que les ions à détecter. La présence d'électrolyte conduit ainsi à un signal de détection élevé. Lorsque les analytes passent au niveau de la fenêtre de détection, une chute de signal est observée et ceux-ci sont détectés par des pics négatifs.

Il est à noter qu'outre le fait que le co-ion doit être de même charge que les analytes, il doit avoir une mobilité électrophorétique du même ordre de grandeur que ceux-ci afin de ne pas provoquer de dispersion et doit être présent à une concentration restant inférieure à la gamme de linéarité du détecteur.

4.1.1 UV

Les détecteurs UV à longueur d'onde fixe utilisent une lampe de deutérium à décharge (D2) comme source de lumière, dont les longueurs d'onde varient de 190 à 380 nm. Pour des longueurs d'onde situées dans le domaine du visible, l'ajout d'une lampe de tungstène à la lampe précédente est nécessaire. Un système de filtres permet alors de sélectionner la longueur d'onde appropriée.

L'alternative est l'utilisation de détecteurs à barrette de diodes pour détecter l'ensemble de l'absorption dans le domaine UV-visible et obtenir ainsi à tout instant le spectre d'absorption de la solution présente au niveau de la fenêtre de détection.

Bien que l'avantage des barrettes de diode soit considérable, il faut cependant noter que leur utilisation avec des capillaires présentant des greffages de polyacrylamide linéaire conduit à une diminution notable de la durée de vie de ces derniers.

Les limites de détection obtenues en UV sont très variables selon la nature du groupement chromophore présent sur les analytes. Celles-ci sont en général de l'ordre de 10^{-8} à $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4.1.2 Fluorescence

En fluorescence, atteindre une grande sensibilité de détection nécessite la focalisation du faisceau d'excitation sur un très petit volume de détection mais aussi la collecte de la lumière émise par l'analyte à partir de ce même volume. La majorité des détecteurs de fluorescence utilisés en électrophorèse capillaire sont ainsi des détecteurs à fluorescence induite par laser LIF (*Laser-Induced Fluorescence*), en raison de l'intensité lumineuse intense induite par la focalisation du faisceau.

Les lasers utilisés sont généralement des lasers à gaz dont les plus fréquemment rencontrés sont les lasers à argon (488 nm), hélium/néon (633 nm) ou hélium/cadmium (325 nm, 442 nm) ou des diodes laser. Les deux configurations optiques les plus courantes sont le montage dit orthogonal (figure 5a) et le montage dit colinéaire (figure 5b).

De manière assez générale, la détection de fluorescence sur les puces se fait par microscopie confocale. Dans ce cas, la configuration s'apparente à celle d'un montage colinéaire. L'objectif du microscope sert à focaliser le laser sur la puce mais également à collecter le signal qui est ensuite focalisé par une lentille sur une fente située au point focal.

Les recherches actuelles visent à s'affranchir de l'utilisation coûteuse des lasers et à leur préférer les **diodes électroluminescentes LED**, moins onéreuses. De plus, ces diodes présentent un encombrement faible et leur utilisation semble de ce fait plus appropriée dans des dispositifs miniaturisés.

La détection de certaines molécules *via* leurs propriétés de fluorescence native est possible, notamment grâce à l'introduction des lasers émettant dans le proche UV [13]. Cependant afin d'augmenter la proportion d'analytes détectables, le recours à des **réactions de dérivation** reste souvent incontournable :

- la **dérivation pré-capillaire** consiste à faire réagir les composés à analyser avec le réactif avant l'injection de l'échantillon dans le capillaire. Dans ce cas, elle est majoritairement réalisée en amont de l'analyse car elle permet l'utilisation de réactions nécessitant des temps élevés et/ou des apports d'énergie ainsi que l'élimination du réactif en excès ;

- la **dérivation dite *in-capillary***, consiste à réaliser la réaction directement dans le capillaire, en utilisant la différence de vitesse de migration entre le réactif et les analytes. Le capillaire est alors considéré comme un véritable microréacteur. Ce type de dérivation, rapide et facilement automatisable, est cependant restreint à des réactions à cinétique rapide.

Ce type de détection permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 10^{-16} à $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ par un choix judicieux de l'agent de dérivation.

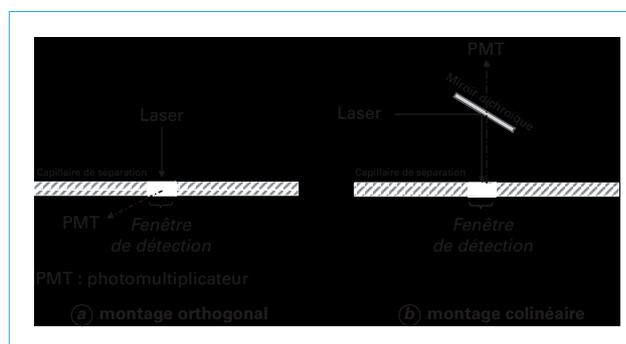


Figure 5 - Détection de la fluorescence induite par laser en électrophorèse capillaire

4.2 Détection électrochimique

Si elles ont été quelque peu délaissées dans les appareils classiques, les détections de type électrochimique [14] [15] connaissent un regain d'intérêt avec le développement des puces en raison de leur miniaturisation intrinsèque, compatible avec les puces, de leur sensibilité, là où la fluorescence requiert souvent une dérivation préalable des analytes, et de leur coût.

4.2.1 Conductimétrie

La détection de la conductivité a aujourd'hui une place importante parmi les modes de détection utilisés en électrophorèse capillaire car elle permet en principe la détection de toutes les espèces chargées et peut donc être considérée comme quasi universelle. Le corollaire en est bien entendu un signal de base non négligeable, dû à la présence des tampons salins de l'électrolyte.

Le signal mesuré correspond à la différence de conductivité entre la solution et les analytes. Un des avantages non négligeable de la conductimétrie est qu'elle ne requiert pas la présence de groupements chromophores ou électro-actifs sur les composés à détecter.

La concentration d'un analyte peut être directement calculée à partir de l'équation :

$$G = A \lambda c \mu \quad (3)$$

avec G mesure de conductance,
 A surface de l'électrode,
 λ distance entre les deux électrodes,
 μ et c conductivité électrolytique molaire et concentration de l'ion.

Ce mode de détection implique donc un système à deux électrodes, qui nécessite soit un contact direct avec l'électrolyte, soit un couplage capacitif, permettant le positionnement des électrodes de manière externe à la solution (*contactless*).

Ce dernier détecteur est couramment appelé C^4D (*Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector*). Ce détecteur est composé de deux électrodes cylindriques formant un condensateur, disposées autour de la gaine de polyimide du capillaire de silice et séparées de 1 à 5 mm (figure 6). De par sa simplicité, il est adaptable à de nombreux types de capillaire et peut être positionné à la distance voulue de l'extrémité du capillaire. S'il existe de nombreux dispositifs développés par les laboratoires eux-mêmes, des versions commerciales sont maintenant largement utilisées.

Particulièrement bien adaptée pour les espèces n'absorbant pas en UV, la détection conductimétrique permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-4} mol · L⁻¹. Il est intéressant de signaler que contrairement à l'UV, ces limites de détection ne semblent pas affectées par une réduction du diamètre du capillaire.

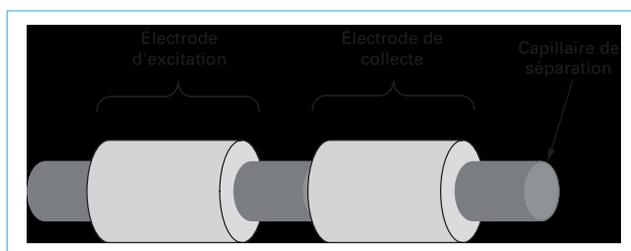


Figure 6 – Détecteur conductimétrique C^4D utilisé en électrophorèse capillaire

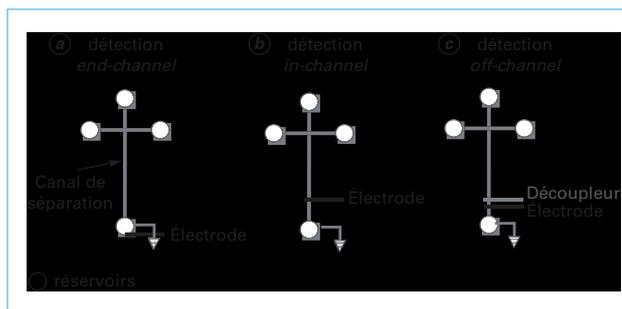


Figure 7 – Configurations proposées pour le couplage des puces d'électrophorèse avec la détection ampérométrique

4.2.2 Ampérométrie

Outre la détection de la conductivité, la détection ampérométrique a su bénéficier du développement des puces et est quasi exclusivement utilisée dans ce format.

En ampérométrie, les solutés sont réduits ou oxydés par application d'un potentiel adéquat à l'électrode de travail.

Trois configurations sont développées dans le couplage de cette détection électrochimique avec l'électrophorèse capillaire sur puce, dénommées *in-channel*, *off-channel* et *end-channel* (figure 7).

Le **mode end-channel** est le plus utilisé en détection ampérométrique. Dans cette configuration, l'électrode de travail est positionnée quelques micromètres après la fin du canal de séparation, ce qui garantit un découplage suffisant avec le voltage de séparation. Ce mode de détection souffre cependant d'une efficacité de séparation réduite, due à la diffusion des solutés dans la zone comprise entre la séparation et la détection.

Pour éliminer cet élargissement de bandes, deux autres modes de détection ont été développés :

- le **mode in-channel** qui consiste à placer l'électrode de travail directement dans le canal de séparation, de façon analogue à ce qui est réalisé en détection optique, grâce à une isolation électrique du potentiostat ;

- le **mode off-channel**, où l'électrode de travail est positionnée de façon similaire au mode *in-channel* mais pour lequel, cette fois, une dérivation vers la terre du voltage de séparation est réalisée grâce à un découpleur.

Limitée aux espèces présentant un groupement électro-actif, cette détection permet d'atteindre des limites de détection variant de 10^{-10} à 10^{-5} mol · L⁻¹.

4.3 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode de détection aujourd'hui incontournable, combinant sensibilité et sélectivité de détection. De nombreux modes d'ionisation ont été envisagés en couplage mais nous ne mentionnons ici que les plus courants, à savoir :

- l'électrospray (ESI) ;
- l'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) ;
- ou encore l'ionisation par plasma (ICP).

De plus amples détails peuvent être obtenus dans les références [16] [17] [18] [19].

Si le couplage de l'électrophorèse capillaire avec l'ESI-MS (spectrométrie de masse à ionisation par électrospray) ou l'ICP-MS (spectrométrie de masse à ionisation par plasma induit) est souvent réalisé en ligne, l'option d'une analyse discontinue est souvent retenue dans le cas du MALDI-MS (spectrométrie de masse à ionisation/désorption laser assistée par une matrice) même si la possibilité d'un couplage en ligne a été démontrée par quelques auteurs.

Quel que soit le mode d'ionisation retenu, l'interface utilisée doit réunir les caractéristiques suivantes :

- assurer le maintien du courant nécessaire au processus de séparation par l'électrophorèse ;
- permettre le transfert des analytes dans des conditions adéquates, en maintenant l'efficacité de séparation et une nébulisation continue.

4.3.1 Spectrométrie de masse moléculaire

4.3.1.1 ESI-MS

L'électrospray est le mode d'ionisation le plus répandu en couplage avec l'électrophorèse capillaire. Les instruments de spectrométrie de masse modernes peuvent facilement être couplés aux appareils d'électrophorèse capillaire, qu'ils soient commerciaux ou développés par les laboratoires grâce à des interfaces dont les plus courantes sont schématisées sur la figure 8 et qui peuvent être subdivisées en deux catégories :

- les interfaces nécessitant un **liquide additionnel** ; celles-ci regroupent les dispositifs à jonction liquide (figure 8a) où le contact entre électrolyte et liquide additionnel est réalisé dans un espace étroit, avant l'introduction dans le spectromètre de masse, et les dispositifs à liquide de gainage (figure 8b), où électrolyte et liquide additionnel arrivent dans le spectromètre de masse de manière coaxiale. Ce dernier dispositif est un des plus utilisés ;

- les interfaces sans apport de liquide extérieur ; ces interfaces sont principalement utilisées avec des **sources nanospray** dont les débits d'utilisation (quelques $nL \cdot \text{min}^{-1}$) sont compatibles avec les débits de sortie de l'électrophorèse capillaire. Dans ce cas, le contact électrique est réalisé par recouvrement de l'extrémité du nébuliseur par un matériau conducteur, par insertion d'une électrode (figure 8c) ou par utilisation d'un capillaire dont l'extrémité poreuse permet d'assurer la connexion électrique par transfert d'ions (figure 8d). Ce dernier dispositif où capillaire de séparation et source électrospray sont combinés en un dispositif unique est disponible commercialement.

La principale limitation de ce couplage est une restriction de la gamme d'électrolytes aux électrolytes volatils, très souvent composés de formiate ou d'acétate d'ammonium. De même, les modifications de surface interne du capillaire doivent être réalisées par des revêtements permanents ou stables dans les conditions expérimentales choisies.

Divers revêtements utilisés en couplage CE-ESI-MS sont détaillés dans la référence [20].

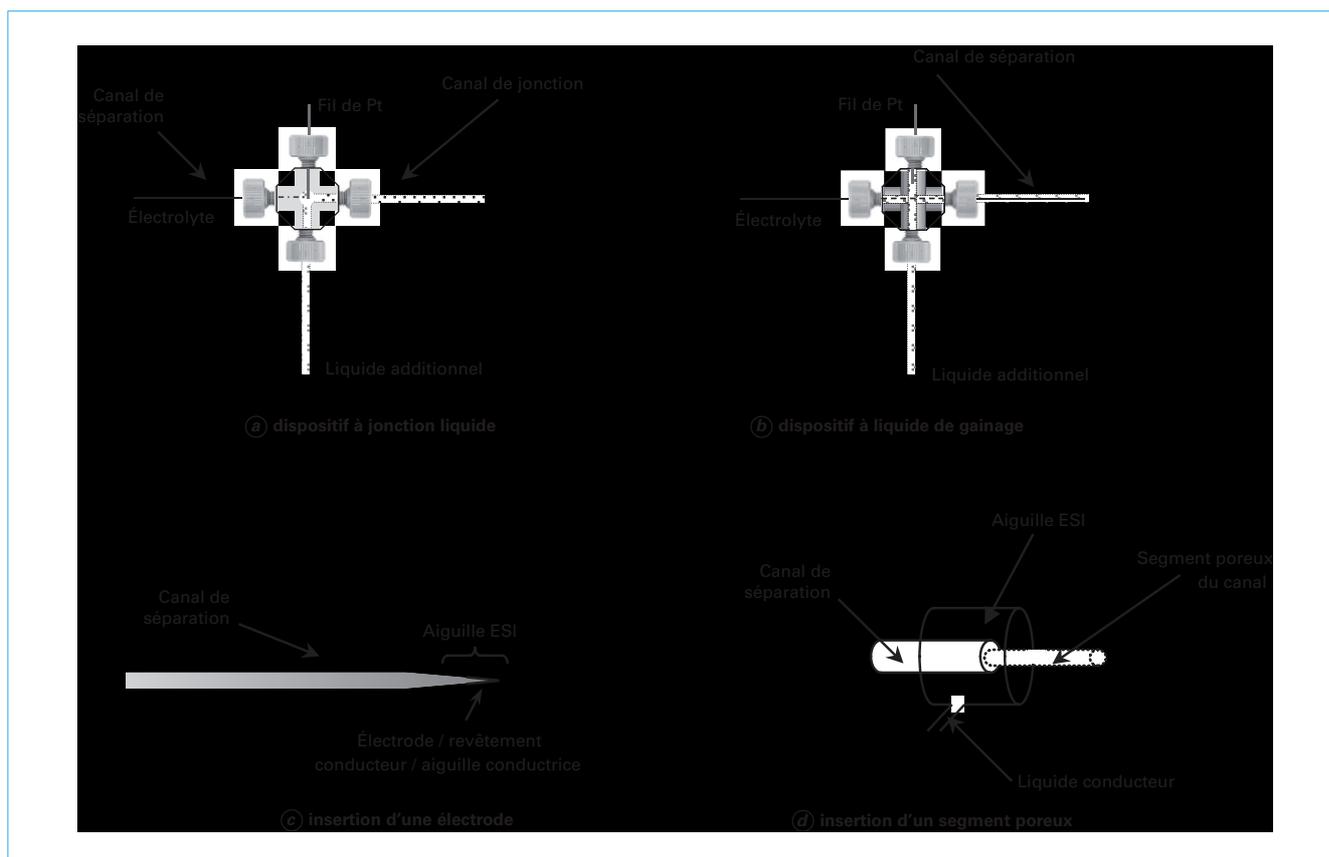


Figure 8 - Schéma des principales interfaces avec l'ESI-MS

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

4.3.1.2 MALDI-MS

Comme cela a été évoqué précédemment, le couplage hors ligne entre l'électrophorèse capillaire et le MALDI-MS est l'approche la plus fréquente car elle combine plusieurs avantages : optimisation distincte des étapes de séparation et de détection, acquisition des données de spectrométrie de masse indépendante de la vitesse de séparation...

La plupart des appareils commerciaux d'électrophorèse capillaire permettent la collecte de fractions à la sortie du capillaire. Cependant, cette collecte est assortie d'une rupture du courant, à chaque fraction, préjudiciable à l'efficacité de la séparation. De ce fait, des collecteurs de fractions externes ont ainsi été couplés à l'électrophorèse capillaire. Le type d'interface le plus fréquemment rencontré dans ce cas est l'interface à jonction liquide (figure 8a).

4.3.2 Spectrométrie de masse élémentaire ICP-MS

Grâce à la prise de conscience de l'importance de la spéciation des éléments dans de nombreux domaines (environnement, toxicologie...), l'intérêt pour les couplages de l'électrophorèse capillaire avec les détecteurs élémentaires spécifiques s'est considérablement accru [21]. Parmi ceux-ci, le couplage avec l'ICP-MS occupe une place de choix en raison de la grande sensibilité de détection et du caractère multi-élémentaire de ce détecteur. L'incompatibilité des débits, évoquée dans le cas du couplage avec l'ESI-MS, se retrouve d'autant plus dans le couplage avec l'ICP-MS car les nébuliseurs classiques sont des nébuliseurs concentriques pneumatiques, qui nécessitent des débits compris entre 50 et 1 000 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. De ce fait, la plupart des couplages entre l'électrophorèse et l'ICP-MS font appel à une interface nécessitant un liquide additionnel, telle que celles présentées sur les figures 8a et b). Ici encore, l'option la plus utilisée est d'introduire ce liquide additionnel de manière coaxiale.

Pour éliminer les effets de dilution inhérents à l'utilisation de tels nébuliseurs, deux options ont été envisagées afin de réduire les débits de liquide additionnel :

- l'utilisation de nébuliseurs n'engendrant pas d'aspiration, tels que les nébuliseurs ultrasoniques ou Babington V ;
- l'utilisation de nébuliseurs à injection directe, travaillant à quelques $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ et permettant l'introduction de la totalité de l'effluent dans l'ICP-MS.

Signalons également la commercialisation d'une interface combinant faible volume mort et nébuliseur à introduction directe.

Certains auteurs ont utilisé une interface sans apport extérieur de liquide afin d'éviter les phénomènes de dilution et d'augmenter l'efficacité de transfert. Cependant, si le développement du nanospray a facilité ce type d'interfaçage en CE-ESI-MS, le nanonébuliseur est toujours attendu en ICP-MS. De ce fait, le flux laminaire créé par aspiration au sein du capillaire doit être compensé par application d'une pression négative à l'entrée du capillaire. Dans ces conditions, assurer le contact électrique reste très problématique et ce type d'interfaçage reste anecdotique.

Outre la nature des composés et de l'électrolyte, le choix et l'optimisation de l'interface ont une influence cruciale sur les limites de détection qui peuvent facilement varier d'un facteur 100. Ainsi, il semble difficile de donner une estimation des limites de détection avec ces techniques. Toutefois, des concentrations de l'ordre de 10^{-9} à $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sont fréquemment rapportées dans la littérature. Signalons également que les couplages réalisés à partir d'appareils commerciaux souffrent tous du même inconvénient, à savoir la nécessité d'utiliser des capillaires de séparation de grande longueur (typiquement plus de 60 cm).

5. Conclusion

L'électrophorèse capillaire s'est aujourd'hui imposée dans le panel des techniques séparatives. La possibilité d'utiliser des détecteurs variés augmente encore sa flexibilité et sa capacité à s'adresser à des domaines très différents.

L'électrophorèse capillaire a, sans conteste, un rôle clé à jouer dans le développement des laboratoires sur puce, systèmes intégrés regroupant la totalité de la chaîne d'analyse.

La force motrice de ces développements est la demande de nombreux secteurs d'applications de disposer d'appareils portables ou de capteurs pour réaliser des analyses directement sur site.

Parmi ses points forts, on peut citer le flux électro-osmotique servant à véhiculer les fluides et permettant de s'affranchir de pompes mais aussi la possibilité d'utiliser les capillaires comme de véritables microréacteurs (ainsi qu'en témoignent les développements réalisés dans les domaines de la préconcentration ou de la dérivation). Il faut également noter que le format puce offre des possibilités de multiplexage (analyses en parallèle), permettant ainsi la réalisation de nombreuses analyses en un temps réduit.

Cependant, de nombreux verrous sont encore à lever pour obtenir de vrais laboratoires sur puce. Ainsi, bien que l'utilisation de faibles volumes d'échantillon soit un avantage pour de nombreuses raisons, elle engendre également des inconvénients, notamment quant à la sensibilité de détection requise, encore peu compatible avec la miniaturisation. Le développement de détecteurs optiques est cependant un secteur très actif.

Par ailleurs, l'intégration d'étapes de traitement d'échantillon nécessite la miniaturisation de composants clés tels que vannes, pompes...

Enfin, le développement de systèmes intégrés jetables pourrait également constituer un atout important.

Électrophorèse capillaire

Appareillage

par **Agnès HAGÈGE**

Chargée de recherche CNRS à l'Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, UMR 7265 CNRS-CEA-Aix-Marseille II et SBTN, CEA Marcoule

et **Thi Ngoc Suong HUYNH**

Diplômée de la faculté de pharmacie de Hô Chi Minh-ville (Vietnam)
Doctorante au Service de Biochimie et de Toxicologie Nucléaire, CEA Marcoule

Sources bibliographiques

- [1] TAVERNA (M.), LE POTIER (I.) et MORIN (Ph.). – *Électrophorèse capillaire : Appareillage*. Techniques de l'Ingénieur [P 3 366] (2003).
- [2] HJERTEN (S.). – *Free zone electrophoresis*. Électrophorèse de zone. *Chromatographic reviews*, 9, p. 122-219 (1967).
- [3] JORGENSEN (J.W.) et LUKACS (K.D.). – *Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries*. – Électrophorèse de zone dans des capillaires ouverts en verre. *Analytical chemistry*, 53, p. 1298-1302 (1981).
- [4] BREADMORE (M.C.). – *Capillary and microchip electrophoresis : Challenging the most common conceptions*. Électrophorèse capillaire et sur micro-puce : Remise en cause des idées les plus répandues. *Journal of chromatography A*, 1221, p. 42-55 (2012).
- [5] CIFUENTES (A.), CANALEJAS (P.) et DIEZ-MASA (J.C.). – *Preparation of linear polyacrylamide-coated capillaries : Study of the polymerization process and its effect on capillary electrophoresis performance*. Préparation de capillaires greffés par du polyacrylamide linéaire : étude du processus de polymérisation et de son influence sur les performances en électrophorèse capillaire. *Journal of chromatography A*, 830, p. 423-438 (1999).
- [6] HORVATH (J.) et DOLNIK (V.). – *Polymer Wall coatings for capillary electrophoresis*. Greffages des parois par les polymères en électrophorèse capillaire. *Electrophoresis*, 22, p. 644-655 (2001).
- [7] TABELING (P.). – *Introduction à la microfluidique*. 254 p., Belin (2003).
- [8] BLANES (L.), COLTRO (W.K.T.), SAITO (R.M.), VAN GRAMBERG (A.), DO LAGO (C.L.) et DOBLE (P.). – *High-voltage power supplies to capillary and microchip electrophoresis*. Générateurs haute tension pour électrophorèse capillaire et sur puce. *Electrophoresis*, 33, p. 893-898 (2012).
- [9] PETERSEN (N.J.), NIKOLAJSSEN (R.P.H.), MOGENSEN (K.B.) et KUTTER (J.P.). – *Effect of Joule heating on efficiency and performance for microchip-based and capillary-based electrophoretic separation systems : A closer look*. Influence de l'effet Joule sur l'efficacité et les performances des systèmes de séparation électrophorétique en capillaire ou sur puce : un examen plus minutieux. *Electrophoresis*, 25, p. 253-269 (2004).
- [10] SAITO (R.M.), COLTRO (W.K.T.) et DE JESUS (D.P.). – *Instrumentation design for hydrodynamic sample injection in microchip electrophoresis : A review*. Conception de dispositifs pour l'injection hydrodynamique d'échantillons en électrophorèse sur puce : une revue. *Electrophoresis*, 33, p. 2614-2623 (2012).
- [11] GIORDANO (B.C.), BURGI (D.S.), HARTA (S.J.) et TERRAYA (A.). – *On-line sample preconcentration in microfluidic devices : A review*. Préconcentration en ligne des échantillons dans les systèmes microfluidiques : Une revue. *Analytica chimica acta*, 718, p. 11-24 (2012).
- [12] LIN (C.-C.), HSU (J.-L.) et LEE (G.-B.). – *Sample preconcentration in microfluidic devices*. Préconcentration d'échantillons dans les systèmes microfluidiques. *Microfluidics and nanofluidics*, 10, p. 481-511 (2011).
- [13] DE KORT (B.J.), DE JONG (G.J.) et SOMSEN (G.W.). – *Native fluorescence detection of biomolecular and pharmaceutical compounds in capillary electrophoresis : detector designs, performance and applications : A review*. Détection de la fluorescence native de biomolécules et de composés pharmaceutiques en électrophorèse capillaire : design des détecteurs, performances et applications : une revue. *Analytica chimica acta*, 766, p. 13-33 (2013).
- [14] VANDAVEER (W.R.), PASAS-FARMER (S.A.), FISCHER (D.J.), FRANKENFELD (C.N.) et LUNTE (S.M.). – *Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis*. Récents développements de la détection électrochimique en électrophorèse capillaire sur puce. *Electrophoresis*, 25, p. 3528-3549 (2004).
- [15] MARK (J.J.P.), SCHOLZ (R.) et MATYSIK (F.M.). – *Electrochemical methods in conjunction with capillary and microchip electrophoresis*. – Méthodes électrochimiques alliées à l'électrophorèse en capillaire et sur puce. *Journal of chromatography A*, 1267, p. 45-64 (2012).
- [16] HOMMERSON (P.), KHAN (A.M.), DE JONG (G. J.) et SOMSEN (G.W.). – *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry : principles, design, and applications*. Techniques d'ionisation en couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse : principes, conception et applications. *Mass spectrometry reviews*, 30, p. 1096-1120 (2011).
- [17] KLEPÁRNIK (K.). – *Recent advances in the combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry : From element to single-cell analysis*. Avancées récentes dans le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse : de l'analyse de l'élément à celle de la cellule unique. *Electrophoresis*, 34, p. 70-85 (2013).
- [18] MAXWELL (E.J.) et CHEN (D.D.Y.). – *Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*. Vingt ans de développement d'interface pour le couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse à ionisation par électrospray. *Analytica chimica acta*, 627, p. 25-33 (2008).
- [19] STAUB (A.), SCHAFFNER (J.), RUDAZ (S.) et VEUTHEY (J.-L.). – *CE-TOF/MS : Fundamental concepts, instrumental considerations and applications*. CE-TOF/MS : Concepts fondamentaux, considérations instrumentales et applications. *Electrophoresis*, 30, p. 1610-1623 (2009).
- [20] HUHN (C.), RAMAUTAR (R.), WUHRER (M.) et SOMSEN (G.W.). – *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis – mass spectrometry*. Pertinence et utilisation des revêtements en électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396, p. 297-314 (2010).
- [21] TIMERBAEV (A.R.). – *Element speciation analysis using capillary electrophoresis : twenty years of development and applications*. Analyse de la spéciation par électrophorèse capillaire : vingt ans de développement et d'applications. *Chemical reviews*, 113, p. 778-812 (2013).

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

À lire également dans nos bases

PELTRE (G.) et GAREIL (P.). – *Électrophorèse*. [P 1 815] (1995).

TAVERNA (M.), LE POTIER (I.) et MORIN (Ph.). – *Électrophorèse capillaire. Principe*. [P 3 365] (2003).

TAVERNA (M.), LE POTIER (I.) et MORIN (Ph.). – *Électrophorèse capillaire. Applications* [P 3 367] (2003).

Annuaire

Constructeurs – Fournisseurs – Distributeurs
(liste non exhaustive)

Agilent Technologies (appareillage conventionnel)
<http://www.chem.agilent.com>

Applied Biosystems (appareillage conventionnel)
<http://www.appliedbiosystems.com>

Beckman Coulter (appareillage conventionnel)
<http://www.beckmancoulter.com>

Perkin Elmer (appareillage conventionnel)
<http://www.perkinelmer.com>

CE Resources (appareillage portable)
<http://www.ce-resources.com>

Micalyne (puces)
<http://www.micalyne.com>

Microfluidic Chipshop (puces)
<http://www.microfluidic-chipshop.com>

Micronit Microfluidics (puces)
<http://www.micronit.com>

Thi-Ngoc Suong Huynh¹
 Damien Bourgeois²
 Christian Basset¹
 Claude Vidaud¹
 Agnès Hagège^{1,3}

¹CEA/DSV/iBEB/SBTN,
 Laboratoire d'Etude des
 Protéines Cibles, Bagnols sur
 Cèze Cedex, France

²Institut de Chimie Séparative de
 Marcoule, Laboratoire de
 Chimie et Physico-chimie des
 Actinides, Bagnols-sur-Cèze
 cedex, France

³CNRS, UMR 7265,
 CEA/DSV/iBEB, St. Paul Les
 Durance, France

Received October 11, 2014

Revised December 27, 2014

Accepted January 11, 2015

Research Article

Assessment of CE-ICP/MS hyphenation for the study of uranyl/protein interactions

Identification of uranyl transport proteins is key to develop efficient detoxification approaches. Therefore, analytical approaches have to be developed to cope with the complexity of biological media and allow the analysis of metal speciation. CE-ICP/MS was used to combine the less-intrusive character and high separation efficiency of CE with the sensitive detection of ICP/MS. The method was based on the incubation of samples with uranyl prior to the separation. Electrophoretic buffers were compared to select a 10 mM Tris to 15 mM NaCl buffer, which enabled analyses at pH 7.4 and limited dissociation. This method was applied to the analysis of a serum. Two main fractions were observed. By comparison with synthetic mixtures of proteins, the first one was attributed to fetuin and in a lesser extent to HSA, and the second one to uranyl unbound to proteins. The analysis showed that fetuin was likely to be the main target of uranyl. CE-ICP/MS was also used to investigate the behavior of the fetuin–uranyl complex, in the presence of carbonate, an abundant complexing agent of uranyl in blood. This method enabled association constants determination, suggesting the occurrence of both FETUA(UO₂²⁺) and FETUA(UO₂²⁺)(CO₃²⁻) complexes, depending on the carbonate concentration.

Keywords:

Capillary electrophoresis / Carbonate / Metalloproteomics / Uranium

DOI 10.1002/elps.201400471

1 Introduction

Uranium, either naturally occurring or anthropically released in the environment (nuclear fuel cycle activities, weapons containing depleted uranium, and, in some extent, due to the use of phosphate fertilizers), is an important element to study because of its chemical rather than radiological toxicity. In aerobic media, uranium is mainly found as uranyl (UO₂²⁺). Once in the body, it reaches blood and accumulates preferentially in kidneys and bones [1]. To date, there is a real lack of knowledge concerning the uranyl biodistribution at the molecular level in blood and the mechanisms leading to its transport to bones and kidneys remain poorly understood. Uranyl is known to be partitioned in blood into carbonate complexes (50%), protein complexes (30%), and the erythrocytes bound fraction (20%) [2]. It requires however the determination of uranyl distribution among the proteins that can bind this cation. Attempts to determine these proteins can be divided into two main types of approaches.

The first one is based on the determination of affinity constants of individual proteins. Based on pioneer works concerning uranyl distribution in blood [2, 3], HSA and transferrin (TF) were suggested as the first main targets and their complexation with uranyl was extensively studied using different spectroscopic approaches [4–6]. Additionally, other proteins from different cellular compartments were proposed as potential targets of uranyl on the basis of spectrochemical investigations on individual proteins, for example, phosvitin, ferritin, cytochromes, etc. [7–10]. Such approaches were also used to investigate proteins engineered to bind uranyl with a very high affinity [11–13]. Using the constants available for numerous inorganic and organic ligands, Sutton and Burastero [14] described the chemical speciation of UO₂²⁺ in simulated body fluids and concluded that a more complete characterization of uranium interactions with HSA, TF, and erythrocytes is required. More recently, major serum proteins were tested using a rapid and sensitive screening method based on surface plasmon resonance and classified according to their affinity for uranyl [10]. It has been demonstrated, by affinity constant calculations, that despite its moderate concentration in serum, fetuin A (FETUA) conveys more than 80% of the uranyl bound to proteins [10]. Due to the complexity of biological media, these studies remain insufficient, albeit necessary to describe the biodistribution of uranium.

The second trend is to study the formation of a metal–protein complex directly from biological fluids and cells, owing to the complexity of the metal selection mechanisms [15, 16]. In this case, the development of analytical approaches involving separation techniques to identify uranium-binding

Correspondence: Dr. Agnès Hagège, SBTN, Laboratoire d'Etude des Protéines Cibles, BP 17171, 30207 Bagnols sur Cèze Cedex, France

E-mail: agnes.hagege@cea.fr

Fax: +33-0-466-791-905

Abbreviations: A1AH, α -1 acid glycoprotein; FETUA, fetuin A; OPN, osteopontin; TBP, tributylphosphine; TF, transferrin; UV, ultraviolet; μ_{ep} , electrophoretic mobility

proteins directly from complex mixtures was considered. Very few papers were dedicated to uranium biodistribution in biological samples. An early study performed in CE suspected the presence of uranium in serum protein samples because of a broadening of the peak observed in ultraviolet (UV), which corresponds to the HSA fraction [17]. However, no direct proof of the presence of uranium was given. Moreover, the separation was performed in alkaline conditions, which can affect both the initial uranyl speciation and the proteins conformation. 2DE combined with laser ablation ICP/MS was used by Becker et al. [18] to identify metal-containing human brain proteins. Protein fractions containing uranium were detected in brain samples doped with uranium. Later on, Frelon et al. applied a similar methodology to investigate uranyl-binding proteins from renal cells [19]. These authors reported a loss of uranium due to the denaturing conditions used in SDS-PAGE. The same group explored the potential of nondenaturing conditions of IEF as the first dimension of 2DE, for the separation of protein–uranium complexes in cytosols [20]. A loss of ca. 50% of metal was reported. However, a colocalization of hemocyanin, pseudohemocyanin-2, arginine kinase with uranium was proved and these proteins were therefore suspected to bind uranyl. The complexity of these biological samples leads to conflicting consequences with the determination of target proteins. First, it hampers the unequivocal identification of uranium-binding proteins since the protein fractions contain much more than a single protein. Second, the separation conditions dictated by the need of a high resolution often lead to the disruption of metal–protein interactions. Several reviews discussed these advantages and drawbacks [21–23]. Although SEC and CE have to cope with a low resolution, these techniques appear to be good options, less intrusive than others, since no chemical interactions theoretically occur during the separation. Separations can also be achieved using aqueous mobile phases/electrolytes, allowing simulated physiological conditions. Furthermore, these features, combined with the handling of small sample volumes, make CE a promising tool for metal–protein complexes separation.

We thus propose the use of CE to realize the separation of protein–uranyl complexes in nondenaturing conditions. Its hyphenation with ICP/MS combines its high separation efficiency with the sensitive detection of ICP/MS. This was already successfully applied to the study of the binding of metalloids to serum proteins [24]. Quintina et al. also reported the use of CE-ICP/MS as a second dimension in the separation of manganese species from liver extracts [25]. The aim of this work was to demonstrate that CE-ICP/MS is able to maintain uranyl–protein interactions and could be involved in the future as a supplementary separative dimension, used in combination with other techniques, for the analysis of uranyl distribution in biological samples.

Uranyl distribution in simple mixtures of proteins was studied and the results were compared to those obtained by calculations from independently previously determined binding constants [10]. For that purpose, the simultaneous analysis of uranyl-binding proteins present in serum was

performed. Finally, titration with carbonates was performed to assess the binding constant of FETUA for uranyl and compare the results with those previously obtained by spectroscopic and biophysical approaches [10].

2 Materials and methods

2.1 Materials

Tris, sodium borate and sodium hydroxide, sodium chloride, hydrochloric acid (HCl 37%), sodium bicarbonate, tributylphosphine (TBP), and DMSO from Sigma-Aldrich were all of analytical grade. All aqueous solutions were prepared with ultrapure water (18.2 M Ω cm resistivity; Milli-Q station, Merck Millipore). The separation buffers were daily prepared and filtered using a 0.45 μ m filter (Analytapore). Nitric acid 1 mM was obtained by dilution of HNO₃ Suprapur[®] (Merck). HSA and TF were purchased from Sigma-Aldrich. α -1 Acid glycoprotein (A1AH) was purchased from Fluka (Sigma-Aldrich). These proteins were dialyzed against BGE before use. Fetuin from fetal calf serum (FETUA) from Sigma-Aldrich and bovine osteopontin (OPN) obtained from Lacprodan[®] OPN-10 (Arla Foods Ingredients, Aarhus, Denmark) were purified according to published protocols [9, 10]. The uranyl solutions were prepared from a 1000 μ g/mL certified solution (PlasmaCAL) purchased from SCP Science (Courtaboeuf, France). Erbium used to control the flow stability was obtained from a 1000 μ g/mL certified solution (PlasmaCAL, SCP Science). Human serum of healthy volunteer donors was obtained as a pooled sample without any anticoagulant or citrate treatment (PAA Laboratories GmbH, Pasing, Austria).

2.2 CE-ICP/MS hyphenation

The capillaries were untreated fused-silica capillaries (65 cm \times 75 mm id, 375 mm od) from Photon Lines (St-Germain-en-Laye, France). Separations were carried out on a Beckman P/ACE MDQ instrument using the 32 Karat Software. Prior to the first use, the capillary was flushed with NaOH 0.5 M, water and the BGE for 10 min under 20 psi. Between runs, the capillary was washed with the BGE for 3 min under 20 psi. TBP 0.01% in DMSO 2% was used as an EOF marker and injected during 3 s, under 0.3 psi before each sample injection. Samples were hydrodynamically injected and separations were performed under constant voltage at 25°C, followed by a pressure step, first with BGE then with 1 mM HNO₃.

An Agilent 7700 ICP/MS equipped with a Micromist micronebulizer was used for the specific detection of elements. Signals at m/z 31, 166, and 238 were monitored using an integration time of 1, 0.1, and 0.3 s for the detection of phosphorus, erbium, and uranium, respectively. Operating conditions were the following: nebulizer gas flow rate: 1 L/min, plasma gas flow rate: 15 L/min, auxiliary gas flow

rate: 0.9 L/min, and radiofrequency power 1550 W for the plasma.

The hyphenation between CE and ICP/MS was achieved via a homemade sheath-flow interface described elsewhere [26]. The electrical connection was achieved by a ground electrode positioned in one of its inlets. The sheath liquid (3 nM Er^{3+} in 1 mM HNO_3) was introduced by self-aspiration to another inlet of the interface. Double detection was realized using the UV detector of the CE apparatus. For that purpose, a detection window was created at 10 cm from the injection end of the capillary by simply removing the polyimide coating. Consequently, proteins were detected at either 200 or 214 nm, at 10 cm from the capillary inlet and uranium species were detected in ICP/MS at $m/z = 238$ at the end of the same capillary.

2.3 Screening of uranyl-binding proteins

For the optimization of the CE conditions, a sample containing TF, FETUA, and OPN, respectively, 32, 8, and 8 μM , in a 10 mM Tris, 15 mM NaCl buffer at pH 7.4 was realized. Various BGEs were used to obtain different pH (10 mM Tris, 15 mM NaCl at pH 7.4 and 8.0, and 15 mM sodium borate, 5 mM NaCl at pH 9.2) and various ionic strengths (by varying both Tris and NaCl concentrations). Separations were performed in BGE, under a constant voltage (25 kV) at 25°C.

Serum samples were diluted ten times in water before analysis. Two different mixtures of TF, HSA, FETUA, and A1AH were also prepared in a 10 mM Tris, 15 mM NaCl buffer at pH 7.4: the first one containing 12 μM TF, 200 μM HSA, and 6 μM A1AH and the second one, 12 μM TF, 4 μM FETUA, and 6 μM A1AH. Concentrations were calculated in order to be proportional to those in serum.

Uranyl was added in each mixture to reach the final concentration of 1 μM and all samples were incubated for 4 h at 37°C with the mixing frequency of 500 revolution per minute to reach the equilibrium before analysis. Separations were performed in 10 mM Tris, 15 mM NaCl buffer at pH 7.4, under a constant voltage (25 kV) at 25°C. All samples were hydrodynamically injected at 0.3–0.5 psi during 5 s (around 23 nL) and experiments were performed at least in duplicate.

2.4 Competition assays with carbonate

Samples were prepared in 5 mM Tris, 10 mM NaCl at pH 7.4. FETUA and uranyl concentrations were fixed at 10 μM and 150 nM, respectively, while carbonate concentrations were varied from 200 μM to 67 mM. After protection against further CO_2 dissolution and incubation for 4 h at 37°C, samples were hydrodynamically injected at 0.5 psi during 12 s (around 50 nL). Separations were performed in 50 mM Tris, 5 mM NaCl buffer at pH 7.4, under a constant voltage (25 kV) at 25°C.

For each carbonate concentration, the uranium peak area corresponding to FETUA was measured and expressed

Table 1. Aqueous equilibrium constants used in this study

	logK (ionic strength = 0)	Reference
$\text{UO}_2^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})^+ + \text{H}^+$	−5.25	[27]
$\text{UO}_2^{2+} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2^{2+}(\text{OH})_2 + 2 \text{H}^+$	−12.15	[27]
$\text{UO}_2^{2+} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{OH})_3^- + 3 \text{H}^+$	−20.25	[27]
$\text{UO}_2^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)$	9.94	[27]
$\text{UO}_2^{2+} + 2 \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$	16.61	[27]
$\text{UO}_2^{2+} + 3 \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	21.84	[27]
$2 \text{UO}_2^{2+} + \text{CO}_3^{2-} + 3 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons (\text{UO}_2)_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_3 + 3 \text{H}^+$	−0.86	[27]
$\text{H}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	−6.38	[28]
$\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$	−10.32	[28]

as a percentage of the initial FETUA(UO_2^{2+}) complex. Speciation diagrams were established and complexation constants determined by fitting the experimental data with the theoretical curves generated by the software JChess (Ecole des Mines, France) using constants recapitulated in Table 1.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of CE conditions

As already mentioned, the challenge of the method was to separate proteins in a system maintaining noncovalent uranyl–protein interactions. CE is regarded as a soft separation method and hence expected to maintain complexes since the separations do not require interactions with a stationary phase. TF has been recognized as a target of uranyl for a long time [4]. Recently, OPN [9] and FETUA [10] were identified as potential targets of uranyl. As these proteins were found to exhibit a high affinity for uranyl, a mixture of these three proteins was realized and used to select the optimal conditions for the CE analysis.

3.1.1 Selection of the BGE

An additional challenge is to overcome the adsorption of both uranyl and proteins onto silica capillary walls. At alkaline pH, both the protein and the capillary wall are negatively charged, and the adsorption process is minimized. For each BGE, the distribution of uranyl between the different species is expressed as following:

$$\%U_{\text{species } i} = \frac{A_{\text{species } i}}{\sum_{j=0}^n A_{\text{species } j}} \times 100, \quad (1)$$

where $A_{\text{species } i}$ denotes the peak area measured in ICP/MS at $m/z = 238$, for each free (unbound to protein) or protein-bound uranium form.

As expected, increasing the pH value of the BGE to 8 and 9.2 results not only in the modification of uranium distribution among proteins but also in a partial release of the uranium from the protein (Fig. 1A). Indeed, at pH 8.0 and

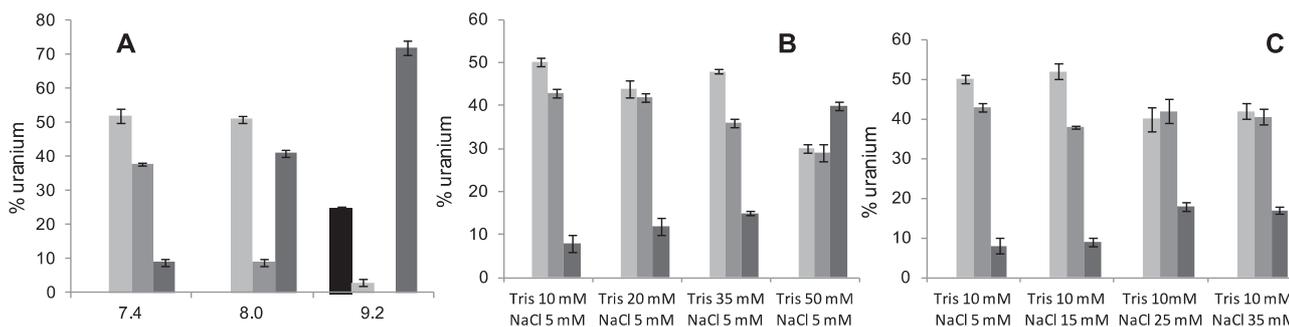


Figure 1. Influence of the BGE composition on uranyl binding ($1 \mu\text{M}$) in a $32 \mu\text{M}$ TF, $8 \mu\text{M}$ FETUA, $8 \mu\text{M}$ OPN mixture. (A) pH, (B) Tris concentration, (C) NaCl concentration. ■OPN, ■FETUA, ■TF, ■U unbound to proteins. Separation conditions: capillary: fused silica, $65 \text{ cm} \times 75 \text{ mm}$ id, 25 kV, 25°C , hydrodynamic injection: 0.5 psi, 5 s. Detection ICP/MS at $m/z = 238$.

9.2, FET- and OPN-uranyl complexes tend to dissociate significantly. For instance, at pH 9.2, TF becomes the main uranium-binding protein and more than 70% of uranium remains unbound to proteins.

As a consequence, the buffer should be chosen not to depart too much from the physiological medium (pH 7.4). Although phosphate buffer has a high buffer capacity, the formation of insoluble and/or slightly soluble uranyl phosphates [25] prohibits its use. In addition, electrolytes should not contain any uncontrolled competitors, which may bias uranium distribution. Different concentrations of Tris and NaCl were investigated. Figure 1B and C show that either a high concentration of Tris (50 mM) or a high concentration of NaCl ($\geq 25 \text{ mM}$), leading to increased migration times, affect significantly the distribution of uranium. The ionic strength was adjusted to obtain a good compromise between the salt content, often required to maintain proteins in their native state, and a short migration time. Indeed, the decrease in EOF induced by the increase of the salt content favors the dissociation upon electrophoretic dilution. As a result, a 10 mM Tris to 15 mM NaCl buffer exhibiting a pH of 7.4 was then selected.

3.1.2. Reproducibility of the analyses

Using the previously selected conditions, a low adsorption of free uranyl onto silica capillary walls was still observed. Owing to the presence of negatively charged silanols at pH 7.4 at the capillary surface, electrostatic interaction with uranyl could not be avoided. Moreover, the proteinaceous content of biological samples is known to often lead to protein binding to silanols. However, the use of a polymer coating at pH 7.4 was incompatible with an EOF, high enough to obtain reasonable analysis times at pH 7.4.

As a consequence, a postrun washing protocol was implemented to desorb both free uranyl and proteins adsorbed onto capillaries. After the migration of the last protein, capillaries were flushed first with BGE to elute anionic species presenting high electrophoretic mobilities, if any, and then with 1 mM HNO_3 .

The reproducibility of the analyses was evaluated. Figure 2 displays the uranium profile obtained for four consecutive separations of TF, FETUA, and OPN, previously incubated with $1 \mu\text{M}$ uranyl. Protein peak attribution was realized according to their electrophoretic mobility, calculated using TBP as an EOF marker. This can be done since the bound uranium does not affect significantly the mobility of the protein. Moreover, the assignment of OPN is corroborated by the presence of a ^{31}P signal due to the multiple phosphorylations of this protein.

Table 2 recapitulates the electrophoretic mobilities of the different proteins and the associated percentages of uranium.

As shown in Fig. 2, no uranyl is shown to be associated to TF in such a sample. On the contrary, FETUA and OPN are found to bind high quantities of the uranyl present in solution, 53 ± 2 and $37.9 \pm 0.5\%$, for FETUA and OPN, respectively. Assuming that the peak areas represent the actual distribution of uranyl into the two proteins and that metal dissociation affects equally the two species, these results may reflect a higher affinity of FETUA for uranyl. However, dissociation due to nonequilibrium analysis cannot be excluded, especially for an intrinsically disordered protein such as OPN, despite the precautions taken to avoid it (protein excess, fast separations) and the obtained distribution is likely to be affected by the lability of the complexes.

3.2. Interaction of uranyl with uranium-binding plasma proteins

Based on works performed in the 1970s–1980s, HSA and TF are often considered as the main protein targets of uranyl, owing not only to their abundance in blood, but also to the difficulty of separation of such a biological sample. In order to broaden the knowledge of the protein binding of uranyl, human serum samples were incubated with $1 \mu\text{M}$ uranyl and compared to synthetic mixtures of proteins.

The choice of the proteins was based on a recent revision of these results, which led to a simulated distribution among 13 major serum proteins and showed that uranyl was

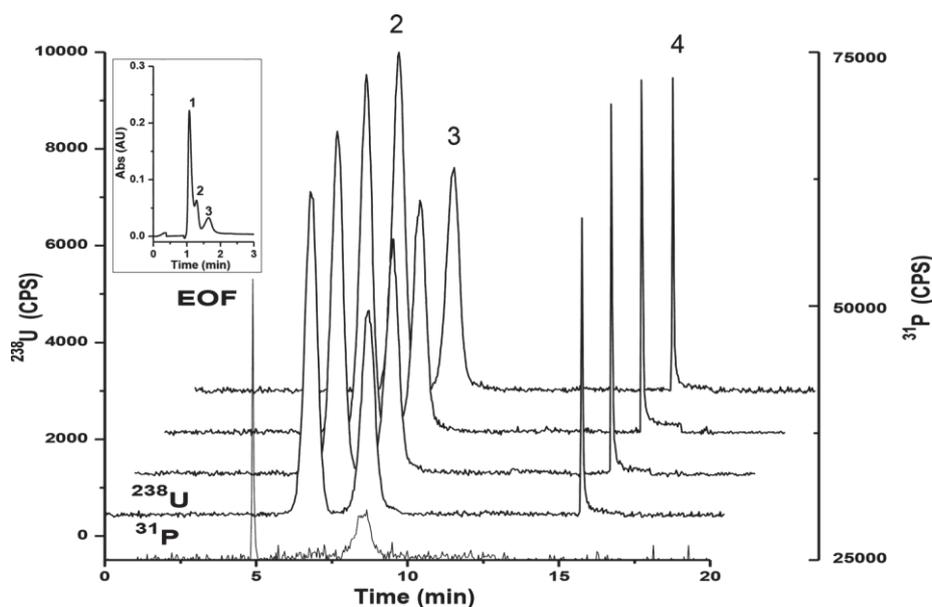


Figure 2. Distribution of uranyl among uranyl-binding proteins after a 4 h incubation with 1 μM uranyl at 37°C in Tris 15 mM, NaCl 10 mM, pH 7.4. (1) 32 μM TF, (2) 8 μM FETUA, (3) 8 μM OPN, (4) uranyl unbound to proteins. Separation conditions: capillary: fused silica, 65 cm \times 75 μm id, BGE: 10 mM Tris, 15 mM NaCl buffer at pH 7.4, 25 kV, 25°C, hydrodynamic injection: 0.5 psi, 5 s. Detection ICP/MS at $m/z = 238$ and 31 (end of the capillary). Inset: UV at 200 nm (10 cm from the injection).

Table 2. Electrophoretic mobility of the uranyl complexes and associated percentages

	Day 1 ($n = 4$)		Day 2 ($n = 3$)	
	Uranyl distribution (%)	Average electrophoretic mobility ($\times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Uranyl distribution (%)	Average electrophoretic mobility ($\times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
U bound to FETUA (%)	54.3 ± 0.1	-1.52 ± 0.04	51.9 ± 0.7	-1.53 ± 0.04
U bound to OPN (%)	37.9 ± 0.2	-2.39 ± 0.05	37.9 ± 0.4	-2.46 ± 0.05
U unbound to protein (%)	7.8 ± 0.2	— ^{a)}	10.3 ± 0.3	— ^{a)}

a) No electrophoretic mobility since it is eluted with the post-run wash.

distributed as follows: 81.5% bound to FETUA, 7% to HSA, 2.5% to TF, and 0.3% to A1AH [10]. Therefore, the simultaneous analysis of these uranyl-binding proteins was considered in order to validate the CE-ICP/MS approach.

However, under the previously selected conditions (Tris-NaCl, pH 7.4), a comigration of HSA and FETUA was obtained. This was unsurprising since the classical protocols used for FETUA separation usually involve either multiple separation steps or affinity chromatography. Consequently, a satisfying separation of HSA, TF, A1AH, and FETUA was not achievable in a single run. Hence, two different sets of proteins, first incubated with 1 μM uranyl, were analyzed by CE-ICP/MS, the first one containing TF, HSA, and A1AH and the second one, TF, FETUA, and A1AH. The protein concentrations in both samples were proportional to those found in blood.

Figure 3 shows the separations of the two mixtures using either a UV detection (Fig. 1A and C) to monitor the proteins or an ICP/MS detection (Fig. 1B and D) to detect uranium. It should be noted that discrepancies in the migration times are due to the differences in detector positioning. Consequently, taking into account this difference, that is, 55 cm for UV and 65 cm for ICP/MS, the migration times

ratio between the two separations is 1.2. A significant increase of the migration times is noticed when injecting high concentrations of proteins (e.g., 200 μM HSA). However, migration electrophoretic mobilities and peak areas were obtained with a good accuracy ($\text{RSD} \leq 3\%$). The accuracy remained acceptable for a high proteinaceous content ($\text{RSD} \leq 6\%$). Once again the electrophoretic mobility calculated for each protein from the UV electropherograms was used to attribute the peaks obtained in ICP/MS: $\mu_{\text{ep,TF}} = (-7.8 \pm 0.2) \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $\mu_{\text{ep,HSA}} = (-1.45 \pm 0.09) \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $\mu_{\text{ep,FETUA}} = (-1.50 \pm 0.02) \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, and $\mu_{\text{ep,A1AH}} = (-2.0 \pm 0.1) \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

As expected, HSA and TF are targeted by uranyl, albeit the percentage of bound uranyl is low, respectively, 13 ± 1 and $2.1 \pm 0.5\%$ (Fig. 3A and B). When replacing HSA (200 μM) by FETUA (4 μM) in the same mixture (Fig. 3C and D), uranyl is predominantly bound to FETUA $73 \pm 3\%$. Complexes formed with A1AH, if any, are below the detection limit (1 nM uranium, i.e., 0.1% of the initial concentration). Serum samples diluted in water were then analyzed. Figure 4 presents the electropherogram of a serum sample incubated with 1 μM uranyl. In order to compare it with synthetic mixtures, the migration is expressed in electrophoretic mobilities. Two

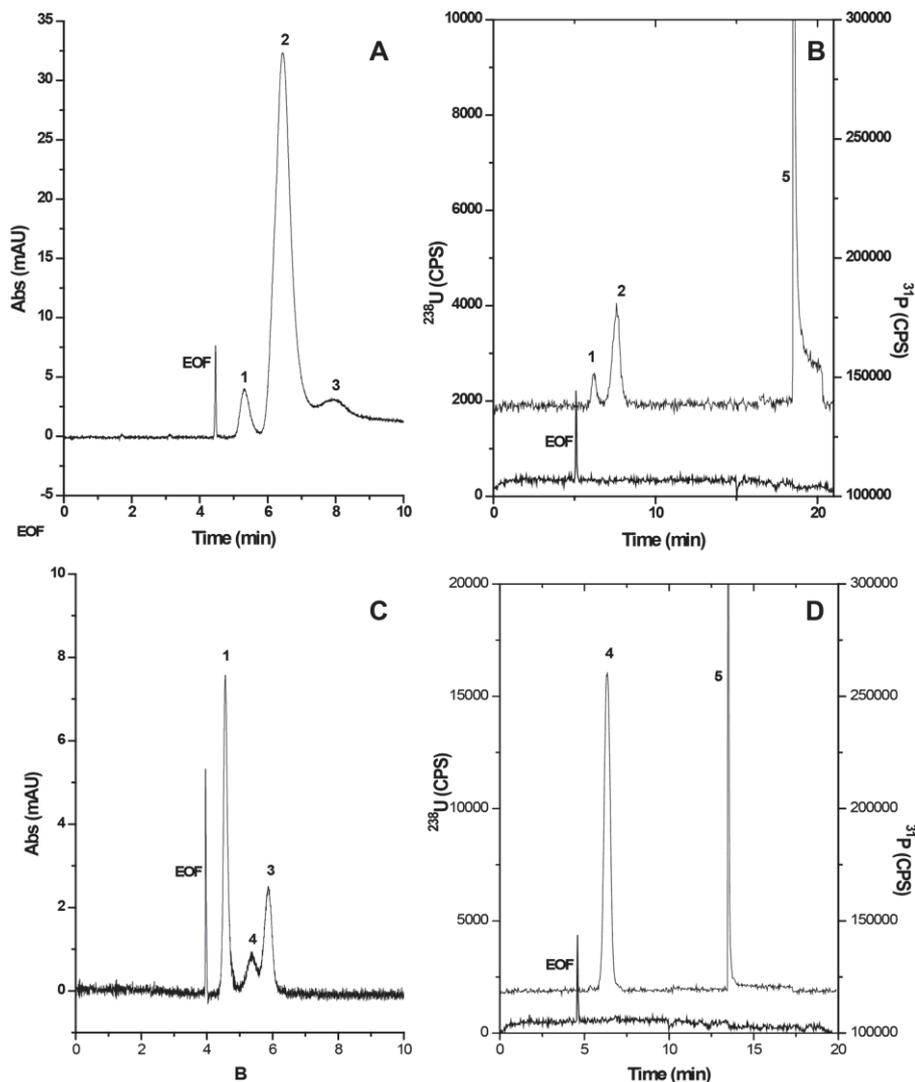


Figure 3. Separation of serum proteins mixtures by CE-ICP/MS after a 4 h incubation with 1 μ M uranyl at 37°C in 10 mM Tris, 15 mM NaCl, pH 7.4. (1) TF, (2) HSA, (3) A1AH, (4) FETUA, (5) uranyl unbound to proteins. (A, B): 12 μ M TF, 200 μ M HSA, 6 μ M A1AH, (C, D): 12 μ M TF, 4 μ M FETUA, 6 μ M A1AH. Separation conditions: same as in Fig. 2. (A, C): UV at 214 nm, (B, D): ICP/MS at $m/z = 238$.

main peaks were observed, the first one corresponding to an electrophoretic mobility of $(-1.50 \pm 0.07) \times 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and the second one eluted during the postwash step. It should be noted that the uranium profile obtained for diluted human blood serum samples incubated with 1 μ M uranyl turns out to be close to that obtained for the synthetic mixture containing FETUA. As a result, FETUA seems clearly the most relevant uranyl target, albeit the formation of a uranyl complex with HSA to a lesser extent cannot be excluded. These results are in good agreement with already published results [10] and demonstrate the potential of the CE-ICP/MS in uranyl biodistribution studies. A uranium profile can fastly be obtained from a complex mixture and the selectivity of the detection offered by ICP/MS greatly simplifies the electropherogram. However, it also reveals the need of complementary techniques. Indeed, the comigration of HSA and FETUA points out the lack of resolution of weakly intrusive separation techniques such as CE. Moreover, the identification of uranyl targets is only possible if their electrophoretic mobilities are known and then standard proteins are available. The combined use of molecular MS would be a great help for that purpose.

3.3. Influence of a small biological ligand: Carbonate

Blood contains 20–25 mM total carbonate, mainly under the bicarbonate form. Carbonate is known for its moderate affinity for uranyl. Therefore, in the range of uranyl concentrations used (50 nM to 1 μ M), it is expected to form mainly a mixed species, $(\text{UO}_2)_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_3^-$, for carbonate concentrations ranging from 1 μ M to 1 mM and carbonate complexes, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ and $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$, at higher concentrations (>1 mM), as predicted from the complexation constants (Table 1).

Owing to the abundance of this inorganic ligand in blood, the uranyl-binding affinity of FETUA was compared to the one of carbonate by competition experiments. For that purpose, samples containing increasing carbonate concentrations were analyzed by CE-ICP/MS and the uranium peak area corresponding to FETUA was measured. Since the use of CE-ICP/MS allowed the rapid analysis of uranyl complexes involving FETUA, a titration curve versus carbonate could be obtained in less than 3 h, consuming around 100 pmol FETUA. Figure 5 displays the electropherograms obtained

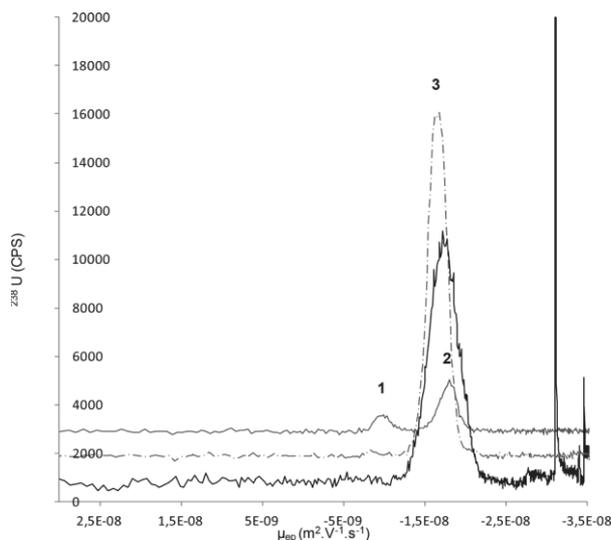


Figure 4. CE-ICP/MS analysis of a serum sample diluted in water. Separation conditions: same as in Fig. 2. (A) UV detection at 214 nm, (B) ICP/MS at $m/z = 238$. Serum sample (—), mixture of 12 μM TF, 200 μM HSA, 6 μM A1AH (—), mixture of 12 μM TF, 4 μM FETUA, 6 μM A1AH (—). (1) TF, (2) HSA, (3) FETUA.

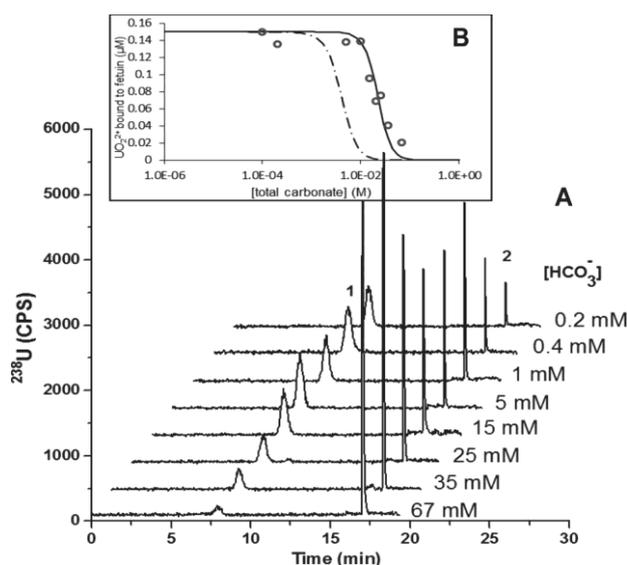
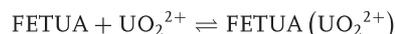


Figure 5. (A) Competition assay of FETUA versus carbonate for uranyl. (1) FETUA, (2) unbound uranyl. Separation conditions: same as in Fig. 2. ICP/MS at $m/z = 238$. (B) Uranyl bounded to FETUA versus carbonate (\circ) and modeling using $\log K_1 = 13.6$ (—) and $\log K_1 = 11.4$ (---) for the formation of the $\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})$ complex.

for several concentrations of carbonate as well as the associated titration curve. Although increasing concentrations of carbonate lead to a decrease of the uranyl fraction bound to protein, these results clearly show that for total carbonate concentrations similar to those present in serum, an appreciable amount of uranyl is still bound to the protein (50% in our case). Assuming a 1:1 stoichiometry, the formation

of a uranyl complex with FETUA can be described by the following simplified equilibrium.

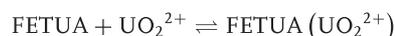


$$K_1 = \frac{[\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})]}{[\text{FETUA}][\text{UO}_2^{2+}]}, \quad (2)$$

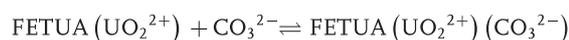
where charges of FETUA and complex are voluntarily omitted.

Under the experimental conditions (pH 7.4 and presence of carbonate), $(\text{UO}_2)_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_3^-$, and carbonate complexes, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ and $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ cannot be excluded. The formation constants of these complexes are well known (Table 1). Using such a complexation model, the best fit between the experimental data with the theoretical curves generated by the software JChess yields to a very high FETUA affinity for uranyl ($\log K_1 = 13.6 \pm 0.3$) (Fig. 5), which seems inconsistent with the surface plasmon resonance data previously published [10], which lead to a lower constant ($\log K_1 = 11.4 \pm 0.3$).

However, as described by several authors in the case of TF and HSA [4, 5, 29], the complexation of uranyl may imply the formation of ternary complexes with carbonates. Similarly, ternary complexes with peptides [30] and humic acids [31] were reported in the complexation of uranyl. Therefore, we contemplated a dual equilibrium model, taking into account the formation of both $\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})$ and $\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})$ complexes.



$$K_1 = \frac{[\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})]}{[\text{FETUA}][\text{UO}_2^{2+}]} \quad (3)$$



$$K_2 = \frac{[\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})]}{[\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})][\text{CO}_3^{2-}]} \quad (4)$$

Using this assumption and $\log K_1 = 11.4 \pm 0.3$ for the first equilibrium, the titration curve was satisfactorily adjusted for $\log K_2 = 8.1 \pm 0.1$. The distribution diagram of inorganic and protein-bound uranyl species (Fig. 6) corresponding to the analytical conditions ($[\text{UO}_2^{2+}]_{\text{tot}} = 0.15 \mu\text{M}$) indicates that the fraction of $\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})$ is predominant for a carbonate concentration ranging from 110 μM and 24 mM and reaches its maximum for a concentration of 3 mM. Above 24 mM carbonate, this small anion becomes a real competitor for FETUA, leading to the formation of $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$. This assumption is consistent with both the data obtained in CE-ICP/MS and the previously published results concerning the affinity constant of FETUA. It is also in agreement with the absence of ternary complexes proposed for low concentrations of carbonate [10]. The distribution diagram of uranyl species calculated with the above-determined constants suggests that the predominant FETUA-uranyl species circulating

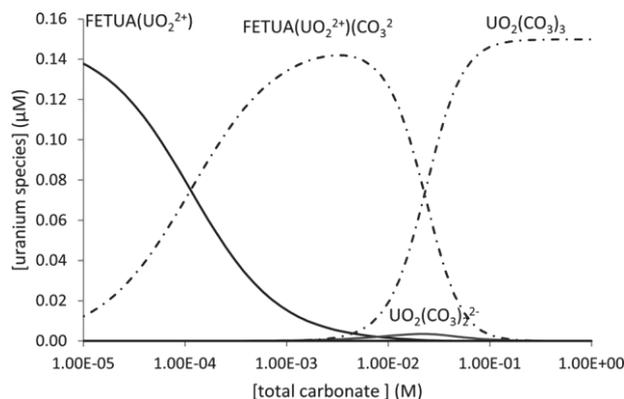


Figure 6. Theoretical speciation of uranyl (150 nM) in the presence of FETUA (10 μM) as a function of carbonate concentration for $\log K_1 = 11.4$ and $\log K_2 = 8.5$.

in blood would be the ternary complex. All together, the results show that the formation of ternary complexes involving FETUA at high concentrations of carbonate needs to be considered, not to overestimate the affinity of FETUA for uranyl. This assumption should however be confirmed, for instance using structural analysis of the ternary complex.

4 Concluding remarks

CE-ICP/MS was proved to be a valuable tool to study the distribution of uranyl among proteins at physiological pH, by taking advantage of the mild separation conditions of CE and the selectivity and sensitivity of ICP/MS. Simple mixtures of proteins were successfully separated and the technique was tested on proteins presenting affinities ranging over several orders of magnitude. The distribution of uranyl among different sets of proteins and the comparison with a serum sample provided an additional proof of the relevancy of FETUA in the uranyl behavior in blood. It also demonstrated that simple and rapid analyses can be performed without any pretreatment, except a dilution step.

This study would however benefit from the use of high-resolution ICP/MS, which allows sulfur detection and provides information about uranyl/protein stoichiometries. Although the separation of noncovalent biological complexes requires conditions of pH and ionic strength often incompatible with a high-resolution separation, CE could be implemented in a multidimensional separation scheme to provide a more complete description of uranyl distribution. Since ICP/MS cannot provide any information about the protein, the combined use of molecular ESI-MS would provide an unambiguous identification of proteins of interest, without the need of standard proteins.

The FETUA-binding mode with uranyl was also studied by competition with carbonates. These results showed the intricate influence of carbonate in the formation of uranyl complexes in blood and the possible occurrence of a ternary

complex $\text{FETUA}(\text{UO}_2^{2+})(\text{CO}_3^{2-})$. Therefore, albeit the impact of carbonates on the determination of complex formation constants has still not been elucidated, it cannot be excluded. Consequently, the formation of similar ternary complexes cannot be excluded for other proteins, and the biodistribution of uranyl in blood can be directly derived from the formation constants of protein–uranyl complexes as long as the carbonate content is taken into account.

This work was supported by the CEA Toxicologie Nucléaire Program (Project BioMUrOs). The Lacprodan® 10 sample was kindly provided by the Arla foods Group (J. Viby, Denmark).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Pellmar, T. C., Fuciarelli, A. F., Ejnik, J. W., Hamilton, M., Hogan, J., Strocko, S., Emond, C., Mottaz, H. M., Landauer, M. R., *Toxicol. Sci.* 1999, 49, 29–39.
- [2] Chevri, S., Likhner, D., *Med. Radiol. (Mosk.)* 1968, 13, 53–57.
- [3] Stevens, W., Bruenger, F. W., Atherton, J. M., Taylor, G. N., *Radiat. Res.* 1980, 83, 109–126.
- [4] Vidaud, C., Gourion-Arsiquaud, S., Rollin-Genetet, F., Torne-Celer, C., Plantevin, S., Pible, O., Berthomieu, C., Quéméneur, E., *Biochemistry* 2007, 46, 2215–2226.
- [5] Montavon, G., Apostolidis, C., Bruchertseifer, F., Repinc, U., Morgenstern, A., *J. Inorg. Biochem.* 2009, 103, 1609–1616.
- [6] Michon, J., Frelon, S., Garnier, C., Coppin, F., *J. Fluoresc.* 2010, 20, 581–590.
- [7] Sun, M.-H., Liu, S.-Q., Du, K.-J., Nie, C.-M., Lin, Y.-W., *Spectrochim. Acta A* 2014, 118, 130–137.
- [8] Li, B., Raff, J., Barkleit, A., Bernhard, G., Foerstendorf, H., *J. Inorg. Biochem.* 2010, 104, 718–725.
- [9] Qi, L., Basset, C., Averseng, O., Quéméneur, E., Hagège, A., Vidaud, C., *Metallomics* 2014, 6, 166–176.
- [10] Basset, C., Averseng, O., Ferron, P.-J., Richaud, N., Hagège, A., Pible, O., Vidaud, C., *Chem. Res. Toxicol.* 2013, 26, 645–653.
- [11] Zhou, L., Bosscher, M., Zhang, C., Özçubukçu, S., Zhang, L., Zhang, W., Li, C. L., Liu, J., Jensen, M. P., Lai, L., He, C., *Nat. Chem.* 2014, 6, 236–241.
- [12] Wegner, S. V., Boyaci, H., Chen, H., Jensen, M. P., He, C., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 2339–2341.
- [13] Krishnaji, S. T., Kaplan, D. L., *Macromol. Biosci.* 2013, 13, 256–264.
- [14] Sutton, M., Burastero, S. R., *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17, 1468–1480.
- [15] Waldron, K. J., Robinson, N. J., *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 6, 625–635.
- [16] Maret, W., *Metallomics* 2010, 2, 117–125.
- [17] Scapolan, S., Ansoborlo, E., Moulin, C., Madic, C., *J. Alloys Compd.* 1998, 271–273, 106–111.

- [18] Becker, J. S., Zoriy, M., Becker, J. S., Pickhardt, C., Damoc, E., Juhacz, G., Palkovits, M., Przybylski, M., *Anal. Chem.* 2005, 77, 5851–5860.
- [19] Frelon, S., Guipaud, O., Mounicou, S., Lobinski, R., Delissen, O., Paquet, F., *Radiochim. Acta* 2009, 97, 367–373.
- [20] Xu, M., Frelon, S., Simon, O., Lobinski, R., Mounicou, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 1063–1072.
- [21] Timerbaev, A. R., *Chem. Rev.* 2013, 113, 778–812.
- [22] Yin, X.-B., Li, Y., Yan, X.-P., *Trends Anal. Chem.* 2008, 27, 554–565.
- [23] Hagège, A. Huynh, T. N. S., Hébrant, M., *Trends Anal. Chem.* 2015, 64, 64–74.
- [24] Groessl, M., Bytzek, A., Hartinger, C. G., *Electrophoresis* 2009, 30, 2720–2727.
- [25] Quintana, M., Klouda, A. D., Gondikas, A., Ochsenkuhn-Petropoulou, M., Michalke, B., *Anal. Chim. Acta* 2006, 573–574, 172–180.
- [26] Varenne, F., Bourdillon, M., Meyer, M., Lin, Y., Brellier, M., Baati, R., Charbonnière, L. J., Wagner, A., Doris, E., Taran, F., Hagège, A., *J. Chromatogr. A* 2012, 1229, 280–287.
- [27] Guillaumont, R., Fanghanel, T., Fuger, J., Grenthe, I., Neck, V., Palmer, D. A., Rand, M. H., *Update on the Chemical Thermodynamics of Uranium, Neptunium and Plutonium*, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam 2003.
- [28] Chang, R., *Chemistry*, 10th edition, McGraw Hill, New York 2010.
- [29] Van Horn, J. D., Huang, H., *Coord. Chem. Rev.* 2006, 250, 765–775.
- [30] Huang, H., Chaudhary, S., Van Horn, J. D., *Inorg. Chem.* 2005, 44, 813–815.
- [31] Steudtner, R., Sachs, S., Schmeide, K., Brendler, V., Bernhard, G., *Radiochim. Acta* 2011, 99, 687–692.

