

THESE

présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

par

Bertrand CHAUMANDE

Apport des analyses protéomique et métallogprotéomique pour l'étude de la géophagie

Soutenue le 07 janvier 2011 devant la commission d'examen :

Pr. Marc BONNEU

Rapporteur

Dr. Richard ORTEGA

Rapporteur

Dr. Florence PLOETZE

Examineur

Dr. Fabien THOMAS

Examineur

Pr. Laurence SABATIER

Directeur de thèse

A mes enfants

*Antoine, Clément
Et Eloïse*

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement et chaleureusement Madame Laurence Sabatier de m'avoir encadré tout au long de ces quatre années de thèse. Je te remercie pour tes conseils, pour le temps que tu m'as accordé à chaque fois que je suis entré dans ton bureau et que j'avais besoin d'aide et en ces derniers temps, pour tes courtes nuits à relire ce manuscrit. Mais surtout je te suis sincèrement reconnaissant de m'avoir fait confiance pour mener à bien ces travaux.

Je remercie respectueusement Madame Florence Ploetze et Messieurs Marc Bonneu, Richard Ortega et Fabien Tomas d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je souhaite remercier Monsieur Alain Van Dorsselaer, directeur du LSMBO (IPHC-DSA) de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser des analyses de spectrométrie de masse dans les meilleures conditions qu'il soit.

Je remercie également l'ensemble des membres du LSMBO. De peur d'en oublier un, je ne citerai personne. Par vos conseils et votre gentillesse, vous m'avez grandement aidé à découvrir le vaste monde de la spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier nos collaborateurs du DEPE. Merci à Jean Hervé Lignot, Nicole Liewig, Fabielle Angel, Jean Patrice Robin, François Reichardt, Caroline Hibold et Caroline Fischer. Je garderai un très bon souvenir de vous tous.

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble de mon laboratoire d'accueil avec qui j'ai partagé de très bons moments. Merci à Aline (nous ne nous serons pas beaucoup croisé), Cécilie, Geneviève (et votre thé de 16h), Loïc et Zouhair (avec qui nous avons refait le monde une ou deux fois) pour leur accueil. Merci à tous ceux qui ont partagé ma pause café de 9h15 : Anne, Agnès (j'ai beaucoup appris lors nos discussions scientifiques et je n'oublierai jamais une Berrichonne de souche), Pascale (merci pour ta bonne humeur et d'avoir souvent engagé la conversation), Sylvie et Yvan (je dois t'avouer que je n'ai pas souvent tout entendu de ce que

tu disais, mais l'important était ailleurs). Merci à Véronique Delval d'avoir accepté d'écouter mes histoires jusqu'au bout et pour toutes ses remarques et ses conseils.

Je tiens à remercier tous les étudiants que j'ai pu croiser au laboratoire. Je me souviendrai de vous tous et de quelques anecdotes sur la plupart d'entre vous.

Enfin, je garderai un souvenir particulier pour deux étudiants qui ont partagé mon bureau. Merci Amandine de m'avoir laissé 90% de la surface utilisable de notre bureau pour que je puisse m'étaler confortablement (je pense que ça change depuis que je suis parti, il y a certainement plus de lumière) merci également d'avoir répondu à mes questions et d'avoir écouté toi aussi jusqu'au bout mes longues histoires.

Merci Joseph. Tu as été quelqu'un d'essentiel de ma vie au laboratoire. Nous n'avons pas toujours été d'accord sur tout mais c'est sûrement pour ça que nous nous sommes si bien appréciés. J'aurai quand même un regret celui de ne pas avoir réussi à te mettre un club dans les mains. J'espère pouvoir un jour te faire visiter mon Berry... Après tout ce que j'ai pu t'en dire, tu dois en mourir d'envie.

Enfin je souhaite remercier toute ma famille de m'avoir soutenu de près ou de loin dans cette aventure. Je remercie tout particulièrement Tata Marie, Tata Lilou et Tonton Jo d'avoir assuré un certain nombre de garde d'enfant.

Je terminerai ces remerciements par une pensée toute particulière pour ma femme et mes enfants. Sans vous je n'en serai pas là, je vous aime.

Plan général

Liste des abréviations.....	7
Chapitre I : Introduction.....	11
I. La géophagie.....	13
II Les argiles.....	20
III Le système digestif.....	26
IV But de notre étude.....	36
Chapitre II : Outils et stratégies pour l'analyse protéomique et métallogprotéomique....	39
I Outils pour l'analyse protéomique et métallogprotéomique.....	42
II. Stratégies pour l'analyse protéomique et métallogprotéomique.....	69
Chapitre III : Résultats.....	83
<i>Première partie : effets de la complémentation alimentaire en kaolinite chez le rat</i>	
I Optimisation des conditions expérimentales pour l'analyse protéomique.....	88
II Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire.....	95
III Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire au cours et après une phase de jeûne prolongé.....	105
IV Effets de l'ingestion de kaolinite au cours d'une restriction alimentaire.....	116
V Effets de l'ingestion de kaolinite en quantité imposée (5% et 2%).....	117
VI Discussion.....	119
<i>Deuxième partie : développement d'une stratégie pour la recherche et l'identification de protéines liant l'aluminium dans l'intestin de rat suite à une complémentation alimentaire en kaolinite</i>	
I Sélection d'une solution d'éluion passive.....	133
II Comparaison des différents gels natifs pour l'analyse métallogprotéomique.....	143
III Evaluation des gels HrCN-PAGE pour l'analyse métallogprotéomique.....	148
IV Comparaison des gels HrCN-PAGE et de la chromatographie liquide.....	158
V Séparation des protéines intestinales de rat par électrophorèse sur gel en conditions natives et détection de l'aluminium par ICP-MS.....	164
VI Conclusion.....	171
Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives.....	173
Chapitre V : Matériels et méthodes.....	181
Références bibliographiques.....	209
Liste des figures et tableaux.....	229
Productions scientifiques.....	235
Annexe.....	239

Plan détaillé

Liste des abréviations.....	7
Chapitre I : Introduction.....	11
I. La géophagie.....	13
I.1 La géophagie : un comportement naturel.....	13
I.2 La géophagie chez l'Homme	16
I.3 La géophagie : effets liés à l'ingestion d'argile	17
I.3.1 Supplémentation minérale	17
I.3.2 Intérêt thérapeutique	18
I.3.3 Amélioration de l'efficacité alimentaire	19
II Les argiles.....	20
II.1 Définition et classification.....	20
II.2 Principaux minéraux argileux en géophagie	23
III Le système digestif.....	26
III.1 Structure de l'intestin grêle	27
III.2 Absorption des nutriments	31
III.2.1 Absorption de l'eau et des ions	31
III.2.2 Absorption des glucides	32
III.2.3 Absorption des protéines.....	33
III.2.4 Absorption des lipides.....	34
III.3 Rôle des microorganismes dans la digestion.....	35
IV But de notre étude	36
Chapitre II : Outils et stratégies pour l'analyse protéomique et métalprotéomique....	39
I Outils pour l'analyse protéomique et métalprotéomique.....	42
I.1 Outils pour la séparation des protéines et des peptides.....	42
I.1.1 Séparation par électrophorèse	42
I.1.2 Séparation par chromatographie liquide	49
I.2 Identification des protéines par spectrométrie de masse.....	50
I.2.1 Sources d'ionisation.....	51
I.2.2 Analyseurs.....	55
I.2.3 Fragmentation des ions et spectrométrie de masse en tandem	59
I.3 Détection d'éléments métalliques	61
I.3.1 Spectrométrie de masse ICP-MS	62
I.3.2 Spectrométrie de fluorescence X	67
I.3.3 Spectrométrie d'absorption atomique et d'émission atomique.....	68
II. Stratégies pour l'analyse protéomique et métalprotéomique	69
II.1 Stratégies analytiques pour la séparation des protéines et des peptides en analyse protéomique.....	70
II.2 Stratégies pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse.....	71
II.2.1 Méthode d'empreinte peptidique massique	71
II.2.2 Approches par LC-MS/MS.....	73
II.3 Stratégies pour l'analyse des protéines liant des éléments métalliques.....	77

II.3.1 Analyse des protéines liant des métaux de façon covalente.....	78
II.3.2 Analyse des protéines liant des métaux de façon non covalente.....	79
II.3.3 Autres stratégies	82

Chapitre III : Résultats.....83

Première partie : effets de la complémentation alimentaire en kaolinite chez le rat

I Optimisation des conditions expérimentales pour l'analyse protéomique	88
I.1. Optimisation de l'extraction et de la solubilisation des protéines	88
I.2. Reproductibilité des gels bidimensionnels.....	92
I.3. Sélection des spots d'intérêt.....	95
II Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire	95
II.1 Données physiologiques	95
II.2 Analyse protéomique différentielle	100
III Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire au cours et après une phase de jeûne prolongé.....	105
3.1 Données physiologiques.....	106
3.2 Analyse protéomique différentielle.....	108
IV Effets de l'ingestion de kaolinite au cours d'une restriction alimentaire.....	116
V Effets de l'ingestion de kaolinite en quantité imposée (5% et 2%).....	117
VI Discussion	119
VI.1 Consommation de kaolinite et prise de poids.	120
VI.2 Effet de la kaolinite sur la morphologie intestinale	121
VI.3 Ingestion de kaolinite et assimilation des lipides.....	124
VI.4 Altération de la kaolinite et libération d'aluminium.....	126

Deuxième partie : développement d'une stratégie pour la recherche et l'identification de protéines liant l'aluminium dans l'intestin de rat suite à une complémentation alimentaire en kaolinite

I Sélection d'une solution d'éluion passive	133
I.1 Eluion passive des protéines des gels natifs	133
I.2 Compatibilité avec l'analyse par ICP-MS	135
I.2.1 Effet sur l'intensité du signal en ICP-MS	137
I.2.2 Effet sur l'étalonnage et les limites de détection et quantification	140
II Comparaison des différents gels natifs pour l'analyse métalproteomique.....	143
II.1 Séparation de protéines par BN-PAGE	143
II.2 Séparation de protéines par CN-PAGE et HrCN-PAGE.....	145
III Evaluation des gels HrCN-PAGE pour l'analyse métalproteomique	148
III.1 Conservation des interactions protéine/métal sur HrCN-PAGE	148
III.2 Séparation de mélanges protéiques simples sur HrCN-PAGE.....	154
IV Comparaison des gels HrCN-PAGE et de la chromatographie liquide	158
IV.1 Sélection d'un tampon pour la séparation de protéines par SEC.....	159
IV.2 Comparaison des gels HrCN-PAGE et de la SEC pour la détection de la SOD.....	161
V Séparation des protéines intestinales de rat par électrophorèse sur gel en conditions natives et détection de l'aluminium par ICP-MS	164
V.1 Séparation monodimensionnelle sur gels HrCN-PAGE	164

V.2 Séparation par électrophorèse bidimensionnelle en conditions natives	168
VI Conclusion	171

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives.....173

Chapitre V : Matériels et méthodes.....181

I Expérimentation animale	183
I.1 Animaux.....	183
I.1.1 Conditions d'hébergement	183
I.1.2 Suivi des animaux	184
I.1.3 Méthodes d'euthanasie.....	184
I.2 Argile	184
I.3 Régimes alimentaires des différents groupes expérimentaux	185
I.3.1 Complémentation <i>ad libitum</i> sur 28 jours.....	185
I.3.2 Complémentation <i>ad libitum</i> durant la réalimentation consécutive à un jeûne prolongé.....	185
I.3.3 Complémentation <i>ad libitum</i> au cours d'une restriction alimentaire	186
I.3.4 Complémentation avec des quantités d'argile imposées.....	186
II Origine des réactifs	187
III. Analyse protéomique différentielle	188
III.1 Préparation des échantillons.....	188
III.1.1 Prélèvement de la muqueuse intestinale.....	188
III.1.2. Extraction et solubilisation des protéines intestinales.....	188
III.1.3. Dosage des protéines	189
III.2 Electrophorèse bidimensionnelle et analyse différentielle.....	189
III.2.1 Focalisation isoélectrique	189
III.2.2 Réduction alkylation	190
III.2.3 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	191
III.2.4 Analyse différentielle	191
III.3 Identification des protéines par spectrométrie de masse	192
III.3.1 Digestion in-gel des protéines	192
III.3.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF	193
III.3.3 Analyse nanoLC-MS/MS	194
III.3.4 Identification des protéines dans les banques de données.....	195
III.4 Western Blot.....	196
III.4.1 Electrophorèse sur gels SDS-PAGE et transfert sur membrane	197
III.4.2 Immunodétection.....	198
IV. Analyse métallogprotéomique	199
IV.1 Analyse de protéines modèles.....	199
IV.1.1 Electrophorèse en conditions non dénaturantes	199
IV.1.2 Rendement d'éluion passive	202
IV.2 Analyse de la muqueuse intestinale	203
IV.2.1 Focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes	203
IV.2.2 Electrophorèse en conditions non dénaturantes	204
IV.3 Détection métallique par ICP-MS.....	204
IV.4 Identification des métallogprotéines	205

IV.5 Etude de la conservation des interactions métal/protéine par analyse ESI-TOF-MS	206
IV.6 Méthodes chromatographiques	207
Références bibliographiques.....	209
Liste des figures et tableaux.....	229
Productions scientifiques.....	235
Annexe.....	239

Liste des abréviations

AC : Anhydrase carbonique	IEF : Focalisation isoélectrique
ACN : Acétonitrile	IMAC : <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
AcOH : Acide acétique	IPHC : Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien
ADN : Acide désoxyribonucléique	IT : Trappe Ionique
AE : Chromatographie d'échange d'anions	LA : Ablation laser
ADH : Alcool déshydrogénase	LC : Chromatographie liquide
AES : Spectrométrie d'émission atomique	LOD : Limite de détection
ANOVA : Analyse de la variance	LOQ : Limite de quantification
ANR : Agence Nationale de la Recherche	LSMBO : Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique
Apo A-I : Apolipoprotéine A-I	MALDI : <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
Apo A-IV : Apolipoprotéine A-IV	MET : Microscopie électronique à transmission
APS : Persulfate d'ammonium	MM : Marqueurs de masses moléculaires
ARN : Acide ribonucléique	MS : Spectrométrie de masse
BLAST : <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem
BN-PAGE : <i>Blue native PAGE</i>	MudPIT : <i>MultiDimensional Protein Identification Technology</i>
BSA : Albumine de sérum bovin	NH₄HCO₃ : Bicarbonate d'ammonium
CBB : Bleu de Coomassie	NH₄OAc : Acétate d'ammonium
CEC : Capacité d'échange cationique	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
CHAPS : 3-[3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-propanesulfonate	OMSSA : <i>Open Mass Spectrometry Search Algorithm</i>
CID : Dissociation induite par collision	PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
CE : Electrophorèse capillaire	PBS : Tampon phosphate salin
CMC : Concentration micellaire critique	PFF : <i>Peptide Fragment Fingerprinting</i>
CN-PAGE : <i>Clear Native PAGE</i>	PDI : Protéine disulfide isomérase
Da : Dalton	pI : pH isoélectrique
DiGE : <i>Differential Gel Electrophoresis</i>	PIXE : <i>Particule induce X-ray emission</i>
DTT : Dithiothréitol	PMF : <i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
DEPE : Département d'Ecologie, Physiologie et Ethologie	Q : Quadripôle
DSA : Département des Sciences Analytiques	SAA : Spectrométrie d'absorption atomique
ECD : Dissociation par capture d'électron	SDS : Dodécylsulfate de Sodium
EDTA : Acide éthylènediaminetetraacétique	SEC : Chromatographie d'exclusion stérique
ESI : Electrospray	SOD : Superoxyde dismutase
ETD : Dissociation par transfert d'électron	SR-XRF : <i>Synchrotron radiation X-ray fluorescence</i>
FT-ICR : <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>	TFA : Acide trifluoroacétique
HCCA : Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique	TEMED : N,N,N,N-tétraméthylethylènediamine
HPLC : Chromatographie liquide haute performance	TOF : Temps de vol
HrCN-PAGE : <i>High resolution native PAGE</i>	
HSP : <i>Heat Shock Protein</i>	
ICP-MS : <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>	

Les acronymes ont été laissés dans la version anglaise.

La géophagie est l'ingestion volontaire de terre. Elle représente la forme la plus répandue de pica (ingestion de substances non alimentaires). De nombreuses études scientifiques ont montré le caractère naturel et fréquent de la géophagie aussi bien chez les primates (dont l'Homme) que chez de multiples autres animaux. L'ingestion d'argile (composant principal du sol) est couramment pratiquée par l'Homme dans le cas de troubles intestinaux. De même, l'ajout de quelques pourcents d'argile dans l'alimentation en production animale est également très utilisé pour augmenter la croissance.

Alors que chez l'Homme, la géophagie (ou son absence) peut être liée à une notion culturelle, l'observation de celle-ci chez un grand nombre d'animaux sauvages indiquerait que ce comportement soit instinctif. De nombreuses raisons expliquant ce phénomène ont été avancées cependant les mécanismes mis en jeu ne sont pas réellement connus. De plus, peu d'études se sont intéressées à la relation entre l'argile ingérée et la muqueuse intestinale, pourtant la principale zone d'échanges dans l'organisme.

Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier les effets de l'ingestion d'argile en complément alimentaire au niveau de la muqueuse intestinale d'un animal modèle : le rat Wistar. Cette étude a été réalisée, en collaboration avec des biologistes et des géologues de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), grâce à une combinaison originale d'approches expérimentales variées de physiologie animale, de microscopie et d'analyse protéomique. Mon travail s'est articulé autour de deux axes complémentaires :

- (1) l'analyse protéomique différentielle des protéines extraites de l'intestin de rat au cours des différents régimes alimentaires étudiés avec ou sans kaolinite,
- (2) le développement d'une stratégie permettant de révéler et d'identifier des protéines liant des métaux dans des mélanges complexes et son application aux échantillons protéiques intestinaux pour la recherche de protéines liant l'aluminium.

La première partie de ce manuscrit comporte une introduction sur la géophagie complétée par une présentation de la diversité des argiles ainsi que quelques rappels sur le système digestif. Pour mieux comprendre les effets de l'ingestion d'argiles, nous avons utilisé différentes méthodes analytiques pour l'étude du contenu protéique des cellules intestinales. Ces méthodes sont présentées dans le deuxième chapitre.

Le troisième chapitre rassemble les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse et comporte deux parties distinctes : l'une traitant de l'analyse protéomique différentielle réalisée sur les protéines extraites de l'intestin de rats soumis à différents régimes alimentaires et l'autre traitant du développement de la stratégie d'analyse des métalloprotéines.

Les conclusions et perspectives de mon travail sont présentées dans le quatrième chapitre.

Enfin, les protocoles utilisés au cours de cette thèse sont détaillés en fin de manuscrit dans le cinquième chapitre.

Chapitre I

Introduction

I. La géophagie

Le terme géophagie est la combinaison des mots grecs : « gê » (terre) et phagein (manger). La géophagie est définie comme l'ingestion spontanée, volontaire et régulière de terre.

De nombreuses espèces animales, y compris l'Homme, consomment de la terre naturellement et ce, quelle que soit la région du globe. Le caractère récurrent de la géophagie semble indiquer que l'ingestion de terre serait bénéfique pour l'organisme. La terre étant composée en partie d'argiles, les propriétés de ces matériaux sont souvent invoquées pour expliquer les raisons de la géophagie.

1.1 La géophagie : un comportement naturel

Spontanée et volontaire, la géophagie revêt un caractère instinctif chez de nombreuses espèces animales, herbivores strictes ou omnivores. Ce phénomène a notamment été observé chez les oiseaux (Mee et al., 2005 ; Diamond et al., 1999 ; Gilardi et al., 1999) et chez de nombreux mammifères (Abrahams et Parsons, 1996). Ce comportement peut être régulier ou ponctuel. Dans ce dernier cas, la géophagie peut être liée à une carence nutritive ou un état de malaise (Wilson, 2003). L'ingestion de terre peut être également involontaire. On parle alors de géophagie associée. C'est notamment le cas de l'ingestion de terre ou d'argile associée aux végétaux ou aux insectes consommés par certaines espèces animales (Nishihara et Kuroda, 1991). Un autre exemple est le cas des tortues du désert qui creusent pour enterrer leurs œufs et ingèrent dans le même temps de la terre (Marlow et Tollestrup, 1982). Ces comportements de géophagie involontaire ne rentrent cependant pas dans la définition stricte de la géophagie (Krishnamani et Mahaney, 2000).

Chez les oiseaux, l'ingestion d'un certain type de terre a été observée chez des perroquets en Bolivie (Mee et al., 2005) et au Pérou (Gilardi et al., 1999). A titre d'illustration, la figure 1.1 montre des Aras rouges et bleus consommant des argiles sur un affleurement de falaise en Amazonie. D'autres espèces d'oiseaux appartenant par exemple à la famille des Cracidaes ou à la famille des Columbides sont également connues pour être géophages (Brightsmith et Aramburu Munos-Najar, 2004).



Figure 1.1 : Exemple d'oiseaux géophages. Aras rouges et bleus (*Ara macao* et *Ara rauna*) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo C.D. Müller).

Une étude de Diamond et al. (1999) s'est intéressée à la géophagie chez des oiseaux d'un site particulier en Nouvelle Guinée. Dans leur étude, les auteurs ont observé des comportements de géophagie chez 11 espèces d'oiseaux seulement sur les 144 présentes à proximité du site. Ces 11 espèces de perroquets, pigeons ou calaos, avaient pour caractéristiques d'être herbivores strictes et d'appartenir aux espèces les plus grosses dans leurs familles respectives. Néanmoins, la corrélation entre la taille d'une espèce d'herbivore stricte et la pratique de la géophagie étant imparfaite, ces auteurs ont suggéré qu'il existait d'autres facteurs incitant des individus à ingérer de la terre. Après analyse d'échantillons de terre ingérée par ces animaux, les auteurs ont montré que la raison principale de la géophagie sur ce site pouvait être liée à l'élimination de poisons ou de composés amers présents dans les fruits consommés par ces oiseaux géophages.

La géophagie est également observée chez de nombreux mammifères (éléphant, buffle, cerf, bœuf, tapir, pacas) (Krishnamani et Mahaney, 2000) dans différentes zones du globe. Les terres ingérées proviennent généralement d'un site très spécifique (Wilson, 2003). Par exemple, dans les forêts humides tropicales d'Afrique centrale, des éléphants consomment de la terre dans une zone précise riche en argiles (Klaus et al., 1998). Une autre étude a également montré une spécificité de site pour des mammifères pratiquant la géophagie d'une réserve en Tanzanie (Abrahams, 1999). Trois sites ont été caractérisés : l'un possède une composition riche en argiles (principalement de la kaolinite) et les deux autres sites

contiennent une concentration plus faible en argiles (principalement de la smectite). Cette étude met en évidence la complexité des mécanismes mis en jeu pour la sélection des sols ingérés par ces animaux en raison de la nature différente de ces sols.



Figure 1.2 : Exemple de primates géophages. Singes hurleurs (*Alouatta palliata*) consommant de l'argile sur un affleurement de falaise en Amazonie. (Photo C.D. Müller)

Enfin, de nombreuses publications se sont intéressées à la géophagie chez les primates. Un exemple de primates géophages consommant de l'argile est présenté sur la figure 1.2.

De nombreuses espèces de primates peuvent consommer spécifiquement une grande diversité de sols. Par exemple, des chimpanzés du parc national des montagnes de Mahale en Tanzanie consomment uniquement de la terre de termitières (Mahaney et al., 1999). D'autres espèces ne consomment que la terre au niveau des racines des arbres, de monticules de taupes fraîchement retournés ou le sol des forêts (Krishnamani et Mahaney, 2000). Néanmoins, comme observé chez les oiseaux (Diamond et al., 1999), sur 185 espèces de primates répertoriées, seules 39 espèces semblent pratiquer la géophagie dans la nature ou en captivité (Krishnamani et Mahaney, 2000).

Ainsi, la géophagie présente un caractère naturel et se rencontre chez de nombreuses espèces animales. Néanmoins, ce comportement n'est pas universel et les caractéristiques des sols ingérés sont très différentes les unes des autres.

1.2 La géophagie chez l'Homme

La géophagie humaine a été largement décrite au cours du XIX^{ème} siècle avec le développement intensif de l'exploration de nombreux pays tropicaux (Mahaney et al., 1999). La géophagie est rapportée comme étant particulièrement importante chez les enfants et les femmes enceintes (Simon, 1998).

La géophagie chez l'Homme semble être pratiquée depuis le début de l'Humanité. En effet, des écrits datant d'Aristote (384-322 avant Jésus-Christ) mentionnent ce phénomène, mais on considère que l'ingestion de terre se pratiquait déjà il y a 40 000 ans (Vermeer et Frate, 1979). Bien que celle-ci soit observée sur l'ensemble du globe, la pratique de la géophagie chez l'Homme aurait pris naissance dans les régions tropicales puis se serait répandue sur les autres continents (Abrahams et Parsons, 1996). De nos jours, la terre et/ou l'argile est encore consommée dans de nombreux pays. Sur le continent américain, des femmes afro-américaines du sud des Etats-Unis consomment régulièrement de l'argile (Hunter et Kleine, 1984), de même que certaines populations rurales du Mexique (Simon, 1998). Sur le continent africain, de nombreuses tribus pratiquent encore la géophagie, notamment en Guinée (Glickman et al., 1999), au Nigéria (Vermeer et Ferell, 1985) ou au Kenya (Shivoga et Moturi, 2009). Ce comportement est également répertorié au Moyen-Orient, en Asie et en Indonésie (Hunter, 1973 ; Aufreiter et al., 1997).

Différentes motivations sont rapportées comme étant à l'origine de la géophagie chez l'Homme. Parmi celles-ci, le soulagement de la sensation de faim en période de famine, comme ce fut le cas il y a deux ans, avec la famine en Haïti qui a poussé les populations à consommer des galettes d'argile. Il existe également des motivations culturelles ou religieuses à l'ingestion de terre ou d'argile par l'Homme. Enfin, l'ingestion d'argile est largement utilisée en médecine, notamment pour son rôle de pansement gastrique ou en tant que complément alimentaire (Vermeer et Ferell, 1985).

Malgré cela, un débat existe au sein de la communauté scientifique sur la pratique de la géophagie par l'Homme. En effet, alors que dans la quasi-totalité du monde, la géophagie est considérée comme naturelle, aux Etats-Unis, ce comportement est jugé comme pathologique (Henry et Kwong, 2003). A titre d'exemple, en juin 2000, un comité de l'agence américaine des substances toxiques et du registre de maladies (U.S. ATSDR) a fixé arbitrairement à 500 mg le seuil pathologique de consommation de terre pour l'Homme (Callahan, 2003).

Enfin, depuis une cinquantaine d'années, cette complémentation alimentaire est également mise à profit par l'homme pour la production animale. En effet, il est courant de rajouter quelques pourcents d'argile dans l'alimentation des animaux pour augmenter les rendements de production (Quinsenberry, 1968).

1.3 La géophagie : effets liés à l'ingestion d'argile

Alors que la géophagie est définie comme l'ingestion de terre, il semble que les effets inhérents à cette pratique soient essentiellement liés à la présence d'argile (Wilson, 2003). Plusieurs rôles ont été attribués à l'argile afin d'expliquer la conservation de la géophagie par les hommes et les animaux au cours de l'évolution.

1.3.1 Supplémentation minérale

Les sols ingérés par les animaux ou par les hommes ont une composition en minéraux souvent très riche (Mahaney et Krishnamani, 2003 ; Wilson, 2003) et une des raisons souvent avancée pour expliquer la pratique de la géophagie chez certaines espèces est que l'ingestion de terre permettrait un apport essentiel en minéraux pour l'organisme.

Cependant, la présence, même en grande quantité, d'un élément minéral dans un sol ne garantit pas une bonne assimilation par l'organisme (Johns et Duquette, 1991). En effet, de nombreuses études mettent en évidence une contradiction sur l'effet bénéfique de l'ingestion d'argile et la quantité de minéraux réellement assimilables par un organisme (Gomez et Silva, 2007). Certaines argiles peuvent induire des anémies provoquées par la chélation du fer présent au niveau intestinal, diminuant ainsi la quantité de fer assimilable par l'organisme. Ce mécanisme peut également s'étendre à d'autres éléments essentiels comme le zinc ou le potassium (Hooda et al., 2002 ; Halsted, 1968). A l'inverse, des études ont relevé l'intérêt de l'ingestion d'argiles sur l'apport en sodium, sélénium, cobalt, molybdène, calcium, magnésium, manganèse et zinc pour l'organisme (Mills et Milewski, 2007 ; Abrahams, 1999). C'est en réalité la nature physicochimique de l'argile ingérée et sa capacité d'échange cationique (CEC) qui est déterminante : si la CEC d'une argile est élevée, cette argile aura tendance à chélater facilement les cations et diminuera ainsi la quantité d'éléments assimilables par l'organisme.

I.3.2 Intérêt thérapeutique

La géophagie « thérapeutique » est née de l'observation au cours de l'évolution des effets bénéfiques liés à l'ingestion de terre. Que ce soit chez l'homme ou chez les autres espèces animales, l'ingestion d'argile peut être réalisée dans ce but de façon préventive ou curative.

Par exemple, de nombreuses espèces de primates consomment de la terre de façon préventive pour se protéger des parasites présents sur les végétaux qu'ils ingèrent. C'est notamment le cas de macaques rhésus qui consomment une terre riche en kaolinite pour se protéger des effets d'un parasite responsable de diarrhées (Knezevich, 1998). En effet, alors que des taux importants de parasites sont présents dans l'organisme des primates, aucun symptôme n'est observable. Chez l'homme, depuis longtemps, les argiles (kaolinite, smectite) sont également utilisées dans le cas de troubles intestinaux et notamment pour soigner les diarrhées (Vermeer et Ferrell, 1985). Les capacités d'absorption liées à la structure en feuillet de ces argiles (voir II.1) peuvent être mises en avant pour expliquer le rôle de ces composés dans ce processus. En effet, la diarrhée est définie comme une élévation anormale de la concentration en eau dans l'intestin et peut être un symptôme d'une intoxication ou d'une infection alimentaire (bactérienne, virale ou parasitaire). Ainsi, les capacités d'absorption des argiles peuvent agir à deux niveaux : (1) au niveau du symptôme en absorbant l'excédent d'eau présent dans l'intestin et (2) au niveau de la cause en absorbant les toxines ou les agents responsables du trouble.

D'autres exemples ont été décrits dans la littérature. La consommation de terre composée de kaolinite permet à des éléphants d'Asie de se protéger d'éléments toxiques présents dans leur nourriture (Chandrajith et al., 2008). Chez certaines populations d'Amérique du sud, la consommation d'argile permettrait de contrer les effets des alcaloïdes présents dans les pommes de terre et ainsi les rendre comestibles (Dominy et al., 2004). De même, en alimentation animale, l'ajout de bentonite dans la ration alimentaire permet d'éviter l'absorption de mycotoxines et de poisons dans l'intestin et facilite leur excrétion de l'organisme (McKenzie, 1991). L'ingestion d'argile permettrait donc de lier ou de diluer des toxines présentes dans l'alimentation et de réduire les effets néfastes sur l'organisme.

La consommation d'argile est également observée chez les rats dans le cas de nausées. Les rats sont des animaux ne pouvant pas vomir. Ainsi, il a été observé une augmentation de l'ingestion d'argile chez des rats soumis à un stress induisant un état de nausées (Mitchell et al., 1977). L'ingestion d'argile chez les rats dans ce cas serait l'analogue du vomissement. En

laboratoire, ce comportement est également mis à profit pour évaluer l'état de malaise des rats (Takeda et al., 1993).

I.3.3 Amélioration de l'efficacité alimentaire

Des effets bénéfiques liés à l'ingestion d'argile, sur l'utilisation énergétique ou sur le temps de passage des aliments dans l'intestin, sont connus depuis une cinquantaine d'années (Quinsenberry, 1968). A cette époque, les argiles étaient plus utilisées pour la préparation des granulés alimentaires des volailles que pour leur qualité en nutrition. Depuis, la complémentation en argile de l'alimentation en production animale s'est généralisée et revêt une importance économique. De nombreuses études ont démontré l'intérêt de ce type de pratique. En effet, il a été montré que l'ajout de 2 à 5% d'argile dans l'alimentation de poules pondeuses augmente leur gain de poids et la taille des oeufs (Quinsenberry, 1968). Plus récemment, il a été montré que l'ajout de 1% de talc dans la ration alimentaire de poulet augmentait significativement leur gain de poids et leur indice de consommation (Mallet et al., 2005). De même, l'ajout de sépiolite à hauteur de 2% de la ration alimentaire de porcs résulte en un gain de masse musculaire plus important (Castaing et Noblet, 1997). Dans l'alimentation des ruminants, l'ajout de bentonite de quelques pourcents aurait des effets bénéfiques sur l'assimilation de l'azote (Britton et al., 1978). Enfin, il a également été montré qu'avec l'ajout de 2% de bentonite dans l'alimentation de vaches laitières, le lait de celles-ci était plus riche en calcium, magnésium et vitamine A (Dembinski et al., 1985).

En laboratoire, des effets liés à l'ingestion d'argile ont également été observés. Une étude de Sakata et al. (1986) a montré que la complémentation en argile à hauteur de 10% de la ration alimentaire durant 15 jours augmentait significativement la prise de masse de rats.

A côté des argiles, les zéolites sont également très utilisées en alimentation animale. Ces matériaux sont notamment connus pour leur capacité à améliorer la vitesse de croissance des animaux (Khambualai et al., 2009 ; Papaioannou et al., 2004), à réduire l'émission d'ammonium chez les ruminants (Lefcourt et Meisinger, 2001) ou à protéger l'organisme de certaines mycotoxines (Rizzi et al., 2003).

Une étude a également montré que l'ajout de 2% d'une zéolite micronisée TMAZ® permettait d'éviter le recours aux antibiotiques facteurs de croissance, tout en conservant une bonne vitesse de croissance des animaux et en améliorant significativement leur indice de consommation (Quiniou et al., 2005).

II Les argiles

Les argiles naturelles sont abondantes dans les sols et dans les sédiments détritiques fins. Elles sont omniprésentes à la surface du globe et se répartissent en différents types selon la localisation et le climat. Les minéraux argileux se forment à partir de minéraux présents dans la croûte terrestre et qui subissent des processus d'altération au contact de l'hydrosphère ou de l'atmosphère. Ce sont des processus de dissolution et de recristallisation qui sont à l'origine de la formation des argiles (Velde, 1995).

Les propriétés des argiles et leur disponibilité sans limite en font des matériaux particulièrement intéressants pour de nombreuses applications. En effet, compte tenu de leur plasticité après hydratation et leur capacité à durcir après séchage ou cuisson, les argiles sont utilisées depuis des siècles par l'Homme pour la poterie ou comme matériel de construction. Aujourd'hui, les argiles sont étudiées et utilisées dans de nombreux secteurs : industrie des céramiques et des colorants, industrie pétrolière, en médecine, en biologie, en agriculture...

II.1 Définition et classification

Il n'existe pas de définition stricte du terme « argile ». En effet, la définition dépend de la discipline concernée et a constamment évolué au cours de ces 60 dernières années (Bergaya et al., 2006). Nous nous limiterons ici à celle établie par l'AIPEA (Association Internationale Pour l'Etude des Argiles) qui proposent de définir comme argile des minéraux (1) naturels, (2) de petite taille ($<2-4 \mu\text{m}$), (3) possédant une bonne plasticité à des teneurs en eau appropriées, (4) durcissant après séchage ou cuisson et (5) composés majoritairement de phyllosilicates (minéraux lamellaires).

Les minéraux argileux se caractérisent par trois propriétés principales : leur forme particulière (en flocons, en lattes ou en aiguilles) et leur surface spécifique élevée, leur importante capacité d'absorption et de gonflement et leur importante capacité d'échanges d'ions.

Au niveau de leur structure, on distingue 3 niveaux d'organisation :

- les couches tétraédriques (T) et octaédriques (O),
- les feuillets, formés à partir de différentes combinaisons de couches T et O,
- le minéral, qui résulte de l'empilement d'un grand nombre de feuillets.

Les principaux critères de classification des minéraux argileux sont liés principalement aux deux premiers niveaux d'organisation et sont :

- la combinaison des couches dans les feuillets,
- la nature du cation dans les octaèdres,
- la charge globale des feuillets,
- le type de molécules ou d'ions dans l'espace interfoliaire.

→ Premier niveau d'organisation

La première unité de base des phyllosilicates, la couche tétraédrique, s'organise à partir de tétraèdres (SiO_4), où un atome de silicium sera entouré par quatre atomes d'oxygène, qui s'associent en partageant trois de leurs atomes d'oxygène (noté O_b pour oxygène basal). Ces atomes d'oxygène sont tous placés dans le même plan basal tandis que les atomes d'oxygène du plan apical (noté O_a pour oxygène apical) ne sont pas partagés (figure 1.3)

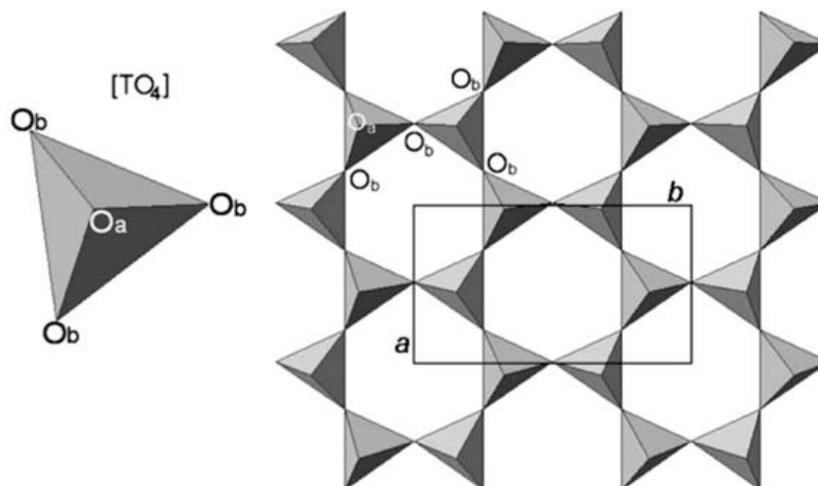


Figure 1.3 : Organisation des unités tétraédriques dans les couches tétraédriques des phyllosilicates (Bergaya et al., 2006). A gauche : unité de base (SiO_4). A droite : couche tétraédrique.

La deuxième unité de base des phyllosilicates est la couche octaédrique (noté O). Dans ce cas, l'unité de base sera un octaèdre composé d'un cation (Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} ou Mg^{2+} généralement) entouré par 6 hydroxyles (OH^-). En fonction de l'orientation des OH^- , il existera 2 formes pour les unités de base : la forme cis et la forme trans (figure 1.4). Lors de la formation de la couche octaédrique, les connections des unités de base se réalisent par un partage de liaisons. Dans les feuillets, pour une maille structurale, on considère qu'une couche octaédrique est constituée de 4 octaèdres cis et de 2 octaèdres trans, soit 6 octaèdres. Une couche octaédrique peut être di- ou trioctaédrique : si les 6 sites sont occupés par des cations bivalents (Mg^{2+} ou

Fe^{2+}) on parle de couche trioctaédrique tandis que si seuls 4 sites sont occupés par des métaux trivalents (Al^{3+} ou Fe^{3+}), on parle de couche dioctaédrique.

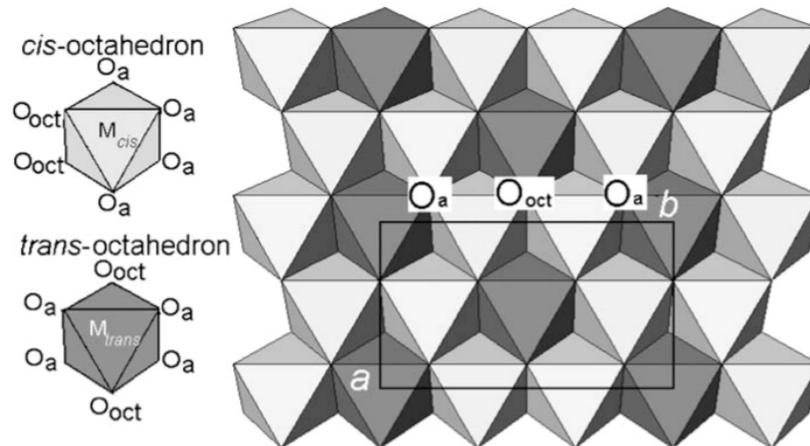


Figure 1.4 : Organisation des unités octaédriques dans les couches octaédriques des phyllosilicates (Bergaya et al., 2006). A droite : unité de base. A gauche : couche octaédrique. Avec : M : Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} ; O_a oxygène qui sera partagé avec une couche tétraédrique et O_{oct} oxygène partagé entre deux unités octaédriques adjacentes.

→ Deuxième niveau d'organisation

Les couches tétraédriques et octaédriques s'agencent entre elles pour former différents types de feuillets (figure 1.5). On distingue trois principaux types d'empilements :

- les minéraux de type TO (ou 1:1) dont les feuillets sont composés d'une couche tétraédrique et d'une couche octaédrique,
- les minéraux de type TOT (ou 2:1) dont les feuillets sont composés d'une couche octaédrique entourée par deux couches tétraédriques,
- les minéraux TOTO (ou 2:1:1) constitués de feuillets TOT avec une couche octaédrique supplémentaire dans l'espace interfoliaire.

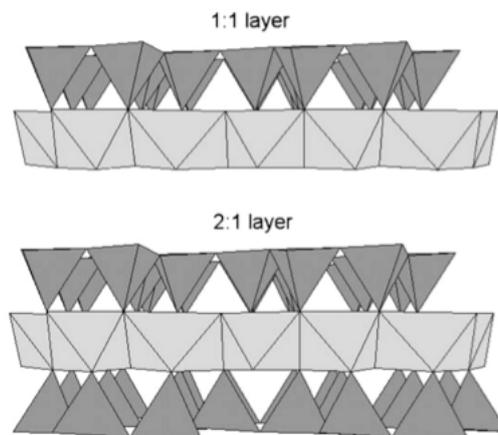


Figure 1.5 : Organisation des feuillets dans les minéraux argileux. (Bergaya et al., 2006). Exemple de feuillets de type 1:1 et 2:1.

La charge globale des feuillets résulte de la substitution de cations par d'autres cations au moment de la formation ou au cours de l'évolution géologique des argiles. Dans la couche tétraédrique, un atome de Si^{4+} peut être substitué par un atome d' Al^{3+} . De même dans la couche octaédrique, un atome d' Al^{3+} peut être remplacé par un atome de Mg^{2+} , qui lui-même peut-être remplacé par un autre atome. Ces différentes substitutions vont créer un déficit de charge au niveau du feuillet. Ce déficit de charge pourra être compensé par la fixation de cations dans l'espace interfoliaire. Ces cations, dits compensateurs, seront très facilement échangeables avec d'autres cations de l'environnement. C'est la capacité d'échange cationique (CEC). Dès lors, le type de molécules présentes dans l'espace interfoliaire, et plus ou moins fortement liées aux feuillets, va dépendre de la charge des feuillets (présence de molécules d'eau ou de cations) et de la taille de cet espace.

II.2 Principaux minéraux argileux en géophagie

Les argiles les plus couramment retrouvées dans les sols ingérés par les animaux ou par l'Homme sont les phases naturellement concentrées dans les sols, et notamment la kaolinite et les smectites (Wilson, 2003). Notons que les sols ne sont jamais composés d'un seul type d'argile, mais regroupent généralement plusieurs argiles différentes, dans des proportions variables en fonction du lieu de prélèvement (figure 1.6).

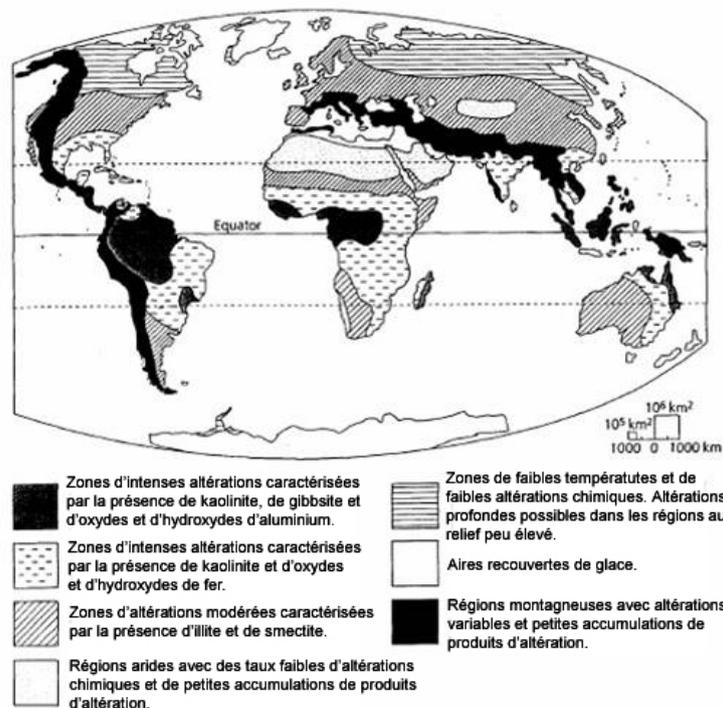


Figure 1.6 : Répartition des argiles à la surface du globe. (D'après Allen, 1997)

→ La kaolinite

La kaolinite est un minéral de formule brute $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$. Ce minéral fait partie de la famille des phyllosilicates de type 1:1 constitué d'une couche tétraédrique et d'une couche dioctaédrique possédant comme cations structuraux du Si^{4+} et de l' Al^{3+} respectivement (figure 1.7). Elle se présente sous forme de plaquettes hexagonales rigides. La kaolinite se caractérise par une faible propension pour les substitutions cationiques (charge cationique nulle). La surface d'échange de la kaolinite est de 10-30 m^2/g et sa CEC est comprise entre 5 et 15 meq pour 100 g.

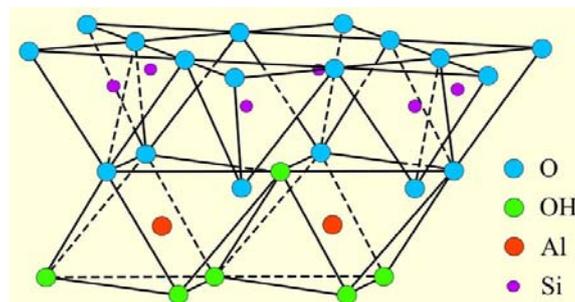


Figure 1.7 : Structure de la kaolinite. (D'après Grim, 1962)

Abondante dans de nombreux sols, la kaolinite est une argile souvent ingérée dans la nature en raison de sa grande capacité d'adsorption, elle est efficace pour adsorber des tannins et des alcaloïdes réduisant ainsi leur biodisponibilité (Dominy et al., 2004) et pour soigner les troubles intestinaux comme la diarrhée (Wilson, 2003).

→ Les smectites

Les smectites forment le groupe le plus diversifié des minéraux de type 2:1 et se présentent sous forme de flocons. Les smectites sont des argiles de type gonflantes et se caractérisent par la présence en quantités variables de molécules d'eau et de cations dans l'espace interfoliaire. La charge cationique est faible (0,2-0,6 par demi-maille) et la surface d'échange des smectites est importante (700-800 m^2/g), tout comme leurs CEC (80-150 meq pour 100 g).

Une des smectites les plus abondantes dans les sols est la montmorillonite (figure 1.8). Une formule brute généralisée d'une maille pour cette argile est $(\text{Na}, \text{Ca})_{0,6}(\text{Al}, \text{Mg})_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$. C'est une argile dont le contenu interfoliaire est facilement échangeable.

Comme pour la kaolinite, l'ingestion de montmorillonite s'accompagne de nombreux effets chez l'animal. La montmorillonite est notamment consommée en vertu de ces propriétés anti-diarrhéiques (Petkova et al., 1981), protectrices de la muqueuse intestinale (Droy-Lefaix et al., 1985) ou aidant à la régénération de l'épithélium intestinal (Girardeau, 1987). Des

animaux consommant de la montmorillonite présentent une amélioration de la croissance permise par une réduction de la charge bactérienne dans l'intestin (Tauquir et Nawaz, 2001).

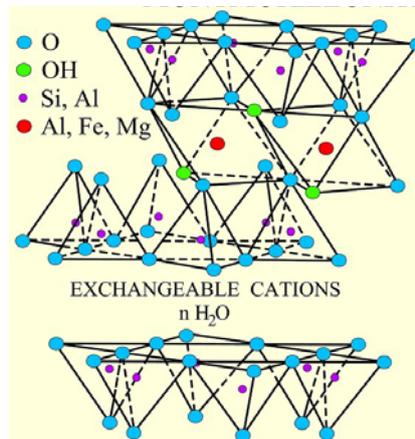


Figure 1.8 : Structure de la montmorillonite. D'après Grimm, 1962.

La bentonite est également souvent mentionnée dans les études sur la géophagie et très utilisée en alimentation animale. La bentonite, roche formée par l'altération de cendres volcaniques au cours du temps, est constituée majoritairement de montmorillonite (80%) mais peut contenir également d'autres minéraux comme le quartz, le mica, la pyrite ou la calcite. Néanmoins ce sont les propriétés absorbantes de la montmorillonite qui semblent être recherchées. La bentonite est notamment connue pour absorber les protéines et réduire l'activité des enzymes (Yesiloglu, 2005).

→ Autres types de minéraux rencontrés en géophagie et en nutrition

La **sépiolite** appartient à la famille des phyllosilicates fibreux. C'est un silicate de magnésium de formule brute $(Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \cdot 6H_2O)$. Les feuillets de cette argile sont organisés en structure du type TOT discontinus (présence de canaux intra cristallins) et forment des fibres. Cette particularité leur offre une surface spécifique très importante. Les caractéristiques moyennes d'une fibre de sépiolite sont une surface spécifique de 200 à 300 m^2/g et une CEC de 10 à 15 meq pour 100g.

Les **zéolites** sont à la fois proches et différentes des argiles. Ce sont des minéraux microporeux formés par l'agencement en trois dimensions d'unités tétraédriques AlO_4 et SiO_4 liées entres-elles par un échange d'ions oxygène. La CEC des zéolites est de 200 à 400 meq

pour 100g et dépend principalement de la proportion des tétraèdres AlO_4 (plus la proportion de tétraèdres AlO_4 est élevée plus la CEC augmente).

Les zéolites naturelles sont retrouvées sur l'ensemble du globe. Comme les argiles, elles ne sont jamais retrouvées seules dans un environnement donné, mais sont contaminées par d'autres éléments (autres zéolites, argiles ou quartz). Ce sont ainsi les zéolites synthétiques qui sont majoritairement utilisées en industrie ou en production animale (voir revue Mumpton, 1999).

III Le système digestif

La digestion englobe tous les processus mécaniques et biochimiques grâce auxquels un organisme va transformer les aliments ingérés en substances assimilables par l'organisme.

Au cours de leur passage dans les différents organes du système digestif, les aliments vont être dégradés en protéines, lipides, glucides, sels minéraux et oligoéléments qui seront absorbés au niveau intestinal pour rejoindre la circulation sanguine et l'ensemble de l'organisme.

Le tube digestif (figure 1.9) commence avec la bouche, où les aliments sont mastiqués et mélangés aux enzymes salivaires (amylase et lipase essentiellement). Le bol alimentaire est avalé et passe jusque dans l'estomac grâce aux mouvements péristaltiques (contractions rythmées) de l'oesophage. Dans l'estomac, la nourriture est mélangée à de l'acide chlorhydrique qui poursuit le processus de dégradation. Lorsque la nourriture est bien digérée, le chyme gastrique (substance semi-liquide, épaisse et visqueuse) franchit un sphincter appelé pylore pour entrer dans l'intestin grêle où il transitera jusqu'au gros intestin. Dans ce long tube aux multiples circonvolutions, les nutriments du chyme sont absorbés pour passer dans la circulation générale. Les résidus inutilisables passent dans le côlon (où la majeure partie de l'eau est réabsorbée dans la circulation sanguine) et le rectum, où ils sont stockés avant leur excrétion. Ces déchets solides, appelés fèces, sont compactés et expulsés par le canal anal et l'anus.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux interactions argiles/muqueuse intestinale et à l'effet de l'ingestion d'argile sur le contenu protéique de cette muqueuse intestinale. Ainsi, nous ne développerons que la partie intestin grêle du système digestif.

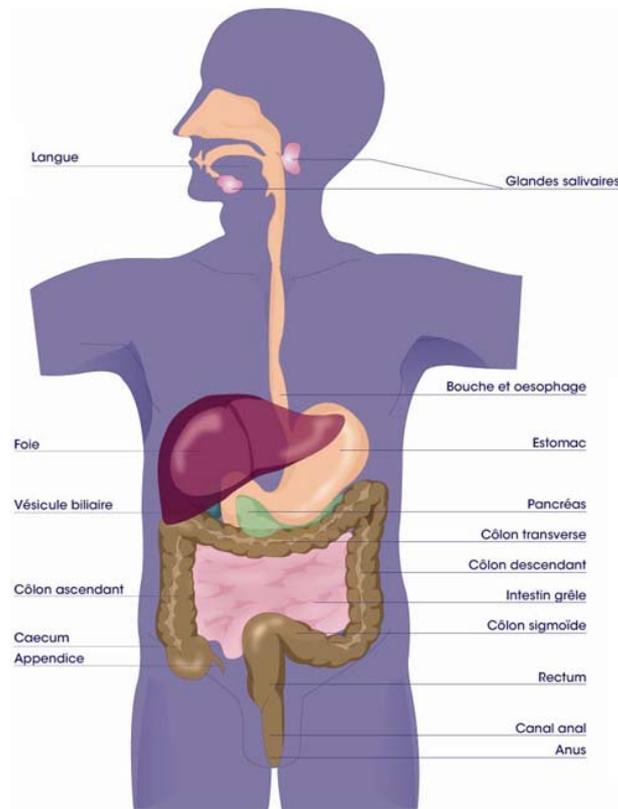


Figure 1.9 : Schéma représentant le système digestif chez l'Homme

III.1 Structure de l'intestin grêle

Chez les mammifères, l'intestin grêle est un organe cylindrique, long, situé dans l'abdomen et délimité à une extrémité par le pylore (estomac) et à l'autre extrémité par la jonction iléo-caecale. L'intestin grêle peut être décrit en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (figure 1.10).

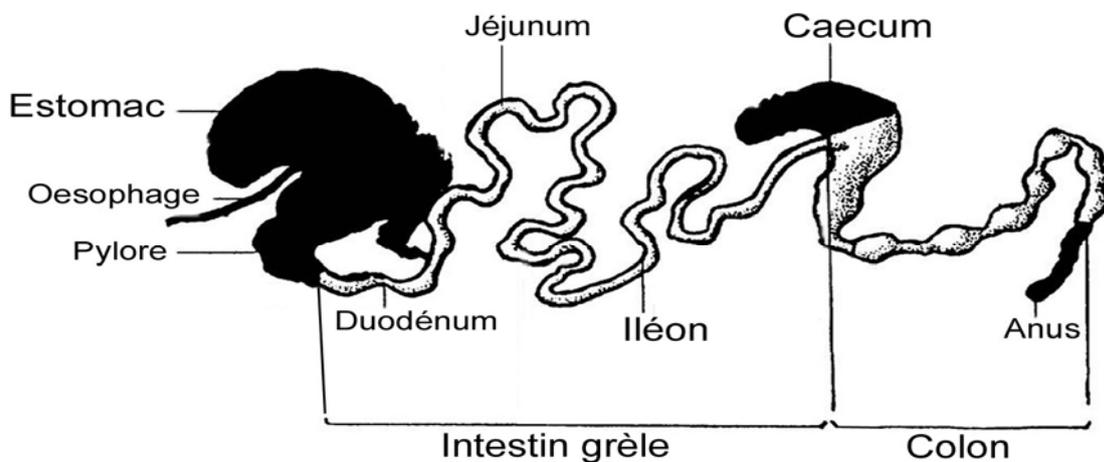


Figure 1.10 : Le tube digestif chez le rat.

Le duodénum est la première partie de l'intestin grêle. Le canal de Wirsung (pancréas) et le canal cholédoque (vésicule biliaire) débouchent au niveau du duodénum pour déverser les enzymes pancréatiques (destinées à la digestion des sucres et protéines) et la bile (nécessaire pour l'absorption des lipides et des vitamines au niveau de l'iléon). Le duodénum possède également de nombreuses cellules synthétisant des enzymes protéolytiques. Ainsi, la plupart des phénomènes digestifs sont réalisés dans le duodénum. Une partie des lipides et des ions sont également absorbés dans le duodénum.

Le jéjunum, partie de l'intestin prélevée dans notre étude, fait suite au duodénum et possède une paroi interne constituée d'une muqueuse tapissée de nombreux replis qui augmentent la surface totale interne et permettent une plus grande absorption des lipides, des glucides et des protéines. Sa taille est d'environ un sixième du total de l'intestin grêle chez le rat. Il commence avec l'apparition des premières valvules conniventes et se termine avec l'iléon.

Enfin, l'iléon, la partie terminale de l'intestin grêle, s'étend du jéjunum jusqu'à la valvule iléo-caecale et se termine au niveau du côlon par un carrefour appelé cæcum. Il assure l'absorption de certains micronutriments, d'électrolytes et de vitamines.

Le tube digestif est constitué sur toute sa longueur de quatre couches concentriques qui sont (en partant de la lumière intestinale) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (figure 1.11).

La muqueuse est délimitée par un épithélium, situé au dessus d'un chorion composé d'un tissu conjonctif lâche, très vascularisé et riche en cellules immunitaires organisées en follicules lymphoïdes. La muqueuse est également pourvue de glandes exocrines. Elle se termine par la musculaire de la muqueuse appelée *muscularis mucosae*, formée de cellules musculaires lisses. La sous-muqueuse est composée d'un tissu conjonctif plus dense contenant des vaisseaux sanguins et un réseau de nerfs sympathiques : le plexus de Meissner qui commande la motilité du tube digestif. C'est dans cette couche que l'on trouve les follicules lymphoïdes des organes lymphoïdes annexés au tube digestif (plaques de Peyer de l'iléon) et les glandes du duodénum. La musculuse est formée de cellules musculaires lisses disposées selon deux axes formant ainsi une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. Entre les deux, des plexus nerveux, les plexus d'Auerbach, assurent l'innervation végétative du tube digestif. Enfin, la séreuse est une couche de tissu conjonctif dense vascularisé et comportant de nombreux adipocytes.

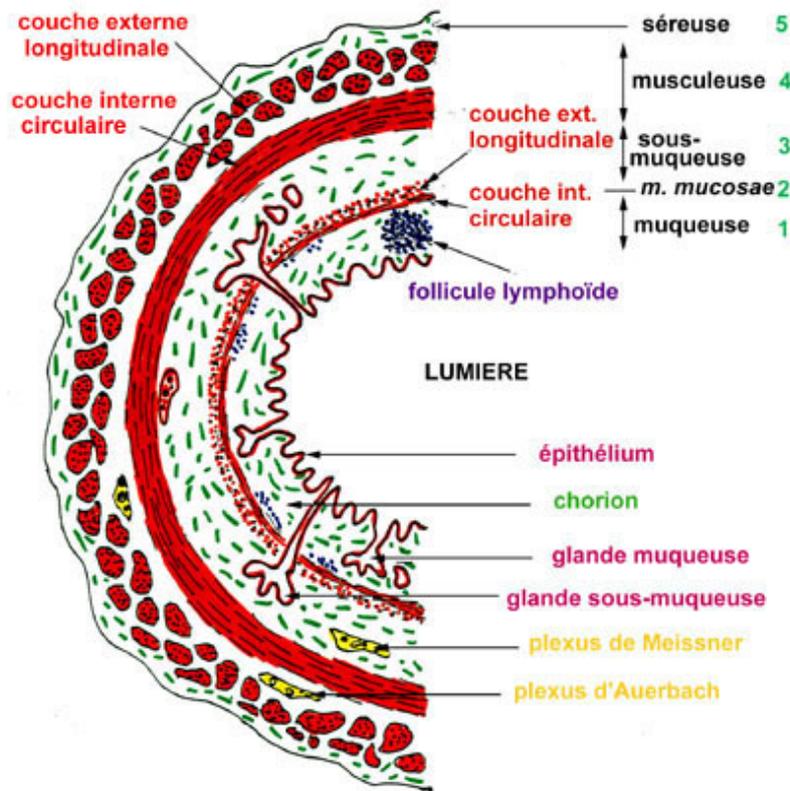


Figure 1.11 : Schéma d'une coupe transversale du tube digestif.

L'intestin grêle se caractérise par une importante surface d'échange, augmentant ainsi l'absorption des nutriments. L'augmentation de la surface d'échange est permise par : la grande longueur de l'organe, la présence de plis transversaux au niveau de la muqueuse et la sous-muqueuse (valvules conniventes), mais surtout par la présence de villosités intestinales (structures étroites et très longues dans la muqueuse au niveau du duodénum et du jéjunum proximal) et de microvillosités au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (figure 1.12). C'est au niveau des entérocytes que se déroule l'absorption des nutriments, de l'eau, des sels minéraux et des vitamines. Dès lors, la fonction principale des entérocytes est d'assurer le transport des nutriments de la lumière de l'intestin grêle vers l'intérieur de l'organisme. Les nutriments sont absorbés au niveau des microvillosités par diffusion passive ou par transport actif. Puis, ils traversent l'entérocyte et sortent de la cellule soit dans le sang (glucides, acides aminés, acides gras libres) soit dans les canaux lymphatiques (lipides).

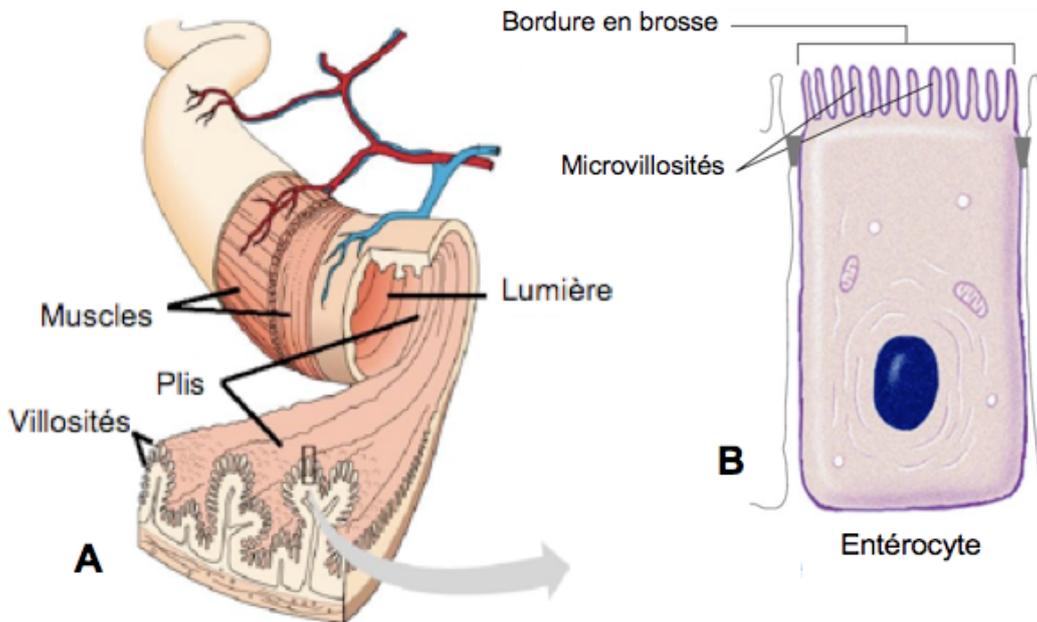


Figure 1.12 : Repléments du tube digestif au niveau intestinal (A) et au niveau des entérocytes (B).

Les entérocytes sont des cellules cylindriques dont les sommets sont différenciés en microvillosités (figure 1.13). Des systèmes de jonction assurent l'étanchéité des espaces intercellulaires latéraux (jonctions serrées) et la cohésion des cellules (desmosomes). Du côté basal, les entérocytes sont séparés par un espace intercellulaire qui s'élargit au passage des lipides absorbés pour former les espaces de Grünhagen (L'Hermite et al., 1996).

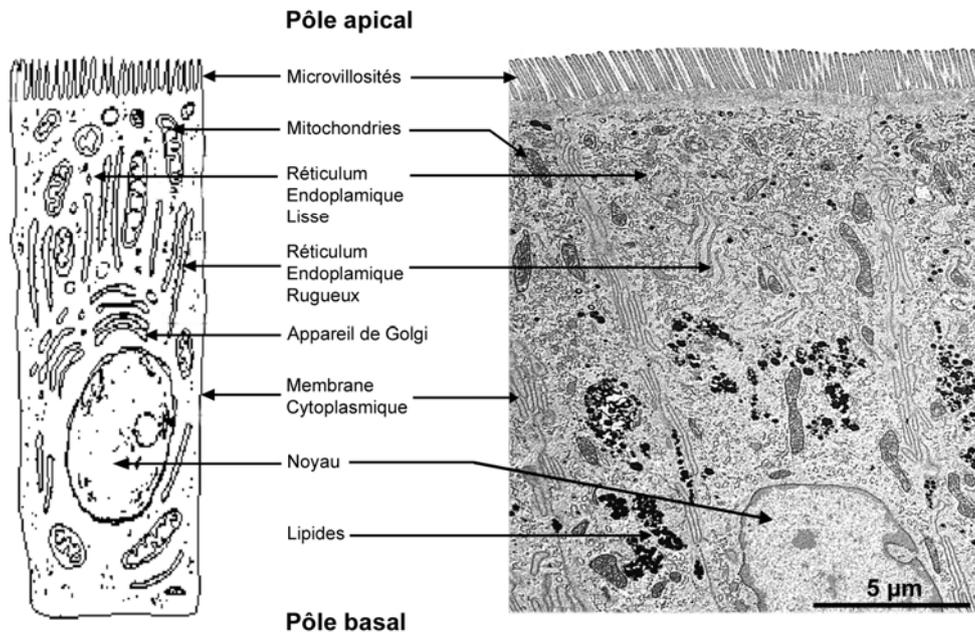


Figure 1.13 : Schéma et image en MET d'un entérocyte.

Les microvillosités sont des prolongements cytoplasmiques réguliers disposés parallèlement les uns par rapport aux autres (figure 1.14). Elles contiennent des microfilaments d'actine qui sont reliés aux protéines transmembranaires par des protéines accessoires, comme la fibrine et la villine (Kukulies et al., 1984 ; Coudrier et al., 1988). L'ensemble des microvillosités constitue un plateau strié, situé au pôle apical des entérocytes de l'épithélium intestinal, appelé bordure en brosse. Ces microvillosités sont toutes du même diamètre (0,1 à 0,2 μm chez le rat) et de même longueur (1 à 2 μm , chez le rat) (Kukulies et al., 1984).

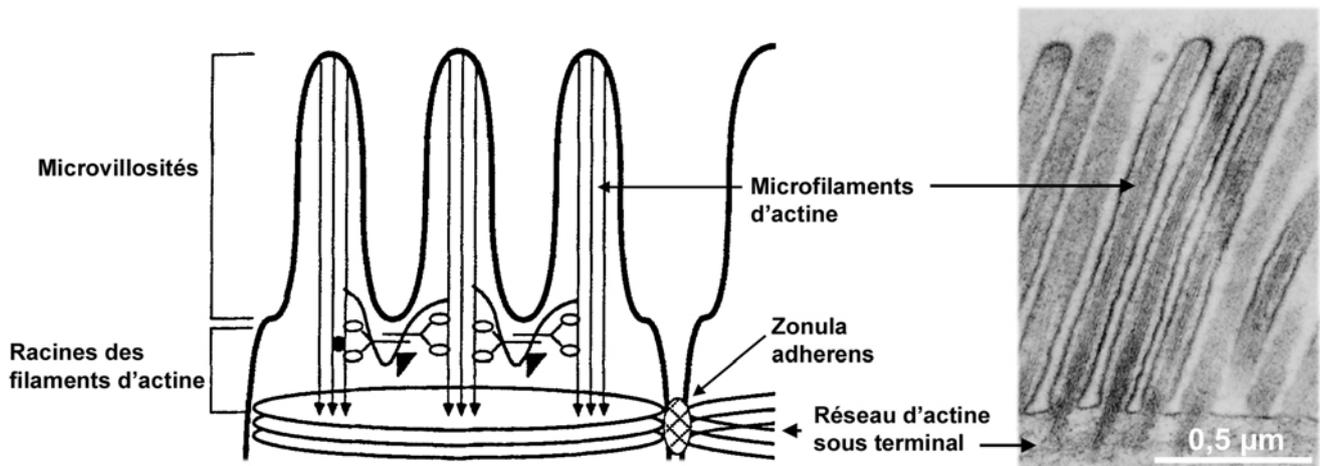


Figure 1.14 : Schéma et image en MET de la structure des microvillosités.
D'après Coudrier et al., 1988.

Enfin, une couche épaisse de longs filaments glycoprotéiques, le glycocalix, recouvre les microvillosités. Ce dispositif permet d'augmenter considérablement la surface membranaire du pôle apical de la cellule et, de ce fait, de jouer un rôle considérable dans les phénomènes d'absorption.

III.2 Absorption des nutriments

III.2.1 Absorption de l'eau et des ions

L'intestin assure un rôle critique dans le maintien de l'hydratation et de l'équilibre acido-basique de l'organisme. L'intestin absorbe chaque jour de grandes quantités d'eau par l'intermédiaire de canaux spécifiques : les aquaporines. Ces protéines se présentent sous forme de tétramères et sont majoritairement localisées au sommet des villosités. L'absorption de l'eau est liée à celle des électrolytes et des sucres. En effet, l'entrée de l'eau dans

l'entérocyte se réalise par transport passif dans le sens du gradient d'osmolarité créé par l'absorption des électrolytes et des sucres. Parmi les ions absorbés au niveau intestinal, l'ion sodium joue un rôle prédominant dans l'absorption de l'eau. Cet ion est concentré au niveau des sommets des villosités favorisant ainsi l'entrée de l'eau dans l'intestin.

L'absorption du sodium nécessite un transport actif. Celui-ci est réalisé soit par des pompes à sodium et l'énergie nécessaire à leur fonctionnement est fournie par des ATPases membranaires, soit par un co-transport avec le glucose ou des acides aminés.

D'autres ions nécessitent également un transport actif. C'est le cas notamment du calcium absorbé de la lumière intestinale par l'intermédiaire de la « calcium binding protein ».

L'intestin joue également un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre des ions ferreux. L'absorption du fer se fait dans l'intestin grêle proximal, sous forme de fer ferreux Fe^{2+} transporté avec un proton. Dès lors, si l'organisme a un besoin en fer, les ions se lient à la transferrine et rejoignent le sang. En absence de besoin, le fer absorbé, incorporé à la ferritine, reste dans l'entérocyte et sera perdu à sa mort.

L'argile utilisée dans cette étude contient une grande quantité d'aluminium dans sa structure (voir II.2). Chez l'homme, l'absorption gastro-intestinale d'aluminium est faible. Selon Pichard et al. (2005), elle est généralement de l'ordre de 0,1 à 1 %, elle dépend en grande partie de la biodisponibilité de l'aluminium aux différents pH de l'intestin et elle est liée à la forme ingérée et aux agents complexant présents. De plus, l'alimentation peut, soit faciliter et augmenter l'absorption, en formant par exemple des complexes absorbables avec des acides carboxyliques comme l'acide citrique ou l'acide lactique, soit la réduire en formant des composés insolubles avec des phosphates ou des silicates.

III.2.2 Absorption des glucides

Au niveau de l'intestin, des enzymes hydrolysent les polysaccharides jusqu'au stade disaccharides. Puis, au niveau des microvillosités, des disaccharidases les réduisent en monosaccharides. Ces derniers sont absorbés grâce à un transporteur sodium dépendant (figure 1.15). Puis ils traversent la cellule jusqu'à la membrane basale et gagnent la veine porte par laquelle ils sont drainés jusqu'au foie.

III.3.3 Absorption des protéines

L'action de peptidases et oligopeptidases va permettre la dégradation des protéines jusqu'au stade oligopeptide ou acide aminé. Ces peptidases peuvent être gastriques, comme la pepsine, ou pancréatiques, comme la trypsine. Les oligopeptides seront absorbés par transport actif tandis que les acides aminés pourront être absorbés par diffusion facilitée à l'aide d'une pompe sodium dépendante (co-absorption du sodium par des transporteurs spécifiques dans le sens du gradient de concentration) (figure 1.15). Les acides aminés traversent la cellule pour rejoindre le système sanguin dans le système porte.

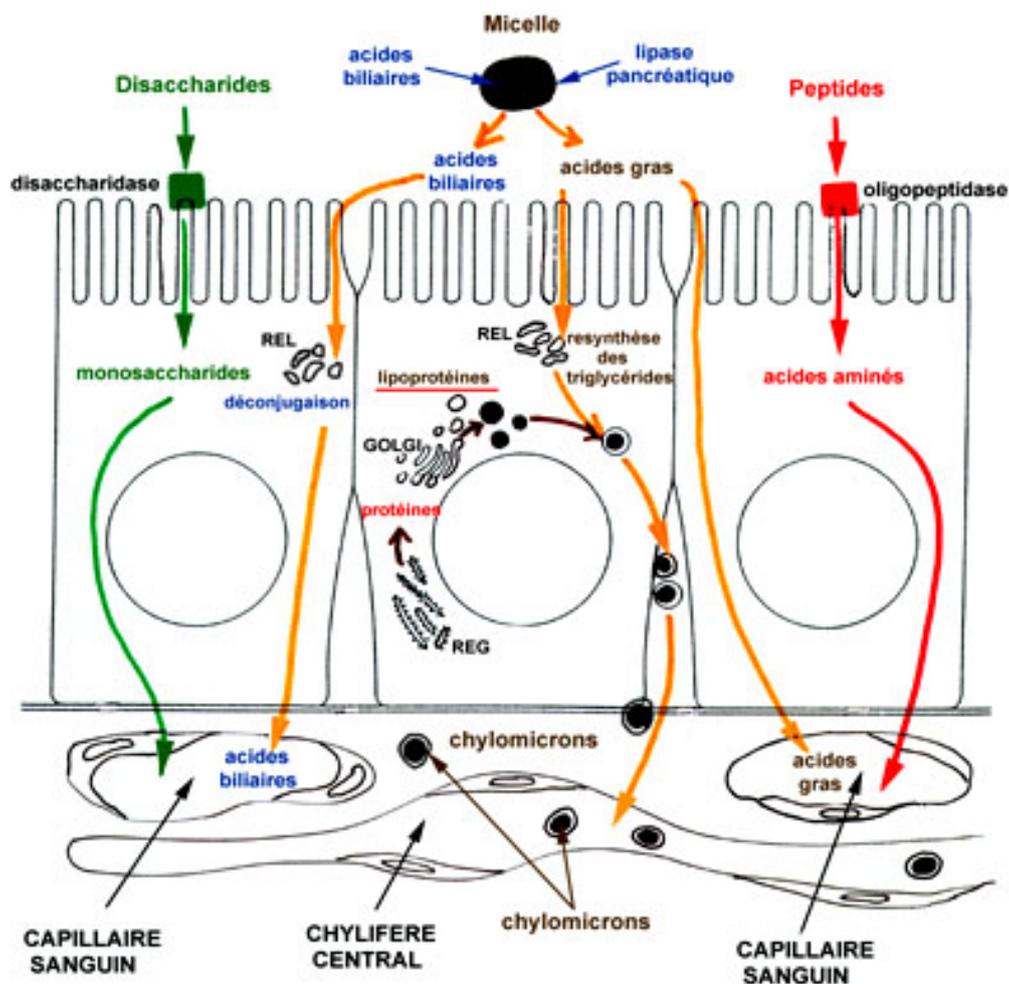


Figure 1.15 : Absorption des différents nutriments par les entérocytes.

III.2.4 Absorption des lipides

L'absorption des lipides est schématisée sur la figure 1.15. Les lipides se présentent sous plusieurs formes : phospholipides, esters de cholestérol, vitamines liposolubles et en majeure partie sous formes de triglycérides. Les acides gras libres sont absorbés par diffusion simple au travers des microvillosités, tandis que pour les autres lipides, un processus plus complexe est nécessaire. Ce processus comporte quatre étapes : (1) émulsion des graisses, (2) hydrolyse des lipides, (3) formation de micelles et (4) absorption du contenu micellaire par les entérocytes par endocytose.

L'arrivée des lipides dans le duodénum stimule la sécrétion de bile permettant leur émulsion par l'action des sels biliaires (tensio-actifs). Ces sels biliaires sont amphiphiles et vont rompre les gouttelettes lipidiques. Il y aura ainsi formation de micelles qui se chargeront en lipides et en lipases pancréatiques (Tso et Balint, 1986). Puis les lipases pancréatiques dégraderont les triglycérides en acides gras et en glycérol. Les esters de cholestérol et les phospholipides seront dégradés par l'action d'une cholestérol lipase pancréatique et d'une phospholipase, respectivement, pour libérer des acides gras libres et des lysophospholipides. Au fur et à mesure de la dégradation des lipides, des micelles de plus petite taille se formeront grâce à la présence en excès des sels biliaires, et leur contenu sera ensuite absorbé au niveau du jéjunum par endocytose.

Les acides gras possédant une courte chaîne (inférieure à 8-10 atomes de carbone), et donc une relative hydrophilie, pourront rejoindre la circulation sanguine, tandis que les acides gras à plus longue chaîne intégreront un processus de synthèse des triglycérides. Celui-ci a lieu dans le réticulum endoplasmique lisse après activation de l'acyl-coenzyme A synthase (Cross et Mercer, 1993). Le transport de ces acides gras vers le réticulum endoplasmique lisse est assuré par la FABP (fatty acid binding protein) dont la présence semble indispensable à leur réestérification (Friedman et Nylund, 1980). Les mécanismes de transport et d'estérification du cholestérol sont également assurés par des protéines spécifiques.

Les triglycérides et le cholestérol resynthétisés se retrouvent associés aux apolipoprotéines (protéines synthétisées par l'appareil de Golgi) pour former des lipoprotéines et notamment des chylomicrons (Friedman et Nylund, 1980). Les lipoprotéines sont de grands complexes hydrosolubles de protéines et de lipides permettant le transport des lipides dans tout

l'organisme (Tso et Balint, 1986). La coque externe est une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol et une ou plusieurs apolipoprotéines, tandis que la partie centrale contient des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles (Hamilton et al., 1998). Les chylomicrons sont des lipoprotéines qui se forment en période de digestion, et qui permettent le transport des lipides de l'intestin grêle vers le foie (Tso et Balint, 1986 ; Hamilton et al., 1998).

III.3 Rôle des microorganismes dans la digestion

L'intestin est un organe dans lequel un nombre conséquent de microorganismes se développent, constituant un écosystème complexe.

La flore intestinale correspond à l'ensemble des bactéries présentes dans le tube digestif. Sa composition est relativement stable pour un individu donné dès les premiers jours de sa vie. Néanmoins, des modifications de la flore intestinale peuvent intervenir en fonction du type d'alimentation, mais surtout lors de l'ingestion d'antibiotiques. Chaque individu possède sa propre composition de flore intestinale. En effet, alors que le nombre estimé d'espèces bactériennes dans l'intestin est supérieur à 10 000 (Eckburg et al., 2005), il semble qu'une faible proportion d'espèces (une centaine) soit partagée par l'ensemble des êtres humains (Tap et al., 2009). De plus, de nombreux microorganismes sont quotidiennement ingérés. Parmi ceux-ci, certains microorganismes ont des effets positifs sur l'organisme : les probiotiques. Un probiotique est un micro-organisme vivant qui, ingéré en quantité suffisante, produit des effets bénéfiques sur la santé de celui qui les consomme (définition de l'OMS). Les principaux probiotiques sont les levures, les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*.

En raison du pH acide de l'estomac, très peu de microorganismes sont dénombrés dans cet organe ($<10^3$ par gramme). Dans l'intestin grêle, le nombre de bactéries augmente continuellement entre les différents compartiments, passant de 10^3 par gramme dans le duodénum à 10^8 par gramme dans l'iléon. Néanmoins, leur présence reste relativement faible et, de ce fait, ces microorganismes ne semblent pas jouer pas un rôle très important à ce niveau. Par contre, dans le colon, la quantité de microorganismes est très élevée (jusqu'à 10^{11} par gramme). Parmi les espèces présentes, la flore dominante ($>10^9$ par gramme) est

constituée de bactéries anaérobies strictes (*Bacteroides*, *Clostridium*) et de bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*).

La flore intestinale présente des effets à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elle permet de dégrader des substances non absorbées par l'intestin. C'est le cas notamment de sucres non digérés qui sont dégradés jusqu'au stade d'acides organiques assimilables par l'organisme, de protéines non digérées qui seront dégradées jusqu'au stade azote, ou de substances non digérables par l'organisme (fibres, amidon). Ces microorganismes interviennent également pour limiter la prolifération d'espèces pathogènes ou leur adhésion aux cellules intestinales, et pour stimuler le système immunitaire (reconnaissance de bactéries pathogènes) (Guarner et Malagelada, 2003).

A côté de ces rôles bénéfiques pour l'organisme, la flore intestinale peut également présenter des inconvénients si l'équilibre de celle-ci est modifié. Par exemple, certains microorganismes produisent des substances potentiellement cancérigènes : des aglycones, et des nitrosamines qui sont des produits de dégradation de sucres et de protéines, respectivement (Drasar et Hill, 1972). Il existe également un lien entre la flore intestinale et l'obésité. En effet, il a été montré que chez de nombreux individus obèses, une proportion anormale de certaines espèces bactériennes était responsable d'une augmentation de l'apport en calories pour l'organisme, liée à une amélioration de la digestibilité des lipides et des sucres (Turnbaugh et al., 2006).

IV But de notre étude

La géophagie est un comportement naturel pratiqué par un grand nombre d'espèces animales. Cette ingestion de terre semble présenter des avantages en améliorant les rendements caloriques de l'alimentation, en protégeant l'organisme des agressions de certains parasites ou de certaines toxines ingérées, ou en maintenant une balance optimale dans l'apport de minéraux.

La plupart des études réalisées sur la géophagie a consisté à mettre en relation la nature physicochimique des sols et les raisons poussant un animal à ingérer celui-ci. De même, les recherches entreprises sur l'utilisation d'argile en production animale se sont limitées à vérifier la non-toxicité de la complémentation alimentaire en argile ou à valider l'intérêt de

celle-ci. Mais, peu d'études se sont intéressées au devenir de l'argile après ingestion, dans le système digestif ou son interaction avec celui-ci. L'intestin est pourtant la principale zone d'échange dans l'organisme et dans le cas de géophagie, il semble primordial d'étudier l'interaction de l'argile à ce niveau de l'organisme. Quelques études ont montré que les argiles interagissaient fortement avec le mucus intestinal en le stabilisant et renforçaient ainsi la barrière intestinale (Droy-Lefaix et al., 1985, Albengres et al., 1985). Plus récemment, Ma et Guo (2008) ont montré que la complémentation en montmorillonite (chargée en cuivre) entraînait une diminution du renouvellement des cellules de la bordure en brosse et augmentait l'activité de certaines enzymes intestinales (maltase, amininopeptidase N).

Il semble ainsi particulièrement intéressant d'étudier plus précisément l'effet de l'ingestion d'argile en complément alimentaire sur le système digestif. Notre étude se propose d'étudier l'effet de la consommation d'argile au niveau intestinal, principale zone d'échange de nutriments dans l'organisme tant au niveau morphologique qu'au niveau protéique.

Enfin, l'argile utilisée dans notre étude, la kaolinite, contenant une forte concentration en aluminium, il semblait particulièrement intéressant de pouvoir définir quelles protéines fixent cet élément. A cette fin, le deuxième objectif de mon travail de thèse était de développer une stratégie analytique basée sur l'utilisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives et une détection métallique par ICP-MS réalisable dans notre laboratoire.

Chapitre II

Outils et stratégies pour l'analyse protéomique et métallobiotéomique

Le protéome peut être défini comme l'ensemble des protéines exprimées par des cellules dans un environnement donné et dans des conditions physiologiques données (Kenyon et al., 2002). En 2003, l'étude du protéome a été élargie à « l'ensemble des isoformes et modifications des protéines, des interactions entre protéines et à la description structurale des protéines et des complexes » (Tyers et Mann, 2003).

Avant les années 1990, la technique de choix pour la caractérisation des protéines était le séquençage par la méthode d'Edman (Edman, 1950). Grâce à l'automatisation de cette dernière, cette méthode a permis de faire de grande avancée dans l'étude des protéines. Néanmoins, dès le début des années 1990, la spectrométrie de masse a pris une place de plus en plus importante en biologie et est devenue en quelques années une méthode incontournable pour l'étude des biomolécules. De nos jours, l'analyse protéomique repose sur trois piliers :

- (1) les techniques séparatives des biomolécules,
- (2) la spectrométrie de masse adaptée aux biomolécules,
- (3) les outils de bioinformatique et les données de séquençage des génomes.

Dans un contexte de métallobiologie, il est également nécessaire de disposer de stratégies et de méthodes spécifiques pour la détection des métaux contenus dans les métallobiologie.

Dans ce deuxième chapitre, nous allons présenter les différents outils et stratégies utilisés pour la séparation des protéines, l'identification des protéines par spectrométrie de masse et la détection des éléments métalliques.

I Outils pour l'analyse protéomique et métallogprotéomique

I.1 Outils pour la séparation des protéines et des peptides

I.1.1 Séparation par électrophorèse

L'électrophorèse est une technique basée sur la séparation dans un champ électrique de molécules chargées. La première électrophorèse fut mise au point par Arne Tiselius en 1937. Cette première électrophorèse fut réalisée en milieu liquide dans un tube et a permis de séparer des protéines sériques.

On peut distinguer deux types d'électrophorèse :

- l'électrophorèse en veine liquide (ou en champ libre), c'est le cas de l'électrophorèse de A. Tiselius et de l'électrophorèse capillaire en solution libre,
- l'électrophorèse de zone (ou électrophorèse sur support) pour laquelle différents supports peuvent être utilisés (papier, acétate de cellulose, gels).

De nos jours, les techniques d'électrophorèse utilisées pour la séparation des biomolécules sont principalement les électrophorèses sur gels et l'électrophorèse capillaire.

En électrophorèse sur gel, la nature du gel est fonction des molécules à séparer. Des gels d'agarose sont utilisés pour la séparation de molécules de très haut poids moléculaires (ADN, ARN) tandis que des gels de polyacrylamide sont employés pour la séparation des protéines.

Au cours de cette thèse, nous avons employé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) pour la séparation des protéines extraites d'intestin de rat. Ainsi, nous ne développerons que ce type d'électrophorèse.

Le principe de l'électrophorèse PAGE est basé sur la migration des protéines en fonction de leur taille et de leur charge dans un gel de polyacrylamide. Le gel de polyacrylamide prend la forme d'un réseau de mailles dont la réticulation est fonction du pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide final. Plus le pourcentage est élevé, plus les pores sont petits. Ainsi la concentration en acrylamide/bisacrylamide est adaptée à la taille des molécules à séparer. Plus les pores sont petits, plus une protéine de grande taille a des difficultés à se mouvoir dans le gel. Généralement le pourcentage d'acrylamide est compris entre 4 et 20%.

Deux types de gels peuvent être utilisés : soit des gels dont la concentration en acrylamide/bisacrylamide est fixe (à titre d'exemple, pour la séparation de protéines de poids moléculaires compris entre 20 et 200 kDa au cours de l'analyse protéomique différentielle,

nous avons utilisé des gels SDS-PAGE à 12% d'acrylamide/bisacrylamide), soit des gels en gradient d'acrylamide/bisacrylamide (par exemple 4-16%). L'avantage des gels en gradient est la possibilité de séparer des protéines de poids moléculaires très différents (de quelques milliers de Da à plusieurs centaines de milliers).

Dans les premiers systèmes d'électrophorèse, le dépôt de protéines se faisait directement dans le gel de séparation (système continu). Dans ces systèmes, les protéines pénètrent dans le gel avec une différence de temps, liée au volume de l'échantillon, ce qui résulte en des bandes protéiques larges après électrophorèse. Afin d'augmenter la résolution, des systèmes discontinus formés de deux gels (un gel de concentration et le gel de séparation) et dont les tampons de migration et ceux pour la formation du gel sont de compositions et de pH différents, ont été développés. Dans le système d'Ornstein et Davis (Ornstein, 1964 ; Davis, 1964), l'amélioration de la résolution est obtenue en concentrant l'échantillon dans une fine couche au-dessus du gel de séparation. Cette concentration de l'échantillon résulte de la différence de réticulation des gels de concentration et de séparation (pores larges dans le gel de concentration et resserrés dans le gel de séparation) et de l'effet isotachophorèse lié à l'utilisation d'un pH différent entre les deux gels (pH 6-7 dans le gel de concentration et pH 8-9 dans le gel de séparation).

En pratique, les protéines sont solubilisées dans un tampon dont la composition varie en fonction du type de gel utilisé. De nombreuses variantes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide peuvent être employées. Nous pouvons classer ces méthodes en deux groupes : l'électrophorèse en conditions dénaturantes (type SDS-PAGE) et l'électrophorèse en conditions natives (native PAGE, Blue Native-PAGE (BN-PAGE), Clear Native-PAGE (CN-PAGE) et High resolution Clear Native-PAGE (HrCN-PAGE)). L'avantage de l'électrophorèse SDS-PAGE est sa grande résolution obtenue grâce à l'utilisation du SDS (agent dénaturant) tandis que les gels en conditions natives permettent de conserver la structure native des protéines, nécessaire pour l'étude de leurs activités ou pour préserver leurs interactions avec d'autres molécules ou avec un élément métallique.

1.1.1.1 Formation d'un gel de polyacrylamide

Quel que soit le type d'électrophorèse sur gel, la formation du gel résultera du même procédé de polymérisation (figure 2.1). Au minimum, un gel de polyacrylamide est constitué :

- de molécules d'acrylamide qui vont polymériser pour former du polyacrylamide,
- de molécules de N,N-méthylène bisacrylamide, un agent pontant permettant la formation des pores (réticulation),
- de persulfate d'ammonium (formation de radicaux libres $\text{SO}_4^{\bullet-}$) et de TEMED (catalyseur de la formation de radicaux libres), deux agents nécessaires pour initier la polymérisation.

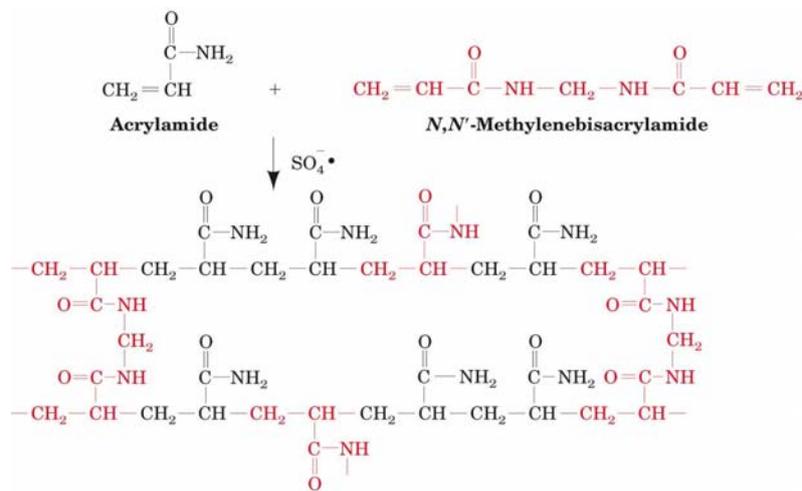


Figure 2.1 : Formation du réseau de polyacrylamide dans un gel PAGE.

Les monomères d'acrylamide vont polymériser sous forme de chaîne de polyacrylamide. Le N,N-méthylène bisacrylamide permettra la formation de pores dans le gel. Des radicaux libres provenant du persulfate d'ammonium et stabilisés par le TEMED sont les catalyseurs de la réaction de polymérisation.

L'électrophorèse peut se réaliser verticalement (gel coulé entre deux plaques de verre) ou horizontalement. En électrophorèse verticale, les échantillons seront déposés dans des puits situés au sommet du gel, tandis qu'en électrophorèse horizontale, les protéines peuvent être déposées au centre du gel autorisant leur migration dans les deux sens.

1.1.1.2 Les différentes variantes d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide

A. Electrophorèse en conditions dénaturantes

Les gels SDS-PAGE sont certainement les plus employés pour la séparation de protéines à l'état dénaturé. Le SDS, présent dans le tampon d'électrophorèse, dans le gel et dans le tampon de charge, va charger négativement et uniformément les protéines (1,4 g de SDS par g de protéines globulaires environ, Reynolds et Tanford, 1970) afin que la migration se fasse uniquement en fonction de leur masse moléculaire de la cathode vers l'anode. Sur ce type de gel, il est possible, à l'aide de marqueurs de masses moléculaires, d'estimer la masse des protéines.

Pour une séparation monodimensionnelle, la technique de choix est celle mise au point par Laemmli (1970) pour dénaturer les protéines. Cette technique consiste à chauffer l'échantillon avant dépôt dans un tampon constitué, entre autres, d'un agent dénaturant (SDS) et d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol ou dithiothréitol). Cet agent réducteur permet de réduire les ponts disulfure.

L'utilisation de ce type de gel dans le cadre d'une séparation en deux dimensions sera présentée plus loin.

B. Electrophorèse en conditions natives

Dans ce système, en raison de l'absence de SDS, les protéines migrent dans le gel en fonction de leur rapport masse/charge et non plus uniquement en fonction de leur masse. Dès lors, le pH des tampons utilisés pour la préparation du gel et des tampons de migration est un facteur crucial. En effet, la charge globale de la protéine est dépendante du pH : une protéine dont le pI est inférieur au pH de travail est globalement chargée négativement tandis qu'une protéine dont le pI est supérieur au pH de travail est globalement chargée positivement. Ainsi dans une électrophorèse verticale, les protéines chargées positivement migrent vers la cathode et sont perdues. Pour remédier à ce problème, des méthodes d'électrophorèse dans lesquelles l'ajout de molécules imposant une charge aux protéines (« charge shift ») tout en conservant leur structure native ont été développées. L'équipe de Wittig et Schägger a proposé deux types de gels d'électrophorèse sur ce principe : le BN-PAGE et le HrCN-PAGE dans lesquels on trouve respectivement des molécules de bleu de Coomassie (Schägger et von Jagow, 1991) ou de déoxycholate de sodium (Wittig et al., 2007). Historiquement, cette équipe travaillait sur la séparation de complexes membranaires et l'ajout de détergent était nécessaire pour solubiliser ces protéines. Le premier protocole mis au point fut celui du BN-PAGE.

Cependant, le principal inconvénient du BN-PAGE réside dans la difficulté de visualiser des activités enzymatiques en raison de la présence des molécules de bleu de Coomassie. Le CN-PAGE a donc été mis en place pour permettre la séparation des protéines membranaires (présence de détergent) mais en éliminant le bleu de Coomassie. Comme le native PAGE, la migration des protéines est dépendante du pH des solutions employées et les séparations obtenues présentent une mauvaise résolution. Dès lors, le HrCN-PAGE fut mis au point (Wittig et al., 2007). La résolution de ce type de gel est comparable à celle obtenue avec les gels BN-PAGE tout en permettant la visualisation d'activité enzymatique. Le tableau 2.1 résume les différences entre ces différentes méthodes électrophorétiques.

	Native PAGE	BN-PAGE	CN-PAGE	HrCN-PAGE
« Charge shift » des protéines	Non	Oui Bleu de Coomassie	non	Oui Déoxycholate de sodium
Adapté aux protéines membranaires	Non	Oui	Oui	Oui
Visualisation d'activité enzymatique	Possible	Difficile	Possible	Possible
Résolution	Moyenne	Bonne	Moyenne	Bonne

Tableau 2.1 : Comparatif des méthodes d'électrophorèse en conditions non dénaturantes.

C. Electrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide a fait l'objet de plusieurs revues (Görg et al., 2004, Rabilloud et al., 2010). Cette technique allie une séparation des protéines en fonction de leur pI au cours d'une première dimension (focalisation isoélectrique) et une séparation en fonction de leur taille dans un deuxième temps sur un gel SDS-PAGE (O'Farrell, 1975). En routine, cette technique permet d'obtenir la séparation de 1000 à 2000 protéines sur un gel. Plus récemment, Görg et al. (2004) ont annoncé la possibilité de séparer près de 5000 protéines sur un même gel 2D. La reproductibilité de ce type de séparation rend possible l'analyse différentielle des cartes protéiques d'échantillons obtenus dans des conditions expérimentales différentes. L'électrophorèse bidimensionnelle n'est cependant pas adaptée aux protéines hydrophobes et membranaires, ni aux protéines possédant des pI extrêmes.

De nos jours, la focalisation isoélectrique se réalise sur un gel dans lequel est immobilisé un gradient de pH (Bjellqvist et al., 1982). Les protéines sont solubilisées dans un tampon constitué d'agents chaotropiques (urée, thiourée) et de détergent (par exemple CHAPS ou Triton X100) (Rabilloud et al., 1997). Un agent réducteur et des ampholytes porteurs sont ajoutés à cette solution. Les protéines sont entraînées par un champ électrique et vont se déplacer dans ce gel en fonction de leur charge nette globale. Quand les protéines arrivent dans une zone proche du pH qui correspond à leur point isoélectrique, leur charge globale devient nulle, et leur migration s'arrête. Après la focalisation isoélectrique, les protéines sont soumises à une étape de réduction des ponts disulfure et d'alkylation des cystéines. Puis la deuxième dimension est réalisée sur des gels SDS-PAGE en système continu.

1.1.1.3 Détection des protéines par coloration des gels après électrophorèse

Les protéines sont détectées après coloration des gels. Différentes colorations sont utilisées (tableau 2.2) et conditionnent la sensibilité de détection des protéines. Différents principes peuvent être à la base de la coloration : fixation de molécules organiques (bleu de Coomassie) ou fluorescentes (Sypro) ayant une forte affinité pour les protéines, réduction d'un ion métallique et fixation sur les protéines (coloration au nitrate d'argent) ou formation de sels métalliques insolubles laissant certaines régions de la protéine non colorées (coloration négative).

Coloration	Limite de détection	Avantages	Inconvénients	Référence
Argent	0,1 ng de protéine par spot	Très bonne sensibilité	Mauvaise reproductibilité, gamme dynamique limitée, protéine dépendant, moindre compatibilité avec l'analyse MS	Rabilloud, 1990 Görg et al., 2000
Négative	1,4 ng de protéines par mm ²	Pas d'étape de fixation, méthode rapide et peu coûteuse	Visualisation des spots et quantification difficiles	Ferreras et al., 1993
Fluorescence Sypro Ruby	0,25 à 1 ng de protéine par mm ²	Très bonne sensibilité	Coût élevé des réactifs	Patton, 2000
Organique CBB	8-10 ng de protéine par spot	Bonne reproductibilité, bonne compatibilité avec l'analyse MS	Sensibilité moyenne	Neuhoff et al., 1988

Tableau 2.2 : Limites de détection, avantages et inconvénients de méthodes de coloration couramment utilisées pour la détection de protéines sur gel de polyacrylamide.

1.1.1.4 Analyse différentielle

L'analyse différentielle à partir de gels d'électrophorèse bidimensionnelle a été rendue possible à partir du moment où les bandelettes à gradient de pH immobilisé ont été disponibles. En effet une bonne reproductibilité des gels est indispensable pour pouvoir comparer des cartes protéiques provenant de différents échantillons.

L'approche comparative multi-gels consiste à réaliser l'analyse différentielle après coloration des gels à l'aide de logiciels de traitement d'image conçus pour l'analyse protéomique (par exemple : PDQuest de Bio-Rad, Progenesis SameSpot de Nonlinear Dynamics). Ces logiciels permettent de détecter, de quantifier et de comparer les différents spots présents sur le gel. Ils se différencient par leurs interfaces respectives, leurs approches différentes et la présence d'outils statistiques. Les limites de cette approche sont liées à la reproductibilité des gels et à la technique de coloration (sensibilité, gamme de linéarité). Elle nécessite de réaliser un grand nombre de gels pour chaque condition expérimentale.

La technique d'analyse différentielle DiGE (Difference Gel Electrophoresis) (Ünlü et al., 1997) permet de dépasser ces limites. Dans la technique DiGE, les différents échantillons protéiques sont marqués par différentes cyanines fluorescentes (Cy2, Cy3, Cy5). Puis les échantillons sont mélangés et les protéines sont séparées sur un même gel. Après normalisation à l'aide d'un standard interne, l'analyse différentielle est réalisée en comparant la fluorescence des différentes cyanines. La technique DiGE permet de s'affranchir des problèmes de reproductibilité puisque les échantillons à comparer migrent dans le même gel. Elle est compatible avec une identification des protéines par spectrométrie de masse. L'inconvénient majeur de cette technique est son coût.

D'autres méthodes ont été proposées pour réaliser une analyse différentielle à partir des signaux observés en spectrométrie de masse. Il s'agit des méthodes de type ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) (Gygi et al., 1999), SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) (Ong et al., 2002), iTRAQ (Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification) (Ross et al., 2004), DIMAL-K (Difference in Mass Analysis Using Labelled Lysine) (Delcourt et al., 2005) ou encore ICPL (Isotope-Coded Protein Labels) (Schmidt et al., 2005). Ces méthodes ont en commun le principe de marquer les deux échantillons protéiques à l'aide de réactifs de masses légèrement différentes (lourd/léger) puis de les mélanger. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel. Après digestion, les

peptides issus de ces protéines sont analysés par spectrométrie de masse. L'analyse différentielle quantitative est réalisée, soit à partir des spectres MS (calcul du ratio des paires de peptides lourds/légers), soit à partir des spectres MS/MS des fragments (cas de l'iTRAQ où les peptides isobares se décomposent par MS/MS en ions de masse différente).

Une quantification relative sans marquage est également possible. C'est le cas des méthodes « label free » dans lesquelles la quantification d'une protéine est réalisée en prenant en compte l'intensité ionique des chromatogrammes obtenus pour chaque peptide (Chelius et Bondarenko, 2002) ou par « spectral counting » basé sur l'hypothèse que plus une protéine est abondante plus le nombre de spectres MS/MS de peptides issus de cette protéine est élevé (Liu et al., 2004).

En 2007, une autre technique de quantification différentielle de protéine par spectrométrie de masse a été proposée : la méthode MeCAT (Metal Coded Affinity Tag) (Ahrends et al., 2007). Cette méthode utilise comme marqueurs des complexes macrocycliques contenant différents ions lanthanides et présente l'avantage de permettre une quantification absolue des protéines par dosage des lanthanides par ICP-MS.

L'inconvénient de ces méthodes est la nécessité d'analyser par spectrométrie de masse tous les spots présents sur les gels.

I.1.2 Séparation par chromatographie liquide

La chromatographie liquide, comme toutes les chromatographies, est un procédé physico-chimique de séparation basé sur la différence d'affinité des constituants d'un mélange entre une phase stationnaire et une phase mobile. En fonction de leur affinité pour les deux phases, les solutés vont parcourir plus ou moins rapidement la colonne et seront ainsi séparés.

Une chaîne chromatographique est constituée au minimum d'un système de pompes capable de fournir un apport en phase mobile avec un débit constant quel que soit le mode chromatographique utilisé (mode isocratique ou en gradient), d'une colonne remplie avec la phase stationnaire et d'un détecteur.

Pour l'analyse protéomique et métalloprotéomique, trois types de chromatographie liquide sont principalement utilisés :

(1) **La chromatographie sur phase inverse** qui est certainement la chromatographie liquide la plus employée pour la séparation des protéines et des peptides. Ces molécules sont séparées en fonction de leur hydrophobicité par un phénomène de partage entre une phase stationnaire

non polaire (généralement des microparticules de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes octadécyle C18, octyle C8 ou butyle C4) et une phase mobile polaire (généralement un mélange acétonitrile/eau ou méthanol/eau).

(2) **La chromatographie d'échange d'ions.** Dans ce cas, la phase stationnaire présente en surface des sites ioniques qui vont créer des interactions électrostatiques avec les constituants d'un mélange. La séparation repose sur un échange de contre ions liés à la phase stationnaire et les solutés à séparer. Le type de colonne est choisi en fonction des solutés à séparer : pour la séparation de cations, la phase stationnaire est greffée avec des fonctions (SO_3^- par exemple) capables d'échanger des cations tandis que pour la séparation d'anions, la phase stationnaire est greffée avec des fonctions (par exemple NR_4^+) capables d'échanger des anions.

(3) **La chromatographie d'exclusion stérique** qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille en utilisant des phases stationnaires constitués d'une matrice poreuse. Ces phases stationnaires sont soit des polymères réticulés, soit des silices poreuses et se présentent sous forme de grains sphériques possédant des pores compris entre 4 et 200 nm. Le principe de séparation est ici basé sur le coefficient de diffusion des solutés à l'intérieur des pores de la phase stationnaire.

1.2 Identification des protéines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse basée sur la séparation de molécules chargées en phase gazeuse selon leur rapport masse sur charge (m/z).

Un spectromètre de masse se compose de trois parties principales (figure 2.2) : (1) une source d'ionisation qui a pour fonction de volatiliser et d'ioniser l'échantillon, (2) un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z et (3) un détecteur.

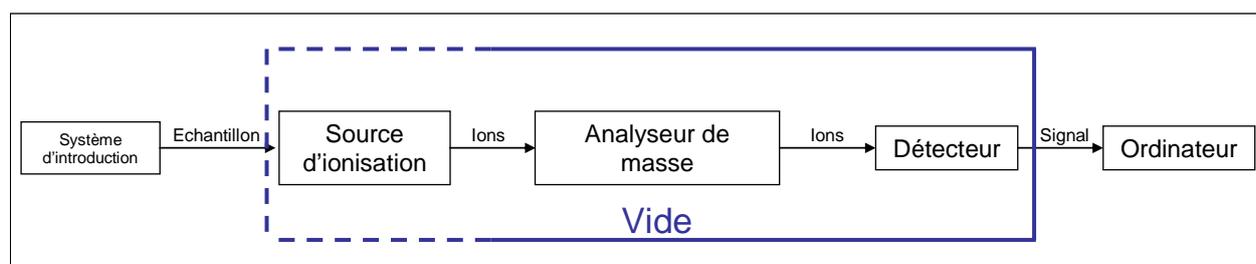


Figure 2.2 : Principaux constituants d'un spectromètre de masse.

I.2.1 Sources d'ionisation

Dans le cadre de l'étude de protéines, il est indispensable de pouvoir conserver la structure intacte de celle-ci au cours du processus d'ionisation. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation de sources d'ionisation dites « douces » telle que l'électrospray (Yamashita et Fenn, 1984 ; Fenn et al., 1989) et la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) (Karas et al., 1987 ; Tanaka et al., 1988). L'utilisation de telles sources d'ionisation est à la base du succès de la spectrométrie de masse en biologie.

I.2.1.1 Ionisation MALDI

Le MALDI est une méthode d'ionisation par laser, assistée par l'utilisation d'une matrice. Dans une source MALDI, l'énergie du laser (faisceau laser pulsé de longueur d'onde située dans l'UV) est transmise aux molécules de la matrice qui se dissocient et entraînent l'analyte. Puis, l'ionisation est réalisée en phase gazeuse par un transfert de protons entre la matrice et l'analyte. Ce processus d'ionisation engendre généralement des ions monochargés. Les matrices les plus couramment utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (peptides et protéines), l'acide sinapinique (protéines) et l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (phosphopeptides et oligosaccharides).

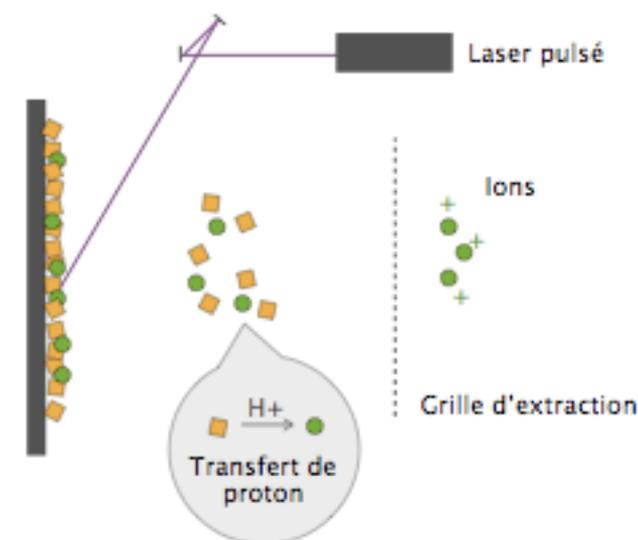


Figure 2.3 : L'ionisation MALDI (d'après De Hoffmann et Stroobant, 2003).

L'ensemble du processus d'ionisation par MALDI s'effectue sous vide ($\approx 10^{-7}$ mbar) et se compose de trois événements majeurs (figure 2.3) (De Hoffmann et Stroobant, 2003).

- (1) l'excitation des molécules de matrice par les photons du laser,
- (2) le transfert des analytes et de la matrice dans la phase gazeuse,
- (3) l'ionisation des molécules en phase gazeuse.

La source MALDI est relativement tolérante aux sels. Cette tolérance est notamment due à la nature solide du dépôt, ainsi qu'à la faible solubilisation des matrices dans l'eau. Le processus MALDI est indépendant de la taille des composés à analyser et permet la désorption et l'ionisation d'analytes de très haut poids moléculaire (>100000 Da).

1.2.1.2 Ionisation par électrospray (ESI)

L'ionisation par électrospray est réalisée par la nébulisation d'un fin nuage d'ions créés sous l'effet d'un fort champ électrique (10^6 V.m⁻¹) et d'un gaz de nébulisation (figure 2.4). Le processus d'ionisation-desorption par ESI se produit à pression atmosphérique et se divise en 3 étapes majeures (Kearle, 1993).

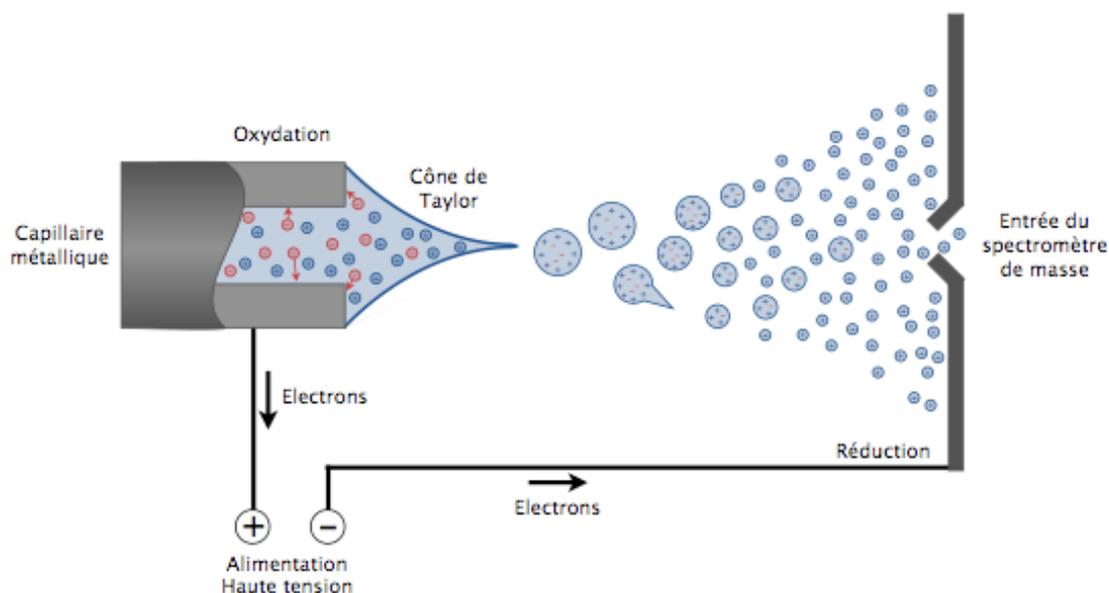


Figure 2.4 : Processus de production d'ions par électrospray (d'après Kearle, 1993)

Etape 1 : production des gouttelettes chargées à partir de l'électrolyte en solution,

Le champ électrique intense appliqué entre la pointe du capillaire et l'entrée du spectromètre de masse entraîne une polarisation du liquide et une séparation des charges positives et négatives dans celui-ci. Cette accumulation de charges à la pointe du capillaire va déstabiliser la surface du liquide qui prendra la forme d'un cône (cône de Taylor). C'est à partir de ce cône que se formeront les gouttelettes multichargées.

Etape 2 : fission des gouttelettes chargées par explosions coulombiennes,

La température de la source va entraîner la désolvatation des gouttelettes et leur rétrécissement jusqu'à un seuil tel que la limite de stabilité de Rayleigh soit atteinte. Dès lors, la gouttelette devient instable et se décompose en gouttelettes plus petites. Il se produit une succession d'explosions coulombiennes au fur et à mesure que le solvant s'évapore.

Etape 3 : transfert des ions désolvatés en phase gazeuse.

Deux types de production d'ions sont aujourd'hui admis : le mécanisme de la charge résiduelle (CRM, Dole et al., 1968) et le mécanisme de l'évaporation ionique (IEM, Iribarne et Thomson, 1976). Dans le premier cas (CRM), on considère qu'une gouttelette mère va subir une succession de fissions coulombiennes jusqu'à désolvatation totale de l'ion chargé. Tandis que dans le deuxième cas (IEM), on considère qu'à un stade donné de la vie d'une gouttelette le champ électrique de surface sera suffisant pour désorber les ions directement de celle-ci.

Il semble que le mécanisme CRM soit responsable de la formation de petits ions, alors que le mécanisme IEM soit responsable de la formation d'ions plus importants (Kearle, 2000).

Ainsi, l'électrospray permet d'ioniser rapidement des échantillons d'une solution liquide. De plus, pour des échantillons contenant plusieurs sites ionisables, la source ESI génère des ions multichargés augmentant ainsi la gamme de masse analysable par le spectromètre de masse. Par contre, l'électrospray présente une intolérance aux sels non volatils nécessitant dans de nombreux cas une étape de dessalage des échantillons ou un changement de tampon avant analyse.

Cette méthode d'ionisation par électrospray s'est considérablement miniaturisée pour donner naissance aux méthodes de micro-spray et nano-spray (Emmet et al., 1994 ; Wilm et Mann, 1996, respectivement). Dans ces méthodes, la réduction des diamètres des capillaires utilisés pour la formation du spray permet de travailler à des débits plus faibles (de l'ordre du $\mu\text{l}/\text{min}$

en micro-spray et de quelques nl/min en nano-spray). Ainsi, à volume d'échantillon constant, cette diminution des débits d'entrée permet d'avoir un temps d'analyse plus long et donc d'améliorer la précision de mesure de l'appareil. Cette miniaturisation présente également d'autres avantages tels qu'une amélioration de la tolérance au sel et une augmentation de la sensibilité (Wilm et Mann, 1996).

La miniaturisation de la source ESI et le développement des microtechnologies ont permis l'essor de nouveaux dispositifs présentant de nombreux avantages pour l'analyse protéomique. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le système Chip d'Agilent Technologies (figure 2.5) qui présente l'avantage de diminuer les volumes morts et combiner une nano-colonne de chromatographie et une source nano-spray sur une puce de 4,8 cm².

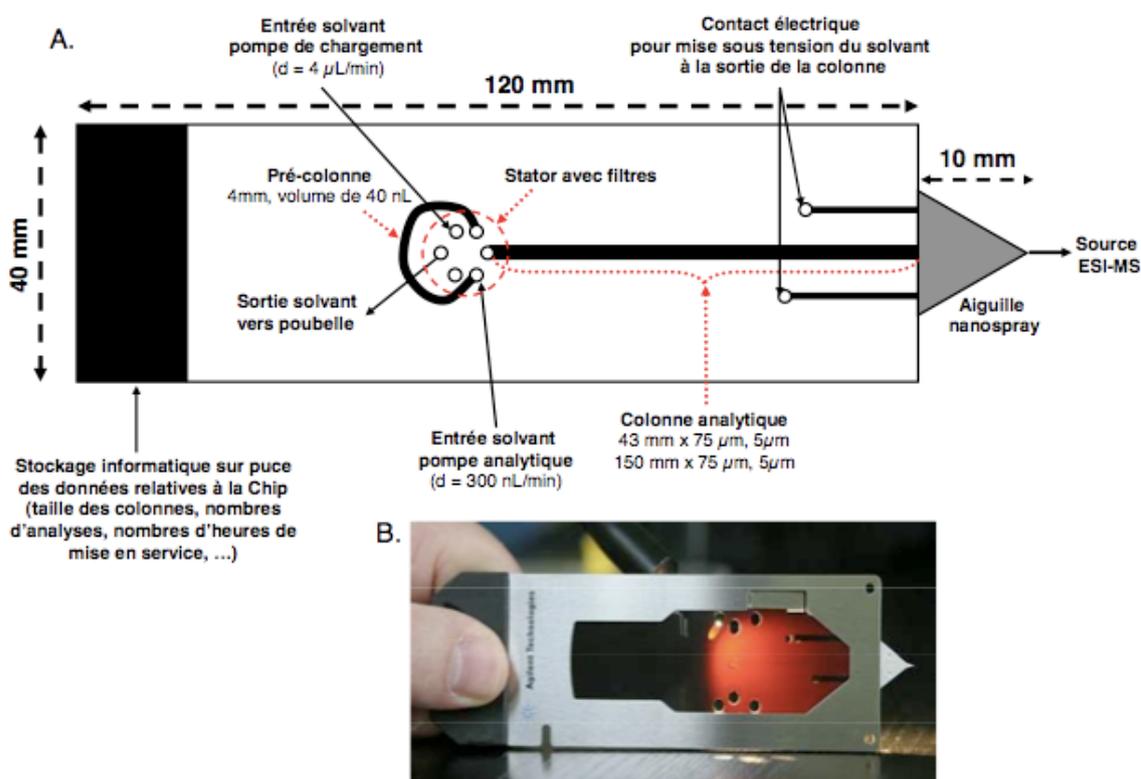


Figure 2.5 : Le système Chip (Agilent Technologies).

(A) Représentation schématique. (B) Photo d'une Chip utilisée au cours de cette thèse. Le système Chip intègre une précolonne, une colonne analytique et l'aiguille du nanospray dans un même ensemble.

I.2.2 Analyseurs

L'analyseur est l'élément clé d'un spectromètre de masse. En effet, ce sont les caractéristiques et les performances de celui-ci qui conditionnent la qualité des spectres obtenus. Quatre types d'analyseurs sont utilisés couramment en analyse protéomique : l'analyseur à temps de vol (TOF), l'analyseur quadripolaire (Q), la trappe ionique (IT), et les analyseurs à transformé de Fourier (FT-ICR et Orbitrap). L'utilisation combinée de plusieurs analyseurs en série permet de tirer profit de leurs avantages respectifs en spectrométrie de masse en tandem (tableau 2.3)

Instrument	HCT Ultra Bruker Dal.	Amazon Bruker Dal.	LCT Waters corp.	Ultraflex Bruker Dal.	Synapt HDMS Waters corp.	MaXis Bruker Dal.	LTQ-Orbitrap Thermo Sci.	SolariX Bruker Dal.
Type d'analyseur	IT	IT	TOF	TOF-TOF	Q-TOF	Q-TOF	LTQ-Orbitrap	FT-ICR
Résolution	5 000	20 000	5 000	25 000	17 500	40 000	100 000	1 000 000
Précision de mesure	80 ppm	30 ppm	3 ppm	3 ppm	3 ppm	0,6 ppm	3 ppm	1 ppm
Gamme de masse (m/z)	4000	3 000	30 000	-	32 000	20 000	4 000	6 000
Sensibilité	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++
Vitesse d'acquisition	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
Possibilité MS/MS	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui

Tableau 2.3 : Principales caractéristiques techniques et performances moyennes des instruments disponibles sur le marché (sources : Bruker Daltonics, Waters Corporation et Thermo Scientific).

I.2.2.1 Analyseur à temps de vol (TOF)

Le principe de ce type d'analyseur est de séparer des ions et de mesurer leur rapport m/z en fonction du temps nécessaire à ceux-ci pour parcourir la distance d'un tube de vol sous vide poussé (de l'ordre de $2 \cdot 10^{-7}$ mbar). Après avoir acquis une énergie cinétique dans la source (MALDI ou ESI) qui est dépendante de leur masse et de leur charge, les ions entrent dans une zone « libre de champ » dans laquelle ils sont séparés en fonction de leur vitesse (et donc de leur rapport m/z).

Les ions générés au niveau de la source ne se forment pas au même endroit et au même moment. Ainsi, des ions possédant un même rapport m/z peuvent acquérir une énergie

cinétique différente. Pour pallier ces problèmes, deux technologies ont été mises en place sur ce type d'instrument (exemple d'un MALDI-TOF : figure 2.6) :

- l'utilisation d'une lentille (notée DE sur la figure 2.6), située entre la source et l'analyseur TOF, qui permet de ralentir les ions un court instant afin qu'ils pénètrent simultanément dans le tube de vol. C'est le principe de l'extraction retardée.
- l'utilisation d'un réflecteur électrostatique (figure 2.6) qui permet de résoudre le problème de différence d'énergie cinétique d'ions de rapport m/z identique. Ce réflecteur est composé d'une série d'anneaux ou de grilles sur lesquels sont appliqués des potentiels croissants et faisant office de miroir électrostatique. En fonction de leur énergie cinétique, les ions pénètrent plus ou moins profondément dans le réflecteur. Ainsi, des ions de même rapport m/z ayant des énergies cinétiques légèrement différentes (ions rouge et violet sur la figure 2.6) sont refocalisés et arrivent au détecteur au même moment.

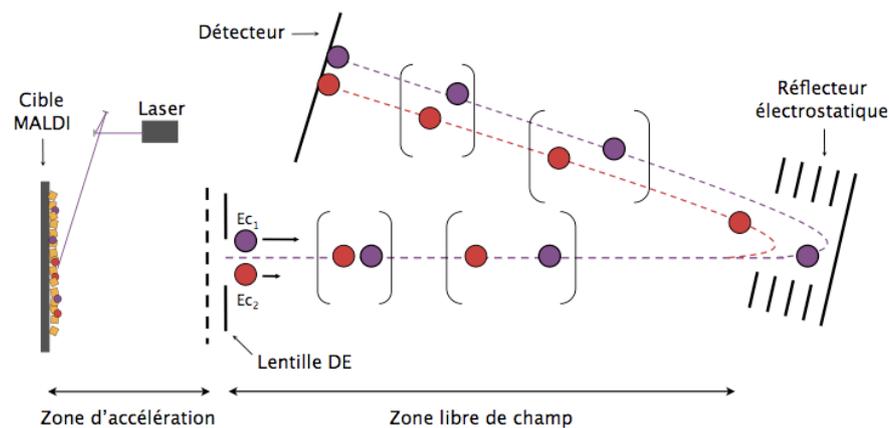


Figure 2.6 : Schéma de fonctionnement d'un instrument MALDI-TOF avec système d'extraction retardée (lentille DE) et réflecteur électrostatique.

Les ions rouges et violets sont des ions de même rapport m/z ayant des énergies cinétiques légèrement différentes.

1.2.2.2 Analyseur quadripolaire (Q)

Un analyseur quadripolaire est constitué de deux couples de barres métalliques parallèles et opposées 2 à 2 (figure 2.7). Ces couples de barres sont portés à un potentiel oscillant opposé et caractérisé par son amplitude et sa fréquence.

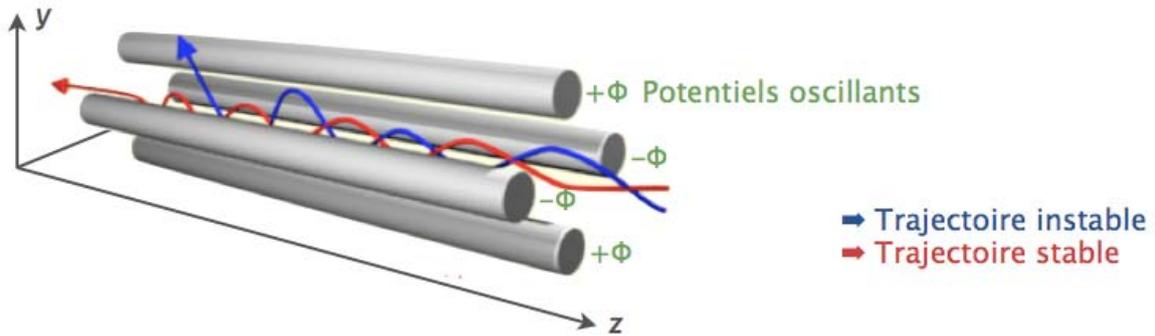


Figure 2.7 : Schéma de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire.

La trajectoire des ions de différents rapports m/z dépend des potentiels appliqués au niveau des barres. Seuls les ions ayant une trajectoire stable arriveront au détecteur.

Le principe de l'analyseur quadripolaire est basé sur la stabilité d'un faisceau d'ion d'un rapport m/z donné le long de l'axe z , en fonction du potentiel appliqué. Dès lors, en faisant varier ce potentiel, il est possible de transmettre successivement chacun des ions selon leur rapport m/z .

1.2.2.3 Trappe ionique (IT)

Le principe de la trappe ionique est de piéger l'ensemble des ions à analyser puis de les éjecter selon leur rapport m/z croissant.

Une trappe ionique est constituée de trois électrodes : une électrode annulaire en forme de diabolo et deux électrodes chapeaux à géométrie hyperbolique par lesquelles entrent et sortent les ions (figure 2.8). L'ensemble est soumis à une pression d'hélium de l'ordre de $5 \cdot 10^{-6}$ bar. Ce gaz permet d'augmenter l'efficacité de piégeage des ions et est essentiel pour leur fragmentation éventuelle.

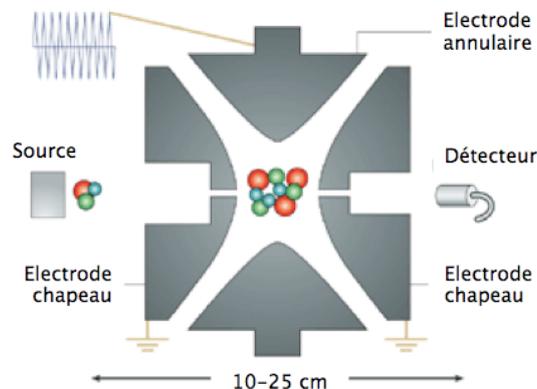


Figure 2.8 : Schéma de l'analyseur trappe ionique (d'après March, 1997).

Les tensions oscillantes appliquées au niveau de l'électrode annulaire permettent de piéger les ions sur des trajectoires stables. L'analyse est réalisée en déstabilisant les trajectoires des ions de rapport m/z défini.

En pratique, une fois qu'ils ont pénétré dans la trappe, les ions sont piégés par l'application d'une tension oscillante (radiofréquence) au niveau de l'électrode annulaire. Cette radiofréquence stabilise la trajectoire des ions dans un puits de potentiel dont la profondeur est proportionnelle à la tension appliquée. Puis l'éjection des ions peut se réaliser de deux façons : soit par balayage croissant de l'amplitude de la radiofréquence (éjection simple) soit par application d'une tension supplémentaire sur les électrodes chapeaux permettant de faire entrer en résonance les ions de différents rapport m/z (éjection résonante). Dans les deux cas, l'éjection des ions se fait dans le sens des rapports m/z croissants. Par contre, dans le cas d'une éjection résonante, il est possible de mettre en résonance des ions de rapport m/z supérieur à une valeur choisie afin de les éjecter avant des ions de rapport m/z inférieur.

1.2.2.4 Analyseurs à transformée de Fourier

Deux types d'analyseurs à transformée de Fourier sont utilisés actuellement pour l'analyse protéomique : l'analyseur à résonance cyclotronique des ions (FT-ICR) et l'analyseur Orbitrap™.

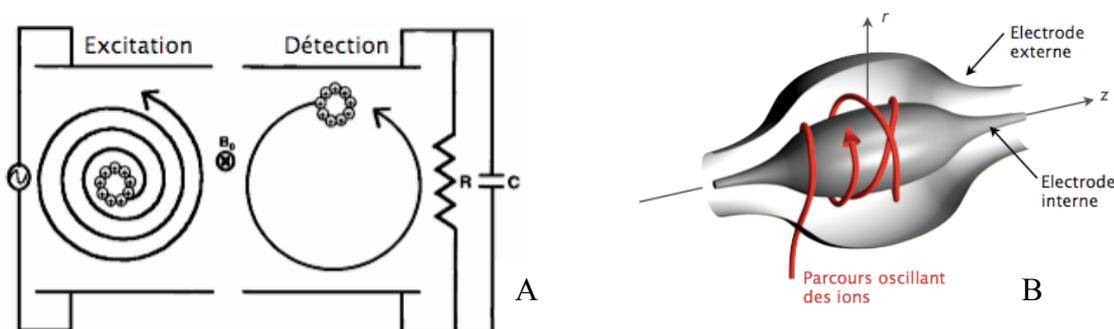


Figure 2.9 : Analyseurs à transformée de Fourier.

(A) Schéma de l'analyseur FT-ICR. Le mouvement cyclotronique incohérent des ions dans le champ magnétique est converti en mouvement cohérent et détectable par l'application d'un champ électrique oscillant à la fréquence de chaque ion de rapport m/z donné (D'après Marshall et al., 1998).

(B) Schéma de l'Orbitrap™. Mouvement oscillant des ions autour de l'électrode interne de l'Orbitrap™.

Dans le premier type d'analyseur, les ions sont piégés dans une cellule où règne un champ magnétique uniforme forçant les ions à suivre une trajectoire cyclotronique (figure 2.9A). L'application d'un champ électrique balayant une gamme de fréquence identique à celle de la rotation des ions rend leur mouvement cohérent. Le mouvement cyclotronique cohérent génère alors un signal électrique entre deux électrodes opposées qui sera mesuré et converti en fréquence. L'échantillon global conduit à un signal complexe, nommé interférogramme,

composé de l'ensemble des fréquences induites par l'ensemble des ions de rapport m/z différents. De cet interférogramme sera déterminée, par transformée de Fourier, la totalité des rapports m/z de la population d'ions. La détermination des valeurs des rapports m/z des ions est reliée à la fréquence de rotation des ions.

Le principal inconvénient de cette méthode est lié à la nécessité de disposer d'aimant supraconducteur permettant la génération d'un champ magnétique élevé, ce qui engendre un coût non négligeable.

Un système moins onéreux a été mis sur le marché, présentant des spécifications de résolution et de précision de mesure de masse similaires au FT-ICR, mais sans utiliser d'aimant supraconducteur : l'OrbitrapTM. Dans ce type d'analyseur, la séparation des ions n'a pas lieu dans un champ magnétique mais dans un champ électrique généré par deux électrodes (figure 2.9B). Les ions tournent autour de l'électrode interne et oscillent selon une fréquence propre à leur rapport m/z . Une image du courant induit par ces oscillations est convertie en un spectre de fréquence et les rapports m/z des ions présents seront déterminés à l'aide de la transformée de Fourier.

I.2.3 Fragmentation des ions et spectrométrie de masse en tandem

L'intérêt de la spectrométrie de masse en tandem réside dans la possibilité d'obtenir des informations de séquence des peptides grâce à leur fragmentation dans le spectromètre de masse. Cette fragmentation est réalisée en phase gazeuse.

Le premier modèle de fragmentation des peptides en phase gazeuse a été établi par Roepstorff et Fohlmann (Roepstorff et Fohlmann, 1984). En 1990, ce modèle a été complété et simplifié par Biemann (figure 2.10, Biemann, 1990) et fait toujours référence aujourd'hui.

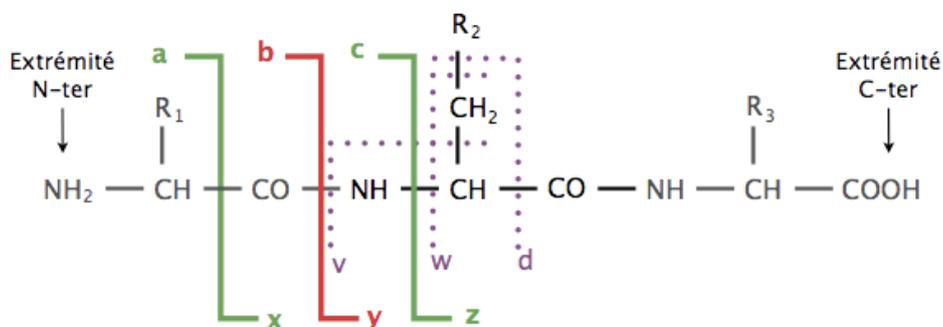


Figure 2.10 : Nomenclature de fragmentation des peptides en phase gazeuse (d'après Biemann, 1990).

En fonction de la localisation de la fragmentation et de la partie du peptide portant la charge de l'ion, différents types d'ions peuvent être générés. Dans le cas de coupures au niveau de la chaîne peptidique, les séries a, b et c correspondent aux ions dont la charge est portée par la partie N terminale ; tandis que les séries x, y et z correspondent aux ions dont la charge est portée par la partie C terminale. Dans le cas de fragmentation des chaînes latérales des acides aminés, ce sont les séries v, w et d qui seront générées.

La nature des fragments générés va dépendre du mode de fragmentation utilisé. Les principaux modes de fragmentation des peptides utilisés en spectrométrie de masse sont la fragmentation (ou dissociation) induite par collision (CID) et la dissociation par transfert d'électron (ETD) ou par capture d'électron (ECD).

Dans le cas de la CID, la fragmentation est réalisée en augmentant l'énergie interne des ions par collision de ceux-ci dans un gaz inerte (hélium ou argon). Ce mode de fragmentation implique une délocalisation du proton à différents endroits du squelette peptidique. En fonction du type d'analyseur, on observe deux types de fragmentation en CID, les fragmentations basse énergie (quelques eV, IT et Q-TOF) et les fragmentations haute énergie (quelques keV, TOF-TOF). Pour les fragmentations basse énergie, les liaisons peptidiques sont les principaux sites de fragmentation et les ions des séries b et y seront majoritaires. Ainsi, les spectres MS/MS obtenus sont relativement simples à analyser. En effet, la différence de masse entre deux ions consécutifs d'une même série issus d'un même parent permet l'identification de l'acide aminé. Néanmoins, pour les acides aminés isobares (leucine et isoleucine) cette distinction sera impossible. Notons que pour des acides aminés de masse très proche, leur distinction est éventuellement possible avec un spectromètre de masse de haute résolution et de grande précision de masse. En fragmentation CID haute énergie, les ions de séries d, v et w sont également générés rendant les spectres plus complexes mais également plus informatifs.

La fragmentation par ECD, technique de dissociation spécifique aux spectromètres de masse FT-ICR, est basée sur la capture exothermique d'un électron par les peptides chargés. Dans le cas de l'ETD, l'électron nécessaire à la fragmentation d'un peptide est apporté par un radical anion (anthracène, fluoranthène par exemple). Dans les deux cas, le site de fragmentation est aléatoire et toutes les séries peuvent être générées. Dès lors, les spectres MS/MS obtenus sont beaucoup plus complexes à analyser mais ce type de fragmentation apporte plus d'informations sur la structure des peptides, notamment au niveau des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation).

Au cours de cette thèse, nous avons exclusivement réalisé des identifications de protéine en mode MS/MS à l'aide d'une trappe ionique. Une trappe ionique permet, grâce à ses capacités de piégeage et d'éjection sélective des ions, de réaliser de la MS/MS et de la MSⁿ. Il est ainsi possible d'isoler des ions d'un rapport m/z donné, puis de les fragmenter et d'analyser les ions fragments ainsi générés (figure 2.11).

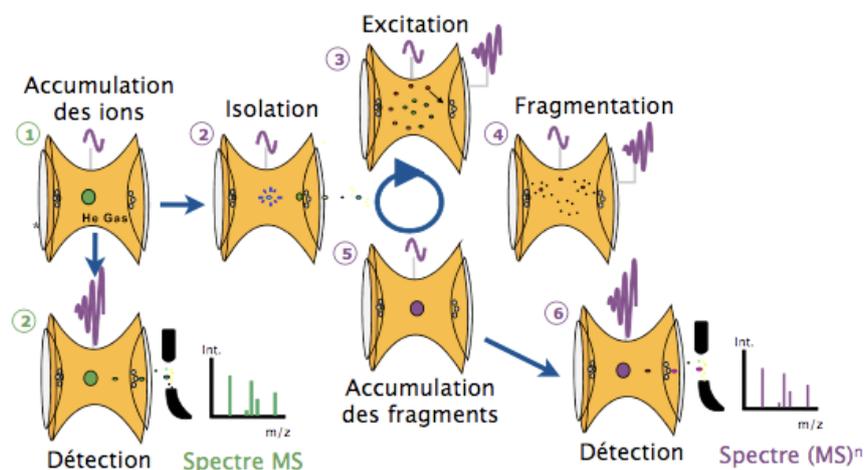


Figure 2.11 : Principe de l'analyse MS/MS et MSⁿ à l'aide d'une trappe ionique.
 En mode MS/MS, des ions parents sont sélectionnés à partir d'un spectre MS puis sont isolés et fragmentés en ions fils qui seront détectés.
 En mode MSⁿ, l'isolement et la fragmentation de nouveaux ions fils sont répétés n fois.

1.3 Détection d'éléments métalliques

Les méthodes de séparation de protéines compatibles avec la détection des métalloprotéines sont la chromatographie liquide, l'électrophorèse capillaire et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les techniques couramment utilisées pour la détection des éléments métalliques dans des échantillons biologiques sont la spectrométrie d'absorption atomique (SAA), la spectrométrie de masse ICP-MS et les techniques de spectrométrie de fluorescence X.

Une des caractéristiques essentielles des modes de détection des éléments métalliques contenus dans les métalloprotéines est leur sensibilité (tableau 2.4). De plus, pour les techniques permettant d'obtenir un profil métallique spatial, la résolution sera un facteur très important.

Méthodes de détection	Limite de détection métallique	Résolution spatiale	Méthode non destructive	Référence
FA-SAA	ppm	-	non	Garcia et al., 2006
Micro-PIXE	ppm	1-10 μm	oui	Garman et Grime, 2005
SR-XRF	ppm	< 1 μm	oui	Garman et Grime, 2005
ICP-MS	ppb	-	non	Labat et al., 2003
LA-ICP-MS	ppb	20 μm	non	Becker et al., 2008

Tableau 2.4 : Comparatif des performances de méthodes de détection compatibles avec l'analyse de protéine liant les métaux.

FA-SAA : spectrométrie d'absorption atomique de flamme ; Micro-PIXE : émission de rayon X induite par un microfaisceau de particules ; SR-XRF : émission de fluorescence X induite par rayonnement synchrotron ; ICP-MS : spectrométrie de masse par plasma inductif couplé ; LA-ICP-MS : ICP-MS couplé à l'ablation laser. Les valeurs de limites de détection et de résolution spatiale sont indicatives et dépendent de l'appareillage utilisé et des éléments analysés.

La technique de choix pour la détection de métaux dans des protéines séparées par chromatographie liquide ou par électrophorèse capillaire est certainement l'ICP-MS. En effet, l'ICP-MS permet une détection multi-élémentaire et dispose d'une très grande sensibilité. De plus, cette technique offre la possibilité d'un couplage en ligne avec ces méthodes de séparation.

En ce qui concerne des mélanges protéiques séparés sur gel de polyacrylamide, plusieurs méthodes de détection métallique sont utilisées : l'ICP-MS, la spectrométrie de fluorescence X et la spectrométrie d'absorption atomique (Ma et al., 2004). Depuis 2004, l'ICP-MS et la spectrométrie de fluorescence X sont les techniques les plus couramment rencontrées dans la littérature.

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé l'ICP-MS comme méthode de détection des éléments métalliques. Ainsi, cette technique sera présentée en détail, tandis que nous aborderons plus brièvement le principe des autres techniques de détection utilisables pour l'analyse métallogénomique.

I.3.1 Spectrométrie de masse ICP-MS

Un spectromètre de masse ICP-MS est composé au minimum d'un système d'introduction de l'échantillon permettant son passage à l'état gazeux, d'une source par plasma ICP permettant l'atomisation et l'ionisation de l'échantillon, d'un analyseur (généralement un analyseur quadripolaire) permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z et d'un détecteur. Compte tenu de nombreuses possibilités d'interférences, la plupart des appareils actuels possèdent un système permettant de s'en affranchir, comme par exemple une cellule de

collision/réaction pour le modèle de la marque Agilent (Agilent 7500ce) utilisé au cours de ce travail de thèse.

Le schéma de principe de l'appareil utilisé au cours de cette thèse est présenté ci-dessous (figure 2.12).

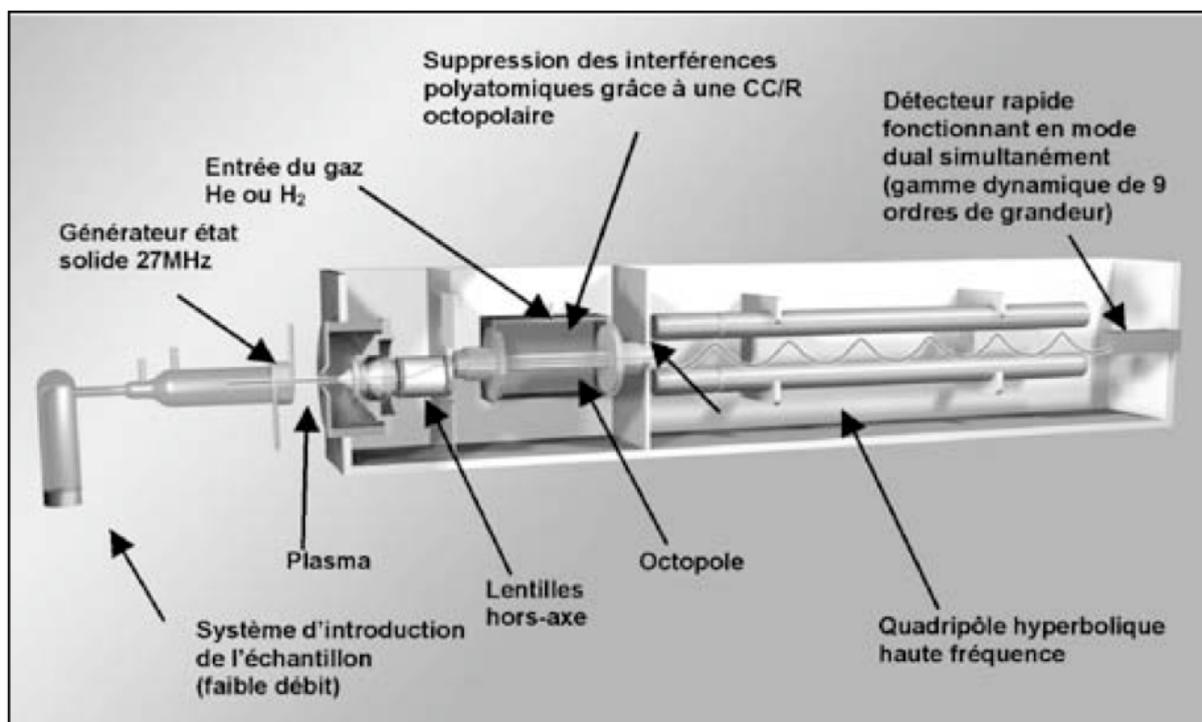


Figure 2.12 : Schéma de principe de l'ICP-MS Agilent 7500ce (d'après Darrouzes, Agilent Technologies).

1.3.1.1 Introduction de l'échantillon

L'introduction de l'échantillon va dépendre de l'état dans lequel il se trouve. Généralement, pour l'analyse de métalloprotéines, celui-ci est soit sous forme liquide, soit à l'état solide (gel d'électrophorèse).

Dans le premier cas, la solution sera emmenée dans un nébuliseur par une pompe péristaltique. Le rôle du nébuliseur est de permettre le passage de l'échantillon de l'état liquide à l'état gazeux (sous forme d'un nuage de particules extrêmement fines). Les nébuliseurs utilisés sont des nébuliseurs concentriques dans lesquels la nébulisation est réalisée par le mélange simultané d'un gaz (argon) et de l'échantillon liquide au travers d'un orifice de très faible diamètre. En général, une chambre de nébulisation est placée à la suite du nébuliseur et permet de sélectionner les gouttelettes ayant une taille optimale et de les transmettre jusqu'au plasma. La taille des gouttelettes doit être petite pour que celles-ci soient totalement désolvatées et ionisées en raison d'un temps de résidence dans le plasma court. Les

gouttelettes trop grosses seront condensées dans la chambre de nébulisation et seront éliminées. Au cours de cette étape, une grande proportion de l'échantillon est perdue (environ 95%). Ainsi, des nébuliseurs à injection directe (ou nébuliseur à consommation totale) ont été développés. Ce procédé a notamment été employé dans notre laboratoire lors de l'étude de métalloprotéines par couplage de l'électrophorèse capillaire avec l'ICP-MS (CE-ICP-MS) et à permis de gagner un facteur 10 sur la limite de détection du zinc et du cuivre (Chamoun et al., 2005). Shaumlöffel et al. (2003) ont également montré l'intérêt de ce type de nébuliseur pour le couplage d'une colonne capillaire d'HPLC pour la détection de sélénopeptides. Ces auteurs ont rapporté une limite de détection jusqu'à 150 fois plus faible qu'avec l'utilisation d'une chambre de nébulisation standard.

Pour des échantillons protéiques sous forme solide (gel d'électrophorèse, coupe de tissus), l'introduction par ablation laser (LA) est particulièrement bien adaptée (Neilsen et al., 1998). Ce système se compose :

- (1) d'une cellule d'ablation dans laquelle est placé l'échantillon. Cette enceinte hermétique, mobile dans les trois dimensions, permet un balayage en deux dimensions de la surface à analyser, mais également en profondeur,
- (2) d'un laser permettant l'ablation de l'échantillon. Le faisceau laser, focalisé par un jeu de lentilles, est envoyé sous forme d'impulsions et permet l'explosion du solide et la formation d'un aérosol,
- (3) d'une entrée de gaz de transport. Ce gaz balaye continuellement la surface de l'échantillon afin de transmettre la matière ablatée vers la torche plasma.

L'élément clé de ce système est le laser. En effet, le choix du laser conditionnera les caractéristiques du système complet. Les caractéristiques principales d'un laser sont l'énergie du faisceau ($>10^9 \text{W/cm}^2$) et la durée de l'impulsion (de la nanoseconde à la femtoseconde). Ces deux critères sont essentiels pour qu'ait lieu la sublimation de la matière et ainsi son explosion et l'éjection de particules. C'est principalement sur la durée de l'impulsion que se sont portés les développements récents. Plus la durée de l'impulsion est faible (de l'ordre de la femtoseconde) plus les performances en termes de rapport signal sur bruit, de résolution spatiale et de fractionnement élémentaire sont améliorées (Russo et al., 2004).

D'autres procédés d'introduction de matériel à l'état solide peuvent être utilisés, comme la vaporisation électrothermique. Dans ce procédé, l'échantillon, placé dans un four, est soumis à une augmentation progressive de température qui permet la vaporisation de l'analyte. Comme pour l'ablation laser, l'analyte sera ensuite transporté jusqu'à la torche plasma par un gaz de transport.

Enfin, il est également possible d'éluer des protéines d'un gel de polyacrylamide afin de les transférer en solution pour permettre l'analyse des éléments métalliques contenus dans celles-ci par ICP-MS. Cette méthode présente l'inconvénient majeur de rajouter une étape à l'analyse, augmentant sa durée et les risques de perte et de contaminations. Néanmoins, en prenant le maximum de précautions, nous verrons au cours du manuscrit que ce procédé peut être tout à fait satisfaisant.

1.3.1.2 Atomisation et ionisation des analytes

L'atomisation et l'ionisation des éléments constituant l'échantillon se réalisent dans la torche à plasma. La torche est constituée d'un tube en quartz et d'un injecteur en son centre, tous les deux alimentés par de l'argon. Cette torche est située au centre d'une bobine inductive qui fournit une puissance d'environ 1500 à 1650 W permettant de générer et d'entretenir le plasma. La température d'un plasma d'argon avoisine les 8000 K. Dès lors, à son entrée dans le plasma grâce au gaz injecteur, l'échantillon, sous forme d'aérosol, est désolvaté, atomisé puis les atomes sont ionisés sous forme de cations monovalents.

1.3.1.3 Séparation des ions dans l'analyseur

Les ions sont introduits dans une interface qui a pour rôle de transférer les ions générés à pression atmosphérique dans le plasma d'argon vers l'analyseur où règne un vide poussé (10^{-5} mbar). Cette interface est composée de deux cônes, l'échantillonneur (« sampler » en anglais) et l'écrémeur (« skimmer » en anglais) qui permettent de récupérer les ions formés dans le plasma, et de plusieurs lentilles qui permettent de refocaliser et d'optimiser la trajectoire des ions à analyser tout en éliminant les photons pouvant parasiter le détecteur.

Les ions sont par la suite analysés dans l'analyseur. Différents analyseurs peuvent être utilisés en ICP-MS : quadripôle, TOF, secteur magnétique. L'analyseur quadripolaire est le plus

souvent rencontré sur ce type d'appareil. Le principe de celui-ci a été présenté dans le paragraphe I.2.2.2. L'avantage de ce type d'analyseur est son coût. Par contre le principal inconvénient est sa résolution ne permettant pas de différencier les interférences polyatomiques possibles à certaines masses de l'élément à détecter. Dès lors, ce type d'analyseur est généralement couplé à une cellule de collision/réaction. Dans le système que nous avons utilisé au cours de cette thèse, la chambre de collision/réaction est un octopôle dans lequel est introduit un gaz. En fonction des interférences à éliminer, le mode collision ou le mode réaction est utilisé.

En mode collision, un gaz inerte (He par exemple) perturbe le transfert des ions vers l'analyseur : les ions polyatomiques interférents, étant plus larges que l'ion à analyser, subissent plus de collisions. Dès lors, leur énergie cinétique est diminuée et en appliquant une barrière énergétique en amont de l'analyseur, ces ions sont éliminés. Ce mode est préconisé lors de l'analyse des éléments compris entre $Z=40$ et $Z=80$.

En mode réaction, un gaz réactif est utilisé (H_2 par exemple). Deux stratégies peuvent être utilisées : la réaction de modification de l'interfèrent ou la réaction de condensation de l'analyte. Dans tous les cas, le principe repose sur le fait que la réaction du gaz réactif est uniquement possible soit avec l'interfèrent soit avec l'analyte. Le rapport m/z est ainsi déplacé pour l'un des deux (analyte ou interfèrent) éliminant l'interférence.

I.3.2 Spectrométrie de fluorescence X

Le principe de la spectrométrie de fluorescence X est basé sur l'émission de rayons X par des ions excités et se décompose en trois étapes :

- (1) *Excitation de l'atome* : une source permet d'éjecter un électron d'une couche interne près du noyau (couche K ou L),
- (2) *Réarrangement électronique* : la lacune électronique de la couche interne est remplie par un électron d'une couche plus externe,
- (3) *Émission d'un rayon X* : lors du réarrangement électronique, l'atome émet un rayon X pour libérer l'excédant d'énergie qui sera caractéristique d'un élément donné.

En spectrométrie de fluorescence X conventionnelle (XRF, X-ray fluorescence), des photons sont bombardés sur l'échantillon à analyser pour exciter les ions. L'émission de rayons X peut également être induite par un bombardement de particules chargées, particules α ou protons, (technique PIXE) ou par rayonnement synchrotron (SR-XRF et μ SR-XRF). Ces techniques sont adaptées pour la caractérisation *in situ* d'éléments dans un liquide ou à la surface d'un solide.

Dans le cadre de détection de métalloprotéines dans un mélange protéique séparées par électrophorèse sur gel ou sur des coupes de cellules ou d'organes, les techniques micro-PIXE et SR-XRF ont été décrites. Ces techniques utilisent des sources très fines et présentent deux avantages par rapport à la spectrométrie de fluorescence X conventionnelle : une meilleure sensibilité et une meilleure résolution spatiale (tableau 2.4).

Les limites de détection sont cependant moins bonnes que celles obtenues avec un ICP-MS couplé à un système d'ablation laser (tableau 2.4). Mais contrairement à une détection par LA-ICP-MS, ces méthodes de détection présentent l'avantage d'être non destructives. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour l'identification de métalloprotéines dans un mélange séparé par électrophorèse sur gel. En effet, il est possible sur un même gel de localiser les métalloprotéines grâce au profil métallique puis d'identifier les protéines par les techniques classiques de protéomique.

I.3.3 Spectrométrie d'absorption atomique et d'émission atomique

Le principe de la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) est basé sur l'absorption d'énergie par un atome passant de son état fondamental à un état excité. Cette énergie est fournie par une source lumineuse de longueur d'onde spécifique. Dans un spectromètre d'absorption atomique, l'échantillon est atomisé à une forte chaleur (obtenu par exemple dans une flamme) et les atomes sont alors soumis à une radiation lumineuse de longueur spécifique de l'élément à doser. Ainsi en utilisant un détecteur capable de quantifier l'intensité de lumière transmise après passage dans l'échantillon, il est possible de réaliser une analyse quantitative. L'intensité de lumière absorbée sera proportionnelle à la concentration de l'analyte en suivant la relation $A = k.C$ (avec A l'absorbance de l'échantillon, k un coefficient propre de à chaque élément pour la longueur d'onde choisie, et C la concentration en analyte)

En spectrométrie d'émission atomique (AES ou OES), le principe est lié à l'émission de photons par une population d'atomes retournant de l'état excité à leur état fondamental. Dans ce type d'analyse, tous les atomes d'un échantillon sont excités par atomisation et ionisation à très haute température (obtenue avec un ICP par exemple). Les atomes reviennent à leur état fondamental en émettant des radiations de longueur d'onde caractéristique de l'élément. Ainsi, les appareils d'analyse par émission atomique nécessitent des optiques de très haute qualité afin de discriminer avec une excellente résolution l'ensemble des radiations émises par un échantillon.

II. Stratégies pour l'analyse protéomique et métallobiotéomique

Afin de permettre une identification ou une caractérisation de protéines dans un mélange complexe, il est nécessaire de séparer ces molécules. Ainsi, les méthodes utilisées doivent être adaptées à la séparation des biomolécules et être compatibles avec leur analyse. Les méthodes couramment utilisées pour la séparation des biomolécules sont les méthodes d'électrophorèse et de chromatographie liquide. Dans le cas d'une analyse de protéines liant des métaux, il est indispensable de recourir à des méthodes séparatives permettant la conservation de ces interactions et à des techniques de détection des éléments métalliques (figure 2.13).

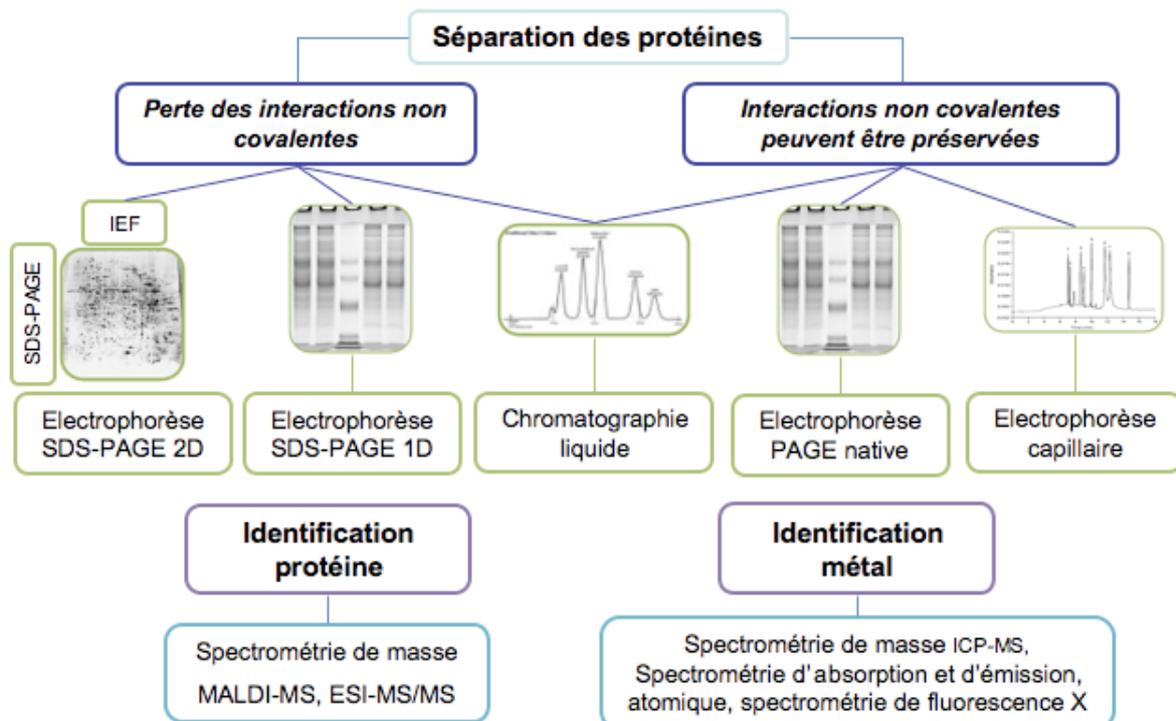


Figure 2.13 : Les méthodes séparatives utilisables pour l'identification de protéines et de métallobiotéomiques.

II.1 Stratégies analytiques pour la séparation des protéines et des peptides en analyse protéomique

Les stratégies utilisées pour l'identification de protéines dans un échantillon complexe sont des stratégies reposant sur une séparation de protéines par une ou plusieurs méthodes séparatives puis les protéines sont digérées par une enzyme en peptides avant l'analyse par spectrométrie de masse. Ces stratégies sont nommées en protéomique des stratégies « bottom-up ».

La figure 2.13 présente les méthodes utilisables pour la séparation des protéines, leur identification et la détection d'éléments métalliques présents dans celles-ci. Lorsque seule l'identification des protéines est recherchée, il est préférable de travailler sur des protéines sous forme dénaturée. En effet, une meilleure résolution est obtenue. Les techniques de choix sont l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE, la focalisation isoélectrique et la chromatographie liquide.

Une méthode de choix pour la séparation des protéines est l'électrophorèse sur gel en deux dimensions. En effet, jusqu'à 5000 protéines peuvent être séparées sur un seul gel bidimensionnel (Görg et al., 2004). Ce type de séparation permet la réalisation d'analyses différentielles à partir des cartes protéiques d'échantillons différents et l'identification des protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée. Bien que longue, l'identification de toutes les protéines séparées sur ces gels peut également être réalisée. Les protéines peuvent être également séparées par électrophorèse sur gel monodimensionnel et identifiées après découpe systématique de ce gel. Les gels monodimensionnels de type SDS-PAGE sont plus adaptés aux protéines hydrophobes ou ayant des pI extrêmes que les gels bidimensionnels.

Une stratégie « shotgun », équivalente protéomique de la stratégie « shotgun » mise au point pour le séquençage génomique, sera privilégiée pour identifier la totalité des protéines contenues dans un échantillon. Cette méthode consiste à digérer l'ensemble des protéines d'un échantillon puis à séparer les peptides générés et à les analyser directement par spectrométrie de masse MS et MS/MS. En raison de la complexité des mélanges peptidiques à analyser, la stratégie MuDPIT (MultiDimensional Protein Identification Technology) (Link et al., 1999) est généralement employée et consiste en deux séparations orthogonales par HPLC avant l'analyse par spectrométrie de masse. Cette stratégie présente l'avantage de s'affranchir des

gels d'électrophorèse 2D et d'être automatisable. Néanmoins, pour des échantillons très complexes, il peut être nécessaire de réaliser un pré-fractionnement des protéines avant la digestion en peptides.

Lorsqu'une caractérisation fine d'une protéine est requise, une stratégie « top down » peut être employée. Dans cette stratégie, une protéine intacte est ionisée dans une source électrospray et des informations de masse peuvent être obtenues sur la protéine entière. Dans certains cas elle peut être fragmentée en phase gazeuse dans le spectromètre de masse pour obtenir des informations de structure. Cette stratégie permet d'obtenir une caractérisation plus précise des modifications post-traductionnelles d'une protéine qu'une stratégie « bottom-up ». (Siuti et Kelleher, 2007) et peut permettre un meilleur recouvrement de séquence (Kelleher et al., 1999).

II.2 Stratégies pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse

Les stratégies d'identification de protéines par spectrométrie de masse ont connu un essor considérable d'une part grâce à la disponibilité d'une importante masse de données de séquences contenues dans les banques de données, et d'autre part, grâce au développement d'outils de bioinformatique nécessaires à la gestion et à l'utilisation d'une telle quantité de données.

Deux méthodes pour l'identification de protéines par spectrométrie de masse sont essentiellement employées aujourd'hui : la méthode de l'empreinte peptidique massique (PMF pour Peptide Mass Fingerprinting) et les approches par chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

II.2.1 Méthode d'empreinte peptidique massique

La méthode PMF consiste en la comparaison de la liste de masses expérimentales de peptides issus d'une protéine par digestion enzymatique, à l'ensemble des listes de masses théoriques calculées *in silico* pour les protéines présentes dans les banques de données (figure 2.14). Cette stratégie reprend le concept proposé par l'équipe de U.K. Laemmli selon lequel une protéine peut être caractérisée par son profil de digestion peptidique après séparation sur gel

Dans cette stratégie, la validation d'une identification d'une protéine va dépendre de plusieurs critères qui sont indiqués dans les directives de publications de données de protéomiques (Wilkins et al., 2006) :

- le « score » attribué par le moteur de recherche,
- le taux de recouvrement de séquence et le nombre de peptides identifiés,
- les erreurs de masse observées,
- le nombre de masses n'ayant pas été attribuées à la protéine identifiée,
- la comparaison de la masse molaire et du pI théorique à ceux observés dans le cas d'une séparation sur gels 2D.

Malgré ses nombreux avantages, cette stratégie souffre de plusieurs limites (Clauser et al., 1999) :

- les échantillons analysés doivent être simples afin d'éviter les superpositions d'empreinte massique de plusieurs protéines rendant difficile (voire impossible) l'interprétation des spectres,
- compte tenu des critères de validation, l'identification de protéines de petite taille peut être difficile en raison du faible nombre de peptides générés,
- la précision du spectromètre de masse doit être élevée pour limiter l'identification de faux positifs.

Enfin, la spécificité du PMF, liée à la précision de mesure des instruments, est aujourd'hui de plus en plus limitée du fait de l'augmentation exponentielle du nombre de données présentes dans les banques. En effet, cette augmentation du nombre de séquences rend de plus en plus probable l'identification de faux positifs par cette approche (Gattiker et al., 2002).

Dès lors, dans de nombreux cas, le recours à des approches par LC-MS/MS, offrant une plus grande spécificité grâce à l'obtention d'information de séquence, est nécessaire.

II.2.2 Approches par LC-MS/MS

Hunt et al. (1992) ont été les premiers à utiliser une approche par LC-MS/MS pour l'analyse de mélanges complexes de peptides. Aujourd'hui, ce sont des approches par nanoLC-MS/MS qui sont au cœur des stratégies d'identification de protéines par spectrométrie de masse grâce notamment à la faible quantité d'échantillon nécessaire pour l'analyse (Lane, 2005).

Ces approches présentent deux avantages majeurs sur la stratégie par PMF. Tout d'abord, en ajoutant une étape de chromatographie liquide, ces approches permettent d'analyser des

mélanges protéiques plus complexes puisque les peptides seront séparés avant leur entrée dans le spectromètre de masse. Le deuxième avantage est la possibilité d'accéder à des informations de séquence grâce à la MS/MS (analyse d'ions issus de la fragmentation d'un ion parent). Ces informations de MS/MS permettent une identification plus aisée des protéines mais peuvent également mettre en évidence des modifications post-traductionnelles ou des mutations dans les séquences.

A partir des données de MS/MS obtenues, deux types d'approches pour l'identification des protéines sont couramment utilisées : (1) une approche basée sur une recherche directe dans des banques de données et (2) une approche par séquençage *de novo*.

→ Approche par recherche directe dans des banques de données protéiques

Ce type d'approche est la méthode la plus couramment utilisée dans les études de protéomique à grande échelle pour des organismes dont on dispose de données de séquences. Elle est basée sur la comparaison des spectres MS/MS expérimentaux et des spectres MS/MS théoriques générés à partir de l'ensemble des peptides théoriques des protéines contenues dans les banques de données. L'ensemble des peptides ainsi identifiés permet de remonter à l'identification de la protéine (figure 2.15). Cette stratégie a été dénommée « Peptide Fragment Fingerprinting » pour son homologie avec la stratégie par PMF (Blueggel et al., 2004).

Comme précédemment, l'utilisation d'un moteur de recherche spécifique est nécessaire. Au cours de cette thèse, deux moteurs de recherche ont été utilisés pour l'identification des protéines : Mascot (Perkins et al., 1999) ou OMSSA (Geer et al., 2004).

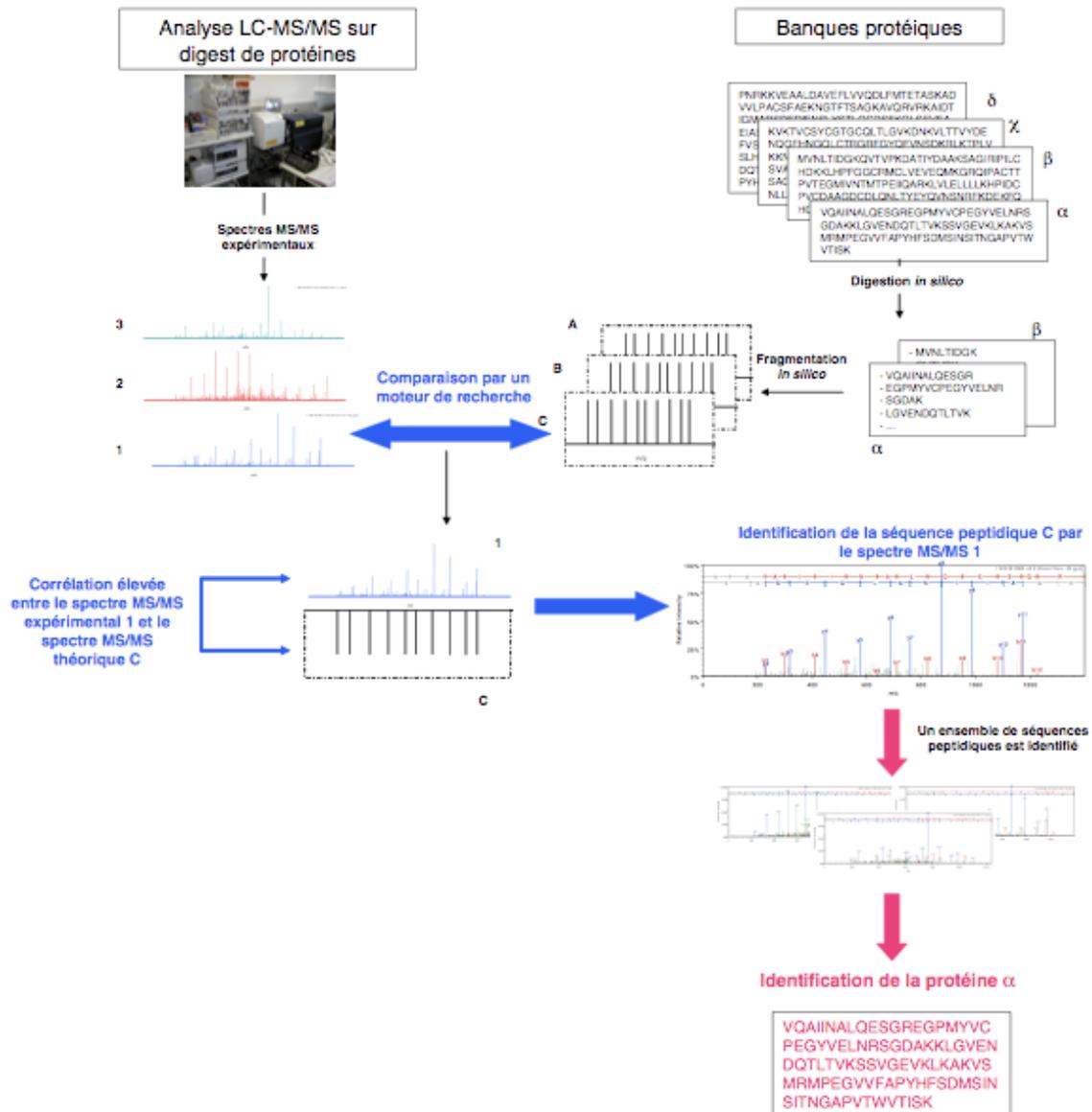


Figure 2.15 : Stratégie d'identification d'une protéine par LC-MS/MS et « Peptide Fingerprinting ».

Les différents algorithmes utilisés dans ces moteurs de recherche sont de plus en plus rapides et permettent de lancer des requêtes dans des banques de données de plus en plus volumineuses. Mais ce type de recherche n'est pas infallible et le recours à des stratégies pour la validation des identifications protéiques obtenues est indispensable. En effet, les scores (ou probabilités) calculés par les différents moteurs de recherche peuvent conduire à l'identification de faux positifs. Il semble nécessaire de vérifier manuellement tous les spectres MS/MS ayant servi pour l'identification d'une protéine et de se fixer des critères pour la validation des identifications. Cependant, compte tenu du nombre d'échantillons à analyser, cette vérification manuelle des spectres peut s'avérer très longue. De plus, une validation manuelle est opérateur dépendant. Ainsi, des stratégies informatiques ont été mises

au point pour estimer le nombre de faux positifs présents dans une série d'analyses et limiter ce nombre au maximum en affinant les paramètres d'identification au niveau peptidique et protéique. Deux exemples peuvent être cités : la stratégie Target-Decoy (Elias et al., 2007) et les approches empiriques de Bayes (Storey et al., 2003).

La première stratégie repose sur l'utilisation d'une banque de données constituée des séquences « normales » à laquelle on ajoute les mêmes séquences modifiées (inversion ou mélange). La nouvelle banque aura donc autant de séquences justes (ou cible, « target ») que de séquences fausses (ou leurre, « decoy »). Dès lors, il sera possible d'avoir une estimation directe du nombre de faux positifs (identifiés dans les séquences « decoy ») dans une série d'analyses.

La deuxième stratégie est une stratégie probabilistique basée sur les travaux de Bayes. Après modélisation de la distribution des scores attribués à l'identification des peptides dans une série d'analyse sous forme de courbe bimodale (identification correcte et identification incorrecte), il est possible d'établir pour chaque seuil de score le taux de faux positifs possibles. Cette stratégie est notamment utilisée dans le logiciel PeptideProphet (Keller et al., 2002).

Ces deux stratégies permettent, à partir de l'évaluation du taux de faux positifs, d'affiner au maximum les seuils de score afin de minimiser ce nombre. En effet, les critères d'identification seront ajustés pour limiter le taux de faux positif à moins de 1% par exemple. Enfin, selon le nombre d'identifications, il sera judicieux d'utiliser l'une ou l'autre stratégie. D'un côté, la stratégie Target-Decoy présente l'avantage de pouvoir être utilisée quel que soit le nombre d'analyses (de quelques dizaines à plusieurs milliers) mais sera plus longue (interrogation dans une banque de données d'une taille deux fois plus importante que la banques de données initiale). De l'autre, l'approche empirique n'est utilisable que pour un grand nombre d'analyses (>1000) car celle-ci se base sur un ensemble de peptides identifiés.

→ Approche par séquençage *de novo*

Dans cette approche, la séquence en acide aminé d'un peptide est directement déduite de la différence des masses entre des pics d'un spectre MS/MS. En effet, la différence de masse entre deux pics consécutifs issus d'une même série correspond à la masse d'un acide aminé. Il est alors possible d'obtenir tout ou partie de la séquence d'un peptide. Dans ce type d'approche, la qualité des spectres doit être particulièrement bonne.

Ce séquençage peut être réalisé manuellement à partir des outils informatiques fournis par les constructeurs (Data Analysis de Bruker ou PepSeq de Waters) ou de façon automatique avec des logiciels qui utilisent les fichiers de liste de masses des spectres MS/MS (Peaks Studio de Bioinformatics Solutions Inc.). Les séquences obtenues, en général des petits fragments d'une dizaine d'acides aminés, sont soumises à des programmes permettant l'identification dans les banques de données de type BLAST (programme de recherche par similarité de séquences) spécifique aux données de spectrométrie de masse (MS-BLAST, Shevchenko et al., 2001). Ce moteur de recherche présente deux principales différences par rapport au moteur de recherche BLAST classique : (1) il ne tolère aucune interruption dans la séquence des fragments peptidiques mais (2) il tolère n'importe quelle longueur d'interruption entre ces fragments. Ces approches sont beaucoup plus longues que les approches par recherche directe dans les banques de données. Néanmoins elles sont particulièrement intéressantes dans le cas d'identification de protéines d'organismes non séquencés, ou pour valider les identifications ambiguës obtenues après une approche directe.

II.3 Stratégies pour l'analyse des protéines liant des éléments métalliques

On estime que les protéines nécessitant un métal pour leur activité ou leur fonction (metalloenzyme et métalloprotéine) ou pouvant lier un élément métallique représentent plus du tiers du contenu protéique cellulaire total (Gao et al., 2007). Disposer de stratégies permettant l'analyse de ces protéines est essentiel pour la compréhension de nombreux mécanismes biologiques.

Les stratégies mises au point pour l'étude de métalloprotéines ou de protéines liant des éléments métalliques comportent en plusieurs étapes : séparation des protéines, détection de l'élément métallique contenu dans celle-ci et identification de la protéine.

L'identification de la protéine étant réalisée par les stratégies mentionnées précédemment (voir II.2), nous nous intéresserons ici aux stratégies de séparation des protéines et de l'identification du métal.

L'interaction d'un métal avec une protéine peut être covalente (cas des sélénoprotéines par exemple) ou non covalente. Dans ce dernier cas, les méthodes de séparation doivent être judicieusement choisies. Ainsi, alors que pour l'étude de protéines liant les métaux de façon covalente, les méthodes séparatives de protéomique (électrophorèse 2D, chromatographie en

phase inverse) sont tout à fait envisageables, pour l'étude de protéines liant les métaux de façon non covalente, des stratégies employant des méthodes séparatives permettant de conserver la structure native des protéines sont indispensables. En effet, la dénaturation des protéines entraînerait la perte des interactions.

II.3.1 Analyse des protéines liant des métaux de façon covalente

Parmi les métaux liés de façon covalente à une protéine, le cas du sélénium est sans doute le plus étudié. En effet, de nombreuses études ont été réalisées sur l'étude des sélénoprotéines (voir revues Szpunar, 2004 ; Lopez-Barea et Gomez-Ariza, 2006 ; Shi et Chance, 2008 ; Mounicou et al., 2009).

Pour l'étude de sélénoprotéines, les stratégies employées en protéomique et mentionnées dans la partie II.1 sont envisageables et sont présentées dans la figure 2.16.

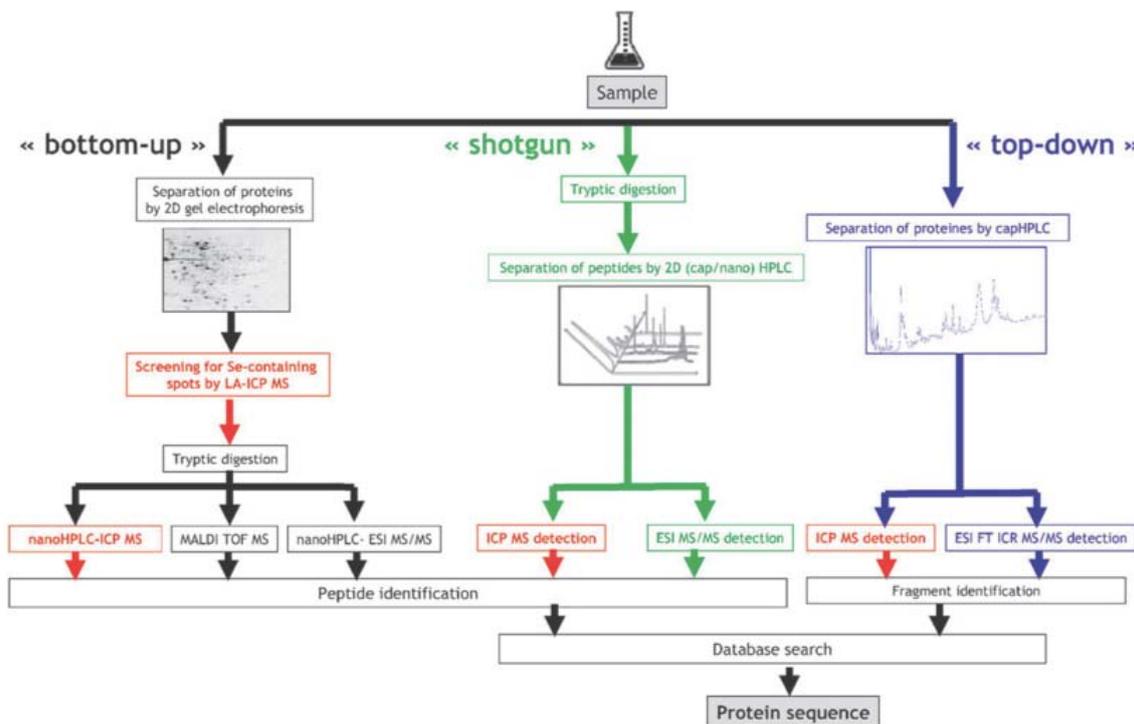


Figure 2.16 : Stratégies analytiques pour l'identification de protéines liant les métaux de manière covalente (Mounicou et al., 2009)

Dans une stratégie « bottom-up », les protéines peuvent être séparées par exemple par électrophorèse bidimensionnelle en conditions dénaturantes puis un screening des spots contenant du sélénium permet de repérer les sélénoprotéines. Les protéines contenues dans les spots d'intérêt sont soumises à une digestion enzymatique et identifiées par spectrométrie de masse.

Dans la stratégie « shotgun », toutes les protéines sont digérées en peptides, qui sont ensuite séparés par chromatographie liquide en 2 dimensions. La détection du sélénium en sortie de colonne permet d'identifier les fractions d'intérêt. Ces fractions peuvent être analysées par spectrométrie de masse pour identifier les protéines.

Enfin, dans la stratégie « top-down », un mélange peu complexe de protéines est séparé par chromatographie (1D/2D). Après identification des fractions contenant du métal, celles-ci sont collectées et les protéines contenues dans ces fractions peuvent être caractérisées.

Dans la majeure partie des études de cette dernière décennie, l'ICP-MS est la technique la plus employée pour la détection des éléments métalliques (Lobinski et al., 2006). En effet, cette technique est particulièrement sensible et peut être facilement couplée à la chromatographie liquide. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, d'autres méthodes de détection des éléments métalliques peuvent être utilisées.

Des méthodes de détection par émission de rayons X sont utilisées et notamment les techniques PIXE (émission de rayons X induite par le bombardement de particules) qui ont fait l'objet d'une revue en 2005 (Garman et Grime, 2005). La première étude utilisant la technique PIXE pour l'analyse des protéines liant les métaux est celle de Szökefalvi et al. (1990). Après séparation sur gel SDS-PAGE, cette équipe a pu révéler la présence d'une protéine purifiée contenant des groupements Fe-S grâce au profil du fer, démontrant ainsi la validité d'une telle analyse. Plus récemment, Weseloh et al. (2004) ont utilisé un couplage SDS-PAGE- μ SR-XRF pour révéler le profil sélénique de protéine de testicule de rat.

II.3.2 Analyse des protéines liant des métaux de façon non covalente

Dans ce cas, seules des stratégies « bottom-up » et « top down » peuvent être envisagées. En effet, la digestion des protéines entraîne la perte des interactions protéine/métal. De plus, l'utilisation de méthodes séparatives, au cours desquelles la structure native des protéines est conservée, est indispensable (Jiménez et al., 2009, Raab et al., 2009). Ces méthodes sont : l'électrophorèse sur gel en conditions natives, la chromatographie liquide (exclusion stérique et échangeuse d'ion) et l'électrophorèse capillaire. Plusieurs étapes de séparation sont nécessaires pour des échantillons complexes et la plupart des études réalisées sont des combinaisons de différentes méthodes.

L'électrophorèse sur gel en conditions natives est une très bonne technique pour la séparation de protéines liant les métaux de façon non covalente. En effet, cette technique est particulièrement bien adaptée à la séparation d'échantillons protéiques complexes et est compatible avec de nombreuses méthodes de détection des métaux comme la spectrométrie d'absorption atomique, l'émission de rayons X ou l'ICP-MS (Ma et al., 2004). Parmi les méthodes utilisées en métallogéochimie, les séparations sur gel de polyacrylamide « native PAGE » et « BN-PAGE » sont les plus utilisées.

Hinkamp et Dunemann (1990) ont établi le profil métallique (Cu, Ni et Zn) par SAA d'un extrait protéique de soja après séparation de celui-ci par électrophorèse sur gel en conditions natives et électroélution.

Strivay et al. (1998) ont démontré la faisabilité de quantifier des métaux dans une bande protéique d'un gel de polyacrylamide par analyse PIXE après calibration du signal à l'aide de dépôts de quantité connue de métal dans un gel. Plus récemment, Chevreux et al. (2009) ont réussi à déterminer la stœchiométrie en Zn et en Cu dans de différentes formes de SOD humaine après une séparation par focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes. La focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes peut également être utilisée hors gel : Pioselli et al. (2009) ont étudié la capacité de la focalisation isoélectrique en microsolution pour la séparation de protéines liant les métaux de façon non covalente. D'après les profils de distribution en Cu, Zn et Fe, ces auteurs ont conclu que cette méthode de focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes permettait de conserver les interactions protéine/métal intactes durant la séparation de protéines.

Après avoir séparé des protéines issues d'une bactérie par électrophorèse sur gel en conditions non dénaturantes « native PAGE », Allardyce et al. (2001) ont recherché la présence de Pt par LA-ICP-MS. L'identification, dans la région du gel présentant un fort taux de Pt, d'une protéine membranaire (ompA) connue pour lier cet élément a permis à ces auteurs de valider leur stratégie pour l'identification de protéines liant les métaux. De même, Binet et al. (2003) ont pu détecter, par LA-ICP-MS, et caractériser une protéine liant le Zn et le Cd d'une bactérie surexprimant cette protéine après séparation du contenu protéique total (sans pré-fractionnement) sur gel d'électrophorèse « native-PAGE ». En 2004, Bernd Kastholz a utilisé l'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en conditions natives pour la séparation de protéines liant le Cd chez *Arabidopsis*. Plus récemment, Becker et al. (2009) ont séparé les protéines extraites de reins de rat sur gel d'électrophorèse en conditions natives en deux dimensions (BN-PAGE/BN-PAGE). Des éléments métalliques (Cu, Zn et Pb) ont été détectés par LA-ICP-MS dans différents spots du gel. L'identification de protéines contenues

dans les fractions contenant une forte concentration en métal a été possible par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

La chromatographie liquide est également une méthode séparative utilisable pour la séparation de protéines liant les métaux de façon non covalente.

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) semble la méthode la mieux adaptée pour la séparation de protéines à l'état natif et pour la conservation des interactions protéine/métal (Guntiñas et al., 2002). Cependant pour l'identification de métalloprotéines, cette technique souffre d'une trop faible résolution pour être utilisée seule sur des mélanges complexes. Néanmoins, dans le cas de protéines purifiées ou de mélanges peu complexes, la SEC couplée à une détection des éléments métalliques par ICP-MS peut permettre la détection d'interactions protéine/métal, la détermination de la stœchiométrie ou encore la détermination de constantes d'affinité de complexes protéine/métal (Benson et al., 2003). La chromatographie d'échange d'ions a également été utilisée pour des analyses métalloprotéomiques. Notamment, Nagaoka et al. (2002) ont utilisé une colonne échangeuse d'anions (AE) pour étudier la fixation du V à la transferrine dans le sérum humain. De même, pour la comparaison d'isoformes de transferrine dans des sérums d'individus sains et alcooliques, Busto et al. (2005) ont utilisé une séparation par chromatographie AE et une détection du Fe par ICP-MS.

Cependant, pour l'étude de protéines liant des métaux dans des échantillons plus complexes, plusieurs étapes de séparation sont nécessaires (Lobinski et al., 2006). Généralement, la première étape consiste en un fractionnement des échantillons par SEC. Infante et al. (2002) ont utilisé la combinaison SEC-ICP-MS et AE-ICP-MS pour la spéciation de métalloprotéines cytoplasmique de carpe. De même, après pré-fractionnement par SEC, Loreti et al. (2005) ont utilisé la chromatographie AE pour caractériser des complexes Cd/phytochélatine. L'inverse est également possible. Ainsi un couplage AE en première dimension et SEC en deuxième dimension a été utilisé par Bouyssiere et al. (2004) pour la détection de protéines liant le Ni dans des cellules de colon normal et cancéreux.

Enfin, **l'électrophorèse capillaire** peut également être utile pour l'étude des protéines liant les métaux. Généralement, son utilisation est limitée à l'étude de la complexation d'un métal sur une protéine native ou un mélange peu complexe de protéines. Par exemple, Timerbaev et al. (2004) ont eu recours à l'électrophorèse capillaire couplée à un spectromètre de masse pour confirmer la liaison du Pt avec l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette stratégie leur a également permis de déterminer la constante d'affinité du couple albumine/Pt. Pour l'étude

d'échantillons complexes, l'électrophorèse capillaire peut être envisagée en dernière étape de purification avant identification de la protéine (Lavorante et al., 2004 ; Quintana et al., 2006).

II.3.3 Autres stratégies

Les stratégies présentées précédemment permettent la détection et l'identification des protéines liant *in vivo* des éléments métalliques. En parallèle, d'autres stratégies ont été mises en œuvre pour identifier des protéines « pouvant » lier un élément métallique mais n'informant en aucun cas si cette interaction est réellement observable *in vivo*.

C'est notamment le cas des techniques de chromatographie d'affinité pour un métal immobilisé (IMAC) : dans un mélange protéique, certaines protéines (ayant une affinité pour un métal donné) seront retenues sur la phase stationnaire de la colonne IMAC. Ces protéines seront par la suite éluées et identifiées. Smith et al. (2004) ont tout d'abord séparé des protéines ayant une affinité pour le cuivre dans un échantillon protéique de cellules hépatiques, à l'aide d'une colonne IMAC à cuivre. Après élution des protéines d'intérêt, ils ont séparé celles-ci par électrophorèse bidimensionnelle en vue de leur identification par spectrométrie de masse. Parmi les 67 protéines identifiées, 52 d'entre elles possédaient une séquence de liaison d'élément métallique.

Des méthodes de bioinformatique sont également utilisables pour la prédiction de site spécifique de liaison d'élément métallique dans une protéine (Muegge et Martin, 1999 ; Gohlke et al., 2000). Ces identifications *in silico* ont été rendues possible grâce la quantité de données obtenues à partir du séquençage de génomes et des structures 3D des protéines. Il est ainsi possible de définir des séquences consensus nécessaires pour la fixation d'éléments métalliques.

Chapitre III

Résultats

Première partie

Effets de la complémentation alimentaire en kaolinite chez le rat

La géophagie est l'ingestion volontaire de terre. Son caractère naturel et fréquent a été démontré et des raisons expliquant ce phénomène ont été avancées. Les données bibliographiques sur la géophagie montrent que l'ingestion d'argile a un impact significatif sur le système digestif. Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont pas réellement connus. Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude de la complémentation en argile dans l'alimentation d'un animal modèle, le rat, soumis à différents régimes alimentaires :

1. complémentation alimentaire en kaolinite *ad libitum* pendant 28 jours,
2. réalimentation avec complémentation *ad libitum* après un jeûne prolongé,
3. complémentation *ad libitum* au cours d'une restriction alimentaire,
4. complémentation avec des quantités d'argile imposées.

Le fruit de ce travail est né de notre collaboration avec des biologistes et des géologues du département DEPE de l'IPHC. La présentation de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette collaboration nous semble nécessaire pour appréhender au mieux l'impact des argiles en complémentation alimentaire.

Ainsi, la partie « analyses physiologiques » est une présentation des résultats obtenus principalement par nos collaborateurs : suivi du poids des animaux et des consommations de nourriture et de kaolinite aux cours des différents régimes étudiés ; analyse en microscopie optique et électronique de la muqueuse intestinale ; et enfin détermination de la composition corporelle.

Bien que ces résultats permettent de faire un certain nombre d'hypothèses sur les effets d'une complémentation alimentaire en argile, il était indispensable de s'intéresser en parallèle aux modifications engendrées au niveau protéique. En effet, le contenu protéique d'une cellule dépend de nombreux facteurs dont son environnement et son état physiologique. L'étude protéomique est donc une excellente stratégie pour comprendre plus précisément l'impact de l'argile sur la muqueuse intestinale de rat.

Dans la première partie de ces résultats, nous présenterons l'optimisation des conditions expérimentales, nécessaires à toute analyse protéomique, puis nous décrirons les effets engendrés par la consommation d'argile en complément alimentaire lors de différents régimes étudiés.

I Optimisation des conditions expérimentales pour l'analyse protéomique

La diversité des échantillons biologiques nécessite d'optimiser les conditions d'extraction et de séparation des protéines lors de toute nouvelle analyse protéomique. Ainsi à partir du prélèvement de la muqueuse intestinale, l'ensemble des étapes de traitement de l'échantillon doit permettre l'extraction et la solubilisation des protéines tout en maintenant l'intégrité du contenu protéique pour satisfaire l'exigence principale de l'analyse protéomique : la reproductibilité des gels.

I.1. Optimisation de l'extraction et de la solubilisation des protéines

L'extraction et la solubilisation des protéines pour l'analyse protéomique est couramment réalisée dans un tampon composé :

- d'un ou de plusieurs détergents qui permettent la solubilisation des protéines en évitant qu'elles ne s'agrègent (exemples de détergent : SDS, CHAPS, Triton X100),
- d'agents chaotropiques qui rompent les liaisons hydrogènes au sein de la protéine (exemples d'agents chaotropiques : urée, thiourée),
- d'inhibiteurs de protéases qui empêchent les processus de destruction des protéines au cours de la préparation des échantillons.

Un travail préliminaire réalisé par Céline Huillet au cours de son stage de Master (stage M2, avril-septembre 2006) avait permis la sélection d'un tampon d'extraction (7 M urée, 2 M thiourée, 4% (p/v) CHAPS, 20 mM Tris/HCl pH 8, inhibiteurs de protéases) et l'établissement d'une première carte protéique.

A partir de ce travail, nous avons testé quatre protocoles d'extraction et de solubilisation des protéines pour lesquels 100 mg de muqueuse intestinale ont été prélevés au sein d'un même échantillon. Ces quatre protocoles nous ont permis de comparer différents paramètres (tableau 3.1). Deux types de broyage mécanique ont été comparés : soit un broyage de la muqueuse au mortier dans de l'azote liquide, soit un broyage à sec par bille magnétique dans de l'azote liquide à l'aide d'un Mikrodismembrator (Sartorius AG). L'extraction et la solubilisation des protéines ont été réalisées dans 200 µl de tampon d'extraction (avec ou sans inhibiteurs de protéases) par trois successions d'agitation vigoureuse (30 secondes au vortex) et sonication (5 minutes) et de phase de repos dans la glace (30 minutes). Enfin, une étape de précipitation

à l'acétone a été réalisée soit directement, soit après centrifugation des solutions obtenues pour éliminer les débris cellulaires.

Protocole	A	B	C	D
Type de broyage	Mortier	Mortier	Mortier	Bille
Présence d'inhibiteurs de protéases	oui	non	oui	oui
Élimination des débris cellulaires	non	non	oui	non

Tableau 3.1 : Protocoles d'extraction et de solubilisation des protéines intestinales.

Afin de comparer l'efficacité des différents protocoles, la quantité de protéines extraites a été déterminée par un dosage de Bradford. Pour le broyage par mortier, deux rendements ont été calculés : soit par rapport à la quantité de muqueuse broyée, soit par rapport à la quantité de poudre récupérée après broyage (tableau 3.2).

Protocole	Quantité en µg de protéines par mg de poudre récupérée après broyage	Quantité en µg de protéines par mg de muqueuse broyée
A	109 (n=1)	60 (n=1)
B	105 (n=1)	62 (n=1)
C	90 (n=1)	52 (n=1)
D	-	95 ± 12 (n=18)

Tableau 3.2 : Rendements d'extraction des protéines selon les protocoles d'extraction/solubilisation.
Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Les quantités de protéines récupérées après un broyage de la muqueuse intestinale au mortier souffrent d'une perte importante de matériel liée aux conditions de broyage. En effet, lors du broyage dans l'azote liquide, nous avons observé que, malgré nos précautions, des éclats de muqueuse pouvaient être éjectés du mortier. De plus après broyage, il n'est pas aisé de récupérer la totalité de la poudre. Le protocole utilisant le broyage par bille magnétique permet de pallier ces problèmes. La bille étant directement placée dans le tube qui servira à la remise en solution des protéines, les seules pertes possibles peuvent intervenir lors de l'élimination de la bille. En prenant des précautions, cette perte est négligeable. Enfin, une meilleure qualité de broyage est obtenue avec la bille grâce à un effet mécanique plus important lié à la vitesse d'agitation (3000 rpm pendant une minute) et au poids de la bille. Les résultats obtenus indiquent également qu'une élimination des débris cellulaires, par centrifugation avant précipitation des protéines, a très peu d'effet sur la perte de matériel. Enfin, l'absence d'inhibiteurs de protéases n'affecte pas la quantité de protéines récupérées après extraction.

Nous avons ensuite séparé les protéines extraites avec ces différents protocoles par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (200 µg déposés). La focalisation isoélectrique des quatre extraits a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions sur des bandelettes de gradient non linéaire de pH préformé de 3 à 10. Puis après réduction et alkylation, les bandelettes ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 10%. Les gels A et B d'une part, et C et D d'autre part, ont migré en parallèle.

La figure 3.1 présente les séparations obtenues après coloration au CBB.

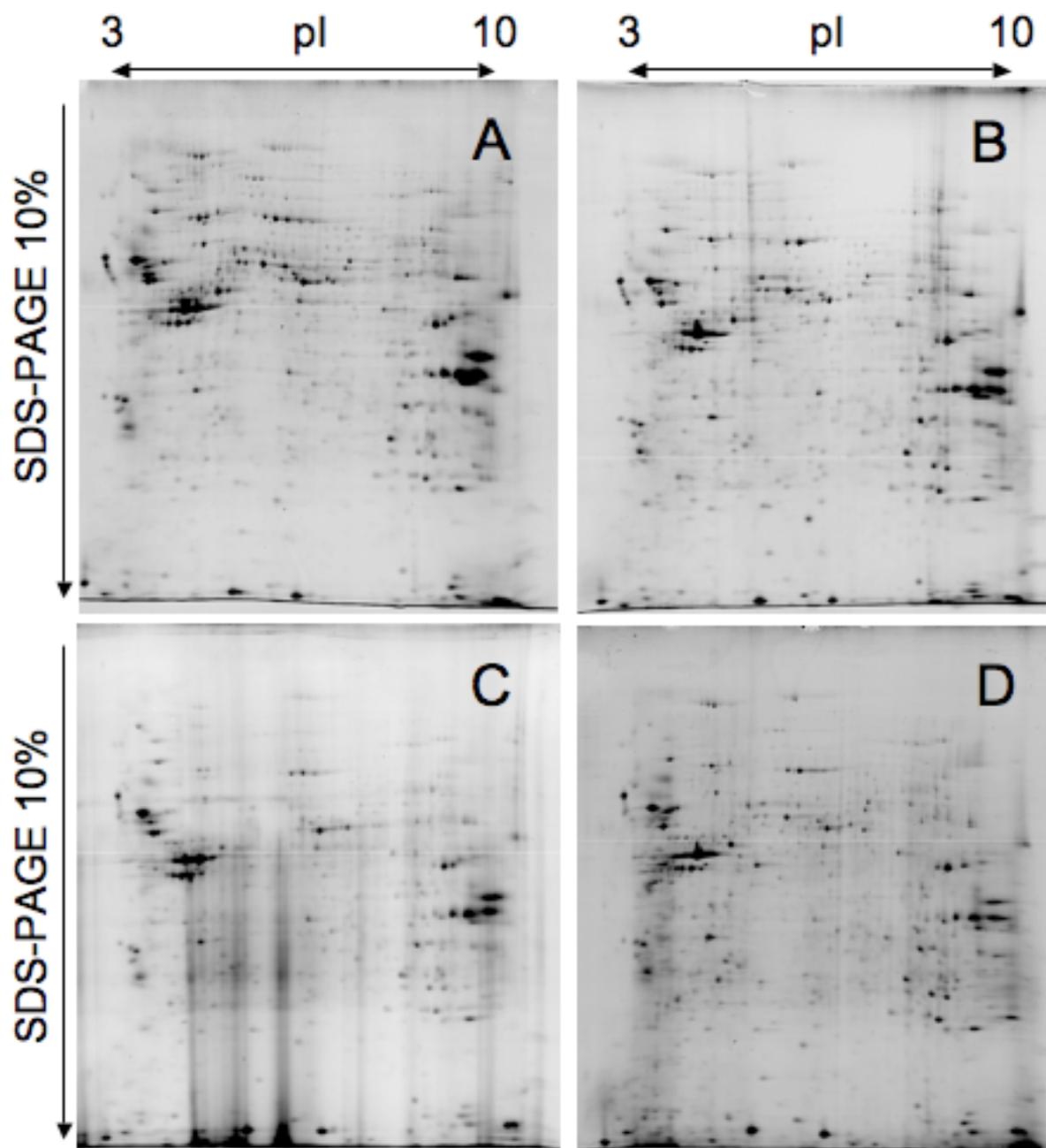


Figure 3.1 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale d'un même échantillon par différents protocoles d'extraction et de solubilisation. Dépôt de 200 µg de protéines. Première dimension : IEF pH 3-10 NL. Seconde dimension : SDS-PAGE 10%. Coloration CBB. Les lettres indiquées correspondent aux protocoles du tableau 3.1

La séparation des protéines, après extraction avec les protocoles A, B et D, est satisfaisante. La résolution des spots semble néanmoins de meilleure qualité sur le gel D. La comparaison des gels A et B permet de conclure sur l'importance des inhibiteurs de protéases. Quelques protéines de haut poids moléculaire semblent moins intenses sur le gel B par rapport au gel A et dans le même temps, des spots plus intenses sont retrouvés dans le bas du gel.

La qualité du gel C souffre de nombreuses traînées verticales. Une concentration excessive de certaines protéines ou une précipitation de celles-ci est généralement responsable de ce type de problème. Dans notre cas, quelques spots très intenses dans le bas du gel semblent être à l'origine des traînées. De plus l'intensité des protéines sur l'ensemble de ce gel est plus faible par comparaison aux autres.

Au vu de ces résultats, le protocole D présente le plus d'avantages. En effet, en diminuant la perte de matériel au cours du broyage de la muqueuse, la quantité de protéines récupérées est jusqu'à deux fois plus importante qu'avec un broyage au mortier. L'ajout d'inhibiteurs de protéases semble également être indispensable pour la conservation de l'intégrité du contenu protéique.

D'autres optimisations ont été envisagées. Nous avons notamment testé un autre agent réducteur, la tributylphosphine, en remplacement du DTT dans le tampon de focalisation isoélectrique et pour l'étape de réduction avant la seconde dimension. Cet agent réducteur augmenterait la solubilité des protéines et, grâce à sa nature non-ionique, maintiendrait des conditions réductrices sur toute la gamme de pH au cours de la focalisation isoélectrique (Herbert, 1998). En effet, le DTT, dont le pKa est de 8,3, a tendance à migrer vers l'anode et ainsi délaissier la zone basique au cours de la focalisation isoélectrique. En l'absence de DTT, les ponts disulfure des protéines peuvent se reformer et entraîner des problèmes de migration des protéines basiques. Dans notre cas, l'utilisation de tributylphosphine n'a pas apporté d'amélioration de la qualité des gels obtenus (non montrés).

Nous avons également évalué l'intérêt d'un kit de précipitation des échantillons pour l'analyse protéomique : le kit 2D Clean-up (GE Healthcare). Selon ce fournisseur, la qualité des gels bidimensionnels (élimination des traînées verticales, diminution du bruit de fond lors de la coloration) est améliorée sans perte de protéines. Bien que la qualité de nos premiers gels bidimensionnels fût satisfaisante, nous avons voulu savoir si nous pouvions encore l'améliorer avec l'utilisation de ce kit en remplacement de la précipitation par l'acétone. Les rendements de protéines extraites et la qualité des gels bidimensionnels (résultats non

montrés) n'étant pas supérieurs à ceux obtenus avec une précipitation des protéines par l'acétone, nous avons estimé qu'une précipitation à l'acétone était suffisante pour nos échantillons.

1.2. Reproductibilité des gels bidimensionnels

La reproductibilité des gels bidimensionnels est indispensable pour permettre une analyse différentielle de qualité. Ainsi, pour chaque étude entreprise, nous avons (1) préparé des quantités de tampon suffisantes pour traiter l'ensemble des échantillons d'une même analyse, (2) traité les échantillons en même temps, (3) respecté un ratio quantité de poudre / volume de tampon (200 µl de tampon d'extraction pour 20 mg de poudre) et (4) utilisé un même lot de bandelettes de gradient de pH préformé pour chaque analyse.

Nous avons évalué la reproductibilité des gels en déposant 4 fois 400 µg de protéines extraites d'un même échantillon de muqueuse intestinale. Pour la focalisation isoélectrique, les quatre séparations ont été réalisées en parallèle, tandis que les séparations sur gels SDS-PAGE ont été réalisées 2 par 2 (1 et 2 puis 3 et 4). Après coloration des gels au CBB (figure 3.2), les images des gels ont été analysées à l'aide du logiciel PDQuest (Bio-Rad). Les paramètres de détection automatique des spots ont été choisis pour garantir la détection d'un maximum de spots tout en évitant la détection d'artefacts liés à la coloration. Puis, les images ont été minutieusement observées et des spots ont été rajoutés ou éliminés manuellement.

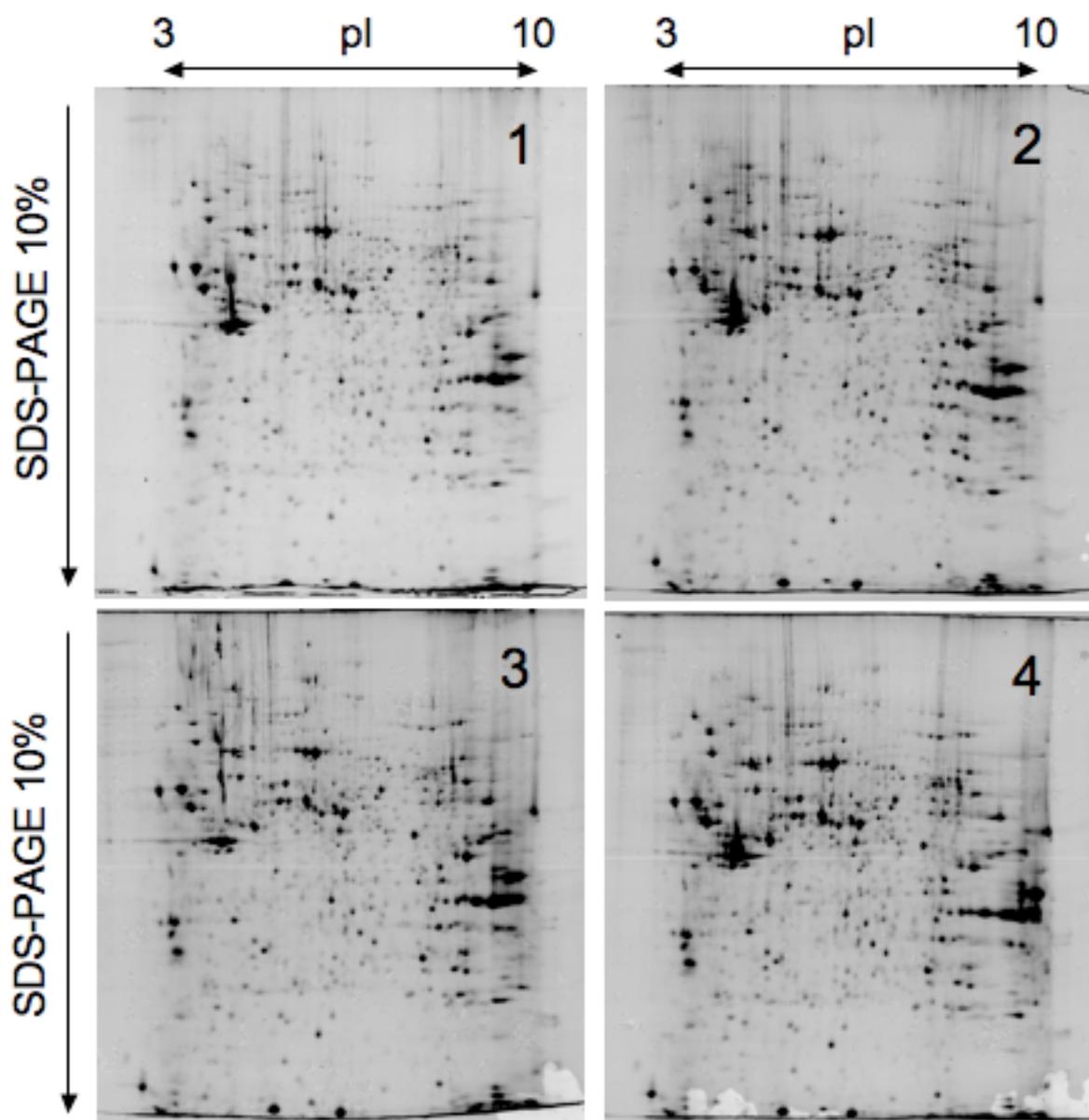


Figure 3.2 : Différents gels bidimensionnels obtenus à partir d'un même extrait protéique.
 Dépôt de 400 μg de protéines. Première dimension : IEF pH 3-10 NL. Seconde dimension SDS-PAGE 10%.
 Coloration CBB.

Nous remarquons qu'en augmentant la quantité de protéines déposées sur les gels (400 μg contre 200 μg en 1.1), la présence de traînées verticales est augmentée. Néanmoins, la majorité des spots étant bien résolus, l'analyse de la reproductibilité peut être envisagée.

La reproductibilité des gels sera estimée par trois paramètres : le nombre de spots présents sur les gels, le pourcentage de spots identiques sur les gels (matching) et la variation de l'intensité de chaque spot.

Le nombre de spots détectés sur les gels bidimensionnels après coloration au CBB est en moyenne de 625 spots pour les quatre gels (tableau 3.3). Le pourcentage de spots identiques retrouvés sur chaque gel, en comparaison à ceux présents sur le gel référence 1, est en moyenne de 80% et le nombre de spots présents sur les quatre gels est de 400 (tableau 3.4), soit 64% des spots détectés.

Gel	Nombre de spots détectés	Nombre de spots « matchés »	Pourcentage de « matching »
1	630	630	100
2	624	509	81
3	628	485	77
4	618	509	81
Moyenne	625 ± 6	501 ± 14	80 ± 3

Tableau 3.3 : Analyse de la reproductibilité des gels bidimensionnels.

Est indiqué le nombre de spots détectés sur chaque gel après vérification visuelle et ajout ou élimination manuelle de spots, le nombre de spots présents sur les différents gels et présents sur le gel référence 1 (spot matchés) et leurs pourcentages.

D'après ces résultats, il semble nécessaire de faire un tri dans les spots pris en compte avant d'envisager de faire une analyse différentielle correcte. Ainsi pour l'analyse de la variation de l'intensité de chaque spot, nous avons calculé le pourcentage de spots variant de moins d'un facteur 2 ou 5, quand ceux-ci sont retrouvés sur un, deux, trois ou quatre gels.

En prenant en compte les spots présents sur au moins	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels
Nombre de spots conservés pour l'analyse	625	616	538	400
Pourcentage moyen de spot matchés au gel 1	79%	85%	93%	100%
Pourcentage de spots dont la variation d'intensité est < 2	86%	92%	93%	95%
Pourcentage de spots dont la variation d'intensité est < 5	98%	98%	99%	99%

Tableau 3.4 : Reproductibilité de l'analyse en fonction du nombre de gels pris en compte.

Quel que soit le nombre de gels pris en considération, la grande majorité des spots présente une variation d'intensité inférieure à 5. Par contre, pour les spots dont l'intensité varie d'un facteur inférieur à 2, plus on augmente le nombre de gels sur lesquels doit être présent un spot, plus leur pourcentage augmente. Dans le cas d'une analyse avec quatre gels, un bon compromis entre le nombre de spots conservés et leur variation en intensité, semble être obtenu en prenant en compte les spots présents sur au moins trois gels.

Par extension, pour les analyses protéomiques différentielles avec un nombre de gels plus important, ne seront conservés que les spots présents sur au moins (n-1) gels d'une même condition (avec n le nombre total de gels par condition).

I.3. Sélection des spots d'intérêt

Pour la sélection des spots d'intérêt, aucun consensus n'existe au sein de la communauté scientifique. En général pour des gels colorés au CBB, un minimum de cinq gels par conditions est réalisé et un seuil de variation de l'intensité d'un facteur deux entre deux conditions différentes est associé à un test statistique de Student (Marengo et al., 2005).

Les dernières directives pour la publication de données de protéomique n'indiquent pas de minimum mais demandent à ce qu'un certain nombre d'informations soient indiquées comme le nombre d'échantillons, le nombre de réplicats analytiques et biologiques, le test statistique utilisé et le résultat de celui-ci pour chaque spot d'intérêt (Wilkins et al., 2006).

Ainsi, en absence de critères de sélection communément admis, nous avons choisi nos propres critères de sélection des spots à conserver pour l'identification par analyse par spectrométrie de masse. Dans tous les cas, un test statistique (test de Student ou test ANOVA) a été employé pour valider la significativité des variations d'intensité entre chaque condition.

II Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire

Cette expérience a consisté à étudier les effets d'une complémentation libre en kaolinite sur 28 jours. Deux groupes de rats ont été considérés : un groupe témoin dont les animaux (n=5) ont été alimentés en nourriture standard *ad libitum* et un groupe test dont les animaux (n=10) avaient en plus à disposition de la kaolinite en quantité non limitée.

Les résultats décrits ci-dessous ont fait l'objet d'une publication (Reichardt et al., 2009).

II.1 Données physiologiques

Ces travaux ont principalement été réalisés par le Dr François Reichardt (DEPE) au cours de sa thèse. Dans cette première expérience, tous les animaux ont eu un accès non limité en eau et en nourriture. Les animaux du groupe test ont eu, en plus, de la kaolinite à disposition par rapport aux animaux du groupe témoin. Bien que la consommation en argile soit variable en fonction de chaque individu et tout au long de la période de 28 jours ($1,1 \pm 0,9$ g/jour représentant $4,6 \pm 2,4$ % de la fraction alimentaire ingérée), la consommation volontaire et spontanée de kaolinite a été observée chez tous les animaux du groupe test. La prise de masse et la quantité de croquettes ingérées n'ont pas présenté de différence significative entre les animaux de chaque groupe.

Afin de connaître le devenir de l'argile dans l'intestin, des prélèvements de muqueuses intestinales ont été réalisés et observés par microscopie électronique. Deux types de microscopie électronique à balayage ont été utilisés : en mode environnemental et en mode conventionnel. L'utilisation du mode environnemental permet d'observer la muqueuse intestinale avec un minimum de traitement chimique et permet une observation plus proche de la réalité qu'en mode conventionnel. Par contre, ce dernier permet des grossissements plus importants.

L'aspect des villosités intestinales de rats ayant consommé de la kaolinite pendant 28 jours (figure 3.3B) est semblable à celui des animaux témoins nourris normalement (figure 3.3A). Après ingestion d'argile, de nombreuses particules de kaolinite sont visiblement engluées dans le mucus à la surface des villosités. Ces particules sont généralement retrouvées à la pointe et sur les bords des villosités (figure 3.3C) et présentent des bords érodés (figure 3.3D). Les observations réalisées en mode conventionnel mettent en évidence une altération de la kaolinite au niveau des villosités intestinales (figures 3.3F, 3.3G et 3.3H) en comparaison à l'observation de la kaolinite avant ingestion (figure 3.3E).

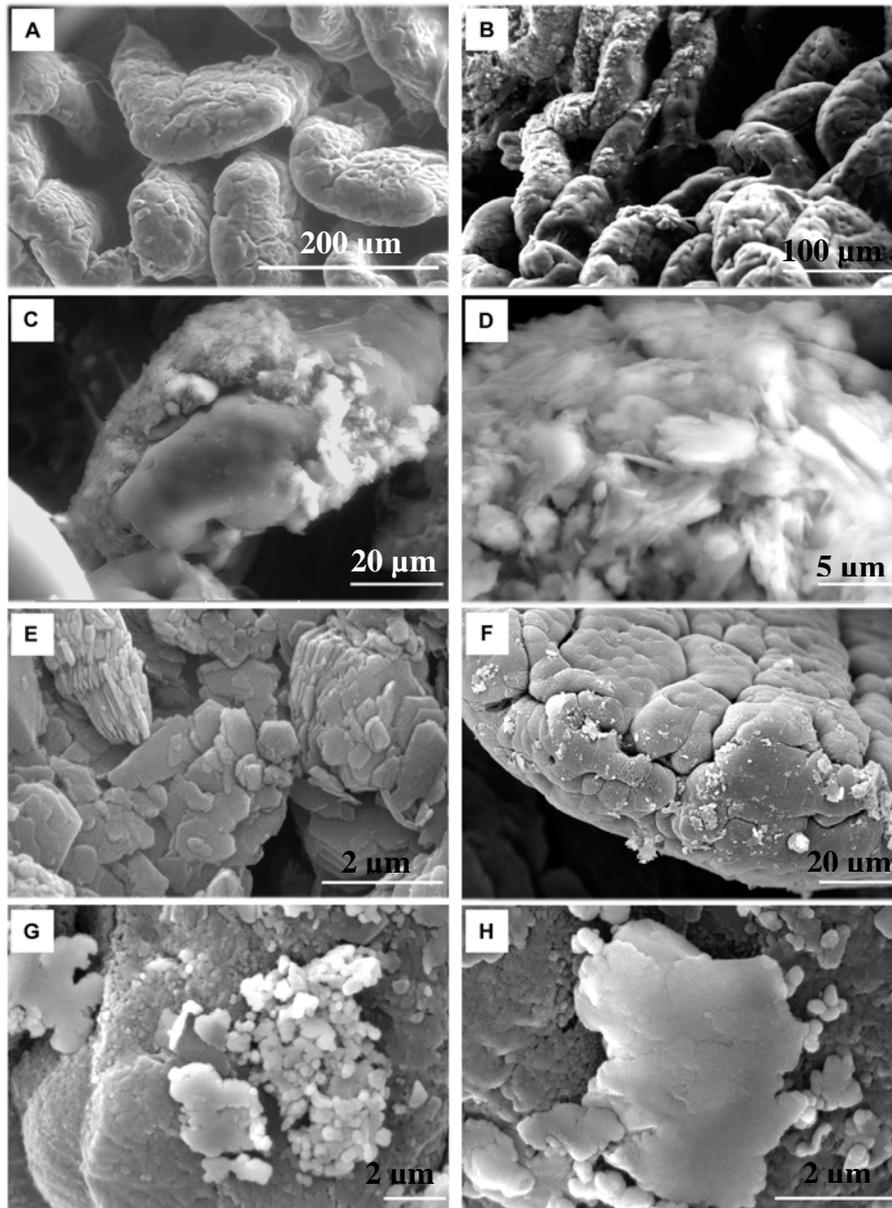


Figure 3.3 : Microscopie électronique à balayage de jéjunum de rat et de kaolinite en mode environnementale (A à D) et en mode conventionnel (E à H)

(A) Villosités d'un animal témoin (B à D) Kaolinite engluée dans le mucus à la surface des villosités d'un animal ayant consommé de la kaolinite pendant 28 jours. (E) Particules de kaolinite avant ingestion. (F à H) Particules de kaolinite à la surface des villosités d'un animal ayant consommé de la kaolinite pendant 28 jours présentant une altération en grains (G) ou une érosion (H).

Une analyse par émission des rayons X lors de l'observation en microscopie électronique à balayage en mode environnemental sur une particule engluée dans le mucus (figure 3.4A) révèle une diffusion de l'aluminium au niveau des villosités (figure 3.4B). La présence d'aluminium a également été révélée dans la muqueuse intestinale (figure 3.4C).

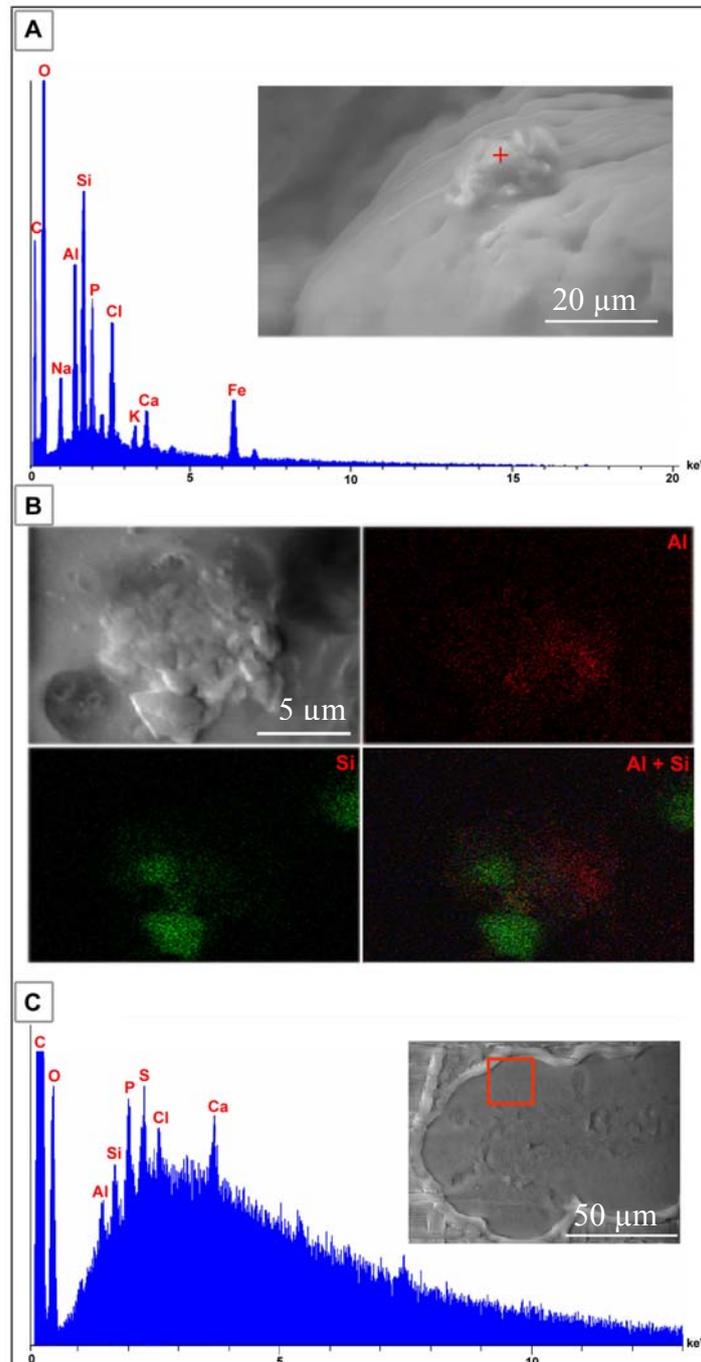


Figure 3.4 : Analyse par microscopie électronique couplée à l'analyse par émission des rayons X (ESEM/EDX). (A) Spectre EDX d'une particule de kaolinite à la surface d'une villosité. (B) Cartographie 2D montrant la répartition spatiale distincte entre l'aluminium et le silicium d'une particule de kaolinite au niveau des villosités intestinales. (C) Analyse d'une coupe de muqueuse intestinale d'un animal Kao28.

Enfin, nous nous sommes également intéressés à la morphologie de la muqueuse intestinale par microscopie optique et électronique à transmission. Ces observations révèlent une modification de la morphologie de la muqueuse intestinale suite à l'ingestion d'argile. En effet, la largeur des villosités est augmentée de $14 \pm 2\%$ (figure 3.5A), tandis que la longueur des microvillosités est diminuée de $21 \pm 2\%$ (figure 3.5C). Une présence accrue de vacuoles à la base des entérocytes est observable (figure 3.5A). De nombreuses gouttelettes lipidiques sont également présentes chez les animaux du groupe kaolinite (figure 3.5B).

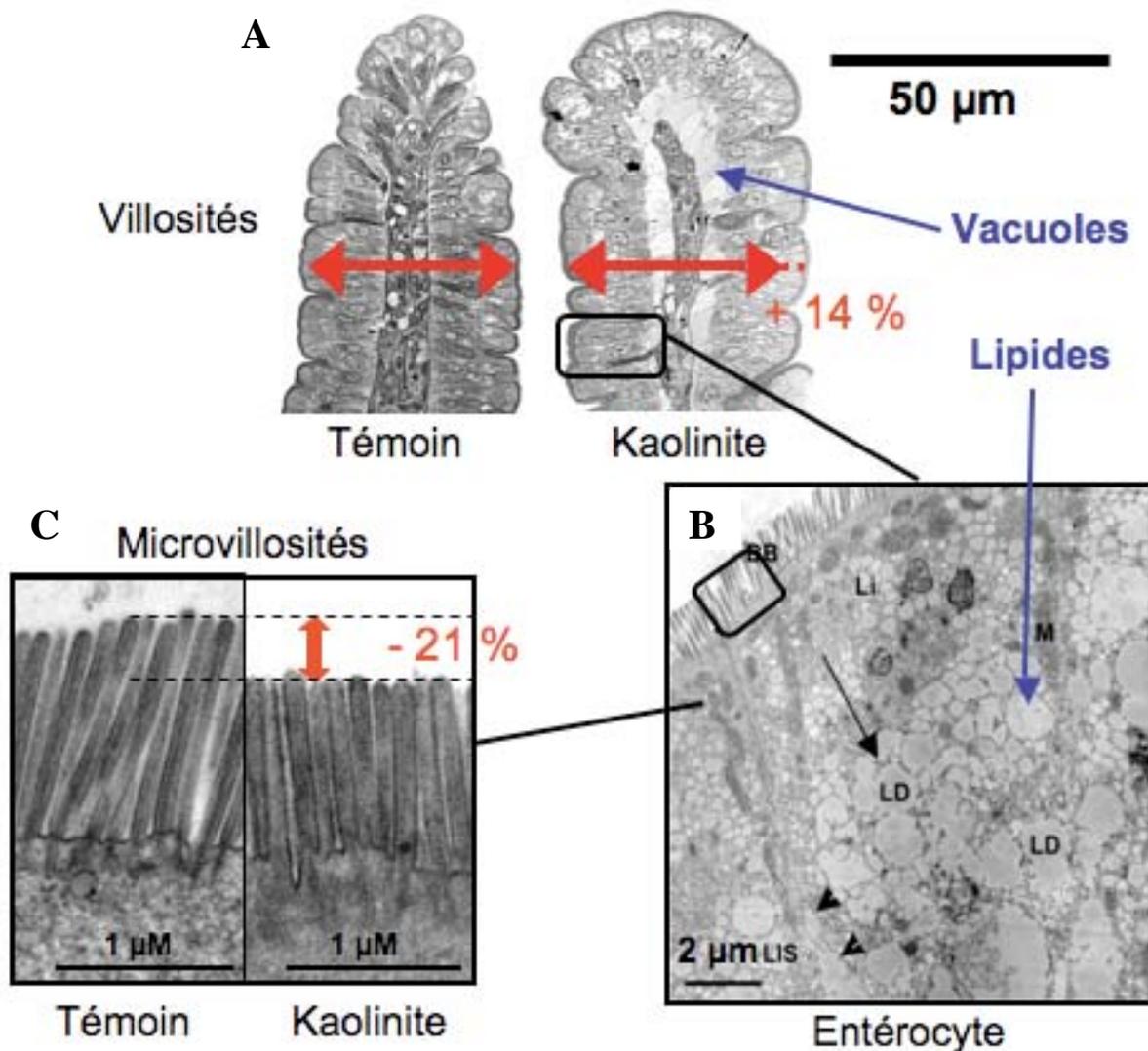


Figure 3.5 : Analyses microscopiques de la muqueuse intestinale de rat. (A) Observation des villosités intestinales en microscopie optique. (B) Observation d'un entérocyte en microscopie électronique à transmission. (C) Observation des microvillosités en microscopie électronique à transmission.

D'autres animaux (n=5) ont également été complémentés en kaolinite et ont été sacrifiés au bout de sept jours de complémentation. L'aspect de la kaolinite au niveau de la muqueuse intestinale est semblable à l'aspect de la kaolinite après 28 jours de complémentation (résultats non montrés). Nous avons également noté la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques dans les entérocytes (résultats non montrés). Par contre, aucune différence significative de morphologie de la muqueuse n'est visible après 7 jours de complémentation en comparaison aux animaux témoins nourris normalement. Compte tenu de ces résultats, nous avons restreint l'analyse protéomique différentielle à l'étude de la complémentation pendant 28 jours.

II.2 Analyse protéomique différentielle

Des échantillons de muqueuse intestinale ont été réservés pour l'analyse protéomique différentielle. Malheureusement, nous n'avons eu accès qu'à quatre individus du groupe témoins et deux individus du groupe test ayant ingéré la kaolinite. Les deux individus du groupe test ont consommé des quantités similaires de kaolinite ($1,2 \pm 0,1$ g/jour). La consommation en croquettes des animaux témoins et des animaux du groupe test a été de $21,3 \pm 1,2$ et $21,3 \pm 0,9$ g/jour, respectivement.

L'extraction des protéines de la muqueuse intestinale avec le protocole mis en place précédemment (protocole D), nous a permis d'extraire 89 ± 5 μ g de protéines par mg de muqueuse intestinale. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus lors de l'optimisation de ce protocole.

Nous avons réalisé deux séries de gels en déposant soit 300 μ g, soit 600 μ g, de protéines par gel. Une analyse préliminaire nous a conduits à modifier la gamme de pH étudiée en première dimension. Compte tenu d'un faible nombre de spots et d'une mauvaise résolution dans les zones de pH supérieur à 8 et inférieur à 5, nous nous sommes limités à une focalisation isoélectrique sur des bandelettes de gradient linéaire de pH préformé de 5 à 8. La diminution de la gamme de pH nous permet d'obtenir une meilleure résolution dans la zone d'intérêt, ainsi que la possibilité de déposer une plus grande quantité de protéines. Un gel représentatif est présenté sur la figure 3.6.

Une bonne résolution sur les gels bidimensionnels est obtenue pour la séparation des protéines intestinales de rat sur une gamme de masses moléculaires comprises entre 17 kDa et 95 kDa. Après analyse des gels selon les critères déterminés précédemment (voir I.2), le

nombre de spots détectés après coloration au CBB est de 390 ± 30 pour $300 \mu\text{g}$ de protéines déposées et de 530 ± 30 pour $600 \mu\text{g}$ de protéines déposés.

L'analyse différentielle a été entreprise en deux temps : en prenant en compte 3 gels de chaque condition et en répétant l'opération pour les deux quantités de protéines déposées ($300 \mu\text{g}$ et $600 \mu\text{g}$). L'ensemble des spots variant significativement a été retrouvé indifféremment par ces deux analyses. La variation en intensité des spots pour chaque groupe est inférieure à un facteur 2 pour 85% des spots et inférieure à un facteur 5 pour 97% des spots. Ces pourcentages sont plus faibles que lors de l'optimisation des conditions expérimentales (93 et 99% respectivement), ce qui révèle une variabilité inter-individu. En effet, dans l'étude préliminaire, nous avons déposé quatre solutions de protéines issues d'un même animal, tandis que pour cette analyse, les solutions protéiques sont issues de rats différents.

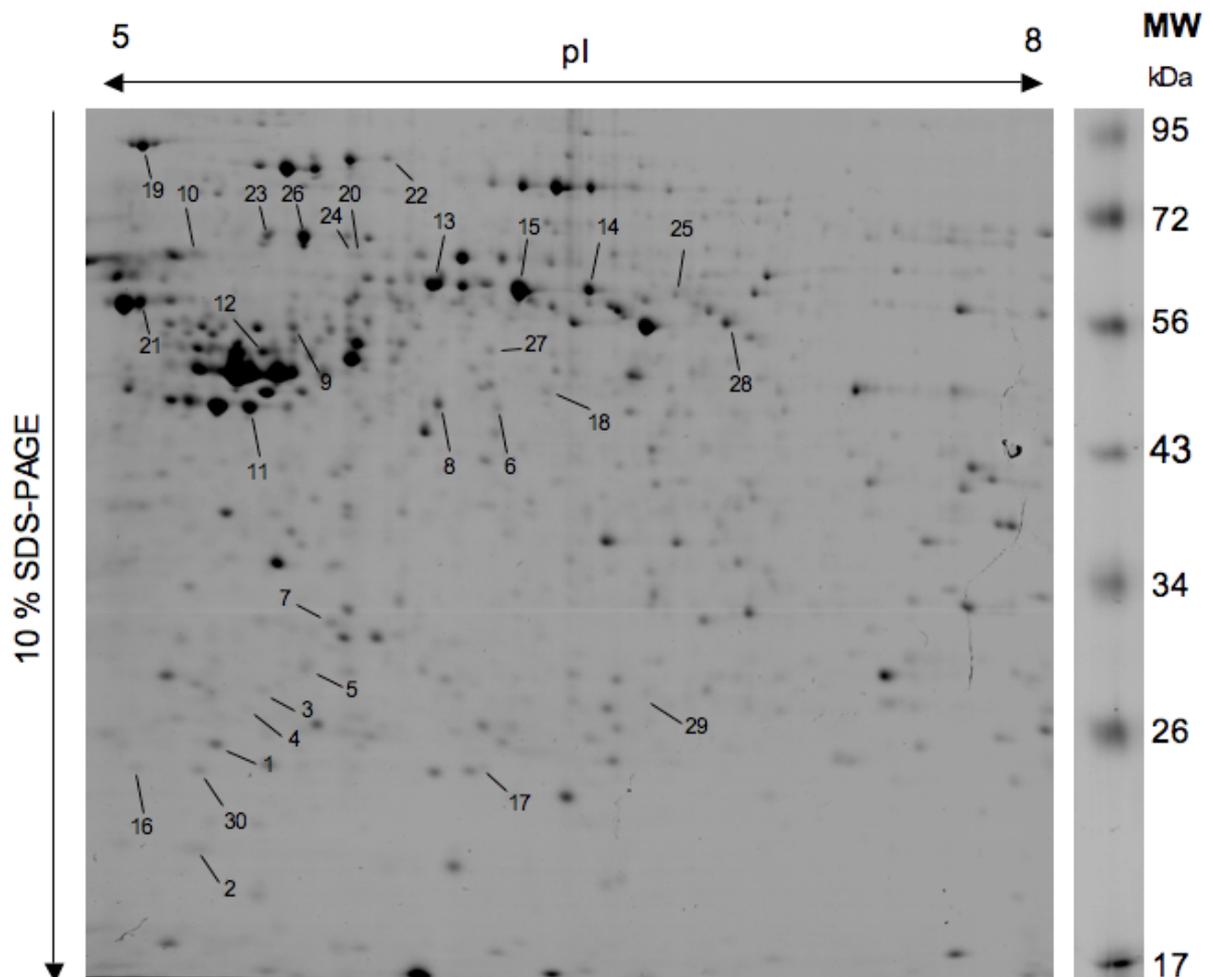


Figure 3.6 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale de rat du groupe témoin. Dépôt de $300 \mu\text{g}$ de protéines. Première dimension : IEF 5-8. Seconde dimension : SDS-PAGE 10%. Environ 400 spots sont détectés après coloration au CBB. Les numéros indiqués correspondent aux spots excisés pour identification (tableau 3.5, hormis spots 28, 29 et 30 non identifiés). Une comparaison visuelle des spots d'intérêt est présentée en annexe (Reichardt et al., 2009).
MW : marqueur de masses moléculaires en kDa.

A partir de ces résultats, nous avons choisi de prendre en considération les spots variant d'au moins un facteur deux et satisfaisant le test statistique de Student ($p < 0,05$). Après vérification des spots sur les différents gels, 30 d'entre-eux présentent une variation en intensité statistiquement significative. Quatorze sont plus intenses (de 2,5 à 39 fois) et seize sont moins intenses (de 2,1 à 61 fois) chez les animaux du groupe test par rapport au groupe témoin. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS a permis d'identifier sans ambiguïté les protéines de 21 spots (tableau 3.5). Sur les neuf restants, six protéines ont été identifiées par nanoLC-MS/MS (tableau 3.5). Enfin, pour les spots 28, 29 et 30, surexprimés 3,3, 2,9 et 2,5 fois, respectivement, aucune protéine n'a pu être identifiée en raison d'un faible signal en spectrométrie de masse et ce malgré plusieurs tentatives.

Parmi les protéines affectées par l'ingestion d'argile, deux familles de protéines sont bien représentées : les protéines du cytosquelette (actine, tubuline, kératine et cytokératine) et des protéines chaperonnes (HSP 70 et HSP 60).

Plus particulièrement, la cytokératine 8, une protéine du cytosquelette spécifique des cellules intestinales, est identifiée dans les spots qui présentent les variations d'intensité les plus fortes (jusqu'à 39 fois plus intense et 61 fois moins intense). La localisation des spots 13, 14 et 15, est en accord avec la masse moléculaire de la protéine entière et les spots 9 et 12 sont légèrement en dessous. Pour les spots 1 à 3, leurs localisations sur le gel indiquent que ce sont des fragments de cette protéine. Ainsi, il semblerait qu'un clivage de la cytokératine 8 soit induit après ingestion de kaolinite en complément alimentaire. Nous avons estimé la masse théorique de ces fragments (spot 1 à 3) à partir du recouvrement de séquence obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS et de l'utilisation du logiciel ProtParam (ExPaSy Proteomics Server, Suisse). La localisation des spots sur les gels est en accord avec les masses et les pI estimés pour ces fragments.

Spot	Ratio	Protéine identifiée	Numéro d'accension NCBI	MM	pI	Score	% rec.	
Protéines liées à la dynamique du cytosquelette								
1	+39	Cytokeratin 8 (22-222)	AAA 19668	23	5,2	94	27	(M)
2	+15	Cytokeratin 8 (242-403)	AAA 19668	18	5,1	173	27	(M)
3	+5,8	Cytokeratin (13-222)	AAA 19668	24	5,3	58	26	(M)
4	+3,7	Keratin 19	AAH 82424	47	5,3	165/3	7	(L)
5	+3,4	γ Actin	CAM 27034	33	5,2	66	30	(M)
6	+3,1	β Actin	BAE 36758	42	5,2	128	40	(M)
7	+2,8	γ Actin	CAM 27034	33	5,2	74	43	(M)
8	+2,7	β Actin	BAE 36758	42	5,2	154	50	(M)
9	-2,7	Cytokeratin 8	AAA 19668	53	5,5	527/9	18	(L)
10	-2,8	α Tubulin	NP 035784	50	4,9	117	52	(M)
11	-3,5	Keratin complex type 1	NP 955792	45	5,2	309	69	(M)
12	-4,1	Cytokeratin 8	AAA 19668	53	5,5	182	61	(M)
13	-10	Cytokeratin 8	AAA 19668	53	5,5	86	36	(M)
14	-29	Cytokeratin 8	AAA 19668	53	5,5	135	51	(M)
15	-61	Cytokeratin 8	AAA 19668	53	5,5	120	40	(M)
Autres fonctions								
16	+5,0	Ca ²⁺ binding protein P22	XP 575321	28	5,1	68	43	(M)
17	+2,8	HSP 70 (25-126)	NP_037215	13	5,4	428/8	14	(L)
18	+2,7	HSP 70 (3-357)	NP_037215	39	5,8	78	27	(M)
19	-2,1	HSP 70	NP_037215	71	5,4	145	42	(M)
20	-2,5	HSP 60	CAA 37654	58	5,4	58	26	(M)
21	-2,6	ATP Synthase β	AAB 02288	51	4,9	100	40	(M)
22	-2,6	Major Vault Protein	NP 073206	99	5,7	348/6	6	(L)
23	-3,6	HSP 60	CAA 37654	58	5,4	38	23	(M)
24	-3,9	HSP 60	CAA 37654	58	5,4	67	27	(M)
25	-4,5	Retinoic acid receptor	EDM 05964	51	8,0	466/10	16	(L)
26	-5,0	HSP 60	CAA 37654	58	5,4	179	50	(M)
27	-6,1	Aldehyde dehydrogenase	AAH 74019	51	4,9	483/9	14	(L)

Tableau 3.5 : Identification des protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée après ingestion de kaolinite en complémentation alimentaire pendant 28 jours. Les numéros correspondent aux spots indiqués sur la figure 3.6. Pour les facteurs de variation, (+) signifie une surexpression chez les animaux du groupe test et (-) une répression. Pour les spots 1, 2, 3, 17 et 18, la couverture de séquence obtenue par analyse par MALDI-TOF est indiquée entre parenthèses. MM : masse moléculaire théorique en kDa. pI : pI théorique. Les valeurs de score, de pourcentage de recouvrement (% rec), de masses moléculaires et de pI sont ceux indiqués sur la page de résultats Mascot. Pour les identifications par MS/MS, est également indiqué avec le score, le nombre de peptides uniques identifié. Pour les fragments (spots 1, 2, 3, 17 et 18), les valeurs de MM et de pI indiquées ont été estimées par le logiciel ProtParam (ExPaSy, Suisse) à partir des recouvrements de séquences. M : identification par MALDI-TOF-MS, L : identification par nanoLC-MS/MS.

La figure 3.7 montre les recouvrements de séquence de la protéine entière (spot 15) et des fragments contenus dans les spots 1 et 2. Pour le spot 1, correspondant à un fragment du côté N-terminal, aucun recouvrement de séquence n'est observable à partir de l'acide aminé 223, et pour le spot 2, correspondant à un fragment du côté C-terminal, aucun recouvrement de séquence n'est observable jusqu'à l'acide aminé 242. Alors que, pour la protéine entière, nous observons un recouvrement de la séquence de l'acide aminé 197 à l'acide aminé 262, le recouvrement de séquence obtenu par MALDI-TOF-MS pour les spots 1, 2 et 3 met en évidence un clivage spécifique entre le glutamate 223 et l'arginine 241.



Figure 3.7 : Mise en évidence d'un clivage de la cytokératine 8 après ingestion de kaolinite en complément alimentaire par analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. (A) Recouvrement de séquence obtenu par MALDI-TOF-MS pour la protéine entière et pour des fragments de cytokératine 8. (B) Séquence potentielle de clivage soulignée en bleu. En rouge, les peptides détectés par spectrométrie de masse.

III Effet de la kaolinite en complémentation alimentaire au cours et après une phase de jeûne prolongé

Dans cette nouvelle expérience, nous nous sommes intéressés à l'effet de la consommation d'argile au cours d'une phase de jeûne et au cours de la phase de réalimentation suite à ce jeûne. Le jeûne peut être décrit en trois phases réversibles (Belkhou et al., 1991). Au cours de la première phase, une diminution rapide de la masse de l'animal est observable et ce sont principalement les réserves glucidiques qui sont utilisées comme source énergétique. Quand les réserves glucidiques sont épuisées, le jeûne entre dans la deuxième phase. Durant celle-ci, la perte de poids de l'animal est ralentie, la dégradation des protéines est limitée, et l'oxydation des lipides est principalement utilisée pour fournir l'énergie nécessaire au métabolisme de l'organisme. Quand les réserves lipidiques atteignent un certain seuil, le jeûne entre dans sa troisième phase au cours de laquelle les protéines sont également utilisées comme source énergétique. Nous avons privilégié une réalimentation au moment du passage en phase III du jeûne quand les réserves lipidiques sont les plus faibles. En effet, compte tenu de l'augmentation de l'absorption lipidique observée lors de l'étude précédente, nous voulions évaluer l'intérêt de l'ingestion de kaolinite en complément alimentaire pour favoriser la réalimentation de sujets dénutris. La figure 3.8 présente l'expérience réalisée lors de cette étude. L'effet de la kaolinite a été étudié en comparant des animaux ayant à disposition de la kaolinite au cours du jeûne ou au cours de la phase de réalimentation, à des animaux témoins sans kaolinite.

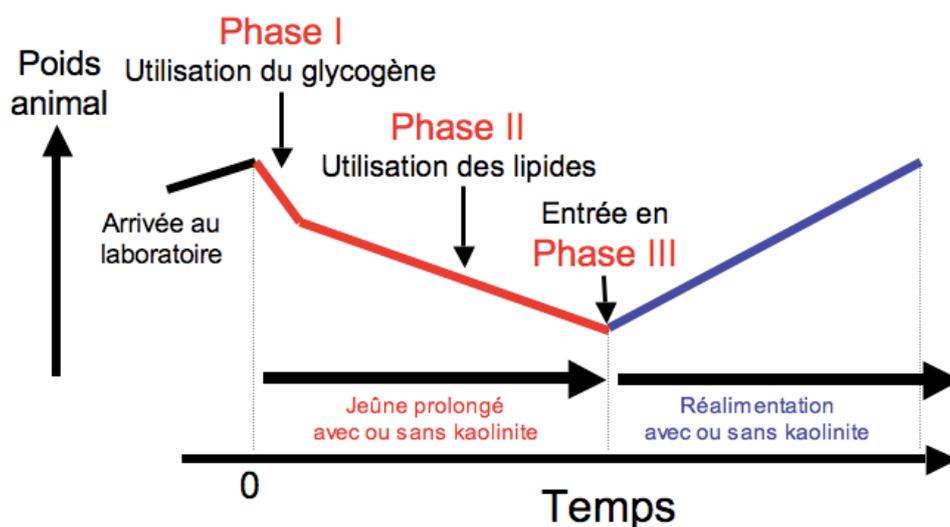


Figure 3.8 : Présentation schématique des conditions expérimentales de l'étude de l'effet de la consommation de kaolinite au cours du jeûne prolongé en phase III et au cours de la phase de réalimentation. En fonction du groupe, les animaux ont eu ou non accès à de la kaolinite.

3.1 Données physiologiques

Au cours du jeûne, la consommation de kaolinite est très variable selon les individus ($3,4 \pm 2,6$ g/jour) et ne modifie ni les phases métaboliques ni leurs durées. En effet, la perte de poids des animaux des deux groupes est similaire (136 ± 6 et 135 ± 9 g pour les animaux témoins et ceux ayant consommé de la kaolinite respectivement, avec $n=5$ dans chaque groupe).

Dans une première expérience de réalimentation (RéaA), le gain de poids total et le gain de poids journalier pendant la réalimentation ne sont pas significativement différents entre le groupe alimenté normalement (NF, $n=9$) et le groupe ayant à disposition de la kaolinite en plus des croquettes standards (KaoA, $n=9$). Par contre, la consommation alimentaire quotidienne pour les rats du groupe KaoA est significativement réduite de $6 \pm 1\%$ par rapport aux rats nourris normalement ($p<0,001$). La consommation quotidienne en kaolinite a été stabilisée à partir de la deuxième journée jusqu'à la fin de la réalimentation à $3,9 \pm 1,2\%$ de la ration alimentaire journalière (contre $18,2 \pm 4,8\%$ le premier jour).

Compte tenu de ces premiers résultats, nous avons entrepris une deuxième expérience de réalimentation (RéaB). Dans cette nouvelle expérience, nous avons modifié le protocole précédent en limitant la quantité de croquettes disponibles pour les animaux ne disposant pas de kaolinite (groupe NF-, $n=13$) à la quantité de croquettes ingérées par les animaux disposant de kaolinite (KaoB, $n=7$). Cette modification a induit, pour les animaux du groupe NF-, un allongement de la durée nécessaire au retour à la masse initiale de l'ordre de 15% ($p=0,04$) et un gain de masse quotidien diminué de 18% ($p=0,003$). Pour le groupe KaoB, les consommations quotidiennes en kaolinite ont été stabilisées à $3,4 \pm 1,2\%$ de la fraction alimentaire journalière (contre $14,2 \pm 1,2\%$ le premier jour) à partir du deuxième jour de réalimentation jusqu'à la fin de réalimentation.

Après euthanasie et dissection, tous les rats présentaient une forte accumulation de masse graisseuse viscérale. Une analyse de la composition corporelle a été réalisée par le Dr Jean Patrice Robin au DEPE. Pour l'expérience RéaA, aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne la composition corporelle en lipides, en protéines et en eau. Par contre, les teneurs en minéraux des animaux du groupe RéaA étaient plus élevées (augmentation de 6% , $p=0,044$).

En ce qui concerne la deuxième expérience (RéaB), les teneurs en eau, en matières grasses et en minéraux sont significativement différentes entre les animaux des groupes KaoB et NF-.

Les teneurs en eau et en minéraux sont plus faibles chez les animaux NF- de 2,3%, ($p=0,014$) et de 11,6%, ($p<0,001$) respectivement, en comparaison aux animaux du groupe KaoB, tandis que la teneur en graisse est plus élevée de 13,6% ($p=0,042$) pour les animaux NF-.

Des observations par microscopie optique et électronique à transmission ont également été réalisées sur la muqueuse intestinale. Contrairement à l'étude d'une complémentation alimentaire de 28 jours, aucune différence significative concernant la longueur et l'épaisseur des villosités ou la largeur des entérocytes n'est observable entre les différents groupes d'animaux. De plus, la présence de gouttelettes lipidiques dans les entérocytes et la présence de chylomicrons dans les espaces intercellulaires à l'extrémité des villosités intestinales est observable quel que soit le groupe d'animaux.

Par contre, la bordure en brosse présente des morphologies différentes selon le groupe étudié. En effet, la longueur des microvillosités des rats des groupes KaoA et KaoB est diminuée par rapport à celles des rats des groupes NF et NF- de l'ordre de 21% ($p<0,001$) et 16% ($p<0,001$), respectivement. La largeur des microvillosités du groupe NF est diminuée de l'ordre de 22% ($p<0,001$) et 17% ($p=0,001$) par rapport aux animaux ayant ingéré de la kaolinite et le groupe NF-, respectivement. De même, la densité des microvillosités du groupe NF est augmentée de l'ordre de 11% ($p=0,005$) et 9% ($p=0,021$) par rapport aux rats ayant consommé de la kaolinite et le groupe NF-, respectivement.

Néanmoins, les surfaces d'échanges totales et les volumes des microvillosités ne sont pas significativement différents entre les animaux du groupe NF et les animaux ayant consommé de la kaolinite. Par contre, si l'on compare des animaux ayant consommé de la kaolinite et les animaux du groupe NF-, ces valeurs sont significativement plus élevées chez les rats du groupe NF- de 11,5% ($p=0,030$) pour la surface d'échange totale et de 28,5% ($p=0,010$) pour le volume des microvillosités, respectivement.

3.2 Analyse protéomique différentielle

Des échantillons de muqueuse intestinale ont été prélevés au cours des deux analyses de réalimentation RéaA et RéaB. Compte tenu du nombre d'échantillons récupérés (n=9, 9, 13 et 7 pour les groupes NF, KaoA, NF- et KaoB, respectivement), nous avons réalisé des pools à partir des extraits individuels. Ces mélanges ont été réalisés de telle sorte que les moyennes des consommations de croquettes et d'argiles de chaque individu dans chaque pool soient similaires (tableau 3.6). La création de pools permet également de s'affranchir de la variabilité de chaque individu.

Groupe	Expérience RéaA	Expérience RéaB
Animaux témoins	NF (n=9) 3 pools de 3 rats Conso croquettes : $29,1 \pm 0,4$ g/j	NF- (n=13) 1 pool de 5 rats et 2 pools de 4 rats Conso croquettes : $28,5 \pm 0,5$ g/j
Animaux ayant à disposition de la kaolinite	KaoA (n=9) 3 pools de 3 rats Conso croquettes : $27,1 \pm 0,7$ g/j Conso argile : $1,4 \pm 0,1$ g/j	KaoB (n=7) 1 pool de 4 rats et 1 pool de 3 rats Conso croquettes : $28,4 \pm 0,8$ g/j Conso argile : $1,3 \pm 0,1$ g/j

Tableau 3.6 : Création de pools pour l'analyse protéomique différentielle.

Les consommations journalières de croquettes et de kaolinite indiquées dans le tableau correspondent aux moyennes des moyennes de consommation de chaque pool, elles mêmes étant les moyennes des consommations journalières moyennes de chaque individu constituant ce pool.

La séparation des protéines intestinales a été réalisée en première dimension sur des bandelettes de gradient linéaire de pH préformé de 5 à 8, et en deuxième dimension sur des gels SDS-PAGE à 10%. Des exemples de gels de chaque condition, obtenus pour l'analyse RéaA et pour l'analyse RéaB, sont présentés sur la figure 3.9. Pour chaque condition, six gels ont été réalisés en déposant 500 µg de protéines extraites de la muqueuse intestinale. Les spots conservés pour l'analyse devaient être présents sur au moins cinq gels d'une même condition et satisfaire le test statistique de Student ($p < 0,05$). Compte tenu de faibles facteurs de variation d'intensité des spots en comparaison aux facteurs de variation de l'étude précédente (jusqu'à 2,7 fois contre 61 fois), nous avons réalisé en complément un test d'analyse de la variance ANOVA pour définir quels spots variaient significativement entre les groupes.

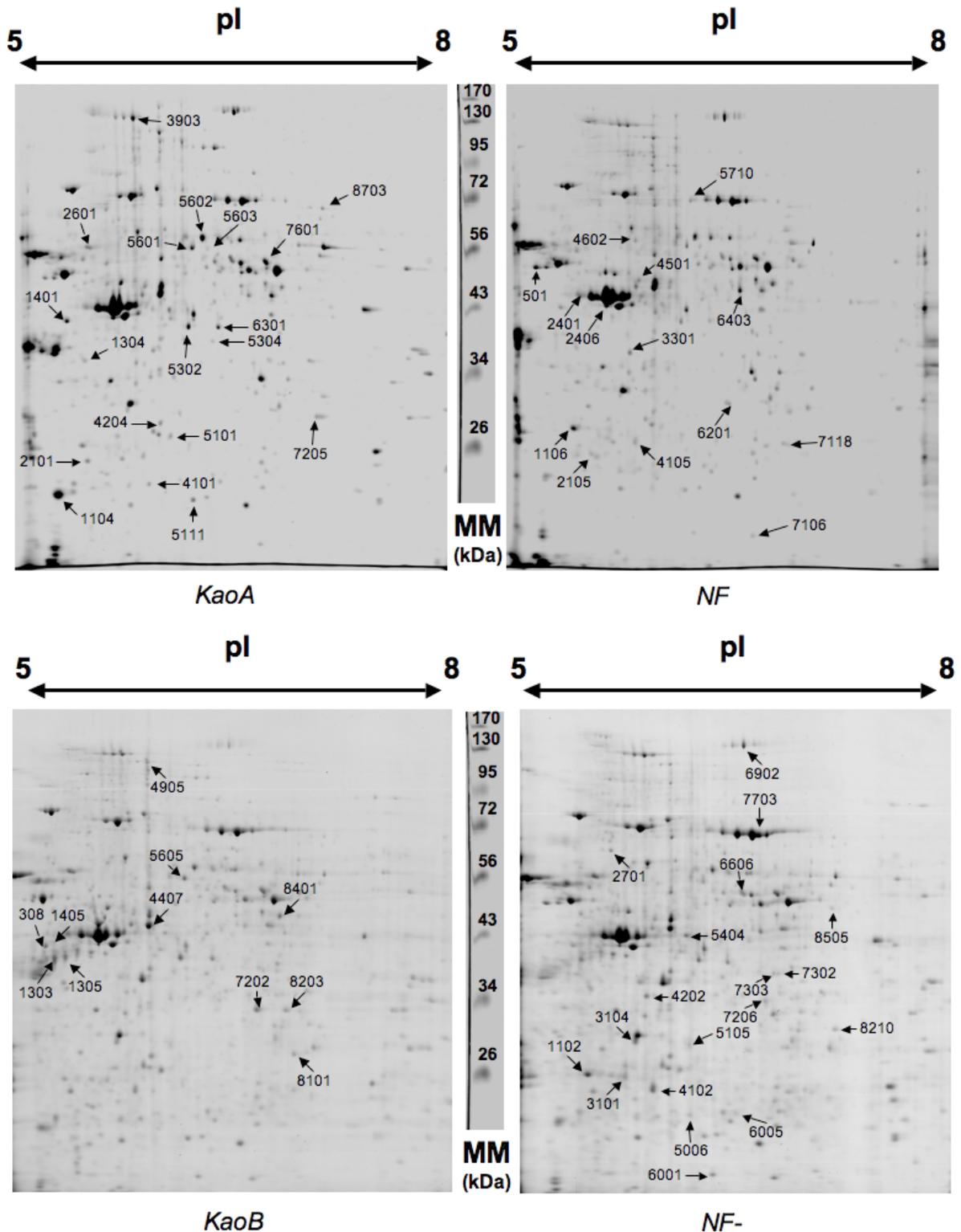


Figure 3.9 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale de rat ayant consommé de la kaolinite (*KaoA*, *KaoB*) ou réalimentés normalement (*NF*, *NF-*) au cours des expériences RéaA et RéaB. 500 µg de protéines ont été déposés. Première dimension : IEF 5-8. Seconde dimension : SDS-PAGE 10%. Environ 400 spots sont détectés après coloration au CBB. Les numéros indiqués correspondent aux protéines identifiées dans le tableau 3.7 pour RéaA et tableau 3.8 pour RéaB (hormis la 8210 non identifiée). MM : marqueurs de masses moléculaires en kDa.

Les cartes protéiques obtenues dans cette étude sont en accord avec celles obtenues précédemment (figure 3.6). Il est à noter que les images des gels présentées dans cette partie ne sont pas découpées à l'identique en raison de spots d'intérêt présents dans une gamme de masse supérieure à 95 kDa, ce qui n'était pas le cas auparavant.

A partir de 500 µg de protéines déposées sur les gels, 395 ± 41 spots en moyenne ont été détectés après coloration au CBB avec des masses moléculaires comprises entre 17 et 130 kDa. L'analyse statistique a révélé que l'intensité de 33 spots était significativement différente (test de student et ANOVA, valeur $p \leq 0,05$) entre les témoins et les rats ayant ingéré de la kaolinite au cours de la phase de réalimentation dans l'expérience RéaA (tableau 3.7). Dix-neuf spots ont une intensité plus forte sur les gels kaolinite tandis que 14 spots ont une intensité plus faible. Une analyse similaire entre le groupe de rats ayant ingéré de la kaolinite et le groupe de rats témoins restreints (RéaB) indique que 30 spots ont une intensité significativement différente : 11 spots sont plus intenses et 19 sont moins intenses (tableau 3.8).

Nous avons identifié les protéines contenues dans les spots d'intérêt par analyse nanoLC-MS/MS uniquement. Pour l'identification des protéines, nous avons également appliqué une stratégie « Target Decoy » (Elias et Gygi, 2007) combinée à l'utilisation de deux moteurs de recherche : Mascot et OMSSA (Geer et al., 2004). L'intérêt de cette stratégie est d'augmenter considérablement le taux de confiance dans les identifications des protéines par l'utilisation de moteurs de recherche utilisant des algorithmes de recherche différents et d'une banque de données constituée des séquences normales (cible) et de séquences leurres. Dans notre cas, les séquences leurres sont les séquences cibles inversées. A partir des identifications des protéines dans cette banque, les seuils de scores sont affinés pour éviter l'identification de faux positifs (taux de faux positifs <1%).

Pour un seul spot (spot 8210, expérience RéaB, réprimé d'un facteur 1,6 fois, $p=0,0265$), nous n'avons pas pu identifier la protéine présente dans le spot.

Dans la majorité des cas, une protéine unique a été identifiée sans ambiguïté. Pour certains spots (7/62), deux protéines ont été identifiées. Ces identifications ont été volontairement placées en bas du tableau, et nommées identifications ambiguës, car même si l'identification proprement dite des protéines dans le spots n'a pas posé de problème, nous ne pouvons pas déterminer quelle est la protéine qui varie sous l'effet de la kaolinite. Enfin, l'essentiel des protéines a été identifié quel que soit le moteur de recherche utilisé (Mascot ou OMSSA). Toutefois, certaines protéines (5/69) n'ont pas été identifiées par le moteur de recherche OMSSA.

Plus précisément, en prenant en compte toutes les protéines identifiées par les deux moteurs de recherche :

- dans 76% des cas (49/64), un plus grand nombre de peptides uniques a été identifié par le moteur de recherche Mascot,
- dans 16% des cas (10/64), un nombre de peptides uniques identiques est identifié par les deux moteurs de recherche,
- dans 8% des cas (5/64), un plus grand nombre de peptides uniques a été identifié par le moteur de recherche OMSSA.

Ainsi, dans notre cas, c'est le moteur de recherche Mascot qui permet l'identification du plus grand nombre de peptides uniques. Cette observation est en contradiction avec les observations des créateurs du moteur de recherche OMSSA et qui ont publié des résultats indiquant un plus grand nombre de peptides identifiés par leur moteur de recherche (Geer et al., 2004).

La répartition des fonctions cellulaires des protéines dont l'expression est affectée par l'ingestion d'argile est présentée sur la figure 3.10. Nous constatons que pour les deux expériences (RéaA et RéaB), les fonctions cellulaires les plus touchées sont le métabolisme des lipides, la dynamique du cytosquelette et la dégradation des protéines.

Spot	p-value	Ratio	Protéine identifiée	Numéro d'accension NCBI	MM	pI	% rec	A	B
Protéines liées au métabolisme des lipides									
1401	0,0040	+2,0	Apolipoprotein A-IV	AAH91159	44	5,1	28	12	11
4101	0,0051	+1,5	Apolipoprotein A-I	AAH89820	30	5,5	33	9	8
5602	0,0159	+1,5	Protein disulfide-isomerase A3	AAH62393	57	5,9	24	16	12
Protéines liés à la dynamique du cytosquelette									
2101	0,0017	+2,4	Rho-GDI alpha	AAH83817	23	5,1	16	4	5
8703	0,0204	+2,4	WD repeat protein 1	AAX94056	66	6,1	5	6	5
2601	0,0043	+2,2	tubulin alpha chain	AAH78830	50	4,9	5	3	3
1304	0,0390	+1,9	Villin-1 (Frag)	AAH15267	93	5,7	2	3	3
6301	0,0080	+1,9	Actin beta	A38571	42	5,3	5	4	2
2401	0,0223	-1,5	Actin beta	A38571	42	5,3	18	5	2
4105	0,0135	-1,7	Actin beta	A38571	42	5,3	15	6	4
2406	0,0141	-1,9	Actin beta	A38571	42	5,3	27	9	8
4602	0,0003	-2,7	Coronin like protein	CAA06838	54	5,7	5	3	3
Autres fonctions									
5304	0,0239	+2,2	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha	EDL95540	40	6,3	13	6	6
5302	<,0001	+1,9	Proteasome 26S su	BAE37156	43	5,5	13	6	-
7601	0,0079	+1,9	Aldehyde dehydrogenase family 9	EDM09283	56	6,7	12	5	6
5101	0,0224	+1,7	Proteasome SU 28	AAH60574	29	5,6	23	10	7
3903	0,0090	+1,7	Similar to frag FC des IgG BP (frag)	AAH30871	127	5,0	4	2	4
5601	0,0333	+1,6	Peptidase D	AAH88440	55	5,6	8	7	5
4204	0,0044	+1,5	Proteasome activator complex subunit 2	BAA08207	27	5,5	20	5	3
5111	0,0346	+1,5	Cytidylate kinase	AAH98727	26	8,2	18	5	4
6403	0,0162	-1,5	Ornithine Oxo acid transaminase	AAH61551	48	6,5	15	12	-
3301	0,0124	-1,5	Bisphosphate 3 nucleotidase	AAH85692	33	5,6	26	9	7
4501	0,0033	-1,6	Guanine deaminase	AAF63337	51	5,5	14	11	9
2105	0,0473	-1,6	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone)	AAA41669	27	6	14	3	3
6201	0,0307	-1,9	Carboxypeptidase B	CAJ01240	47	5,4	4	5	3
7106	0,0449	-2	Adenylyl cyclase-associated protein 1	AAH05446	51	7,3	10	5	4
1106	0,0060	-2,3	Chaperonin GroEL precursor (frag)	CAA38564	61	5,9	14	4	4
501	0,0230	-2,3	F1-atpase beta chain beta chain	1MABB	49	5,1	36	12	12
7118	0,0310	-2,3	Phosphoglycerate mutase	JC1132	29	6,7	16	5	4
Identifications ambiguës									
5603	0,0190	+2,5	Protein disulfide-isomerase A3	AAH62393	57	5,9	6	7	4
			Peptidase D	AAH88440	55	5,6	11	11	6
7205	0,0267	+2,4	Proteasome endopept, Complex chain C2	AAH62233	30	6,1	10	8	5
			Glutathione transferase omega1	BAA34217	28	6,2	17	3	2
1104	0,0204	+1,8	catechol O-methyltransferase	AAH81850	30	5,4	11	5	4
			Cytokeratin-8 (83-230)	AAA19668	54	5,7	11	7	5
5710	0,0112	-2	Albumin precursor	CAA24532	69	6,1	20	15	13
			Similar to ALG-2-Interacting protein	XP_343495	97	5	6	5	2

Tableau 3.7 : Protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée par ingestion d'argile en complémentation alimentaire après un jeûne prolongé (RéaA). Les numéros de spot correspondent aux numéros indiqués sur la figure 3.9. Pour les facteurs de variation : (+) signifie une surexpression chez les animaux du groupe kaolinite et (-) une répression chez les animaux du groupe kaolinite. MM : masse moléculaire en kDa. Les valeurs de score, de pourcentage de recouvrement, de masses moléculaires et de pI sont ceux indiqués sur la page de résultats Mascot. Est également indiqué le nombre de peptides attribués pour l'identification d'une protéine par le moteur de recherche Mascot (A) et/ou OMSSA (B). Identifications ambiguës : incapacité à définir quelle protéine identifiée varie sous l'effet de la kaolinite.

Spot	P-value	Ratio	Protéine identifiée	Numéro d'accension NCBI	MM	pI	% rec	A	B
Protéine liée au métabolisme des lipides									
308	0,0009	+1,6	Apolipoprotein A-IV	AAH91159	44	5,1	30	15	13
Protéines liées à la dynamique du cytosquelette									
1305	0,0075	+2,3	Cytokeratin 8	AAA19668	53	5,5	22	21	18
1405	0,0459	+2,0	Keratin 21 type I	AAA41473	49	5,3	17	20	15
1303	0,0079	+2,0	Cytokeratin 8	AAA19668	53	5,5	18	17	16
4102	0,0018	-2,0	Actin beta (184-fin)	A38571	42	5,3	9	6	7
1102	0,0464	-2,2	Actin related protein	AAI15751	34	6,9	8	5	-
5105	0,0312	-2,3	Actin capping protein beta chain	AAA52226	31	5,5	26	14	9
5006	0,0115	-2,4	Actin beta (235-Ct)	A38571	42	5,3	12	7	5
3101	0,0055	-2,7	Actin beta (85-385)	A38571	42	5,3	11	7	5
Autres fonctions									
5605	0,0448	+2,1	Peptidase D	Q5I0D7	55	5,6	21	15	12
4905	0,0063	+1,7	Major Vault Protein	I53908	99	5,7	14	16	9
8203	0,0011	+1,6	Glycerol 3 P deshydrogenase	AAH88396	37	6,7	31	17	13
4407	0,0108	+1,6	Creatine kinase beta chain	AAA492	43	5,3	21	14	11
7302	0,0351	-1,5	Galactose 4 epimerase	AAH97293	38	6,0	9	5	-
7303	0,0377	-1,5	Arginase II	AAC22580	39	6,2	5	3	3
6001	0,0061	-1,6	Fth 1 (Ferritin heavy chain)	AAH81845	26	6,2	13	6	3
6005	0,0384	-1,6	Peroxiredoxin 3	EDL94585	28	7,1	11	5	3
6606	0,0069	-1,6	Aldehyde dehydrogenase prec,	AAH62081	56	6,6	17	13	8
7206	0,0033	-1,7	Intellectin	JE0328	35	8,0	14	7	6
5404	0,0013	-1,8	Albumin precursor (fragment)	CAA24532	69	6,1	15	12	14
3104	0,0152	-1,8	Anexin A4	AAH85688	36	5,4	20	6	6
6902	0,0350	-1,9	Sucrase isomaltase	AAA65097	210	5,6	2	9	5
7703	0,0085	-1,9	Albumin precursor	CAA24532	69	6,1	31	29	26
4202	0,0172	-1,9	Biphosphate 3 Nucleotidase	AAH85692	33	5,6	6	6	4
8505	0,0080	-2,5	Albumin precursor (191-Ct)	CAA24532	69	6,1	5	3	-
2701	<0,0001	-2,7	dnaK molecular chaperone precursor	AAH62017	72	5,1	23	14	10
Identifications ambiguës									
8101	0,0006	+2,1	Proteasome endopept, Complex C2	AAH62233	30	6,1	12	8	7
			Gluthation transferase omega 1	BAA34217	28	6,2	6	4	2
8401	0,0149	+1,7	Proteasome 26S su	BAE37156	43	5,5	7	3	3
			ATP sulfurylase/APS kinase 2 (frag)	AAC98687	70	7,1	16	21	19
7202	0,0435	+1,5	Glycerol 3 P deshydrogenase	AAH88396	37	6,3	14	8	6
			Malate dehydrogenase	AAH59124	36	6,2	21	15	6

Tableau 3.8 : Protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée par ingestion d'argile en complémentation alimentaire après un jeûne prolongé (réaB). Les numéros de spot correspondent aux numéros indiqués sur la figure 3.9. Pour les facteurs de variation : (+) signifie une surexpression chez les animaux du groupe kaolinite et (-) une répression chez les animaux du groupe kaolinite. MM : masse moléculaire en kDa. Les valeurs de pourcentage de recouvrement, de masses moléculaires et de pI sont ceux indiqués sur la page de résultats Mascot. Est également indiqué le nombre de peptides uniques attribués pour l'identification d'une protéine par le moteur de recherche Mascot (A) et/ou OMSSA (B).
Identifications ambiguës : incapacité à définir quelle protéine identifiée varie sous l'effet de la kaolinite.

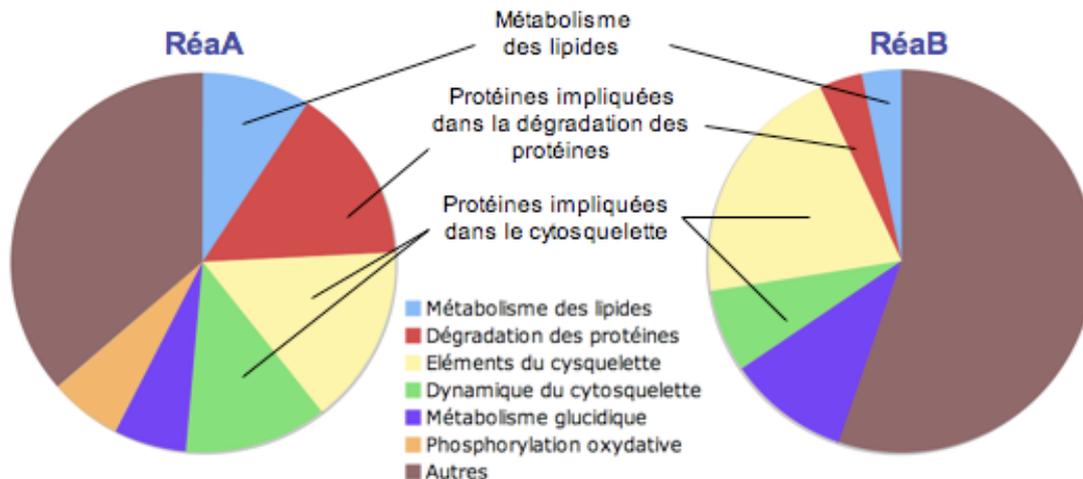


Figure 3.10 : Répartition des fonctions cellulaires affectées par l'ingestion d'argile.
 L'aire de chaque fraction du camembert est fonction du nombre de protéines identifiées dans les différentes expériences.

Parmi les protéines identifiées, trois protéines, sur-exprimées par la consommation d'argile, sont impliquées dans le métabolisme des lipides : l'apolipoprotéine A-IV (sur-exprimée 2 fois et 1,6 fois, pour les expériences RéaA et RéaB respectivement), l'apolipoprotéine A-I (sur-exprimée 1,5 fois au cours de l'expérience RéaA) et la protéine disulfide-isomérase A3 (PDI) (sur-exprimée 1,5 fois au cours de l'analyse RéaA). L'apolipoprotéine A-IV est impliquée dans le transport des acides gras et joue également un rôle de facteur de satiété pour l'organisme (Tso et Liu, 2004). L'apolipoprotéine A-I est un constituant des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Franck et Marcel, 2000). La PDI est un membre de la famille des Microsomal Triglycerides Transfert Protein, localisée à l'intérieur de la membrane de la bordure en brosse (Slight et al., 2004).

Comme lors d'une complémentation en kaolinite pendant 28 jours, l'expression de protéines du cytosquelette est également modifiée. Parmi ces protéines, les changements dans les niveaux d'expression d'éléments fondamentaux du cytosquelette (certaines isoformes d'actine, de tubuline et de cytokératine) et de protéines impliquées dans la régulation et la réorganisation du cytosquelette, mettent en évidence une adaptation du cytosquelette des entérocytes. Il est également important de noter le rôle de la tubuline (surexpression de 2,2 fois de la tubuline alpha) dans le transport intracellulaire des lipides (Reaven et Reaven, 1977).

Par contre, très peu de protéines semblent être régulées de façon identique pour les deux expériences (tableau 3.9). Cette observation peut paraître surprenante. En effet, quand nous avons imaginé l'expérience RéaB, compte tenu de la limitation de la quantité de nourriture

pour les rats sans argiles, nous pensions obtenir une augmentation des effets de la kaolinite sur les protéines intestinales identifiées lors de la première expérience (RéaA). Cependant, telle que nous avons réalisé l'expérience B, le groupe témoin (NF-) était soumis à deux paramètres : la réalimentation sans argile suite à un jeûne et dans le même temps une restriction alimentaire, tandis que le groupe disposant de kaolinite ne subissait qu'un seul paramètre : une réalimentation avec argile après une phase de jeûne prolongé. De ce fait, une comparaison de ces deux expériences semble compromise.

Protéine identifiée	Facteur de variation RéaA	Facteur de variation RéaB
Apolipoprotéine A-IV	+ 2,0	+ 1,6
Peptidase D	+ 1,6	+ 2,1
Biphosphate 3 nucleotidase	- 1,5	- 1,9
Albumine (précurseur)	- 2*	-1,8 ; -2,5
Protéasome 26S su	+ 1,9	+ 1,7*

Tableau 3.9 : Protéines régulées dans les deux expériences de réalimentation.

Expérience RéaA : réalimentation après un jeûne prolongé avec une quantité de nourriture non limitée avec ou sans kaolinite. Expérience RéaB : réalimentation après un jeûne prolongé avec une quantité de nourriture limitée avec ou sans kaolinite. Pour les facteurs de variation : (+) signifie une surexpression chez les animaux du groupe kaolinite et (-) une répression chez les animaux du groupe kaolinite. * Protéine dont l'identification est ambiguë.

Enfin, parmi toutes les protéines identifiées, l'apolipoprotéine A-IV a retenu plus particulièrement notre attention. Afin de valider ce résultat obtenu par analyse protéomique différentielle, nous avons réalisé une analyse par Western Blot sur des extraits protéiques individuels (n=5 pour chaque groupe). La figure 3.11 présente les résultats obtenus.

Malgré une importante hétérogénéité des expressions de la protéine dans un même groupe (écart type de 20%, n=5), un facteur de variation de +1,8 de l'expression de l'apolipoprotéine A-IV, statistiquement significatif (p=0,0061 et p=0,0129 pour RéaA et Réa B, respectivement), est observable entre les animaux ayant consommé de la kaolinite au cours de la phase de réalimentation et les animaux témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse protéomique : augmentation d'un facteur 2 et 1,6 pour les expériences RéaA et RéaB, respectivement.

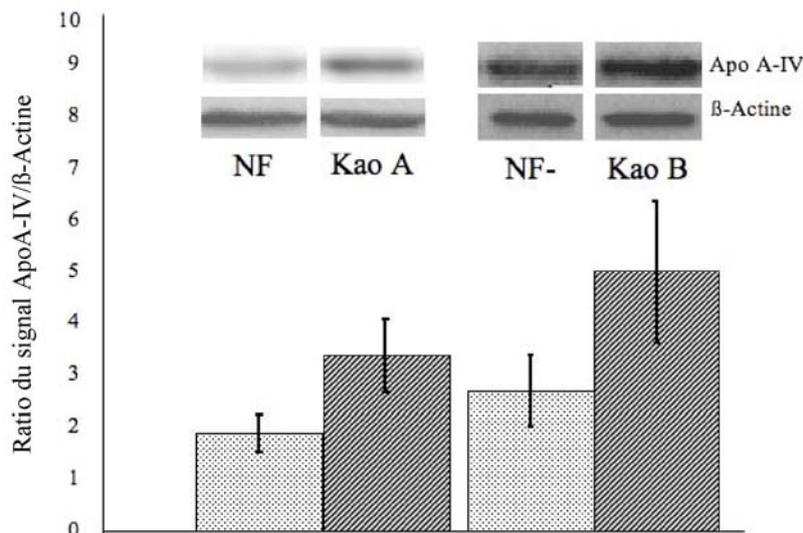


Figure 3.11 : Analyse de l'expression de l'apolipoprotéine A-IV par Western Blot.

Les bandes correspondant à l'apolipoprotéine A-IV (Apo A-IV) et à la β -Actine ont été révélées par chimioluminescence à l'aide d'anticorps primaires spécifiques et d'anticorps secondaires couplés à la peroxidase après séparation des protéines sur gels SDS-PAGE 10%. Les ratios de signal sont obtenus en rapportant l'intensité de la bande de l'Apo A-IV sur l'intensité du contrôle β -Actine.

IV Effets de l'ingestion de kaolinite au cours d'une restriction alimentaire

Dans cette expérience, nous avons limité la quantité de croquettes à 75% de la ration normalement consommée par les animaux et ayant à disposition ou non de la kaolinite en quantité non limitée (Kao75 et NF75, respectivement). Des animaux non restreints avec ou sans complémentation alimentaire en kaolinite ont servi de groupes contrôles (Kao100 et NF100). Une approche similaire aux expériences précédentes a été réalisée : suivi de la prise de poids et de la consommation de croquette et d'argile, observation microscopique de la muqueuse intestinale et analyse protéomique différentielle.

Cette étude n'a révélé aucune différence significative, entre les animaux témoins et ceux ayant à disposition de la kaolinite, aussi bien au niveau de la prise de poids que de la morphologie intestinale, malgré une consommation de 5% de kaolinite.

Pour l'analyse protéomique, en raison d'une mauvaise reproductibilité des cartes protéiques obtenues par électrophorèse bidimensionnelle sur les échantillons de muqueuse intestinale récupérés à l'issue de cette expérience, nous n'avons pas pu réaliser d'analyse différentielle des groupes NF75 et Kao75. Cette mauvaise qualité de séparation a été obtenue malgré deux séries de gels, réalisées par deux personnes différentes, le Dr Véronique Delval et moi-même, et ayant refait la manipulation dès l'étape d'extraction. Il semble ainsi possible qu'un

problème au niveau des échantillons ou de leurs conservations soit à l'origine de ce manque de reproductibilité. Disposant de nombreuses cartes protéiques, nous avons tenté une analyse différentielle entre les groupes NF75 et NF100 d'une part, et les groupes Kao75 et Kao100 d'autre part. Les résultats obtenus pour ces deux analyses n'ont pas révélé de modification de protéines d'un intérêt particulier.

Nous avons également analysé l'expression de l'Apo A-IV par Western Blot dans tous les échantillons issus de cette expérience. Cette analyse n'a révélé aucune différence significative entre les individus soumis à une restriction alimentaire ayant ou non à disposition de la kaolinite (résultats non montrés).

V Effets de l'ingestion de kaolinite en quantité imposée (5% et 2%)

Alors qu'une des observations de nos études était la consommation volontaire, régulière et autorégulée de kaolinite par les animaux, cette consommation était très variable selon les individus. Ainsi, l'étude de l'impact de l'apport en kaolinite dans la fraction alimentaire, nous a semblé un préliminaire avant d'envisager l'étude d'autres argiles. Nous avons donc étudié l'effet de l'ajout de 2% et 5% de kaolinite à la nourriture (proportion minimale utilisée en production animale et quantité spontanément ingérée dans nos premières études, respectivement). Afin de comparer les résultats à ceux obtenus lors de l'expérience 1 (complémentation *ad libitum*), l'étude s'est étendue sur une période de 28 jours. Deux séries ont été effectuées : l'une pour comparer des individus témoins nourris avec une nourriture standard (n=6) et des animaux ayant à disposition des croquettes contenant 5% de kaolinite (n=7), et l'autre pour comparer des animaux témoins nourris avec une nourriture standard (n=7) et des animaux ayant à disposition des croquettes contenant 2% de kaolinite (n=8).

La pesée quotidienne des animaux a montré que l'évolution de la masse corporelle des rats témoins et ayant consommé de la kaolinite était similaire quelle que soit la quantité d'argile présente dans les croquettes. De même, la quantité de croquettes ingérées quotidiennement était similaire pour tous les groupes de rats considérés. Ainsi, nous avons observé une prise de poids équivalente pour tous les animaux malgré un apport nutritionnel plus faible de 2 ou 5% chez les animaux disposant de croquettes complétementées en kaolinite.

L'analyse microscopique de la muqueuse intestinale n'a révélé aucune modification significative de la morphologie des microvillosités (longueur et largeur).

L'analyse protéomique différentielle a été réalisée par Amandine Bœuf au cours de son stage master (stage M2, avril-septembre 2009), stage pour lequel j'ai été l'un de ses encadrants.

Six échantillons de chaque groupe expérimental ont été utilisés pour l'analyse protéomique. Trois pools de deux échantillons ont été réalisés et deux gels bidimensionnels ont été obtenus pour chaque pool, soit six gels au total pour chaque condition expérimentale. 600 spots en moyenne ont été détectés sur les gels (dépôt de 700 µg de protéines) et 400 spots en moyenne ont été conservés pour l'analyse différentielle. Une variation significative (test de student et ANOVA $p < 0,05$) a été observée pour 6 spots pour l'expérience 5% et 2 spots pour l'expérience 2%. La variation d'intensité des spots de l'expérience 5% est plus élevée (de -2,2 à +5,6 fois) que pour l'expérience 2% (tableau 3.10).

En comparaison avec les analyses précédentes (expériences 1 et 2), très peu de protéines ont une accumulation cellulaire modifiée par l'ingestion de kaolinite en quantité fixée.

P-value	Ratio	Protéine identifiée	Numéro d'accension NCBI	MM	pI	% rec	
Expérience 5% kaolinite							
0,011	+5,6	Protein disulfide-isomerase A3	AAH62393	57	5,9	31	(M)
		Carboxylesterase 5	XP_001056053	62	6,0	22	(M)
0,010	+2,0	Cytokeratin 8	AAA19668	53	5,5	28	(L)
0,025	+1,6	Albumin	CAA24532	69	6,1	31	(M)
0,023	-2,0	Triosephosphate isomerase 1	NP_075211	31	6,9	33	(M)
0,002	-2,2	Transketolase	NP_072114	68	7,5	9	(M)
0,002	-2,3	Protein disulfide-isomerase A3	AAH62393	57	5,9	31	(L)
Expérience 2% kaolinite							
0,0309	-1,5	Peptidase D	Q5I0D7	55	5,6	19	(L)
0,0461	-1,7	GDP dissociation inhibitor	NP_058972	51	5,9	9	(L)
		Proteasome 26S su	BAE37156	43	5,5	11	(L)

Tableau 3.10 : Identification des protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée après ingestion de kaolinite en quantité fixée (5% ou 2%) en complément alimentaire pendant 28 jours. Pour les facteurs de variation, (+) signifie une surexpression chez les animaux du groupe test et (-) une répression. MM : masse moléculaire théorique en kDa. pI : pI théorique. Les valeurs de pourcentage de recouvrement, de masses moléculaires et de pI sont ceux indiqués sur la page de résultats Mascot. M : identification par MALDI-TOF-MS, L : identification par nanoLC-MS/MS.

Parmi les protéines qui varient significativement, nous retrouvons la cytokératine 8 qui avait également été identifiée précédemment. Sa variation (2 fois) est cependant beaucoup plus faible que lors de l'expérience de complémentation avec la kaolinite *ad libitum* (jusqu'à 61 fois). Ce résultat est en accord avec l'absence de modification de la morphologie de la muqueuse intestinale observée dans cette expérience.

Les autres protéines, dont l'accumulation cellulaire est modifiée, sont des protéines impliquées dans différents métabolismes. Cependant, ces protéines ne sont pas des protéines majeures et n'interviennent pas, au niveau intestinal, dans les processus de modification de la muqueuse intestinale ou dans l'assimilation des nutriments. Par contre, l'accumulation cellulaire de la PDI, protéine impliquée dans le transport des triglycérides et déjà identifiée au cours de l'expérience de réalimentation, semble être modifiée par l'ingestion d'argile à hauteur de 5%.

Enfin, l'étude de l'expression de l'Apo A-IV a également été réalisée par Western Blot. Aucune différence significative n'a été observée entre les rats témoins et les rats ayant ingéré de la kaolinite en quantité imposée.

VI Discussion

Les résultats présentés dans cette partie s'inscrivent dans une étude à long terme sur l'étude de la géophagie et plus particulièrement sur l'effet de la consommation d'argile en nutrition animale. Ces résultats préliminaires ont été complétés pour la première expérience (complémentation alimentaire *ad libitum* en kaolinite pendant 28 jours) par l'étude de l'effet d'une complémentation alimentaire *ad libitum* en montmorillonite pendant 7 et 28 jours. Des résultats similaires à ceux obtenus avec la kaolinite ont été observés pour l'aspect physiologique et morphologique de la muqueuse intestinale.

Les résultats obtenus lors des expériences réalisées au cours de cette thèse, révèlent que la muqueuse intestinale de rats ayant ingéré spontanément de la kaolinite, présente des changements au niveau morphologique et dans l'accumulation des lipides en comparaison à des animaux nourris normalement. De plus, des effets bénéfiques sur l'optimisation de l'utilisation des ressources nutritives ont été observés pendant la phase de réalimentation après un jeûne prolongé. Par contre, la libération d'une partie de l'aluminium due à l'altération des particules de kaolinite pourrait être dangereuse à long terme pour l'organisme.

L'un des résultats les plus marquants de nos différentes expériences est le fait que tous les animaux ayant à disposition de la kaolinite en consomment tous les jours malgré un apport nutritionnel non limité. De plus, la quantité de kaolinite semble être autorégulée par les

animaux : la moyenne du pourcentage de kaolinite ingérée dans la fraction alimentaire étant proche de 5% quelle que soit l'expérience considérée. Cette consommation spontanée de kaolinite par des rats a déjà été mise en évidence dans d'autres études, notamment en cas de troubles digestifs ou pour réduire un état de malaise (Andrews et Horn, 2006). Le rat étant incapable de vomir, la consommation de kaolinite peut également être utilisée comme indicateur de nausée chez le rat. En effet, Cabezos et al. (2008) ont montré que l'injection de cisplatine, un agent émétique, entraîne une augmentation de la quantité de kaolinite ingérée par le rat dans la fraction alimentaire (augmentation comprise entre 2 et 15%).

VI.1 Consommation de kaolinite et prise de poids.

Les rats nourris normalement, d'une part, et les rats ayant eu une alimentation complétée en kaolinite pendant 28 jours, d'autre part, ont montré des gains de poids similaires, en dépit d'une consommation en kaolinite moyenne de $4,6 \pm 2,4$ % du total consommé des aliments. De même, au cours d'une phase de réalimentation suite à un jeûne prolongé (RéaA), aucune différence sur la prise de poids n'est observable si on considère uniquement la prise de poids des animaux ayant à disposition ou non de la kaolinite et une quantité non limitante de nourriture (RéaA).

Dans une étude au cours de laquelle de la bentonite a été donnée en complément alimentaire à hauteur de 2% pendant 28 jours, aucun effet significatif sur le gain de masse de l'animal ou sur la masse de différents organes (foie, reins, cœur, testicule, rate) n'a été observé (Grosicki et Kowalski, 2003). Au contraire, une étude antérieure avait montré qu'une complémentation avec 10% de kaolinite pendant 14 jours augmentait le poids de l'animal de 10% (Sakata T., 1986). Dans ces conditions, l'étude de Sakata a mis en évidence une augmentation préférentielle de la masse du foie (+10%), du cœur (+5%) et du côlon (+10%). Ainsi, il semblerait qu'il existe une relation entre la quantité minimale d'argile à ingérer et l'obtention d'effets sur la prise de poids.

Néanmoins, au cours de notre étude, un effet sur la prise de poids a été observé lors de la phase de réalimentation chez des sujets ayant une même quantité d'éléments nutritifs (RéaB). La quantité de nourriture ayant été volontairement limitée à celle consommée par le groupe disposant de kaolinite, les animaux réalimentés normalement se retrouvent dans un état de restriction alimentaire qui peut expliquer cette différence de prise de poids.

Au cours de la première expérience de réalimentation (RéaA), la consommation en croquettes du groupe disposant de kaolinite est significativement réduite d'environ 6% par rapport à la consommation en croquettes du groupe réalimenté normalement. De plus, il n'y a aucun impact sur la composition corporelle des animaux (lipides, protéines et minéraux) malgré cette diminution de la prise d'éléments nutritifs. En ce qui concerne la seconde expérience de réalimentation (RéaB), la durée de réalimentation nécessaire pour que les animaux témoins (NF-) reviennent à leur poids initial est plus longue. Il est également intéressant de noter que la teneur en matières grasses des carcasses de ces animaux est plus élevée que celle des autres groupes. En raison d'une durée de réalimentation plus longue, la quantité totale de nourriture ingérée est plus importante que pour les animaux des autres groupes. Cette consommation totale de nourriture plus élevée pourrait expliquer les différences de masses grasses au niveau de l'organisme.

Enfin, dans la dernière expérience (quantité de kaolinite fixée à 2 et 5%), aucune différence sur la prise de poids de l'animal n'est observée malgré une diminution de l'apport nutritif de la ration alimentaire.

Ainsi la complémentation alimentaire en kaolinite avec une quantité de nourriture non limitante n'affecte pas la prise de poids d'un individu.

Lors d'une phase de réalimentation après un jeûne prolongé, quand les réserves lipidiques d'un organisme sont diminuées, la consommation de kaolinite semble faciliter l'assimilation des nutriments.

VI.2 Effet de la kaolinite sur la morphologie intestinale

Au cours de l'expérience de complémentation avec de la kaolinite pendant 28 jours, de nombreux changements morphologiques ont été observés. La longueur des microvillosités chez les rats ayant consommé de la kaolinite est diminuée de façon significative de 21% par rapport à des rats nourris normalement. La largeur des entérocytes et la densité des microvillosités n'étant pas modifiées, la diminution de la longueur des microvillosités entraîne une diminution de la surface d'échange au niveau intestinal.

A l'inverse au cours de l'expérience de réalimentation RéaA, malgré une diminution de la taille des microvillosités, la surface d'échange au niveau intestinal n'est pas modifiée.

Il a été montré que la variation de la taille dynamique des villosités intestinales et des microvillosités des entérocytes est un moyen flexible de moduler l'absorption des nutriments, dont notamment l'absorption des matières grasses (Habold et al., 2007). Ainsi, la réduction de la surface d'absorption de l'intestin au cours d'une complémentation alimentaire avec de la kaolinite pendant 28 jours permettrait de limiter l'absorption passive des graisses. Il est également connu que les animaux nourris avec un régime riche en matières grasses réduisent la longueur de leurs microvillosités (28%) avec une légère augmentation du diamètre (12%), réduisant ainsi considérablement la surface d'échange totale (Goda et Takase, 1994). En outre, la variation observée (augmentation et diminution) de certaines isoformes de protéines impliquées dans le cytosquelette après 28 jours d'ingestion d'argile reflète une modification profonde du cytosquelette des cellules intestinales. Une augmentation de la synthèse de la protéine p22 liant le Ca^{2+} est également connue pour être impliquée dans la régulation de l'organisation des microtubules (Andrade et al., 2004). Enfin, la régulation des protéines HSP 60 et HSP 70, deux membres de la famille des protéines chaperonnes, est compatible avec leur participation dans la dynamique du cytosquelette (Liang et MacRae, 1997). Ces protéines sont également en mesure d'intervenir dans d'autres processus cellulaires, en particulier dans la prévention de l'apoptose (Beere, 2005).

L'analyse protéomique ayant révélé un clivage spécifique de la cytokératine 8, nous nous sommes intéressés aux processus induisant ce type de clivage. Comme l'apoptose est connue pour activer une cascade d'activation de caspases protéolytiques, ce mécanisme pourrait être responsable de ces observations et serait en accord avec la diminution du niveau d'accumulation des protéines HSP 60 et 70. Toutefois, les observations en microscopie n'ont montré aucune différence au niveau de l'apoptose des cellules entre les deux groupes. De plus, contrairement aux kératines de type I qui subissent une dégradation dépendant des caspases au cours de l'apoptose, la cytokératine 8, qui appartient à la famille des kératines de type II, ne possède pas la séquence consensus de clivage et serait donc résistante à cette protéolyse (Marceau et al., 2007). La cytokératine 8 possède d'autres séquences potentiellement reconnues par des caspases ($^{67}\text{LEVD}$ et $^{243}\text{LDMD}$) (Ku et Omary, 2001). Cependant, dans notre étude, ce processus ne semble pas être activé par l'ingestion de kaolinite. En effet, nous avons montré que le clivage de la cytokératine 8 est localisé entre les résidus ^{223}E et ^{241}R , tandis que les sites potentiels de clivage par les caspases ^{70}D et ^{246}D sont intacts. L'hypothèse de la dégradation par une caspase peut donc être exclue.

Selon la littérature, la dégradation de la cytokératine 8, pourrait également être dépendante d'une ubiquitination comme cela est observé chez l'homme pour des carcinomes colorectaux (Nishibori et al., 1996) ou pour des cellules pulmonaires traitées à l'uranium (Malard et al., 2005). Toutefois, la séquence des fragments de cytokératine 8 obtenus après l'ingestion de kaolinite est totalement différente de celles observées dans ces études, où tous les fragments de cytokératine 8 se trouvent dans une gamme de 40-48 kDa. Sans exclure l'hypothèse de l'ubiquitination, la fragmentation de la cytokératine 8 induite par l'ingestion de kaolinite peut être expliquée par un clivage spécifique entre ^{223}E et ^{241}R . Par conséquent, les résultats des analyses protéomiques soutiennent l'hypothèse d'une modification dans la structure du cytosquelette intestinal sans apoptose extensive, en accord avec les changements morphologiques observés.

Au cours de la phase de réalimentation, l'analyse protéomique différentielle a également révélé des modifications dans l'accumulation de certaines protéines du cytosquelette. Cependant, contrairement à l'étude de la complémentation durant 28 jours, les facteurs de variation sont beaucoup plus faibles. Ces résultats sont en accord avec les observations microscopiques. En effet, la morphologie de l'intestin est moins affectée au cours de la phase de réalimentation suite à un jeûne prolongé qu'elle ne l'est après 28 jours de complémentation en kaolinite.

Il est également connu que la phase de réalimentation stimule le renouvellement de la muqueuse intestinale chez le rat avec en particulier une augmentation de la taille des villosités (Altmann, 1972) pour rapidement inverser les changements de morphologie intestinale induite par le jeûne (Buts et al., 1990 ; Habold et al., 2007). En outre, au début de la réalimentation, les lipides exercent un effet stimulateur sur la régénération des muqueuses (Buts et al., 1990). Ainsi, avec ou sans complémentation en argile, tous les individus cherchent à réorganiser leurs réserves en graisses et adaptent la morphologie de leur muqueuse intestinale. Ceci expliquerait le peu de différences morphologiques entre les groupes.

Par contre, les microvillosités des animaux NF- sont moins denses et plus grandes que celles des animaux NF. Il en résulte que la surface d'échange des microvillosités est plus élevée chez les animaux du groupe NF- que celle des animaux du groupe NF ou ceux dont l'alimentation est complétée en argile (KaoA et KaoB). Ceci suggère que l'épithélium intestinal des animaux ayant une quantité de nourriture restreinte pourrait être adapté avec une surface d'échange augmentée de manière à optimiser l'absorption des éléments nutritifs.

Ainsi, il semble que l'ingestion de kaolinite en complément alimentaire et sa présence dans l'intestin entraîne une modification significative de la morphologie de la muqueuse intestinale en réponse à un apport lipidique accru chez un individu.

VI.3 Ingestion de kaolinite et assimilation des lipides

Bien que l'ingestion spontanée de kaolinite varie considérablement entre les individus, des vacuoles à la base des entérocytes ont été observées chez tous les animaux après 28 jours de complémentation. Ces vacuoles contribuent à l'augmentation de l'épaisseur des villosités. Probablement remplies de lipides et/ou d'eau, ces vacuoles ne sont présentes que chez les animaux ayant consommé de la kaolinite, ce qui suggère que la kaolinite ingérée comme complément alimentaire optimise leur absorption au niveau intestinal. En outre, certaines gouttelettes lipidiques ont été observées dans les entérocytes.

La présence d'argile dans la lumière intestinale favorise l'hydrolyse des triglycérides et augmente la concentration d'acides gras libres pouvant être absorbés (Habold et al., 2009). Ces acides gras entrent ensuite dans la cellule par endocytose passive à travers la membrane apicale des entérocytes et migrent vers la partie basale des cellules pour former des gouttelettes lipidiques puis des chylomicrons (figure 3.12). Parallèlement, les espaces intercellulaires sont également élargis. L'augmentation de l'assimilation des lipides est également cohérente avec la littérature indiquant que les particules d'argile ingérées peuvent absorber l'eau et assécher les matières fécales, et par conséquent, ralentir le transit intestinal (Castaing et Noblet, 1997). Les nutriments résident ainsi plus longtemps au niveau intestinal.

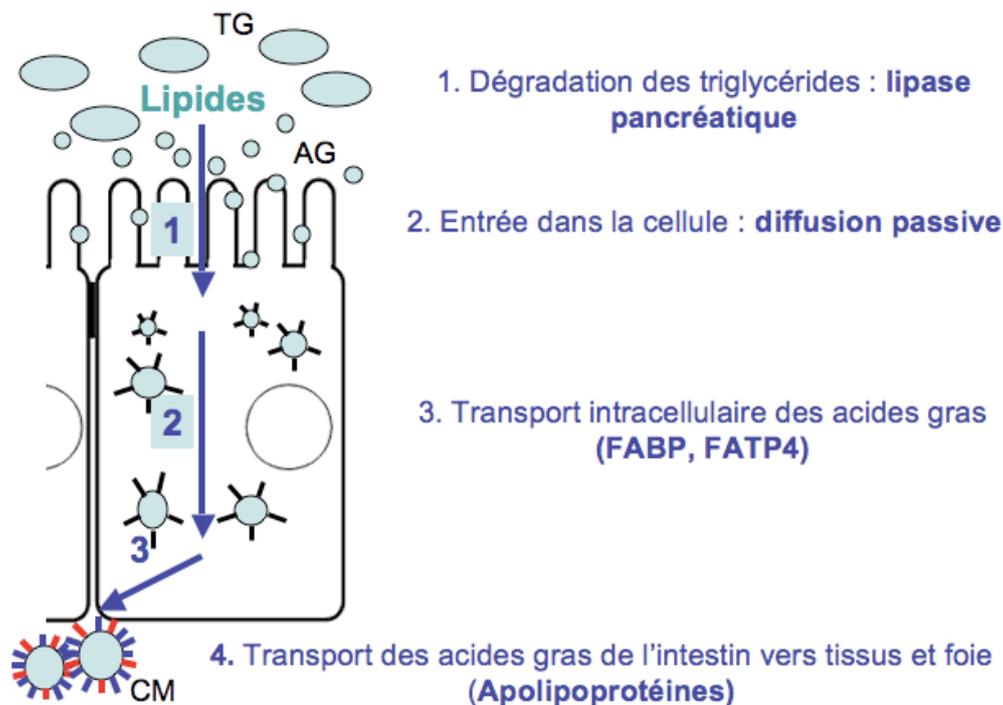


Figure 3.12 : Schéma de l'assimilation des lipides au niveau des entérocytes de la muqueuse intestinale. Le schéma n'est pas à l'échelle et les microvillosités sont volontairement agrandies.

TG : Triglycérides, AG : Acides gras, CM : Chylomicrons, FABP : Fatty Acid Binding protein et FATP : Fatty Acid Transport protein.

Au cours de la phase de réalimentation suite à un jeûne prolongé (RéaA), quels que soient les groupes, tous les rats présentaient de nombreuses vacuoles lipidiques à l'intérieur des entérocytes. Compte tenu du fait que les animaux consommant de l'argile ingèrent moins de croquettes (-6%), l'accumulation de lipides ne semble pas réduite même avec un apport en lipides plus faible. De plus, les animaux dont l'alimentation est complétée en kaolinite, présentent des taux d'apolipoprotéines, Apo A-I et Apo A-IV, plus élevés que chez les animaux témoins. Ces deux protéines sont impliquées dans le transport des lipides de l'intestin vers le foie et les autres tissus. En outre, l'Apo A-IV est connue pour être impliquée dans les mécanismes de la satiété (Tso et Liu, 2004), et sa surexpression chez les rats consommant de la kaolinite pourrait expliquer la réduction de leurs absorptions alimentaires pendant la réalimentation.

Chez le rat, l'Apo A-IV est une glycoprotéine de 43 kDa, synthétisée dans l'intestin (principalement dans le jéjunum) et le foie. L'Apo A-IV fixe les triglycérides pour former les chylomicrons (transport des acides gras de l'intestin vers les tissus et le foie) ou des VLDL (transport des acides gras du foie vers les organes).

Le mécanisme de régulation de l'Apo A-IV est encore mal connu, néanmoins, sa synthèse est stimulée indirectement par l'absorption des lipides dans l'intestin. C'est la formation des chylomicrons liée à l'absorption des lipides, qui régule le niveau de transcription et d'expression de l'Apo A-IV (Hayashi et al., 1990). D'autre part, le peptide PYY (sécrété par l'iléon et le colon suite à l'absorption de lipides, de glucides ou de protéines) augmente la concentration de l'Apo A-IV dans les cellules du jéjunum.

La concentration plasmatique en Apo A-IV augmente rapidement après l'ingestion d'une alimentation riche en graisses (162 g/ml contre 138 mg/ml dans le niveau de base ; Doi et al., 2001). Une cible de l'Apo A-IV étant l'hypothalamus (Fujimoto et al., 1993), cette protéine jouerait un rôle de signal de satiété à court terme pour l'organisme. A l'inverse, au cours d'un jeûne, sa concentration dans le plasma est diminuée de façon significative : 68% dans la phase II et 91% dans la phase III par rapport aux témoins nourris (Bertile et al., 2009).

En outre, l'Apo A-IV est régulée négativement par la leptine (Doi et al., 2001) et positivement par l'insuline (Tso et al., 2004), respectivement synthétisées par les cellules adipeuses et le pancréas. La leptine informe l'organisme sur le niveau de ses réserves lipidiques, tandis que l'insuline agit sur l'organisme afin d'augmenter ses réserves énergétiques (lipides et glucides). Ces deux protéines étant impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme, l'Apo A-IV semble également être impliquée dans la régulation de la prise alimentaire à long terme.

Notre étude indique que la complémentation alimentaire en kaolinite facilite l'absorption des lipides et la réalimentation d'un organisme dénutri en améliorant l'absorption intestinale.

VI.4 Altération de la kaolinite et libération d'aluminium

Les villosités jéjunales des animaux ayant une alimentation complétée en argile sont couvertes de kaolinite incorporée dans une épaisse couche de mucus directement en contact avec la bordure en brosse. Ces particules présentent une structure altérée aux extrémités.

Les analyses par EDX sur les reliques de kaolinite dans le mucus suggèrent que la structure tétraédrique siliceuse de la kaolinite résiste mieux à la dissolution, alors que l'aluminium de la structure octaédrique diffuse dans le mucus. Des traces d'aluminium sont également retrouvées dans les entérocytes. Cet élément neurotoxique traverse la barrière intestinale en se liant aux glycoprotéines dans le glycocalyx de la couche de mucus (Whitehead, 1997), puis

atteint la circulation générale. Normalement l'élimination de cet élément de l'organisme se fait par l'intermédiaire des fèces et de l'urine (Cunat et al., 2000 ; Mahieu et al. 2005) mais il peut être stocké dans divers organes comme le cerveau, le foie et les reins (Greger et al., 1985). L'aluminium conduit à certaines maladies, telles que des modifications hématologiques, une déminéralisation osseuse ou une neurodégénérescence (Roig et al., 2006), dont les symptômes sont associés à la maladie d'Alzheimer.

La présence d'aluminium dans le mucus et son absorption par la muqueuse intestinale témoigne de l'altération mécanique et/ou chimique des particules de kaolinite lors du transit digestif. Il est connu que des argiles soumises *in vitro* à des attaques acides peuvent libérer de l'aluminium et du silicium issus respectivement des couches octaédriques et tétraédriques (Cabrera et Talibudeen, 1978). Les différents pH rencontrés le long du tube digestif, entre l'acidité de l'estomac (pH aux environs de 3,5) et la neutralité de l'intestin grêle (Eastman et Miller, 1935) pourraient expliquer l'altération partielle des particules de kaolinite et l'absorption de l'aluminium au niveau intestinal. En effet, l'augmentation du pH dans l'intestin entraîne la précipitation de l'aluminium dissous, neutralisé par les sécrétions pancréatiques et biliaires sous différentes formes telles que l'hydroxyde d'aluminium (Weberg et Berstad, 1986 ; Cunat et al., 2000). Cependant, l'aluminium lié aux molécules organiques des sucs gastriques peut rester soluble dans l'intestin grêle et une petite quantité de cet aluminium peut être absorbée par la paroi intestinale (Weberg et Berstad, 1986 ; Powell et Thompson, 1993 ; Kaehny et al., 1997 ; Cunat et al., 2000). Chez l'animal, selon la forme ionique considérée, 0,7 à 2,2% des quantités d'aluminium présentes dans l'alimentation pourraient ainsi être absorbées (Pichard et al., 2005).

Les travaux présentés dans ce chapitre ont grandement contribué à l'obtention d'un financement ANR pour approfondir cette thématique pour laquelle de nouvelles équipes se sont rattachées au projet (ANR ARZERI, 2009-2011). L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des solides poreux en physiologie digestive et de comparer les effets de différents matériaux synthétiques, dont les compositions sont maîtrisées, et qui possèdent des structures et des capacités d'échanges spécifiques. Ces études sont actuellement en cours chez le rat, ainsi que chez un autre animal d'intérêt agronomique : le porc.

A côté des effets positifs de l'ingestion d'argile, l'observation de la dégradation de la kaolinite entraînant une diffusion de l'aluminium contenue initialement dans sa structure, doit également être approfondie.

En effet, l'aluminium libéré a été détecté à l'intérieur des entérocytes, à partir desquels il peut rejoindre la circulation générale. Bien qu'un organisme sain élimine facilement et rapidement l'aluminium qu'il ingère, des dosages effectués sur différents organes de rats des groupes ayant consommé de la kaolinite, révèlent des taux élevés d'aluminium en comparaison aux animaux témoins, notamment au niveau du sang et du foie (voir deuxième partie des résultats).

Dans ce contexte, une approche de métallogénomique sur des extraits protéiques intestinaux nous a semblé intéressante pour approfondir cette thématique. De plus, cette démarche a nécessité un développement analytique qui pourra être mis à profit au laboratoire pour d'autres thématiques ou collaborations.

Résultats 2^{ème} partie

Développement d'une stratégie pour la recherche et l'identification de protéines liant l'aluminium dans l'intestin de rat suite à une complémentation alimentaire en kaolinite

Une analyse effectuée dans notre laboratoire a montré une augmentation significative de la concentration en aluminium dans différents organes des rats suite à l'ingestion de kaolinite. Le dosage par spectrométrie d'absorption atomique a révélé une augmentation significative du taux d'aluminium dans le sang ($3,8 \pm 1,5 \mu\text{g/g}$ contre $1,8 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$) et dans le foie ($23 \pm 14 \mu\text{g/g}$ contre $6 \pm 5 \mu\text{g/g}$) chez des animaux complémentés en kaolinite pendant 28 jours en comparaison à des témoins nourris sans kaolinite. Au niveau intestinal, les analyses par microscopie électronique et fluorescence X réalisées sur les coupes de muqueuse ont révélé la présence d'aluminium dans les villosités (voir résultats 1^{ère} partie, III.1). Afin de préciser le mode d'accumulation de l'aluminium dans la muqueuse intestinale, point d'entrée dans l'organisme, il est essentiel d'identifier les biomolécules impliquées dans ce mécanisme ou altérées par la fixation d'aluminium.

Des stratégies pour l'analyse métalloprotéomique ont été décrites dans l'introduction bibliographique. Parmi celles-ci, nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à l'utilisation de l'électrophorèse sur gel en conditions natives. En maintenant les protéines dans leur état natif, ces méthodes permettent la séparation des protéines et la conservation des liaisons protéine-métal. Plusieurs études ont montré l'intérêt des gels BN-PAGE (Becker et al., 2008 ; Chery et al., 2002) pour la détection de métalloprotéines dans des mélanges complexes. L'utilisation de ce type de gel, combinée à une détection élémentaire par fluorescence X ou par ablation du gel par un faisceau laser et introduction de la matière ablatée directement dans le plasma de l'ICP-MS, rendent ces stratégies particulièrement prometteuses.

Avant d'entreprendre la recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat, nous avons voulu évaluer la pertinence de l'électrophorèse en conditions natives selon le type de gel utilisé. Ainsi, une première étape a consisté à comparer le BN-PAGE, déjà utilisé dans la littérature, au CN-PAGE et au HrCN-PAGE qui n'avaient pas encore été décrits pour l'étude de protéines liant les métaux, et à étudier la conservation des métaux au sein de protéines modèles après électrophorèse. Dans notre démarche, ne disposant pas de module d'ablation laser ni de scanner de fluorescence X, l'élution passive des protéines s'est avérée une étape nécessaire pour permettre la détection du métal par ICP-MS. Il est donc indispensable de vérifier la conservation du métal au sein des protéines modèles après élution. La figure 3.13 reprend la stratégie analytique que nous avons envisagée et les différentes contraintes analytiques.

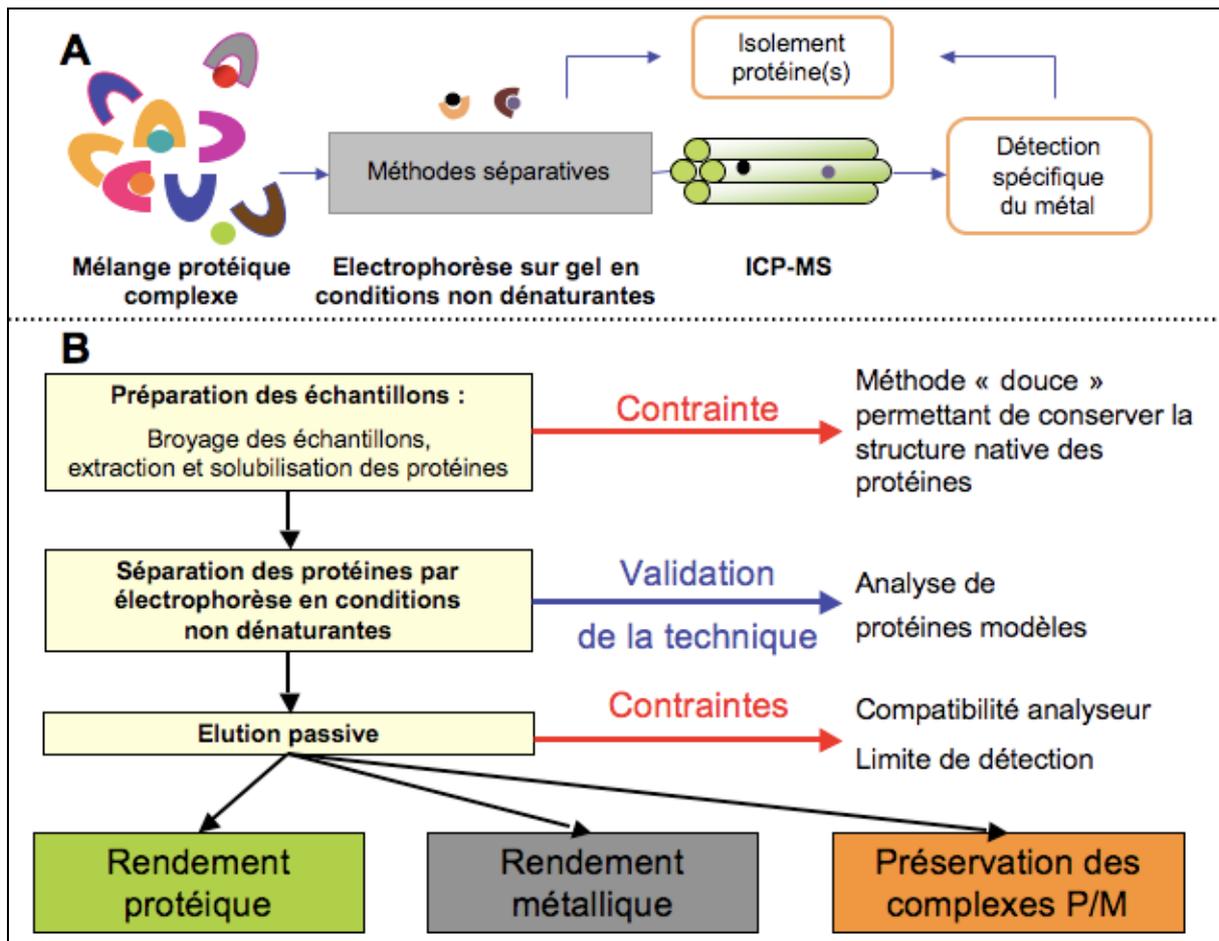


Figure 3.13 : Stratégie envisagée pour la recherche de metalloprotéines dans un mélange protéique complexe (A) et contraintes analytiques (B).

ICP-MS : Spectromètre de masse à ionisation par plasma induit. P/M : protéine/métal.

Ainsi, les travaux entrepris dans cette partie devaient permettre de :

- sélectionner une solution d'élution passive compatible avec une détection sensible des éléments métalliques,
- évaluer les différents types de gels natifs aussi bien au niveau de la résolution pour la séparation des protéines que pour la détection après élution passive,
- valider le maintien des interactions protéines-métaux après électrophorèse,
- montrer l'intérêt de cette stratégie par rapport à la chromatographie liquide.

I Sélection d'une solution d'élution passive

Pour l'analyse métalloprotéomique, une solution d'élution passive doit posséder deux propriétés essentielles : celle-ci doit permettre d'éluer les protéines avec un rendement satisfaisant, mais doit également être compatible avec l'analyse par ICP-MS. Notre choix s'est porté sur une solution volatile de bicarbonate d'ammonium (NH_4HCO_3).

I.1 Elution passive des protéines des gels natifs

Afin d'évaluer l'efficacité de l'élution passive, la détermination du rendement d'élution de la SOD (31 kDa), de la BSA (66 kDa) et de l'ADH (141 kDa) a été réalisée par un dosage des protéines dans l'éluat et comparaison à la quantité de protéines déposée sur le gel.

Pour réaliser l'élution passive, nous avons testé différents détergents (octylglucoside et SDS). Une solution de NH_4HCO_3 10 mM contenant 0,1% d'octylglucoside n'a pas donné d'élution satisfaisante. Nous nous sommes alors tournés vers le SDS. Ce détergent est bien adapté pour l'élution passive des protéines : sur une gamme de concentration de 0,001% à 1%, plus la concentration en SDS est élevée, plus le rendement d'élution est grand (Jorgensen et al., 2004). Mais dans le cadre d'une étude de métalloprotéines, le SDS peut entraîner une dénaturation des protéines et la perte des interactions protéine-métal. Afin de limiter cette dénaturation, différentes concentrations de SDS ont été testées dans la solution d'élution passive : 0,001%, 0,01%, 0,1% et 1% et les rendements ont été comparés.

Une étude préliminaire de l'élution de SOD d'un gel BN-PAGE (8%) a montré que pour des concentrations en SDS de 0,001% et 0,01% dans la solution d'élution, aucune protéine n'était détectable dans l'éluat après une incubation d'une nuit à 37°C. Par contre, des résultats satisfaisants ont été obtenus avec une concentration en SDS de 0,1% (61%, n=1). L'augmentation de la concentration en SDS à 1% dans la solution d'élution n'améliore pas de façon significative l'élution de la SOD (66%, n=1). Le tableau 3.11 présente les rendements d'élution passive obtenus avec une solution de NH_4HCO_3 10 mM, 0,1% SDS pour les 3 protéines modèles sur les différents gels natifs envisagés dans notre étude (BN-PAGE, CN-PAGE et HrCN-PAGE).

Protéine	MM	BN-PAGE	CN-PAGE	HrCN-PAGE
ADH	141 kDa	78% (n=1)	55% (n=1)	55 ± 7 % (n=3)
BSA	66 kDa	92% (n=1)	69% (n=1)	70 ± 2 % (n=2)
SOD	31 kDa	61% (n=1)	53% (n=1)	69 ± 18 % (n=6)

Tableau 3.11 : Rendements d'élution passive de gels natifs.

Dépôt de 100 µg de protéines sur des gels composés de 8% d'acrylamide/bisacrylamide. Élué par incubation pendant une nuit dans 500 µl de NH₄HCO₃ 10 mM, SDS 0,1% à 37°C. Les % indiquent les rendements de protéines dans les éluats par rapport aux quantités déposées. Dosage des protéines par DC Protein assay (Bio-Rad).

Avec des rendements de 67 ± 13 % en moyenne, ces résultats montrent que la récupération des protéines après élution passive est satisfaisante. Cependant, il est à noter une variabilité des rendements calculés en fonction de la protéine et de la composition du gel. Nous pouvons également remarquer qu'il n'y a pas de corrélation entre la taille de la protéine et le rendement d'élution. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec les estimations de rendements protéiques établis par d'autres équipes pour cette méthode d'élution : à titre d'exemple, l'élution d'un gel SDS-PAGE (12,5%), avec du tampon NaOAc 0,1 M, 0,1% SDS, pH 8,1, de la myoglobine, de l'anhydrase carbonique et la protéine A atteint environ 60% (Claverol et al., 2003).

A ce stade, pour être dans les mêmes conditions que celles utilisées par le LSMBO (IPHC-DSA, Strasbourg) pour l'étude par spectrométrie de masse supramoléculaire dont les résultats seront présentés plus loin, nous avons remplacé NH₄HCO₃ par NH₄OAc dans les milieux d'élution passive. Nous avons vérifié que les rendements d'élution pour les 3 protéines ADH, BSA et SOD, étaient similaires dans ces deux milieux.

Afin de déterminer la durée optimale pour l'élution des protéines, nous avons entrepris une étude cinétique de l'élution de la SOD d'un gel HrCN-PAGE (8 %). La figure 3.14 présente les résultats obtenus.

A partir de 3h d'incubation à 37°C, 75 % de la SOD est élue du gel HrCN-PAGE. Des rendements légèrement supérieurs sont obtenus après 5h (78%) et 7h d'incubation (83%). Malgré une élution satisfaisante dès 3h d'incubation pour la SOD, nous avons choisi de réaliser une incubation dans la solution d'élution passive à 37°C durant une nuit pour toutes les analyses ultérieures.

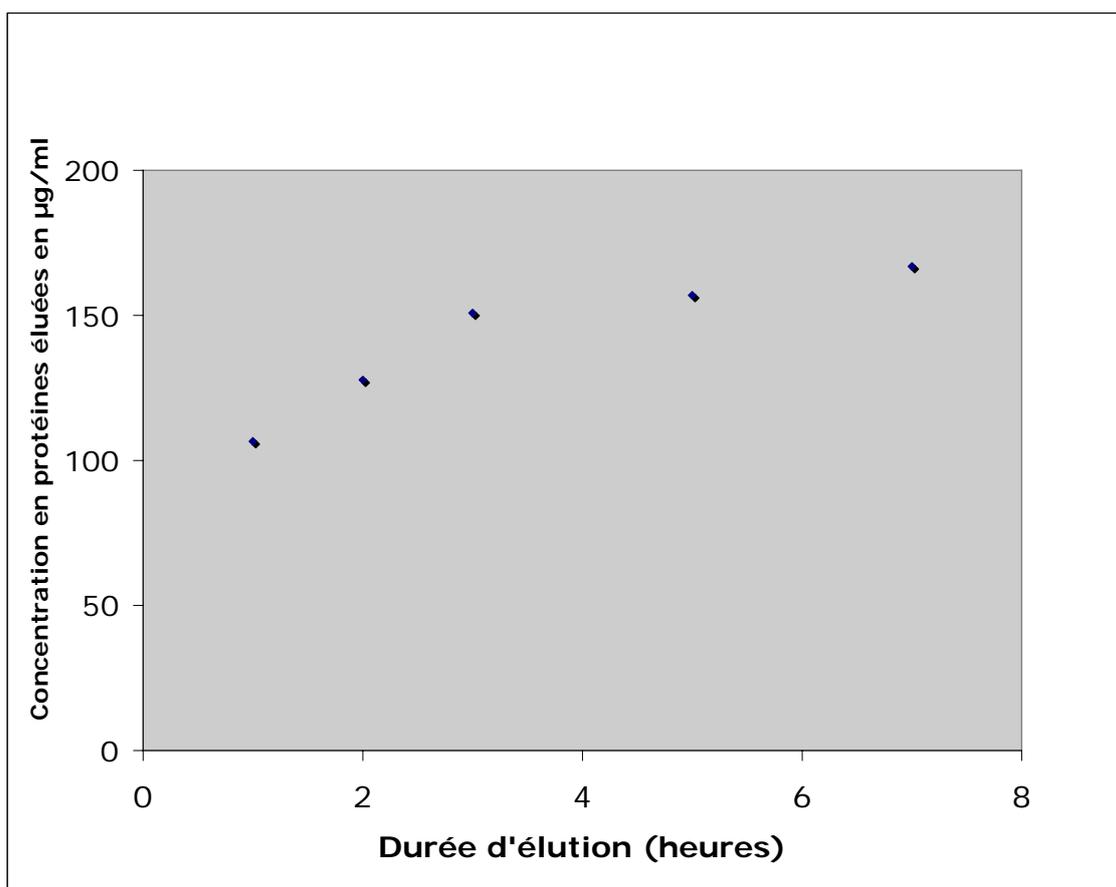


Figure 3.14 : Cinétique d'élution de la SOD d'un gel HrCN-PAGE.

Dépôt de 100 µg de SOD sur un gel HrCN-PAGE (8%). Elution dans 500 µl de solution de NH₄OAc 10 mM, SDS 0,1%, 37°C. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford.

I. 2 Compatibilité avec l'analyse par ICP-MS

Comme indiqué dans le chapitre 2, l'ICP-MS est une technique d'analyse qui présente l'avantage de permettre une analyse multi élémentaire avec une sensibilité pouvant atteindre 0,1 ppt environ, en milieu acide et en fonction des éléments (Hoelzl et al., 2000). Cependant, comme tout appareil de mesure, ces performances peuvent être perturbées par des effets liés à la matrice. En effet, des interférences liées à la composition du tampon peuvent modifier de façon importante le processus de nébulisation ou les conditions d'ionisation dans le plasma de l'élément à doser.

Une étude de Lui et Beauchemin (2006) s'est intéressée à l'effet du SDS sur l'intensité du signal obtenu par ICP-MS. Par comparaison des résultats obtenus dans une solution HNO₃ à 1% à ceux obtenus dans la même solution additionnée de SDS en concentration croissante, leur étude a montré un effet sur le signal de plusieurs éléments (⁶⁶Zn, ⁷⁵As, ⁷⁸Se, ¹¹⁴Cd et

^{121}Sb). Pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5% de SDS une augmentation du signal est observée, tandis que pour des concentrations supérieures à 0,5% on constate le phénomène inverse.

Afin de vérifier la compatibilité de ce tampon d'éluion passive utilisé dans notre méthode avec l'analyse par ICP-MS, nous avons étudié l'effet de différentes compositions de solution sur le signal obtenu pour différents métaux. Ainsi, des gammes étalons en métal (Al, Fe, Cu, Zn, As) ont été réalisées dans cinq solutions de composition suivante :

- HNO_3 1% (v/v),
- HNO_3 0,1% (v/v),
- HNO_3 0,1% (v/v), NH_4OAc 10 mM,
- HNO_3 0,1% (v/v), NH_4OAc 10 mM, SDS 0,1% (p/v),
- HNO_3 0,1% (v/v), NH_4OAc 10 mM, SDS 1% (p/v).

Ces études ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour les analyses ICP-MS envisagées par la suite. Nous avons dilué ces solutions au $1/6^{\text{ème}}$ dans une solution de HNO_3 0,12% et d'In 1,2 ppb afin d'obtenir une concentration finale de 0,1% en HNO_3 (sauf pour le témoin HNO_3 1%) et 1 ppb final en étalon interne In. Le signal de l'étalon interne est utilisé pour normaliser les valeurs de signal de chaque élément à doser. Pour éviter toute confusion, les concentrations en acétate d'ammonium et de SDS mentionnée par la suite sont celles des solutions initiales.

Le choix de travailler à une concentration finale de 0,1% HNO_3 est justifié par le fait que, bien que les analyses « classiques » par ICP-MS soient réalisées dans 1% HNO_3 , des essais préliminaires effectués avec des protéines modèles ont montré que cette concentration en acide entraînait la précipitation des protéines et l'obturation du nébuliseur. Une concentration en acide de 0,1% permet d'éviter ce problème.

Afin de vérifier la compatibilité de la solution d'éluion, nous avons choisi de comparer l'intensité du signal pour une solution contenant 10 ppb des différents métaux (^{27}Al , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn et ^{75}As), les droites d'étalonnages, les limites de détection et les limites de quantification pour chaque métal.

I.2.1 Effet sur l'intensité du signal en ICP-MS

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des différentes solutions d'éluion passive sur l'intensité du signal d'une solution témoin contenant 1 ppb d' ^{115}In (figure 3.15) puis d'étalons contenant 10 ppb de chaque métal (figure 3.17).

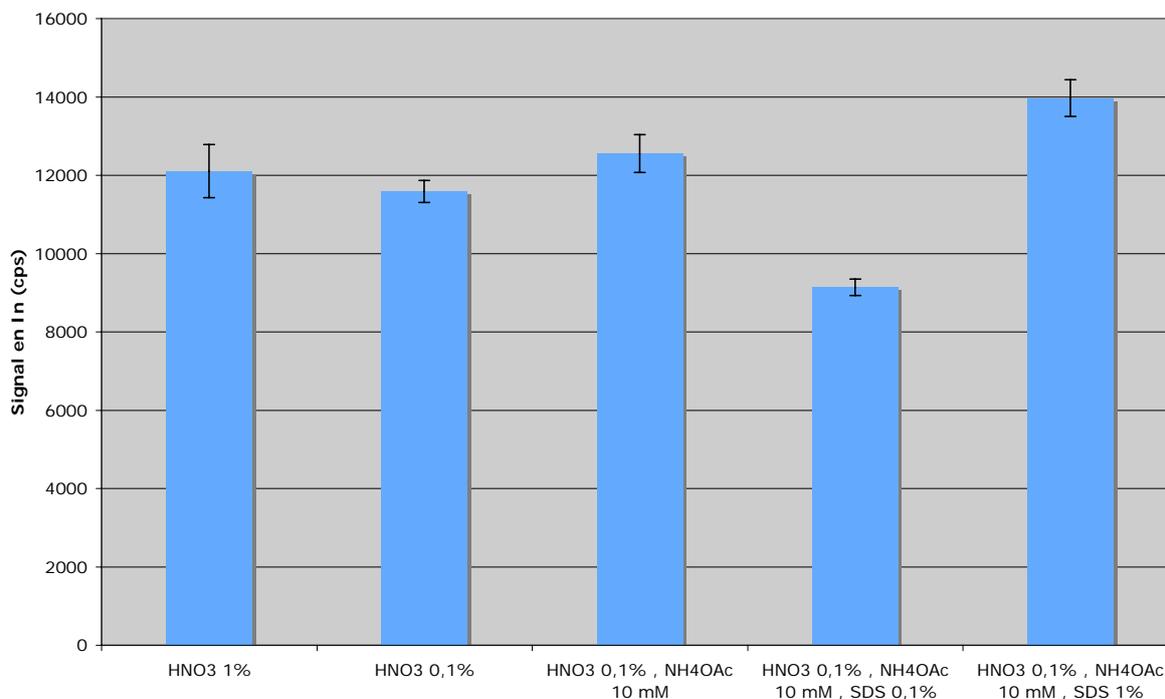


Figure 3.15 : Effet de la composition de la solution d'éluion sur le signal d'une solution d' ^{115}In . En ordonnée est représentée l'intensité du signal obtenu pour 1 ppb d'In dans chaque solution. Dilution au 1/6^{ème} avec une solution de HNO₃ 0,12%, In 1,2 ppb (hormis pour le témoin dilué avec une solution de HNO₃ 1%, In 1,2 ppb). n = 20 mesures consécutives.

Sur la figure 3.15, aucune différence significative sur le signal de l'indium n'est observable entre les différentes solutions contenant uniquement de l'HNO₃ et du NH₄OAc. Par contre, nous constatons un effet significatif lié à la présence du SDS. En effet, nous pouvons observer une diminution du signal de 25% en présence de 0,017% de SDS (0,1% initial) et une augmentation du signal de 15% pour une concentration en SDS de 0,17% (1% initial). Cette dernière observation est en accord avec les résultats obtenus par Liu et Beauchemin (2006) qui avaient observé une augmentation du signal pour l'ensemble des éléments analysés avec une concentration en SDS proche de sa concentration micellaire critique (CMC = 0,24% p/v). Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont mis en avant l'étude de Xu et al. (2001) sur les effets du SDS sur la taille des gouttelettes dans la chambre de nébulisation et leur transfert vers le plasma. Compte tenu du fait que ce phénomène n'avait pas été observé avec des

détergents non ioniques, la modification de la distribution de la taille des gouttelettes dans la chambre de nébulisation serait liée à la nature ionique du SDS. En affectant la charge nette des gouttelettes, un effet sur la fission de Coulomb est possible. Cette fission de Coulomb se produit naturellement dans la chambre de nébulisation (figure 3.16) et conduit à la création de gouttelettes plus petites (Fraser et Beauchemin, 2009). Dès lors, la chambre de nébulisation ayant pour rôle la sélection de gouttelettes en fonction de la taille de celles-ci, toute modification de ce paramètre affectera le signal des analytes. Ainsi, à une concentration proche de sa CMC, le SDS peut avoir un effet bénéfique sur la taille des gouttelettes et donc sur la quantité d'analytes qui seront ionisés dans le plasma.

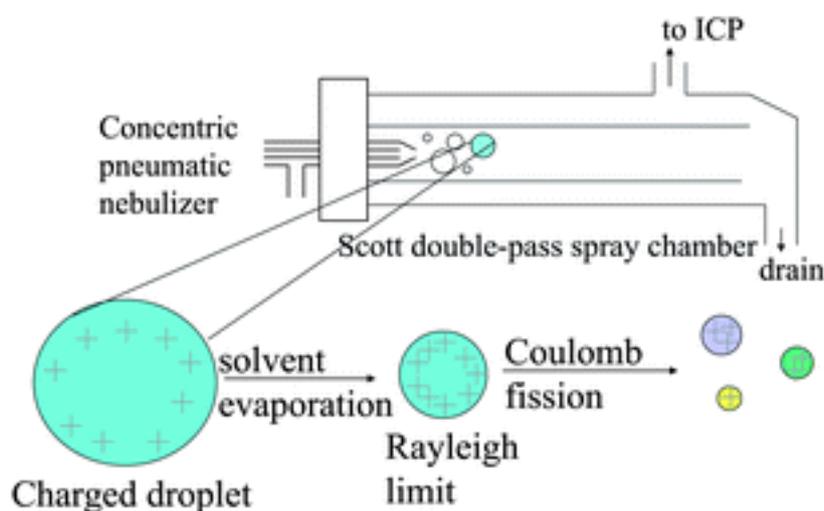


Figure 3.16 : Formation des gouttelettes dans la chambre de nébulisation (d'après Fraser et Beauchemin, 2009).

Après normalisation du signal par l'étalon interne (figure 3.17), nous constatons que pour l'aluminium, le fer et le cuivre, les rapports d'intensité de signal sont très semblables pour les différentes solutions à celles obtenues avec l'acide nitrique 1%. Une augmentation du signal est observable dans tous les tampons pour le zinc et l'arsenic. Par contre, on observe pour tous les éléments, une atténuation du signal, pouvant atteindre 15%, quand la concentration en SDS est de 1% (soit 0,17% final) (barre violet foncée) en comparaison à la même solution sans SDS (barre jaune).

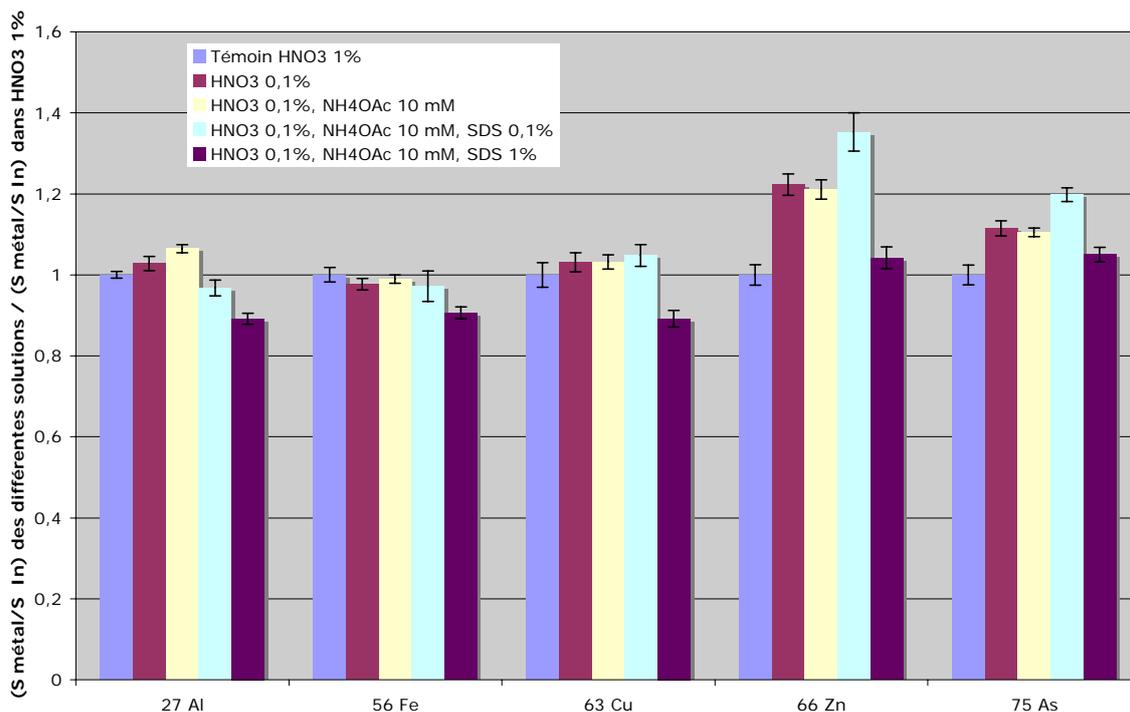


Figure 3.17 : Effet de la composition de la solution d'élution sur le signal de différents métaux.

En ordonnée est représenté le ratio de l'intensité du signal obtenu pour 10 ppb de chaque métal pour chaque solution rapporté à celui obtenu dans la solution témoin (HNO₃ 1%). Dilution au 1/6^{ème} avec une solution de HNO₃ 0,12%, In 1,2 ppb (hormis pour le témoin dilué avec une solution de HNO₃ 1%, In 1,2 ppb).
n = 10 mesures consécutives.

Dès lors, contrairement à ce à quoi on aurait pu s'attendre, une concentration en SDS de 0,017% final (soit une concentration de 0,1% dans la solution d'élution) semble judicieuse malgré la diminution de 25% de l'intensité du signal de l'indium. Les résultats obtenus avec une concentration en SDS de 0,17% montre que l'effet du SDS est variable selon l'élément. Par contre, celui-ci ne semble pas être corrélé au potentiel d'ionisation. En effet, plus un élément s'ionise difficilement, plus l'effet du SDS devrait être diminué. Or, sachant que les potentiels d'ionisation sont de 5,986 eV, 7,870 eV, 7,726 eV, 9,394 eV et 9,810 eV, respectivement pour l'aluminium, le fer, le cuivre, le zinc et l'arsenic, aucune corrélation n'est possible avec la diminution du ratio du signal de l'élément sur le signal de l'indium (-16%, -8%, -14%, -14% et -6% pour l'Al, le Fe, le Cu, le Zn et l'As respectivement).

Enfin, les erreurs sur les mesures semblent équivalentes quels que soient la solution et l'élément analysé, hormis pour le fer et le zinc dans la solution contenant 0,1% de SDS. Ce paramètre devrait probablement influencer les limites de détection et de quantification de ces éléments.

I.2.2 Effet sur l'étalonnage et les limites de détection et quantification

Dans un deuxième temps, après avoir vérifié l'effet de la solution d'éluion sur l'intensité du signal pour une solution concentrée en métaux, nous avons déterminé les limites de détection et de quantification dans les différentes solutions.

Les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), consignées dans le tableau 3.12, ont été calculées comme suit :

- LOD = moyenne mesure du blanc + 3 fois l'écart type (n=10)
- LOQ = moyenne mesure du blanc + 10 fois l'écart type (n=10)

		HNO ₃ 0,1%	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM SDS 0,1%	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM SDS 1%
²⁷ Al	LOD	0,1	0,1	0,2	0,5
	LOQ	0,3	0,2	0,6	1,7
⁵⁶ Fe	LOD	0,02	0,02	0,1	0,9
	LOQ	0,08	0,07	0,5	2,9
⁶³ Cu	LOD	0,2	0,2	0,4	0,5
	LOQ	0,7	0,7	1,3	1,5
⁶⁶ Zn	LOD	0,3	0,3	0,5	0,7
	LOQ	1,0	1,0	1,5	2,3

Tableau 3.12 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) en ppb dans les différentes solutions d'éluion. Les valeurs mentionnées ont été déterminées à partir du ratio du signal du métal sur le signal de l'étalon interne (¹¹⁵In) rapporté à une gamme d'étalonnage réalisée dans chaque tampon.

Avec des LOD et LOQ similaires pour les solutions d'HNO₃ 0,1% et d'HNO₃ 0,1% / NH₄OAc 10 mM quel que soit l'élément considéré, l'acétate d'ammonium n'a pas d'effet néfaste sur ces paramètres.

En ce qui concerne la solution contenant 0,1% de SDS, les LOD et LOQ sont multipliées par 3 environ pour l'aluminium, le cuivre et le zinc et par 5 pour le fer en comparaison aux solutions ne contenant pas de SDS. Comme nous pouvions l'attendre avec les résultats précédents (figure 3.16), un effet significatif sur les limites de détection et de quantification est observé. En effet, l'erreur sur les mesures étant plus importante (surtout pour le fer et le zinc) en présence de SDS, les limites de détection et de quantification sont augmentées.

Enfin, pour la solution contenant 1% de SDS, les valeurs de LOD et LOQ sont plus importantes, notamment pour le fer où elles sont multipliées par 40 en comparaison aux solutions ne contenant pas de SDS.

Pour terminer cette étude comparative, nous nous sommes intéressés à l'effet de la composition de la solution d'éluion sur une gamme d'étalonnage en métaux. Les équations des droites d'étalonnage et leurs coefficients de corrélation ont été déterminés pour apprécier la faisabilité d'une étude quantitative. Un exemple de gamme d'étalonnage pour l'aluminium (^{27}Al) est présenté sur la figure 3.18.

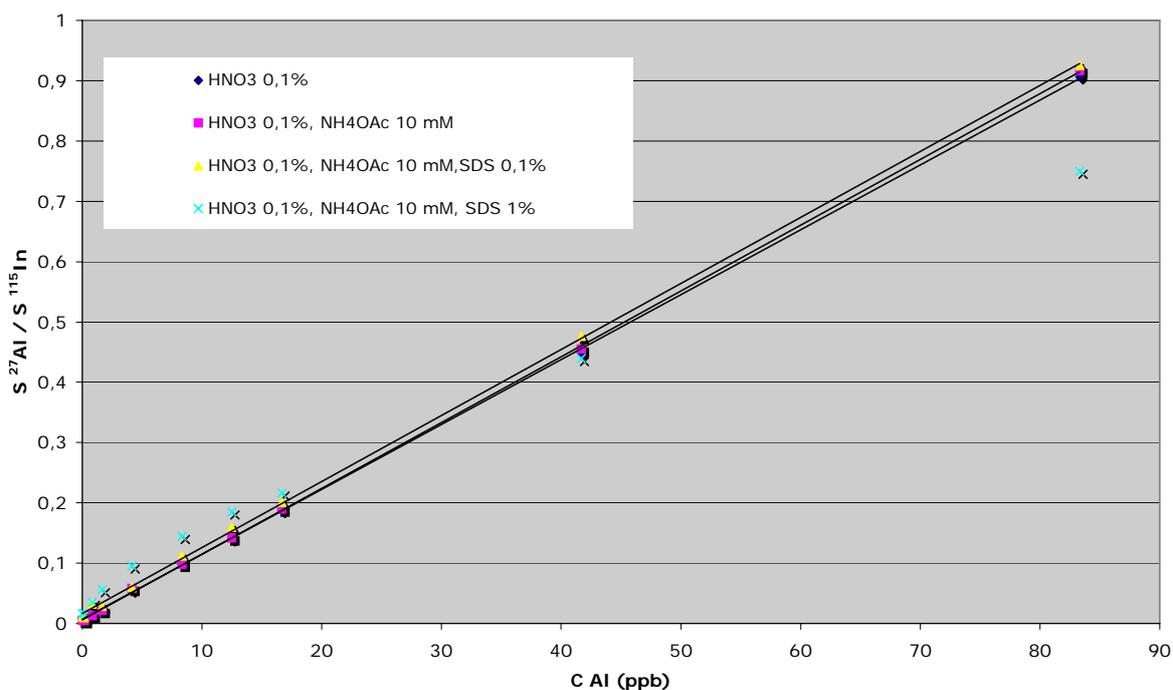


Figure 3.18 : Gamme d'étalonnage en aluminium dans les différentes solutions d'éluion.
Est représenté le ratio du signal en aluminium sur le signal de l'étalon interne (In à 1 ppb) en fonction de la concentration en aluminium.

Pour les concentrations en métal étudiées, nous n'observons aucun effet lié à la présence de NH_4OAc à 10 mM ou de SDS à 0,1% sur la gamme d'étalonnage. Par contre, les résultats obtenus avec 1% de SDS mettent en évidence un problème de linéarité sur la gamme de métaux étudiés.

Les équations des droites d'étalonnage pour les métaux analysés (^{27}Al , ^{56}Fe , ^{63}Cu et ^{66}Zn) sont consignées dans le tableau 3.13.

	HNO ₃ 0,1%	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM SDS 0,1%	HNO ₃ 0,1% NH ₄ OAc 10mM SDS 1%
²⁷ Al	y=0,011 x + 0,007 R ² = 0,99995	y=0,011 x + 0,006 R ² = 0,99993	y= 0,011 x + 0,016 R ² = 0,99982	y = 0,009 x + 0,047 R ² = 0,99388
⁵⁶ Fe	y=0,461 x + 0,352 R ² = 0,99996	y=0,462 x + 0,335 R ² = 0,99996	y=0,476 x + 0,335 R ² = 0,99983	y=0,401 x + 2,078 R ² = 0,99793
⁶³ Cu	y=0,788 x + 2,739 R ² = 0,99966	y=0,778 x + 2,862 R ² = 0,99980	y=0,801 x + 5,342 R ² = 0,99970	y=0,628 x + 15,713 R ² = 0,98887
⁶⁶ Zn	y=0,130 x + 1,225 R ² = 0,99917	y=0,131 x + 1,151 R ² = 0,99993	y=0,127 x + 2,170 R ² = 0,99506	y=0,087 x + 4,958 R ² = 0,98792

Tableau 3.13 : Equations des droites d'étalonnages et coefficients de corrélation (R²) obtenus pour des gammes en métaux de 0 à 83 ppb dans les différentes solutions d'éluion.

Avec des équations de droite d'étalonnage similaires entre les solutions d'HNO₃ 0,1% contenant ou non 10 mM NH₄OAc, ces résultats montrent un effet négligeable de l'acétate d'ammonium sur la gamme d'étalonnage.

Les résultats obtenus pour la solution contenant 0,1% de SDS, pour l'aluminium et le fer révèle un très faible effet sur les constantes (pente et ordonnée à l'origine) des gammes d'étalonnage. Par contre pour le cuivre et le zinc, les valeurs des ordonnées à l'origine sont beaucoup plus élevées en présence de SDS. Ces résultats sont en accord avec l'augmentation du signal observé précédemment (figure 3.16).

Enfin, avec des valeurs de coefficient de corrélation inférieures à 0,999, l'ajout de SDS à une concentration de 1% est à proscrire.

Ainsi, pris dans leur globalité, les paramètres déterminés à partir d'une solution d'éluion passive constitué de 10 mM de NH₄OAc et 0,1% de SDS indiquent que le choix de cette solution d'éluion pour la suite de notre étude est envisageable. En effet, cette solution permet une bonne éluion des protéines tout en restant compatible avec l'analyse élémentaire par ICP-MS après une dilution au 1/6^{ème} dans une solution d'acide nitrique à 0,12% contenant 1,2 ppb d'indium.

II Comparaison des différents gels natifs pour l'analyse métalloprotéomique

Deux types de gels natifs ont été décrits dans la littérature pour l'analyse de métalloprotéines liant des éléments métalliques par des liaisons non covalentes : les gels native PAGE et les gels BN-PAGE (Voir Chapitre II, II.3.2). Dans les études publiées récemment, le BN-PAGE a été plus souvent utilisé car il présente une meilleure résolution de séparation. En effet, les molécules de CBB utilisées dans le tampon de migration permettent de charger négativement les protéines comme font les molécules de SDS pour les gels SDS-PAGE, connus pour leur très grande résolution. Ainsi, au début de notre étude nous avons réalisé des essais préliminaires de séparation de protéines intestinales par électrophorèse sur gel BN-PAGE.

II.1 Séparation de protéines par BN-PAGE

Dans un premier temps, nous avons utilisé le protocole original établi par Schagger et von Jagow (1991) pour l'étude de complexes membranaires. Cependant, pour simplifier la réalisation des gels, la réticulation du gel de séparation a été fixée à 10%. De plus, le pH des tampons et du gel a été fixé à 7. Proche du pH du cytoplasme (pH 7,2, Alberts et al., 1994), ce pH nous semblait bien adapté pour la conservation des protéines à l'état natif.

Les protéines intestinales de quatre échantillons prélevés lors de l'analyse RéaA (voir première partie des résultats, III), ont été extraites dans un tampon composé de 125 mM de Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,1% octylglucoside et contenant des inhibiteurs de protéases. Afin de vérifier l'intérêt d'une élimination des ARN et de l'ADN sur la qualité des gels, nous avons ajouté des RNase/DNase dans une partie des échantillons. Avec ce protocole, la quantité de protéines récupérées est de 43 ± 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'intestin ($n=4$). Ce résultat est à comparer aux 95 ± 12 μg de protéines extraites par mg d'intestin obtenus avec le protocole utilisé pour l'analyse protéomique différentielle. Ainsi, l'utilisation d'un tampon sans agents dénaturants ne permet l'extraction que de la moitié des protéines intestinales par rapport à un tampon composé d'urée, de thiourée et de CHAPS. Néanmoins, la quantité de protéines extraites par ce protocole permet d'envisager une analyse métalloprotéomique.

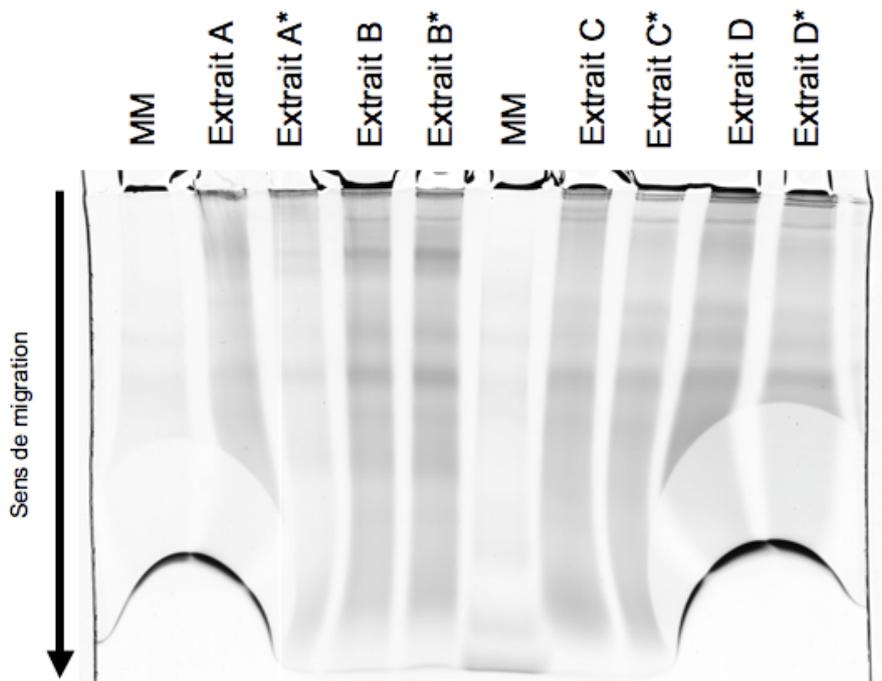


Figure 3 .19 : Séparation de protéines intestinales par BN-PAGE 10%.

Échantillons de muqueuse intestinale prélevée lors de l'analyse RéaA. Extraction des protéines dans un tampon 125 mM Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,1% octylglucoside, inhibiteurs de protéases. Pour les pistes *, présence de RNase/DNase. Dépôt de 100 µg de protéines par piste. Coloration CBB. MM : marqueurs de masses moléculaires - dénaturés.

Avec une réticulation homogène des gels BN-PAGE (10% d'acrylamide/bisacrylamide), la séparation des protéines extraites d'intestin de rat en conditions natives présente une assez bonne résolution. Nous pouvons également observer que l'ajout de RNase/DNase n'améliore pas la qualité de la séparation (pistes notés avec *). L'ajout de ces enzymes ne sera donc pas conservé dans la suite de notre étude.

La qualité de l'électrophorèse est néanmoins altérée par des effets de bord important. Ce phénomène peut être dû à un voltage trop important ou un problème de concentration des tampons de migration. Cependant, le voltage utilisé est comparable aux données de la littérature (Reisinger et Eichacker, 2006) et le renouvellement des tampons n'a pas apporté de changement. Ainsi, des modifications de la composition des tampons utilisés pour l'électrophorèse ont donc été nécessaires. Suite à une discussion avec Jean Paul Lasserre (Laboratoire de Biochimie des Protéines et Protéomique, Université Paris XIII), plusieurs essais ont été réalisés et nous avons conclu au rôle négatif de HCl utilisé pour l'ajustement du pH du tampon Tris. En effet, en éliminant cet acide ou en le remplaçant par de l'acide acétique, aucun effet de bord n'a été observé sur les gels. L'utilisation de tampon de Tris/AcOH a donc été préférée pour la suite de l'étude.

Afin de vérifier la conservation des éléments métalliques par des métalloprotéines suite à la séparation par électrophorèse BN-PAGE, nous avons utilisé deux protéines modèles contenant des métaux (ADH contenant du Zn et SOD contenant du Cu et du Zn). La BSA dépourvue de métal a été utilisée comme témoin négatif. Lors de l'analyse par ICP-MS, après élution des protéines du gel dans une solution de NH₄OAc 10 mM et SDS 0,1%, le bruit de fond important, lié à la présence de molécules de CBB fixées sur les protéines, n'a pas permis la quantification du métal. Après décoloration des gels, une très faible quantité de métal a été détectée pour la SOD (représentant 5% de la quantité initiale de métal) et aucun métal pour l'ADH.

Bien que des études aient démontré l'utilité de ce type de gel pour l'analyse de métalloprotéines (Becker et al., 2008 ; Babusiak et al., 2007 ; Chery et al., 2002), il semble que leur utilisation soit incompatible avec notre méthode d'élution passive des protéines et de détection par ICP-MS. Ainsi, afin de trouver une alternative aux gels BN-PAGE, l'étude d'autres types de gels natifs s'est avérée nécessaire. Les méthodes d'électrophorèse utilisant des gels CN-PAGE et HrCN-PAGE ont été sélectionnées.

II.2 Séparation de protéines par CN-PAGE et HrCN-PAGE

Nous avons étudié la migration de protéines modèles par électrophorèse sur gels HrCN-PAGE à pH 7, CN-PAGE à pH 7 et CN-PAGE à pH 11. Bien qu'un pH neutre soit à priori plus adapté pour la conservation de protéines à l'état natif, il semblait judicieux de tester un gel CN-PAGE à un pH basique. En effet, en raison de l'absence de molécules imposant une charge aux protéines dans les gels CN-PAGE, la migration de celles-ci est dépendante de leur charge intrinsèque. Ainsi en réalisant les électrophorèses sur gels CN-PAGE à pH 7, les protéines dont le pI est supérieur à 7 seraient chargées positivement et ne migreraient pas vers l'anode. Elles pourraient donc être perdues.

La composition des solutions utilisées dans cette étude est présentée en détail dans la partie matériels et méthodes. Afin de permettre le dosage des protéines après électrophorèse et élution passive, 100 µg de protéines modèles ont été déposées sur les gels HrCN-PAGE et CN-PAGE. Les gels ont été réalisés en double : le premier étant coloré au CBB pour la visualisation des protéines et le second étant découpé, sans coloration, pour la détection des métaux et le dosage des protéines après élution passive (figure 3.20).

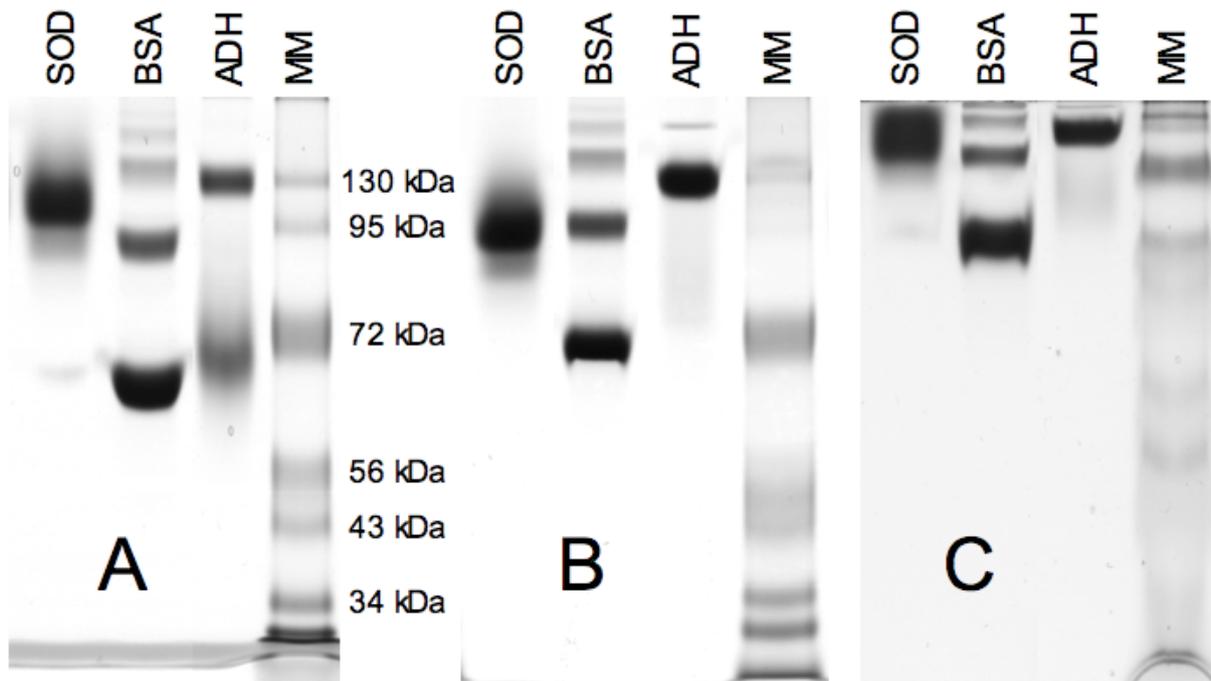


Figure 3.20 : Analyse de protéines modèles par gels HrCN-PAGE pH 7 (A), CN-PAGE pH 7 (B) et CN-PAGE pH 11 (C). Gels à 8% d'acrylamide/bisacrylamide. Dépôts de 100 µg de protéines. Conditions électrophorétiques : 15 minutes à 50V puis 3 heures à 100V. Coloration CBB. MM : marqueurs de masses moléculaires - dénaturés.

Les migrations des protéines modèles sur gels HrCN-PAGE pH 7 et CN-PAGE à pH 7 sont équivalentes. Par contre, la résolution du marqueur de poids moléculaire sur le gel HrCN-PAGE semble meilleure. Cette observation est particulièrement visible pour les masses moléculaires de 130, 95, 56 et 43 kDa. Nous constatons également que la migration des protéines à l'état natif n'est pas corrélée à la migration des marqueurs de masses moléculaires (protéines dénaturées).

Une faible migration des protéines est observable sur le gel CN-PAGE à pH 11. La tricine (ou la glycine) étant généralement utilisée comme « trailing ion » dans une gamme de pH de 8,3 à 9,5, le problème de migration observé à pH 11 peut-être expliqué par un choix inadapté du tampon d'électrophorèse.

Nous pouvons observer plusieurs bandes sur tous les gels pour la BSA (4 bandes) et sur le gel HrCN-PAGE pour l'ADH (2 bandes). Compte tenu de la non dénaturation des protéines en électrophorèse native, la séparation de plusieurs formes multimériques d'une même protéine est possible. Ainsi, la visualisation de plusieurs bandes pour la BSA est certainement liée à la présence de dimère, trimère et tétramère dans la solution initiale de BSA. Par contre, pour l'ADH, la visualisation de deux bandes sur le gel HrCN-PAGE est vraisemblablement due à une dégradation inhabituelle de la protéine. En effet, pour tous les autres gels HrCN-PAGE

réalisés ultérieurement, une seule bande pour l'ADH est visible après coloration (par exemple voir figure 3.21).

Les protéines contenues dans une ou plusieurs bandes découpées d'un gel non coloré ont été éluées. Le rendement d'éluion protéique et le pourcentage de métal détecté dans l'éluat ont été calculés. Les résultats de rendements d'éluion protéique sont rassemblés dans le tableau 3.14.

	Rendement protéique		
	ADH	SOD	BSA
HrCN-PAGE pH 7	55 ± 7% (n=3)	69 ± 18% (n=6)	70 ± 2% (n=2)
CN-PAGE pH 7	55% (n=1)	53% (n=1)	69% (n=1)
CN-PAGE pH 11	57% (n=1)	24% (n=1)	82% (n=1)

Tableau 3.14 : Rendements d'éluion des protéines modèles pour les différents gels natifs.

Elution dans 500 µl de NH₄OAc 10 mM, SDS 0,1%. Les rendements protéiques ont été calculés par rapport à un témoin constitué de la quantité de protéines déposées diluée dans un même volume de solution d'éluion. Dosage des protéines : DC Protein Assay (Bio-Rad)

Hormis pour la SOD faiblement éluée d'un gel CN-PAGE pH 11, les rendements d'éluion des protéines modèles sont satisfaisants avec des valeurs supérieures à 55%.

Les quantités de Cu et de Zn dans les éluats de la SOD ont été déterminées par analyse ICP-MS. Les résultats obtenus sont 69% (Cu) et 64% (Zn) détectés après électrophorèse HrCN-PAGE pH 7, et 79% (Cu) et 77% (Zn) après électrophorèse CN-PAGE pH 7. Ces résultats démontrent la conservation des métaux de la SOD au cours de l'électrophorèse sur gels natifs.

Avec un rendement d'éluion passive des protéines et une conservation en métal semblables aux autres gels, mais avec une meilleure résolution et avec moins de contraintes liées aux pIs puisque les protéines sont chargées par le déoxycholate de sodium, nous avons choisi de privilégier les gels HrCN-PAGE dans la suite de notre étude. Ainsi, une analyse plus complète sur un plus grand nombre de protéines modèles a été réalisée sur ce type de gel.

III Evaluation des gels HrCN-PAGE pour l'analyse métalloprotéomique

Pour évaluer l'intérêt des gels HrCN-PAGE dans l'analyse de protéines liant des éléments métalliques au sein d'un mélange complexe, nous avons effectué différentes analyses avec sept protéines modèles de tailles différentes et contenant des métaux variés. Ces protéines sont présentées dans la section IV.1. de la partie matériels et méthodes.

Une première étude a consisté à établir les rendements de conservation des éléments métalliques après électrophorèse et élution passive. Puis, dans un deuxième temps, l'effet de la réticulation des gels sur l'efficacité de séparation de mélanges protéiques simples a été étudié.

III.1 Conservation des interactions protéine/métal sur HrCN-PAGE

La détermination des rendements d'élution passive des différentes protéines modèles et de la conservation des métaux après électrophorèse a été réalisée sur des gels HrCN-PAGE à 8% d'acrylamide/bisacrylamide. Comme précédemment, deux gels ont été réalisés en parallèle : l'un étant coloré au CBB pour la visualisation des bandes protéiques et l'autre servant pour l'élution passive. Les rendements ont toujours été calculés par rapport à une quantité de protéine identique à celle déposée pour l'électrophorèse, et diluée dans le même volume de solution d'élution passive.

Les migrations sur gels HrCN-PAGE 8% (figure 3.21) sont satisfaisantes pour la plupart des protéines modèles, excepté pour l'hémoglobine et la myoglobine. Ces protéines de faible poids moléculaire se présentent sous la forme de bandes très diffuses. Ceci est très vraisemblablement lié à la réticulation des gels. En effet, pour des protéines de cette taille, un pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide plus élevé serait préférable.

Comme mentionné précédemment, en électrophorèse en conditions natives, toutes les formes multimériques des protéines sont conservées. Ainsi, pour la suite de l'analyse, toutes les bandes ont été découpées et éluées dans un même tube. Ainsi, pour la BSA (piste D), plusieurs coupes de gels ont été effectuées sur le gel non coloré, alors que pour la l'holo-transferrine (piste C), la SOD (piste E), l'AC (piste F), la myoglobine (piste G) et l'hémoglobine (piste H), des coupes plus grandes et couvrant la totalité de la zone contenant les protéines ont été réalisées.

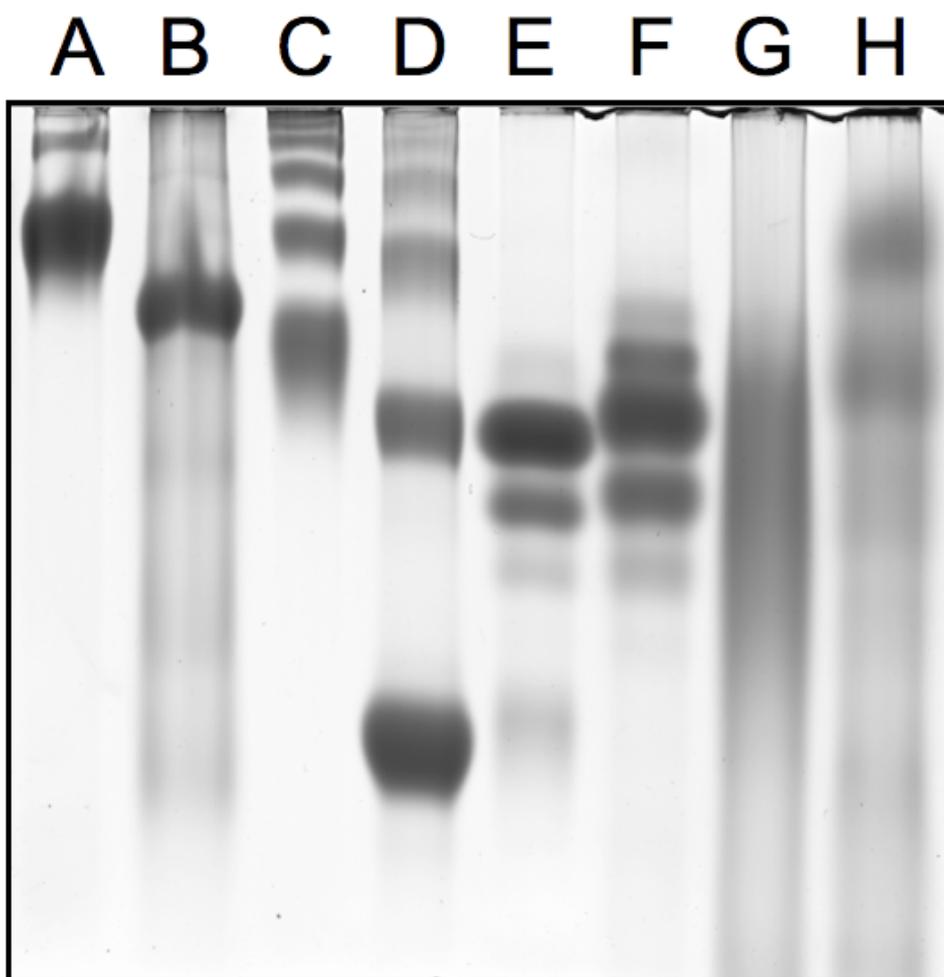


Figure 3.21 : Analyse de protéines modèles par gels HrCN-PAGE 8%.

Dépôt de 100 µg de protéines. Conditions électrophorétiques : 30 minutes à 20V puis 20 heures à 50V. Coloration CBB. Les lettres correspondent aux lettres indiquées dans le tableau 3.14.

	Protéine	Métal	MM (kDa)	Rendement protéique	n	Rendement métallique	n
A	Catalase	Fe	232	74 ±11	2	73 ±22	3
B	Alcool deshydrogénase (ADH)	Zn	141	55 ±7	3	54 ±13	9
C	Holo-transferrine	Fe	76	70 ±10	5	58 ±7	8
D	Albumine bovine (BSA)	-	66	70 ±2	2	-	-
E	Superoxide dismutase (SOD)	Cu Zn	31	69 ±18	6	73 ±22 84 ±26	13
F	Anhydrase carbonique (AC)	Zn	29	63 ±6	3	94 ±27	4
G	Myoglobine	Fe	17	47 ±3	3	48 ±10	9
H	Hémoglobine	Fe	16	56 ±17	2	57 ±37	4

Tableau 3.15 : Rendements protéiques et métalliques de protéines modèles après électrophorèse sur gels HrCN-PAGE 8%. Elution des bandes visibles sur la figure 3.21 pendant 1 nuit à 37°C dans 500 µl de NH₄OAc 10 mM, SDS 0,1%. Les rendements ont été calculés par rapport à des témoins réalisés en diluant la même quantité de protéines que celle déposée sur le gel dans un même volume de solution d'éluant. Dosage des protéines : DC Protein Assay (Bio-Rad) et dosage des métaux par ICP-MS après dilution au 1/6^{ème} dans une solution de 0,12% HNO₃ et 1,2 ppb d'In.

Avec des rendements protéiques variables (tableau 3.15), on constate que l'élution passive dépend fortement des protéines. De plus, comme précédemment indiqué, aucune corrélation entre la taille des protéines et le rendement de l'élution ne peut être établie. Par contre, une bonne corrélation entre le rendement d'élution de la protéine (rendement protéique) et le pourcentage de détection des métaux (rendement métallique) est observable, mettant en évidence une conservation totale des interactions pour la plupart des protéines étudiées. Par exemple, pour la catalase, le rendement protéique est de 74% et le rendement métallique est de 73%. Cette bonne corrélation est également vraie pour l'ADH, la SOD, la myoglobine et l'hémoglobine. Une moins bonne corrélation (mais satisfaisante en prenant en compte les erreurs) est obtenue avec l'holo-transferrine, le rendement métallique moyen ($58 \pm 7\%$) étant inférieur au rendement protéique moyen ($70 \pm 10\%$).

Enfin, les valeurs obtenues pour la détection métallique dans les éluats de l'anhydrase carbonique, sont beaucoup plus élevées que les rendements protéiques. Deux raisons nous semblent envisageables pour expliquer ces résultats. D'une part, une partie du métal, contenu dans la protéine toujours emprisonnée dans le gel, peut s'être détachée et avoir diffusé dans la solution d'élution. D'autre part, la protéine commerciale pourrait ne pas être totalement saturée en métal et celle-ci pourrait lier des atomes de Zn présents dans les différents tampons d'électrophorèse. La deuxième explication a été privilégiée compte tenu des pourcentages de détection de Zn supérieurs à 100% ($94 \pm 27\%$) après élution passive.

Par ailleurs, les écarts-types indiqués dans le tableau peuvent paraître importants et mettre à mal la reproductibilité de la méthode. Il est cependant nécessaire de signaler que ces valeurs ont été obtenues pour différentes manipulations réalisées sur des gels différents, espacées dans le temps de plusieurs semaines et ayant subi ou non des durées de congélation variables (de 1 à 10 jours). Afin de nous assurer de la reproductibilité de notre stratégie, nous avons déposé 3 fois la même solution de SOD, d'holo-transferrine et de myoglobine sur un même gel, et l'élution passive a été réalisée le même jour et dans les mêmes conditions. Avec des écarts-types inférieurs à 4% pour le rendement protéique et à 5% pour la détection métallique pour ces trois protéines, ces résultats démontrent la reproductibilité de notre méthode.

Ces résultats démontrent de façon non ambiguë la capacité des gels HrCN-PAGE à conserver durant l'électrophorèse les interactions non covalentes entre des protéines et des éléments métalliques.

Ces résultats ne démontrent cependant pas que les interactions protéine/métal sont conservées au cours du processus d'élution passive. En effet, on pourrait imaginer que les interactions soient rompues durant l'élution passive, et que les protéines et les métaux soient détectés correctement dans l'éluat sans pour autant être associés l'un à l'autre. Nous avons donc entrepris une étude par spectrométrie de masse supramoléculaire ESI-TOF-MS en collaboration avec D. Ayoub et le docteur S. Sanglier-Cianférani du LSMBO (IPHC-DSA). Cette étude a consisté à comparer la masse mesurée dans des conditions natives des protéines éluées des gels d'électrophorèse, avec la masse de ces mêmes protéines dans des conditions dénaturantes (élimination du métal) (Sanglier et al., 2008). Si le métal était bien conservé, nous devions obtenir un écart de masse entre les deux états de la protéine correspondant à la masse du métal.

La première étape a consisté à déterminer de façon précise la masse des protéines à l'état dénaturé. Malheureusement, seules les masses de la SOD et de l'AC ont été déterminées avec une précision permettant la poursuite de l'étude (tableau 3.16). Pour les autres protéines modèles, la complexité des spectres obtenus, liée à l'hétérogénéité des protéines commerciales, ne permettait pas une détermination précise de la masse.

Avant d'entreprendre une mesure de masse des protéines éluées du gel, nous avons voulu savoir si la concentration de SDS contenue dans la solution d'élution serait compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse ESI-TOF-MS. Nous avons suivi l'effet de l'augmentation de la concentration en SDS sur le signal de la myoglobine (protéine utilisée pour la calibration du spectromètre de masse). Nous avons pu observer une atténuation totale du signal pour une concentration en SDS de 0,01% dans le tampon. Ainsi, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines contenues dans les éluats nécessitait l'élimination du SDS par un traitement préalable (dessalage et dialyse). Le dessalage, effectué par un changement de tampon grâce à deux étapes de filtration sur gel (Zeba, Thermo Scientific, cutoff à 1000 Da), n'affectait pas les complexes protéines/métal.

Dès lors, pour chaque protéine, trois mesures de masse ont été réalisées :

- la mesure de la masse de la protéine dénaturée (sans métal),
- la mesure de la masse de la protéine à l'état natif,
- la mesure de la masse des protéines contenues dans les éluats après électrophorèse et élimination du SDS.

Les différents spectres obtenus sont présentés sur la figure 3.22.

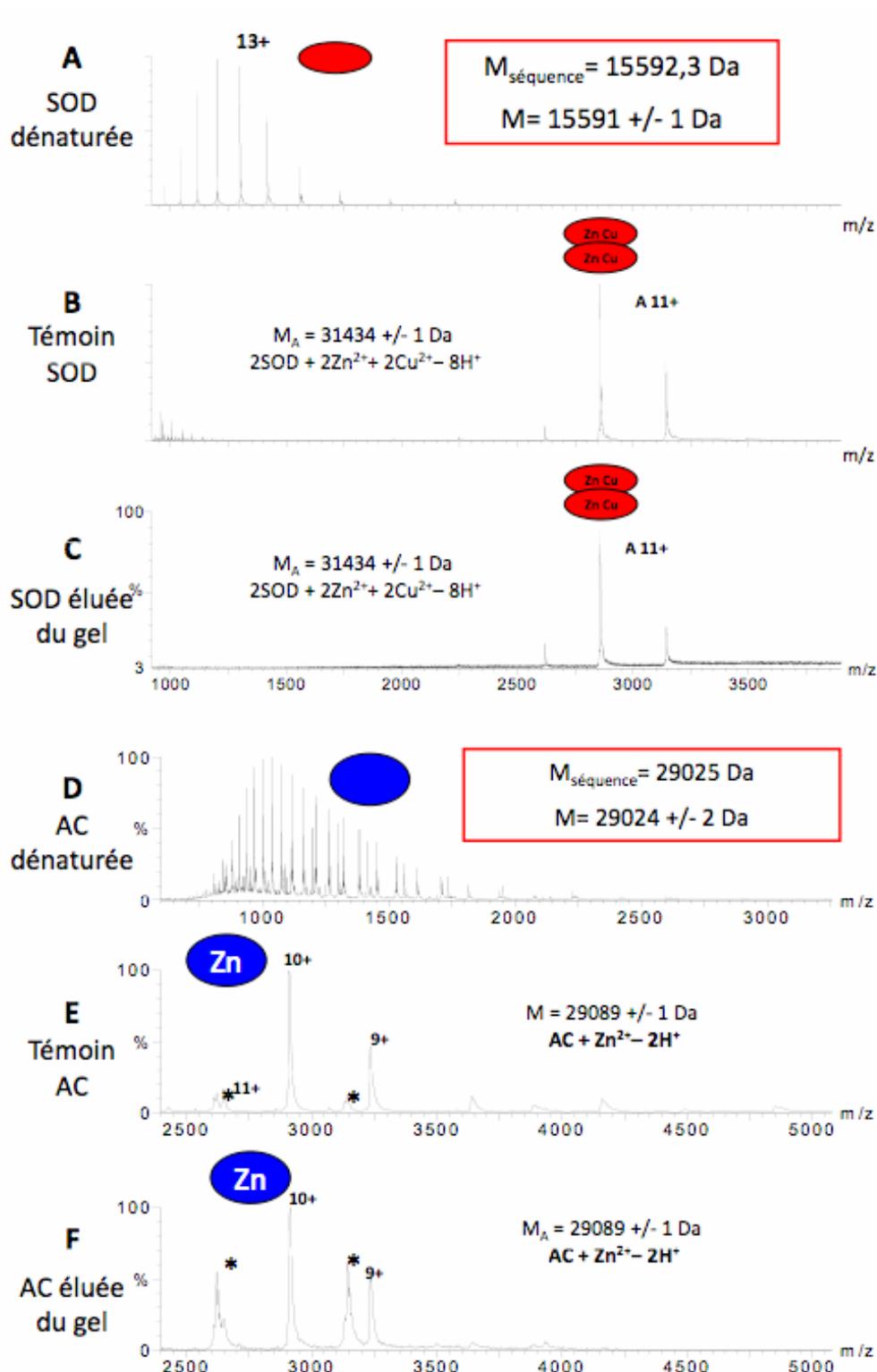


Figure 3.22 : Analyse ESI-TOF-MS de la SOD et de l'AC en conditions dénaturantes (A et D) et en conditions natives (B, C, E et F). Les mesures de masse sont effectuées sur un spectromètre de masse ESI-TOF-MS en mode positif. La mesure de la masse moléculaire des protéines à l'état dénaturé (A et D) est réalisée sur les protéines diluées dans un mélange eau/ACN (1:1) contenant 1% d'acide formique. La mesure de la masse moléculaire des protéines à l'état natif est réalisée après dilution dans une solution d' NH_4OAc 100 mM (B et E) et après dessalage (échange de tampon par filtration sur gel, Zeba) et dialyse d'une nuit dans une solution d' NH_4OAc 100 mM pour les éluats des gels (C et F).

Présence d'impuretés dans les spectres de l'AC notée par un*

Protéine modèle	Masse mesurée en conditions dénaturantes	Masse mesurée en conditions natives*	Écart de masse
SOD	15592 ±1 Da (monomère)	31434 ±1 Da* (dimère)	252 Da
AC	29025 ±2 Da	29089 ±1 Da*	64 Da

Tableau 3.16 : Masses moléculaires de la SOD et de l'AC déterminées par spectrométrie de masse ESI-TOF-MS. *Les masses mesurées sont identiques pour les témoins et les protéines éluées du gel. Le rappel des conditions d'analyse sont indiquées dans la légende de la figure 3.22.

Tous les spectres obtenus en conditions dénaturantes et natives ont permis la détermination précise de la masse des deux protéines malgré la présence de quelques contaminants dans le cas de l'AC (indiqués par un astérisque sur les spectres E et F). Par ailleurs, nous pouvons observer une distribution très différente de l'état de charge des protéines en conditions dénaturantes et natives. En effet, pour la SOD, on observe essentiellement des protéines 13 fois chargées en conditions dénaturantes tandis que ce sont des protéines 11 fois chargées qui sont majoritaires en conditions natives (protéines témoins et protéines éluées). Pour l'AC, cette différence est plus importante, avec des états de charge supérieurs à 20 fois pour la forme dénaturée, tandis que la protéine est majoritairement 10 fois chargée dans sa forme native. Ces observations sont dues à la différence de conformation des protéines dans les deux états. En effet, un plus grand nombre d'acide aminés peuvent être protonnés dans une protéine totalement dénaturée en comparaison à une protéine repliée dans sa configuration native (Felitsyn et al., 2002).

L'écart de masse observé (tableau 3.15) pour la SOD est en accord avec une stœchiométrie de 1 Cu, 1 Zn par monomère de SOD (Parge et al., 1992) et l'écart pour l'AC est en accord avec une stœchiométrie 1/1 pour le Zn (Lindskog, 1997). En effet, l'écart de 252 Da pour la SOD résulte de la perte 2 Cu (63,55 Da) et 2 Zn (65,39 Da) entre la forme dénaturée et la forme native (+ 4 H⁺). Pour l'AC, l'écart de 64 Da résulte de la perte d'un atome de Zn (+ 1 H⁺) pour la forme dénaturée. Ainsi, la comparaison des masses mesurées par spectrométrie de masse ESI-MS démontre que :

- le dessalage et la dialyse n'ont pas entraîné la perte des interactions protéine/métal,
- les protéines éluées passivement des gels HrCN-PAGE ont conservé leurs interactions avec les métaux initialement présents dans leur structure.

Les résultats obtenus par analyse par spectrométrie de masse supramoléculaire démontrent que l'élué passive dans une solution d'acétate d'ammonium contenant 0,1% de SDS est compatible avec la conservation des interactions entre des protéines et des éléments métalliques.

III.2 Séparation de mélanges protéiques simples sur HrCN-PAGE

Avant d'entreprendre l'analyse des protéines de la muqueuse intestinale, nous avons voulu évaluer l'efficacité de séparation des gels HrCN-PAGE à l'aide de mélanges protéiques simples constitués de trois protéines (2 métalloprotéines et la BSA).

Pour la détection de protéines liant les métaux, notre stratégie analytique nécessite une découpe systématique du gel par petites bandes. Ainsi, après séparation des protéines, les différentes pistes ont été découpées de façon systématique par fraction de 2,5 mm de hauteur. Après élution passive, les métaux contenus dans chaque fraction ont été détectés par analyse ICP-MS. En parallèle, les protéines ont été analysées individuellement pour pouvoir comparer leur profil de migration. Les résultats sont présentés sur la figure 3.23.

La séparation des protéines contenues dans les trois mélanges est satisfaisante. En effet, les protéines sont bien séparées et leurs migrations respectives sont identiques à celles obtenues pour les dépôts individuels. De même, les profils métalliques sont en accord avec la migration des protéines modèles et aucun métal n'est détecté dans les fractions ne contenant pas de protéine ou dans celles contenant la BSA. Par contre, l'étalement de la myoglobine et de l'hémoglobine reste problématique. En effet, très peu de Fe est détecté dans les éluats. Alors que nous avons montré précédemment la conservation du Fe par ces protéines, la détection de ces protéines par le profil métallique n'est pas possible. En effet, compte tenu de l'étalement de ces protéines, la quantité de Fe contenue dans chaque fraction passe sous la limite de détection de cet élément par ICP-MS.

Afin d'évaluer l'impact de la réticulation des gels HrCN-PAGE sur la qualité de séparation, nous avons poursuivi l'étude de mélange de protéines modèles, en faisant varier les pourcentages d'acrylamide/bisacrylamide dans le gel. La suite de cette étude a été réalisée avec des mélanges constitués des protéines suivantes : la catalase, l'ADH, la SOD et l'AC. Compte tenu des résultats précédents, nous avons choisi de ne pas déposer l'hémoglobine et la myoglobine. De plus, à ce stade de l'étude, le dépôt de la BSA nous a paru superflu.

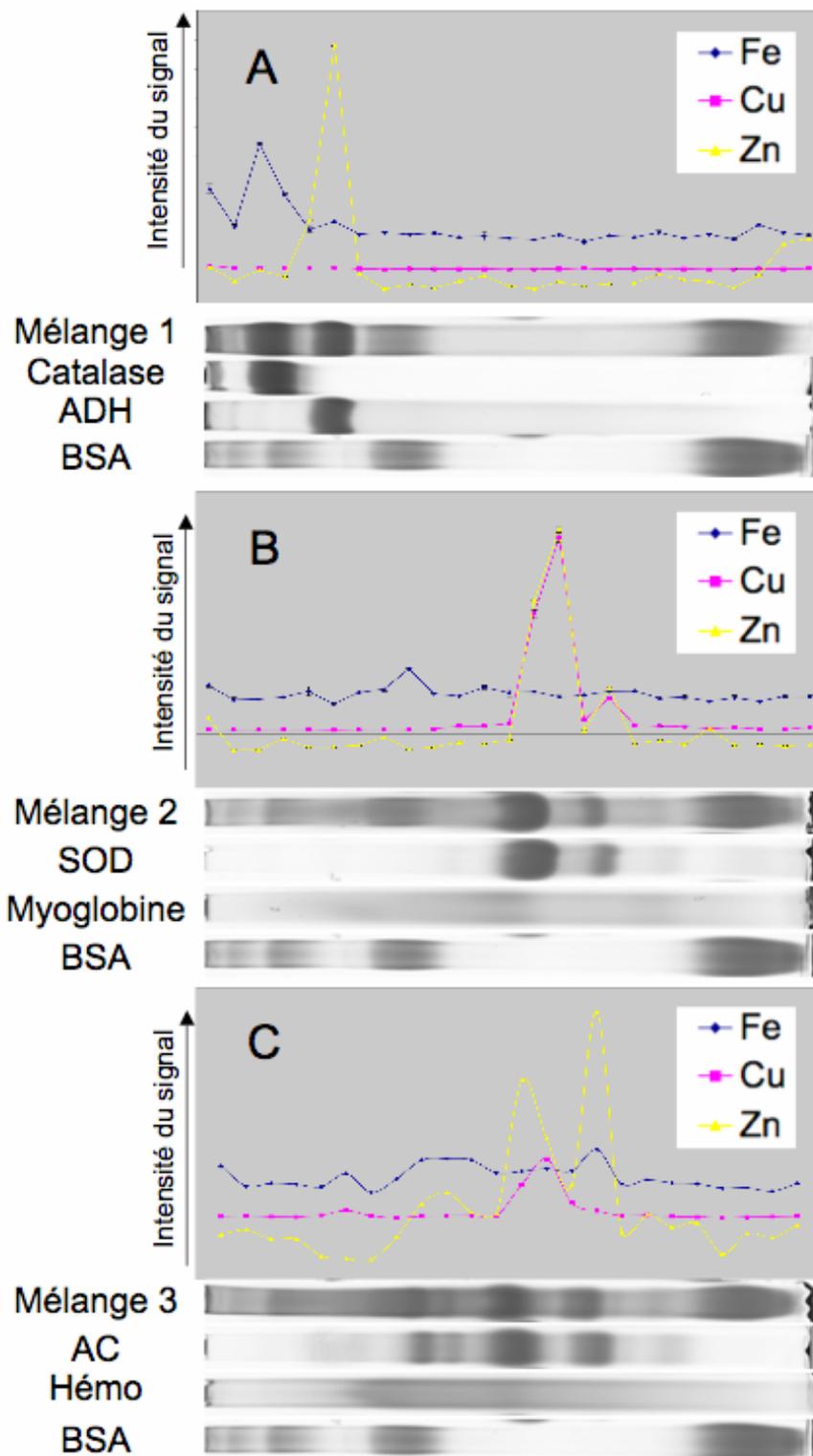


Figure 3.23 : Séparation de mélanges protéiques sur HrCN-PAGE 8%.

Dépôt de 25 µg de chaque protéine dans chaque piste (soit 75 µg de protéines/piste pour les mélanges).
 (A) Mélange 1 : Catalase, ADH, BSA, (B) Mélange 2 : SOD, Myoglobine, BSA. (C) Mélange 3 : AC, hémoglobine, BSA. Conditions électrophorétiques : 15 minutes à 50V puis 5 heures à 100V. Coloration CBB. Détection métallique par ICP-MS après élution passive de fractions de 2,5 mm de gels non colorés dans 500 µl de NH₄OAc 10 mM, 0,1% SDS. Signal normalisé par ¹¹⁵In du ⁵⁶Fe en bleu, du ⁶³Cu en rose et du ⁶⁶Zn en jaune.

En électrophorèse sur gel, la réticulation des gels est choisie en fonction des poids moléculaires des protéines à séparer. En effet, pour des protéines de haut poids moléculaire, des gels à faible réticulation seront utilisés, tandis que pour des protéines de bas poids moléculaire, les gels posséderont une réticulation plus serrée. L'utilisation de gels réalisés avec un gradient de polyacrylamide est bien adaptée pour la séparation de mélanges composés de protéines de masses moléculaires très différentes. Ces derniers étant plus difficiles à préparer de façon reproductible, nous avons préféré évaluer l'effet de différentes réticulations fixes avec les mélanges de protéines modèles. Des gels HrCN-PAGE composés de 10, 12 14 et 16% d'acrylamide/bisacrylamide ont été réalisés et les conditions électrophorétiques ont été optimisées. Ainsi, le voltage a été augmenté de 25V à chaque augmentation de 2% d'acrylamide/bisacrylamide. Les résultats sont présentés sur la figure 3.24.

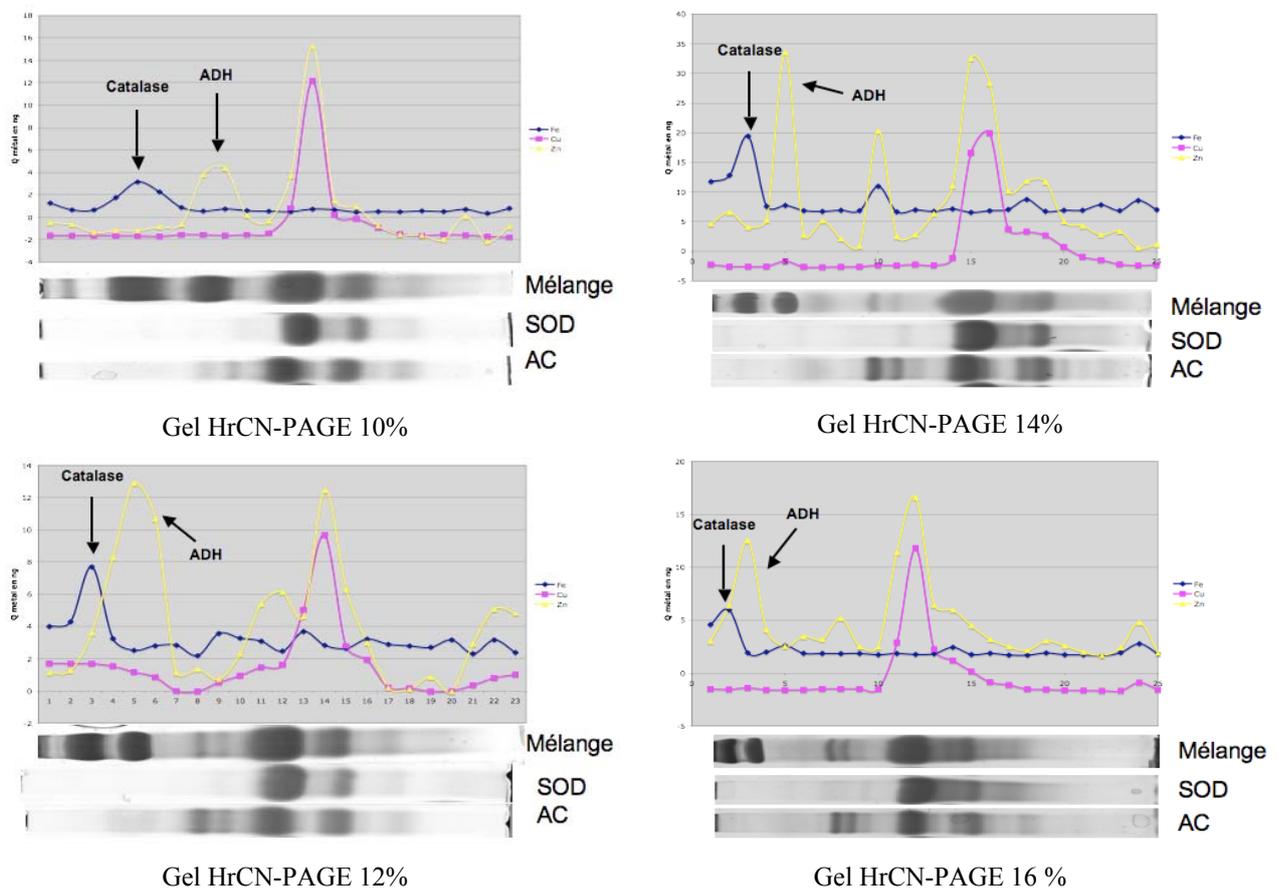


Figure 3.24 : Séparation de mélanges protéiques sur HrCN-PAGE de différentes réticulations. Chaque mélange est constitué de catalase, ADH, SOD et AC à 25 µg chacune. Coloration CBB. Détection métallique par ICP-MS après élution passive de fractions de 2,5 mm de gels non colorés dans 500 µl de NH₄OAc 10 mM, 0,1% SDS. Signal normalisé par ¹¹⁵In du ⁵⁶Fe en bleu, du ⁶³Cu en rose et du ⁶⁶Zn en jaune. Les migrations de la SOD et de l'AC sont indiquées en raison de leur co-migration.

Comme attendu, certaines bandes de protéines sont plus fines en augmentant la réticulation du gel. Pour ce mélange, la meilleure séparation est obtenue avec un pourcentage de polyacrylamide de 14%. En effet, la catalase et l'ADH sont bien séparées de la SOD et de l'AC. Ces deux dernières, ayant une masse très similaire, ne peuvent pas être séparées. Par contre nous pouvons détecter spécifiquement la SOD grâce au profil du Cu, métal absent de l'AC. Quelle que soit la réticulation des gels HrCN-PAGE, les profils de détection métallique sont en accord avec la migration des protéines dans le gel. De plus, une réticulation plus élevée ne gêne pas l'éluion passive des protéines. En effet, les estimations de la quantité de métal élué sont similaires, quel que soit le pourcentage de polyacrylamide. Par exemple, la quantité de Cu estimé (en pourcentage du Cu contenu dans le mélange initial) est de 73%, 64%, 65% et 65% pour les gels 10%, 12%, 14% et 16%, respectivement. Étant donné que seule la SOD contient cet élément, ces résultats peuvent être comparés au $73 \pm 22\%$ de Cu détecté pour la SOD lors de l'étude de la conservation métallique sur les gels 8% du III.1. Afin de s'assurer de la conservation des métaux pour les autres protéines, la détermination des rendements protéique et métallique des protéines modèles a été réalisée pour chaque protéine déposée individuellement sur un gel 14% avec la procédure décrite précédemment (voir III.1). Les résultats de cette analyse et le rappel des valeurs obtenues sur le gel 8% sont présentés dans le tableau 3.17.

Protéine	HrCN-PAGE 8 %		HrCN-PAGE 14 %	
	Rendement protéique	Rendement métallique	Rendement protéique	Rendement métallique
Catalase	74 % \pm 8 (n=5)	73 % \pm 4 (Fe, n=5)	69 %	89 % Fe
ADH	55 % \pm 7 (n=3)	54 % \pm 13 (Zn, n=9)	70 %	61 % Zn
SOD	69 % \pm 18 (n=6)	73 % \pm 22 (Cu, n=13) 84 % \pm 26 (Zn, n=13)	76 %	71 % Cu 69 % Zn
AC	63 % \pm 6 (n=3)	94 % \pm 27 (Zn, n=4)	72 %	78 % Zn

Tableau 3.17 : Rendements protéiques et métalliques obtenus avec les gels HrCN-PAGE 8% et 14%.
Valeurs calculées pour chaque protéine déposée séparément par rapport à des témoins constitués d'une même quantité de protéines diluées dans un même volume de solution d'éluion.

Dans l'ensemble, en tenant compte des écarts types déterminés précédemment avec les gels 8%, les rendements calculés avec les gels 14% sont équivalents. Ces résultats montrent que l'éluion passive des protéines d'un gel HrCN-PAGE 14% est satisfaisante. En effet, en rapportant les rendements métalliques aux rendements protéiques, ces résultats montrent qu'environ 90% du métal contenu par la SOD et l'ADH est conservé au cours de l'électrophorèse. Par contre, comme précédemment le pourcentage de Zn détecté pour l'AC est supérieur au rendement protéique; de plus contrairement aux résultats obtenus avec les

gels 8%, la catalase montre un phénomène similaire. En prenant en compte les résultats obtenus avec les gels 8% et 14%, notre hypothèse précédente concernant l'AC reste possible. Cependant, pour la catalase, la bonne corrélation des rendements protéiques et métalliques obtenus avec un pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide de 8% nous conduit à faire une autre hypothèse pour cette protéine. Compte tenu du poids moléculaire élevé de la catalase (242 kDa), de la réticulation du gel et de la présence de SDS dans le tampon d'élution, nous pensons qu'une partie du métal, contenu dans la catalase toujours emprisonnée dans le gel, s'est détachée de la protéine et a diffusée dans la solution d'élution.

Ces résultats démontrent la capacité de notre stratégie pour la détection de métalloprotéines de tailles variées dans des mélanges simples en adaptant la réticulation des gels.

IV Comparaison des gels HrCN-PAGE et de la chromatographie liquide

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, de nombreuses publications mettent en avant la possibilité de détecter des métalloprotéines dans des échantillons complexes après séparation des protéines par HPLC. Parmi ces techniques, la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) semble la mieux adaptée pour la recherche de protéines liant les métaux de façon non covalente en raison de la conservation de la structure native des protéines au cours de la séparation et de l'absence d'interaction entre l'analyte et la phase stationnaire (Bresson et al., 2006). Afin d'évaluer la stratégie basée sur les gels HrCN-PAGE par rapport aux autres techniques déjà utilisées, à cette dernière, nous avons comparé la détection de la SOD par ces deux techniques.

Pour entreprendre cette comparaison, nous avons dans un premier temps, réalisé un couplage SEC-ICP-MS. Cette étape a nécessité la sélection d'un tampon permettant la séparation des protéines, tout en étant compatible avec l'analyse par ICP-MS.

Notre choix s'est porté sur une colonne TSK-gel SW3000 (gel de silice sphérique hydrophile) permettant la séparation de biomolécules dans une gamme de poids de 10 kDa à 500 kDa.

IV.1 Sélection d'un tampon pour la séparation de protéines par SEC

Dans un premier temps, les performances de la colonne ont été vérifiées avec une solution de protéines standard (Gel filtration standard, Bio-Rad) et la phase mobile conseillée par le fabricant (0,1 M Na₂SO₄ dans 0,1 M de tampon phosphate pH 6,7) puis avec un mélange de trois protéines modèles (ADH, BSA et SOD) (figure 3.25).

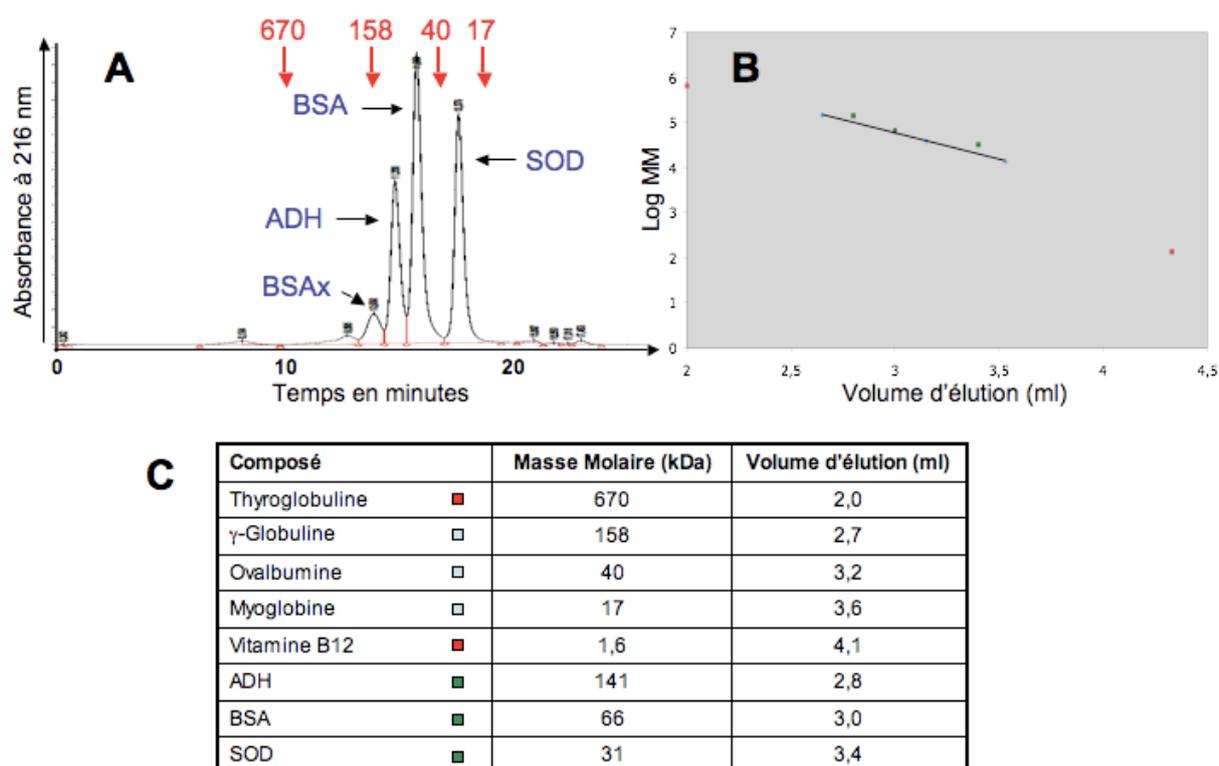


Figure 3.25 : Vérification des performances de la colonne TSK SW3000.

(A) Chromatogramme des trois protéines modèles (ADH, BSA, SOD, 10 µg de chaque protéine). (B) Etalonnage de la colonne. (C) Masses molaires et volumes d'éluion des marqueurs et des protéines modèles.

Phase mobile : 0,1 M Na₂SO₄, 0,1 M tampon phosphate pH 6,7, débit 0,2 ml/min.

Dans ces conditions, nous pouvons observer une bonne séparation de la SOD et de la BSA. L'ADH et la BSA peuvent également être séparées l'une de l'autre mais avec une résolution moins bonne. En effet, la résolution est de 1,2 entre la l'ADH et la BSA contre 2,1 entre la BSA et la SOD (figure 3.25A). Par ailleurs, les temps de rétention sont en parfait accord avec la droite d'étalonnage (figure 3.25B) réalisée avec les standards.

Nous avons ensuite déterminé l'efficacité et la résolution pour la séparation des trois protéines modèles en fonction du débit de la phase mobile (Tableau 3.18).

Débit	0,15 ml/min	0,25 ml/min	0,35 ml/min
Efficacité (nombre de plateaux N)			
ADH	10000	7000	5000
BSA	9500	6000	4000
SOD	9000	7000	6000
Résolution (Rs)			
ADH/BSA	1,30	1,06	0,90
BSA/SOD	2,24	1,89	1,65

Tableau 3.18 : Effet du débit sur l'efficacité de la colonne et la résolution.

Quantité de protéine injectée : 10 µg. Phase mobile : 0,1 M Na₂SO₄, 0,1 M tampon phosphate pH 6,7.

Les valeurs d'efficacité calculées à partir de pics des protéines modèles (10 µg injectés) sont inférieures à celle annoncée par le fabricant ($N \geq 30000$ à un débit de 0,35 ml/min). Cependant cet écart peut être expliqué en partie par le fait que ce nombre de plateaux théoriques a été calculé par le fabricant à partir du pic de l'acide aminobenzoïque, produit en quantité plus faiblement injecté (0,05 µg) et présentant un pic très fin. En ce qui concerne la résolution, une bonne séparation de la BSA et de la SOD est obtenue quel que soit le débit pris en compte ($R_s > 1,5$). Par contre, la séparation de la BSA et de l'ADH est mauvaise pour les débits de 0,25 et 0,35 ml/min. En diminuant le débit à 0,15 ml/min, la résolution est correcte. En diminuant encore le débit, nous devrions augmenter la résolution de ces deux protéines. Cependant le temps d'analyse en serait rallongé. Compte tenu d'un volume total de 4,1 ml, à un débit de 0,15 ml/min, le temps d'analyse est déjà de 27 minutes.

Ainsi, en considérant les valeurs d'efficacité et de résolution pour chaque débit, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un débit de 0,15 ml/min. Ce débit a été utilisé pour la suite de notre étude.

Le tampon conseillé par le fabricant présente une forte concentration en sels pouvant interférer avec l'analyse par ICP-MS. Dans la littérature, la séparation et la détection de métalloprotéines a été réalisée dans un tampon Tris/HCl à une concentration de 10 à 30 mM (Van Campenhout et al., 2004 ; Mason et Borja, 2002 ; Polec et al., 2002) ou dans une solution de NH₄OAc ou NH₄HCO₃ à une concentration de 10 à 50 mM (Bresson et al., 2006 ; Tastet et al., 2006 ; Palacios et al., 2005 ; Bouyssiere et al., 2004). Dans un premier temps, nous avons préféré une solution de 10 mM NH₄HCO₃ pH 6,7 comme phase mobile. Néanmoins, lors d'essais préliminaires, une augmentation de la force ionique de la phase mobile s'est avérée nécessaire pour pallier les interactions ioniques avec la colonne. En effet, avec une phase mobile constituée de 10 mM NH₄HCO₃, la BSA et l'ADH sont co-éluées (non

montré). En augmentant la concentration en NH_4HCO_3 à 200 mM, un début de séparation des deux pics est observable ($R_s=0,9$, non montré). Nous avons également testé d'autres phases mobiles dont le tampon utilisé par Kameo et al. (2005) composé de Tris 25 mM, HCl 12,5 mM et KCl 20 mM, mais les résultats obtenus n'ont pas apporté d'amélioration significative. De plus, ce dernier tampon présente l'inconvénient de laisser un dépôt important de sels au niveau de l'entrée du spectromètre de masse au niveau du « sampler ». Ainsi, malgré une résolution moindre, nous avons préféré la phase mobile volatile constituée de 200 mM NH_4HCO_3 pH 6,7, ne présentant pas cet inconvénient.

Par ailleurs, un couplage SEC-ICP-MS a été réalisé. Afin de compenser la différence de débit entre la chromatographie (0,15 ml/min) et le débit du nébuliseur de l'ICP-MS (0,7 ml/min), une solution d'appoint de NH_4OAc 10 mM et HNO_3 0,1% a été utilisée.

Après avoir vérifié la compatibilité de la phase mobile avec une analyse par ICP-MS, nous avons déterminé la quantité de métaux présente dans les protéines SOD et ADH, après séparation par SEC-HPLC. Pour 10 μg de chaque protéine injectée, 87% du Cu et 90% du Zn ont été détectés pour la SOD et 100% du Zn a été détecté pour l'ADH.

Ainsi, bien qu'une optimisation soit nécessaire pour améliorer la qualité de séparation des protéines, la conservation des métaux après chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne TSK gel SW3000 et leur détection par ICP-MS sont possibles avec une phase mobile constituée de 200 mM NH_4HCO_3 pH 6,7.

IV.2 Comparaison des gels HrCN-PAGE et de la SEC pour la détection de la SOD

Nous avons choisi de comparer la technique d'électrophorèse sur gel HrCN-PAGE à la chromatographie d'exclusion stérique en déterminant la quantité minimale de SOD détectable par ces deux techniques (figures 3.26 et 3.27). Ainsi des quantités décroissantes de SOD (de 50 μg à 100 ng) ont été analysées par les deux méthodes.

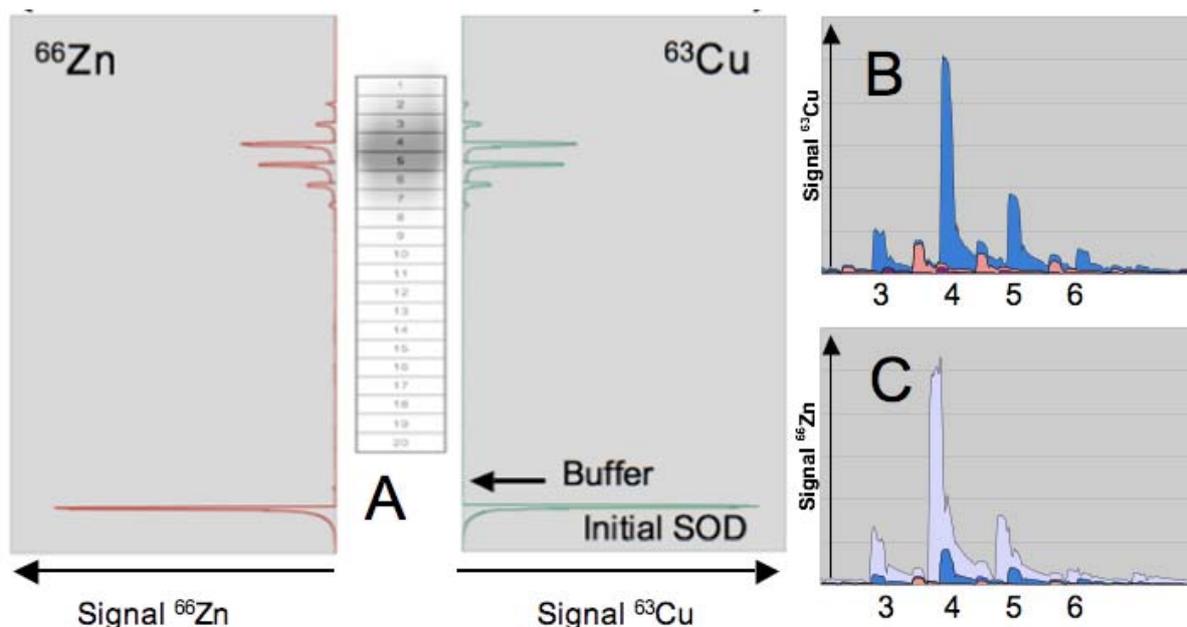


Figure 3.26 : Détermination de la quantité minimale de SOD détectable sur gel HrCN-PAGE 8%.
 (A) Profil de détection du ^{63}Cu et ^{66}Zn d'une piste de SOD (50 µg déposés, coloration CBB) après découpe du gel (fraction de 5 mm de hauteur) et élution dans 500 µl de NH_4OAc 10 mM, 0,1% SDS. Détection des métaux dans les éluats par ICP-MS par « flow injection » (60 µl). Sont également indiqués dans le bas les signaux obtenus par « flow injection » de 60 µl de solution d'élution passive (Buffer) et de 50 µg de SOD dans la solution d'élution passive (initial SOD). (B) Agrandissement de la détection du Cu et (C) Agrandissement de la détection du Zn pour les fractions 3 à 6 (Bleu clair : 50 µg ; Bleu foncé : 25 µg ; Rose : 5 µg ; Violet : 1 µg).

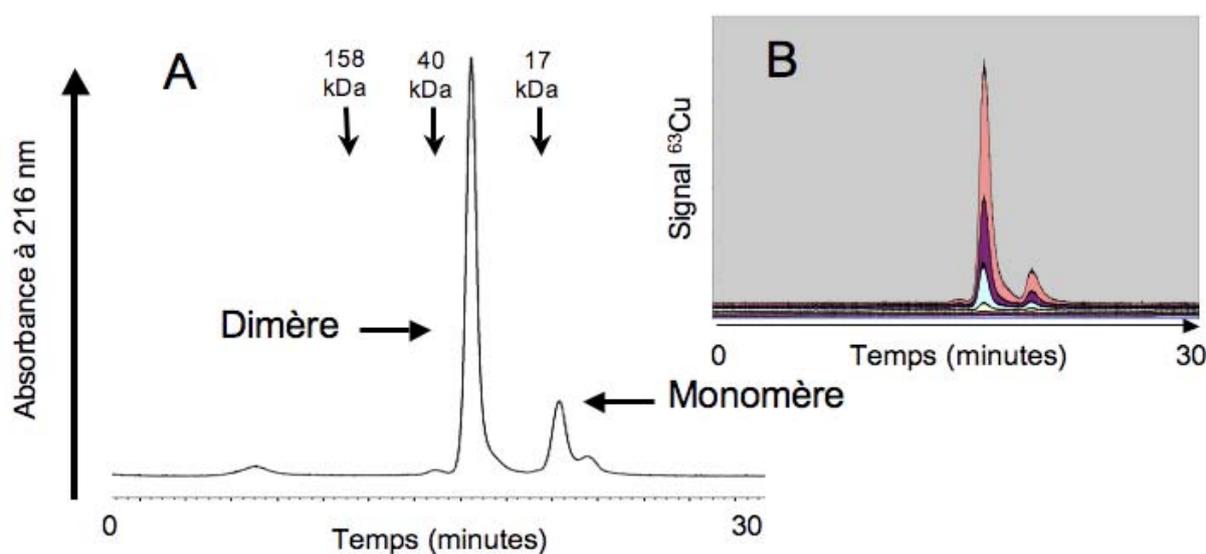


Figure 3.27 : Détermination de la quantité minimale de SOD détectable par SEC-ICP-MS.
 (A) Chromatogramme obtenu pour 10 µg de SOD injectée et détectée par le suivi de l'absorbance à 216 nm. Les flèches indiquent les masses moléculaires des standards servant à l'étalonnage de la colonne.
 (B) Chromatogrammes obtenus pour des concentrations décroissantes en SOD injectée et détectée par ICP-MS (signal du ^{63}Cu) (Rose : 25 µg ; Violet : 10 µg, Bleu clair : 5 µg ; Jaune : 1 µg).

Sur la figure 3.26A, nous pouvons observer une seule bande après coloration du gel au CBB. La détection du ^{63}Cu et du ^{66}Zn dans l'ensemble des fractions de gels correspond à la quantité totale de métal présent dans la protéine initiale. En effet, la somme des signaux obtenus dans chaque fraction est équivalente au signal obtenu dans le témoin SOD (dernier pic).

Nous pouvons observer qu'un dépôt de 25 μg de SOD est détectable quel que soit le métal détecté tandis qu'après un dépôt de 5 μg , la SOD n'est plus détectée par la détection du ^{66}Zn (figure 3.26C) mais toujours possible par la détection du ^{63}Cu (figure 3.26B). Par contre, une quantité de 1 μg de SOD déposée n'est plus détectable. Ainsi, la quantité minimale de SOD à déposer sur un gel HrCN-PAGE 8% pour être détectable avec notre méthode d'analyse est comprise entre 1 et 5 μg .

La détection de la SOD par mesure de l'absorbance en sortie de chromatographie d'exclusion stérique montre la présence de 2 pics correspondant à deux formes de la SOD (figure 3.27A). En comparant les temps d'élution de ces pics avec ceux de standards, nous pouvons identifier la forme dimérique de la SOD dans le pic majoritaire et la présence du monomère dans le pic minoritaire. Ainsi, alors qu'une seule bande est visible sur le gel HrCN-PAGE, il semblerait qu'une séparation par chromatographie d'exclusion stérique soit légèrement plus dissociante. Par ailleurs, la détection de la SOD par le suivi du cuivre après chromatographie d'exclusion stérique est possible à partir de 1 μg de SOD injectée (figure 3.27B).

Ainsi, une quantité de SOD jusqu'à cinq fois plus faible est détectable par couplage SEC-ICP-MS en comparaison à la détection de la SOD dans les éluats de gel HrCN-PAGE. Notons néanmoins que la détection métallique dans les éluats des gels HrCN-PAGE n'est réalisée que sur 60 μl de solution, soit 12% du volume total de l'éluat (500 μl), alors que la totalité de l'éluat de la SEC est introduite dans l'ICP-MS.

Avec une quantité minimale de SOD détectable de même ordre de grandeur (maximum 5 fois) après chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'ICP-MS ou après élution passive après électrophorèse sur gel HrCN-PAGE, notre stratégie reste envisageable pour l'analyse de métalloprotéines dans des mélanges complexes en alternative, ou en complément, de la chromatographie.

V Séparation des protéines intestinales de rat par électrophorèse sur gel en conditions natives et détection de l'aluminium par ICP-MS

V.1 Séparation monodimensionnelle sur gels HrCN-PAGE

Compte tenu des résultats encourageants obtenus avec les protéines modèles, nous avons réalisé une séparation des protéines de la muqueuse intestinale sur gel HrCN-PAGE et une recherche de l'aluminium après découpe systématique du gel et élution des protéines.

Différents échantillons de muqueuse intestinale, récupérés lors de l'expérience RéaA (voir première partie des résultats, III) ont été utilisés pour cette analyse. L'extraction des protéines a été réalisée dans un tampon composé de 50 mM de Tris/AcOH pH 7, 750 mM d'acide aminocaproïque et des inhibiteurs de protéases.

La quantité de protéines récupérée est de $70 \pm 10 \mu\text{g}$ ($n=9$) de protéines par mg de muqueuse intestinale. Cette valeur se situe entre le rendement d'extraction obtenu en présence de détergent CHAPS, d'urée et de thiourée ($95 \pm 12 \mu\text{g}/\text{mg}$, première partie des résultats, I.1) et celui obtenu sans agents dénaturants mais en présence d'octylglucoside ($43 \pm 2 \mu\text{g}/\text{mg}$, deuxième partie des résultats, II.1). Ainsi, l'utilisation d'acide aminocaproïque permet une meilleure solubilisation des protéines que l'octylglucoside. Un dosage de l'aluminium a été fait sur les extraits protéiques. Cependant, les valeurs étant comprises entre la limite de détection (0,2 ppb) et la limite de quantification (0,6 ppb), aucune concentration n'a pu être calculée. Seule une estimation de la quantité d'aluminium contenu dans les extraits protéiques ayant les plus fortes concentrations en aluminium a pu être réalisée : elle est d'une centaine de pg par μg de protéine.

Conscients de la faible quantité d'aluminium présente dans les échantillons, une première séparation a néanmoins été réalisée sur des gels HrCN-PAGE 8%. 100 μg de protéines ont été déposés sur les gels HrCN-PAGE. Après électrophorèse, les gels ont été découpés en fractions de 4 mm. L'élution passive des protéines et la détection de l'aluminium contenu dans ces fractions ont été réalisées comme précédemment. La figure 3.28 présente les résultats obtenus.

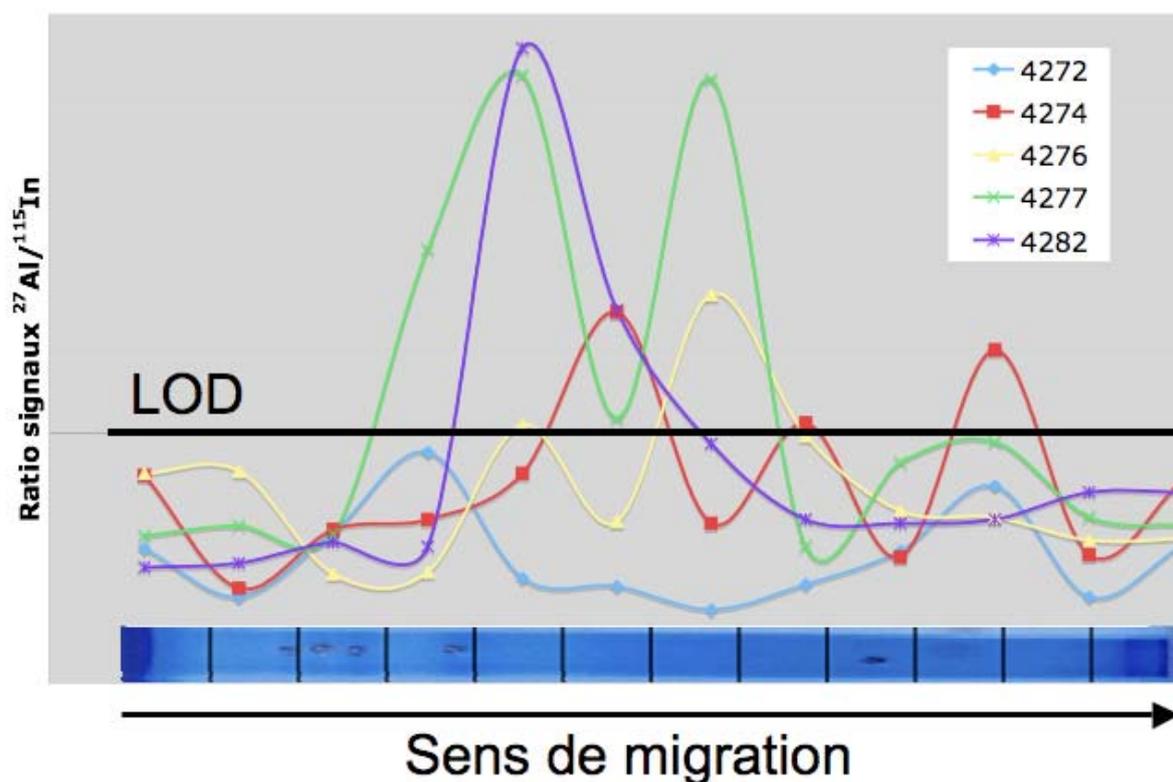


Figure 3.28 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gel HrCN-PAGE 8%. Dépôt de 100 µg de protéines sur gel HrCN-PAGE 8%. Détection de l'aluminium par ICP-MS dans les fractions de 4 mm après élution dans 500 µl de solution de NH₄OAc 10 mM, 0,1% SDS. Le signal de ²⁷Al a été normalisé par ¹¹⁵In (étalon interne à 1 ppb). La LOD indiquée sur le graphe a été déterminée à partir de la découpe d'une piste de gel sans protéine (fractions de 4 mm). Les différents profils métalliques correspondent aux protéines extraites de la muqueuse intestinale de 5 rats différents ayant ingéré de la kaolinite (4272, 4274, 4276, 4277 et 4282).

La piste de gel colorée au CBB correspond à celle de l'échantillon 4282.

Comme on peut le voir sur la figure 3.28, peu de bandes bien définies sont observables après coloration au CBB. De plus, les profils métalliques sont différents et révèlent une hétérogénéité des échantillons. Les échantillons 4277 et 4282, présentant des quantités d'aluminium nettement supérieures à la limite de détection, ont été sélectionnés pour la suite de l'étude. Nous pouvons estimer à 12 ng et 20 ng la quantité d'aluminium total détecté dans les éluats des échantillons 4282 et 4277, respectivement. Ces résultats sont du même ordre de grandeur que l'estimation de la quantité d'aluminium déposée (une dizaine de ng), ce qui montre qu'il n'y a pas eu de perte notable d'aluminium au cours de l'électrophorèse.

Nous avons renouvelé cette analyse à partir de nouvelles parties d'aliquotes de muqueuse intestinale mais sur des gels HrCN-PAGE 14% et en déposant une quantité de protéines plus importante (400 µg). Nous avons également réduit à 2 mm la taille des fractions de gels découpés.

Pour cette nouvelle extraction de muqueuse, la quantité d'aluminium dans les extraits protéiques a été estimée à environ 20 pg d'aluminium par μg de protéine, pour les deux échantillons 4277 et 4282, ce qui est nettement inférieur à la quantité estimée dans les extraits précédents.

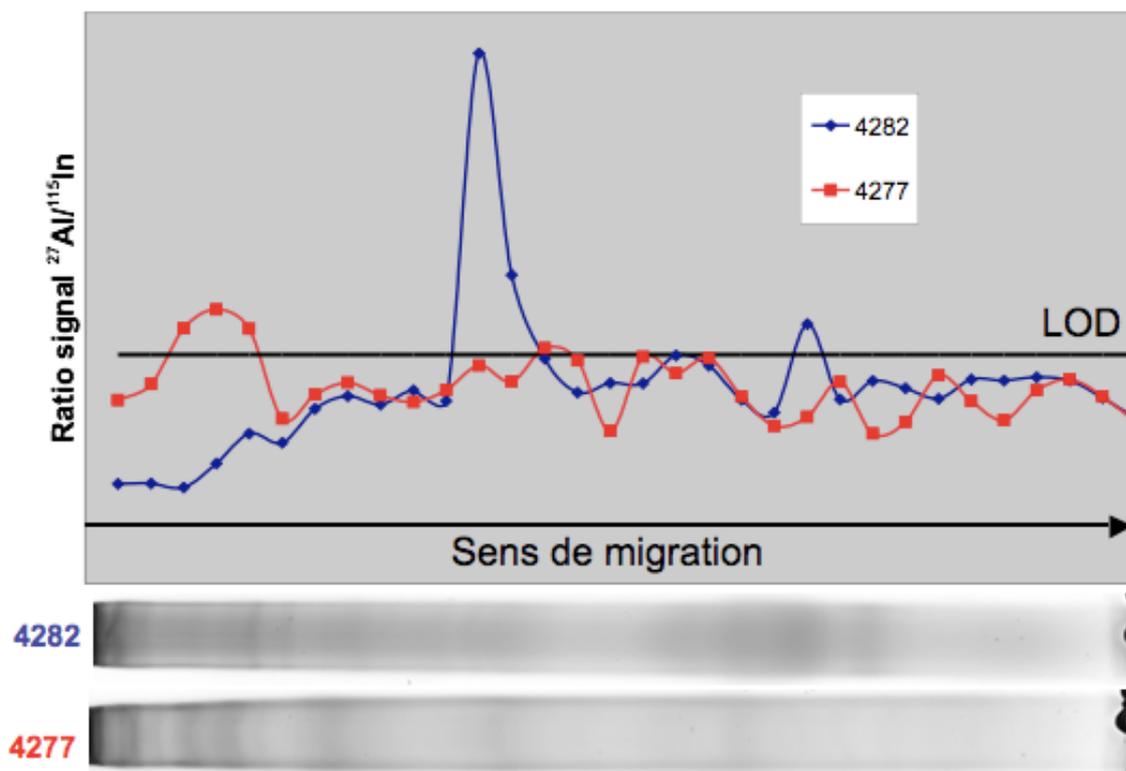


Figure 3.29 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gel HrCN-PAGE 14%.

Dépôt de 400 μg de protéines sur gel HrCN-PAGE 14%. Coloration CBB. Détection de l'aluminium par ICP-MS dans les différentes fractions de 2 mm après élution dans 500 μl de solution de NH_4OAc 10 mM, 0,1% SDS. Le signal de ^{27}Al a été normalisé par ^{115}In (étalon interne à 1 ppb). La LOD indiquée sur le graphe a été déterminée à partir de la découpe d'une piste de gel (fractions de 2 mm) sans protéine. Les deux profils métalliques correspondent aux protéines extraites de la muqueuse intestinale de deux rats (4282 et 4277) ayant ingéré de la kaolinite.

La coloration des gels au CBB met en évidence une hétérogénéité des deux extraits protéiques. De même les profils de détection de l'aluminium sont très différents. Le profil de l'échantillon 4282 est en accord avec celui obtenu précédemment sur le gel à 8%. La quantité de métal détecté pour l'échantillon 4282 est de l'ordre de 7,5 ng, en accord avec l'estimation de la quantité déposée sur le gel (8 ng).

Par contre, le profil métallique de l'échantillon 4277 est très différent de celui obtenu précédemment et la quantité d'aluminium détecté pour cet échantillon est très faible. Ces résultats mettent en évidence un problème de reproductibilité. Cependant, compte tenu du fait que lors de l'étude de mélanges simples, la séparation sur gel et le profil métallique étaient

reproductibles, ce problème ne semble pas être lié à la nature du gel ni à la méthode d'analyse mais plutôt à une mauvaise reproductibilité de l'extraction, à la quantité trop faible de protéines déposées pour que l'aluminium soit quantifiable ou à la complexité des échantillons. Ainsi, une des perspectives de ce travail sera de s'attacher à la résolution de ce problème. Nous avons poursuivi l'analyse et tenté d'identifier les protéines présentes dans les éluats contenant de l'aluminium. Une digestion en milieu liquide suivie d'une analyse par nanoLC-ESI-MS/MS s'est révélée infructueuse. Nous avons alors décidé de déposer le contenu des éluats contenant de l'aluminium sur un gel SDS-PAGE. La coloration au nitrate d'argent a révélé de nombreuses bandes protéiques pour chaque éluat mettant en évidence une grande complexité protéique (non montré). Ces bandes ont été excisées et les protéines identifiées par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS. Un grand nombre de protéines ont été identifiées dans les éluats contenant de l'aluminium (tableau 3.19). Parmi celles-ci, la sérotransferrine et l'albumine ont été identifiées pour les éluats issus de l'échantillon 4282. Ces protéines ont été décrites pour leur capacité à lier l'aluminium (Nagaoka et Maitani, 2005 ; Sadler et al., 1994).

Fractions	Protéines identifiées
4277/3	Angiotensin converting protein, IgG heavy chain, Aminopeptidase N, Malate deshydrogenase, Hydroxyacyl coenzyme A, HSP70, AcetylcoA deshydrogenase, Fructose biphosphate aldolase, Gluthatione S transferase, Aldehyde deshydrogenase, Fumarate hydratase, Transketalase, Carboxypeptidase, Dipeptyl peptidase, PDI.
4277/4	Proprotein convertase, Chloride chanel calcium, Aminopeptidase N, Alpha enolase, IgG haevy chain, Fructose di phosphate aldolase, PDI, Carboxypeptidase, Microsomale Triglyceride Transporter, Malate deshydrogenase, Acetyl coA deshydrogenase, Gluthatione S transferase, HSP70.
4277/5	IgG heavy chain, Dihydrolipoyl deshydrogenase, Carboxypeptidase, Microsomal Triglyceride Transporter, Fructose diphosphate aldolase, Protein C, Alpha enolase.
4282/12	Albumin, Serotransferrin, γ actin, Dipeptidase, Leukocyte elastase inhibitor, HSP70, Dermcidin, Malate deshydrogenase, Elongation factor 2, Aldo keto reductase, Gluthatione S transferase, Carbonic anhydrase, PDI, Citrate synthase, Fructose di phosphate aldolase, Purine nucleoside phopshorylase.
4282/13	γ actin, Dipeptidase, Leukocyte elastase inhibitor, Selenium binding protein 2, Malate deshydrogenase, Carbonic anhydrase, Gluthatione S transferase, Purine nucleoside phosphorylase, Latexin, Fructose diphosphate aldolase, PDI, Ornithine aminotrasnferase.
4282/22	Calnexin, PSDM1, Serine protease inhibitor, Leukocyte elastase, Carboxyl esterase, Gluthatione S Transferase, Triosephosphate isomerase.

Tableau 3.19 : Liste des protéines identifiées dans les éluats contenant de l'aluminium.

Les numéros de fractions indiquent l'échantillon et le numéro d'éluat (cf figure 3.29).

Bien qu'aucune conclusion n'ait pu être tirée, compte tenu de la complexité protéique, sur l'identification des protéines liées à l'aluminium dans ces échantillons, ces résultats étaient néanmoins encourageants car ils montraient la faisabilité d'identifier des protéines après une succession d'étapes HrCN-PAGE / élution passive / SDS-PAGE.

A partir de données récentes de la littérature ayant montré la capacité de la focalisation isoélectrique en conditions natives à séparer des protéines en conservant les métaux associés (Chevreux et al., 2009), nous avons alors initié une stratégie de séparation bidimensionnelle en conditions natives, qui combine une première dimension de séparation par focalisation isoélectrique en conditions natives et une seconde dimension par électrophorèse sur gel HrCN-PAGE.

V.2 Séparation par électrophorèse bidimensionnelle en conditions natives

Compte tenu du problème d'hétérogénéité des échantillons, ce sont les mêmes extraits protéiques qui ont été utilisés pour l'analyse HrCN-PAGE 14% précédente et pour l'analyse bidimensionnelle. La première dimension a été réalisée sur des bandelettes de gels de gradient de pH préformé (3-10). Afin de conserver la structure native des protéines, aucun agent dénaturant ou réducteur n'a été utilisé. Contrairement au protocole utilisé par Chevreux et al. (2009), après une réhydratation active à 50V, l'ajout de papier imprégné d'une solution d'acide phosphorique 1 M et de soude 1 M au niveau de l'anode et de la cathode, respectivement, a été nécessaire pour la création d'un champ électrique suffisant pour la migration. En effet, sans cet ajout, la limite de 50 μ A par gel était atteinte dès 4V.

Afin d'imposer une charge négative aux protéines, les bandelettes ont été incubées en présence de déoxycholate de sodium avant la deuxième dimension sur HrCN-PAGE 14%. La concentration en déoxycholate de sodium a été portée à 0,5%, correspondant à la concentration dans le tampon de charge utilisé en électrophorèse monodimensionnelle sur gel HrCN-PAGE. La migration a ensuite été réalisée comme précédemment. Les résultats sont présentés sur la figure 3.30.

Nous pouvons observer une différence entre les deux profils électrophorétiques des deux échantillons analysés (figure 3.30.1A et 2A). De même, les profils métalliques sont différents (figure 3.30.1B et 2B). Ainsi, l'hétérogénéité des échantillons mise en évidence lors de l'analyse précédente se confirme avec cette nouvelle analyse. Néanmoins, la détection de

l'aluminium après élution des protéines des gels bidimensionnels est cohérente avec les résultats obtenus sur les gels monodimensionnels HrCN-PAGE 14%. En effet, pour l'échantillon 4282, les fractions contenant de l'aluminium sont situées au milieu du gel (fractions 3 et 4 sur figure 3.30.2B) et, pour l'échantillon 4277, elles sont situées dans le haut du gel (fractions 1 et 2 sur figure 3.30.1B). Par ailleurs, l'estimation de la quantité d'aluminium récupéré dans les éluats est de l'ordre de 15 ng pour les deux échantillons. Ces résultats sont en accord avec l'estimation de la quantité d'aluminium déposé (20 ng pour 1 mg de protéine déposée).

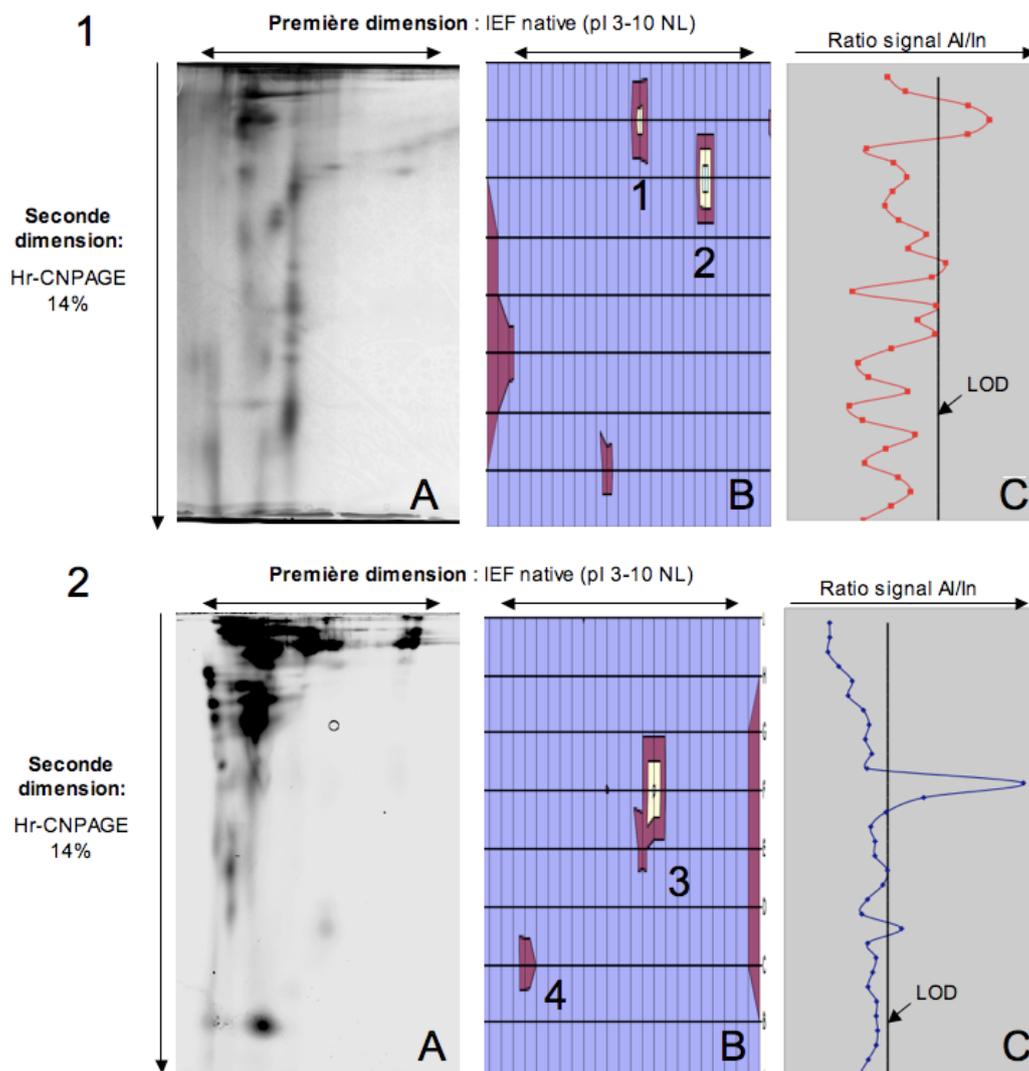


Figure 3.30 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gels natifs 2D. Dépôt de 1 mg protéines extraites des échantillons 4277 (1) et 4282 (2).

Première dimension : IEF native bandelette pI 3-10. Seconde dimension : gel HrCN-PAGE 14%

A : Coloration CBB, **B :** Profil de détection de l'aluminium par ICP-MS dans les éluats d'un gel non coloré et découpé en petits morceaux (10 x 2 mm), **C :** Rappel du profil obtenu en électrophorèse monodimensionnelle sur gel HrCN-PAGE 14%. L'intensité du signal de l'aluminium dans les éluats a été calculée comme suit : ratio du signal de ^{27}Al sur le signal de ^{115}In auquel est soustraite la LOD (calculée à partir de la découpe d'un morceau (10 x 2 mm) de gel témoin sans protéine. En B les cases colorées en bleu ont un signal inférieur à la LOD.

Les éluats contenant de l'aluminium ont été concentrés et déposés sur gel SDS-PAGE. Seules quelques bandes étaient visibles après coloration à l'argent (non montré), indiquant une complexité protéique moins importante que pour les éluats obtenus à partir des gels monodimensionnels. L'excision de ces bandes, leur digestion et l'analyse par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS n'a malheureusement pas permis d'identifier toutes les protéines contenues dans ces bandes (quantité de matériel insuffisante). Néanmoins, l'identification de quelques unes d'entre-elles a été réalisée (tableau 3.20).

Échantillon	Zone	Protéines identifiées	Identifiée sur gel 1D 14%
4277	1	angiotensin converting enzyme	Oui
	2	aucune identification	
4282	3	albumin γ actin cytokeratin 4	Oui Oui Non
	4	dystroglycan cytokeratin 4	Non Non

Tableau 3.20 : Identification des protéines présentes dans les éluats des gels 2D contenant de l'aluminium puis redéposés sur gel SDS-PAGE. Les numéros correspondent aux zones indiquées dans la figure 3.30. La dernière colonne indique si les protéines ont également été identifiées à partir des gels monodimensionnels HrCN-PAGE 14% (cf tableau 3.18).

Parmi les protéines identifiées à partir des gels bidimensionnels en conditions natives, trois ont également été identifiées à partir des séparations monodimensionnelles précédentes sur HrCN-PAGE 14%. Pour deux d'entre-elles, des données de la littérature indiquent une interaction possible avec des éléments métallique.

Dans l'échantillon 4277, l'enzyme de conversion de l'angiotensine a été identifiée dans la fraction 1 du gel bidimensionnel et dans la fraction 3 du gel monodimensionnel. Cette protéine, également connue sous le nom de peptidyl-dipeptidase A, est une glycoprotéine de 184 kDa et contient deux atomes de zinc dans sa structure. Elle est retrouvée dans de nombreux tissus dont l'intestin au niveau de la bordure en brosse (Naim, 1992). Cette enzyme catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, qui, sous la forme octapeptide, est un agent vasoconstricteur. Aucune étude n'a mis en évidence une fixation de l'aluminium par cette protéine mais le cobalt et le cadmium peuvent être fixés au niveau des sites du zinc (Bicknell et al., 1987, Carvalho et al., 1995). Par contre, il a été montré une réduction de l'activité de cette protéine, pour l'isoenzyme testiculaire, après exposition à une forte concentration en aluminium (Guo et al., 2002).

Dans l'échantillon 4282, l'albumine a été identifiée dans la fraction 3 du gel bidimensionnel et dans une des fractions du gel monodimensionnel. Cette protéine de 66 kDa est connue pour sa capacité à transporter un grand nombre d'éléments dont les métaux, tel que l'aluminium (Zatta et al., 2003 ; Harris, 1996). Par ailleurs, par analyse par RMN, il a été montré que 3 ions Al^{3+} pouvaient se lier à l'albumine au niveau des sites de fixation du calcium (Jemil et al., 1992).

VI Conclusion

Afin de mettre en évidence des protéines pouvant lier l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat suite à l'ingestion de kaolinite, nous avons mis au point une stratégie analytique centrée sur l'utilisation de l'électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Le travail de validation de notre stratégie a abouti à des résultats prometteurs. Notre étude montre que les gels HrCN-PAGE sont préférables aux gels BN-PAGE et CN-PAGE. Par ailleurs, notre protocole d'élution passive s'est avéré très satisfaisant pour la détection et la quantification des éléments métalliques liés à des protéines modèles. Enfin, nous avons démontré que la conservation des éléments métalliques au sein de protéines modèles après électrophorèse sur gel HrCN-PAGE atteint les 100%. De plus, pour des mélanges peu complexes, une séparation sur gel monodimensionnel est suffisante et permet une localisation de métalloprotéines, ainsi que la caractérisation du métal associé.

Par contre, pour des échantillons plus complexes, les résultats obtenus à ce jour sur les extraits de muqueuse intestinale n'ont pas permis d'atteindre notre objectif initial. En effet, sur les gels monodimensionnels, la complexité protéique n'a pas permis d'identifier les protéines liant l'aluminium, tandis que pour les gels bidimensionnels, la faible quantité de protéines n'a permis qu'un faible taux d'identification. Rappelons également que nos échantillons étaient très hétérogènes et présentaient une faible concentration en aluminium.

Néanmoins, grâce à notre stratégie analytique, nous avons pu détecter quelques fractions contenant de l'aluminium dans des échantillons biologiques complexes. De plus, l'identification de deux protéines pouvant lier l'aluminium, l'albumine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, est encourageante et démontre la faisabilité de notre approche pour une analyse métalloprotéomique. Les gels HrCN-PAGE peuvent être envisagés en alternative ou en complément d'autres techniques de séparation (chromatographie liquide et électrophorèse capillaire).

Chapitre IV

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre les effets de la géophagie par l'étude de la complémentation en kaolinite de l'alimentation de rats soumis à différents régimes alimentaires. L'ensemble des approches utilisées a permis de mettre en évidence des effets notables aussi bien sur la prise alimentaire que sur la morphologie de l'intestin et sur le protéome de la muqueuse intestinale.

En parallèle, ce travail a également permis de développer une stratégie pour l'étude des protéines liant des éléments métalliques, réalisable dans notre laboratoire, par séparation électrophorétique en conditions non dénaturantes, élution passive des protéines et détection des éléments métalliques par ICP-MS.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre au point des conditions expérimentales adaptées :

- (1) pour l'étude comparative du protéome de cellules intestinales de rats,
- (2) pour la recherche de protéines liant des éléments métalliques dans des échantillons protéiques complexes.

Apport de l'analyse protéomique différentielle pour l'étude de la géophagie

Dans l'introduction de ce manuscrit, nous avons présenté différentes études s'intéressant au comportement d'espèces animales vis-à-vis de la géophagie. L'ingestion volontaire de sols, constitués en grande partie d'argile, est observée chez de nombreuses espèces animales dans de nombreuses régions du globe et pour de multiples raisons. De par la nature physico-chimique particulière des argiles, notamment leur grande capacité d'adsorption, la consommation de celles-ci présente un intérêt pour l'animal notamment pour limiter les effets négatifs d'une alimentation riche en substances néfastes pour l'organisme (alcaloïdes, tanins, microorganismes pathogènes et leurs toxines), ou pour soigner des troubles intestinaux. De plus, l'utilisation d'argile, ou de zéolite, en complément alimentaire améliore les rendements en production animale.

Cependant, l'impact et le devenir des argiles dans l'organisme après ingestion ont été peu étudiés. Ainsi notre étude a proposé, par une combinaison d'approches de physiologie, de microscopie et de protéomique, de répondre à ce questionnement scientifique.

Nos collaborateurs du DEPE (IPHC) ont mis en évidence une consommation spontanée et volontaire d'argile par l'animal alors qu'une source nutritionnelle lui est pourtant apportée en quantité non limitée. Cette consommation d'argile n'affecte pas la prise de poids de l'animal par contre, celle-ci semble faciliter l'assimilation des nutriments, et notamment des lipides.

De plus, les résultats indiquent que l'organisme tend à limiter cette assimilation en adaptant sa surface d'absorption au niveau intestinal ou en réduisant son apport en nutriments.

Grâce aux analyses protéomiques différentielles, nous avons mis en évidence une modification de l'expression de protéines du cytosquelette ou impliquées dans la dynamique de celui-ci. Ces résultats sont à mettre en lien avec les observations microscopiques de la muqueuse intestinale et démontrent que cette adaptation au niveau protéique induit une modification au niveau morphologique. De plus, la méthode employée (séparation des protéines sur gels bidimensionnels) nous a permis de révéler un clivage spécifique de la cytokératine 8 suite à une complémentation en kaolinite durant 28 jours.

Au cours de l'expérience de réalimentation après un jeûne prolongé, jusqu'à un stade où les réserves lipidiques sont très atténuées, des protéines liées au métabolisme des lipides sont surexprimées suite à l'ingestion de kaolinite. Parmi celles-ci, l'augmentation de l'expression de l'apolipoprotéine AIV, protéine impliquée dans le transport des triglycérides et jouant un rôle de facteur de satiété dans l'organisme, permet d'expliquer en partie la diminution de la prise alimentaire des rats au cours de cette expérience.

Par ailleurs, l'altération des particules de kaolinite engluées dans le mucus intestinal et la libération d'aluminium absorbé par les entérocytes posent cependant des questions sur l'impact de l'ingestion de kaolinite. En effet, ce métal est connu pour être responsable de nombreux troubles pour l'organisme (neurodégénérescence, déminéralisation osseuse). Dès lors, les bénéfices sur l'organisme liés à la consommation de kaolinite doivent être mis en confrontation avec ce risque potentiel.

Mon travail de thèse a apporté des éléments nouveaux dans l'étude des effets de l'ingestion d'argile en complémentation alimentaire chez le rat et des perspectives peuvent être envisagées aussi bien au niveau du type d'argile utilisé qu'au niveau des effets physiologiques liés leur ingestion.

Nous avons réalisé cette étude avec une kaolinite commerciale (Argiletz) qui, en raison d'une hétérogénéité liée aux différents sites de prélèvement, peut présenter une hétérogénéité dans sa composition (taille, structure, impuretés). De plus des analyses par diffusion des rayons X réalisées récemment par nos partenaires du projet ANR (Pr Jocelyne Brendle, IS2M, Département des Matériaux à Porosité Contrôlée, Mulhouse) ont montré que la kaolinite utilisée pour notre étude contenait également de l'illite et du quartz.

Ainsi, il semble essentiel de poursuivre ces travaux avec des argiles synthétiques de composition connue (kaolinite et montmorillonite) et de l'étendre à des zéolites synthétiques. Cet axe est au coeur du projet ANR ARZERI en cours et deux composés synthétiques, la silicalite (MFI-type zéolithe) et l'Amadeite®, fournis par nos partenaires mulhousiens, viennent d'être testés en complémentation alimentaire après un jeûne prolongé. D'autres composés tels que la faujasite ou la TMAZ® sont en cours de synthèse et vont être testés début 2011.

Les effets de ces différents matériaux seront étudiés par la même approche combinée (histologie/microscopie/protéomique) que celle nous avons entreprise pour la kaolinite et seront complétés par d'autres analyses. Il est notamment prévu d'étudier les effets sur la motricité digestive et le contrôle par le système nerveux entérique par électrophysiologie sur des organes isolés (étude réalisée par le Dr Fabielle Angel, IPHC-DEPE). En effet, le cerveau est capable de moduler la motricité et les sécrétions du tube digestif en fonction des différents stimuli qu'il reçoit. Il est donc intéressant d'étudier cet axe cerveau-intestin. Il est également prévu d'étudier le devenir des matériaux en interaction avec la muqueuse intestinale et de réaliser des analyses physico-chimiques de matériaux ayant été ingérés (étude réalisée par le Dr Nicole Liewig, IPHC, DEPE). Enfin, l'appareil digestif fonctionnant en étroite collaboration avec la flore intestinale, l'étude de l'impact de l'ingestion des différents matériaux sur cette communauté pourrait également être envisagée.

En parallèle, des études sont prévues chez le porc vigile. Les premiers travaux (réalisés par le Dr Charles Henri Malbert, INRA, Rennes) ont porté sur les effets d'une complémentation en kaolinite à différents niveaux : comportement alimentaire, vidange de l'estomac et histologie de la muqueuse intestinale. A ce jour aucun effet n'a pu être observé chez les porcs ayant eu un régime enrichi en kaolinite commerciale. D'autres composés synthétiques sont en cours d'évaluation.

Développement d'une stratégie analytique pour la recherche de protéines liant des éléments métalliques

Afin de définir le devenir de l'aluminium contenu dans la kaolinite, nous avons souhaité mettre en place une stratégie analytique permettant de caractériser les protéines liant cet élément au niveau intestinal.

Dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, nous avons présenté les stratégies et les méthodes utilisées pour l'analyse protéomique et métallogprotéomique. Parmi les méthodes employées pour l'analyse de complexe protéine/métal, nous avons privilégié l'utilisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes pour la séparation des protéines et la spectrométrie de masse ICP-MS pour la détection des éléments métalliques.

Dans un premier temps, un travail de développement analytique a été réalisé pour permettre l'application de cette stratégie dans notre laboratoire. En effet, ne disposant pas de module d'ablation laser couplé à l'ICP-MS, l'élution passive des protéines après séparation par électrophorèse sur gel était nécessaire. Nous avons sélectionné une solution d'élution passive permettant d'éluer les protéines avec un bon rendement (pouvant atteindre jusqu'à 74%), tout en restant compatible avec la détection élémentaire par spectrométrie de masse ICP-MS.

Dans un deuxième temps, ce travail a permis de démontrer que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide HrCN-PAGE était préférable aux séparations sur gels BN-PAGE et CN-PAGE pour la détection de métallogprotéines par spectrométrie de masse. De plus, nous avons montré que cette méthode de séparation était tout à fait envisageable en complément ou en substitution d'une méthode de séparation par chromatographie d'exclusion stérique pour l'étude de protéines liant les métaux par liaison non covalente.

Nous avons également montré que l'utilisation de l'électrophorèse sur gel HrCN-PAGE monodimensionnel était possible pour la séparation, la détection et l'identification de métallogprotéines dans un mélange peu complexe. Cette unique séparation n'est cependant pas suffisante pour l'identification de métallogprotéines dans des mélanges plus complexes.

Enfin, pour la recherche de protéines liant l'aluminium dans l'intestin de rat ayant consommé de la kaolinite, nous avons employé une stratégie combinant une séparation par focalisation isoélectrique en conditions natives et une séparation par électrophorèse sur gel HrCN-PAGE.

Les résultats obtenus à ce jour, bien que n'ayant pas permis d'atteindre l'objectif initial, sont encourageants et démontrent la faisabilité de notre stratégie.

Les problèmes majeurs ont été l'importante hétérogénéité des individus et la faible quantité d'aluminium dans les échantillons de muqueuse intestinale. Pour les prochaines expériences, il semble indispensable de sélectionner plusieurs échantillons présentant une forte concentration en métal, de travailler sur un pool d'échantillons plutôt qu'à l'échelle individuelle et de faire un pré-fractionnement avant les électrophorèses en conditions non dénaturantes. Ce pré-fractionnement devrait permettre de ne déposer sur les gels d'électrophorèse qu'une fraction protéique enrichie en métal. Il pourrait être effectué par chromatographie d'exclusion stérique couplée à l'ICP-MS.

Par ailleurs, comme nous l'avons exposé dans le chapitre II, d'autres méthodes de détection d'élément métallique sont utilisées pour la détection de protéines liant les métaux dans un gel d'électrophorèse. Certaines méthodes sont plus rapides et ne nécessitent pas d'étape d'élution, source de perte et/ou de contamination. Mais ces méthodes sont également plus coûteuses à mettre en place. Il serait donc intéressant de comparer ces différentes méthodes à l'aide de protéines modèles séparées sur gels HrCN-PAGE. Plus particulièrement, une comparaison de la sensibilité de notre méthode par rapport à des analyses LA-ICP-MS et PIXE devrait être réalisée.

Enfin, avec les méthodes analytiques employées dans notre stratégie, il y a peu de limites concernant la nature de l'élément métallique à détecter et l'analyse d'échantillons protéiques d'origine variée est réalisable (après optimisation des conditions d'extraction). Ainsi, ce travail pourrait être valorisé dans d'autres thématiques et permettre de répondre à de nouveaux questionnements biologiques. A titre d'exemple, nous avons eu l'occasion d'appliquer notre stratégie à des échantillons protéiques issus de la bactérie *Herminimonas* cultivée en absence ou en présence d'arsenic. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Florence Ploetze (UMR 7156, Institut de Botanique, Strasbourg). Les résultats préliminaires obtenus à ce jour nous confortent dans la poursuite de ce travail. En effet, on observe sur la figure 4.1 un profil de séparation sur gel HrCN-PAGE 8% très satisfaisant, malgré la complexité de l'extrait protéique, ainsi qu'un profil en arsenic significatif. Ceci illustre l'intérêt que peut avoir la stratégie que nous avons développée au cours de cette thèse.

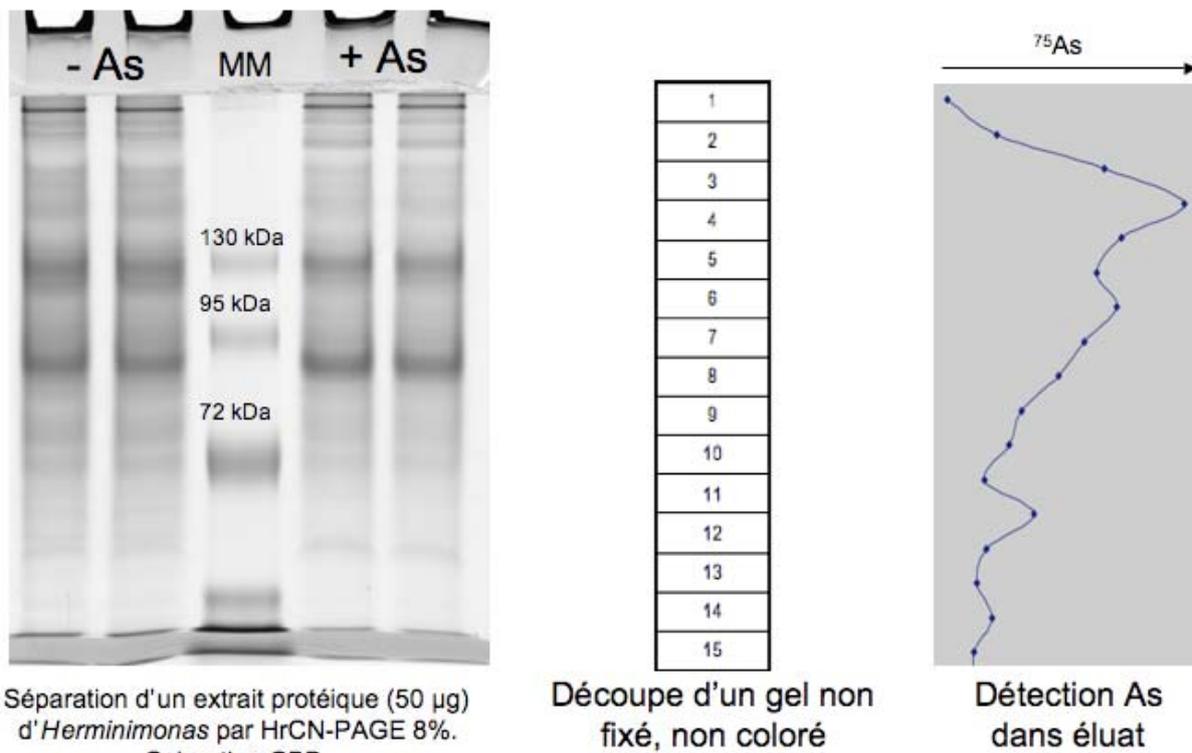


Figure 4.1 : Recherche de protéines liant l'arsenic dans un extrait protéique issu d'une culture bactérienne. Dépôt de 50 µg de protéines extraites d'une culture de *Herminimonas* réalisée en absence ou en présence d'arsenic. Séparation sur gel HrCN-PAGE 8%. Coloration CBB (à gauche) ou découpe d'un gel non coloré en fractions de 2,5 mm pour élution passive dans 10 mM NH₄HCO₃ 0,1% SDS et analyse par ICP-MS (à droite). MM : marqueurs de poids moléculaires.

Chapitre V

Matériels et Méthodes

I Expérimentation animale

Afin de mieux comprendre les effets de la complémentation alimentaire en argile sur la physiologie animale ou sur la morphologie et le protéome de la muqueuse intestinale, l'utilisation d'animaux modèles est nécessaire.

Notre choix s'est porté sur le rat et plus spécifiquement sur l'espèce Wistar. Couramment utilisé lors d'études en laboratoire, le modèle murin présente une propriété particulièrement intéressante : il possède un système digestif semblable à celui de l'Homme.

Les différentes études réalisées durant mes travaux de thèse ont permis d'étudier l'effet d'un type d'argile, la kaolinite, en complémentation au cours de quatre expériences :

- (1) complémentation *ad libitum* sur 28 jours
- (2) complémentation *ad libitum* durant la réalimentation après un jeûne prolongé
- (3) complémentation *ad libitum* au cours d'une restriction alimentaire
- (4) complémentation avec des quantités d'argile imposées

I.1 Animaux

I.1.1 Conditions d'hébergement

Des rats mâles de souche Wistar (Charles Rivers, Lyon, France) ont été installés pour toute la durée des expériences dans des cages individuelles situées dans une pièce à environnement contrôlé ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, 50-60% d'humidité, cycle jour/nuit de 12h avec une période diurne de 08h à 20h). Afin de récupérer chaque jour tous les fragments non ingérés d'argile et de nourriture et de minimiser la coprophagie, le sol des cages a été équipé d'une grille métallique. Les animaux ont eu un accès continu à l'eau (eau du robinet) et variable à la nourriture selon les conditions expérimentales. Des granules standard A03 (UAR, Epinay-sur-Orge, France) composées de 23% (% en masse) de protéines, 51,1% d'hydrates de carbone, 4,3% de lipides, 4% de cellulose, 5,6% de minéraux, et 12% d'eau ont été utilisées. Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux ont été répartis aléatoirement dans les différents groupes expérimentaux.

Dans les trois premières expériences, la nourriture et l'argile ont été données dans des pots séparés et complétés chaque jour d'expérience. Ainsi les animaux disposaient quotidiennement de plus de 100 g de croquettes (excepté dans les expériences de jeûne et de restriction alimentaire où les apports de nourriture étaient limités) et environ 50 g de kaolinite. Les consommations de croquettes et de kaolinite sont indiquées en g/j et en % de complémentation (masse d'argile ingérée par rapport à la masse solide totale ingérée

quotidiennement). Les pourcentages moyens de complémentation volontaire présentés dans notre étude prennent en compte les consommations en argile du premier au dernier jour de chaque expérience.

Dans la quatrième expérience, la kaolinite a été mélangée aux croquettes pour obtenir une concentration finale de 2% ou 5 % dans les croquettes. Les animaux disposaient quotidiennement de plus de 100 g de croquettes.

I.1.2 Suivi des animaux

Afin de suivre l'évolution de la masse corporelle de chaque animal, ainsi que l'eau, la nourriture et l'argile consommées et excédentaires ($\pm 0,1$ g), des pesées à heure fixe (entre 8h et 9h) ont été réalisées quotidiennement.

I.1.3 Méthodes d'euthanasie

Tous les animaux ont été euthanasiés à la fin des expériences. Lors des deux premières expériences (complémentation 28 jours et réalimentation après un jeûne), les euthanasies ont été effectuées par décapitation consécutive à un choc crânien (concussion). Lors de deux dernières expériences (restriction alimentaire et quantité d'argile fixée à 2% et 5%), les euthanasies ont été effectuées par décapitation consécutive à une anesthésie à l'isoflurane, selon les recommandations du Comité Régional d'Ethique en matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (C.R.E.M.E.A.S.) (numéro d'agrément : AL/03/12/05/08).

I.2 Argile

L'argile (kaolinite) présentée aux animaux est une argile commerciale (Argiletz, Lisy-sur-Ourcq, France). Elle a été préparée sous forme de blocs de taille centimétrique proche de celle des croquettes de nourriture standard. Pour réaliser ces blocs, la poudre de kaolinite a été mélangée avec de l'eau distillée, puis la pâte obtenue a été étalée sur une épaisseur de 1 à 2 cm dans un moule plat et séchée dans un four à $38 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant au moins 2 jours pour former une masse compacte qui a ensuite été débitée en morceaux.

Pour la quatrième expérience, le mélange croquette/argile a été élaboré par la société Safe (Augy, France) par le processus de fabrication suivant : mélange des ingrédients (95% ou 98% de granules A03 + 5% ou 2% de kaolinite) à froid pendant 3 heures, puis granulation sans vapeur avec passage dans la filière à $65-75^\circ\text{C}$ pendant 10 secondes et refroidissement à température ambiante pendant 12 heures.

Une caractérisation de l'argile utilisée dans notre étude a été réalisée par Jocelyne Brendle, de l'Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse (IS2M). La composition chimique de

l'argile a été définie par une analyse par spectrométrie de fluorescence X. L'argile utilisée est composée de SiO₂ 55,9 % (m/m), Al₂O₃ 39,6% (m/m), K₂O 2.3% (m/m), Fe₂O₃ 1,0% (m/m), MgO 0,5% (m/m) et TiO₂ 0,2% (m/m). Une analyse par diffraction des rayons X a également révélée une contamination de la kaolinite par de l'illite et du quartz.

I.3 Régimes alimentaires des différents groupes expérimentaux.

I.3.1 Complémentation *ad libitum* sur 28 jours

Les effets d'une complémentation libre en kaolinite sur le long terme ont été abordés au cours d'une expérience dont la durée totale a été fixée à quatre semaines (28 jours) comme cela avait déjà été fait dans des études antérieures de complémentation (Grosicki et Kowalski, 2003).

Cette expérience a été menée sur des rats pesant 350 ± 5 g au début de l'expérimentation. Deux groupes ont été considérés : un groupe témoin dont les animaux ont été alimentés avec de la nourriture standard *ad libitum* (n = 5) et un groupe test pour lequel les animaux (n = 10) ont été alimentés avec de la nourriture standard *ad libitum* et une complémentation *ad libitum* en kaolinite. Les animaux ont été euthanasiés au bout de 28 jours.

I.3.2 Complémentation *ad libitum* durant la réalimentation consécutive à un jeûne prolongé

Après avoir atteint précisément une masse de 380 ± 2 g, avec une nourriture standard, les animaux ont été mis à jeun jusqu'à l'entrée en phase III (P3) puis ont été réalimentés jusqu'au retour à leur masse initiale de 380 g avant d'être euthanasiés.

L'entrée des animaux dans les trois phases du jeûne a été déterminée par le calcul de la perte de masse corporelle spécifique quotidienne dM/Mdt (g/kg/jour) (dM représente la perte de masse durant $dt = t_1 - t_0$ et M est la masse corporelle à t_0) (Belkhou et al., 1991). Typiquement et en présence d'eau, les rats mâles de souches Wistar pesant 380 g lors de la mise à jeun atteignent le début de P3 en environ 9 jours et à la masse de 250 g.

Ces expérimentations ont satisfait aux « Principes de soins aux animaux » (publication n° 86-23), révisée en 1985 du NIH (National Institute of Health) et avec la législation courante (L87-848) sur l'expérimentation animale en France. Les critères utilisés pour arrêter le jeûne des groupes en P3 ont été : la perte de masse corporelle (>30%), l'augmentation de l'activité locomotrice diurne, l'érection des poils, et 2 jours consécutifs de vitesse accrue de la perte de masse corporelle.

Les animaux ont ensuite été réalimentés selon 2 protocoles :

Expérience RéaA : Deux groupes ont été constitués à partir de l'entrée en P3 : le premier a été réalimenté avec une nourriture standard donnée *ad libitum* (NF, n = 9) et le second avec une nourriture standard et de la kaolinite, tous deux données *ad libitum* (KaoA, n = 9). Les animaux des deux groupes ont eu des durées de jeûne similaires (9 ± 1 jours).

Expérience RéaB : Deux groupes ont été constitués successivement : le premier a été réalimenté avec une nourriture standard et de la kaolinite, toutes deux données *ad libitum* (KaoB, n = 7), et le second avec une quantité de croquettes réduite, égale uniquement à la quantité moyenne ingérée par les animaux complémentés du groupe KaoB (NF-, n = 13). Les animaux des deux groupes ont eu des durées de jeûne similaires (9 ± 1 jours).

1.3.3 Complémentation *ad libitum* au cours d'une restriction alimentaire

Les rats ont été sélectionnés pour l'expérience dès que leur masse a atteint précisément 380 g. La durée de complémentation a été fixée à 14 jours avant euthanasie des animaux. Quatre groupes ont été différenciés sur deux séries successives. Les deux premiers groupes ont été nourris *ad libitum* avec une alimentation standard donnée soit sans complémentation (NF14, n = 6) soit avec de la kaolinite *ad libitum* (Kao14, n = 6). Les deux derniers groupes ont été traités dans un second temps et ont reçu seulement 75% de la quantité moyenne de croquettes ingérée par les animaux du groupe NF14, l'un sans complémentation (NF14(-), n = 6) et l'autre avec de la kaolinite donnée *ad libitum* (Kao14(-), n = 6).

1.3.4 Complémentation avec des quantités d'argile imposées

Les rats ont été sélectionnés pour l'expérience dès que leur masse a atteint précisément 300 g. La durée de complémentation a été fixée à 28 jours avant euthanasie des animaux. Quatre groupes ont été différenciés sur deux séries successives. Dans les deux séries, un groupe a été nourri *ad libitum* avec une alimentation standard (n = 6) et l'autre groupe d'une série a été nourri avec un mélange croquette/kaolinite contenant 5% ou 2% en masse d'argile (n = 7 ou 8, respectivement).

II Origine des réactifs

Le Tris (sous forme Tris base) provient d'Euromedex (Mundolsheim, France). L'acide acétique (AcOH), l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide formique, l'acide trifluoroacétique (TFA), l'acide aminocaproïque, l'acétonitrile (ACN), le méthanol, l'urée, la thiourée, le 3-[3-cholamidopropyl]diméthylammonio]-propanesulfonate CHAPS, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le deoxycholate de sodium, l'octylglucoside, le Triton X100, l'acide ethylènediaminetetraacétique (EDTA), l'acétate d'ammonium, le bicarbonate d'ammonium, le glycérol, le bleu de bromophénol, le rouge Ponceau, le Tween X100, l'albumine de sérum de bœuf (BSA), le tampon phosphate salin (PBS), l'agarose, le sulfate d'ammonium, la solution à 30% d'acrylbisacrylamide (ratio 37,5 :1), les anticorps primaires anti β actine et les anticorps secondaires anti IgG de souris proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). Les anticorps primaires anti Apo-AIV et les anticorps secondaires anti IgG de lapin proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Le dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide, la glycine, la tricine, le persulfate d'ammonium (APS), le tetramethylethylènediamine (TEMED), les ampholytes porteurs Bio-Lytes (40%), les bandelettes de gradient de pH préformé, le bleu de Coomassie (CBB) G250 et l'huile minérale proviennent de Bio-Rad (Munich, Allemagne). Le cocktail d'inhibiteurs de protéases utilisé lors de l'optimisation et des expériences 1 et 2 provient de Roche Diagnostics (Mannheim, Allemagne). Pour les expériences 3 et 4, le cocktail d'inhibiteurs de protéases provient de Sigma-Aldrich (St Louis, USA). La trypsine « Sequencing Grade » provient de Promega (Madison, USA). Le kit ECL provient de GE Healthcare (Little Chalfont, UK). L'acide phosphorique provient de VWR (West Chester, USA). Le lait écrémé est commercialisé par Régilait (Saint Martin Belle Roche, France). L'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) provient de Bruker Daltonics (Brême, Allemagne). L'acide nitrique (HNO₃) suprapur provient de Merck (Darmstadt, Allemagne). Les solutions étalons de métaux proviennent de CPI International (Santa Rosa, USA).

La solution de marqueurs de poids moléculaire provient de Fermentas Life Sciences (Burlington, Canada). Les dix protéines (non renseignées par le fournisseur) constituant ce mélange couvrent des masses moléculaires comprises entre 11 et 170 kDa.

L'eau ultrapure est obtenue à partir d'eau osmosée par passage sur des résines échangeuses d'ions QPack® de Millipore (Billerica, USA). Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau ultrapure.

III. Analyse protéomique différentielle

Afin de définir quelles protéines de la muqueuse intestinale sont affectées par la prise de kaolinite en complémentation alimentaire, nous avons entrepris une étude globale du contenu protéique de la muqueuse intestinale par une analyse protéomique différentielle.

Brièvement, après prélèvement de la muqueuse intestinale, les protéines sont extraites et séparées par électrophorèse bidimensionnelle selon leurs caractéristiques intrinsèques : leur pH isoélectrique (pI) et leur masse.

À partir des cartes protéiques obtenues pour différentes conditions, une analyse différentielle permet de définir les protéines dont l'accumulation cellulaire est significativement modifiée.

Ces protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF ou nanoLC-ESI-MS-MS.

III.1 Préparation des échantillons

III.1.1 Prélèvement de la muqueuse intestinale

Après euthanasie des rats, le jéjunum, partie centrale de l'intestin grêle, est rapidement prélevé (quelques centimètres) puis celui-ci est rincé à l'eau physiologique et nettoyé à l'aide d'un pinceau pour éliminer les résidus de nourriture et d'argile. La muqueuse intestinale est ensuite récupérée en grattant avec une lame de verre afin de la séparer de la couche musculaire fine *muscularis mucosae* puis rapidement congelée dans de l'azote liquide, et stockée à -80°C.

III.1.2. Extraction et solubilisation des protéines intestinales

Afin d'optimiser l'extraction et la solubilisation des protéines contenues dans la muqueuse intestinale, différents protocoles ont été testés et ont été présentés en détail dans le chapitre résultats (première partie, I.1). Nous ne présenterons ici que le protocole optimisé.

La muqueuse intestinale (environ 100 mg) est broyée à froid (tube placé dans N₂ liquide) et à sec à l'aide d'un Mikro-dismembrator (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne). Environ 20 mg (50 mg lors de l'optimisation du protocole) de la poudre obtenue sont repris dans 200 µl de tampon d'extraction (7 M urée, 2 M thiourée, 4% (p/v) CHAPS, 20 mM Tris/HCl pH 8, inhibiteurs de protéases). L'extraction et la solubilisation des protéines ont été réalisées, pour l'optimisation et les expériences 1 et 2, par trois cycles successifs d'agitation vigoureuse (30 secondes vortex) et sonication (5 minutes dans un bain à ultrasons) avec conservation des échantillons 30 minutes dans la glace entre chaque cycle. Pour les expériences 3 et 4, l'extraction et la solubilisation des protéines ont été réalisées par quatre cycles de sonication

(5 secondes à l'aide d'une sonde à ultrasons, puissance 30%) et agitation (15 minutes à 4°C) puis ont été centrifugés (10000g, 4°C, 30 min).

Les protéines sont ensuite précipitées à l'acétone (1 volume de tampon pour 9 volumes d'acétone) une nuit à -20°C.

Le lendemain après centrifugation (10000g, 4°C, 30 min) le culot est récupéré et les protéines sont solubilisées dans 200 µl de tampon d'extraction.

III.1.3. Dosage des protéines

Pour garantir une bonne analyse différentielle des gels, il est indispensable de déposer une quantité identique de protéines lors de la première dimension. Le dosage systématique des protéines est donc nécessaire avant chaque dépôt. Nous avons utilisé la méthode de dosage des protéines de Bradford (Bradford, 1976) modifiée par l'ajout d'HCl. Afin de minimiser les volumes de réactifs et d'échantillons employés, le dosage est réalisé en microplaque de 96 puits.

La gamme étalon est réalisée à partir de sérum albumine bovine à des concentrations comprises entre 0,01 µg/µl et 0,07 µg/µl dans de l'eau ultrapure. Nous avons vérifié qu'il n'était pas nécessaire de réaliser la gamme étalon dans le tampon d'extraction compte tenu de la dilution des échantillons (1/100 ou 1/200^{ème}).

2 µl d'HCl 1 M sont déposés préalablement dans les puits de la microplaque. Le dosage s'effectue sur 100 µl d'étalon ou d'échantillon dilué auxquels sont rajoutés 100 µl de réactif Protein Assay dilué au 2/5^{ème} dans de l'eau (Bio-Rad, Munich, Allemagne). Le mélange est homogénéisé par aspiration/refoulement dans les puits.

Après 30 min d'incubation à température ambiante (durée optimale pour la linéarité de la gamme étalon), l'absorbance est lue à 595 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tecan, Sunrise™, Männedorf, Switzerland).

III.2 Electrophorèse bidimensionnelle et analyse différentielle

III.2.1 Focalisation isoélectrique

La première étape de l'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer les protéines selon leur pI. Toutes les analyses ont été réalisées sur des bandelettes de gradient de pH préformé de 17 cm et dans un Protean IEF Cell (Bio-Rad, Munich, Allemagne).

Le tableau 5.1 récapitule les différences de conditions de focalisation isoélectrique au cours des différentes expériences.

Expérience	Optimisation	1 Complémentation 28 jours	2 Réalimentation	3 Restriction	4 Complémentation 28 jours 2 et 5%
Quantité de protéine déposée	200 et 400 µg	300 et 600 µg	500 µg	500 µg	700 µg
Gradient de pH	3-10 NL	5-8 linéaire	5-8 linéaire	4-7 linéaire	5-8 linéaire

Tableau 5.1 : Quantité déposée de protéines et gamme de pH utilisée au cours des différentes expériences.
NL : gradient de pH non linéaire.

Le tampon de focalisation isoélectrique est le tampon d'extraction auquel est rajouté extemporanément 20 mM de DTT, 0,2% (p/v) d'ampholytes porteurs (Bio-Lytes 3-10) et 0,005% (p/v) de bleu de bromophénol.

Ce mélange est placé dans une rigole du plateau d'isofocalisation sur lequel est déposée une bandelette. Puis le tout est recouvert de 2 ml d'huile minérale.

Après une réhydratation active sous une tension de 50V, une nuit à 20°C, la focalisation isoélectrique est réalisée à 20°C selon les conditions suivantes :

Montée linéaire à 200V en 1h

Montée linéaire à 1000V en 1h

Montée linéaire à 5000V en 10h

Palier à 5000V jusqu'à atteindre 80000Vh

Puis palier à 500V jusqu'à l'arrêt.

Les bandelettes sont soit directement utilisées pour la deuxième dimension, soit congelées à -20°C.

III.2.2 Réduction alkylation

Afin que les protéines migrent uniquement selon leur poids moléculaire dans le gel SDS-PAGE utilisé lors de la deuxième dimension, il est nécessaire que celles-ci soient totalement dénaturées. Cette étape permet donc de dénaturer les protéines, de réduire les ponts disulfure par du DTT et de bloquer leur reformation par alkylation des cystéines.

Les bandelettes sont placées successivement 30 minutes dans une solution de base (6M urée, 2% (p/v) SDS, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 20% (p/v) glycérol) à laquelle sont rajoutés 2% (p/v) de DTT, puis 30 minutes dans la solution de base contenant 2,5% (p/v) d'iodoacétamide. Après un rapide rinçage à l'eau ultrapure, les bandelettes sont placées deux minutes avant dépôt sur les gels SDS-PAGE dans du tampon de migration [25 mM Tris/HCl pH 8,8 (optimisation et expériences 1 et 2) ou 25 mM Tris base (expériences 3 et 4), 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS contenant 0,0005% (p/v) bleu de bromophénol].

III.2.3 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Toutes les électrophorèses en conditions dénaturantes ont été réalisées sur des gels de polyacrylamide à 10%, permettant la séparation des protéines de poids moléculaires compris entre 17 et 170 kDa.

La solution de marqueurs de poids moléculaire est déposée sur un papier absorbant (papier 3MM CHR, Whatman, Maidstone, Angleterre) placé à côté de la bandelette.

Les bandelettes sont déposées sur les gels de polyacrylamide (10% acrylamide/bisacrylamide, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,05% (p/v) APS et 0,05% (v/v) de TEMED) et scellées avec une solution d'agarose à 0,5 % (p/v) dans le tampon de migration décrit ci-dessus.

La migration est réalisée à l'aide d'un Protean II XL (Bio-Rad, Munich, Allemagne) sous une intensité constante de 16 mA/gel pendant 30 minutes puis de 32 mA/gel durant un temps déterminé par la migration du bleu de bromophénol (durée moyenne : 5 heures).

Après démoulage des gels, les protéines sont fixées 30 minutes dans une solution aqueuse de fixation (45% (v/v) méthanol, 5% (v/v) acide acétique) puis détectées par coloration au bleu colloïdal [0,12% (p/v) CBB, 10% (v/v) acide phosphorique, 10% (p/v) sulfate d'ammonium, 20% (v/v) méthanol] pendant 3 jours. Puis la décoloration des gels est effectuée par une succession de bains d'eau ultrapure. La fixation, la coloration et la décoloration sont réalisées sous agitation (100 rpm) à température ambiante.

III.2.4 Analyse différentielle

Les gels obtenus sont scannés sur un densitomètre Bio-Rad GS-800TM et analysés par le logiciel PDQuest (version 8.0.1 build 055, Bio-Rad, Munich, Allemagne).

La sélection du gel de référence est effectuée par le logiciel. Une détection automatique des spots est réalisée, puis celle-ci est complétée manuellement par une analyse minutieuse des gels pris séparément. Après comparaison, les spots présents sur au moins (n-1) gels d'un même groupe d'analyse ont été conservés pour l'analyse statistique.

Pour la suite de l'étude, différents critères ont permis de sélectionner les spots d'intérêt (tableau 5.2).

Expériences	1	2, 3 et 4
Tests statistiques	Test de Student ($p < 0,05$)	Test de Student ($p < 0,05$) suivi d'un test ANOVA ($p < 0,05$)
Seuil de variation minimum	≥ 2	$\geq 1,5$
Autres critères	Contrôle visuel	Contrôle visuel

Tableau 5.2 : Critères de sélection des spots dont l'intensité varie significativement.

L'ensemble des spots variant significativement sont excisés manuellement à l'aide d'un embout de pipette (Pipetman) coupé à la taille de chaque spot (expériences 1, 2 et 4) ou à l'aide d'un robot gel cutter (Proteineer SP, Bruker Daltonics) (expérience 3) et les protéines contenues dans ces spots sont digérées et analysées par spectrométrie de masse.

III.3 Identification des protéines par spectrométrie de masse

III.3.1 Digestion in-gel des protéines

L'enzyme utilisée dans nos études est la trypsine. Un prétraitement des spots a été réalisé soit manuellement, soit à l'aide d'un robot de pré-digestion (MassPREP Station, Waters, Manchester, Angleterre). Les spots sont tout d'abord lavés 2 fois 10 minutes dans un mélange ACN/ NH_4HCO_3 25 mM (1:1) afin d'éliminer le colorant. Cette étape est suivie d'une déshydratation des spots par l'ACN pendant 5 minutes avant une étape de réduction par 50 μl de DTT (10 mM dans une solution de NH_4HCO_3 25 mM) 1h à 60°C. 50 μl d'une solution d'iodoacétamide à 55 mM dans une solution de NH_4HCO_3 25 mM sont ensuite ajoutés. Cette étape d'alkylation dure 20 minutes et se réalise à température ambiante. Les spots sont ensuite lavés par 100 μl d'une solution de NH_4HCO_3 25 mM et déshydratés par de l'ACN.

7 μl de trypsine à 12,5 ng/ μl sont ajoutés et la digestion enzymatique in-gel s'effectue à 37°C durant une nuit.

Les peptides générés sont extraits par ajout de 10 μl d'une solution aqueuse de 60% (v/v) d'ACN et 1% (v/v) d'acide formique, par sonication pendant 15 minutes et agitation 1 heure à température ambiante. L'excès d'ACN est éliminé par centrifugation sous vide (SpeedVac) pendant 20 à 30 minutes en évitant l'évaporation totale. Puis le volume de chaque puits est ajusté à 10 μl avec une solution aqueuse de TFA à 0,1%.

III.3.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les rapports m/z des peptides générés par digestion enzymatique sont mesurés à l'aide d'un spectromètre de masse Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) en mode réflectron, situé au LSMBO (IPHC-DSA, Strasbourg).

La matrice utilisée est l'HCCA préparée comme suit : une solution saturée de HCCA dans une solution aqueuse à 50% (v/v) d'ACN est diluée au tiers dans une solution aqueuse à 50% (v/v) d'ACN et 0,1% (v/v) de TFA.

0,7 μ l d'échantillon ou de standards sont mélangés à 0,7 μ l de matrice directement sur la cible (Polished Steel, Bruker Daltonics) selon la technique de la goutte séchée. Le mélange est séché à température ambiante et pression atmosphérique avant d'être rincé par une solution de TFA à 0,1%.

La solution de standards utilisée est un mélange commercialisé par Bruker Daltonics (Bruker Peptide Calibration Standard) composé de 7 peptides : bradykinin 1-7 ($m/z=757,400$), human angiotensin II ($m/z=1046,542$), human angiotensin I ($m/z=1296,685$), substance P ($m/z=1347,735$), bombesin ($m/z=1619,822$), renin ($m/z=1758,933$), ACTH 1-17 ($m/z=2093,087$) et ACTH 18-39 ($m/z=2465,199$)

Au niveau du paramétrage du spectromètre de masse, la tension appliquée à la source est de 25kV et celle appliquée au réflectron est de 26 kV. La valeur de l'extraction retardée est fixée à 110 ns afin d'obtenir la meilleure résolution sur les peptides servant à la calibration. Le laser utilisé est un laser à azote (337 nm) travaillant à une fréquence de 20 Hz. L'acquisition des données est réalisée dans une gamme de m/z comprise entre 400 et 4000, la valeur de suppression de matrice étant fixée à 500. Le spectromètre est étalonné avec une tolérance de 10 ppm avant chaque série d'analyse à l'aide de la solution de standards. Avant de valider la calibration, la vérification sur 100 tirs (puissance du laser ajusté pour éviter la saturation du signal) de la résolution isotopique (supérieure à 6000) et du rapport signal/bruit (compris entre 500 et 2000) de chaque étalons est réalisée. La vérification des performances de l'appareil est réalisée avec 10 fmol d'une solution de GluFibrinoPeptide (résolution isotopique de l'ion 1570,68 Da supérieure à 12 000).

Les spectres de masse obtenus sont analysés par le logiciel FlexAnalysis 2.4 build 11 (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) utilisant les paramètres par défaut et l'algorithme SNAP pour la détection du pic isotopique.

III.3.3 Analyse nanoLC-MS/MS

Les analyses nanoLC-MS/MS sont réalisées à l'aide d'un système nanoLC-ChipCube (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) couplé à une trappe ionique HCT Plus (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Ces équipements sont situés au LSMBO (IPHC-DSA, Strasbourg).

Le système Chip intègre une pré-colonne d'enrichissement de 4 mm x 75 µm (phase inverse C18 Zorbax, 5µm, 300Å), une colonne de séparation de 43 mm x 75 µm (phase inverse C18 Zorbax, 5µm, 300Å) et l'aiguille nanospray. La Chip est placée dans le cube fixé au spectromètre de masse.

L'échantillon est chargé sur la pré-colonne à l'aide de la phase mobile A (2% ACN, 0,1% acide formique) à un débit de 3,75 µl/min pendant 3 minutes. La séparation des peptides est réalisée à un débit de 300 nl/min avec un gradient en phase mobile B (98% ACN, 0,1% acide formique) de 8% à 40% en 7 minutes.

La trappe ionique opère en mode électrospray positif. La tension appliquée à l'extrémité extérieure du capillaire de transmission est réglée entre -1600 et -1800V afin que l'intensité soit stable et supérieure à 40 nA. La tension du skimmer est fixée à 40V. L'étalonnage est réalisé à l'aide du mélange « TuneMix » G2431A (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). L'acquisition des données se fait selon un programme de basculement automatique du mode MS au mode MS/MS (tableau 5.3). Ce programme sélectionne les trois peptides doublement ou triplement chargés ayant les signaux les plus intenses avec une fenêtre d'acquisition de 4 Da afin de les fragmenter. La rampe d'énergie utilisée pour la fragmentation est de 1,5V dont l'amplitude varie de 30 à 200%.

Acquisition des données	MS	MS/MS
Gamme de m/z analysée	250 - 2500	50 - 2800
Vitesse d'acquisition (m/z par seconde)	8100	26000
Quantité d'ions dans la trappe	100000	300000
Temps d'accumulation maximale (ms)	200	
Nombre de balayages par spectre	4	6

Tableau 5.3 : Paramètres d'analyse MS et MS/MS

Le système est piloté par le logiciel EsquireControl 5.3 Build 11 (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Les données obtenues au cours de l'analyse sont traitées et converties en liste de masse (fichiers mgf, Mascot Generic Format) par le logiciel DataAnalysis 3.3 Build 146 (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Le bruit de fond est soustrait selon l'algorithme de Savitzky Golay avec une largeur de lissage de 0,2 m/z pour 1 cycle et un seuil de 60000. Les

fichiers mgf ainsi générés sont ensuite exploitables par des logiciels de recherche dans les banques de données.

Les performances de l'appareil sont vérifiées avant chaque série d'analyse avec l'injection de 1 µl de digest tryptique de BSA à 50 fmol/µl. En mode MS, deux ions caractéristiques (722,33 m/z et 464,25 m/z) sont étudiés. L'intensité du courant d'ions sur les chromatogrammes doit être supérieure à 10^7 et $0,5 \cdot 10^7$, la largeur à mi-hauteur doit être inférieure à 0,3 et 0,4 minute et la résolution isotopique doit être supérieure à 2500 et 1800 respectivement pour l'ion 722,33 m/z et 464,25 m/z. Enfin les deux pics doivent être séparés d'au moins 3,5 minutes. En mode MS/MS, le taux de recouvrement de la BSA doit être supérieur à 35% après traitement des données et identification par le moteur de recherche Mascot.

III.3.4 Identification des protéines dans les banques de données

Dans les expériences 1 et 4, seul le moteur de recherche Mascot a été utilisé. Dans l'expérience 2, nous avons utilisé en complément du moteur de recherche Mascot, le logiciel Open Mass Spectrometry Search Algorithm (OMSSA) (Geere et al., 2004). Les paramètres utilisés pour la recherche sont les mêmes quel que soit le moteur de recherche (tableau 5.4). Par contre, ces deux moteurs de recherche utilisant des algorithmes de recherche différents, une grande confiance dans les identifications peut être obtenue pour les protéines identifiées par les deux moteurs de recherche.

Les résultats de l'identification des protéines à l'aide du moteur de recherche Mascot, sont associés à une valeur appelée « score » (S) qui est reliée à la probabilité (P) que la correspondance entre la liste de valeurs expérimentales et celle obtenue théoriquement avec la base de données soit aléatoire : $S = -10 \cdot \log(P)$. Si le score excède le seuil de confiance de 95% ($p < 0,05$), l'identification de la protéine est significative. En analyse MS, la valeur du score dépend de la taille de la base de données interrogée, du pourcentage de recouvrement de séquence de la protéine et du nombre de peptides qui ont permis son identification. Pour l'analyse MS/MS, la valeur du score prend également en compte la masse la séquence des peptides ainsi que le bruit de fond.

Le moteur de recherche OMSSA, utilisé pour l'analyse des données MS/MS, attribue une E-value représentant la probabilité que l'association des spectres expérimentaux et théoriques soit due au hasard selon l'hypothèse que la distribution du nombre d'ions fragments théoriques et expérimentaux issu d'un ion parent expérimental suit une loi de Poisson. La moyenne de la distribution dépend de la tolérance sur la masse des ions fragments, du nombre

de pics expérimentaux et théoriques, et de la masse du peptide parent considéré. Le score est ensuite exprimé sous la forme $-\log(\text{E-value})$.

Paramètres	MALDI-TOF-MS	NanoLC-MS/MS
Type de recherche	Peptide mass fingerprint	MS/MS ion search
Taxonomie	<i>Rattus norvegicus</i>	
Enzyme	Trypsine	
Modification variable	Acétylation des protéines en Nt, Carbamidométhylation des cystéines et oxydation des méthionines	
Valeurs de masse	Monoisotopique	
Masse protéine	Non restreinte	
Tolérance sur la masse des peptides	± 50 ppm	± 0,3 Da
Tolérance sur la masse des fragments	/	± 0,3 Da
État de charge des peptides	+1	+1, +2, +3
Maximum de coupure oublié	1	
Type d'instrument	/	ESI-TRAP

Tableau 5.4 : Paramètres de recherche dans les banques de données.

Une stratégie « Target Decoy » (Elias et Gygi, 2007) a été également employée. Cette stratégie nécessite l'utilisation d'une banque de données particulière composée des séquences des principaux contaminants d'origine humaine, des séquences peptidiques cibles (target) de l'organisme *Rattus norvegicus* (NCBI) et des séquences « leurres » (séquences peptidiques cibles inversées). Cette création de banques a été réalisée avec un logiciel développé en interne au LSMBO (IPHC-DSA, Strasbourg). Grâce à l'utilisation de la banque de données « Target-Decoy » et du logiciel Scaffold (version Scaffold_2_06_01, Proteome Software Inc., Portland, USA), il est possible d'affiner les paramètres pour l'identification des protéines. En effet, les seuils de scores peptidiques (« Ion score -Identity score » pour les résultats Mascot et $-\log(\text{E-value})$ pour les résultats OMSSA) sont optimisés de façon à obtenir un taux de faux positifs inférieur à 1%.

III.4 Western Blot

Afin de confirmer la variation de l'apolipoprotéine A-IV après ingestion d'argile au cours d'une phase de réalimentation après un jeûne prolongé (expérience 2), nous avons entrepris une analyse par Western Blot. Cette analyse a également été réalisée pour les expériences 3 et 4.

Cette technique permet de révéler et quantifier la présence d'une protéine par utilisation d'anticorps spécifiques de celle-ci après transfert des protéines sur une membrane. La préparation des échantillons pour cette analyse est identique à la préparation des échantillons pour l'analyse protéomique différentielle (voir III.1). Les protéines sont séparées sur un gel

SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les protéines d'intérêt sont révélées par deux anticorps : le premier (anticorps primaire) est très spécifique de la protéine d'intérêt, le deuxième (anticorps secondaire) est spécifique de l'anticorps primaire et est couplé à une enzyme permettant, après ajout de réactifs, la visualisation de la protéine d'intérêt (dans notre cas, l'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase).

III.4.1 Electrophorèse sur gels SDS-PAGE et transfert sur membrane

Cette analyse a été effectuée sur cinq échantillons de chaque groupe de l'expérience 2 (RéaA et RéaB) et sur l'ensemble des échantillons pour les expériences 3 et 4 (restriction et 2 et 5%). 40 µg de protéines intestinales extraites comme précédemment (III.1.2) sont dilués au ½ dans du tampon de Laemmli 2X (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 40% (p/v) glycerol, 4% (p/v) SDS, 0,1% (p/v) DTT, 0,025% (p/v) Bleu de bromophénol) et sont chauffés 5 minutes à 95°C.

L'électrophorèse est réalisée sur des gels de polyacrylamide constitués d'un gel de concentration (4% acrylamide/bisacrylamide ; 125 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) APS ; 0,01% (v/v) TEMED) et d'un gel de séparation (10% acrylamide/bisacrylamide ; 375 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) APS ; 0,01% (v/v) TEMED). Le tampon de migration est constitué de 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. La migration s'effectue à l'aide d'un MiniProtean III (Bio-Rad, Munich, Allemagne) sous voltage constant : 20V/gel pendant 30 minutes puis 75V/gel durant un temps déterminé par la migration du bleu de bromophénol.

Dès la fin de la migration, les gels sont démoulés et rincés rapidement dans la solution de transfert (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0,0375 % (p/v) SDS et 20% (v/v) méthanol). Le gel est ensuite placé sur la membrane de nitrocellulose (Protran, Whatman, Dassel, Allemagne) (préincubée au moins 10 minutes dans le tampon de transfert) entre deux papiers Whatman 3M dans une cassette de transfert (Mini Trans-Blot, Bio-Rad, Munich, Allemagne). Le transfert se réalise sur la nuit à 4°C (280 mA pendant 15 minutes puis 100 mA) dans le tampon de transfert.

La qualité du transfert est vérifiée par la coloration des membranes au rouge Ponceau (5 minutes dans une solution contenant 0,1% (p/v) de rouge Ponceau dans 1% acide acétique). Les protéines sont visualisées après décoloration par plusieurs bains d'eau ultrapure. Les membranes sont ensuite totalement décolorées par une solution de PBS.

III.4.2 Immunodétection

Toutes les solutions mentionnées dans ce paragraphe sont réalisées dans une solution de PBS contenant 0,05% (p/v) de Tween 100 et notées PBS/Tween.

Afin de limiter les interactions non spécifiques, les membranes sont incubées 1 heure dans une solution de lait écrémé à 5% (p/v) dans du PBS/Tween avant d'être incubées pendant 2 heures avec l'anticorps primaire (dilué selon les indications mentionnées dans le tableau 5.4 dans une solution de PBS/Tween contenant 1% de lait écrémé). Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS/Tween puis incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire (dilué selon les indications mentionnées dans le tableau 5.5 dans une solution de PBS/Tween contenant 1% de lait écrémé).

Anticorps primaire	dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti Apo-AIV de lapin	1/500	Anti IgG de lapin	1/1000
Anti β Actine de souris	1/1000	Anti IgG de souris	1/10000

Tableau 5.5 : Dilution des anticorps pour l'analyse par Western Blot.

Après 3 rinçages de 10 minutes dans la solution de PBS/Tween, les protéines d'intérêt sont révélées par chimioluminescence à l'aide du kit ECL Western Blotting Analysis et du système d'acquisition Gene Gnome® (SynGene, Cambridge, Angleterre).

La membrane est placée sur le plateau de lecture et recouverte de 400 μ l de réactif chimioluminescent. Le logiciel d'acquisition (Gene Snap, version 6.07, SynGene) est paramétré pour réaliser 15 acquisitions de 1 minute (l'intensité du signal est ajoutée à chaque nouvelle acquisition) pour l'Apo A-IV et pour réaliser 10 acquisitions de 30 secondes pour l'actine β . L'image précédant l'image présentant une saturation du signal est conservée pour l'analyse. L'intensité du signal de chaque protéine est déterminée pour chaque échantillon à l'aide du logiciel Gene Tools (version 3.07, SynGene).

Pour la comparaison de chaque groupe, le signal de l'Apo A-IV de chaque échantillon est normalisé par le signal de la β Actine. Un test statistique d'analyse de la variance ANOVA est réalisé pour valider la variation d'intensité entre les différents groupes étudiés ($p \leq 0,05$).

IV. Analyse métallogprotéomique

Afin de mettre en évidence des protéines liant l'aluminium dans les extraits de muqueuse intestinale, une méthode alliant une séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et une détection des métaux par ICP-MS a été mise en place. Cette méthode a été validée par l'étude de la conservation métallique de protéines modèles et comparée à une méthode de chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS).

IV.1 Analyse de protéines modèles

Afin de valider notre stratégie, nous avons sélectionné des protéines de poids moléculaires variés et contenant des métaux différents (tableau 5.6).

Protéine	Référence*	Métal	MM
Catalase	C9322	Fe	232 kDa
Alcool deshydrogénase (ADH)	10127558001	Zn	141 kDa
Holo-Transferrine (HoloTf)	T4132	Fe	76 kDa
Superoxide dismutase (SOD)	86200	Cu, Zn	31 kDa
Anhydrase carbonique (AC)	C3934	Zn	29 kDa
Myoglobine	M1882	Fe	17 kDa
Hémoglobine	H2500	Fe	16 kDa
Sérum Albumine Bovine (BSA)	A4503	-	66 kDa

Tableau 5.6 : Protéines modèles utilisées pour l'évaluation de la stratégie analytique.

*Toutes les protéines proviennent de Sigma-Aldrich (St Louis, USA) sauf l'ADH provenant de Roche (Mannheim, Allemagne).

Chaque solution est préparée à 10 µg/µl dans un tampon contenant 750 mM d'acide aminocaproïque, 50 mM de Tris/AcOH pH 7 et des inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). Ces solutions sont stockées à -20°C.

IV.1.1 Électrophorèse en conditions non dénaturantes

Différentes méthodes d'électrophorèses en conditions non dénaturantes ont été évaluées au cours de ce travail de thèse. L'étude de la conservation des éléments métalliques liés à des protéines modèles a été réalisée après séparation par électrophorèse Blue Native PAGE (BN-PAGE), différents Clear Native PAGE (CN-PAGE) et par High resolution CN-PAGE (HrCN-PAGE).

Pour toutes les électrophorèses, 20 µl d'échantillon, additionnés de 5 µl de tampon de charge, sont déposés dans les puits du gel d'électrophorèse. La composition des gels, des tampons de migration et du tampon de charge est fonction de chaque catégorie de gels. Différentes adaptations de BN-PAGE ont été testées, notamment au niveau des détergents utilisés pour la

solubilisation des échantillons (tableau 5.7) et différents protocoles de CN-PAGE ont été réalisés (tableau 5.8). Toutes les électrophorèses sont réalisées à 4°C.

Pour les gels BN-PAGE, la migration s'est déroulée en 2 étapes. Dans un premier temps, 0,02% (p/v) de CBB a été additionné au tampon de cathode. L'électrophorèse se déroule à 20V/gel pendant 10 minutes puis à 100V/gel jusqu'à ce que le front de migration atteigne les 2/3 du gel. Dans un second temps, le tampon de cathode est remplacé par du tampon de cathode sans CBB et la migration est poursuivie à 100V jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel.

Pour le comparatif CN-PAGE/HrCN-PAGE, la migration est effectuée à 20V/gel durant 15 minutes puis 3 ou 5 heures à 100V/gel. Pour la suite des analyses sur HrCN-PAGE, différents voltages ont été utilisés en fonction de la réticulation des gels (tableau 5.9).

Réticulation du gel (% polyacrylamide)	8%	10%	12%	14%	16%
Conditions électrophorétiques pour 2 gels	20V pendant 30 minutes puis 20 heures à				
	50V	75V	100V	125V	150V

Tableau 5.9 : Conditions électrophorétiques utilisés pour les séparations sur gels HrCN-PAGE.

Après migration, les gels sont soit placés 30 minutes dans une solution aqueuse de fixation (45% (v/v) méthanol, 5% (v/v) acide acétique) et colorés par une solution de « bleu colloïdal » (voir II.2.3) afin de révéler la migration des protéines, soit directement coupés pour l'élution passive et la détection des éléments métalliques par ICP-MS. Pour l'élution passive des protéines, 500 µl d'acétate d'ammonium à 10 mM contenant 0,1% (p/v) de SDS sont ajoutés sur les morceaux de gels. L'élution passive se réalise à 37°C sans agitation durant une nuit.

	BN Standard	BN « Triton »	BN « Tris »	BN « Acétate »
Tampon échantillon	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/HCl pH 7 0,5 mM EDTA 0,1% (p/v) octylglucoside Inhibiteurs de protéases	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/HCl pH 7 1 mM EDTA 0,1% Triton X100 Inhibiteurs de protéases	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris pH 11,1 0,1% (p/v) octylglucoside Inhibiteurs de protéases	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/AcOH pH 7 0,1% (p/v) octylglucoside Inhibiteurs de protéases
Tampon de charge	0,75 M acide aminocaproïque 5% CBB			
Composition des gels	8% acrylamide/bisacrylamide 0,5 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/HCl pH 7 20% (p/v) glycérol			8% acrylamide/ bisacrylamide 0,5 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/AcOH pH 7 20% (p/v) glycérol
Tampon cathode	50 mM Tricine 15 mM Tris/HCl pH 7			50 mM Tricine 15 mM Tris/AcOH pH 7
Tampon anode	50 mM Tris/HCl pH 7			50 mM Tris/AcOH pH 7

Tableau 5.7 : Composition des différentes solutions utilisées pour les gels BN-PAGE.

	HrCN-PAGE	CN Tris base	CN Tris/Ac
Tampon échantillon	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/AcOH pH 7 Inhibiteur de protéases	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris pH 11,1 Inhibiteur de protéases	0,75 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/AcOH pH 7 Inhibiteur de protéases
Tampon de charge	0,1% (p/v) deoxycholate de sodium 10% (p/v) glycérol	10% (p/v) glycérol	
Composition des gels	acrylamide/ bisacrylamide* 0,5 M acide aminocaproïque 50 mM Tris/AcOH pH 7 20% (p/v) glycérol	8% acrylamide/ bisacrylamide 0,5 M acide aminocaproïque 50 mM Tris pH 11,1 20% (p/v) glycérol	8% acrylamide/ bisacrylamide 0,5 M acide aminocaproïque 50mM Tris/AcOH pH 7 20% (p/v) glycérol
Tampon cathode	50 mM Tricine 15 mM Tris/AcOH pH 7 0,05% (p/v) deoxycholate de sodium	50 mM Tricine 15 mM Tris pH 11,1	50 mM Tricine 15 mM Tris/AcOH pH 7
Tampon anode	50 mM Tris/AcOH pH 7	50 mM Tris pH 11,1	50 mM Tris/AcOH pH 7

Tableau 5.8 : Composition des différentes solutions utilisées pour les gels CN-PAGE/HrCN-PAGE.

* : le pourcentage d'acrylamide/bisacrylamide varie entre 8 et 16% en fonction des gels.

IV.1.2 Rendement d'éluion passive

La détermination du rendement protéique de l'éluion passive est réalisée par le dosage des protéines dans les éluats rapporté à la quantité de protéines déposées sur le gel (témoin dilué dans un même volume de tampon d'éluion). Ainsi, compte tenu des quantités maximales de protéines déposées sur les gels, la concentration maximale de protéines dans 500 µl d'éluat est de 0,2 µg/µl.

Les protéines sont dosées à l'aide du kit commercial DC Protein assay (Bio-Rad, Munich, Allemagne) et d'une gamme étalon de BSA de 0 à 0,25 µg/µl. Le fournisseur indiquant une limite de détection de 0,2 µg BSA/µl et une linéarité sur une gamme de concentration de 0,2 à 1,5 µg/µl, une adaptation du protocole a été réalisée pour pouvoir quantifier des concentrations inférieures à 0,2 µg/µl. Ainsi, le volume d'échantillon prélevé pour le dosage a été multiplié par 5 (soit 25 µl). Dans ces conditions, nous avons vérifié la linéarité de la loi de Beer Lambert pour des concentrations en protéines de 0,05 à 0,25 µg/µl.

IV.2 Analyse de la muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale a été prélevée de la même façon que pour l'analyse précédente (voir III.2.1) et broyée à froid dans un Mikro-dismembrator (Sartorius AG, Göttingen, Allemagne). Pour la séparation des protéines par BN-PAGE (deuxième partie des résultats, II.1), environ 50 mg de poudre ont été repris dans un tampon composé de 125 mM Tris/HCl pH 7, 1 mM EDTA, 0,1% octylglucoside et contenant des inhibiteurs de protéases. Pour la séparation des protéines par HrCN-PAGE et native IEF/HrCN-PAGE (deuxième partie des résultats, V) environ 50 mg de la poudre ont été repris dans 500 µl d'un tampon constitué de 750 mM acide aminocaproïque, 50 mM Tris/AcOH pH 7, inhibiteurs de protéases. Dans les deux cas, après quatre cycles de sonication (25 °C, 5 s)/agitation (4 °C, 15 min) avec conservation des échantillons 30 minutes dans la glace entre chaque cycle, les échantillons ont été centrifugés (10000g, 4 °C, 5 min). Les protéines contenues dans les surnageants ont été dosées par la méthode de Bradford (voir III.1.3) et conservées à -20°C.

IV.2.1 Focalisation isoélectrique en conditions non dénaturantes

La focalisation isoélectrique est réalisée à l'aide d'un Protean IEF Cell (Bio-Rad, Munich, Allemagne) à une température de 10°C.

Afin de conserver la structure native des protéines, aucun agent dénaturant ou réducteur n'est ajouté dans ce protocole. Ainsi, seuls les ampholytes porteurs à 0,2% (p/v) final sont ajoutés aux échantillons.

L'échantillon est placé dans une rigole du plateau d'isofocalisation sur lequel est déposée une bandelette de 7 cm de gradient linéaire de pH préformé (pH 5-8). L'ensemble est recouvert de 1 ml d'huile minérale.

Après une réhydratation passive d'une nuit, un papier (wicks) imbibé d'une solution d'acide phosphorique à 1 M est placé au niveau de l'anode et un papier imbibé d'une solution de soude à 1 M au niveau de la cathode. Une réhydratation active (50V) de 3 heures est réalisée avant le programme d'isofocalisation suivant :

Montée linéaire à 250V jusqu'à atteindre 100Vh

Montée linéaire à 4000V jusqu'à atteindre 2000Vh

Plateau à 4000V jusqu'à atteindre 12000Vh

Plateau à 500V jusqu'à l'arrêt.

Après la focalisation isoélectrique, les bandelettes sont soit directement utilisées pour la deuxième dimension, soit conservées à -20°C.

IV.2.2 Électrophorèse en conditions non dénaturantes

Pour la séparation bidimensionnelle en conditions non dénaturantes des protéines extraites de la muqueuse intestinale de rat, le protocole d'électrophorèse HrCN-PAGE a été utilisé pour la deuxième dimension. La réticulation du gel est de 14%.

Suite à la focalisation isoélectrique, les bandelettes sont placées dans le tampon de migration cathode, dans lequel la concentration en déoxycholate de sodium est augmentée à 0,5%, pendant 1 heure sous agitation. Ces bandelettes sont ensuite déposées sur un gel puis scellées avec une solution d'agarose à 0,5% (p/v) dans le tampon de migration. La migration s'effectue comme mentionné précédemment en IV.1.2.

Après migration, les gels sont soit fixés et colorés par du CBB afin de révéler la migration des protéines, soit directement découpés pour l'élution passive et la détection des éléments métalliques par ICP-MS.

IV.3 Détection métallique par ICP-MS

Les analyses ont été réalisées sur un ICP-MS équipé d'une cellule de collision de la marque Agilent Technologies (modèle 7500ce). L'instrument est entièrement piloté par le logiciel ICP-MS Chemstation (Version B.03.06). Les performances de l'appareil sont vérifiées (tableau 5.10), et optimisées si nécessaire, avant chaque utilisation à l'aide d'une solution « Tune » contenant 1 ppb de Li (m/z 7), Mg (m/z 24), Co (m/z 59), Y (m/z 89), Ce (m/z 140), et de Tl (m/z 205) dans de l'acide nitrique à 2% (v/v).

Mode d'analyse	No Gaz	Mode Hélium	Mode Hydrogène
Signal pour m/z 7	> 2000 cps		
Signal pour m/z 89	> 5000 cps	> 1000 cps	> 1000 cps
Signal pour m/z 205	> 2500 cps		
Taux d'oxyde (m/z 156/140)	<1%		
Taux de doublement chargé (m/z 140/70)	<3%		
Signal m/z 51		<10 cps	
Signal m/z 59		> 1000 cps	> 1000 cps
Signal m/z 78			<10 cps

Tableau 5.10 : Vérification des performances de l'ICP-MS.

Un dosage des éléments métalliques a été réalisé pour des étalons élémentaires (vérification de la compatibilité des tampons utilisés avec l'ICP-MS et étalonnage), pour les solutions initiales de protéines modèles et pour chaque éluat de gels natifs (toutes expériences sauf comparaison HrCN-PAGE et chromatographie d'exclusion stérique).

Compte tenu du débit d'introduction de l'ICP-MS, du volume mort des tubulures et du temps d'analyse, un volume minimum de 1 ml est nécessaire. Ainsi, dans chaque cas, 200 µl d'éluat sont prélevés sur les 500 µl disponibles et dilués au 1/6^{ème} dans une solution d'HNO₃ à 0,12% et 1,2 ppb In afin d'obtenir une concentration finale de 0,1% (v/v) de HNO₃ et de 1 ppb d'In. La gamme étalon de métaux est préparée dans le tampon d'éluat passive puis diluée comme les échantillons.

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant la cellule de collision en mode hélium.

Les données ICP-MS sont traitées par le logiciel Data Analysis de ICP-MS Chemstation (Version B.03.06) et exportées au format Excel. Le signal de ¹¹⁵In est utilisé pour la normalisation du signal des éléments analysés (étalonnage interne).

Lors de la comparaison des stratégies HrCN-PAGE et SEC, la détection de l'aluminium dans les éluats s'est réalisée par « flow injection » : injection de 60 µl d'éluat non dilué toutes les 30 secondes et passage d'une solution d'HNO₃ 0,1% entre chaque injection. L'acquisition du signal par ICP-MS s'est déroulée en mode chromatographie « time resolve ». Le traitement des données est réalisé par le module ICP-MS Chromatographic Software du logiciel ICP-MS Chemstation (version B.03.06).

IV.4 Identification des métalloprotéines

Pour les éluats contenant des éléments métalliques, les protéines ont été séparées par SDS-PAGE avant d'être identifiées par spectrométrie de masse.

Les protéines contenues dans 200 µl d'éluat sont concentrées par centrifugation sous vide (SpeedVac) dans un volume final de 10 µl auxquels sont ajoutés 10 µl de tampon de Laemmli 2X (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 40% (p/v) glycerol, 4% (p/v) SDS, 0,1% (p/v) DTT, 0,025% (p/v) bleu de bromophénol). Avant leur dépôt sur le gel, les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 5 minutes.

L'électrophorèse est réalisée sur des gels de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration (4% acrylamide/bisacrylamide ; 125 mM Tris/HCl pH 6,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) APS ; 0,01% (v/v) TEMED) et d'un gel de séparation (10% acrylamide /bisacrylamide ; 375 mM Tris/HCl pH 8,8 ; 0,1% (p/v) SDS ; 0,05% (p/v) APS ; 0,01% (v/v) TEMED). Le tampon de migration est constitué de 25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. La migration se réalise à l'aide d'un MiniProtean III (Bio-Rad, Munich, Allemagne) sous voltage constant : 20V/gel pendant 30 minutes puis 75V/gel durant un temps déterminé par la migration du bleu de bromophénol.

Les protéines sont ensuite fixées 30 minutes dans une solution aqueuse de fixation (45% (v/v) méthanol, 5% (v/v) acide acétique) et détectées par une coloration au nitrate d'argent.

Pour cette dernière, un protocole simplifié est utilisé : après fixation les gels sont lavés à l'eau ultrapure (3 fois 5 minutes), puis placés dans une solution de DTT (5 mg/l) pendant 20 minutes avant d'être mis dans la solution de nitrate d'argent à 0,1% (p/v). Les gels sont rapidement rincés à l'eau ultrapure avant d'être révélés par une solution de carbonate de sodium (3% (p/v)) et de formaldéhyde (0,06% (v/v)). La révélation est stoppée par une solution d'acide acétique à 10% (v/v). Les gels sont rincés à l'eau ultrapure avant d'être scannés. Les bandes sont rapidement prélevées et conservées à -20°C.

L'identification des protéines se déroule de la même façon que pour les analyses précédentes (voir III.3). L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par nanoLC-MS/MS (voir III.3.3).

IV.5 Etude de la conservation des interactions métal/protéine par analyse ESI-TOF-MS

Afin d'éliminer les molécules de SDS présentes dans les solutions de protéines modèles témoins et des protéines éluées des gels HrCN-PAGE, un traitement préalable a été réalisé. Les échantillons ont subi deux cycles d'échange de tampon (NH₄OAc 100 mM) par filtration sur gel (cutoff 1000 Da) (Zeba, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), puis une dialyse sur une nuit (Slide A Lyser, Pierce) avec une solution de NH₄OAc 100 mM.

Les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées sur un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT, Waters, Manchester, Royaume Uni) équipé d'une source nanoESI avec injection automatisée Triversa Nanomate (Advion Biosystem, Ithaca, NY, USA). Le système opère en mode positif. Une calibration externe est effectuée avec des ions multichargés produits par 2 µM de myoglobine de cœur de cheval dans un mélange eau/ACN (1:1) acidifié avec 1% d'acide formique. La masse moléculaire et l'intégrité des protéines ont tout d'abord été vérifiées dans des conditions dénaturantes en les diluant dans un mélange eau/ACN (1:1) acidifié avec 1% acide formique.

Les analyses en conditions non dénaturantes ont nécessité un paramétrage fin de l'instrument afin de trouver un compromis entre la désolvatation/transmission des ions à travers le spectromètre de masse et la préservation des interactions non-covalentes. L'optimisation concerne spécialement la tension d'accélération (V_c) appliquée sur le cône d'échantillonnage et la pression dans le premier étage de pompage du spectromètre de masse (P_i). La pression a

été fixée à 5 mbar et des acquisitions avec différentes tensions d'accélération ont été effectuées. Pour la superoxyde dismutase (SOD), une tension d'accélération de 50V a été choisie (tension à laquelle on n'observe pas de dissociation du dimère), tandis que pour l'anhydrase carbonique (AC), les meilleures conditions de transmission ont été obtenues avec une tension d'accélération de 40V. L'analyse des données a été effectuée avec le logiciel Masslynx 4.0 (Waters, Manchester, Royaume-uni).

IV.6 Méthodes chromatographiques

Pour cette analyse, les solutions de protéines ont été préparées dans un tampon 10 mM Tris/HCl pH 7,4.

Les chromatographies d'exclusion stérique ont été réalisées sur une chaîne Waters contrôlée par un système Waters 600S et équipée de pompes Waters 626, d'un dégazeur en ligne Gastorr BG-14 et d'un détecteur UV Waters 2487.

Une colonne de 30 cm x 4,6 mm TSK gel SW3000 (Tosoh, Tokyo, Japon), 4 μ m, 250Å a été utilisée. La phase mobile conseillée par le fabricant est la suivante : 0,1 M Na₂SO₄ dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,7. Pour des raisons de compatibilité avec l'ICP-MS, différentes compositions de phase mobile ont été utilisées (tableau 5.11).

Eluant	Composition
Métallo I	0,1 M Na ₂ SO ₄ dans un tampon phosphate 0,1M pH6,7
Métallo II	10 mM NH ₄ HCO ₃ *
Métallo III	50 mM NH ₄ HCO ₃ *
Métallo IV	100 mM NH ₄ HCO ₃ *
Métallo V	200 mM NH ₄ HCO ₃ *
Métallo VI	25 mM de Tris, 12,5 mM HCl et 20 mM KCl, pH 6,7
Métallo VII	25 mM de Tris, 12,5 mM HCl et 40 mM KCl, pH 6,7

Tableau 5.11 : Composition des phases mobiles testées pour l'analyse métalloprotomique par SEC.

* le pH de ces solutions a été ajusté à 6,7 avant utilisation avec de l'acide acétique.

Pour l'analyse élémentaire, un couplage en ligne SEC-ICP-MS a été réalisé. Pour compenser la différence de débit entre la sortie de la colonne (0,15 ml/min) et le débit d'entrée au niveau du nébuliseur (0,7 ml/min), une solution d'acétate d'ammonium (10 mM) et 0,1% (v/v) HNO₃ a été utilisée comme solution d'appoint.

L'acquisition du signal par ICP-MS s'est déroulée en mode chromatographie « time resolve ». Le traitement des données est réalisé par le module ICP-MS Chromatographic Software du logiciel ICP-MS Chemstation (version B.03.06).

Références bibliographiques

Abrahams, P. W. and J. A. Parsons. 1996. Geophagy in the tropics: A literature review. *Geographical Journal* 162:63-72.

Abrahams, P. W. 1999. The chemistry and mineralogy of three savanna lick soils. *Journal of Chemical Ecology* 25:2215-2228.

Ahrends, R., S. Pieper, A. Kuhn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, and M. W. Linscheid. 2007. A metal-coded affinity tag approach to quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 6:1907-1916.

Albengres, E., S. Urien, J. P. Tillement, P. Oury, S. Decourt, B. Flouvat, and K. Drieu. 1985. Interactions between smectite, a mucus stabilizer, and acidic and basic drugs. In vitro and in vivo studies. *Eur. J Clin Pharmacol* 28:601-605.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition.

Allardyce, C. S., P. J. Dyson, F. R. Abou-Shakra, H. Birtwistle, and J. Coffey. 2001. Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell system. *Chem. Commun.*2708-2709.

Altmann, G. G. 1972. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am. J. Anat.* 133:391-400.

Andrade, J., H. Zhao, B. Titus, S. T. Pearce, and M. Barroso. 2004. The EF-hand Ca²⁺-binding protein p22 plays a role in microtubule and endoplasmic reticulum organization and dynamics with distinct Ca²⁺-binding requirements. *Molecular Biology of the Cell* 15:481-496.

Andrews, P. L. R. and C. C. Horn. 2006. Signals for nausea and emesis: Implications for models of upper gastrointestinal diseases. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 125:100-115.

Aufreiter, S., R. G. V. Hancock, W. C. Mahaney, A. StambolicRobb, and K. Sanmugadas. 1997. Geochemistry and mineralogy of soils eaten by humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 48:293-305.

Babusiak, M., P. Man, J. Petrak, and D. Vyoral. 2007. Native proteomic analysis of protein complexes in murine intestinal brush border membranes. *Proteomics* 7:121-129.

Becker, J. S., S. Mounicou, M. V. Zoriy, J. S. Becker, and R. Lobinski. 2008. Analysis of metal-binding proteins separated by non-denaturing gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta* 76:1183-1188.

Becker, J. S., R. Lobinski, and J. S. Becker. 2009. Metal imaging in non-denaturing 2D electrophoresis gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the detection of metalloproteins. *Metallomics* 1:312-316.

- Beere, H. M. 2005.** Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *Journal of Clinical Investigation* 115:2633-2639.
- Belkhou, R., Y. Cherel, A. Heitz, J. P. Robin, and Y. Lemaho. 1991.** Energy Contribution of Proteins and Lipids During Prolonged Fasting in the Rat. *Nutrition Research* 11:365-374.
- Benson, L. M., R. Kumar, J. Cavanagh, and S. Naylor. 2003.** Protein-metal ion interactions, stoichiometries and relative affinities determined by on-line size exclusion gel filtration mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17:267-271.
- Bergaya, F., B. K. G. Theng, and G. Lagaly. 2006.** *Handbook of Clay Science*
- Bertile, F., C. Schaeffer, Y. Le Maho, T. Raclot, and A. Van Dorsselaer. 2009.** A proteomic approach to identify differentially expressed plasma proteins between the fed and prolonged fasted states. *Proteomics* 9:148-158.
- Bicknell, R., B. Holmquist, F. S. Lee, M. T. Martin, and J. F. Riordan. 1987.** Electronic spectroscopy of cobalt angiotensin converting enzyme and its inhibitor complexes. *Biochemistry* 26:7291-7297.
- Biemann, K. 1990.** Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods. Enzymol.* 193:886-887.
- Binet, M. R., R. Ma, C. W. McLeod, and R. K. Poole. 2003.** 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* 318:30-38.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier, and W. Postel. 1982.** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys. Methods.* 6:317-339.
- Blueggel, M., D. Chamrad, and H. E. Meyer. 2004.** Bioinformatics in proteomics. *Curr. Pharm Biotechnol* 5:79-88.
- Bouyssiére, B., T. Knispel, C. Ruhnau, E. Denkhaus, and A. Prange. 2004.** Analysis of nickel species in cytosols of normal and malignant human colonic tissues using two dimensional liquid chromatography with ICP-sector field MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19:196-200.
- Bresson, C., C. Lamouroux, C. Sandre, M. Tabarant, N. Gault, J. L. Poncy, J. L. Lefaix, C. Den Auwer, R. Spezia, M. P. Gaigeot, E. Ansoborlo, S. Mounicou, A. Fraysse, G. Deves, T. Bacquart, H. Sez nec, T. Pouthier, P. Moretto, R. Ortega, R. Lobinski, and C. Moulin. 2006.** An interdisciplinary approach to investigate the impact of cobalt in a human keratinocyte cell line. *Biochimie* 88:1619-1629.
- Brightsmith, D. J. 2004.** Effects of weather on parrot geophagy in Tambopata, Peru. *Wilson Bulletin* 116:134-145.
- Britton, R. A., D. P. Colling, and T. J. Klopfenstein. 1978.** Effect of Complexing Sodium Bentonite with Soybean-Meal Or Urea Invitro Ruminant Ammonia Release and Nitrogen-Utilization in Ruminants. *Journal of Animal Science* 46:1738-1747.

- Busto, M. E. D., M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Meija, and A. Sanz-Medel. 2005.** Strategies to study human serum transferrin isoforms using integrated liquid chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF detection: Application to chronic alcohol abuse. *Analytical Chemistry* 77:5615-5621.
- Buts, J. P., V. Vijverman, C. Barudi, N. Dekeyser, P. Maldague, and C. Dive. 1990.** Refeeding After Starvation in the Rat - Comparative Effects of Lipids, Proteins and Carbohydrates on Jejunal and Ileal Mucosal Adaptation. *European Journal of Clinical Investigation* 20:441-452.
- Cabezos, P. A., G. Vera, M. Castillo, R. Fernandez-Pujol, M. I. Martin, and R. Abalo. 2008.** Radiological study of gastrointestinal motor activity after acute cisplatin in the rat. Temporal relationship with pica. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 141:54-65.
- Cabrera, F. and O. Talibudeen. 1978.** Release of Aluminum from Aluminosilicate Minerals .1. Kinetics. *Clays and Clay Minerals* 26:434-440.
- Callahan, G. N. 2003.** Eating dirt. *Emerging Infectious Diseases* 9:1016-1021.
- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P. G. Righetti. 2004.** Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333.
- Carvalho, E., P. O. Gothe, R. Bauer, E. Danielsen, and L. Hemmingsen. 1995.** Effect of inhibitors on the coordination geometries of cadmium at the metal sites in angiotensin-I-converting enzyme. *Eur. J Biochem* 234:780-785.
- Castaing, J. and J. noblet. 1997.** Conséquences de l'introduction de sépiolite sur l'utilisation digestive de l'aliment et les performances du porc en croissance. *Journées Rech. Porcine en France* 29:213-220.
- Chamoun, J. and A. Hagege. 2005.** Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry for metal/protein interactions analysis by using large volume stacking with polarity switching. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20:1030-1034.
- Chandrajith, R., E. Kudavidanage, H. J. Tobschall, and C. B. Dissanayake. 2009.** Geochemical and mineralogical characteristics of elephant geophagic soils in Udawalawe National Park, Sri Lanka. *Environ Geochem. Health* 31:391-400.
- Chelius, D. and P.V. Bondarenko. 2002.** Quantitative Profiling of Proteins in Complex Mixtures Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 1:317-323
- Chery, C. C., K. De Cremer, E. Dumont, R. Cornelis, and L. Moens. 2002.** Vanadium speciation in serum by means of blue native gel electrophoresis. *Electrophoresis* 23:3284-3288.
- Chevreux, S., S. Roudeau, A. Fraysse, A. Carmona, G. Deves, P. L. Solari, S. Mounicou, R. Lobinski, and R. Ortega. 2009.** Multimodal analysis of metals in copper-zinc superoxide dismutase isoforms separated on electrophoresis gels. *Biochimie* 91:1324-1327.

Clauser, K. R., P. Baker, and A. L. Burlingame. 1999. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS MS and database searching. *Analytical Chemistry* 71:2871-2882.

Claverol, S., O. Burlet-Schiltz, J. E. Gairin, and B. Monsarrat. 2003. Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. *Molecular & Cellular Proteomics* 2:483-493.

Cleveland, D. W., S. G. Fischer, M. W. Kirschner, and U. K. Laemmli. 1977. Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl-Sulfate and Analysis by Gel-Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* 252:1102-1106.

Coudrier, E., M. Arpin, B. Dudouet, J. Finidori, A. Garcia, C. Huet, E. Pringault, S. Robine, C. Sahuquillomerino, and D. Louvard. 1988. Villin As A Structural Marker to Study the Assembly of the Brush-Border. *Protoplasma* 145:99-105.

Cross, P. C. and K. L. Mercer. 1993. Cell and tissue ultrastructure: a functional perspective., De Boeck University ed.

Cunat, L., M. C. Lanhers, M. Joyeux, and D. Burnel. 2000. Bioavailability and intestinal absorption of aluminum in rats - Effects of aluminum compounds and some dietary constituents. *Biological Trace Element Research* 76:31-55.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 121:404-427

De Hoffmann, E. and V. Stroobant. 2007. Mass Spectrometry: Principles and Applications, Wiley, Chichester ed.

Delcourt, N., P. Jouin, J. Poncet, E. Demey, E. Mauger, J. Bockaert, P. Marin, and N. Galeotti. 2005. Difference in mass analysis using labeled lysines (DIMAL-K) - A new, efficient proteomic quantification method applied to the analysis of astrocytic secretomes. *Molecular & Cellular Proteomics* 4:1085-1094.

Dembinski, Z., W. Wieckowski, and A. Kuklinska. 1985. The use of Polish Bentonite in treatment of alimentary canal diseases in newborn calves. *Medycyna Wet.* 6:359-362.

Diamond, J., K. D. Bishop, and J. D. Gilardi. 1999. Geophagy in New Guinea birds. *Ibis* 141:181-193.

Doi, T., M. Liu, R. J. Seeley, S. C. Woods, and P. Tso. 2001. Effect of leptin on intestinal apolipoprotein AIV in response to lipid feeding. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 281:R753-R759.

Dole, M., L. L. Mack, R. L. Himes, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice. 1968. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* 49:2240-2249.

Dominy, N. J., E. Davoust, and M. Minekus. 2004. Adaptive function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine. *J Exp. Biol* 207:319-324.

Drasar, B. S. and M. J. Hill. 1972. Intestinal bacteria and cancer. *Am J Clin Nutr* 25:1399-1404.

- Droylefaix, M. T., Y. Drouet, and B. Schatz. 1985.** Sodium Glycodeoxycholate and Spinability of Gastrointestinal Mucus - Protective Effect of Smectite. *Gastroenterology* 88:1369.
- Eastman, I. M. and E. G. Miller. 1935.** Gastrointestinal pH in rats as determined by the glass electrode. *Journal of Biological Chemistry* 110:255-262.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. 2005.** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Edman P. 1950.** Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*4:283-293
- Elias, J. E. and S. P. Gygi. 2007.** Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods* 4:207-214.
- Emmet, M. R. and R. M. Caprioli. 1994.** Micro-electrospray: ultra-high-sensitivity-analysis of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5:605-613.
- Felitsyn, N., E. N. Kitova, and J. S. Klassen. 2002.** Thermal dissociation of the protein homodimer ecotin in the gas phase. *J Am Soc Mass Spectrom.* 13:1432-1442.
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. 1989.** Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246:64-71.
- Ferreras, M., J. G. Gavilanes, and J. M. Garcia-Segura. 1993.** A permanent Zn²⁺ reverse staining method for the detection and quantification of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem* 213:206-212.
- Frank, P. G. and Y. L. Marcel. 2000.** Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *Journal of Lipid Research* 41:853-872.
- Fraser, M. M. and D. Beauchemin. 2009.** Evidence supporting the occurrence of Coulomb fission during conventional sample introduction in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24:469-475.
- Friedman, H. I. and B. Nylund. 1980.** Intestinal Fat Digestion, Absorption, and Transport - A Review. *American Journal of Clinical Nutrition* 33:1108-1139.
- Fujimoto, K., H. Machidori, R. Iwakiri, K. Yamamoto, J. Fujisaki, T. Sakata, and P. Tso. 1993.** Effect of intravenous administration of apolipoprotein A-IV on patterns of feeding, drinking and ambulatory activity of rats. *Brain. Res* 608:233-237.
- Gao, Y.X., Chen, C.Y. and Z.F. Chai. 2007.** Advanced nuclear analytical techniques for metalloproteomics. *J. Anal. At. Spectrom.* 22: 856-866.
- Garcia, J. S., C. S. Magalhaes, and M. A. Arruda. 2006.** Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69:1-15.
- Garman, E. F. and G. W. Grime. 2005.** Elemental analysis of proteins by microPIXE. *Prog. Biophys. Mol Biol* 89:173-205.

- Gattiker, A., W. V. Bienvenut, A. Bairoch, and E. Gasteiger. 2002.** FindPept, a tool to identify unmatched masses in peptide mass fingerprinting protein identification. *Proteomics* 2:1435-1444.
- Geer, L. Y., S. P. Markey, J. A. Kowalak, L. Wagner, M. Xu, D. M. Maynard, X. Yang, W. Shi, and S. H. Bryant. 2004.** Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome. Res* 3:958-964.
- Gilardi, J. D., S. S. Duffey, C. A. Munn, and L. A. Tell. 1999.** Biochemical functions of geophagy in parrots: Detoxification of dietary toxins and cytoprotective effects. *Journal of Chemical Ecology* 25:897-922.
- Girardeau, J. P. 1987.** Smectite aggregation by *Escherichia coli*. *Acta Gastro-Enterol. Belg.* 50:181-192.
- Glickman, L. T., A. O. Camara, N. W. Glickman, and G. P. McCabe. 1999.** Nematode intestinal parasites of children in rural Guinea, Africa: prevalence and relationship to geophagia. *International Journal of Epidemiology* 28:169-174.
- Goda, T. and S. Takase. 1994.** Effect of Dietary-Fat Content on Microvillus in Rat Jejunum. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 40:127-136.
- Gohlke, H., M. Hendlich, and G. Klebe. 2000.** Predicting binding modes, binding affinities and 'hot spots' for protein-ligand complexes using a knowledge-based scoring function. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 20:115-144.
- Gomes, C. D. F. and J. B. P. Silva. 2007.** Minerals and clay minerals in medical geology. *Applied Clay Science* 36:4-21.
- Gorg, A., C. Obermaier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, and W. Weiss. 2000.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21:1037-1053.
- Gorg, A., W. Weiss, and M. J. Dunn. 2004.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 4:3665-3685.
- Greger, J. L., E. N. Bula, and E. T. Gum. 1985.** Mineral metabolism of rats fed moderate levels of various aluminum compounds for short periods of time. *Journal of Nutrition* 115:1708-1716.
- Grosicki, A. and B. Kowalski. 2003.** Influence of bentonite on trace element kinetics in rats.1. *Iron. Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47:555-558.
- Guarner, F. and J. R. Malagelada. 2003.** Gut flora in health and disease. *Lancet* 361:512-519.
- Guntinas, M. B. D. C., G. Bordin, and A. R. Rodriguez. 2002.** Identification, characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography. A review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374:369-378.

Guo, C. H., C. J. Huang, Y. L. Chiou, and G. S. Hsu. 2002. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biol Trace. Elem. Res* 86:145-157.

Gygi, S. P., B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, and R. Aebersold. 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology* 17:994-999.

Habold, C., F. Reichardt, C. Foltzer-Jourdainne, and J. H. Lignot. 2007. Morphological changes of the rat intestinal lining in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 455:323-332.

Habold, C., F. Reichardt, Y. Le Maho, F. Angel, N. Liewig, J. H. Lignot, and H. Oudart. 2009. Clay ingestion enhances intestinal triacylglycerol hydrolysis and non-esterified fatty acid absorption. *British Journal of Nutrition* 102:249-257.

Halsted, J. A. 1968. Geophagia in man: its nature and nutritional effects. *Am J Clin Nutr* 21:1384-1393.

Hamilton, R. L., J. S. Wong, C. M. Cham, L. B. Nielsen, and S. G. Young. 1998. Chylomicron-sized lipid particles are formed in the setting of apolipoprotein B deficiency. *Journal of Lipid Research* 39:1543-1557.

Harris, W. R., G. Berthon, J. P. Day, C. Exley, T. P. Flaten, W. F. Forbes, T. Kiss, C. Orvig, and P. F. Zatta. 1996. Speciation of aluminum in biological systems. *J Toxicol. Environ Health* 48:543-568.

Hayashi, H., K. Fujimoto, J. A. Cardelli, D. F. Nutting, S. Bergstedt, and P. Tso. 1990. Fat Feeding Increases Size, But Not Number, of Chylomicrons Produced by Small-Intestine. *American Journal of Physiology* 259:G709-G719.

Henry, J. and A. M. Kwong. 2003. Why is geophagy treated like dirt? *Deviant Behavior* 24:353-371.

Henzel, W. J., T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, and C. Watanabe. 1993. Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide-Fragments in Protein-Sequence Databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:5011-5015.

Henzel, W. J., C. Watanabe, and J. T. Stults. 2003. Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14:931-942.

Herbert, B. R., M. P. Molloy, A. A. Gooley, B. J. Walsh, W. G. Bryson, and K. L. Williams. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 19:845-851.

Hinkamp, S. and L. Dunemann. 1990. Electrophoretic Techniques in Element Species Analysis - Comparison Between Flow-Through and Flat-Bed Techniques. *Analytica Chimica Acta* 230:1-7.

Hoelzl, R., L. Fabry, L. Kotz, and S. Pahlke. 2000. Routine analysis of ultra pure water by ICP-MS in the low- and sub-ng/L level. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366:64-69.

Hooda, P. S., C. J. K. Henry, T. A. Seyoum, L. D. M. Armstrong, and M. B. Fowler. 2002. The potential impact of geophagia on the bioavailability of iron, zinc and calcium in human nutrition. *Environmental Geochemistry and Health* 24:305-319.

Horn, D. M., E. C. Peters, H. Klock, A. Meyers, and A. Brock. 2004. Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT-ICR MS peptide mass fingerprinting. *International Journal of Mass Spectrometry* 238:189-196.

Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. 1992. Characterization of Peptides Bound to the Class-I Mhc Molecule Hla-A2.1 by Mass-Spectrometry. *Science* 255:1261-1263.

Hunter, J. M. 1973. Geophagy in Africa and the United States: a culture-nutrition hypothesis. *Geographical Review* 63:170-195.

Hunter, J. M. and R. Dekleine. 1984. Geophagy in Central America. *Geographical Review* 74:157-169.

Infante, H. G., K. Van Campenhout, R. Blust, and F. C. Adams. 2002. Inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography for multi-elemental speciation analysis of metalloproteins in carp cytosols. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17:79-87.

Iribarne, J. V. and B. A. Thomson. 1976. Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *Journal of Chemical Physics* 64:2287-2294.

James, P., M. Quadroni, E. Carafoli, and G. Gonnet. 1993. Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195:58-64.

Jemil, S., A. Fatemi, D. J. Williamson, and G. R. Moore. 1992. A Al-27 Nmr Investigation of Al-3+ Binding to Small Carboxylic-Acids and the Proteins Albumin and Transferrin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 46:35-40.

Jimenez, M. S., M. T. Gomez, L. Rodriguez, L. Martinez, and J. R. Castillo. 2009. Some pitfalls in PAGE-LA-ICP-MS for quantitative elemental speciation of dissolved organic matter and metalomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393:699-707.

Johns, T. and M. Duquette. 1991. Traditional Detoxification of Acorn Bread with Clay. *Ecology of Food and Nutrition* 25:221-228.

Jorgensen, C. S., M. Jagd, B. K. Sorensen, J. McGuire, V. Barkholt, P. Hojrup, and G. Houen. 2004. Efficacy and compatibility with mass spectrometry of methods for elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and polyvinylidene difluoride membranes. *Analytical Biochemistry* 330:87-97.

Kaehny, W. D., A. P. Hegg, and A. C. Alfrey. 1977. Gastrointestinal Absorption of Aluminum from Aluminum-Containing Antacids. *New England Journal of Medicine* 296:1389-1390.

- Kameo, S., K. Nakai, N. Kurokawa, T. Kanehisa, A. Naganuma, and H. Satoh. 2005.** Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem* 381:1514-1519.
- Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp. 1987.** Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78:53-68.
- Kastenholz, B. 2004.** Preparative native continuous polyacrylamide gel electrophoresis (PNC-PAGE): An efficient method for isolating cadmium cofactors in biological systems. *Analytical Letters* 37:657-665.
- Kebarle, P. and L. Tang. 1993.** From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 65:A972-A986.
- Kebarle, P. 2000.** A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35:804-817.
- Kelleher, N. L., H. Y. Lin, G. A. Valaskovic, D. J. Aaserud, E. K. Fridriksson, and F. W. McLafferty. 1999.** Top down versus bottom up protein characterization by tandem high-resolution mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society* 121:806-812.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002.** Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem* 74:5383-5392.
- Kenyon, G. L., D. M. DeMarini, E. Fuchs, D. J. Galas, J. F. Kirsch, T. S. Leyh, W. H. Moos, G. A. Petsko, D. Ringe, G. M. Rubin, and L. C. Sheahan. 2002.** Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Mol Cell Proteomics* 1:763-780.
- Khambualai, O., J. Ruttanavut, M. Kitabatake, H. Goto, T. Erikawa, and K. Yamauchi. 2009.** Effects of dietary natural zeolite including plant extract on growth performance and intestinal histology in Aigamo ducks. *British Poultry Science* 50:123-130.
- Khambualai, O., K. Yamauchi, S. Tangtaweewipat, and B. Cheva-Isarakul. 2009.** Growth performance and intestinal histology in broiler chickens fed with dietary chitosan. *British Poultry Science* 50:592-597.
- Klaus, G., C. Klaus-Hügi, and B. Schmid. 1998.** Geophagy by large mammals at natural licks in the rain forest of the Dzanga National Park, Central African Republic. *Journal of Tropical Ecology* 14:829-839.
- Knezevich, M. 1998.** Geophagy as a therapeutic mediator of endoparasitism in a free-ranging group of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *American Journal of Primatology* 44:71-82.
- Knochenmuss, R. and R. Zenobi. 2003.** MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews* 103:441-452.
- Krishnamani, R. and W. C. Mahaney. 2000.** Geophagy among primates: adaptive significance and ecological consequences. *Animal Behaviour* 59:899-915.

Ku, N. O. and M. B. Omary. 2001. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry* 276:26792-26798.

Kukulies, J., W. Naibmajani, and H. Komnick. 1984. Coincident Filament Distribution and Histochemical-Localization of F-Actin in the Enterocytes of the Larval Dragonfly *Aeshna-Cyanea*. *Protoplasma* 121:157-162.

L'Hermite, A., J. P. Sine, and B. Colas. 1996. Ultrastructural localization of butyrylcholinesterase in epithelial cells of rat intestine. *Eur. J. Histochem.* 40:299-304.

Labat, L., B. Dehon, and M. Lhermitte. 2003. Rapid and simple determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Anal. Bioanal. Chem* 376:270-273.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lane, C. S. 2005. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:848-869.

Lavorante, A. F., M. F. Gine, A. P. G. Gervasio, C. E. S. Miranda, M. F. Fiore, C. M. Bellato, and E. Carrilho. 2003. Identification of a metallothionein in *Synechococcus* by capillary electrophoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Sciences* 19:1611-1616.

Lefcourt, A. M. and J. J. Meisinger. 2001. Effect of adding alum or zeolite to dairy slurry on ammonia volatilization and chemical composition. *Journal of Dairy Science* 84:1814-1821.

Liang, P. and T. H. Macrae. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 110:1431-1440.

Lindskog, S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther.* 74:1-20.

Link, A. J., J. Eng, D. M. Schieltz, E. Carmack, G. J. Mize, D. R. Morris, B. M. Garvik, and J. R. Yates. 1999. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nature Biotechnology* 17:676-682.

Liu, H., Sadygov, R.G. and J.R. Yates. 2004. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Anal. Chem.* 76:4193-4201

Liu, S. and D. Beauchemin. 2006. Effect of methanol and sodium dodecylsulfate on radial profiles of ion abundance in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 61:319-325.

Lobinski, R., D. Schaumlöffel, and J. Szpunar. 2006. Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry. *Mass Spectrom. Rev.* 25:255-289.

Lopez-Barea, J. and J. L. Gomez-Ariza. 2006. Environmental proteomics and metallomics. *Proteomics.* 6 Suppl 1:S51-S62.

- Loreti, V., D. Toncelli, E. Morelli, G. Scarano, and J. Bettmer. 2005.** Biosynthesis of Cd-bound phytochelatins by *Phaeodactylum tricorutum* and their speciation by size-exclusion chromatography and ion-pair chromatography coupled to ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383:398-403.
- Ma, R., C. W. McLeod, K. Tomlinson, and R. K. Poole. 2004.** Speciation of protein-bound trace elements by gel electrophoresis and atomic spectrometry. *Electrophoresis*. 25:2469-2477.
- Ma, Y. L. and T. Guo. 2008.** Intestinal morphology, brush border and digesta enzyme activities of broilers fed on a diet containing Cu²⁺-loaded montmorillonite. *Br Poult. Sci* 49:65-73.
- Mahaney, W. C., J. Zippin, M. W. Milner, K. Sanmugadas, R. G. V. Hancock, S. Aufreiter, S. Campbell, M. A. Huffman, M. Wink, D. Malloch, and V. Kalm. 1999.** Chemistry, mineralogy and microbiology of termite mound soil eaten by the chimpanzees of the Mahale Mountains, Western Tanzania. *Journal of Tropical Ecology* 15:565-588.
- Mahaney, W. C. and R. Krishnamani. 2003.** Understanding geophagy in animals: Standard procedures for sampling soils. *Journal of Chemical Ecology* 29:1503-1523.
- Mahieu, S., M. Millen, M. Gonzalez, M. D. Contini, and M. M. Elias. 2005.** Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99:1858-1864.
- Malard, V., O. Prat, E. Darrouzet, F. Berenguer, N. Sage, and E. Quemeneur. 2005.** Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium. *Proteomics* 5:4568-4580.
- Mallet, S., P. Delort, H. Juin, and M. Lessire. 2005.** Effect of in feed talc supplementation on broiler performance. *Animal Research* 54:485-492.
- Mann, M., P. Hojrup, and P. Roepstorff. 1993.** Use of Mass-Spectrometric Molecular-Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases. *Biological Mass Spectrometry* 22:338-345.
- Marceau, N., B. Schutte, S. Gilbert, A. Loranger, M. E. R. Henfling, J. L. V. Broers, J. Mathew, and F. C. S. Ramaekers. 2007.** Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Experimental Cell Research* 313:2265-2281.
- March, R. E. 1997.** An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 32:351-369.
- Marengo, E., E. Robotti, F. Antonucci, D. Cecconi, N. Campostrini, and P. G. Righetti. 2005.** Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. *Proteomics* 5:654-666.
- Marlow, R. W. and K. Tollestrup. 1982.** Mining and Exploitation of Natural Mineral-Deposits by the Desert Tortoise, *Gopherus-Agassizii*. *Animal Behaviour* 30:475-&.

- Mason, A. Z. and M. R. Borja. 2002.** A study of Cu turnover in proteins of the visceral complex of *Littorina littorea* by stable isotopic analysis using coupled HPLC-ICP-MS. *Mar. Environ Res* 54:351-355.
- McKenzie, R. A. 1991.** Bentonite as therapy for *Lantana camara* poisoning of cattle. *Aust. Vet J* 68:146-148.
- Mee, A., R. Denny, K. Fairclough, D. M. Pullan, and W. Boyd-Wallis. 2005.** Observations of parrots at the geophagy site in bolivia. *Biota Neotropica* 5:103-106.
- Mills, A. and A. Milewski. 2007.** Geophagy and nutrient supplementation in the Ngorongoro Conservation Area, Tanzania, with particular reference to selenium, cobalt and molybdenum. *Journal of Zoology* 271:110-118.
- Mitchell, D., M. L. Krusemark, and D. Hafner. 1977.** Pica: a species relevant behavioral assay of motion sickness in the rat. *Physiol Behav.* 18:125-130.
- Mounicou, S. and R. Lobinski. 2008.** Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions. *Pure and Applied Chemistry* 80:2565-2575.
- Mounicou, S., J. Szpunar, and R. Lobinski. 2009.** Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* 38:1119-1138.
- Muegge, I. and Y. C. Martin. 1999.** A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: A simplified potential approach. *Journal of Medicinal Chemistry* 42:791-804.
- Mumpton, F. A. 1999.** La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3463-3470.
- Nagaoka, M. H., T. Yamazaki, and T. Maitani. 2002.** Binding patterns of vanadium ions with different valence states to human serum transferrin studied by HPLC/high-resolution ICP-MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296:1207-1214.
- Nagaoka, M. H. and T. Maitani. 2005.** Binding affinity of aluminium to human serum transferrin and effects of carbohydrate chain modification as studied by HPLC/high-resolution ICP-MS--speciation of aluminium in human serum. *J Inorg. Biochem* 99:1887-1894.
- Naim, H. Y. 1992.** Angiotensin-converting enzyme of the human small intestine. Subunit and quaternary structure, biosynthesis and membrane association. *Biochem J* 286 (Pt 2):451-457.
- Neilsen, J. L., A. Abildtrup, J. Christensen, P. Watson, A. Cox, and C. W. McLeod. 1998.** Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 53:339-345.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube, and W. Ehrhardt. 1988.** Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric-Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262.

Nishibori, H., Y. Matsuno, K. Iwaya, T. Osada, N. Kubomura, A. Iwamatsu, H. Kohno, S. Sato, M. Kitajima, and S. Hirohashi. 1996. Human colorectal carcinomas specifically accumulate M(r) 42,000 ubiquitin-conjugated cytokeratin 8 fragments. *Cancer Research* 56:2752-2757.

Nishihara, T. and S. Kuroda. 1991. Soil-Scratching Behavior by Western Lowland Gorillas. *Folia Primatologica* 57:48-51.

O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.

Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and M. Mann. 2002. Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Moll. Cell. Proteomics*. 1:376-386

Ornstein L. 1964. Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 121:321-349

Palacios, O., J. R. Encinar, G. Bertin, and R. Lobinski. 2005. Analysis of the selenium species distribution in cow blood by size exclusion liquid chromatography-inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry (SEC-ICPccMS). *Anal. Bioanal. Chem* 383:516-522.

Papaioannou, D. S., C. S. Kyriakis, C. Alexopoulos, E. D. Tzika, Z. S. Polizopoulou, and S. C. Kyriakis. 2004. A field study on the effect of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff, alone or in combination with certain antimicrobials, on the health status and performance of weaned, growing and finishing pigs. *Research in Veterinary Science* 76:19-29.

Pappin, D. J. C., P. Hojrup, and A. J. Bleasby. 1993. Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. *Current Biology* 3:327-332.

Parge, H. E., R. A. Hallewell, and J. A. Tainer. 1992. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6109-6113.

Patton, W. F. 2000. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*. 21:1123-1144.

Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20:3551-3567.

Petkova, E., T. Venkov, P. Chushkov, I. Encheva, and E. Poshtakov. 1981. [Biochemical and hematological indices from the use of a bulgarben preparation in digestive disorders in calves]. *Vet Med Nauki*. 18:28-33.

Pichard, A., M. Bisson, G. Gay, N. Houeix, B. Jolibois, J. P. Lefevre, H. Magaud, V. Migné, A. Morin, and S. Tissot. 2005. Aluminium et dérivés. INERIS-DRC-02-25590-02DF41.

- Pioselli, B., C. Munro, A. Raab, C. L. Deitrich, K. Songsrirote, J. Feldmann, and J. Thomas-Oates. 2009.** Denaturing and non-denaturing microsolution isoelectric focussing to mine the metalloproteome. *Metallomics* 1:501-510.
- Polec, K., M. Perez-Calvo, O. Garcia-Arribas, J. Szpunar, B. Ribas-Ozonas, and R. Lobinski. 2002.** Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. *J Inorg. Biochem* 88:197-206.
- Powell, J. and R. P. H. Thompson. 1993.** The Chemistry of Aluminum in the Gastrointestinal Lumen and Its Uptake and Absorption. *Proceedings of the Nutrition Society* 52:241-253.
- Quiniou, N., D. Gaudre, P. Levasseur, S. Dubroca, and F. X. Maxant. 2005.** Intérêt zootechnique d'une zéolithe micronisée par procédé tribomécanique sur le porcelet sevré. *Techniporc* 28:13-20.
- Quinsberry, J. H. 1968.** The use of clay in poultry feed. *Clays and Clay Minerals* 16:267-270.
- Quintana, M., A. D. Klouda, A. Gondikas, M. Ochsenkuhn-Petropoulou, and B. Michalke. 2006.** Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CZE-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta* 573:172-180.
- Raab, A., B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, and J. Feldmann. 2009.** Evaluation of gel electrophoresis conditions for the separation of metal-tagged proteins with subsequent laser ablation ICP-MS detection. *Electrophoresis* 30:303-314.
- Rabilloud, T. 1990.** Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis*. 11:785-794.
- Rabilloud, T., C. Adessi, A. Giraudel, and J. Lunardi. 1997.** Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 18:307-316.
- Rabilloud, T., M. Chevallet, S. Luche, and C. Lelong. 2010.** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *Journal of Proteomics* 73:2064-2077.
- Reaven, E. P. and G. M. Reaven. 1977.** Distribution and Content of Microtubules in Relation to Transport of Lipid - Ultrastructural Quantitative Study of Absorptive Cell of Small-Intestine. *Journal of Cell Biology* 75:559-572.
- Reichardt, F., C. Hibold, B. Chaumande, A. Ackermann, L. Ehret-Sabatier, Y. Le Maho, F. Angel, N. Liewig, and J. H. Lignot. 2009.** Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: proteomic and cellular evidences. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 23:69-79.
- Reisinger, V. and L. A. Eichacker. 2006.** Analysis of membrane protein complexes by blue native PAGE. *Proteomics*6-15.

Reynolds, J. A. and C. Tanford. 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66:1002-1007.

Rizzi, L., M. Simioli, P. Roncada, and A. Zaghini. 2003. Aflatoxin B1 and clinoptilolite in feed for laying hens: Effects on egg quality, mycotoxin residues in livers, and hepatic mixed-function oxygenase activities. *Journal of Food Protection* 66:860-865.

Roepstorff, P. and J. Fohlman. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom.* 11:601.

Roig, J. L., S. Fuentes, M. T. Colomina, P. Vicens, and J. L. Domingo. 2006. Aluminum, restraint stress and aging: Behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology* 218:112-124.

Ross, P. L., Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, and D. J. Pappin. 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics.* 3:1154-1169.

Russo, R. E., X. L. Mao, C. Liu, and J. Gonzalez. 2004. Laser assisted plasma spectrochemistry: laser ablation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19:1084-1089.

Sadler, P. J., A. Tucker, and J. H. Viles. 1994. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. *Eur. J Biochem* 220:193-200.

Sakata, T. 1986. Effects of Indigestible Dietary Bulk and Short Chain Fatty-Acids on the Tissue Weight and Epithelial-Cell Proliferation Rate of the Digestive-Tract in Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 32:355-362.

Sakata, T. 1986. Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty acids on the tissue weight and epithelial cell proliferation rate of the digestive tract in rats. *J Nutr Sci Vitaminol. (Tokyo)* 32:355-362.

Sanglier, S., C. Atmanene, G. Chevreux, and A. V. Dorsselaer. 2008. Nondenaturing mass spectrometry to study noncovalent protein/protein and protein/ligand complexes: technical aspects and application to the determination of binding stoichiometries. *Methods. Mol Biol* 484:217-243.

Schagger, H. and G. Vonjagow. 1991. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane-Protein Complexes in Enzymatically Active Form. *Analytical Biochemistry* 199:223-231.

Schaumloffel, D., L. Ouerdane, B. Bouyssiére, and R. Lobinski. 2003. Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18:120-127.

Schmidt, A., J. Kellermann, and F. Lottspeich. 2005. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics.* 5:4-15.

- Shevchenko, A., S. Sunyaev, A. Loboda, A. Shevchenko, P. Bork, W. Ens, and K. G. Standing. 2001.** Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time of flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Analytical Chemistry* 73:1917-1926.
- Shi, W. and M. R. Chance. 2008.** Metallomics and metalloproteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65:3040-3048.
- Shivoga, W. A. and W. N. Moturi. 2009.** Geophagia as a risk factor for diarrhoea. *J Infect. Dev. Ctries.* 3:94-98.
- Simon, S. L. 1998.** Soil ingestion by humans: A review of history, data, and etiology with application to risk assessment of radioactively contaminated soil. *Health Physics* 74:647-672.
- Siuti, N. and N. L. Kelleher. 2007.** Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. *Nature Methods* 4:817-821.
- Slight, I., M. Bendayan, C. Malo, E. Delvin, M. Lambert, and E. Levy. 2004.** Identification of microsomal triglyceride transfer protein in intestinal brush-border membrane. *Experimental Cell Research* 300:11-22.
- Smith, S. D., Y. M. She, E. A. Roberts, and B. Sarkar. 2004.** Using immobilized metal affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry to identify hepatocellular proteins with copper-binding ability. *Journal of Proteome Research* 3:834-840.
- Storey, J. D. and R. Tibshirani. 2003.** Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9440-9445.
- Strivay, D., B. Schoefs, and G. Weber. 1998.** Quantification by PIXE of metallic sites in proteins separated by electrophoresis. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 137:932-935.
- Szokefalvi-Nagy, Z., C. Bagyinka, I. Demeter, K. L. Kovacs, and L. H. Quynh. 1990.** Location and quantification of metal ions in enzymes combining polyacrylamide gel electrophoresis and particle-induced X-ray emission. *Biol Trace. Elem. Res* 26-27:93-101.
- Szpunar, J. 2004.** Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem* 378:54-56.
- Takeda, N., S. Hasegawa, M. Morita, and T. Matsunaga. 1993.** Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacol Biochem Behav.* 45:817-821.
- Tanaka, K., H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, and T. Matsuo. 1988.** Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2:151-153.
- Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J. P. Furet, E. Ugarte, R. Munoz-Tamayo, D. L. E. Paslier, R. Nalin, J. Dore, and M. Leclerc. 2009.** Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* 11:2574-2584.

- Tastet, L., D. Schaumlöffel, B. Bouyssiere, and R. Lobinski. 2006.** Capillary HPLC-ICP MS mapping of selenocompounds in spots obtained from the 2-D gel electrophoresis of the water-soluble protein fraction of selenized yeast. *Anal. Bioanal. Chem* 385:948-953.
- Tauquir, N. A. and H. Nawaz. 2001.** Performance and economics of broiler chicks fed on rations supplemented with different levels of sodium bentonite. *Int. J. Agric. Biol.* 3:149-150.
- Timerbaev, A. R., K. S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C. G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz, and B. K. Keppler. 2004.** Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin. *Electrophoresis* 25:1988-1995.
- Tosco, A., R. A. Siciliano, G. Cacace, M. F. Mazzeo, R. Capone, A. Malorni, A. Leone, and L. Marzullo. 2005.** Dietary effects of copper and iron deficiency on rat intestine: A differential display proteome analysis. *Journal of Proteome Research* 4:1781-1788.
- Tso, P. and J. A. Balint. 1986.** Formation and Transport of Chylomicrons by Enterocytes to the Lymphatics. *American Journal of Physiology* 250:G715-G726.
- Tso, P. and M. Liu. 2004.** Apolipoprotein A-I, food intake, and obesity. *Physiology & Behavior* 83:631-643.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006.** An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027-1031.
- Tyers, M. and M. Mann. 2003.** From genomics to proteomics. *Nature* 422:193-197.
- Unlu, M., M. E. Morgan, and J. S. Minden. 1997.** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18:2071-2077.
- Van Campenhout, K., H. G. Infante, F. Adams, and R. Blust. 2004.** Induction and binding of Cd, Cu, and Zn to metallothionein in carp (*Cyprinus carpio*) using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol. Sci* 80:276-287.
- Velde, B. 1985.** Possible Chemical Controls of Illite Smectite Composition During Diagenesis. *Mineralogical Magazine* 49:387-391.
- Vermeer, D. E. and D. A. Frate. 1979.** Geophagia in Rural Mississippi - Environmental and Cultural Contexts and Nutritional Implications. *American Journal of Clinical Nutrition* 32:2129-2135.
- Vermeer, D. E. and R. E. Ferrell. 1985.** Nigerian Geophagical Clay - A Traditional Antidiarrheal Pharmaceutical. *Science* 227:634-636.
- Weberg, R. and A. Berstad. 1986.** Gastrointestinal Absorption of Aluminum from Single Doses of Aluminum Containing Antacids in Man. *European Journal of Clinical Investigation* 16:428-432.
- Weseloh, G., M. Kuhbacher, H. Bertelsmann, M. Ozaslan, A. Kyriakopoulos, A. Knochel, and D. Behnel. 2004.** Analysis of metal-containing proteins by gel electrophoresis

and synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 259:473-477.

Whitehead, M. W., G. Farrar, G. L. Christie, J. A. Blair, R. P. H. Thompson, and J. J. Powell. 1997. Mechanisms of aluminum absorption in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 65:1446-1452.

Wilkins, M. R., R. D. Appel, J. E. Van Eyk, M. C. Chung, A. Gorg, M. Hecker, L. A. Huber, H. Langen, A. J. Link, Y. K. Paik, S. D. Patterson, S. R. Pennington, T. Rabilloud, R. J. Simpson, W. Weiss, and M. J. Dunn. 2006. Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics*. 6:4-8.

Wilm, M. and M. Mann. 1996. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem* 68:1-8.

Wilson, M. J. 2003. Clay mineralogical and related characteristics of geophagic materials. *Journal of Chemical Ecology* 29:1525-1547.

Wittig, I. and H. Schagger. 2005. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5:4338-4346.

Wittig, I., M. Karas, and H. Schagger. 2007. High resolution clear native electrophoresis for In-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:1215-1225.

Wittig, I. and H. Schagger. 2008. Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8:3974-3990.

Xu, J. Q., D. Balik, and G. R. Agnes. 2001. Aerosol static electrification and its effects in inductively coupled plasma spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16:715-723.

Yamashita, M. and J. B. Fenn. 1984. Electrospray Ion-Source - Another Variation on the Free-Jet Theme. *Journal of Physical Chemistry* 88:4451-4459.

Yates, J. R., S. Speicher, P. R. Griffin, and T. Hunkapiller. 1993. Peptide Mass Maps - A Highly Informative Approach to Protein Identification. *Analytical Biochemistry* 214:397-408.

Yesiloglu, Y. 2005. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry* 40:2155-2159.

Zatta, P., V. L. Dalla, and N. Di, V. 2003. Binding studies on aluminum(III)-albumin interaction. *Arch Biochem Biophys*. 417:59-64.

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Chapitre I

- Figure 1.1 : Exemple d'oiseaux géophages
- Figure 1.2 : Exemple de primates géophages
- Figure 1.3 : Organisation des unités tétraédriques dans les couches tétraédriques des phyllosilicates
- Figure 1.4 : Organisation des unités octaédriques dans les couches octaédriques des phyllosilicates
- Figure 1.5 : Organisation des feuillets dans les minéraux argileux
- Figure 1.6 : Répartition des argiles à la surface du globe
- Figure 1.7 : Structure de la kaolinite
- Figure 1.8 : Structure de la montmorillonite
- Figure 1.9 : Schéma représentant le système digestif chez l'Homme
- Figure 1.10 : Le tube digestif chez le rat.
- Figure 1.11 : Schéma d'une coupe transversale du tube digestif
- Figure 1.12 : Replissements du tube digestif au niveau intestinal et au niveau des entérocytes
- Figure 1.13 : Schéma et image en MET d'un entérocyte
- Figure 1.14 : Schéma et image en MET de la structure des microvillosités
- Figure 1.15 : Absorption des différents nutriments par les entérocytes

Chapitre II

- Figure 2.1 : Formation du réseau de polyacrylamide dans un gel PAGE
- Figure 2.2 : Principaux constituants d'un spectromètre de masse
- Figure 2.3 : L'ionisation MALDI
- Figure 2.4 : Processus de production d'ions par électrospray
- Figure 2.5 : Le système Chip (Agilent Technologies)
- Figure 2.6 : Schéma de fonctionnement d'un instrument MALDI-TOF avec système d'extraction retardée et réflecteur électrostatique
- Figure 2.7 : Schéma de fonctionnement d'un analyseur quadripolaire
- Figure 2.8 : Schéma de l'analyseur trappe ionique
- Figure 2.9 : Analyseurs à transformée de Fourier
- Figure 2.10 : Nomenclature de fragmentation des peptides en phase gazeuse
- Figure 2.11 : Principe de l'analyse MS/MS et MSⁿ à l'aide d'une trappe ionique
- Figure 2.12 : Schéma de principe de l'ICP-MS Agilent 7500ce
- Figure 2.13 : Les méthodes séparatives utilisables pour l'identification de protéines et de métalloprotéines
- Figure 2.14 : Stratégie d'identification d'une protéine par empreinte peptidique massique
- Figure 2.15 : Stratégie d'identification d'une protéine par LC-MS/MS et « Peptide Fragment Fingerprinting ».
- Figure 2.16 : Stratégies analytiques pour l'identification de protéines liant les métaux de manière covalente

Chapitre III

- Figure 3.1 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale d'un même échantillon par différents protocoles d'extraction et de solubilisation
- Figure 3.2 : Différents gels bidimensionnels obtenus à partir d'un même extrait protéique
- Figure 3.3 : Microscopie électronique à balayage de jéjunum de rat et de kaolinite en mode environnementale et en mode conventionnel
- Figure 3.4 : Analyse par microscopie électronique couplée à l'analyse par diffraction des rayons X (ESEM/EDX)
- Figure 3.5 : Analyses microscopiques de la muqueuse intestinale de rat
- Figure 3.6 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale de rat du groupe témoin
- Figure 3.7 : Mise en évidence d'un clivage de la cytokératine 8 après ingestion de kaolinite en complément alimentaire par analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS
- Figure 3.8 : Présentation schématique des conditions expérimentales de l'étude de l'effet de la consommation de kaolinite au cours du jeûne prolongé en phase III et au cours de la phase de réalimentation
- Figure 3.9 : Séparation des protéines extraites de la muqueuse intestinale de rat ayant consommé de la kaolinite ou réalimentés normalement au cours des expériences RéaA et RéaB
- Figure 3.10 : Répartition des fonctions cellulaires affectées par l'ingestion d'argile

Figure 3.11 : Analyse de l'expression de l'apolipoprotéine A-IV par Western Blot
Figure 3.12 : Schéma de l'assimilation des lipides au niveau des entérocytes de la muqueuse intestinale
Figure 3.13 : Stratégie envisagée pour la recherche de métalloprotéines dans un mélange protéique complexe et contraintes analytiques
Figure 3.14 : Cinétique d'éluion de la SOD d'un gel HrCN-PAGE
Figure 3.15 : Effet de la composition de la solution d'éluion sur le signal d'une solution d'¹¹⁵In
Figure 3.16 : Formation des gouttelettes dans la chambre de nébulisation
Figure 3.17 : Effet de la composition de la solution d'éluion sur le signal de différents métaux
Figure 3.18 : Gamme d'étalonnage en aluminium dans les différentes solutions d'éluion
Figure 3.19 : Séparation de protéines intestinales par BN-PAGE 10%
Figure 3.20 : Analyse de protéines modèles par gels HrCN-PAGE pH 7, CN-PAGE pH 7 et CN-PAGE pH 11
Figure 3.21 : Analyse de protéines modèles par gels HrCN-PAGE 8%
Figure 3.22 : Analyse ESI-TOF-MS de la SOD et de l'AC en conditions dénaturantes et en conditions natives
Figure 3.23 : Séparation de mélanges protéiques sur HrCN-PAGE 8%
Figure 3.24 : Séparation de mélanges protéiques sur HrCN-PAGE de différentes réticulations
Figure 3.25 : Vérification des performances de la colonne TSK SW3000
Figure 3.26 : Détermination de la quantité minimale de SOD détectable sur gel HrCN-PAGE 8%
Figure 3.27 : Détermination de la quantité minimale de SOD détectable par SEC-ICP-MS
Figure 3.28 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gel HrCN-PAGE 8%
Figure 3.29 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gel HrCN-PAGE 14%
Figure 3.30 : Recherche de protéines liant l'aluminium dans la muqueuse intestinale de rat après séparation sur gels natifs 2D

Chapitre IV

Figure 4.1 : Recherche de protéines liant l'arsenic dans un extrait protéique issu d'une culture bactérienne

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau 2.1 : Comparatif des méthodes d'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Tableau 2.2 : Limites de détection, avantages et inconvénients de méthodes de coloration couramment utilisées pour la détection de protéines sur gel de polyacrylamide

Tableau 2.3 : Principales caractéristiques techniques et performances moyennes des instruments disponibles sur le marché

Tableau 2.4 : Comparatif des performances de méthodes de détection compatibles avec l'analyse de protéine liant les métaux

Chapitre III

Tableau 3.1 : Protocoles d'extraction et de solubilisation des protéines intestinales

Tableau 3.2 : Rendements d'extraction des protéines selon les protocoles d'extraction/solubilisation

Tableau 3.3 : Analyse de la reproductibilité des gels bidimensionnels

Tableau 3.4 : Reproductibilité de l'analyse en fonction du nombre de gels pris en compte

Tableau 3.5 : Identification des protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée après ingestion de kaolinite en complémentation alimentaire pendant 28 jours

Tableau 3.6 : Création de pools pour l'analyse protéomique différentielle

Tableau 3.7 : Protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée par ingestion d'argile en complémentation alimentaire après un jeûne prolongé (RéaA)

Tableau 3.8 : Protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée par ingestion d'argile en complémentation alimentaire après un jeûne prolongé (réaB)

Tableau 3.9 : Protéines régulées dans les deux expériences de réalimentation

Tableau 3.10 : Identification des protéines dont l'accumulation cellulaire est modifiée après ingestion de kaolinite en quantité fixée (5% ou 2%) en complémentation alimentaire pendant 28 jours

Tableau 3.11 : Rendements d'élution passive de gels natifs

Tableau 3.12 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) en ppb dans les différentes solutions d'élution

Tableau 3.13 : Equations des droites d'étalonnages et coefficients de corrélation (R^2) obtenus pour des gammes en métaux de 0 à 83 ppb dans les différentes solutions d'élution

Tableau 3.14 : Rendements d'élution des protéines modèles pour les différents gels natifs

Tableau 3.15 : Rendements protéiques et métalliques de protéines modèles après électrophorèse sur gels HrCN-PAGE 8%

Tableau 3.16 : Masses moléculaires de la SOD et de l'AC déterminées par spectrométrie de masse ESI-TOF-MS

Tableau 3.17 : Rendements protéiques et métalliques obtenus avec les gels HrCN-PAGE 8% et 14%

Tableau 3.18 : Effet du débit sur l'efficacité de la colonne et la résolution

Tableau 3.19 : Liste des protéines identifiées dans les éluats contenant de l'aluminium

Tableau 3.20 : Identification des protéines présentes dans les éluats des gels 2D contenant de l'aluminium puis redéposés sur gel SDS-PAGE

Chapitre V

Tableau 5.1 : Quantité déposée de protéines et gamme de pH utilisée au cours des différentes expériences

Tableau 5.2 : Critères de sélection des spots dont l'intensité varie significativement

Tableau 5.3 : Paramètres d'analyse MS et MS/MS

Tableau 5.4 : Paramètres de recherche dans les banques de données

Tableau 5.5 : Dilution des anticorps pour l'analyse par Western Blot

Tableau 5.6 : Protéines modèles utilisées pour l'évaluation de la stratégie analytique

Tableau 5.7 : Composition des différentes solutions utilisées pour les gels BN-PAGE

Tableau 5.8 : Composition des différentes solutions utilisées pour les gels CN-PAGE/HrCN-PAGE

Tableau 5.9 : Conditions électrophorétiques utilisés pour les séparations sur gels HrCN-PAGE

Tableau 5.10 : Vérification des performances de l'ICP-MS

Tableau 5.11 : Composition des phases mobiles testées pour l'analyse métalloprotomique par SEC

Productions scientifiques

Publication

Interactions between ingested kaolinite and the intestinal mucosa in rat: proteomic and cellular evidences. *Reichardt, F., Habold, C., Chaumande, B., Ackermann, A., Ehret-Sabatier, L., Le Maho, Y., Angel, F., Liewig, N. and Lignot, J.H. (2009). Fundamental & Clinical Pharmacology 23: 69–79.*

Communications orales

Effect of clays on intestinal mucosa of rats: physiological, morphological and proteomic approaches. **B. Chaumande, F. Reichardt, C. Habold, A. Ackermann, H. Oudart, A. Boos, A. Hagège, F. Angel, Y. Le Maho, N. Liewig, J.H. Lignot et L. Ehret-Sabatier. Symposium MEH – Paris 17 septembre 2009.**

Etude de l'interaction argile-muqueuse intestinale chez le rat par une approche protéomique combinée à des approches physiologiques et morphologiques. **B. Chaumande, F. Reichardt, C. Habold, A. Ackermann, H. Oudart, A. Boos, A. Hagège, F. Angel, Y. Le Maho, N. Liewig, J.H. Lignot et L. Ehret-Sabatier. Fédération Gay-Lussac – Rennes 5 décembre 2008.**

Interaction argile/muqueuse intestinale chez le rat : Augmentation de l'absorption lipidique et restructuration morphologique sous l'effet de la consommation d'argile. **B. Chaumande, F. Reichardt, C. Habold, A. Hagège, A. Boos, N. Liewig, F. Bertile, C. Carapito, A. Van Dorsselaer, Y. Le Maho, J.H. Lignot et L. Sabatier. Congrès GFA-RST – Nancy 21-24 Avril 2008.**

Etude de l'effet de la kaolinite en complémentation alimentaire chez le rat par des approches morpho-chimique, protéomique et métalproteomique. **B. Chaumande, F. Reichardt, C. Habold, A. Hagège, A. Boos, N. Liewig, F. Bertile, C. Carapito, A. Van Dorsselaer, Y. Le Maho, J.H. Lignot et L. Sabatier. Club jeune SFEAP - Paris 14 mars 2008.**

Les méthodes séparatives : de la conception du support au développement méthodologique - **J. Chamieh, B. Chaumande. Journée des doctorants de l'IPHC - Strasbourg 31 janvier 2008**

Communications par affiche

Analyse des effets d l'ingestion d'argile par une approche pluridisciplinaire. A. Bœuf, **B. Chaumande**, V. Delval, F. Angel, C. Fischer, F. Voinot, J.H. Lignot, N. Liewig et L. Sabatier. Congrès SFEAP – Marseille 6-8 septembre 2010.

Apport de la SM supramoléculaire dans la caractérisation des métalloprotéines séparées sur gel d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes. D. Ayoub, **B. Chaumande**, A. Hagège, S. Sanglier, L. Sabatier et A. Van Dorsselaer. Congrès SFSM-SFEAP – Dijon 14-17 septembre 2009.

Obtention d'un Prix poster

Evaluation of non denaturing separative methods for the study of metal-binding proteins. **B. Chaumande**, A. Hagège et L. Ehret-Sabatier. Congrès SFEAP – Tours 6-8 octobre 2008.

Effect of clay on the intestinal mucosa of rat investigated by a combination of physiological, morphological and proteomic approaches. **B. Chaumande**, F. Reichardt, C. Habold, A. Ackermann, H. Oudart, A. Boos, A. Hagège, F. Angel, Y. Le Maho, N. Liewig, J.H. Lignot et L. Ehret-Sabatier. Congrès SFEAP – Tours 6-8 octobre 2008.

Clay complementation in rat diet: effect of kaolin on intestinal cell. **B. Chaumande**, F. Reichardt, C. Habold, A. Hagège, A. Boos, N. Liewig, F. Bertile, C. Carapito, A. Van Dorsselaer, Y. Le Maho, J.H. Lignot et L. Sabatier. Congrès SFSM-SFEAP – Pau 17-20 septembre 2007.

Interactions entre kaolinite et muqueuse intestinale chez le rat lors d'une supplémentation argileuse. F. Reichardt, C. Habold, H. Oudart, A. Ackermann, **B. Chaumande**, L. Sabatier, A. Hagège, A. Boos, N. Liewig et J.H. Lignot. Groupe français des argiles – Mulhouse 18 avril 2007.

Obtention d'un Prix poster

Les argiles dans la restauration fonctionnelle de l'intestin : analyse protéomique et métallomique. **B. Chaumande**, C. Huillet, F. Bertile, A. Van Dorsselaer, J.H. Lignot, N. Liewig, C. Habold, F. Reichardt, Y. Le Maho et L. Sabatier. Métaux et biologie – Strasbourg 7 décembre 2006.

Vulgarisation scientifique

Séparer pour mieux comprendre. J. Chamieh, **B. Chaumande**, S. Safi. Fête de la science - Strasbourg 17 octobre 2006.

Annexe

ORIGINAL
ARTICLEInteractions between ingested kaolinite
and the intestinal mucosa in rat:
proteomic and cellular evidencesFrançois Reichardt^a, Caroline Habolde^a, Bertrand Chaumande^b,
Alain Ackermann^a, Laurence Ehret-Sabatier^b, Yvon Le Maho^a,
Fabielle Angel^a, Nicole Liewig^a and Jean-Hervé Lignot^{a*}^aIPHC, Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, ULP, CNRS, 23 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France^bIPHC, Département Sciences Analytiques, ULP, CNRS, 25 rue Becquerel, F-67087 Strasbourg Cedex 2, France**Keywords**aluminium,
intestinal mucosa,
kaolinite,
microscopy,
microvilli,
proteomic**ABSTRACT**

Although some of the effects of clay ingestion by humans and animals, such as gastrointestinal wellness and the increase in food efficiency are well known, the underlying mechanisms are not yet fully understood. Therefore, the interactions between the intestinal mucosa and kaolinite particles and their effects on mucosal morphology were observed using light microscopy (LM), transmission electron microscopy (TEM), conventional (CSEM) and environmental (ESEM) scanning electron microscopy combined with an EDX micro-analysis system. Kaolinite consumption, given with free access to rats, varied considerably from one animal to the other but was regular through time for each individual. Some kaolinite particles appeared chemically dissociated in the lumen and within the mucus barrier. Aluminium (Al) originating from ingested clay and present in the mucus layer could directly cross the intestinal mucosa. A significant increase in the thickness of the villi with large vacuoles at the base of the mucosal cells and a decrease in the length of enterocyte microvilli characterized complemented animals. The proteomic analyses of the intestinal mucosa of complemented rats also revealed several modifications in the expression level of cytoskeleton proteins. In summary, kaolinite particles ingested as food complement interact with the intestinal mucosa and modify nutrient absorption. However, these data, together with the potential neurotoxicity of Al, need further investigation.

Received 15 May 2008;
revised 8 August 2008;
accepted 9 September 2008*Correspondence and reprints:
francois.reichardt@
c-strasbourg.fr;
nicole.liewig@c-strasbourg.fr**INTRODUCTION**

Geophagy, i.e. clay ingestion, is a widespread behaviour in humans [1], and other vertebrates, such as several species of mammals, including apes and monkeys, and birds [2]. A number of beneficial effects on the intestinal function have been identified, but the underlying mechanisms of the interaction of clay with the intestinal mucosa are still poorly described [3].

Clays are used in the human diet as well as in domestic animals [4]. They are well known to treat diarrhoea and

to cure gastrointestinal diseases, as it was already observed with kaolinite [1,2]. This commonly ingested clay is one of the simplest clay-type and a major compound of soils all over the world. For rodents that cannot vomit, kaolinite ingestion is increased and has a beneficial action after irradiation and toxic injection or ingestion, and it can be used as an index of nausea [5–7]. Kaolinite ingestion is also known to protect the intestinal mucosa by reducing the bioavailability of alkaloids and tannins, as shown in an artificial digestive system [8], and by decreasing parasitic actions [2,9].

Moreover, clay complementation is also known to favour food assimilation by facilitating absorption, and its use is increasing in animal production [10,11]. Geophagy occurs during extended periods of fasting [12] or when food supplies are limited for animals in the wild [13] and humans. Thus, as ingested clays protect intestinal mucosa and increase food efficiency, they may also facilitate absorption.

These protective and nutritive effects could be explained by the specific interactions between ingested clays and the mucosa of the small intestine. This very dynamic and responsive organ, responsible for most of the nutrient and ion absorptions, is a physiological barrier capable of modulate its morphology to optimize its function [14].

The aim of this study was to observe the nature of the interactions between ingested kaolinite particles and intestinal mucosa, and between the effects of this ingestion on the morphology and the protein content of the intestinal mucosa, after a short and a long complementation. This work was undertaken using light (LM), transmission (TEM) and scanning (CSEM and ESEM/EDX) electron microscopy techniques and two-dimensional gel electrophoresis (2DE).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats ($n = 20$), weighing approximately 350 g at the beginning of the experiments and obtained from Charles Rivers (Lyon, France), were housed individually for the entire duration of the experiment and were weighted every morning. Cages had a wire mesh floor to minimize coprophagia and to recuperate kaolinite and food fragments every day. Rats were maintained at 23 °C with a daily 12-h light period and had free access to water and food [A03 pellets; UAR, Epinay-sur-Orge, France: 23.0% (by mass) protein, 51.1% carbohydrates, 4.3% fat, 4.0% cellulose, 5.6% minerals and 12.0% water], with or without kaolinite complement.

Kaolinite

Kaolinite belongs to the mineralogic class of phyllosilicates and to the group of clay minerals, which detailed structural types have been determined with X-ray diffractions methods [15,16]. Kaolinite is one of the simplest clay minerals, with an ideal chemical formula $\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$, and a 1/1 structure where silicium (Si^{4+}) and aluminium (Al^{3+}) are the structural cations in the tetrahedral and octahedral layers, respectively. (For more detailed information see [17]).

The commercial kaolinite (Argiletz, Lizy-sur-Ourcq, France) given to the rats was prepared as compact blocks similar in size to the standard food pellets: kaolinite powder was mixed with distilled water and dried in an oven for 2 days at 37 °C to give blocks, which were fragmented into centimetric size pieces. Food and clay pellets were then put in separate pots and renewed every day. Approximately, 50 g of kaolinite per rat was available every day of complementation.

Experimental sets

Seven days is the most frequent maximal duration of clay treatment for diarrhoea, but chronic clay complementation is also commonly used in animal production and is seen in wildlife during geophagic behaviour. Therefore, two experimental sets of kaolinite complemented rats were used. The first set was fed kaolinite ad libitum for 7 days (Kao7, $n = 5$) and the second one for 28 days (Kao28, $n = 10$). All animals were euthanized after 7 or 28 days of experimentation and compared with normally-fed rats (NF, $n = 5$).

Intestinal sampling

Euthanasia was conducted by decapitation following concussion approved by the local Veterinary Services for Animal Care. After sacrifice, the jejunum, the most absorptive part of small intestine, was rapidly dissected and samples were prepared specifically according to the distinct methods of study.

The instrument for scanning electron microscopy was a Philips XL30 ESEM (FEI, Eindhoven, Netherlands), equipped with an Everhart-Thornley secondary electron detector and a LaB6 filament, and combined with a PGT 'Spirit' EDX microanalysis system (Princeton Gamma-Tech, Princeton, NJ, USA). Samples were chemically fixed with paraformaldehyde (3%) for 4 hours, then washed in a phosphate buffer solution (PBS) and directly observed using the environmental low vacuum or 'wet' mode (ESEM). Relative humidity at the sample surface was held at 17% by maintaining the sample chamber at room temperature (20 °C) and pressure at 3 Torr. For CSEM analyses (or high vacuum mode) on the same instrument, chemically fixed samples were dehydrated, rapidly bathed in hexamethyldisilazane (HMDS) and gold-coated (Sputter Coater S150A; Edwards High Vacuum, Crawley, England) 3 min at 50mV. Surface observations were made at 10–20 kV. Elemental composition (spot or 2D map) was determined using the combined ESEM/EDX mode. The acquisition time for the elemental composition was set at 100 s with a dead time of 10–15%.

For TEM analyses, samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH = 7.4) for 2 h at 4 °C. Pieces were subsequently post-fixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated before being embedded in Araldite 502 resin (EMS). Semi-thin ($\approx 1.5 \mu\text{m}$) and ultra-thin ($\approx 90 \text{ nm}$) sections were placed on poly-L-lysine-coated slides or TEM copper grids respectively. Semi-thin sections were stained with Toluidin Blue, and observed using AxioPlan 2 Imaging light microscope combined with AxioVision software (Carl Zeiss MicroImaging SAS, LePecq, France). Toluidin Blue stained sections were used for morphometric observations. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, before examination with a TEM H-7500 (Hitachi, Tokyo, Japan) at 60 kV combined with a digital camera AMT (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA, USA).

Morphometric measurements

The villi thickness (10 villi per animal), enterocyte width (distance between tight junctions), the microvilli length (5–10 microvilli) and their densities (number of microvilli per μm) were measured using the SigmaScan software (Jandel Scientific Inc., San Rafael, CA, USA) on the LM and TEM images (enterocyte width and microvilli measurements were made just under the third upper part of the entire villus length). After ultramicrotomy, residual epoxy block faces were used for in situ elemental analyses using the ESEM/EDX mode [18].

Data obtained from NF rats and those complementing their diet with kaolinite were compared. Statistical comparisons of the experimental data were performed by using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test by means of the SigmaStat software (Jandel Scientific Inc., San Rafael, CA, USA). Data are presented as mean \pm SD. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Proteomic analyses

For 2DE, mucosa was collected from dissected jejunum using a glass slide and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until use. Considering the variable kaolinite ingestion among rats, individuals with similar mean kaolinite daily uptake were selected for further analyses. Frozen mucosa was grinded in a Mikro-Dismembrator S (Sartorius AG, Göttingen, Germany) and the resulting powder was suspended in Tris buffer 20 mM pH 8 containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS and a cocktail of protease inhibitors (Complete™, 1 tablet/50 mL; Roche AG, Rotkreuz, Switzerland). After two cycles of incubation (4 °C, 15 min)/vortex (30 s)/sonication (20 °C, 5 min),

proteins were precipitated with acetone overnight at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. After centrifuging samples at 10 000 *g* for 30 min at 4 °C, the protein pellet was solubilized in the same buffer, using up to five cycles of incubation/vortex/sonication as before. Prior to 2D gel electrophoresis, samples were centrifuged (9500 *g*, 5 min, 20 °C), and DTT (20 mM), Biolytes 3–10 (0.2%; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and bromophenol blue (0.005%) were added.

Sample volumes were adjusted to analyse the same amount of protein for each set of experiments (300 or 600 μg). Isoelectric focusing (IEF) and sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were performed as previously described with the following modifications [19]. After active rehydration (50 V, overnight), IEF was performed following four steps: 1st voltage ramping (50–200 V in 1 h), 2nd ramping (200–1000 V in 1 h), 3rd ramping (1000–5000 V in 10 h) and focusing (5000 V, for a total of 80 kWh). Spots were detected by blue silver staining [20].

Gel images were captured using the GS-800™ Calibrated Densitometer and analyzed with PDQuest™ software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The protein content of each spot was determined by its relative quantity normalized by the total density in gel image. Statistical analyses were performed on both classes (NF, Kao28): three gels for each condition repeated for different amount of loaded protein.

Spots of interest (class ratios ≥ 5 , Student's *t*-test controlled ($P < 0.05$) and differences visually examined) were manually excised from the gels. Then, in-gel digestion, matrix assisted laser desorption ionisation–time of flight (MALDI-TOF) mass measurement and database searches were carried out as previously described [21].

RESULTS

Kaolinite consumption

Over the first 7 days, for all complemented rats ($n = 15$), the mean daily uptake was $24.3 \pm 1.5 \text{ g/day}$ for food and $3.4 \pm 1.3 \text{ g/day}$ for kaolinite that represents around 9.6% of clay in daily solid eaten fraction from the 3rd to the 7th day, with the highest kaolinite ingestion on the first day ($6.3 \pm 7.6 \text{ g/day}$, $15.9 \pm 19.6\%$ of clay in solid eaten fraction). Kaolinite uptake differed among rats but was repetitive over time for a same individual. More or less whitely coloured faeces were also used as an indication of kaolinite ingestion.

Kao28 rats ($n = 10$) also ate clay everyday but with highly variable amounts among individuals and over

time. The mean daily uptake was 1.1 ± 0.4 g/day ($n = 8$), equivalent to around 4.1% of clay in daily solid eaten fraction, from the second day to the end of the experiment (13.8% the first day). Two individuals, compared with the other animals, had a much higher daily consumption (11.4 ± 0.6 g/day), equivalent to around 29.8% of clay in daily solid eaten fraction from the second day to the end of the experiment (36.8% the first day). Mean food consumption was 25.6 ± 2.6 g/day ($n = 10$) and weight gain over the 28 days of the experiment was 93.2 ± 16.3 g. These two parameters were similar for the 10 tested animals despite of the different kaolinite uptake. However, they were not statistically different from NF rats (97.0 ± 10.5 g, 24.4 ± 1.7 g/day respectively).

Intestinal mucosa

Jejunal samples from NF (Figure 1a) and kaolinite-complemented rats (Figure 1b) were observed by ESEM (after slight fixation but still wet and uncoated). Without clay ingestion, the intestinal mucosa was typical of NF rats (Figure 1a). After clay ingestion, numerous mineral particles covered the intestinal mucosa in patches (Figure 1b), most often located at the tip and along the sides of the intestinal villi (Figure 1c). In the thick kaolinite aggregates inside the mucus, the individual particles appeared disjointed and with altered edges (Figure 1d). CSEM observations revealed a more detailed aspect of the kaolinite particles in contact with the brushborder of the enterocytes. Compared with the reference non-eaten kaolinite with typical linear and sub-hexagonal shapes (Figure 1e), the residual particles dispersed at the tip of the villi (Figure 1f) presented many rounded sub-grains and deep indented edges (Figure 1g) and eroded surfaces (Figure 1h).

The ESEM/EDX elemental analysis performed directly on the flat surfaces of the intestinal villi allowed, by comparison with the signal for the numerous elements of the mucus, to correlate the signal for Al and Si elements with the location of rather well preserved kaolinite particles (Figure 2a). However, in some places, Al appeared diffused inside the mucous layer covering the surface of the villi, while Si appeared concentrated in some relics of kaolinite (Figure 2b). Moreover, elemental analyses on block faces, including section of intestinal mucosa, indicated the presence of Al and Si inside the intestinal mucosa (Figure 2c).

Compared with NF (Figure 3a) and Kao7 rats, histological observations of the tip of intestinal villi from all Kao28 rats revealed enlarged cellular bases along the

lacteals of the villi (Figure 3b). These enlarged bases were characterized by a clear cytoplasm, the absence of organites and visible apical delimitation (Figure 3c). Their presence increased the thickness of the villi by 14.4% (Table II). Compared with NF rats (Figure 3d), more numerous and large lipid droplets were observed entering the cells in Kao28 rats (Figure 3e). Intercellular spaces were also widened (Figure 3f). Compared with NF rats, the length of the microvilli of Kao7 was not different, but it had decreased by 22.8% in all Kao28 rats, including high kaolinite consumer animals (Table I). Moreover, both width of the enterocytes and the density of the microvilli were not significantly different in the three groups (Table I).

Protein variations

The optimization of sample preparation led to a well-resolved 2D map showing an average of 390 spots from 300 μ g loaded protein with molecular masses of between 17 and 95 kDa (10% SDS-PAGE), within a 5–8 pH range (Figure 4). The increase in loaded protein amount to 600 μ g resulted in the detection of 530 spots (not shown).

The reproducibility of 2D maps was analysed from independent samples in each set of experiments. For 85% of the spots from NF rat samples, the variation in intensity, as measured by PDQuest, was less than twofold and this value rose to 96% of all spots at the fivefold level. In the case of all Kao28 rat samples, the variation in intensity was less than twofold for 82% of the spots and less than fivefold for 97% of all spots. For comparison between NF and Kao28 samples, to be confident that variations observed were because of kaolinite consumption, we therefore decided to first consider differences at fivefold or more.

Analyses of 2D maps of two independent experiments ($n = 3$ gels for each condition, NF and Kao28 rats, repeated for 300 and 600 μ g loaded protein) showed similar variations between NF and Kao28 rats. These analyses revealed that the intensity of eight spots is strongly modified (≥ 5) after kaolinite consumption. Half are over-expressed (16, 17, 18 and 24, Figure 4), up to 39-fold, and half are repressed (1, 2, 3 and 7, Figure 4) up to 61-fold. These regulated spots were analysed using a classical MALDI fingerprint approach and the proteins were unambiguously identified (Table II). Among them, spots 16–18 correspond to fragments of cytokeratin 8 (CK8), which is a major constituent of intermediate filaments of the intestinal cytoskeleton [22]. For these spots, the experimental molecular weight values

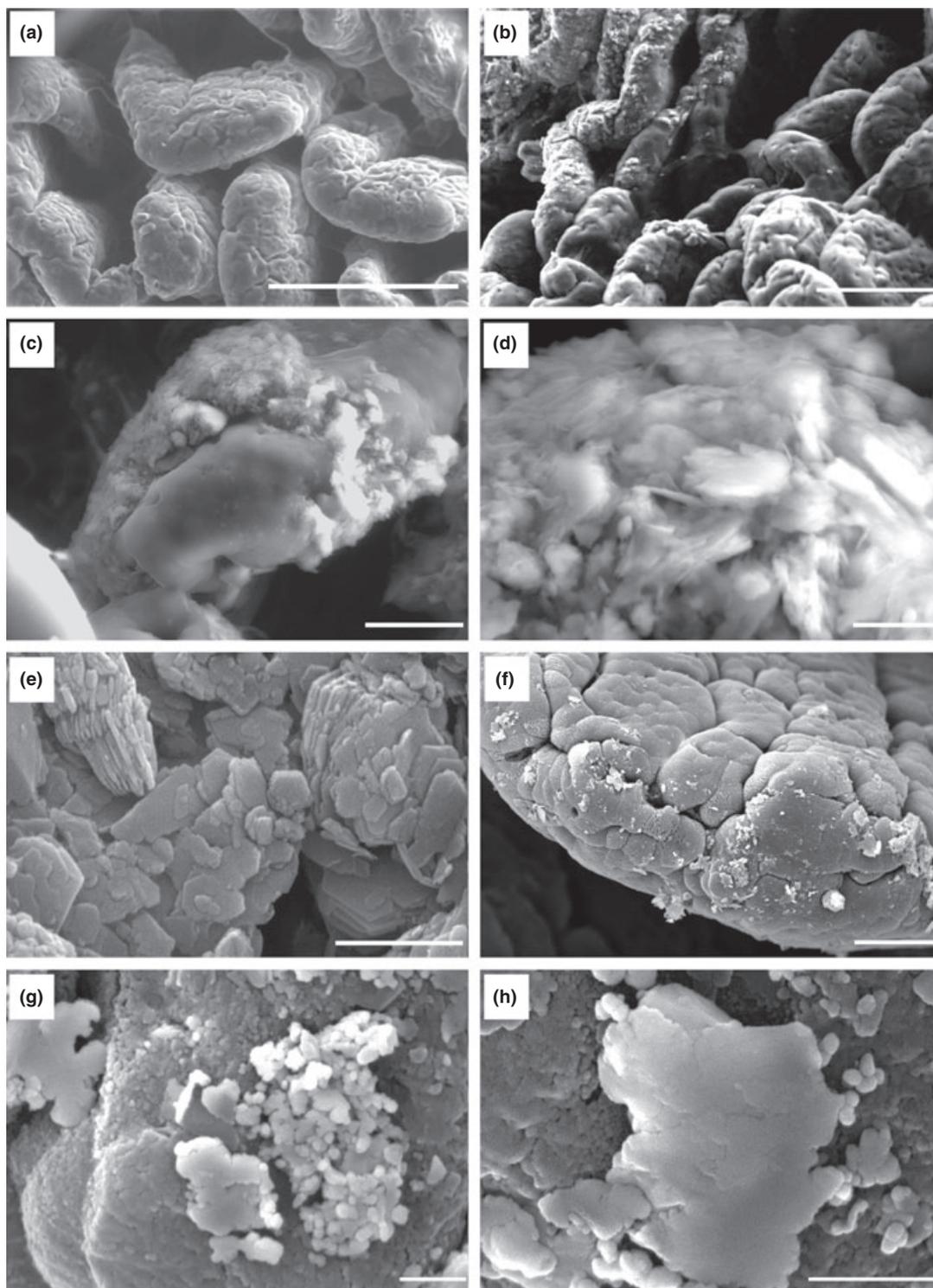


Figure 1 Environmental and conventional scanning electron microscopy images of jejunum from Kao28 rats. ESEM mode = (a, b, c, d). CSEM mode = (e, f, g, h). (a) Normally fed jejunal villi. Scale bar: 200 μm . (b) Villi covered with kaolinite for 28 days complemented animals. Scale bar: 100 μm . (c) Kaolinite covering villus. Scale bar: 20 μm . (d) Eroded kaolinite particles in mucus layer. Scale bar: 5 μm . (e) Kaolinite particles before ingestion. Scale bar: 2 μm . (f) Villus top with kaolinite particles. Scale bar: 20 μm . (g) Kaolinite particle altered into small sub-grains. Scale bar: 2 μm . (h) Eroded kaolinite particle. Scale bar: 2 μm .

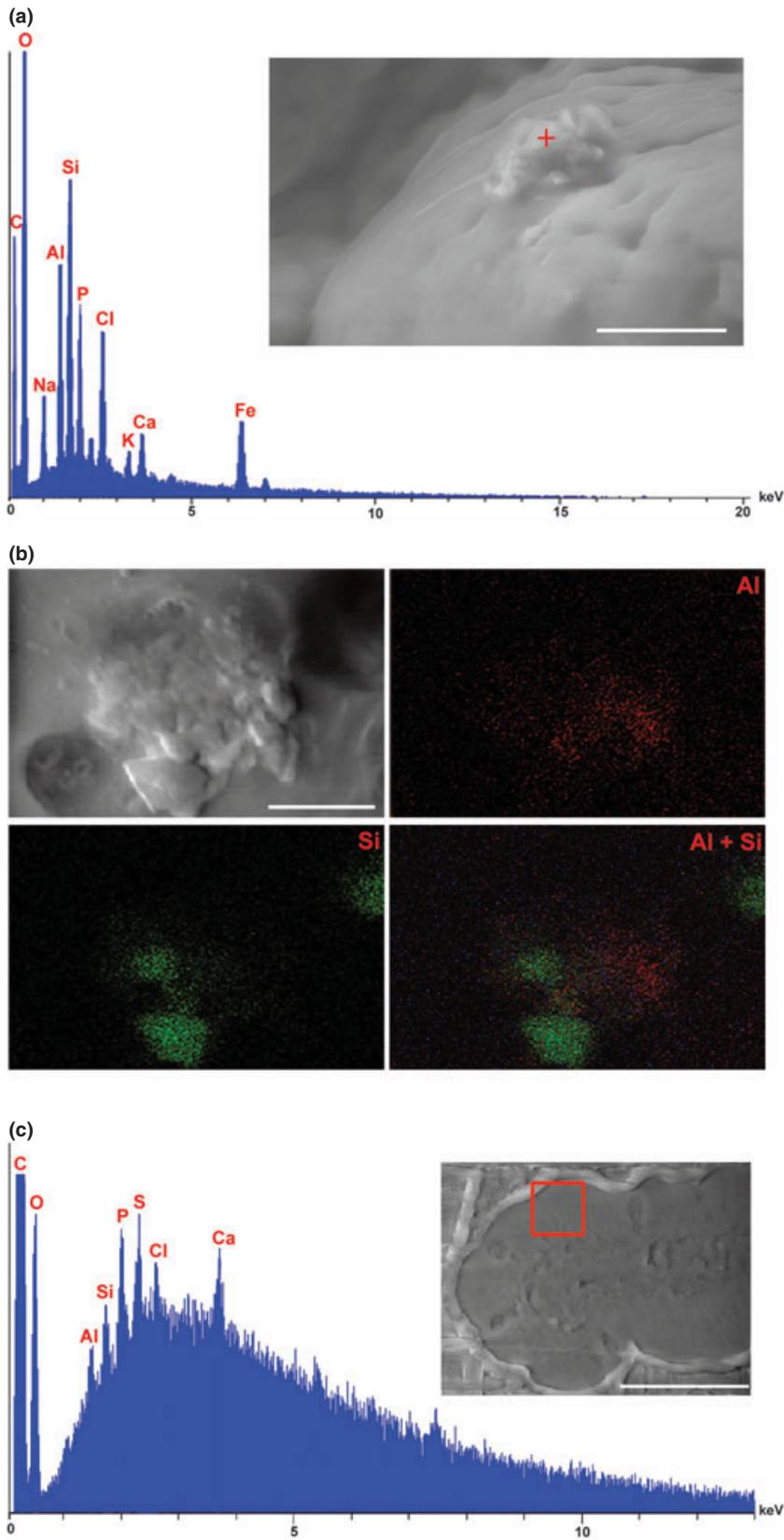


Figure 2 ESEM/EDX analysis of kaolinite particles and intestinal villi. (a) EDX spectrum of kaolinite particles on a villus surface (counts/keV). Scale bar: 20 μm. (b) EDX mapping of kaolinite aggregates, for elements Al and Si, and for Al + Si. Scale bar: 5 μm. (c) EDX spectrum of an intestinal villi section fixed in an Araldite resin block (block face) (counts/keV). Scale bar: 50 μm.

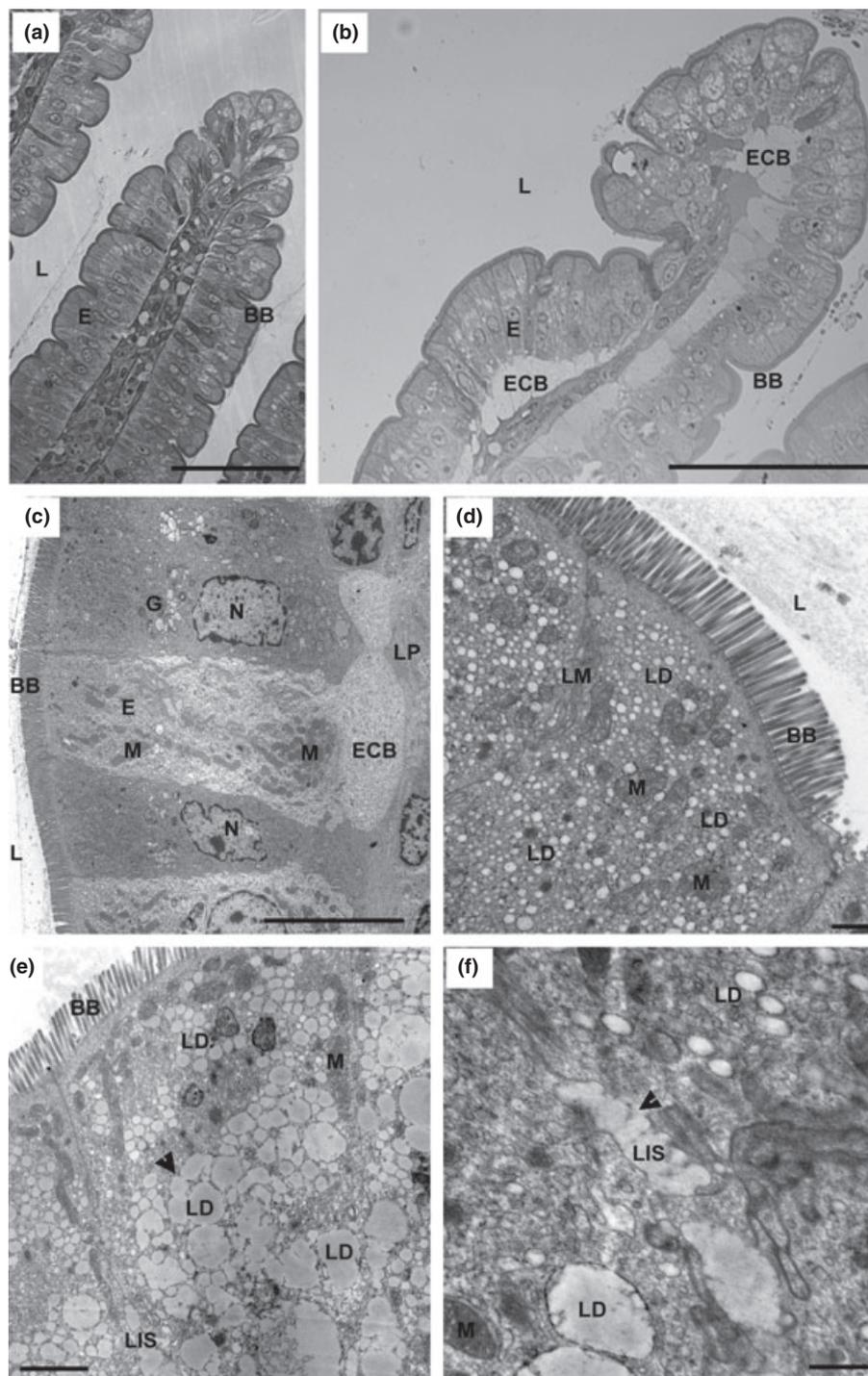


Figure 3 Histological observations of jejunal villi from Kao28 rats. (a, b) Thin sections observed with LM. (c, d, e, f) Ultrathin sections observed with TEM. (a, d) NF rat. (b, c, e, f) Kao28 rat. (a) Intestinal villus. Scale bar: 50 μ m. (b) Intestinal villus with wide vacuoles under the enterocytes. Scale bar: 50 μ m. (c) Enterocytes with vacuole at the base. Scale bar: 10 μ m. (d) Apical side of an enterocyte. Scale bar: 1 μ m. (e) Lipid droplets entering the apical side of an enterocyte and fusing together (arrow). Scale bar: 2 μ m. (f) Lipid entering in intercellular spaces (arrow) between enterocytes. Scale bar: 1 μ m. BB, brush border; E, enterocyte; ECB, enlarged cellular bases; G, golgi apparatus; L, lumen; LD, lipid droplets; LIS, lipids in intercellular spaces; LM, lateral membrane; LP, lamina propria; M, mitochondria; N, nucleus.

Table I Effects of kaolinite ingestion on jejunal villi thickness, apical enterocyte width and microvilli length and density.

Experimental sets	Villus thickness (μm)		Enterocyte apical width (μm)		Microvilli length (μm)		Microvilli density ($\mu\text{villi}/\mu\text{m}$)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
NF rats ($n = 5$)	66.5 ^a	4.0	5.4 ^a	0.2	1.5 ^a	0.2	8.0 ^a	1.1
Kao7 rats ($n = 5$)	68.9 ^a	2.2	4.8 ^a	1.2	1.4 ^{a,b}	0.2	8.3 ^a	1.6
Kao28 rats ($n = 10$)	77.8 ^a	8.6	4.2 ^a	1.0	1.2 ^b	0.2	9.7 ^a	2.3

Comparisons between data for NF, Kao7 and Kao28 rats obtained with one-way ANOVA and Tukey post hoc test ($P > 0.05$). For the thickness of villi:

a \neq b ($P = 0.048$). For microvilli length: a \neq b ($P = 0.020$).

observed on 2D gels were lower than those of the full-length protein (spots 1–3). The detailed analyses of peptide coverage obtained from MALDI mass fingerprinting indicated that the three CK8 fragments result from a cleavage between ²²³E and ²⁴¹R. Spots 16 and 18 correspond to C-terminally truncated forms of CK8 while spot 17 correspond to an N-terminally truncated form (Table II). In addition, the intensity of 20 spots was altered with a lower variation factor (two- to fivefold), from which 12 spots were identified. Among them two

protein fragments were characterized as before (spot 4: truncated CK8, spot 23: truncated HSP 70). Failure of identification for the other eight spots was mainly because of lack of signal in the MALDI mass spectrum.

DISCUSSION

The present data reveal that intestinal mucosa of laboratory rats that spontaneously ingest kaolinite exhibits morphological changes within the epithelial barrier and in the expression of several cytoskeleton proteins. NF rats and those eating a kaolinite complemented diet during 28 days showed a similar weight gain despite an average kaolinite consumption of 4.5% of total solid food eaten (as measured from the first day up to the end of the experiment). Earlier studies on rats showed that a 10% complementation of kaolinite to the food during 14 days increases body weight, with a preferential increase in the liver, heart and colon masses and a decrease in the small intestine mass [23]. Organ and body weight increases could be because of an increased fat store. Another possibility is an increased cell proliferation rate (hyperplasia) [24]. However, 3 days of a diet comprising 30% of kaolinite did not change the rate of cell proliferation in the small intestine [25].

Jejunal villi of animals with a clay complemented diet appear covered with kaolinite masses embedded within a thick mucus layer, directly in contact with the brush-border. Most of the alterations seen on the mineral particles could be because of the direct contact with acidic gastric secretions. EDX analyses on kaolinite relics inside the mucus suggest that the tetrahedral siliceous structure of kaolinite better resists to dissolution while Al from the octahedral structure diffuses in the surrounding mucus. EDX Al and Si traces obtained on block faces also indicate their presence inside the enterocytes. The release of these elements from the mineral structure to the intestinal mucus and sub-adjacent cells could be initiated by acid secretion in the stomach. In vitro, it has been shown that Al can be partially released from the octahedral layer of kaolinite particles by acidic attacks [26]. This well-known neurotoxic element crosses the intestinal barrier by binding to glycoproteins in the mucus-glycocalyx layer [27], then reaches the general circulation and is preferentially stocked in various organs such as the brain, liver and kidneys [28]. Al leads to some diseases such as haematological changes, bone demineralization and neurodegenerescence [29], symptoms associated to Alzheimer's disease.

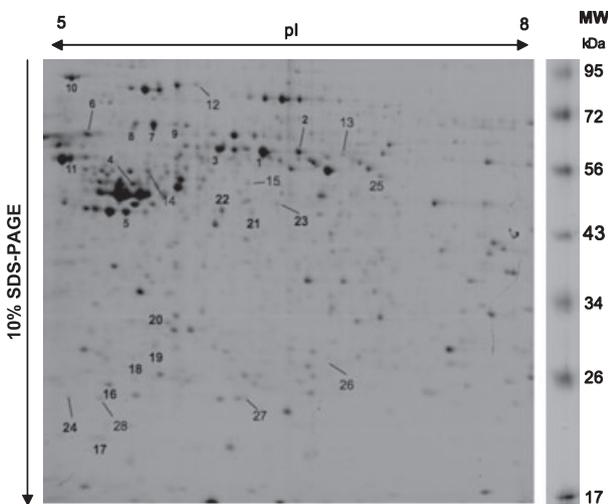


Figure 4 Representative 2D map of intestinal mucosa proteins from NF rats. Intestinal mucosa proteins (300 μg) were separated on 2D gel electrophoresis (1st dimension: IEF pH range 5–8; 2nd dimension: 10% SDS-PAGE). A total of 390 spots were detected after colloidal CBB staining. Labelled spots are those regulated in Kao28 as compared with NF rats. Spots 1–15: downregulated; spots 16–28: upregulated. In bold, proteins identified by MALDI-TOF mass spectrometry. See Table II for details.

Table II Identification of intestinal regulated proteins after kaolinite consumption.

Spot	Protein identity	Accession number	NF	Kao 28	Ratio	Calc MW	Calc pl
1	Cytokeratin 8	AAA19668			-- (61)	53	5.5
2	Cytokeratin 8	AAA19668			-- (29)	53	5.5
3	Cytokeratin 8	AAA19668			-- (10)	53	5.5
4	Cytokeratin 8 (30–403)	AAA19668			–	53	5.5
5	Keratin complex 1	NP955792			–	45	5.2
6	Tubulin α	NP035784			–	50	4.9
16	Cytokeratin 8 (22–222)	AAA19668			++ (39)	53	5.5
17	Cytokeratin 8 (242–403)	AAA19668			++ (15)	53	5.5
18	Cytokeratin 8 (13–222)	AAA19668			++ (6)	53	5.5
19	Actin γ	CAM27034			+	33	5.2
20	Actin γ	CAM27034			+	33	5.2
21	Actin β	BAE36758			+	42	5.2
22	Actin β	BAE36758			+	42	5.2
7	HSP 60	CAA37654			-- (5)	58	5.4
8	HSP 60	CAA37654			–	58	5.4
9	HSP 60	CAA37654			–	58	5.4
10	HSP 70	NP037215			–	71	5.4
23	HSP 70 (3–357)	NP037215			+	71	5.4
11	ATP Synthase β	AAB02288			–	51	4.9
24	Ca ²⁺ -binding protein P22	XP575321			++ (5)	28	5.1

Spot labels: numbers according to those in Figure 4. Ratios of spots average intensities for each condition are determined, thanks to PDQuest analysis. ++ (x): protein which expression level increased at least fivefold (the variation rate is indicated in brackets). -- (x): protein which expression level decreased at least fivefold (the variation rate is indicated in brackets). +: protein which expression level increased with a variation rate between two and fivefold. -: protein which expression level decreased with a variation rate between two and fivefold. For spots 4, 16, 17, 18 and 23 (protein fragments), the sequence coverage observed by MALDI fingerprint of tryptic peptides is indicated in brackets. Ratio values are from 600 μ g protein gels. Calculated MW and pl are from NCBI database.

Although spontaneous kaolinite uptake varies considerably among individuals, similar enlarged cellular bases were observed in all animals after 28 days complementation but not after 7 days. These enlarged bases of the cells contributed to the increase in villi thickness. They were present when food and kaolinite were available together, thus suggesting that kaolinite ingested as food complement optimizes intestinal absorption, and/or cellular plasticity depending on the movement of the chorion. Moreover, some lipid droplets were seen in the enterocytes. Lipids enter the cell passively by endocytosis through the apical membrane of the enterocyte and move further down to the median part of the cells to form larger lipid droplets. Concomitantly, intercellular spaces are also widened. This is consistent with literature indicating that ingested clay particles can absorb water and drain faecal matter, consequently slowing down intestinal transit [10]. This effect is amplified when nutrients are present in the lumen, possibly leading to an increased metabolic absorption.

Usually, during this process, the apical surface of the cells that appears as a dense brushborder elongates its microvilli. The dynamic size variation of the intestinal villi and cell microvilli is known as a flexible way to

modulate nutrient absorption and fat uptake in particular [30]. The length of microvilli in Kao7 was not modified, but it decreased significantly by 22.8% in Kao28 rats compared with NF rats, but the width of the enterocytes and the density of the microvilli are not modified. Cell absorption area, therefore, is reduced, limiting thus passive fat absorption. It is also known that animals fed with a high-fat diet show a reduced length (28%) of microvilli with a slight diameter increase (12%), significantly reducing the surface area [31]. Different degrees of kaolinite consumption, basal or high, have induced the same morphological changes.

In addition, the observed variation (up- or downregulation) of numerous isoforms of CK8, keratin complex, α -tubulin, β - and γ -actin after 28 days of clay ingestion reflects a modification of the cytoskeleton of the intestinal cells and fits with the observed morphological changes. The upregulated Ca²⁺-binding protein P22 is also known to be involved in the regulation of microtubule organization [32]. Finally, the regulation of HSP60 and HSP70, two members of the so-called heat-shock or stress protein family, is consistent with their involvement in folding, assembly/disassembly and heat shock/protection processes of the cytoskeleton [33]. Moreover, HSPs

are capable of mediate other cellular processes, in particular in preventing apoptosis [34]. Interestingly, three N-terminally or C-terminally truncated fragments of CK8 were induced by kaolinite ingestion, concomitantly with a decrease in CK8 expression level. As apoptosis is known to activate proteolytic caspase cascades, it could be responsible for such observations. This would also fit with the observed decrease in HSP 60 and 70 expression level. However, LM, SEM and TEM analyses of NF and Kao28 rats showed no differences in cell apoptosis at the tip of the villi.

In contrast to type I keratins which undergo caspase-mediated degradation during apoptosis, CK8 belongs to the type II keratin family, which lacks the L1–2 consensus caspase cleavage sequence and is therefore resistant to proteolysis [35]. CK8 does possess other potential caspase recognition sequences (⁶⁷LEVD and ²⁴³LDMD) that do not appear to be cleaved in our study because of kaolinite ingestion [36]. As we showed that the cleavage of CK8 is located between residues ²²³E and ²⁴¹R, while the potential caspase cleavage sites ⁶⁹D and ²⁴⁶D are intact, the hypothesis of caspase degradation can be excluded.

According to the literature, CK8 degradation could also be ubiquitin-mediated as observed in human colorectal carcinomas [37] or and uranium-treated lung cells [38]. However, the pattern of CK8 fragments after kaolinite ingestion is totally different to those observed in these studies where all CK8 fragments are observed in a range of 40–48 kDa. Without excluding the ubiquitin hypothesis, the CK8 fragments induced by kaolinite ingestion can be explained by a specific cleavage between ²²³E and ²⁴¹R. Therefore, the results of proteomic analyses in Kao28 rats support the hypothesis of a modification in structure of the intestinal cytoskeleton without extensive apoptosis, probably correlated to the morphological changes observed. The functional significance of these proteomic data needs further investigations to see if paracellular permeability is modified.

In summary, our study reveals that ingested kaolinite particles in contact with the intestinal mucosa after a free consumption and as a complement to a normal diet are transformed during their transit through the digestive system. Their presence in the intestine is correlated to morphological changes in the mucosa and to a higher level of lipid droplets in the enterocytes at the villi tip. These changes were induced after regular clay ingestion and were observed after 28 days but not after 7. The kinetic of mucosa response to clay ingestion needs to be studied in future works. Moreover, possible interactions among clay particles and the intestinal

mucosa and/or food need to be further investigated as well as the effects induced by the presence of Al within the intestinal wall. To conclude, it seems very interesting to evaluate the dose-effect of clay ingestion, for example by incorporating a controlled dose of clay in food pellets.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank V. Demais for TEM technical assistance (Plateforme de Microscopie in vitro, Institut de Neurosciences, Strasbourg), A. Hranitzky for animal care and A. van Dorsselaer (LSMBO, DSA) for the access to the mass spectrometry facilities. Financial support for this study was provided by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), the Fondation de France and the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

- Mascolo N., Summa V., Tateo F. Characterization of toxic elements in clays for human healing use. *Appl. Clay Sci.* (1999) **15** 491–500.
- Wilson M.J. Clay mineralogical and related characteristics of geophagic materials. *J. Chem. Ecol.* (2003) **29** 1525–1547.
- Moré J., Bénazet F., Fioramonti J., Droy-Lefaix M.T. Effects of treatment with smectite on gastric and intestinal glycoproteins in the rat: a histochemical study. *Histochem. J.* (1987) **19**(Suppl. 12) 665–670.
- Trckova M., Matlova L., Dvorska L., Pavlik I. Kaolin, bentonite, and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. *Vet. Med. – Czech.* (2004) **49** 389–399.
- Takeda N., Hasegawa S., Morita M., Matsunaga T. Pica in rats is analogous to emesis – an animal-model in emesis research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1993) **45** 817–821.
- Yamamoto K., Takeda N., Yamatodani A. Establishment of an animal model for radiation-induced vomiting in rats using pica. *J. Radiat. Res.* (2002) **43** 135–141.
- Yamamoto K., Ngan M.P., Takeda N., Yamatodani A., Rudd J.A. Differential activity of drugs to induce emesis and pica behavior in *Suncus murinus* (house musk shrew) and rats. *Physiol. Behav.* (2004) **83** 151–156.
- Dominy N.J., Davoust E., Minekus M. Adaptive function of soil consumption: an in vitro study modeling the human stomach and small intestine. *J. Exp. Biol.* (2004) **207** 319–324.
- Knezevich M. Geophagy as a therapeutic mediator of endoparasitism in a free-ranging group of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Am. J. Primatol.* (1998) **44** 71–82.
- Castaing J., Noblet J. Effect of addition of sepiolite on digestive utilization of feed and performance in growing pigs. *Journées Rech. Porcine en France* (1997) **29** 213–220.
- Mallet S., Delord P., Juin H., Lessire M. Effect of in feed talc supplementation on broiler performance. *Anim. Res.* (2005) **54** 485–492.

- 12 Krishnamani R., Mahaney W.C. Geophagy among primates: adaptive significance and ecological consequences. *Anim. Behav.* (2000) **59** 899–915.
- 13 Vermeer D.E., Frate D.A. Geophagia in rural Mississippi – environmental and cultural contexts and nutritional implications. *Am. J. Clin. Nutr.* (1979) **32** 2129–2135.
- 14 Altmann G.G., Leblond C.P. Factors influencing villus size in the small intestine of adult rats as revealed by transposition of intestinal segments. *Am. J. Anat.* (1970) **127** 15–36.
- 15 Bailey S.W. Summary of recommendations of AIPEA nomenclature committee on clay minerals. *Am. Mineral* (1980) **65** 1–7.
- 16 Brindley G.W., Brown G. (Eds). *Crystal structures of clay minerals and their x-ray identification*. Mineralogical Society, London, 1984, 495 pp.
- 17 Bergaya F., Theng B.K.G., Lagaly G. (Eds). *Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science 1*, Elsevier, Amsterdam, 2006, 1224 pp.
- 18 Laue M., Kiefer G., Pütz N., Mestres P. Use of environmental scanning electron microscopy to study a resin block face. *Eur. Microsc. Anal.* (2005) **97** 13–15.
- 19 Levy F., Bulet P., Ehret-Sabatier L. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. *Mol. Cell Proteomics* (2004) **2** 156–166.
- 20 Candiano G., Bruschi M., Musante L. et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* (2004) **25** 1327–1333.
- 21 Sizova D., Chaurbaut E., Delalande F. et al. Proteomic analysis of brain tissue from a Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Neurobiol. Aging* (2007) **28** 357–370.
- 22 Coulombe P.A., Omary M.B. Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2002) **14**(Suppl. 1) 110–122.
- 23 Sakata T. Effects of indigestible dietary bulk and short chain fatty-acids on the tissue weight and epithelial-cell proliferation rate of the digestive-tract in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (1986) **32** 355–362.
- 24 Goodlad R.A., Lenton W., Ghatei M.A., Adrian T.E., Bloom S.R., Wright N.A. Effects of an elemental diet, inert bulk and different types of dietary fiber on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and relationship to plasma gastrin, enteroglucagon, and Pyy concentrations. *Gut* (1987) **28** 171–180.
- 25 Goodlad R.A., Ratcliffe B., Fordham J.P., Wright N.A. Does dietary fiber stimulate intestinal epithelial-cell proliferation in germ free rats. *Gut* (1989) **30** 820–825.
- 26 Cabrera F., Talibudeen O. The release of aluminium from aluminosilicate minerals I. Kinetics. *Clay Clay Miner.* (1978) **26** 434–440.
- 27 Whitehead M.W., Farrar G., Christie G.L., Blair J.A., Thompson R.P., Powell J.J. Mechanisms of aluminium absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* (1997) **65** 1446–1452.
- 28 Mahieu S.T., Gionotti M., Millen N., Elias M.M. Effect of chronic accumulation of aluminium on renal function, cortical renal oxidative stress and cortical renal organic anion transport in rats. *Arch. Toxicol.* (2003) **77** 605–612.
- 29 Roig J.L., Fuentes S., Colomina M.T., Vicens P., Domingo J.L. Aluminium, restraint stress and aging: behavioural effects in rats after 1 and 2 years of aluminium exposure. *Toxicology* (2006) **218** 112–124.
- 30 Habold C., Reichardt F., Foltzer-Jourdainne C., Lignot J.H. Morphological changes of the rat intestinal mucosa in relation to body stores depletion during fasting and after refeeding. *Eur. J. Physiol.* (2007) **455**(Suppl. 2) 323–332.
- 31 Goda T., Takase S. Effect of dietary-fat content on microvillus in rat jejunum. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (1994) **40** 127–136.
- 32 Andrade J., Zhao H., Titus B., Timm Pearce S., Barroso M. The EF-hand Ca(2+)-binding protein p22 plays a role in microtubule and endoplasmic reticulum organization and dynamics with distinct Ca(2+)-binding requirements. *Mol. Biol. Cell* (2004) **15** 481–496.
- 33 Liang P., MacRae T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* (1997) **110** 1431–1440.
- 34 Beere H.M. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *J. Clin. Invest.* (2005) **115** 2633–2639.
- 35 Marceau N., Schutte B., Gilbert S. et al. Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. *Exp. Cell Res.* (2007) **313** 2265–2281.
- 36 Ku N.O., Omary M.B. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* (2001) **276** 26792–26798.
- 37 Nishibori H., Matsuno Y., Iwaya M. et al. Human colorectal carcinomas specifically accumulate Mr 42,000 ubiquitin-conjugated cytokeratin 8 fragments. *Cancer Res.* (1996) **56** 2752–2757.
- 38 Malard V., Prat O., Darrouzet E., Bérenguer F., Sage N., Quéméneur E. Proteomic analysis of the response of human lung cells to uranium. *Proteomics* (2005) **5** 4568–4580.



Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien

Service de reprographie
Michel Schlée

23, rue du Loess
67037 Strasbourg Cedex 2