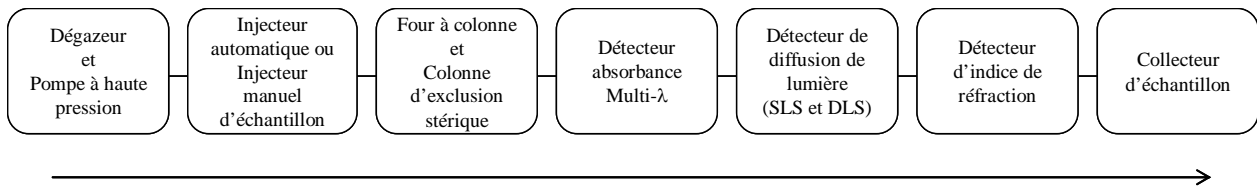


La plateforme de caractérisation PAOL (*Protein Analysis On Line*) comporte une série de plusieurs composants :



Le **dégazeur** « **SHIMADZU DGU 20A** » permet de dégazer les tampons, préalablement filtrés à 0.1µm, avant le passage dans la pompe et sur les colonnes.

La **pompe** « **SHIMADZU LC-20AD** » permet de générer un flux de tampon à travers les différents composants de PAOL. Le flux est caractérisé par un débit constant (en général 0.5 ml/min) et de faibles pulsations, lors du mouvement des pistons, car les détecteurs sont très sensibles aux fluctuations (changement de débit, vibrations ...).

L'**injecteur automatique d'échantillon** « **SHIMADZU SIL-20AC HT** » permet de stocker jusqu'à 70 échantillons, entre 4 et 40°C, et de les injecter. La boucle d'injection a un volume de 100 µl pouvant être couplée à une boucle de 2 ml ; le volume d'injection est typiquement de 20µl.

La **colonne d'exclusion stérique** sert à séparer physiquement les différentes espèces en solution. Les colonnes utilisées à l'IBS sont : « **Protein KW-804, Protein KW-803 et Protein KW-802.5**, avec, en garde, Protein KW-G (Shodex) », « **WTC 050N5G**, avec, en garde, WTC 050N5 (Wyatt) », **Superdex 200 et 75 10/300 GL et Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare)**. Elles sont remplies de silice ou de polymère et ont des gammes de séparation différentes. Les « petites » particules peuvent entrer dans les pores de la matrice et sont éluées de la colonne plus tard que les particules plus grandes : Il y a donc séparation.

Le **four à colonne** « **XL T-01** » (WynSep) maintient les colonnes à température contrôlée entre 10° et 30°C.

Le **détecteur d'absorbance de lumière multi-λ** « **SHIMADZU SPD-M20A** » mesure, au cours de l'éluion, l'absorbance entre 190 et 700 nm. Trois longueurs d'onde sont envoyées au logiciel ASTRA. On utilise en général $\lambda = 280$ nm pour déterminer la concentration d'une protéine en solution, avec : $A_{280nm} = \epsilon_{280nm} \times l \times c$

Le **détecteur de diffusion de lumière à trois angles (SLS : Static Light Scattering = MALLS : Multi Angle Lazer Light Scattering)** « **WYATT mini DAWN TREOS** » : La solution passe par une cellule de mesure et est traversée par un faisceau laser ($\lambda = 658$ nm). La lumière diffusée est mesurée à trois angles différents (41,9°; 90° et 138,1°).

D'après le modèle de Rayleigh-Debye-Gans, l'intensité I de la lumière diffusée par la solution est directement proportionnelle à la concentration totale du soluté c (en g/ml) et à sa masse molaire moyenne M_w :

$$I = k \times c \times M_w \times \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad \text{avec} \quad k = \frac{4\pi n_0^2}{\lambda^4 N_A}$$

qui dépend de l'indice de réfraction n_0 du solvant, de λ et du nombre d'Avogadro N_A . (dn/dc) représente la variation de l'indice de réfraction de la solution avec la concentration. La concentration étant déterminée indépendamment, à partir du signal du détecteur RI. On peut déterminer M_w à partir de l'intensité de la lumière diffusée.

Pour des solutés des tailles > 20 nm, l'intensité diffusée décroît avec l'angle de diffusion θ et la détermination de M_w se fait par extrapolation à l'angle de diffusion nul. C'est la raison pour laquelle on mesure l'intensité de la lumière diffusée à trois angles différents.

Le **détecteur de diffusion de lumière (DLS : Dynamic Light Scattering = QELS : Quasi Elastic Light Scattering)** « **WYATT DynaPro Nanostar** » mesure la fluctuation de l'intensité lumineuse diffusée à 90°, qui est récupérée par une fibre optique issue du détecteur mini DAWN TREOS. Il peut aussi être utilisé seul (avec des UVettes ou une cuve de Quartz et son propre laser).

Les fluctuations d'intensité lumineuse permettent de déterminer une fonction d'auto corrélation $g^{(2)}(\tau)$. Pour une solution homogène, $g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta \times e^{-2 \times D_t \times q^2 \times \tau}$ avec D_t le coefficient de diffusion et q le vecteur de

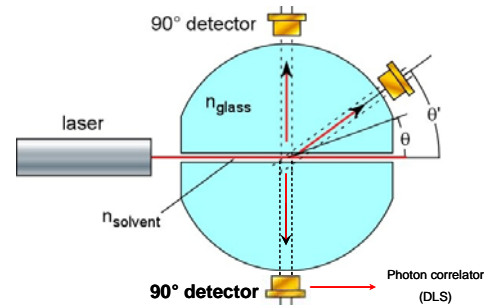
$$\text{diffusion} \quad q = \frac{4\pi \times n_0}{\lambda_0} \times \sin \frac{\theta}{2}$$

D_t est lié au rayon hydrodynamique R_h , par la relation $D_t = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$ avec k : constante de Boltzmann ; T : température (Kelvin) ; η : viscosité du solvant.

Le MALS analyse la moyenne de l'intensité lumineuse I , diffusé par l'échantillon, sur des temps longs (1 s) et en déduit la masse moléculaire M_w (et le rayon de giration R_g si > 20 nm).

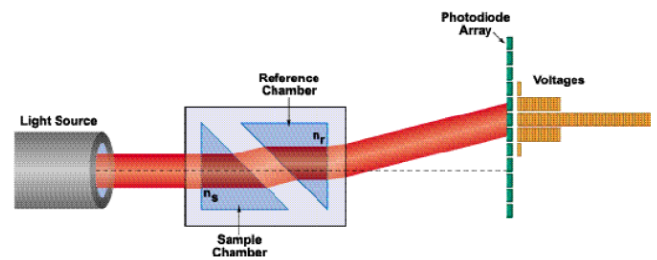
Le QELS analyse les fluctuations de l'intensité lumineuse, I , diffusée par l'ensemble des molécules présentes dans l'échantillon, sur des temps courts ($10^{-8} - 10^{-9}$ s) et en déduit le coefficient de diffusion D_t et donc le rayon hydrodynamique R_h .

Fig. 1 : Schéma du détecteur MALLS (couplé au détecteur QELS) :



Le détecteur d'indice de réfraction différentiel « WYATT Optilab rEX » RI, (*Refractive Index*) mesure la différence d'indice de réfraction entre la chambre échantillon et la chambre de référence.

Fig. 2 : Schéma du détecteur RI :



Le détecteur travaille avec un laser de la même longueur d'onde que le détecteur MALS, le faisceau traverse deux cellules à section triangulaire. La première cellule, appelée chambre échantillon (*Sample Chamber*), contient la solution en sortie de colonne qui circule continuellement, la deuxième cellule contient la solution de référence. En sortant de la chambre échantillon, ainsi qu'en entrant dans la chambre de référence, le faisceau subit une déviation. Si les indices de réfraction dans les deux cellules sont identiques, cette deuxième déviation annule exactement la première, le faisceau n'a donc pas changé sa direction initiale, il est seulement décalé. Même un petit écart entre l'indice de réfraction n_s de la chambre échantillon et n_r de la chambre de référence a pour effet que le faisceau change de direction. Ce changement est converti en unité de différence d'indice de réfraction Δn . Cette différence permet de déterminer la concentration à l'aide de la relation $\Delta n = n_s - n_r = \left(\frac{dn}{dc}\right) \times c$

Pour les protéines, la valeur de (dn/dc) est 0,186 ml/g ; pour les protéines membranaires 0,187 ml/g ; pour les détergents, sucres, lipides et ARN, le (dn/dc) reste du même ordre de grandeur (0.08-0.2 ml/g).

L'analyse des protéines membranaires utilise la combinaison des signaux d'absorbance, du RI et du LS.

Le Collecteur d'échantillon « SHIMADZU FRC-10A » permet de collecter et de conserver des fractions après élution à température contrôlée (4 à 35°C). Il peut être asservi à la détection en absorbance.

DATE ET VISA DU RESPONSABLE APPAREIL : 13/05/2013 ; ALINE LE ROY ET C. EBEL