



**HAL**  
open science

## Méthodes et dosages de protéines : guide pratique

Eliane Cases, Philippe Cayot

► **To cite this version:**

Eliane Cases, Philippe Cayot. Méthodes et dosages de protéines : guide pratique. Educagri éditions, pp.256, 2024, 9791027505708. <hal-04593649>

**HAL Id: hal-04593649**

**<https://institut-agro-dijon.hal.science/hal-04593649v1>**

Submitted on 30 Jan 2026

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

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



HAL Authorization

---

# METHODES ET DOSAGES DE PROTEINES

---

## Guide pratique

Extraits (10 % du livre).

Auteurs : Éliane Cases et Philippe Cayot

Editeur : Educagri éditions ; BP 87999 – 21079 DIJON cedex

Date d'édition : mai 2024

ISBN : 9791027505708 ; EAN13 : 9791027505708

256 pages.

## Sommaire

### Introduction générale 9

### Chapitre 1 • Méthode de Kjeldahl vs méthode de Dumas 13

- 1 ▶ Un peu d'histoire pour commencer 14
- 2 ▶ La méthode de Kjeldahl 17
  - Étape 1 : la minéralisation 19
  - Étape 2 : la distillation 21
  - Étape 3 : la titration « méthode directe » 23
  - Étape 4 : la titration « méthode indirecte » 26
  - Étape 5 : la détermination de la quantité de protéines 26
- 3 ▶ La méthode de Dumas 33

### Chapitre 2 • La méthode chimique (ou méthode sans équipement particulier) de dosage par le formol dite de Sorensen ou Formol Titration 39

- 1 ▶ Principes généraux des dosages d'amino-acides et de protéines, basés en premier lieu sur la modification des  $pK_a$  des fonctions protonables 40
- 2 ▶ Qu'est-ce que la « Formol Titration » ? 42
- 3 ▶ Description du dosage 43

### Chapitre 3 • Les méthodes « SPECTRO » (méthodes spectrométriques) 55

- 1 ▶ Quelques généralités 56

- 2 ▶ Les mesures directes d'absorbance dans l'ultraviolet à  $\lambda = 205$  et  $\lambda = 280$  nm 60
- 3 ▶ Les méthodes indirectes par interactions protéine-chromophore, complexation d'un chromophore ou formation d'un chromophore 70
  - a. Généralités 70
  - b. Utilisation d'un colorant acide azosulfonique : le Noir Amido 72
  - c. Utilisation d'un colorant acide azosulfonique : le bleu de Coomassie Brillant (BCB) ; la méthode de Bradford 75
  - d. Utilisation des quinones 82
  - e. Utilisation de la génipine 85
  - f. Utilisation de la ninhydrine 86
  - g. Utilisation du nitrophénol 89
  - Cas particulier : suivi d'une hydrolyse protéique 94
  - h. Utilisation du chlorure de dabsyl ou du chlore de Dansyl 97

#### **Chapitre 4 • Les méthodes indirectes par utilisation d'ions cuivriques 101**

- 1 ▶ La méthode du biuret 102
- 2 ▶ La méthode de Lowry 109
- 3 ▶ La méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) 113

#### **Chapitre 5 • Les méthodes indirectes par utilisation de métaux de transition : complexe fluorène-métal 121**

#### **Chapitre 6 • Les méthodes FLUO (ou méthodes fluorimétriques) 125**

- 1 ▶ Généralités 126
- 2 ▶ Fluorescence et utilisation du BCA 128
  - Première stratégie : rechercher la fluorescence propre du fluorophore 129
  - Seconde stratégie : utiliser l'effet quencher d'un fluorophore 130
- 3 ▶ Utilisation du O-phtalaldéhyde (OPA) 133
- 4 ▶ Utilisation de la fluoescamine 136
- 5 ▶ Utilisation de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) 138
- 6 ▶ Utilisation de l'oxadiazole 140
- 7 ▶ Utilisation de la scopolétine 142

#### **Chapitre 7 • Les méthodes utilisant la diffusion de la lumière ou Rayleigh Light Scattering Method 145**

- 1 ▶ Généralités 146
- 2 ▶ Utilisation du noir ériochrome R (Eriochrome Blue Black R, EBBR) 154
- 3 ▶ Utilisation du bleu de bromophénol (BromoPhenol Blue, BPB) 156
- 4 ▶ Utilisation du Sodium Lauroyl Sarcosinate (SLS) 159

- 5 ▶ Utilisation du CarboxyArsenAzo III (CAA III) 162
- 6 ▶ Utilisation du Bleu de Coomassie Brillant (BCB) 165
- 7 ▶ Utilisation du Cobalt (II) TetraSulfo-PhtaloCyanine (CoTSPc) 166
- 8 ▶ Entrée en scène d'un élément « Quencheur »... quand rien ne va plus 168
  - a. Utilisation du Bleu de Méthylène en présence de Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate 169
  - b. Utilisation du Rouge Eriochrome en présence de Sodium Dodecyl Sulfate 171
- 9 ▶ Si on résumait un peu... 172

## **Chapitre 8 • Et les autres méthodes, autres que chimiques ? 179**

- 1 ▶ Bilan des méthodes présentées 180
- 2 ▶ Généralités sur les méthodes physiques 182
- 3 ▶ Utilisation des analyses spectrales : comment s'y retrouver ? 183
  - a. Analyses spectrales dans les ultraviolets 184
  - b. Analyses spectrales dans les infrarouges 185
  - c. Les infrarouges à transformer de Fourier (FTIR) 189
  - d. Le proche infrarouge (Near Infra-Red, NIR) 191
  - e. L'infrarouge Raman (IR-Raman) 194
  - f. La Spectroscopie d'Émission Atomique de Plasma induit par un laser (LIBS) 196
  - g. Comparaison des techniques spectrales 199
- 4 ▶ Utilisation de méthodes séparatives 200
  - a. Isolement des protéines puis pesée : cas des protéines contenues dans un système solide 200
  - b. Isolement des protéines puis pesée : cas des protéines contenues dans un système liquide 201
  - c. La Chromatographie Liquide Haute Performance... ou Haute Pression (HPLC) 201
  - d. L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide polymérisé (PAGE) 204
  - e. L'électrophorèse capillaire (CE) 209
- 5 ▶ Le dosage des protéines par Immuno-Absorption par Enzyme Liée (Enzyme-Linked Immuno Assay, ELISA) 213
- 6 ▶ Utilisation de capteurs spécifiques des protéines 216
  - a. Utilisation des ondes acoustiques 216
  - b. Utilisation de sondes électrochimiques 216
  - c. Utilisation de sondes microondes 219
  - d. Utilisation de biocapteurs 221

## **Conclusion 223**

## **Références bibliographiques 227**

# Introduction générale

Les protéines représentent un intérêt considérable de par leurs fonctions extrêmement variées : elles sont à la fois enzymes (catalyseurs de réactions chimiques), éléments de structure et de mobilité des organismes vivants (tissus conjonctifs, os, muscles...), moteurs de régulation génétique et de signalisation cellulaire, antioxydants, marqueurs de dysfonctionnement dans certaines pathologies, etc.

On l'oublie aussi, mais les protéines sont aussi des agents technologiques (aptitude à la gélification et à la stabilisation d'émulsions, capteurs de molécules d'arôme) qui participent à la réalisation d'aliments. Elles sont un des constituants majeurs et critiques pour l'alimentation humaine, si on observe les enjeux de sécurité alimentaire mondiale en termes d'approvisionnement. Le dosage des protéines est donc d'une importance capitale dans de nombreux domaines tels que l'industrie agroalimentaire, la cosmétique, les secteurs médicaux et pharmaceutiques et les contrôles en laboratoire.

Cet ouvrage sera centré sur l'évaluation quantitative des protéines, mais n'abordera pas les méthodes de séparation, d'isolement, de purification et d'identification des protéines. Les techniques de FTIR et NIR ne feront l'objet que d'une description succincte.

Parce que les protéines sont souvent contenues dans des matrices de composition et de structure extrêmement complexes (céréales, aliments pour humains ou animaux, médicaments, plasma ou sang, produits cosmétiques), il est très difficile de choisir une méthode de dosage. Il n'existe pas de méthode universelle : toutes présentent des limites, toutes possèdent des avantages et des inconvénients. En choisir une devient alors un casse-tête récurrent que l'on peut tenter de résoudre en suivant une démarche particulière.

Le premier réflexe qu'il faut avoir est de comprendre la matrice sur laquelle vous travaillez : est-elle liquide ? Solide ? Riche en matières grasses ? Riche en fibres ? Pauvre en eau ? Contient-elle – c'est sûrement le cas – des éléments susceptibles d'interférer avec les techniques de dosage des protéines que vous souhaitez mettre en œuvre ?

Lorsque l'ensemble de ces questions a trouvé une réponse, d'autres questions viennent alors à l'esprit : quelle méthode vais-je choisir ? Quelle est sa précision, sa sensibilité ?

Est-elle fiable ? Puis-je l'utiliser en routine ? Suis-je suffisamment expérimenté-e pour la réaliser ? Combien de temps va-t-elle me prendre ? Quel coût va-t-elle engendrer ? Les réactifs et solvants que je vais utiliser vont-ils m'exposer à des risques toxicologiques ? Existe-t-il un risque environnemental ? Est-il aisé de faire éliminer le produit de mes dosages ? Quelles précautions dois-je donc prendre ?

Autant de questions auxquelles nous vous proposons de répondre afin de faciliter votre démarche. À travers cet ouvrage, les principales méthodes de dosage des protéines sont décrites en précisant les principes de dosage, les mécanismes réactionnels (nécessaires à la maîtrise du dosage et à l'identification des limites, principes, généralement omis dans la plupart des recueils de méthode de dosage), ainsi que

les protocoles. L'exploitation des résultats tient une place tout à fait particulière et est minutieusement observée.

Véritable guide pour l'étudiant en formation, l'expérimentateur en industrie agroalimentaire, en cosmétique, en secteurs médical et pharmacologique, en laboratoires de contrôle, ainsi que le formateur, cet ouvrage aborde les limites, les avantages et les inconvénients des méthodes de dosage des protéines qui existent aujourd'hui.

Cet ouvrage est composé de huit chapitres qui aborderont successivement les méthodes purement chimiques, sans appareillage particulier (seule de la verrerie de précision, bien sûr, sera indispensable), les méthodes spectrophotométriques qui nécessitent l'utilisation d'un spectrophotomètre et les méthodes fluorimétriques qui ne sont rien d'autre que des méthodes dérivées de la spectrophotométrie. Les méthodes de Kjeldahl et de Dumas feront l'objet d'un tout premier chapitre, particulier, puisqu'elles font référence dans toute normalisation de dosage des protéines.

Choisir une méthode nécessite de bien comprendre son fonctionnement et de savoir précisément ce que la méthode permet de mesurer. La figure 1 présente une vue d'ensemble des différents éléments qui constituent une protéine. La description des résidus aminoacyles permet ainsi de décrire les grands principes sur lesquels reposent les méthodes de dosage des protéines, excepté les techniques infrarouges.

Dans la méthode qui consiste à mesurer l'absorbance dans les UV d'un échantillon à la longueur d'onde  $\lambda = 214$  nm (Stoscheck, 1990), l'absorbance mesurée est due aux transitions électroniques de la liaison peptidique tandis que l'absorbance mesurée à la longueur d'onde  $\lambda = 280$  nm reflète les transitions électroniques de quelques résidus aminoacyles aromatiques. Par ces résidus aminoacyles, le résidu tryptophanyl qui absorbe à un maximum de  $\lambda = 280$  nm réémet des photons après absorption photonique : il peut donc aussi être dosé en fluorescence. La méthode au p-chloranile (Birks et Slifkin, 1963 ; Zaia et al., 1999, 2000) utilise l'absorbance développée par le transfert de charge au sein du complexe résidu aminoacyl/quinone... Cette fois-ci, la protéine sera dosée via certains de ses résidus aminoacyles et non plus via les liaisons peptidiques qui la constituent. La méthode du biuret (Gornall et al., 1949) fait appel aux transitions électroniques d'un complexe cuivre/liaison peptidique. L'absorbance qui résulte de la réaction avec le cuivre est mise en œuvre dans la très célèbre méthode de Lowry.

Cet ouvrage vous montrera que cette méthode, bien que très populaire dans les sciences de la biologie, dépend de nombreux paramètres souvent mal maîtrisés. Ainsi, la méthode de Lowry dépend à la fois de la concentration en certains résidus aminoacyles, mais également du nombre de liaisons peptidiques par unité de protéine, ces deux paramètres conditionnant la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu (Folin et Ciocalteu, 1927 ; Lowry et al., 1951 ; Chou et Goldstein, 1960 ; Legler et al., 1985). La méthode de Bradford, méthode très populaire chez les biologistes, est basée sur l'interaction qui peut s'établir entre une molécule colorante et une protéine. À noter que les peptides et/ou les acides aminés ne réagissent pas avec la molécule colorante, seules les protéines sont donc évaluées (Bradford, 1976 ; Snyder et Desborough, 1978 ; Wei et al., 1997). Cette méthode dépend elle aussi d'un certain nombre de paramètres, à commencer par le choix de la protéine servant à établir la courbe d'étalonnage. Les méthodes de dosage sont extrêmement nombreuses... Laquelle choisir et pour quelle raison ? Faut-il privilégier une méthode parce qu'elle est la plus citée dans la littérature scientifique ? Nous pensons bien sûr à la méthode de Lowry qui est encore aujourd'hui LA méthode incontournable de nombreux

chercheurs, en particulier dans le monde de la biologie... Mais est-ce que ce simple constat de grande utilisation doit tenir lieu de justification d'une méthode de dosage des protéines ?

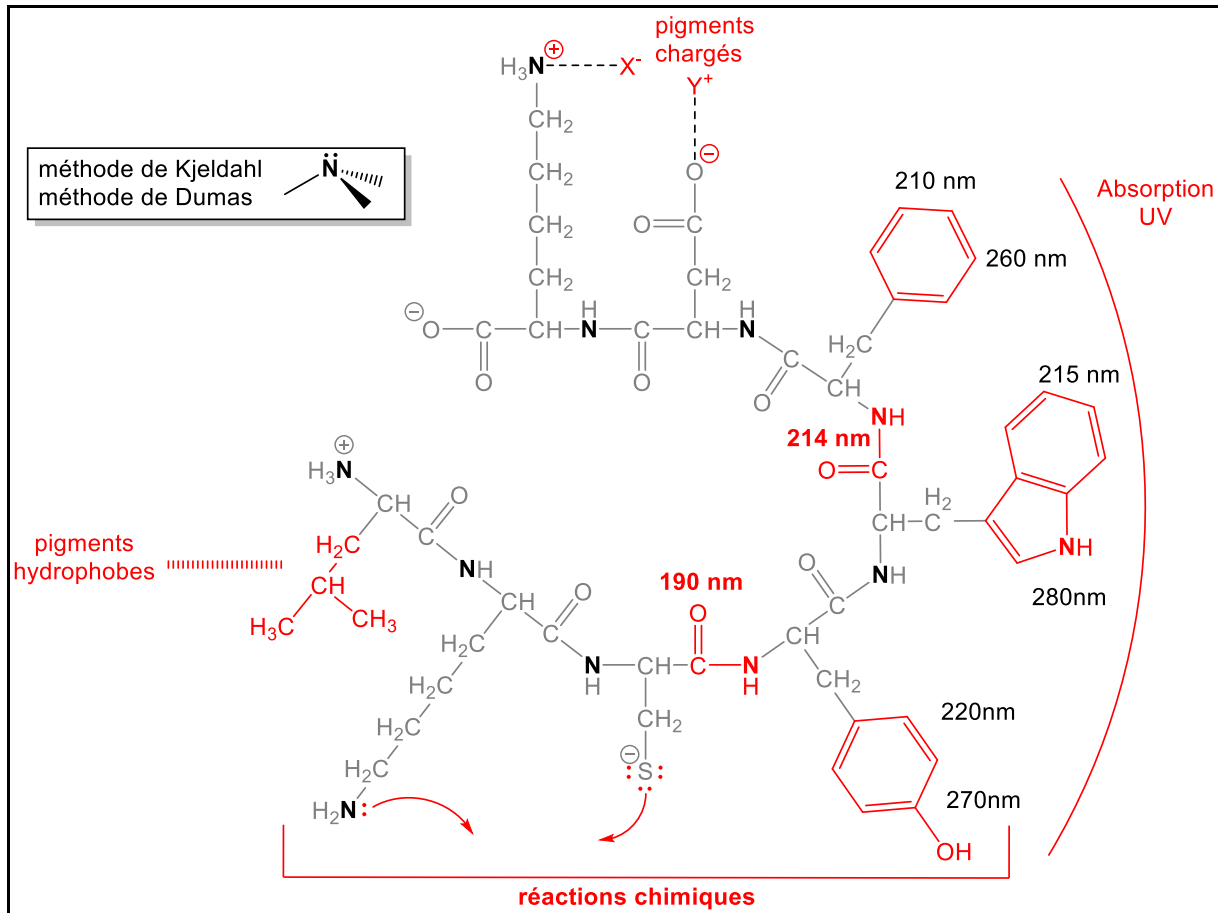


Figure 1 : Relation entre la structure primaire d'une protéine et les grands principes des méthodes de dosage des protéines.

Le choix de la méthode de dosage dépend d'abord de la structure de la matrice qui contient les protéines et de la précision qu'elle permet d'obtenir. La précision d'une méthode est une difficulté majeure et une notion globale qui fait appel à la répétabilité (même résultat obtenu un grand nombre de fois par le même opérateur), à la reproductibilité (même résultat obtenu un grand nombre de fois par des opérateurs différents). La reproductibilité est conditionnée par une description exhaustive des conditions opératoires, mais encore à la justesse (que l'on peut estimer en comparaison avec une méthode de référence) et à la sensibilité (seuil de détection) et à des notions de performance (temps nécessaire et coût financier pour obtenir un résultat discriminant, répétable et reproductible).

Des publications scientifiques, soumises à des règles de concision, ne peuvent ni décrire les détails (surtout infimes) à connaître pour effectuer un dosage ni décrire précisément le principe du dosage. Cet ouvrage va alors tenter de vous les offrir. Il ne peut être exhaustif, mais les auteurs ont toutefois cherché à décrire un grand nombre de méthodes qui leur ont semblé être utiles, avec un soin de description visant à interpeller sur les risques de biais des dosages.

# Chapitre 1 : Méthode de Kjeldahl vs méthode de Dumas

## 1. Un peu d'histoire pour commencer

...

## 2. La méthode de Kjeldahl

La méthode de Kjeldahl est LA méthode de référence pour évaluer la teneur en protéines d'un aliment (pour les produits laitiers NF EN ISO 8968-1<sup>er</sup> mai 2014 / IDF 020-1 : 2014 // pour les produits type amidon féculé et produits dérivés NF EN ISO 3188-octobre 1994 // pour les céréales et légumineuses NF EN ISO 20483-janvier 2014). Ce dosage permet en réalité de doser l'élément azote quelle que soit son origine : amines, sels d'ammonium quaternaires, protéines, matériel génétique (ADN et ARN), lécithine (phosphatidylcholine)... Généralement, on néglige les autres composés, car l'azote dosé provient majoritairement des protéines. Il existe cependant des exceptions, nous les aborderons plus loin dans ce livre.

....

La minéralisation peut être favorisée par ajout de certains sels comme le sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ ) qui permet d'élever la température d'ébullition du milieu de minéralisation (tabl. 1). Le sélénium, le cuivre et le mercure peuvent être utilisés comme catalyseurs de la réaction. Le tableau 2 présente des exemples de catalyseurs que vous pourrez réaliser vous-même. Si le mercure était utilisé par le passé, il était important de l'éliminer à la fin de la minéralisation, car sa présence durant l'étape de distillation (étape 2) entraînait la formation d'amines mercuriques, conduisant à une perte de l'ion ammonium. Le mercure est aussi un polluant très toxique pour l'homme et l'environnement. L'élimination du mercure du minéralisât posait un problème, l'évacuation dans l'évier n'étant pas possible. Actuellement, les pastilles de catalyse pour appareil de Kjeldahl vendues ne contiennent pas de mercure, mais la présence de titane et la grande quantité de cuivre vous obligeront à faire éliminer vos déchets chimiques par une entreprise spécialisée dans le traitement des déchets chimiques. Il existe cependant des catalyseurs de Kjeldahl dans le commerce (appelés aussi pastilles de Kjeldahl) qui ne contiennent ni titane ni aluminium et avec une teneur très réduite en cuivre, ce qui autorise l'élimination du minéralisât dans les eaux usées (tabl. 2, catalyseur n°5). Attention, on trouve aussi des pastilles de catalyseurs Kjeldahl qui contiennent du sélénium, pouvant être toxique pour l'homme. Quitte à minéraliser plus longtemps, préférez un catalyseur ne contenant que du sulfate de potassium et une faible quantité de cuivre.

Composition du milieu	Température d'ébullition
Acide sulfurique concentré	330 °C
Acide sulfurique concentré + $K_2SO_4$ 50 % (m/v)	344 °C
Acide sulfurique concentré + $K_2SO_4$ 100 % (m/v)	364 °C
Acide sulfurique concentré + $K_2SO_4$ 150 % (m/v)	383 °C
Acide sulfurique concentré + $K_2SO_4$ 200 % (m/v)	> 400°C (attention : perte d'ammoniac)

**Tableau 1** : Incidence de la quantité de sulfate de potassium  $K_2SO_4$  ajouté (en masse par volume d'acide sulfurique) sur la température d'ébullition au sein du matras durant la minéralisation (étape 1). m/v = % masse volumique.

...

### Étape 3 : la titration « méthode directe »

Cette méthode de dosage de l'ammoniac à l'aide d'une solution d'acide borique a été inventée par Winkler (1913). Le pKa de l'acide borique est de 9,3 (les autres valeurs de pKa de l'acide borique sont 10,7 et 13,8). Le pH de la solution d'acide borique à 2 ou 4 % (m/v), en absence d'ammoniac, se situe autour de pH = 4, très loin de la valeur du pKa, faisant que la solution d'acide borique à 2 ou 4 % (m/v) ne présente aucun pouvoir tampon à ce pH. Pour être précis, ajoutons que la solution d'acide borique (B(OH)<sub>3</sub>) à 4 % (m/v) (40 g·L<sup>-1</sup>; proche de la saturation) possède un pH entre 3,8 et 4 et la solution d'acide borique à 2 % (m/v), un pH entre 3,9 et 4,3. Dès l'arrivée des premières gouttes de vapeur condensée contenant de l'ammoniac dissous (NH<sub>3</sub>), le pH remonte très rapidement vers la zone tampon. La zone tampon se situe entre 8,5 et 10, autour du pKa de l'acide borique et aussi de l'ammoniac (pKa[H<sub>4</sub>N<sup>+</sup>/H<sub>3</sub>N] = 9,25). Le pH reste en général sous pH 8,5. En dehors de la zone tampon, l'observation d'un changement de teinte d'un indicateur coloré se fait à la goutte près lors d'un titrage. Comme la montre la figure 4, dès pH 4,4, l'hélianthine (méthylorange, N<sup>o</sup>.CAS 547-58-0) commence à se colorer en orange, c'est-à-dire très proche du pH initial de l'acide borique, avant la distillation de l'ammoniac. Pour plus de détails, nous vous recommandons la lecture de l'article de Martin et al. (2007) portant spécifiquement sur ce titrage en présence d'acide borique, un article complet et fouillé en chimie, accessible en *open access*.

Il est possible d'utiliser d'autres indicateurs colorés que l'hélianthine, et le vert de bromocrésol (tabl. 3) peut tout à fait convenir. Dans ce cas, on pourra lui ajouter du rouge de méthyle, avec un passage de gris « sale » à violet lors du titrage. On peut enfin opter pour le mélange de Tashiro, un mélange de rouge de méthyle et de bleu de méthylène (2:1 m/m). Ce dernier permet d'obtenir une solution d'acide borique avec une teinte de violet « sensible », après léger ajustement du pH de l'acide borique de départ.

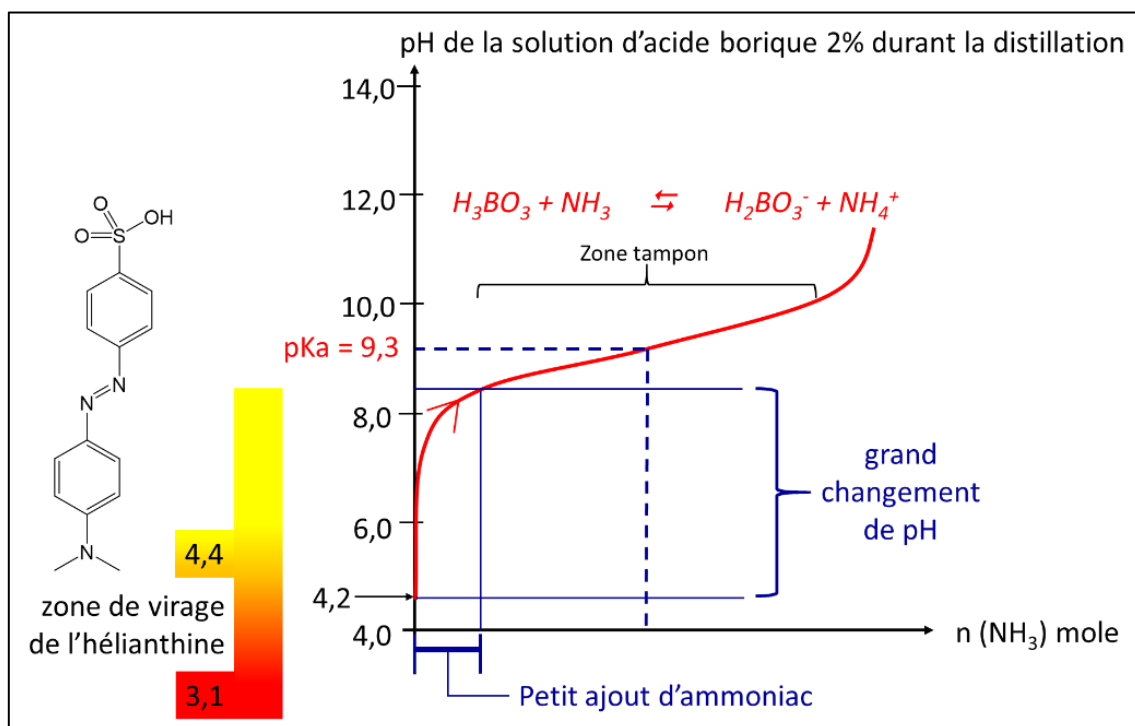


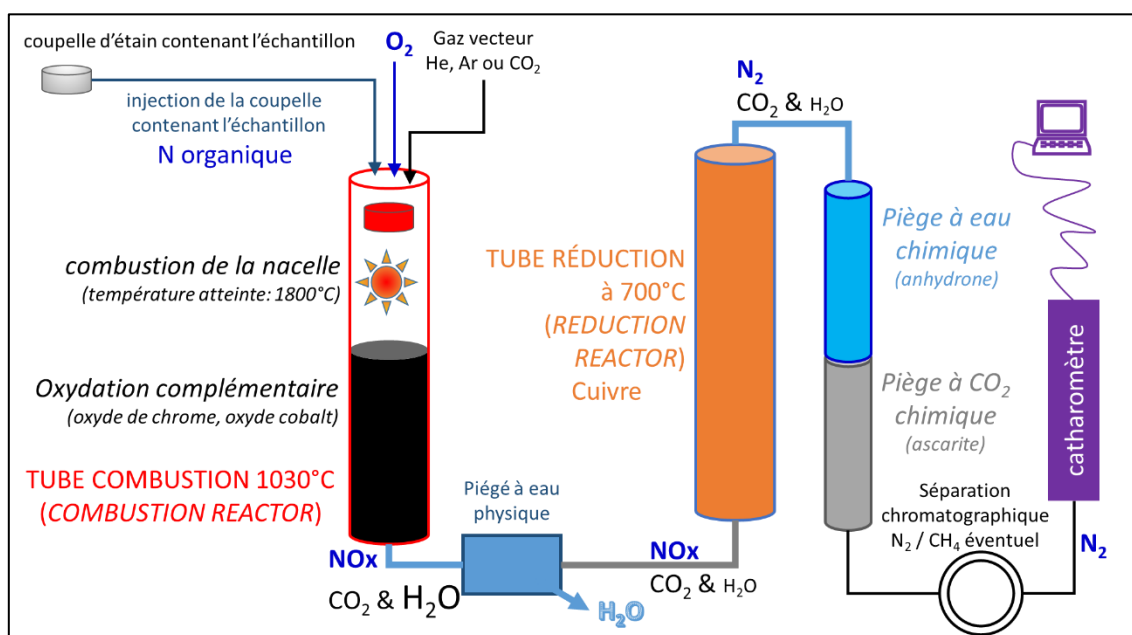
Figure 4 : Évolution du pH d'une solution d'acide borique à 2 % (m/v) lors de la distillation de l'ammoniac contenu dans un matras, issu de la minéralisation d'une matrice organique.

...

### 3. La méthode de Dumas

La méthode de Dumas est, disons-le, la méthode concurrente de la méthode de Kjeldahl. Elle consiste à amener la matrice contenant les protéines à doser, à une température extrêmement élevée ( $> 1\ 000\ ^\circ\text{C}$ ) en présence de dioxygène  $\text{O}_2$ , de sorte à produire du  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (dioxyde de carbone, eau) et de l'azote  $\text{N}$ , sous forme d'oxyde d'azote ( $\text{NO}_x$ ).

Les  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  produits sont piégés par passage sur différentes colonnes. L'azote  $\text{N}$  restant est ensuite dosé selon la méthode de Dumas (fig. 7).



**Figure 7** : Principe de quantification de l'azote selon la méthode de Dumas. L'oxygène permet la combustion de l'échantillon, et l'oxydation des gaz (début du circuit des gaz) dans la colonne de combustion. Une réduction des oxydes d'azotes (dans une seconde colonne, appelée réacteur de réduction) permet l'obtention du gaz diazote. Après séchage des gaz puis piégeage du dioxyde de carbone, le gaz diazote  $\text{N}_2$  est dosé en sortie d'appareil de Dumas par un catharomètre (détecteur de conductibilité thermique). La capsule en aluminium permet l'utilisation d'échantillons sous forme solide ou liquide, mais dans ce dernier cas, une substance support, la silice ( $\text{SiO}_2$ ), est introduite au préalable dans la capsule. Tous les types d'échantillons peuvent être dosés avec la technique de Dumas, mais attention aux échantillons trop acides (ceux provenant d'un traitement au TCA 12 % (m/V) par exemple, en vue d'isoler l'azote non protéique) : la capsule en aluminium ne supportera pas l'acidité et sera détériorée avant sa combustion, avec le risque d'introduire des coulures parasites au sein même du passeur d'échantillons.

...

## Chapitre 2. La méthode chimique (ou méthode sans équipement particulier) de dosage par le formol dite de Sorensen ou Formol Titration

...

Il semble qu'il existe deux voies réactionnelles (fig. 15), l'une formant une imine (VOIE 1), l'autre formant une amine tertiaire (VOIE 2) de type diméthylolamine,  $R-N(CH_2OH)_2$  [Debajyoti, 1978] (et non diméthylamine,  $R-N(CH_3)_2$ , comme dans la réaction d'Eschweiler-Clarke). La formation de l'imine semble une donnée acquise par grand nombre de chimistes.

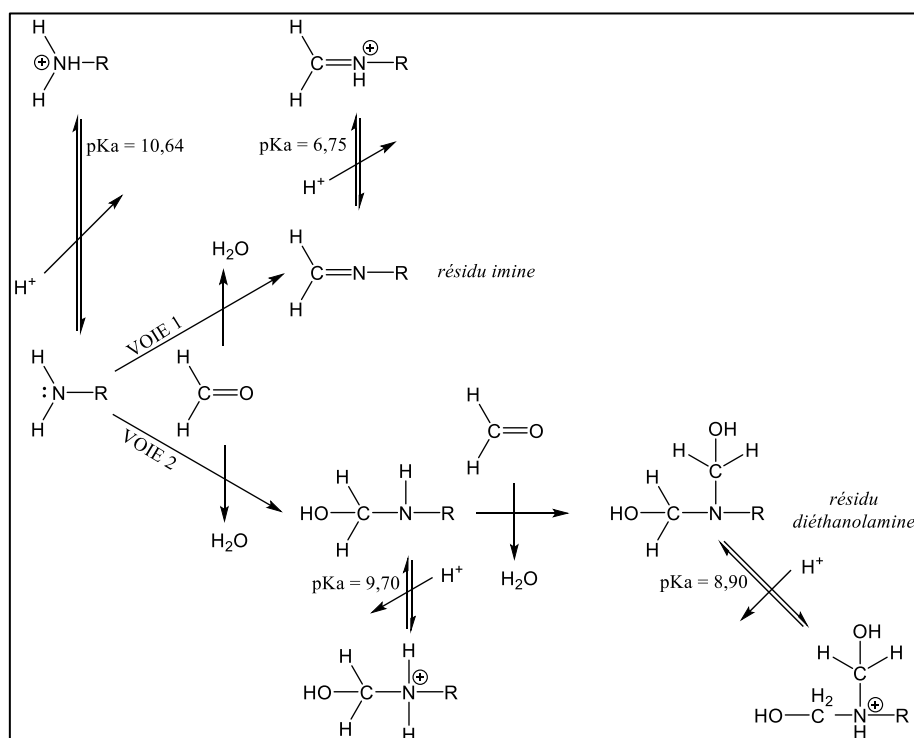


Figure 15 : Alkylation d'une amine par le formol : deux voies réactionnelles possibles

...

Les auteurs vous proposent un mécanisme de réaction entre le formol et les amines. Sont considérés comme amines réagissant, les groupes fonctionnels  $\epsilon\text{-NH}_2$  ou  $\alpha\text{-NH}_2$  des protéines ou des acides aminés et l'ammoniaque  $\text{NH}_3/\text{N}\cdot\text{H}_4$ . La réaction (fig. 16) débute par l'attaque nucléophile d'une amine sur le carbone du formaldéhyde (carbonyle) et formation d'un hémiaminal. Bien que le pH 8,5 ne soit pas favorable à la réaction (environ 10 % des fonctions lysyls ou des  $\alpha\text{-NH}_2$  terminaux sont sous la forme amino nucléophile), l'équilibre ammonium/ amino est « tiré » par la réaction. Un départ d' $\text{H}_2\text{O}$  (bon groupe partant) conduit selon un premier possible mécanisme à une imine (mécanisme le plus probable) [fig. 19].

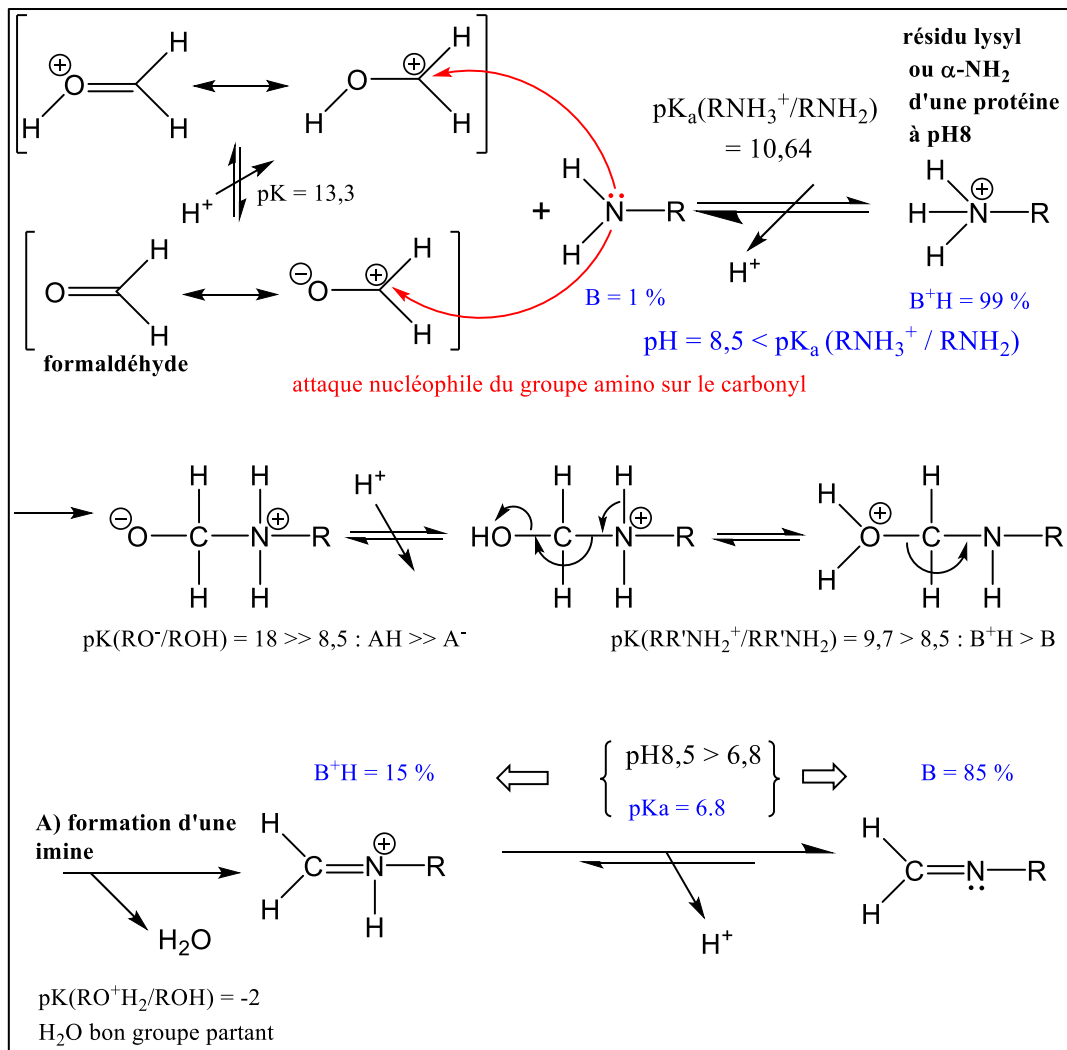


Figure 19 : Première voie réactionnelle possible d'une amine réagissant sur le formol et aboutissant à la formation d'une imine en fin de réaction de la « Formol Titration ». (Par simplification d'écriture, pK pour pKa).

...

## Chapitre 3. Les méthodes « SPECTRO » (méthodes spectrométriques)

...

### 2. Les mesures directes d'absorbance dans l'ultraviolet à $\lambda = 205$ et $\lambda = 280$ nm

À une longueur d'onde donnée  $\lambda$ , l'absorbance d'un mélange de  $n$  espèces absorbantes est la somme des absorbances individuelles (Éq. 19). La somme des absorbances des résidus d'acides aminés contenant des noyaux aromatiques (résidus de tyrosine Tyr, tryptophane Trp, phénylalanine Phe et cystéine Cys, fig. 26) sont responsables de l'absorbance maximale des protéines à 280 nm (Goldfarb et al., 1951 ; Layne, 1957). Notons que la liaison peptidique est responsable du pic d'absorbance des protéines à 205 nm.

$$\text{Équation 19 : } A = \sum_{i=1}^n A_i(\epsilon_{\lambda}, i, l, C_i)$$

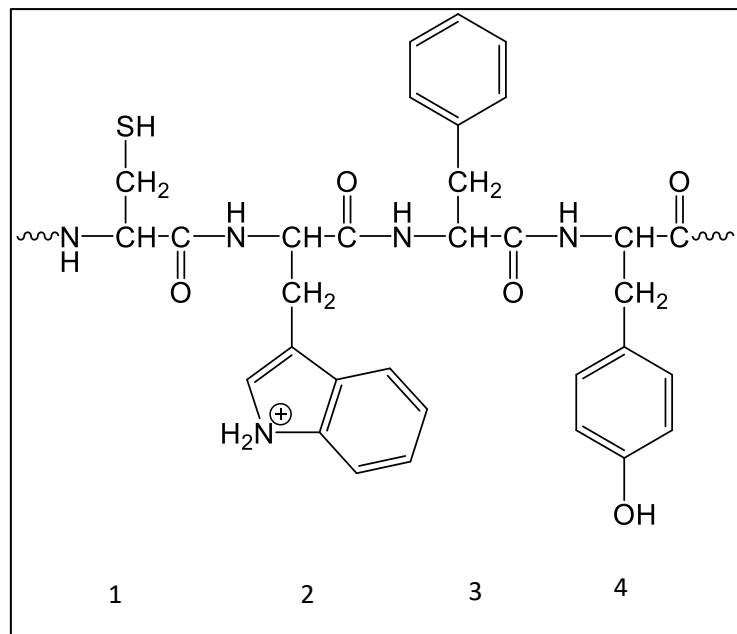


Figure 26 : Séquence peptidique correspondant à, de gauche à droite : 1, cystéine ; 2, tryptophane ; 3, phénylalanine ; 4 : tyrosine.

Parmi les 4 acides aminés, le tryptophane absorbe considérablement, la tyrosine absorbe dans une moindre mesure et la phénylalanine n'absorbe que très faiblement (fig. 27).

...

L'absorbance de ces acides aminés varie en fonction du pH (fig. 28) et la sensibilité de la méthode serait meilleure à pH 10 en raison du groupement phénol de la tyrosine ionisé ( $pK_a = 10,1$ ) [Luebke et al., 1975 ; Yang et Zhang, 1998].

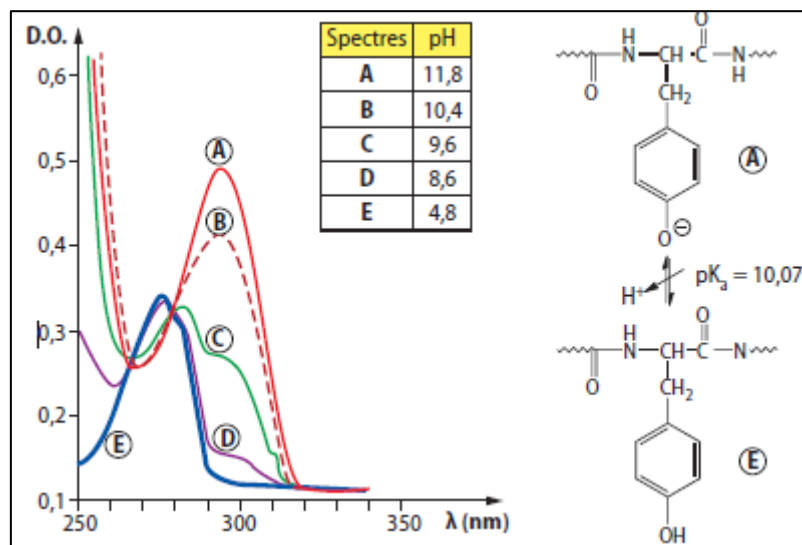


Figure 28 : Influence du pH sur le spectre d'absorption UV de la tyrosine (d'après Yang et Zhang, 1998).

...

### 3. Les méthodes indirectes par interactions protéine-chromophore, complexation d'un chromophore ou formation d'un chromophore

...

#### b. Utilisation d'un colorant acide azosulfonique : le Noir Amido

La méthode consiste à former un complexe insoluble entre une protéine à doser et un colorant acide azosulfonique. Après complexation protéines-colorant, le précipité est éliminé par centrifugation et le pigment non complexé restant et présent dans le surnageant est alors dosé. Il ne s'agit pas de doser directement les protéines, mais d'évaluer la quantité de colorant restant après complexation avec les protéines. En réalisant une gamme étalon à l'aide d'albumine ou de  $\gamma$  globuline (à défaut de disposer de la protéine à doser pour établir une gamme étalon), il est possible de déterminer la quantité de protéines présentes dans le milieu. Ce type de dosage des protéines est facile et semble parfaitement corrélé à un dosage par la méthode de Kjeldahl, comme l'ont montré Hafeza et Mikkelsen (1981) dans l'évaluation de teneurs en protéine de riz, résultats donnés en équivalent albumine (idéalement des protéines de riz isolées pour établir la gamme étalon).

Le mécanisme réactionnel entre protéine et composé azosulfonique (fig. 31) repose sur le fait que lorsque le pH de la suspension de protéines à doser est inférieur au pH isoélectrique des protéines, les charges positives ( $\text{NH}_3^+$ ) des résidus histidinyles, arginyles et lysyles des protéines interagissent avec les charges négatives des groupements sulfoniques ( $\text{SO}_3^-$ ) du colorant azoïque. Il convient donc de travailler dans un environnement acide dans lequel le pH est maintenu entre 2,5 et 3,5, c'est-à-dire sous la valeur la plus faible des pKa des fonctions carboxyliques (résidus Asp et Glu, pKa voisine de 4 à 5). Ces interactions électrostatiques conduisent à des changements structuraux de la protéine qui permettent également la mise en place d'interactions hydrophobes protéine-colorant (Lakin, 1974 ; McGann, 1978 ; Kroger et al., 1978). Les colorants azosulfoniques sont très habituellement l'Acide Orange 7 (CAS 633-96-5, encore appelé l'Acide Orange 7 ou Orange II), l'Orangé G (CAS 1936-15-8) [Ashworth, 1966] et le Noir Amido (CAS 1064-48-8) encore appelé Noir Amido 10B ou bleu naphthol noir. Il est nécessaire d'utiliser le colorant azosulfonique en excès par rapport à la quantité de protéines à doser.

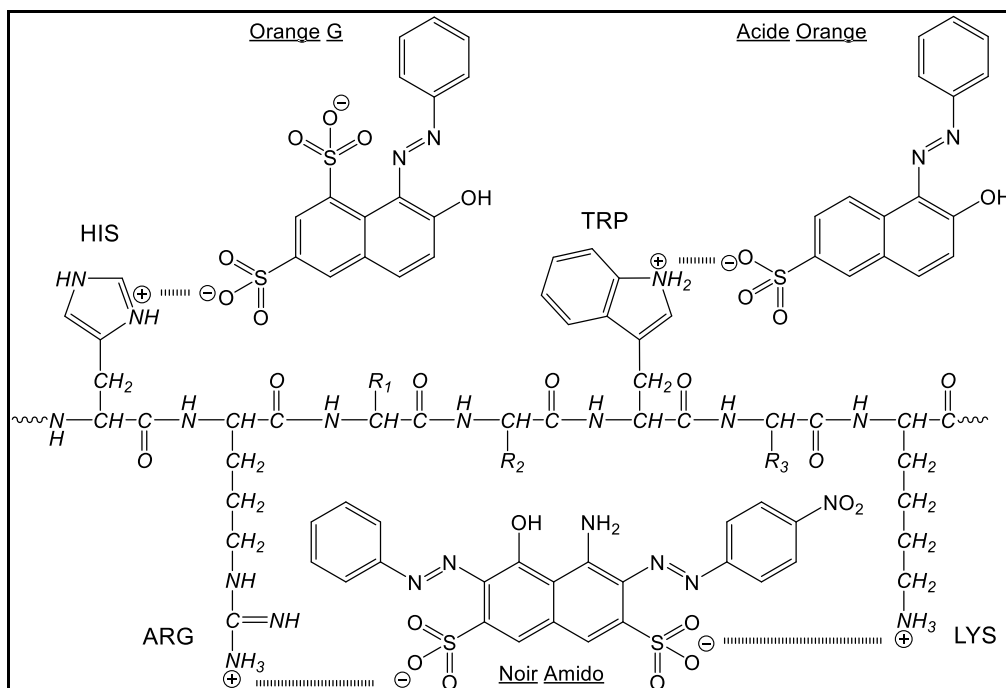


Figure 31 : Exemples d'interactions entre composés azosulfoniques classiques et protéines : (+)-----(-) = interaction électrostatique.

...

### c. Utilisation d'un colorant acide azosulfonique : le bleu de Coomassie Brillant (BCB) ; la méthode de Bradford

Ce colorant est impliqué dans la très connue méthode de Bradford (1976). Ce colorant, triphénylméthane sulfaté, est le premier à avoir été introduit sur le marché pour doser des protéines. Encore appelé « Brilliant Blue », « Brilliant Blue G », « Acid Blue 90 », « C. I. 42655 », ou « Brilliant Blue G 250 », il ne faut pas confondre le bleu de Coomassie brillant G-250 (n<sup>o</sup>.CAS 6104-58- 1) avec le bleu de Coomassie brillant R-250 (n<sup>o</sup>.CAS 6104-59-2)... La tromperie est aisée... Jouons quelques instants aux jeux des différences. Attention, elles sont très subtiles : le colorant G250 (fig. 33 [1]) étant la forme diméthylée du colorant R-250 (fig. 33 [2]). Le bleu de Coomassie R-250 est alors moins soluble dans l'eau que ne l'est le bleu de Coomassie G-250.

Vous ne voyez pas la différence entre le R-250 et le G-250 ? Regardez attentivement la figure 33 : vous allez trouver !

La méthode de Bradford repose sur la capacité qu'a le bleu de Coomassie brillant G-250 à absorber lorsque celui-ci, chargé négativement, se lie via des interactions de Van der Waals aux résidus arginyles (prioritairement), histidyles, lysyles, tyrosyles des protéines à doser (Pierce et Schultze, 1977). Il peut également y avoir des interactions avec les résidus tryptophanyles et phénylalaninyles des protéines (Bradford, 1976 ; Tal et al., 1985 ; Compton et Jones, 1985 ; Wei et al., 1997 ; Wenrich et Trumbo, 2012).

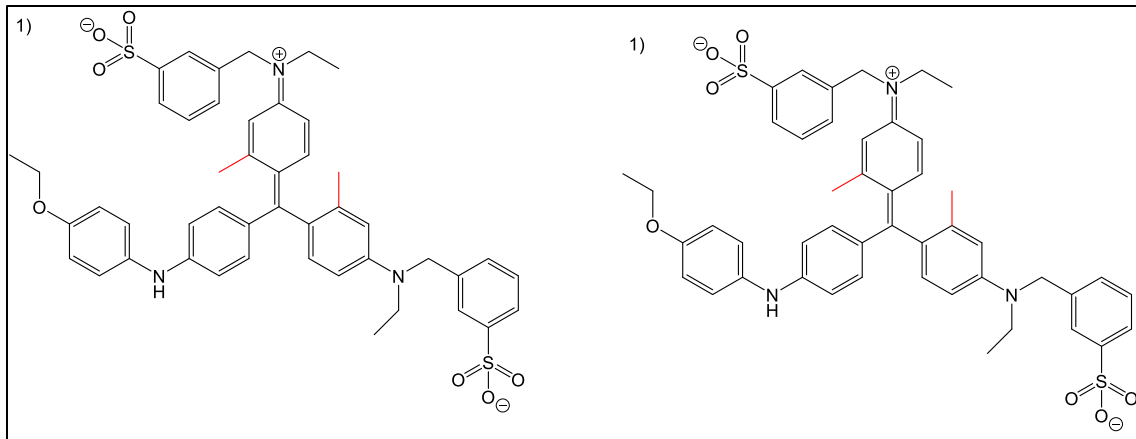


Figure 33 : Structure du bleu de Coomassie brillant G-250 (1) et du bleu de Coomassie brillant R-250 (2).

...

### f. Utilisation de la ninhydrine

Bien que la ninhydrine soit utilisée surtout pour le dosage des acides aminés (formation du pourpre de Ruheman via une étape de décarboxylation), il est possible de doser des protéines directement par réaction entre la ninhydrine (fig. 52) et les groupes amino des protéines, sans passage obligé par l'hydrolyse des protéines en acides aminés.

...

Le mécanisme réactionnel entre protéine et ninhydrine débute par une attaque nucléophile, de manière quasi certaine (fig. 53). Dans une protéine, ce sont ses résidus lysyls ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) qui vont réagir ainsi que son groupement  $\alpha$ -amino terminal. La réaction s'arrête à ce premier produit de l'addition nucléophile.

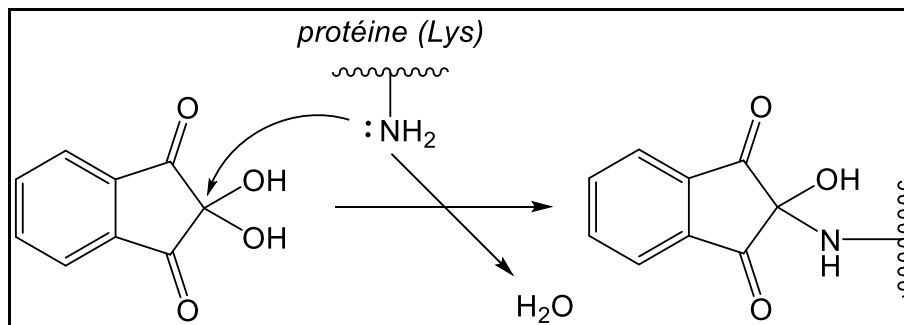


Figure 53 : Proposition d'attaque nucléophile entre protéines à doser et ninhydrine : mécanisme général avec une amine quelconque et le résidu lysyl d'une protéine.

...

### h. Utilisation du chlorure de Dabsyl ou du chlore de Dansyl

Chlorure de dabsyl ou chlorure de dansyle (fig. 66) – attention à ne pas les confondre – sont habituellement utilisés pour doser des acides aminés en HPLC (dérivation pré-colonne), comme l'indique par exemple De Mey et al. (2012). On peut cependant doser des protéines avec ces réactifs. Preuve étant,

dabsyl et dansyle sont utilisés pour dériver des protéines avant électrophorèse (Hsi et al., 1998). Cela signifie que contrairement au dosage par la ninhydrine, il n'est pas nécessaire d'hydrolyser.

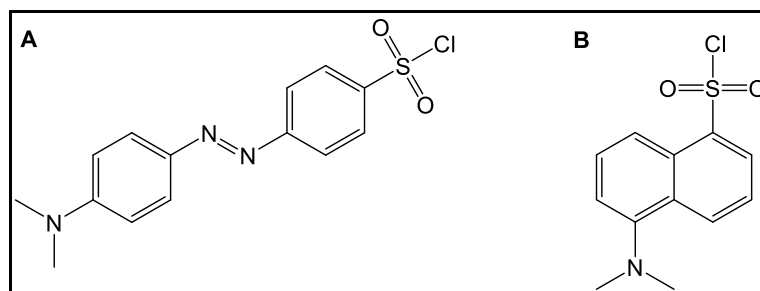


Figure 66 : Structure du A) chlorure de dabsyl ; 4-(diméthylamino)azobenzène-4'-sulfonyl chloride ; CAS 56512-49- 3) et du B) chlorure de dansyle (B ; 5-(diméthylamino)naphtalène-1-sulfonyl chloride ; CAS 605-65-2).

Il semble que le chlorure de dansyle ne soit pas spécifique des amines puisqu'il réagit aussi avec les thiols, les phénols et les groupes imidazoles (Kumar et al., 1995) : ainsi, le dosage des protéines est permis par le greffage d'un chromophore-fluorophore grâce à la réaction du chlorure de dabsyl sur les fonction amino – résidus lysyls (Lys) –, mais aussi sur les fonctions thiols – résidu cystéinyl (Cys) –, phénol – résidu tyrosinyl (Tyr) –, et imidazole – résidu histidinyl (His) – (Kumar et al., 1995).

Le soufre est un atome « mou », très polarisable. Le chlore est très électro-négatif. De fait, l'addition d'un groupe amino sur l'atome de soufre du résidu de chlorure sulfonyl est aisée. Cependant, la réaction principale s'opère entre les groupes aminos (Lys) et le chlorure de dabsyl (fig. 67).

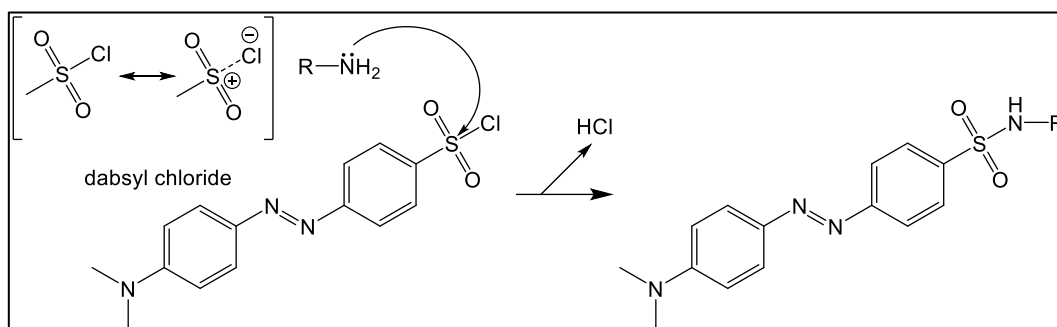


Figure 67 : Proposition de mécanisme réactionnel entre le chlorure de dabsyl et une protéine.

Le protocole de dosage des protéines au réactif de dabsyl est extrêmement simple (fig. 68). À 5 mL de suspension aqueuse (limpide) de protéine tamponnée à pH 9,5 à l'aide d'un tampon carbonate (tampon 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) ou phosphate (0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), vous ajouterez 10 mL d'une solution de dabsyl préparée à 1 g/L dans de l'acétone. La solution est chauffée 20 min entre 70 °C et 80 °C, à 60 °C durant 60 min ou encore à 38 °C durant 120 min minimum si les protéines sont thermodénaturables, c'est-à-dire « fragiles », capables d'être dénaturées par la chaleur, ce qui correspond à la majorité des protéines. Ce protocole de 20 min à 80 °C serait donc plutôt réservé aux protéines stables à la chaleur comme les caséinates de sodium ou de potassium ou encore certaines protéines végétales.

La suspension adopte une couleur orange profond. Si cela est nécessaire, vous centrifugerez et mesurerez alors l'absorbance du surnageant devenu limpide (ou directement de la solution limpide) à  $\lambda = 450$  nm ou à  $\lambda = 325$  nm (fig. 68). Il existe plusieurs pics d'absorption de la lumière.

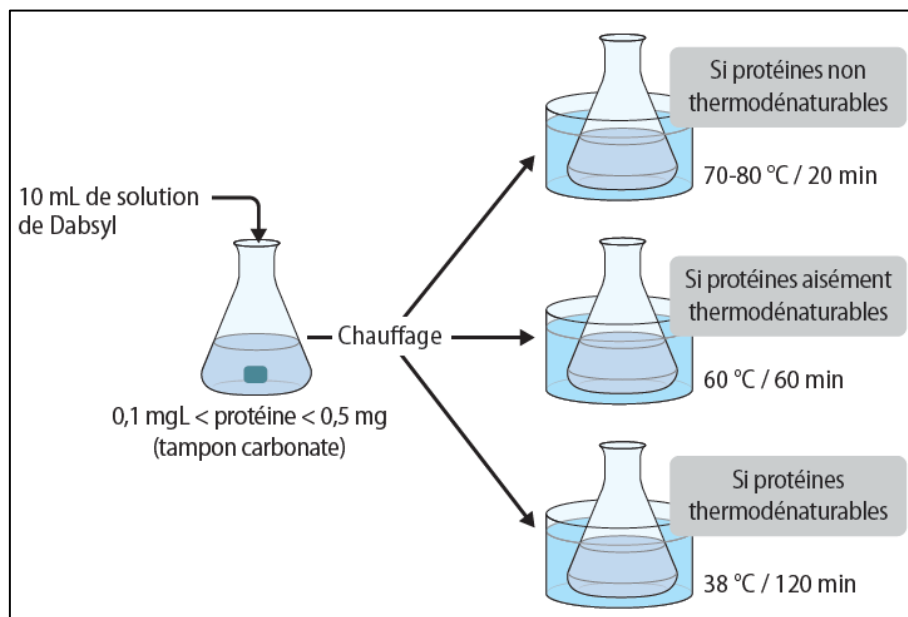


Figure 68 : Protocole de dosage des protéines selon la méthode au chlorure de dabsyl. À noter que selon la sensibilité des protéines à la dénaturation thermique, les paramètres d'incubation ( $T$  °C/Tps) ne sont pas les mêmes.

...

## Chapitre 4. Les méthodes indirectes par utilisation d'ions cuivriques

### 1. La méthode du biuret

Cette méthode reposait, pensait-on, sur une réaction colorimétrique basée sur la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique  $\text{Cu}_{2+}$  et le groupement imino de la liaison peptidique (fig. 70) [Gornal et al., 1949 ; Parvin et al., 1965]. Le chromophore résultant, violet, est alors stable et absorbe à  $\lambda = 550$  ou  $\lambda = 330$  nm. En effet, deux moles de biuret ( $\text{H}_2\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ ) interagiraient semble-t-il avec une mole d'ion cuivre II ( $\text{Cu}_{2+}$ ), l'ion cuprique, qui est l'autre nom de l'ion cuivrique (cupric ion en anglais) [Bhagavan, 2002].

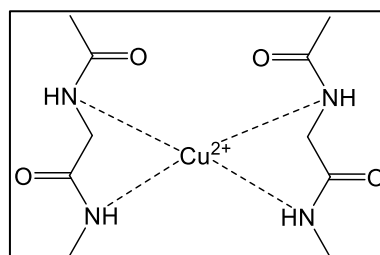
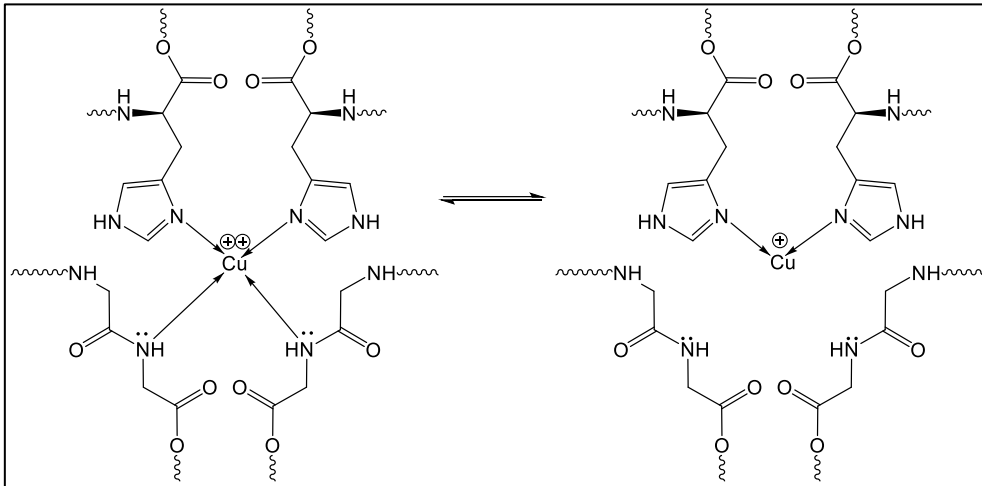


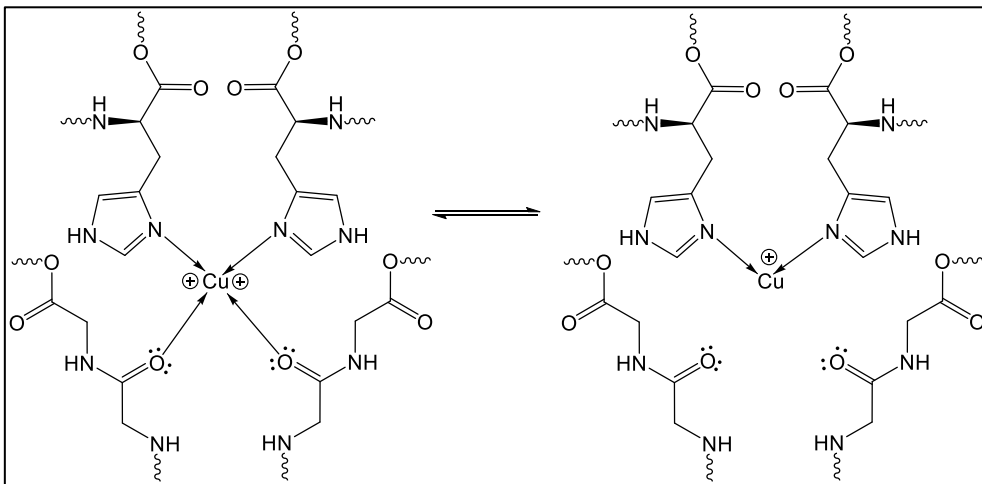
Figure 70 : Interaction probable entre  $\text{Cu}_{2+}$  et la liaison peptidique d'une protéine.

...

Avec cet ensemble d'informations, nous pouvons donc proposer le mécanisme suivant : un changement de valence s'opère lors de la complexation du cuivre par 2 histidinyls, avec – ou non – liaison de coordinance avec la liaison peptidique (doublet d'électrons non liants de l'atome d'azote (fig. 71) ou de l'atome d'oxygène (fig. 72).



**Figure 71** : Complexation des ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) par les noyaux imidazoles des histidinyls des protéines et par la liaison peptidique via les atomes d'azote.



**Figure 72** : Complexation des ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) par les noyaux imidazoles des histidinyls des protéines et par la liaison peptidique via les atomes d'oxygène.

## 2. La méthode de Lowry

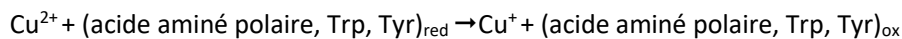
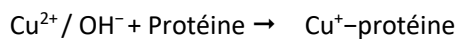
Nous y voilà... Enfin, LA très connue et très utilisée méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Cette méthode peut être considérée comme une « amélioration » de la méthode du biuret dans laquelle a été introduit le réactif de Folin-Ciocalteu afin d'augmenter l'intensité de coloration du chromophore.

Depuis plus de 70 ans, la publication Lowry et al. (1951) est continuellement citée dans le monde scientifique. En 2014, à l'occasion des 50 ans de l'Index des citations scientifiques (qui répertorie le nombre de publications et de citation bibliographique d'un chercheur), la revue Nature annonçait qu'il ressortait de son étude intitulée « The Top 100 papers », que parmi la montagne de publications analysée, la publication de Lowry se situait au premier rang du classement parce que citée 305 148 fois (fig. 80, <https://www.nature.com/news/the-top-100-papers-1.16224>). Outre les travaux de Lowry, les travaux de Bradford (Bradford, 1976) se situent au troisième rang du classement en ayant été cités 155 530 fois. Il est également incroyable de découvrir dans ce classement que les plus grandes découvertes scientifiques du siècle passé, sont quasi-absentes.

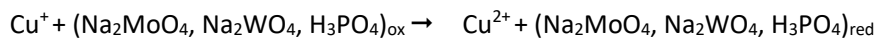
...

Cette méthode consiste en une réaction d'oxydoréduction entre les protéines à doser et le réactif de Folin (acide phosphomolybdique phosphotungstique). Le mécanisme repose donc sur la capacité qu'ont les résidus tryptophanes et tyrosines des protéines à réduire le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  lequel, à son tour, réduit le réactif de Folin (solution phénolique contenant des composés de tungstène et de molybdène) qui voit alors sa couleur changer du jaune (acide phosphomolybdique phosphotungstique) au bleu (heteropoly molybdenum blue ou bleu de molybdène, un complexe d'hétéropolymolybdates réduits et de polyoxométalates), en condition alcaline (pH 10) [Dunn, 1992] (Éq. 33, 34). Il est probable que les résidus d'histidine participent à la réduction du cuivre II (fig. 71 et 72).

**Équation 33 :**



**Équation 34 :**

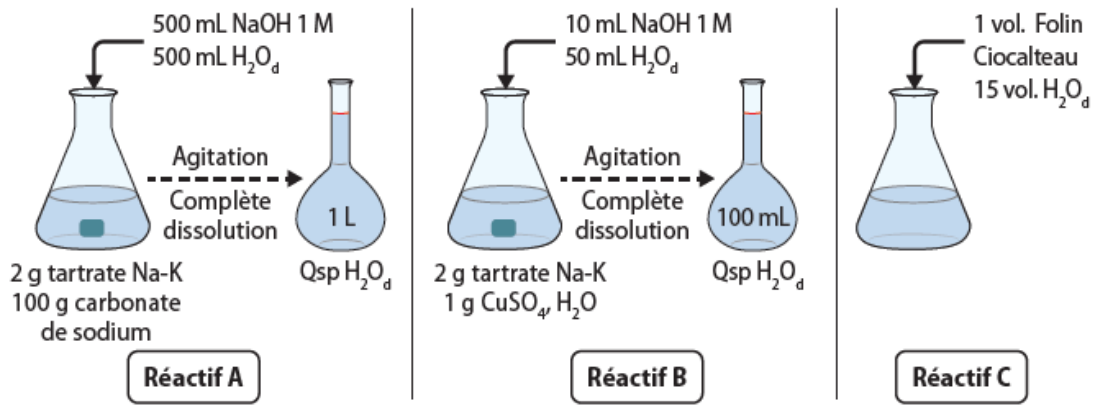


Mo est le symbole chimique du molybdène, W du tungstène.

L'absorbance du produit de la réaction (le bleu de molybdène  $\text{Na}_2\text{MoO}_4, \text{Na}_2\text{WO}_4, \text{H}_3\text{PO}_4$ ), proportionnelle à la quantité de protéines, est enfin lue au spectrophotomètre à  $\lambda = 750 \text{ nm}$ . La démarche expérimentale est relativement longue puisqu'elle se déroule en plusieurs étapes (fig. 81). Parallèlement au dosage de protéines contenues dans l'échantillon, une gamme étalon est préparée selon les étapes 1 et 2 (fig. 81).

La méthode de Lowry est plus sensible que la méthode du biuret classique. La zone de linéarité de la réaction est cependant étroite et il faut utiliser la portion linéaire de la courbe (fig. 24) qui correspond à des concentrations en protéines ne pouvant excéder 10 mg/L. Il est donc nécessaire de réaliser des dilutions en conséquence.

Étape 1 : réalisation de 3 solutions notées réactifs A, B, C.



Étape 2 : dosage des protéines.

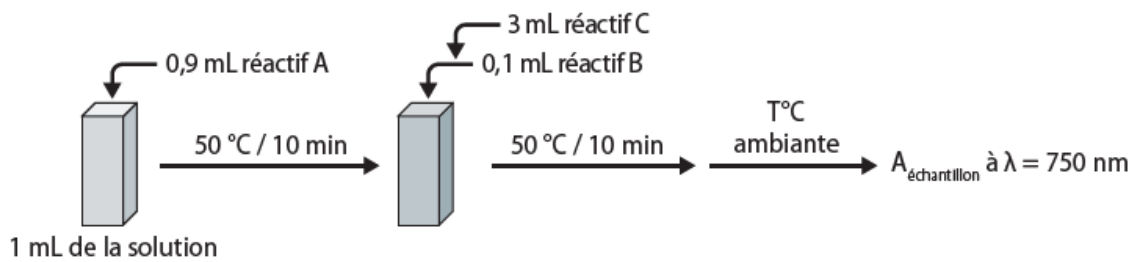


Figure 81 : Protocole de dosage des protéines selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951).

...

### 3 ► La méthode à l'acide bicinchonique (BCA)

Comme pour le dosage par le bathocuproïne, le mécanisme probable d'apparition du chromophore serait une interaction du Cu<sup>+</sup> avec les doublets d'électrons non liants des atomes d'azote du BCA (fig. 82).

Lorsque l'ion cuivreux Cu<sup>+</sup> est formé, il est alors fortement chélaté (Éq. 35) par deux molécules d'acide bicinchonique (BCA) : le complexe chromophore qui en résulte absorbe à λ = 562 nm (fig. 83).

Équation 35 :

$K_a = 1/K_d = 4,6 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-2}$  avec  $K_a$ , constante d'association ;  $K_d$  constante de dissociation de Cu<sup>+</sup> par le BCA.

Le dosage est habituellement décrit par la complexation des ions cuivreux par le BCA. On sait que le complexe Cu-(BCA)<sub>2</sub> possède un coefficient de dissociation  $K_d = 2,16 \cdot 10^{-15} \text{ M}^2$  (Yatsunyk et Rosenzweig, 2007) et un maximum d'absorption à λ = 562 nm avec un coefficient d'extinction molaire,  $E = 7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Djoko et al., 2007).

Tout comme la réaction de Lowry, la réduction du cuivre Cu<sup>2+</sup> en Cu<sup>+</sup> par les protéines à doser, en milieu alcalin, sera d'autant plus importante que la quantité de protéines est élevée.

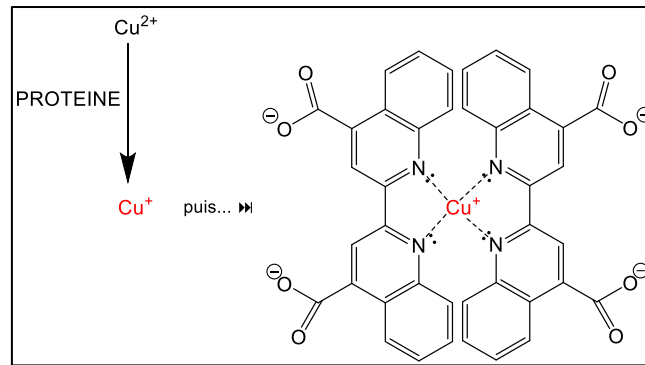


Figure 83 : Formation d'un chromophore [Cu+-BCA2] après réduction du Cuivre  $\text{Cu}^{2+}$  par les protéines à doser (méthode au BCA).

...

Le protocole utilisé dans la grande majorité des publications fait appel à l'utilisation d'un kit commercial sous la dénomination « Working Solution » ou « Working Reagent », composé d'un réactif dit « réactif A » et d'un réactif dit « réactif B ». Tandis que le réactif B fait clairement apparaître sa composition sur le flacon (4 % (m/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ), le réactif A fait image de réactif assez énigmatique et il était inconcevable pour les auteurs de rédiger cet ouvrage sans en percer le mystère pour la raison simple qu'il n'est pas possible de travailler correctement en présence d'éléments qualifiés de « boîte noire », d'autant plus que la maîtrise du pH est essentielle. Nous vous proposons alors de préparer vous-même le « Working Reagent » selon la méthode de Smith et al. (1985) en mélangeant les réactifs A-BCA et B-BCA dans les proportions 50:1 (v/v) (fig. 84).

...

## CHAPITRE 5. Les méthodes indirectes par utilisation de métaux de transition : complexe fluorène-métal

...

## CHAPITRE 6. Les méthodes FLUO (ou méthodes fluorimétriques)

### 1. Généralités

La fluorescence provient d'une molécule ayant absorbé de l'énergie photonique (absorption photonique, comme cela s'observe avec les colorants), donc à l'état excité, qui retourne à l'état de base en réémettant de l'énergie photonique. Tous les chromophores ne sont pas des fluorophores. Certains chromophores, après avoir absorbé de l'énergie photonique, retournent à l'état de base par une émission brownienne d'énergie (dissipation thermique du gain d'énergie).

La plupart du temps, la longueur d'onde maximale d'absorption de l'énergie d'excitation diffère de la longueur d'onde maximale d'émission (ce phénomène se nomme le déplacement de Stokes). Un fluorimètre possède une source lumineuse (lampe flash xénon ou LED) afin d'exciter les molécules

fluorescentes et un détecteur pour capter le faisceau de lumière réémise, généralement placé à 90 degrés d'angles pour éliminer l'addition du faisceau incident (lumière d'excitation) [fig. 97].

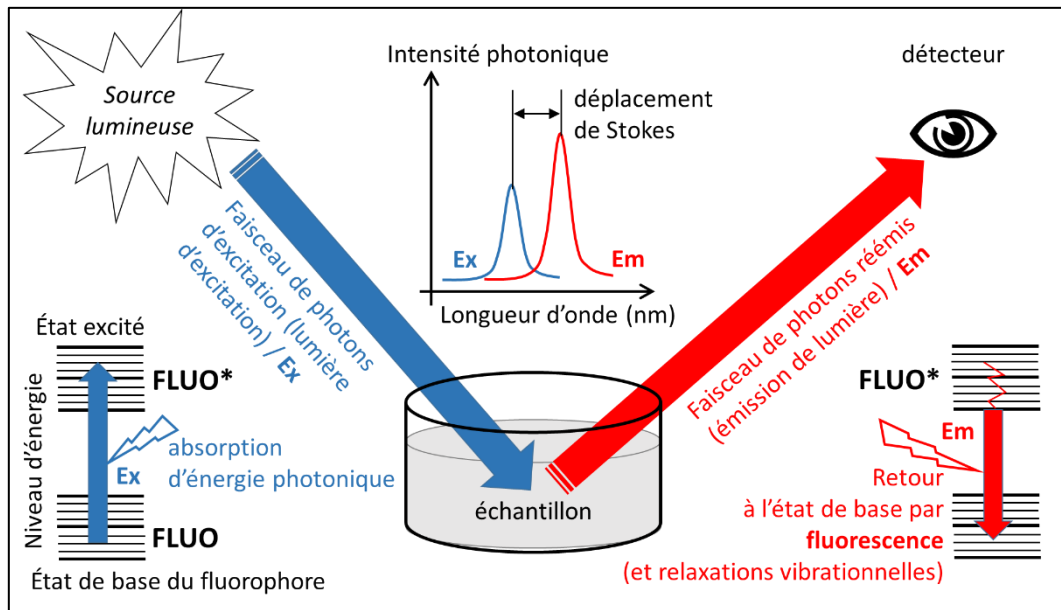


Figure 97 : Principe du fluorimètre. L'irradiation lumineuse d'une espèce fluorescente à l'état énergétique de base, FLUO, passe à un état excité, FLUO\*, qui redescend à l'état de base en émettant des photons (fluorescence).

...

## 2. Fluorescence et utilisation du BCA

...

## 3. Utilisation du O-phtalaldéhyde (OPA)

Le composé O-phtalaldéhyde (1,2-benzène dicarbal ; CAS 643-79-8) réagit avec les amines et les thiols en mélange pour former un composé fluorescent ayant une structure indolique (fig. 103) [Simons et Johnson, 1976 ; 1977 ; 1978].

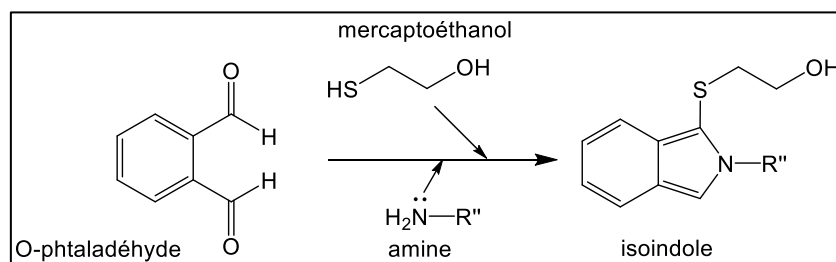
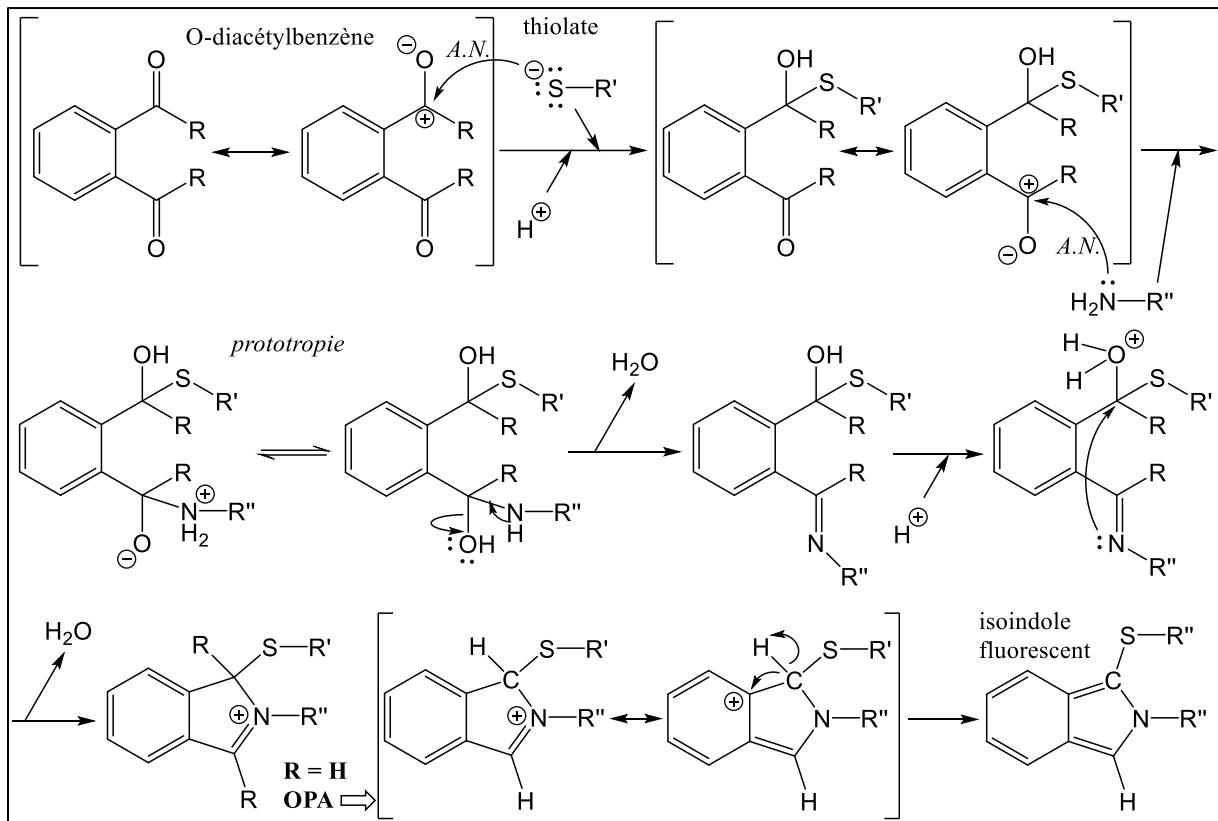


Figure 103 : iso-indole (fluorescent) produit par l'OPA (O-phtalaldéhyde), une amine, et le mercaptoéthanol.

L'addition de O-phtalaldéhyde ou de O-diacétylbenzène à des amines permet alors de les doser par fluorescence. Hillmann (1943) a montré que l'ajout de O-diacétylbenzène à du blanc d'oeuf produit un composé fluorescent bleu. Roth (1971) reprend cette réaction et obtient un composé fluorescent par un mélange de mercaptoéthanol, O-diacétylbenzène et des acides aminés (glycine, lysine, histidine ou cystéine).

Voici le mécanisme réactionnel que nous vous proposons pour comprendre comment cette méthode de dosage opère (fig. 104) : une première attaque nucléophile d'un thiolate (le mercaptoéthanol) puis une seconde attaque nucléophile d'un groupe amino (groupe  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> d'un résidu Lys d'une protéine ou son groupe  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminal) sur l'OPA (O-phthalaldéhyde) conduit à la formation d'une imine qui se cyclise par attaque nucléophile intramoléculaire pour donner le fluorophore iso-indole :



**Figure 104** : Dosage des protéines par l'OPA (O-phthalaldéhyde) ; proposition de mécanisme réactionnel entre les O-diacétylbenzène – et l'OPA en particulier – et une amine primaire (un résidu Lys d'une protéine ou le groupe amino terminal) en présence de thiolate (par exemple le mercaptoéthanol) jusqu'au produit final, un isoindole fluorescent. (A. N. pour addition nucléophile).

Le protocole de dosage est présenté figure 105. La mesure par fluorescence peut se faire entre 5 et 25 min après la réaction entre l'OPA et les protéines à doser, avec une illumination d'excitation à 340 nm et une émission en fluorescence à 455 nm, dans une cuvette de quartz. La fluorescence résultante est proportionnelle à l'intensité de fluorescence.

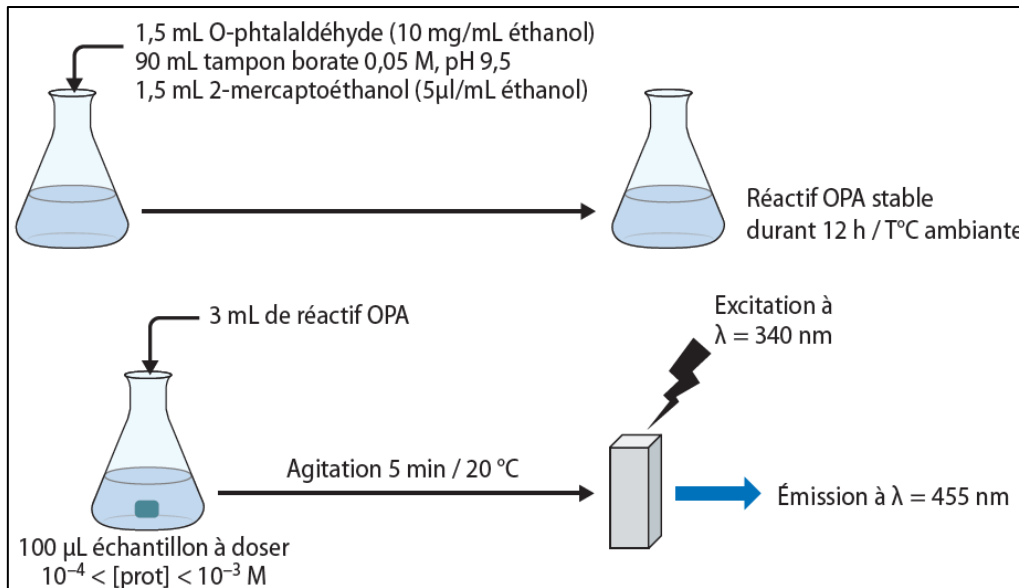


Figure 105 : Protocole de dosage des protéines par l'O-phthalaldéhyde (OPA), par fluorescence selon Roth (1971).

La réaction décrite en figure 104 est complète en une à deux minutes. En 5 minutes, vous pouvez quantifier de 0,2 à 100 mg par litre de protéine (BSA). Des kits commerciaux d'OPA existent. Attention, cependant, car l'OPA est toxique et en particulier pour les organismes aquatiques (H400). Pensez à traiter convenablement vos déchets !

...

## 5. Utilisation de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)

...

Nous vous proposons le mécanisme suivant (fig. 109) basé sur la réaction d'un groupe amino nucléophile sur un résidu isothiocyanate. La méthode de dosage des protéines en présence du rouge de pyrogallol a été décrite par Fiorina et al. (2001). Le principe est simple : le rouge de pyrogallol combiné avec le molybdate forme un complexe qui absorbe à  $\lambda = 460 \text{ nm}$ . En milieu acide (pH 2,5), ce complexe interagit avec les protéines via probablement des interactions électrostatiques (entre le groupe  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{pK}_a = 1,9$ , et les protéines chargées positivement lorsque  $\text{pH} < \text{pH}_i$ , avec les résidus lysyls chargés positivement  $\text{R-NH}_3^+$ ). Ces interactions électrostatiques entre le complexe ion molybdate-rouge de pyrogallol ( $\text{R-SO}_3^-$ ) et les protéines ( $\text{R-NH}_3^+$ ) provoque un effet bathochromique, c'est-à-dire un déplacement du maximum d'absorption,  $\lambda_{\text{max}}$ , à 600 nm (Watanabe et al., 1986). Il en résulte une modification de la longueur d'onde d'excitation et de la longueur d'onde d'émission.

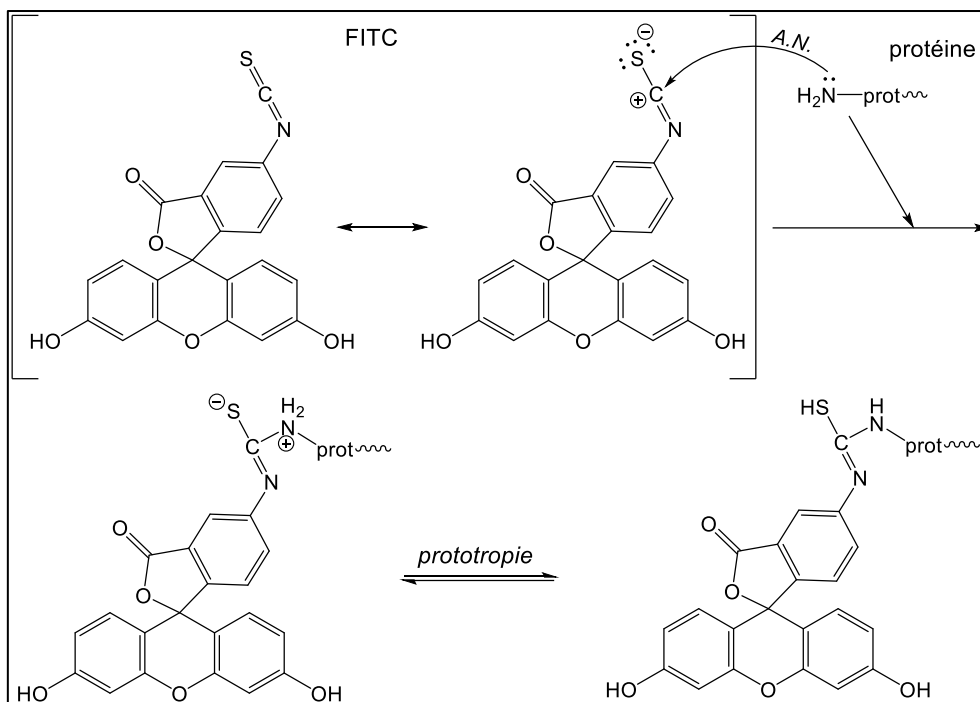


Figure 109 : Mécanisme réactionnel probable entre l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et le résidu amino d'une protéine. (A. N. pour addition nucléophile).  $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ .

...

## CHAPITRE 7. Les méthodes utilisant la diffusion de la lumière ou Rayleigh Light Scattering Method

...

### 9. Si on résumait un peu...

Parmi les nombreuses méthodes que nous vous présentons tout au long de ce livre, nous comprendrons qu'à ce stade vous vous posez de nombreuses questions. Les études de Zaia et al. (1998) et de Williams et al. (2003) ont porté sur la comparaison de différentes méthodes de dosage des protéines, en présence ou non d'agents potentiellement interférents, afin de permettre à l'expérimentateur de pouvoir choisir en toute connaissance de cause.

#### Quelle méthode choisir finalement ?

Le tableau 31 – bien que non exhaustif – peut vous aider en proposant les limites de détection des différentes méthodes que nous vous avons présentées jusqu'ici. Vous remarquerez que nous ne les avons pas toutes exposées.

Méthode	Réactifs	Zone de concentration pour laquelle le signal est linéaire (mg/L)	Limite de détection ( $\mu\text{g/L}$ )	Références bibliographiques

F	Chrome Azurol S (CAS)	5-80 (protéine = HSA)	—	Saito et al., 1985
F	Eosine Y	0,02-0,21	—	Gao et al., 2007
F	Erythrosin B	1,36-20,40	—	Ma et al., 1996a
F	$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ -Tetra(4'- carboxyphenyl)porphin (TPCC)	0,09-12	60	Li et al., 1996
F	Doxycycline europium	9,2-34,5	115	Jiang et Luo, 2004
F	Aluminum tetrasulfonated phthalocyanine (AlS <sub>4</sub> PC)	0,10-4,0	40	Li et al., 1999
F	Magdala red	0,1-4,0	100	Qin et al., 2000
F	Nanoparticles (CdS fonc- tionnalisés)	0,1-3,0	10	Wang et al., 2002
F	Rhodamine 6G	1,0-31	320	Liu et al., 2005
R	Carboxyarsenazo (CAA)	0,10-15,3	---	Yao et al., 1999
R	Quercetin (QT)	0,0-4,5	59,8	Feng et al., 1999
R	Chrome Azurol S (CAS)	0,0-1,0	20,0	Wei et al., 1998
R	Chlorophosphonazo III (CPA III)	0,0-3,6	18,5	Liu et al., 2001c
R	4-Chromotoropic acid phenylfluorone (ACAP)	0,2-4,0	75,0	Guo et Shen, 2000
R	Alizarin Red S	0,2-24,9	9,59	Zhong et al., 2004a
R	Bromothymol blue (BB)	7,0-70,0	3,75	Vidal et al., 2003
R	PSbMoB	0,05-5,0	54	Long et al., 2004
R	Ponceau G	0,2-7,5	17,5	Yang et al., 2003
R	Dibromochloro-arenazo- Al <sup>3+</sup>	2,50-50,0	123,4	Jia et al., 2002
R	Gold nanoparticle	0,0015-0,35	0,45	Liu et al., 2006
S	Biuret	200-1700	—	Zishka et Nishi- mura, 1970
S	Folin-Phenol	(5-10) × 10 <sub>s</sub>	10 <sub>s</sub>	Lowry et al., 1951
S	Bradford	(1-60) × 10 <sub>s</sub>	5000	Bradford, 1976

Tableau 31 : Comparaison des différentes méthodes pour le dosage de la BSA (albumine de sérum bovin) : F = méthode fluorescence ; R = méthode RLS ; S = méthode spectrophotométrique (les plus communes).

...

## CHAPITRE 8. Et les autres méthodes, autres que chimiques ?

Nous nous sommes attelés dans ce livre à décrire des méthodes chimiques pour doser les protéines. Sans doute en avons-nous oublié. Ce compendium des méthodes chimiques de dosage des protéines a pour objet de décrire précisément les protocoles, de prévenir les erreurs éventuelles, d'explicitier les origines possibles de dosage sur- ou sous-évaluées. Ce livre veut surtout ne présenter que les méthodes chimiques dont il était possible de décrire les fondements du dosage. Faute de publication ou de description dans des livres, nous avons parfois proposé notre hypothèse mécanistique.

Il existe cependant d'autres méthodes que les méthodes chimiques pour doser des protéines : ce sont les méthodes physiques. Ce livre n'a pas vocation à les décrire, mais nous ne pouvions pas, dans cette

conclusion, ne pas vous proposer une rapide description des méthodes physiques pour doser des protéines.

...

### 3. Utilisation des analyses spectrales : comment s’y retrouver ?

Outre les méthodes chimiques, les protéines peuvent être dosées par des méthodes physiques basées sur l’absorption d’ondes électromagnétiques. Ces techniques spectrales sont adaptées à toutes les protéines et tous les systèmes « aliments », y compris des systèmes protéiques non liquides comme la viande (Kumar et Chandrakant Karne, 2017). Les protéines peuvent être dosées sur une grande partie du spectre électromagnétique (fig. 142), des UV à l’infrarouge en passant par le visible (cas décrit dans ce livre avec l’usage de chromophores).

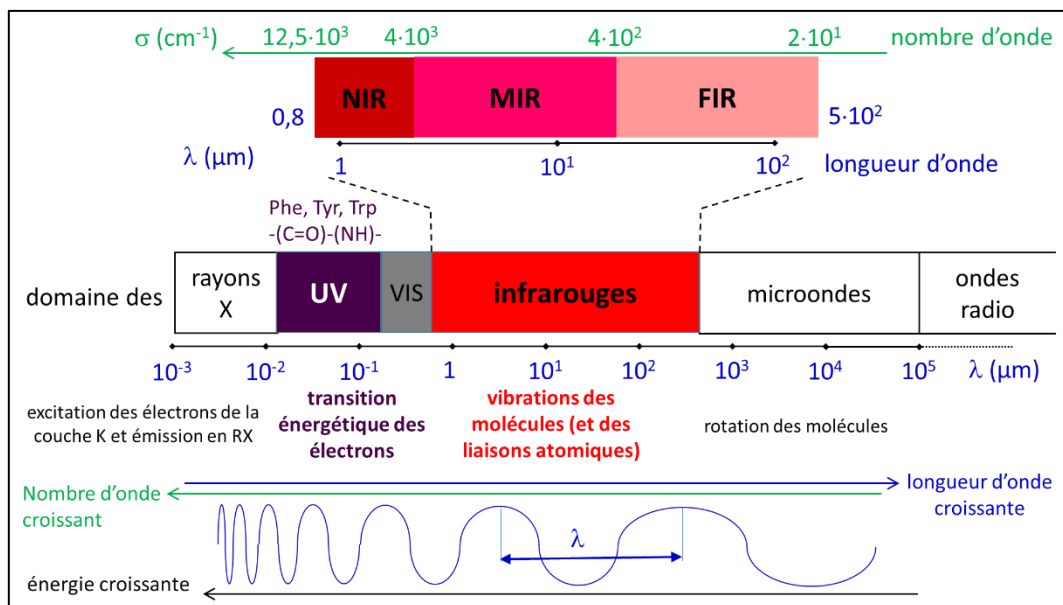


Figure 142 : Spectre électromagnétique qui permet le dosage des protéines par des méthodes physiques : ultraviolet (UV) et infrarouges, proche et moyen infrarouge en particulier (NIR et MIR).

...

Les groupes amino (liaisons N-H) pourraient servir à doser les protéines, mais leurs pics d’absorption en infrarouge se confondent avec celui d’autres liaisons. Les liaisons amide I (c’est-à-dire (C = O)–(NH) ou liaison peptidique) absorbent au nombre d’onde de 1 700 à 1 600  $\text{cm}^{-1}$  (Singh, 1999) et servent à étudier les structures secondaires des protéines (hélices  $\alpha$ , feuilletts  $\beta$ ...). Les régions d’absorption IR des bandes amide I et II servent aussi servir à doser les protéines (fig. 144).

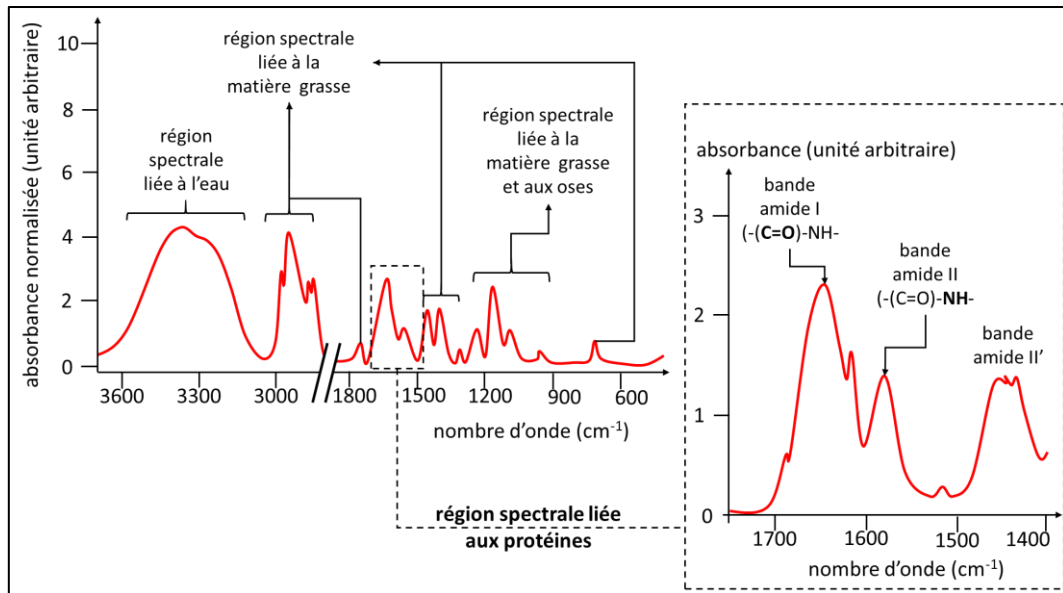


Figure 144 : Spectre d'absorption en infrarouge (MID) d'un échantillon de fromage de brebis affiné, avec en encart détaillant la région spectrale correspondant à l'absorption des protéines (schéma inspiré de Pereira et al., 2020 et de Baldassarre et al., 2012).

...

#### d. Le proche infrarouge (Near Infra-Red, NIR)

...

Grâce à la méthode mathématique de la PLS, le résultat reliant les données obtenues par la méthode de Dumas et les spectres NIRs peut être présenté (fig. 149). Une analyse de la teneur en protéines par la méthode de Dumas coûte environ 25 euros par échantillon quand une analyse par NIRs coûte moins de 5 euros (Ingle et al., 2016).

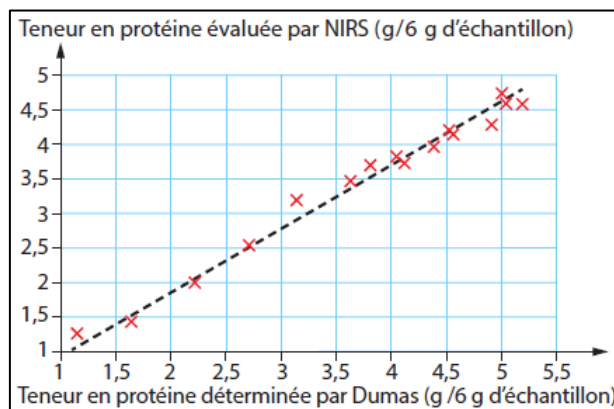


Figure 149 : Prédiction de la teneur en protéines par NIRs, régression PLS réalisée avec les valeurs obtenues par la méthode de Dumas. Selon Ingle et al. (2016).

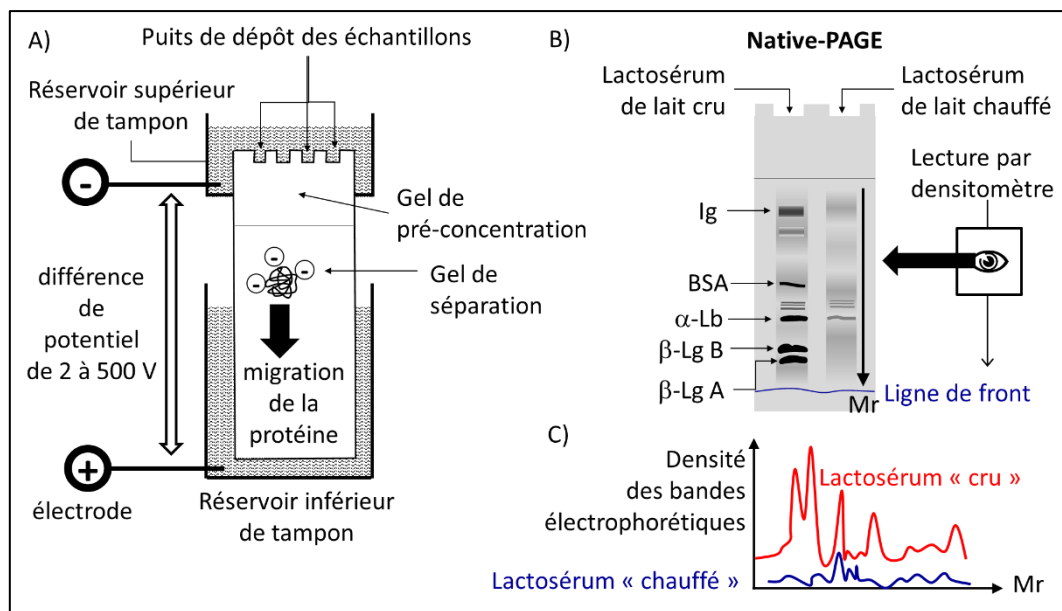
...

## 4. Utilisation de méthodes séparatives

...

#### d. L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide polymérisé (PAGE)

La PAGE consiste à faire migrer dans un gel poreux de polyacrylamide, à travers un champ électrique, un ensemble de protéines. Le maillage du gel d'acrylamide est déterminé par la proportion des monomères servant à la synthèse du gel, l'acrylamide et le N,N'-méthylène bisacrylamide, C (acrylamide/bisacrylamide en % m/m), et par la concentration totale en monomère, T (acrylamide + bisacrylamide en % m/v). Les monomères sont polymérisés par addition radicalaire, en présence d'un agent réticulant, le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine), par dégradation d'un donneur de radical, généralement du persulfate d'ammonium, sous lumière UV ou visible. Pour des valeurs de T = 5 % m/v et C = 5 % m/m (5 % de bisacrylamide), la porosité du gel est de 20 nm. Pour T = 5 % m/v et C = 30-50 %, la porosité du gel est de 500 à 600 nm (Hames et Rickwood, 1990). Une fois le gel polymérisé (désormais, il est possible de trouver des gels de PAGE tout prêts, mais certains chercheurs préfèrent encore parfois fabriquer leur propre gel), le mélange de protéines est déposé à l'aide d'une seringue dans un puits avant que la plaque de polyacrylamide soit soumise à une différence de potentiel entre les deux extrémités du gel (fig. 154). Certes, la différence de potentiel détermine la vitesse de migration électrophorétique des protéines. [...]



**Figure 154** : A) principe de l'électrophorèse en gel d'acrylamide, dite PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), basé sur la migration des protéines (espèces chargées par définition) dans un champ électrique. B) électrophorèse native de protéines de lactosérum, β-Lg = β-lactoglobuline, α-Lb = α-lactalbumine, BSA = Bovin Serum albumin, Ig = immunoglobuline C) Le dosage s'effectue par un scan du gel, un densitomètre, l'intensité colorée étant proportionnelle à la quantité de protéine. Mr : migration relative :  $Mr = \frac{\text{distance de migration des protéines}}{\text{distance de migration du bleu de bromophénol}}$ , le bleu de bromophénol n'interagissant pas avec les protéines et servant de marqueur de ligne de front de migration.

...

## Conclusion

Rien de tel pour conclure que de comparer, finalement, les performances des différentes méthodes présentées dans ce livre. Le tableau 42 permet de réaliser un comparatif rapide de toutes les méthodes de dosages des protéines abordées ici. Ce comparatif est réalisé sur la base des limites de détection (LOD) et des limites de quantification (LOQ). Cependant, ce tableau ne rend pas compte du degré d'expertise exigé, du temps de préparation avant un usage routinier, de la trop forte spécificité, du coût des dosages, des faux positifs, des sur- ou sous-évaluations possibles. Soyez prudent avec ces méthodes modernes rapides et finalement très attirantes. Assurez-vous avec une autre méthode que vous dosez bien les protéines...

Méthodes	LOD	LOQ	Références bibliographiques
Kjeldahl	90 mg/kg *	300 mg/kg *	van Reeuwijk et Houba, 1998
Dumas	60 mg/kg	200 mg/kg	Beljkaš et al., 2010
Biuret	30 mg/L	110 mg/L	Finete et al., 2013
Bradford	11 mg/L	35 mg/L	Finete et al., 2013
Lowry ou Markwell	9 mg/L	30 mg/L	Finete et al., 2013
BCA (micro)	1 mg/L 2 mg/L	2 mg/L 6 mg/L	Li et al., 2020 Hussain et al., 2019
UV (micro)	7 mg/L	21 mg/L	Ehnert et al., 2021
ATR-FTIR	30 mg/L 18 mg/kg	80 mg/L 54 mg/kg	Szentirmai et al., 2020 Uysal et al., 2019
RP-HPLC + UV	2,4 mg/L	7,4 mg/L	Hussain et al., 2019
RP-HPLC + DAD	3 à 8 mg/L	9 à 24 mg/L	Ostertag et al., 2021
HPLC + ELSD	0,8 mg/L	2,3 mg/L	Hussain et al., 2019
SDS-PAGE – Coomassie	62 g/kg	187 g/kg	Uysal et al., 2019
PAGE coloration à l'argent	0,01 mg/L °	0,1 mg/L ?	Heukeshoven et Dernick, 1985
Électrophorèse capillaire (CGE)	0,04 à 0,2 g/L	0,1 à 0,5 g/L	Cianciulli et al., 2012
ELISA protéines d'oeuf 2S-albumine de noix de cajou	0,5 mg/kg 0,4 mg/kg	1,6 mg/kg 4 mg/kg	Nguyen et al., 2019 Chen et al., 2019
Biocapteur (ELISA-sandwich et électrochimie)	1 mg/L	3 à 5 mg/L	Voir paragraphe précédent

**Tableau 42 :** Limite de détection (LOD, Limit of Detection) et de quantification (LOQ, Limit of Quantification) de différentes techniques de dosage des protéines. LOD est généralement déterminée par la valeur du rapport signal-sur-bruit de 3 ou 3,3 et LOQ par la valeur du rapport signal-sur-bruit de 10. Le rapport signal-sur-bruit est déterminé pour une valeur de signal qui soit 3,3 ou 10 fois supérieure à la variation standard  $\sigma$ , calculée avec l'analyse 10 fois répétée d'un blanc. RPHPLC + UV : HPLC en phase inverse (Reverse Phase) avec un détecteur UV ; HPLC + ELSD (HPLC Coupled to an Evaporative Light Scattering Detector) une HPLC avec un détecteur laser à détection de diffraction de lumière sur plasma. \*Kjeldahl : Calcul basé sur une descente de burette de 0,15  $\pm$  0,02 mL d'HCl 0,01 M (intervalle de confiance à 5 %) soit une valeur moyenne à 0,019 mg/g d'azote avec un écart-type standard de 0,0048, soit une LOQ (coefficient de 3) de 0,016 mg d'azote par g soit 16 mg-N/kg d'échantillon et un coefficient de transformation K de 6,25. ° PAGE-argent : 1 ng/bande pour 100  $\mu$ L déposés, soit 1 ng/100  $\mu$ L.

...

360 références bibliographiques