

N° Ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI  
BOUMEDIENE

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Thèse de Magister en Biochimie-Immunologie

Thème :

**Purification de la transglutaminase tissulaire du foie de cobaye en vue de son utilisation dans le diagnostic de la maladie cœliaque**

Réalisé par : LAOUFI Razika

Soutenu le 05/01/2012 Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup> Y.BENAZZOUG</b>	<b>Professeur</b>	<b>FSB/USTHB</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> N.KACI</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>FSB/USTHB</b>	<b>Directrice de thèse</b>
<b>M<sup>r</sup> H. BAZ</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>ENS / KOUBA</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> N.ADDOUR</b>	<b>Maitre de conférences</b>	<b>FSB/USTHB</b>	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> K.BELANTEUR</b>	<b>Maitre assistante</b>	<b>IPA</b>	<b>Examineur</b>

# Remerciements

- *Docteur N. KACI*, merci pour m'avoir proposé le sujet de thèse, m'avoir guidé patiemment le long de sa réalisation, pour votre soutien moral et aide inestimable, vos conseils judicieux et pour vos encouragements qui m'ont toujours permis d'aller de l'avant. Merci également pour votre compréhension et pour votre patience à mon égard, pour votre générosité et votre bonne humeur de tous les instants .
- Je remercie chaleureusement Mme le Professeur **Y. BENAZZOUG** pour l'honneur qu'elle m'accorde en acceptant de présider le jury malgré ses nombreuses obligations.
- J'exprime mes sincères remerciements à Mme le Docteur **N. ADDOUR**, qui malgré ses nombreuses responsabilités a aimablement acceptée d'examiner ce travail.
- J'exprime ma sincère reconnaissance à Mr le Docteur **H.BAZ** de son disponibilité à examiner ce travail.
- Je remercie chaleureusement Mme le Docteur **K.BELANTEUR** qui a accepté d'examiner ce travail.
- J'exprime ma profonde gratitude et reconnaissance à **Mme Anissa**, je vous remercie pour votre bienveillance, pour votre disponibilité pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée durant l'accomplissement de ce travail.
- Je tiens à exprimer mon infinie reconnaissance à **Mr le Professeur T.Hamaddouche** responsable de biologie moléculaire qui en m'accueillant dans son laboratoire m'a permis de mener à bien mes expérimentations.
- Mes sincères remerciements s'adressent à
  - M<sup>elle</sup> Leila Misab** pour son amitié et son aide précieuse et pour ses conseils et soutien le long de ma formation en magister.
  - M<sup>elle</sup> Faïza** pour son aide, son amitié et son soutien moral.
  - M<sup>elle</sup> D. Ait Idir** pour son aide durant la réalisation de ce travail.
  - M<sup>me</sup> Amel** pour son aide précieuse et son amitié.
  - M<sup>me</sup> Mimoun** pour son aide et pour sa gentillesse.

# *Dédicaces*

*A la mémoire de mon père et ma mère les deux lumières de ma vie qui brillent à jamais dans mon ciel.*

*A mes enfants Islem, Rami et Hiba,*

*A mon mari,*

*A mes sœurs, fadhéla, Sihem, Nabila, Nassima, Khadidja,,*

*A mes frères, Hamid, Hocine, Yacine, Abdelmalek, Mohamed,*

*A mes neveux, Raouf, Adelsalem, Oussama ,Taha Riyadh, Zaki, Aymen, Ayoub ,Boualem et Adel,*

*A mes nièces Lina , Ghada , Raouya , ILhem, Ahlem, Anya, Rima et Ritedje.*

*Razika*

## Liste des abréviations

ABTS	2,2-Azino-di-3ethyl-BenzoThiazoline 6Sulfonic acid
APS	Ammonium PerSulfate
BSA	Bovin Sérum Albumin
DEAE	DiEthyl Amino Ethyle
EDTA	Ethylène DiamineTétra Acétate
ELISA	Enzyme Liked Immunosorbent Assay
HLA	Human Leucocyte Antigen
IgA	Immunoglobuline de classe A
IgG	// // // G
M	Molaire
min	Minute
ml	Millilitre
mg/ml	Milligramme par millilitre
PMSF	Phenylmethylsulfonide fluoride
Rf	Relative mobility
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl SulfatePolyacrylamide Gel Electrophoresis
TEMED	N' N'Tetramethylene diamine
tTG	Transglutaminase tissulaire
µg	Microgramme
µl	Microlitre
H2S04	Acide sulfurique

## Liste Des Figures

- Figure 1 : Réactions catalysées par les transglutaminases
- Figure 2 : Modifications post-traductionnelles des protéines catalysées par transglutaminases
- Figure 3 : Mécanisme de type (ping-pong modifié) des transglutaminases
- Figure 4 : Structure cristalline de transglutaminase
- Figure 5 : Mécanismes d'action de la transglutaminase (tTG)
- Figure 6 : Réponse et destruction tissulaires au cours de la maladie cœliaque
- Figure 7 : Protocole d'extraction et de purification de la transglutaminase tissulaire à partir de foie de cobaye
- Figure 8 : Effet du pH sur la charge nette de la protéine
- Figure 9 : Principe de chromatographie d'échangeuse d'ions
- Figure 10 : Système de chromatographie échangeuse d'ions
- Figure 11 : Principe de l'ELISA
- Figure 12 : Courbe étalon des protéines
- Figure 13 : Profil électrophorétique des protéines solubles de l' homogénat de foie de cobaye
- Figure 14 : Profil électrophorétique des protéines de l'extrait 1
- Figure 15 : Profil électrophorétique des protéines de l'extrait 2
- Figure 16 : Purification de la tTG de l'extrait 2 par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE microcristalline
- Figure 17 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des différentes fractions obtenues après chromatographie sur DEAE -52
- Figure 18 : Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE microcristalline
- Figure 19 : Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- microcristalline (pH7.5)
- Figure 20 : Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- microcristalline (pH 6.75)
- Figure 21 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des différents extraits et fractions
- Figure 22 : Dosage des anticorps anti transglutaminase par ELISA
- Figure 23 : Courbe étalon poids moléculaires

## Liste des tableaux

- Tab I : Les isoformes de la transglutaminase tissulaire des mammifères
- Tab II : Spécificité de la transglutaminase tissulaire pour les substrats non naturels
- Tab III : Génération des molécules HLA.DQ : complémentation cis et trans
- Tab IV : Réalisation d'une courbe d'étalonnage
- Tab V : Propriétés des gels utilisés
- Tab VI : Détermination de la concentration de tTG nécessaire pour le dosage immunoenzymatique d'ELISA
- Tab VII : Effet de la vitesse de centrifugation sur le rendement d'extraction
- Tab VIII : Précipitation par le sulfate d'ammonium
- Tab IX : Détermination du rendement de purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- 52
- Tab X : Effet de l'échangeur anionique sur le rendement de purification
- Tab XI : Détermination du rendement de purification de tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE microcristalline
- Tab XII : Dilutions utilisées pour la détermination du titre de la tTG
- Tab XIII : Détection des anticorps anti-transglutaminase tissulaire par ELISA

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Généralités : ...</b> .....	2
1. Les transglutaminases .....	2
1.1 Mécanisme catalytique .....	4
1.2 Les isoformes des transglutaminases .....	4
1.3 Structure .....	7
1.4 Spécificité .....	8
2. La transglutaminase tissulaire .....	10
2.1 Rappels physiopathologiques .....	10
2.2 Immunopathogenie de la maladie .....	11
2.3 Mécanisme immunopathogénique .....	12
2.3.1 Mécanisme d'action de la transglutaminase tissulaire .....	12
2.3.2 Rôle de la Transglutaminase tissulaire dans la maladie cœliaque .....	15
<b>Matériel et méthodes</b> .....	18
1. Matériel .....	
1.1 Matériel biologique .....	18
1.2 Matériel non biologique .....	18
2. Extraction de la tTG .....	18
2.1 Broyage et homogénéisation du foie .....	18
2.2 Ultracentrifugation .....	18
2.3 Dosage des protéines .....	18
2.3.1 Principe de la technique .....	19
2.3.2 Mode opératoire .....	19
2.4 Précipitation différentielle des protéines au sulfate d'ammonium .....	20
2.4.1 Principe .....	20
2.4.2 Mode opératoire .....	20
2.5 Ultrafiltration .....	22
3. Purification de la tTG .....	22
3.1 Chromatographie échangeuse d'ions .....	22
3.1.1 Principe .....	25
3.1.2 Mode opératoire .....	25
3.2 Électrophorèse .....	28
3.3.1 Principe .....	28
3.3.2 Mode opératoire .....	30
3.3 ELISA .....	31
3.3.1 Principe .....	32
3.3.2 Mode opératoire .....	32

Résultats.....	34
1. Extraction et purification de la transglutaminase tissulaire .....	34
1.1 Détermination du rendement d'extraction de la tTG .....	37
1.2 Analyse des protéines solubles de l'homogénat du foie de cobaye par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes(SDS-PAGE). .....	37
1.3 Optimisation des conditions de purification de la tTG .....	42
1.3.1 Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- 52 .....	42
1.3.2 Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur D.E.A.E. microcristalline .....	46
1.4 Analyse des profils électrophorétiques .....	51
1.5 Révélation de la tTG par ELISA .....	53
<b>Discussion</b> .....	<b>54</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>59</b>
<b>Annexes</b>	

### Introduction

La transglutaminase tissulaire tTG (E.C.2.3.2.1.3) a été identifiée comme un auto antigène intervenant dans le déclenchement de la maladie cœliaque (Dieterich *et al.*, 1997).

C'est une enzyme intracellulaire ubiquitaire  $Ca^{2+}$  dépendante, qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre protéines porteuses de résidus glutamine et protéines porteuses de résidus lysine.

La tTG est une enzyme cytosolique contenue dans le surnageant après ultracentrifugation. C'est une enzyme monomérique de PM 85kDa et de pHi 5-6.

C'est une protéine qui est difficile à isoler et à purifier, car elle s'agrège facilement.

Il a été suggéré que la liaison de la transglutaminase à la gliadine ou à certains peptides de la gliadine induit la formation de néo-antigènes reconnus par le système immunitaire et ainsi la production d'auto-anticorps dirigés contre la transglutaminase.

La découverte de la transglutaminase tissulaire a permis de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie cœliaque et de développer de nouveaux tests diagnostiques basés sur la recherche d'anticorps anti-transglutaminase par dosage immunoenzymatique ELISA.

### Objectif

En raison des difficultés rapportées par différentes données de la littérature, nous nous sommes proposé d'optimiser les conditions de purification de cette enzyme, afin de limiter l'utilisation de la biopsie jéjunale qui permet de poser le diagnostic de la maladie cœliaque, mais qui reste cependant une épreuve traumatisante pour les malades.

Nous envisageons dans ce travail :

- D'isoler et de purifier la transglutaminase tissulaire à partir de foie de cobaye,
- D'utiliser l'enzyme purifiée pour la mise en évidence d'auto-anticorps dans le sérum de malades cœliaques,
- De comparer sa sensibilité à celle de:
  - \* La transglutaminase du foie de cobaye commercialisée (utilisée en routine pour le diagnostic de la maladie cœliaque),
  - \* La transglutaminase recombinante.

La transglutaminase ainsi obtenue aura un intérêt valorisable en tant que contrôle positif stable pour des tests d'auto-immunité au cours des intolérances au gluten.

## 1. Les transglutaminases

Les transglutaminases (TGases) composent une famille d'enzymes faisant partie de la classe des transférases (EC2.3.2.13) qui catalysent la réticulation post-traductionnelle des protéines par formation d'une liaison covalente entre un groupement amine libre et le groupement carboxymide  $\gamma$  de protéines ou de peptides liés au groupement glutamine.

La réticulation des protéines par les TGases génère des produits de poids moléculaire élevé très résistants à la dégradation protéolytique et au stress mécanique. Ces produits se retrouvent dans plusieurs tissus et forment en partie la peau, les cheveux, les matrices extracellulaires et les caillots sanguins (Griffin *et al.*, 2002).

Les TGases sont impliquées dans plusieurs rôles physiologiques importants tels que l'endocytose, la coagulation sanguine, la formation de l'épiderme, l'apoptose et la régulation de la croissance cellulaire (Autuori *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1999).

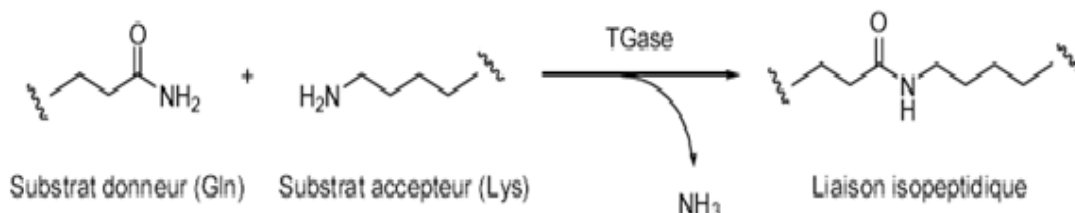
Une mauvaise régulation de l'activité des TGases aboutit à plusieurs désordres physiologiques, tels la formation des cataractes (Shridas *et al.*, 2001), la maladie cœliaque (Shan *et al.*, 2002) et le psoriasis (Schroeder *et al.*, 1992) ; la transglutaminase tissulaire ou tTG semble être impliquée dans le développement de maladies neurodégénératives telles les maladies d'Alzheimer et de Huntington (Lorand, 1969 ; Cooper *et al.*, 2002 ; Boeshans *et al.*, 2007).

Les transglutaminases ont d'abord été décrites pour la première fois en 1959 (Dieterich *et al.*, 1997) ; l'activité biochimique exacte de la transglutaminase a été mise en évidence dans la coagulation du sang (facteur XIII) en 1968 (Molberg *et al.*, 1998).

### 1.1. Mécanisme catalytique

La réaction catalytique est généralement considérée comme une réaction irréversible (Clarke *et al.*, 1959) ; les TGases réticulent les protéines en catalysant une réaction de transfert d'acyle dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  entre le groupement  $\gamma$ -carboxamide d'un résidu Gln et le groupement  $\epsilon$ -amino d'un résidu Lys, ce qui mène à la formation d'un lien isopeptidique  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysine (**Fig.1**) ; ces liaisons isopeptidiques ne sont pas susceptibles à la protéolyse.

En plus de catalyser la formation de liens isopeptidiques entre des peptides et des protéines, les TGases peuvent aussi catalyser d'autres modifications post-traductionnelles telles l'incorporation d'amines dans les protéines et la désamination sur des sites spécifiques de résidus Gln (**Fig.2**).



**Figure.1** Réaction catalysée par les transglutaminases.

Les réactions catalysées par les TGases procèdent *via* un mécanisme de type « ping-pong modifié » (Folk., 1969) (**Fig.3**).

La réaction est effectuée par une triade catalytique Cys-His-Asp conservée, similaire à celle des protéases à cystéine. Il est généralement admis que les résidus Cys et His forment une paire d'ions thiolate-imidazolium (Yee *et al.*, 1994 ; Ahvazi *et al.*, 2003) .

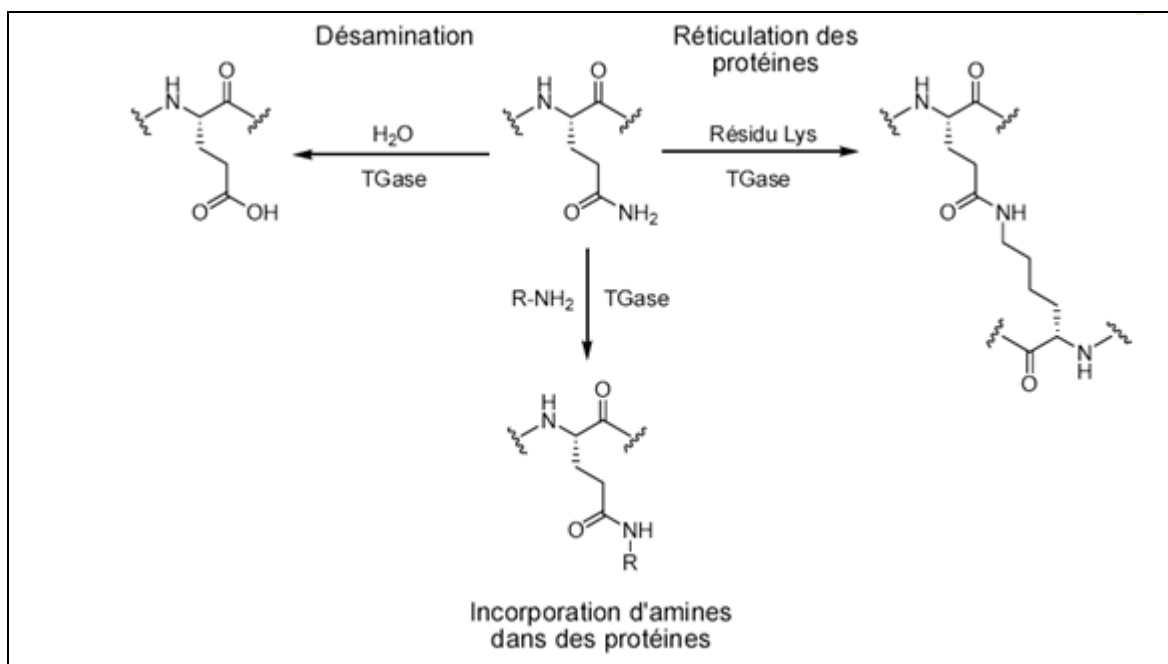
La première étape du mécanisme est l'étape d'acylation, où une protéine ou un peptide contenant un résidu Gln exposé, agissant comme substrat donneur d'acyle, réagit avec la Cys catalytique, formant un intermédiaire acyl-enzyme covalent et libérant de l'ammoniaque. Par la suite, cet intermédiaire acyl-enzyme réagit avec le second substrat, l'accepteur d'acyle, et lui transfère le groupement  $\gamma$ -glutamyle, régénérant par la suite l'enzyme libre : c'est l'étape de désacylation.

Lorsque le substrat accepteur est une amine, l'étape de désacylation est appelée transamidation.

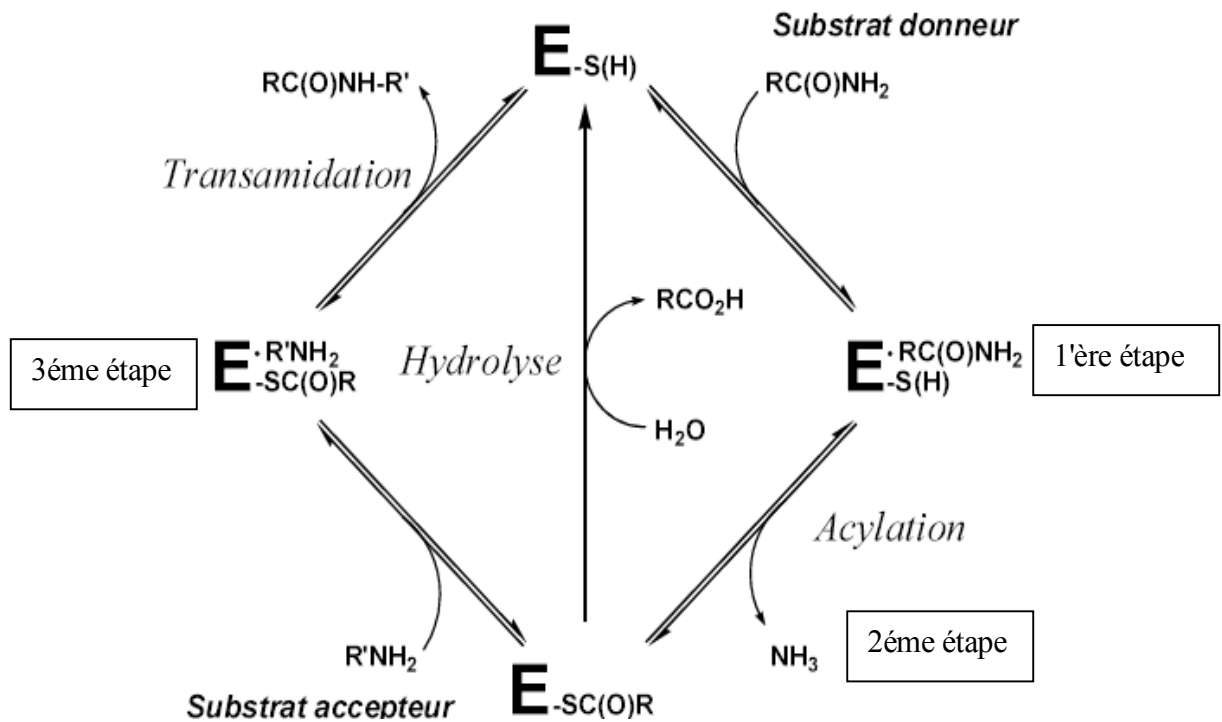
Pour la transamidation, le substrat accepteur peut être presque n'importe quelle amine primaire, mais *in vivo*, il s'agit habituellement d'un résidu Lys d'une protéine ou d'un peptide.

En l'absence d'amine primaire, l'intermédiaire acyl-enzyme peut aussi être hydrolysé, transformant le résidu Gln du substrat donneur en résidu Glu, mais à une vitesse inférieure par rapport à la transamidation.

L'étape de désacylation se nomme alors hydrolyse.



**Figure .2** Modifications post-traductionnelles catalysées par les transglutaminases(Folk., 1969)



**Figure. 3** Mécanisme de type « ping-pong modifié » des transglutaminases (Folk., 1969).

L'étape limitante du mécanisme de la TGase est l'étape de désacylation (transamidation ou hydrolyse) (Leblanc *et al.*, 2001 ; Case *et al.*, 2003)

En effet, il a été démontré que, même en utilisant des amines hautement nucléophiles comme substrats accepteurs, la vitesse de la désacylation restait inférieure à la vitesse d'acylation (Leblanc *et al.*, 2001). Ce qui montre bien que les TGases sont très efficaces pour activer le transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl vers les amines primaires aux dépens de l'eau, et ce, bien que l'eau soit à une concentration beaucoup plus élevée dans le milieu réactionnel (Leblanc *et al.*, 2001).

## 1.2 Les Isoformes des transglutaminases

Les TGases sont des transférases de classe EC2.3.2.13 (protéine-glutamine  $\gamma$ -glutamyltransférases) qui sont présentes chez tous les vertébrés de même que chez les bactéries (Pasternack *et al.*, 1998), les nématodes (Madi *et al.*, 1998) les levures (Iranzo *et al.*, 2002) et les plantes (Delle Mea *et al.*, 2004),.

On distingue des formes sécrétée, tissulaire, épidermale, keratinocytaire et hémocytaire.

Les transglutaminases sont isolées difficilement en raison de leur haut pouvoir d'agrégation (Beate *et al.*, 1996).

Chez les mammifères, neuf TGases ont été identifiées par séquençage génomique (**Tab.I**) (Chen et Mehta., 1999 ; Griffin *et al.*, 2002 ; Lorand et Graham 2003 ; Mehta., 2005) et ont été classifiées selon leur séquence. Cependant, seules six d'entre elles ont pu être

caractérisées au niveau protéique : il s'agit du facteur XIIIa, de la TGase de kératinocyte, de la TGase tissulaire, de la TGase épidermale, de la TGase de prostate (tTG sécrétée) de la TGase X.

**Tableau. I** Les isoformes de la transglutaminase tissulaire des mammifères

Type de TGase	Synonyme	Masse (kDa) approximative	Localisation cellulaire	Expression Tissulaire
Facteur XIIIa	TGase du plasma facteur stabilisant la fibrine	83 (monomère)	extracellulaire et cytosolique	sang
TGase 1	TGase de kératinocyte	90	majoritairement membranaire	épithélium
TGase 2	TGase tissulaire	80	cytosolique, nucléaire et extracellulaire	ubiquitaire
TGase 3	TGase épidermale	77	cytosolique	épithélium
TGase 4	TGase de prostate sécrétée	77	extracellulaire	prostate
TGase 5	TGase X	81	inconnue	inconnue
TGase 6	TGase Y	inconnue	inconnue	inconnue
TGase 7	TGase Z	80	inconnue	inconnue
Bande	B4.2 (inactive)	77	membranaire	Sang

Le facteur XIII connu également comme TGase du plasma est le dernier zymogène activé lors de la cascade de coagulation sanguine et participe donc à la formation du caillot sanguin. Cette protéine tétramérique est composée de deux chaînes A contenant le site actif de la transglutaminase et de deux chaînes B n'ayant aucune activité catalytique (Lai., 1999) ; elle est activée à la suite de la libération du peptide d'activation de la chaîne A par l'action de la thrombine, générant ainsi le facteur XIIIa.

Le facteur XIIIa est la seule TGase de mammifère qui est homodimérique : chaque monomère est formé de 732 résidus et a une masse moléculaire de 83 kDa. Cette TGase peut se retrouver dans le plasma et dans le cytoplasme de plusieurs types de cellules.

La TGase de kératinocyte ou TGase de type 1 est une enzyme monomérique de 90 kDa qui est associée à la membrane cytoplasmique cellulaire des kératinocytes.

C'est la TGase de PM apparent le plus élevé (817 résidus, 90 kDa), elle possède une région d'ancrage à la membrane en N-terminal qui contient un groupe de cinq cystéines sur

lesquelles des acides gras tels l'acide myristique et l'acide palmitique peuvent former des liens thioester, donnant lieu à l'ancre lipidique (Steinert *et al.* , 1996).

Ses rôles biologiques sont la différenciation des kératinocytes et la formation de la couche cornée de la peau.

La TGase tissulaire (TGase de type 2) est une protéine monomérique de 690 résidus de PM apparent de 80 kDa ; elle représente le membre le plus répandu et le plus étudié de cette famille. Cette TGase se retrouve dans tous les tissus et est majoritairement cytosolique ; elle peut également se retrouver dans le noyau (Lesort ., 1998) et dans le milieu extracellulaire ( Mehta ., 2005). Elle possède une activité d'hydrolyse de nucléotides (GTP et ATP), et représente ainsi un membre de la famille des protéines G (Nakaoka *et al.*, 1994).

La liaison au GTP inhibe son activité transférase. Cette TGase démontre de plus, des activités isomérase (Hasegawa *et al.*, 2003) kinase (Mishra et Murphy., 2004) et contient des sites de liaison à la fibronectine et à l'intégrine ( Fesus et Piacentini, 2002).

Le rôle physiologique précis de cette TGase n'est pas encore clairement démontré, mais elle semble être impliquée dans l'induction de l'apoptose (Fesus *et al.*, 1987), l'endocytose, l'adhésion cellulaire, le développement de la matrice extracellulaire et la différenciation cellulaire ( Chen *et al.*, 1999 ; Mehta., 2005).

La TGase épidermale (TGase de type 3) est une TGase monomérique impliquée dans la différenciation des kératinocytes et dans la formation de l'enveloppe cellulaire dans l'épiderme et le follicule pileux. Cette enzyme est soluble constituée de deux chaînes polypeptidiques qui sont exprimées en une seule proenzyme de 692 résidus, dont le PM apparent est de 77 kDa elle requiert pour son activation une protéolyse , A la suite de cette protéolyse, deux fragments globulaires qui demeurent associés sont générés ( Mehta , 2005).

La TGase épidermale comme la TGase tissulaire peut aussi lier et hydrolyser le GTP, mais le rôle de cette activité demeure pour l'instant inconnu (Ahvazi *et al.*, 2002).

La TGase sécrétée est identifiée dans la sécrétion de prostate dorsale et (glande coagulante) la fonction de cette enzyme est la formation du caillot post-coïtal chez le rat. Son rôle chez l'homme est inconnu (Bures *et al.* , 1980 ; Wilhelm *et al.*, 1995).

Les autres TGases de mammifères sont encore peu étudiées. La TGase X (TGase de type 5) contribue à la formation de la couche cornée des kératinocytes et peut lier le GTP (Candi *et al.*, 2004 ). La protéine Bande 4.2 de l'érythrocyte fait partie de la famille des TGases mais n'a pas d'activité enzymatique, car la cystéine catalytique est remplacée par une alanine ; c'est un composant majeur du cytosquelette des érythrocytes qui joue un rôle important dans la structure et les propriétés mécaniques de ces cellules (Mehta, 2005). Le rôle physiologique des TGases de type 6 et 7 n'a pas encore été élucidé.

Une TGase microbienne provenant de *Streptoverticillium mobaraense* a aussi été étudiée, c'est la seule TGase provenant des procaryotes à avoir été isolée ; elle est très différente

des TGases de mammifères et ne possède aucune homologie de séquence ni de structure avec TGases homologues de mammifères. C'est une enzyme sécrétée composée de 331 résidus et de PM de 38 kDa. La forme active est un propeptide issu du clivage de la TGase

Cette enzyme possède une triade catalytique Cys-His-Asp et catalyse la même réaction que les autres TGases mais ne requiert pas de  $\text{Ca}^{2+}$  pour être active, ce qui la distingue des TGases provenant d'eucaryotes. Son rôle biologique n'est pas encore connu (Kashiwagi *et al.*, 2002).

### 1.3 Structure

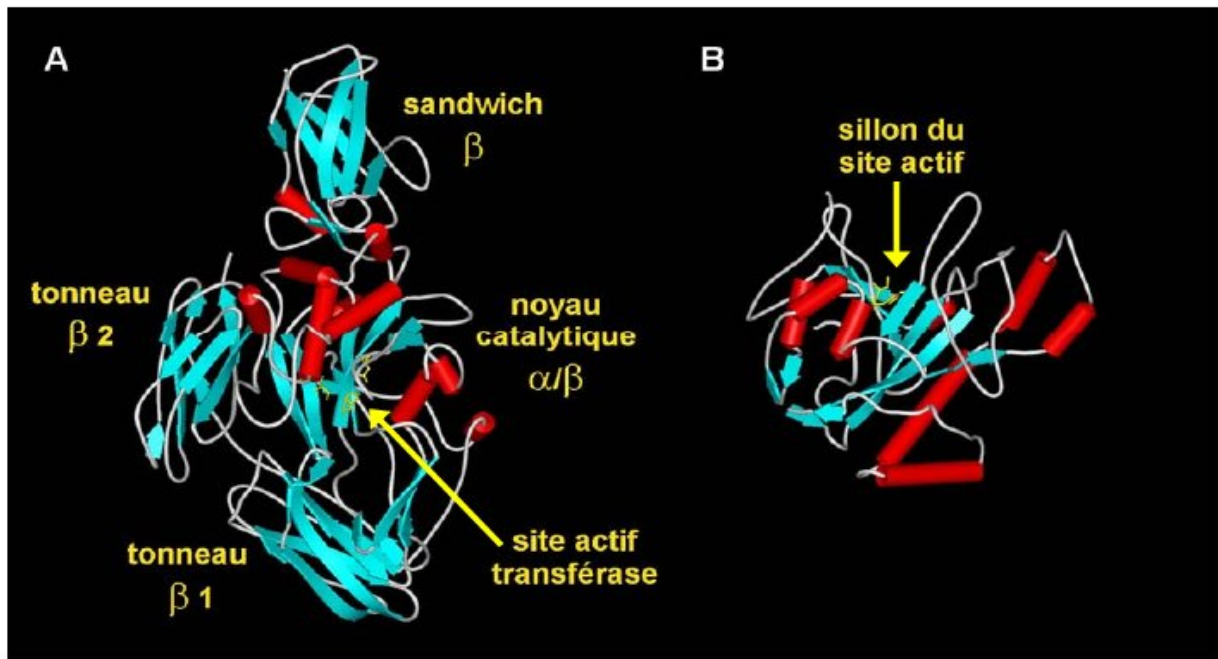
Les structures cristallines de quatre TGases de vertébrés appartenant à trois différentes classes ont été résolues. Il s'agit de la TGase de plasma humaine (facteur XIIIa) (Yee *et al.*, 1994 ; Weiss *et al.*, 1998 ; Fox *et al.*, 1999), des TGases tissulaires humaines (Liu *et al.*, 2002) et de poisson (*Pagrus major*) (Noguchi *et al.*, 2001), de même que de la TGase épidermale humaine (Ahvazi *et al.*, 2004).

Malgré les différences significatives dans leur structure primaire, ces TGases adoptent toutes une structure tridimensionnelle similaire. Ces structures sont formées de quatre domaines: le domaine N-terminal sandwich  $\beta$ , le noyau catalytique  $\alpha/\beta$ , le tonneau  $\beta$  1 et le tonneau  $\beta$  2 C-terminal (**Fig.4A**).

Le domaine N-terminal sandwich  $\beta$  est connu comme étant le site de liaison de la fibronectine et de l'intégrine à la TGase tissulaire. Le noyau catalytique  $\alpha/\beta$  est composé d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$  et contient le site actif pour l'activité transférase, mais aussi le site actif pour l'activité d'hydrolyse de nucléotides des TGases de type 2, 3 et 5. Ce domaine contient aussi le site de liaison au calcium, dont la localisation demeure indéfinie pour la TGase tissulaire.

D'après des études de délétions, les domaines tonneaux  $\beta$  1 et 2 ne semblent pas être indispensables pour l'activité catalytique de la TGase tissulaire (Lai *et al.*, 1996) et du facteur XIIIa (Lai *et al.*, 1994).

Les TGases de vertébrés contiennent plusieurs résidus cystéine, mais aucun pont disulfure n'a été identifié (Wiliming *et al.*, 2002)



**Figure. 4** Structure cristalline des transglutaminases (Kashiwagi *et al.*, 2002)  
 (A) TGase tissulaire de *Pagrus major* (PDB 1G0D)  
 (B) TGase microbienne de *Streptovercillium mobaraense* (PDB 1IU4)

La structure cristalline de la TGase microbienne provenant de *Streptovercillium mobaraense* a également été résolue (Kashiwagi *et al.*, 2002); elle est complètement différente de celle des TGases de mammifères et ne présente pas d'homologie de structure avec aucune autre protéine connue. Elle est formée d'un seul domaine en forme de cœur contenant des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ ; le site actif se retrouve à la base d'un sillon de 16 Å de profondeur contenant le seul résidu Cys de l'enzyme (**Fig.6B**).

#### 1.4 Spécificité

Les substrats naturels des TGases sont des protéines et des peptides qui peuvent être divisés en deux catégories :

- les substrats donneurs d'acyle possédant une Gln réactive ..,
- les substrats accepteurs d'acyle possédant une Lys réactive.

A l'heure actuelle, plusieurs protéines ont été identifiées comme étant des substrats de TGases (Facchiano2005).

Comme ces protéines peuvent contenir à la fois des résidus Gln et Lys, certains des substrats des TGases peuvent être à la fois un substrat donneur et un substrat accepteur. Il ne semble pas y avoir de séquence consensus reconnue par les TGases, car celles-ci peuvent réagir sur presque n'importe quel résidu Gln ou Lys accessible.

Par contre il a été montré que la séquence PQQQLPY contenue dans les gliadines est une séquence de haute affinité chez les substrats donneurs de la TGase tissulaire pour la réaction

de désamination (Haush *et al.*, 2003 ; Choi *et al.*, 2005) .

Les TGases peuvent aussi reconnaître plusieurs mono et polyamines naturelles avec une spécificité large. En effet, plusieurs amines telles la putrécine, la spermidine, la spermine, la cadavérine, l'histamine et la sérotonine sont utilisées par les TGases comme accepteurs d'acyle *in vitro* (Clarke *et al.*, 1959; Facchiano *et al.*, 2005)

La spécificité des TGases vis-à-vis des substrats non naturels a surtout été étudiée chez la TGase tissulaire, (**Tab.II**).

Ces substrats non naturels incluent des peptides synthétiques et plusieurs amines primaires. La TGase tissulaire présente une très large spécificité envers le substrat accepteur d'acyle. Ce substrat peut être presque n'importe quelle amine primaire (Aeschlimann et Paulsson., 1994).

Des amines primaires aliphatiques, telles la glycine, la glycine méthyle ester et la cadavérine (Clarke *et al.*, 1959 ; Folk et Chung, 1985 ; Leblanc *et al.*, 2001) ainsi que des anilines, telle la *N,N*-diméthyl-1,4-phénylènediamine (Macedo *et al.*, 2004) peuvent être des substrats de l'enzyme. Toutefois, les amines contenant des fonctions acides carboxyliques libres, tels les acides aminés, et les amines ayant des groupements volumineux adjacents au groupement amine, tel l'amide aminé L-tyrosinamide ne sont pas des substrats (Clarke *et al.*, 1959 ; AbeS *et al.*, 2000).

**Tableau. II** Spécificité de la transglutaminase tissulaire pour les substrats non naturels. (Folk et Chung, 1985)

substrats donneurs		substrats accepteurs	
molécules reconnues	molécules non reconnues	molécules reconnues	molécules non reconnues
peptide contenant L-Gln	peptide contenant D-Gln ou L-Asn	amines primaires	amines secondaires
	L-Gln	anilines	acides aminés
peptides contenant un ester aromatique de L-Glu	peptide contenant un dérivé anilide de L-Gln	dérivés d'acides aminés sans fonction carboxylate libre et ayant de petites chaînes latérales	dérivés d'acides aminés sans fonction carboxylate libre et ayant des chaînes latérales volumineuses
	amides secondaires	Eau	

La spécificité des transglutaminases tissulaires pour les substrats donneurs est plus étroite (**Tab.II**). Les peptides contenant de la L-Gln sont reconnus contrairement aux peptides contenant les résidus similaires L-Asn et D-Gln. De plus, pour qu'un peptide soit un substrat de la TGase, il faut qu'il ait au minimum deux résidus et le groupement protecteur Cbz en N-terminal. La L-Gln seule n'est pas un substrat des TGases (Folk et Chung., 1985).

De ce fait, le peptide synthétique N-carbobenzyloxyglutaminyglycine (Cbz-Gln-Gly) est le substrat donneur synthétique le plus couramment utilisé pour les études cinétiques des transglutaminases tissulaires. Ce composé a un  $K_m$  élevé d'environ 3 mM (Day et Keillor, 1999 ; Anderson *et al.* , 2004 ; Chica *et al.* , 2004).

Il est également connu que les esters aromatiques  $\gamma$ -glutamyles sont de bons substrats des TGases, tel le substrat artificiel N-carbobenzyloxy-L-glutamyl ( $\gamma$ -p-nitrophényl ester) glycine (Leblanc *et al.* , 2001) qui est utilisé en analyses cinétiques et dont le  $K_m$  de 20  $\mu$ M est nettement inférieur à celui de son analogue : le Cbz-Gln-Gly.

La fonction  $\gamma$ -carboxamide de la L-Gln est le seul amide reconnu par l'enzyme contrairement aux anilides et aux amides secondaires qui ne sont pas des substrats (Halim *et al.*, 2006).

La TGase peut donc reconnaître plusieurs dipeptides, tels Cbz-Gln-Gly comme substrats donneurs et plusieurs dérivés d'acides aminés, telle la glycinamide comme substrats accepteurs.

## 2. La Transglutaminase tissulaire

L'identification récente de la transglutaminase tissulaire comme antigène cible des auto-anticorps anti-endomysium dans la maladie cœliaque représente une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie (Dieterich *et al.*, 1997). La caractérisation des modifications enzymatiques de la gliadine induites par la transglutaminase et la mise en évidence de lymphocytes T spécifiques de la gliadine modifiée par cette enzyme (Molberg *et al.*, 1998) permettent d'imaginer comment la tolérance immune à un antigène oral, la gliadine peut être rompue, conduisant à une réponse auto-immune dirigée contre la muqueuse digestive.

### 2.1 Rappels physiopathologiques

La maladie cœliaque est une maladie inflammatoire du tube digestif (Maki *et al.* , 1997) caractérisée par une intolérance au gluten, constituant protéique majeur des farines de céréales (blé, seigle, orge) , elle se définit par trois critères :

- un syndrome de malabsorption intestinale déclenché par le gluten.,.
- une atrophie villositaire de la muqueuse intestinale,
- une guérison des signes cliniques et histologiques sous régime sans gluten.

Il s'agit d'une maladie relativement fréquente, dont la prévalence (de 0,5 à 2/1000 en Algérie) est largement sous-estimée en raison de l'existence de formes cliniques atypiques ou pauci-symptomatiques. Le traitement unique repose sur un régime alimentaire dépourvu de gluten, en particulier de gliadine, fraction alcool-soluble du gluten et composant toxique principal dans la maladie cœliaque. Ce régime doit être bien suivi en raison des complications observées quand la maladie n'est pas traitée, en particulier les lymphomes intestinaux.

Du point de vue histologique, les lésions muqueuses sont très évocatrices et se caractérisent par :

- Une infiltration lymphocytaire de la muqueuse touchant à la fois l'épithélium (lymphocytes T intra-épithéliaux de type CD8) et la lamina propria ou chorion (lymphocytes T de type CD4 et plasmocytes à IgA)

- Une atrophie villositaire totale ou sub-totale prédominant sur le grêle proximal avec altérations des entérocytes de surface
- une hypertrophie des cryptes de Lieberkühn.

La maladie cœliaque survient chez des individus génétiquement prédisposés comme l'indiquent les études familiales. En effet, sa fréquence est d'environ 10 % chez les apparentés au premier degré d'un patient, soit 100 fois plus que dans la population générale et le taux de concordance pour la maladie atteint 70% chez les jumeaux monozygotes. Cependant, le nombre de gènes en cause n'est pas clairement défini (Sollid *et al.*, 1993).

Au premier rang des facteurs génétiques impliqués dans la susceptibilité à la maladie cœliaque, se trouve la région HLA de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité.

Des études systématiques du génome tentent actuellement d'identifier d'autres gènes de susceptibilité à la maladie.

L'existence d'une réponse immune anormale au cours de la maladie cœliaque repose sur un faisceau d'arguments :

- La présence d'anticorps circulants d'isotype IgA induits par le gluten disparaissant sous régime sans gluten sont probablement synthétisés par les plasmocytes intestinaux. Ces anticorps sont de deux types : anticorps anti-gliadine et auto-anticorps anti-endomysium
- La forte association de la maladie cœliaque à la molécule HLA-DQ2
- L'infiltration du chorion par des lymphocytes TCD4 spécifiques de la gliadine et restreints par les molécules DQ2 ;
- L'association fréquente de la maladie cœliaque à d'autres maladies auto-immunes telles que le diabète insulino-dépendant, la thyroïdite auto-immune et la dermatite herpétiforme.

## 2.2. Immunopathogénie de la maladie cœliaque

Les anticorps IgA retrouvés au cours de la maladie cœliaque ont essentiellement une valeur diagnostique et prédictive.

Les IgA sont plus spécifiques que les IgG dans la mesure où ils disparaissent après 2 à 6 mois de régime sans gluten ; de plus, ils permettent de vérifier l'efficacité du régime. Ils n'ont vraisemblablement pas de rôle pathogène direct.

Les anticorps anti-gliadine, dont le titre est souvent bien corrélé à l'atrophie villositaire, ont une sensibilité et une spécificité moyennes ; ils ne sont pas retrouvés de manière constante chez les patients ayant une maladie cœliaque et à l'inverse, peuvent être présents au cours d'autres entéropathies inflammatoires ou chez des sujets sains.

Les auto-anticorps anti-endomysium ont une sensibilité et une spécificité proches de 100%. Les IgA anti endomysium ont été longtemps considérés comme le meilleur marqueur de la maladie cœliaque. Ils sont détectés en immunofluorescence sur coupe d'œsophage de singe où ils sont responsables d'un marquage de l'endomysium, formation conjonctive gainant les fibres musculaires lisses. Ces anticorps sont au moins en partie, synthétisés par les plasmocytes intestinaux : *in vitro*, la stimulation de biopsies intestinales de patients par de la

---

gliadine provoque leur apparition en 24 à 48 heures dans le surnageant de culture (Picarelli *et al.*, 1996). Les IgG n'ont aucune valeur diagnostique.

## 2.3. Mécanisme Immunopathogénique

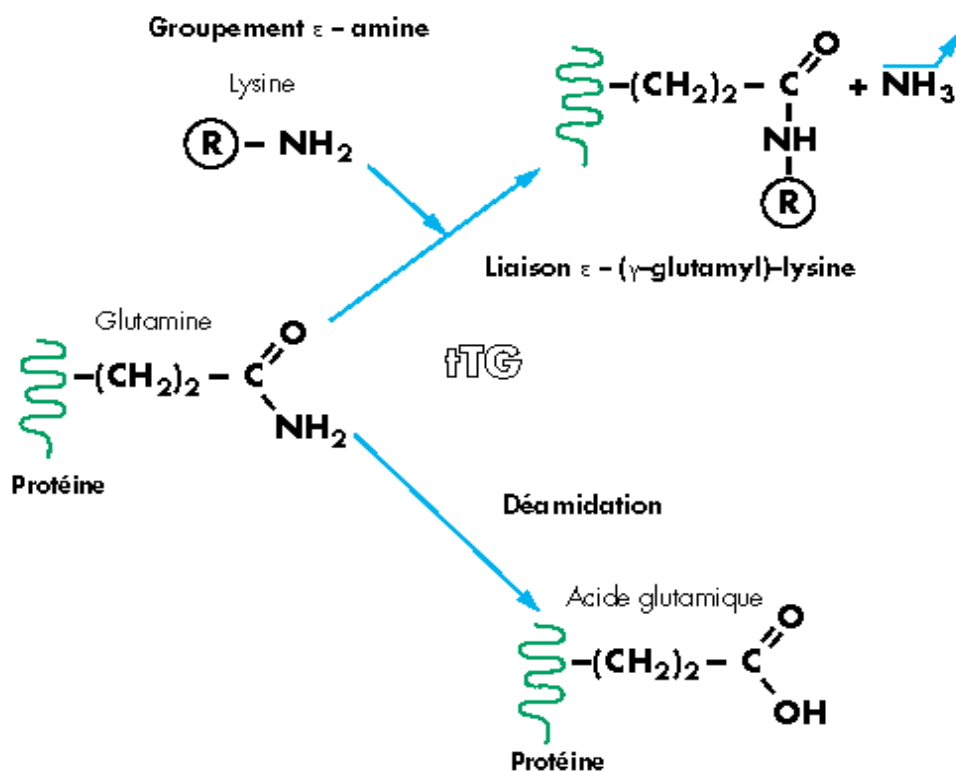
### 2.3.1 Mécanisme d'action de la transglutaminase tissulaire

Les auto-anticorps anti-endomysium reconnaissent un constituant de la matrice extracellulaire non collagénique récemment identifié, la transglutaminase tissulaire.

En 1997, Dieterich *et coll* ont pu immunoprécipiter à l'aide de sérums contenant des anticorps anti-endomysium, une protéine fibroblastique de 85 kDa correspondant à la transglutaminase tissulaire, enzyme ubiquitaire de type amine  $\gamma$ -glutamyl-transférase.

La transglutaminase tissulaire agit en catalysant la formation de liaisons  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysine ou  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-polyamine entre un groupement  $\gamma$ -carboxamide d'un résidu glutamine et un groupement  $\epsilon$ -amine d'un résidu lysine ou d'une polyamine (**Fig.5**). Elle crée ainsi des ponts entre différentes protéines ou au sein d'une même protéine. De plus, cette enzyme, principalement intracellulaire, peut être libérée lors d'une inflammation locale, ce qui conduit à la formation de ponts entre les différents constituants protidiques de la matrice extracellulaire (tels que la fibronectine, l'ostéonectine et le collagène) et par conséquent, à la stabilisation du tissu conjonctif (Greenberg *et al.*, 1991). En l'absence de groupements amines accepteurs, la transglutaminase tissulaire peut « déamider » des résidus glutamine en résidus acide glutamique.

La gliadine, protéine particulièrement riche en résidus glutamine (jusqu'à 50 % de sa composition en acides aminés) constitue donc un substrat idéal pour la transglutaminase. Des travaux indiquent par ailleurs que l'activité transglutaminase est augmentée dans la muqueuse intestinale de patients présentant une maladie cœliaque active (Bruce *et al.*, 1985).



**Figure. 5** Mécanisme d'action de la transglutaminase tissulaire (tTG) (Bruce *et al.*, 1985).

La maladie cœliaque est très fortement associée à certaines molécules HLA de classe II. En effet, 95 % des patients qui en sont atteints expriment le dimère HLA-DQ2, constitué d'une chaîne alpha codée par l'allèle DQA1\*0501 et d'une chaîne β codée par l'allèle DQB1\*0201 (Sollid *et al.*, 1989). Les rares patients non-DQ2 portent généralement la molécule DQ8 (α\*0301, β1\*02) (**Tab III**).

DR3 DQA1*0501 DQB1*02	DQ2 codé en <i>cis</i>
DR7 DQA1*0201 DQB1*02	DQ2 codé en <i>trans</i>
DR11 DQA1*0501 DQB1*0301	
DR4 DQA1*0301 DQB1*0302	DQ8

**Tableau III** Génération des molécules HLA-DQ : complémentation *cis* et *trans*.

Les molécules HLA de classe II exprimées à la surface des cellules professionnelles pour la présentation antigénique (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B) ont pour fonction essentielle de présenter des peptides dérivés de protéines exogènes aux lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup>.

Le polymorphisme allélique HLA conditionne la nature des peptides qui peuvent être présentés par ces molécules. Chaque allèle HLA fixe préférentiellement des peptides ayant des caractéristiques physico-chimiques particulières. Ainsi, les molécules HLA-DQ2 et DQ8 fixent plutôt des peptides qui portent des résidus chargés négativement à certaines positions cruciales. Aucun peptide issu de la séquence d'origine de la gliadine ne se fixe avec une bonne affinité aux molécules DQ2 ou DQ8, pas même un peptide de la région N-terminale dite « toxique » dans la maladie cœliaque.

En revanche, il semble que la transglutaminase tissulaire, en provoquant la « déamidation » de la gliadine (transformation des résidus glutamine en acide glutamique) peut générer des fragments peptidiques qui ont à ce stade les conditions biochimiques requises pour se fixer aux molécules HLA-DQ2 ou DQ8 avec une bonne affinité (Molberg *et al.*, 1998).

Au cours de la maladie cœliaque, il existe une infiltration lymphocytaire de la lamina propria et de l'épithélium intestinal. Les lymphocytes T de la lamina propria sont majoritairement de type T auxiliaires CD4<sup>+</sup> et expriment le récepteur TCR  $\alpha$   $\beta$ . Les lymphocytes intra-épithéliaux, quant à eux, sont plutôt des lymphocytes de type cytotoxiques CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha$   $\beta$ .

Des clones TCD4<sup>+</sup> TCR  $\alpha$   $\beta$ <sup>+</sup> ont été obtenus à partir de biopsies intestinales de patients atteints de maladie cœliaque (Lundin *et al.*, 1993). Ils prolifèrent spécifiquement vis-à-vis de la gliadine en présence de cellules présentatrices d'antigène exprimant les molécules DQ2 ou DQ8 (phénomène de restriction HLA). Cependant, aucun peptide de la gliadine ne peut reproduire l'effet stimulant de la protéine entière sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Les travaux de Molberg et coll 1998 montrent que la « déamidation » de la gliadine par la transglutaminase tissulaire crée de nouveaux déterminants antigéniques qui peuvent se fixer spécifiquement aux molécules HLA-DQ2 ou DQ8 et qui sont reconnus spécifiquement par les clones T CD4<sup>+</sup>.

Par ce mécanisme la transglutaminase tissulaire peut donc modifier un antigène exogène, la gliadine, de telle manière qu'il devienne immunogène chez un sujet génétiquement prédisposé (DQ2 ou DQ8).

Ce phénomène de rupture de tolérance à un antigène oral conduit à une réponse auto-immune dirigée contre la muqueuse digestive, véhiculée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés spécifiques de l'antigène modifié et présentant un profil de sécrétion de cytokines propre aux lymphocytes Th1 (Nilsen *et al.*, 1995). La production par ces lymphocytes de cytokines inflammatoires telles que l'interféron  $\gamma$ , peut ensuite être à l'origine de l'activation non spécifique des lymphocytes intra-épithéliaux cytotoxiques et du recrutement d'autres cellules

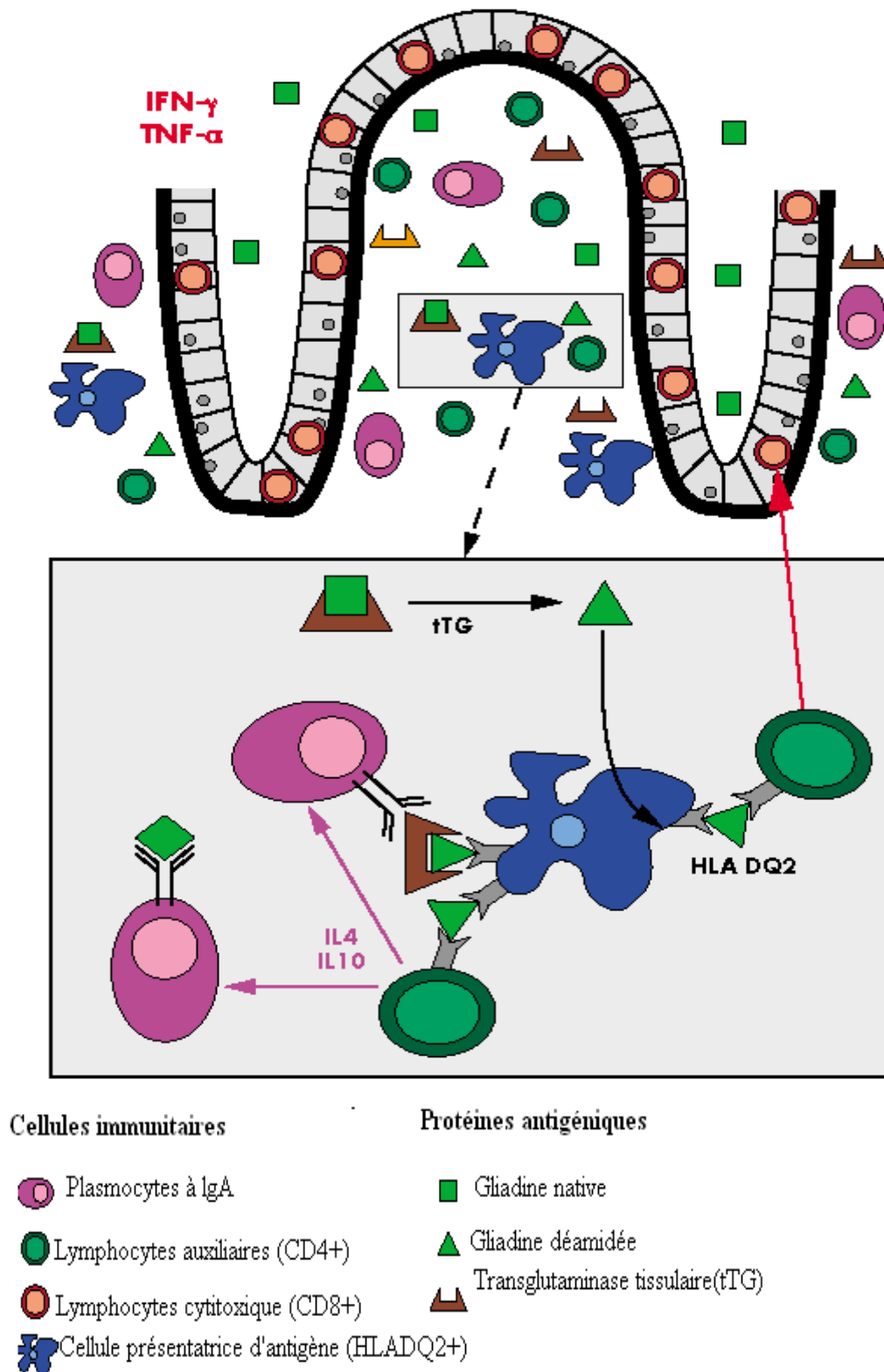
de l'inflammation (polynucléaires neutrophiles, monocytes, macrophages), dont l'action sur les entérocytes est responsable des lésions intestinales de la maladie cœliaque.

Les études immunohistochimiques indiquent d'ailleurs que la transglutaminase tissulaire extracellulaire est abondamment retrouvée dans la région sous-épithéliale muqueuse, à proximité de l'infiltrat lymphocytaire TCD4<sup>+</sup> et des cellules présentatrices d'antigène qui expriment les molécules DQ.

Cette région semble donc représenter un micro-environnement adéquat pour la modification enzymatique de la gliadine par la transglutaminase tissulaire, pour la fixation de peptides modifiés de la gliadine aux molécules DQ2 et pour leur présentation aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques.

### **2.3.2. Rôle de la transglutaminase tissulaire dans la maladie cœliaque**

L'ensemble des travaux récents portant sur le rôle de la transglutaminase tissulaire dans le développement de la réponse immune au cours de la maladie cœliaque permet de proposer un schéma physiopathologique des différentes étapes de la maladie (Schuppan *et al.*, 1998) (**Fig.6**).



**Figure 6.** Réponse et destruction tissulaire au cours de la maladie cœliaque (Schuppan *et al.*, 1998).

La gliadine, fraction protéique des céréales présente habituellement dans l'alimentation occidentale, traverse l'épithélium intestinal et est «déamidée» par la transglutaminase tissulaire, enzyme constitutionnellement produite par les cellules mononuclées, les fibroblastes et les cellules endothéliales qui résident dans la matrice sous-épithéliale de la muqueuse digestive.

En cas d'inflammation locale, la transglutaminase tissulaire est produite en excès ; la modification enzymatique de la gliadine qu'elle induit conduit à l'apparition de nouveaux déterminants antigéniques.

Chez certains sujets porteurs de l'allèle HLA-DQ2 ou DQ8 (et probablement sous l'influence d'autres facteurs génétiques), les néo-épitopes sont présentés par les cellules de type monocytaire ou dendritique du chorion aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui s'activent spécifiquement et provoquent une réponse immune de type Th1 (production de cytokines inflammatoires telles que l'interféron gamma et le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* )).

Il en résulte une activation non spécifique des lymphocytes T intra-épithéliaux CD8<sup>+</sup>, des polynucléaires et des macrophages qui vont exercer leur action cytotoxique directe ou indirecte sur les entérocytes intestinaux et provoquer les lésions muqueuses de la maladie cœliaque.

Cette réponse immune est, en principe, strictement locale et non systémique : on ne trouve pas en périphérie de lymphocytes T spécifiques de la gliadine modifiée.

Parallèlement, par un phénomène de coopération entre lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et plasmocytes du chorion, des anticorps IgA anti-gliadine et anti-transglutaminase sont produits. Ils sont vraisemblablement non pathogènes. Néanmoins, on sait que la transglutaminase tissulaire est elle-même nécessaire à l'activation du TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) qui est un facteur de différenciation des entérocytes.

Des travaux récents Halttunen et coll., 1998 suggèrent que les anticorps anti-transglutaminase pourraient avoir un rôle direct en neutralisant l'action de la transglutaminase tissulaire, ce qui pourrait expliquer l'atrophie villositaire caractéristique de la maladie cœliaque.

La recherche d'IgA anti-transglutaminase peut se faire en utilisant soit l'antigène tissulaire venant d'extrait de foie de cobaye soit de l'antigène transglutaminase tissulaire humain recombinant (Ambrus A *et al.*, 2001) des tests utilisant les deux types d'enzyme ont la même sensibilité.

## **1 Matériel**

### **1.1 Matériel biologique**

- Foie de cobaye
  - Contrôles positifs : sérums de malades cœliaques
- Contrôles négatifs : sérum de témoins

### **1.2 Matériel non biologique (annexe1)**

#### **1.2.1 Appareillage**

#### **1.2.2 petit matériel**

## **2 Extraction de la transglutaminase (fig 7)**

### **2.1 Broyage et homogénéisation du foie de cobaye**

Le foie est découpé en petits fragments qui sont placés par la suite dans une solution de sucrose (0.25M) contenant du PMSF (2mM) (inhibiteur des protéases permettant la conservation des enzymes à purifier en parfait état). La suspension ainsi obtenue est homogénéisée à froid à l'aide d'un homogénéiseur pendant 2 min à une vitesse de 1500 tours /min (toutes les étapes de la purification de l'enzyme se font à + 4°C). L'homogénat est conservé à -70°C.

### **2.2 Ultracentrifugation**

La centrifugation est une technique qui permet de séparer les constituants d'une solution suivant leur densité et leur poids moléculaire.

L'ultracentrifugeuse diffère de la centrifugeuse classique par la puissance du moteur d'entraînement et par l'établissement d'un vide très puissant dans la chambre de rotation afin d'éviter l'échauffement du rotor par frottement dans l'air.

L'extraction des protéines à partir de l'homogénat est réalisée par ultracentrifugation à 45000 rpm ou tours minutes (trs/min) pendant une heure à + 4°C et sous vide.

Le surnageant obtenu est récupéré et constitue l'extrait protéique.

### **2.3 Dosage des protéines**

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (1976), cette technique permet d'évaluer des microquantités de protéines contenues dans un système de doubles liaisons conjuguées.

L'intensité de la coloration est dosée par spectrophotométrie, elle est proportionnelle à la quantité de produit présente dans le milieu réactionnel.

#### **2.3.1 Principe**

L'intensité d'un faisceau lumineux est modifiée quand il traverse un milieu de composition donnée ; cette modification est fonction du milieu et est mesurée par spectrophotométrie.

Pour les solutions très diluées, ces variations obéissent à la loi de Beer Lambert qui montre que la densité optique d'une substance absorbante en solution est proportionnelle à la concentration de la substance elle-même pour une longueur d'onde donnée.

$$DO = \epsilon LC$$

La loi de BEER Lambert n'est valable que pour des faisceaux monochromatiques et des solutions très diluées.

### Matériel

A partir d'une solution étalon de BSA à 0,1%, nous réalisons une gamme étalon de 5 dilutions allant de 0 à 100 µg/µl d'albumine, Le volume total (BSA + tampon NaCl) doit être de 100 µl dans chaque tube. De la même manière : le volume total (échantillon + tampon NaCl) doit être de 100 µl. 3 ml de colorant de Bradford\* sont ajoutés dans chaque tube. Le complexe protéine-colorant se forme au bout de 2 minutes et se stabilise pendant une heure mais au delà de ce temps le complexe s'agrège il convient donc de lire les DO entre 5 et 20 minutes après addition du colorant (**Annexe 2**). Les valeurs obtenues à partir des dilutions de la gamme étalon permettent de tracer une courbe étalon. Cette courbe correspond à la régression linéaire de la densité optique en fonction de la quantité de protéines de la gamme étalon  $DO_{595\text{ nm}} = f[\text{concentration en protéines}]$ . L'équation de la droite de régression est obtenue par le logiciel Excel (**Fig. 12**). La concentration en protéines de chaque échantillon peut alors être déterminée à partir de cette équation

**Tableau.IV** courbe d'étalonnage des protéines

réactifs tubes	BSA (µl)	BSA(µg/µl)	Nacl (9%) (µl)	Réactif de Bradford (ml)
<b>Blanc</b>	0	0	100	3
<b>1</b>	20	20	80	3
<b>2</b>	40	40	60	3
<b>3</b>	60	60	40	3
<b>4</b>	80	80	20	3
<b>5</b>	100	100	0	3

### 2.4 Précipitation différentielle des protéines par le sulfate d'ammonium

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Cette méthode relativement peu spécifique s'applique bien aux grands volumes qu'on obtient souvent en début de processus de purification ; il faut toutefois suivre cette étape d'une dialyse ou d'une ultrafiltration pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel.

#### 2.4.1 Principe

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les protéines à précipiter quand on augmente avec certains sels, la force ionique du milieu ; cet effet s'explique par une déshydratation des groupes hydrophiles de la protéine et par conséquent une diminution de leur solubilité (Kamoun, 1997).

#### 2.4.2 Mode opératoire

Précipitation différentielle des protéines par le sulfate d'ammonium est réalisée en ajoutant goutte à goutte sous agitation magnétique deux volumes de solution de sulfate d'ammonium (3.2M) (**Annexe 1**) à un volume de fraction éluée par chromatographie échangeuse d'ions, tout en maintenant le pH à 7 afin d'éviter la dénaturation des protéines.

La précipitation des protéines est poursuivie pendant 20 minutes à + 4°C. Le précipité obtenu après centrifugation à 4000trs /min pendant 45min à + 4°C est recueilli dans un volume de tampon Tris-Hcl (5mM) pH 7.5 et subit par la suite une ultrafiltration suivie d'une centrifugation à 4000 trs/min.

### 2.5 Ultrafiltration

L'ultrafiltration sur membrane à perméabilité sélective permet la séparation de substances selon leur poids moléculaire ; les membranes utilisées à cet effet jouent le rôle de filtres et présentent des porosités différentes. L'ultrafiltration est réalisée par centrifugation.

La solution à ultrafiltrer est mise dans un cône formé par une membrane adhérente. Ce cône est placé dans un support plastique percé d'un orifice inférieur lui-même posé sur l'extrémité supérieure d'un tube à centrifuger.

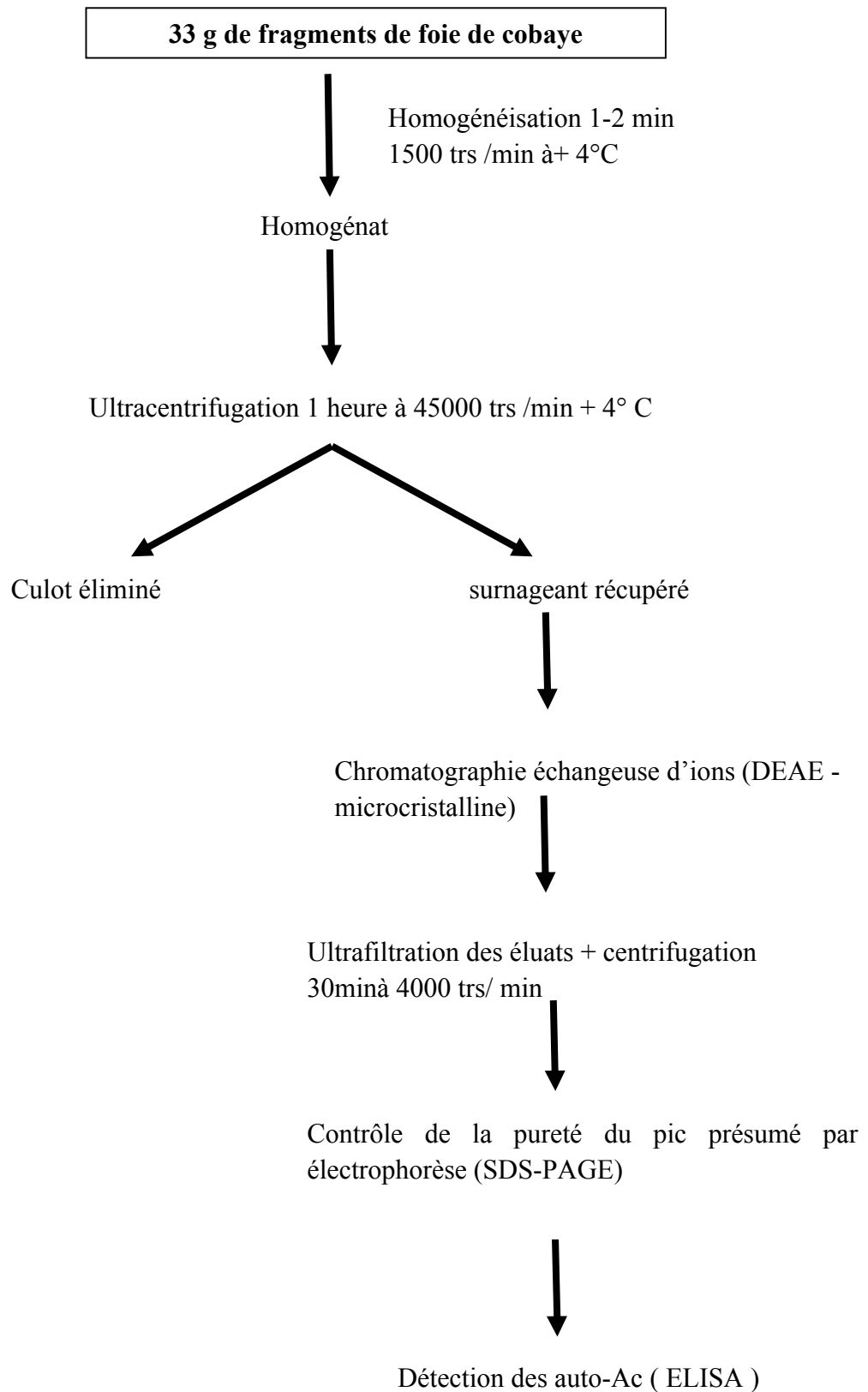
Après l'étape de centrifugation, le liquide restant dans le cône est également concentré en molécules dont le PM est supérieur au seuil de coupure de la membrane.

Ce procédé d'ultrafiltration est combiné à une étape de dialyse rapide d'où la dénomination « diafiltration ».

Après la détermination de la concentration protéique des fractions obtenues après purification par chromatographie échangeuse d'ions, un certain nombre d'échantillons nécessite une ultrafiltration. Les fractions sont mises dans des tubes à dialyse munis de filtres permettant de retenir les molécules de PM supérieur à 10 kDa puis centrifugées à 4000 trs/min à + 4°C pendant 25 à 30 min, les filtrats sont par la suite récupérés.

Cette étape de filtration permet d'éliminer les produits diffusibles à travers les filtres.

Figure.7 Protocole d'extraction et de purification de la transglutaminase tissulaire à partir de foie de cobaye



### 3. Purification de la transglutaminase tissulaire

#### 3.1 Chromatographie échangeuse d'ions

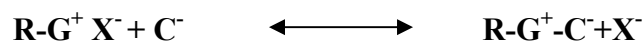
##### 3.1.1 Principe

Une échangeuse d'ions est une matrice insoluble sur laquelle des groupements chargés sont liés covalentiellement, ces groupements chargés sont associés à des contre ions : ions mobiles ; les contre ions peuvent être réversiblement échangés avec d'autres ions de même charge sans altérer la matrice.

La séparation des macromolécules (protéines) par chromatographie échangeuse d'ions est obtenue par adsorption réversible.

Elle est basée sur les affinités de différentes substances vis-à-vis de l'échangeur, due à leur différence de charge. Ces affinités peuvent être contrôlées en variant les conditions de force ionique ou de pH.

Les résines échangeuses d'ions sont des composés formés de substances lentement polymérisées constituant un réseau tridimensionnel et portant des fonctions acides ou basiques. On appelle résine anionique celle qui échange réversiblement des anions.



Il y a des échangeurs anioniques forts et des échangeurs anioniques moyens et faibles, le choix de l'échangeur est limité par la stabilité de l'échantillon, car les macromolécules se dénaturent au delà d'un certain pH (Plummer.,1989).

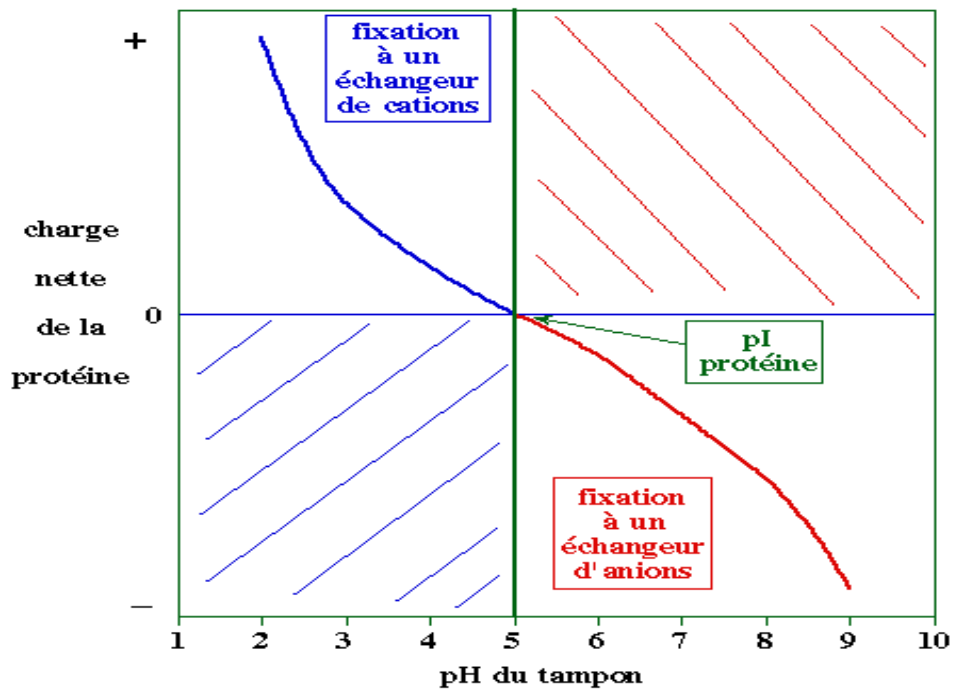


Figure.8 Effet du pH sur la charge nette de la protéine

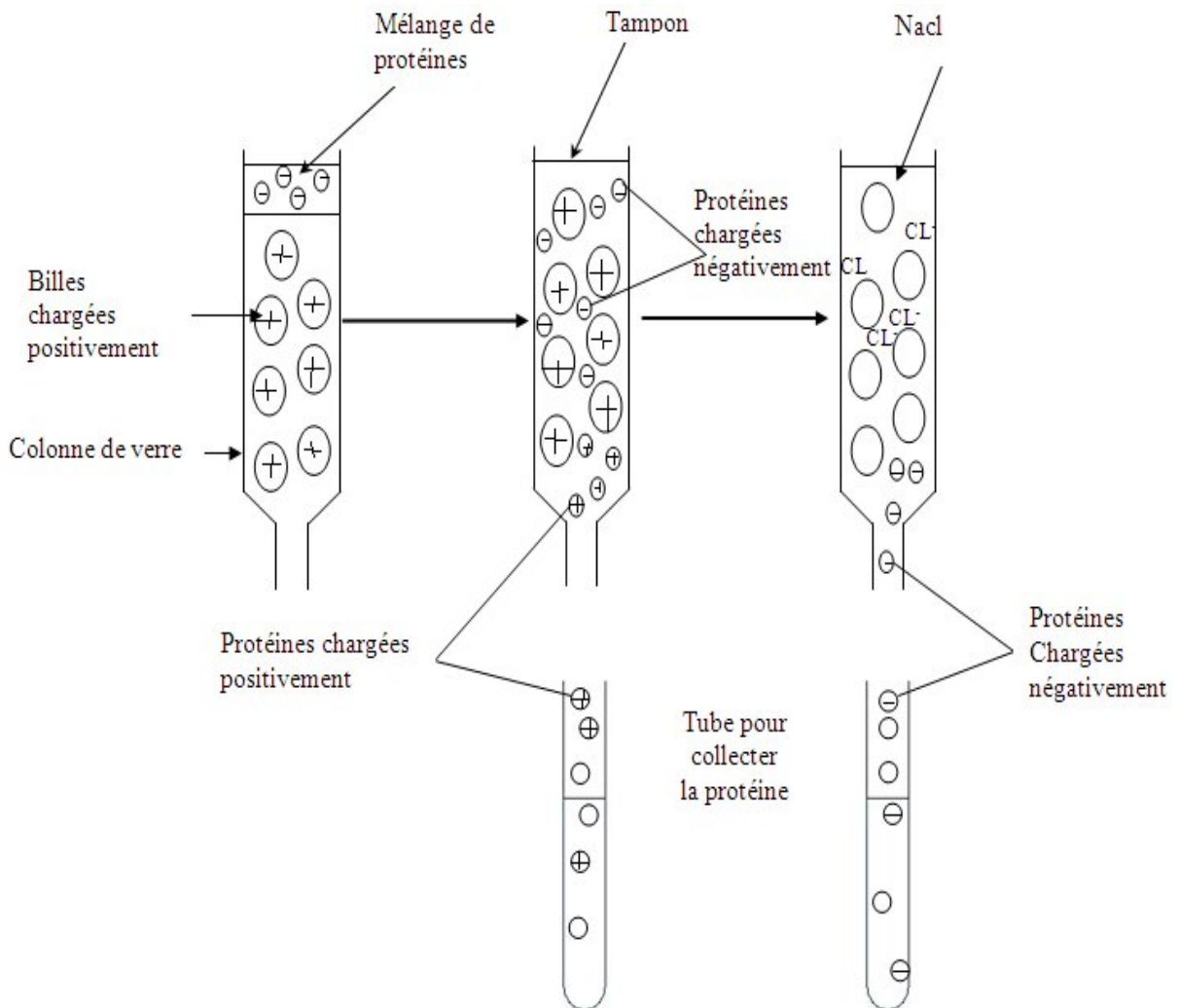


Figure.9 Principe de la chromatographie d'échange ionique ( Hames *et al.*, 2000)

### 3.1.2 Mode Opérateur

Dans notre présent travail deux échangeurs anioniques sont utilisés : Le DEAE-52 et DEAE (sephacel) microcristalline

Ils se présentent sous forme de billes et sont disponibles en poudre blanche sèche qui gonfle par hydratation. La quantité de gel à utiliser pour la séparation est déterminée en fonction des dimensions de la colonne selon l'équation suivante :

$$V = \pi R^2 H$$

**V** : volume de la colonne

**H** : hauteur de la colonne

**R** : rayon de la colonne

Les gels sont d'abord régénérés dans de l'eau distillée ou dans un tampon approprié à température ambiante, dégazés puis coulés dans la colonne.

le lavage de la colonne se fait avec 2 à 3 volumes de tampon d'élution. Après avoir réglé le débit d'élution pour chaque type de chromatographie, l'échantillon est déposé délicatement à la surface du gel puis le robinet est laissé ouvert jusqu'à ce que l'échantillon pénètre entièrement dans le gel ; l'élution des différentes fractions est réalisée avec 4 à 5 volumes de tampon. Les fractions sont recueillies par un collecteur de fractions programmé de manière à avoir un volume constant par tube.

- le DEAE-52 qui est un échangeur anionique faible, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau V (Kamoun ; 1997).

10g de gel de DEAE-52 sont mis à gonfler dans 500 ml de tampon Tris-Hcl (**Annexe2**) pendant une nuit à température ambiante. Le gel est lavé plusieurs fois avec du tampon Tris-Hcl pH 7.5 jusqu'à élimination des fines particules en suspension.

Un volume de 2.5 ml d'échantillon protéique obtenu après ultracentrifugation contenant 470.12mg de protéine soit une concentration de 188.05 mg/ml est élué sur l'échangeuse anionique DEAE 52

- DEAE (sephacel) -microcristalline

La même quantité du gel est prise et traitée de la même manière, Un volume de 2.5 ml d'échantillon protéique après ultracentrifugation contenant 470.12 mg de protéine est élué sur l'échangeuse anionique DEAE- microcristalline.

L'élution est réalisée avec un volume 150ml de tampon A et de 350 ml de tampon B,

La durée de la séparation étant longue, il est nécessaire de travailler à + 4°C afin d'éviter la dénaturation des macromolécules.

Les fractions de chaque pic sont rassemblées concentrées par diafiltration puis centrifugées.

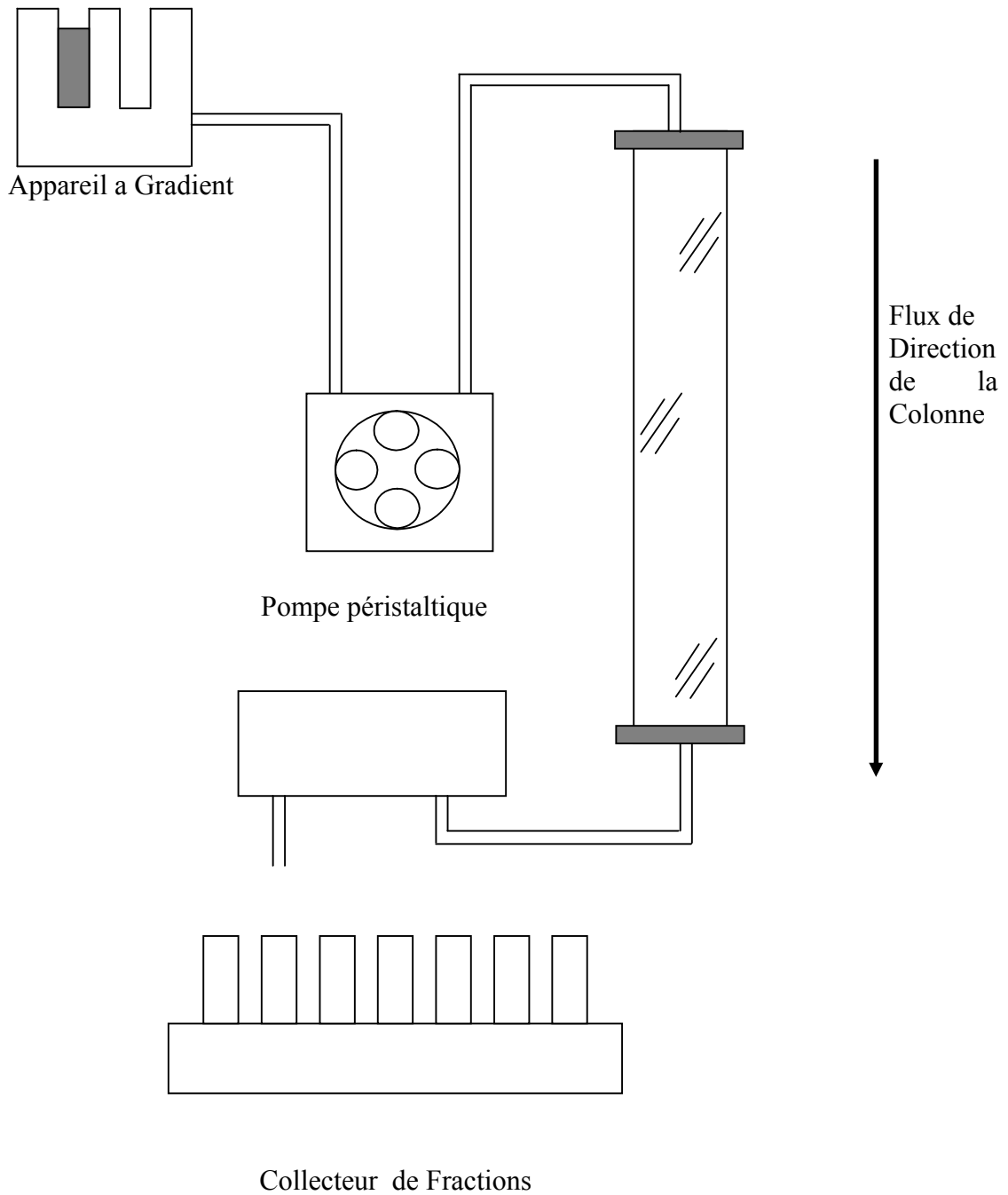


Figure.10 Dispositif de chromatographie échangeuse d'ions

Tableau. V Propriétés des gels utilisés

<b>gels utilisés</b>	DEAE-52	DEAE Microcristalline
<b>Caractéristiques des gels</b>	échangeur d'anions faible	échangeur d'anions faible
<b>Groupement échangeur</b>	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}=(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$	$(\text{CH}_2)_2 \text{N}=(\text{C}_2\text{H}_5)_2-$
<b>Capacité de Fixation</b>	2 mEq /g	3.5 mEq/g
<b>pH d'utilisation</b>	2 - 10	3 -10
<b>Caractéristique de la colonne</b>	Ø 1cm L 35cm Volume du gel 10g	1. cm 35 cm 10g
<b>Echantillon à séparer</b>	Extrait 2	Extrait2
<b>Eluant</b>	Tris HCl (5mM) pH7.5 EDTA(2mM)	Tris-Hcl(5Mm) PH7.5 EDTA (2mM)
<b>Débit d'élution</b>	0.22ml /min	0 ,22ml /min

## **3.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)**

### **3.2.1 Principe**

L'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) selon la technique de Lammeli (1970) est une technique permettant la séparation analytique des protéines dans des conditions dénaturantes.

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de fractionnement basée sur la migration différentielle de particules chargées dans un champ électrique ; elle est fonction de leur taille et de leur charge.

les protéines ainsi séparées apparaissent sous forme de bandes distinctes.

Le gel d'acrylamide constitue un réseau tridimensionnel de mailles d'acrylamide qui se polymérise en longues chaînes des ponts sont réalisés par le M-N'méthylène-bis acrylamide. cette réaction est catalysée par le tétraméthylamine ou Temed et le persulfate d'ammonium . En conditions dénaturantes le gel d'acrylamide est préparé en présence du sodium dodécyle sulfate (SDS) qui est un détergent capable de dissocier les parties en sous unités et dénature ainsi la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de la molécule de façon irréversible .

Les molécules présentent alors une charge globale négative et migrent vers l'anode selon leur poids moléculaire. L'électrophorèse permet ainsi de déterminer le poids moléculaire apparent des protéines contenues dans un échantillon.

Des protéines standards de PM connu sont soumises à l'électrophorèse dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. Ces marqueurs de PM permettent de tracer une courbe de référence (log PM en fonction de la mobilité électrophorétique Rf de chaque marqueur), ( Weber et Osborn 1969).

$$RF = \frac{\text{Distance de migration de la protéine}}{\text{Distance de migration de bleu de bromophénol}}$$

### **3.2.2 Mode Opérateur**

La technique utilisée est celle du gel discontinue adopté à une cuve d'électrophorèse verticale. Le gel comporte deux parties le gel supérieur qui concentre l'échantillon avant sa pénétration dans le gel et ainsi à améliorer la résolution. On prépare un gel avec deux concentrations différentes en acrylamide un gel de concentration et un gel de séparation.

- **Préparation des gels**

Les deux plaques de verre (10cm /10cm) sont lavées dégraissées à l'alcool puis assemblées et montées sur le support des plaques (les gels de polyacrylamide sont préparés extemporanément puis coulés sur les plaques montées) l'épaisseur du gel est de 0.75 cm.

- **Préparation du gel de séparation**

Le pourcentage d'acrylamide dans le gel de séparation dépend de la taille des protéines à séparer. Pour la séparation des protéines de nos échantillons, nous avons utilisé un gel d'acrylamide-bisacrylamide à 12% (**Annexe 3**).

La polymérisation du gel se fait après addition des catalyseurs (APS 10 % et TEMED)

- **Préparation du gel de concentration**

Le chargement des protéines se fait dans un gel de concentration à 5% d'acrylamide-bis-acrylamide. Il est coulé sur 2 cm de hauteur au dessus du gel de séparation les puits sont réalisés avec un peigne de 0.75cm d'épaisseur muni de 10 dents de 1cm de largeur.

- **Préparation de l'échantillon protéique**

Les échantillons sont dilués ou concentrés selon le cas de façon à déposer 20 µg de protéines par puits. Les protéines sont dénaturées pendant 5min à 90°C, après addition d'un quart de volume de tampon de charge (**Annexe 3**).

- **Dépôt des protéines et migration**

Les échantillons contenant 20 µg de protéines sont déposés à l'aide d'une seringue Hamilton, dans des puits formés dans le gel de concentration. La migration se déroule dans une cuve en présence du tampon glycine pH 8.3 (**Annexe 3**).

L'intensité du courant appliqué est de 4mA /plaque.

la migration dure 2 heures

La cuve d'électrophorèse est remplie avec le tampon de migration puis reliée au générateur, la migration se fait sous une intensité de courant de 70 à 95 V dans le gel de concentration. Lorsque le bleu de bromophénol atteint le gel de séparation, le voltage est augmenté de 130 à 140 ; la migration est terminée quant le front de migration coloré par le bleu de bromophénol atteint le bas du gel.

- **Révélation des protéines**

Une fois la migration achevée, les gels sont délicatement démoulés puis mis à colorer.

La coloration (**Annexe3**) des gels s'opère sous agitation pendant 1h (de préférence toute la nuit) ; le lendemain les gels sont décolorés dans plusieurs bains successifs de décolorant (**Annexe 3**).

Les gels peuvent être conservés dans de l'eau distillée en présence de l'azide de sodium à température ambiante et ou à 4°C en présence du glycérol.

- **Détermination des poids moléculaires apparents**

Les gels sont scannés à l'aide d'un scanner EPSON STYLUS CX 4300. L'image ainsi numérisée, permet d'estimer la masse moléculaire apparente de chaque protéine soluble correspondant à l'emplacement d'une bande.

Cette estimation se fait en fonction de la mobilité relative de celle-ci par rapport aux bandes des protéines standards

Une courbe mettant en évidence la mobilité relative de chaque protéine standard en fonction du logarithme décimal de son poids moléculaire, permet de calculer le poids moléculaire apparent de chaque protéine soluble de l'échantillon (**Annexe 5**).

### **3.3 ELISA**

#### **3.3.1 Principe**

L'ELISA ou Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay est une technique de dosage immunoenzymatique développée depuis 1971 et largement utilisée en routine pour le dosage immunologique de nombreuses substances biologiques.

Le principe de cette méthode simple, rapide et sensible est fondé sur la formation d'un complexe entre un antigène et un anticorps couplé à une enzyme (la peroxydase) il est réalisé en quatre étapes :

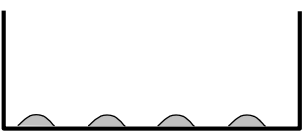
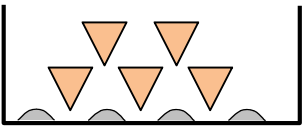
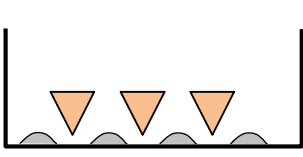
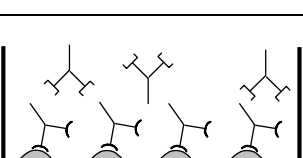
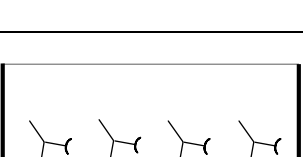
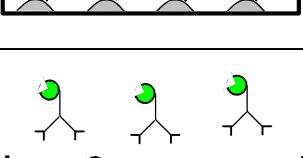
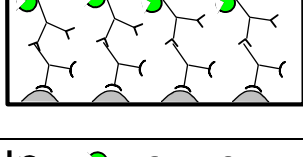
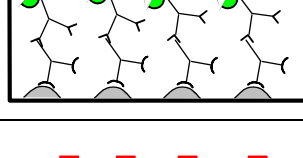
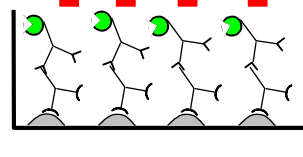
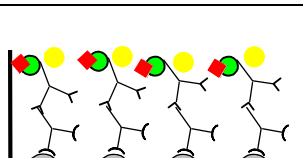
-Etape(1): la première étape consiste en une liaison passive de l'antigène (tTG) à un support solide en général sur une plaque de microtitration en polystyrène.

-Etape(2) : Incubation de l'Ag à température ambiante pendant 1 heure 30 min avec le sérum à tester les anticorps (IgA) spécifiques réagiront avec les antigènes fixés lors de la première étape formation de complexes Ag-Ac.

-Etape(3) : la quantité d'anticorps fixé sur l'Ag est mesurée à l'aide d'un deuxième Ac anti-IgA marqué par la peroxydase après incubation d'une heure à 37° C

-Etape(4) : l'addition du substrat de l'enzyme permet le développement d'une réaction colorimétrique, dont l'intensité est dosée, par un spectrophotomètre et exprimée en unités arbitraires de densité optique (**Fig.11**).

Figure. 11 Principe du dosage immunoenzymatique (ELISA)

absorption d'antigène		coating	1 <sup>ère</sup> étape
BSA tween		Saturation	
TET		Lavage	2 <sup>ème</sup> étape
		Premier Ac anti tTG	
TET		Lavage	3 <sup>ème</sup> étape
		Deuxième Ac anti IgA de chevre	
TET		Lavage	
		Substrat de la peroxydase	4 <sup>ème</sup> étape
		Chromogène	
arrêt de la réaction		mesure de la DO	

### 3.3.2 Mode opératoire

- Fixation de l'Ag ou coating : l'enzyme tGT est absorbée sur une phase solide représentée par des puits d'une microplaque en polystyrène à raison de 1 à 5 µg soluble dans 10ml tampon Tris HCL CaCl<sub>2</sub> (50mM) PH 7

100µl sont déposés dans chaque puits puis incubés à + 4°C pendant une nuit, l'excès d'antigènes libres est éliminé par lavage

- Saturation des sites de liaisons non spécifiques. 100µl d'une solution de BSA 0.2g/l sont déposés dans chaque puits puis incubés pendant une nuit à + 4°C ou pendant une heure à 37°C.

- Réaction Ag-Ac : après lavage des puits, les sérums dilués sont répartis à raison de 100µl par puit puis incubés à 37°C pendant 1 heure 30 minutes ou à + 4°C pendant une nuit.

- Révélation de la réaction Ag-Ac : Après élimination de l'excès de sérum et lavage des puits 100 µl d'une solution de l'Ac secondaire couplé à la peroxydase sont déposés dans chaque puits puis incubés pendant une heure à 37°C ou une nuit à + 4°C.

La solution du substrat chromogène est préparée minutieusement en mettant 0.01g d'ABTS dans 10ml de tampon citrate et 10µl d'eau oxygénée à 30% qui doit être ajouté en dernier. 100 µl de substrat sont ajoutés dans chaque puits ; la microplaque est incubée à 37°C pendant 10 à 20 minutes jusqu'à développement d'une coloration verte ; la réaction est stoppée avec une solution de H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> diluée 1/5. La DO est lue à 450nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

**Tableau.V Détermination de la concentration de tTG nécessaire pour le dosage immunoenzymatique ELISA.**

	Sérum 1/250				Sérum 1/250				Sérum 1/250			
<b>1 µg de tTG</b>	T-	S+	S-	Ss	T-	S+	S-	Ss	T-	S+	S-	Ss
<b>5 µg de tTG</b>	T-	S+	S-	Ss	T-	S+	S-	Ss	T-	S+	S-	Ss

T- sans tTG

S+ sérum positif

S- sérum négatif

Ss sans sérum

### **1. Extraction et purification de la transglutaminase tissulaire (tTG)**

Dans cette première partie nous présenterons les résultats de l'extraction et de la purification de la transglutaminase tissulaire à partir de l'homogénat de foie de cobaye après différentes étapes d'optimisation.

#### **1.1 Détermination du rendement d'extraction de la tTG**

Pour la détermination du rendement de l'extraction, nous avons procédé au dosage des protéines par la méthode Bradford (1976) des différents échantillons obtenus après chaque étape.

Notre échantillon initial étant l'homogénat de foie de cobaye ou « extrait brut », les échantillons numérotés de 1 à 4 correspondent aux extraits obtenus après les différentes étapes de séparation des protéines (centrifugation ; ultracentrifugation ; chromatographie).

L'échantillon d'homogénat de foie de cobaye « extrait brut » à partir duquel est déterminé le rendement d'extraction de la transglutaminase tissulaire (tTG) présente une concentration protéique de 1444,44 mg/ml dans un volume final de 35 ml.

Le rendement de l'extraction de la tTG est obtenu à partir des différentes concentrations protéiques déterminées.

Le rendement est égal au rapport de la quantité de protéines extraite (après ultracentrifugation) sur la concentration protéique de « l'extrait brut » ou homogénat.

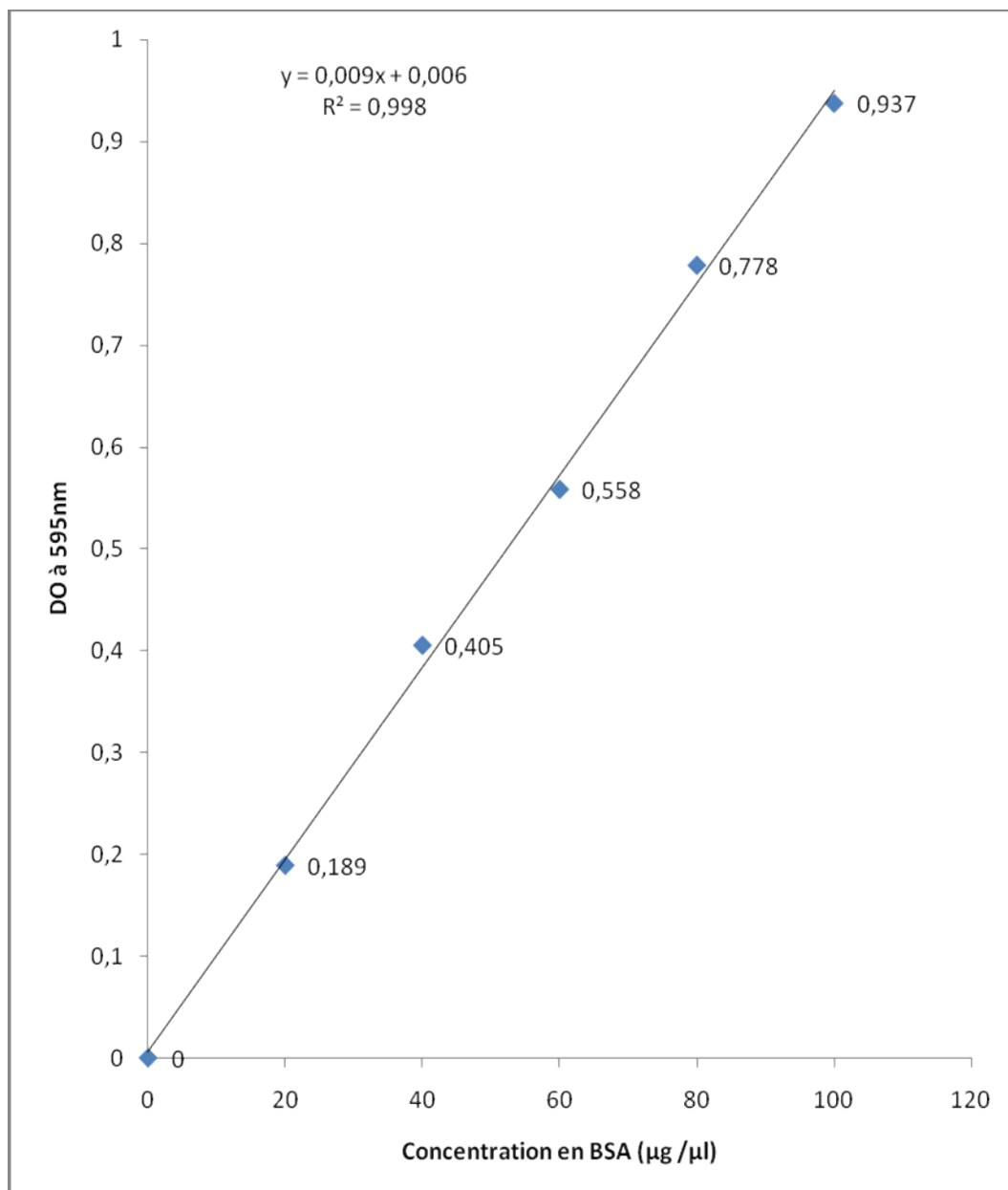


Figure 12 . Courbe étalon des protéines

**Tableau VII. Effet de la vitesse de centrifugation sur le rendement d'extraction**

Echantillon	Volume (µl)	DO à 595 nm	Concentration µg/µl	Rendement(%)
<b>Extrait brut</b>	5	0.656	1444.44	
<b>Extrait 1</b> (35000trs/min)	20	0.148	78.89	5.46
<b>Extrait 2</b> (45000trs/min)	15	0.830	610.37	42.25

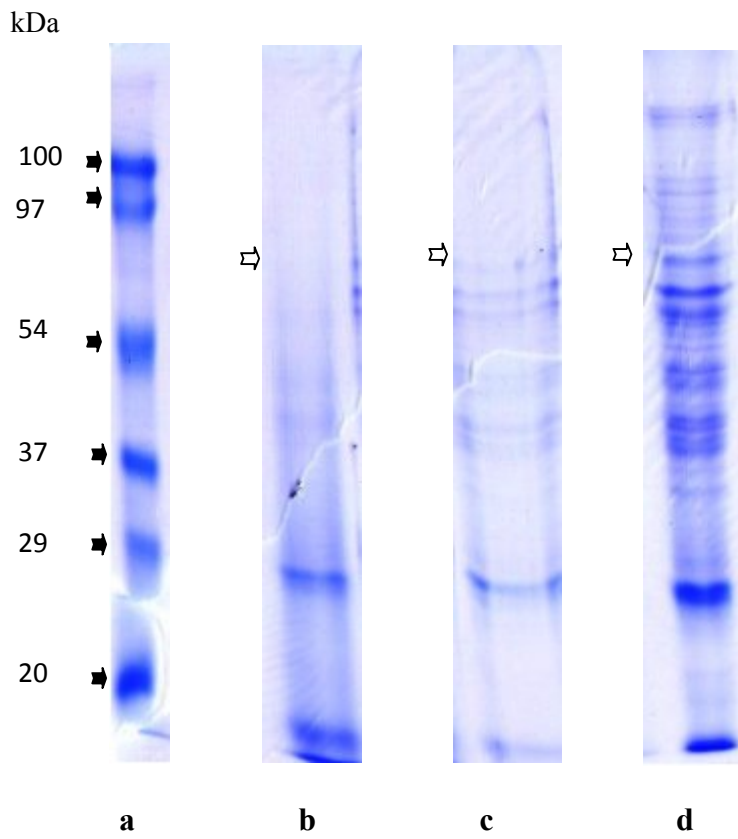
Nous avons résumé dans le tableau VII, les rendements protéiques des différents extraits et des différentes fractions obtenus :

**Rendement 1** : correspond aux protéines de « **l'extrait 1** », c'est-à-dire du surnageant obtenu après ultracentrifugation de l'homogénat obtenu à une vitesse de 35000 trs/ min pendant une heure.

Nous avons dans une 2<sup>ème</sup> étape essayé d'augmenter le rendement en augmentant la vitesse d'ultracentrifugation de l'homogénat et nous avons noté qu'une vitesse de 45000trs/min pendant une heure a permis d'améliorer le rendement. En effet, « **l'extrait 2** » obtenu après cette étape présente un rendement de 42.25%.

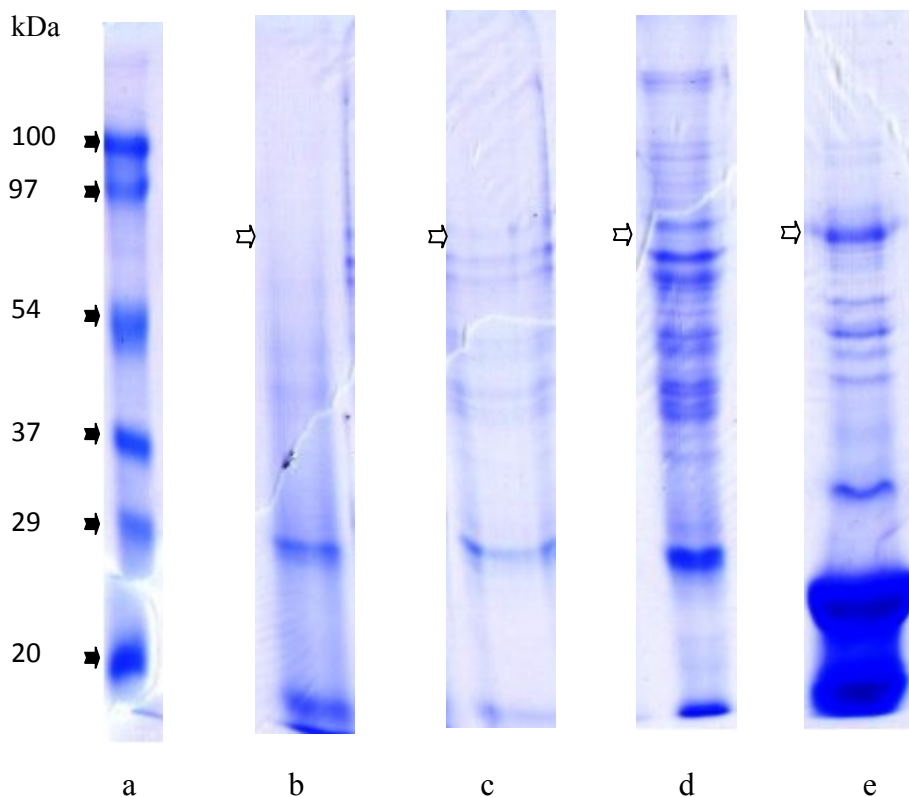
### **1.2 Analyse des protéines solubles de l'homogénat du foie de cobaye par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes de « l'homogénat » du foie de cobaye montre la présence d'une quarantaine de bandes protéiques de PM apparent compris entre 5 kDa et 225 kDa ; nous notons dans la zone des **PM de 85 kDa**, la présence d'une bande protéique qui correspondrait à la transglutaminase et qui n'apparaît que dans l'échantillon d'homogénat présentant une quantité de protéines totales de 20µg (**Fig.13 d**).



**Figure 13. Profil électrophorétique des protéines solubles de « l'homogénat » de foie de cobaye**

- (a) protéines standards
- (b) 10 µg d'homogénat de foie de cobaye
- (c) 15 µg d'homogénat de foie de cobaye
- (d) 20 µg d'homogénat de foie de cobaye
  - Intensité du courant appliqué : 140 V/ 4mA
  - Temps de migration : 120 min



**Figure 14. Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat et de « l'extrait 1 »**

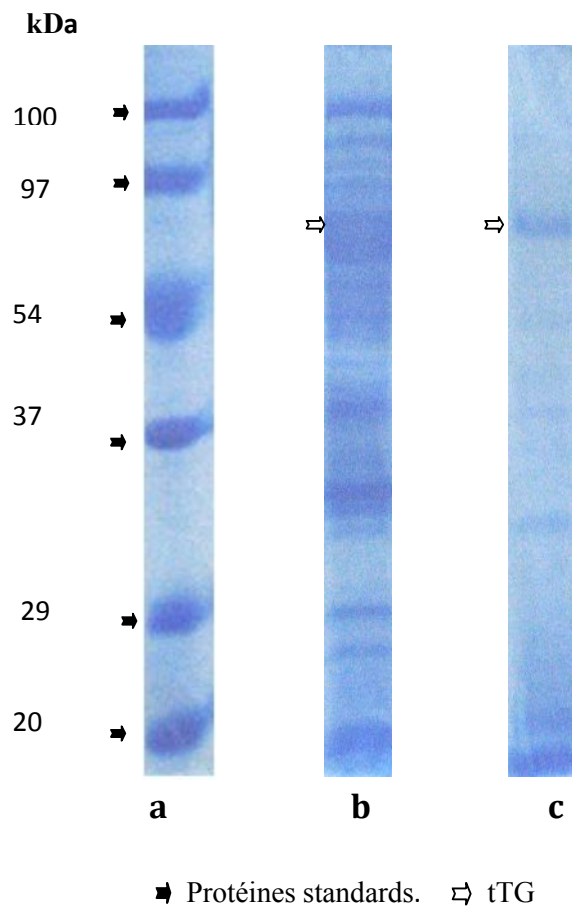
- (a) protéines standards
- (b) 10µg d'homogénat de foie de cobaye
- (c) 15 µg d'homogénat de foie de cobaye
- (d) 20 µg d'homogénat de foie de cobaye
- (e) 20 µg de « l'extrait 1 »

Intensité du courant appliqué : 140 V/4mA

Temps de migration : 120min

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des protéines de « l'extrait 1 » montre la présence de plusieurs bandes protéiques de PM apparent compris entre 10 kDa et 100 kDa ; nous notons au niveau de ce profil la présence d'un composé majeur de PM apparent de 85 kDa qui pourrait correspondre à la transglutaminase (**Fig.14e**).

Nous notons par ailleurs au niveau de ce profil, la présence d'un nombre moins important de protéines par rapport à l'extrait brut, ce qui explique l'amélioration du rendement pour cette étape.



**Figure 15. Profil électrophorétique des protéines solubles de l'homogénat et de l'extrait 2**

(a) protéines standards

(b) 20 µg d'homogénat

(c) 20 µg de « l'extrait 2 »

Intensité du courant appliqué : 140 V/ 4mA

Temps de migration : 120 min

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des protéines de « l'extrait 2 » montre la présence de plusieurs bandes protéiques de PM apparent compris entre 10 kDa et 100 kDa ; nous notons également au niveau de ce profil, la présence d'un composé majeur de PM apparent de 85 kDa qui semble correspondre à la transglutaminase (**Fig.15c**).

Nous relevons au niveau de ce profil, la présence d'un nombre de protéines nettement supérieur à celui de « l'extrait 1 », ce qui explique l'amélioration du rendement au cours de cette étape.

### 1.3 Optimisation des conditions de purification de la tTG

#### 1.3.1 Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-52

Pour la purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions, nous avons utilisé dans un premier temps un échangeur anionique le DEAE-52.

Le profil chromatographique obtenu (**Fig.16**) montre la présence de 4 pics (A, B, C et D):

- **Le pic A** apparu entre le temps 0 et 200 min correspond aux protéines non fixées à la matrice et éluées en début d'expérience.

-**Le pic B** est obtenu après application du gradient de NaCl, les protéines correspondant à ce pic sont éluées avec une concentration de NaCl de 0.1 M et à un pH de 7.5 au bout de 320 min.

- **Le pic C** est obtenu après application du gradient de NaCl, les protéines correspondant à ce pic sont éluées avec une concentration de NaCl de 0.3 M et à un pH de 7.5 au bout de 600 min.

- **Le pic D** est obtenu après application du gradient de NaCl, les protéines correspondant à ce pic sont éluées avec une concentration de NaCl de 0.6 M et à un pH de 7.5 au bout de 3000 min.

#### 1.3.1.1 Détermination du rendement protéique après chromatographie sur DEAE -52

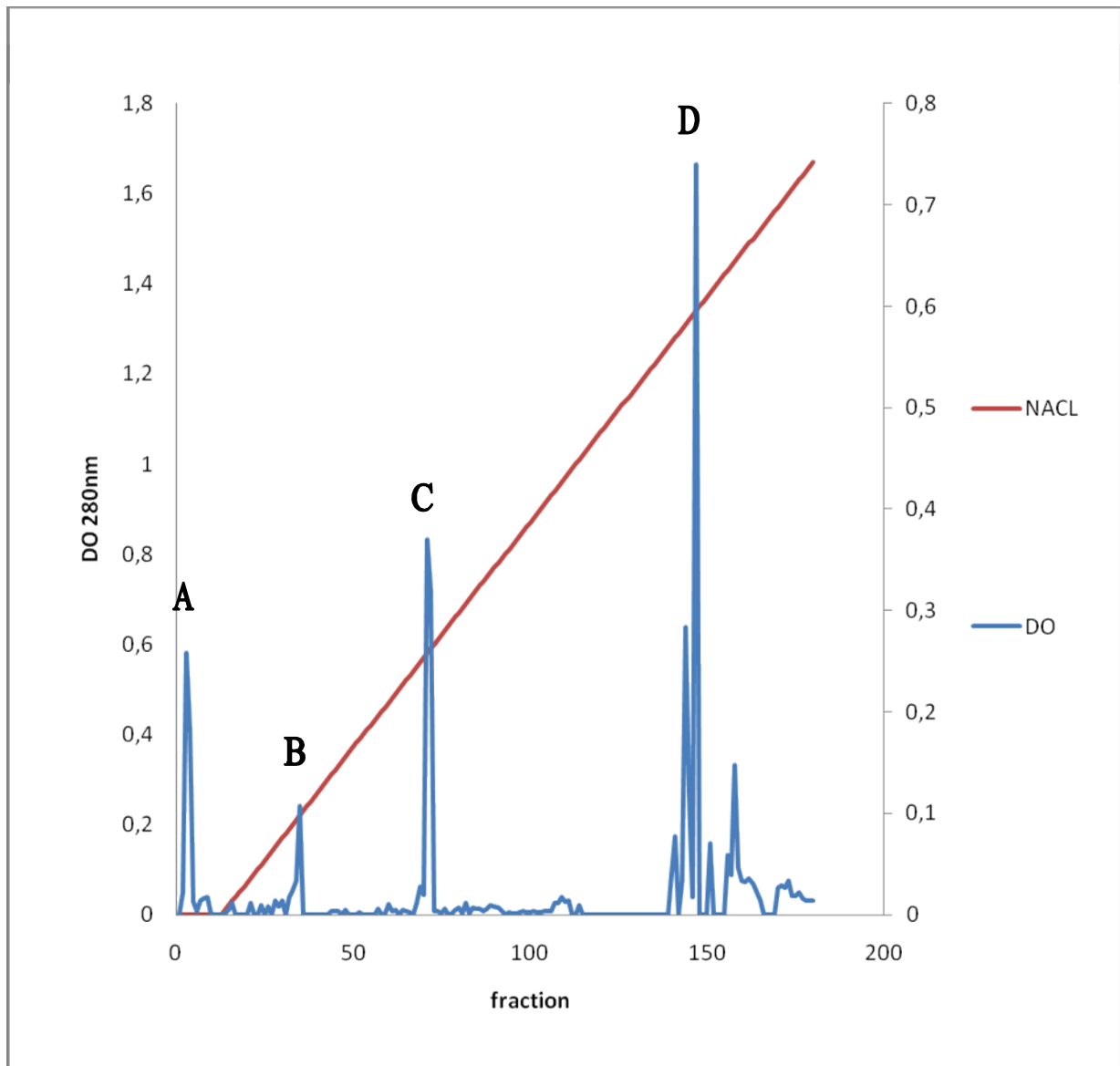
Après élution, les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées et les concentrations protéiques sont déterminées.

- **Précipitation par le sulfate d'ammonium**

Pour la concentration des fractions protéiques éluées, nous avons testé différentes techniques ; la précipitation par le sulfate d'ammonium ne s'est pas avérée efficace pour nos échantillons. En effet, nous notons une perte importante de protéines qui pourrait être liée à l'agrégation de la tTG.

Le deuxième procédé de concentration utilisé est la lyophilisation qui, comme la précipitation par le sulfate d'ammonium n'a pas permis de concentrer nos échantillons, puisqu'une perte d'environ 50% est notée (**Tab.VIII**)

La diafiltration qui a été récemment mise au point a permis de concentrer les différentes fractions obtenues après purification.



**Figure 16. Purification de la tTG a partir de «l'extrait 2» par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-52**

- Volume de l'échantillon déposé 2.5 ml
- Concentration protéique 188.05 mg/ml
- Gradient de NaCl: (0-1 M)
- Volume d'élution: 100ml Tp A ; .300 ml Tp B
- Débit d'élution: 0.22ml/min
- Durée: 55h

**Tableau VIII. Précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium**

<b>Fractions</b>	<b>Concentration protéique avant précipitation (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Concentration protéique après précipitation (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>
<b>Fraction 1</b>	<b>4.88</b>	<b>2.08</b>
<b>Fraction 2</b>	<b>0.35</b>	<b>0.20</b>
<b>Extrait 2</b>	<b>610.37</b>	<b>291.28</b>

**Tableau IX. Détermination du facteur purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-52**

<b>Fraction ou pic</b>	<b>Concentration (mg/ml)</b>	<b>Volume final (ml)</b>
<b>A</b>	0.8	1.5
<b>B</b>	0.02	1
<b>C</b>	1.1	1
<b>D</b>	0.2	1

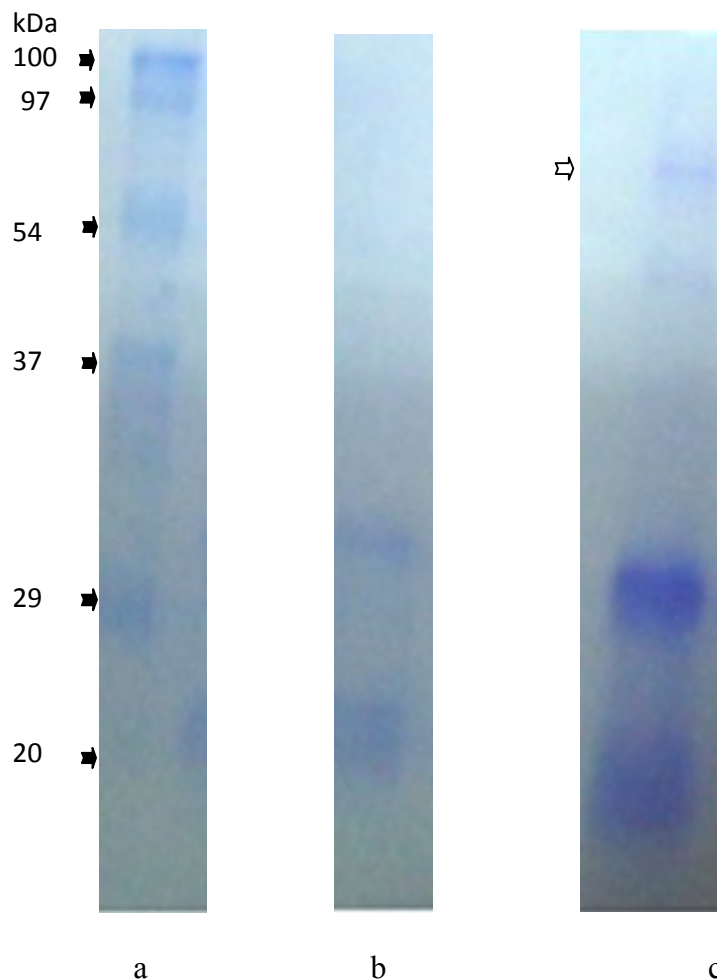
Pour la purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions, nous avons testé 2 échangeurs anioniques le DEAE-52 et le DEAE microcristalline.

**Tableau X. Effet de l'échangeur anionique sur le facteur de purification**

<b>Echantillon</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>DO à 595 nm</b>	<b>Concentration <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math></b>	<b>Facteur (%)</b>
<b>Fraction 1 (DEAE-52)</b>	20	0.071	36.11	5.9
<b>Fraction 2 (DEAE-microcristalline)</b>	20	0.167	119.25	19.53

Le facteur de purification obtenu après chromatographie sur DEAE-52 est de 5.9 % ; ce facteur est de 19.53 % lorsque nous utilisons un autre échangeur anionique le DEAE-microcristalline, soit 4 fois supérieur à celui obtenu après chromatographie sur DEAE-52 ; d'où le choix de cet échangeur anionique pour le reste de nos expérimentations.

Pour le contrôle de la pureté des fractions protéiques purifiées, nous avons soumis les éluats correspondant à chaque pic à une séparation par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).



**Figure 17. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des différentes fractions obtenues après chromatographie sur DEAE-52**

(a) Protéines standards

(b) Pic A : 20 $\mu$ g

(c) Pic C : 20 $\mu$ g

Intensité du courant appliqué : 140 V/4mA

Temps de migration : 120min

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes montre pour :

- le pic **A**, la présence de deux bandes protéiques de PM de 25 et de 40 kDa .
- le pic **C**, la présence de cinq bandes protéiques de PM compris entre 10 kDa et 90 kDa avec la présence d'une bande située dans la zone de PM de 83 kDa qui correspondrait à la tTG
- Les fractions correspondant aux pics **B** et **D** ne sont pas révélées en raison de leur faible concentration protéique.

Il ressort de cette analyse électrophorétique que la chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-52 a permis de purifier la tTG qui se retrouve dans le pic C qui est élué avec une concentration de NaCl de 0.3M avec un rendement de 5.9%.

Nous notons cependant que dans cette fraction (1) ou pic C en plus de la bande protéique correspondant à la tTG, la présence d'un composé de PM apparent de 40 kDa (**Fig.17c**).

### 1.3.2 Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE microcristalline

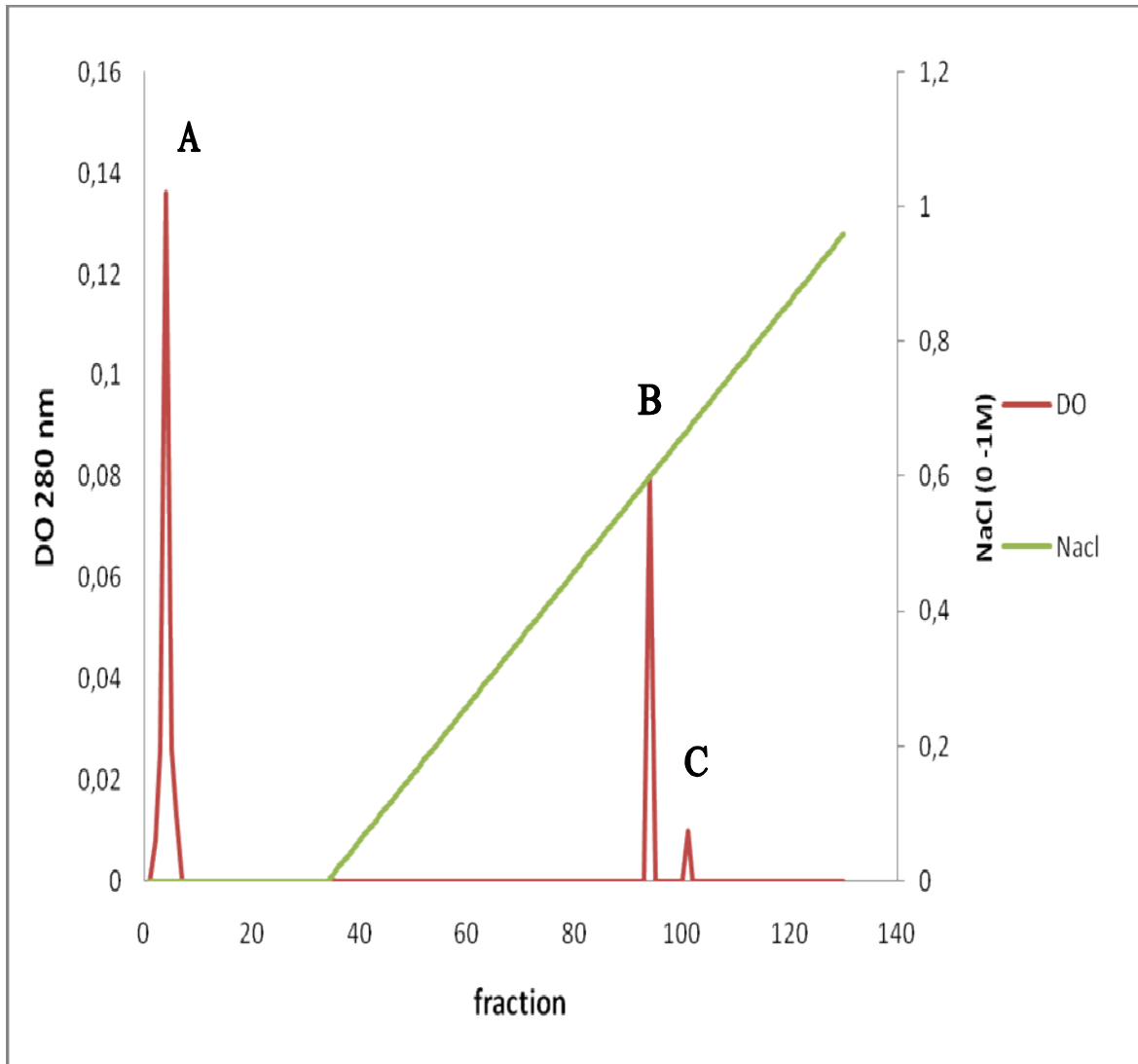
Le profil chromatographique obtenu montre la présence de trois pics (A, B et C) (**Fig.18**):

- Le pic **A** apparu entre le temps 0 et 1h 30 min correspond aux protéines non fixées à la matrice et éluées au début d'expérience.
- Le pic **B** est obtenu après application du gradient de NaCl, les protéines correspondant à ce pic sont éluées avec une concentration de NaCl de 0.6 M et à un pH de 7.5 au bout de 31 h.
- Le pic **C** est obtenu après application du gradient de NaCl de 0.07M et à un pH de 7.5 au bout de 37h.

Après élution, les fractions correspondant à chaque pic sont rassemblées et les concentrations sont déterminées.

**Tableau XI. Détermination du facteur de purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- microcristalline**

Fraction ou pic	Concentration (mg /ml)	Volume final (ml)
<b>A</b>	117.03	3
<b>B (fraction 2)</b>	34.81	1
<b>C</b>	0.3	1



**Figure 18. Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-microcristalline**

Volume de l'échantillon : 2.5 ml  
 Concentration protéique 188.28 mg/ml  
 Gradient de NaCl (0-1M)  
 Volume d'éluion : 100 ml tampon A et 300 ml tampon B  
 Débit:0.22ml /min  
 Durée de l'éluion : 22h

Un échantillon de 2.5ml avec une concentration protéique de 188.05 mg/ml de « l'extrait 2 » est purifié par chromatographie sur DEAE-microcristalline dans les mêmes conditions que précédemment avec des temps et des volumes d'élution différents (tampon A : 50ml ; tampon B : 300ml) (**Fig.19**).

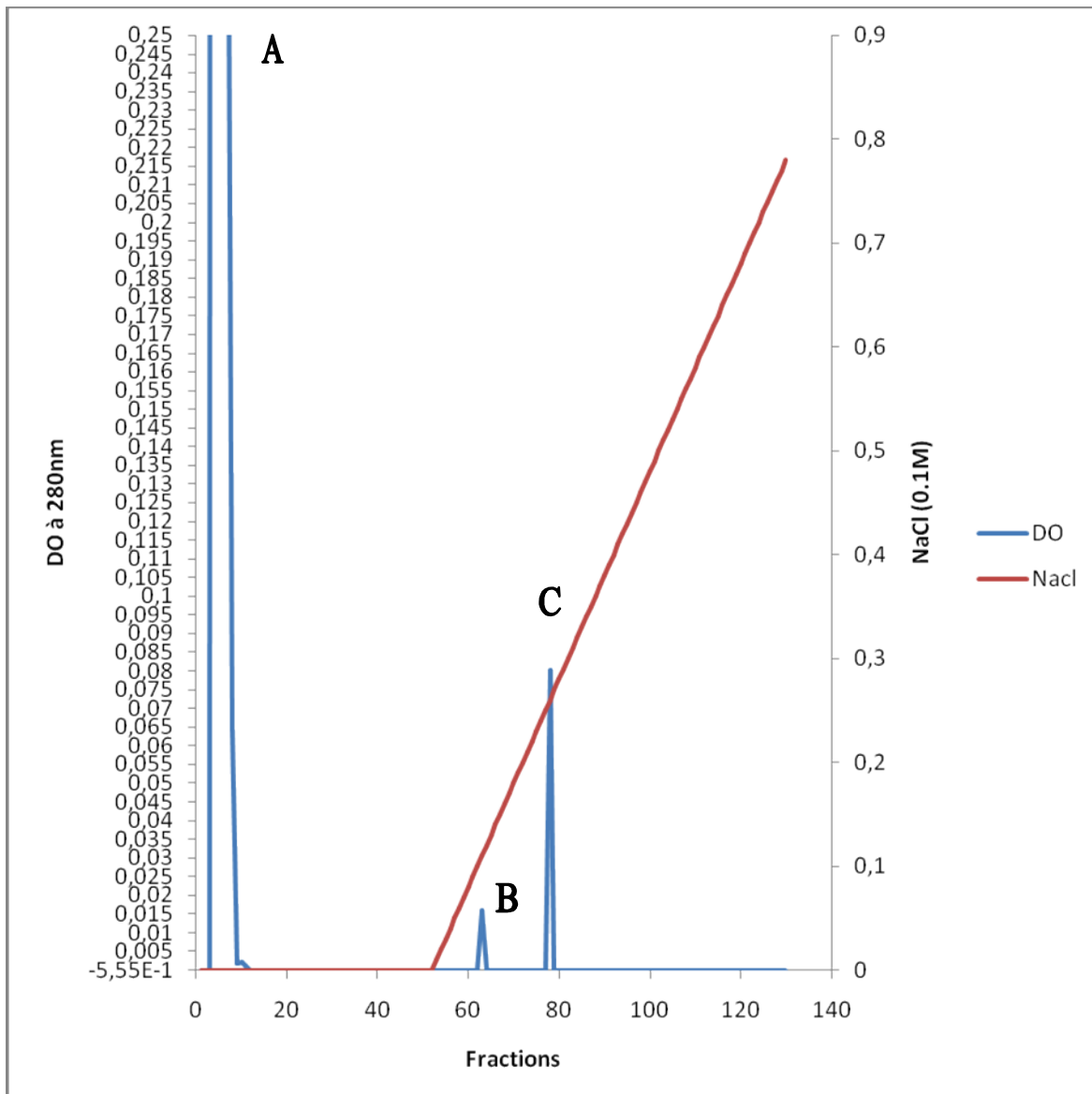
Le profil chromatographique obtenu après élution sous l'effet d'un gradient linéaire de NaCl compris entre 0-1M montre :

- un pic de lavage (pic A),
- le pic B élué avec une concentration de NaCl de 0.05 M qui est peu important,
- le pic C élué avec une concentration de NaCl de 0.3 M correspond à la tTG.

Un échantillon de 2.5ml avec une concentration protéique de 188.05 mg/ml de « l'extrait 2 » est purifié par chromatographie sur DEAE-microcristalline dans les mêmes conditions que précédemment avec des temps et des volumes d'élution différents (tampon A : 100ml ; tampon B : 300ml) (**Fig.20**).

L'élution avec un gradient de NaCl compris entre 0.1M et 0.8 pH 6.75 montre que :

- le pic A, dont le temps de rétention est de 1min correspondrait aux composés de l'échantillon non fixés sur l'échangeur anionique,
- le pic C élué avec une concentration de NaCl de 0.07M correspond à la tTG.



**Figure 19. Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE- Microcristalline**

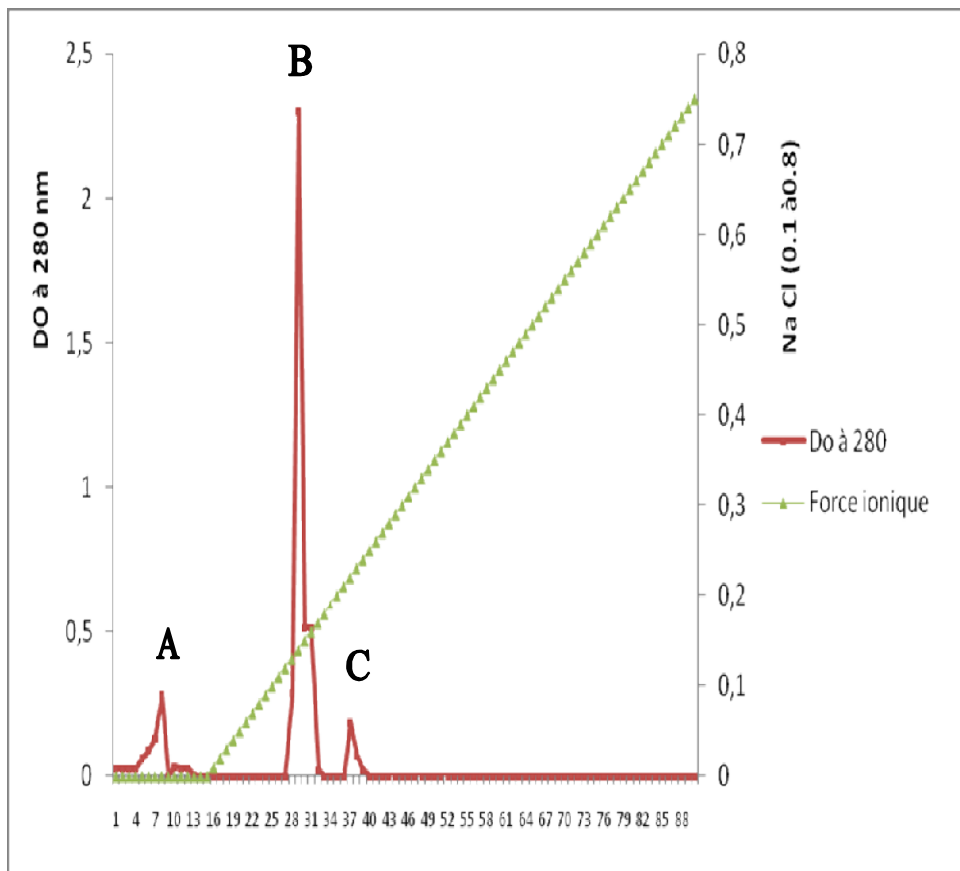
Volume de l'échantillon : 2.5ml

Concentration protéique 188.05ml /mg

Gradient de NaCl (0-1M)

Volume d'éluion: 50 ml TpA et 400 ml TpB

Durée de l'éluion : 22 h



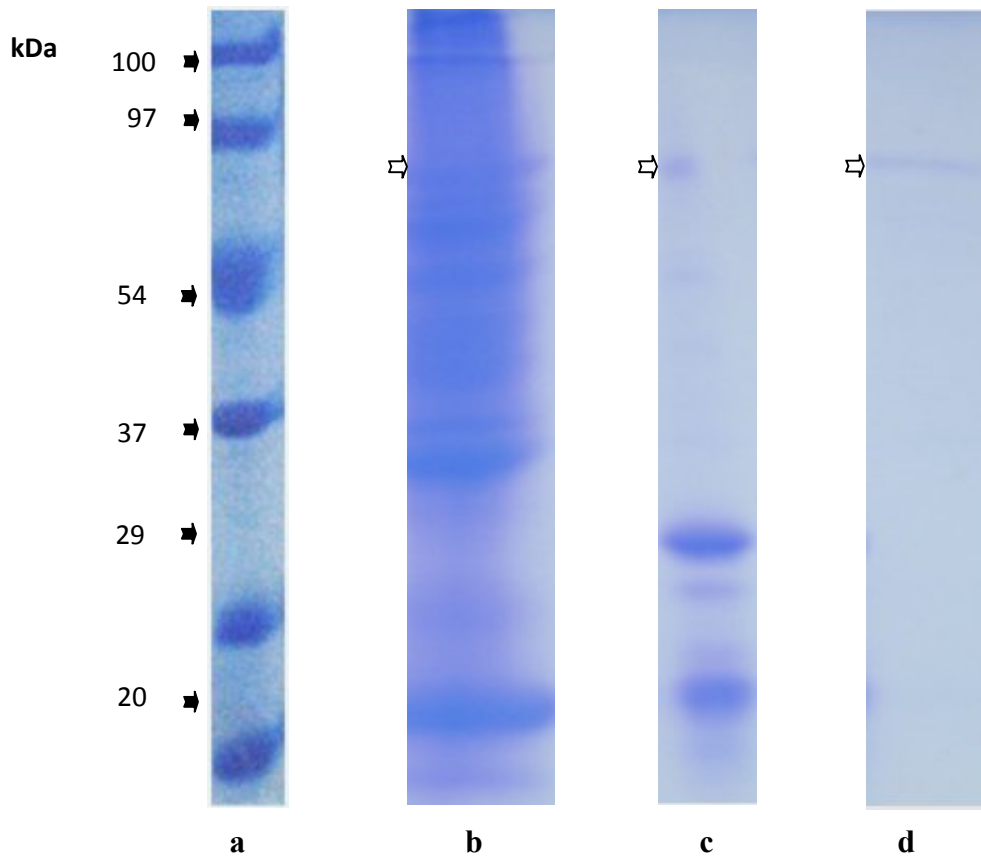
**Figure 20. Purification de la tTG par chromatographie échangeuse d’ions sur DEAE- microcristalline**

Volume de l’échantillon : 2.5ml  
 Concentration protéique 188.05ml /mg  
 Gradient de NaCl : (0 - 1M) pH 6.75  
 Volume d’élution : 50 ml TpA et 350 ml TpB  
 Débit d’élution : 0.22ml /min  
 Durée d’élution: 20h

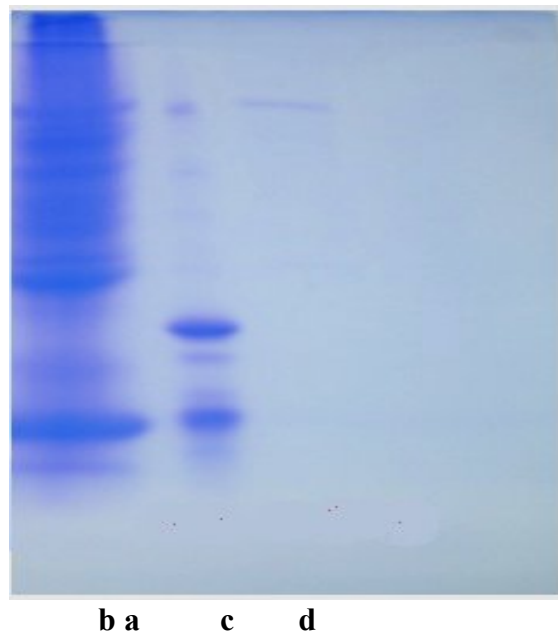
### 1.4 Analyse des profils électrophorétiques

L'analyse des profils électrophorétiques des différents échantillons testés montre pour:

- **l'extrait brut** ou « homogénat », un nombre important de bandes protéiques, dont les PM apparents sont compris entre 14 et 100 kDa (**Fig. 14d**),
- les **extraits 1 et 2**, un nombre de bandes protéiques beaucoup plus faible par rapport à celui de l'extrait brut (**Fig. 14 e**) et (**Fig. 15c**),
- La **fraction 1 (pic C)** éluée après chromatographie sur DEAE-52 révèle la présence de 8 bandes protéiques de PM apparents compris entre 20 kDa et 90 kDa ; nous notons la présence d'une bande protéique dans la zone de **PM de 83 kDa** qui pourrait correspondre à la transglutaminase (**Fig. 21Bb**),
- la **fraction 2 (pic B)** éluée après chromatographie sur DEAE-microcristalline révèle la présence d'une **seule bande** au niveau des PM de **83 kDa** (**Fig. 21Ad**) et (**Fig. 21Bc**).



**Figure 21A. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des différents extraits et fractions**  
 (a) protéines standards ; (b) 20 µg de l'extrait 2 ; (c) 20 µg de la fraction 1 ;(d) 20 µg de la fraction 2  
 Intensité du courant appliqué : 140 V/4mA Temps de migration : 120min



**Figure 21B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des différents extraits et fractions**

(b) 20 µg de l'extrait 2 ; (c) 20 µg de la fraction 1 ;(d) 20 µg de la fraction 2  
 Intensité du courant appliqué : 140 V /4mA ; Temps de migration : 120min

## 1.4 Révélation de la tTG par ELISA

Pour la détection des anticorps anti-tTG nous avons utilisé comme contrôles négatifs des sérums d'individus sains (ne contenant pas d'anticorps anti-tTG) et des contrôles positifs (sérums de malades coeliaques) comportant des anticorps spécifiques de l'antigène tTG ; la concentration de ces Ac est estimée par l'intensité de la coloration développée après l'étape de révélation, elle est représentée par un nombre de (+) allant de 1 à 4 .

**Tableau. XII Détermination des titres des sérums**

Sérum positif	1/100	1/250	1/1000
<u>Intensité de la coloration</u>	++++	+++	++

Au niveau de la plaque de microtitration de 96 puits, où nous avons effectué notre test, nous notons au niveau des puits :

- A<sub>3</sub> et A<sub>7</sub> l'absence de coloration qui montre bien qu'il s'agit des contrôles négatifs.
- A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> une coloration avec une intensité importante correspondant au contrôles positifs qui révèlent la présence d'une concentration importante en Ac.
- A<sub>2</sub> et B<sub>2</sub> correspondant aux sérums de malades montrent que l'intensité de la coloration est différente au niveau des 2 puits ; il s'agit de sérums de malades présentant des concentrations en Ac différentes.

**Tableau. XIII Mise en évidence des anticorps anti tTG dans les sérums de malades coeliaques par ELISA**

Concentration d'Ag testé (1µg/ml)	Intensité de la coloration											
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>	A <sub>7</sub>	A <sub>8</sub>	A <sub>9</sub>	A <sub>10</sub>	A <sub>11</sub>	A <sub>12</sub>
-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Concentration d'Ag testé (5µg/ml)	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	B <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>	B <sub>7</sub>	B <sub>8</sub>	B <sub>9</sub>	B <sub>10</sub>	B <sub>11</sub>	B <sub>12</sub>
-	+++	-	-	-	++++	-	-	+	+	+	+	+

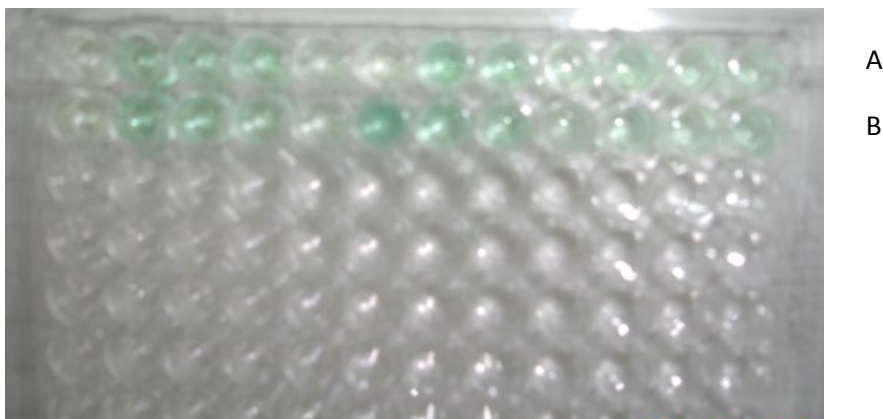
Pour ce test, nous avons utilisé pour l'étape de fixation de l'Ag, la fraction 2 correspondant à la tTG purifiée et dont le contrôle de pureté par SDS-PAGE a montré la présence d'une seule bande de PM apparent de 83 kDa. Les concentrations utilisées sont de 1µg/ml et de 5µg/ml.

La première concentration testée n'a pas permis de mettre en évidence les Ac présents dans les sérums de malades de façon reproductible.

En effet, pour les mêmes échantillons, nous avons noté d'un test à l'autre, une variabilité dans l'intensité de la coloration, contrairement aux résultats obtenus avec la concentration de 5µg/ml qui a permis de mettre en évidence les Ac anti-transglutaminase présents dans le sérum de malades avec une très bonne reproductibilité.

Pour notre travail, les résultats obtenus pour ce test constituent un moyen supplémentaire permettant de confirmer la présence de la tTG dans la fraction 2 obtenu après chromatographie sur DEAE-microcristalline.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Figure 22. Mise en évidence des anticorps anti – transglutaminase dans le sérum de malades cœliaques.**

La purification de la transglutaminase tissulaire a été abordée par plusieurs auteurs (Leblanc *et al.*,1999 ; Beate Wilhem *et al.*,1996 ;Steitz *et al.*,1996) ; les procédés utilisés ont été adaptés à partir de ceux adoptés par Folk et collaborateurs en 1985, leur utilisation a nécessité cependant de nombreuses modifications, notamment celles permettant de réduire le temps de purification.

Les techniques qui ont été employées sont des techniques chromatographiques, d'échange d'ions, de filtration sur gel et d'affinité, qui souvent, lors de leur utilisation, entraînent la dilution des protéines ; d'où la nécessité de procéder au préalable par une étape de concentration.

La technique la plus couramment utilisée pour la concentration des protéines est la précipitation par le sulfate d'ammonium.

Pour notre travail, nous avons procédé par plusieurs étapes afin d'essayer d'optimiser les conditions de purification de la tTG à partir du foie de cobaye.

Les résultats présentés portent sur trois parties essentielles :

- l'extraction de la transglutaminase (tTG) à partir du foie de cobaye et la concentration de la tTG par précipitation, lyophilisation et diafiltration.
- la purification de la tTG par chromatographie et contrôle de pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.
- l'utilisation de la tTG pour la mise en évidence d'auto anticorps dans le sérum de malades cœliaques par ELISA

### **I. Extraction de la tTG**

L'extraction de la tTG étant une étape déterminante pour sa purification, nous avons en premier lieu procédé à l'extraction de cette enzyme par ultracentrifugation.

Cette étape est réalisée après obtention de l'homogénat à une température de + 4°C permettant de conserver une activité enzymatique élevée et à différentes vitesses, afin de déterminer, celle qui permet l'obtention du meilleur rendement.

La première vitesse utilisée est de 35000 trs/min ; l'extraction de l'enzyme à cette vitesse n'a pas été suffisante puisqu'un rendement de 5.46% seulement a été obtenu. L'augmentation de la vitesse d'ultracentrifugation à 45000 trs/min, a permis d'extraire la tTG avec un rendement protéique nettement supérieur ; en effet, il est de 42.25% soit (8fois plus) que celui obtenu à 35000 tours/min ; c'est à cette vitesse que toutes les extractions de nos échantillons ont été réalisées.

### **II. Concentration de la tTG**

Pour améliorer le rendement de la purification de la transglutaminase tissulaire, nous avons procédé au préalable par une étape de concentration des échantillons.

Nous avons, pour cela testé plusieurs techniques permettant la concentration de nos échantillons, telle que la précipitation par le sulfate d'ammonium et par le sulfate de zinc, la lyophilisation et la diafiltration.

Parmi les modes de précipitation utilisés : la précipitation par le sulfate d'ammonium et par le sulfate de zinc n'ont pas permis de concentrer les extraits protéiques. Ce qui pourrait être liée aux caractéristiques physicochimiques de la tTG ; en effet un certain nombre d'auteurs rapporte que cette enzyme présente des difficultés pour son isolement en raison de son haut pouvoir d'agrégation (Beate Wilhem *et al.*, 1996) et que la concentration élevée du sulfate d'ammonium pourrait interférer avec l'activité de l'enzyme (Leblanc *et al.*, 1999).

La lyophilisation a été testée en second lieu pour certains échantillons ; ce procédé de concentration a entraîné une perte significative des protéines estimée à environ 50%. En plus de cette perte en protéines, il a été montré qu'une perte de 50% de l'activité enzymatique est notée (Leblanc *et al.*, 1999).

A l'heure actuelle, la concentration des protéines par un nouveau procédé qui est la diafiltration s'avère intéressant ; en effet, en plus de l'étape de concentration et de prépurification que subit l'échantillon, ce dernier est soumis à une dialyse qui permet d'éliminer les sels pouvant interférer et générer une baisse de l'activité enzymatique, tel qu'il a été montré par Leblanc et collaborateurs pour la lyophilisation.

Ce procédé nous a permis de concentrer ainsi l'ensemble de nos échantillons.

### III. Purification de la tTG

Après l'étape d'extraction et de concentration de la transglutaminase tissulaire nous avons procédé à la purification de cette enzyme par chromatographie échangeuse d'ions en utilisant deux échangeurs anioniques différents.

Avant d'aborder la purification proprement dite, et tenant compte des caractéristiques physico-chimiques de la transglutaminase, il a été nécessaire de choisir l'échangeur ionique le plus approprié. En effet, il a été montré que certains échangeurs ioniques, tel que le « Biogel A » utilisé avec un débit élevé de 5ml/min entraînait une saturation rapide de la colonne ; ce qui suggère l'utilisation de gels plus rigides permettant une purification avec un rendement nettement supérieur (76% au lieu de 50%) (Folk *et al.*, 1985).

Parmi les échangeurs anioniques couramment utilisés pour la purification des protéines, les matrices de cellulose présentent l'inconvénient de nécessiter des temps de manipulation très longs.

Afin de minimiser les inconvénients liés à l'échangeur ionique, nous avons dans un premier temps utilisé un échangeur anionique : le DEAE- 52 qui a permis de purifier la tTG en utilisant un gradient de NaCl.

Pour toutes les chromatographies que nous avons réalisées, nous avons retrouvé la transglutaminase au niveau du même pic élué avec NaCl (0.3M) ; cette concentration de NaCl correspond à la zone de concentration avec laquelle la transglutaminase a été purifiée par Wilhem et collaborateurs en 1996 par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-cellulose. En effet, ces auteurs montrent que la tTG est éluée avec une concentration de NaCl comprise entre 0.25M et 0.45M ; ces résultats rejoignent ceux de Folk et collaborateurs en 1969.

L'inconvénient de cet échangeur anionique est qu'il ne permet pas la purification de la transglutaminase avec une bonne résolution ; en effet, le contrôle par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la pureté des fractions éluées révèle la présence d'une bande protéique de PM apparent de 83 kDa qui semble correspondre à la tTG ainsi que la présence de deux

bandes supplémentaires de PM de 30 kDa et de 40 kDa (Fig. 19 c). Des résultats similaires sont rapportés par Anouk le blanc et collaborateur en 1999.

Cet échangeur anionique, n'ayant pas permis de purifier la tTG avec un degré de pureté important, nous avons envisagé d'améliorer la purification de la tTG en testant un deuxième échangeur anionique : le DEAE- microcristalline.

La purification de la tTG par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE microcristalline a permis la séparation de la tTG avec un gradient de NaCl et son élution avec une concentration de NaCl de 0.6M ; le contrôle par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de la pureté des fractions éluées a révélé la présence d'une seule bande protéique de PM apparent de 83 kDa (Fig. 23 Ad) correspondant à la tTG. Cette technique présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, elle permet en plus de purifier l'enzyme avec un rendement d'environ 48%.

Contrairement à la chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE cellulose, où la tTG se retrouve dans presque toutes les expériences au niveau d'un seul pic qui est élué avec une concentration de NaCl de 0.3M, la purification par chromatographie sur DEAE- microcristalline montre qu'une autre partie est éluée soit avec une concentration de NaCl plus importante 0.6 M soit avec une concentration plus faible 0.075M ; ces résultats pourraient s'expliquer par une modification de certains paramètres d'élution tels que la force ionique et le pH.

En dépit de quelques difficultés rencontrées nous avons obtenu la tTG avec un rendement de purification et un degré de pureté intéressants.

Ces résultats montrent que pour certains protocoles de purification et en fonction de l'échangeur ionique utilisé, la purification de la tTG peut être réalisée en une seule étape, alors que pour de nombreux autres cas, une seconde étape est requise pour l'obtention d'un meilleur degré de pureté.

Il faut souligner, néanmoins que ces résultats sont obtenus pour des échantillons dont la concentration protéique n'excède pas la capacité maximale de la colonne qui est de 200mg ; ce qui rend ce procédé de purification limitant en concentration protéique.

Grâce aux avancées des biotechnologies, des protocoles de purification de la transglutaminase tissulaire plus performants ont pu être mis au point. L'utilisation des anticorps monoclonaux anti-tTG, comme ligand, a permis de purifier la tTG par chromatographie d'affinité avec un degré de pureté élevé (Ikura Sakurai *et al.*, 1985), elle reste néanmoins peu utilisée en raison de la limite d'accessibilité des anticorps monoclonaux.

La chromatographie d'affinité utilisant la sépharose caséine a permis également la purification de la tTG dont le contrôle de pureté réalisé par SDS-PAGE a montré la présence d'une bande de PM apparent de 83 kDa (Croall *et al.*, 1986).

De nombreux travaux portant sur la purification de la tTG utilisent les mêmes méthodes de purification qui présentent l'inconvénient d'être longues et ne permettent pas l'obtention d'une activité enzymatique supérieure ou égale à 14  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  (Blackwell *et al.*, 1991).

Récemment, un procédé de purification par chromatographie d'affinité utilisant la tTG recombinante a permis de réduire considérablement le temps et a montré une importante reproductibilité. C'est pourquoi la mise au point d'un système d'expression efficace de la TGase tissulaire recombinante chez les mammifères s'est avéré un outil indispensable et la mise en place d'un système d'expression efficace de la transglutaminase tissulaire

recombinante de foie de cobaye a permis d'obtenir l'enzyme avec un rendement élevé et un important degré de pureté (Steitz *et al.*,1996).

Puisque l'activité de la transglutaminase ne nécessite pas de modifications post-traductionnelles, elle constitue une bonne cible pour l'expression recombinante dans des cellules bactériennes (Ikura *et al.*,1990).

L'expression dans *E.coli* et la purification de la tTG humaine par hexa histidine-tag par chromatographie d'affinité ont été récemment décrits par Shi et collaborateurs en 2002 .

L'activité spécifique de la transglutaminase humaine recombinante rapportée dans certains travaux est d'environ 2 à 4 fois inférieure à celle de la tTG de foie de cobaye commerciale native (sigma) avec une concentration de 0,6 mg par litre de culture cellulaire

En outre, la présence de la balise hexa histidine permet l'utilisation d'un protocole de purification pour lequel les cellules bactériennes d'*E.coli* hébergeant le plasmide d'expression pQe32-TGase ont d'abord été testées pour la production de l'enzyme transglutaminase tissulaire de foie de cobaye His6-tagué. Son analyse par SDS-PAGE montre une bande protéique qui migre un peu plus lentement que la tTG de foie de cobaye native à la suite de la balise hexa histidine supplémentaire.

L'activité spécifique de la tTG recombinante du foie de cobaye exprimée dans *E.coli* obtenue par Ikura et collaborateurs en 1990 est environ 7 fois inférieure à celle de tTG native, cependant la quantité d'enzyme produite par litre de culture est de l'ordre de 37,5 mg /l; soit un rendement important de 62.5 % ce qui montre l'intérêt de ce procédé de production de la tTG (Ikura *et al.*,2002).

L'expression dans *E. coli* de la transglutaminase tissulaire avec une étiquette hexa histidine à l'extrémité N-terminale permet la purification rapide par immobilisation de groupement métal sur chromatographie d'affinité (IMAC) (Yokoyama *et al.* ,1998).

IL a été rapporté par ailleurs, que l'expression des chaperonnes a un effet positif sur la production de transglutaminase recombinante.

- La première méthode basée sur celle de Yokoyama et collaborateurs. en 1998 repose sur la DnaK chaperons DnaJ et permet l'obtention d'un rendement élevé de la protéine soluble.
- La seconde méthode repose sur l'utilisation de la bétaine, une chaperonne chimique qui a été utilisée pour améliorer le rendement de la protéine soluble lors de l'expression de protéines recombinantes.

Cette procédure de modification a permis d'obtenir pour la première fois en une seule étape de purification, une hexa-histidine-tagué tTG avec une meilleure activité spécifique (17 U/mg) et un rendement important de (22 mg/l de culture) (Miklos et al.,1999).

#### IV. Révélation de la tTG par méthode immuno-enzymatique (ELISA)

La tTG est l'antigène principal reconnu par les anticorps anti-endomysium, la découverte de cet antigène a permis de mettre en place des tests sérologiques basés sur des techniques immuno-enzymatiques.

Au cours de cette étude de détection, des problèmes de reproductibilité et de faux positifs ont été rencontrés, ce qui nous a conduits à modifier partiellement les protocoles originaux. Les modifications apportées ne concernent pas toutes les étapes du protocole initial.

Il s'agit essentiellement de l'étape de fixation de l'antigène, où nous avons fait varier la concentration de ce dernier dans le tampon tris HCl CaCl<sub>2</sub> et de déterminer celle qui permet la meilleure visualisation du complexe Ag-Ac ; nous avons montré qu'une concentration de (5µg/ml) a permis d'obtenir de bons résultats pour tous les sérums analysés.

La recherche d'auto-Ac dans le sérum de malades cœliaques a nécessité également, une étape préalable de détermination de la dilution optimale permettant le meilleur résultat ; parmi les différentes dilutions testées, la dilution 1/250 a été retenue et utilisée pour l'ensemble des échantillons sériques. En effet, il est établi qu'il existe une dilution optimale au dessus et en dessous de laquelle, la capacité de fixation décroît.

Les résultats qualitatifs de nos tests ELISA ont permis d'apprécier et de montrer qu'avec une concentration de l'Ag (tTG) de 5µg/ml, nous arrivons à détecter des auto-Ac présents à des concentrations faibles dans les sérums testés.

Cette appréciation qualitative des résultats a permis de mettre en évidence les Ac anti-tTG dans le sérum de malades cœliaques, elle constitue ainsi un outil intéressant pour le diagnostic de la maladie cœliaque et un moyen intéressant pour le contrôle de l'efficacité du procédé de purification mis au point dans ce travail.

En dépit des problèmes rencontrés lors de la détection des anticorps anti-transglutaminase par cette méthode immuno-enzymatique d'utilisation courante et facile à mettre en œuvre, la technique ELISA constitue un moyen efficace pour la mise en évidence des auto-Ac dans le sérum des malades. C'est une méthode d'analyse qui permet de tester un grand nombre d'échantillons à la fois, elle a en outre l'avantage d'être rapide et sensible et peut être utilisée couramment en routine.

### Conclusion

La transglutaminase tissulaire est une enzyme intracellulaire monomérique de PM apparent de 85 kDa et de pHi compris entre 5 et 6 ; sa purification demeure cependant difficile en raison de sa capacité à s'agréger facilement.

L'optimisation des conditions:

- d'extraction de l'enzyme à partir de foie de cobaye ,
- de concentration par dia-filtration ,
- de séparation par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-microcristalline

a permis de purifier la transglutaminase tissulaire en une seule étape avec un rendement de purification de 48 %.

Le DEAE- microcristalline est un échangeur anionique qui a permis de purifier la tTG avec un rendement de 48 % ; il est utilisé pour la première fois pour la purification de cette enzyme.

L'enzyme purifiée par cette technique chromatographique a pu être utilisée pour la recherche d'anticorps anti-transglutaminase dans le sérum de malades cœliaques par une technique immunoenzymatique « ELISA ».

La transglutaminase ainsi purifiée peut donc être utilisée pour le diagnostic de la maladie cœliaque.

### Perspectives

Cette étude mérite d'être complétée par :

- la mesure de l'activité enzymatique en utilisant les deux principaux substrats de la transglutaminase tissulaire : la gliadine et /ou le substrat synthétique : le benzyloxy-carbonyl-L -glutaminyglycine.
- de comparer la transglutaminase purifiée par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-microcristalline à la transglutaminase purifiée et commercialisée et à la transglutaminase recombinante utilisée dans les tests de diagnostic de la maladie cœliaque .

- Abe S., Yamashita K., Kohno H. et Ohkubo Y. 2000. Involvement of transglutaminase in the receptor-mediated endocytosis of mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharmac Bull* **23**, 1511-1513.
- Ahvazi B., Kim H.C., Kee H., Nemes Z. et Steinert P. M. 2002. Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *JEMBO* **21**, 2055-2067.
- Ahvazi B., Boeshans K.M., Idler W., Baxa U. et Steinert P. M. 2003. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase3 enzyme. *J Biol Chem* **278**, 23834-23841.
- Ahvazi B. et Steinert P.M. 2003. A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme. *Exp Mol Med* **35**, 225-242.
- Ahvazi B., Boeshans K. M., Idler W., Baxa U., Steinert P. M. et Rastinejad F. 2004. Structural basis for the coordinated regulation of transglutaminase 3 by guanine nucleotides and calcium/magnesium. *J Biol Chem* **279**, 7180-7192.
- Ahvazi B., Boeshans K. M. et Steinert P. M. 2004. Crystal structure of transglutaminase 3 in complex with GMP: structural basis for nucleotide specificity. *J Biol Chem* **279**, 26719-26725.
- Aeschlimann D. et Paulsson. 1994. Transglutaminases: protein cross linkages enzyme in tissues and body fluids. *Thromb. haemostasis* **71**, 402-415.
- Ambrus A., Fesus L. 2001. Polyethylene glycol enhanced refolding of the recombinant human tissue transglutaminase, *Prep. Biochem Biotechnol* **31** (1), 59-70.
- Andersson L., Blomberg L., Flegel M., Lepsa L., Nilsson B. et Verlander M. 2000. Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* **55**, 227-250.
- Autuori F., Farrace M.G., Oliverio S., Piredda L. et Piacentini M. 1998. "Tissue" transglutaminase and apoptosis. *Adv Biochem Biotechnol* **62**, 129-136.
- Beate W., Andreas M. et Seitz J. 1996. Transglutaminase Purification and activity assays. *J chromatogr* **684**, 163-177.
- Blackwell J.R. et Horgan R. 1991. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett* **295**.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Boeshans K.M. et Mueser T.C. 2007. A three-dimensional model of the human transglutaminase 1: insights into the understanding of lamellar ichthyosis. *J Mol Mod* **13**, 233-246.

- Bruce S.E., Bjarnason I. et Peters T.J. 1985. Human jejunal transglutaminase : demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease. *Clin Sci* **68**, 573-579.
- Bures D.M., Goldsmith L.A et Stone K R.1980. Transglutaminase activity of culture d' human prostatic epithelium. *Invest Urol* **17**(4), 298-301.
- Clark M.J., Mycek A., Neidle et Waelsch H.1959. The incorporation of amines into protein. *biochem* **79**, 338-354.
- Candi E., Paradisi A., Terrinon A., Pietroni V., Oddi S., Cadot B., Jogini V., Meiyappan M., Clardy J., Finazzi-Agro A. et Melino G. 2004. Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides. *Biochem* **381**, 313-319.
- Case A. et Stein R. L.2003. Kinetic analysis of the action of tissue transglutaminase on peptide and protein substrates. *Biochem* **42**, 9466-9481.
- Chen J. S. et Mehta K.1999. Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Inter J Biochem Cell Biol* **31**, 817-836.
- Chica R.,Gagnon P.,Keillor J W.,et Pelletier J.N.2004.Tissue transglutaminase acylation ;Proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding Protein. *Sci* **13**, 979-991.
- Choi K., Seigel M., Piper J.L., Yuam L., Cho E., Stmad P., Omary B., Rich K. et Khosla C. 2005. Chemistry and biology of dihydroisoxazole derivatives selective inhibitors of human transglutaminase 2. *Chem Biol* **12**, 469-475.
- Cooper A.L., Jeitner T.M. et Blass J.P. 2002. The role of transglutaminases in neurodegenerative diseases. *Neurochem Inter* **40**,1-5.
- Croal D.E. et Demartino G.N.1986. Calcium –dependent affinity purification of transglutaminase from rat liver cytosol. *Cell* **7**, 29-39.
- Day N.,et Keillor J.W.1999.A continuous spectrophotometer linked enzyme assay for transglutaminase activity. *Anal Biochem* **274**, 141-144.
- Della Mea M., Caparros-Rui D., Claparols I., Serafini-Fracassini D. et Rigau J.2004 AtPng1p. The first plant transglutaminase. *Plant Physiol* **135**, 2046-2054.
- Dieterich W. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nat Med* **3**, 797-801.
- Facchiano F. et Facchiano A. 2005. Transglutaminase and Experimental Tumor. *Res* **38**, 37-57.
- Fesus L. et Piacentini M. 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in Biochem Sci* **27**, 534-539.
- Fesus L., Thomazy V. et Falus A. 1987. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Letts* **224**, 104-108.

- Folk J.E. 1969. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VI. Order of substrate addition. *J Biol Chem* **244**, 3707-3713.
- Folk J.E. et Chung S. I. 1985. Transglutaminase. *Methods Enzymol.* **113**, 358-364.
- Fox B.A., Yee C.C., Pedersen L.C., Le Trong I., Bishop P.D., Stenkamp R.E. et Teller D.C. 1999. Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem* **274**, 4917-4923.
- Greenberg C.S., Birckbichler P.J. et Rice R.H. 1991. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* **5**, 3071-3077.
- Griffin M R., et Bergamini C.M. 2002. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J* **368**, 377-396.
- Halttunen T. et Mäki M. 1998. Celiac disease antibodies and tissue transglutaminase antibodies interfere similarly with fibroblast-induced epithelial cell differentiation. *Gastroenterol* **4**, 374- 377.
- Halim D., Caron K. et Keillor J.W. 2006. Synthesis and evaluation of peptidic maleimides as transglutaminase inhibitors. *BioorgMed Chem Lett* **17**, 305-308.
- Hames B., Hooper N. et Houghton J. 2000. *L'essentiel en biochimie. ed BERTI* p **48**.
- Hasegawa G., Suwa M., Ichikawa Y., Ohtsuka T., Kumagai S., Kikuchi M., Sato Y. et Saito Y. 2003. A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem J* **373**, 793-803.
- Hausch F., Halttunen T., Maki M. et Khosla C. 2003. Design, synthesis, and evaluation of gluten peptide analogs as selective inhibitors of human tissue transglutaminase. *Chem Bio* **10**, 225-231.
- Horton Moran, Ochs Rawnnet Suingever. 1994. Principe de biochimie. *Ed De boeck universite-Paris*, p **68**.
- Ikura K., Kokubu T., Natsuka S., Ichikawa A., Adachi M., Nishiara K., Ynagi H. et Utsumi S. 2002. Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of the recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in *Escherichia coli* prep. *Biotechnol* **3**, 189-205.
- Ikura K., Sakurai H., Okumura K., Sasaki R. et Chiba H. 1985. *Agric Biol Chem* **49**, 3527-3531.
- Ikura K., Tsuchiya Y., Sasaki R. et Chiba H. 1990. Expression of guinea pig liver transglutaminase cDNA in *Escherichia coli*. Amino-terminal N-alpha-acetyl group is not essential for catalytic function of transglutaminase. *Eur J Biochem* **187**, 705-711.
- Iranzo M., Aguado C., Pallotti C., Canizares J.V. et Mormeneo S. 2002. Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction *Microbiol* **148**, 1329-1334.

- Kamoun N.1997. Appareils et methodes en biochimie et biologie moléculaire. *Ed Flammarion-paris*, 156 P.
- Kashiwagi T., Yokoyama K., Ishikawa K., Ono K., Ejima D., Matsui H. et Suzuki E. 2002. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *J Biol Chem* **277**, 44252-44260.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai T.S., Achyuthan K.E., Santiago M. A. et Greenberg G.S. 1994. Carboxy-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity. *J Biol Chem* **269**, 24596-24601.
- Lai T.S., Slaughter T.F., Koropchak C.M., Haroon Z.A. et Greenberg C.S. 1996. Terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem* **271**, 31191-31195.
- Lai T.S., Slauch T.F., Peoples K.A. et Greenberg C.S. 1999. Site-directed mutagenesis of the calcium-binding site of blood coagulation factor XIIIa. *J Biol Chem* **274**, 24953-24958.
- Leblanc A., Gravel C., Labelle J. et Keillor J.W. 2001. Kinetic studies of guinea pig liver transglutaminase reveal a general-base-catalyzed deacylation mechanism. *Biochem* **40**, 8335-8342.
- Leblanc A., Day N., Ménard A. et Jeffrey W. Keillor. 1999. Guinea pig liver transglutaminase: A modified purification procedure affording enzyme with superior activity in greater yield. *Protein Expr Purif* **1**, 89-95.
- Lesort M., Attanavanich K., Zhan J. et Johnson G.V. 1998. Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase. *J Biol Chem* **273**, 11991-11994.
- Liu S., Cerione R.A. et Clardy J. 2002. Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2743-2747.
- Lorand L.1996. Neurodegenerative diseases and transglutaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14310-14313.
- Lorand L. et Graham R.M. 2003. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 140-156.
- Lundin K.E.1993. Gliadin specific, HLA DQ ( $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ ) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of coeliac disease patient. *J Exp Med* **178**, 187-196.
- Macedo P., Marrano C. et Keillor J.W. 2004. A direct continuous spectrophotometric assay for transglutaminase activity. *Anal Biochem* **285**, 16-20.

- Madi A., Punyiczki M., di Rao M., Piacentini M. et Fesus L. 1998. Biochemical characterization and localization of transglutaminase in wild-type and cell-death mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem* **253**, 583-590.
- Mäki M. et Collin P. 1997. Coeliac disease. *J Biol Chem* **349**, 1755-1759.
- Mehta K. 2005. Mammalian transglutaminase: a family portrait. *Progr Experim Tum Res* **38**, 1-18.
- Miklos S., Uwe O., Sarolta K., Mats P. et Neil S. 1999. Recombinant human tissue transglutaminase Elisa for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *J Bio Clin Chem* **189**, 2142-2149.
- Mishra S. et Murphy L. J. 2004. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J Biol Chem* **279**, 23863-23868.
- Molberg O. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognised by gut-derived T cells in coeliac disease. *Nat. Med* **4**, 713-717.
- Nakaoka H., Perez M., Baek K. J., Das T., Husain A., Misono K., Im M. J et Graham, R. M. 1994. A GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Sci* **264**, 1563-1596.
- Nilsen E.M., Lundin K.E.A., Krajci P., Scott H., Sollid L.M. 1995. Gluten specific, HLA DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon-gamma. *Gut* **37**, 766-771.
- Noguchi K., Ishikawa K., Yokoyama K., Ohtsuka T., Nio N. et Suzuki, E. 2001. Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *J Biol Chem* **276**, 12055-12059.
- Pasternack R., Dorsch S., Otterbach J. T., Robenek I. R., Wolf S. et Fuchsbauer H. L. 1998. Bacterial pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* purification, characterization and sequence of the zymogen. *Eur J Biochem* **257**, 570-576.
- Pedersen L. C., Yee V. C., Bishop P. D., Le Trong I., Teller D. C. et Stenkamp R. E. 1994. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Sci* **3**, 1131-1135.
- Picarelli A., Maiuri L., Frate A., Greco M., Londei M. 1996. Production of antiendomysial antibodies after *in vitro* gliadin challenge of small intestine biopsy samples from patients with coeliac disease. *Anal Biochem* **348**, 1065-1067.
- Plummer D. 1989. Introduction aux techniques de biochimie. Ed : *Mc Graw-Hill-Paris*, 65-66.
- Regnault J., 1988. Immunologie générale ed ; *Vigot- Paris*, 248-253.
- Seitz J., Wilhelm B. et Meinhardt A. 1996. Transglutaminase purification and activity assay. *J. Chromatogr* **684**, 163-177.

- Schroedder W. T., Thacher S. M., Stewart-Galetka S., Annarella M., Chema D., Siciliano M. J., Davies P. J., Tang H. Y., Sowa B.A. et Duvic M. 1992. Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *Nat Med* **3**, 27-34.
- Schuppan D., Dieterich W. et Riecken E.O. 1998. Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nat Med* **4**, 666-667.
- Shan L., Molberg Q., Parrot I., Hausch F., Gray G. M., solid L. M. et Khoslsa C. 2002. Structure basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Sci* **297**, 2275-2279.
- Shi Q., Kim S.Y., Blass J.P. et Cooper A.J.I. 2002. Expression in *Escherichia coli* and purification of hexahistidine-tagued human tissue transglutaminase, *Protein Expr.purif* **24**, 366-373.
- Shridas P., Sharma Y. et Balasubramanian D.2001. Transglutaminase-mediated cross-linking of alpha-crystallin: structural and functional consequences. *FEBS Lett* **499**, 245-250.
- Steinert P. M., Kim S. Y., Chung S. I. et Marekov L. N. (1996) The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* **271**, 26242-26248.
- Sollid L.M., Markussen G., Ek J., Gjerde H., Vartdal F. et Thorsby E. 1989. Evidence for a primary association of coeliac disease to a particular HLA DQ alpha/β heterodimer. *J. Exp Med* **169**, 345-350.
- Sollid L.M., Thorsby E. 1993. HLA susceptibility genes in coeliac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterol* **105**,910-914.
- Weeber K. et Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. **286**, 25417-25421.
- Weiss S., Metzner H. J. et Hilgenfeld R. 1998. Two non-proline cis peptide bonds may be important for factor XIII function. *J Biol Chem* **423**, 291-269.
- Wiliming M., Iffland A., Tafelmeyer P. Arrivoli C., Saudan C. et Johnsson K. 2002. Examining reactivity and specificity of cytochrome c peroxidase by using combinatorial mutagenesis. *Chem Biochem* **3**, 1097-1104.
- Wilhelm C., Keppler C., R Geyer. et Seitz. 1995. Blood Coagulation and fibrinolysis 6 344 *J Biol chem* **12**,401-415.
- Yee V.C., Pedersen L.C., Le Trong I., Bishop, P. D., Stenkamp R.E. and Teller D. C. 1994. Threed-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc Natl Acad. f Sci USA* **19**, 7296 -7300.
- Yokoyam K I., Kikuchi Y. et Yasueda H. 1998. Over production of Dnaj in *Escherichia coli* improves in vivo solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 1205-1210.

## Annexe 1

### Appareillage

Homogénéiseur (SANA CLAV)  
 Ultracentrifugeuse Beckman (LS 50 )  
 Spectrophotomètre (Biophotometer.)  
 Centrifugeuse réfrigérée (Sigma)  
 Générateur (Biométrat)  
 Collecteur de fractions (Retriever 500)  
 Lecteur de microplaques ELISA(BIO.RADiMark)  
 Bain marie (Mettler)

### Petit matériel

Cuve d'électrophorèse verticale (Hofer SE 260)  
 Colonnes de chromatographie (Pharmacia/45 cm-1.5 cm et 35-1cm)  
 Pompe péristaltique(Ismatec ecoline)  
 Appareil à gradient (GM -1)  
 Microplaques à 96 puits (greiner bio one)  
 Tubes d'ultrafiltration (Millipore)  
 Plaques de verre (10 cm/10cm)

## Annexe 2

### 1. Réactifs d'extraction de la transglutaminase tissulaire

- Sucrose (0,25M).....85,57g/100ml
- PMSF (4mM)..... 8,7g/10ml d'éthanol absolu

### 2. Réactifs de Bradford

- Bleu de Coomassie G250 (0,01%).....100 mg
- Ethanol à 4,5%..... 50 ml
- Acide phosphorique à 95%.....100 ml
- Eau distillée..... 500 ml

Le bleu Coomassie est dissous dans l'éthanol sous agitation après addition de l'acide phosphorique, le volume est ajusté à un litre d'eau distillée.

La solution est filtrée conservée dans un flacon brun pendant un mois.

- BSA 0,1%.....0,1g /100ml H<sub>2</sub>O
- Na Cl 9‰ .....0,9g/1000ml H<sub>2</sub>O

**2. Réactifs de chromatographie échangeuse d'ions**

- DEAE-Microcristalline
- DEAE-52
- Tampon de lavage (TpA)
  - Tris HCl pH 7.5 ..... 5mM
  - EDTA.....2mM
- Tampon B(Tp B)
  - Tris HCl.....5mM
  - EDTA..... 2mM
  - NaCl..... 1M
- Tampon de gradient
  - Tampon A.....150ml
  - Tampon B.....350ml

**Annexe 3****Electrophorèse SDS/PAGE****1. Solutions pour gel d'électrophorèse****1.1 - Solution d'acrylamide : 30% acrylamide, 0,8% bis acrylamide**

- Acrylamide.....29,2g
- Méthylène bis-acrylamide.....0,8g
- Eau distillée.....100ml

**1.2- Tampon pour gel de séparation**

- Tris HCl pH 8,8..... 1,5M
- SDS.....0,4%

**1.3- Tampon pour gel de concentration**

- Tris HCl pH 6,8..... 0,5M
- SDS..... 10%

**1.4-Tampon de migration (Running buffer)**

- Tris HCl.....0,25M

- Glycine..... 0,192 M
- SDS..... ..0,5%

**1.5- Tampon de charge**

- Tris HCl (0,5M, pH 6,8)..... 1ml
- SDS 10%..... 2ml
- Glycérol..... 0,8 ml
- Bleu de bromophénol..... 0,4ml
- $\beta$  mercaptoéthanol..... 0,4ml
- Eau distillée..... ..3,4ml
- Volume final ..... 8ml

**1.6- Solution de coloration**

- Méthanol..... ..40%
- Acide Acétique glacial..... 10%
- Bleu de Coomassie..... 0,15%
- Eau distillée..... ..50%

**1.7- Solution de décoloration**

- Méthanol..... ..40%
- Acide acétique glacial..... 10%
- Eau distillée..... ..50%

**1.8- Solution de séchage du gel**

- Ethanol..... ..30%
- Acide Acétique glacial..... 10%
- Glycérol..... ..3%
- Eau distillée..... ..37%

**2. Gel d'électrophorèse à 12% (quantité suffisante pour 2 mini gels)**

**2.1-Gel de résolution (separating gel)**

- Solution d'acrylamide..... 6,25ml
- Tampon de séparation..... 3,75ml
- Eau distillée..... 4,95ml
- Persulfate d'ammonium..... 10%
- TEMED 30 $\mu$ l

**2.2-Gel de Concentration (stacking gel)**

• Solution d'acrylamide.....	0,8ml
• Tampon (Tris-HCl pH 8,8).....	3,93ml
• Eau distillée.....	3,93ml
• persulfate d'ammonium.....	60µl
• TEMED.....	12µl

### 2.3- protéines standards

• Phosphorylase B.....	100,886
• Serum albumin bovin.....	97,320
• Ovalbumine.....	54,033
• Anyhdrase carbonique.....	37,554
• trypsine.....	29,228
• Lysozyme.....	20,011

## Annexe 4

### Réactifs pour dosage immunoenzymatique « ELISA »

#### 1-tampon pour coating

• Tris HCl pH=7,5.....	5 m mol/l
• CaCl <sub>2</sub> .....	5mM

#### 2- Solution de saturation

• BSA (0,2%).....	0,02g
• Tampon TET.....	10ml

#### 3- Tampon de lavage (TET)

• Tris HCl.....	50m mol/l
• EDTA.....	10m mol/l
• Tween 20.....	20 ml/l

#### 4- Tampon citraté pH 4

• Acide citrique.....	13g
• NaOH (1N).....	125ml
• Eau distillée qsp.....	500ml

#### 5- solutions de révélation

• ABTS.....	0,01g
• H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%).....	100µl
• Tampon citraté.....	10ml

**Annexe 5 Tableau .I :** Détermination des concentrations protéiques des fractions de tTG purifiée par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-52.

Tube	DO(280nm)	NaCl (M)	Tube	DO(280nm)	NaCl (M)
1	0	0	46	0,003	0,33
2	0,022	0	47	0	0,34
3	0,258	0	48	0,005	0,35
4	0,184	0	49	0	0,36
5	0,013	0	50	0	0,37
6	0,004	0	51	0	0,38
7	0,014	0	52	0,002	0,39
8	0,016	0	53	0	0,4
9	0,017	0	54	0	0,41
10	0,001	0	55	0	0,42
11	0	0	56	0	0,43
12	0	0	57	0,006	0,44
13	0	0	58	0	0,45
14	0,001	0,01	59	0,001	0,46
15	0,005	0,02	60	0,01	0,47
16	0,011	0,03	61	0,003	0,48
17	0	0,04	62	0,005	0,49
18	0	0,05	63	0	0,5
19	0	0,06	64	0,005	0,51
20	0	0,07	65	0,004	0,52
21	0,011	0,08	66	0,002	0,53
22	0	0,09	67	0	0,54
23	0	0,1	68	0,012	0,55
24	0,009	0,11	69	0,028	0,56
25	0	0,12	70	0,02	0,57
26	0,008	0,13	71	0,37	0,58
27	0	0,14	72	0,32	0,59
28	0,014	0,15	73	0,003	0,6
29	0,008	0,16	74	0,003	0,61
30	0,014	0,17	75	0,001	0,62
31	0	0,18	76	0,006	0,63
32	0,017	0,19	77	0	0,64
33	0,024	0,2	78	0,001	0,65
34	0,034	0,21	79	0,005	0,66
35	0,107	0,22	80	0,007	0,67
36	0	0,23	81	0,001	0,68
37	0	0,24	82	0,011	0,69
38	0	0,25	83	0,001	0,7
39	0	0,26	84	0,007	0,71
40	0	0,27	85	0,006	0,72
41	0	0,28	86	0,006	0,73
42	0	0,29	87	0,003	0,74
43	0	0,3	88	0,006	0,75
44	0,003	0,31	89	0,009	0,76
45	0,004	0,32	90	0,008	0,77

Tube	DO (280nm)	NaCl (M)
91	0,007	0,78
92	0,004	0,79
93	0	0,8
94	0,002	0,81
95	0,001	0,82
96	0,001	0,83
97	0,002	0,84
98	0,003	0,85
99	0,002	0,86
100	0,002	0,87
101	0,003	0,88
102	0,002	0,89
103	0,002	0,9
104	0,003	0,91
105	0,003	0,92
106	0,004	0,93
107	0,011	0,94
108	0,012	0,95
109	0,017	0,96
110	0,013	0,97
111	0,014	0,98
112	0	0,99
113	0	1
114	0,009	1,01
115	0	1,02
116	0	1,03
117	0	1,04
118	0	1,05
119	0	1,06
120	0	1,07
121	0	1,08
122	0	1,09
123	0	1,1
124	0	1,11
125	0	1,12
126	0	1,13
127	0	1,14
128	0	1,15
129	0	1,16
130	0	1,17
131	0	1,18
132	0	1,19
133	0	1,2
134	0	1,21
135	0	1,22

Tube	DO (280nm)	NaCl (M)
136	0	1,23
137	0	1,24
138	0	1,25
139	0	1,26
140	0,04	1,27
141	0,077	1,28
142	0	1,29
143	0,033	1,3
144	0,284	1,31
145	0,12	1,32
146	0,017	1,33
147	0,74	1,34
148	0	1,35
149	0	1,36
150	0	1,37
151	0,07	1,38
152	0	1,39
153	0	1,4
154	0	1,41
155	0	1,42
156	0,059	1,43
157	0,039	1,44
158	0,147	1,45
159	0,046	1,46
160	0,034	1,47
161	0,032	1,48
162	0,036	1,49
163	0,03	1,5
164	0,022	1,51
165	0,014	1,52
166	0	1,53
167	0	1,54
168	0	1,55
169	0	1,56
170	0,026	1,57
171	0,029	1,58
172	0,026	1,59
173	0,033	1,6
174	0,018	1,61
175	0,018	1,62
176	0,022	1,63
177	0,016	1,64
178	0,014	1,65
179	0,014	1,66
180	0,014	1,67

**Tableau. II** Détermination des concentrations protéiques des fractions de tTG purifiée par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-microcristalline

Tube	DO	NaCl(M)	Tube	DO	NaCl M	Tube	DO	NaCl(M)
1	0	0	45	0	0	89	0	0,37
2	0	0	46	0	0	90	0	0,38
3	0	0	47	0	0	91	0	0,39
4	2,8	0	48	0	0	92	0	0,4
5	2,135	0	49	0	0	93	0	0,41
6	1,007	0	50	0	0	94	0	0,42
7	0,339	0	51	0	0	95	0	0,43
8	0,064	0	52	0	0	96	0	0,44
9	0,002	0	53	0	0,01	97	0	0,45
10	0,002	0	54	0	0,02	98	0	0,46
11	0,001	0	55	0	0,03	99	0	0,47
12	0	0	56	0	0,04	100	0	0,48
13	0	0	57	0	0,05	101	0	0,49
14	0	0	58	0	0,06	102	0	0,5
15	0	0	59	0	0,07	103	0	0,51
16	0	0	60	0	0,08	104	0	0,52
17	0	0	61	0	0,09	105	0	0,53
18	0	0	62	0	0,1	106	0	0,54
19	0	0	63	<b>0,016</b>	0,11	107	0	0,55
20	0	0	64	0	0,12	108	0	0,56
21	0	0	65	0	0,13	109	0	0,57
22	0	0	66	0	0,14	110	0	0,58
23	0	0	67	0	0,15	111	0	0,59
24	0	0	68	0	0,16	112	0	0,6
25	0	0	69	0	0,17	113	0	0,61
26	0	0	70	0	0,18	114	0	0,62
27	0	0	71	0	0,19	115	0	0,63
28	0	0	72	0	0,2	116	0	0,64
29	0	0	73	0	0,21	117	0	0,65
30	0	0	74	0	0,22	118	0	0,66
31	0	0	75	0	0,23	119	0	0,67
32	0	0	76	0	0,24	120	0	0,68
33	0	0	77	0	0,25	121	0	0,69
34	0	0	78	<b>0,080</b>	0,26	122	0	0,7
35	0	0	79	0	0,27	123	0	0,71
36	0	0	80	0	0,28	124	0	0,72
37	0	0	81	0	0,29	125	0	0,73
38	0	0	82	0	0,3	126	0	0,74
39	0	0	83	0	0,31	127	0	0,75
40	0	0	84	0	0,32	128	0	0,76
41	0	0	85	0	0,33	129	0	0,77
42	0	0	86	0	0,34	130	0	0,78
43	0	0	87	0	0,35			
44	0	0	88	0	0,36			

**Tableau .III** Détermination des concentrations protéiques des fractions de tTG purifiée par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-microcristalline

Tube	DO	NaCl(M)
1	0	0
2	0,008	0
3	0,026	0
4	0,136	0
5	0,026	0
6	0,013	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	0	0
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
31	0	0
32	0	0
33	0	0
34	0	0
35	0	0,01
36	0	0,02
37	0	0,03
38	0	0,04
39	0	0,05
40	0	0,06
41	0	0,07
42	0	0,08
43	0	0,09

Tube	DO	NaCl(M)
44	0	0,11
45	0	0,12
46	0	0,13
47	0	0,14
48	0	0,15
49	0	0,16
50	0	0,17
51	0	0,18
52	0	0,19
53	0	0,2
54	0	0,21
55	0	0,22
56	0	0,23
57	0	0,24
58	0	0,25
59	0	0,26
60	0	0,27
61	0	0,28
62	0	0,29
63	0	0,3
64	0	0,31
65	0	0,32
66	0	0,33
67	0	0,34
68	0	0,35
69	0	0,36
70	0	0,37
71	0	0,38
72	0	0,39
73	0	0,4
74	0	0,41
75	0	0,42
76	0	0,43
77	0	0,44
78	0	0,45
79	0	0,46
80	0	0,47
81	0	0,48
82	0	0,49
83	0	0,5
84	0	0,51
85	0	0,52
86	0	0,53

Tube	DO	NaCl(M)
87	0	0,55
88	0	0,56
89	0	0,57
90	0	0,58
91	0	0,59
92	0,08	0,6
93	0	0,61
94	0	0,62
95	0	0,63
96	0	0,64
97	0	0,65
98	0	0,66
99	0,01	0,67
100	0	0,68
101	0	0,69
102	0	0,7
103	0	0,71
104	0	0,72
105	0	0,73
106	0	0,74
107	0	0,75
108	0	0,76
109	0	0,77
110	0	0,78
111	0	0,79
112	0	0,8
113	0	0,81
114	0	0,82
115	0	0,83
116	0	0,84
117	0	0,85
118	0	0,86
119	0	0,87
120	0	0,88
121	0	0,89
122	0	0,9
123	0	0,91
124	0	0,92
125	0	0,93
126	0	0,94
127	0	0,95
128	0	0,96

Tableau. IV DO des fractions de tTG purifiée par chromatographie échangeuse d'anions

Tube	DO (280nm)	NaCl (M)	tube	DO(280nm)	NaCl (M)
1	0,026	0	47	0	0,31
2	0,026	0	48	0	0,32
3	0,026	0	49	0	0,33
4	0,026	0	50	0	0,34
5	0,062	0	51	0	0,35
6	0,088	0	52	0	0,36
7	0,13	0	53	0	0,37
8	0,28	0	54	0	0,38
9	0,0013	0	55	0	0,39
10	0,033	0	56	0	0,4
11	0,027	0	57	0	0,41
12	0,027	0	58	0	0,42
13	0,0027	0	59	0	0,43
14	0	0	60	0	0,44
15	0	0	61	0	0,45
16	0	0,01	62	0	0,46
17	0	0,02	63	0	0,47
18	0	0,03	64	0	0,48
19	0	0,04	65	0	0,49
20	0	0,05	65	0	0,5
21	0	0,06	66	0	0,51
23	0	0,07	67	0	0,52
24	0	0,08	68	0	0,53
25	0	0,09	69	0	0,54
26	0	0,1	70	0	0,55
27	0	0,11	71	0	0,56
28	0	0,12	72	0	0,57
29	0,29	0,13	73	0	0,58
30	2,3	0,14	74	0	0,59
31	0,5162	0,15	75	0	0,6
32	0,517	0,16	76	0	0,61
33	0,02	0,17	77	0	0,62
34	0	0,18	78	0	0,63
35	0	0,19	79	0	0,64
36	0	0,2	80	0	0,65
37	0	0,21	81	0	0,66
38	0,185	0,22	82	0	0,67
39	0,074	0,23	83	0	0,68
40	0,021	0,24	84	0	0,69
41	0	0,25	85	0	0,7
42	0	0,26	86	0	0,71
43	0	0,27	87	0	0,72
44	0	0,28	88	0	0,73
45	0	0,29	89	0	0,74
46	0	0,3	90	0	0,75

Tableau V. PM des protéines standards

RF	Log(PM)	PM
0,08333333	2,004	100,886
0,14583333	1,988	97,32
0,29166667	1,732	54,01
0,47916667	1,575	37,554
0,58333333	1,466	29,228
0,72916667	1,301	20,011

Tableau VI. PM de la transglutaminase tissulaire

		RF		PM
Log P1	1,9212064	0,8	0,16666667	83,3681185

Figure. 23 Courbe étalon des poids moléculaires des protéines standards

