

RÉALISATION D'UN CAPTEUR THERMIQUE DE HAUTE SENSIBILITÉ. APPLICATION À L'ÉTUDE DU COMPORTEMENT THERMIQUE DES SOLUTIONS DE LYSOZYME ET D'HORMONE HUMAINE DE CROISSANCE BIOSYNTHÉTIQUE

P. CLAUDY et J.M. LETOFFE

Laboratoire de Thermochimie Minérale, U.R.A. 116, I.N.S.A., 20 avenue A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex (France)

A. BAYOL et M.C. BONNET

Sanofi Elf Bio Recherches, Centre de Labège, B.P. 197, 31328 Labège Cedex (France)
(Reçu le 9 mai 1990)

ABSTRACT

A new "home-made" sensor has been developed, using a Mettler TA 2000 B apparatus. A sensitivity of 0.2 μW was obtained. The thermal behaviour of aqueous solutions of proteins was studied. The endothermic enthalpy of transition of lysozyme has been found to be $\Delta H = +433 \pm 20 \text{ kJ mol}^{-1}$.

A study of reversibility versus thermal history of the samples has been carried out. Solutions of biosynthetic human hormone H.G.H. at a concentration of 5.6 mg ml^{-1} have been studied. The enthalpy of transition has been determined as $\Delta H = +181.5 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$.

The total irreversibility of the phenomenon has been established. No exothermal effect was observed even if a low concentration of 1 mg ml^{-1} was used.

RÉSUMÉ

Un nouveau capteur de haute sensibilité (0,2 μW) a été développé en utilisant un ensemble Mettler TA 2000 B. Le comportement thermique des solutions aqueuses de protéines a été étudié. L'enthalpie de transition du lysozyme a été déterminée: $\Delta H = +433 \pm 20 \text{ kJ mol}^{-1}$.

L'étude de la réversibilité a été conduite en fonction de l'histoire thermique de la solution. L'enthalpie de transition de l'hormone de croissance humaine biosynthétique H.G.H. a été mesurée sur des solutions de concentration 5,6 mg ml^{-1} : $\Delta H = +181.5 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$

Cette transition est totalement irréversible. Aucun effet exothermique n'est observé même si une faible concentration de 1 mg ml^{-1} est utilisée.

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, l'étude des solutions de molécules biologiques a fait l'objet de nombreux travaux utilisant l'analyse calorimétrique

différentielle. Cette technique permet la détermination de la température, de l'enthalpie et de la variation de capacité calorifique accompagnant les changements de conformation des protéines en solution [1,2]. Un certain nombre d'appareillages spécifiques ont été développés par différents expérimentateurs et constructeurs: microcalorimètre DASM1-4 de Privalov (URSS) [3]; biocalorimètre de Setaram (France); microcalorimètre MCI-2 de Microcal et Hart 7707 du N.B.S. (USA).

Les volumes d'échantillons sont de l'ordre de 1 ml pour des vitesses de chauffe n'excédant pas $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$. La gamme de température utilisable varie de 0°C à 100°C , le système de refroidissement limitant vitesse et température inférieure d'étude, la nature des capteurs, la température maximale.

L'utilisation d'appareillages commerciaux polyvalents de type micro-A.C.D. à compensation (Perkin-Elmer) ou à flux de chaleur (Du Pont, Mettler, Setaram) est le plus souvent impropre pour ces études. Les solutions sont de faible concentration en raison soit d'une mauvaise solubilité, soit de la difficulté d'obtenir des quantités importantes de la protéine à étudier. Les creusets expérimentaux étant de volume réduit (quelques dizaines de μl) une vitesse de chauffe importante $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ à $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ est nécessaire pour l'obtention d'un signal calorimétrique exploitable. Des modifications ont d'ailleurs été effectuées concernant la taille des échantillons et le rapport signal-bruit à basse température (cas du DSC1B et DSC2B Perkin-Elmer) [4].

Il était intéressant de combiner les avantages des deux familles d'appareillages, c'est-à-dire:

- (i) Utiliser l'environnement d'un appareillage performant de micro A.C.D. (four, régulation, programmation, acquisition de données). En particulier des vitesses de refroidissements rapides: $30^{\circ}\text{C min}^{-1}$ à $100^{\circ}\text{C min}^{-1}$ permettent de multiplier le nombre des essais ou de tremper le système.
- (ii) Remplacer le capteur d'origine (sensibilité $7\text{--}15\ \mu\text{W}$ suivant le fabricant) par un capteur spécifique de haute sensibilité (objectif $0.5\ \mu\text{W}$) développé pour l'étude des solutions de molécules biologiques et qui permettra l'utilisation de vitesses de chauffe peu élevées ($1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ou moins) et de faibles concentrations (inférieures à $10\ \text{mg ml}^{-1}$).
- (iii) réduire le volume d'échantillon à $100\ \mu\text{l}$ afin de limiter la masse de protéine consommée à chaque essai. Ce point est particulièrement important pour des molécules difficiles d'obtention.

ÉLABORATION DU CAPTEUR. TRAITEMENT DU SIGNAL

L'appareillage d'A.C.D. utilisé est un Mettler TA 2000 B pouvant fonctionner de -170°C à $+550^{\circ}\text{C}$. Compte-tenu des dimensions du four en argent (diamètre 22 mm, hauteur 26 mm), le capteur a été développé à

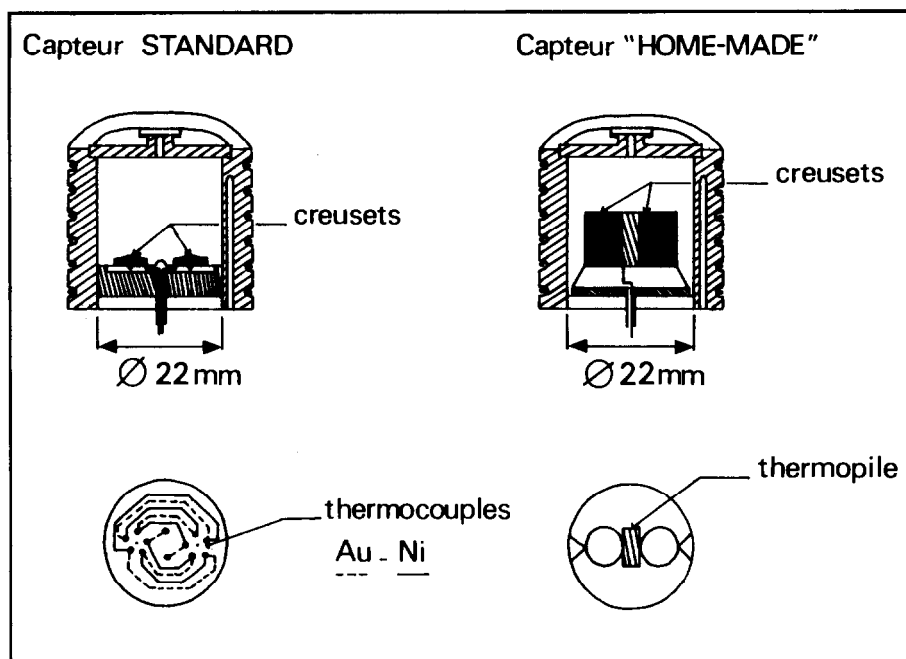


Fig. 1. Capteur standard et capteur "home-made".

partir de deux thermopiles de $6,6 \times 6,6$ mm et de 2,4 mm d'épaisseur comportant chacune 31 thermocouples Melcor PINFCO 4531-05) et soudées face à face. La nature des thermocouples limite le domaine de température utilisable à 110°C . Sur les deux autres faces sont soudés deux supports cylindriques en cuivre de faible épaisseur recevant les creusets référence et produit. Ces derniers de $120 \mu\text{l}$ de volume sont en acier Cr-Ni. Ils sont étanches jusqu'à 10^6 Pa de pression interne et sont commercialisés par Mettler. L'ensemble est maintenu sur un support en cuivre par les fils provenant des thermopiles montées en opposition. Le capteur obtenu est représenté dans la Fig. 1. Sa réalisation a été conduite de façon à obtenir une symétrie la plus parfaite possible compte-tenu des objectifs visés.

Le signal calorimétrique obtenu est envoyé sur un voltmètre Keithley 189 puis stocké sur disquette. Un ordinateur (Inetech 286 AT) contrôle et exécute chaque expérience (T départ et finale, vitesse de chauffe et de refroidissement). Chaque expérience est traitée "off line" par des programmes spécifiques mis au point au laboratoire.

CALIBRAGE. PERFORMANCES

Matériaux

En raison de la taille du capteur et des creusets, un étalonnage par effet Joule est délicat à réaliser. Aussi avons-nous utilisé des matériaux très purs

dont la fusion se situe dans le domaine de température exploitable -150°C à $+100^{\circ}\text{C}$. Pour cela les matériaux ou composés suivants ont été retenus.

Toluène: Aldrich HPLC 99,9%.

Mercure: Aldrich ACS reagent 99,9995%.

Eau distillée.

Gallium: Aldrich 99,9999%.

Hexacosane: Aldrich 99%.

Tétratétracontane: Fluka 99%.

Hexacontane: Fluka 99%.

Calibrage en température. Influence de la vitesse de chauffe

Le gaz de balayage utilisé est de l'argon en raison de sa masse volumique élevée et de sa mauvaise conductibilité thermique.

Des essais ont été conduits avec le toluène et le gallium à des vitesses de chauffe variant de $0,1-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ afin de déterminer l'écart de température entre la température du four et celle de l'échantillon. Avec le capteur standard, cet écart est égal à la moitié de la vitesse de chauffe utilisée. Les valeurs obtenues avec le nouveau capteur sont données dans le Tableau 1.

L'évolution $T_p - T_e$ en fonction de dT/dt est représentée dans la Fig. 2. Pour des vitesses supérieures ou égales à $0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$: $T_e = T_p - \frac{3}{2} dT/dt$. Cette relation sera utilisée durant le reste de l'étude.

Calibrage enthalpique

Pour ces essais tous les étalons sont utilisés (vitesse: $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$), les masses d'échantillon étant calculées de façon à ce que l'enthalpie mesurée n'excède pas 100 mJ, exception faite du toluène où de faibles masses ne cristallisent plus dans nos conditions expérimentales. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 2. L'évolution de la sensibilité $K = \Delta H/S$ (ΔH

TABLEAU 1

Ecart entre température du four T_p et température de l'échantillon T_e en fonction de la vitesse de chauffe

Vitesse de chauffe dT/dt ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Gallium			Toluène		
	$T_{\text{fusion}} (^{\circ}\text{C})$		$T_p - T_e$ ($^{\circ}\text{C}$)	$T_{\text{fusion}} (^{\circ}\text{C})$		$T_p - T_e$ ($^{\circ}\text{C}$)
	Réelle	Obtenue		Réelle	Obtenue	
0,2	29,8	29,9	0,1	-95,0	-94,0	1,0
0,5	29,8	30,15	0,35	-95,0	-94,6	0,4
0,7	29,8	30,50	0,70	-95,0	-94,4	0,6
1	29,8	31,10	1,3	-95,0	-93,6	1,4
1,5	29,8	32,0	2,2	-95,0	-92,6	2,4
2	29,8	32,75	2,95	-95,0	-91,8	3,2

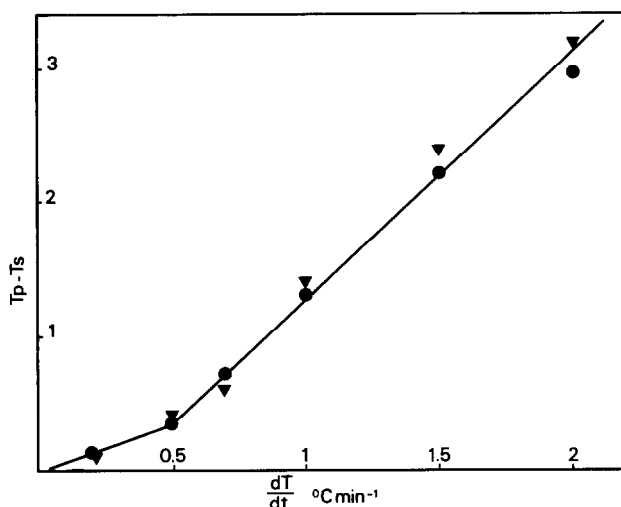


Fig. 2. Ecart entre température programmée T_p et température de l'échantillon T_s en fonction de la vitesse de chauffe.

TABLEAU 2

Calibrage enthalpique du capteur

Etalon	Masse (10^{-3} g)	$T_{\text{fusion}} (^{\circ}\text{C})$		ΔH (mJ)	K (mW V^{-1})
		Réelle	Obtendue		
Toluène	2,91	-95,0	-95,4	209,5	0,301
Hg	5,87	-38,8	-38,6	68,1	0,231
H ₂ O	0,162	0	-0,4	54,1	0,240
Gallium	0,400	29,8	29,7	32,1	0,219
Hexacosane	0,096	56,2	56,5	23,3	0,182
Tétratétracontane	0,068	86,1	86,2	14,6	0,150
Hexacosane	0,103	100,5	100,8	21,9	0,160

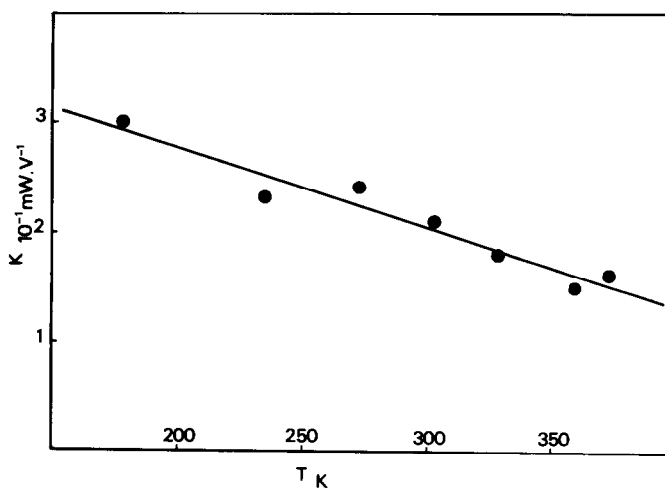


Fig. 3. Variation de la sensibilité calorimétrique en fonction de la température.

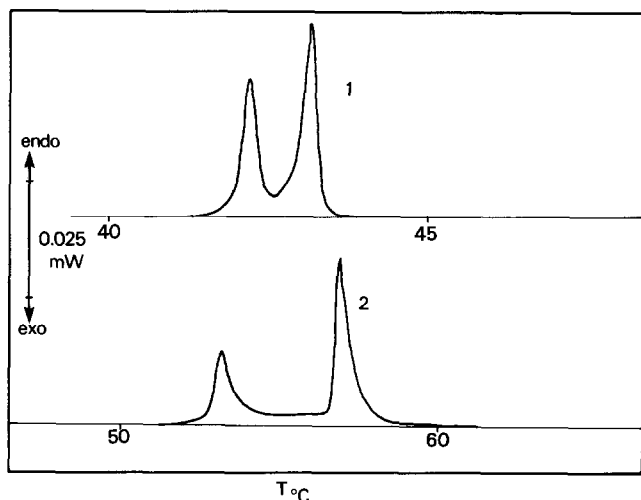


Fig. 4. Courbe A.C.D de: 1, le docosane $C_{22}H_{46}$ ($m = 0,026$ mg), $dT/dt = 0,2^{\circ}C\ mn^{-1}$; 2, l'hexacosane $C_{26}H_{54}$ ($m = 0,014$ mg), $dT/dt = 1^{\circ}C\ mn^{-1}$.

en mJ, S en V s) est représentée dans la Fig. 3. Une représentation linéaire a été adoptée (avec K en $mW\ V^{-1}$ et T en K). $K = -7,227 \times 10^{-4} T + 4,217 \times 10^{-1}$.

La répétabilité sur les températures mesurées est de $\pm 0.3^{\circ}C$ et de 3% sur les enthalpies.

Performances

Afin de s'assurer de la limite de détection du système, des masses de plus en plus faibles ont été utilisées de façon à obtenir des effets thermiques de quelques millijoules. Nous avons représenté dans la Fig. 4 la courbe obtenu avec 0,014 mg (courbe 2) d'hexacosane. L'effet thermique global, transition solide-solide + fusion, est de 3,4 mJ. L'amplitude du signal atteint 40 μW au maximum du pic de fusion. Le bruit de fond dans ce type d'essai est de l'ordre de 0,1 μW . L'utilisation d'un tel capteur rend possible la séparation de pics très proches en température ($0,35^{\circ}C$ entre la transition et la fusion du docosane) par la conjugaison de faible masse (0,026 mg) et d'une vitesse de chauffe réduite à $0,2^{\circ}C\ min^{-1}$ (courbe 1).

Tous les essais ont été réalisés jusqu'alors sous atmosphère d'argon. Dans des travaux précédents [5], nous avons montré l'importance de la nature du gaz de balayage sur la sensibilité calorimétrique. Dans le cas où un gaz d'une bonne conductibilité thermique est utilisé (l'hydrogène par exemple) la sensibilité du capteur est divisée par 2.

Nous pouvons donc résumer les caractéristiques et performances de l'ensemble microcalorimétrique comme suit:
gaz de balayage argon (débit quelques $1\ h^{-1}$)

creusets en acier Cr-Ni de 120 μl préalablement étuvés à 200°C, pouvant supporter 10^6 Pa de pression interne
 domaine de température exploitable -150°C à +110°C
 vitesse de chauffe jusqu'à 2°C min⁻¹
 vitesse de refroidissement jusqu'à 30°C min⁻¹
 sensibilité 0,3 μW , répétabilité en température $\pm 0,3^\circ\text{C}$, en enthalpie 3%.

APPLICATIONS AUX PROTÉINES EN SOLUTION

Lysozyme

Comportement thermique

Le lysozyme constitue l'exemple type de molécule sphérique. Il a fait l'objet d'études, en particulier en fonction du pH [6]. Nous avons réexaminé la transition observable au cours du chauffage (1°C min⁻¹) et en particulier la réversibilité de cette transformation, ce qui n'avait jusqu'alors jamais été abordé.

Deux lots de lysozyme ont été utilisés: lysozyme chlorure, lot A 7317 de Brookside; et lysozyme 3 fois cristallisé, lot J4F 8155 de Sygma.

Le même comportement thermique a été observé pour les échantillons des deux lots, les solutions étant à une concentration pondérale de 2% en accord avec les résultats antérieurs [6] un effet endothermique débute à 63°C, maximum à 78°C. Sur 4 essais distincts, l'enthalpie trouvée s'établit à 433 ± 20 kJ mol⁻¹ ($M = 14450$).

Réversibilité de la transition

Nous avons représenté dans la Fig. 5 les courbes A.C.D. obtenues au cours des cycles successifs de température effectués comme suit: montée à

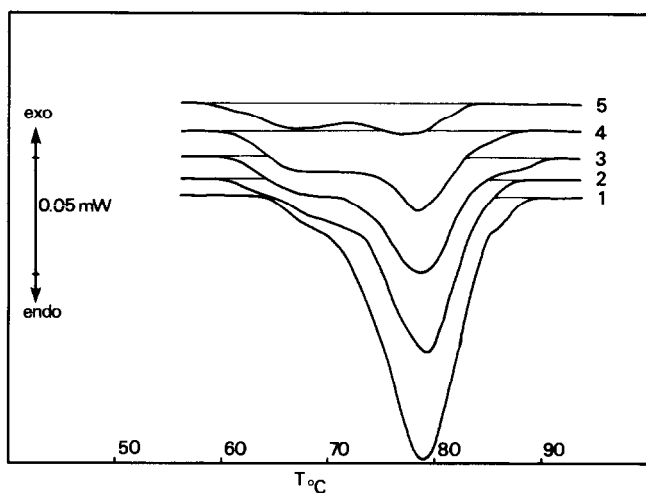


Fig. 5. Courbe A.C.D. de la transition du lysozyme au cours des cycles thermiques successifs.

TABLEAU 3

Enthalpie de transition du lysozyme en fonction des cycles thermiques successifs

Cycle	Essai 1 ΔH (kJ mol ⁻¹)	Essai 2 ΔH (kJ mol ⁻¹)
1	423	418
2	334	301
3	261	246
4	198	188
5	145	-
6	132	-

1°C min⁻¹ de 25–100°C, descente à 10°C min⁻¹ jusqu'à 25°C, puis montée suivante jusqu'à 100°C à 1°C min⁻¹ et ainsi de suite. Une nette évolution de l'effet thermique de la transition est mise en évidence. L'enthalpie diminue jusqu'à une valeur limite: 150 ± 20 kJ mol⁻¹ atteinte après 5 à 6 cycles thermiques et un dédoublement du pic initial apparaît. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 3 pour deux essais distincts. Si au lieu d'effectuer un refroidissement à 10°C min⁻¹, une vitesse plus lente est utilisée: 1°C min⁻¹ l'état final est atteint dès la deuxième montée de température.

Laissée plusieurs jours à température ambiante, la solution n'évolue pas et le retour à l'état initial n'est jamais observé. Il y a donc évolution irréversible de la molécule de lysozyme au cours des traitements thermiques.

Etude isotherme

Lors des essais précédents, la température finale atteinte était de 100°C, soit 20°C au-dessus de la température du maximum de l'effet thermique de transition. Afin de s'assurer de l'importance de la température finale atteinte, une autre série d'essais a été réalisée en maintenant l'échantillon à température constante durant des temps variables. Trois températures ont été retenues: 70, 75 et 80°C pour des durées allant de 0–4 h. Les valeurs de l'enthalpie de transition mesurées sont rassemblées dans le Tableau 4.

TABLEAU 4

Enthalpie de transition du lysozyme en fonction du traitement thermique de l'échantillon

<i>t</i> (h)	70°C ΔH (kJ mol ⁻¹)	75°C ΔH (kJ mol ⁻¹)	80°C ΔH (kJ mol ⁻¹)
0	416	418	425
1	421	396	293
2	464	406	183
3	-	-	148
4	449	390	-

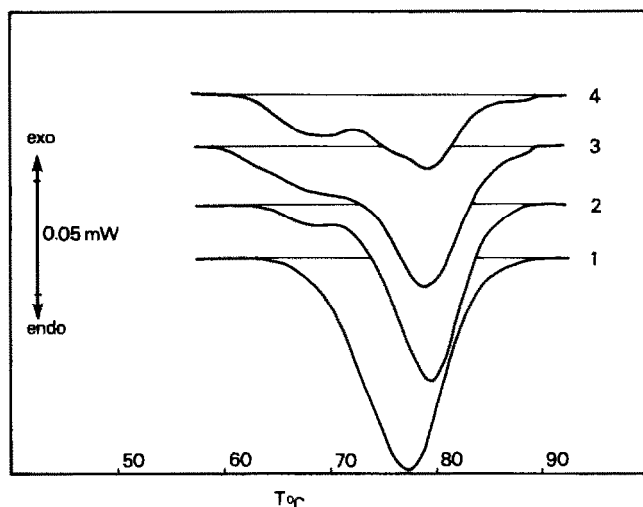


Fig. 6. Courbe A.C.D. de la transition du lysozyme suivant le traitement thermique ($T = 80^{\circ}\text{C}$): 1, initial $t = 0$; 2, initial $t = 1$ h; 3, initial $t = 2$ h; 4, initial $t = 3$ h.

A 70°C , la transition ne subit pas de modification. Il en est de même à 75°C . En revanche à 80°C , la diminution d'enthalpie est nette. L'évolution du pic de transition (Fig. 6) est analogue à celle représentée dans la Fig. 5.

Il apparaît donc clairement que la transition du lysozyme n'est pas constituée d'un seul phénomène (passage d'un état A à un état B) comme il a été considéré jusqu'alors. Elle peut être assimilée à deux transformations distinctes:

(i) l'une réversible si la température finale n'excède pas 75°C , et (ii) l'autre irréversible débute avec une cinétique appréciable au-delà de 75°C .

L'étude de cette transition complexe va être poursuivie par d'autres techniques afin de préciser la nature des évolutions observées.

Hormone de croissance humaine biosynthétique H.G.H.

Le dispositif expérimental ayant montré ses performances et fiabilité, nous nous sommes intéressés à une protéine d'intérêt industriel: l'H.G.H.

La seule étude du comportement thermique d'H.G.H. a été effectuée par A.C.D. par Bewley [7]. Il s'agissait d'hormone naturelle concentrée à 10 mg ml^{-1} , les essais s'effectuant avec une vitesse de chauffe de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (Perkin-Elmer DSC2). La température de transition avait été estimée à 78°C et l'enthalpie de changement de phase associée entre 400 et 800 kJ mol^{-1} , un effet exothermique d'agglomération perturbant la détermination.

Ces travaux ont été repris avec des échantillons d'H.G.H. biosynthétique purifiée et lyophilisée en présence d'alanine. Chaque échantillon fourni par le Centre de Labège contient $1,7\text{ mg}$ d'H.G.H., le solvant de reprise étant de l'eau distillée.

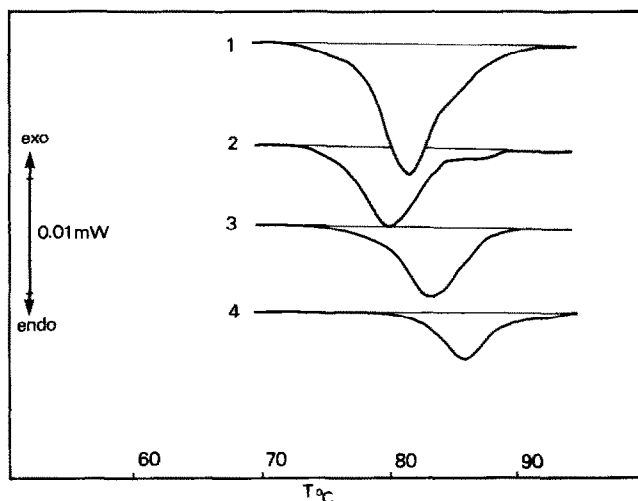


Fig. 7. Courbe A.C.D. de la transition de l'H.G.H. biosynthétique: 1, 5,6 mg ml⁻¹, 1° C min⁻¹; 2, 2,8 mg ml⁻¹, 1° C min⁻¹; 3, 1,7 mg ml⁻¹, 1,5° C min⁻¹; 4, 1,0 mg ml⁻¹, 2° C min⁻¹.

Les essais ont été réalisés en reprenant le lyophilisat avec 0,3 ml d'eau distillée (concentration 5,6 mg ml⁻¹ en H.G.H.). L'échantillon de référence est constitué par de l'eau distillée. La vitesse de chauffe est de 1° C min⁻¹, le creuset contient 95 mg de solution, soit 0,55 mg d'H.G.H. La courbe A.C.D. obtenue est représentée dans la Fig. 7. Seul un effet endothermique apparaît vers 72° C, maximum à 79,8° C où l'amplitude atteint 14 μW. Aucun effet exothermique n'est visible sur le domaine de température étudié (25–100° C). L'effet thermique mesuré est de l'ordre de 4 mJ s'étalant sur 20° C. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 5.

Après retour à la température ambiante, un deuxième essai ne montre plus aucun phénomène thermique significatif. L'effet endothermique initial

TABLEAU 5

Température et enthalpie de transition de l'H.G.H. biosynthétique, $M = 21450$

Essai	Concentration (mg ml ⁻¹)	dT/dt (° C min ⁻¹)	T _{trans} (° C)	ΔH _{trans} (kJ mol ⁻¹)
1	5,6	1	80,4	172,5
2	5,6	1	80,8	174,3
3	5,6	1	80,9	187,4
4	5,6	1	79,8	174,6
5	2,8	1	79,15	184,2
6	1,7	1,5	81,4	193,8
7	5,6	1	80,2	184,1
8	1	2	83,0	(152)

correspond ici à une transformation irréversible. D'autres essais ont été effectués avec une vitesse de chauffe plus rapide: 1,5 et 2 °C min⁻¹, ce qui a permis de diminuer la concentration en H.G.H. jusqu'à 1 mg ml⁻¹; cette valeur constitue pour cette protéine la limite de détection du système microcalorimétrique. L'incertitude sur la mesure enthalpique devient très importante puisque l'effet thermique mesuré est inférieur à 1 mJ.

La présence d'alanine n'induit pas de phénomène parasite, une solution d'alanine à la concentration de reprise du lyophilisat ne présente aucun effet thermique dans le domaine de température 25–100 °C. D'où finalement: $\Delta H_{\text{trans}} = 181,5 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$ avec $T_{\text{trans}} = 80 \pm 1^\circ \text{C}$ (prise au maximum du pic de transition).

CONCLUSION

La mise au point d'un capteur de haute sensibilité a permis d'améliorer les caractéristiques et performances de l'ensemble microcalorimétrique Mettler TA 2000 B. La sensibilité a été mesurée à 0,2 μW au lieu de 7 μW avec le capteur standard. La répétabilité en température et enthalpie reste inchangée $\pm 0,3^\circ \text{C}$ et 3% respectivement. La vitesse de chauffe maximale est de 2 °C min⁻¹, la vitesse de refroidissement peut varier de 0,1 à 30 °C min⁻¹, d'où la possibilité de multiplier les essais ou d'effectuer des trempes thermiques. L'utilisation de creusets de 120 μl (au lieu de 40 μl standard) étanches jusqu'à 10⁶ Pa permet l'étude du comportement thermique des solutions de protéines. L'enthalpie de transition du lysozyme a été trouvée à 433 ± 20 kJ mol⁻¹ et l'étude de la réversibilité a été conduite en fonction des cycles thermiques ainsi que du traitement thermique préalable de l'échantillon. La transition diminue en enthalpie pour atteindre 150 kJ mol⁻¹ et un dédoublement du pic endothermique est mis en évidence. A ce stade, il n'y a plus d'évolution, ni en fonction du temps, ni du traitement thermique. Il y a donc évolution irréversible du lysozyme au cours des différents traitements.

L'étude des solutions d'H.G.H. à une concentration de 5,6 mg ml⁻¹ a permis de déterminer la température et l'enthalpie de transition: $\Delta H = 181,5 \pm 13 \text{ kJ mol}^{-1}$ avec $T = 80,3 \pm 1^\circ \text{C}$ (maximum de l'effet endothermique).

Aucun effet exothermique d'agglomération n'a été observé contrairement à Bewley [7].

La transformation est totalement irréversible, aucun effet thermique n'apparaît au cours d'une deuxième chauffe. L'étude en fonction de la concentration a été effectuée jusqu'à 1 mg ml⁻¹ sans qu'aucun changement ne soit observé.