

Sommaire :

INTRODUCTION GENERALE	-1-
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	-5-
1.1. GENERALITES SUR L'ALLERGIE.....	- 6 -
1.1.1. Définition	- 6 -
1.1.2. Mécanismes.....	- 6 -
1.1.3. Importance des allergies alimentaires. Cas de l'allergie au lait	- 7 -
1.2. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE : GENERALITES	- 9 -
1.2.1. Phénomènes de migration	- 9 -
1.2.1.1 <i>Migration électroosmotique</i>	- 9 -
1.2.1.2 <i>Migration électrophorétique</i>	- 11 -
1.2.2. Principaux modes de séparation électrocinétique	- 12 -
1.2.2.1. <i>Electrophorèse de zone (ECZ)</i>	- 12 -
1.2.2.2. <i>Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)</i>	- 13 -
1.2.2.3. <i>Electrophorèse capillaire en gel (ECG)</i>	- 13 -
1.2.2.4. <i>Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (CEMC)</i>	- 14 -
1.2.2.5. <i>Electrochromatographie capillaire (ECC)</i>	- 15 -
1.2.2.6. <i>Isotachophorèse (ITP)</i>	- 16 -
1.2.3. Limitations en électrophorèse capillaire	- 18 -
1.2.3.1. <i>Effet Joule</i>	- 18 -
1.2.3.2. <i>Adsorption des analytes</i>	- 21 -
1.3. FOCALISATION ISOELECTRIQUE CAPILLAIRE (CIEF).....	- 23 -
1.3.1. Principe	- 24 -
1.3.1.1. <i>Focalisation</i>	- 24 -
1.3.1.2. <i>Mobilisation</i>	- 26 -
1.3.1.3. <i>Détection</i>	- 27 -
1.3.2. Evaluation des performances d'une séparation en CIEF.....	- 28 -
1.3.3. Voies de synthèse et structure des ampholytes porteurs	- 29 -
1.3.4 Facteurs influençant la formation du gradient de pH	- 31 -
1.3.4.1. <i>Phénomène de plateau</i>	- 31 -
1.3.4.2. <i>Dérive cathodique</i>	- 33 -
1.3.4.3. <i>Influence de l'écoulement électroosmotique</i>	- 35 -
1.3.4.4. <i>Compression du gradient de pH</i>	- 36 -
1.3.4.5. <i>Modification du gradient de pH</i>	- 37 -
1.3.5. Autres types de gradients de pH.....	- 38 -
1.4. ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE ZONE EN SOLUTIONS QUASIISOELECTRIQUES D'AMPHOLYTES (CABCE).....	- 39 -
1.4.1 Utilisation de solutions peu conductrices en ECZ	- 39 -
1.4.2. La courbe d'électrotitrage (CET). Fractionnement des ampholytes porteurs.	- 41 -
1.4.3 Electrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes (CABCE)....	- 43 -
1.5. MICROSYSTEMES POUR LA SEPARATION DE PROTEINES	- 46 -

1.5.1. Matériaux utilisés pour la fabrication de microsystèmes analytiques et traitements de surface	- 46 -
1.5.2. Dérivation de protéines pour la détection de fluorescence.....	- 50 -
1.5.3. Séparations monodimensionnelles de protéines.....	- 52 -
1.5.3.1. <i>Electrophorèse en gel</i>	- 52 -
1.5.3.2. <i>Electrophorèse de zone</i>	- 54-
1.5.3.3. <i>Focalisation isoélectrique</i>	- 54 -
1.5.4. Séparations bidimensionnelles	- 58 -
1.6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 60 -

CHAPITRE 2 : SEPARATION DE PROTEINES PAR FOCALISATION ISOELECTRIQUE CAPILLAIRE ET UTILISATION DE COUPES ETROITES D'AMPHOLYTES PORTEURS POUR AMELIORER LA RESOLUTION.....- 69 -

2.1. INTRODUCTION.....	- 70 -
2.2. ARTICLE 1: COMPARISON OF DIFFERENT CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING METHODS –USE OF “NARROW PH CUTS”OF CARRIER AMPHOLYTES AS ORIGINAL TOOLS TO IMPROVE RESOLUTION	- 72 -
2.3. ARTICLE 2: USE OF QUASI-ISOELECTRIC BUFFERS AS ANOLYTE AND CATHOLYTE TO IMPROVE CIEF PERFORMANCES	- 88 -
2.4. UTILISATION DE NC COMME ANOLYTE ET CATHOLYTE : EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES	- 102-
2.4.1. Variation de la nature des NC utilisés comme catholyte.....	- 102-
2.4.2. Utilisation d'anolytes et de catholytes de différentes natures en présence d'un capillaire greffé	- 103-
2.5. CONCLUSION	- 104-
2.6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 105-

CHAPITRE 3 : SEPARATION DE PROTEINES DU LAIT PAR FOCALISATION ISOELECTRIQUE EN MICROSYSTEMES
-107-

3.1. INTRODUCTION ET EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES	- 108 -
3.2. ARTICLE 3:VERSATILE METHOD FOR EOF MEASUREMENTS IN MICROCHIP CE	- 113 -
3.3. ARTICLE 4: EVALUATION OF MICROCHIP MATERIAL AND SURFACE TREATMENT OPTIONS FOR ISOELECTRIC FOCUSING OF ALLERGENIC MILK PROTEINS ON MICROCHIPS.....	- 122 -
3.4. CONCLUSION	- 140 -
3.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 142 -

CHAPITRE 4 : SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE DE ZONE EN SOLUTIONS QUASI-ISOELECTRIQUES D'AMPHOLYTES, AU FORMAT CAPILLAIRE ET EN MICROSYSTEMES.....-143-

4.1. INTRODUCTION.....	- 144 -
4.2. FRACTIONNEMENT DES AMPHOLYTES ET CARACTERISATION DES FRACTIONS OBTENUES	- 146 -
4.2.1. Fractionnement d'un mélange d'ampholyte de gamme large de pH.....	- 147 -
4.2.1.1. <i>pH des fractions obtenues.....</i>	- 148 -
4.2.1.2. <i>Conductivités des fractions obtenues.....</i>	- 149 -
4.2.1.3. <i>Séparation d'un mélange test de protéines.....</i>	- 150 -
4.2.2. Fractionnement de mélanges d'ampholytes de gammes de pH étroites.....	- 151 -
4.2.2.1. <i>pH des fractions obtenues.....</i>	- 152 -
4.2.2.2. <i>Conductivité des fractions obtenues</i>	- 153 -
4.2.2.3. <i>Mesure des FEO en électrolytes constitués de coupes étroites d'ampholytes</i>	- 155 -
4.3. UTILISATION D'ELECTROLYTES QUASI-ISOELECTRIQUES POUR LA LIMITATION DE L'ADSORPTION DES PROTEINES EN ECZ.....	- 157 -
4.3.1. Article 5: Use of quasi-isoelectric buffers to limit protein adsorption in CZE.....	- 157 -
4.3.2. Perspectives.....	- 165 -
4.4. DERIVATION COVALENTE DE PROTEINES POUR LA DETECTION PAR FLUORESCENCE	- 166 -
4.4.1. Stabilité du FITC.....	- 166 -
4.4.2. Optimisation des conditions de dérivation.....	- 168 -
4.4.3. Dérivation d'autres protéines	- 173 -
4.5. SEPARATION EN ELECTROPHORESE DE ZONE EN MICROSYSTEMES	- 174 -
4.5.1. Séparation de composés modèles.....	- 175 -
4.5.2 Séparation de protéines du lait	- 178 -
4.5.3. Conclusions	- 184 -
4.6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 185 -

CHAPITRE 5: PERSPECTIVES.....- 187 -

5.1. INTRODUCTION.....	- 188 -
5.2. UTILISATION DE TENSIOACTIFS POUR AMELIORER LES SEPARATIONS EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ET EN MICROSYSTEMES	- 190 -
5.2.1. Utilisation de tensioactifs pour améliorer la sensibilité.....	- 190-
5.2.1.1. <i>Influence de la présence de CHAPS sur la détection de la BSA.....</i>	- 191 -
5.2.1.2. <i>Influence de la présence de CHAPS sur la détection de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline A.....</i>	- 193 -
5.2.2. Utilisation de tensioactifs pour améliorer la résolution. Application à la séparation des protéines du lait écrémé	- 197-
5.3. COUPLAGE DES DEUX DIMENSIONS DE SEPARATION.....	- 201 -

5.4. CONCLUSIONS	- 207 -
5.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 208 -
ANNEXES.....	-213-
ANNEXE 1 : FRACTIONNEMENT D'AMPHOLYTES AVEC LE ROTOFOR® : CONDITIONS EXPERIMENTALES...	- 214 -
ANNEXE 2 : ELECTROLYTES UTILISES POUR LES MESURES DE FLUX ELECTROOSMOTIQUES	- 215 -
ANNEXE 3 : REACTION DE DERIVATION AU FITC.....	- 216 -
ANNEXE 4 : COMPOSES MODELES UTILISES EN MICROSYSTEMES	- 218 -
ANNEXE 5 : MONTAGE MICROFLUIDIQUE	- 219 -
ANNEXE 6 : INJECTION EN ELECTROPHORESE DE ZONE EN MICROSYSTEMES	- 221 -
ANNEXE 7 : CALCUL DU CHAMP ELECTRIQUE APPLIQUE DANS UN MICROSYSTEME LORS D'UNE SEPARATION EN ELECTROPHORESE DE ZONE.	- 222 -
ANNEXE 8 : POTENTIELS APPLIQUES LORS DES SEPARATIONS EN ELECTROPHORESE DE ZONE EN MICROSYSTEME	- 224 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 225 -

Liste des abréviations :

6-AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate
ACN	Acétonitrile
ANS	N-arylamminonaphthalene
APC	Allophycocyanine
BSA	Albumine de sérum bovin
CA	Anhydrase carbonique
CABCE	<i>Carrier ampholyte based capillary electrophoresis</i> , électrophorèse en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes
CEMC	Chromatographie electrocinétique micellaire capillaire
CET	Courbe d'électrotitrage
CIEF	Focalisation isoélectrique capillaire
CMC	Concentration micellaire critique
COC	<i>Cyclic olefin copolymer</i>
Conalb	Conalbumine
CPL	Chromatographie en phase liquide
CytC	Cytochrome C
EC	Electrophorèse capillaire
ECC	Electrochromatographie
ECG	Electrophorèse capillaire en gel
ECZ	Electrophorèse capillaire de zone
ESI	Electrospray
FC	Fluorescamine
FEO	Flux électroosmotique
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FQ	3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldéhyde
GFP	<i>Green Fluorescent protein</i>
GluOx	Glucose oxydase
HEC	Hydroxyethylcellulose
HMDS	Hexamethyldisiloxane
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IEF	Focalisation isoélectrique
IPG	Gradient de pH immobilisé
ITP	Isotachoporèse
LIF	Fluorescence induite par laser
LPA	Polyacrylamide linéaire
LYS	Lysozyme
MALDI-TOFMS	Spectrométrie de masse à ionisation par désorption laser assistée par matrice couplée à un analyseur à temps de vol
MC	Methylcellulose
MC540	Merocyanine 540
MS	Spectrométrie de masse
Myo	Myoglobine

NBD-F et NBD-Cl	4-fluoro- et 4-chloro-7-nitrobenzofurazan
NC	<i>Narrow cuts</i> , coupes étroites d'ampholytes porteurs
NDA	Naphtalene-2,3-dicarboxaldéhyde
OPA	Ortho-phtalaldéhyde
P(AM-PDMA)	Poly(N,N-diméthylacrylamide)
PA	Polyacrylamide
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PC	Polycarbonate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PE	Phycoérythrine
PEI	polyéthyleneimine
PEO	d'oxyde de polyéthylène
PEO	Oxyde de polyéthylène
Phyco	Phycocyanine
pI	Point isoélectrique
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle
PVA	Alcool polyvinyle
RNA	Ribonucléase A
SDS	Dodécylsulfate de sodium
STI	<i>Soybean trypsin inhibitor</i>
Strepta	Streptavidine
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthylethylenediamine
WCID	<i>Whole channel imaging detection</i>
β Lg	β -lactoglobuline

Introduction Générale

Rapport-Gratuit.com

Les allergies alimentaires représentent aujourd’hui un réel problème de santé publique : depuis 20 ans, elles sont de plus en plus fréquentes, touchent cinq pour cent des enfants, et les aliments en cause sont toujours plus nombreux.

Pour déterminer à quelle(s) protéine(s) d’un aliment donné un patient est allergique, deux techniques sont majoritairement employées : les tests ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), utilisés en routine, et l’électrophorèse bidimensionnelle en gels de polyacrylamide (2D-PAGE) suivie d’une immunodétection, utilisée en recherche.

Les tests de diagnostic de l’allergie les plus employés sont les tests ImmunoCAP® (format ELIFA pour *Enzyme Linked ImmunoFiltration Assay*, www.phadia.fr). Le sérum d’un patient est alors incubé dans une éponge sur laquelle l’allergène ou le mélange d’allergènes d’intérêt est fixé, puis les anticorps ayant réagit avec cet allergène sont quantifiés par une technique d’immunodétection. Ces kits commerciaux sont disponibles pour plus de 450 allergènes, et permettent de doser non seulement les immunoglobulines E, anticorps responsables de l’allergie, mais aussi éventuellement les immunoglobulines G.

Cependant, ces tests ne permettent pas d’identifier de nouveaux allergènes. Il faut pour cela avoir recours à l’électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide. (2D-PAGE). Cette technique consiste à séparer les protéines d’un extrait alimentaire d’intérêt, avant de réaliser leur immunodétection et/ou de leur éventuelle identification par spectrométrie de masse. Plus précisément, les protéines de l’extrait considéré sont d’abord séparées en fonction de leur point isoélectrique par focalisation isoélectrique puis en fonction de leur masse en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium, tensioactif anionique) par SDS-PAGE. Une fois cette séparation effectuée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrate de cellulose, qui est incubée avec le sérum du patient. Une étape de révélation permet alors de déterminer sur quelles protéines des immunoglobulines E du patient se sont fixées, ces protéines étant celles auxquelles le patient est allergique.

Bien que la technique de 2D-PAGE soit extrêmement puissante, elle est longue à mettre en œuvre (~ 48 heures), nécessite un expérimentateur confirmé et une grande quantité de sérum (environ 500 µL par gel). Ainsi, l’utilisation de cette technique pour le diagnostic personnalisé est difficilement envisageable à grande échelle.

Dans le cadre du projet européen « Allergycard », notre équipe s'est associée à plusieurs laboratoires pour développer un nouveau système de diagnostic rapide et personnalisé de l'allergie.

Le dispositif proposé sera miniaturisé de façon à réduire les temps d'analyse et les volumes d'échantillons utilisés. Il comportera une unité de séparation des protéines, couplée à une unité de détection, comme illustré en Figure 1.

La première partie du microsystème permettra de séparer les protéines d'un extrait alimentaire d'abord par focalisation isoélectrique puis par électrophorèse de zone. Ce mode d'analyse permet de séparer des composés en fonction de leur rapport charge/masse dans un électrolyte donné. Il a été choisi comme alternative à l'électrophorèse en gel car il permet de travailler en conditions natives en évitant la dénaturation des protéines au SDS, qui, s'il n'interdit pas l'immunodétection de ces dernières, peut tout de même modifier leur structure tridimensionnelle.

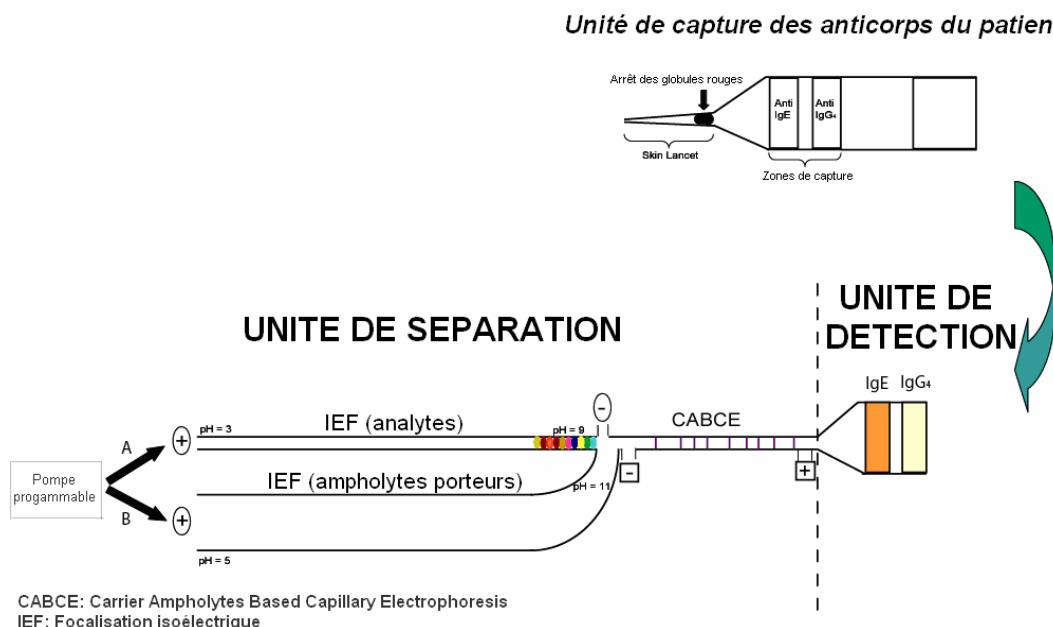


Figure 1 : Microsystème à développer dans le cadre du projet Européen « Allergycard ».

L'unité de détection comportera différentes zones à la surface desquelles seront fixés différents types d'immunoglobulines provenant du sang d'un patient. Ces zones de capture seront intégrées à un capteur électrochimique qui permettra de déterminer si une protéine s'est fixée ou non aux immunoglobulines immobilisées. Cette unité sera ensuite couplée à l'unité de séparation.

Ainsi, une fois les protéines d'un extrait alimentaire séparées, elles seront détectées en fonction de leur affinité pour les anticorps d'un patient considéré : il sera donc possible de déterminer à quelle protéine ce patient est allergique.

Le rôle de notre équipe consiste à développer l'unité de séparation du microsystème décrit ci-dessus. Notre approche a d'abord consisté à mettre au point les différentes dimensions de séparation au format capillaire sur un appareil automatisé avant d'utiliser les résultats obtenus pour la réalisation du microsystème.

Pour la réalisation de la deuxième dimension de séparation, l'utilisation d'électrolytes peu conducteurs pour permettre l'utilisation de champs électriques élevés et donc des analyses rapides a été envisagée. Ainsi J.-M. Busnel a démontré lors de son doctorat¹ que les électrolytes constitués d'ampholytes d'intervalles étroits de pH permettaient des séparations rapides de protéines en électrophorèse capillaire de zone, tout en offrant des possibilités intéressantes de préconcentration.

Ainsi lors de cette thèse nous nous sommes tout d'abord intéressés à la séparation de protéines du lait par focalisation isoélectrique au format capillaire. Nous avons en particulier évalué l'apport d'ampholytes d'intervalles étroits de pH pour augmenter la résolution.

Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à la séparation de protéines de lait par IEF en microsystèmes. Pour cela plusieurs matériaux et traitements de surface ont été envisagés.

Nous nous sommes ensuite penchés sur la transposition de l'électrophorèse de zone en solutions d'ampholytes d'intervalles étroits de pH du format capillaire au format microsystème, en nous intéressant tout d'abord à la capacité de ces électrolytes à limiter l'adsorption des protéines sur les parois des capillaires. Après avoir étudié la dérivation de protéines avec un marqueur fluorescent, nous avons pu envisager leur séparation en électrophorèse de zone sur des microsystèmes.

Enfin, l'influence de la présence de tensioactif sur la sensibilité et la résolution des différentes méthodes de séparation mises en œuvre plus haut ainsi que la possibilité de coupler ces deux dimensions de séparation ont été étudiées.

¹ Busnel, J.-M., *Electrophorèse en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes*, Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2006.

Chapitre 1 :

Etude bibliographique

1.1. Généralités sur l'allergie

1.1.1. Définition

Le terme allergie, des mots grec *allos* signifiant autre et *ergon* action, a été défini par Von Piquet en 1906 comme « une altération de la capacité de l'organisme de réagir à une substance étrangère ». L'allergie, ou réaction d'hypersensibilité de type I (immédiate), est une exacerbation de la réponse immunitaire vis-à-vis de substances inoffensives communes que l'on appelle allergènes. Elle intervient chez des individus prédisposés génétiquement à produire ce genre de réponse dans des conditions d'exposition particulières. Ces conditions mettent en jeu l'allergène lui-même, sa structure, sa dose, son mode d'entrée, sa voie d'entrée, sa fréquence d'administration, son moment d'entrée, et l'individu par son statut immunologique au moment de la sensibilisation.

1.1.2. Mécanismes

Après une première phase de rencontre avec l'allergène, appelée sensibilisation, une réponse immunitaire préférentielle de type Th2 s'engage (Figure 1). La réponse immunitaire Th2 est caractérisée par la production de certaines cytokines polarisant la réponse immune et conduisant, entre autres, à la production d'immunoglobulines d'isotype IgE, spécifiques de l'allergène. Les IgE peuvent ensuite se fixer sur leurs récepteurs de haute affinité (RFc ϵ I) exprimés par différentes cellules spécialisées de la lignée hématopoïétique contenant de nombreux granules intracytoplasmiques. Ces dernières peuvent être des basophiles, cellules circulantes, ou bien des mastocytes, leurs homologues tissulaires. Les allergènes, lors de leurs réintroductions, se fixent sur les IgE spécifiques liées à leur récepteur membranaire. Ceci induit une cascade de signalisation aboutissant à la dégranulation c'est-à-dire la libération des médiateurs immunitaires et de l'inflammation (telle que l'histamine) contenus dans les granules des cellules. Ces médiateurs (amines biogènes et cytokines) ont des effets immédiats, vasodilatateurs et/ou bronchoconstricteurs, et retardés de type inflammatoire (recrutement de cellules sur les lieux de l'inflammation). Ils sont à l'origine des symptômes observés: asthme,

rhinoconjonctivite, kératite, prurit, eczéma, ou de son expression la plus aiguë: l'anaphylaxie.

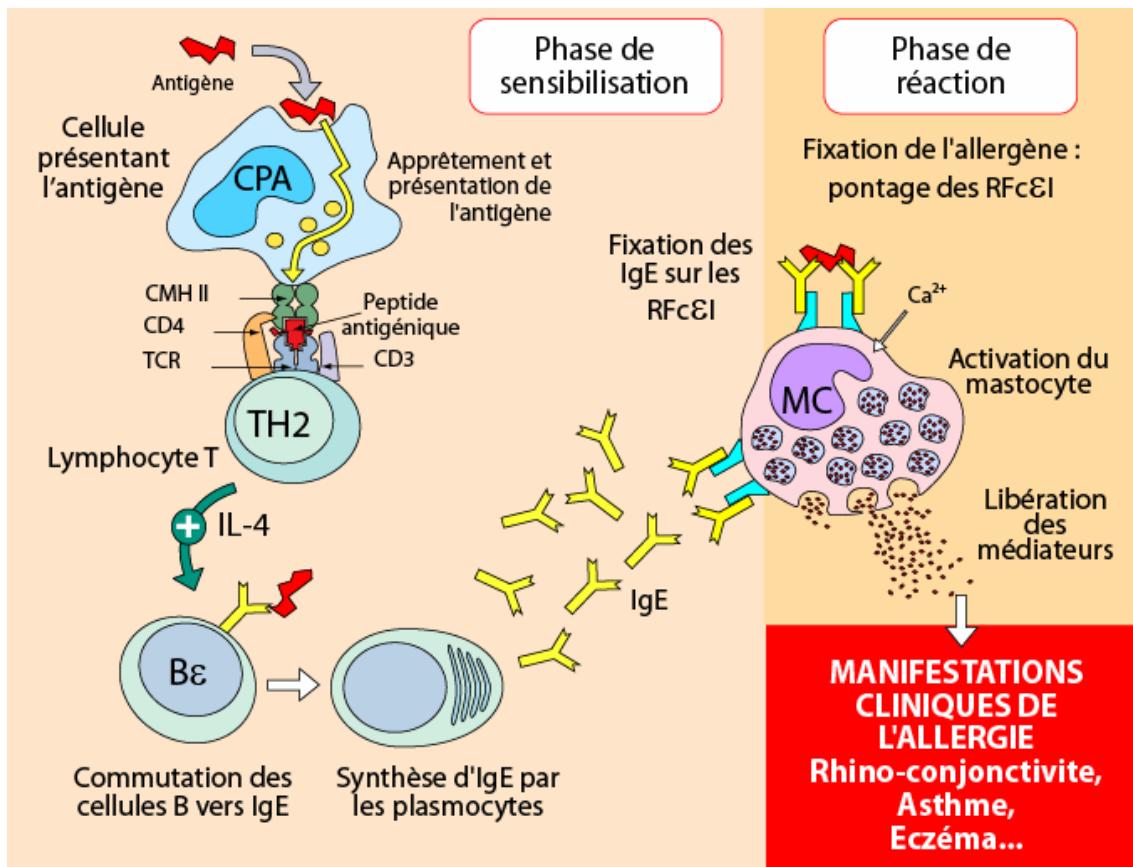


Figure 1: représentation schématique du mécanisme de l'allergie, hypersensibilité de type I (immédiate).

1.1.3. Importance des allergies alimentaires. Cas de l'allergie au lait

Depuis 20 ans, les allergies alimentaires sont de plus en plus fréquentes et de plus en plus complexes [1, 2]. Bien que leur prévalence soit surestimée par le grand public car elles sont confondues avec des hypersensibilités ne faisant pas intervenir de mécanisme immunologique, elles concernent tout de même environ 5% des enfants et 3% des adultes. Il existe cependant des disparités importantes en fonction des pays, de l'âge et des habitudes de consommation.

Les allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte sont présentés en Tableau 1. Au-delà de trois ans, l'arachide est le premier allergène. Il est d'autant plus important qu'il est le premier responsable des anaphylaxies sévères déclarées par le réseau d'allergovigilance en France et en Belgique (11,5% en 2007).

Allergènes	0-1 an	1-3 ans	3-15 ans	Adultes
Œuf	77,5	69,9	24,3	6,3
Lait	29,2	25,6	7	3,5
Arachide	19,7	37,6	49,3	10,1
Fruits à coques	2,7	4,4	10,2	15,7
Légumineuses	0,6	4,4	13,4	5,9
Poisson	0,6	5	10	3,1
Prunoïdées	0	0	0	31,3
Avocat, banane, châtaigne, kiwi	0,6	1,3	5,3	22,6
Apiacées	0	0	1,7	16,4
Blé, céréales	6,1	6,4	2,7	13,2

Tableau 1 : Allergènes alimentaires les plus fréquents chez l'enfant et l'adulte (données du Centre d'Investigations Cliniques et Biologiques en Allergologie Alimentaire). Adapté de [1].

Chez l'enfant, le lait de vache est le deuxième aliment responsable d'allergies derrière l'œuf, mais son importance est primordiale car il reste le premier aliment des nourrissons. L'allergie au lait de vache débute souvent avant l'âge de six mois mais disparaît généralement au cours de l'enfance après éviction du lait du régime alimentaire. Les protéines du lait de vache peuvent être séparées en deux fractions par acidification : le lactosérum et le lait caillé ou coagulé. La composition en protéines de ces deux fractions, leurs points isoélectriques et leurs masses moléculaires, ainsi que le taux de patients qui y sont sensibilisés sont présenté en Tableau 2.

	Protéines	% des protéines du lait total	Point isoélectrique	Masse moléculaire (kDa)	% des patients sensibilisés
Lait caillé	Caséine α s1	32	5	23,6	66
	Caséine α s2	10	5,3	25,2	
	Caséine β	28	5,2	24	
	Caséine κ	10	5,5	19	
Lactosérum	β -lactoglobuline A	10	5,25	18	58
	β -lactoglobuline B		5,35	18	
	α -lactalbumine	5	4,2-4,5	14,4	38
	Immunoglobulines	1	5,5-6,8	150-1000	n.d.
	BSA (albumine)	3	4,7-4,9	66	50
	Lactoferrine	traces	8,3	78	45

Tableau 2 : Composition des différentes fractions du lait en protéines et taux de patient y étant sensibilisés. Adapté de [2]

La plupart des protéines du lait font réagir plus de la moitié des patients : ce sont des allergènes dit majeurs. En outre, de nombreux patients sont sensibilisés à plusieurs de ces protéines.

Comme nous l'avons vu en introduction générale, la détermination des protéines auxquelles un patient est allergique se fait par test ELISA [3, 4] ou par séparation bidimensionnelle en gel de l'extrait allergénique [5].

Ces techniques sont relativement longues et laborieuses, c'est pourquoi nous proposons d'essayer de réaliser la séparation des composants d'un extrait allergénique en microsystème bidimensionnel, en mettant en œuvre deux mécanismes de séparation électrophorétiques : la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse de zone en électrolytes peu conducteurs.

Notre approche consistant à mettre au point des séparations électrophorétiques au format capillaire avant de les transposer en microsystèmes, nous allons donc tout d'abord nous intéresser aux séparations en électrophorèse capillaire.

1.2. Electrophorèse capillaire (EC): généralités

1.2.1. Phénomènes de migration

1.2.1.1 Migration électroosmotique

La migration électroosmotique est un phénomène très important en EC. Elle correspond à l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire sous l'action d'un champ électrique tangentiel. Cet écoulement est directement lié à la charge de surface du capillaire. Ainsi, ceux en silice vierge classiquement utilisés en EC possèdent une charge de surface négative dès que le pH de l'électrolyte est supérieur à 2 ou 3, car les groupements silanol -SiOH situés à leur surface sont alors ionisés négativement. Pour assurer l'électroneutralité, une partie des cations présents dans l'électrolyte va former une double couche électrique au niveau de la paroi de silice (Figure 2). Plus précisément, une partie des cations compensant les charges fixes du capillaire se place à une distance très faible de la paroi du capillaire et forme une couche appelée couche compacte alors qu'une partie de

ces cations se situent à une distance un peu plus grande pour former une couche appelée couche diffuse. Lors de l'application d'un champ électrique aux bornes du capillaire, les cations de la couche compacte ne peuvent migrer et restent immobiles car ils subissent des interactions électrostatiques fortes de la part des groupements silanol de la paroi du capillaire. En revanche, les cations de la couche diffuse, bien qu'attirés par les groupements silanol ionisés, vont migrer vers la cathode et entraîner via des phénomènes de friction l'ensemble des molécules de l'électrolyte. Ceci est le phénomène d'électroosmose, qui consiste en un écoulement général du contenu du capillaire en direction de la cathode, en raison de la charge de surface négative de la silice.

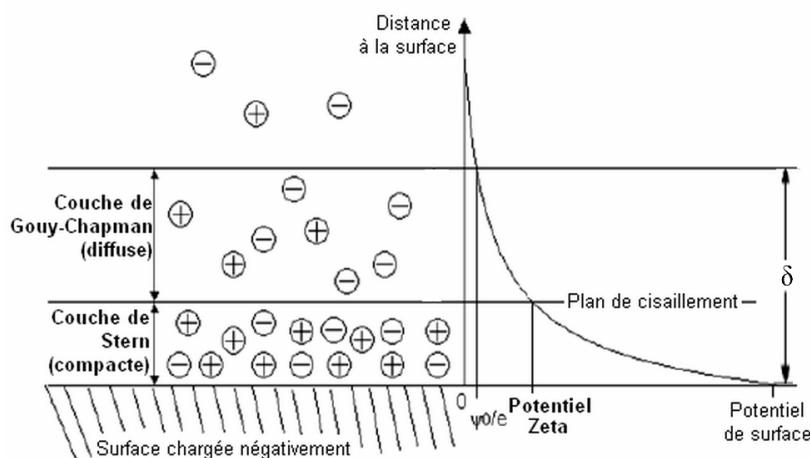


Figure 2: structure de la double couche électrique présente à la surface d'un capillaire chargé négativement. Adapté de[6].

La double couche électrique est caractérisée par un potentiel de surface, appelé potentiel ζ , qui s'exprime en Volts:

$$\zeta = \frac{\delta \cdot \sigma}{\epsilon_r \cdot \epsilon_0}$$

Equation 1

Où δ est l'épaisseur de la double couche électrostatique (m), σ est la densité de charge de surface du capillaire ($C.m^{-2}$), ϵ_0 est la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} C^2.N^{-1}.m^{-2}$) et ϵ_r est la constante diélectrique de l'électrolyte. Dans le cas de capillaires en silice fondue, ζ est négatif, et sa valeur absolue augmente avec le pH (augmentation de la densité de charge de la paroi du capillaire) et diminue avec la force ionique (diminution de l'épaisseur de la double couche).

La vitesse linéaire de l'écoulement électroosmotique dépend du potentiel ζ et obéit à la relation d'Helmoltz-Smoluchowski :

$$v_{eo} = m_{eo} \cdot E = \frac{\delta \cdot \sigma}{\eta} \cdot E$$

Equation 2

Où η est la viscosité du milieu (cP) et E le champ électrique appliqué (V.m⁻¹).

La vitesse de l'écoulement électroosmotique dépend notamment du pH, de la force ionique et de la viscosité de l'électrolyte de séparation. Cependant, des traitements de surface du capillaire peuvent modifier l'écoulement électroosmotique. Par exemple, l'adsorption dynamique de tensioactifs cationiques permet de réduire voire d'inverser le sens de l'écoulement électroosmotique. De même, des polymères neutres peuvent être greffés de manière covalente ou immobilisés thermiquement sur les parois du capillaire et supprimer presque totalement l'écoulement électroosmotique.

Une caractéristique importante de l'écoulement électroosmotique est son profil plat, contrairement aux profils d'élution paraboliques rencontrés en chromatographie en phase liquide [7]. Il en résulte une faible dispersion des zones d'analytes et donc une meilleure efficacité.

1.2.1.2. Migration électrophorétique

L'électrophorèse permet la séparation de composés chargés sous l'application d'un champ électrique. La séparation est permise par les différences de vitesse de migration existant entre les différents analytes. La vitesse v_{ep} (m.s⁻¹) de migration électrophorétique d'un analyte s'exprime en fonction de sa mobilité effective m_{ep} (m².s⁻¹.V⁻¹) et du champ électrique appliqué E (V.m⁻¹) :

$$v_{ep} = m_{ep} E$$

Equation 3

La mobilité électrophorétique d'un composé dépend de plusieurs paramètres : mobilité absolue du composé à dilution infinie, pH et force ionique de l'électrolyte, interactions avec des molécules présentes dans le milieu de séparation. Si l'analyte présente des propriétés acido-basiques, le pH du tampon est important car, dans ce cas, son degré

d'ionisation et par conséquent sa mobilité électrophorétique seront influencés par le pH. En outre, quelles que soient les propriétés acido-basiques de l'analyte considéré, si ce dernier est chargé, sa mobilité électrophorétique dépendra de la force ionique de l'électrolyte support. Issue de la théorie de Debye-Hückel, la relation ci-dessous est souvent utilisée pour modéliser l'évolution de la mobilité absolue m_{ep}^0 d'un composé en fonction de la force ionique I de l'électrolyte support [8].

$$m_{ep}^0 = m_{ep}^\infty - (0.23q^2 m_{ep}^\infty + 31.4 \cdot 10^{-5} q) \sqrt{I}$$

Equation 4

Où m_{ep}^∞ est la mobilité absolue à dilution infinie du composé et q sa charge.

Dans le cas des petits ions, la valeur de la mobilité électrophorétique m_{ep} d'un ion dépend de son rapport charge (q) sur rayon hydrodynamique (R_h). La formule générale ci-dessous est alors utilisée:

$$m_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R_h}$$

Equation 5

1.2.2. Principaux modes de séparation électrocinétique

1.2.2.1. Electrophorèse capillaire de zone (ECZ)

L'ECZ est sans doute la méthode électrocinétique la plus simple. Les analytes présents dans l'échantillon sont séparés en fonction de leur mobilité électrophorétique dans un électrolyte support de pH et de force ionique donnée, mais ne contenant aucun additif particulier.

Un schéma de séparation en ECZ est présenté en Figure 3. Un analyte migrera vers l'anode s'il est sous forme anionique, et vers la cathode s'il est sous forme cationique. Cependant, la vitesse apparente des composés sera la somme de leur vitesse électrophorétique et de la vitesse electroosmotique :

$$\vec{v}_{app} = \vec{v}_{eo} + \vec{v}_{ep} = (m_{eo} + m_{ep}) \vec{E}$$

Equation 6

Ainsi, l'ECZ n'est pas adaptée à la séparation de composés neutres, ses derniers étant tous détectés au temps électroosmotique.

Comme illustré en Figure 3, il est intéressant de préciser que malgré leur sens de migration opposé, des anions et des cations peuvent être séparés simultanément par ECZ à la condition que l'écoulement électroosmotique présente une valeur assez élevée.

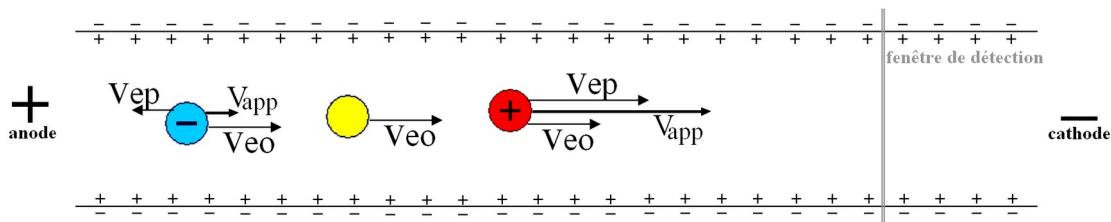


Figure 3 Schéma de principe de séparation en ECZ.

Lors de la séparation, les zones d'analytes ont tendance à s'élargir sous l'effet de la diffusion si aucune force ne vient contrebalancer les effets dispersifs liés à la diffusion. Ainsi, si l'effet Joule est faible, on pourra le négliger et on aura intérêt à essayer d'effectuer la séparation le plus rapidement possible afin de limiter l'élargissement par diffusion des zones d'analyte.

1.2.2.2. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)

La CIEF consiste à séparer des composés amphotériques tels que des protéines ou des peptides en fonction de leur point isoélectrique (pI) dans un gradient de pH. Elle sera présentée en détail dans la suite de ce chapitre.

1.2.2.3. Electrophorèse capillaire en gel (ECG)

L'ECG permet la séparation de macromolécules selon leur masse moléculaire. Pour cela, un gel est ajouté à l'électrolyte, et agit comme un tamis moléculaire sur les analytes.

Cette méthode est particulièrement adaptée à la séparation de macromolécules présentant des masses différentes mais des mobilités électrophorétiques proches, tels que des acides

nucléiques ou des glycoprotéines. L’analyse de protéines non glycosylées par ECG se fera en général en présence de SDS, qui les dénature et uniformise leur densité de charge.

Différents types de gel peuvent être utilisés comme tamis moléculaire. L’agarose et le polyacrylamide sont classiquement utilisés en gels minces, et leur utilisation a été adaptée au format capillaire. L’agarose, qui présente des pores larges, est surtout utilisé pour la séparation d’acides nucléiques, alors que la taille des pores des gels de polyacrylamide est mieux adaptée à la séparation de protéines. Ces derniers sont polymérisés *in situ* dans les capillaires mais leur préparation reste délicate et leur stabilité limitée, malgré leurs bonnes performances séparatives.

Par conséquent, l’utilisation de gels qui ne sont plus greffés de manière covalente aux parois du capillaire mais contenus dans l’électrolyte support s’est beaucoup développée. Par simple rinçage du capillaire, le gel peut être remplacé par une solution neuve ou bien encore par un gel de toute autre nature. Ainsi, l’optimisation de la séparation est facilitée et la reproductibilité des analyses améliorée. Des polymères hydrosolubles tels que le polyacrylamide linéaire (LPA), l’alcool polyvinyle (PVA), la methylcellulose (MC), l’hydroxypropylcellulose (HPC), l’hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) ou les polyéthileneglycols (PEG) peuvent être utilisés en ECG. Des copolymères tels que le P(AM-PDMA) (polyacrylamide greffé poly(N,N-diméthylacrylamide)) ont également été développés [9] ; ils présentent l’avantage de posséder des propriétés variables en fonction de leur composition, qui peut être modifiée en fonction des applications envisagées. Tous ces polymères qui agissent comme de véritables tamis moléculaires réduisent aussi fortement la vitesse de l’écoulement électroosmotique.

1.2.2.4. Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (CEMC)

La CEMC est une technique électrocinétique permettant notamment la séparation de composés neutres. Les électrolytes utilisés contiennent un tensioactif (chargé ou neutre) à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC). Lors d’une séparation par CEMC, les analytes se distribuent en fonction de leur hydrophobie entre la pseudo-phase micellaire et la phase aqueuse. La séparation est donc réalisée à la fois en fonction des mobilités électrophorétiques des analytes (dans le cas de composés chargés)

mais aussi de leurs coefficients de partage entre la phase aqueuse (ou hydro-organique) et la pseudo-phase stationnaire constituée de micelles.

La mise en œuvre la plus classique de la CEMC utilise un électrolyte de séparation de pH assez basique, par exemple un tampon borate présentant un pH d'environ 9, et le SDS. Le pH de l'électrolyte utilisé induit un écoulement électroosmotique suffisamment important pour entraîner vers la cathode la totalité des analytes ainsi que les micelles, bien que ces dernières présentent une charge globale négative et une mobilité assez élevée. Ainsi pour des composés neutres, la fenêtre temporelle de séparation s'étalera entre le temps de détection de l'électroosmose et le temps de détection de la pseudo-phase micellaire. Dans ces conditions, plus le composé considéré sera hydrophobe, plus il interagira avec la pseudo-phase stationnaire et plus il sera ralenti, et par conséquent détecté tardivement. Un composé neutre et totalement hydrophile sera quant à lui déplacé à la vitesse de l'écoulement électroosmotique.

Présentée pour la première fois en 1984 par Terabe [10], la CEMC est aujourd'hui appliquée à une grande variété de composés. En effet, elle peut être utilisée pour la séparation de petites molécules neutres ou chargées, de peptides ou bien encore de protéines.

1.2.2.5. Electrochromatographie capillaire (ECC)

L'ECC est une méthode hybride qui combine les avantages de l'EC et de la chromatographie en phase liquide (CPL). En effet, le capillaire contient ici une phase stationnaire qui permet d'ajouter un degré de liberté à une séparation réalisée en ECZ par le biais des interactions qu'elle génère avec les analytes. En effet, en ECC les mécanismes de rétention chromatographique et de transport électrophorétique se superposent, ce qui peut permettre une augmentation intéressante de la sélectivité pour certaines familles de composés.

Qui plus est, alors qu'en chromatographie l'écoulement hydrodynamique de la phase mobile entraîne un profil d'élution parabolique, en ECC le profil d'élution est plan car l'écoulement est assuré par le phénomène d'électroosmose. Ceci permet de réduire fortement la dispersion des zones d'analytes et d'obtenir des efficacités plus importantes qu'en CPL classique.

Enfin, le dernier avantage, que l'on retrouve aussi en nanochromatographie qui présente des dimensions identiques, est la faible consommation d'échantillon et de solvants organiques.

Différents types de colonnes peuvent être utilisés: des colonnes tubulaires, remplies ou monolithiques.

Les colonnes tubulaires présentent une fine pellicule de phase stationnaire sur leur paroi. Elles sont faciles à concevoir et leur phase stationnaire peut être aisément fonctionnalisée. Leur inconvénient majeur est leur faible surface spécifique. Par conséquent, la capacité d'injection tout comme les possibilités d'interactions sont faibles.

Des colonnes remplies, consistant en un capillaire de diamètre interne compris entre 25 et 100 µm rempli de particules de 0,5 à 5 µm de diamètre, peuvent également être utilisées en ECC. Ces phases particulières, par rapport aux phases pelliculaires, permettent d'augmenter fortement la surface spécifique ainsi que la capacité d'injection. Cependant, leur réalisation s'avère délicate et leur résistance mécanique (frittés en particulier) limitée. Pour ces raisons, des colonnes de types monolithiques ont été développées ces dernières années. Elles sont constituées d'un bloc continu de phase stationnaire, attaché de manière covalente aux parois du capillaire. Elles sont obtenues par polymérisation photochimique ou thermique à l'intérieur même du capillaire. Tout comme les colonnes capillaires remplies, les colonnes monolithiques présentent une surface spécifique importante. Leur mode de synthèse ainsi que leurs propriétés rétentives et séparatives apparaissent avantageux. Néanmoins elles sont encore à ce jour en développement.

Les domaines d'application de l'ECC sont assez vastes étant donné qu'un grand nombre de composés, neutres ou chargés, de petite ou de grande taille peuvent être analysés par cette méthode.

1.2.2.6. Isotachophorèse (ITP)

L'ITP est une méthode électrocinétique qui permet la séparation des analytes selon leur mobilité électrophorétique dans un gradient de champ électrique. Elle peut être utilisée comme méthode séparative ou de manière transitoire en début d'analyse pour préconcentrer des composés avant de les séparer par une autre technique électrocinétique.

Alors qu'un seul électrolyte support est utilisé en ECZ, deux électrolytes différents sont nécessaires à la réalisation d'une expérience d'ITP. Plus précisément, les analytes sont injectés entre un électrolyte meneur placé en sortie de capillaire et un électrolyte terminal placé en entrée. L'ITP permet de séparer des ions de même signe, sous réserve que ceux-ci présentent des mobilités électrophorétiques inférieures à celle du co-ion de l'électrolyte meneur et supérieures à celle du co-ion de l'électrolyte terminal. L'ITP est souvent réalisée à courant constant, et de préférence en l'absence d'électroosmose afin qu'un régime stationnaire puisse s'établir.

Sous l'action du champ électrique, tous les co-ions vont migrer à la même vitesse, car il n'existe pas de discontinuité de courant. C'est pourquoi cette méthode porte le nom d'isotachophorèse ; *iso* et *tacho* signifiant respectivement *même* et *vitesse*. Les différents ions s'organiseront ainsi entre les deux zones électrolytiques par ordre de mobilité électrophorétique croissante et formeront des zones pures. D'après l'Equation 7, le champ électrique dans le capillaire sera discontinu, et d'autant plus grand que le co-ion de la zone considéré possède une mobilité faible :

$$\vec{v} = m_{ep,meneur} \vec{E}_{meneur} = m_{ep,analyte i} \vec{E}_{analyte i} = m_{ep,terminal} \vec{E}_{terminal}$$

Equation 7

Où \vec{v} est la vitesse isotachophorétique, \vec{E}_i le champ électrique dans les différentes zones et $m_{ep,i}$ les vitesses électrophorétiques des différents co-ions considérés.

Ce gradient de champ électrique entraîne un phénomène de ségrégation des ions présentant des mobilités électrophorétiques différentes. Par exemple, si l'on considère un ion qui diffuse hors de sa propre zone vers une zone voisine où les ions ont une mobilité supérieure, il subira un champ électrique plus faible et sera donc ralenti jusqu'à ce qu'il rejoigne à nouveau sa propre zone où le champ électrique sera plus important. Inversement, si ce même ion diffuse dans l'autre zone voisine de sa propre zone, qui quant à elle contient des ions de mobilité inférieure, le champ électrique plus élevé existant dans cette zone lui permettra de rejoindre sa propre zone.

En électrophorèse capillaire, d'après la loi d'Ohm, la densité de courant J , régie par l'équation 8, est constante dans chaque section du capillaire :

$$\vec{J} = K \vec{E}$$

Equation 8

avec K, la conductivité de l'électrolyte support considéré et E, le champ électrique. Ainsi, pour assurer la continuité de la densité de courant dans le capillaire, les différentes zones d'analytes adapteront leur conductivité à celle de la zone voisine. Pour cela, la concentration au sein de ces zones sera modifiée, ce qui se fera par adaptation de la longueur qu'elles occupent dans le capillaire. En choisissant correctement les électrolytes meneur et terminal, il en résultera une préconcentration importante des zones d'analytes. C'est pourquoi cette méthode a souvent été utilisée pour l'étude de traces au format analytique, mais aussi au format préparatif.

1.2.3. Limitations en électrophorèse capillaire

1.2.3.1. Effet Joule

L'échauffement de l'électrolyte par effet Joule est l'un des principaux phénomènes limitants en électrophorèse. Il est dû à la dissipation de la chaleur créée par passage du courant dans le capillaire [7, 11-19]. Cette élévation de température va influencer les performances d'une séparation, un certain nombre de paramètres dépendant de la température. Ainsi, la viscosité et la permittivité électrique d'un électrolyte diminuent avec la température, alors que son potentiel ζ augmente [17]. La constante de diffusion des analytes augmente elle aussi avec la température [13]. Un effet Joule trop important peut également entraîner la formation de bulles voire l'évaporation de l'électrolyte. L'élévation globale de la température n'est cependant pas la principale cause de diminution des performances d'une séparation. En revanche, lors de l'application de la tension de séparation, même si la chaleur est générée uniformément dans le capillaire, le transfert de chaleur vers l'extérieur induira une température plus élevée au centre qu'aux bords du capillaire. L'effet Joule sera donc à l'origine d'un gradient radial de température, de profil parabolique [16, 18-21] .

La principale conséquence de l'élévation de température dans le capillaire par effet Joule est la diminution de la viscosité. Ceci engendre notamment une augmentation de la mobilité electroosmotique, celle-ci étant inversement proportionnelle à la viscosité, comme le montre l'Equation 9 :

$$m_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta}$$

Equation 9

En revanche, il a été montré que même si ϵ_r et le potentiel ζ dépendent de la température, leur produit peut en être considéré comme indépendant [22]. D'après l'Equation 5, la mobilité électrophorétique d'un composé chargé varie elle aussi comme l'inverse de la viscosité.

Ainsi, en présence d'effet Joule on observera dans le capillaire un profil parabolique de vitesse lié au gradient de mobilité, ce qui induira une perte d'efficacité dans le capillaire. Gobie et Ivory ont cependant proposé d'utiliser un écoulement hydrodynamique de sens opposé à l'écoulement électroosmotique pour contrebalancer la distorsion parabolique de la vitesse de migration [21].

La conductivité de l'électrolyte dépend elle aussi de la température. Elle est indépendante des dimensions du capillaire et peut être estimée grâce à l'équation ci-dessous :

$$k_{electrolyte} = \sum_{j=1}^n m_j |q_j| c_j N_A$$

Equation 10

Où m_j représente la mobilité électrophorétique de l'ion j , q_j sa charge effective, c_j sa concentration, et N_A est la constante d'Avogadro. Par ailleurs, en remplaçant la mobilité électrophorétique par l'expression donnée en Equation 5 on obtient:

$$k_{electrolyte} = \frac{1}{\eta} \sum_{j=1}^n \frac{q_j^2 c_j N_A}{6\pi R_j}$$

Equation 11

On montre ainsi que la conductivité de l'électrolyte est inversement proportionnelle à la viscosité du milieu de séparation. Or, la viscosité diminue lorsque la température augmente. Ainsi, si la chaleur dissipée par effet Joule au sein du milieu de séparation est significative, la hausse de température provoquera une augmentation de sa conductivité. Or cette augmentation de la conductivité va encore accroître l'effet Joule : il est donc important de contrôler la conductivité des électrolytes pour éviter cet effet de contrôle positif.

En résolvant l'équation de diffusion de la chaleur, Grushka *et al.* [20] ont calculé l'élévation globale de température dans le capillaire en fonction du taux G de création de chaleur par unité de volume ($\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$), ce qui conduit à l'Equation 12 :

$$T_{cap} - T_{ext} = \frac{Gr_1^2}{2} \left(\frac{1}{k_{sil}} \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right) + \frac{1}{k_{pol}} \ln\left(\frac{r_3}{r_2}\right) + \frac{1}{r_3 \cdot \lambda} \right)$$

Equation 12

Où r_1 est le rayon interne du capillaire, et r_2 et r_3 sont ses rayons externes en absence et présence du revêtement de polyimide. k_{sil} et k_{pol} sont les conductivités thermiques de la silice et du polyimide ($\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) et λ le coefficient de transfert de chaleur entre le capillaire et l'extérieur. λ peut être pris égal à $50 \text{ W} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{K}^{-1}$ si le capillaire est refroidi par de l'air mais il sera bien plus important si le refroidissement du capillaire est effectué par circulation d'eau.

Cependant dans la plupart des cas, l'Equation 12 se simplifie car la résistance au transfert de chaleur entre la paroi externe du capillaire et le milieu extérieur étant prédominant, le troisième terme de l'équation est nettement supérieur aux deux autres [7]. De plus, si on exprime le taux de création de chaleur par unité de volume de capillaire en fonction de la conductivité k de l'électrolyte de séparation et du champ électrique E appliqué, l'élévation globale de température au sein du capillaire devient:

$$T_{cap} - T_{ext} = \frac{k \cdot E \cdot r_1^2}{2r_3 \cdot \lambda}$$

Equation 13

On limitera ainsi l'effet Joule en diminuant le diamètre interne des capillaires, de façon à rendre plus efficace la dissipation de chaleur. La conductivité des électrolytes utilisés pourra également être diminuée.

Lorsque l'on travaille en microsystèmes, il est admis que la diminution des performances dues à l'effet Joule est beaucoup moins importante qu'en format capillaire [13]. Ceci est principalement dû à la meilleure dissipation de chaleur, en raison de l'utilisation du plus grand rapport surface sur volume des canaux (dimensions plus petites et forme rectangulaire) et de la taille du support contenant le canal de séparation. Qui plus est la température des microcanaux est probablement plus uniforme que dans les capillaires, où il existe des zones thermostatées et d'autres non thermostatées.

La mesure de l’élévation de température dans un capillaire ou dans un microsystème est relativement complexe [12, 14, 17, 23]. Dans le cas de l’utilisation d’appareils commerciaux, il est possible de réaliser des mesures indirectes, en travaillant sur la mobilité électroosmotique ou sur la conductivité de l’électrolyte [17]. Une manière simple pour l’expérimentateur de vérifier si un effet Joule significatif existe au sein de son système consiste à tracer l’évolution du courant en fonction du champ électrique appliqué. Tant que cette évolution présente un profil linéaire, on peut considérer qu’aucun effet Joule significatif n’est généré. Par contre, dès lors que cette courbe présente un écart à la linéarité, il peut être considéré que la conductivité de l’électrolyte varie : le champ électrique appliqué est alors trop important et la chaleur dissipée par effet Joule n’est plus négligeable.

1.2.3.2. Adsorption des analytes

Un autre phénomène limitant en EC est l’adsorption des analytes sur les parois du capillaire, en particulier lors de l’analyse de protéines. Il conduit à une instabilité de l’écoulement électroosmotique, une perte d’efficacité et une diminution de la reproductibilité.

Les interactions entre les protéines et la surface du capillaire sont diverses et comprennent notamment des interactions électrostatiques, hydrophobes ou de Van der Waals [24, 25]. Elles dépendent de plusieurs paramètres tels que le pH et la force ionique de l’électrolyte, de l’état de surface du capillaire, de la co-adsorption d’ions de faible poids moléculaire [26], et bien sûr des caractéristiques de la protéine considérée, telles que son point isoélectrique, son hydrophobie et sa structure tridimensionnelle. En effet, la stabilité de cette structure est essentielle dans le phénomène d’adsorption [27]: des protéines globulaires comme l’ α -chymotripsinogène ou la β -lactoglobuline seront plutôt rigides et auront peu tendance à s’adsorber sur les parois du capillaire en l’absence d’interactions électrostatiques. Au contraire, des protéines dites « molles » et ayant une stabilité interne plus faible pourront s’adsorber sur des surfaces même en l’absence d’attraction électrostatique. Ce sera notamment le cas des albumines et des caséines.

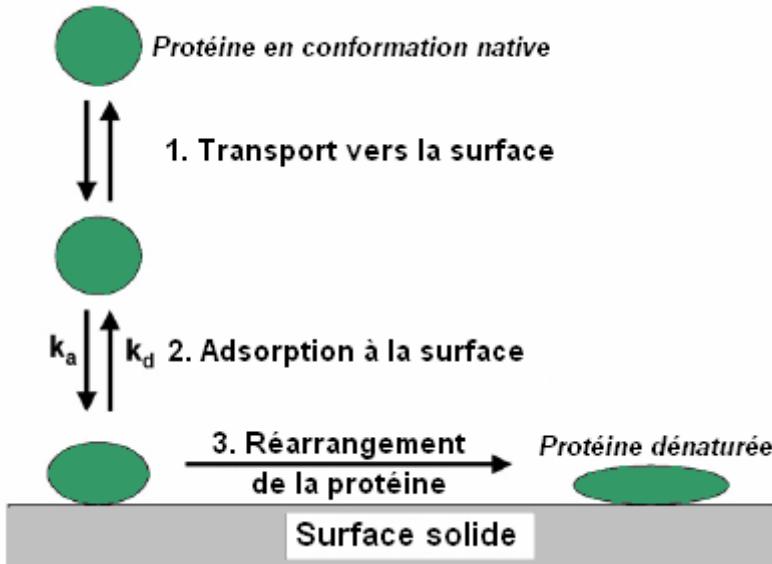


Figure 4 : Modèle simplifié de l'adsorption des protéines. Adapté de [24]

La compréhension des mécanismes d'adsorption des protéines sur la surface du capillaire reste incomplète. Cependant, on peut la décrire en plusieurs étapes, illustrées en Figure 4. La protéine doit d'abord être transportée à la surface par diffusion, puis interviennent des phénomènes d'adsorption/désorption. Lors de cette étape, la protéine subit des changements conformationnels, en se dépliant par exemple. Si la protéine modifiée peut se désorber facilement de la surface, l'adsorption peut être considérée comme réversible. Par contre, si son temps de résidence augmente, elle peut aussi se relaxer vers un état d'équilibre, devenant alors adsorbée irréversiblement à la surface. La réversibilité de l'adsorption dépend également du temps ; Graf *et al.* [28] ont travaillé sur l'adsorption de la myoglobine et ont montré que des protéines fraîchement adsorbées sur un capillaire pouvaient être désorbées par un rinçage conséquent au SDS, ce qui était impossible pour des protéines adsorbées depuis un certain temps.

Plusieurs méthodes ont été développées pour limiter l'adsorption des protéines sur les parois du capillaire. La plus courante consiste à greffer les parois de ce dernier de façon dynamique ou permanente avec un polymère ou un tensioactif [24, 29, 30]. Il a également été démontré que des additifs tels que des diamines [31, 32] ou du baryum [26] pouvaient limiter l'adsorption de peptides en interagissant avec la surface du capillaire. Comme nous le verrons par la suite, une solution alternative pour limiter l'adsorption des protéines consiste à utiliser comme électrolyte de séparation des coupes étroites d'ampholytes

porteurs, utilisés habituellement en focalisation isoélectrique pour créer le gradient de pH [33, 34].

Pour mesurer l'adsorption des protéines, plusieurs méthodes peuvent être employées [24]. L'adsorption réversible peut être évaluée grâce à des mesures d'efficacité, de symétrie de pics et de mobilités de protéines. L'adsorption irréversible sera quant à elle caractérisée par un changement de hauteur de la ligne de base après un pic de protéine, par un changement de mobilité électroosmotique et par des mesures de taux de récupération des protéines. Pour ces dernières, deux principales méthodes ont été décrites dans la littérature. Verzola *et al.* ont utilisé des micelles de SDS pour désorber les protéines, l'aire du pic obtenu permettant de déduire le taux d'adsorption [35]. La méthode de Towns et Regnier [36] consiste à travailler avec un capillaire équipé de deux détecteurs, la différence d'aire entre les deux pics obtenus donnant la quantité de protéine adsorbée à la surface du capillaire entre les deux détecteurs. Cette méthode a été adaptée par plusieurs groupes. Le groupe de Charles Lucy [37-40] utilise un capillaire unique qui est coupé après une série de mesures, pour séparer les protéines sur deux longueurs différentes, et calcule simplement le taux de récupération en comparant les aires de pics obtenues sur le capillaire initial et raccourci. Celui de Myriam Taverna [41, 42] injecte les protéines des deux côtés du capillaire et calcule le taux de récupération par une méthode plus élaborée, en considérant que le taux d'adsorption des protéines est proportionnel à la distance parcourue par l'analyte.

1.3. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)

La focalisation isoélectrique (IEF) permet la séparation de composés amphotériques tels que des protéines ou des peptides dans un gradient de pH. Elle a d'abord été mise en œuvre sur couche mince, et se pratique en capillaire depuis les travaux de Hjertén en 1985 [43]. Plusieurs revues de la littérature traitent des applications existant en CIEF [44, 45, 46], et de l'utilisation de cette technique pour la détermination de points isoélectriques de protéines [47]. Récemment la CIEF a notamment été utilisée non seulement pour la séparation de protéines [48-52], mais aussi pour l'étude de microorganismes [53] ou de biofilms à la surface de bactéries [54]. Elle a également permis de déterminer des

constantes d'affinité entre des anticorps et la protéine du prion [55], et de quantifier des protéines de signalisation cellulaire par une méthode d'immunodétection par chimioluminescence [56].

1.3.1. Principe

Une séparation en CIEF se déroule en plusieurs étapes : les analytes sont tout d'abord focalisés dans le capillaire puis, lorsque l'état d'équilibre est atteint, une étape de mobilisation de ces analytes vers le détecteur est en général nécessaire.

1.3.1.1. Focalisation

Le gradient de pH est le plus souvent créé par des mélanges complexes d'ampholytes porteurs. Le mécanisme de focalisation isoélectrique est présenté en Figure 5. Le capillaire est tout d'abord rempli de l'électrolyte de séparation qui contient le mélange d'ampholytes porteurs et les analytes à séparer. Un acide (généralement l'acide phosphorique) est placé à l'anode et une base (généralement la soude) est placée à la cathode (Figure 5A).

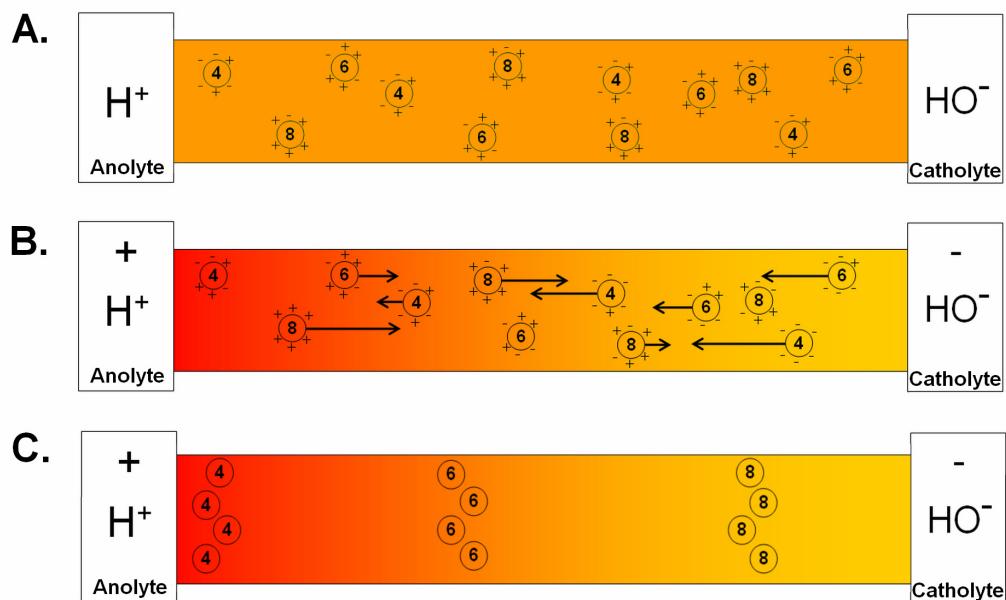


Figure 5: principe de la focalisation isoélectrique

Lors de l'application du champ électrique (Figure 5B), des ions hydroxyde et hydronium vont migrer dans le capillaire, ce qui va permettre aux ampholytes porteurs de s'organiser en fonction de leur point isoélectrique pour former le gradient de pH, les ampholytes les plus acides se plaçant près de l'anode et les plus basiques près de la cathode. Les analytes vont en même temps se focaliser dans ce gradient : si un analyte se trouve initialement à un point du gradient où le pH est inférieur à son pI, il sera chargé positivement et migrera vers la cathode, jusqu'à atteindre le pH égal à son pI, où sa charge apparente sera nulle. A l'inverse, s'il se trouve initialement à un pH supérieur à son pI, il sera chargé négativement et migrera vers l'anode.

Pour décrire la focalisation des protéines, l'approche dite de double pic est classiquement utilisée [57-60]. Elle a été mise en évidence sur gel de polyacrylamide puis par simulation numérique et par visualisation de l'ensemble du milieu de séparation. Son principe est illustré en Figure 6. Il a ainsi été démontré que deux zones seront formées en début de focalisation, l'une contenant les analytes chargés positivement et se déplaçant vers la cathode, l'autre contenant les analytes chargés négativement et se déplaçant vers l'anode. Au cours de la focalisation ces deux zones se rapprocheront et finiront par coalescer au niveau du point isoélectrique des analytes.

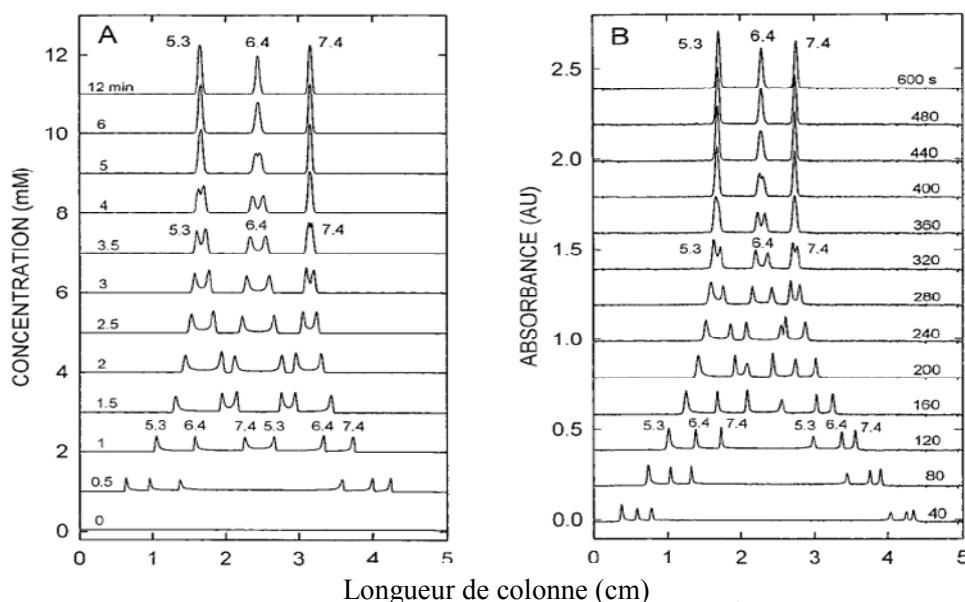


Figure 6 : Electrophérogrammes représentant la focalisation isoélectrique de trois marqueurs de pI : 6,6 ; 7,4 et 8,6 en fonction du temps de focalisation. Gradient de pH 3-10. E= 300 V.cm⁻¹. Cathode à droite. A) simulation B) données expérimentales. Adapté de [60].

Au final, les ampholytes et les protéines seront focalisés en bandes étroites autour de leur point isoélectrique, et il existera un équilibre entre la diffusion qui tendra à élargir ces bandes et la migration électrophorétique qui tendra à les affiner [61]. Cette technique offre ainsi un fort pouvoir de préconcentration : contrairement aux autres modes d'électrophorèse, les analytes sont ici introduits dans tout le capillaire puis focalisés dans une zone de taille restreinte.

Les expériences de CIEF sont généralement réalisées en l'absence d'écoulement electroosmotique, pour permettre une bonne focalisation des analytes [62]. Ceci est le plus souvent réalisé en greffant les parois du capillaire avec un polymère ou un tensioactif [24, 30, 63, 64]. Il est également possible d'ajouter un additif tel qu'un gel anticonvectif ou du glycérol dans le milieu de séparation [65]. Ceci aura pour conséquences d'augmenter la viscosité du milieu de séparation, de diminuer la vitesse de l'écoulement electroosmotique, et d'augmenter la solubilité des protéines.

1.3.1.2. Mobilisation

Lorsque l'on ne dispose pas de dispositif permettant de visualiser l'ensemble du capillaire [66], il est nécessaire de mobiliser les analytes focalisés vers le détecteur. La mobilisation peut être de type hydrodynamique, electroosmotique ou chimique.

La mobilisation hydrodynamique [67] consiste à faire migrer les analytes vers le détecteur en appliquant une différence de pression ou de gravité entre les extrémités du capillaire. Dans ce cas il est nécessaire de maintenir la tension de focalisation lors de l'étape de mobilisation pour limiter la diffusion des analytes et donc l'élargissement des pics. Il a été démontré que cette méthode offrait la meilleure linéarité entre les temps de mobilisation et les points isoélectriques, lorsque les gradients couvrent une large gamme de pH [68].

La mobilisation electroosmotique [69-71] nécessite un écoulement electroosmotique résiduel dans le capillaire, car c'est cet écoulement qui sert à déplacer les analytes vers le détecteur. Dans ce cas, focalisation et mobilisation sont réalisées en une seule étape. Cependant, l'écoulement electroosmotique ne doit pas être trop important afin que la focalisation puisse avoir lieu. Le profil d'écoulement plan provoqué par l'électroosmose est un avantage par rapport à l'écoulement de profil parabolique obtenu par mobilisation

hydrodynamique. En raison de sa simplicité, ce type de mobilisation est particulièrement adapté aux séparations en microsystèmes [72].

Enfin, la mobilisation chimique [62, 73, 74] consiste à modifier la composition de l'anolyte ou du catholyte, de façon à introduire une modification du gradient de pH et donc à déplacer les zones focalisées vers le détecteur. On peut par exemple remplacer la base du catholyte par un acide, ou inversement. Dans le cas où anolyte et catholyte contiennent tous les deux de l'acide phosphorique des protons migreront ainsi depuis l'anode dans le capillaire, et des ions phosphates migreront depuis la cathode. Les protons titreront les ampholytes et les protéines, qui acquerront une charge positive. Ce phénomène n'étant plus compensé par l'entrée d'ions hydroxyde depuis le catholyte, ampholytes et protéines migreront donc vers la cathode. Un phénomène similaire aura lieu si l'on remplace l'acide de l'anolyte par une base. Il est également possible de mobiliser chimiquement le contenu du capillaire en ajoutant un sel dans un des deux flacons d'anolyte et catholyte. Dans le cas d'une mobilisation cathodique, une solution de chlorure de sodium sera ajoutée au catholyte. Des ions chlorure pénétreront dans le capillaire, et, pour respecter l'électroneutralité, des protons de l'anolyte entreront également, conduisant à la mobilisation des analytes. Il a été démontré par des simulations informatiques [75] que cette mobilisation par ajout d'un sel dans l'anolyte ou le catholyte est en fait un mécanisme d'isotachophorèse, où le sodium joue le rôle d'ion meneur (dans le cas précédent). Il faut tout de même préciser que ces simulations ont été effectuées dans le cas d'un capillaire partiellement rempli d'anolyte et de catholyte. Dans cette même publication, Mosher et Thormann ont également montré que l'étape de mobilisation par ajout de sel pouvait être réalisée en même temps que la focalisation, simplifiant ainsi le travail de l'expérimentateur. Le choix d'une mobilisation anodique ou cathodique dépendra des points isoélectriques des protéines étudiées, une courte mobilisation étant préférable pour ne pas trop altérer leur focalisation.

1.3.1.3. Détection

Les modes de détection utilisables en CIEF sont les mêmes que ceux utilisés pour les autres modes d'EC.

La détection utilisée le plus souvent est la détection UV. Bien que sa sensibilité soit beaucoup plus faible qu'à 200 nm, elle est souvent effectuée à 280 nm, les ampholytes porteurs absorbant fortement aux longueurs d'ondes inférieures à 250 nm.

La détection par fluorescence induite par laser est également possible ; c'est une technique très sensible mais qui nécessite souvent une dérivation préalable des analytes.

Enfin, le couplage avec la spectrométrie de masse est très spécifique, très sensible, et permet l'identification des protéines. Le couplage en ligne CIEF-MS est toutefois complexe et reste relativement peu employé [48, 76-78] car les ampholytes porteurs peuvent générer un bruit de fond important dans le domaine des faibles masses, limitant ainsi la sensibilité. De plus, leur volatilité est limitée, ce qui peut provoquer une instabilité de l'électronébulisation lorsqu'une source électrospray est utilisée

1.3.2. Evaluation des performances d'une séparation en CIEF

Pour évaluer les performances séparatives d'une analyse chromatographique ou électrophorétique, on utilise généralement la résolution et l'efficacité. Cette dernière est exprimée en nombre de plateaux (par mètre) et reflète la largeur des pics d'analytes. La résolution représente quant à elle la plus ou moins bonne séparation de deux pics d'analytes considérés.

Le cas de la CIEF est un peu particulier. En effet, alors qu'en ECZ par exemple, les analytes migrent naturellement vers le détecteur, en CIEF ces derniers sont focalisés à une position stationnaire dans le capillaire puis sont déplacés « artificiellement » vers le détecteur par une étape de mobilisation. Ainsi, comme préconisé par Giddings et Dahlgren [79], l'efficacité, exprimée en nombre de plateaux, ne peut pas être utilisée. En revanche, si l'on dispose d'un détecteur permettant de visualiser le canal de séparation on pourra travailler directement avec la largeur des pics.

Le pouvoir résolutif en CIEF se définit quant à elle comme la plus petite différence de pI pouvant être résolue. Elle s'exprime avec la relation suivante [80] :

$$\Delta(pI) = 3 \sqrt{\frac{D(dpH/dx)}{E(-d\mu/dpH)}}$$

Equation 14

où D est la constante de diffusion de l'analyte, $\frac{dpH}{dx}$ la dérivée du pH en fonction de la distance x, E le champ électrique et $\frac{d\mu}{dpH}$ la dérivée de la mobilité de l'analyte en fonction du pH.

Expérimentalement, les variables contrôlables sont le champ électrique et la dérivée du pH en fonction de la distance. On améliorera donc la résolution en appliquant des champs électriques élevés et en utilisant des gradients de pH de gamme étroite (typiquement 2 unités pH). Cependant, la valeur du champ électrique ne devra pas non plus être trop élevée pour éviter une dégradation de la séparation par effet Joule.

La résolution entre des analytes sera d'autant plus élevée que leur constante de diffusion est faible : c'est souvent le cas pour les protéines. En outre, autour de leur pI, leur mobilité devra varier le plus possible, ceci étant exprimé par $\frac{d\mu}{dpH}$. En effet, si un analyte diffuse hors de sa zone, il acquerra une charge et sera refocalisé d'autant plus vite que sa mobilité aura changé.

1.3.3. Voies de synthèse et structure des ampholytes porteurs

Les débuts de l'IEF ont été contés par P.G. Righetti dans un récente revue [61]. Dans les années 1940 Svensson a d'abord essayé de former un gradient de pH par électrolyse d'une solution saline, mais se heurtait à plusieurs difficultés, dont la trop faible conductivité du gradient à pH neutre. Il s'est donc rendu compte de la nécessité d'utiliser des composés amphotériques pour former un gradient de pH stable, ces composés devant avoir un pouvoir tampon suffisamment important à leur point isoélectrique, et devant pouvoir légèrement diffuser dans les zones voisines de la leur pour assurer une certaine conductivité au milieu de séparation. Cependant trop peu de composés adéquats étaient alors disponibles commercialement et Svensson a d'abord travaillé en utilisant comme ampholytes porteurs des hydrolysats de protéines (caséines, albumine, hémoglobines et même sang total). Après ces différents essais plus ou moins prometteurs, il est apparu évident qu'un autre type d'électrolyte était indispensable à la bonne réalisation de l'IEF. Des composés présentant à la fois une capacité tampon importante, une conductivité suffisante et des pI distribués de façon homogène sur une gamme large de pH étaient nécessaires. En 1965 Vesterberg, élève de Svensson, réussit à développer une voie de

synthèse permettant d'obtenir un mélange de tels composés [81, 82]. Comme un grand nombre de composés amphotériques est nécessaire à la formation d'un gradient de pH régulier, il proposa l'utilisation d'un mélange hétérogène de réactifs, de façon à obtenir un grand nombre de composés différents. En ajoutant au goutte à goutte de l'acide acrylique à un mélange de polyamines à 70 °C dans un rapport bien défini (généralement 2 atomes d'azote pour une fonction carboxyle), puis en laissant la réaction se poursuivre jusqu'à ce que la totalité de l'acide acrylique ait réagi (environ 5 heures pour un rendement proche de 100 %), des ampholytes de pI répartis de façon homogène sur une gamme large de pH (3,5-10) sont obtenus [83]. Cette synthèse proposée par Vesterberg a été brevetée et ce type d'ampholytes est aujourd'hui vendu sous le nom d'Ampholine.

D'autres types d'ampholytes sont aujourd'hui commercialisés, notamment les Servalyt, Biolyte et Pharmalyte.

La voie de synthèse ainsi que les propriétés des Servalyt ont été décrites par Pogacar et Jarecki en 1974 [84], et celle des Biolyte par Grubhofer et Borja en 1977 [85]. Ces deux familles d'ampholytes sont en fait obtenues à partir d'une synthèse assez proche de celle utilisée pour l'obtention des Ampholine. Cependant, à la différence des Ampholine, des groupements phosphates et sulfates sont introduits au cours de leurs synthèses respectives.

La synthèse des Pharmalyte fait appel à des principes différents. Elle met en effet en jeu la copolymérisation d'amines, d'acides aminés, de dipeptides avec l'épichlorhydrine [83]. A la différence des mélanges précédents, la synthèse d'une gamme large de Pharmalyte est obtenue grâce à la synthèse individuelle de cinq mélanges d'ampholytes d'intervalles de pH plus étroits qui sont ensuite mélangés. Une nouvelle idée a de plus été introduite dans la synthèse des Pharmalyte, afin d'augmenter encore la diversité des ampholytes obtenus : différents énantiomères d'acides aminés et de l'épichlorhydrine ont été introduits dans le mélange réactionnel. Ainsi, même si les énantiomères des réactifs présentent les mêmes caractéristiques physico-chimiques, les diastéréoisomères produits par cette synthèse pourront présenter des propriétés physico-chimiques, et par conséquent des pI légèrement différents.

Afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques des ampholytes disponibles commercialement, ou bien tout simplement de diminuer leur coût, certaines équipes de

recherche se sont intéressées à la synthèse de mélanges d'ampholytes porteurs pour leur utilisation en IEF. Les différentes procédures mises en œuvres ont été décrites avec précision [83].

Par ailleurs, certains travaux très récents de l'équipe de P.G. Righetti ont porté sur l'étude de l'hétérogénéité des mélanges d'ampholytes utilisés pour l'établissement d'un gradient de pH en IEF [86]. Des mélanges commerciaux de gamme de pH étroite ont ainsi étudiés, des pH les plus acides (2,5-4) aux plus basiques (9-11). Ces mélanges ont chacun été fractionnés par IEF préparative en 20 fractions d'intervalle d'environ 0,1 unité pH, puis les différentes fractions obtenues ont été analysées en électrophorèse de zone couplée à la spectrométrie de masse. Ces travaux ont mis en évidence plusieurs caractéristiques des mélanges d'ampholytes. Ainsi, plus le pH augmente, plus la masse maximale des ampholytes composant les fractions et le nombre d'isoformes en présence diminuent. Mais ces travaux ont surtout démontré qu'une grande partie des ampholytes présents dans les mélanges -voire la majorité- étaient présents dans plusieurs fractions et non pas focalisés en bandes étroites comme attendu, ce phénomène étant d'autant plus important que la gamme de pH du mélange considéré est basique. Ainsi, une part importante des ampholytes composant ces mélanges sont en fait de « mauvais ampholytes », car, étant incapables de se focaliser, ils sont a priori inutiles à la formation du gradient de pH. Il faut tout de même noter que la présence de ces « mauvais ampholytes » n'empêche pas la formation correcte des gradients de pH.

1.3.4 Facteurs influençant la formation du gradient de pH

La formation du gradient de pH en IEF est un phénomène complexe, qui a fait l'objet de nombreuses simulations informatiques, notamment par R.A. Mosher et W. Thormann [59, 70, 75, 87-94] depuis le milieu des années 1980, mais aussi plus récemment par l'équipe de C. Ivory [95, 96]. Elle est influencée par plusieurs phénomènes qui vont être décrits ici.

1.3.4.1. Phénomène de plateau

Le phénomène de plateau a été expliqué en détail en 1986 [92] : il consiste en une déformation progressive du gradient de pH, qui tendra à être aplati au niveau des pH

« neutres » et de pente plus élevée aux pH extrêmes. Il est dû à la compression des ampholytes les plus acides vers l'anode et des plus basiques vers la cathode, ce qui conduit à un élargissement des zones d'ampholytes dans la région neutre du gradient, et donc à la formation d'un plateau. Pour illustration, la simulation de la focalisation de trois ampholytes est présentée en Figure 7.

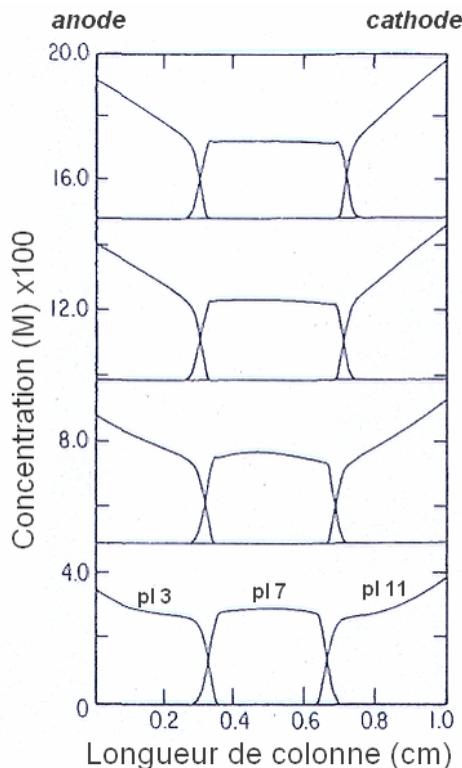


Figure 7 : Simulation de la focalisation de trois ampholytes hypothétiques (pI 3, 7 et 11). De bas en haut : concentration des trois ampholytes après 25, 50, 100 et 150 minutes de focalisation. La compression cathodique est plus importante que la compression anodique. Adapté de [92].

Le phénomène de plateau s'explique par le fait qu'aux pH les plus acides, la concentration en ion H_3O^+ n'est plus négligeable, et que pour assurer l'électroneutralité une partie des ampholytes porteurs est donc chargée négativementⁱ. Ceci a plusieurs conséquences.

Tout d'abord, dans une zone d'ampholytes très acides donnée, les ampholytes chargés négativement ont tendance à migrer vers l'anode : il en résulte un gradient de concentration des ampholytes dans leur propre zone, d'autant plus important que le point isoélectrique de l'ampholyte considéré est faible. Il a été démontré par simulation numérique que ceci se traduit par une compression de la zone considérée, cette

ⁱ Considérons par exemple une molécule amphotérique hypothétique possédant deux fonctions acidobasiques B/BH^+ et AH/A^- , de pK_a respectifs 2 et 4. On peut prédire par le calcul qu'une solution aqueuse à 10 mM de cette molécule aura un pH de 3,15 et que cette dernière sera présente à 82% sous forme $\text{BH}^+ \text{-R-A}^-$, 12% sous forme B-R-A^- et 6% sous forme $\text{BH}^+ \text{-R-AH}$.

compression augmentant quand le pH diminue. Il faut cependant noter que la migration des ampholytes sera partiellement compensée par la diffusion, qui tend à uniformiser la concentration des ampholytes dans leur zone. Un mécanisme analogue intervient bien évidemment à la cathode avec une compression des zones d'ampholytes porteurs les plus basiques.

Ensuite, la compression des zones d'ampholytes est plus importante du côté basique du gradient que du côté acide. En effet, la conductivité des zones d'ampholytes est d'autant plus importante que leur pH est extrême, en raison de la plus grande concentration en ions (H_3O^+ / HO^- et ampholytes porteurs partiellement chargés). Comme la conductivité n'est donc pas uniforme dans le capillaire, d'après la loi d'Ohm (Equation 8) le champ électrique ne l'est pas non plus. Ainsi, ce dernier sera plus faible aux pH extrêmes qu'aux pH intermédiaires. En outre, les ions H_3O^+ étant plus mobiles que les ions HO^- , la conductivité des zones d'ampholytes acides sera plus importante que celle des zones basiques et le champ électrique sera donc moins important du côté acide du gradient que du côté basique. Comme la pente du gradient de concentration dans une zone d'ampholytes donnée croît avec la vitesse électrophorétique des ions, et donc avec le champ électrique local, la compression des ampholytes et donc la pente du gradient de pH seront moindres du côté acide du gradient que du côté basique.

Enfin, le phénomène de plateau sera d'autant plus important que la tension appliquée est grande tandis qu'une augmentation de la viscosité et de la force ionique ralentit l'apparition du plateau, la mobilité des ampholytes porteurs diminuant.

1.3.4.2. Dérive cathodique

Le phénomène de dérive cathodique a notamment été expliqué par R.A. Mosher et W. Thormann [89]. Il correspond à la perte des ampholytes basiques à la frontière avec le catholyte quand le temps de focalisation augmente. Un phénomène de perte des ampholytes acides à l'anode peut également exister mais il est moins fréquent. Nous considérerons ici le cas où le capillaire est partiellement rempli d'anolyte et de catholyte. Le phénomène de dérive cathodique suit un mécanisme d'isotachophorèse, le rôle de l'ion meneur étant joué par les contre-ions du catholyte (typiquement du sodium). Il est illustré en Figure 8. La vitesse de migration de la frontière entre ions sodium et ampholytes

porteurs, et donc la vitesse de perte des ampholytes, dépendent des concentrations et des mobilités des ions composant l'anolyte et le catholyte, mais aussi de la densité de courant. Si l'on considère que la vitesse de migration isotachophorétique est imposée par le catholyte, en combinant la loi d'Ohm et la définition de la vitesse d'un ion sous champ électrique, on obtient l'expression suivante pour la vitesse de dérive cathodique :

$$v_{\text{dérive cathodique}} = \frac{m_{\text{meneur}} j}{k_{\text{catholyte}}}$$

Equation 15

Où m_{meneur} est la mobilité du contre-ion du catholyte (qui joue le rôle d'ion meneur) et s'exprime en $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, j la densité de courant dans le capillaire (en $\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$) et $k_{\text{catholyte}}$ la conductivité du catholyte (en $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$). Ainsi on limitera la vitesse de dérive en limitant la mobilité du contre-ion du catholyte, en utilisant par exemple des solutions amphotériques, en limitant la tension de focalisation de façon à diminuer la densité de courant, ou en utilisant un catholyte suffisamment concentré pour que sa conductivité soit importante.

Un phénomène analogue de perte des ampholytes acides aura également lieu à l'anode. Cependant, en fonction de la vitesse relative des migrations isotachophorétiques à l'anode et à la cathode, on observera plutôt une dérive anodique ou cathodique. Dans le cas où ces vitesses seront égales on parlera de dérive symétrique. D'après l'Equation 15, la valeur relative des deux dérives dépendra de la conductivité des anolyte et catholyte, ainsi que de la mobilité de leurs contre-ions. Si l'on considère par exemple le schéma classique où l'anolyte est de l'acide phosphorique et le catholyte de la soude, et que tous deux ont des conductivités équivalentes, on observera avant tout une dérive cathodique, les ions sodium étant plus mobiles que les ions phosphate.

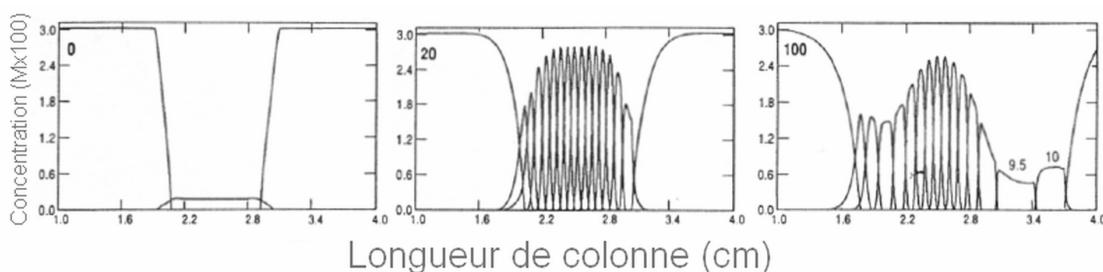


Figure 8 : Simulation numérique de la focalisation de 15 ampholytes entre des solutions à 30 mM d'acide phosphorique et de soude comme anolyte et catholyte. Temps de focalisation : 0, 20 et 100 minutes. On observe une dérive cathodique plus rapide, qui s'accompagne d'une diminution plus importante de la concentration des ampholytes basiques. Adapté de [89].

Comme illustré en Figure 8, ce phénomène de dérive cathodique (anodique) se traduit également par une diminution de la concentration des ampholytes les plus basiques (acides), ceux-ci adaptant leur concentration à celle du contre-ion du catholyte (de l'anolyte).

Enfin, il a été démontré dans des publications récentes [93] que la dérive cathodique pouvait également provenir d'une mobilité plus importante des formes cationiques des ampholytes porteurs par rapport à leurs formes anioniques. Ceci se traduit par un décalage vers la cathode du gradient de pH. On observe également dans ce cas une distorsion de ce gradient, qui devient plus plat aux pH acides et plus pentu aux pH basiques.

Une dérive anodique similaire peut également être observée si les mobilités des formes anioniques des ampholytes sont plus grandes que celles de leurs formes cationiques. Cependant, ceci est rarement le cas car les espèces anioniques étant généralement légèrement plus hydratées, elles auront des mobilités légèrement plus faibles que celles des espèces cationiques [97].

1.3.4.3. Influence de l'écoulement électroosmotique

En CIEF, la vitesse de l'écoulement électroosmotique doit être réduite pour permettre une focalisation complète des analytes avant leur détection [62]. En présence d'un écoulement électroosmotique résiduel, le contenu du capillaire sera mobilisé vers l'anode ou la cathode, en fonction du signe de la charge surfacique du capillaire. Il a cependant été démontré que si cet écoulement n'est pas suffisamment important, la totalité du gradient de pH ne quittait pas le capillaire [70, 90]. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'écoulement électroosmotique n'est pas le seul phénomène influant sur la mobilité des ampholytes porteurs. Ceux-ci seront également mobilisés vers l'anode pour les ampholytes acides et vers la cathode pour les ampholytes basiques par un phénomène d'isotachophorèse. Dans le cas d'un capillaire en silice vierge, la frontière entre les ampholytes acides et l'anolyte aura deux composantes de vitesse de directions opposées : la vitesse électroosmotique dirigée vers la cathode et une vitesse isotachophorétique dirigée vers l'anode. Si l'écoulement électroosmotique n'est pas trop important, un équilibre s'établira entre ces deux phénomènes, la frontière précédente devenant alors stationnaire, sa position étant d'autant plus décalée vers la cathode que l'écoulement électroosmotique sera important.

Dans le cas où l'on souhaite réaliser une mobilisation électroosmotique de tout le contenu du capillaire, il peut ainsi être nécessaire de greffer sa surface de façon à augmenter la vitesse de l'écoulement électroosmotique. En revanche, dans le cas d'une visualisation directe du gradient (cas courant en microsystèmes), il sera opportun de limiter au maximum cet écoulement, pour que la frontière entre anolyte et ampholytes porteurs soit le moins possible décalée vers la cathode.

1.3.4.4. Compression du gradient de pH

Une compression du gradient de pH au centre du capillaire ou du microcanal de séparation a été décrite dans plusieurs publications [87, 98-100]. Elle a notamment été attribuée à deux phénomènes différents.

Dans le cas où l'anolyte et le catholyte sont concentrés, elle peut tout d'abord être due à une diffusion de ces derniers dans l'espace de séparation. Dans ce cas, la compression peut être évitée en diminuant la concentration de ces électrolytes, tout en gardant en mémoire qu'une diminution trop importante augmentera la vitesse des dérives anodique et cathodique [87]. Une augmentation de la viscosité des électrolytes a également été proposée pour des séparations en microsystèmes. Cette solution a donné des résultats encourageants pour des puces en PDMS où de la methylcellulose était ajoutée à l'anolyte et au catholyte [98, 99]. En revanche, l'ajout de glycérine aux solutions d'électrolytes dans des puces en COC a conduit à une compression plus importante du gradient de pH [99].

La présence de sels dans l'échantillon est également à l'origine de la compression du gradient [100-102]. Si on considère par exemple la frontière entre l'anolyte et le milieu de séparation, le nombre de protons provenant de l'anolyte qui la traversent par unité de temps est donné par la relation suivante [73]:

$$N_{H^+} = \frac{I m_{H^+} n_{H^+}}{k_{anolyte}}$$

Equation 16

où I est le courant traversant le capillaire, m_{H^+} la mobilité des protons dans l'anolyte, n_{H^+} leur nombre par unité de volume et $k_{anolyte}$ la conductivité de l'anolyte.

Ainsi, en présence de sels dans l'échantillon la conductivité dans le capillaire augmentera, ce qui augmentera le courant et donc le nombre de protons entrant dans le capillaire. Une fois dans le capillaire, ces protons auront pour effet de charger les ampholytes porteurs

positivement. Ces derniers migreront alors vers la cathode. De la même façon, les ampholytes présents du côté basique migreront vers l'anode, et le gradient de pH sera confiné au centre de l'espace de séparation.

Pour limiter ce phénomène, la solution la plus évidente consiste à désaler les échantillons avant leur analyse. L'utilisation de solutions amphotériques comme anolyte et catholyte a également permis de désaler un échantillon en ligne. Liao et Zhang [101] ont utilisé pour cela une solution d'ampholytes porteurs titrés à pH 4 et 10. Dans ce cas, les ions sodium initialement présents dans le milieu de séparation sont remplacés par des ampholytes, et non plus uniquement par des ions H^+ , ce qui a pour effet de diminuer la conductivité et donc le courant dans le capillaire, d'où une compression moindre du gradient.

Enfin, comme il n'est pas toujours possible de s'affranchir des distorsions du gradient de pH dues à la présence de sels, une solution consiste simplement à utiliser des marqueurs de point isoélectrique qui entourent au plus près les protéines d'intérêt [47, 102, 103]

1.3.4.5. Modification du gradient de pH

En fonction des analytes ciblés, il peut être intéressant de modifier la forme du gradient de pH. La solution la plus simple pour cela consiste à utiliser en même temps plusieurs mélanges commerciaux d'ampholytes de gammes de pH différentes.

Il est également possible d'ajouter des composés amphotériques au mélange initial d'ampholytes porteurs ([83], page 284). Ces espaces se focaliseront à leur point isoélectrique dans le gradient de pH et l'aplatiront localement. Cette diminution de la pente du gradient de pH est ainsi un moyen d'augmenter le pouvoir résolutif de la séparation à un pH donné, correspondant au point isoélectrique de l'ampholyte choisi.

Lorsque l'on veut analyser des protéines basiques, l'ajout de TEMED (N,N,N',N' -tetramethyléthylenediamine) au mélange initial d'ampholytes est relativement classique [104]. Ce composé organique extrêmement basique s'insérera entre les ampholytes et le catholyte, ce qui aura pour effet d'augmenter le pH des analytes pouvant être séparés, et également de « bloquer » le gradient de pH avant le détecteur.

Il est même possible d'analyser par IEF des protéines dont le point isoélectrique n'est pas compris dans la gamme du gradient de pH [104, 105]. Pour cela, les protéines à analyser sont injectées entre deux zones d'ampholytes porteurs. Lors de l'application de la tension de focalisation, le gradient de pH se forme et les protéines migrent dans le gradient de pH.

Celles dont le pI n'est pas compris dans la gamme de ce gradient ne seront pas focalisées, leur mais seront tout de même séparées en fonction de leur différence de mobilité. Cette technique permet d'obtenir des efficacités plus importantes qu'en électrophorèse de zone. Au cours de leur migration, les protéines se rapprocheront en effet de leur point isoélectrique, elles deviendront donc de moins en moins mobiles, ce qui engendrera un phénomène de préconcentration important.

1.3.5. Autres types de gradients de pH

Les premiers essais de formation d'un gradient de pH n'ont pas été réalisés grâce à l'utilisation de mélanges d'ampholytes porteurs, non disponibles alors, mais par électrolyse de l'eau [61], qui conduit à la formation de protons à l'anode et d'ions hydroxyde à la cathode [106]. Il est également possible d'utiliser un acide et une base comme anolyte et catholyte [107, 108]. Dans les deux cas, c'est la diffusion des protons et des ions hydroxydes à l'intérieur du capillaire qui est à l'origine du gradient de pH. Il faut cependant noter que la stabilité de ce type de gradient pour la séparation de protéines est discutée [61, 109].

En revanche, il est possible de s'affranchir de l'utilisation d'ampholytes porteurs lorsque l'on analyse des mélanges complexes de peptides en IEF [76, 110]: ces derniers étant des ampholytes, ils vont former eux-mêmes un gradient de pH. Cette technique d'autofocalisation est particulièrement avantageuse pour le couplage à la spectrométrie de masse, l'absence d'ampholytes porteurs améliorant la sensibilité.

La formation d'un gradient de pH par effet Joule a également été décrite [111, 112]. Cette technique requiert l'utilisation d'un canal dont la section n'est pas constante, et d'un électrolyte dont le pH varie avec la température. En chauffant le microsystème, on obtient un échauffement non uniforme du canal de séparation et donc un gradient de pH.

Enfin, l'utilisation de gradients de pH immobilisés (IPG) permet de s'affranchir des déformations observées avec l'utilisation d'ampholytes porteurs en solution [113]. Cette technique est principalement utilisée en gel de polyacrylamide, les ampholytes porteurs de différents pI étant liés de manière covalente à des monomères d'acrylamide. Cette

technique a récemment été adaptée au format capillaire. Zhu *et al.* [114] ont ainsi immobilisé des ampholytes porteurs commerciaux sur des colonnes monolithiques.

1.4. Electrophorèse capillaire de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes (CABCE)

1.4.1 Utilisation de solutions peu conductrices en ECZ

L'intérêt des séparations rapides en ECZ est double : en plus du gain de temps, essentiel pour des analyses à haut débit, plus une séparation sera rapide, moins les analytes diffuseront et plus l'efficacité sera importante [34]. On aura donc intérêt en ECZ à appliquer un champ électrique important de façon à augmenter la vitesse des analytes. Cependant, l'efficacité ne croît avec le champ électrique appliqué qu'en présence d'un effet Joule négligeable. Ainsi, l'application de champs électriques très élevés ne sera permise qu'en présence d'électrolytes peu conducteurs, qui induisent peu d'effet Joule.

Pour cela, il est possible de travailler en milieu hydroorganique [34, 115], mais aussi d'utiliser des molécules amphotériques comme électrolyte porteur [116]. Mandecki et Hayden ont ainsi travaillé dès 1988 avec une solution isoélectrique d'histidine en gel d'électrophorèse pour la séparation d'oligonucléotides [117]. En 1995, Hjertén a proposé le premier de travailler avec des tampons isoélectriques en électrophorèse capillaire [118]. Pour diminuer la conductivité des électrolytes de séparation, il a alors recommandé d'utiliser des ions volumineux ayant une charge faible à leur pKa, ou des molécules amphotères de masse moléculaire élevée, ou encore des solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes, habituellement utilisées en CIEF, les meilleurs résultats ayant été obtenus avec ces dernières. Cependant, ce sont surtout les acides aminés qui ont été utilisés comme électrolytes supports de faible conductivité. L'équipe de P.-G. Righetti a notamment utilisé pour la séparation d'oligonucléotides et de protéines des molécules telles que l'histidine [119, 120], ou les acides iminodiacétique [121, 122], aspartique [123, 124], cystéique [125] ou glutamique [126]. Rodemann *et al.* ont également introduit une nouvelle classe de molécules quasi-isoélectriques, qui comportent un groupement acide totalement dissocié et deux fonctions amines partiellement protonées qui assurent le pouvoir tampon de l'électrolyte. Ces fonctions acido-basiques sont attachées à un

squelette transparent aux UV, ce qui fait de ces molécules des électrolytes de choix pour la détection UV indirecte [127]. D'autres équipes ont travaillé elles aussi en électrolytes isoélectriques pour obtenir des séparations rapides de protéines ou de peptides [128-130].

Pour obtenir des résultats satisfaisants en ECZ, les solutions amphotériques doivent cependant présenter des propriétés physico-chimiques adaptées. Ces solutions doivent bien évidemment assurer la conduction du courant électrique pour permettre la migration des espèces. Même à faible conductivité, cette condition est pour ainsi dire toujours réalisée, ne serait-ce que grâce à la présence d'ions provenant de la dissociation de l'eau. Les solutions amphotériques doivent ensuite permettre de maintenir un pH constant sur toute la longueur de séparation, sous peine d'observer un élargissement des pics d'analytes. Ceci se mesure par le pouvoir tampon β , caractérisant la capacité d'une solution à maintenir son pH en dépit d'un ajout d'une base ou d'acide fort, et défini par la relation suivante :

$$\beta = \frac{dC_b}{d(pH)}$$

Equation 17

Où dC_b représente l'augmentation de la concentration en base forte nécessaire pour faire varier le pH de la solution considérée de $d(pH)$.

En pratique, on considère qu'une espèce ayant des propriétés acido-basiques aura un pouvoir tampon correct pour des pH situés à moins d'une unité de son pK_a [34]. Cette propriété limite le nombre d'ampholytes utilisables comme électrolyte en CZE. En effet, si l'on considère un ampholyte « simple » possédant uniquement une fonction acide et une fonction basique, ses deux pK_a devront tous les deux être distants de moins d'une unité pH de son point isoélectrique pour présenter une capacité tampon satisfaisante une fois dilué dans l'eau [61].

Pour distinguer les « bonnes » solutions isoélectriques des « mauvaises », Stoyanov et Righetti ont ainsi proposé d'utiliser le rapport pouvoir tampon sur conductivité [131], qui rend compte de la capacité d'un électrolyte à permettre des séparations rapides tout en générant des efficacités importantes.

L'utilisation de composés amphotériques comme électrolytes supports a cependant été mise en doute [132, 133], notamment parce que leur faible conductivité limite leur

capacité de chargement. Dans ce cas, l'analyse de solutions trop concentrées devient en effet impossible à cause d'un élargissement trop important des bandes d'analytes. Pour pallier ces problèmes de faible capacité de chargement, Beckers [132] recommande ainsi d'utiliser les composés amphotériques comme électrolyte support uniquement à forte concentration ou à des pH éloignés de leur point isoélectrique, bien que leur conductivité ne puisse plus être considérée comme faible.

Il semble ainsi délicat de trouver une molécule amphotérique aux propriétés adéquates pour permettre des séparations à la fois rapides et satisfaisantes en termes d'efficacité, et les solutions d'ampholytes porteurs d'intervalle étroit de pH apparaissent comme une alternative intéressante.

1.4.2. La courbe d'électrotitrage (CET). Fractionnement des ampholytes porteurs.

L'électrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes est en fait déjà utilisée depuis de nombreuses années comme deuxième dimension de séparation d'une technique électrophorétique particulière : la courbe d'électrotitrage.

La CET d'une protéine peut être décrite comme l'évolution de la mobilité électrophorétique d'une protéine en fonction du pH. Elle est très utile, notamment pour déterminer le point isoélectrique de protéines cibles et pour optimiser le pH de séparation d'un mélange protéique en électrophorèse de zone.

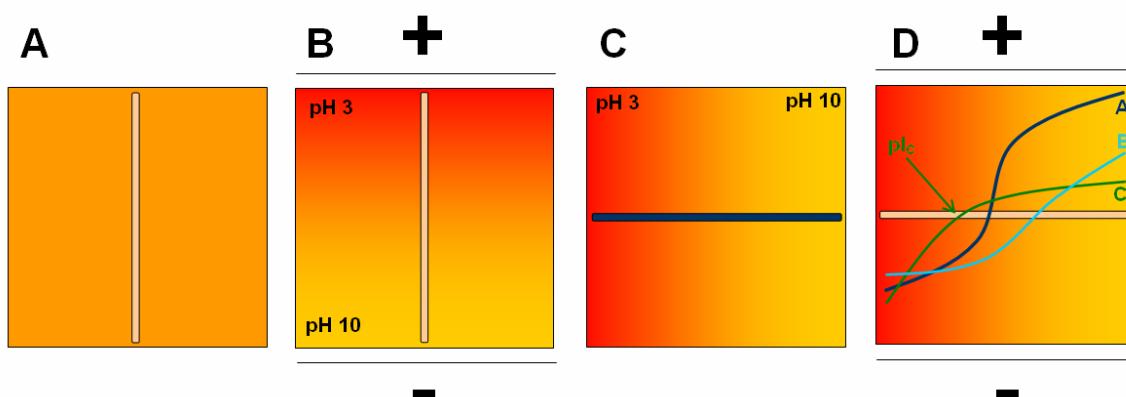


Figure 9: Principe de la séparation de 3 protéines par la technique de la courbe d'électrotitrage.

Il est bien évidemment possible de l'obtenir en électrophorèse capillaire, mais la procédure à suivre est longue et laborieuse dans la mesure où elle requiert un nombre d'analyses important et la préparation de nombreux électrolytes sur une large gamme de pH. La CET d'une ou plusieurs protéines est bien plus simple à obtenir par électrophorèse en gel mince. Dans ce cas, on utilise un gel contenant des ampholytes de large gamme de pH, au centre duquel on aura préalablement formé une rigole sur toute sa largeur (Figure 9A). Les ampholytes sont d'abord focalisés pour former un gradient de pH dans la direction de cette rigole (Figure 9B). Le gel est ensuite tourné de 90° et l'échantillon à analyser est placé dans la rigole (Figure 9C). Enfin, un champ électrique est de nouveau appliqué. Dans chacune des portions du gel les protéines migrent par un mécanisme d'électrophorèse de zone, les électrolytes supports étant en fait constitués d'une bande étroite d'ampholytes porteurs focalisés à leur point isoélectrique (Figure 9D). Cette deuxième étape de séparation pourra donc se faire sous champ électrique élevé, la conductivité de tels électrolytes étant très faible. Une fois la coloration du gel réalisée, on pourra alors visualiser la distance parcourue par les analytes en fonction du pH, et en déduire leur mobilité.

La CET semble donc montrer que les fractions d'intervalle étroit de pH peuvent être utilisées comme électrolyte support de faible conductivité. Pour les utiliser en ECZ, il faut cependant fractionner des mélanges commerciaux d'ampholytes porteurs. Les différentes techniques utilisées ont déjà été décrites en détails [34, 83]. Il est entre autres possible d'utiliser l'électrophorèse en gel granuleux selon la technique décrite par Radola en 1973 [134, 135]. Cette technique a été utilisée au laboratoire lors de la thèse de Jean-Marc Busnel [34]. Le Rotofor, appareil commercial de la société Biorad, représente une alternative plus rapide aux gels granuleux. Son principe est présenté en Figure 10. Il permet de réaliser des séparations par IEF dans une cellule cylindrique séparée en 20 compartiments. Cette cellule est isolée des chambres d'anolyte et de catholyte par des membranes échangeuses d'ions (Figure 10A). Elle tourne sur elle-même autour d'une tige thermostatée, la rotation permettant d'éviter les phénomènes de précipitation gravitationnelle (Figure 10B). Une fois la focalisation terminée, les 20 fractions sont collectées par un système d'aspiration et sont directement utilisables (Figure 10C).

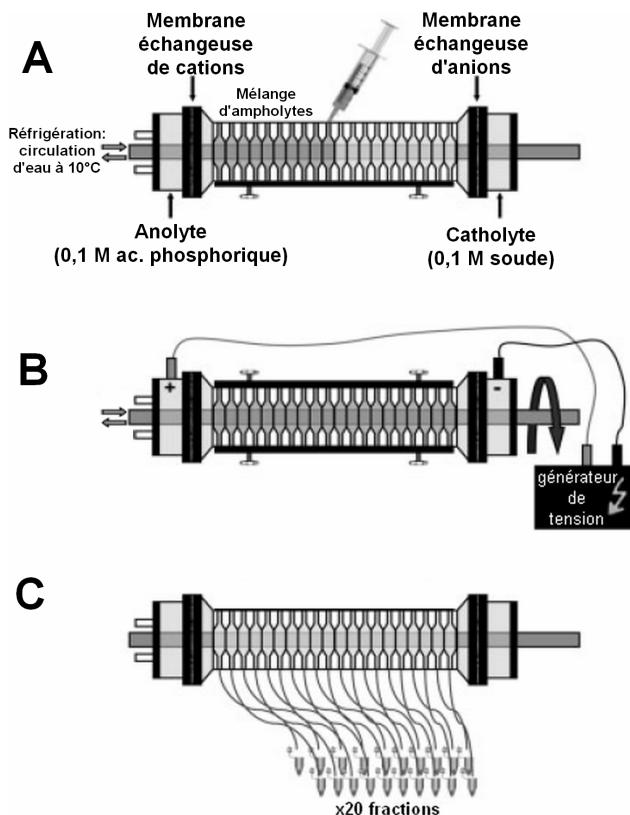


Figure 10 : Schéma de principe d'un fractionnement d'ampholytes porteurs avec le Rotofor.
A : remplissage de la cellule de focalisation. **B :** focalisation des ampholytes. **C :** collecte des fractions focalisées. Adapté de [86].

1.4.3 Electrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes (CABCE).

Pour des raisons de simplicité, l'abréviation NC, pour « narrow cut » en anglais, sera utilisée par la suite pour désigner les coupes étroites d'ampholytes porteurs.

L'utilisation des NC comme électrolytes de séparation en CZE a été introduite par Hjertén [118], et leur potentiel a notamment été démontré par J.-M. Busnel lors de son doctorat [34].

Après avoir fractionné un mélange d'ampholytes Serva 4-9 par la technique de Radola [134, 135], il a tout d'abord mis en évidence la faible conductivité et le pouvoir tampon correct des NC obtenus [136].

Les conductivités des fractions obtenues sont présentées en Figure 11. En dehors des fractions très acides et très basiques, où la contribution des ions H^+ et HO^- n'est plus négligeable, les conductivités des NC à 4% v/v ($\sim 0,4\%$ m/v) étaient inférieures à 40 mS/m, alors qu'à titre de comparaison, un électrolyte phosphate de pH 6,95 et de force ionique 100 mM présente une conductivité de 550 mS/m.

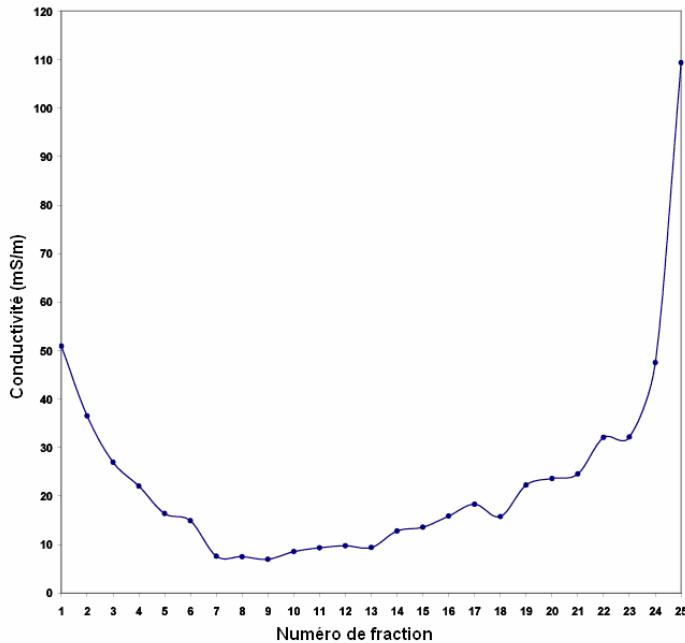


Figure 11 : Conductivités de NC obtenues par fractionnement sur gel granuleux de Serva 4-9, diluées à 4%v/v [136].

Le pouvoir tampon de ces mêmes NC est quant à lui présenté en Figure 12. La courbe obtenue présente un profil similaire à celle de la conductivité, les fractions intermédiaires ayant le pouvoir tampon le plus faible. Les valeurs obtenues restaient inférieures à la capacité tampon d'un électrolyte classique (21mM/pH pour un électrolyte phosphate de pH 6,95 et de force ionique 100 mM), mais étaient tout de même satisfaisantes vu la faible concentration utilisée pour les NC.

Ainsi, 20 fractions obtenues sur 25 possédaient des propriétés encourageantes en termes de conductivité et de pouvoir tampon. En outre, la capacité de chargement des NC a été évaluée par des mesures de fonction de régulation de Kohlrausch et il a été démontré qu'elle était supérieure à celle d'une solution d'histidine à 10 mM ou même d'un électrolyte non isoélectrique [137].

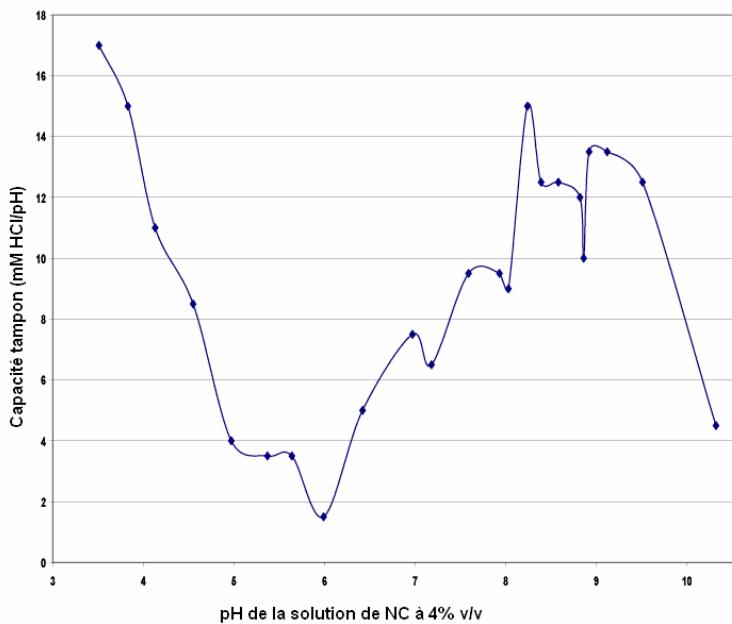


Figure 12 Capacité tampon de NC obtenues par fractionnement sur gel granuleux de Serva 4-9, diluées à 4%v/v. Fractions identiques à celles de la figure précédente [136].

Ensuite, l'utilisation des NC en CZE a donné de bons résultats, à la fois pour la séparation de protéines [33, 138] et de peptides [139], mais aussi en couplage à la spectrométrie de masse pour l'analyse de digestats trypsiques [140].

Il a également été démontré que différents types de préconcentration en ligne pouvaient être mis en œuvre en CABCE pour augmenter la sensibilité des analyses. Tout d'abord, la faible mobilité des ampholytes permet d'intégrer une étape transitoire d'ITP en début d'analyse, les ampholytes servant d'ions terminaux. Il est pour cela nécessaire d'introduire un ion meneur, soit sous forme d'une zone précédant celle de l'échantillon, soit directement dans la solution à analyser. Cette technique a notamment permis l'analyse d'un échantillon réel de lait écrémé [141].

Il est également possible de préconcentrer en ligne des échantillons par amplification de champ électrique, en injectant les composés grâce à de longues injections hydrodynamiques et/ou électrocinétiques [34, 142].

Ces deux techniques de préconcentration ont enfin été couplées pour l'analyse de digestats trypsiques de protéines [142, 143].

Ainsi, les capacités de séparation des NC en CZE ont largement été démontrées et devraient donner des résultats prometteurs lors de leur utilisation en microsystèmes.

1.5. Microsystèmes pour la séparation de protéines

Le premier système séparatif miniaturisé a été décrit en 1979. C'était un appareil de chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse de l'air [144]. Cependant la miniaturisation des systèmes analytiques s'est surtout développée depuis le début des années 1990. En effet, l'utilisation de systèmes miniaturisés permet d'intégrer plusieurs étapes de la chaîne analytique sur un même support, de réaliser des analyses à haut débit, mais également d'utiliser des volumes moindres d'échantillons et de solvants. De plus le couplage de plusieurs dimensions de séparation est en général plus souple en système miniaturisé qu'en système classique. L'apparition de plateformes commerciales (μ ChemLabTM de Sandia ou BioanalyzerTM d'Agilent), surtout utilisées pour l'électrophorèse en gel, a permis de réaliser des séparations automatisées en microsystèmes.

Bien que des systèmes de chromatographie en phase liquide sur puce en couplage à la spectrométrie de masse soient disponibles commercialement (Agilent), la miniaturisation des séparations chromatographiques reste complexe, pour deux raisons principales. La faible dimension des canaux impose tout d'abord l'application de fortes surpressions, ce qui n'est pas toujours facile à mettre en œuvre, et le remplissage des microcanaux avec des phases stationnaires peut se révéler délicat. En outre, l'obtention de résolutions satisfaisantes en chromatographie en phase liquide reste difficile à obtenir sur des petites dimensions de séparation. Ainsi, les séparations électrophorétiques sont beaucoup plus courantes en microsystèmes, du fait de la facilité de manipulation de fluides par application de champs électriques. Plusieurs revues récentes traitent de ces séparations électrophorétiques en microsystèmes [145-148], dont une s'intéresse plus particulièrement à la séparation de protéines [148].

1.5.1. Matériaux utilisés pour la fabrication de microsystèmes analytiques et traitements de surface

Les tous premiers microsystèmes analytiques étaient fabriqués en silicium, mais ce matériau, précédemment utilisé en microélectronique, a rapidement été abandonné car ses propriétés de conduction ne permettaient pas l'application de champs électriques élevés [149]. Les supports en verre (incluant quartz, silice fondue, verre de borosilicate...) sont quant à eux très utilisés en raison de leurs excellentes propriétés optiques, de leur très

bonne résistance chimique et de leur similitude avec les capillaires utilisés en EC, dont les propriétés de surface sont bien connues et maîtrisées. Cependant, la fabrication de microsystèmes en verre est coûteuse, laborieuse, et nécessite des produits chimiques dangereux tels que l'acide fluorhydrique, utilisé pour graver les canaux. Ainsi, l'utilisation de matériaux polymériques s'est beaucoup développée ces dernières années, car leur fabrication est relativement simple et ils sont beaucoup moins onéreux, ce qui permet d'envisager des systèmes à usage unique. Ces matériaux peuvent être classés en plusieurs catégories, suivant le type de polymère utilisé. Ils comprennent les matériaux élastomériques, comme le polydiméthylsiloxane (PDMS), dont la souplesse permet l'intégration de valves facilitant la manipulation des fluides, les résines, incluant les résines epoxy type « SU-8 » très utilisées en microfabrication, et les matériaux thermoplastiques tels le polyméthacrylate de méthyle (PMMA ou Plexiglas), le polycarbonate (PC) ou le copolymère d'oléfines cycliques (COC). Cependant, ces matériaux ont souvent des propriétés moins satisfaisantes que le verre, notamment en ce qui concerne la résistance chimique, l'autofluorescence et l'adsorption des analytes à leur surface. En outre, leur chimie de surface est moins maîtrisée que celle des systèmes en verre.

Que l'on utilise des microsystèmes en verre ou polymériques, il est souvent nécessaire de traiter la surface des canaux [150], à la fois pour obtenir un écoulement électroosmotique plus répétable et pour limiter l'adsorption des protéines. En effet, la plupart des injections en microsystèmes sont électrocinétiques, et la quantité d'analyte injecté dépend donc de la vitesse de l'écoulement électroosmotique. D'autre part, lorsque l'on analyse des protéines, leur adsorption modifie localement le potentiel ζ et donc l'écoulement électroosmotique. Ceci étant dommageable à la fois en termes d'efficacité, de reproductibilité des temps de migration et de possibilité de quantification, il est préférable de limiter cette adsorption par un traitement de surface approprié. Plusieurs solutions sont envisageables et ont été décrites dans de nombreuses revues [6, 29, 145, 148, 150-152].

Si l'on considère tout d'abord les systèmes en verre, la procédure la plus simple consiste à ajouter un additif (polymère ou tensioactif) directement dans l'électrolyte de séparation : on parle alors de greffage dynamique. Des polymères neutres et hydrophiles dérivés de cellulose tels que l'hydroxyéthylcellulose (HEC), l'hydroxypropylcellulose (HPC) ou l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) sont très utilisés en greffage dynamique. Ils

peuvent également servir de matrice de tamisage pour la séparation d'ADN. Plusieurs classes de tensioactifs (anioniques, cationiques, zwitterioniques ou neutres) peuvent être utilisés pour limiter l'adsorption des protéines. Les tensioactifs cationiques permettent en outre d'inverser le sens de l'écoulement électroosmotique et ils évitent les interactions électrostatiques des protéines basiques avec les parois des canaux. Cependant, les tensioactifs ioniques sont en général dénaturants et empêchent l'analyse des protéines sous forme native. Ce n'est pas le cas des tensioactifs zwitterioniques, qui permettent en outre de limiter l'écoulement électroosmotique et évitent l'adsorption des protéines par des interactions électrostatiques. L'utilisation de tensioactifs neutres est également possible, mais il a été démontré que ces derniers étaient moins efficaces que leurs homologues zwitterioniques pour la limitation de l'adsorption des protéines [153]. L'addition à l'électrolyte de séparation de petites molécules telles que des amines permet aussi de modifier l'écoulement électroosmotique et de limiter l'adsorption des protéines.

Le greffage covalent d'un polymère à la surface des canaux est également très utilisé, cette technique étant plus complexe à mettre en œuvre, mais donnant souvent de meilleurs résultats. Cette solution permet également de régler les problèmes d'incompatibilité de l'additif avec la détection des analytes (spectrométrie de masse, détection par sonde de fluorescence...). Le polymère le plus utilisé pour cela est sans doute le polyacrylamide. Il peut être polymérisé *in situ*, selon la procédure décrite par Hjertén en 1985 [62], où un groupement réactif est alors préalablement greffé à la surface des canaux via une étape de silanisation. Une autre technique consiste à réaliser la polymérisation de l'acrylamide avant son introduction dans le capillaire, le polymère déjà formé étant alors attaché à la surface des canaux dans une deuxième étape. D'autres polymères tels que l'alcool polyvinyle (PVA) ou l'oxyde de polyéthylène (PEO) ont aussi été greffés à la surface de canaux en verre de manière covalente.

Une solution intermédiaire consiste à adsorber un polymère à la surface du canal, via des liaisons non covalentes mais suffisamment fortes pour ne pas nécessiter sa présence dans l'électrolyte de séparation. Ainsi, le PVA ou l'HPC peuvent être immobilisés thermiquement, suivant des procédures décrites en format capillaire [154, 155]. Les greffages cationiques peuvent se révéler très utiles pour la séparation de protéines basiques : il est possible pour cela d'utiliser du polybrène, du polyéthylèneimine (PEI) ou du chitosan, qui sont simplement adsorbés sur les parois du canal.

Le traitement de surface des microsystèmes polymériques est d'autant plus crucial que leur surface est souvent plus hydrophobe que celle des puces en verre. Les mêmes types de greffages que ceux décrits dans le paragraphe précédent peuvent être utilisés pour la modification de surface de matériaux polymériques, mais des procédures spécifiques sont également disponibles.

Ainsi, l'incorporation de monomères hydrophiles au mélange à polymériser pour la fabrication des microsystèmes a permis de diminuer l'hydrophobie du PMMA et du PDMS [151].

L'oxydation des fonctions Si-CH₃ en Si-OH du PDMS par passage au plasma d'oxygène est une technique très employée pour rendre la surface de ce matériau plus hydrophile et augmenter la vitesse de l'écoulement électroosmotique. L'efficacité de cette modification est parfois modeste en ce qui concerne l'adsorption des protéines et reste peu stable dans le temps, bien que des procédures aient été décrites pour pallier partiellement ce problème [148].

Si les mêmes polymères que ceux utilisés pour le verre peuvent être utilisés pour greffer la surface des microsystèmes polymériques, les procédures d'activation sont bien évidemment différentes. L'intégration de groupements de surface réactifs peut notamment être réalisée par passage au plasma, irradiation aux UV (pour réaliser une polymérisation radicalaire) ou par traitement chimique. Cette dernière méthode a notamment été utilisée pour former des fonctions amines à la surface du PMMA, ces amines servant d'intermédiaire réactionnel ou étant utilisées telles quelles pour augmenter la vitesse de l'écoulement électroosmotique [152].

Ainsi, une grande variété de traitements de surface a été décrite dans la littérature, mais il n'existe pas de procédure universelle permettant d'obtenir par un protocole simple un greffage parfaitement stable, régulant l'écoulement électroosmotique et empêchant totalement l'adsorption des protéines. Lorsqu'il choisit son traitement de surface, l'expérimentateur doit donc faire des compromis entre efficacité, stabilité, facilité de mise en œuvre et bien entendu compatibilité du traitement envisagé avec la méthode d'analyse utilisée.

1.5.2. Dérivation de protéines pour la détection de fluorescence

Le mode de détection le plus utilisé en microsystèmes est de loin la fluorescence, en raison avant tout de sa très grande sensibilité [156]. De plus, les dispositifs pour la détection UV (Shimadzu MCE-2010) ne sont disponibles commercialement que depuis peu [157]. La détection de protéines par fluorescence a été décrite dans plusieurs revues [158-160]. Elle peut être induite par laser : sa sensibilité est alors optimale en raison de l' excellente focalisation du faisceau lumineux. Cependant, le coût des lasers à gaz (argon, helium-néon...) reste élevé. Des lasers à diode, moins onéreux, ont donc été développés, ainsi que des sources de lumière utilisant des diodes électroluminescentes. Ces dernières ne sont pas des sources laser, mais présentent de très bonnes propriétés optiques, sont peu onéreuses et bien adaptées à l'intégration dans des systèmes miniaturisés. Il est également possible de travailler avec des lampes (à mercure par exemple) munies de filtres, qui permettent de travailler avec des longueurs d'ondes différentes selon le filtre utilisé, bien que la sensibilité soit alors plus faible.

L'inconvénient majeur de la détection par fluorescence est qu'elle n'est pas universelle. Si l'on considère les protéines, la plupart ne sont pas fluorescentes naturellement. Il faut pour cela qu'elles comportent des acides aminés aromatiques. Elles peuvent alors être excitées entre 260 et 280 nm. Certaines protéines comme les phycobiliprotéines, extraites d'algues, et la GFP (*Green Fluorescent Protein*), provenant de la méduse *Aequora victoria*, sont également fluorescentes en raison de leur structure particulière, et présentent des longueurs d'onde d'excitation dans le domaine du visible.

Cependant, dans la plupart des cas, une dérivation des protéines cibles avec un marqueur fluorescent est nécessaire. Celle-ci peut avoir lieu avant la séparation (*pre-column*), directement dans le canal de séparation (*on-column*) ou après la séparation (*post-column*). Le marquage avant la séparation est très souple et particulièrement adapté à une réaction de dérivation lente ou nécessitant un milieu réactionnel non compatible avec le milieu de séparation, mais conduit souvent à des multimarquages des analytes, qui perturbent bien évidemment la séparation. La dérivation *on-column* est très pratique, mais nécessite une cinétique de réaction rapide entre la protéine et son marqueur. Enfin, la dérivation *post-column* permet quant à elle de ne pas perturber la séparation des analytes. Cependant ce mode de détection nécessite des dispositifs particuliers après le canal de séparation et induit en général une dilution de l'échantillon qui diminue la sensibilité. De plus, les

réactions de dérivation doivent alors être suffisamment rapides pour maintenir l'efficacité de la séparation.

Le marquage des protéines peut être effectué de manière covalente ou non. Dans le cas d'un marquage covalent, le marqueur de fluorescence réagit le plus souvent avec les fonctions amines primaires des protéines, N-terminales ou situées sur les résidus lysine. La réaction avec les fonctions amines des résidus arginine a lieu quant à elle uniquement à pH basique. La dérivation via les fonctions acides carboxyliques des protéines est possible, mais nécessite une activation préalable de ces groupements. Les fonctions thiol des cystéines sont très réactives, mais ces résidus sont malheureusement peu abondants. Enfin, dans le cas de l'analyse de glycoprotéines, la dérivation peu être effectuée par réaction avec la partie réductrice des sucres. La détection de fluorescence se fait en général en utilisant des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 350 et 650 nm, du fait des lasers disponibles et de l'efficacité des photomultiplicateurs dans cette gamme de longueur d'onde. Les principaux marqueurs réagissant avec les fonctions amines primaires des protéines sont présentés en Tableau 3.

Marqueur	Nom complet	λ_{exc}	Particularités
OPA	Ortho-phtalaldéhyde	325 nm	Réaction rapide, en présence de mercaptoéthanol
NDA	Naphtalene-2,3-dicarboxaldéhyde	325-460 nm	Analogue de l'OPA, dérivés plus stables
FC	Fluorescamine	488 nm	Réaction rapide, peu soluble dans l'eau
FQ	3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldéhyde	488 nm	Formation de dérivés indoles très fluorescents en présence de KCN
6-AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate	325 nm	Réaction avec les amines I et II. Formation d'une fonction urée, diminuant le pI des protéines
NBD-F et NBD-Cl	4-fluoro- et 4-chloro-7-nitrobenzofurazan	488 nm	Solubles dans ACN, réaction rapide à 50-60 °C avec les amines I et II
FITC	Fluorescein isothiocyanate	488 nm	Réaction lente, très fluorescent, réaction spécifique avec les amines α
Py-1 et Py-6	Molécules possédant un groupe pyrilium et un groupe aromatique	503 nm 540 nm	Changent de couleur une fois liés aux protéines.

Tableau 3 : Principaux marqueurs covalents réagissant avec les fonctions amines des protéines.
D'après [158-160]

Quelques sondes, dérivées de rhodamine ou de cyanine permettent de travailler à des longueurs d'onde d'excitation plus élevées, ce qui permet de limiter fortement le bruit de fond. Enfin, les sondes Alexa Fluor (Molecular Probes) et Chromeo (Chromo) sont

disponibles à plusieurs longueurs d'onde d'excitation et avec plusieurs types de groupements réactifs.

Le marquage non covalent des protéines est souvent moins complexe à mettre en place que le marquage covalent, et requiert moins de manipulations des échantillons. Les sondes non covalentes se lient rapidement avec les protéines via des interactions électrostatiques ou hydrophobes. Leur longueur d'onde d'excitation est souvent supérieure à 500 nm. On peut citer parmi elles les *albumin blue*, réagissant spécifiquement avec les albumines ou l'*indocyanine green*. Il existe également des sondes solvatochromiques, qui changent de couleur en fonction de la polarité du milieu dans lequel elles se trouvent. Elles comprennent notamment les dérivés de sulfonate de N-arylamino naphtalène (ANS), le MC540 (merocyanine 540), très soluble dans l'eau, et enfin le NanoOrange ainsi que les sondes SYPRO, commercialisées par la société Molecular Probes. Ces dernières sondes ont été préférées à un marquage covalent pour la séparation de protéines par IEF [161], du fait de la faible modification de pI qu'elles entraînent, attribuée à leur interaction avec les protéines uniquement par liaisons hydrophobes. Cependant cette interprétation a été contestée [161, 162].

Ainsi, plusieurs types de réactions peuvent être mis en œuvre pour la dérivation de protéines avec un marqueur fluorescent. Cependant, la dérivation covalente *pre-column* reste la technique la plus utilisée en raison notamment de sa souplesse d'utilisation. Elle est très sensible mais des pertes en résolution et en efficacité sont souvent observées en raison de multimarquages. La dérivation non covalente avec des sondes de fluorescence est quant à elle très facile à mettre en œuvre. Elle est utilisée sur des appareils commerciaux (Agilent, Biorad), mais présente une sensibilité relativement faible. Il faut toutefois remarquer que de nombreuses études portant sur le développement de nouveaux microsystèmes sont réalisées avec des protéines naturellement fluorescentes (GFP...), ce qui évite d'ajouter à la mise au point du microsystème celle d'une réaction de dérivation.

1.5.3. Séparations monodimensionnelles de protéines

1.5.3.1. Electrophorèse en gel

Depuis les premiers travaux de l'équipe de Schultz en 1999 [163], l'électrophorèse en gel est devenue la technique de séparation électrophorétique la plus utilisée en microsystèmes

pour la séparation de protéines, qui sont alors en général traitées au SDS. Ceci est certainement dû à la disponibilité d'appareils commerciaux, qui permettent d'automatiser les analyses. Ainsi, le *Bioanayzer* d'Agilent a été utilisé pour de nombreuses applications, qui ont été passées en revue par l'équipe de Myriam Taverna [148]. La qualité de céréales a par exemple pu être évaluée après extraction et séparation de leurs protéines [164]. Cet appareil est utilisé pour la séparation en gel de polydiméthylacrylamide avec une détection par fluorescence et un marquage non covalent des protéines analysées [165]. Cependant, la présence de SDS en concentration relativement importante dans l'électrolyte diminue fortement la sensibilité, le SDS interagissant avec la sonde de fluorescence utilisée. Ainsi, un dispositif astucieux de dilution de l'électrolyte a été ajouté après le canal de séparation, pour permettre la dilution du SDS sous sa concentration micellaire critique et diminuer fortement la limite de détection du système. La plateforme *Experion* de Biorad, fonctionnant sur un principe similaire, a permis notamment d'analyser le protéome urinaire pour le diagnostic clinique [166]. En l'absence de dispositif commercial, les séparations par électrophorèse en gel sont en général réalisées dans des puces en verre [167-170], mais aussi dans des microsystèmes en PMMA [171]. Ainsi, Fruetel *et al.* ont développé un système portable dénommé μ ChemLab, utilisé pour la séparation de variants de biotoxines protéiques, en électrophorèse de zone et en présence de gel Beckman [167]. La séparation des protéines du plasma a quant à elle été réalisée en présence d'oxyde de polyéthylène (PEO), les auteurs ayant constaté que cette matrice de tamisage conduisait à un faible bruit de fond de fluorescence [168]. L'électrophorèse en gel a également été couplée à des étapes de préconcentration des protéines. L'équipe de Ramsey a ainsi pu obtenir une limite de détection de 100 fM pour l'ovalbumine marquée à la fluorescéine en utilisant deux systèmes de canaux distincts et parallèles séparés par une membrane de silice poreuse [172]: l'échantillon à étudier passe d'abord à travers la membrane, sur laquelle les protéines sont préconcentrées. Ces protéines sont ensuite transférées de cette membrane vers le canal de séparation. L'équipe de Hatch a utilisé une approche différente consistant à polymériser *in-situ* un gel de polyacrylamide directement dans la zone d'injection du microsystème [173]. Ce dispositif astucieux a permis d'obtenir des facteurs de préconcentration supérieurs à mille en moins de cinq minutes.

1.5.3.2. Electrophorèse de zone

La faisabilité de la séparation de protéines par électrophorèse de zone a été démontrée sur des séparations de protéines modèles, dans des conditions variées [174-180]. Le groupe de Ramsey a utilisé un schéma de canaux relativement simple mais élégant pour permettre la dérivation des protéines en ligne une fois la séparation effectuée. Une résolution satisfaisante a été obtenue en 40 secondes pour la séparation de l' α -lactalbumine et des β -lactoglobulines A et B [174]. La séparation de protéines par électrophorèse de zone a été couplée à une étape de préconcentration par ITP sur une puce en PMMA [177] : pour un mélange de plusieurs protéines modèles, la reproductibilité des temps de migration était très satisfaisante (coefficients de variation de l'ordre de 0,5%) et les limites de quantification atteignaient quelques $\mu\text{g/mL}$, sachant que la détection était effectuée par mesure de conductivité. Shadpour *et al.* ont développé un microsystème en polycarbonate comportant 16 canaux, utilisé pour la séparation en parallèle de protéines modèle à pH acide et en présence d'un greffage dynamique à la methylhydroxycellulose [180]. Enfin, comme indiqué dans le paragraphe précédent, Fruetel *et al.* ont également séparé des variants de biotoxines protéiques en électrophorèse de zone sur un système portatif. [167].

Toutefois, le potentiel de l'électrophorèse de zone pour la séparation d'échantillons complexes reste limité, en raison notamment de l'impossibilité d'appliquer des champs électriques très élevés sans observer d'effet Joule et de la nécessité d'avoir des canaux assez longs pour obtenir des résolutions satisfaisantes. Cependant, comme cette technique est simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir des séparations rapides, elle reste très adaptée comme deuxième dimension de séparation dans des systèmes bidimensionnels.

1.5.3.3. Focalisation isoélectrique

Les premières séparations par IEF en microsystèmes ont été décrites dès la fin des années 1990 [72, 181]. Cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de schéma de microsystème complexe car les séparations peuvent être réalisées dans un simple monocanal.

Le Tableau 4 résume les conditions d'analyses rapportées dans la littérature pour les séparations de protéines réalisées par IEF en microcanaux. Des peptides ont également été séparés par cette technique [72, 182, 183].

L'utilisation de systèmes miniaturisés étant relativement récente, la plupart des séparations présentées sont effectuées avec quelques protéines modèles, bien que des séparations de protéines thérapeutiques aient été décrites récemment [157]. La détection des analytes focalisés est plus souple en microsystèmes qu'au format capillaire. En effet, l'étape de mobilisation n'est pas toujours nécessaire car il est possible de visualiser directement le contenu du canal de séparation, soit dans son ensemble (on parle alors de « Whole Column Imaging Detection » ou WCID), soit en utilisant un détecteur mobile. Dans ce cas, l'écoulement électroosmotique est alors limité par un traitement de surface approprié. Bien que la fluorescence soit la technique de détection la plus utilisée, plusieurs modes de détection originaux ont également été décrits. L'équipe de Sze a ainsi mis en œuvre des séparations en IEF en utilisant des canaux ouverts, de façon à permettre l'analyse du contenu de ces canaux par MALDI-TOF-MS [184]. Huang et Ren ont quant à eux utilisé la chimioluminescence pour l'analyse de protéines après IEF [185]. La détection était alors effectuée de manière élégante en remplaçant le catholyte par le réactif de chimioluminescence, qui servait en même temps de solution de mobilisation.

Ref	Matériau	Traitements de surface-Additifs	Analytes	Dérivation	Détection	Mobilisation	Remarques
[181]	Quartz	LPA	Myo	-	UV 280nm	Aucune (WCID)	-
[186]	PC	-	Myo CA	-	ESI-MS	Chimique	-
[187]	Capillaire en silice vierge	0.35% MC	Myo	-	Abs. 450 nm	Aucune (WCID)	Appareil commercial
[188]	PMMA	0,3% MC	BSA, CA LYS	Alexa Fluor 488	LIF	Chimique	-
[189]	PDMS, PC	BSA	GFP, BSA	Bodipy (pour BSA)	Fluorescence	Aucune	Injection dynamique des analytes
[190]	Verre	Acrylamide, ACN, HMDS	CytC, Hemo, Phyco.	-	Utilisation de protéines colorées	Aucune	Polymérisation de l'HMDS et de l'ACN par plasma
[191]	PMMA	-	Myo CA STI	-	MALDI-TOF MS	Aucune	Canaux pseudo-fermés pour détection par MALDI-TOF-MS
[170]	PDMS	1% MC	GFP, PE, CA	Rhodamine (pour CA)	Fluorescence	Aucune	Canal très court (4mm)
[192]	Verre	gel de PA	GFP, PE	-	LIF	Aucune (WCID)	-
[193]	COC	LPA	β LgA, Conalb, CA	AlexaFluor 488 ou 546	Fluorescence	Aucune	-
[185]	Verre, PDMS-verre	HPMC	CytC, Myo, HRP	-	Chimio-luminescence	Chimique	Réactif de chimioluminescence ajouté lors de la mobilisation
[98]	PDMS	0-0,8% MC	GFP, PE, APC	-	Fluorescence	Aucune	-
[99]	COC	10%glycérol, 1,83% HPC, 0,73% HEC	GFP, PE	-	LIF	Aucune (WCID)	-
[184]	Résines	-	STI, Lys, Myo, RNA, BSA	-	MALDI-TOF-MS	Aucune	Comparaison matériaux de canaux
[194]	PDMS-verre	1% HPMC	PE	-	Fluorescence	Aucune (WCID)	-
[195]	PMMA	PVA	BSA, GluOx, Strepta	FITC et Texas Red	Fluorescence	Aucune	Après separation, protéines encapsulées dans un gel d' Al_2O_3
[157]	Quartz	LPA	Protéines thérapeutiques	-	UV 280 nm	Aucune (WCID)	Appareil Commercial

Tableau 4 : Séparation de protéines en microsystèmes (gradient de pH créé par des ampholytes porteurs). Les abréviations sont répertoriées après le sommaire.

Enfin, Shi *et al.* ont décrit récemment une méthode originale permettant d’immobiliser les protéines dans un gel d’ Al_2O_3 , ce dernier étant formé par un procédé sol-gel une fois la focalisation terminée, grâce à des réactifs présents dans l’électrolyte de séparation [195]. L’immobilisation de la glucose oxydase par cette technique a ainsi été démontrée grâce à l’injection de glucose, détecté de façon électrochimique.

Dans le Tableau 4 seules les publications utilisant des ampholytes porteurs pour créer le gradient de pH ont été répertoriées, mais d’autres techniques peuvent être utilisées. L’équipe de Paul Yager a notamment réalisé des expériences de focalisation électrique en créant un gradient de pH « naturel » par électrolyse de l’eau [196, 197]. La formation du gradient de pH a été vérifiée par utilisation d’indicateurs colorés puis la BSA a été focalisée avec succès. Un canal effilé a quant à lui été utilisé pour créer un gradient de pH thermique dans un électrolyte Tris-HCl, dont le pKa dépend fortement de la température : lors de l’application du champ électrique, comme le canal n’a pas de section constante, l’effet Joule induit n’est pas uniforme et est à l’origine de la formation du gradient de pH. La focalisation de différentes hémoglobines a ainsi pu être observée [198].

La séparation de protéines par IEF en microsystèmes peut également être réalisée en veine liquide ou mode « free-flow », qui a été décrit en détail dans une revue récente [199]. Ce mode de séparation est surtout utilisé en mode préparatif, à l’heure actuelle plutôt en systèmes non-miniaturisés, car il permet d’injecter l’échantillon en continu. La séparation est réalisée dans une chambre où règne un écoulement hydrodynamique et où un champ électrique perpendiculaire à cet écoulement est appliqué, comme illustré en Figure 13.

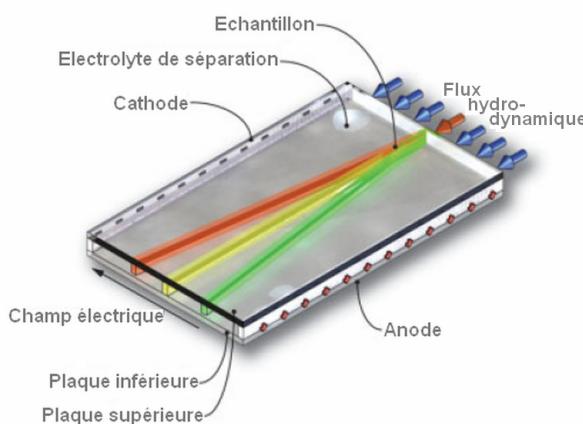


Figure 13: Principe de séparation des analytes en veine liquide ou mode « free-flow ». Adapté de [199].

Ainsi, les analytes injectés en entrée de chambre se focaliseront progressivement dans le gradient de pH et différentes fractions pourront être collectées en sortie. Cette technique a notamment été utilisée en microsystèmes pour étudier la formation du complexe entre la protéine G et les immunoglobulines G de souris [200].

1.5.4. Séparations bidimensionnelles

Dans le cadre de l'analyse d'échantillons complexes, typiquement rencontrés en analyse protéomique, il peut devenir nécessaire de mettre en œuvre des méthodes de séparation bidimensionnelles, de façon à augmenter la capacité de pics de l'analyse. Pour que celle-ci soit la plus grande possible les deux dimensions de séparation utilisées doivent être orthogonales, c'est-à-dire basées sur des mécanismes de séparation indépendants.

Le potentiel de la miniaturisation pour la réalisation de séparations bidimensionnelles est très grand car elle permet notamment de limiter les volumes morts, et d'obtenir des séparations plus rapides. Enfin, le format microsystème permet d'imaginer des schémas de canaux originaux pour réaliser le couplage des différentes dimensions de séparation.

L'équipe de Ramsey a été pionnière dans le domaine des séparations bidimensionnelles. Elle a utilisé des schémas de séparation variés (ECC-ECZ, ECC-CEMC, ECZ-CEMC) pour la séparation de digestats trypsiques de protéines [201-203].

Pour l'analyse de protéines entières, comme en gels bidimensionnels classiques, la première dimension de séparation en microsystèmes est le plus souvent la focalisation isoélectrique, couplée à l'électrophorèse en gel en deuxième dimension [204-208]. L'IEF a également été couplée à l'électrophorèse de zone, le mélange d'ampholytes porteurs utilisé pour créer le gradient de pH étant utilisé (sous forme non focalisée) comme électrolyte pour la deuxième dimension de séparation [209]. Dans la plupart des cas, un mélange de quelques protéines modèles est utilisé pour démontrer les possibilités des systèmes présentés, mais les capacités de pics rapportées sont en général de 1000 à 2000. Un mélange de dix protéines a également été séparé par électrophorèse en gel couplée à l'électrophorèse micellaire [210]. D'excellentes efficacités ont ainsi été obtenues (hauteurs de plateau inférieures au μm), avec une durée totale d'analyse de seulement 12 minutes et une capacité de pics de l'ordre de 1000.

Plusieurs approches ont été envisagées pour coupler les deux dimensions de séparation. Dans le cas où la deuxième dimension de séparation est réalisée dans un canal unique, elle

doit être le plus rapide possible pour ne pas perdre le pouvoir résolutif de la première dimension. L'utilisation d'un gel dans la première dimension permet d'éviter la diffusion des analytes et limite fortement cette perte en résolution [210]. Une solution alternative consiste à utiliser un réseau de canaux pour la deuxième dimension de séparation, ce qui permet d'analyser en même temps tout le contenu du canal ayant servi à effectuer la première séparation [205-208].

Pour éviter la diffusion des analytes et des électrolytes d'une partie des microsystèmes à une autre, il est possible de séparer physiquement les différents canaux de séparation. Dans les systèmes en PDMS cela peut être réalisé par l'intégration de valves [204]. L'équipe de DeVoe a récemment mis en œuvre une solution originale consistant à polymériser des zones étroites de gel de polyacrylamide dans une puce en PMMA. Ces zones bloquent les écoulements hydrodynamiques tout en permettant un bon contact électrique. Ce système a ainsi permis d'analyser des hydrolysats de bactérie *Escherichia Coli* en couplant la focalisation isoélectrique à l'électrophorèse en gel.

Enfin, un système entièrement automatisé d'électrophorèse en gel miniaturisé a également été décrit [211]. L'échantillon est d'abord séparé par IEF sur des bandes de gel d'IPG (gradient de pH immobilisé). Le chargement de l'échantillon et la réhydratation des bandes sont réalisés automatiquement, le support du gel d'IEF étant motorisé pour permettre de l'incuber dans des solutions appropriées. Ce même système permet de venir déposer l'échantillon focalisé sur un gel de 48x60 mm pour séparation par SDS-PAGE. La séparation d'un hydrolysat de foie de souris a ainsi été réalisé en moins d'une heure trente, avec de meilleurs résultats que ceux obtenus avec des mini-gels commerciaux.

1.6. Références bibliographiques

- [1] Moneret-Vautrin, D. A., *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2008, 48, 171-178.
- [2] Mondoulet, L., *Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs*, Thèse de doctorat, INSA ,Toulouse 2005.
- [3] Bernard, H., Negroni, L., Chatel, J. M., Clement, G., Adel-Patient, K., Peltre, G., Creminon, C., Wal, J. M., *Mol. Immunol.* 2000, 37, 161-167.
- [4] Sélo, Clément, Bernard, Chatel, Crémion, Peltre, Wal, *Clin. Exp. Allergy* 1999, 29, 1055-1063.
- [5] Brodard, V., Bernard, H., Wal, J. M., David, B., Peltre, G., *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 371, 879-981.
- [6] Pallandre, A., de Lambert, B., Attia, R., Jonas, A. M., Viovy, J.-L., *Electrophoresis* 2006, 27, 584-610.
- [7] Grossman, P. D., Colburn, J. C., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, Inc., San Diego 1992.
- [8] Gareil, P., *Analusis* 1990, 18, 221-241.
- [9] Weber, J., Barbier, V., Pages-Berhouet, S., Caux-Moncoutier, V., Stoppa-Lyonnet, D., Viovy, J.-L., *Anal. Chem.* 2004, 76, 4839-4848.
- [10] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal. Chem.* 1984, 56, 111-113.
- [11] Cetin, B., Li, D., *Electrophoresis* 2008, 29, 994-1005.
- [12] Xuan, X., *Electrophoresis* 2008, 29, 33-43.
- [13] Petersen, N. J., Nikolajsen, R. P. H., Mogensen, K. B., Kutter, J. P., *Electrophoresis* 2004, 25, 253-269.
- [14] Rathore, A. S., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 431-443.
- [15] Bohuslav, G., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2000, 21, 3888-3897.
- [16] Hjerten, S., Mohabbati, S., Westerlund, D., *J. Chromatogr. A* 2004, 1053, 181-199.
- [17] Evenhuis, C. J., Guijt, R. M., Macka, M., Marriott, P. J., Haddad, P. R., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2684-2693.
- [18] Bello, M. S., Giorgio Righetti, P., *J. Chromatogr. A* 1992, 606, 95-102.
- [19] Bello, M. S., Giorgio Righetti, P., *J. Chromatogr. A* 1992, 606, 103-111.
- [20] Grushka, E., McCormick, R. M., Kirkland, J. J., *Anal. Chem.* 1989, 61, 241-246.
- [21] Gobie, W. A., Ivory, C. F., *J. Chromatogr. A* 1990, 516, 191-210.
- [22] Knox, J., McCormack, K., *Chromatographia* 1994, 38, 215-221.

- [23] Swinney, K., J., B. D., *Electrophoresis* 2002, **23**, 613-620.
- [24] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., *J. Chromatogr. A* 2008, **1184**, 81-105.
- [25] Sadana, A., *Chemical reviews* 1992, **92**, 1799-1818.
- [26] Mendieta, M. E., Antonioli, P., Righetti, P. G., Citterio Attilio, Descroix, S., Sebastian, R., *Electrophoresis* 2006, **27**, 4016-4024.
- [27] Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K., *J. Biosci. Bioeng.* 2001, **91**, 233-244.
- [28] Graf, M., García, R. G., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2409-2417.
- [29] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, **24**, 34-54.
- [30] Horvath, J., Dolník, V., *Electrophoresis* 2001, **22**, 644-655.
- [31] Sebastian, R., Gelfi, C., Righetti, P. G., Citterio, A., *J. Chromatogr. A* 2000, **894**, 53-61.
- [32] Olivier, E., Sebastian, R., Citterio, A., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, **894**, 273-280.
- [33] Antonioli, P., Mendieta, M. E., Sebastian, R., Citterio, A., Peltre, G., Busnel, J.-M., Descroix, S., Candiano, G., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. B* 2006, **833**, 19-25.
- [34] Busnel, J.-M., *Electrophorèse en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes*, Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2006.
- [35] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, **868**, 85-99.
- [36] Towns, J. K., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1991, **63**, 1126-1132.
- [37] MacDonald, A. M., Lucy, C. A., *J. Chromatogr. A* 2006, **1130**, 265-271.
- [38] Yeung, K. K. C., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 3435-3441.
- [39] Wang, C., Lucy, C. A., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 2015-2021.
- [40] Wang, C., Lucy, C. A., *Electrophoresis* 2004, **25**, 825-832.
- [41] Tran, N. T., Taverna, M., Miccoli, L., Angulo, Jaime F., *Electrophoresis* 2005, **26**, 3105-3112.
- [42] Zhang, J., Tran, N. T., Weber, J., Slim, C., Viovy, J.-L., Taverna, M., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3086-3092.
- [43] Hjertén, S., Zhu, M.-d., *J. Chromatogr. A* 1985, **346**, 265-270.
- [44] Shimura, K., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3847-3857.
- [45] Kilár, F., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3908-3916.
- [46] Silvertand, L. H. H., Toraño, J. S., van Bennekom, W. P., de Jong, G. J., *J. Chromatogr. A, In Press, Corrected Proof*.
- [47] Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2004, **1037**, 491-499.
- [48] Kuroda, Y., Yukinaga, H., Kitano, M., Noguchi, T., Nemati, M., Shibukawa, A., Nakagawa, T., Matsuzaki, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, **37**, 423-428.
- [49] Graf, M., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2004, **25**, 2959-2964.

- [50] Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 1204-1213.
- [51] Lacunza, I., Kremmer, T., Díez-Masa, J. C., Sanz, J., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 4447-4451.
- [52] Dou, P., Liu, Z., He, J., Xu, J.-J., Chen, H.-Y., *J. Chromatogr. A* 2008, 1190, 372-376.
- [53] Horka, M., Ruzicka, F., Horky, J., Hola, V., Slais, K., *J. Chromatogr. B* 2006, 841, 152-159.
- [54] Ruzicka, F., Horka, M., Hola, V., Votava, M., *J. Microbiol. Methods* 2007, 68, 530-535.
- [55] Li, G., Zhou, X., Wang, Y., El-Shafey, A., L. Chiu, N. H., Krull, I. S., *J. Chromatogr. A* 2004, 1053, 253-262.
- [56] O'Neill, R. A., Bhamidipati, A., Bi, X., Deb-Basu, D., Cahill, L., Ferrante, J., Gentalen, E., Glazer, M., Gossett, J., Hacker, K., Kirby, C., Knittle, J., Loder, R., Mastroeni, C., MacLaren, M., Mills, T., Nguyen, U., Parker, N., Rice, A., Roach, D., Suich, D., Voehringer, D., Voss, K., Yang, J., Yang, T., Vander Horn, P. B., *PNAS* 2006, 103, 16153-16158.
- [57] Behnke, J. N., Dagher, S. M., Massey, T. H., Deal, J., W. C., *Anal. Biochem.* 1975, 69, 1-9.
- [58] Dishon, M., Weiss, G. H., *Anal. Biochem.* 1977, 81, 1-8.
- [59] Thormann, W., Huang, T., Pawliszyn, J., Mosher, R. A., *Electrophoresis* 2004, 25, 324-337.
- [60] Mao, Q., Pawliszyn, J., Thormann, W., *Anal. Chem.* 2000, 72, 5493-5502.
- [61] Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2006, 27, 923-938.
- [62] Hjertén, S., *J. Chromatogr. A* 1985, 347, 191-198.
- [63] Huang, Y.-F., Huang, C.-C., Hu, C.-C., Chang, H.-T., *Electrophoresis* 2006, 27, 3503-3522.
- [64] Dolník, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 143-156.
- [65] Busnel, J.-M., Varenne, A., Descroix, S., Peltre, G., Gohon, Y., Gareil, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 3369-3379.
- [66] Bo, T., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1018-1025.
- [67] Minarík, M., Groiss, F., Gaš, B., Blaas, D., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1996, 738, 123-128.
- [68] Schwer, C., *Electrophoresis* 1995, 16, 2121-2126.
- [69] Mazzeo, J. R., Krull, I. S., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2852-2857.
- [70] Steinmann, L., Mosher, R. A., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* 1996, 756, 219-232.
- [71] Tang, Q., Lee, C. S., *J. Chromatogr. A* 1997, 781, 113-118.
- [72] Hofmann, O., Che, D., Cruickshank, K. A., Muller, U. R., *Anal. Chem.* 1999, 71, 678-686.
- [73] Hjertén, S., Liao, J.-L., Yao, K., *J. Chromatogr. A* 1987, 387, 127-138.

- [74] Liu, X., Sosic, Z., Krull, I. S., *J. Chromatogr. A* 1996, **735**, 165-190.
- [75] Thormann, W., Mosher, R. A., *Electrophoresis* 2006, **27**, 968-983.
- [76] Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *Electrophoresis* 2004, **25**, 3461-3467.
- [77] Clarke, N. J., Naylor, S., *Biomedical Chromatography* 2002, **16**, 287-297.
- [78] Martinovic, S., Veenstra, T. D., Anderson, G. A., Pasa-Tolic, L., Smith, R. D., *J. Mass Spectrom.* 2002, **37**, 99-107.
- [79] Giddings, J. C., Dahlgren, K., *J. Sep. Sci.* 1971, **6**, 345.
- [80] Karger, B. L., Cohen, A. S., Guttman, A., *J. Chromatogr. B* 1989, **492**, 585-614.
- [81] Vesterberg, O., *Sci. Tools* 1969, **16**, 24-27.
- [82] Vesterberg, O., *Acta. Chem. Scand.* 1969, **23**, 2653-2666.
- [83] Righetti, P. G., *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 1983.
- [84] Pogacar, P., Jarecki, R., *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*, De Gruyter, Berlin 1974.
- [85] Grubhofer, H., Borja, C., *Electrofocusing and Isotachophoresis*, De Gruyter, Berlin 1977.
- [86] Righetti, P. G., Simó, C., Sebastian, R., Citterio, A., *Electrophoresis* 2007, **28**, 3799-3810.
- [87] Mosher, R. A., Thormann, W., Bier, M., *J. Chromatogr. A* 1988, **436**, 191-204.
- [88] Mosher, R. A., Thormann, W., *Electrophoresis* 2002, **23**, 1803-1814.
- [89] Mosher, R. A., Thormann, W., *Electrophoresis* 1990, **11**, 717-723.
- [90] Thormann, W., Caslavská, J., Mosher, R. A., *J. Chromatogr. A* 2007, **1155**, 154-163.
- [91] Thormann, W., Mosher, R. A., Bier, M., *J. Chromatogr.* 1986, **351**, 17-29.
- [92] Mosher, R. A., Thormann, W., Bier, M., *J. Chromatogr.* 1986, **351**, 31-38.
- [93] Mosher, R. A., Thormann, W., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1036-1047.
- [94] Thormann, W., Mosher, R. A., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1676-1686.
- [95] Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2007, **28**, 572-586.
- [96] Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1026-1035.
- [97] Bier, M., Mosher, R. A., Palusinski, O. A., *J. Chromatogr. A* 1981, **211**, 313-335.
- [98] Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., Ivory, C. F., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 1303-1309.
- [99] Das, C., Fan, Z. H., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3619-3626.
- [100] Rodriguez-Diaz, R., Zhu, M., Wehr, T., *J. Chromatogr. A* 1997, **772**, 145-160.
- [101] Liao, J.-L., Zhang, R., *J. Chromatogr. A* 1994, **684**, 143-148.
- [102] Mao, Q., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. B* 1999, **729**, 355-359.
- [103] Wu, J., Huang, T., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3584-3590.

- [104] Mohan, D., Lee, C. S., *J. Chromatogr. A* 2002, **979**, 271-276.
- [105] Yang, C., Zhang, W., Zhang, J., Duan, J., Zhang, Y., *J. Sep. Sci.* 2005, **28**, 78-86.
- [106] Huang, T., Wu, X.-Z., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 4758-4761.
- [107] Pospíchal, J., Deml, M., Bocek, P., *J. Chromatogr. A* 1993, **638**, 179-186.
- [108] Wu, X.-Z., Zhang, L.-H., Onoda, K., *Electrophoresis* 2005, **26**, 563-570.
- [109] Naydenov, C. L., Kirazov, E. P., Kirazov, L. P., Genadiev, T. T., *J. Chromatogr. A* 2006, **1121**, 129-139.
- [110] Tomás, R., Yan, L., Krenková, J., Foret, F., *Electrophoresis* 2007, **28**, 2283-2290.
- [111] Fang, X., Adams, M., Pawliszyn, J., *The Analyst* 1999, **124**, 335-341.
- [112] Kates, B., Ren, C. L., *Electrophoresis* 2006, **27**, 1967-1976.
- [113] Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2007, **28**, 545-555.
- [114] Zhu, G., Yuan, H., Zhao, P., Zhang, L., Liang, Z., Zhang, W., Zhang, Y., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3578-3583.
- [115] Descroix, S., *L'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux: contribution à la compréhension des phénomènes physico-chimiques impliqués et applications* Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie 2002.
- [116] Descroix, S., Varenne, A., *Analytica Chimica Acta* 2008, sous presse.
- [117] Mandecki, W., Hayden, M., *DNA* 1988, **7**, 57-62.
- [118] Hjertén, S., Valtcheva, L., Elenbring, K., Liao, J.-L., *Electrophoresis* 1995, **16**, 584-594.
- [119] Gelfi, C., Perego, M., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 1996, **17**, 1470-1475.
- [120] Magnusdottir, S., Gelfi, C., Hamdan, M., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1999, **859**, 87-98.
- [121] Herrero-Martinez, J. M., Simo-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, **878**, 261-271.
- [122] Perego, M., Gelfi, C., Stoyanov, A. V., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 1997, **18**, 2915-2920.
- [123] Capelli, L., Stoyanov, A. V., Wajcman, H., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1997, **791**, 313-322.
- [124] Olivieri, E., Viotti, A., Lauria, M., Simò-Alfonso, E., Righetti, P. G., *Electrophoresis* 1999, **20**, 1595-1604.
- [125] Bossi, A., Olivieri, E., Castelletti, L., Gelfi, C., Hamdan, M., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1999, **853**, 71-82.
- [126] Verzola, B., Chiti, F., Manao, G., Righetti, P. G., *Anal. Biochem.* 2000, **282**, 239-244.
- [127] Rodemann, T., Johns, C., Yang, W. S., Haddad, P. R., Macka, M., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 120-125.
- [128] Bean, S. R., Lookhart, G. L., *Electrophoresis* 1998, **19**, 3190-3198.
- [129] Bean, S. R., Lookhart, G. L., *J. Agric. Food Chem.* 2000, **48**, 344-353.

- [130] Solinova, V., Kasicka, V., Koval, D., Hlavacek, J., *Electrophoresis* 2004, **21**, 2299-2308.
- [131] Stoyanov, A. V., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1997, **790**, 169-176.
- [132] Beckers, J. L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 548-556.
- [133] Horká, M., Slais, K., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2814-2827.
- [134] Radola, B. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1973, **295**, 412-428.
- [135] Radola, B. J., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1975, **386**, 181-195.
- [136] Busnel, J.-M., Hennion, M.-C., Peltre, G., *J. Chromatogr. B* 2005, **818**, 99-107.
- [137] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, **27**, 563-571.
- [138] Busnel, J.-M., Kilár, F., Kašicka, V., Descroix, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., *J. Chromatogr. A* 2005, **1087**, 183-188.
- [139] Busnel, J. M., Lion, N., Girault, H. H., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 5949-5955.
- [140] Busnel, J.-M., Descroix, S., Le Saux, T., Terabe, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, **27**, 1481-1488.
- [141] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Kašicka, V., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3591-3598.
- [142] Busnel, J.-M., Le Saux, T., Descroix, S., Girault, H. H., Hennion, M.-C., Terabe, S., Peltre, G., *J. Chromatogr. A* 2008, **1182**, 226-232.
- [143] Busnel, J.-M., Lion, N., Girault, H. H., *Electrophoresis* 2008, **29**, 1565-1572.
- [144] Terry, S.-C., Jerman, J.-H., Angell, J.-B., *IEEE Trans Electron Devices* 1979, **26**, 1880-1886.
- [145] Wu, D., Qin, J., Lin, B., *J. Chromatogr. A* 2008, **1184**, 542-559.
- [146] Dolnik, V., Liu, S., *J. Sep. Sci.* 2005, **28**, 1994-2009.
- [147] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 3887-3908.
- [148] Peng, Y., Pallandre, A., Tran, N. T., Taverna, M., *Electrophoresis* 2008, **29**, 157-178.
- [149] Becker, H., Gärtner, C., *Electrophoresis* 2000, **21**, 12-26.
- [150] Belder, D., Ludwig, M., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3595-3606.
- [151] Muck, A., Svatos, A., *Talanta* 2007, **74**, 333-341.
- [152] Liu, J., Lee, M. L., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3533-3546.
- [153] Castelletti, L., Verzola, B., Gelfi, C., Stoyanov, A., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, **894**, 281-289.
- [154] Shen, Y., Smith, R. D., *J. Microcolumn Separations* 2000, **12**, 135-141.
- [155] Gilges, M., Kleemiss, M. H., Schomburg, G., *Anal. Chem.* 1994, **66**, 2038-2046.
- [156] Götz, S., Karst, U., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, **387**, 183-192.

- [157] Vlckova, M., Kalman, F., Schwarz, M. A., *J. Chromatogr. A* 2008, **1181**, 145-152.
- [158] García-Campaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* 2007, **28**, 208-232.
- [159] Lacroix, M., Poinsot, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2608-2621.
- [160] Underberg, W. J. M., Waterval, J. C. M., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3922-3933.
- [161] Sze, N. S.-K., Huang, T., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2002, **25**, 1119-1122.
- [162] Stoyanov, A. V., Fan, Z. H., Das, C., Ahmadzadeh, H., Mei, Q., Mohammed, S., *Anal. Biochem.* 2006, **350**, 263-267.
- [163] Yao, S., Anex, D. S., Caldwell, W. B., Arnold, D. W., Smith, K. B., Schultz, P. G., *PNAS* 1999, **96**, 5372-5377.
- [164] Uthayakumaran, S., Batey, I. L., Wrigley, C. W., *Journal of Cereal Science* 2005, **41**, 371-374.
- [165] Bousse, L., Mouradian, S., Minalla, A., Yee, H., Williams, K., Dubrow, R., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 1207-1212.
- [166] Thongboonkerd, V., Songtawee, N., Sritippayawan, S., *J. Proteome Res.* 2007, **6**, 2011-2018.
- [167] Fruetel, J. A., Renzi, R. F., VanderNoot, V. A., Stamps, J., Horn, B. A., West, J. A. A., Ferko, S., Crocker, R., Bailey, C. G., Don, A., Boyd, W., Choi, W.-Y., Yee, D., Shokair, I., Hasselbrink, E., Paul, P., Rakestraw, D., Padgen, D., *Electrophoresis* 2005, **26**, 1144-1154.
- [168] Giordano, B. C., Jin, L., Couch, A. J., Ferrance, J. P., Landers, J. P., *Anal. Chem.* 2004, **76**, 4705-4714.
- [169] Jin, L. J., Giordano, B. C., Landers, J. P., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 4994-4999.
- [170] Han, J., Singh, A. K., *J. Chromatogr. A* 2004, **1049**, 205-209.
- [171] Nagata, H., Tabuchi, M., Hirano, K., Baba, Y., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2687-2691.
- [172] Foote, R. S., Khandurina, J., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 57-63.
- [173] Hatch, A. V., Herr, A. E., Throckmorton, D. J., Brennan, J. S., Singh, A. K., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 4976-4984.
- [174] Liu, Y., Foote, R. S., Jacobson, S. C., Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 4608-4613.
- [175] Colyer, C. L., Mangru, S. D., Harrison, D. J., *J. Chromatogr. A* 1997, **781**, 271-276.
- [176] Ceriotti, L., Shibata, T., Folmer, B., Weiller, B. H., Roberts, M. A., de Rooij, N. F., Verpoorte, E., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3615-3622.
- [177] Olvecka, E., Kaniansky, D., Pollak, B., Stanislawska, B., *Electrophoresis* 2004, **25**, 3865-3874.
- [178] Abad-Villar, E. M., Tanyanyiwa, J., Fernandez-Abedul, M. T., Costa-Garcia, A., Hauser, P. C., *Anal. Chem.* 2004, **76**, 1282-1288.
- [179] Schulze, P., Ludwig, M., Kohler, F., Belder, D., *Anal. Chem.* 2005, **77**, 1325-1329.

- [180] Shadpour, H., Hupert, M. L., Patterson, D., Liu, C., Galloway, M., Stryjewski, W., Goettert, J., Soper, S. A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 870-878.
- [181] Mao, Q., Pawliszyn, J., *The Analyst* 1999, 124, 637-641.
- [182] Shimura, K., Takahashi, K., Koyama, Y., Sato, K., Kitamori, T., *Anal. Chem.* 2008, 80, 3818-3823.
- [183] Raisi, F., Belgrader, P., Borkholder, D. A., Herr, A. E., Kintz, G. J., Pourhamadi, F., Taylor, M. T., Northrup, M. A., *Electrophoresis* 2001, 22, 2291-2295.
- [184] Guo, X., Chan-Park, M. B., Yoon, S. F., Chun, J.-h., Hua, L., Sze, N. S.-K., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3249-3256.
- [185] Huang, X., Ren, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 3595-3601.
- [186] Wen, J., Lin, Y., Xiang, F., Matson, D. W., Udseth, H. R., Smith, R. D., *Electrophoresis* 2000, 21, 191-197.
- [187] Wu, X.-Z., Sze, N. S.-K., Pawliszyn, J., *Electrophoresis* 2001, 22, 3968-3971.
- [188] Tan, W., Fan, Z. H., Qiu, C. X., Ricco, A. J., Gibbons, I., *Electrophoresis* 2002, 23, 3638-3645.
- [189] Li, Y., DeVoe, D. L., Lee, C. S., *Electrophoresis* 2003, 24, 193-199.
- [190] Tsai, S.-W., Loughrann, M., Hiratsuka, A., Yano, K., Karube, I., *Analyst* 2003, 128, 237-244.
- [191] Mok, M. L.-S., Hua, L., Phua, J. B.-C., Wee, M. K.-T., Sze, N. S.-K., *Analyst* 2004, 129, 109-110.
- [192] Das, C., Xia, Z., Stoyanov, A., Fan, Z. H., *Instrumentation Science and Technology* 2005, 33, 379.
- [193] Li, C., Yang, Y., Craighead, H. G., Lee, K. H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1800-1806.
- [194] Yao, B., Yang, H., Liang, Q., Luo, G., Wang, L., Ren, K., Gao, Y., Wang, Y., Qiu, Y., *Anal. Chem.* 2006, 78, 5845-5850.
- [195] Shi, M., Peng, Y., Yu, S., Liu, B., Kong, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1587-1594.
- [196] Macounova, K., Cabrera, C. R., Holl, M. R., Yager, P., *Anal. Chem.* 2000, 72, 3745-3751.
- [197] Macounova, K., Cabrera, C. R., Yager, P., *Anal. Chem.* 2001, 73, 1627-1633.
- [198] Huang, T., Pawliszyn, J., *Electrophoresis* 2002, 23, 3504-3510.
- [199] Kohlheyer, D., Eijkel, J. C. T., van den Berg, A., M., S. R. B., *Electrophoresis* 2008, 29, 977-993.
- [200] Albrecht, J. W., Jensen, K. F., *Electrophoresis* 2006, 27, 4960-4969.
- [201] Gottschlich, N., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2001, 73, 2669-2674.
- [202] Rocklin, R. D., Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 5244-5249.
- [203] Ramsey, J. D., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2003, 75, 3758-3764.
- [204] Wang, Y.-C., Choi, M. H., Han, J., *Anal. Chem.* 2004, 76, 4426-4431.

- [205] Li, Y., Buch, J. S., Rosenberger, F., DeVoe, D. L., Lee, C. S., *Anal. Chem.* 2004, **76**, 742-748.
- [206] Chen, X., Wu, H., Mao, C., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* 2002, **74**, 1772-1778.
- [207] Griebel, A., Rund, S., Schonfeld, F., Dorner, W., Konrad, R., Hardt, S., *Lab Chip* 2004, **4**, 18-23.
- [208] Liu, J., Yang, S., Lee, C. S., DeVoe, D. L., *Electrophoresis* 2008, **29**, 2241-2250.
- [209] Herr, A. E., Molho, J. I., Drouvalakis, K. A., Mikkelsen, J. C., Utz, P. J., Santiago, J. G., Kenny, T. W., *Anal. Chem.* 2003, **75**, 1180-1187.
- [210] Shadpour, H., Soper, S. A., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 3519-3527.
- [211] Hiratsuka, A., Kinoshita, H., Maruo, Y., Takahashi, K., Akutsu, S., Hayashida, C., Sakairi, K., Usui, K., Shiseki, K., Inamochi, H., Nakada, Y., Yodoya, K., Namatame, I., Unuma, Y., Nakamura, M., Ueyama, K., Ishii, Y., Yano, K., Yokoyama, K., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 5730-5739.

Chapitre 2 :

**Séparation de protéines par focalisation
isoélectrique capillaire et utilisation de
coupes étroites d'ampholytes porteurs pour
améliorer la résolution**

2.1. Introduction

Dans le cadre du développement du système bidimensionnel « Allergycard » dédié à la séparation électrophorétique de protéines allergènes, la première partie de ce travail de thèse a consisté à étudier la séparation de protéines allergènes majeurs du lait par focalisation isoélectrique.

Ces travaux ont tout d'abord été réalisés au format capillaire, l'objectif ultérieur étant de transposer les méthodes développées en microsystèmes.

De nombreux travaux ont porté sur la séparation de protéines par CIEF [1] mais à notre connaissance aucun d'entre eux n'a porté spécifiquement sur les protéines du lait. Notre étude a donc tout d'abord consisté à développer un système de CIEF facilement transposable en microsystèmes et adapté à ces dernières.

En effet, deux des « contraintes » importantes à respecter pour le système à mettre en œuvre sont la limitation de l'adsorption des protéines et la faible valeur du flux electroosmotique. Cette dernière caractéristique sera d'autant plus importante en microsystèmes que la détection sera effectuée en visualisant le contenu du canal : en présence d'un FEO trop important, on observera un décalage du gradient de pH vers la cathode, ce qui empêchera de détecter des protéines basiques.

Deux solutions ont été envisagées pour résoudre ces problèmes. La première est relativement classique et consiste à immobiliser thermiquement de l'HPC sur les parois du capillaire. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, ce polymère neutre et hydrophile masque les charges négatives du capillaire et évite les interactions hydrophobes et/ou électrostatiques avec les protéines.

La deuxième solution envisagée est plus simple à mettre en œuvre. Elle a été développée par l'équipe de Pierre Gareil pour la séparation de protéines hydrophobes [2]. Elle utilise un capillaire en silice vierge mais nécessite l'utilisation d'un électrolyte comportant 30% de glycérol. Ce dernier a pour effet d'augmenter la viscosité du milieu de séparation, ce qui diminue fortement le FEO. La constante de diffusion des analytes diminue elle aussi, ce qui permet d'augmenter la résolution. Le glycérol est également connu pour augmenter la solubilité des protéines, ce qui peut se révéler essentiel lors de l'analyse d'échantillons de lait, contenant en autres des caséines, dont la solubilité en solution aqueuse est faible.

Le potentiel des solutions d'ampholytes porteurs de gamme étroite de pH (NC) pour améliorer les séparations en CIEF a ensuite été exploré. En effet, ces électrolytes peu conducteurs ont été développés pour l'ECZ par J.-M. Busnel lors de son doctorat, mais comme ils sont obtenus à partir d'ampholytes porteurs utilisés pour créer les gradients de pH en CIEF, il nous a paru naturel de les mettre à profit lors de cette étude.

Ces solutions ont tout d'abord été utilisées en mélange avec une gamme large d'ampholytes porteurs, dans le but d'élargir le gradient de pH et donc d'améliorer la résolution entre les espèces de pI proches du pH de la solution de NC ajoutée.

Il nous a également paru intéressant d'utiliser ces solutions de NC comme anolyte et catholyte. En effet, un mélange d'ampholytes porteurs titrés à pH acide et basique a déjà été utilisé pour cela dans le but de déssaler des échantillons en ligne et limiter ainsi la compression du gradient de pH [3]. Ainsi, l'utilisation de composés amphotériques comme anolyte et catholyte paraît prometteuse pour améliorer les séparations en CIEF.

La comparaison des deux systèmes de CIEF envisagés et l'utilisation de NC en addition au mélange d'ampholyte initial sont présentées en première partie de ce chapitre. Cette étude a été publiée dans *Journal of Chromatography A* (1155 (2007) 230-236).

L'utilisation des NC comme anolyte et catholyte est présenté dans une seconde partie et a été publiée dans *Electrophoresis* (29 (2008) 1687-1693).

2.2. Article 1: Comparison of different capillary isoelectric focusing methods – Use of “narrow pH cuts” of carrier ampholytes as original tools to improve resolution

Martine Poitevin, Aude Morin, Jean-Marc Busnel, Stéphanie Descroix, Marie-Claire Hennion, Gabriel Peltre

Journal of Chromatography A 1155 (2007) 230-236

Abstract

Two capillary isoelectric focusing (CIEF) systems have first been optimized: one uses a bare silica capillary and 30% (v/v) of glycerol in the separation medium while the other uses a coated capillary and an aqueous background electrolyte. To perform permanent capillary coating, two neutral polymers have been compared: hydroxypropylcellulose (HPC) and polyvinylalcohol (PVA). HPC coating gave best results for electroosmotic flow (EOF) limitation on a wide pH range: as compared to a bare silica capillary, it allowed to decrease EOF by 96% at pH 7.2 after acidic and basic treatments, whereas PVA coating lead only to a 76% decrease. The glycerol CIEF system was more satisfying for the separation of model proteins classically used as pI markers. Finally, the use of “narrow pH cuts” of carrier ampholytes added to commercial ampholyte mixtures allowed increasing resolution up to a factor 2.4 at a chosen pH for the separation of pI markers and milk proteins.

Keywords

CIEF, glycerol, permanent coating, “narrow pH cuts” of carrier ampholytes

Introduction

After human genome sequencing, proteomics is becoming a field of growing importance. Its goal is to identify, characterize, and quantify the proteins involved in a process, as well as to study their functional roles and the variations that can occur under the effect of various stimuli. Isoelectric focusing (IEF) [1,2], which allows the separation of zwitterionic analytes such as proteins or peptides in a pH gradient according to their isoelectric point, is the technique of choice to study protein mixtures. CIEF can be used as a monodimensional separation technique or as the first dimension of a bidimensional separation system. In the last decades IEF has been performed in capillary format [3,4] and CIEF, as other CE methods [5], has become widely used to perform protein analysis. Moreover, down-scaling of capillary isoelectric focusing into microsystems, whether mono-[6-10] or bidimensionals [6,11-14] allows decreasing sample consumption and analysis time.

Carrier ampholytes mixtures are generally used to create the CIEF pH gradient. Once an electric field is applied, these carrier ampholytes form the gradient and the analytes focus at their respective pI in the capillary. If a classical single point detection is used, the focused analytes have then to be mobilized through the detector [6,14] using hydrodynamic[15], chemical [16,17] or EOF-assisted [18-20] mobilization. There are two main problems to solve in order to perform satisfying CIEF analysis, namely to limit protein adsorption on capillary walls and to reduce electroosmotic flow so that the analytes have enough time to focus at their respective pIs before reaching the detection window, as shown by Hjertén in 1985 [16].

CIEF experiments are thus classically performed in capillaries coated with a neutral and hydrophilic polymer, using dynamic or permanent coating (for reviews see [5,21-23]). Uncoated capillaries have also been used to perform CIEF experiments. In this case, additives such as methylcellulose [24] or glycerol [25] have to be used in the separation medium. It indeed significantly decreases the electroosmotic flow, allows better protein solubilization and limits diffusion inside the capillary by increasing the electrolytes viscosity. In particular, the use of an electrolyte consisting of 70/30 water/glycerol in a bare fused silica capillary allowed the separation and the pI determination of complex

protein mixtures as well as the characterization of hydrophobic proteins under native conditions. This also leads to lower background noise, reduced cost and increased stability [25].

Moreover, “narrow pH cuts” of carrier ampholytes have been prepared by IEF fractionation of a wide pH range carrier ampholyte mixture [26]. They indeed present a very low conductivity and a satisfying buffering capacity, and have proven to be very good background electrolytes in zone electrophoresis [27,28]. To increase the resolution of CIEF in a given zone of the pH gradient, amphoteric compounds can be added to a wide pH range mixture [1,29,30]: this allows flattening the pH gradient in the zone of the amphoteric compounds. As they are carrier ampholyte mixtures of very small pH range, “narrow pH cuts” can be used in this way in order to increase the separation resolution in a very narrow pH zone.

The aim of this study is to compare two CIEF systems, as an alternative to commercial kits. The first one uses a bare silica capillary and an electrolyte containing 30% (v/v) of glycerol. The second CIEF system tested is more classical. It uses a coated capillary with an aqueous separation medium. These two CIEF systems have first been optimized. Concerning the classical one, two permanent coatings have been tested (hydroxyprolycellulose and polyvinylalcohol). Then for both systems different parameters such as focusing time and voltage or mobilization pressure have been studied. After this optimization step, the CIEF systems performances have been compared using pI markers mixtures.

Finally, the potential of “narrow pH cuts” to improve the resolution of CIEF separations has also been investigated. They have been added to wide pH range commercial ampholyte mixture in order to flatten the pH gradient and thus increase resolution at a chosen pH.

Materials and methods

1. Chemicals

Several carrier ampholyte mixtures were used: Servalyt pH 4-9 (Serva, Heidelberg, Germany), Beckman pH 3-10 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA), Ampholine 3.5-9.5 and Pharmalyte 3-10 (both from General Electrics Healthcare, Orsay, France). Colored pI markers kits from BDH, containing proteins derived from myoglobins with pIs

in the range 5.65-8.3 or 4.7-10.6, used as protein test mixture, were purchased from VWR (Strasbourg, France). Their compositions are given in Table 1 and 2. The other proteins used were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Unless otherwise stated all chemicals were of analytical grade and also came from Sigma-Aldrich. Buffer solutions compositions were computed by Phoebus software. Glycerol (87%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydroxypropylcellulose (M.W. 100,000) came from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA) and polyvinylalcohol (M.W. 89,000-98,000, 99+% hydrolysed) was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France). Water was produced with an alpha Q Millipore system (Molsheim, France).

	Protein	pI	M.W.
1	Azurin (<i>P. aeruginosa</i>)	5.65	14,000
2	Trifluoroacetylated Myoglobin Met (Porcine)	5.92	~17,000
3	Myoglobin Met (Porcine)	6.45	17,569
4	Trifluoroacetylated Myoglobin Met (Equine)	6.86	~17,000
5	Myoglobin Met (Equine)	7.30	17,567
6a	Trifluoroacetylated Myoglobin Met (Sperm Whale)	7.65	~18,000
6b			
6c	Myoglobin ferro (Sperm Whale)	7.75	n.c.
7	Myoglobin Met (Sperm Whale)	8.3	17,815

Table 1: protein mixture 1 composition (pI range 5.65-8.3)

	Protein	pI	M.W.
a, b	C-Phycocyanin (<i>A. Nidulans</i>)	4.75, 4.85	232,000
c	Azurin (<i>P. aeruginosa</i>)	5.65	14,000
d	Trifluoroacetylated Myoglobin Met (Porcine)	5.92	~17,000
e	Myoglobin Met (Porcine)	6.45	17,569
f	Myoglobin Met (Equine)	7.30	17,567
g	Myoglobin Met (Sperm Whale)	8.3	17,815
h	Cytochrome C (horse heart)	10.6	12,360

Table 2: protein mixture 2 composition (pI range 4.7-10.6)

2. CE Apparatus

All the experiments were carried out with an HP^{3D}CE apparatus (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a diode-array detector, an autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. The temperature of the cartridge was set at 25 °C. Data were handled by an HP Chemstation software.

3. Capillaries

Bare fused silica capillaries (Photonlines, Marly le Roi, France) of 40 cm total length, 31.5 cm effective length and 50 µm internal diameter were used. HPC coated capillaries have been coated according to the following procedure [31]: the capillary was filled at 50µL/hour with a 5% (w/v) HPC solution in water, the polymer solution was then ejected under nitrogen pressure (4 bar), and the capillary was heated in a GC oven from 60 °C-140 °C at 5 °C/minute, and maintained at 140 °C for 30 minutes, still under nitrogen flow. PVA coated capillaries were coated according to a very similar procedure [32]: the 140 °C plateau was maintained for 2 hours instead of 30 minutes. Before use, the coated capillaries were rinsed with water for 10 minutes.

Each new bare silica capillary was activated using the following three-step sequence: 10 minutes 1 M NaOH rinse, 10 minutes 0.1 M NaOH rinse and 10 minutes water rinse.

4. EOF measurements.

To compare the coated capillaries, EOF measurements have been performed according to the Williams and Vigh method [4], at three different pH: 7.2 (phosphate buffer, ionic strength 50 mM), 2.5 (phosphate buffer, ionic strength 50 mM) and 9.2 (borate buffer, ionic strength 50 mM). For each series of experiments, EOF has been measured first at pH 7.2, then at pH 2.5, 7.2, 9.2 and at last 7.2. At each pH five measurements in a row have been performed in order to estimate repeatability. The measurements at neutral pH after the ones at acidic or basic pH are intended to check if the coating has been degraded at extreme pH. For each coating, four capillaries have been tested and the given EOF values are the mean of the values obtained with the different capillaries. These results have been compared to the ones obtained with a bare silica capillary, for the same series of experiments. 0.02 M formamide in water have been used as neutral marker.

5. CIEF protocols

Prior to each experiment, the capillary was filled with the separation mixture, which contained the carrier ampholyte mixture (3% (v/v)) and the proteins to separate. For the water/glycerol system 30% (v/v) of glycerol was also added in the mixture. Unless

otherwise stated, the anolyte consisted in 90 mM phosphoric acid and the catholyte was 20 mM sodium hydroxide, both diluted in water or in 70/30 water/glycerol according to the CIEF system used. Hydrodynamic mobilization to the cathodic side was performed under a given pressure (10-50 mbar, precised later) while maintaining the focusing voltage to prevent analyte diffusion. Protein mixtures from BDH were detected at 415 nm, while milk proteins were detected at 200 nm.

Results and discussion

1. Optimization of the glycerol CIEF system

First the separation conditions with the glycerol CIEF system have been optimized. Several parameters have been varied in order to get the best separation. Several commercial ampholyte mixtures have been tested. 3 % (v/v) concentration has been chosen in order to allow a good focusing while limiting the background noise, as a UV detector is used. For each ampholyte mixture focusing voltage (10 to 30 kV), mobilization pressure (10 to 50 mbar) and focusing time (3 to 12 minutes) have been optimized. For each ampholyte mixture, 6 minutes of focusing appeared to be sufficient and have been selected for the rest of the study. The highest focusing voltages which do not induce too much decrease in resolution due to Joule heating effect have been chosen. For the mobilization pressures, a compromise has been done between short analysis times and loss of resolution due to the parabolic flow profile.

The comparison of the different ampholyte mixtures tested is shown on figure 1. The separation parameters have been optimized for each mixture. Several criteria were considered to compare the carrier ampholytes such as number of peaks and resolution. Efficiency, expressed in the plate number, has not been considered. It should indeed not be used in IEF because a steady-state is reached, as shown by Giddings and Dahlgren [34]. The quality of separation varies a lot from one carrier ampholyte mixture to another, highlighting differences in the quality of the ampholytes used. This may be related to recent works published by Righetti's Group [35,36]. They have fractionated basic and slightly acidic narrow pH range carrier ampholyte mixtures of 4 different brands, and have studied the focusing properties of the ampholytes by CZE-MS. They have observed that a non-negligible part of carrier ampholytes from the mixtures tested are in fact "bad" ampholytes, as they are present in the whole pH gradient. This phenomenon could explain

the differences observed here in the quality of focusing when different brands of carrier ampholytes are used.

In this study, the Pharmalyte 3-10 (1.C) gave the worst separation, as the peaks were broad and poorly resolved. The separation with the Servalyt 4-9 (1.A) was better but not satisfying either. The Ampholine 3.5-9.5 (1.B) and Beckman 3-10 (1.D) gave the best results in the tested conditions. The proteins were indeed detected as sharp peaks and with almost baseline resolution. Beckman 3-10 carrier ampholyte mixture has thus been chosen to compare the two CIEF systems. These results may seem contradictory to the ones obtained by Righetti's group, as they found that the Pharmalyte ampholytes were the best ones in terms of quality of focusing. These differences can be explained by the fact that they tested narrow pH range ampholytes mixtures, whereas the ones used here are of wide pH range.

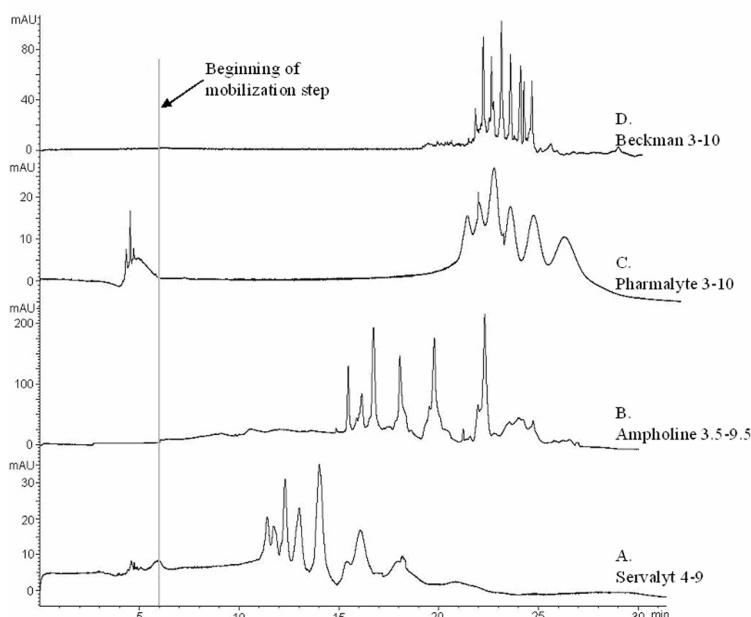


Figure 1: Separation of protein mixture 1 (pI 5.65-8.3) with the glycerol CIEF system, using different commercial carrier ampholyte mixtures. Bare silica capillary. Electrolyte: water/glycerol medium 70/30 (v/v). Detection at 415 nm. Focusing time: 6 minutes. Protein concentration: 0.08 mg/mL each. Anolyte : H₃PO₄ 90 mM in water/glycerol 70/30, catholyte : NaOH 20 mM. **A)** Carrier ampholyte: Servalyt 4-9 3% (v/v), focusing voltage: 30 kV, mobilization pressure: 20 mbar. **B)** Carrier ampholyte: Ampholine 3.5-9.5. 3% (v/v), focusing voltage: 30 kV, mobilization pressure: 10 mbar. **C)** Carrier ampholyte: Pharmalyte 3-10 3% (v/v), focusing voltage: 15 kV. Mobilization pressure: 35 mbar. **D)** Carrier ampholyte: Beckman 3-10 3% (v/v), focusing voltage: 25 kV, mobilization pressure: 30 mbar.

2. Optimization of the classical aqueous CIEF system

2.a. Capillary coating

Two hydrophilic and neutral polymers have been chosen to perform a permanent capillary coating: PVA and HPC. For both polymers the coating procedure is very simple because it

merely consists of a thermal treatment in a GC oven. The selected coating has to be stable on the whole pH range, to avoid degradation when performing CIEF experiments with wide pH range gradients. Thus EOF measurements have been performed at three different pH, as described previously. After each series of measurements at acidic or basic pH, a series of EOF measurements at neutral pH has been performed to check if the coating has been damaged at these extreme pH. An increase of EOF at neutral pH would indeed mean that silanol groups are available on the capillary surface due to coating degradation.

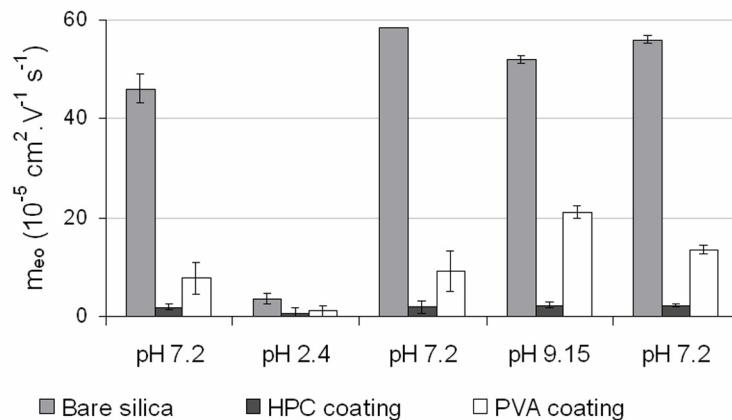


Figure 2: Comparison of mean EOF at neutral, acidic and basic pH, with HPC-coated, PVA-coated and bare silica capillaries. The experimental protocol is detailed in the “Materials and methods” part.

The EOF measurements for each coating are shown on figure 2. The first series of measurements at neutral pH shows that the EOF is significantly decreased with both coatings, but HPC gives lower EOF. Thus, EOF has been decreased by 96% with the HPC coating and by 76% with the PVA coating, as compared to a bare silica capillary. At acidic pH, EOF is very low whatever capillary used because even if there remain residual silanol groups on the surface of the capillaries, they are under neutral form and thus do not induce EOF. The second series of EOF measurements at neutral pH shows that contrary to the HPC coating, the PVA coating has been degraded by the acidic electrolyte previously used, because EOF is higher than for the first series of measurements. At basic pH, EOF is still decreased by 95% with the HPC coating, but the PVA coating is less efficient. EOF is indeed only 59% lower than with a non-coated capillary. The last series of EOF measurements at neutral pH shows that the PVA coating has also been degraded under basic pH, contrary to the HPC coating (96% EOF decrease for the HPC coating and 76% decrease for the PVA coating). HPC has therefore been chosen to coat the CIEF capillaries.

2.b. CIEF operating conditions

The influence of focusing time on the separation of protein mixture 1 (composition given on Table 1) has first been studied. As observed by Behnke [37] and Dishon [38] and then by Thorman [39], the coalescence of two protein zones should occur during the focusing step. As expected, this coalescence of two zones can be observed here (figure 3). Before the application of the focusing voltage the proteins are indeed present in the whole capillary. When the focusing voltage is applied, the proteins that are first in the acidic part of the pH gradient are positively charged and thus migrate to the cathode, and the ones which are first in the basic part of the pH gradient are negatively charged and migrate to the anode. During the focusing step, two protein zones, migrating one toward the other, are observed (3.A, $t_{foc}=0$ minute, i.e. mobilization pressure applied as soon as the focusing voltage is applied). When the focusing time increases, the two zones become closer (3.B, 3 minutes of focusing) and then coalesce (3.C, 10 minutes of focusing). This is coupled with an increase of peak area and of signal to noise ratio, because the protein zones become sharper as the focusing occurs. 10 minutes of focusing thus appear to be necessary to observe the coalescence: the focusing time will have to be superior to get satisfying separations.

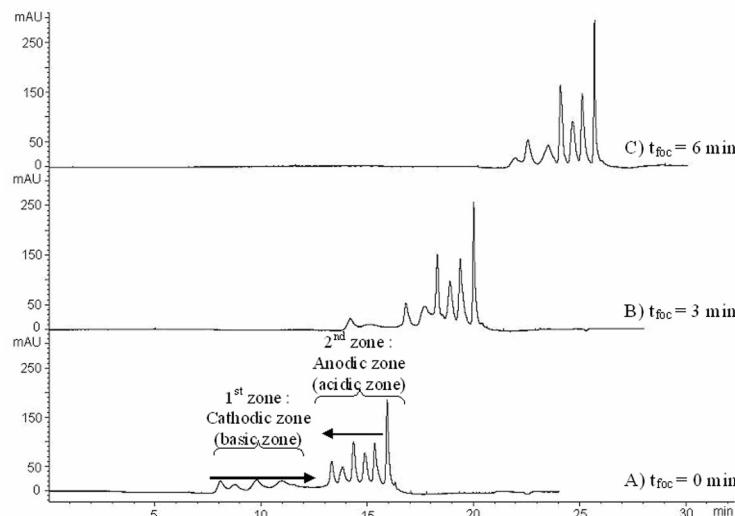


Figure 3 : Influence of focusing time on the separation of protein mixture 1 (pI 5.65-8.3). HPC coated capillary. Separation electrolyte: Beckman pH 3-10 ampholytes 3% (v/v). Protein concentration: 0.08 mg/mL each. Detection at 415 nm. Focusing voltage/time: 10 kV / 0 minute (A), 3 minutes (B) and 10 minutes (C). Mobilization pressure P = 10 mbar.

Concerning the mobilization pressure, 10 mbar appeared to be a compromise between long analysis time and loss in resolution and sensitivity induced by too high mobilization pressure. One can notice that this optimal value is lower for the CIEF system using an

HPC coated capillary than for the one using glycerol. This is probably due to the fact that the high viscosity of glycerol leads to an anti-convective effect, thus allowing applying a higher pressure without loss in resolution.

10 kV has been chosen as the optimal focusing voltage. It is much lower than the one obtained with the CIEF system using glycerol: this can be explained by the fact that the presence of glycerol decreases the conductivity of the separation medium. Then it is possible to apply a higher voltage without inducing Joule heating effect.

3. Comparison of the two CIEF systems

The comparison of the two CIEF systems used both in optimized conditions is presented on figure 4 for the separation of protein mixture 1 (compositon given on Table 1). As focusing voltage and mobilization pressure were lower with the CIEF system using an HPC coated capillary, the analysis time was longer than with the glycerol CIEF system. Moreover, this last system gave higher resolution. It allowed separating the two forms of porcine myoglobin (peaks 2 and 3), as well as Myoglobin ferro from Sperm Whale and two isoforms of Trifluoroacetylated Myoglobin Met also from Sperm Whale (peaks 6a, 6b and 6c). The peaks were also sharper, probably due to lower diffusion because of higher viscosity of the separation medium. Another advantage of the glycerol system is that it is easier to perform, because it does not necessitate a coating procedure. One can at last notice that the protein zone observed before the mobilization step was only observed with the system using the HPC coated capillary. This may be explained by the residual EOF that exists with the glycerol system: the proteins that are first in the basic part of the capillary do not have time to focus before going out of the capillary, driven by this residual EOF.

The glycerol system gave finally more satisfying results, as it is easier to perform and gives better separation. Thus it has been chosen for the rest of the study.

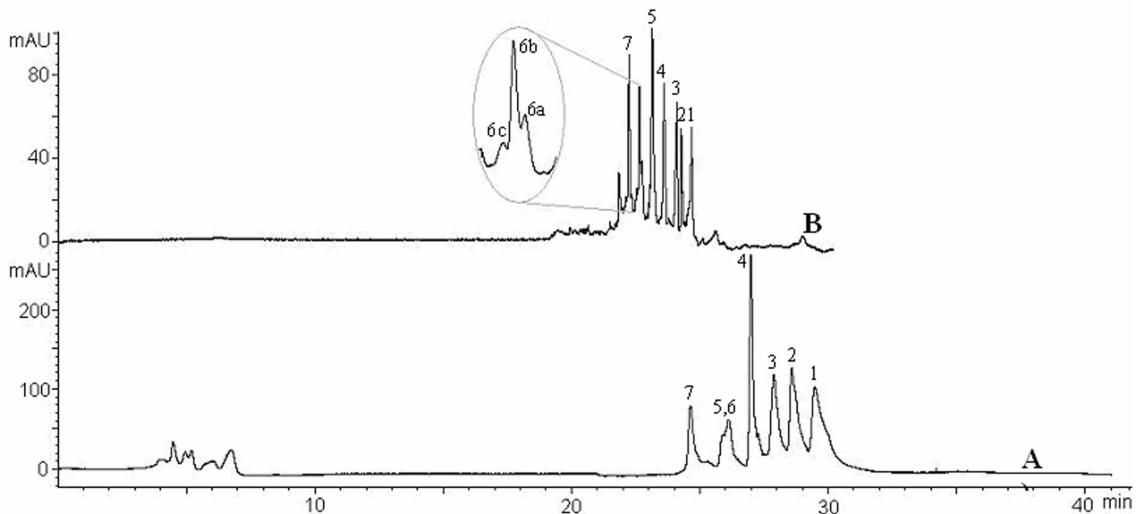


Figure 4: Comparison of the separation of protein mixture 1 (pI 5.65-8.3) with the two CIEF systems.
Detection at 415 nm. Protein concentration: 0.08 mg/mL. **A)** HPC coated capillary. Electrolyte: Beckman ampholytes: pH 3-10 3% (v/v) in water. Anolyte: H₃PO₄ 90 mM, catholyte: NaOH 20 mM. Focusing : 10 kV/20 minutes. Mobilization: P = 10 mbar. **B)** Bare silica capillary. Electrolyte: Beckman ampholytes: pH 3-10 3% (v/v), water/glycerol medium 70/30 (v/v). Anolyte: H₃PO₄ 90 mM in water/glycerol 70/30, catholyte: NaOH 20 mM. Focusing: 25 kV / 6 minutes. Mobilization: P = 30 mbar.

4. Use of narrow pH cuts in the pH gradient

To increase resolution in a given pH zone, one classical technique consists in adding an amphoteric compound to the initial wide pH range ampholyte mixture [1,29,30]. The idea has been taken up here, but instead of a single amphoteric compound, home made “narrow pH cuts” of carrier ampholytes have been used [26]. These ampholytes were prepared by IEF fractionation of a commercial ampholyte mixture of 4-9 pH range, and can be considered as very narrow parts of a pH gradient (0.2 pH units). If added to a wide pH range ampholyte mixture, the ampholytes from the “narrow pH cut” will interpose themselves between the initial carrier ampholytes. This will therefore flatten the pH gradient around the pH of the “narrow pH cut” used. Moreover, as the IEF fractionation results in 25 fractions of “narrow pH cuts” which pH ranges from 4 to 9, one can chose to flatten the pH gradient and thus increase resolution at a chosen pH according to the separation needs.

As an illustration, the separation of the protein mixture 2 (composition given on table 2) has been performed in the presence or absence of “narrow pH cut” in the ampholyte mixture, as can be seen on figure 5. The resolution between the adjacent pI markers has been classically calculated according to the following expression:

$$R = \frac{x_2 - x_1}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)} \quad (\text{eq. 1})$$

where x_1 and x_2 are the location of two adjacent peaks, and w_1 and w_2 are the width of the peak at the base, measured between the tangent lines of the peak sides [40]. When 3% (v/v) of narrow pH cut of pH 4.9 is added to the Beckman 3-10 ampholyte mixture, the resolution between the proteins which pIs are close to 4.9 (a and b, respective pIs 4.75 and 4.85, increase of resolution from 0.5 to 1.2 when adding the “narrow pH cut”) is more than doubled, due to the flattening of the pH gradient at the pH of the “narrow pH cut”.

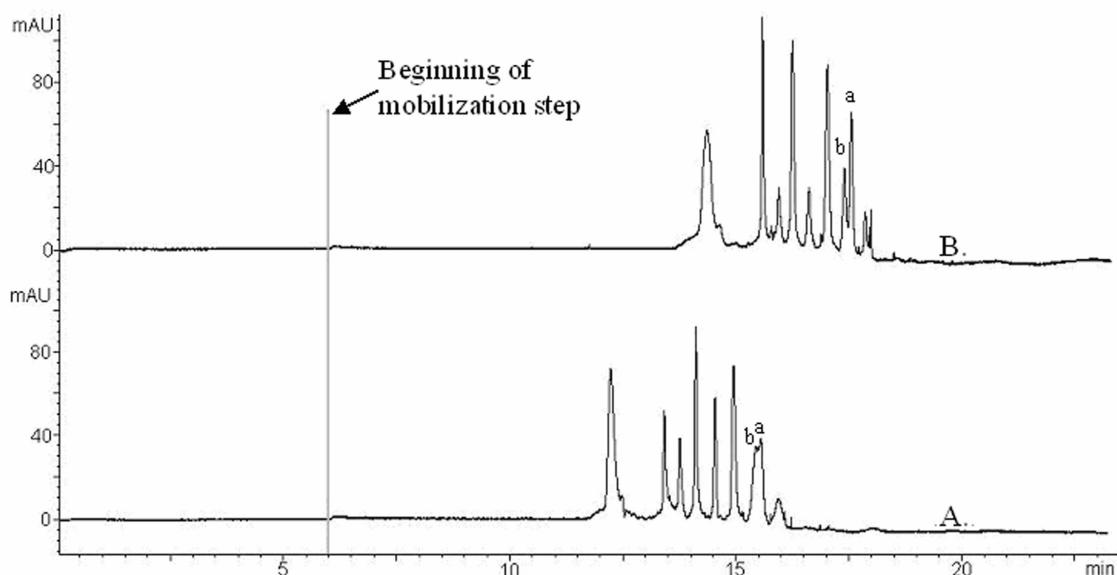


Figure 5: Influence of the presence of narrow pH cut in the carrier ampholyte mixture on the separation of protein mixture 2 (4.7-10.6) with the CIEF system using glycerol. Detection at 415 nm. Focusing: 25 kV / 6 minutes. Mobilization: P = 30 mbar. Protein concentration: 0.08 mg/mL. Bare silica capillary. **A)** Electrolyte: Beckman ampholytes: pH 3-10 3 % (v/v), water/glycerol medium 70/30 (v/v). **B)** Electrolyte: Beckman ampholytes: pH 3-10 3 % (v/v), with addition of 3% (v/v) of narrow pH cut pH 4.89 water/glycerol medium 70/30 (v/v).

A similar experiment has been performed, with the separation of three milk proteins (α -lactalbumin -pI ~ 4.5- and β -lactoglobulin A and B -pIs 5.25 and 5.35). The percentage of “narrow pH cut” of pH 4.9 has been varied from 0 to 5% (v/v) (figure 6). This “narrow pH cut” has been chosen because its pH is comprised between the pIs of α -lactalbumin and β -lactoglobulins. Without addition of narrow pH cuts, β -lactoglobulin A and B are not separated, due to their very close pIs. A trail is also observed after the α -lactalbumin peak. It may be due to impurities such as caseins that are present with α -lactalbumin (which is available only 85% pure). If up to “3% (v/v) of narrow pH cut” is added to the commercial ampholyte mixture, two peaks corresponding to β -lactoglobulin A and B appear, confirming the increase of resolution observed with the separation of pI markers.

Nevertheless, if more than 3% (v/v) of narrow pH cut of carrier ampholytes is added, a loss in sensitivity is observed.

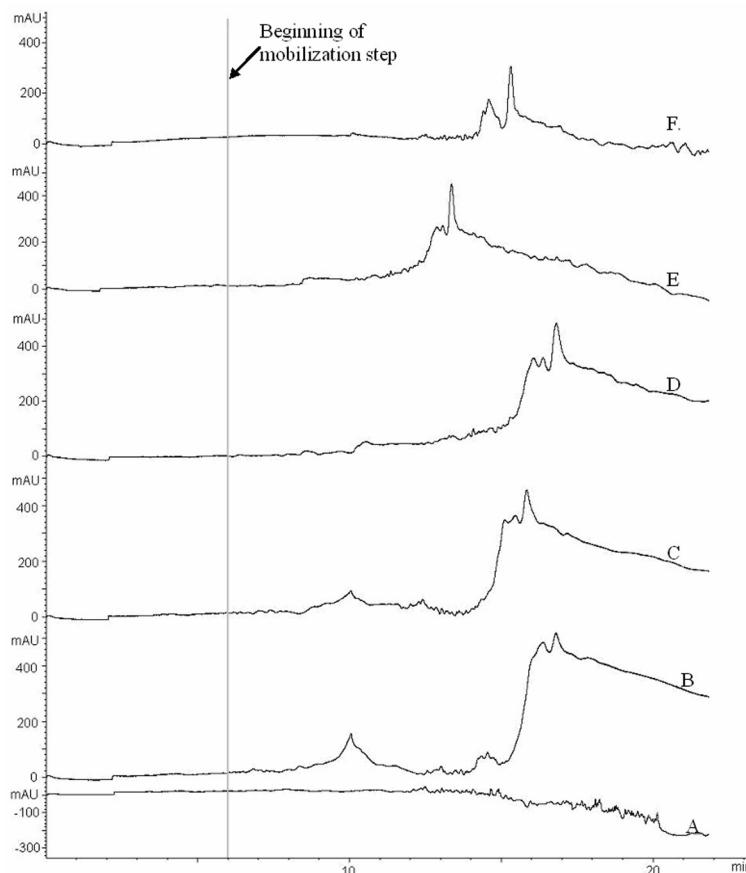


Figure 6: Influence of the presence of narrow pH cut in the carrier ampholyte mixture on the separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin A+B with the CIEF system using glycerol. UV detection at 200 nm. Focusing: 30 kV / 6 minutes. Mobilization: P = 20 mbar. Protein concentration: 0.1 mg/mL. Bare silica capillary. Electrolyte: Servalyt ampholytes: pH 4-9 3 % (v/v), water/glycerol medium 70/30 (v/v). **A**) blank. With addition of: **B**) 0% (v/v) "narrow pH cut" pH 4.9, **C**) 2% (v/v) "narrow pH cut" pH 4.9, **D**) 3% (v/v) "narrow pH cut" pH 4.9, **E**) 4% (v/v) "narrow pH cut" pH 4.9, **F**) 5% (v/v) "narrow pH cut" pH 4.9.

This is due to the fact that the optimal wavelength to detect the milk proteins is 200 nm, where the ampholytes absorb. If the amount of narrow pH cut is increased too much, these additional ampholytes "hide" the proteins, which explains the loss in sensitivity. The optimal percentage of narrow pH cut added thus appears to be 3% (v/v), because it allows observing the increase of the resolution without too much loss in sensitivity. Nevertheless, the separation is still not totally satisfactory. This is not surprising given that the chosen proteins have very close isoelectric points, but it could be improved by addition of additives such as urea or CHAPS, as it is classically done for gel IEF, even if the proteins would not be under native form anymore.

However, this separation of whey proteins still confirms the fact that the addition of home made “narrow pH cuts” of carrier ampholyte to the initial carrier ampholyte mixture can lead to an increase of the resolution at a chosen pH, and not only with model pI markers.

Concluding remarks

We report here the comparison of two home-made CIEF systems with a view to transposition into microsystems. For one of them a capillary coating procedure has been successfully optimized in order to limit EOF on a wide pH range. The second CIEF system uses glycerol in the separation medium as an alternative to capillary coating, as described in a previous study [25]. The latter gave more satisfying results for pI markers separation. “Narrow pH cuts” of carrier ampholytes have also been added to the initial ampholyte mixture, which has appeared to be a simple way to increase resolution for pI markers as well as milk proteins separation.

This work was supported by a grant from European Union (contract No. 12793).

References

- [1] P.G. Righetti, *Isoelectric focusing: theory, methodology and applications*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1983.
- [2] R. Weistermeir, *Electrophoresis in practice*, Wiley-WCH (Editor), Weinheim, 2001, p. 45.
- [3] F. Kilár, *Electrophoresis* 24 (2003) 3908.
- [4] K. Shimura, *Electrophoresis* 23 (2002) 3847.
- [5] Y.-F. Huang, C.-C. Huang, C.-C. Hu, H.-T. Chang, *Electrophoresis* 27 (2006) 3503.
- [6] O. Hofmann, D. Che, K.A. Cruickshank, U.R. Muller, *Anal. Chem.* 71 (1999) 678.
- [7] W. Tan, Z.H. Fan, C.X. Qiu, A.J. Ricco, I. Gibbons, *Electrophoresis* 23 (2002) 3638.
- [8] C. Li, Y. Yang, H.G. Craighead, K.H. Lee, *Electrophoresis* 26 (2005) 1800.
- [9] H. Cui, K. Horiuchi, P. Dutta, C.F. Ivory, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1303.
- [10] B. Yao, H. Yang, Q. Liang, G. Luo, L. Wang, K. Ren, Y. Gao, Y. Wang, Y. Qiu, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5845.
- [11] A.E. Herr, J.I. Molho, K.A. Drouvalakis, J.C. Mikkelsen, P.J. Utz, J.G. Santiago, T.W. Kenny, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1180.
- [12] Y. Li, J.S. Buch, F. Rosenberger, D.L. DeVoe, C.S. Lee, *Anal. Chem.* 76 (2004) 742.

- [13] Y.-C. Wang, M.H. Choi, J. Han, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4426.
- [14] C. Schwer, *Electrophoresis* 16 (1995) 2121.
- [15] M. Minarík, F. Groiss, B. Gaš, D. Blaas, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 123.
- [16] S. Hjertén, *J. Chromatogr. A* 347 (1985) 191.
- [17] S. Hjertén, J.-L. Liao, K. Yao, *J. Chromatogr. A* 387 (1987) 127.
- [18] J.R. Mazzeo, I.S. Krull, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2852.
- [19] L. Steinmann, R.A. Mosher, W. Thormann, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 219.
- [20] Q. Tang, C.S. Lee, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 113.
- [21] J. Horvath, V. Dolník, *Electrophoresis* 22 (2001) 644.
- [22] E.A.S. Doherty, R.J. Meagher, M.N. Albarghouthi, A.E. Barron, *Electrophoresis* 24 (2003) 34.
- [23] V. Dolník, *Electrophoresis* 25 (2004) 3589.
- [24] F. Kilár, A. Végvári, A. Mód, *J. Chromatogr. A* 813 (1998) 349.
- [25] J.-M. Busnel, A. Varenne, S. Descroix, G. Peltre, Y. Gohon, P. Gareil, *Electrophoresis* 26 (2005) 3369.
- [26] J.-M. Busnel, M.-C. Hennion, G. Peltre, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 99.
- [27] J.-M. Busnel, F. Kilár, V. Kašicka, S. Descroix, M.-C. Hennion, G. Peltre, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 183.
- [28] P. Antonioli, M.E. Mendieta, R. Sebastian, A. Citterio, G. Peltre, J.-M. Busnel, S. Descroix, G. Candiano, P.G. Righetti, *J. Chromatogr. B* 833 (2006) 19.
- [29] R. Charlionet, J.P. Martin, R. Sesboüé, P.J. Madec, F. Lefebvre, *J. Chromatogr.* 176 (1979) 89.
- [30] R.K. Brown, M.L. Caspers, J.M. Lull, S.N. Vinogradov, K. Felgenhauer, M. Nekic, *J. Chromatogr.* 131 (1977) 223.
- [31] Y. Shen, R.D. Smith, *J. Microcolumn Separations* 12 (2000) 135.
- [32] M. Gilges, M.H. Kleemiss, G. Schomburg, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2038.
- [33] B.A. Williams, G. Vigh, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1174.
- [34] J.C. Giddings, K. Dahlgren, *J. Sep. Sci.* 6 (1971) 345.
- [35] R. Sebastian, C. Simó, M.E. Mendieta, P. Antonioli, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre, P.G. Righetti, *Electrophoresis* 9999 (2006) NA.
- [36] C. Simó, M.E. Mendieta, P. Antonioli, R. Sebastian, A. Citterio, A. Cifuentes, G. Peltre, P.G. Righetti, *Electrophoresis* 27 (2006) 4849.
- [37] J.N. Behnke, S.M. Dagher, T.H. Massey, J. Deal, W. C., *Anal. Biochem.* 69 (1975) 1.
- [38] M. Dishon, G.H. Weiss, *Anal. Biochem.* 81 (1977) 1.
- [39] W. Thormann, T. Huang, J. Pawliszyn, R.A. Mosher, *Electrophoresis* 25 (2004) 324.

- [40] P.D. Grossman, J.C. Colburn, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, Inc., San Diego, 1992.

2.3. Article 2: Use of quasi-isoelectric buffers as anolyte and catholyte to improve CIEF performances

Martine Poitevin, Gabriel Peltre, Stephanie Descroix*

Electrophoresis 29 (2008) 1687-1693

Abbreviations

NC: narrow pH cuts of carrier ampholytes, HPC: hydroxypropylcellulose

Keywords

CIEF, EOF, narrow pH cuts of carrier ampholytes, quasi-isoelectric buffers.

Abstract

The use of quasi-isoelectric anolytes and catholytes has been investigated to improve CIEF performances. Narrow pH cuts of carrier ampholytes (NC) have been compared to more conventional couples of anolytes/catholytes (phosphoric acid/sodium hydroxide and glutamic acid/lysine). First a CIEF setup that consists in a bare silica capillary and 70/30 water/glycerol separation medium has been used. The experiments have shown that when using NC instead of more classical anolytes and catholytes, an increase of protein detection time was observed and the resolutions obtained for neutral and acidic proteins were doubled. Moreover, according to the NC fraction used, the resolution was modified. In order to investigate further the mechanisms involved, a second setup using a capillary coated with hydroxypropylcellulose (HPC) was used. With this setup no difference has been observed when changing anolyte and catholyte nature. A simple methodology has then been developed to evaluate EOF during focusing and mobilization steps of CIEF experiments. It highlighted the crucial role played by EOF when using a bare silica capillary. EOF indeed decreased by 33% during mobilization step when using NC instead of classical anolytes and catholytes.

1. Introduction

In the field of proteomics, 2D gels are classically used to perform the separation of complex protein mixtures [1, 2]. This technique is powerful but labour intensive and time consuming. As an alternative, capillary electrophoresis appears to be a promising tool to miniaturize protein analysis [3-6]

In particular, isoelectric focusing allows the separation of amphoteric compounds such as peptides or proteins in a pH gradient according to their isoelectric point [7]. It has been performed in capillary format [8, 9] or in microdevices [10-15], sometimes coupled with a second separation dimension [16-19]. Several IEF steps have even been coupled to improve protein resolution [20].

In capillary format or in microdevices, the pH gradient is usually formed by carrier ampholytes mixtures present in the separation medium. The separation channel is placed between anolyte and catholyte reservoirs, which contain respectively an acid and a base, in order to allow the formation of the pH gradient under electric field. EOF is usually minimized to allow good protein focusing. In traditional fused silica capillaries, this is generally done by permanent or dynamic capillary coating. In the case of non-coated capillaries, the separation medium viscosity has then to be increased by glycerol [21] or methylcellulose [22] addition, which also limits EOF. Moreover, all these procedures avoid protein adsorption on capillary walls.

Several studies have investigated the mechanisms of the pH gradient formation, mostly in capillary format but also in microdevices. The pH gradient can indeed be disrupted by several phenomena. One of them is known as the plateau phenomenon [23]. It leads to a flattening of the neutral part of the pH gradient and is due to a compression of very acidic and very basic carrier ampholytes towards the extremities of the pH gradient. Another one has been described as the cathodic drift. It is a degradation of the pH gradient due to the fact that carrier ampholytes leave the capillary by an ITP phenomenon [24]. The presence of salts in the sample can also compress the pH gradient in the middle of the capillary: as the presence of salts leads to higher current, hydronium and hydroxide ions from anolyte and catholyte enter the capillary and titrate carrier ampholytes [25]. In microdevices, this compression of the pH gradient in the middle of the capillary has been observed [12, 13] and has been attributed to diffusion of anolyte and catholyte inside the separation channel. EOF also influences the location of the pH gradient in the separation channel: Thormann

et al. have shown that in the presence of EOF an equilibrium is reached between anodic loss of ampholytes by ITP and EOF [26].

Anolyte and catholyte can play a major role in the pH gradient formation. To avoid the drift phenomenon, Mosher and Thormann recommend maximizing electrolyte concentration to current density ratio [24]. In order to limit the entrance of electrode solutions inside the separation channel, their viscosity can also be increased. This gave satisfying results in PDMS microchips [13, 20] but lead to an increase of the gradient compression in plastic microchips [12]. Moreover the use of amphoteric compounds as anolytes and catholytes has not been studied to a large extent [27].

The aim of this paper is to study the use of quasi-isoelectric anolytes and catholytes in order to improve CIEF separations. In particular we have investigated the potential of “narrow pH cuts” of carrier ampholytes (NC) in comparison to more conventional electrolytes. NC have been obtained by preparative IEF fractionation of commercial carrier ampholyte mixtures. Each fraction contains carrier ampholytes with close pI values, and the fraction pH can be expected to be rather close to the pI of the carrier ampholytes present in the fraction. As a consequence, NC have very low conductivity and very low ionic strength while maintaining a satisfying buffering capacity [28]. These properties make them excellent background electrolytes for capillary zone electrophoresis [29-32]. We have also previously shown that added to commercial carrier ampholyte mixtures they could improve CIEF resolution [33]. In the present study, several couples of anolytes and catholytes have been tested to perform CIEF experiments. Classical electrolytes have been compared to single amphoteric compounds and NC. The role of EOF on the pH gradient formation has also been investigated: experiments have been performed in bare silica capillaries with 30% glycerol in the separation medium and in capillaries coated with hydroxypropylcellulose (HPC), in which EOF is very limited.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Beckman pH 3-10 carrier ampholyte mixture came from Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA). Colored pI markers kit from BDH, containing proteins derived from myoglobins with pI in the range 4.7-10.6, used as protein test mixture, was purchased from VWR (Strasbourg, France). Its composition is given in Table 1. Unless otherwise

stated all chemicals were of analytical grade and came from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Glycerol (87%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hydroxypropylcellulose (M.W. 100,000) came from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA). Water was produced with an alpha Q Millipore system (Molsheim, France).

	Protein	pI	M.W.
a, b	C-Phycocyanin (<i>A. Nidulans</i>)	4.75, 4.85	232,000
c	Azurin (<i>P. aeruginosa</i>)	5.65	14,000
d	Trifluoroacetylated Myoglobin Met (Porcine)	5.92	~17,000
e	Myoglobin Met (Porcine)	6.45	17,569
f	Myoglobin Met (Equine)	7.30	17,567
g	Myoglobin Met (Sperm Whale), MMsw	8.3	17,815
h	Cytochrome C (horse heart)	10.6	12,360

Table 1: Protein test mixture composition

2.2. CE Apparatus

All the experiments were performed with an HP3DCE apparatus (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with a diode-array detector, an autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. The temperature of the cartridge was set at 25 °C. Data were handled by HP Chemstation software.

2.3. Capillaries

Bare fused silica capillaries (Photonlines, Marly le Roi, France) of 40 cm total length, 31.5 cm effective length and 50 µm id were used. HPC coated capillaries have been coated according to the following procedure [33, 34]: the capillary was filled at 50µL/hour with a 5% (w/v) HPC solution in water, the polymer solution was then ejected under nitrogen pressure (4 bar), and the capillary was heated in a GC oven from 60 °C 140 °C at 5 °C/minute, and maintained at 140 °C for 30 minutes, still under nitrogen flow. Before use, the coated capillaries were rinsed with water for 10 minutes.

Each new bare silica capillary was activated using the following three-step sequence: 10 minutes 1 M NaOH rinse, 10 minutes 0.1 M NaOH rinse and 10 minutes water rinse.

2.4. CIEF experiments

Prior to each experiment, the capillary was filled with the separation mixture, which contained the carrier ampholyte mixture (3% (v/v)) and the protein test mixture. For the

water/glycerol setup, 30% (v/v) of glycerol was also added in the mixture. Hydrodynamic mobilization to the cathodic side was performed under a 30 mbar pressure while maintaining the focusing voltage to prevent analyte diffusion. Proteins from the protein test mixture were detected at 415 nm. Three couples of anolyte and catholyte were used: 90 mM phosphoric acid (pH 1.7) / 20 mM sodium hydroxide (pH 12.2) as classical electrolytes, 30 mM glutamic acid (pH 3.3) / 30 mM lysine (pH 9.9) as single amphoteric compounds, and NC (10% w/v, pH 3.5 and 8.9). The latter solutions have been obtained by preparative IEF fractionation of Serva 4-9 carrier ampholyte mixtures on Sephadex beads, as described elsewhere [28]. When glycerol was present in the separation medium, the same percentage was also added to the anolytes and catholytes solutions.

2.5. EOF evaluation as a function of focusing time.

To evaluate residual EOF as a function of focusing time, after filling the capillary with the ampholyte mixture, a formamide plug (formamide concentration: 10 mM diluted in the carrier ampholyte mixture) has been injected at the capillary inlet, and the focusing step has been performed under 25 kV. At the end of the focusing step, the voltage has been turned off and the capillary content has been mobilized hydrodynamically under 50 mbar. The initial position of the formamide plug in the capillary, $x_0(t_{foc})$, has been calculated using equation 1:

$$x_0(t_{foc}) = l - t_{det}(t_{foc}) \cdot v_{hydro,mob} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where l is the effective length of the capillary, $t_{det}(tfoc)$ is the detection time of the formamide plug and $v_{hydro,mob}$ is the mobilization speed of the capillary under 50 mbar pressure. $v_{hydro,mob}$ has been calculated using equation 2:

$$v_{hydro,mob} = \frac{l}{t_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

where t_0 is the detection time of the formamide plug when the focusing time is set to 0 minutes.

2.6. Electroosmotic velocity evaluation during focusing and mobilization steps

Here the focusing time has been set to 6 minutes, as during CIEF experiments. Mean electroosmotic velocity during focusing step $v_{eo,foc}$ has been determined by similar experiments as previously, and equation 3 has been used:

$$v_{eo,foc} = \frac{x_0}{t_{foc}} \quad (\text{Eq. 3})$$

where x_0 is known from equation 1 and t_{foc} is the focusing time.

As the focusing voltage is maintained during the mobilization step, it is also necessary to evaluate electroosmotic velocity during this step. The following experiment has thus been performed: the capillary has been filled with the carrier ampholyte mixture, a formamide plug has been injected and a focusing step has been performed for 6 minutes. The capillary content has then been mobilized under 50 mbar while maintaining the 25 kV focusing voltage. During this mobilization step, the formamide moves due to electroosmotic flow and mobilization pressure. Its apparent velocity is thus calculated from equation 4:

$$v_{app} = \frac{l - x_0}{t_2} = v_{eo,mob} + v_{hydro,mob} \quad (\text{Eq. 4})$$

where t_2 is the detection time of the formamide plug. As x_0 is known from equation 1 and $v_{hydro,mob}$ is known from equation 2, $v_{eo,mob}$ is deduced easily from equation 4.

3. Results and discussion

The aim of this study is to investigate the use of isoelectric buffers as anolytes and catholytes, in order to improve CIEF separations. Two CIEF setups already described [33] have been used. The first one (CIEF setup 1) uses a bare silica capillary and 30 % of glycerol in the separation medium and the second one (CIEF setup 2) uses an HPC coated capillary and an aqueous separation medium.

Three couples of electrolytes have been used as anolyte and catholyte. The first one is classical and uses 90 mM phosphoric acid (pH 1.7) as anolyte and 20 mM sodium hydroxide (pH 12.2) as catholyte [33]. Two types of quasi isoelectric buffers have also been used. First, single amphoteric compounds that present relatively good buffering capacity [9] have been tested: electrolytes consisting of 30 mM glutamic acid (pH 3.3) for the anolyte and 30 mM lysine (pH 9.9) for the catholyte have been used. At last, the use of complex mixtures of amphoteric compounds has been investigated. NC solutions prepared in the laboratory [28] have thus been used.

3.1. Influence of anolyte and catholyte nature using a bare silica capillary and a hydro-organic electrolyte.

The influence of the anolyte and catholyte nature has first been investigated with CIEF setup 1.

3.1.1. Influence of the fraction pH when using NC as anolyte and catholyte

First, several NC fractions with pH close to glutamic acid and lysine pI have been tested as anolytes and catholytes.

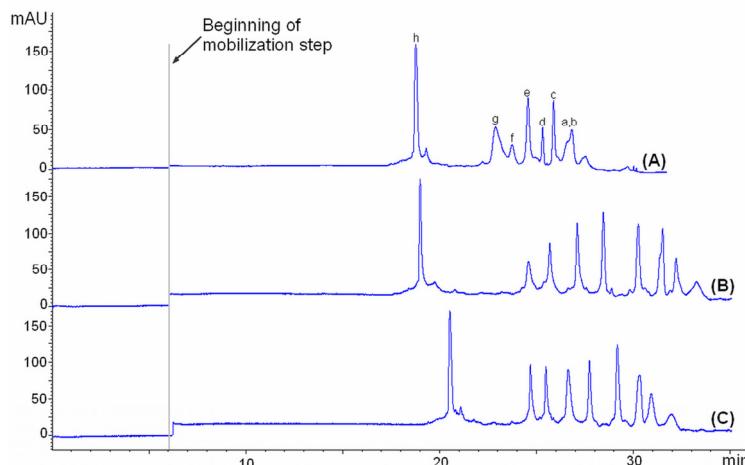


Figure 1 CIEF separation of protein test mixture using NC pH 9.7 4% w/v as catholyte and different NC as anolyte. Bare silica capillary. L = 40 cm, l = 31.5 cm, id = 50 µm - Temperature 25°C, Detection at 415 nm. Focusing: 25 kV / 6 min. Mobilization: P = 30 mbar. Protein concentration: 0.08 mg/mL each. Electrolyte: Beckmann ampholytes: pH 3-10 3 % (v/v) in 70/30 water/glycerol. Anolytes and catholytes are also diluted in 70/30 water/ glycerol. Anolytes (1% w/v) (A): NC pH 3.2 (B): NC pH 3.5 (C): NC pH 3.7.

To investigate the influence of anolyte pH, NC fraction with pI 9.7 (similar to lysine pH) has been used, and three acidic NC fractions (pH 3.2, 3.5 and 3.7) have been compared. The test protein mixture separation obtained is shown on figure 1. Similar experiments have been performed with catholyte and lead to similar results. This clearly illustrate that NC appear to be versatile buffers to improve CIEF experiments, as the separation can be improved significantly according to the NC fractions used as anolyte and catholyte. As they gave the best results, NC pH 3.5 and pH 8.9 have thus been chosen to compare NC to other anolytes and catholytes.

3.1.2. Comparison of different types of anolytes and catholytes

Then, after have shown that different types of NC can be used as anolytes and catholytes, leading to different resolutions, these NC have been compared to more classical electrolytes. The CIEF separation of protein test mixture with CIEF setup 1 using the different anolytes and catholytes is shown on figure 2.

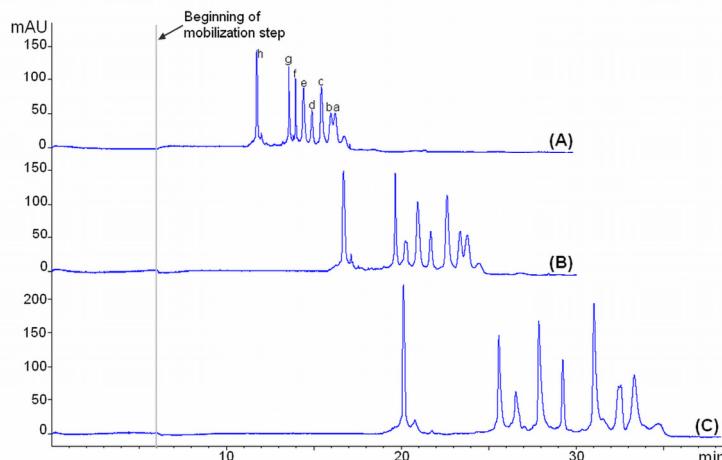


Figure 2. CIEF separation of protein test mixture using different anolytes and catholytes. Bare silica capillary. L = 40 cm, l = 31.5 cm, id = 50 µm - Temperature 25°C, Detection at 415 nm. Focusing: 25 kV / 6 min. Mobilization: P = 30 mbar. Protein concentration: 0.08 mg/mL each. Electrolyte: Beckmann ampholytes: pH 3-10 3 % (v/v) in 70/30 water/glycerol. Anolytes and catholytes are also diluted in 70/30 water/ glycerol. (A): Anolyte: 90 mM phosphoric acid, catholyte: 20 mM sodium hydroxide. (B): Anolyte: 30 mM glutamic acid, catholyte: 30 mM lysine. (C): Anolyte: NC pH 3.5 1% w/v, catholyte: NC pH 8.9 1% w/v.

First, these experiments have shown that whatever the electrolytes used, the pH gradient is compressed. This is demonstrated by the detection of cytochrome C (pI 10.6), which should not even focus inside the capillary, as its pI is not comprised in the pH gradient range (3-10). One can also observe that the range of mobilization times between acidic and basic proteins increase when amphoteric electrolytes are used. The difference between C-phycocyanin (pI 4.7) and cytochrome C (pI 10.6) mobilization times is about 4.5 minutes when classical anolyte and catholyte are used, it reaches 7.1 minutes with glutamic acid and lysine and even 13.2 minutes with NC. These results indicate that the length occupied by the pH gradient in the capillary increases when using NC electrolytes. This limitation of gradient compression also leads to an increase of resolution. Figure 3 shows the resolution between different proteins for the separations shown on figure 2. The resolution between the most basic proteins does not vary much when changing the electrolytes (fig 3a), whereas for neutral and acidic proteins the resolution increases drastically when replacing phosphoric acid and sodium hydroxide by amphoteric electrolytes (fig 3b, 3c and 3d).

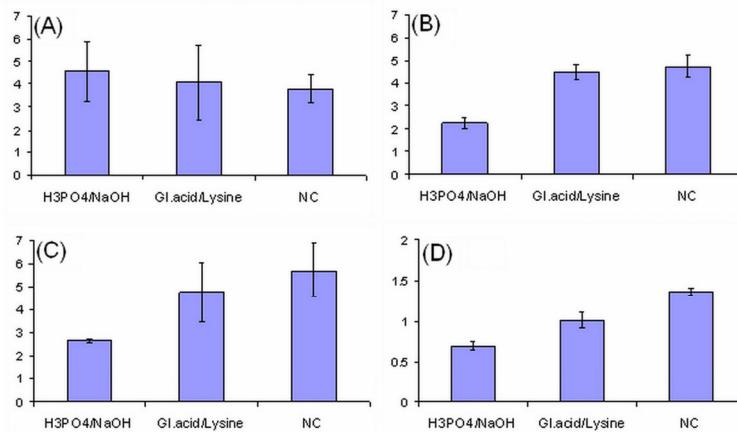


Figure 3. Resolution between several pI markers using different anolytes and catholytes. Experimental conditions are the same as in figure 1. **(A)** Resolution between markers of pI 8.3 and pI 7.3. **(B)** Resolution between markers of pI 6.45 and pI 5.92. **(C)** Resolution between markers of pI 5.92 and pI 5.65. **(D)** Resolution between markers of pI 4.85 and pI 4.75.

An assumption to explain this gradient compression is that carrier ampholytes can be titrated by hydronium/hydroxide ions from anolyte/catholyte [25]. For instance, when hydronium ions from anolyte enter the capillary electrophoretically, the pH decreases locally, and the carrier ampholytes acquire a positive net charge. These acidic carrier ampholytes thus move towards the cathode. In our case, the pH of the amphoteric anolytes used is higher than the one of the classical 90 mM phosphoric acid solution also used. The concentration of protons is thus lower in amphoteric anolytes than in the classical one. As the number of protons entering the capillary is proportional to their concentration in the anolyte solution [25], they will less enter the capillary when amphoteric solutions are used, thus limiting the compression of the pH gradient. Similarly, the pH gradient will be less compressed when using amphoteric solutions instead of sodium hydroxide as catholyte.

3.2. Anolyte and catholyte influence on CIEF experiments performed in HPC coated capillaries

In order to investigate further the phenomena involved in the previous results, a similar series of experiments has been performed with CIEF setup 2, which uses an aqueous separation medium and an HPC coated capillary. In this case, there was no significant difference in terms of migration times and resolution between the separations when changing the nature of electrolytes (data not shown). Moreover, the resolutions between proteins with CIEF setup 2 were much lower than with CIEF setup 1: while seven peaks were observed with CIEF setup 1, only five were observed with CIEF setup 2. The differences between the two series of experiments could first be linked to the presence of

glycerol in CIEF setup 1, which increases the separation medium viscosity. A third series of experiments has thus been performed to elucidate this. The three previous couples of electrolytes have been tested in an “intermediate” CIEF setup, which uses an HPC coated capillary and 30% of glycerol in the separation medium (CIEF setup 3). The separations obtained were very similar to the ones obtained with CIEF setup 2 and again no significant changes have been observed in the separation when changing the electrolyte nature (data not shown). The presence of glycerol thus does not explain the differences between the separations obtained with CIEF setups 1 and 2.

These results thus seem to show that EOF is certainly the key parameter to explain that anolyte and catholyte nature influence the separation pattern only with CIEF setup 1. Electroosmotic mobility has indeed been measured in borate buffer (pH 9.2, 50 mM ionic strength): it was $54.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in a bare silica capillary in pure aqueous medium, decreased to $14.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ when adding 30% glycerol in the separation medium and even reached $2.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ when using an HPC coated capillary in pure aqueous medium.

3.3. Influence of anolyte and catholyte nature on EOF during CIEF experiments

To study more precisely the influence of anolyte and catholyte nature on EOF during CIEF separations, a methodology has been developed to evaluate EOF during the different CIEF steps, namely focusing and mobilization.

First, mean electroosmotic velocity as a function of focusing time has been evaluated by the injection of a formamide plug after filling the capillary with carrier ampholytes (see materials and methods part for experimental setup). The comparison has been done between CIEF setups 1 and 3, in order to keep the viscosity constant and to evaluate only the influence of the HPC coating. The results obtained for the different couples of anolytes and catholytes used are shown on figure 4. As expected when using CIEF setup 3 no differences were observed between the different anolytes and catholytes couples. Moreover, with the HPC coating, the formamide plug remained very close to the anodic side: it covered less than 3 cm within 10 minutes, which corresponds to an electroosmotic velocity inferior to $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. On the contrary, when using CIEF setup 1 the formamide plug moved towards the cathode as the focusing time increased, due to the presence of residual EOF. Surprisingly, no major difference was observed between the different anolyte and catholyte couples, even if a slight limitation of the boundary migration was observed when using amphoteric electrolytes instead of classical ones.

Nevertheless, this difference is not sufficient to explain the differences observed on figure 3 when changing the electrolyte nature.

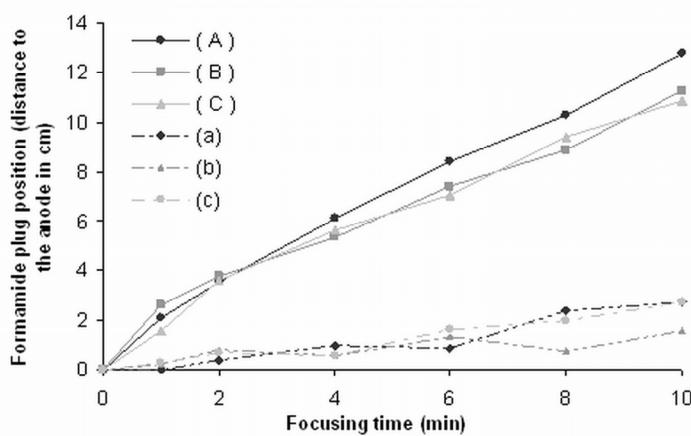


Figure 4. Position of the boundary between anolyte and carrier ampholyte as a function of focusing time in a bare silica capillary (A, B and C) or in an HPC coated capillary (a, b and c), using different anolytes and catholytes. Focusing voltage: 25 kV. Electrolyte: 3 % (v/v) Beckman ampholytes pH 3-10 in 70/30 water/glycerol. Anolytes and catholytes are also diluted in 70/30 water/glycerol. (A and a): Anolyte: 90 mM phosphoric acid, catholyte: 20 mM sodium hydroxide. (B and b): Anolyte: 30 mM glutamic acid, catholyte: 30 mM lysine. (C and c): Anolyte: NC pH 3.5 1% w/v, catholyte: NC pH 8.9 1% w/v.

EOF has thus been evaluated for CIEF setup 1 not only during focusing step but also during mobilization step. For this series of experiments, the focusing time has been set to 6 minutes, as in figure 2. The experimental protocol is detailed in the materials and methods parts. The results obtained are shown on figure 5. Figure 5A confirms that there is only a slight difference of EOF during focusing step when using amphoteric anolytes and catholytes instead of classical ones. On the contrary, figure 5B shows that electroosmotic velocity during mobilization step is decreased by 22% when using glutamic acid and lysine instead of phosphoric acid and sodium hydroxide as anolyte and catholyte. This decrease even reaches 33% when using NC instead of classical electrolytes. This could be due to the fact that the amphoteric compounds used could interact with the silanol groups of the capillary walls, leading to a decrease of the net charge of the capillary surface and thus a decrease of EOF [32]. It is outstanding that the differences of electroosmotic velocities are observed mainly during mobilization step. This may be due to the fact that during this mobilization step anolytes are forced to enter the capillary or simply that focusing step is not long enough to observe significant differences between the anolyte and catholytes couples used. Nevertheless, these differences of mobilization speed during mobilization step explain the increase of mobilization times observed on figure 2: as EOF is decreased during mobilization step, the apparent mobilization speed is decreased, and the focused proteins need more time to

leave the capillary when using amphoteric anolyte and catholyte. This gradual increase of mobilization times also lead to the increase of resolutions observed (figure 3). No significant variation of resolution of basic proteins was observed because as they go out of the capillary first, their increase of mobilization times is less pronounced than for the acidic ones.

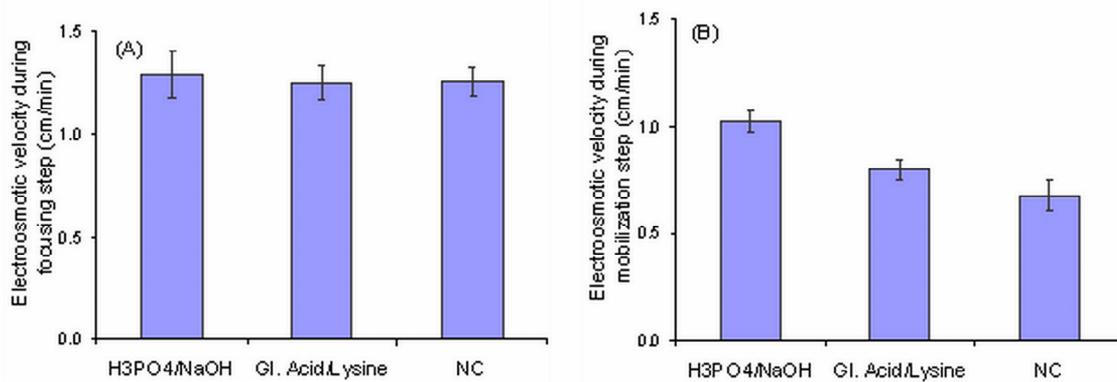


Figure 5. Electroosmotic velocities during focusing and mobilization steps using different anolyte and catholyte in a bare silica capillary. Focusing 25 kV, 6 min. Electrolyte: 3 % (v/v) Beckman ampholytes pH 3-10 in 70/30 water/ glycerol. Anolytes and catholytes are similar to figure 4 and also diluted in 70/30 water/glycerol. (A): electroosmotic velocity during focusing step. (B): electroosmotic velocity during mobilization step.

Finally, it can be concluded that the differences observed when changing the nature of anolyte and catholyte with a bare silica capillary were probably not due to a limitation of the gradient compression during focusing step, but to a decrease of EOF velocity during mobilization step when using single amphoteric compounds or NC as anolytes and catholytes.

4. Concluding remarks

An interesting and original tool to improve resolution in CIEF separation is reported here: the use of amphoteric anolytes and catholytes in CIEF has been investigated, and their ability to improve CIEF separations in bare silica capillaries has been demonstrated. In the absence of EOF (HPC coated capillaries) no difference in the separation pattern was observed when using classical or amphoteric electrolytes whereas in the presence of residual EOF, the use of NC increased greatly resolution between focused proteins. We have shown that this was probably due to a decrease of EOF velocity during mobilization step. To do so, we have developed a methodology to evaluate EOF during CIEF experiments using a classical CE apparatus. At last, it is worth to be noticed that the fact

that NC can influence EOF should be useful not only for CIEF but also for CZE experiments [32].

5. References

- [1] Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
- [2] Rabilloud, T., *Proteomics* 2002, 2, 3-10.
- [3] Dolník, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 126-141.
- [4] Huang, Y.-F., Huang, C.-C., Hu, C.-C., Chang, H.-T., *Electrophoresis* 2006, 27, 3503-3522.
- [5] Ahrer, K., Jungbauer, A., *Journal of Chromatography B* 2006, 841, 110-122.
- [6] Cooper, J. W., Wang, Y., Lee, C. S., *Electrophoresis* 2004, 25, 3913-3926.
- [7] Weistermeir, R., *Electrophoresis in Practice* Wiley-WCH (Ed.) 2001, pp. 45-58.
- [8] Kilár, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 3908-3916.
- [9] Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2006, 27, 923-938.
- [10] Hofmann, O., Che, D., Cruickshank, K. A., Muller, U. R., *Anal. Chem.* 1999, 71, 678-686.
- [11] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887-3908.
- [12] Das, C., Fan, Z. H., *Electrophoresis* 2006, 27, 3619-3626.
- [13] Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., Ivory, C. F., *Anal. Chem.* 2005, 77, 1303-1309.
- [14] Li, C., Yang, Y., Craighead, H. G., Lee, K. H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1800-1806.
- [15] Yao, B., Yang, H., Liang, Q., Luo, G., Wang, L., Ren, K., Gao, Y., Wang, Y., Qiu, Y., *Anal. Chem.* 2006, 78, 5845-5850.
- [16] Herr, A. E., Molho, J. I., Drouvalakis, K. A., Mikkelsen, J. C., Utz, P. J., Santiago, J. G., Kenny, T. W., *Anal. Chem.* 2003, 75, 1180-1187.
- [17] Wang, Y.-C., Choi, M. H., Han, J., *Anal. Chem.* 2004, 76, 4426-4431.
- [18] Li, Y., Buch, J. S., Rosenberger, F., DeVoe, D. L., Lee, C. S., *Anal. Chem.* 2004, 76, 742-748.
- [19] Wang, Y., Rudnick, P. A., Evans, E. L., Li, J., Zhuang, Z., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Balgley, B. M., *Anal. Chem.* 2005, 77, 6549-6556.
- [20] Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., Ivory, C. F., *Anal. Chem.* 2005, 77, 7878-7886.
- [21] Busnel, J.-M., Varenne, A., Descroix, S., Peltre, G., Gohon, Y., Gareil, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 3369-3379.
- [22] Kilár, F., Végvári, A., Mód, A., *J. Chromatogr. A* 1998, 813, 349-360.
- [23] Mosher, R. A., Thormann, W., Bier, M., *J. Chromatogr.* 1986, 351, 31-38.
- [24] Mosher, R. A., Thormann, W., *Electrophoresis* 1990, 11, 717-723.
- [25] Liao, J.-L., Zhang, R., *J. Chromatogr. A* 1994, 684, 143-148.

- [26] Thormann, W., Caslavská, J., Mosher, R. A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 154-163.
- [27] Mosher, R. A., Thormann, W., Bier, M., *J. Chromatogr. A* 1988, 436, 191-204.
- [28] Busnel, J.-M., Hennion, M.-C., Peltre, G., *J. Chromatogr. B* 2005, 818, 99-107.
- [29] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Kašicka, V., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, 27, 3591-3598.
- [30] Busnel, J.-M., Descroix, S., Le Saux, T., Terabe, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, 27, 1481-1488.
- [31] Busnel, J.-M., Kilár, F., Kašicka, V., Descroix, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., *J. Chromatogr. A* 2005, 1087, 183-188.
- [32] Antonioli, P., Mendieta, M. E., Sebastian, R., Citterio, A., Peltre, G., Busnel, J.-M., Descroix, S., Candiano, G., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. B* 2006, 833, 19-25.
- [33] Poitevin, M., Morin, A., Busnel, J.-M., Descroix, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 230-236.
- [34] Shen, Y., Smith, R. D., *J. Microcolumn Separations* 2000, 12, 135-141.

2.4. Utilisation de NC comme anolyte et catholyte: expériences complémentaires

Lors de la rédaction de l'article précédent, plusieurs expériences ont été citées, sans pour autant être présentées. Elles le sont ici plus en détail.

2.4.1. Variation de la nature des NC utilisés comme catholyte

Tout d'abord, seule l'influence de la nature des NC utilisés comme anolyte a été présenté dans l'article précédent. La Figure 1 illustre ici l'influence de la nature et du pH des NC utilisés comme catholyte sur la séparation d'un mélange test de protéines (mélange de marqueurs de pI BDH 4,7-10,6). On peut remarquer une nette amélioration de la résolution quand le pH du NC utilisé comme catholyte diminue.

Ceci confirme le fait que les NC sont des électrolytes polyvalents, dans la mesure où la séparation peut être améliorée de façon significative en fonction du NC utilisé comme anolyte ou catholyte.

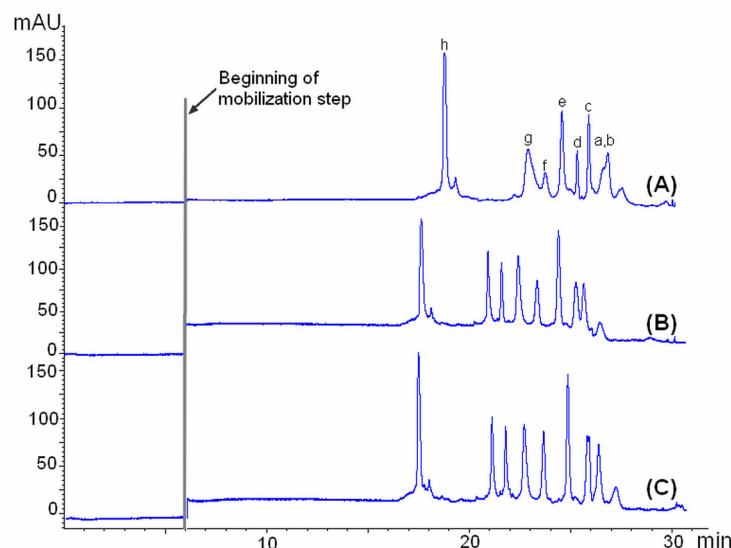


Figure 1 : Séparation en CIEF d'un mélange test de protéines en utilisant le NC de pH 3,2 à 4% m/v comme anolyte et différents NC comme catholyte. Conditions expérimentales similaires à celles de la figure 1 de l'article 2. (A): NC pH 9,7 (B): NC pH 9,4 (C): NC pH 8,9.

2.4.2. Utilisation d'anolytes et de catholytes de différentes natures en présence d'un capillaire greffé

Comme décrit dans l'article précédent, l'utilisation d'anolytes et catholytes quasi-isoélectriques a permis d'améliorer notablement les séparations en CIEF, lorsqu'un capillaire en silice vierge et 30% de glycérol dans l'électrolyte de séparation étaient utilisés. Ceci n'a pas été le cas lors de l'utilisation d'un capillaire greffé HPC et d'un électrolyte purement aqueux, comme l'illustre la Figure 2. En effet, aucune différence notable en terme de temps de migration et de résolution n'a alors été observée en changeant la nature des anolytes et catholytes. Comme il a été démontré dans l'article 2, ceci confirme bien que les différences observées en capillaire en silice vierge étaient principalement dues à des différences de FEO résiduel, d'où l'absence d'influence notable de la nature de l'électrolyte lors des expériences réalisées ici.

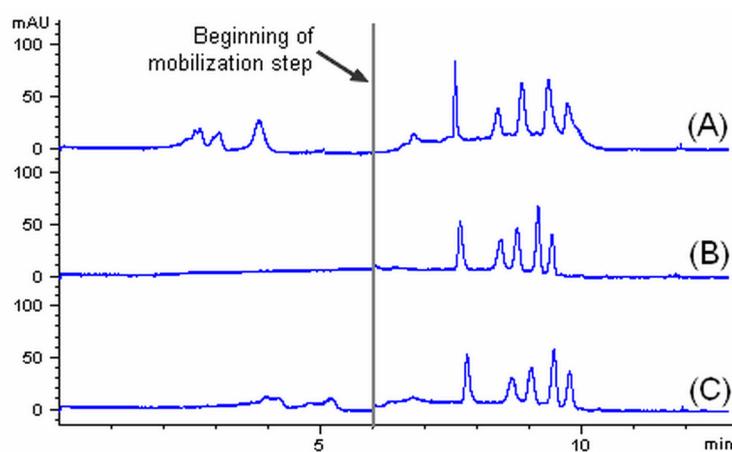


Figure 2 : Séparation par CIEF d'un mélange test de protéines en utilisant différents anolytes et catholytes. Capillaire greffé HPC, L = 40 cm, l = 31,5 cm, id = 50 µm - Température 25°C, Détection à 415 nm. Focalisation: 25 kV /6 min. Mobilisation: P = 30 mbar. Electrolyte: Ampholytes Beckman: pH 3-10 3 % (v/v) dans l'eau. (A) : anolyte : acide phosphorique 90 mM, catholyte : soude 20mM. (B) : anolyte : acide glutamique 30mM, catholyte : lysine 30mM. (C) : anolyte : NC pH 3,5 4% m/v, catholyte: NC pH 8,9 4% m/v.

2.5. Conclusion

Ces travaux ont donc permis de comparer plusieurs systèmes de CIEF, transposables relativement facilement en microsystèmes pour la séparation de protéines modèles

Il s'est ainsi avéré qu'un système de séparation utilisant un capillaire en silice vierge et 30% de glycérol dans l'électrolyte de séparation a permis d'obtenir de meilleurs résultats en termes de résolution qu'avec un milieu de séparation purement aqueux et un capillaire greffé thermiquement avec un polymère neutre et hydrophile. Ces résultats sont plutôt satisfaisants dans la mesure où le greffage des capillaires est effectué sous courant d'azote, ce qui ne sera pas facile à transposer directement en microsystème, car le couplage d'un microsystème et de l'arrivée de gaz d'un four de chromatographie en phase gazeuse avec des connectiques étanches est difficile à réaliser.

De plus nous avons montré que l'utilisation de NC pour améliorer les séparations en CIEF a donné des résultats prometteurs. Tout d'abord, leur ajout au mélange initial d'ampholytes porteurs a permis d'améliorer la résolution dans une zone déterminée du gradient de pH. Ensuite, leur utilisation comme anolyte et catholyte a également permis d'augmenter notablement les performances des séparations du système de CIEF utilisant un capillaire en silice vierge et 30% de glycérol dans l'électrolyte de séparation. Cependant, les raisons de cette amélioration se sont révélées quelque peu surprenantes. En effet, nous avons pu démontrer que cette amélioration de résolution était tout simplement due à une diminution du flux électroosmotique résiduel dans le capillaire lorsque des NC étaient utilisés comme anolyte et catholyte. Ceci explique donc pourquoi aucune différence notable n'a été observée entre les différents anolytes et catholytes testés lorsqu'un capillaire greffé était utilisé.

2.6. Références bibliographiques

- [1] Kilár, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 3908-3916.
- [2] Busnel, J.-M., Varenne, A., Descroix, S., Peltre, G., Gohon, Y., Gareil, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 3369-3379.
- [3] Liao, J.-L., Zhang, R., *J. Chromatogr. A* 1994, 684, 143-148.
- [4] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174-1180.

Chapitre 3 :

Séparation de protéines du lait par focalisation isoélectrique en microsystèmes

3.1. Introduction et expériences préliminaires

La seconde partie de ce travail de thèse a consisté à mettre en œuvre la séparation de protéines du lait par IEF en microsystèmes, en mettant à profit les résultats obtenus au format capillaire.

Le travail en microsystème présente toutefois quelques spécificités. Tout d'abord, le mode de détection est modifié, la détection UV étant remplacée par une détection par fluorescence. Ceci nous a donc imposé de dériver les protéines avec un marqueur fluorescent; nous verrons au cours de ce chapitre que l'utilisation d'une sonde de fluorescence interagissant de manière non covalente avec les analytes nous a semblé être la méthode la plus appropriée pour la séparation par IEF de protéines.

Ensuite, un des avantages majeurs à travailler en microsystème et non plus en capillaire est que l'on peut alors visualiser directement le contenu du canal de séparation, sans avoir à le mobiliser vers un détecteur fixe, ce qui permet de mieux appréhender les mécanismes influençant la focalisation. Pour visualiser l'ensemble des analytes, le canal de séparation est placé sur une platine mobile et passe devant l'objectif d'un microscope (équipé d'une caméra). Au tout début de cette étude, la platine du microscope était déplacée manuellement, mais pour que la vitesse de déplacement reste constante au cours de l'acquisition, cette platine a ensuite été équipée d'un moteur d'astronomie, équipant habituellement les télescopes, comme illustré en Figure 1. Ce dispositif nous a donc permis d'éviter à moindre coût les biais dans l'allure des pics observés induits par une vitesse non constante du déplacement du canal.

Pour des raisons de simplicité nous avons dans un premier temps transposé le système d'IEF décrit dans le chapitre précédent en travaillant en puces de verre non greffé et en utilisant du glycérol dans l'électrolyte de séparation pour les raisons détaillées au cours du chapitre précédent. Les ampholytes choisis pour former le gradient de pH étaient des Servalyt 4-9, car ils avaient donné les meilleurs résultats pour la séparation de protéines du lait en CIEF. En effet, les principales protéines du lait ont des points isoélectriques compris entre 4 et 6 mais nous voulions tout de même conserver une gamme de pH relativement large, notamment pour pouvoir à terme détecter la lactoferrine ($pI \sim 8$),

protéine certes minoritaire, mais dont le potentiel allergisant est de plus en plus souvent reporté dans la littérature [1, 2]. Nous avons alors travaillé à un champ électrique de 750 V/cm. En effet cette valeur avait déjà été optimisée en CIEF, et elle a permis ici d'atteindre les temps de focalisation les plus courts, sans précipitation des protéines ni diminution des performances de séparation.

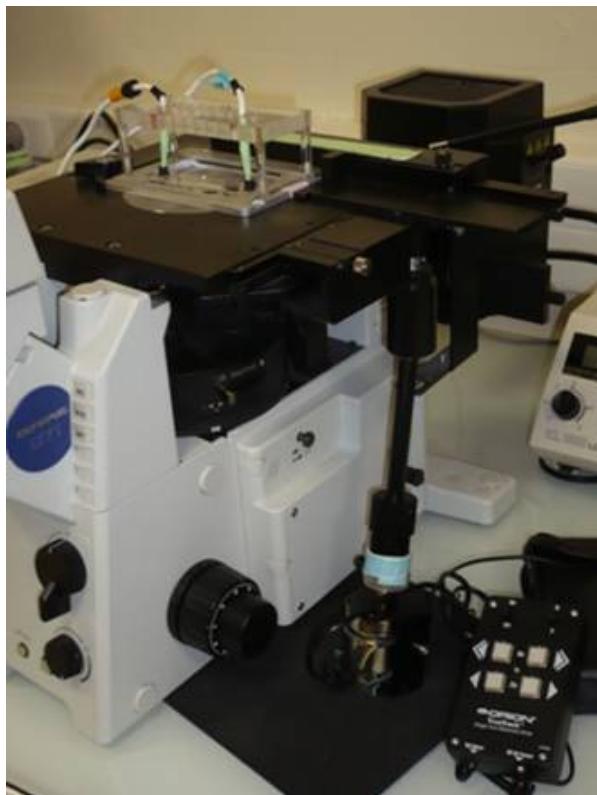


Figure 1 : montage utilisé pour la séparation de protéines du lait par IEF en microsystèmes. La platine du microscope a été motorisée pour permettre un déplacement à vitesse constante du canal de séparation devant le détecteur.

Notre première étude a porté sur le choix de la nature du couple anolyte/catholyte. En utilisant des anolytes classiques, à savoir l'acide phosphorique (90 mM, pH 1,7) et la soude (20 mM, pH 12,2), nous avons observé un fort décalage des protéines vers la cathode, comme en témoigne la Figure 2, qui représente la position dans le canal de la β -lactoglobuline A (pI 5,35) après focalisation, sous différentes conditions expérimentales. Ce décalage vers la cathode pourrait simplement être dû à la présence d'un flux électroosmotique résiduel. Cette hypothèse a été vérifiée en utilisant une puce greffée au polybrène, polymère cationique conférant aux parois des canaux de silice une charge positive et inversant donc le sens du flux électroosmotique. Ainsi, l'utilisation d'un tel greffage conduit à un décalage de la protéine vers l'anode et non plus vers la cathode, ce qui confirme bien le rôle du flux électroosmotique dans la position finale des protéines.

Pour tenter de limiter ce phénomène, nous avons choisi d'utiliser des anolytes et catholytes amphotériques, à savoir l'acide glutamique (30 mM, pH 3,3) et la lysine (30 mM, pH 9,9). Une nette limitation du décalage des protéines a alors été observée. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, l'utilisation d'électrolytes présentant des pH moins extrêmes que l'acide phosphorique ou la soude peut en effet limiter la compression du gradient de pH en limitant l'entrée d'ions H^+ ou HO^- dans le canal de séparation. Ces électrolytes peuvent également diminuer le flux électroosmotique résiduel en interagissant avec les parois du capillaire, comme nous l'avons démontré au chapitre précédent. Malheureusement, ce phénomène s'est également accompagné d'une perte en sensibilité très importante pour certaines protéines. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'acide glutamique et/ou la lysine perturbe(nt) l'interaction des protéines avec le Sypro Orange, utilisé ici comme sonde de fluorescence.

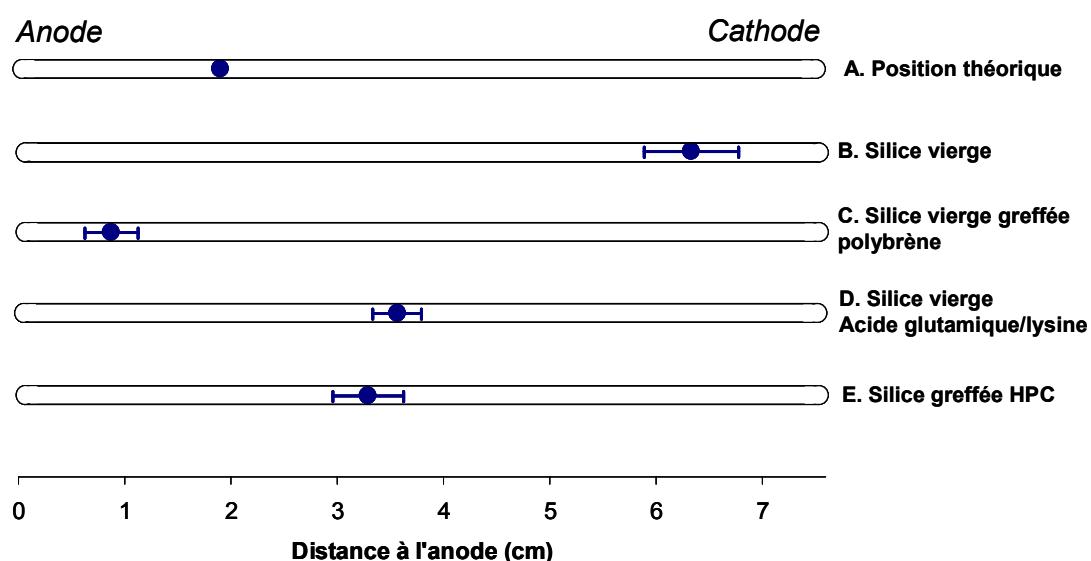


Figure 2: position de la β -lactoglobuline A dans le canal une fois la focalisation achevée, sous différentes conditions expérimentales. Ampholytes utilisés : Servalyt 4-9 3% v/v. Toutes les solutions utilisées contiennent 30% v/v de glycérol. Champ électrique appliqué: 750 V/cm. Anolyte : acide phosphorique 90 mM. Catholyte : soude 20 mM, sauf **D**, où l'acide phosphorique est remplacé par 30 mM d'acide glutamique, et la soude par 30 mM de lysine. **C** : le greffage au polybrène est réalisé en laissant une solution à 5% m/v en polybrène pendant 10 min dans le canal de séparation avant les expériences d'IEF. **E** : le protocole de greffage à l'HPC sera détaillé au cours de ce chapitre.

L'utilisation d'anolytes et catholytes amphotériques a alors été écartée, et nous avons opté pour un greffage covalent des canaux par immobilisation thermique d'HPC, étant donnés les résultats satisfaisants auxquels il a conduit au format capillaire. Comme illustré en Figure 2, et comme nous le verrons au cours du deuxième article présenté dans ce

chapitre, il aura permis de limiter fortement le décalage des protéines vers la cathode, tout en conservant une focalisation correcte.

Par la suite, l'utilisation de puces en PDMS a également été envisagée. En effet, ces dernières sont beaucoup moins onéreuses que les puces en verre, et peuvent être microfabriquées au laboratoire. Du fait de son caractère élastomérique le PDMS permet aussi l'intégration de vannes permettant d'isoler les différents systèmes de canaux composant les microsystèmes, ce qui sera un avantage majeur pour la mise en œuvre des séparations bidimensionnelles. Cependant, la surface du PDMS est beaucoup plus hydrophobe que le verre, et des stratégies devront donc être mises en œuvre pour limiter l'adsorption des analytes à la surface des canaux. Ainsi, deux types de greffage ont été envisagés pour greffer la surface du PDMS : une immobilisation thermique d'HPC déjà utilisée sur les canaux en verre, et un greffage au PDMA-AGE (Poly(dimethylacrylamide-co-allyl glycidyl ether)), développé par l'équipe de M. Chiari [3].

Ce dernier polymère est représenté en Figure 3. Il est obtenu par polymérisation radicalaire de N,N-diméthylacrylamide et d'allyl glycidyl ether. Dans le cas d'un capillaire de silice, il s'adsorbe sur les parois via des liaisons hydrogène. Le greffage est réalisé en introduisant une solution de ce polymère dans le capillaire, et en l'y laissant pendant 10 minutes. Il a permis de réaliser à la suite 50 séparations d'ADN par électrophorèse en gel à pH basique (tampon 100 mM TAPS-Tris EDTA pH 8,5) avec une répétabilité très satisfaisante [3]. Les capillaires greffés au PDMA-AGE par cette méthode peuvent toutefois être régénérés par un rinçage à la soude 0,1M. La stabilité de ce greffage devra donc être vérifiée lors des expériences d'IEF, lors desquelles il sera potentiellement soumis à des pH très basiques.

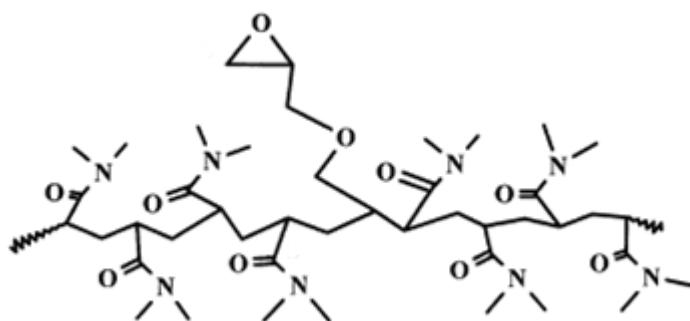


Figure 3 : Réprésentation schématique du PDMA-AGE.

Une représentation schématique de l'HPC est présentée en Figure 4. Ce polymère est hautement hydrophile, comme le sont les autres polymères de cellulose substituée. Y. Shen et al. [4] ont testé deux procédures différentes pour greffer les parois du capillaire avec de l'hydroxypropylcellulose. L'une d'elle consiste à remplir le capillaire d'une solution de polymère, puis la solution est extraite sous pression d'azote et les parois sont séchées pendant quatre jours sous le même flux d'azote, à température ambiante. De cette manière, les polymères sont physiquement adsorbés sur les parois du capillaire. Les résultats ont montré qu'après seulement deux séparations, ce type de revêtement n'était plus stable sous des conditions de CIEF. Ceci suggère qu'une simple adsorption des polymères sur la paroi n'est pas suffisante pour obtenir un greffage stable. La deuxième procédure consiste en une immobilisation thermique à 140°C. Les tests ont montré que ce type de revêtement était stable dans les conditions de CIEF, sur une gamme de pH 3-10. C'est donc cette procédure que nous avons décidé d'adapter au format microsystème.

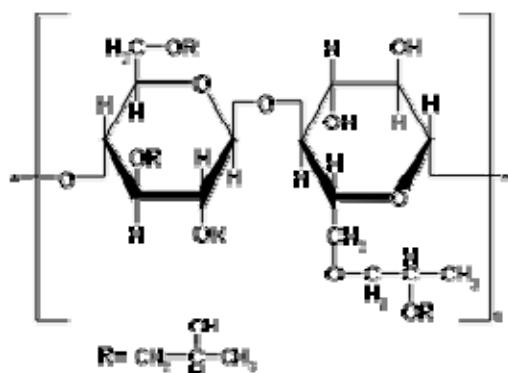


Figure 4 : Représentation schématique de l'hydroxypropylcellulose.

Les différents types de traitements de surface utilisés ont tout d'abord été caractérisés par mesures d'angle de contact et de flux électroosmotique. Pour réaliser ces mesures de flux électroosmotique, nous avons développé une méthode d'électrophorèse frontale permettant de mesurer des mobilités électroosmotiques faibles dans un temps court et dans n'importe quelle géométrie de microsystème. Le potentiel de différents matériaux pour la séparation de protéines du lait par IEF a ensuite été étudié.

Dans un premier temps, afin de caractériser ces traitements de surface, l'article suivant présente la méthode utilisée et les résultats obtenus pour la mesure des FEO en microsystèmes.

3.2. Article 3: Versatile method for EOF measurements in microchip CE

Article soumis à Electrophoresis

Yuliya Shakalisava^a, Martine Poitevin^b, Jean-Louis Viovy^a and Stephanie Descroix^{b*}

^a Laboratoire de Physico-Chimie, Institute Curie, UMR-CNRS 168, Paris, France.

^b Laboratoire de Environnement et Chimie Analytique, UMR-CNRS 7121, ESPCI, Paris, France. Fax: +33 140794776; Tel:+33 140794644; E-mail: stephanie.descroix@espci.fr

Abstract

A novel versatile method for the determination of low or high EOF values in microdevices of variable microchannel design is presented. The EOF calculation is based on the difference of the apparent and effective mobilities of a reference compound. These values are obtained under identical conditions in a conventional CE system and the microchannel of interest, respectively. The proposed method uses microchip frontal electrophoresis for the determination of the apparent mobility of the reference compound. This requires simple monochannel microchip design and demonstrates versatile and time-saving procedure when comparing to conventional current monitoring method when measuring low EOF. It has been applied successfully to the characterization of different coating procedure in glass and PDMS microchips.

Introduction

The development of microfluidic chip based miniaturised technology, so called Lab-on-Chip (LOC) and μ -Total Analytical System (μ TAS), has brought the performance of analytical chemistry to a new level. The requirements for minimal space used, portability, ease of manipulation, inexpensive manufacturing cost, minimal sample and reagent consumption have determined the attractive features of miniaturised analytical systems [1-4]. With the development of microfluidic technologies, increasingly diverse materials such as glass, poly(dimethylsiloxane) (PDMS) or cyclic olefin copolymer (COC) [5] are employed for a wide variety of applications. These materials present various surface properties. In particular, they present different hydrophobicities and /or zeta potential and thus lead to different EOF values when performing microchip electrophoresis [6]. Depending on the experiments performed, it can be necessary to modify the microchannel surface [7] in order to prevent analyte adsorption or to decrease EOF.

To characterize these surface treatments, it is often necessary to evaluate EOF in microchip. Several methods have been proposed for this purpose [8]. The most widely used, current monitoring method, was introduced by Huang *et al.* [9] and consists in monitoring the current level while a higher concentration buffer is being replaced by a lower concentration buffer in a microchannel. Pittman *et al.* [10] showed that current monitoring technique should be applied with caution in microfluidic systems as the measurement technique itself can alter EOF and the effect of the intersecting channels in the microchip design can mislead the measurements. Chen *et al.* reported a method to determine EOF by indirect laser-induced fluorescence detection [11]. Nevertheless this method requires an optimisation of the injection and separation voltage program. Moreover it can be expected that in case of low EOF determination the experiments should be very long. Another method to measure EOF in microchip is more widely used in traditional capillary electrophoresis and consists in adding a neutral compound to the investigated mixture as the EOF marker [12,13]. Nevertheless, the interaction of hydrophobic EOF marker and microchannel walls can limit this technique as the combination of reduced hydrophobic properties with the suitable properties for a specific detection technique is rather rare. Moreover, these methods are well adapted for high EOF values, but require long analysis times and can become less accurate when measuring low EOF. In capillary format, Williams and Vigh [14] have developed a fast method to measure low EOF. However, as this method requires precise hydrodynamic injection of a

neutral marker and employs pneumatically driven mobilization, it is not easily transposable to microchip format. Xu *et al.* have introduced the possibility to measure EOF by amperometric detection [15]. This method allows the detection of non electroactive analytes based on amperometric response of dissolved oxygen in solution. This method required an electrochemical detection as well as a special design integrating carbon fiber disk as working electrode. Recently Wang *et al.* [16] has reported a fast method for low or zero EOF measurement in microchips. It is based on detecting the effective mobility of analyte in fast-electroosmosis microchip, while the apparent mobility of the analyte is obtained in the investigated microchip. The mobility of EOF is extracted from the difference of the apparent and effective mobility of analyte. To apply the method a microchip with cross-type channel combined with end-channel amperometric detector is required.

This paper reports a very simple and versatile method that can be used for the determination of very low or high EOF in microchip of any design. It consists in measuring the apparent mobility of a model compound by frontal electrophoresis, while its electrophoretic mobility is calculated using the same method. As it is performed in a single channel, it is applicable to microchips with variable designs. In addition, the necessity of analyte injection is dismissed. This technique was applied to investigate EOF in glass and PDMS monochannel microchips in order to evaluate the ability of two coating procedures to decrease EOF in both chips.

Materials and methods

Unless otherwise stated all chemicals were of analytical grade and came from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Sylgard 184 (PDMS) was from Dow Corning (US). Hydroxypropylcellulose (M.W. 100,000) was from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA). Water was produced with an alpha Q Millipore system (Molsheim, France). A 20 mM borate buffer pH 9 was prepared with distilled water, the pH was adjusted using 0.1 M NaOH and the solution was filtered with 0.22 µm nylon filter. Fluorescein and rhodamine B were used as marker compound as the detection was fluorescence based. An alternative fluorescent compound could also be employed for this purpose.

Microchip analyses were monitored by an inverted fluorescence microscope system (IX-71, Olympus, France) equipped with a spectral filter 460-490 nm and a 100 W mercury lamp. A camera (XCD-X710, Sony, USA) was mounted on the microscope and NI Vision

software (Alliance Vision, France) was used for camera control and image processing. A 6000 V high-voltage power supply (Micralyne, Edmonton, Alberta, Canada) was used to apply electric fields to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, TX) programmed trough a PC-based computer. Both glass and PDMS microchip experiments in this work were performed in single channel microchips (length=7.3 cm, width: 50 μm , depth: 20 μm). All experiments were performed at room temperature. Glass microchips were purchased from Micronit Microfluidics (Enschede, The Netherlands). PEEK Nanoport reservoirs from Upchurch (Oak Harbor, WA, USA) were bonded around the wells to increase the reservoir volume. PDMS microchips fabrication done was according to soft lithography technique [17-20]. Poly(dimethylacrylamide-co-allyl glycidyl ether (PDMA-AGE) was synthesized in house according to the previously published procedure [21] A 0.1% PDMA-AGE solution was introduced into the channel, which has been previously activated with 1 M NaOH for 15 min. The polymer solution was left in the channel for 30 min and then pneumatically removed. The coating procedure with HPC was adapted from previous work [22] where it has been used for bare silica capillaries. The microchannel was filled with 5% w/v HPC aqueous solution, this solution was then removed from the channel, leaving only a thin layer of HPC solution on the microchannel surface. The microchip was then heated at 140°C for 30 minutes in a GC oven, and was merely rinsed with water.

For current monitoring experiments the channel and one of the reservoirs were filled with a 20 mM borate buffer pH 9, while the other reservoir was filled with 18 mM borate buffer pH 9. The electric field of 112 V cm^{-1} was applied and the current-time profile was recorded every second. Frontal electrophoresis experiments were carried out according to the following procedure. Borate buffer was introduced into the channel and one of the reservoirs pneumatically. The second reservoir was filled with the solution of marker dissolved in the identical buffer. The detector was placed at a given location in the channel. The electric field of 250 V cm^{-1} was applied. This value was chosen to decrease analysis time, but some experiments have been performed at 112 V cm^{-1} and did not lead to significant differences in mobility measurements. The polarity of the applied voltage was adjusted regarding the magnitude of EOF.

Results and discussion

A novel method to determine EOF in microchip is proposed in this paper. This method consists in a frontal injection of a solution of a charged fluorescent marker diluted in an alkaline buffer in a microchip previously filled with an identical buffer. As it requires only one channel to perform the experiment, this method can be applied to a number of microchip geometries. Fluorescein, which is negatively charged at alkaline pH [23], has been chosen as fluorescent marker. It has been preferred to a neutral molecule in order to decrease analysis time in case of low EOF measurements and to decrease marker adsorption onto the channel wall. Electroosmotic mobilities were obtained by subtracting fluorescein electrophoretic mobility to its apparent mobility, according to equation 1:

$$\mu_{eo} = \mu_{app} - \mu_{ep}$$
Eq. 1.

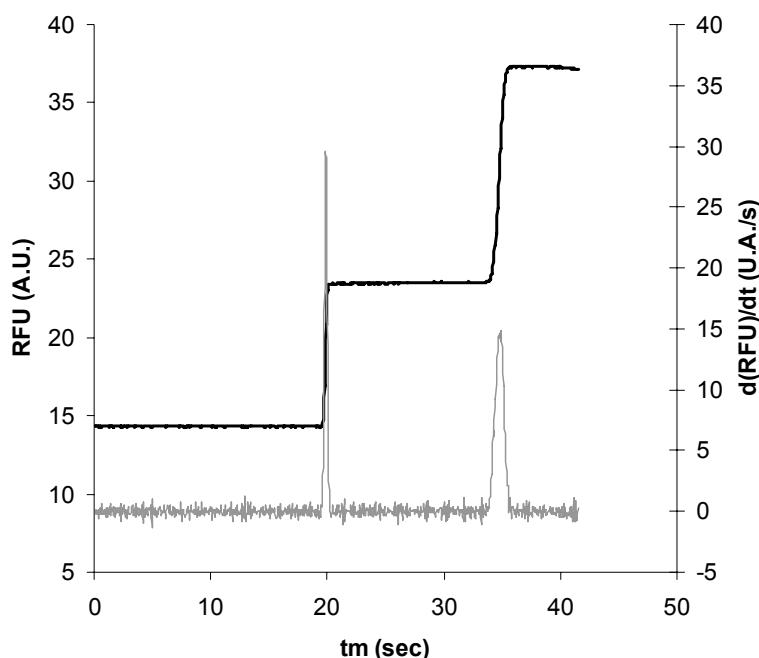


Figure 1. Typical frontal zone electropherogram obtained in bare silica microchip for the determination of fluorescein electrophoretic mobility. Injection of rhodamine B (first peak) and fluorescein (second peak), at 0.1 mg/mL each. Electric field: +250V cm⁻¹. Black line: electropherogram. Grey line: first derivative of the previous electropherogram.

However, fluorescein electrophoretic mobility was unknown. It has been determined thanks to the frontal injection of a fluorescein and rhodamine B mixture in a bare silica microchip. Rhodamine B has been used as EOF marker, because it is globally neutral at alkaline pH. A typical electropherogram obtained with this method is shown in Figure 1. The first derivative of the fluorescence signal has been calculated to ensure accurate determination of migration times. Using this method, fluorescein electrophoretic mobility

was determined to be $-32.7 \pm 0.5 \text{ } 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($n=5$). To validate these experiments, fluorescein electrophoretic mobility has also been calculated using capillary electrophoresis with UV-detection and formamide as EOF marker. The values obtained in microsystems and in capillary were almost identical.

Frontal injections of fluorescein were then used to measure EOF in various microchannels. According to the flow magnitude, the polarity was modified. For example, in case of low EOF a reverse polarity was applied due to the negative effective mobility of fluorescein at alkaline pH.

This method was first used to compare EOF values obtained in glass and PDMS microchips at alkaline pH (20 mM borate buffer pH 9), where high values of EOF are expected. The data from frontal electrophoresis experiments were compared to the one obtained with classical current monitoring method. The results are shown in table 1. For glass microchips the calculated values of electroosmotic mobility were quite similar by frontal electrophoresis and by current monitoring method, and are close to the values classically obtained in bare silica capillaries at this pH [24].

As expected, in case of bare PDMS microchips, EOF values were rather high but were lower than the ones obtained in glass microchip. As in glass microchips, the values obtained with both methods were very close. It thus seems that both methods can be used to determine electroosmotic mobilities in microchannels exhibiting rather high EOF values.

Surface treatment	Glass microchips		PDMS microchips	
	Frontal	Current	Frontal	Current
None	73.3 ± 0.8	78.1 ± 1.5	52.5 ± 2.8	53.7 ± 1.9
PDMA-AGE	-2.1 ± 0.3	< 4	-2.1 ± 0.2	n.d.
HPC	0.1 ± 0.2	< 4	0.4 ± 0.5	n.d.

Table 1. Comparison of EOF mobilities in different channels determined by current monitoring method and new frontal zone electrophoresis method. Mobilities are given in $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. $n = 3$.

To show the versatility of frontal electrophoresis method, very low magnitudes of EOF were investigated in both glass and PDMS microchips coated with two neutral and hydrophilic polymers, HPC and PDMA-AGE. These surface treatment methods are

known to decrease EOF. HPC surface treatment is classically employed in capillary electrophoresis [22] and PDMA-AGE coating have been introduced by the group of M. Chiari [12]. The EOF values were again compared to the ones obtained with current monitoring method. The results shown in table 1 for PDMS and glass microchannels treated with HPC and PDMA-AGE polymers show a dramatic decrease of EOF when the coatings were applied. Nevertheless while measuring EOF by current monitoring method with PDMS treated microchips the current was observed to increase with the time whereas it was expected to decrease. This was probably due to the evaporation of the buffer through PDMS. No determination of EOF magnitude could thus be performed in these cases. Investigating treated glass microchips, accurate EOF measurements could neither be performed using the current monitoring method. The current was indeed noticed to decrease, but the time required for its stabilisation exceeded 30 minutes, after which the experiment was stopped. This time corresponded to the magnitude of EOF being around $4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Conversely it can be seen from table 1 that frontal zone electrophoresis method was able to determine low EOF values in treated glass and PDMS channels. Regardless of the microchip coating, these values are very low, and EOF can thus be considered to be almost zero. It has to be underlined that in case of low EOF the time required to perform one experiment using the frontal electrophoresis method did not exceed 50 seconds, whereas using current monitoring method no well defined trend was observed within 30 minutes. That is the main reason why frontal electrophoresis using a charged compound method allowed an accurate determination of very low EOF values, contrary to current monitoring method.

In conclusion, a rapid method for the determination of low or high EOF values is reported here. It has proven to be applicable to the evaluation of EOF in various experimental conditions in microfluidic devices. Moreover, frontal electrophoresis method for EOF determination only requires a single channel to perform the experiment, no voltage optimisation for injection and separation is necessary: this method can easily be performed within various microchip designs. At last, it has to be noticed that the nature of the reference compound employed can be chosen according to the available detector, making this EOF measurement method very versatile.

Acknowledgments

The authors would like to thank Antoine-Emmanuel Saliba and Sandrine Miserere for their skilful help in PDMS microchip synthesis and current monitoring measurements. This work was supported by AllergyCard European project (contract no. 12793).

References

- [1] R. Daw , J. Finkelstein, *Nature*, 2006, 442, 367-412.
- [2] G.M. Whitesides, *Nature*, 2006, 442, 368-373
- [3] P. Abgrall , A.M. Gue, *J. Micromech. Microengineering*, 2007, 17, R15-R49.
- [4] P.S. Dittrich, K. Tachikawa , A. Manz, *Anal. Chem.*, 2006, 78(12), 3887-3908.
- [5] D. Paul, A. Pallandre, S. Miserere, J. Weber, J-L Viovy *Electrophoresis* 2007, 28, 1115-1122
- [6] A. Muck, A Svatos, *Talanta* 2007, 74, 333-341
- [7] A. Pallandre, B. de Lambert, R. Attia, A.M. Jonas and J.-L. Viovy, *Electrophoresis*, 2006, 27, 584-610.
- [8] W. Wang, F. Zhou, L. Zhao, JR Zhang, JJ Zhu, *J. Chromatogr. A* 2007, 1170, 1-8
- [9] X. Huang, M.J. Gordon and R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1837-1838.
- [10] J.L. Pittman, C.S. Henry and S.D. Gilma, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 361-370.
- [11] R. Chen, H. Guo, Y. Shen, Y. Hu, Y. Sun, *sensor and actuators B* 2006, 114 , 1100-1107
- [12] K.F. Schrum, J.M. Lancaster III, S.E. Johnston and S.D. Gilman, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4317-4321.
- [13] C.T. Culbertson, R.S. Ramsey and J.M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2285-2291.
- [14] B.A. William and G. Vigh, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2771-2775.
- [15] J.J. Xu, N. Bao, XH Xia, Y. Peg ; HY Chen, *Anal. Chem.* 2004 76 6902-6907
- [16] W. Wang, L. Zhao, F. Zhou, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, H.-Y. Chen, *Electrophoresis*, 2007, 28, 2893-2896.
- [17] S. Okasaki, *J. Vac. Sci. Technol.* 1995, 38, 57-66
- [18] H.J. Jeong, D.A. Markle, G. Owen, F. Pease, A. Grenville, R. von Bünau, *Solid State Technol.* 1994 37 39-47
- [19] M.D. Levenson, *Solid State Technol.* 1995 38 57-66
- [20] L. Geppert, *IEEE spectrum* 1996 33 33-38
- [21] M. Chiari, M. Cretich , J. Horvath, *Electrophoresis* 2000, 21, 909-916.
- [22] M. Poitevin, A. Morin, J.-M. Busnel, S. Descroix, M.-C. Hennion , G. Peltre, *J. Chromatogr. A.*, 2007, 1155, 230-236.
- [23] Leonhardt, H., Gordon, L., Livingston R. *J. Phys. Chem.* 1971, 75, 245-249

[24] P.D. Grossman and J.C. Colburn, Ed.;, Capillary electrophoresis: theory and practice, Academic Press, Inc., San Diego, 1992.

3.3. Article 4: Evaluation of microchip material and surface treatment options for isoelectric focusing of allergenic milk proteins on microchips.

Article en rédaction

Martine Poitevin¹, Yuliya Shakalisava², Gabriel Peltre¹, Jean-Louis Viovy², Stephanie Descroix^{1*}

1 – Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, UMR-CNRS 7121, ESPCI, Paris, France

2 – Laboratoire de Physico-Chimie, UMR-CNRS 168, Institut Curie, Paris, France

* corresponding author : stephanie.descroix@espci.fr, tel 00 33 1 40 79 46 44, fax 00 33 1 40 79 46 54

Abstract

The use of glass and PDMS microchips has been investigated to perform IEF separation of allergenic whey proteins. To decrease EOF and limit protein adsorption on microchannel walls, two coating procedures have been compared. The first one consists in immobilizing thermally hydroxypropylcellulose (HPC) on the channel surface, and the second one uses poly(dimethylacrylamide-*co*-allyl glycidyl ether (PDMA-AGE). These coatings have been evaluated on both microchips in terms of EOF limitation by frontal electrophoresis of a fluorescent marker of known effective mobility. Both of them allowed almost suppressing electroosmotic flow. pH gradient formation has then been evaluated for each microchip and each coating using pI markers. Microchannel coating was necessary in order to avoid pH gradient drift regardless of the microchip material used. Both coatings were efficient on glass microchips but only PDMA-AGE allowed observing satisfying focusing of the pI markers on PDMS microchips. Fluorescent labeling of three whey proteins has then been investigated. Non-covalent labeling with Sypro Orange and FITC covalent labeling have been compared with the results obtained by performing IEF on mini slab-gels. Sypro Orange has indeed been chosen to perform the derivatization procedure as it did not lead

to significant change in the relative pI of the investigated proteins. Moreover, the labeling procedure was then straightforward and much faster. At last, IEF separation of three major allergenic whey proteins, namely β -lactoglobulin A and B and α -lactalbumin, was performed in both glass and PDMS microchips. Better resolutions were obtained on glass microchips, but low cost and ease of fabrication of PDMS microchips has to be taken into account when comparing the two materials.

Keywords

IEF, microchip, surface treatment, whey proteins

1. Introduction

In various fields such as proteomics, drug development or medical diagnostics, there has recently been growing needs for rapid, low cost and low analyte consumption protein analysis. In this area, microchip electrophoresis presents many advantages and has led to a number of papers over the past few years, as illustrated by several reviews published in the literature [1-4].

In particular, isoelectric focusing is a technique of choice for protein analysis, which allows their separation in a pH gradient according to their pI values, the gradient generally being formed by carrier ampholytes present in the separation mixture. This technique is very versatile as it is applicable for one-dimension protein separation [5-20] or as the first separation dimension of multidimensional setups, in combination with CZE [21] or SDS-CGE [22-24]. A multistage isoelectric setup has also been described and led to increased resolving power as compared to classical IEF [25].

For cost and ease of fabrication reasons, IEF chips are more often made in polymeric materials such as PDMS or PMMA [6, 8-15, 17-19], but can also be made of quartz [7] or glass [5, 6, 16, 20], this material having the advantage to present properties similar to classical fused silica capillaries. Nevertheless these materials do not always have appropriate surface properties according to the separation requirements. In particular, EOF has to be limited during IEF experiments, in order to prevent basic proteins from leaving the separation channel. Moreover, protein adsorption on channel walls can also occur whether through ionic or hydrophobic interactions. In order to overcome these issues the separation channel is generally coated with a polymer such as polyacrylamide [7, 18], methylcellulose [8, 11, 13] or hydroxypropylmethylcellulose [6, 17]. One possible way to evaluate these coatings performances is to measure EOF in the separation channel [26]. Two main methods are thus reported in the literature: use of flow-tracing particles [13] or current monitoring method [18, 27]. Others methods have also been reported, whether based on indirect laser-induced fluorescence detection [28] or electrochemical detection [29].

Fluorescence is one of the most popular detection modes for protein analysis when using microsystems because of its high sensitivity. Nevertheless this detection mode is not universal. When developing new separation systems, native fluorescent proteins can be used, but when analysing non-fluorescent target proteins, a labelling step with a fluorescent dye is necessary. Either covalent or noncovalent approaches can then be

employed, the former being generally highly sensitive and the latter being more simple to implement [30, 31].

The aim of this study was to perform IEF separation of allergenic whey protein on microchips. A comparative evaluation of two chip materials (glass and PDMS) is thus reported in this paper. Several surface treatment methods including permanent coating with hydroxypropyl cellulose (HPC) or semi-permanent coating with PDMA-AGE were characterized and compared for both chip materials. A novel frontal electrophoresis method to evaluate EOF suppression in the treated microchannels has been developed [32]. The pH gradient formation was evaluated by separation of fluorescent pI markers with both chip materials and both surface treatments. Before performing IEF separation of β -lactoglobulin A and B and α -lactalbumin, which are three major allergenic whey proteins, the fluorescent labelling procedure has been investigated. Two derivatization procedures have been tested: covalent FITC labelling and non covalent labelling with Sypro Orange dye. In a first approach, the performances in terms of pI shift of these procedures have been compared by performing IEF of labelled and non labelled proteins on mini slab gels. At last, microchannel separation of these target proteins has been carried out on glass and PDMS microchips with or without surface treatment.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise stated all chemicals were of analytical grade and came from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Glycerol (87%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Servalyt pH 4-9 carrier ampholyte mixture came from Serva (Heidelberg, Germany). Hydroxypropylcellulose (M.W. 100,000) came from Scientific Polymer Products (Dean PKWY, Ontario, USA). Water was produced with an alpha Q Millipore system (Molsheim, France).

2.2. Microfluidic setup

Microchip analyses were monitored by an inverted fluorescence microscopic system (IX-71, Olympus, France) equipped with a spectral filter 310-390 nm or 460-490 nm and a 100W mercury lamp. A camera (XCD-X710, Sony, USA) was mounted on the microscope and a NI Vision software (Alliance Vision, France) was used for camera control and image processing. Two high-voltage power supplies (HVS448, Labsmith, Livermore, USA or Micralyne, Edmonton, Alberta, Canada) were used to apply electric

fields to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, TX) programmed trough a PC-based computer. The microscope platform was motorized in order to scan the channel content at a constant speed. All experiments were performed at room temperature.

2.3. Microchip characteristics and fabrication

Monochannel glass microchips were purchased from Micronit Microfluidics (Enschede, The Netherlands). The separation channel was 7.3 cm long, 20 μ m depth and 50 μ m wide. PEEK Nanoport reservoirs from Upchurch (Oak, Harbor, WA, USA) were bonded around the wells to increase the reservoir volume. PDMS microchips fabrication used soft lithography technique [33-36] with the same channel dimensions as in glass microchips.

2.4. Microchannel coating procedures

The HPC coating procedure was adapted from the one used in the laboratory for capillary coating [37, 38]. The separation channel was filled with 5% (w/v) HPC aqueous solution. The solution was removed from the channel and the chip was heated in a GC oven from 60 °C to 140 °C at 5 °C/minute, and maintained at 140 °C for 30 minutes.

Poly(dimethylacrylamide-*co*-allyl glycidyl ether) (PDMA-AGE) was synthesized in house according to the previously published procedure [39]. A 0.1 % PDMA-AGE solution was introduced into the channel, which has been previously activated with 1 M NaOH for 15 min. The polymer solution was left in the channel for 3 hours, then pneumatically removed and the channel was left in this way overnight. This coating was then stable during at least 10 runs.

2.5. Surface characterization

2.5.1 Contact angle

The contact angles were measured by a static contact angle in order to compare the nature of the native and treated PDMS. Digidrop contact angle meter apparatus (GBX Instrumentation Scientifique, Romans, France) was used for that purpose. A drop of ultrapure water was placed on the surface and the contact angles were measured after 20 sec at room temperature. The average value for each surface was obtained from three measurements.

2.5.2 Frontal electrophoresis method

To evaluate EOF by frontal electrophoresis, the separation channel was filled with sodium borate buffer pH 9.2 (20 mM concentration). One well was filled with the same buffer, and the other was filled with fluorescein 0.1 mg/mL (0.3 mM) diluted in the buffer. The detector was placed in the middle of the separation channel. 250 V/cm electric field was applied, with the polarity set to observe fluorescein front. Meanwhile, fluorescence signal was recorded, which allowed determining the time necessary for fluorescein to reach the detector. To determine this time more precisely, the first derivative of the electropherogram was used, in order to observe a peak and not a front. As electrophoretic mobility of fluorescein ($-32.7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$, RSD=1.6%, n=5) in 20 mM borate buffer was known from frontal injections of fluorescein and rhodamine B (used as EOF marker) in bare silica microchips, electroosmotic mobility was easily obtained with equation 1:

$$\mu_{\text{eo}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{ep}} \quad \text{Eq. 1}$$

2.5.3. Current monitoring method

In order to measure EOF using current monitoring method [27] the microchannel and one of the reservoirs were filled with a 20 mM borate buffer pH 9, while the other reservoir was filled with 18 mM borate buffer pH 9. An electric field of 112 V/cm was applied and the current-time profile was recorded every second. The time required for current to stabilize was further utilized to obtain the EOF mobility.

2.6. Protein labelling

To perform FITC protein labelling, the following procedure was used: 225 µL of 3 mg/mL protein aqueous solution was mixed with 225 µL of carbonate buffer (pH 9.2, 50 mM ionic strength) and 50 µL of 1 mg/mL FITC solution in acetone. The solution was left 24h in the dark and directly used for IEF experiments. Sypro Orange labelling was performed by adding Sypro Orange to the IEF protein solution at 30x concentration.

2.7. Mini gel electrophoresis

To check pI changes of the proteins due to labelling procedure, experiments have been performed on CleanGel IEF polyacrylamide gels (4.2*4.2 cm, Amersham bioscience, Uppsala, Sweden) with PhastSystem electrophoretic apparatus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The gel was incubated 1 h in an aqueous solution of 5 % v/v Servalyt 4-9 carrier ampholyte mixture. For IEF separation of Sypro Orange labelled proteins, Sypro Orange was also added to the ampholyte solution. IEF was carried out at 2000 V for 2 min, 200 V for 4.5 min, and finally 2000 V for 12 min. 1 µL of protein solution (3mg/mL) was loaded with a sample application comb during the second step of the electrophoretic

process. Colored pI markers kit from BDH (VWR, Strasbourg, France), containing proteins derived from myoglobins with pIs in the range 4.7-10.6 were also used. After separation, the gels were then stained with Coomassie blue.

2.8. IEF experiments

To perform IEF experiments, the protein solution was mixed with Servalyt 4-9 ampholytes (3% v/v). The final solution also contained 30% glycerol, in order to increase protein solubility. The separation channel was filled with that separation mixture, and the wells were filled with as 90 mM phosphoric acid anolyte and 20 mM NaOH as catholyte. These solutions of anolyte and catholyte also contained 30% glycerol. The focusing voltage was then turned on and the channel content was monitored after a given time.

3. Results and discussions

The aim of this study was to perform microchip IEF separation of allergenic whey proteins and to evaluate the potential of two microchip materials to achieve this separation: glass and PDMS. Glass has been chosen because it is hydrophilic and is similar to bare silica capillaries, which surface chemistry is well known. Nevertheless glass chips are quite expensive. On the contrary, even if PDMS surface chemistry is not as easy to control, PDMS is much cheaper and PDMS chips can be made directly in the laboratory. Moreover, valves can quite easily be integrated to PDMS microchips, which is an advantage for fluid control within microchannel networks. In order to decrease EOF and to limit protein adsorption, microchannel surface treatment is often necessary. The most classical way to make the PDMS surface more hydrophilic is plasma treatment, but this treatment is not very stable and add charges to the PDMS surface, which can induce electrostatic interactions between the channel surface and the analyzed proteins [1]. Some additives can also be added to the PDMS solution before curing [40]. One easier way to make the PDMS surface more hydrophilic is to adsorb an hydrophilic polymer on the channel surface. To perform this coating, two different polymers previously used for fused silica capillary coating have been investigated: HPC, that is commercially available, and PDMA-AGE, that is synthesized in the laboratory according to a procedure first described by M. Chiari et al [39].

3.1. Characterization of chip coatings

In a first approach, the PDMS treated surfaces were characterized by contact angle measurement. The values obtained are shown in Table 1. The contact angle of untreated

PDMS was 110° , corresponding to its highly hydrophobic surface. This value significantly decreased (below 40°) when PDMS was coated with PDMA-AGE or HPC, implying that both treatments were efficient to make the surface more hydrophilic.

Chip material	Contact angle (n=3)
PDMS	$110^\circ \pm 1\%$
PDMS coated with PDMA-AGE	$32^\circ \pm 7\%$
PDMS coated with HPC	$39^\circ \pm 9\%$

Table 1: contact angle measurement on treated and non-treated PDMS

EOF limitation has then been used to compare both the coating procedures for glass and PDMS microchips. A method which is based on apparent mobility measurement of a charged compound of known effective mobility by frontal electrophoresis has thus been developed [32]. EOF measurements have been performed at alkaline pH (20 mM borate buffer pH 9), where EOF mobilities are expected to be the highest. EOF values obtained are shown on table 2.

	Glass	PDMS
Bare	73.3 ± 0.8	52.5 ± 2.8
PDMA-AGE	-2.1 ± 0.4	-2.1 ± 0.2
HPC	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.5

Table 2: Electroosmotic mobilities measured by frontal electrophoresis in glass and PDMS microchips ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) n=3. All experiments have been performed in 20mM borate buffer pH 9.

As described elsewhere [32], this method has been compared to classical current monitoring method in the same buffer. For high EOF values the results obtained were similar whatever the method used. On the contrary, current monitoring method did not allow determining EOF values in treated microchannels, where low electroosmotic mobilities lead to extremely long experiments. Due to non-zero effective mobility of fluorescein, frontal electrophoresis allowed performing fast experiments even in the case of low EOF, which lead to more reliable results.

Anyway, these EOF measurements suggested that both coatings were efficient to limit EOF in both glass and PDMS chips. While EOF in non coated glass and PDMS microchips was around 75 and $50 \text{ } 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectively, EOF values equal or inferior to $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ were obtained in the coated channels. It also has to be pointed out that PDMA-AGE, as well as HPC, lead to very close EOF values whatever the chip material. Moreover, EOF was slightly lower in PDMA-AGE coated chips than in HPC

coated ones. Nevertheless, both surface treatment procedures were efficient to decrease EOF and were further used to perform IEF experiments.

3.2. IEF separation of fluorescent pI markers

Before performing IEF separation of whey proteins, the pH gradient formation has been evaluated through the separation of fluorescent pI markers. The positions of the pI markers have been determined after the completion of focusing, which occurred after approximately 5 minutes. The results obtained are shown in figure 1 for PDMS microchips and in figure 2 for glass microchips.

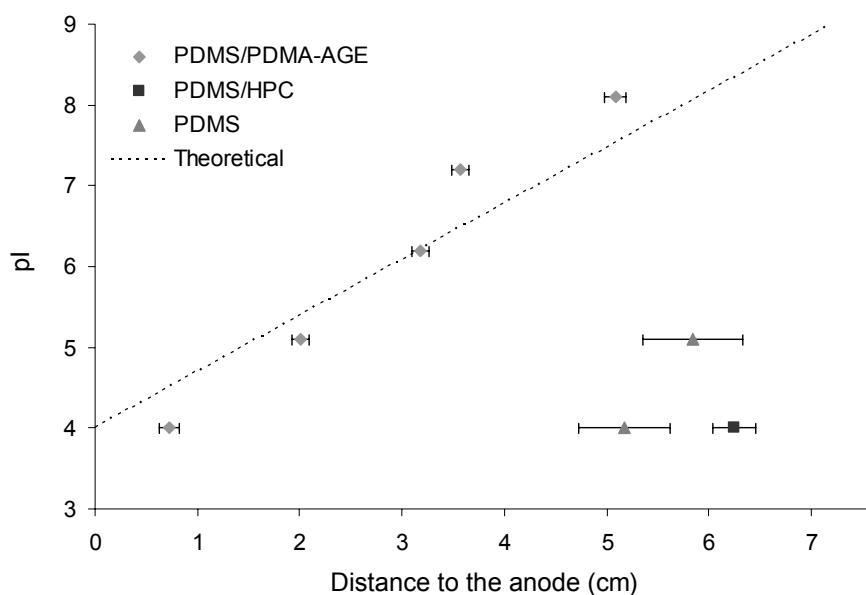


Figure 1 : Position of pI markers in PDMS microchips after 5 minutes of focusing under 750 V/cm. n=3. Black line: theoretical 4-9 pH gradient. Electrolyte: Serva 4-9 3% v/v and 30x SyproOrange in 70/30 water/glycerol. Anolyte: 90 mM phosphoric acid in 70/30 water:glycerol. Catholyte: 20 mM sodium hydroxide in 70/30 water/glycerol.

In non-coated PDMS chips, the pI markers were shifted to the cathode and at the end focusing the more alkaline pI markers had left the separation channel and only pI 4 and pI 5 markers could be detected. This shift of the pH gradient was certainly due to residual EOF. Nevertheless, the more acidic pI markers could be observed and did not leave the separation channel, because of an equilibrium between electrophoretic transport and electroosmotic zone displacement, as shown by Thormann et al [41]. The same phenomenon was observed in glass chips, where as expected the pH gradient shift was higher than in PDMS chips due to higher EOF. These results confirm that channel coating was necessary in glass and PDMS microchips in order to decrease EOF and avoid this pH gradient shift.

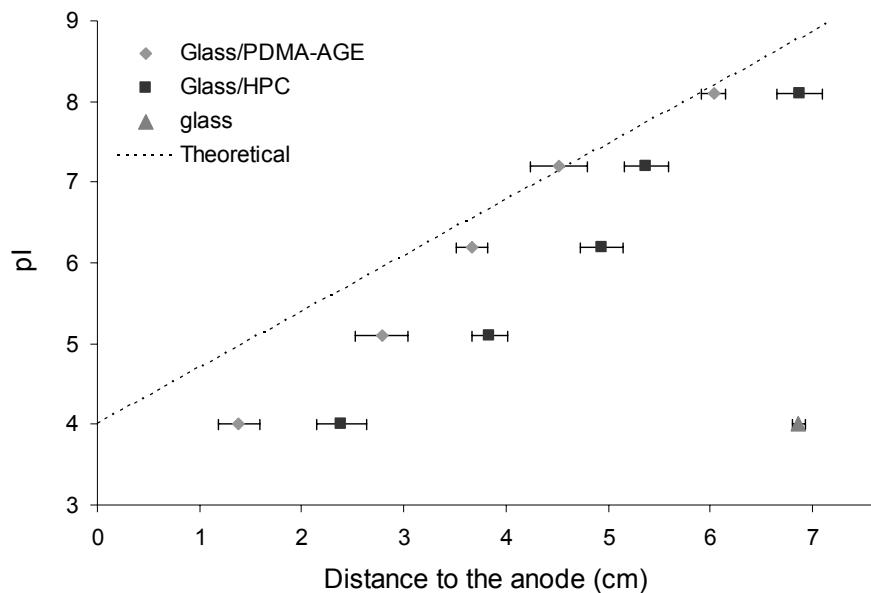


Figure 2 :Position of pI markers in glass microchips after 5 minutes of focusing under 750 V/cm. n=3.
Black line: theoretical 4-9 pH gradient. Electrolyte: Serva 4-9 3% v/v and 30x SyproOrange in 70/30 water/glycerol. Anolyte: 90 mM phosphoric acid in 70/30 water:glycerol. Catholyte: 20 mM sodium hydroxide in 70/30 water/glycerol.

Thermal immobilization of HPC on channel surface was then evaluated in terms of pH gradient formation. In glass microchips the shift of the pH gradient to the cathodic side of the channel was still observed but was limited due to EOF limitation. As shown in figure 2, the slope of the pH gradient was higher than the theoretical one, which means that the pH gradient was compressed. This compression phenomenon has already been described in several publications and has been attributed to diffusion of anolyte and catholyte in the separation channel [13, 14]. On the contrary, HPC coating lead to unexpected results in PDMS chips, as pI markers focusing was strongly affected by the pH gradient shift and only the most acidic pI marker could be observed in the microchannel. The coating stability was first incriminated to explain this phenomenon. However, EOF measurements following several IEF experiments showed that EOF was stable and very low. This shift of the pH gradient could also be attributed to interaction of carrier ampholytes with HPC, but if it were the case, a strong gradient shift would have also been observed in HPC coated glass microchips. Since HPC coated glass microchips did not show the same phenomenon, but rather a good separation, this might indeed suggest that the mechanism of adsorption of HPC on PDMS surface is significantly different from the one on glass and it can be affected by ampholytes employed in this experiment. Anyway, this result is understandable given that HPC coating was first developed for bare silica capillaries, and shows that HPC coating is not totally stable on PDMS.

The channel coating procedure with PDMA-AGE led to slightly different results. In glass chips, the observed pH gradient shift obtained with PDMA-AGE coating was lower than with HPC surface treatment method. This is consistent with the fact that EOF was lower with PDMA-AGE coating than with HPC coating. In PDMS chips, PDMA-AGE coating was the only procedure which led to an acceptable pH gradient formation. It was indeed not significantly shifted to the cathode, even if it was still compressed as compared to the theoretical gradient.

3.3. Milk protein separation

3.4.1. Protein labelling

As the target proteins were not naturally fluorescent at the working excitation wavelength, a labelling step was necessary. Two classical approaches have been investigated: covalent labelling with FITC and non covalent labelling with Sypro Orange. The first approach is more time-consuming but is supposed to lead to higher sensitivity. The second one is faster and simpler, and fewer changes in protein pI are expected as it is based on hydrophobic interactions between the dye and the target protein [42]. First, protein pI changes due to the labelling procedure were evaluated by performing IEF of labelled and non-labelled proteins on mini polyacrylamide slab gels. The IEF gel separations of β -lactoglobulin B are shown in figure 3. Similar results have been obtained with α -lactalbumin and β -lactoglobulin A.

As shown in figure 3, FITC labelling lead to acidification of the proteins: whereas the measured pI of non-labelled β .lactoglobulin B was 5.2, the one of labelled β -lactoglobulin B was indeed 4.9. As Sypro Orange has to be added directly to the separation medium, the gel electrophoresis protocol has been slightly modified to evaluate this labelling procedure: prior to IEF separation, two halves gels have been rehydrated in the absence or presence of Sypro Orange. The focusing of each milk proteins has then been performed. To avoid any experimental variation except the presence or absence of Sypro Orange dye, the two halves gels have been regrouped to perform these experiments at the same time and on the same apparatus.

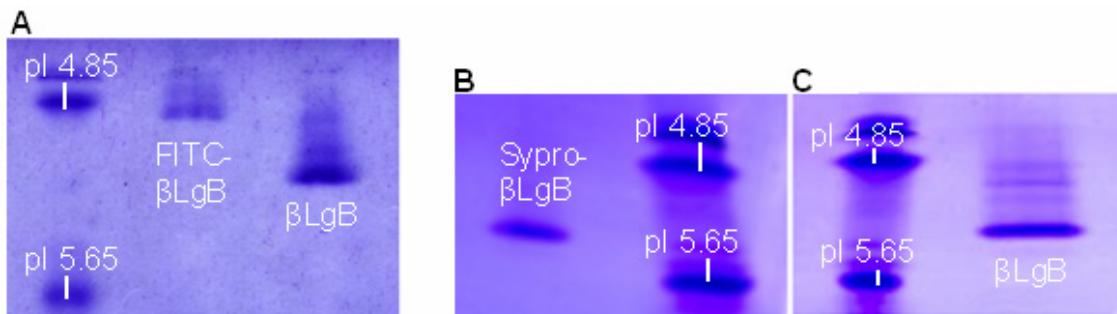


Figure 3: Photographs of mini slab gels of labeled and non-labeled β -lactoglobulin B. pI markers from top to bottom: 4.75, 4.85 and 5.65. A. β -lactoglobulin labelled or not with FITC. β -lactoglobulin with 30x concentration of SyproOrange in the electrolyte. C. β -lactoglobulin B in the absence of SyproOrange in the electrolyte. B. and C. gels have been performed at the same time on the same apparatus.

As shown in figures 3B and 3C the measured pI of labelled and non-labelled β -lactoglobulin B was 5.3 in both cases. We can then conclude that even if similar pI change of pI markers and milk proteins can not be excluded, no relative change in milk proteins' pI could be observed, as compared to pI markers. Given that moreover the FITC fluorescence intensity decreases strongly at acidic pH, Sypro Orange labelling has been chosen to perform IEF separation of the target proteins. Moreover, the on-chip labelling with Sypro Orange is less-time consuming and avoid cross-contamination as compared the FITC labelling procedure. To optimize Sypro Orange labelling, β -lactoglobulin has been focused on HPC-coated glass microchip in the presence of Sypro Orange at concentrations ranging from 10 to 30x, and 30x concentration has been chosen for the following experiments, as it lead to the best sensitivity (data not shown).

3.4.2. IEF separation

The separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin A and B was then performed. The evaluation of the pH gradient formation was then evaluated by monitoring the position of the focused milk proteins in the separation channel. This was intended to assess that proteins did not disrupt the pH gradient through mechanisms such as adsorption. α -lactalbumin position after the completion of focusing as a function of chip material and coating nature is shown in table 3.

Chip Material	Glass			PDMS
Coating	None	HPC	PDMA-AGE	PDMA-AGE
α -lactalbumine position (cm to the anode)	6.3 ± 0.2	3.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1

Table 3: Position of α -lactalbumin in the channels after 5 minutes of focusing at 750V/cm (n=6, except for PDMA-AGE coated chip, n=3)

As expected regarding the results obtained with pI markers, when using PDMS microchips, the whey proteins were not observed in the case of non coated or HPC coated microchips. In case of PDMA-AGE coated PDMS chips, α -lactalbumin (pI 4.5) was focused at 2.3 cm from the anode, whereas its theoretical position would be around 0.7 cm. Nevertheless, this result is again in accordance with the compression of the pH gradient observed for pI markers. In glass microchips, a strong shift of α -lactalbumin position was observed in the absence of surface coating. As expected, this shift was much lower when coated chips were used: as previously the theoretical position of α -lactalbumin was about 0.7 cm from the anode, the experimental location was 3.5 cm with HPC-coated glass microchips and only 2.2 when using PDMA-AGE coated chip. The latter value was very close to the one obtained with PDMS chips with the same coating. These results confirm the compression of the pH gradient in the acidic part of the pH gradient, for both materials with PDMA-AGE coating. Moreover, regardless of the chip material used, the experiments have been performed several times without regenerating the chip coatings. Satisfying reproducibilities of the milk protein positions in the microchannel were observed whatever the employed IEF setup, as RSDs were lower than 5%. These coatings thus seem to be very stable on a wide pH range and on quite a long period of time, which has been observed in capillary format for HPC coating [38] but not for PDMA-AGE [39]. The different chips have then been compared in terms of separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin A and B.

The separation obtained on PDMA-AGE coated PDMS microchip is shown in figure 4. α -lactalbumin was well separated from β -lactoglobulin, but the two isoforms of β -lactoglobulin could only be partially separated.

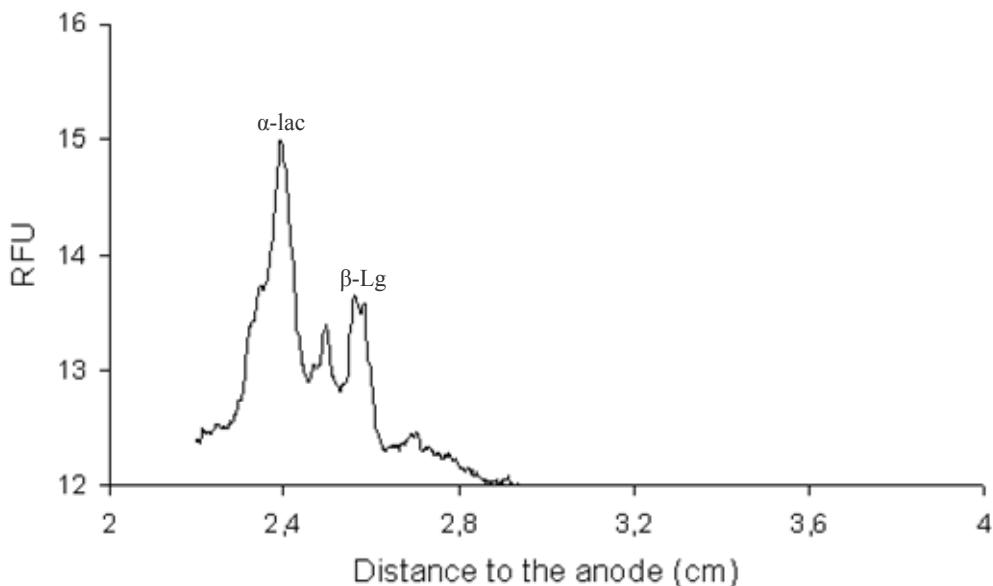


Figure 4: Whey protein separation on PDMA-AGE coated PDMS microchip. 5 minutes of focusing under 750 V/cm. Electrolyte: Serva 4-9 3% v/v and 30x SyproOrange in 70/30 water/glycerol. Anolyte: 90 mM phosphoric acid in 70/30 water:glycerol. Catholyte: 20 mM sodium hydroxide in 70/30 water/glycerol. Protein concentration: α -lactalbumin: 9 μ M. β -lactoglobulin B: 10 μ M. β -lactoglobulin A: 41 μ M.

Whey protein separations in coated or non-coated glass microchips are shown in figure 5. As described previously, in bare silica chip, a strong shift of the proteins to the cathode was observed. Nevertheless, separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin was observed, even if the two isoforms of β -lactoglobulin were not well resolved. This was all the more satisfying than the IEF separation of these proteins has already been performed in capillary format [37] and such a resolution was not reached at that time, certainly due to the hydrodynamic mobilisation step. With PDMA-AGE coated glass chips, similar separation pattern was observed, but no shift of the proteins to the cathodic side of the channel was observed. The best separation results were obtained with HPC-coated chips: even if a slight shift of the proteins to the cathodic side of the channel was observed, this coating allowed separating β -lactoglobulin A and B with a satisfying resolution given their low pI difference (0.1 pH unit). Moreover, it has to be noticed that protein concentrations had to be decreased when using PDMA-AGE coated chip to avoid protein precipitation. HPC coating thus lead to satisfying separation of target proteins on glass microchips. To the best of our knowledge, this is the first microchip IEF separation of major allergenic whey proteins

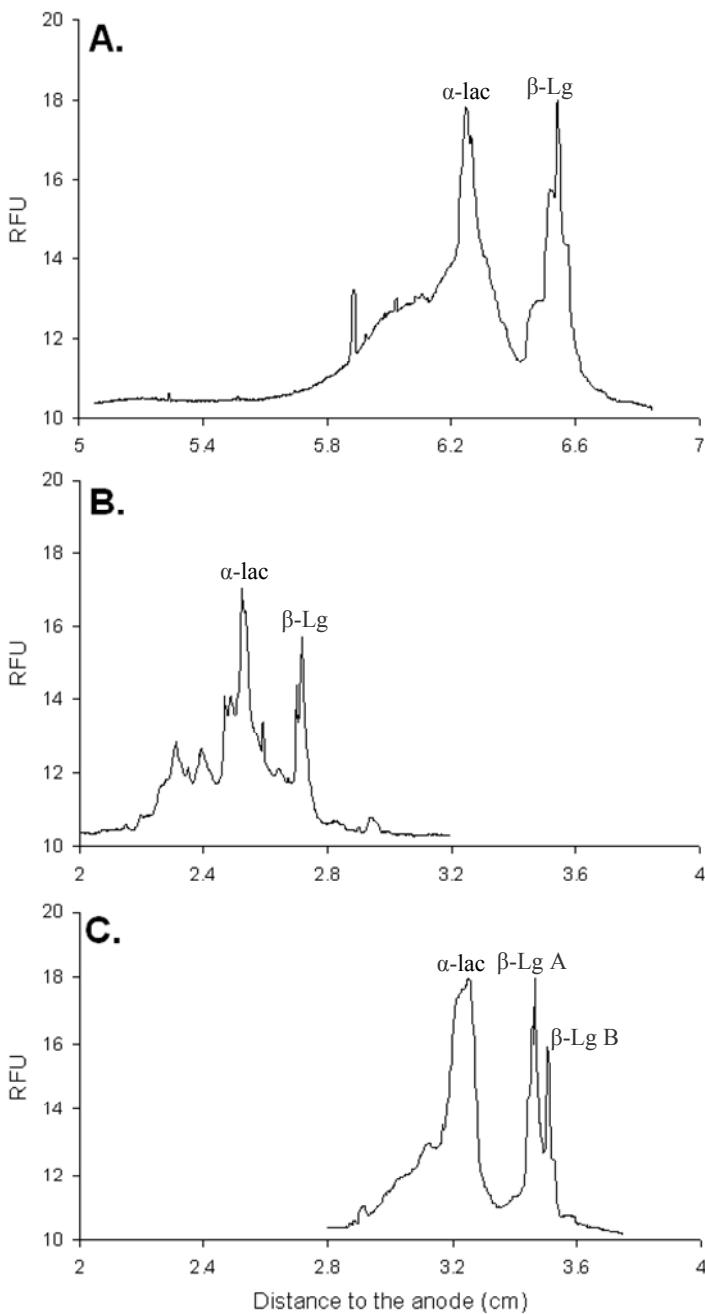


Figure 5 : Whey protein separation on glass microchips. A: bare silica chip. B: PDMA-AGE coated chip. C: HPC coated chip. 5 minutes of focusing under 750 V/cm. Electrolyte: Serva 4-9 3% v/v and 30x SyproOrange in 70/30 water/glycerol. Anolyte: 90 mM phosphoric acid in 70/30 water/glycerol. Catholyte: 20 mM sodium hydroxide in 70/30 water/glycerol. Protein concentration: A and C: α -lactalbumin: 13 μ M mg/mL. β -lactoglobulin B: 21 μ M. β -lactoglobulin A: 41 μ M; B: α -lactalbumin: 9 μ M. β -lactoglobulin B: 10 μ M. β -lactoglobulin A: 41 μ M.

4. Concluding remarks

The comparison of glass and PDMS as microchip material for IEF protein separation has been investigated. With both materials, a coating procedure appeared to be necessary to avoid protein adsorption and to limit pH gradient shift due to residual EOF. HPC coating was well adapted to glass microchips, while only PDMS-AGE coating gave satisfying

results with PDMS microchips. IEF separation of whey protein has thus been performed on PDMS and glass microchips. The separation was better when using glass microchip coated with HPC. However, given the low cost and the ease of fabrication of PDMS microchips, PDMA-AGE coated PDMS chips remain good candidates to perform milk protein separation.

Acknolegments

The authors would like to thank Virginie Dauriac, Antoine-Emmanuel Saliba and Sandrine Miserere for their skilful help in gel IEF and PDMS chips synthesis and characterization respectively. This project was funded by AllergyCard European Project (contract No. 12793).

5. References

- [1] Peng, Y., Pallandre, A., Tran, N. T., Taverna, M., Electrophoresis 2008, 29, 157-178.
- [2] Dolnik, V., Liu, S., J. Sep. Sci. 2005, 28, 1994-2009.
- [3] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., Anal. Chem. 2006, 78, 3887-3908.
- [4] Lion, N., Rohner, T. C., Dayon, L., Arnaud, I. L., Damoc, E., Youhnovski, N., Wu, Z.-Y., Roussel, C., Josserand, J., Jensen, H., Rossier, J. S., Przybylski, M., Girault, H. H., Electrophoresis 2003, 24, 3533-3562.
- [5] Hofmann, O., Che, D., Cruickshank, K. A., Muller, U. R., Anal. Chem. 1999, 71, 678-686.
- [6] Huang, X., Ren, J., Electrophoresis 2005, 26, 3595-3601.
- [7] Mao, Q., Pawliszyn, J., The Analyst 1999, 124, 637-641.
- [8] Tan, W., Fan, Z. H., Qiu, C. X., Ricco, A. J., Gibbons, I., Electrophoresis 2002, 23, 3638-3645.
- [9] Wen, J., Lin, Y., Xiang, F., Matson, D. W., Udseth, H. R., Smith, R. D., Electrophoresis 2000, 21, 191-197.
- [10] Mok, M. L.-S., Hua, L., Phua, J. B.-C., Wee, M. K.-T., Sze, N. S.-K., Analyst 2004, 129, 109-110.
- [11] Han, J., Singh, A. K., J. Chromatogr. A 2004, 1049, 205-209.
- [12] Raisi, F., Belgrader, P., Borkholder, D. A., Herr, A. E., Kintz, G. J., Pourhamadi, F., Taylor, M. T., Northrup, M. A., Electrophoresis 2001, 22, 2291-2295.
- [13] Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., Ivory, C. F., Anal. Chem. 2005, 77, 1303-1309.
- [14] Das, C., Fan, Z. H., Electrophoresis 2006, 27, 3619-3626.
- [15] Guo, X., Chan-Park, M. B., Yoon, S. F., Chun, J.-h., Hua, L., Sze, N. S.-K., Anal. Chem. 2006, 78, 3249-3256.

- [16] Das, C., Xia, Z., Stoyanov, A., Fan, Z. H., Instrumentation Science and Technology 2005, 33, 379.
- [17] Yao, B., Yang, H., Liang, Q., Luo, G., Wang, L., Ren, K., Gao, Y., Wang, Y., Qiu, Y., Anal. Chem. 2006, 78, 5845-5850.
- [18] Li, C., Yang, Y., Craighead, H. G., Lee, K. H., Electrophoresis 2005, 26, 1800-1806.
- [19] Li, Y., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Electrophoresis 2003, 24, 193-199.
- [20] Tsai, S.-W., Loughrann, M., Hiratsuka, A., Yano, K., Karube, I., Analyst 2003, 128, 237-244.
- [21] Herr, A. E., Molho, J. I., Drouvalakis, K. A., Mikkelsen, J. C., Utz, P. J., Santiago, J. G., Kenny, T. W., Anal. Chem. 2003, 75, 1180-1187.
- [22] Wang, Y.-C., Choi, M. H., Han, J., Anal. Chem. 2004, 76, 4426-4431.
- [23] Li, Y., Buch, J. S., Rosenberger, F., DeVoe, D. L., Lee, C. S., Anal. Chem. 2004, 76, 742-748.
- [24] Chen, X., Wu, H., Mao, C., Whitesides, G. M., Anal. Chem. 2002, 74, 1772-1778.
- [25] Cui, H., Horiuchi, K., Dutta, P., Ivory, C. F., Anal. Chem. 2005, 77, 7878-7886.
- [26] Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J., J. Chromatogr. A 2007, 1170, 1-8.
- [27] Huang, X., Gordon, M. J., R.N., Z., Anal. Chem. 1988, 60, 1837-1838.
- [28] Chen, R., Guo, H., Shen, Y., Hu, Y., Sun, Y., Sens. Actuat. B 2006, 114, 1100-1107.
- [29] Xu, J. J., Bao, N., Xia, X. H., Peng, Y., Chen, H. Y., Anal. Chem. 2004, 76, 6902-6907.
- [30] Lacroix, M., Poinsot, V., Fournier, C., Couderc, F., Electrophoresis 2005, 26, 2608-2621.
- [31] García-Campaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., Electrophoresis 2007, 28, 208-232.
- [32] Shakalisava, Y., Poitevin, M., Viovy, J.-L., Descroix, S., Electrophoresis, submitted.
- [33] Okazaki, S., J. Vac. Sci. Technol. B 1991, 9, 2829-2833.
- [34] Jeong, H. J., Markle, D. A., Owen, G., Pease, F., Grenville, A., von Bünau, R., Solid State Technol. 1994, 37, 39-47.
- [35] Levenson, M. D., Solid State Technol. 1995, 38, 57-66.
- [36] Geppert, L., IEEE Spectrum 1996, 33, 33-38.
- [37] Shen, Y., Smith, R. D., J. Microcolumn Separations 2000, 12, 135-141.
- [38] Poitevin, M., Morin, A., Busnel, J.-M., Descroix, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., J. Chromatogr. A 2007, 1155, 230-236.
- [39] Chiari, M., Cretich, M., Damin, F., Ceriotti, L., Consonni, R., Electrophoresis
- [40] Muck, A., Svatos, A., Talanta 2007, 74, 333-341.
2000, 21, 909-916.

- [41] Thormann, W., Caslavská, J., Mosher, R. A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1155, 154-163.
- [42] Sze, N. S.-K., Huang, T., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1119-1122.

3.4. Conclusion

Ces travaux ont donc permis de démontrer la faisabilité de la séparation de protéines du lait par IEF en microsystèmes.

L'utilisation de puces en verre et en PDMS a pour cela été étudiée, différents traitements de surface ayant été mis en œuvre pour diminuer le flux électroosmotique et éviter l'adsorption des protéines sur les parois des canaux. Ainsi, dans un premier temps, une méthode de mesure de vitesse d'écoulement électroosmotique faible en microsystème a été développée pour permettre la comparaison d'une immobilisation thermique à l'HPC et d'un greffage au PDMA-AGE sur les deux matériaux testés pour la fabrication des microsystèmes.

La formation du gradient de pH dans les différents types de canaux a ensuite été évaluée par focalisation de marqueurs de pI fluorescents. La dérivation de protéines du lait a alors été optimisée, un marquage non covalent de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline ayant été choisi pour permettre la détection de ces deux protéines lors de leur séparation par IEF. Les microsystèmes en verre greffé à l'HPC ont alors donné les meilleurs résultats en termes de résolution, les deux isoformes de la β -lactoglobuline, dont les pI diffèrent de seulement 0,1 unité pH étant alors partiellement séparées. Cependant, les microsystèmes en PDMS n'ont pas été écartés pour autant, étant donné leur faible coût et leur souplesse d'utilisation.

Il faut remarquer ici que la sensibilité obtenue en microsystèmes était bien meilleure qu'au format capillaire. Considérons par exemple le cas de l' α -lactalbumine, qui avait été analysée à une concentration de 7 μM (0,1 mg/mL) au format capillaire et à une concentration équivalente de 9 μM en microsystèmes : compte tenu des volumes des canaux utilisés dans ces deux formats, la quantité de protéine analysée est alors 8 fois plus faible en microsystèmes qu'en capillaire (0,68 pmol au lieu de 5,6).

Afin d'évaluer plus avant le potentiel de notre système, des mélanges plus complexes de protéines ont également été séparés par IEF sur puce en verre greffée HPC, dans les conditions optimisées pour l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline. La séparation d'un mélange de BSA ($\text{pI} \sim 4,8$), de β -lactoglobuline A et d'hémoglobine bovine ($\text{pI} \sim 6,8$) est par

exemple présenté en Figure 5. Cette séparation démontre ainsi qu'il est possible de séparer des protéines dans une gamme de pI plus large que celle utilisée dans l'article précédent. Cependant, les différences de concentration des différentes protéines mettent en évidence une limitation du marquage non covalent au Sypro, à savoir que ce dernier n'est pas universel. En effet, il conduit à des sensibilités bien meilleures pour les protéines de type albumine comme la BSA ou l' α -lactalbumine que pour des protéines globulaires telles la β -lactoglobuline ou l'hémoglobine. En outre, du Sypro Red a été ajouté au Sypro Orange, cette nouvelle sonde de fluorescence conduisant à une meilleure sensibilité pour l'hémoglobine bovine. Ce résultat est à rapprocher de la distinction entre protéines « molles » et « dures » faite par C.A. Lucy et al [6], les premières –qui comprennent les albumines– ayant une stabilité interne faible, celle des secondes –dont font partie la β -lactoglobuline et l'hémoglobine– étant beaucoup plus élevée. Ainsi, les protéines possédant une stabilité interne faible pourront plus facilement modifier leur conformation, facilitant ainsi l'interaction avec les sondes de fluorescence (ou la surface des canaux...).

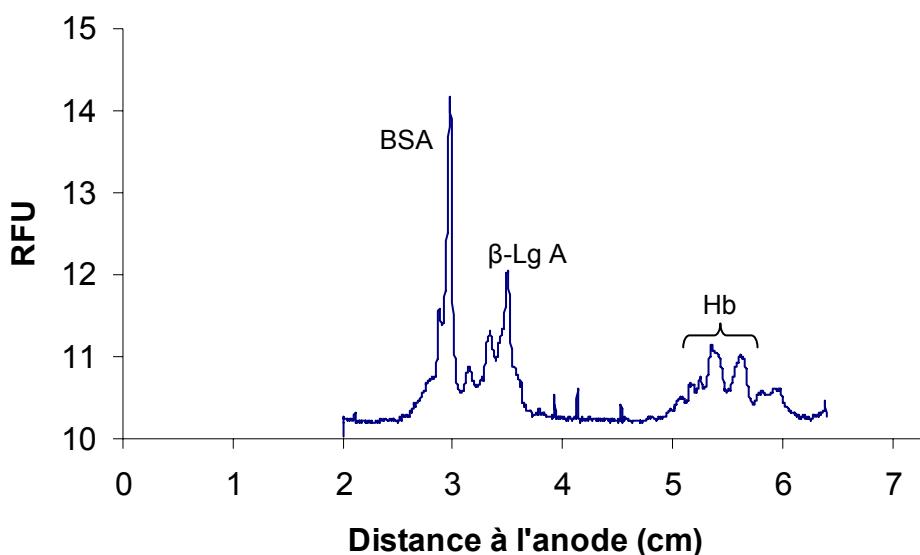


Figure 5 : séparation par IEF de trois protéines. Puce en verre greffée HPC. Concentration en protéines : BSA 2 μ M, β -lactoglobuline A 20 μ M, hémoglobine bovine 14 μ M. La BSA et la β -lactoglobuline A. Concentrations finales en sondes de fluorescence : Sypro Orange 30x et Sypro Red 45x. Autres conditions expérimentales identiques à celles de l'article précédent.

Ainsi, la dérivation de protéines pour permettre leur détection par fluorescence reste un problème majeur en microsystème, aucune méthode de dérivation n'étant universelle, comme nous le verrons au cours du chapitre suivant.

3.5. Références bibliographiques

- [1] Wal, J.-M., *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2004, **93**, S1-S11.
- [2] Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Amalia, P., Perono Garoffo, L., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., Conti, A., *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, **48**, 363-369.
- [3] Chiari, M., Cretich, M., Horvath, J., *Electrophoresis* 2000, **21**, 1521-1526.
- [4] Shen, Y., Smith, R. D., *J. Microcolumn Separations* 2000, **12**, 135-141.
- [5] Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J.-R., Zhu, J.-J., *J. Chromatogr. A* 2007, **1170**, 1-8.
- [6] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., *J. Chromatogr. A* 2008, **1184**, 81-105.

Chapitre 4 :

**Séparation de protéines par électrophorèse
de zone en solutions quasi-isoélectriques
d'ampholytes, au format capillaire et en
microsystèmes**

4.1. Introduction

Après avoir mis en œuvre la séparation de protéines allergéniques du petit lait par IEF en microsystèmes, nous allons ici nous intéresser à la deuxième dimension de séparation du microsystème « Allergycard », à savoir l'électrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes.

Ces électrolytes ont été choisis en raison de leur faible conductivité, qui s'accompagne cependant d'une capacité de chargement correcte [1]. Cette conductivité faible va devenir particulièrement intéressante en microsystèmes, ce format permettant l'utilisation de canaux de séparation très courts, et donc l'application de champs électriques élevés. Le temps de séparation se trouve ainsi fortement réduit, ce qui représente un avantage important pour la mise en œuvre de systèmes séparatifs bidimensionnels. Lors de cette étude, nous avons appliqué des champs électriques pouvant atteindre 1700 V/cm sur un canal de séparation d'une longueur de 2 cm, cette valeur de champ étant environ 2 fois plus élevée que celles pouvant être atteintes avec les systèmes commerciaux d'électrophorèse capillaire.

En effet, la valeur des champs électriques applicables en électrophorèse de zone est principalement limitée par l'effet Joule. Pour mettre en évidence l'intérêt des NC pour la limitation de cet effet Joule, nous pouvons par exemple calculer l'élévation de température au sein d'un capillaire de 50 µm de diamètre interne, lors d'une expérience d'ECZ sous champ électrique classique de 500 V/cm. L'équation utilisée pour cela a été présentée dans le paragraphe sur l'effet Joule du chapitre 1 ; elle permet de calculer qu'à l'équilibre un électrolyte phosphate de pH 6,95 et de 20 mM en force ionique ($k=110 \text{ mS/m}$) induit une élévation de température au centre du capillaire de 22°C, alors que cette dernière est de seulement 5°C pour un NC classique de conductivité 25 mS/m.

Avant de mettre en œuvre la séparation de protéines par électrophorèse de zone en microsystèmes, un autre avantage de l'utilisation des NC en ECZ a été étudié : la limitation de l'adsorption des protéines sur la surface du capillaire. Ce phénomène a déjà été observé par l'équipe de P.G. Righetti [2], avec des NC obtenus par fractionnement d'Ampholine 7-9. Elle a en effet remarqué que ces NC permettaient d'améliorer les efficacités obtenues pour la séparation de protéines, et a attribué ce phénomène à une

interaction des NC avec la paroi du capillaire, cette interaction étant d'autant plus efficace que les ampholytes possèdent plusieurs fonctions capables d'interagir avec la paroi de silice, d'où un effet coopératif. Nous mettrons ici ce phénomène en évidence pour un autre type d'ampholytes, les Servalyt 4-9, par étude du flux électroosmotique et par évaluation du taux d'adsorption des protéines.

Comme nous utilisons en microsystèmes une détection par fluorescence, il était nécessaire de dériver les protéines que nous souhaitions analyser avec un marqueur fluorescent. Pour la séparation de ces protéines en électrophorèse de zone, nous avions tout d'abord envisagé une dérivation non-covalente avec le Sypro Orange, car cette dernière avait donné des résultats satisfaisants pour les séparations en IEF. Cependant, cette solution s'est très vite révélée inapplicable pour les séparations en électrophorèse de zone en raison de sa trop faible sensibilité. En effet, en IEF les protéines remplissant initialement tout le canal de séparation, cette technique permet de préconcentrer les analytes (d'un facteur de quelques dizaines, dépendant de la protéine considérée) ce qui autorise l'utilisation du Sypro Orange malgré la faible sensibilité de cette sonde de fluorescence. Nous avons donc dû envisager l'utilisation de marqueurs covalents pour la dérivation des protéines.

Une fois cette dérivation réalisée, nous avons pu mettre en œuvre la séparation de protéines du lait par électrophorèse de zone en microsystèmes, en utilisant des NC et en comparant leurs performances à celles des électrolytes classiques.

4.2. Fractionnement des ampholytes et caractérisation des fractions obtenues

Avant de présenter les résultats obtenus pour la séparation de protéines de lait en solutions d'ampholytes d'intervalle de pH étroit (NC, pour *narrow cut* en anglais), nous avons dans un premier temps préparé et caractérisé ces électrolytes. Ils étaient précédemment obtenus au laboratoire par électrophorèse sur gel granuleux [3]. Cependant, cette technique est longue à mettre en œuvre (~1 semaine par fractionnement) et nécessite un expérimentateur confirmé. En outre, elle permet seulement d'estimer la concentration des solutions d'ampholytes obtenues. Ainsi le laboratoire a acquis au cours de cette thèse un appareil permettant de faciliter le fractionnement des ampholytes : le Rotofor®, dont le fonctionnement a été décrit brièvement au chapitre 1. Cet appareil permet d'obtenir des NC de concentration connue en seulement quelques heures.

Comme détaillé en Figure 1, le Rotofor® est constitué :

- d'une cellule de focalisation, qui existe en deux formats (20 et 60 mL), dans laquelle est inséré un élément cylindrique en plastique délimitant 20 compartiments grâce à des membranes séparatrices, mais permettant la circulation des espèces.
- d'une anode et d'une cathode dotées de membranes échangeuses d'ions et remplies respectivement d'acide phosphorique (anolyte) et de soude (catholyte) à 0,1 mol/L.
- d'une tige de refroidissement autour de laquelle sont placés les éléments précédents prévenant ainsi tout éventuel échauffement par effet Joule. Lors de la focalisation, cette tige tourne sur elle-même pour homogénéiser le contenu de la cellule.
- d'un générateur haute tension (20-5000 V ; 0,01-500 mA ; 0,1-400 W).
- d'un dispositif de collecte permettant d'aspirer les différentes fractions une fois la focalisation terminée.

Comme indiqué par le constructeur, les ampholytes ont été focalisés à puissance constante (12 ou 15W, suivant que la petite ou la grande cellule de focalisation étaient utilisées). La focalisation était arrêtée lorsque la tension s'était stabilisée à sa valeur maximale.

Pour permettre la comparaison avec les NC obtenus par électrophorèse en gel granuleux, les mélanges d'ampholytes ont été dilués à 25% v/v. Cette concentration correspond à une concentration massique de 10% m/v pour les ampholytes Servalyt.

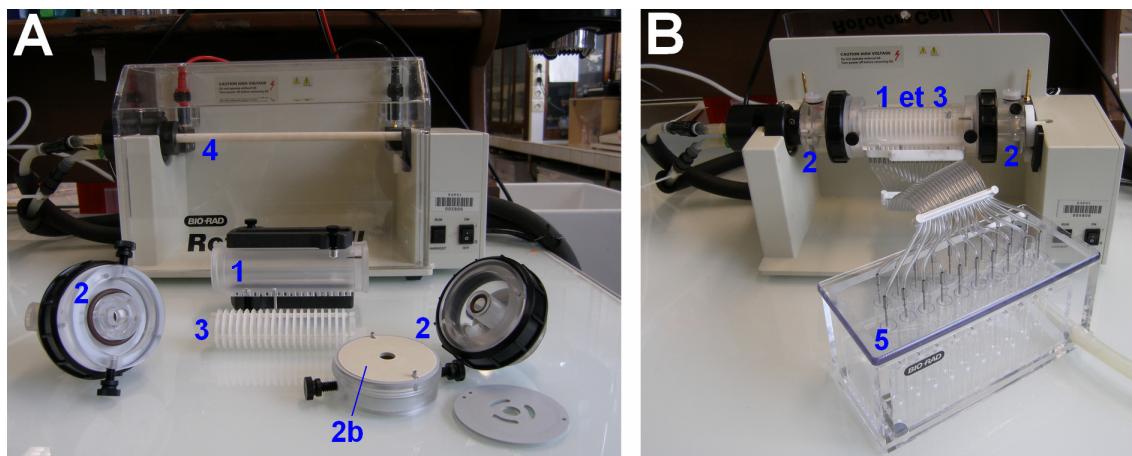


Figure 1 : les éléments constitutifs du Rotofor®. A : avant montage, B : lors de la collecte des fractions.
1 : chambre de focalisation ; 2 : anode et cathode 2b : membrane échangeuse d'ions; 3 : dispositif de membranes séparatrices ; 4 : barreau refroidissant ; 5 : dispositif de collecte

Plusieurs gammes d'ampholytes ont ainsi été fractionnées : un mélange de gamme de pH relativement large Servalyt 4-9 a d'abord été utilisé. Des mélanges acides (Servalyt 2-4) et basiques (Pharmalyte 8-10,5 et Servalyt 9-11) ont également été séparés en NC.

La caractérisation des différentes fractions a ensuite été effectuée en mesurant leur pH et leur conductivité.

4.2.1. Fractionnement d'un mélange d'ampholyte de gamme large de pH

Le mélange d'ampholyte Servalyt 4-9 a tout d'abord été fractionné avec le Rotofor®. Ceci nous a permis de disposer de NC sur une gamme de pH relativement large, mais également de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus sur électrophorèse en gel granuleux car c'est ce mélange d'ampholytes qui avait alors été fractionné. Plusieurs fractionnements de ce mélange ont été réalisés. La grande ou la petite chambre de focalisation ont été utilisées indifféremment car elles ont conduit à des résultats similaires.

4.2.1.1. pH des fractions obtenues

Le pH des différentes fractions récoltées est présenté en Figure 2A. Les valeurs présentées sont les moyennes obtenues sur cinq focalisations. A titre de comparaison, le pH des fractions obtenues par fractionnement sur gel granuleux est présenté en Figure 2B.

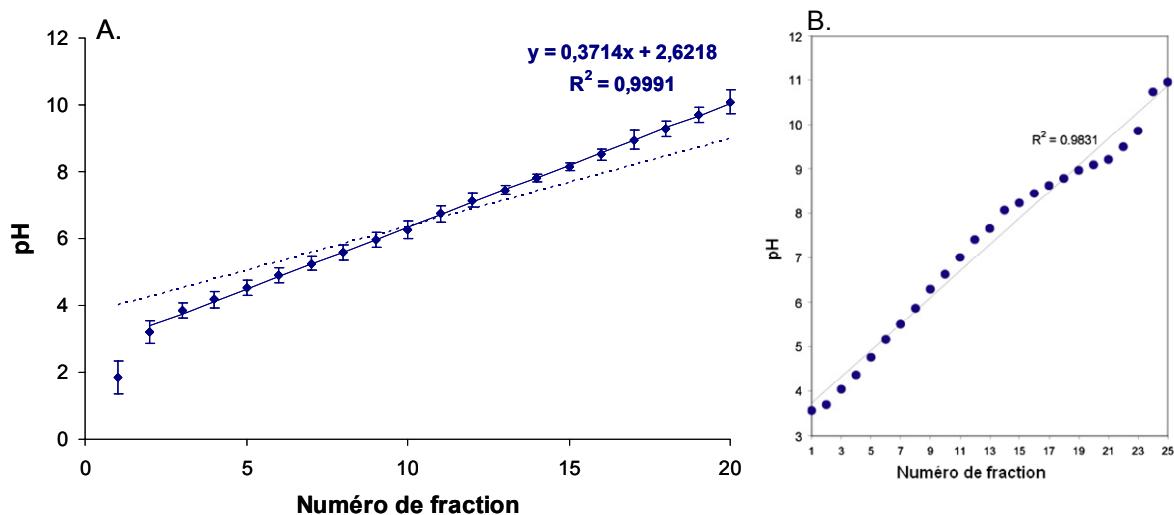


Figure 2 : pH des NC obtenus par focalisation d'un mélange Servalyt 4-9. A. Fractionnement au Rotofor® ($n=5$). En pointillés : droite théorique. **B.** (adapté de [4]) fractionnement sur gel granuleux.

La reproductibilité de la focalisation avec le Rotofor® est très satisfaisante, dans la mesure où les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 10%, excepté pour les deux fractions les plus acides. En outre, si l'on exclut la fraction la plus acide, le gradient de pH présente une très bonne linéarité ($R^2= 0,9991$). Ceci est d'autant plus satisfaisant que le fractionnement des ampholytes sur gel granuleux n'avait pas permis d'obtenir une telle linéarité. Le fait que la première fraction obtenue soit plus acide est probablement dû à la proximité de l'anolyte, d'où des ions H^+ entrent dans la chambre de focalisation. La pente du gradient obtenu est toutefois légèrement plus élevée que la pente théorique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les ions H^+ et HO^- provenant de l'anolyte et du catholyte ont rendu le pH plus extrême aux bords de la cellule de focalisation. Il est également envisageable que les gammes de pH indiquées par les fabricants soient indicatives et restent approximatives.

4.2.1.2. Conductivités des fractions obtenues

Pour économiser les fractions et pour pouvoir facilement comparer leurs conductivités avec celles des fractions obtenues par électrophorèse en gel granuleux, les mesures de conductivités ont été effectuées sur des fractions à 4% v/v, soit 0,4% m/v en ampholytes. Ces mesures ont été réalisées par mesure de courant en EC. Le capillaire de silice vierge utilisé avait une longueur totale L de 40 cm et un diamètre interne d de 50 µm. Des tensions de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 kV ont été successivement appliquées aux bornes du capillaire durant 3 minutes. Pour chaque tension V appliquée, le courant i a été mesuré, ce qui a permis de calculer la conductivité k de la fraction considérée, exprimée en S/m à partir de l'équation suivante:

$$k = \frac{4iL}{\pi d^2 V}$$

Equation 1

En réalité, la conductivité de la fraction est calculée en faisant la moyenne des conductivités obtenues pour chaque tension appliquée. Cette méthode permet également de s'assurer que la conductivité des fractions ne varie pas avec la tension appliquée, ce qui indiquerait la présence d'effet Joule. La Figure 3A présente les conductivités des NC obtenus lors des cinq fractionnements réalisés. Celles des fractions obtenues sur gel granuleux sont présentées en Figure 3B.

Les fractions les plus proches des électrodes sont plus conductrices que les autres. En effet, de par leurs pH extrêmes, elles présentent des concentrations importantes en ions H⁺ et HO⁻, dont les conductivités sont élevées.

Les conductivités obtenues ici sont satisfaisantes et tout à fait équivalentes aux valeurs obtenues par fractionnement sur gel granuleux. Toutefois, le fractionnement au Rotofor® permet d'obtenir un profil de conductivité plus régulier.

Pour la plus grande partie des fractions, la conductivité est extrêmement faible (inférieure à 20 mS/m). A titre de comparaison, un électrolyte formate de sodium de pH 2,8 et de force ionique 7 mM présente une conductivité de 180 mS/m et celle d'un électrolyte borate de sodium de pH 9,2 et de force ionique identique est de 79 mS/m, sachant qu'une valeur de 7 mM en force ionique est une valeur faible en EC.

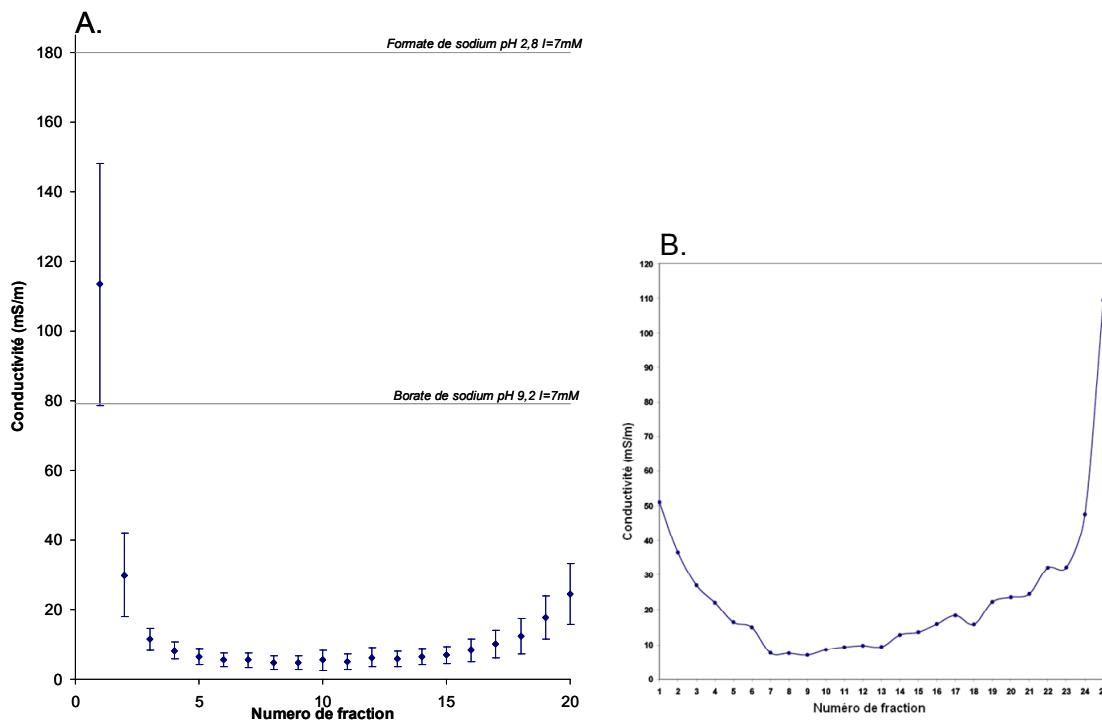


Figure 3: Conductivité des NC obtenus par fractionnement d'un mélange Servalyt 4-9. A.
Fractionnement au Rotofor®. Chaque valeur est la moyenne des 30 valeurs de conductivité obtenues lors des 5 fractionnements, 6 mesures étant effectuées pour chacun des NC. **B.** Fractionnement des ampholytes sur gels granuleux. Adapté de[4].

4.2.1.3. Séparation d'un mélange test de protéines

Pour mettre en évidence le potentiel des NC pour la séparation de protéines en ECZ, un mélange test de trois protéines a été utilisé. La séparation de la myoglobine de cœur de cheval (17,5 kDa, pI 7,3), de l' α -lactalbumine (14 kDa, pI 4,5) et de la β -lactoglobuline A (18 kDa, pI 5,3) a été effectuée à pH basique, pour éviter les interactions électrostatiques entre les protéines et les parois du capillaire. Les séparations obtenues en électrolyte borate (pH 9,2, force ionique 9 mM) et en NC (pH similaire, 1,2% m/v) sont présentées en Figure 4.

Le même champ électrique de 750 V/cm a été appliqué lors des deux séparations. Alors qu'en tampon borate l'intensité du courant parcourant le capillaire est de 13 μ A, celui-ci n'est plus que de 3,8 μ A avec la fraction d'ampholytes, ce qui confirme sa faible conductivité.

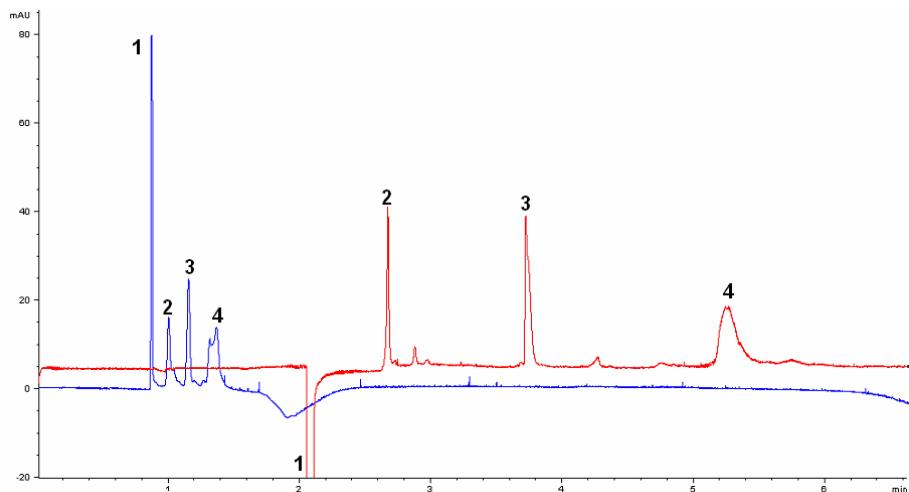


Figure 4: séparation d'un même mélange de 3 protéines. Concentration des protéines : 0,1 g/l.
1 :formamide ; 2 : myoglobine (cœur de cheval) ; 3 : α -lactalbumine ; 4 : β -lactoglobuline Capillaire en silice vierge L : 40 cm ; l : 31,5 cm ; di : 75 μ m ; détection UV à 200 nm, injection: 50 mbar/ 5 secondes ; +30 kV ; T= 25°C ;L'électrophérogramme bleu représente la séparation réalisée en tampon borate à un pH de 9,2 et une force ionique de 9 mM, et le rouge en fraction d'ampholyte possédant un pH similaire et diluée à 1,2% (m/v).

Dans les deux cas on obtient une séparation satisfaisante des protéines étudiées, mais la résolution et les efficacités sont bien meilleures en NC qu'en électrolyte classique. A titre d'exemple, l'efficacité du pic de myoglobine est multipliée par 20 lorsque l'on passe de l'électrolyte borate au NC, passant de 34.900 à 706.000 plateaux par mètre. On peut en outre remarquer que les temps de migration sont plus longs dans le cas d'électrolyte constitué d'une fraction ampholytes, à cause d'une diminution du flux électroosmotique. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène serait que les ampholytes s'adsorberaient sur la paroi interne du capillaire. Elle a été vérifiée en comparant les FEO obtenus en NC et en électrolytes classiques. Les résultats obtenus sont présentés dans la deuxième section de ce chapitre et ont montré qu'à pH équivalent les FEO étaient plus faible en NC qu'en électrolyte classique, ce qui semble confirmer que les ampholytes s'adsorbent sur les parois des capillaires, diminuant ainsi la densité de charge de ces derniers.

4.2.2. Fractionnement de mélanges d'ampholytes de gammes de pH étroites

Les solutions d'ampholytes obtenues à partir de Servalyt 4-9 présentent des propriétés physico-chimiques satisfaisantes. Cependant pour la séparation de protéines par électrophorèse de zone sur le microsystème « Allergycard », il pourra être nécessaire de

disposer de solutions quasi-isoélectriques de pH extrême. Ceci permettra en effet que toutes les protéines d'intérêt possèdent une charge de même signe dans l'électrolyte utilisé, de façon à pouvoir travailler dans la même polarité tout au long de l'analyse. Ainsi, pour disposer de NC de pH plus acide que ceux obtenus avec les Servalyt 4-9, un mélange Servalyt 2-4 a été fractionné au moyen du Rotofor ®. Deux mélanges d'ampholytes de gamme de pH basique - Servalyt 9-11 et Pharmalyte 8-10,5- l'ont également été. Comme précédemment, les fractions obtenues ont tout d'abord été caractérisées en termes de pH et de conductivité.

4.2.2.1. pH des fractions obtenues

Le pH des fractions obtenues est présenté en Figure 5. Deux fractionnements ont été effectués pour les Servalyt 2-4 et la répétabilité obtenue est tout à fait satisfaisante (C.V.<5%, sauf pour les fractions de pH extrêmes). En revanche, le gradient de pH obtenu avec ces ampholytes n'est absolument pas linéaire. On observe tout d'abord une forte augmentation du pH pour les fractions les moins acides. Ceci est certainement dû au fait que l'on a utilisé de la soude comme catholyte, dont le pH est bien plus élevé que celui des ampholytes utilisés ici. Cependant, si l'on ne considère pas les fractions les plus basiques, la focalisation reste correcte bien que la linéarité du gradient de pH soit moins satisfaisante que pour le fractionnement des ampholytes de gamme large. En effet, on observe la formation d'un léger plateau au centre du gradient, qui apparaît sans doute à cause de l'acidité importante des ampholytes utilisés, comme nous l'avons vu au chapitre 1.

Concernant les fractions obtenues à partir de mélanges d'ampholytes de gamme de pH basique, les extrémités des gradients de pH présentent des pentes élevées, à cause de la proximité des anolyte et catholyte, comme pour les fractions acides. Il faut également noter que les NC les plus basiques obtenus à partir de Servalyt 9-11 ont probablement un pH trop élevé et conduisent à une saturation du pH-mètre. En revanche, la linéarité du gradient de pH au centre de la cellule de focalisation est correcte pour les deux mélanges d'ampholytes testés, bien qu'elle soit un peu meilleure pour les Pharmalyte 8-10,5. Ce mélange a également conduit à une très bonne adéquation entre pH théorique et pH obtenu.

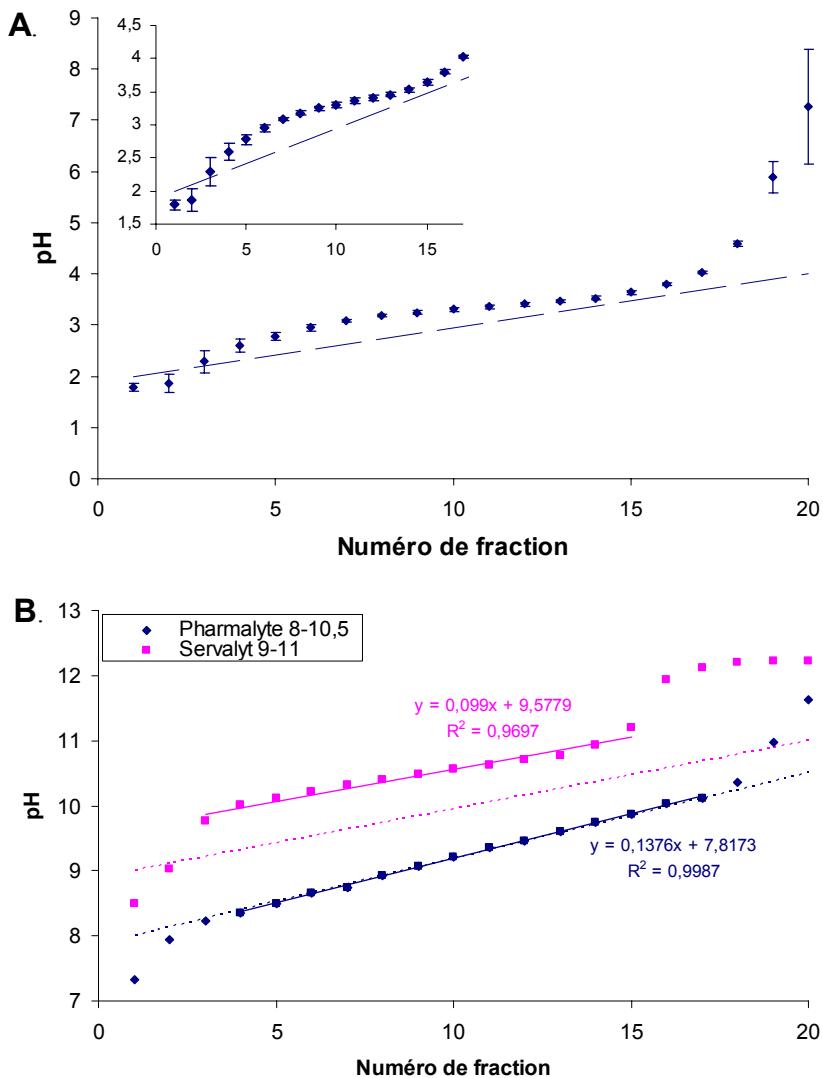


Figure 5: A. pH des NC obtenus par focalisation d'un mélange Servalyt 2-4 ($n=2$), et zoom sur les premières fractions obtenues. B. pH des NC obtenus par focalisation de mélanges Pharmalyte 8-10,5 (en bleu) et Servalyt 9-11 (en rose). En pointillés : droites théoriques.

4.2.2.2. Conductivité des fractions obtenues

Pour pouvoir comparer la conductivité des fractions obtenues avec celle des fractions issues de Servalyt 4-9, la conductivité des fractions a été représentée en fonction du pH et non plus du numéro des différentes fractions. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 6.

Les valeurs de conductivité des fractions provenant des Servalyt 2-4 sont du même ordre de grandeur que celles des fractions de pH équivalent provenant des Servalyt 4-9. Ces conductivités plus élevées à pH acide quel que soit le mélange initial d'ampholyte s'expliquent par la concentration relativement élevée en ions H^+ . De ce fait, l'utilisation de

fractions très acides comme électrolyte pour des séparations sous champ électrique élevé sera peut-être limitée à cause de leurs conductivités plus élevées que les fractions de pH neutre.

Les conductivités des fractions obtenues à partir de Servalyt 9-11 sont quant à elles supérieures à celles des NC provenant Servalyt 4-9 de pH équivalent. Mises à part les fractions les plus basiques, les NC obtenus à partir de Pharmalyte 8-10,5 possèdent en comparaison des conductivités plus acceptables.

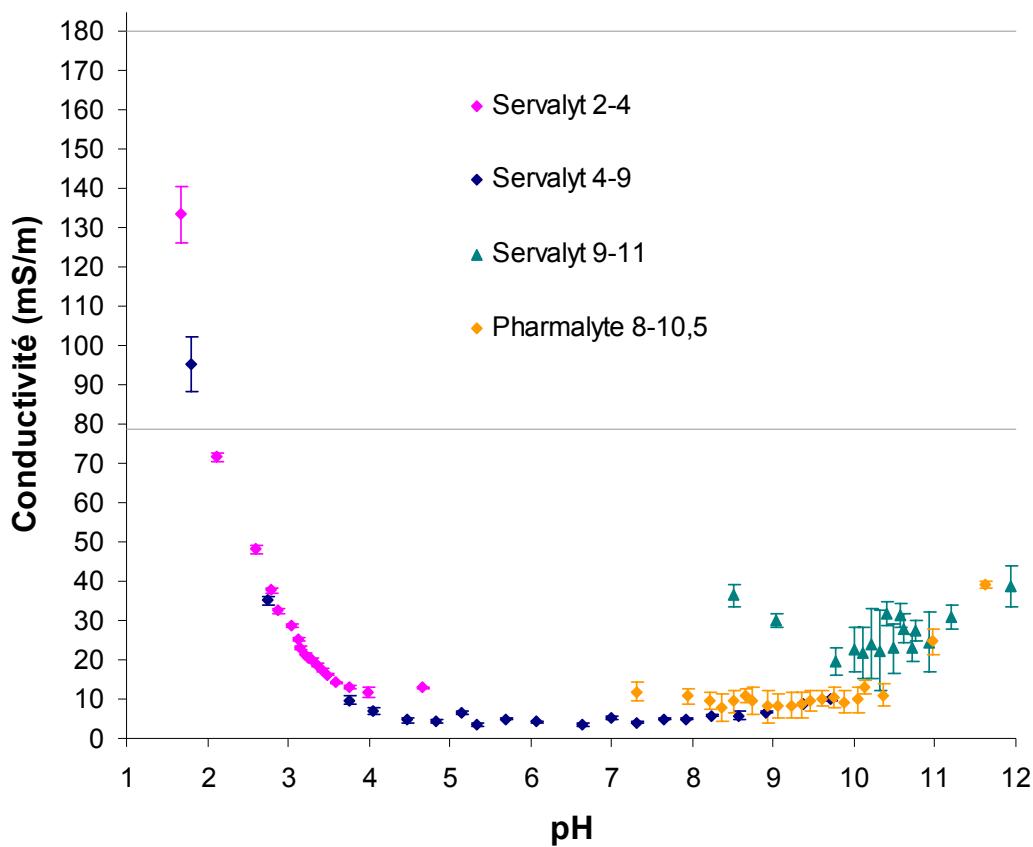


Figure 6: Conductivités des fractions obtenues à partir de différents mélanges d'ampholytes. En bleu: Servalyt 4-9. En rose: Servalyt 2-4. En vert : Servalyt 9-11. En Orange : Pharmalyte 8-10,5.

Ceci peut être mis en relation avec le travail de l'équipe de P.-G. Righetti sur les propriétés de focalisation de différents mélanges d'ampholytes [5]. Cette équipe a fractionné de nombreux mélanges commerciaux d'ampholytes au moyen du Rotofor®, et a analysé les fractions obtenues par ECZ-MS. Ceci a permis de démontrer que de nombreux ampholytes ne sont que partiellement focalisés, voire présents dans toute la cellule de focalisation. En particulier, il s'est avéré que la focalisation des ampholytes était bien moins bonne pour les Servalyt 9-11 que pour les Pharmalyte 8-10,5. Comme il est

raisonnable de penser que la présence d'ampholytes non focalisés contribue à augmenter la conductivité des NC, il n'est pas surprenant d'obtenir des conductivités élevées pour les fractions issues de Servalyt 9-11.

Ainsi, il n'est pas certain que les fractions issues de Servalyt 9-11 permettent d'appliquer des champs électriques très élevés en ECZ. Les fractions issues de Pharmalyte 8-10,5 semblent un peu plus prometteuses à ce niveau.

4.2.2.3. Mesure des FEO en électrolytes constitués de coupes étroites d'ampholytes

Comme nous le verrons par la suite, les fractions issues de Servalyt 4-9 ont conduit à une diminution du FEO par rapport à des électrolytes classiques. Les FEO générés par les fractions obtenus à partir de Servalyt 9-11 et Pharmalyte 8-10,5 ont donc également été mesurés.

Ces mesures de FEO ont été réalisées en EC par simple injection d'un marqueur neutre, comme décrit dans la section suivante de ce chapitre. Ces dernières ayant été effectuées en même temps que les mesures de conductivité, les fractions ont été utilisées à 1% v/v, cette concentration correspondant à une concentration massique de 0,4% m/v pour les Servalyt 9-11. Les électrolytes classiques ont été utilisés à force ionique faible de 2,5 mM, pour obtenir une conductivité proche de celle des fractions d'ampholytes. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 7.

Ainsi, les NC issus de Servalyt 9-11 et Pharmalyte 8-10,5 génèrent des FEO beaucoup plus faibles que les électrolytes classiques, les mobilités électroosmotiques mesurées ne dépassant pas $30 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ alors que les mobilités électroosmotiques obtenues en électrolytes classiques de pH équivalents étaient supérieures à $80 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$. Au vu des faibles concentrations en ampholytes utilisées, une différence de viscosité est à exclure pour expliquer ce phénomène.

Les valeurs de FEO obtenues avec les fractions d'ampholytes issues de mélanges d'ampholytes de gamme basique sont toutefois inférieures à celles obtenues en NC issus de Servalyt 4-9. Ceci pourrait être dû à leur conductivité légèrement plus élevée, qui laisse supposer que leur force ionique est plus élevée. En effet, les fractions issues de Servalyt 9-11 ont été utilisées à des conductivités variant entre 20 et 40 mS/m contre 7 mS/m pour les NC obtenus à partir de Servalyt 4-9. En revanche, cette explication reste discutable pour

les fractions obtenues à partir de Pharmalyte 8-10,5, les FEO qu'elles génèrent ayant été mesurés dans des solutions de conductivité proches de 10 mS/m. Cependant, la nature même des ampholytes composant les différents mélanges utilisés est également à prendre en compte pour expliquer les différences de FEO observées, car elle peut influer sur l'épaisseur de la double-couche électronique au niveau des parois du capillaire.

Les allures des courbes présentées en Figure 7 sont quant à elles relativement similaires pour les Servalyt 9-11 et les Pharmalyte 8-10,5, le FEO formant un plateau aux pH les plus basiques. Le pH auquel apparaît ce plateau est toutefois légèrement plus élevé avec les Pharmalyte 8-10,5. Quoi qu'il en soit, une limitation très importante du FEO est observée avec les deux types d'ampholytes testés : bien que leur synthèse soit différente, il semble donc que tous interagissent avec les parois de la silice et diminuent sa densité de charge.

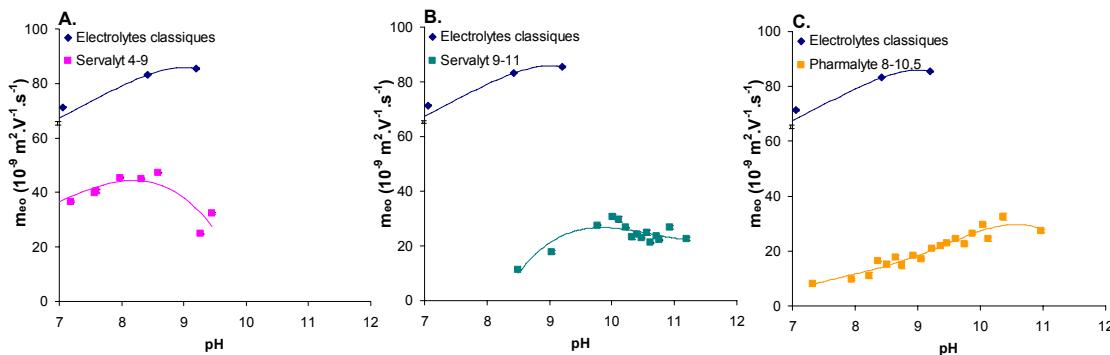


Figure 7: Mobilités électroosmotiques générées par les NC et par des électrolytes classiques ($I=2,5\text{ mM}$) en fonction du pH ($n=3$). La nature des électrolytes classiques utilisés est détaillée en annexe 2.

Plusieurs mélanges d'ampholytes porteurs de gammes de pH variées ont donc été fractionnés au moyen du Rotofor®. Les fractions obtenues semblent constituer de bons candidats pour leur utilisation en tant qu'électrolytes pour l'électrophorèse de zone. Ils sont en particulier très polyvalents : tandis que les NC de pH intermédiaires présentent des conductivités extrêmement faibles, les NC de pH basiques présentent quant à eux très propriétés très intéressantes en termes de limitation du flux électroosmotique, probablement en raison de leur interaction avec les parois des capillaires de silice.

Nous avons ensuite montré que ces propriétés d'interaction des ampholytes avec la silice avaient également lieu à pH acide, permettant alors de diminuer l'adsorption des protéines.

4.3. Utilisation d'électrolytes quasi-isoélectriques pour la limitation de l'adsorption des protéines en ECZ

4.3.1. Article 5: Use of quasi-isoelectric buffers to limit protein adsorption in CZE

Short communication

Martine Poitevin, Karim Hammad, Ichraf Ayed, Pier Giorgio Righetti, Gabriel Peltre, Stéphanie Descroix

Electrophoresis, 2008, accepté

Abbreviations

NC: narrow pH cuts of carrier ampholytes, PDMA: polydimethylacrylamide

Keywords

CZE, polydimethylacrylamide, protein adsorption, quasi isoelectric buffers.

Abstract

The use of quasi-isoelectric buffers consisting of narrow pH cuts of carrier ampholytes (NC) has been investigated to limit protein adsorption on capillary walls during capillary zone electrophoresis experiments. To quantify protein adsorption on the silica surface, a method derived from that of Towns and Regnier has been developed. α -lactalbumin (14 kDa, pI 4.8) and α -chymotrypsinogen A (25 kDa, pI 9.2) have been used as model proteins. Acidic narrow pH cuts of carrier ampholytes (NC, pH 3.0) obtained from fractionation of Serva 4-9 carrier ampholytes were used as BGE in bare silica capillaries, and allowed to decrease significantly protein adsorption, as compared to experiments performed with classical formate buffer. The use of NC as BGE appeared to be as efficient as the use of polydimethylacrylamide (PDMA) coating to prevent protein adsorption. This

increase of protein recovery when using NC was attributed to the interaction of carrier ampholytes with the silica surface, leading to a shielding of the capillary wall.

Introduction

CE is a powerful technique for protein analysis [1, 2]. It allows reaching short analysis times, high efficiencies and low sample consumption. However protein adsorption on silica capillary walls can lead to dramatic loss of efficiency and poorly reproducible migration times, as this phenomenon changes the charge of the capillary surface and thus EOF. A number of methods have been developed to limit protein or peptide adsorption on capillary walls [3, 4]. The most widely used method consists in dynamic or permanent coating of the capillary surface with a polymer or a surfactant [5, 6]. Additives such as diamines [7, 8] or barium [9] have also been reported to be able to limit peptide adsorption due to interaction with silica surface.

Narrow pH cuts of carrier ampholytes (NC) are low conductivity, quasi-isoelectric buffers which are obtained by fractionation of wide pH range carrier ampholyte mixtures, that are usually needed to create a pH gradient in isoelectric focusing [10, 11]. They have been used to separate protein mixtures [12] and have improved separation performances and limited protein adsorption at alkaline pH, due to their interaction with silica wall [13]. Single amphoteric compounds have also been used as acidic isoelectric buffers to separate proteins in the presence of 7M urea and diamines as coating additives [8].

To quantify protein adsorption in CE, two main methods have been reported in the literature. Verzola *et al.* used SDS micelles driven electrophoretically to desorb the adsorbed proteins, the area of the corresponding peak leading to the protein adsorption rate [14]. The method of Towns and Regnier [15] consists in using a capillary equipped with two detectors: the peak decrement between the first and the second detector gives the amount of adsorbed protein on the capillary surface along the path between the two detectors. This method has been adapted by several groups. Lucy's group [16-19] uses one capillary, which is cut after one series of experiments, to separate the proteins on two different lengths and merely calculates recovery by comparing the protein peak areas obtained with the long and the short capillary. Taverna's group [20, 21] injects the proteins by the long and the short side of one single capillary and calculates protein recovery by using a more elaborated calculation, which considers that the protein adsorption rate is proportional to the distance reached by the sample.

In this paper, the potential of NC to limit protein adsorption during CZE experiments has been investigated. The experiments have been performed at acidic pH. Ion-exchange interactions between proteins and silica surface are supposed to be very limited at this pH, since proteins can interact only with the few remaining ionized silanols. Nevertheless, some proteins can bind to capillary surface through other interactions [3]. To quantify protein adsorption, two capillaries of different lengths have been used and Taverna's group calculation has been adapted to the setup used here. The results obtained with NC have been compared to the ones obtained with formate buffer, in bare silica or polydimethylacrylamide (PDMA) coated capillaries.

Material and methods

Unless otherwise stated, proteins and chemicals were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). PDMA (MW: 5000 kDa) was provided by Fluigent (Paris, France). α -lactalbumin (14 kDa, pI 4.8) and α -chymotrypsinogen A (25 kDa, pI 9.2) were chosen as model proteins. They were analyzed by CZE on an HP3DCE apparatus (Agilent, Waldbronn, Germany), using capillaries (Photonlines, Marly le Roi, France) of 50 μ m internal diameter, 40 cm (50 cm) total length and 31.5 cm (41.5 cm) effective length under 600 V/cm. Each new bare silica capillary was activated using the following three-step sequence: 10 minutes 1 M NaOH rinse, 10 minutes 0.1 M NaOH rinse and 10 minutes water rinse. Each day, these capillaries were conditioned with 0.1 M NaOH, water and BGE. Between runs, the capillaries were rinsed with 0.1 M NaOH, water and the running buffer to remove the adsorbed proteins. PDMA coated capillaries were prepared by flushing a new capillary with NaOH 1M, water and then PDMA (1% m/v in water) for 10 minutes each. The quality of the coating was monitored by measuring EOF in borate buffer pH 9.2, 2.5 mM ionic strength: electroosmotic mobility was 30.10^{-9} $\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (RSD=2%, n=5), whereas it was 85.10^{-9} $\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (RSD= 0.3%, n=5) in a bare silica capillary. For recovery studies formate buffer pH 2.8 (8.75 mM ionic strength, corresponding to 81mM concentration of formic acid and 7.3 mM concentration of sodium hydroxide) or NC pH 2.96 (1.5% m/v) were used as BGE. Hydrodynamic injection was performed (50 mbar for 5sec). The proteins were injected at 0.1 mg/mL in water in the presence of creatinine (0.1 mg/mL) as positive internal standard, to avoid bias from injection. Detection was set at 200 nm and temperature at 25 °C. Each analysis was performed five times and the relative standard deviations for normalized peak areas were inferior to 15%.

NC were obtained from Serva 4-9 ampholytes (10% m/v, Serva, Heidelberg, Germany) fractionation using a Rotofor® device (Biorad), equipped with a 60 mL focusing chamber with 20 compartments [13]. Anolyte and catholyte were 0.1 M phosphoric acid and 0.1 M NaOH respectively. Ion exchange membranes were used at the anodic and cathodic sides of the focusing chamber. Ampholytes were allowed to focus for 7 hours by applying a 15 W constant power, and a 1000 V maximum voltage. During the focusing process, the system was cooled with an external refrigerated water bath set at 10°C. Once the current was stabilized, all of the 20 fractions were collected at once as the focusing was stopped. To assess the focusing process, the linearity of the fraction pH over the fraction number was checked and the conductivity of the fractions was measured (it was lower than 20 mS/m, except for fraction 1, as compared to 140 mS/m for formate buffer pH 2.8, I=7 mM).

EOF was determined by injection of formamide as neutral marker for electrolytes with pH above 3, and the Williams and Vigh method [22] was used for electrolytes with lower pH.

Recovery calculation

To evaluate protein adsorption, the protein recovery [20] has been calculated according to the following procedure: a given protein has been injected in two capillaries of different lengths. The recovery percentage of a given protein was determined by comparing the corrected peak areas obtained after separation from the long and the short capillary. To avoid bias from injection variation, creatinine was used as positively charged internal standard, and the protein corrected peak area was normalized by the creatinine corrected peak area. For recovery calculation the amount of adsorbed protein has been considered to be proportional to the migrated distance [20], which leads to equation 1:

$$\frac{dA}{A} = Cdx \quad (\text{Eq 1})$$

where C is a negative constant, A the protein corrected peak area and x the migrated distance.

For the short (long) capillary, after a migrated distance l_1 (l_2), the protein corrected and normalized peak area would be A_0 if there were no adsorption, and is in fact A_1 (A_2). Integration of equation 1 thus leads to equations 2 and 3:

$$\ln\left(\frac{A_1}{A_0}\right) = C \cdot l_1 \quad (\text{Eq 2}), \quad \ln\left(\frac{A_2}{A_0}\right) = C \cdot l_2 \quad (\text{Eq 3})$$

The combination of equations 2 and 3 allows deducing A_0 as a function of A_1 , A_2 , l_1 and l_2 and expressing the protein recovery after covering a distance l_2 :

$$\% \text{recovery} = 100 \cdot \frac{A_2}{A_0} = 100 \left(\frac{A_2}{A_1} \right)^{\frac{1}{1 - \frac{l_1}{l_2}}} \quad (\text{Eq 4})$$

Results and discussion

First, NC have been compared to classical non-isoelectric buffers in terms of EOF on the whole pH range, as shown on figure 1. Classical buffers have been used at low ionic strength (2.5 mM) to obtain conductivities similar to the one of NC and avoid Joule heating effect. As the composition of each NC is unknown, it is not convenient to adjust their ionic strength. Each NC concentration has thus been adapted so that all the fractions have similar conductivity (around 7 mS/m).

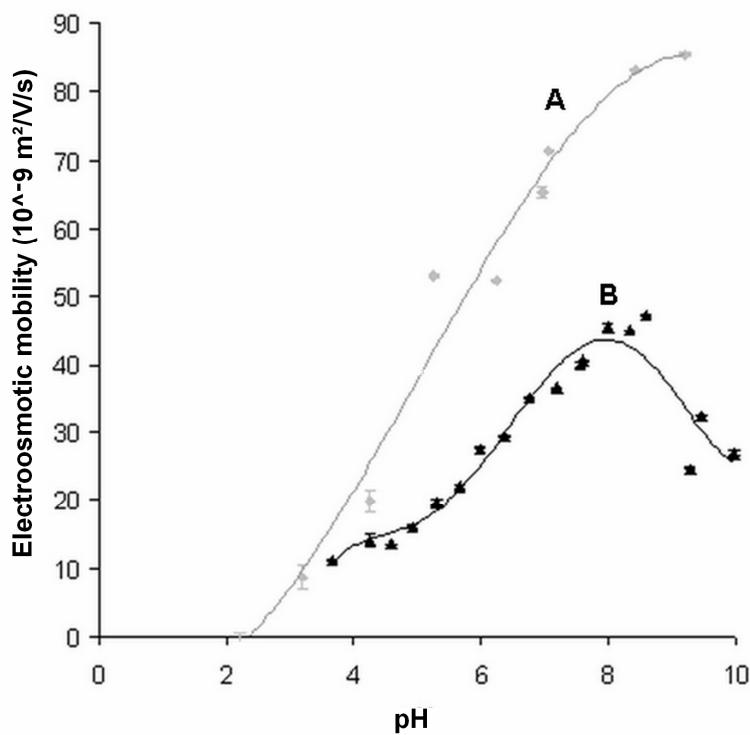


Figure 1: Electroosmotic mobilities in classical buffers, 2.5 mM ionic strength (A) and in NC (B). Standard deviations are plotted but are not always visible at the scale of the drawing.

As expected when using classical buffers, EOF increases with pH with a beginning of plateau at alkaline pH (curve A in Fig. 1). It is to notice that whatever the pH, EOF generated by NC is lower than that generated by classical buffers (curve B in Fig. 1). Experiments have shown that the viscosity of NC cannot explain this trend. Moreover, at

alkaline pH EOF even decreases when NC are used. This phenomenon was quite unexpected and could be attributed to the fact that carrier ampholytes from NC can bind to the silica wall and mask the charged silanol groups [13], thus decreasing the charge density of the capillary surface and decreasing EOF. The decrease of electroosmotic mobility above pH 8.5 could be due to the fact that alkaline ampholytes can shield more easily the silica wall than the neutral ones.

We then took advantage of this capability of NC to shield silica walls to limit protein adsorption at acidic pH. Recoveries were thus monitored at pH 2.8 in classical formate buffer. At this pH, the proteins used are positively charged and as a few ionized silanol groups still remain on the capillary surface [8] the adsorption of proteins via ion-exchange interactions is thus possible. Figure 2 shows typical electropherograms obtained for α -chymotrypsinogen A. Similar ones have been obtained for α -lactalbumin. Separate experiments have been performed for each protein to avoid competition between them for adsorption phenomena. Protein recoveries obtained are shown in table 1.

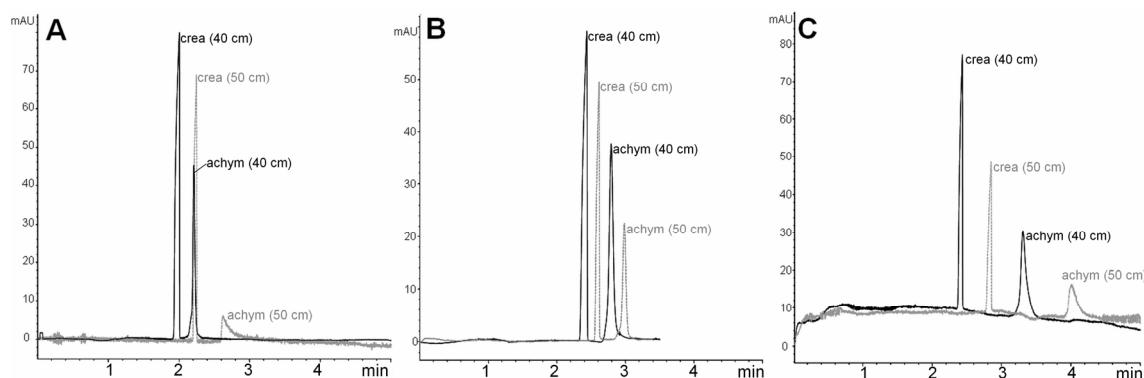


Figure 2: CZE separations of α -chymotrypsinogen A and creatinine, 0.1 mg/mL each. Injection: 50 mbar 5 sec. Black lines: capillary: L=40 cm ($l=31.5\text{cm}$), 50 μm , V=24 kV. Grey lines: capillary L=50 cm ($l=41.5\text{ cm}$), V=30 kV. **A)** Bare silica capillaries and formate buffer pH 2.8, I=7 mM as BGE. **B)** PDMA coated capillaries and formate buffer pH 2.8, I=7 mM as BGE. **C)** Bare silica capillaries and NC pH 3.0 (1.5% m/v) as BGE.

One can first notice that with formate buffer as BGE and in bare silica capillaries, recoveries are inferior to 40%: protein adsorption is thus significant despite the low pH. PDMA coating leads to satisfying limitation of protein adsorption: the protein recovery increased by 123% for α -lactalbumin and by 108% for α -chymotrypsinogen A. PDMA capillary coating thus appears to be a good strategy to limit protein adsorption.

	Bare silica capillary Formate buffer	PDMA coated capillary Formate buffer	Bare silica capillary NC buffer
α -lactalbumin	26.7%	61.4%	59.4%
α -chymotrypsinogen A	35.1%	78.3%	72.9%

Table 1: protein recovery (n=5 for each experiment). Relative standard deviations on corrected peak areas were lower than 15%.

The use of NC as BGE has then investigated to limit protein adsorption. These low conductivity buffers have already been reported to limit protein adsorption at alkaline pH [13], but we propose here to use them at acidic pH as well. Figure 2C presents the electropherograms obtained when α -chymotrypsinogen A is analyzed in NC using bare silica capillaries. NC used as BGE lead to values of protein recoveries similar to the ones obtained with PDMA coated capillaries and formate buffer (Table 1). These recovery values showed that when using NC as BGE no capillary coating is necessary and that the use of NC clearly prevents protein adsorption on the silica wall as previously reported at alkaline pH values [11]. This is most probably due to the interaction of carrier ampholytes from NC with the capillary wall, in a kind of dynamic capillary coating. NC thus seems to act as BGE and coating agent at the same time, which is very convenient and time-saving because it avoids performing a coating procedure or adding a coating agent in the separation medium.

As a conclusion, we report here the use of NC as quasi-isoelectric buffers to prevent protein adsorption during CZE experiments at acidic pH. To quantify protein adsorption, we have developed a method to calculate protein recovery using two capillaries of different length. When using classical formate buffer in bare silica capillaries, strong protein adsorption was observed. The use of NC as BGE drastically reduced adsorption as efficiently as a semi-permanent PDMA coating, with no pre-treatment steps of the capillary, probably due to a dynamic interaction of carrier ampholytes with the silica wall.

The authors would like to thank J. Weber and N.T. Tran for synthesising and providing PDMA. GP and PGR are supported by a grant from the European Community, project “Allergy Card”.

References

- [1] Dolník, V., Electrophoresis 2008, 29, 143-156.
- [2] Huang, Y.-F., Huang, C.-C., Hu, C.-C., Chang, H.-T., Electrophoresis 2006, 27, 3503-3522.
- [3] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., J. Chromatogr. A 2008, 1184, 81-105.
- [4] Kasicka, V., Electrophoresis 2008, 229, 179-206.
- [5] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., Electrophoresis 2003, 24, 34-54.
- [6] Horvath, J., Dolník, V., Electrophoresis 2001, 22, 644-655.
- [7] Sebastiano, R., Gelfi, C., Righetti, P. G., Citterio, A., J. Chromatogr. A 2000, 894, 53-61.
- [8] Olivieri, E., Sebastiano, R., Citterio, A., Gelfi, C., Righetti, P. G., J. Chromatogr. A 2000, 894, 273-280.
- [9] Mendieta, M. E., Antonioli, P., Righetti, P. G., Citterio Attilio, Descroix, S., Sebastiano, R., Electrophoresis 2006, 27, 4016-4024.
- [10] Busnel, J.-M., Hennion, M.-C., Peltre, G., J. Chromatogr. B 2005, 818, 99-107.
- [11] Righetti, P. G., Simó, C., Sebastiano, R., Citterio, A., Electrophoresis 2007, 28, 3799-3810.
- [12] Busnel, J.-M., Kilár, F., Kašicka, V., Descroix, S., Hennion, M.-C., Peltre, G., J. Chromatogr. A 2005, 1087, 183-188.
- [13] Antonioli, P., Mendieta, M. E., Sebastiano, R., Citterio, A., Peltre, G., Busnel, J.-M., Descroix, S., Candiano, G., Righetti, P. G., J. Chromatogr. B 2006, 833, 19-25.
- [14] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G., J. Chromatogr. A 2000, 868, 85-99.
- [15] Towns, J. K., Regnier, F. E., Anal. Chem. 1991, 63, 1126-1132.
- [16] MacDonald, A. M., Lucy, C. A., J. Chromatogr. A 2006, 1130, 265-271.
- [17] Yeung, K. K. C., Lucy, C. A., Anal. Chem. 1997, 69, 3435-3441.
- [18] Wang, C., Lucy, C. A., Anal. Chem. 2005, 77, 2015-2021.
- [19] Wang, C., Lucy, C. A., Electrophoresis 2004, 25, 825-832.
- [20] Tran, N. T., Taverna, M., Miccoli, L., Angulo, Jaime F., Electrophoresis 2005, 26, 3105-3112.
- [21] Zhang, J., Tran, N. T., Weber, J., Slim, C., Viovy, J.-L., Taverna, M., Electrophoresis 2006, 27, 3086-3092.
- [22] Williams, B. A., Vigh, G., Anal. Chem. 1996, 68, 1174-1180.

4.3.2. Perspectives

Nous avons ainsi mis en évidence une propriété intéressante des solutions de NC, à savoir les interactions qu'elles développent avec les parois des capillaires de silice, ce qui entraîne une diminution importante du flux électroosmotique et une limitation du taux d'adsorption des protéines. La méthode que nous avons développée pour calculer ce taux d'adsorption est relativement simple, dans la mesure où elle peut être mise en œuvre sur n'importe quel appareil commercial d'électrophorèse capillaire et où elle nécessite « seulement » l'injection en ECZ de la protéine d'intérêt sur deux capillaires de longueur différente, le rapport entre les longueurs des deux capillaires pouvant être modifié par l'expérimentateur.

Cette méthode pourrait bien évidemment être appliquée pour caractériser d'autres traitements de surface que ceux mis en œuvre ici. Il serait également intéressant d'étudier plus avant la capacité des NC à limiter l'adsorption des protéines sur les parois du capillaire, en choisissant notamment des protéines connues pour leur forte adsorption sur les surfaces, telles que la BSA. En outre, les protéines utilisées lors de cette étude ont été injectées séparément, pour ne pas fausser les calculs de taux de récupération. La séparation d'un mélange de ces protéines a elle aussi été effectuée, dans l'espoir de montrer que la limitation de l'adsorption s'accompagnait d'une augmentation des efficacités de séparation, mais les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants. Ceci pourrait s'expliquer par une faible capacité de chargement des NC aux pH acides. Il pourrait ainsi être opportun de calculer les taux de récupération des protéines à des pH neutres ou basiques, où les séparations en NC sont plus satisfaisantes.

Enfin, ces propriétés des NC seront bien évidemment exploitées pour la séparation de protéines en ECZ en microsystèmes. Ceci va cependant nécessiter au préalable une dérivation covalente des protéines étudiées avec un marqueur fluorescent.

4.4. Dérivation covalente de protéines pour la détection par fluorescence

Lors de la séparation de protéines de lait par IEF en microsystèmes, une dérivation non covalente au Sypro Orange a été utilisée. Cette option a été choisie car elle est extrêmement simple à mettre en œuvre, et aucune modification du pI relatif des analytes n'a été mise en évidence lors de l'analyse des protéines par électrophorèse en gel. Cependant, lorsque nous avons voulu utiliser cette méthode pour la détection de protéines séparées par électrophorèse de zone en microsystèmes, sa sensibilité s'est révélée tout à fait insuffisante. Il faut remarquer que ce problème ne s'était pas posé lors des expériences d'IEF en raison du fort pouvoir de préconcentration de cette méthode d'analyse. Nous ne disposons en outre que d'une lampe à mercure équipée d'un filtre, et l'utilisation d'un laser aurait peut-être permis de pallier ce manque de sensibilité.

Ainsi, il est apparu nécessaire de mettre en œuvre une dérivation covalente des protéines analysées en électrophorèse de zone pour pallier ce problème de sensibilité. L'utilisation de plusieurs marqueurs présentant une longueur d'onde d'excitation autour de 488 nm a été envisagée : le NBD-F, dont le temps de réaction est très rapide, le FITC, très classique et relativement peu onéreux, et enfin l'Alexa Fluor, présentant une très bonne sensibilité. Cependant, la dérivation au NBD-F n'ayant pas conduit à des premiers résultats satisfaisants en termes de sensibilité en microsystèmes, et celle à l'Alexa Fluor ayant conduit à un multimarquage important, l'utilisation de ces deux marqueurs ne sera pas présentée ici.

4.4.1. Stabilité du FITC

Les différents articles traitant de la dérivation de protéines au FITC ont montré que ce dernier pouvait être initialement dissout soit dans un tampon aqueux à pH basique [6], soit dans un solvant organique polaire type DMF [7] ou acétone [8]. Cependant, les auteurs utilisant le FITC dilué en tampon aqueux précisent qu'ils utilisent des solutions fraîchement préparées pour effectuer la réaction de dérivation. Nous avons donc en premier lieu voulu vérifier la stabilité du FITC en solutions aqueuse et organique.

Pour cela, deux solutions de FITC ont été préparées, l'une dans l'acétone et l'autre dans un tampon carbonate (pH 9,2, I=50 mM). Ces solutions ont ensuite été séparées en différents aliquots, qui ont été placés pendant 72 heures à -18°C, 4°C ou température ambiante. L'éventuelle dégradation de ces solutions a ensuite été vérifiée par ECZ-UV. Les électrophérogrammes des différentes solutions sont présentées en Figure 8. Les deux électrophérogrammes correspondant aux solutions fraîches de FITC sont très semblables et comportent un pic extrêmement majoritaire, correspondant au FITC non dégradé. Aucune différence notable n'a pu être observée entre les électrophérogrammes du FITC frais et laissé 72 heures à différentes températures lorsque ce dernier était dissout dans l'acétone. Les solutions acétoniques de FITC sont donc a priori stables au moins pendant plusieurs jours, même en cas de conservation à température ambiante.

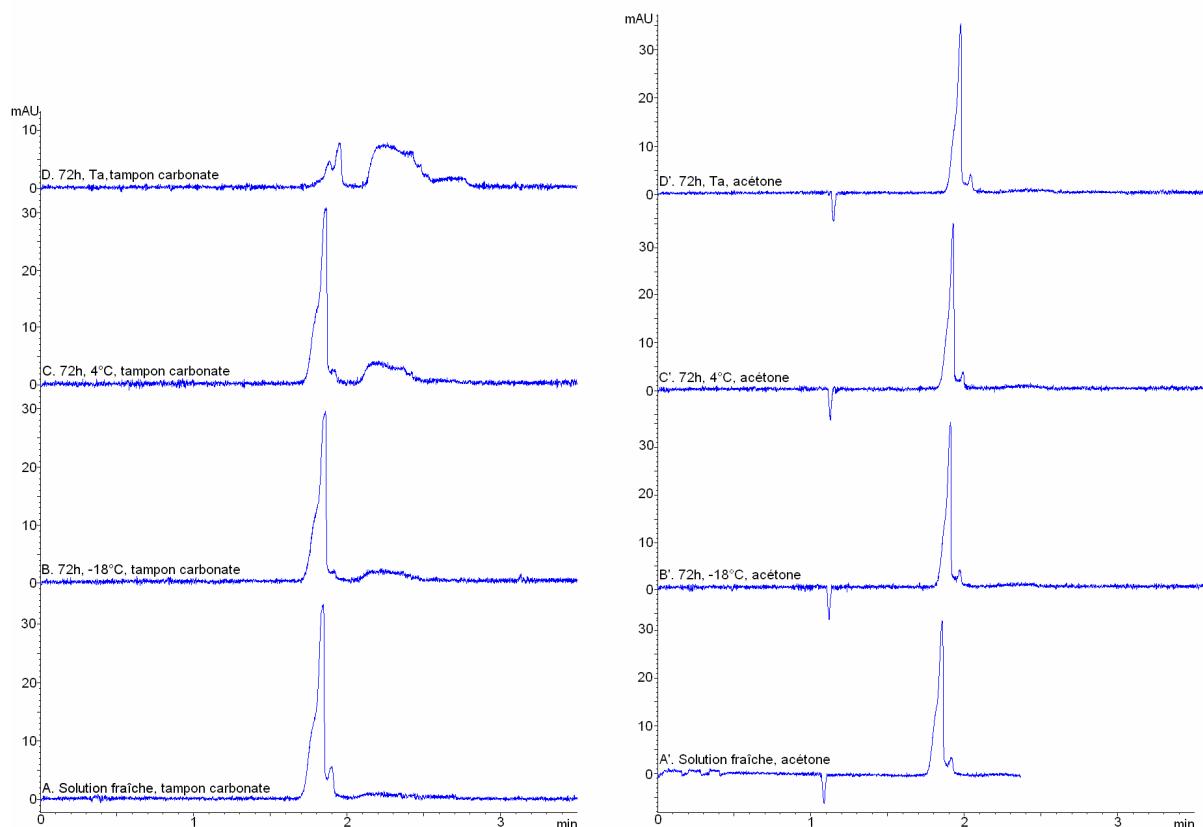


Figure 8 : Electrophérogrammes de différentes solutions de FITC, préparées en tampon carbonate ou en acétone, conservées dans différentes conditions. Capillaire en silice vierge, L=40 cm, l=31,5 cm, di=50 µm. Electrolyte borate I=20 mM. +25 kV. Injection : 50 mbar, 5 sec.

En revanche, les électrophérogrammes du FITC conservé 72 heures en solution aqueuse comportent un composé de mobilité électrophorétique supérieure à celle du FITC non dégradé, et apparaissant sous forme de pic large. La hauteur de ce pic est d'autant plus élevée que la solution de FITC a été conservée à température élevée, ce phénomène

s'accompagnant d'une diminution de la hauteur du pic initial de FITC. Ainsi, une dégradation du FITC préparé en solution aqueuse a été observée, et ce quelle que soit sa température de conservation. Dans le cas d'une préparation en milieu aqueux, il faudra donc utiliser des solutions de FITC fraîchement préparées.

La stabilité des solutions de protéines marquées au FITC devra également être vérifiée, le milieu étant alors principalement aqueux même si le FITC est initialement dilué dans un solvant organique.

4.4.2. Optimisation des conditions de dérivation

Le FITC réagit avec les amines primaires des protéines suivant la réaction présentée en Figure 9 . L'optimisation des conditions de dérivation au FITC a tout d'abord été effectuée en choisissant l' α -lactalbumine comme protéine modèle.

La réaction de dérivation a été réalisée en adaptant les conditions opératoires publiées par Konecsni et Kilar [6]. Le protocole utilisé est détaillé en annexe 3 et utilise un rapport molaire FITC/protéine variant entre 1,1 et 7,5.

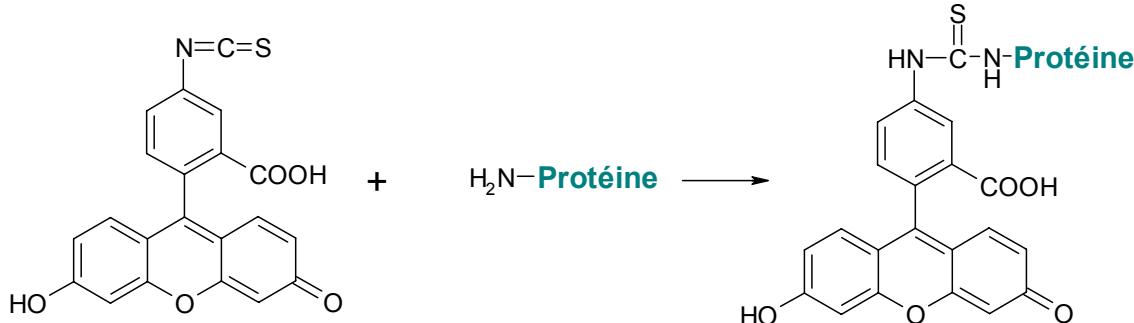


Figure 9 : Réaction du FITC avec les fonctions amines primaires des protéines

Les influences du rapport molaire FITC/protéine et du temps d'incubation ont alors été étudiées. Le suivi de la réaction a été réalisé par injection d'un aliquot de solution de dérivation en ECZ-UV. Les conditions d'analyse sont détaillées en légende de la Figure 10.

Les électrophorogrammes enregistrés après 24h de dérivation sont présentés en Figure 10. Remarquons ici que des expériences similaires ont été réalisées en utilisant du FITC fraîchement dilué en tampon carbonate et non pas dans l'acétone, et que des profils

électrophorétiques similaires ont été obtenus. Cependant, pour les raisons de stabilité vues précédemment, le FITC a été utilisé par la suite uniquement dilué dans l'acétone.

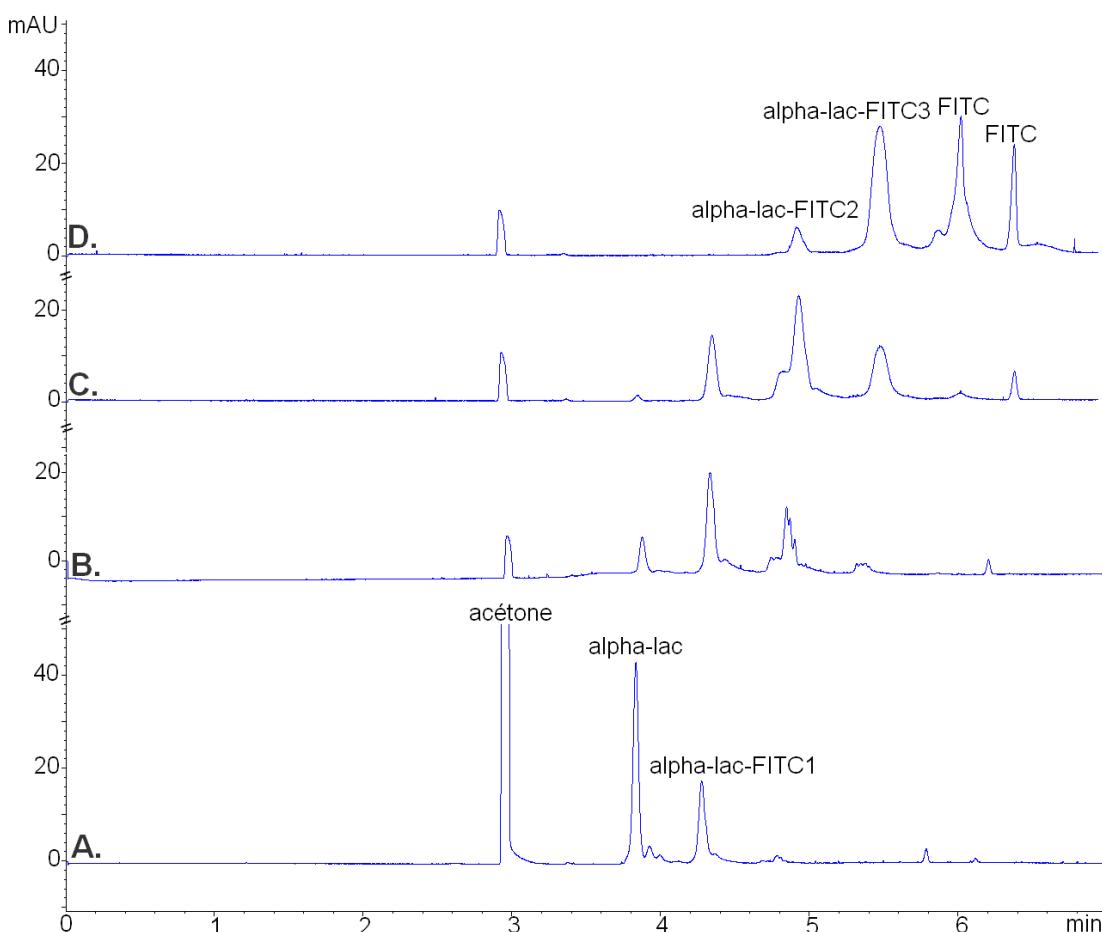


Figure 10 : Influence de la concentration en FITC sur la réaction de dérivation de l' α -lactalbumine.
Electrophorégrammes enregistrés après 24h de dérivation. FITC dilué dans l'acétone. Concentration des solutions initiales de FITC : 0,4 mg/mL (**A**), 0,5 mg/mL (**B**), 1 mg/mL (**C**) et 2,8 mg/mL (**D**), correspondant à des rapports molaires FITC/protéine de 1,1, 1,4, 2,7 et 7,5. Capillaire en silice vierge, L=50 cm, l=41,5 cm, di=50 μ m. V=+20 kV. Injection : 30 mbar, 5 sec. Electrolyte : borate de sodium, pH 9,2, I=50 mM. T=25°C. Détection UV à 214 nm. Les pics d' α -lactalbumine non marquée et de FITC ont été attribués par injection de solutions individuelles conservées dans les mêmes conditions que la solution de dérivation.

La Figure 10 nous montre que pour des rapports molaires inférieurs à 2, la réaction de dérivation n'est pas totale dans la mesure où un pic d' α -lactalbumine non marquée est toujours observé. Pour un rapport molaire FITC/protéine de 7,5, on remarque la présence de deux pics correspondant au FITC, ce qui indique non seulement que tout le FITC n'a pas réagi avec la protéine, ce qui était bien évidemment attendu, mais également qu'il s'est dégradé. Ceci n'est pas non plus surprenant dans la mesure où la solution de dérivation est principalement aqueuse.

Trois pics principaux de protéine marquée au FITC sont également observés, signe qu'il existe sur la protéine plusieurs sites de réaction avec le FITC. Ces trois pics correspondent

à trois isoformes que nous nommerons par la suite α lac-FITC1 ($m_{ep}=-19.10^{-5}$ cm 2 .V $^{-1}$ s $^{-1}$), α lac-FITC2 ($m_{ep}=-23.10^{-5}$ cm 2 .V $^{-1}$ s $^{-1}$), α lac-FITC3 ($m_{ep}=-27.10^{-5}$ cm 2 .V $^{-1}$ s $^{-1}$). Le profil électrophorétique de la protéine marquée dépend fortement du rapport molaire FITC/protéine, les pics de protéine marquée de mobilité électrophorétique plus faible apparaissant quand la concentration initiale en FITC augmente. Pour estimer grossièrement le degré de dérivation de chacun des pics d' α -lactalbumine, la hauteur des différents pics -proportionnelle à l'absorbance des protéines correspondantes- a été mesurée à 280 et 480 nm. Le degré de dérivation r , correspondant au nombre de molécules de FITC ayant réagi avec la protéine, a été obtenu à partir de la relation de Beer-Lambert à 200 et 480 nm, en supposant que la protéine n'absorbe pas à 480 nm :

$$A_{280nm} = \epsilon_{protéine,280nm} l.c_{protéine} + \epsilon_{FITC,280nm} l.c_{FITC}$$

Équation 1

$$A_{480nm} = \epsilon_{FITC,480nm} l.c_{FITC}$$

Équation 2

Où les $\epsilon_{i,j}$ sont les coefficients d'extinction molaire du FITC et de la protéine à 280 et 480 nm, l la longueur du trajet optique dans le capillaire et les c_i les concentrations apparentes en FITC et en protéine. Le degré de dérivation r étant défini comme le rapport entre ces deux concentrations, il peut alors être calculé à partir des deux équations précédentes, en considérant que l'absorbance d'une protéine est proportionnelle à la hauteur de son pic en ECZ:

$$r = \frac{\epsilon_{protéine,280nm}}{\epsilon_{FITC,480nm}} \frac{h_{480nm}}{h_{280nm} - \frac{\epsilon_{FITC,280nm}}{\epsilon_{FITC,480nm}} h_{480nm}}$$

Équation 3

Où h_{280nm} et h_{480nm} sont les hauteurs respectives du pic considéré à 280 et 480 nm. Le rapport $\epsilon_{FITC,280nm}/\epsilon_{FITC,480nm}$ a été estimé à 0,64 en faisant le rapport des hauteurs d'un pic de FITC aux deux longueurs d'onde considérées, ce dernier ayant été injecté seul en ECZ-UV dans les mêmes conditions que la solution de protéine marquée. Les concentrations en protéine au sommet des pics électrophorétiques n'étant pas connues, les valeurs $\epsilon_{protéine,280nm}$ et $\epsilon_{FITC,480nm}$ n'ont pas pu être mesurées. Les valeurs de r ont alors été estimées à un facteur multiplicatif près. Les valeurs calculées pour un rapport FITC/protéine de 2,7

sont présentées en Tableau 1. Etant données les valeurs de coefficients de variation obtenues, ces valeurs sont bien entendu estimatives. De plus, le calcul précédent a été réalisé en faisant l'hypothèse simplificatrice que le coefficient d'extinction molaire du FITC ne varie pas lorsque ce dernier est lié à une protéine. Il est tout de même possible de supposer que le pic de mobilité électrophorétique la plus faible en valeur absolue correspond à l' α -lactalbumine ayant réagi avec environ deux fois moins de molécules de FITC que les deux autres.

	α lac-FITC 1	α lac-FITC 2	α lac-FITC 3
$r \times \epsilon_{\text{FITC}, 480\text{nm}} / \epsilon_{\text{FITC}, 280\text{nm}}$	2,2 (CV=40%)	4,7 (CV=52%)	5,6 (CV=79%)
$r/r(\alpha\text{lac-FITC 1})$	1	2,1	2,5

Tableau 1 : degrés de marquage des différentes isoformes de l' α -lactalbumine marquée au FITC. n=4, les différentes mesures ayant été effectuées à différents temps de marquage.

Le rapport molaire FITC/protéine optimal dépend des caractéristiques désirées par l'expérimentateur. Ici la plus faible concentration en FITC n'a pas permis d'obtenir une réaction complète de l' α -lactalbumine, diminuant ainsi la sensibilité, mais n'a pas conduit à un multimarquage de la protéine. Au contraire, en utilisant du FITC en excès important, celui-ci ne réagit pas totalement et reste présent dans la solution finale. Les concentrations intermédiaires en FITC conduisent quant à elles à du multimarquage, mais permettent de ne pas avoir trop de FITC dans la solution finale, tout en observant une réaction quasi-totale de la protéine.

L'influence du temps de dérivation a également été étudié. Pour cela, un aliquot de la solution de marquage a été injecté régulièrement en CZE-UV au cours des 24h suivant le début de la réaction, ce qui a permis de suivre les aires corrigées des différents pics de protéine. Ces dernières sont présentées en Figure 11, qui a été réalisée avec un rapport molaire FITC/protéine de 2,7. La Figure 11A nous montre que la concentration en protéine non marquée diminue fortement au cours des 6 premières heures de réaction, puis diminue ensuite beaucoup plus lentement. L'aire corrigée du pic d' α lac-FITC1 augmente en tout début de réaction, puis diminue très rapidement. Tout se passe donc comme si ce produit apparaissait en début de réaction puis disparaissait au profit des produits α lac-FITC2 et/ou α lac-FITC3. En effet, ces deux produits apparaissent progressivement au cours de la réaction, leur concentration étant maximale après 10 à 12 heures de réaction. Il faut remarquer qu'après 24 heures de réaction, l'aire de tous les pics diminue légèrement.

Ce phénomène ayant également été observé avec de l' α -lactalbumine non marquée, il a été attribué à une dégradation des protéines à température ambiante.

Ainsi, le temps de marquage a pour la suite été fixé à une nuit, pour permettre une réaction la plus totale possible sans observer de dégradation des protéines.

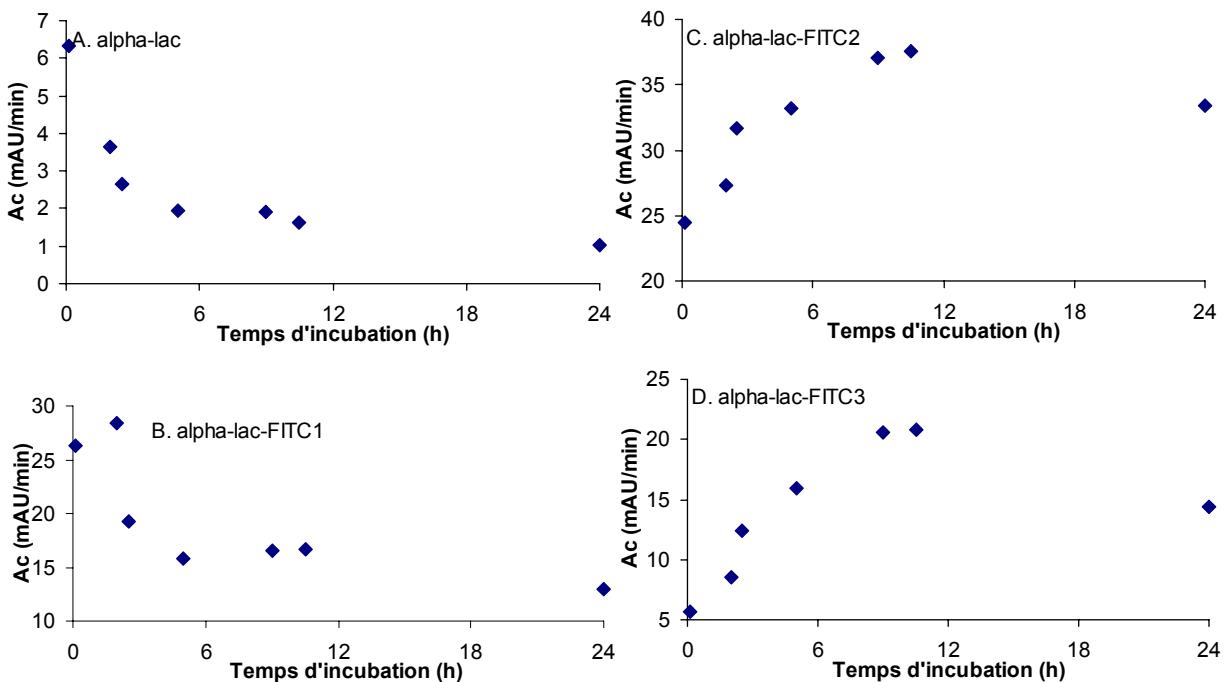


Figure 11: Aire corrigée en CZE-UV des différents pics d' α -lactalbumine au cours de la dérivation au FITC. Rapport molaire FITC/protéine: 2,7. Conditions électrophorétiques analogues à celles de la Figure 10.

Enfin, avant d'étudier la dérivation d'autres protéines, les différents isoformes de l' α -lactalbumine marquée au FITC ont été séparées en électrophorèse de zone avec une détection par fluorescence. Pour cela, les performances du dispositif utilisé au laboratoire pour la séparation par électrophorèse de zone en microsystèmes avec une détection par fluorescence ont été comparées à celles d'un appareil d'EC-LIF commercial. Les séparations obtenues en ECZ-LIF et en microsystème sont présentées en Figure 12.

Les deux profils électrophorétiques obtenus sont similaires, mais du fait des conditions expérimentales différentes en termes de champ électrique et de distance de séparation, les temps de migration sont approximativement 15 fois plus courts en microsystème, les résolutions étant quant à elles plus faibles. On remarque également que la sensibilité est environ 6 fois plus élevée en ECZ-LIF qu'en microsystèmes. Ceci est certainement dû au fait que le montage utilisé en microsystème n'est pas équipé d'un laser mais d'une lampe à mercure munie d'un filtre. En outre, les volumes injectés en électrophorèse capillaire sont

beaucoup plus importants qu'en microsystèmes (de l'ordre de 25 nL contre environ 50 pL).

Il n'en reste pas moins que les séparations en microsystème restent très satisfaisantes, surtout en terme de temps de séparation : elles pourront donc être utilisées par la suite pour évaluer la qualité de la réaction de dérivation pour les autres protéines étudiées.

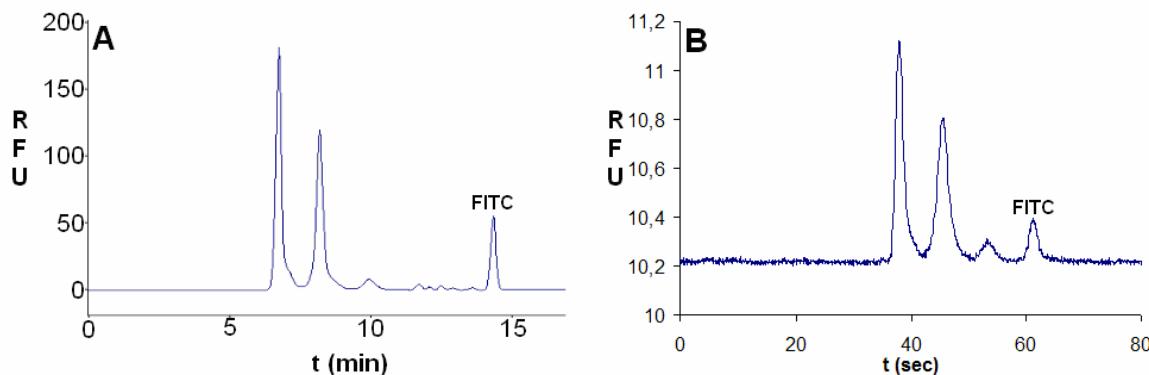


Figure 12 : Electrophérogrammes de l' α -lactalbumine marquée au FITC en ECZ-LIF (A) et en microsystèmes (B). Electrolyte borate pH 9,2, I=50 mM. (A) : Appareil P/ACE System 1200 Beckman de l'université de Pharmacie de Chatenay-Malabry, équipé d'un laser à Argon ($\lambda_{exc}=480$ nm). Capillaire en silice vierge, L=57 cm, di=75 μ m. +20 kV. (B) Montage microfluidique décrit en annexe 5, puce Micralyne en verre non greffée. Injection électrocinétique de type « pinched ». E=294 V/cm. $L_{sep}=1$ cm.

4.4.3. Dérivation d'autres protéines

Une fois la réaction de dérivation mise au point pour l' α -lactalbumine, un protocole similaire a été appliqué à plusieurs autres protéines, dont bien entendu celles du lait. Les protéines cible ont été utilisées à une concentration finale de 1,5 mg/mL (sauf l'insuline, utilisée à 0,5 mg/mL pour des raisons de solubilité), et ont réagi pendant une nuit avec du FITC à une concentration molaire trois fois plus importante que celle de la protéine. Le volume d'acétone a été maintenu constant.

Pour éviter la présence de FITC résiduel dans les solutions de protéines, qui induirait la présence d'un pic interférent, le mélange réactionnel a été séparé sur colonne d'exclusion stérique (Sephadex G-25). Lors de cette étape de purification, les protéines sont élues avant le FITC, car seul ce dernier est capable de pénétrer dans les pores des billes, ce qui augmente son volume d'élution. Une fois les différentes fractions récupérées, elles ont été séparées en ECZ-UV, ce qui a permis d'identifier celles contenant les protéines, mais également d'évaluer la concentration en protéines marquées au FITC par comparaison des aires de pics de protéines marquées ou non, ce calcul étant détaillé en annexe 3.

Les protéines purifiées ont ensuite été analysées par électrophorèse de zone en microsystème. Plusieurs d'entre elles n'ont pas conduit à des résultats satisfaisants en raison d'une faible sensibilité ou d'un multimarquage important. Ainsi, seuls les électrophérogrammes de l' α -lactalbumine, de la β -lactoglobuline A, de la BSA et de l'insuline sont présentées en Figure 13. Les profils de marquage peuvent ainsi être très différents selon la protéine dérivée : la BSA et la β -lactoglobuline conduisent à des pics uniques mais relativement larges, tandis que l' α -lactalbumine et l'insuline marquées au FITC présentent plusieurs isoformes très bien séparés en électrophorèse de zone.

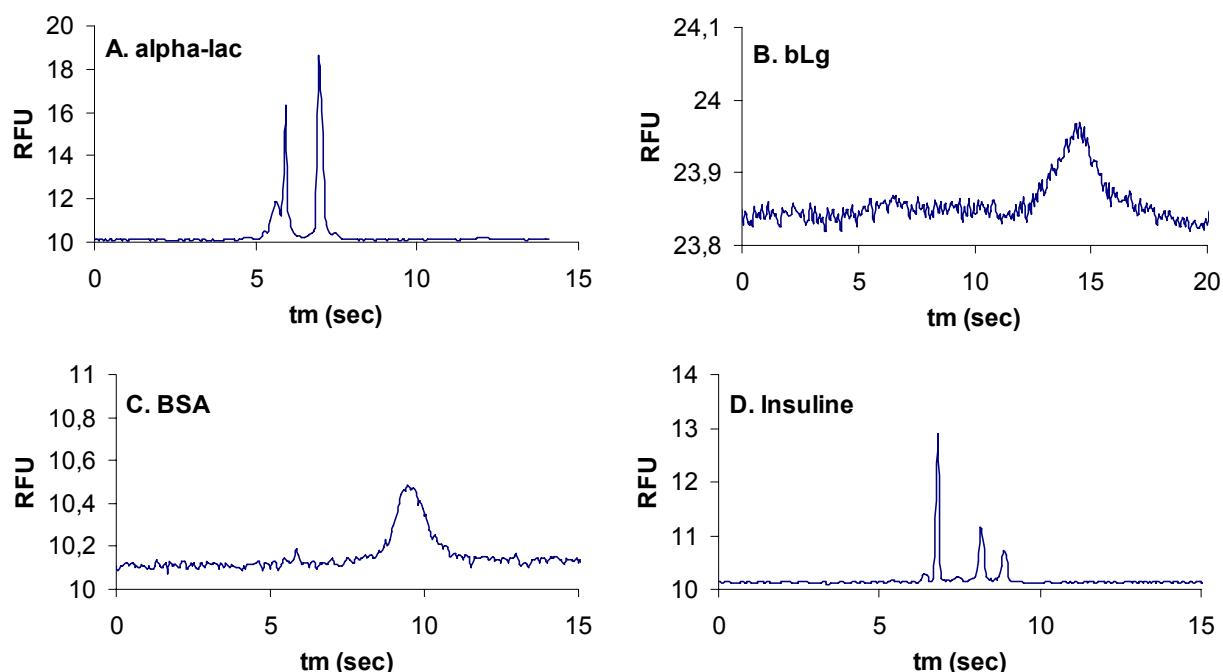


Figure 13 : Electrophérogrammes obtenus en électrophorèse de zone dans une puce en verre non greffée pour différentes protéines marquées au FITC. Electrolyte : borate pH 9,2 I= 9 mM. Champ électrique : 550 V/cm. Injection électrocinétique de type « pinched ». $l_{\text{utile}}=1$ cm.

4.5. Séparation en électrophorèse de zone en microsystèmes

Après avoir optimisé les conditions de marquage fluorescent des protéines, nous nous sommes ensuite intéressés à leur séparation par électrophorèse de zone en microsystèmes. Le montage utilisé est décrit en annexe 5. Sauf mention contraire, les NC utilisées proviennent du fractionnement de Servalyt 4-9.

Les premières séparations ont été réalisées à pH basique pour faciliter le couplage IEF-ECZ sur la puce « AllergyCard ». En effet, en cas de FEO résiduel lors de la première

séparation par IEF, il sera plus simple de devoir mobiliser les protéines dans la même direction que celle du FEO, la cathode devant donc être placée en sortie du canal d'IEF. En outre l'utilisation d'un pH basique (aux alentours de 9 par exemple) permettrait d'obtenir une séparation rapide, les protéines du lait –dont les points isoélectriques sont pour la plupart compris entre 4 et 6– possédant alors une charge apparente importante. D'un point de vue pratique, il était également plus simple de travailler au moins dans un premier temps à pH basique, l'intensité de fluorescence du FITC décroissant fortement quand le pH diminue.

4.5.1. Séparation de composés modèles

Avant de séparer un mélange de protéines, les premiers tests d'électrophorèse de zone en microsystèmes ont été réalisés en séparant des composés fluorescents modèles dont les propriétés sont données en annexe 4.

Ainsi, la séparation de la rhodamine B et de la sulforhodamine B, en puce en verre non greffée est présentée en Figure 14. Cette séparation a été effectuée sous différents champs électriques, et un électrolyte borate de sodium (pH 9,2, $I= 9 \text{ mM}$) a été comparé à un NC de pH équivalent. On peut tout d'abord remarquer qu'en NC les temps de migration sont plus élevés de quelques secondes qu'en électrolyte borate. Ceci semble donc confirmer les résultats précédents, qui ont mis en évidence une interaction des ampholytes contenus dans les NC avec la surface des capillaires en verre, diminuant ainsi la densité de charge de surface et donc le FEO. Comme attendu, ce même phénomène est donc également observé en microsystème sur des puces en verre de borosilicate.

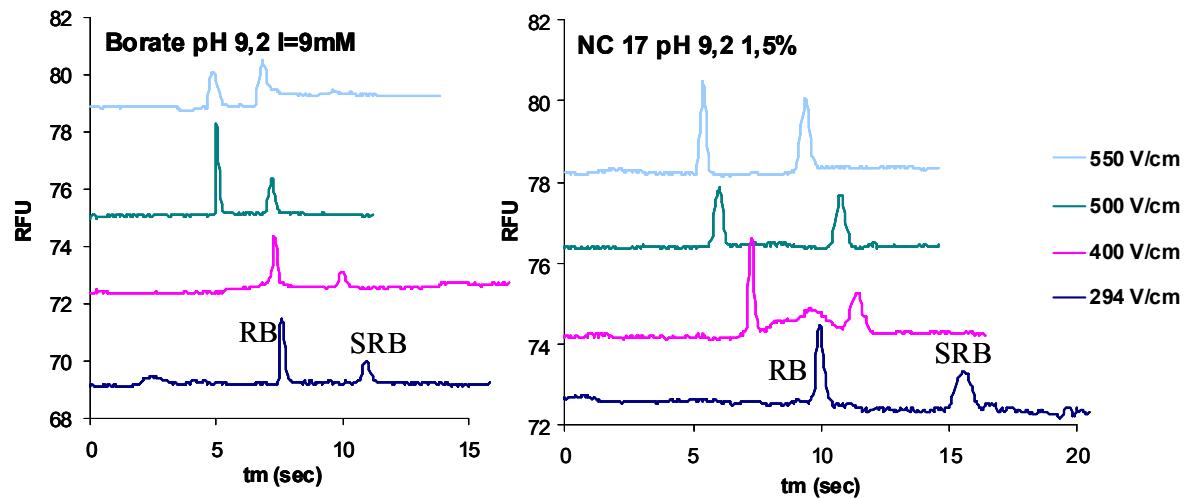


Figure 14 : séparation de la rhodamine B (RB) et de la sulforhodamine B (SRB) en électrophorèse de zone dans une puce en verre non greffée sous différents champs électriques. Electrolytes utilisés : borate pH 9,2 I= 9 mM et NC 17 pH 9,2 1,5% m/v, obtenu à partir de Servalyt 4-9. Injection électrocinétique de type « pinched ». $l_{\text{utile}}=1$ cm.

Les résolutions et les efficacités du pic de sulforhodamine B obtenues avec les deux types d'électrolytes sont présentées en Figure 15. Les résolutions sont peu influencées par le champ électrique, et légèrement supérieures en NC, mais restent relativement similaires quel que soit le type d'électrolyte utilisé. Cette augmentation de la résolution peut s'expliquer par le fait que la séparation est effectuée ici en mode contre-électroosmotique, et que le FEO est plus faible en NC qu'en électrolyte borate. Les valeurs des efficacités sont quant à elles supérieures en électrolyte classique qu'en NC, ce qui s'explique par une plus grande conductivité, entraînant un effet de préconcentration par amplification de champ électrique plus important. Ces valeurs restent toutefois très élevées quel que soit l'électrolyte utilisé (quelques centaines de milliers de plateaux par mètre), ce qui s'explique par le profil plan du flux électroosmotique, mais aussi par la distance de séparation extrêmement courte (1 cm). En électrolyte borate, une légère diminution de l'efficacité est observée pour les champs électriques les plus élevés, ce qui peut indiquer la présence d'un léger effet Joule qui entraîne la formation d'un gradient radial de température et donc un élargissement des bandes. Comme attendu, ce phénomène n'est pas observé en NC, en raison de leur plus faible conductivité.

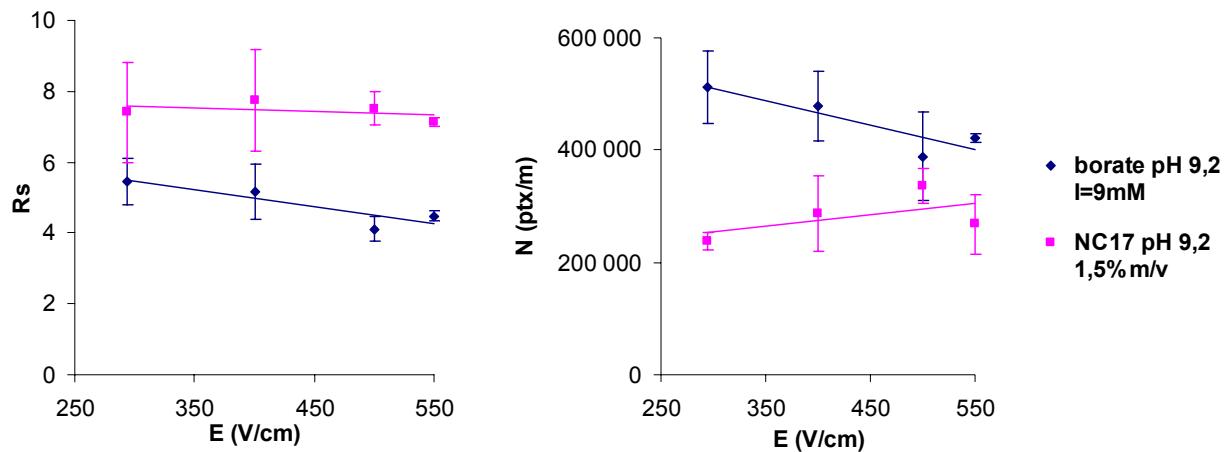


Figure 15 : Influence du champ électrique et de la nature de l'électrolyte sur les résolutions entre rhodamine B et sulforhodamine B et les efficacités du pic de sulforhodamine B. Conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 14.

Pour évaluer le potentiel des NC lié à leur faible conductivité, nous avons ensuite voulu augmenter le champ électrique de séparation. Toutefois, les puces en verre utilisées au laboratoire sont des produits commerciaux et ont un canal de séparation relativement long (8 cm), ce qui empêche l'application de champs électriques très élevés. Ainsi, des puces en PDMS présentant un canal de séparation plus court (2 cm) ont été microfabriquées à l'UMR 168 de l'Institut Curie. L'hydrophobie du PDMS nous a imposé de modifier sa surface. Pour ce faire, la surface des canaux a été recouverte d'un polymère neutre et hydrophile pour éviter l'adsorption des analytes à sa surface. Suite à l'étude réalisée avec les puces d'IEF, le PDMA-AGE a tout naturellement été choisi pour effectuer ce greffage. Pour mieux comparer les résultats obtenus sur ces nouvelles puces, des puces en verre ont été greffées thermiquement à l'HPC, qui est également un polymère neutre et hydrophile. Ceci a en effet donné des résultats similaires pour la limitation du FEO aussi bien au format capillaire qu'avec les puces utilisées en IEF, comme nous avons pu le voir au cours du chapitre 3.

Les résultats obtenus sur les différentes puces greffées ne sont pas présentés ici car ils sont relativement similaires à ceux obtenus en puce de verre non greffée. Aucune différence notable de performance n'a ainsi été observée à champ électrique équivalent, ni entre les deux électrolytes testés, ni entre les deux types de puces. En revanche, les puces en PDMS nous ont permis de travailler en NC à des champs électriques pouvant atteindre 1700 V/cm, le temps nécessaire à la séparation des deux composés modèles ne dépassant pas alors 5 secondes. De plus, aucune diminution significative des efficacités n'a alors été

observée, ce qui confirme la faible influence de l'effet Joule lors des séparations par électrophorèse de zone en NC.

4.5.2 Séparation de protéines du lait

Pour le développement de la séparation de protéines du lait par électrophorèse de zone en microsystèmes, nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline : leurs pI étant relativement proches, ces deux protéines sont donc susceptibles d'être présentes dans les mêmes fractions en sortie de première dimension de séparation sur la puce « Allergycard ». Nous allons ici travailler uniquement en puces greffées avec un polymère neutre et hydrophile, car ce traitement est indispensable pour éviter l'adsorption des protéines sur la paroi des canaux.

Les premiers essais de séparation de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline ont toutefois été réalisés en puce en verre, car nous ne disposions pas encore de puces en PDMS.

La séparation des deux protéines précédentes est présentée en Figure 16. Comme attendu, deux pics d' α -lactalbumine dus au multimarquage ont été observés. Il n'a pas été possible de séparer les deux isoformes de la β -lactoglobuline, qui ont des mobilités électrophorétiques très similaires à pH basique. Ce résultat avait également été observé en électrophorèse capillaire. Pour l'analyse en électrolyte borate, on peut remarquer comme attendu que lorsque la force ionique augmente, la hauteur des pics augmente, en raison d'un phénomène de préconcentration par amplification de champ électrique plus important. Les temps de migration augmentent également, en raison d'une diminution de la mobilité électrophorétique des composés avec la force ionique. La séparation en NC est moins satisfaisante mais reste tout à fait acceptable en termes d'efficacité et de résolution. Cependant, le pic d' α -lactalbumine de mobilité la plus élevée n'est pas observé. Ce phénomène pourrait être attribué à une capacité de chargement moindre de cet électrolyte.

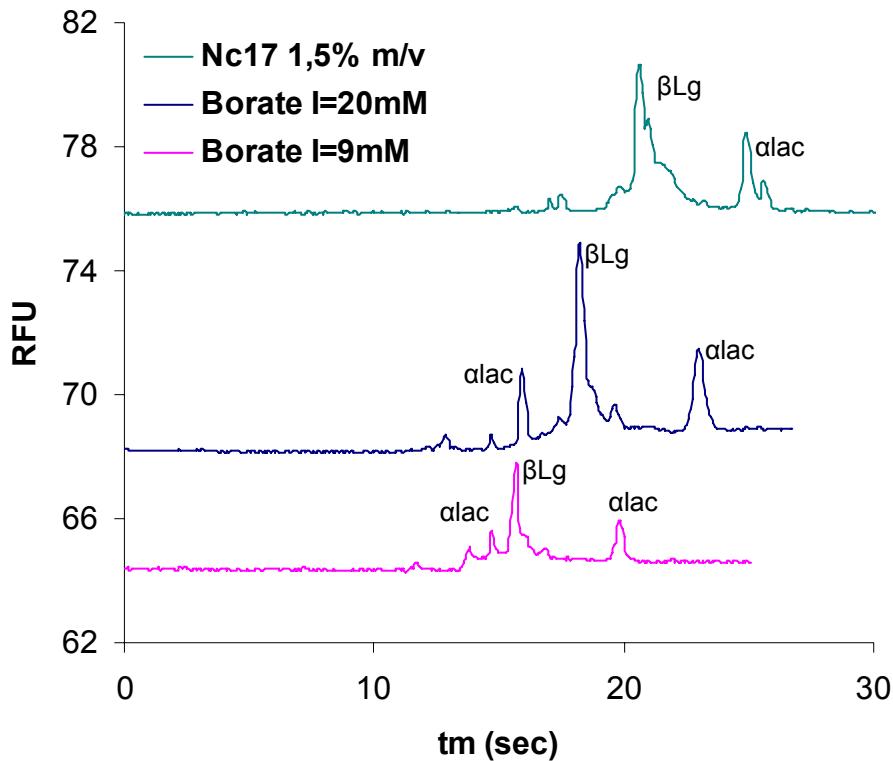


Figure 16 : séparation en ECZ de l’ α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline marquées au FITC en puce en verre greffé à l’HPC. E=500 V/cm, $l_{det}=2$ cm. pH des électrolytes : 9,2. Injection electrocinétique de type « pinched ». Concentration approximative en protéines : 0,4 mg/mL.

Pour pouvoir augmenter les champs électriques appliqués et mettre à profit la faible conductivité des NC, les deux protéines précédentes ont ensuite été séparées sur puce en PDMS, dont le canal de séparation mesure 2 cm au lieu de 8 pour les puces en verre. Les séparations obtenues en NC17 (pH 9,2, 1,5% m/v) sous différents champs électriques sont présentées en Figure 17. De nouveau, un seul pic est observé pour l’ α -lactalbumine, au lieu de deux en électrolyte borate. Comme attendu, on peut noter une diminution des temps de migration lorsque le champ électrique augmente, qui s’accompagne également d’une perte en résolution, en raison des temps de séparation extrêmement courts. En revanche, aucune perte significative d’efficacité n’est observée, ce confirme que l’effet Joule ne dégrade pas les séparations en NC, même à champ électrique élevé.

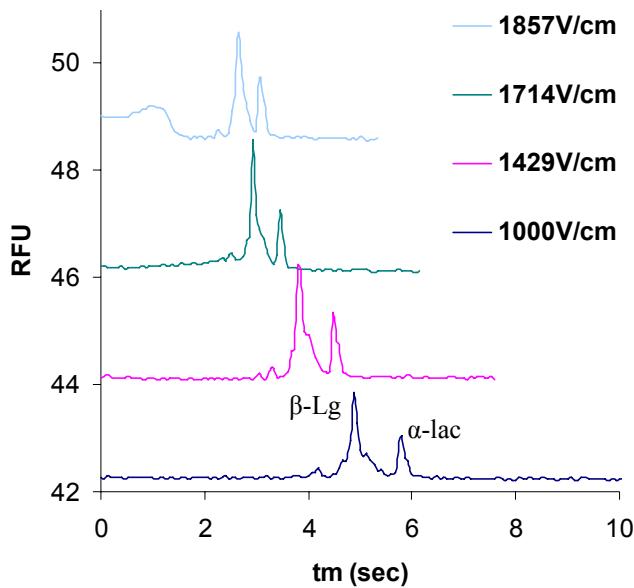


Figure 17 : séparation en ECZ de l’ α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline marquées au FITC en puce en PDMS greffée au PDMS-AGE. Electrolyte : NC17 pH 9,2 1,5% m/v. $l_{det}=1$ cm. Injection électrocinétique de type « pinched ». Concentration approximative en protéines : 0,4 mg/mL.

Après avoir étudié l'influence du champ électrique sur la séparation, l'influence du pH du NC utilisé comme électrolyte a également été étudiée. Pour ce faire, la BSA marquée à l'Alexa Fluor 488 a été ajoutée au mélange précédent. Les différentes fractions ont été utilisées à une concentration de 1,5% m/v. Les électrophérogrammes obtenus sont présentés en Figure 18. La résolution est un peu meilleure à pH basique et la sensibilité diminue fortement quand le pH diminue. Ceci est principalement dû à une diminution de l'intensité de fluorescence du FITC, mais pourrait également s'expliquer par une capacité de chargement moindre des NC ou par une diminution de la charge apparente des protéines lorsque leur pH diminue.

Comme les NC de pH les plus basiques ont conduit aux résultats les plus satisfaisants, des NC issus de Pharmalyte 8-10,5 ont également été utilisés pour la séparation des protéines du lait, mais ces derniers n'ont pas permis d'obtenir des séparations correctes, les deux pics principaux observés avec les NC provenant de Servalyt 4-9 n'étant alors plus séparés. Il semble donc que la capacité de chargement des NC issus d'ampholytes Pharmalyte 8-10,5 ne permette pas d'obtenir des séparations correctes. Ces résultats mettent ainsi en évidence la polyvalence de ce type d'électrolyte, car les fractions utilisées possédaient dans ce cas des pH et des conductivités similaires. Enfin, les NC préparés à partir de Servalyt 9-11 n'ont pas été testés ici en raison de leur trop grande conductivité.

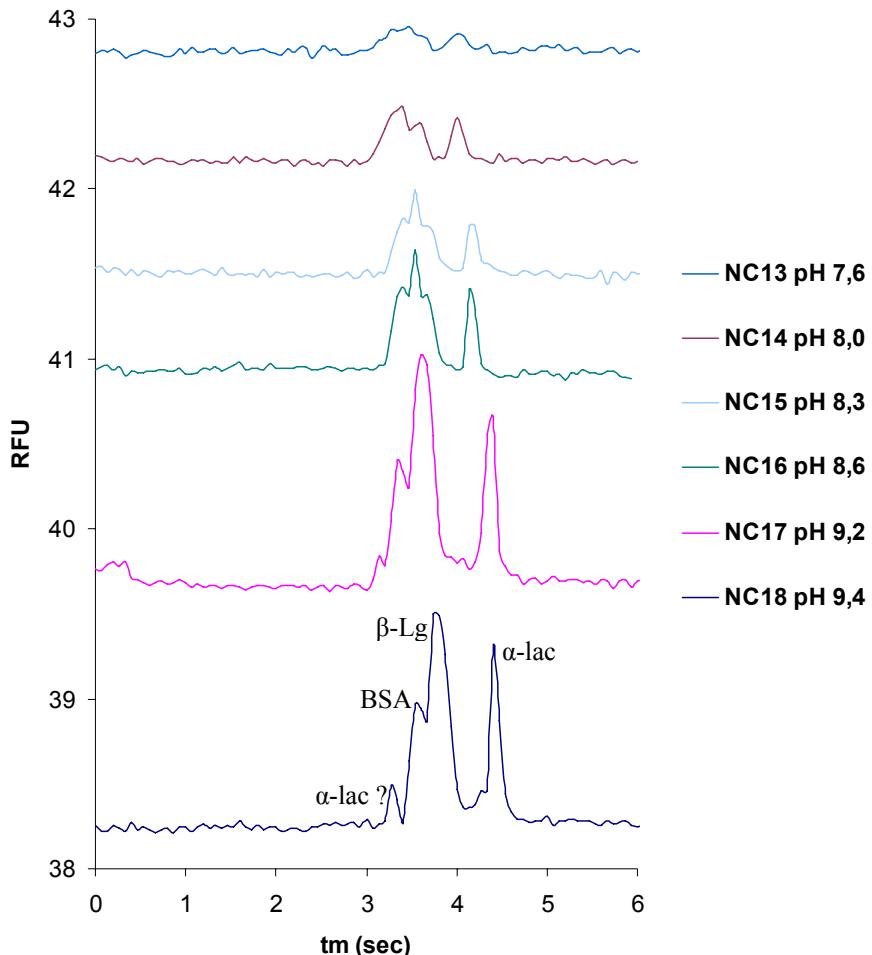


Figure 18 : Influence du pH des NC utilisés pour la séparation de l’ α -lactalbumine, de la β -lactoglobuline marquées au FITC et de la BSA marquée à l’Alexa Fluor 488 en puce en PDMS greffée au PDMA-AGE. $E=1429$ V/cm, $l_{det}=1$ cm. Concentration des NC : 1,5% m/v. Injection électrocinétique de type « pinched ». Concentration approximative en protéines : 0,5 mg/mL pour la BSA et la β -lactoglobuline, 0,2 mg/mL pour l’ α -lactalbumine.

Enfin, la concentration du NC utilisé comme électrolyte a été optimisée à son tour. Nous avons travaillé avec une fraction de pH 9,0 et un champ électrique de 1000 V/cm. Cette valeur un peu plus faible que celle utilisée précédemment a été choisie de façon à ne pas risquer d’observer d’effet Joule pour les concentrations les plus élevées en NC. Des expériences similaires ont toutefois été réalisées à un champ électrique de 1429 V/cm, et les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux présentés ici. La séparation de l’ α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline A sont présentées en Figure 19, et les performances de la séparation pour la β -lactoglobuline A en Figure 20. A titre de comparaison, les valeurs obtenues dans des conditions similaires mais en utilisant un électrolyte borate (pH 9,2, I=20 mM) et un champ électrique plus faible de 430 V/cm sont indiqués sur cette dernière figure par des traits roses.

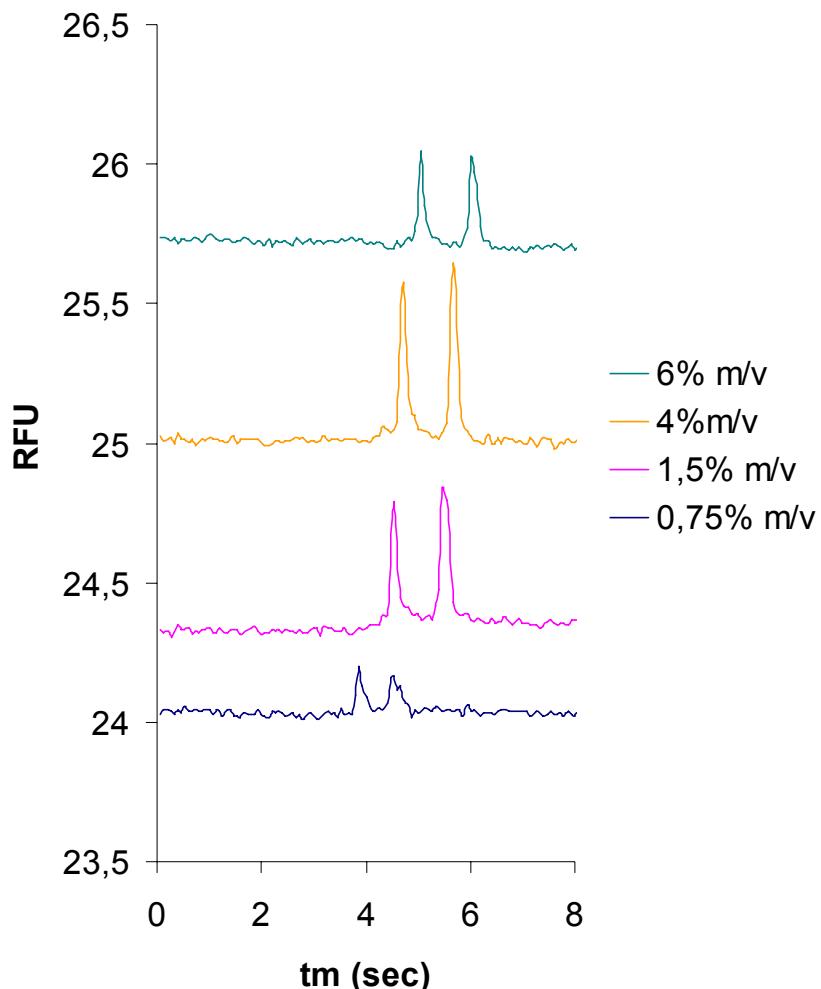


Figure 19: Influence de la concentration en NC sur la séparation en ECZ de l'α-lactalbumine et de la β-lactoglobuline marquées au FITC en puce en PDMS greffée au PDMS-AGE. Electrolyte : NC pH 9,0.

$l_{det}=1$ cm. Champ électrique appliqué : 1000 V /cm. Injection électrocinétique de type « pinched ».

Concentration approximative en protéines : 0,6 mg/mL pour l'α-lactalbumine et 0,2 mg/mL pour la β-lactoglobuline A.

Les temps de migration augmentent très légèrement avec la concentration en NC, car la mobilité des protéines diminue avec la force ionique de l'électrolyte, qui est proportionnelle à sa concentration. La résolution est quant à elle relativement stable, mais diminue très légèrement quand la concentration en NC devient trop faible. L'efficacité du pic d'α-lactalbumine présente une valeur stable pour des concentrations en NC supérieures à 1,5% m/v. Il faut tout de même remarquer que l'efficacité du pic de β-lactoglobuline A augmente globalement avec la concentration en NC. Tous ces phénomènes peuvent s'expliquer par un effet de préconcentration par amplification de champ électrique plus important lorsque la concentration en électrolyte augmente, conduisant également à une augmentation de la capacité de chargement.

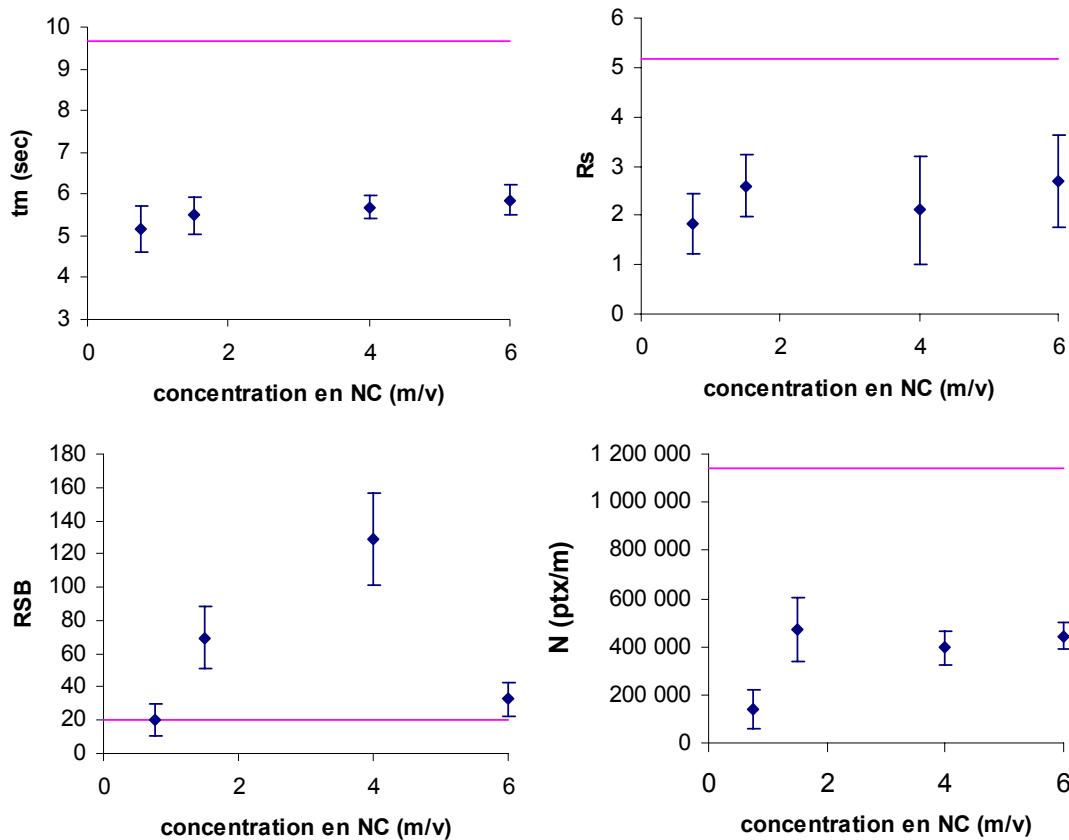


Figure 20: Influence de la concentration en NC sur les performances de la séparation en ECZ de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline A marquées au FITC en puce en PDMS greffée au PDMS-AGE. n=5. Les traits roses représentent les valeurs obtenues sur les mêmes puces et pour le même mélange, mais en utilisant un électrolyte borate (pH 9,2 I=20 mM) et un champ électrique de 430 V/cm. (A) temps de migration d' α -lactalbumine A. (B) rapport signal sur bruit du pic d' α -lactalbumine. (C) efficacité du pic d' α -lactalbumine (D) résolution des pics d' α -lactalbumine et de β -lactoglobuline A. Electrolyte : NC pH 9,0. Idet=1 cm. Champ électrique appliqué : 1000 V /cm. Injection electrocinétique de type « pinched ». Concentration approximative en protéines : 0,6 mg/mL pour l' α -lactalbumine et 0,2 mg :mL pour la β -lactoglobuline A.

Le rapport signal sur bruit présente quant à lui une valeur maximale pour une concentration en NC de 4% m/v. Il semble ainsi que pour des concentrations trop importantes en fractions d'ampholytes ces derniers induisent un bruit de fond conduisant à une perte en sensibilité. En effet, la diminution de la hauteur des pics n'est probablement pas due à la dispersion des analytes en raison de l'effet Joule car ce phénomène s'accompagnerait d'une diminution de l'efficacité. Ainsi, la concentration optimale pour la fraction étudiée se situe autour de 4% m/v.

Nous pouvons également remarquer que si l'utilisation de NC ne permet pas d'atteindre les efficacités et les résolutions rencontrées avec un électrolyte borate à 20 mM en force ionique, les rapports signal sur bruit sont plus élevés en NC, signe d'une meilleure sensibilité. Les temps de migrations observés en NC sont en outre plus faibles qu'en

électrolyte classique du fait de la possibilité d'appliquer des champs électriques plus élevés.

Toutefois, étant donnée la polyvalence des différentes fractions d'ampholytes, cette optimisation de la concentration de l'électrolyte devra idéalement être effectuée pour chacune des fractions utilisées.

4.5.3. Conclusions

La faisabilité de la séparation de protéines du lait par électrophorèse de zone en microsystème a donc été démontrée ici sur la séparation des deux principales protéines du petit lait. L'utilisation de NC comme électrolyte et de puces réalisées à façon et présentant un canal de séparation très court a permis de séparer ces protéines dans un temps très court grâce à l'application de champs électriques très élevés, les performances de séparation étant du même ordre de grandeur que celles obtenues en électrolytes classiques. Ces temps d'analyses de quelques secondes représenteront un atout certain pour la diminution des temps d'analyse sur le microsystème « Allergycard »

Le principal frein à la séparation de ces protéines reste toutefois leur détection, qui nécessite leur dérivation par un marqueur fluorescent. L'utilisation d'une lampe à mercure a en effet nécessité ici le recours à une dérivation covalente ayant conduit à un multimarquage de nombreuses protéines, alors que l'utilisation d'une source laser aurait peut-être permis d'utiliser un marqueur fluorescent non covalent, dont la sensibilité est limitée, mais qui n'induit pas à de multimarquages des analytes. Il faut toutefois remarquer que ce problème ne se posera normalement pas sur le système définitif « Allergycard », sur lesquelles les protéines seront détectées par voie électrochimique.

4.6. Références bibliographiques

- [1] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Peltre, G., Electrophoresis 2006, 27, 563-571.
- [2] Antonioli, P., Mendieta, M. E., Sebastiano, R., Citterio, A., Peltre, G., Busnel, J.-M., Descroix, S., Candiano, G., Righetti, P. G., J. Chromatogr. B 2006, 833, 19-25.
- [3] Busnel, J.-M., Electrophorèse en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes, Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2006.
- [4] Busnel, J.-M., Hennion, M.-C., Peltre, G., J. Chromatogr. B 2005, 818, 99-107.
- [5] Righetti, P. G., Simó, C., Sebastiano, R., Citterio, A., Electrophoresis 2007, 28, 3799-3810.
- [6] Konecsni, T., Kilar, F., J. Chromatogr. A 2004, 1051, 135-139.
- [7] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G., J. Chromatogr. A 2000, 874, 293-303.
- [8] Ban, E., Ryu, J.-C., Yoo, Y. S., Microchemical Journal 2001, 70, 211-217.

Chapitre 5:

Perspectives

5.1. Introduction

Au cours des travaux réalisés précédemment, nous avons développé séparément les deux dimensions de séparation qui seront mises en œuvre dans le microsystème « Allergycard » pour la séparation des protéines du lait, à savoir la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes. Nous avons pour cela travaillé avec des protéines du lactosérum, mais nous n'avons jusqu'à présent pas présenté de séparation d'échantillons réels de lait. En effet les caséines, protéines très hydrophobes, précipitent facilement et s'adsorbent très aisément sur les parois des capillaires. Ainsi, des stratégies particulières doivent être mises en œuvre pour augmenter la solubilité de ces protéines. En particulier, l'utilisation de tensioactifs peut pour cela se révéler intéressante

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Cette partie hydrophobe est constituée d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées. On distingue plusieurs classes de tensioactifs, en fonction la nature de leur tête polaire. Ils peuvent ainsi être anioniques, cationiques, zwitterioniques ou neutres. En solution aqueuse, ces tensioactifs auront tendance à s'adsorber aux interfaces, pour isoler leur partie hydrophobe de l'eau. Au dessus d'une certaine concentration, appelée concentration micellaire critique (CMC), les tensioactifs s'autoagrègeront sous forme de micelles, au sein desquelles les têtes polaires seront dirigées vers l'extérieur, leur partie hydrophobe étant alors isolée au sein de cette structure. La CMC dépend bien évidemment de la nature du tensioactif considéré, mais également des propriétés du milieu dans lequel il se trouve, telles que la force ionique, le pH, ou encore la présence ou non d'un solvant organique.

Comme nous avons pu le voir au cours du chapitre 1, les tensioactifs sont très utilisés en électrophorèse capillaire. Ils servent tout d'abord de phase pseudo-stationnaire en électrophorèse micellaire. Le SDS est quant à lui très utilisé en électrophorèse en gel pour permettre la séparation des protéines en fonction de leur masse. Il interagit en effet avec les protéines et uniformise leur densité de charge. Les tensioactifs se révèlent aussi très utiles pour greffer la surface des capillaires et modifier le flux électroosmotique [1]. Ils ont

également été utilisés pour améliorer la sensibilité de la détection de protéines et de peptides par fluorescence [2].

La solubilisation de protéines hydrophobes pour leur séparation en gel bidimensionnel requiert elle aussi l'utilisation de tensioactifs [3]. En particulier le CHAPS –tensioactif zwitterionique- est utilisé pour cela en présence d'urée et/ou de thiourée. Ces deux molécules sont des agents chaotropes ayant pour effet de modifier la structure des liaisons hydrogènes de la solution, diminuant alors l'énergie de contact entre les résidus hydrophobes des protéines et le reste de la solution. Le CHAPS interagit alors plus facilement avec ces résidus hydrophobes et facilite leur solubilisation. Il faut ici remarquer que la nature du tensioactif utilisé dépend notamment du type de séparation mis en œuvre. Ainsi dans le cas d'une séparation par focalisation isoélectrique, l'utilisation de tensioactifs ioniques est à proscrire et des tensioactifs neutres ou zwitterioniques sont alors utilisés.

Les deux tensioactifs qui vont être utilisés au cours de cette étude sont le CHAPS et le Tween 20. Leurs propriétés sont présentées dans le tableau suivant.

Tensioactif	Formule	Nature	M (g/mol)	CMC (mM)	Nombre d'aggrégation
CHAPS	 	Zwitterionique	614,9	4,2-6,3	10
Tween 20		Neutre	~1228	0,06	n.d.

Tableau 1 : caractéristiques des tensioactifs utilisés lors de cette étude. Les valeurs de CMC sont données à 25°C [4].

Nous allons donc aborder ici l'utilisation de tensioactifs pour permettre la séparation d'échantillons de lait en CIEF. Nous tenterons auparavant d'utiliser ces derniers pour améliorer la sensibilité de détection des protéines lorsque ces dernières sont marquées avec une sonde de fluorescence non covalente.

Enfin, bien que le couplage des deux dimensions de séparation n'ait pu être réalisé faute de temps, nous verrons que plusieurs schémas de microsystèmes ont été envisagés et microfabriqués pour effectuer la séparation bidimensionnelle de protéines.

5.2. Utilisation de tensioactifs pour améliorer les séparations en électrophorèse capillaire et en microsystèmes

5.2.1. Utilisation de tensioactifs pour améliorer la sensibilité.

Au cours des chapitres précédents, nous avons vu que la dérivation des protéines pour la détection par fluorescence était un problème essentiel pour leur analyse par électrophorèse en microsystèmes. En particulier, les réactions de dérivation covalente conduisent dans la plupart des cas à un multimarquage des protéines, et l'utilisation de sondes non covalentes n'est pas appropriée à la dérivation de protéines très hydrophiles. De plus, la sensibilité de cette dernière méthode n'est pas toujours suffisante, notamment en électrophorèse de zone. Ainsi nous allons étudier l'influence de la présence de tensioactifs sur la sensibilité obtenue en utilisant comme agent de dérivation le Sypro Orange. En effet, il a été démontré que la présence de tensioactifs à des concentrations sub-micellaires pouvait améliorer la détection de l'insuline et de peptides marqués au Sypro Orange [2]. Ce phénomène s'explique par une interaction des tensioactifs avec les analytes, ce qui augmente l'affinité de la sonde de fluorescence pour ces derniers. Ainsi, la nature du tensioactif à utiliser peut varier en fonction de la nature du peptide ou de la protéine à dériver.

Comme nous voulions rester le plus possible en conditions natives et donc ne pas modifier la charge apparente des protéines, nous nous sommes limités ici à l'utilisation d'un tensioactif zwitterionique : le CHAPS. Ce type de tensioactif présente également l'avantage de ne pas influer sur le courant lors de la séparation, ce qui évite l'apparition d'effet Joule en électrophorèse de zone et limite la compression du gradient de pH en focalisation isoélectrique.

5.2.1.1. Influence de la présence de CHAPS sur la détection de la BSA.

Avant d'étudier l'influence de la présence de tensioactif sur la détection des protéines du lait dont la séparation a déjà été effectuée par IEF en microsystèmes, nous avons travaillé sur une autre protéine du lait souvent utilisée comme modèle : la BSA. Les expériences ont été réalisées en utilisant le Tween 20 ou le CHAPS. Les résultats obtenus avec ces deux tensioactifs présentant les mêmes tendances, nous ne présenterons ici que ceux ayant été obtenus avec le CHAPS.

D'un point de vue expérimental, l'influence de la concentration en CHAPS a été évaluée en mesurant le signal de fluorescence d'une solution de protéine et de Sypro Orange, présentant des concentrations croissantes en tensioactif. Afin de nous placer dans des conditions similaires à celles utilisées lors de séparations, ces mesures ont été effectuées en remplissant une puce utilisée habituellement en IEF et en mesurant le signal de fluorescence sur un microscope inversé disposant d'une lampe à mercure. Le CHAPS a été utilisé à des concentrations de 0 à 16 mM, sa CMC rapportée dans la littérature étant de 4-6 mM [4]. La concentration en Sypro Orange a été maintenue à 30x, par analogie avec les expériences d'IEF déjà réalisées. La BSA a quant à elle été utilisée à une concentration relativement élevée de 1,5 mg/mL (23 µM), pour se rapprocher des concentrations réelles en protéines dans les zones focalisées lors des expériences d'IEF. En effet, si l'on considère le cas des expériences d'IEF réalisées précédemment au laboratoire, les protéines étaient focalisées sur une longueur approximative de 2 mm alors que la solution initiale remplissait tout le canal de 7,6 cm de long. Ainsi, cette concentration de 1,5 mg/mL pour une protéine focalisée dans sa zone correspondrait à l'injection dans le canal d'IEF d'une solution à seulement 0,04 mg/mL, soit 0,6 µM pour la BSA.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées en milieu purement aqueux ou contenant 30% de glycérol, de façon à se rapprocher des conditions réelles d'IEF. L'influence de la concentration en CHAPS sur le signal de fluorescence du Sypro Orange en milieu purement aqueux, en absence et présence de BSA est présentée en Figure 1A. En absence de protéine, deux régimes sont observés : pour des concentrations inférieures à 5 mM en CHAPS, le signal de fluorescence reste relativement constant puis augmente assez fortement pour des concentrations supérieures. Il est donc raisonnable de penser que cette concentration d'environ 5 mM correspond à la CMC du CHAPS en présence de Sypro Orange, ce dernier interagissant alors avec le cœur hydrophobe des micelles, d'où une

augmentation de son signal de fluorescence. En présence de BSA le signal de fluorescence augmente nettement, en raison d'une interaction du Sypro Orange et de la protéine. Cependant, une concentration trop importante en CHAPS est défavorable à une détection sensible, le bruit de fond induit par les micelles augmentant. Ceci est illustré par la Figure 1A', qui représente la différence entre les intensités de fluorescence en présence et absence de protéine, ce qui permet d'évaluer la hauteur d'éventuels pics de BSA, et donc la sensibilité, en fonction de la concentration en tensioactif. Cette différence est maximale pour une concentration égale à la CMC du tensioactif et permettrait d'obtenir une amélioration de la sensibilité d'environ 50%, cette différence passant de 4,4 en absence de tensioactif à 6,5 quand le CHAPS est introduit à une concentration proche de sa CMC.

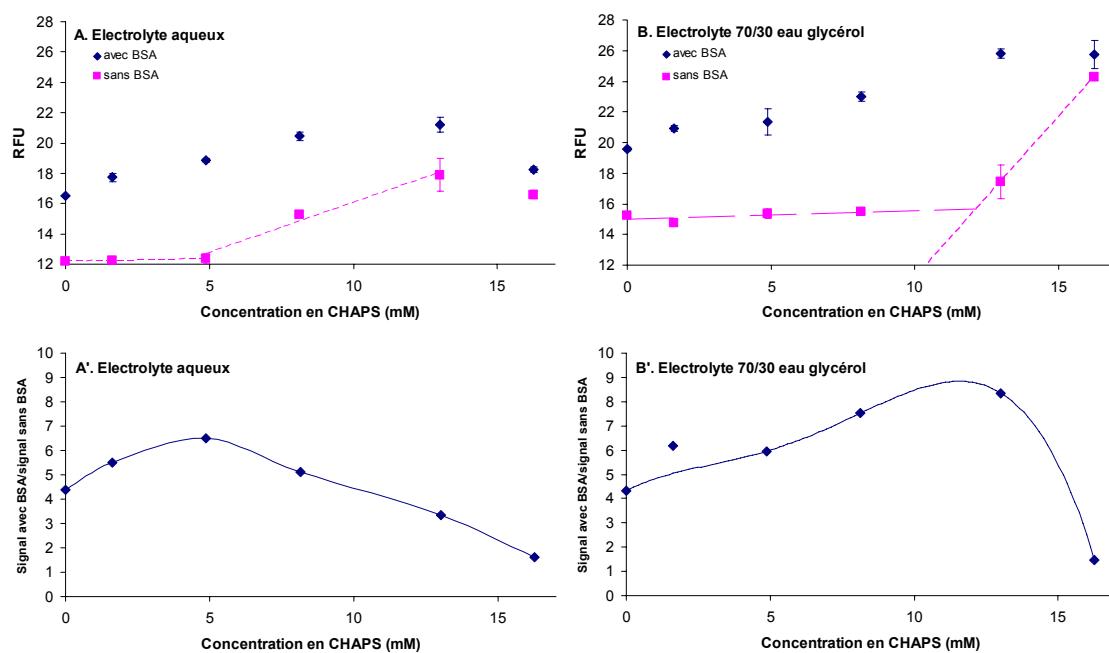


Figure 1 : influence de la présence de CHAPS sur l'intensité de fluorescence de solutions de BSA marquée au Sypro Orange. n=3. Concentration en BSA : 1,5 mg/mL. Concentration en Sypro Orange : 30x. n=3. **(A)** Electrolyte purement aqueux. **(B)** Electrolyte contenant 30% v/v de glycérol.

Une série d'expériences analogues a été réalisée en introduisant 30% v/v de glycérol dans l'électrolyte de séparation. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 1B et B'. Même si ces derniers sont relativement similaires à ceux obtenus en milieu purement aqueux, on peut tout de même remarquer que la rupture de pente de la courbe représentant l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en CHAPS intervient en absence de protéine pour une concentration plus importante, de l'ordre de 12 mM. Ceci indique comme attendu que la CMC du CHAPS est augmentée en présence de glycérol. La présence de glycérol augmente en effet l'hydrophobie du milieu, ce qui a pour effet de

diminuer l'énergie d'interaction entre les molécules de CHAPS et l'électrolyte et donc de retarder l'apparition des micelles. Ces molécules de tensioactif auront donc moins tendance à s'agréger en micelles pour isoler leurs chaînes hydrophobes du milieu dans lequel elles se trouvent. De plus, si la présence de glycérol n'entraîne pas d'amélioration de la sensibilité en absence de tensioactif, dès que du CHAPS est ajouté à l'électrolyte de séparation les rapports des intensités de fluorescence en présence et absence de BSA sont plus importants qu'en milieu purement aqueux. Ainsi une concentration en CHAPS d'environ 12 mM permet ici de doubler ce rapport.

Il semble donc bien que l'ajout d'une concentration en CHAPS voisine de sa CMC permette d'améliorer la sensibilité de la détection de la BSA par une dérivation non covalente au Sypro Orange : grâce à une interaction du tensioactif avec cette protéine l'affinité du Sypro Orange pour cette dernière augmente. La concentration de tensioactif ne doit cependant pas dépasser sa CMC, la sonde de fluorescence interagissant plutôt avec l'intérieur des micelles qu'avec la protéine, d'où une augmentation du bruit de fond. L'amélioration de la sensibilité reste toutefois relativement limitée : la BSA étant relativement hydrophobe, le Sypro Orange interagira en effet relativement facilement avec elle, même en l'absence de tensioactif. Il reste donc à confirmer les résultats obtenus en étudiant l'influence de la présence de tensioactif avec des protéines moins hydrophobes que la BSA.

5.2.1.2. Influence de la présence de CHAPS sur la détection de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline A.

L'étude de l'influence de la présence de CHAPS sur le signal de fluorescence généré par l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline A marquées au Sypro Orange a été réalisée uniquement avec un milieu contenant 30% v/v de glycérol. Les protéines ont été utilisées ici à une concentration finale de 5 mg/mL, soit 357 μ M pour l' α -lactalbumine et 277 μ M pour la β -lactoglobuline A, de façon à se rapprocher des concentrations locales rencontrées précédemment en IEF. Ainsi ces concentrations pour une protéine focalisée correspondraient à l'injection en IEF d'une solution à 0,13 mg/mL, soit 7 μ M pour la β -lactoglobuline A et 9 μ M pour l' α -lactalbumine.

Les résultats obtenus pour l' α -lactalbumine sont présentés en Figure 2. Le profil d'intensité de fluorescence est similaire à celui obtenu avec la BSA, bien que la différence d'intensité de fluorescence soit plus faible. Ceci peut s'expliquer facilement par le fait

que l'hydrophobie de l' α -lactalbumine est évaluée à -0,169 alors que celle de la BSA est de l'ordre de -0,429, ces hydrophobies ayant été calculées sur le site www.expasy.org. En revanche, le gain en hauteur de pic atteint un facteur 4, au lieu d'un facteur 2 pour la BSA. Ainsi, l'utilisation d'un tensioactif pour améliorer la sensibilité de la détection paraît plus intéressante dans le cas où l'hydrophobie de la protéine à détecter est plus faible. Dans le cas où la protéine d'intérêt est déjà très hydrophobe, le Sypro Orange interagit facilement avec cette dernière même en l'absence de tensioactif.

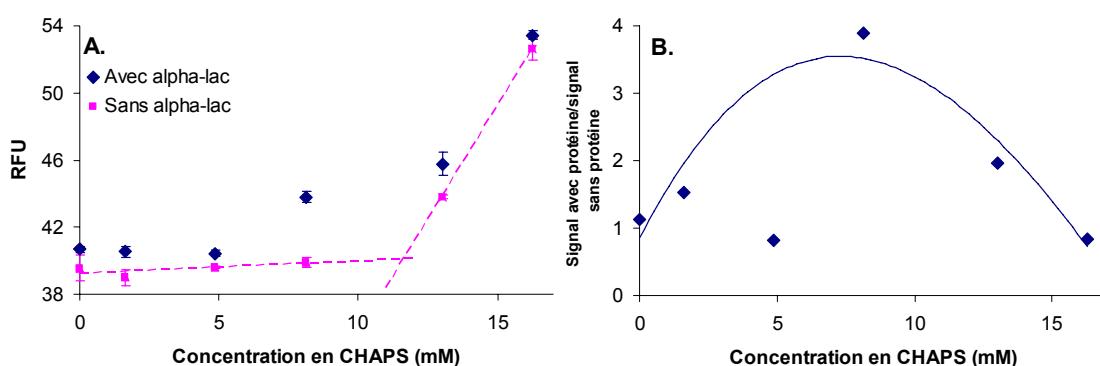


Figure 2 : influence de la présence de CHAPS sur l'intensité de fluorescence de solutions d' α -lactalbumine marquée au Sypro Orange. n=3. Concentration en α -lactalbumine : 5 mg/mL. Concentration en Sypro Orange : 30x. n=3. Electrolyte contenant 30% v/v de glycérol.

Ce résultat a ensuite été confirmé en focalisation isoélectrique comme illustré en Figure 3 : l' α -lactalbumine a été focalisée dans les conditions optimisées au cours du chapitre 3, en ajoutant du CHAPS à l'électrolyte de séparation. Bien que le niveau de la ligne de base augmente avec la concentration en CHAPS, la hauteur du pic de protéine et le rapport signal sur bruit augmentent eux aussi, mettant en évidence l'apport d'un tensioactif pour augmenter la sensibilité de la détection de protéines marquées au Sypro Orange.

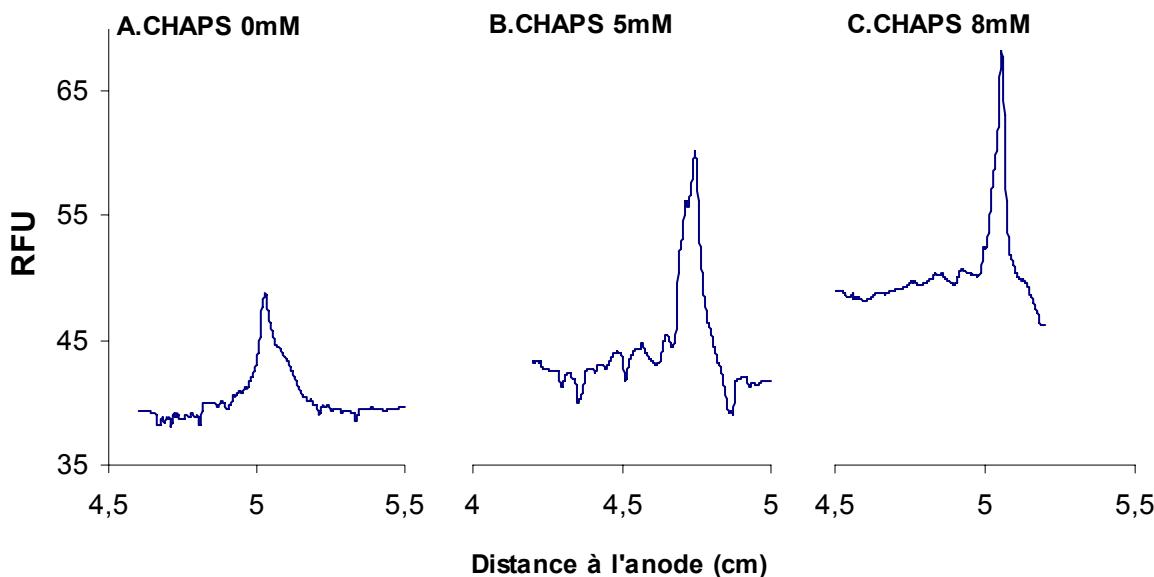


Figure 3: influence de la présence de CHAPS sur la focalisation isoélectrique de l’ α -lactalbumine.
Concentration en protéine : 12 μ M. Concentration en Sypro Orange 30x. Ampholytes : Servalyt 4-9 3% v/v.
Anolyte : acide phosphorique 90 mM. Catholyte : soude 20 mM. L’échantillon et les électrolytes contiennent tous 30% v/v de glycerol. Détection de fluorescence : λ_{exc} :460-490 nm. Champ électrique : 750 V/cm.
Temps de focalisation : 6min. Concentration en CHAPS : (A) 0 mM. (B) 5 mM. (C) 8 mM.

L’influence de la présence de CHAPS sur le signal de fluorescence de la β -lactoglobuline A a alors été étudiée. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 4. Excepté pour une concentration en CHAPS de 13 mM dont la validité peut être discutée, aucune différence notable du signal de fluorescence n’a été observée entre la solution de protéine et celle ne contenant que le Sypro Orange. Ceci indique donc que quelle que soit la concentration en tensioactif ajoutée dans le milieu, le Sypro Orange n’interagit pas ou très peu avec cette protéine. Ceci peut se comprendre dans la mesure où la β -lactoglobuline A est beaucoup moins hydrophobe que les deux protéines testées précédemment (son hydrophobie calculée est de -0,01). Cependant, ce résultat est contradictoire avec le fait que nous ayons pu détecter la β -lactoglobuline A par IEF avec un marquage au Sypro Orange.

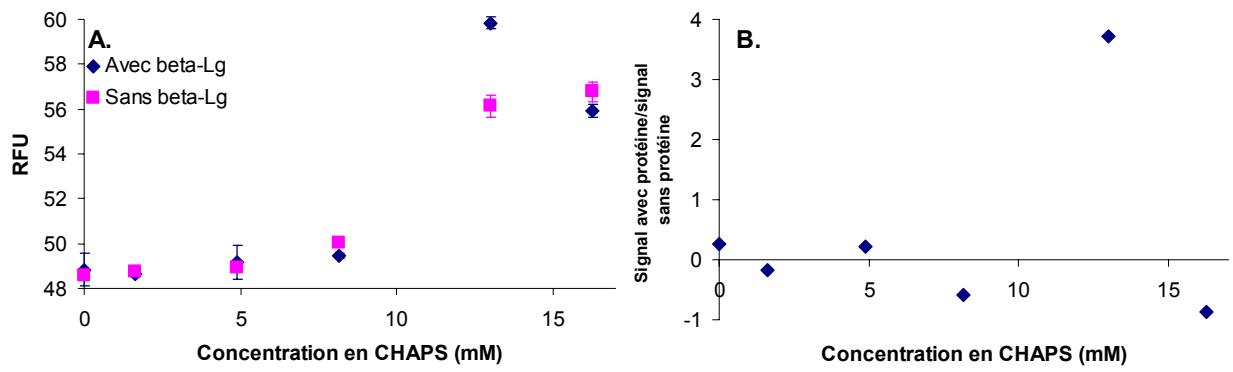


Figure 4: influence de la présence de CHAPS sur l'intensité de fluorescence de solutions d'β-lactoglobuline marquée au Sypro Orange. n=3. Concentration en β-lactoglobuline : 5 mg/mL. Concentration en Sypro Orange : 30x. n=3. Electrolyte contenant 30% v/v de glycérol.

Toutefois, lors des expériences d'IEF la concentration réelle en protéine était de l'ordre de 1,5 mM, en considérant que cette dernière était introduite à une concentration de 40 µM dans le canal d'IEF (de 7,6 cm de longueur) et qu'elle s'était focalisée sur une distance de 2 mm. Pour vérifier l'importance de la concentration en β-lactoglobuline A sur le signal de fluorescence, nous avons alors augmenté la concentration de cette dernière à 10,5 mg/mL, soit 583 µM. Dans ce cas, le signal de fluorescence était de 48,1±0,1 en présence de protéine contre 47,1±0,2 lorsqu'elle n'était pas présente dans l'électrolyte. La β-lactoglobuline A doit donc être présente en concentration suffisante pour pouvoir être détectée au Sypro Orange. Pour travailler en conditions plus proches de la réalité, la β-lactoglobuline A a ensuite été analysée en IEF en absence et présence de CHAPS, dans les conditions optimisées au chapitre 3. Contrairement à l'α-lactalbumine, la présence de tensioactif a conduit à une perte très importante en sensibilité, la β-lactoglobuline A n'étant plus détectable dès que la concentration en CHAPS dépassait 5 mM dans l'électrolyte de séparation.

En conclusion, l'utilisation de tensioactif en concentration submicellaire permet d'améliorer la sensibilité de la réaction de dérivation au Sypro Orange, mais seulement dans le cas où les protéines étudiées sont suffisamment hydrophobes. Ainsi, bien que cette solution ait pu paraître prometteuse pour l'analyse de l'α-lactalbumine elle n'est absolument pas universelle, et ses effets se sont même révélés néfastes pour la détection de la β-lactoglobuline A. Elle ne pourra donc pas être utilisée pour l'analyse de l'ensemble des protéines du lait sur le microsystème « Allergycard ». L'utilisation de Sypro Orange pour le marquage non covalent des protéines pourra tout de même être envisagée sans

tensioactif, dans la mesure où ces protéines seront dans un premier temps concentrées en IEF avant d'être analysées par électrophorèse de zone.

5.2.2. Utilisation de tensioactifs pour améliorer la résolution.

Application à la séparation des protéines du lait écrémé.

L'utilisation de tensioactif pour améliorer la résolution des séparations électrophorétiques a ensuite été étudiée.

En réalité, l'influence de la présence de CHAPS ou de Tween 20 –tensioactif neutre- pour améliorer les séparations en électrophorèse de zone avait été étudiée par Jean-Marc Busnel à la fin de son doctorat [5], et ces deux tensioactifs avaient conduit à des améliorations notables de la résolution pour des séparations de protéines en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes à pH acide. Cependant, les concentrations de tensioactifs utilisées alors étaient bien supérieures à la CMC. Nous avons voulu ici travailler à des concentrations en tensioactif relativement faibles pour limiter la dénaturation des protéines. Nous nous sommes également placés à pH basique et non pas à pH acide. Nous avons ainsi séparé un mélange d' α -lactalbumine et de β -lactoglobuline en électrolyte borate à pH 9,2 en présence ou non de CHAPS. Les résultats obtenus ne sont pas présentés ici car, dans les conditions expérimentales utilisées, la présence de tensioactif n'a pas permis d'améliorer la résolution. Toutefois ces expériences mériteraient d'être approfondies, ce qui n'a pas été réalisé ici faute de temps.

Dans un second temps, des échantillons de lait écrémé ont été analysés en CIEF. A notre connaissance, toutes les publications décrivant la séparation de protéines d'échantillons de lait par électrophorèse capillaire utilisent l'électrophorèse de zone [6-10]. La méthode classique consiste à dénaturer les protéines en réduisant les ponts disulfures au dithiothréitol, puis à les analyser dans un capillaire en silice vierge avec un électrolyte à pH acide (typiquement un tampon citrate pH 2,5). Ce dernier contient également de l'urée à forte concentration (6 ou 8M) et un polymère dérivé de cellulose pour réaliser un greffage dynamique du capillaire. Herrero-Martinez *et al.* ont quant à eux travaillé avec un électrolyte isoélectrique, l'acide imminiodiacétique [10]. Dans ce cas, aucune réduction au dithiothréitol n'a été utilisée, mais du Tween 20 a été ajouté aux échantillons. Cette

méthode a ainsi permis de détecter la présence de lait de vache dans des fromages au lait de chèvre ou de brebis.

Pour solubiliser les caséines, les premières expériences ont été réalisées en dissolvant les échantillons dans un mélange TUC (thiourea 2 M –urée 7 M -CHAPS 81 mM). En effet, ce mélange est couramment utilisé en électrophorèse en gel pour solubiliser les protéines hydrophobes [3, 11] et a donné de bons résultats pour la séparation d'échantillons de lait en gel bidimensionnel [12]. En revanche, les protéines n'ont pas été réduites au DTT pour ne pas les dénaturer de manière trop importante. Les résultats obtenus ne sont pas présentés ici : le mélange thiourea-urée absorbant fortement en UV, il n'a en effet pas été possible de détecter les protéines, même en utilisant ces deux molécules à des concentrations plus faibles.

Les échantillons de lait ont ensuite été analysés en présence d'un tensioactif neutre, le Tween 20, à des concentrations variant entre 0,4 et 4 mM, la concentration habituellement utilisée en électrophorèse en gel étant de 0,8 mM (0,1% v/v). L'influence de la présence de CHAPS a également été étudiée, mais les résultats obtenus étant plutôt moins satisfaisants ils ne sont pas présentés ici. Les échantillons de lait ont été obtenus par dissolution de lait écrémé en poudre (Régilait). Ce dernier a été préparé à une concentration finale de 0,5% m/v pour que les concentrations en α -lactalbumine et en β -lactoglobuline soient similaires à celles utilisées au cours du chapitre 2 et pour que les concentrations en caséines ne soient pas trop importantes. Les concentrations attendues pour les différentes protéines du lait sont présentées en Tableau 2.

Protéine	% des protéines du lait total [13]	Concentration dans une solution de lait à 0,5% m/v (μ g/mL)
Caséine α s1	32	560
Caséine α s2	10	180
Caséine β	28	490
Caséine κ	10	180
α -lactalbumine	5	90
β -lactoglobuline	10	180
BSA	3	50

Tableau 2 : concentrations attendues dans une solution de lait écrémé à 0,5% m/v. Les calculs ont été effectués en considérant que la poudre de lait utilisée contenait 35% m/m de protéines.

Pour commencer, un mélange des protéines majoritaires du petit lait - α -lactalbumine et β -lactoglobuline A et B- ont été focalisées en utilisant les conditions optimisées par Aude Morin lors de son stage de Master au laboratoire. Pour l'analyse d'échantillons de lait elle avait ainsi tout d'abord utilisé un capillaire en silice vierge et 30% de glycérol dans l'électrolyte de séparation, mais les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants notamment en termes de résolution. Elle avait finalement opté pour un capillaire greffé HPC, pour limiter au maximum l'adsorption des caséines sur les parois du capillaire, la seule présence de glycérol dans l'électrolyte de séparation ne suffisant pas à éviter ce phénomène. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 5. Si la présence de Tween 20 n'a pas d'influence sur la résolution des deux pics de β -lactoglobuline, on note une nette amélioration de l'efficacité du pic d' α -lactalbumine. En effet, en l'absence de tensioactif ce dernier comporte une large trainée arrière qui tend à disparaître lorsque la concentration en Tween 20 augmente. Cette action positive du Tween 20 peut être attribuée à une meilleure solubilisation de l' α -lactalbumine, qui semble avoir tendance à s'adsorber sur les parois du capillaire malgré la présence du greffage HPC.

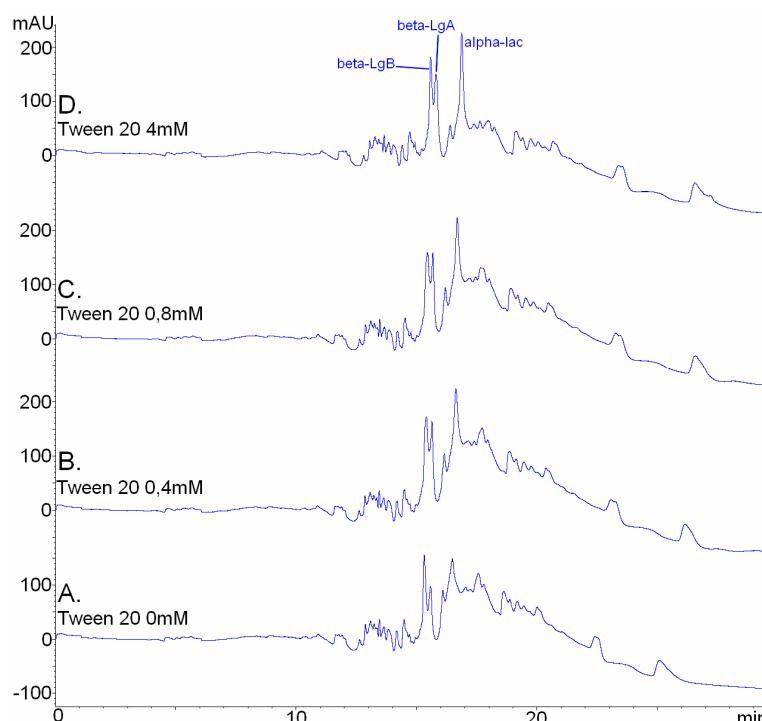


Figure 5: Influence de la présence de Tween 20 sur la séparation des protéines du petit lait par CIEF.
Capillaire greffé HPC L=40 cm, l=31,5 cm d_i=50 µm. Concentration en protéines : α -lactalbumine 45 µg/mL, β -lactoglobuline A et B : 85 µg/mL chacune. Ampholytes : Ampholine 3,5-9,5 3% v/v. Anolyte : acide phosphorique 90 mM. Catholyte : soude 20 mM. Focalisation : 10 kV/6 min. Mobilisation hydrodynamique sous 10 mbar. Détection UV à 214 nm. Les différents pics ont été attribués par injection individuelle des différentes protéines. Concentration en Tween 20: **A.** 0 mM. **B.** 0,4 mM (0,05% v/v). **C.** 0,8 mM (0,1% v/v). **D.** 4 mM (0,5% v/v).

L'influence de la présence de tensioactif a ensuite été étudiée pour des échantillons de lait écrémé. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 6. En l'absence de tensioactif (Figure 6A) de nombreux pics extrêmement fins sont observés, ces derniers correspondant probablement à la précipitation des caséines. En ajoutant du tensioactif dans l'électrolyte de séparation ces pics parasites tendent à disparaître, signe que les protéines ont moins tendance à précipiter. Ensuite, l'ajout de Tween 20 à 4 mM permet de distinguer le pic d' α -lactalbumine, ce qui n'était pas le cas pour les concentrations inférieures. Des essais d'augmentation de la concentration en Tween 20 ont alors été réalisés, mais sans observer d'amélioration de la séparation.

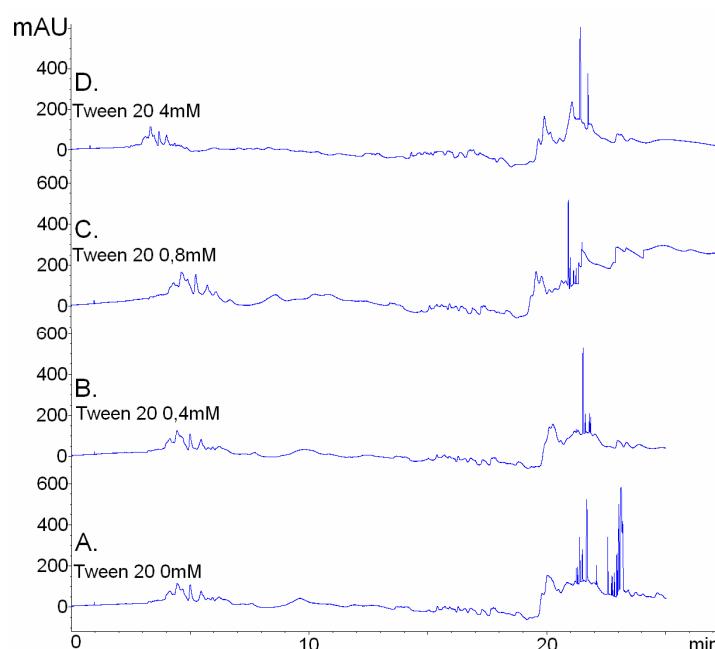


Figure 6: Influence de la concentration en Tween 20 sur la séparation d'échantillons de lait écrémé par CIEF. Concentration en lait 0,5% m/v. Capillaire greffé HPC L=40 cm, l=31,5 cm d_i=50 µm. Ampholytes : Ampholine 3,5-9,5 3% v/v. Anolyte : acide phosphorique 90 mM. Catholyte : soude 20 mM. Focalisation : 10 kV/6 min. Mobilisation hydrodynamique sous 10 mbar. Détection UV à 214 nm. Concentration en Tween 20: **A.** 0 mM. **B.** 0,4 mM (0,05% v/v). **C.** 0,8 mM (0,1% v/v). **D.** 4 mM (0,4% v/v).

Ainsi l'ajout de Tween 20 permet d'améliorer notablement l'analyse par CIEF d'échantillons de lait écrémé. En effet, l'interaction du tensioactif avec les protéines permet d'améliorer leur solubilité et donc de limiter leur précipitation et leur adsorption sur les parois du capillaire, d'où une augmentation de l'efficacité de séparation. Cette solution pourra bien évidemment être mise en œuvre dans le microsystème « Allergycard », sous réserve que l'utilisation de tensioactifs soit compatible avec le type de détection utilisée, ce qui ne sera pas le cas si les protéines sont marquées avec une sonde de fluorescence non covalente. Cependant le système final devant comporter une détection électrochimique, le problème ne devrait pas se poser.

5.3. Couplage des deux dimensions de séparation

La dernière partie de cette thèse a consisté à concevoir le couplage des deux dimensions de séparation du microsystème « Allergycard ».

Pour des raisons de simplicité, ce dernier sera réalisé en utilisant un seul électrolyte pour la deuxième dimension de séparation, et non pas plusieurs fractions d'ampholytes porteurs qui auraient été focalisés pendant l'étape d'IEF dans un canal annexe comme il était prévu au départ de ce projet.

Le matériau choisi pour réaliser les puces est le PDMS, ce dernier permettant d'intégrer des valves au microsystème pour pouvoir isoler les différents canaux. Ces valves ont été décrites par Unger *et al.* [14] et sont représentées en Figure 7. Chaque valve est constituée d'un canal qui est séparé du canal à fermer par une fine couche de PDMS. Le canal de la valve peut être pressurisé, ce qui a pour effet de fermer le canal de séparation situé au dessous en écrasant la couche de PDMS séparant ces deux canaux.

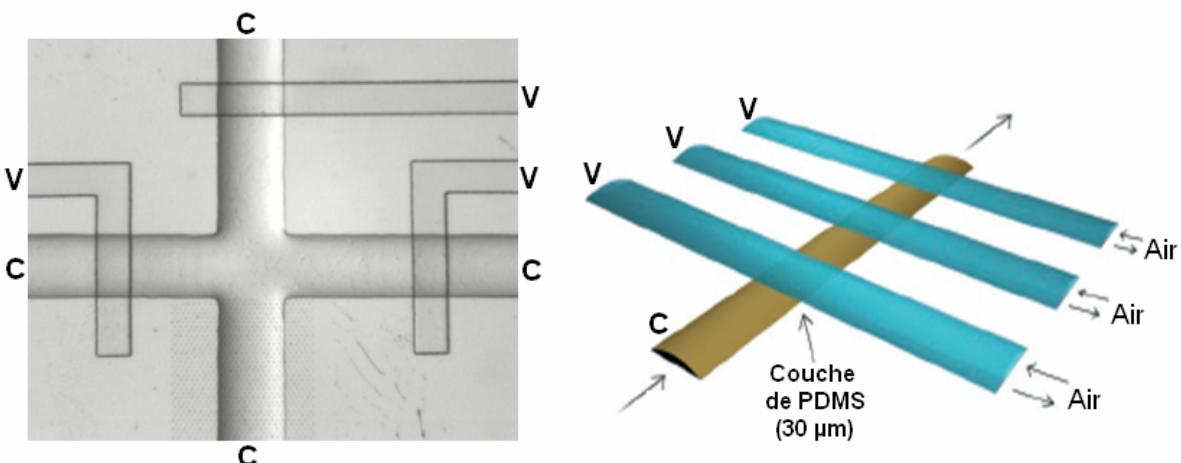


Figure 7 : Photographie et représentation schématique de valves intégrées à des microsystèmes en PDMS. Adapté de [14]. C : canal de séparation. V : valve.

Le premier schéma de puce envisagé est présenté en Figure 8. Le microsystème comporte deux systèmes de canaux, l'un étant dédié à l'IEF (en saumon) et l'autre à l'électrophorèse de zone (en bleu).

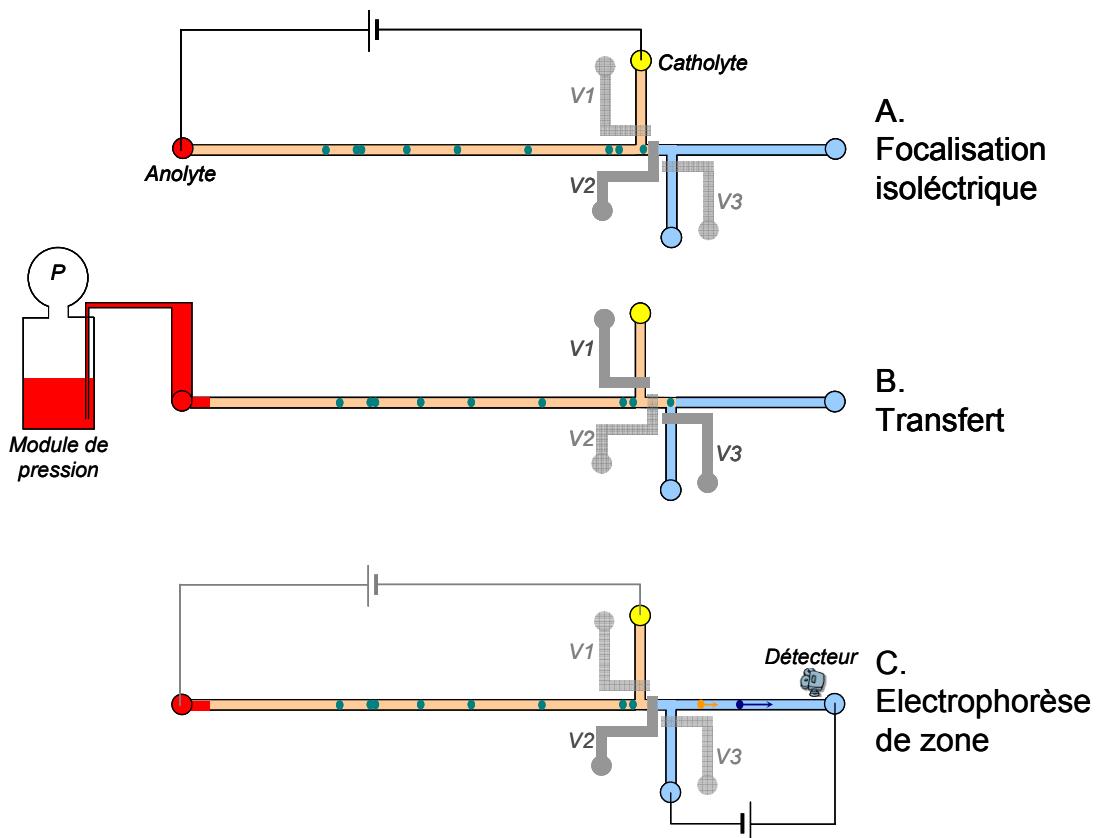


Figure 8 : schéma de principe du microsystème bidimensionnel « Allergycard ». Les valves permettant d'isoler les différents canaux de séparation sont représentées en gris clair lorsqu'elles sont ouvertes et gris plus foncé lorsqu'elles sont fermées. Longueur des canaux de séparation : canal d'IEF (en saumon) : 4 cm, canal d'électrophorèse de zone : 1,5 cm. Largeur et hauteur des canaux : 50 et 20 μm .

La séparation sera réalisée en plusieurs étapes. Les protéines seront tout d'abord focalisées dans la première série de canaux, représentée en saumon sur la Figure 8A, la valve V2 séparant les canaux d'IEF des canaux d'électrophorèse de zone étant fermée. Une fois les analytes (représentés en vert) focalisés, l'application de la tension de séparation sera interrompue. Une première zone du canal d'IEF sera ensuite introduite dans la zone d'injection pour l'électrophorèse de zone, grâce à un contrôleur de pression de type MFCS (Fluigent) permettant d'appliquer des pressions de manière précise au niveau des puits d'entrée du microsystème. Pour cela la valve V2 sera ouverte et les valves V1 et V3 seront fermées. Cette étape de transfert terminée, les analytes introduits dans le deuxième système de canaux seront séparés par électrophorèse de zone. Pendant ce temps, la tension de focalisation pourra être maintenue pour éviter la diffusion des analytes restés dans le canal d'IEF, et pour refocaliser ceux ayant éventuellement diffusé pendant l'étape de transfert.

Avec ce schéma de puce, nous pouvons estimer le temps nécessaire à une analyse à environ 55 minutes. Ce temps a été obtenu en considérant que l'étape d'IEF dure 5

minutes, que la longueur des zones transférées du canal d'IEF vers celui d'électrophorèse de zone devrait correspondre à 1% de la longueur du canal d'électrophorèse de zone -soit 300 zones de 150 µm de long- et que les séparations par électrophorèse de zone durent chacune environ 10 secondes, injection de la zone à analyser comprise. La longueur des zones transférées vers la seconde dimension de séparation devra toutefois être optimisée : plus courte sera cette longueur meilleure sera le pouvoir résolutif, mais plus long sera le temps global d'analyse. Cette longueur de zone devra en outre être suffisamment faible pour ne pas dépasser la capacité de chargement de l'électrolyte de séparation, ce qui conduirait à des pertes en résolution. Ce temps d'analyse de presque une heure peut paraître relativement long pour une analyse en microsystèmes mais reste tout à fait raisonnable pour une analyse bidimensionnelle.

D'un point de vue pratique, plusieurs problèmes seront à résoudre. Tout d'abord, la surface des canaux devra être greffée pour éviter l'adsorption des analytes et pour éliminer le flux electroosmotique. Ceci sera probablement réalisé par un greffage semi-permanent au PDMA-AGE, qui avait fait ses preuves lors du développement de l'IEF en microsystèmes.

Ensuite, le gradient de pH devra être ajusté pour éviter que des analytes ne focalisent dans la partie de canal situé au dessus de la valve V1. Il faudra pour cela utiliser un gradient de pH de gamme plus large que celle des points isoélectriques des protéines d'intérêt ou utiliser un additif tel que du TEMED (N,N,N',N'-tetramethyléthylenediamine), servant habituellement à empêcher les analytes de se focaliser trop près de la cathode et à élargir le gradient du pH [15].

Pour la séparation par électrophorèse de zone, le pH de l'électrolyte sera ajusté en fonction des besoins. Cependant dans le cas d'un échantillon de lait, dont la majorité des protéines ont un point isoélectrique situé autour de 5, il sera peut-être plus facile de travailler à pH basique. Les protéines seront ainsi à un pH suffisamment éloigné de leur point isoélectrique pour pouvoir acquérir une charge suffisante. Elles pourront ainsi être séparées plus rapidement par électrophorèse de zone. Cependant, un électrolyte de pH environ 2 pourra également être utilisé. En revanche, s'il existe un flux electroosmotique cathodique résiduel, il sera plus simple de travailler à pH basique pour la seconde dimension, les protéines focalisées dans le canal d'IEF devant alors être mobilisées dans le sens du flux electroosmotique. Le choix du pH de l'électrolyte sera également crucial

pour obtenir une deuxième dimension qui soit la plus rapide possible, tout en conservant des performances séparatives correctes. En effet, dans le schéma envisagé ici, où le contenu du canal d'IEF serait séparé en 300 fractions pour l'analyse par électrophorèse de zone, une diminution de ne serait-ce qu'une seconde du temps nécessaire à cette séparation par électrophorèse de zone permettrait de gagner environ 5 minutes sur le temps global d'analyse.

Pour améliorer la sensibilité de la détection, la mise en œuvre d'une étape de préconcentration en ligne des analytes a également été envisagée. Dans le cas de l'utilisation d'électrolytes quasi-isoélectriques, une étape transitoire d'isotachophorèse (tITP) avant la séparation des analytes par électrophorèse de zone semble particulièrement appropriée pour cela. En effet, les ampholytes porteurs utilisés comme électrolyte de séparation possèdent des mobilités faibles car le pH de ces solutions est peu éloigné de leur point isoélectrique. Ces ampholytes pourront donc jouer le rôle d'ions terminaux lors d'une étape d'ITP. Pour cela, il suffira d'introduire une zone d'électrolyte meneur en amont de l'échantillon avant de réaliser la séparation par électrophorèse de zone. Cette technique avait été utilisée au format capillaire par J.-M. Busnel lors de sa thèse au laboratoire [16] et lui avait permis d'obtenir des facteurs de préconcentration pouvant atteindre 200 pour la séparation de protéines modèles par électrophorèse de zone, en injectant avant les analytes des zones contenant du chlorure de sodium.

Pour réaliser cette étape de tITP, un deuxième schéma de puce a été imaginé. Il est présenté en Figure 9. Par rapport au schéma précédent, un canal et une valve supplémentaire ont été ajoutés au microsystème. Le protocole de séparation est relativement similaire à celui de la Figure 8. Plus précisément, une fois la focalisation terminée, les valves 2 et 4 pourront être fermées et une zone d'électrolyte meneur pourra alors être injectée de façon hydrodynamique. Ce type d'injection ajoute un degré de complexité supplémentaire au système, mais est indispensable. En effet l'électrolyte meneur pourrait être typiquement constitué de chlorure de sodium ou de lithium, à des concentrations voisines de 100 mM [16]. Une injection electrocinétique est donc à proscrire en raison de la très forte conductivité de l'électrolyte meneur, qui induirait des courants trop importants dans le microsystème. Une fois la zone d'électrolyte meneur injectée, une partie des analytes focalisés dans le canal d'IEF peut être transférée dans le canal d'électrophorèse de zone, en fermant les valves V1, V3 et V4 et en laissant ouverte la valve V2. La préconcentration par tITP des protéines transférées suivie de leur

séparation par électrophorèse de zone sera ensuite réalisée en fermant les valves V2 et V3, la tension de focalisation pouvant de nouveau être appliquée pour éviter la diffusion des analytes restés dans le canal d'IEF.

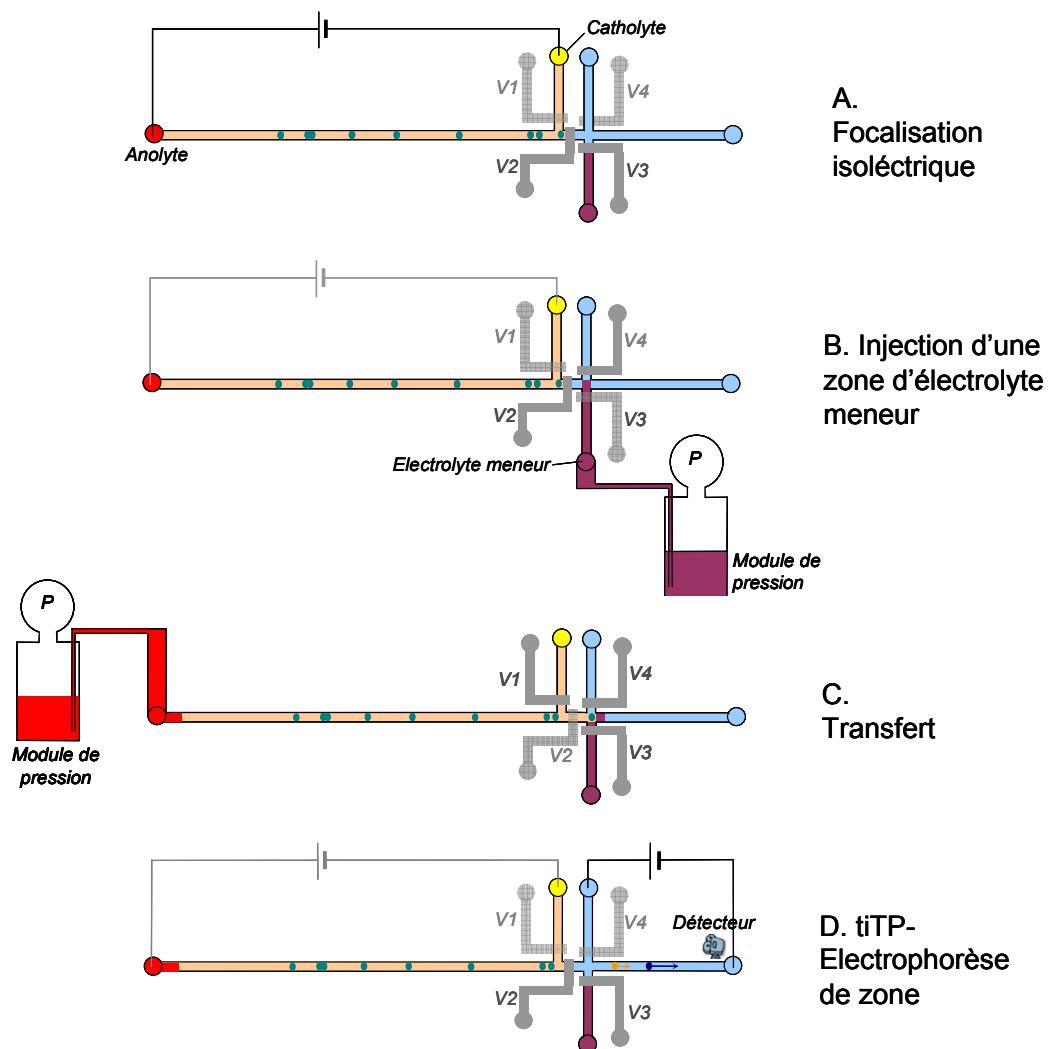


Figure 9 : schéma de principe du microsystème bidimensionnel « Allergycard », avec un canal supplémentaire permettant d'ajouter une étape de tITP avant la séparation par électrophorèse de zone. Les valves permettant d'isoler les différents canaux de séparation sont représentées en gris clair lorsqu'elles sont ouvertes et gris plus foncé lorsqu'elles sont fermées. Longueur des canaux de séparation : canal d'IEF (en saumon) : 4 cm, canal d'électrophorèse de zone : 1,5 cm. Largeur et hauteur des canaux : 50 et 20 μ m.

Un premier microsystème a été microfabriqué à l’Institut Curie selon le schéma présenté en Figure 8. Cependant, avant de réaliser la séparation d’échantillons de lait, plusieurs expériences restent à réaliser. Il faudra ainsi commencer par s’assurer du bon fonctionnement des valves, en utilisant par exemple des solutions colorées pour visualiser

le contenu des canaux. En particulier, étant donné que l'électrolyte de séparation contiendra probablement 30% de glycérol, sa viscosité sera de 2,3 cP au lieu de 0,83 cP pour l'eau. Cette augmentation de la viscosité pourra nécessiter l'application de pressions plus importantes sur les valves pour réussir à fermer correctement les canaux.

Ces canaux devront ensuite être greffés au PDMA-AGE, puis des composés fluorescents modèles seront utilisés pour mettre au point le transfert des analytes entre les deux dimensions de séparation. Cette étape de transfert et de « *rebuffering* » ne sera pas nécessairement la plus facile, car les analytes injectés en électrophorèse de zone auront préalablement été focalisés à leur point isoélectrique lors de la première dimension de séparation et porteront donc une charge globalement neutre. Au début de l'étape d'électrophorèse de zone les ions provenant de l'électrolyte vont migrer dans la zone échantillon, ce qui aura pour effet de charger les analytes, qui pourront alors migrer suivant le mécanisme classique d'électrophorèse de zone. Cette étape devra donc être la plus rapide possible de façon à ne pas observer trop d'élargissement des bandes d'analytes. L'utilisation de NC pourrait donc se révéler préjudiciable à la qualité de séparation. Ces électrolytes étant des solutions quasi-isoélectriques, les ions qui les composent sont en effet peu chargés et leurs mobilités électrophorétiques sont donc faibles. Ces ions de l'électrolyte migrant lentement, le processus d'ionisation des analytes pourrait s'en retrouver ralenti, d'où une diminution possible des performances de la séparation. Le pouvoir tampon de l'électrolyte sera lui aussi un paramètre essentiel pour le bon déroulement de ce processus : s'il est trop faible les ions de l'électrolyte pourraient ne pas imposer leur pH à la zone d'analytes, ce qui conduirait également à un transfert lent des analytes vers le canal d'électrophorèse de zone.

La question de la dérivation des protéines avec un marqueur fluorescent devra également être approfondie. En particulier, un marquage non covalent ne s'était pas révélé assez sensible pour la séparation monodimensionnelle des protéines par électrophorèse de zone. Il serait alors intéressant de déterminer si le facteur de préconcentration atteint grâce à l'étape d'IEF serait suffisant pour pouvoir détecter les protéines après leur séparation par électrophorèse de zone tout en les dérivant avec un marqueur non covalent.

5.4. Conclusions

Ces dernières expériences nous ont donc tout d'abord permis d'examiner l'intérêt d'utiliser des tensioactifs pour améliorer les séparations en électrophorèse.

L'utilisation de CHAPS a ainsi permis d'améliorer la sensibilité de la détection de protéines hydrophobes par dérivation non covalente au Sypro Orange, ce tensioactif interagissant avec les protéines pour faciliter leur interaction avec cette sonde de fluorescence. Nous avons cependant montré que cette stratégie n'était pas applicable aux protéines relativement hydrophiles, car le Sypro Orange interagit alors préférentiellement avec le tensioactif et non plus avec la protéine. Ainsi, l'utilisation d'une dérivation avec un marqueur fluorescent pour la détection de protéines en conditions natives apparaît donc complexe. Pour pallier ce problème, il serait donc envisageable d'utiliser une détection par fluorescence native, les protéines du lait possédant quelques acides aminés aromatiques. Ce type de détection n'a toutefois pas été utilisé ici faute de disponibilité au laboratoire. Une autre solution consisterait à utiliser un autre type de détection ne nécessitant pas de dérivation des analytes, comme par exemple la détection électrochimique prévue pour le microsystème « Allergycard ».

L'ajout de tensioactif s'est en revanche révélé indispensable pour la séparation des protéines d'un échantillon de lait écrémé, en particulier pour éviter la précipitation des caséines. L'utilisation de Sypro Orange pour la détection des protéines paraît donc inenvisageable pour la détection des protéines dans un échantillon de lait, n'étant pas compatible avec l'utilisation de tensioactifs.

Enfin, deux schémas de microsystèmes différents ont été envisagés pour la réalisation du microsystème « Allergycard », permettant ou non l'intégration d'une étape de préconcentration par isotachophorèse transitoire entre les séparations par focalisation isoélectrique et par électrophorèse de zone. Une de ces puces a été réalisée à l'UMR 168 de l'Institut Curie et va permettre de réaliser les premiers essais de couplage des deux dimensions de séparation.

5.5. Références bibliographiques

- [1] Doherty, E. A. S., Meagher, R. J., Albarghouthi, M. N., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 34-54.
- [2] Descroix, S., Le Potier, I., Niquet, C., Minc, N., Viovy, J.-L., Taverna, M., *J. chromatogr. A* 2005, 1087, 203-209.
- [3] Herbert, B., *Electrophoresis* 1999, 20, 660-663.
- [4] Taverna, M., Le Potier, I., Morin, P., *Techniques de l'ingénieur* 2003, P3 365.
- [5] Busnel, J.-M., *Electrophorèse en solutions quasi-isoélectriques d'ampholytes*, Thèse de doctorat, Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2006.
- [6] Clément, P., Agboola, S. O., Bencini, R., *LWT - Food Science and Technology* 2006, 39, 63-69.
- [7] Manso, M. A., Miguel, M., Lopez-Fandino, R., *J. Chromatogr. A* 2007, 1146, 110-117.
- [8] Izco, J. M., Isabel Ordóñez, A., Torre, P., Barcina, Y., *Journal of Chromatography A* 1999, 832, 239-246.
- [9] Miralles, B., Krause, I., Ramos, M., Amigo, L., *International Dairy Journal* 2006, 16, 1448-1453.
- [10] Herrero-Martinez, J. M., Simo-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, 878, 261-271.
- [11] Rabilloud, T., *Electrophoresis* 1996, 17, 813-829.
- [12] Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Amalia, P., Perono Garoffo, L., Valentini, S., Fabris, C., Bertino, E., Coscia, A., Conti, A., *Mol. Nutr. Food Res.* 2004, 48, 363-369.
- [13] Mondoulet, L., *Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide. Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs*, Thèse de doctorat, INSA ,Toulouse 2005.
- [14] Unger, M. A., Chou, H.-P., Thorsen, T., Scherer, A., Quake, S. R., *Science* 2000, 288, 113-116.
- [15] Mohan, D., Lee, C. S., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 271-276.
- [16] Busnel, J.-M., Descroix, S., Godfrin, D., Hennion, M.-C., Kašicka, V., Peltre, G., *Electrophoresis* 2006, 27, 3591-3598.

Conclusion générale

Dans le cadre du projet européen « Allergycard », notre équipe s'est associée à plusieurs laboratoires pour développer un système miniaturisé de diagnostic rapide et personnalisé de l'allergie. Ce microsystème permettra de séparer les protéines d'un extrait alimentaire suivant deux dimensions de séparation, ces protéines étant ensuite soumises à une étape d'immunodétection. Ce travail de thèse a ainsi consisté à développer les deux dimensions de séparation mises en œuvre dans le microsystème « Allergycard », à savoir la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse de zone. Notre approche a plus précisément consisté à développer ces deux modes de séparation au format capillaire avant d'exploiter les résultats obtenus pour la séparation de protéines du lait en microsystèmes.

Nous nous sommes tout d'abord penchés sur la séparation de protéines en CIEF. Nous avons ainsi tout d'abord comparé deux systèmes de CIEF en vue de leur transposition en microsystèmes. Le premier est classique et utilise un capillaire greffé HPC et un électrolyte de séparation aqueux tandis que le second utilise un capillaire en silice vierge et un électrolyte de séparation contenant 30% de glycérol, ce deuxième système ayant donné de meilleurs résultats pour la séparation de protéines modèles. Nous avons ensuite montré que des solutions constituées d'ampholytes porteurs de gamme de pH étroite, utilisés auparavant au laboratoire en électrophorèse de zone, constituaient également des outils intéressants pour améliorer les séparations en CIEF. Ajoutés au mélange initial d'ampholytes porteurs ils permettent ainsi de modifier le gradient de pH pour améliorer la résolution à un endroit ciblé de ce gradient. Ces électrolytes particuliers ont également été utilisés comme anolyte et catholyte, et ont ainsi permis d'observer une amélioration très importante de la résolution. Ce résultat n'étant valable qu'en capillaire en silice vierge et non pas en capillaire greffé avec un polymère neutre, nous avons alors mis en œuvre des méthodes d'évaluation du flux électroosmotique régnant dans le capillaire au cours des différentes étapes d'une séparation par focalisation isoélectrique. Ceci nous a ainsi permis de démontrer que l'amélioration de la résolution observée était due à une diminution du flux électroosmotique résiduel lors de l'utilisation des fractions d'ampholytes comme anolyte et catholyte.

La séparation de protéines du lait par focalisation isoélectrique a ensuite été mise en œuvre en microsystèmes. Ces protéines ont pour cela été dérivées avec une sonde de fluorescence non covalente. Deux matériaux de microsystèmes, le verre et le PDMS, ont ainsi été comparés, tout comme deux traitements de surface permettant de diminuer le flux électroosmotique et de limiter l'adsorption des analytes sur les parois des microsystèmes. Ces traitements ont

consisté à adsorber deux polymères neutres et hydrophiles à la surface des canaux : l’HPC et le PDMA.AGE. Pour évaluer la qualité du greffage de ces deux polymères sur les deux types de matériaux, une méthode de mesure des flux électroosmotiques faibles a été développée et comparée à la méthode classique basée sur des mesures de courant. La séparation de marqueurs de points isoélectriques et de protéines du lait a alors été réalisée. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une puce en verre greffée à l’HPC, mais les puces en PDMS greffées au PDMA-AGE donnaient également des résultats satisfaisants.

La séparation de protéines par électrophorèse de zone en solutions quasi-isoélectriques d’ampholytes a alors été étudiée. Nous avons tout d’abord montré que ces électrolytes permettaient à la fois de diminuer le flux électroosmotique et de limiter l’adsorption des protéines sur les parois des capillaires en silice vierge. La dérivation des protéines du petit lait avec un marqueur fluorescent a ensuite été réalisée, de façon à pouvoir les détecter lors leur analyse en microsystèmes. Ces mêmes protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse de zone sur des puces en verre et en PDMS, et l’utilisation de solutions quasi-isoélectriques d’ampholytes comme électrolytes a permis d’obtenir des séparations plus rapides qu’avec un électrolyte classique tout en conservant des performances similaires.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont encourageants dans la mesure où ils ont permis de démontrer la faisabilité de la séparation de protéines du lait en mettant au point indépendamment les deux modes de séparation envisagés pour le microsystème « Allergycard ». La prochaine étape de ce travail consistera donc à mettre en œuvre la séparation de protéines sur un microsystème bidimensionnel microfabriqué à l’UMR 168 de l’Institut Curie, avant d’envisager la séparation des protéines provenant d’un échantillon de lait sur ce même microsystème.

Annexes

Annexe 1 : Fractionnement d'ampholytes avec le Rotofor® : conditions expérimentales

Pour les Servalyt 4-9, deux fractionnements ont été réalisés en utilisant la petite cellule de focalisation. Dans ce cas la focalisation était terminée en quatre heures environ et la tension appliquée passait de 400 à 700 V (sous puissance constante de 12 W). Quatre autres ont été effectués avec la grande chambre de focalisation. La durée de focalisation était alors de sept heures, la tension passant de 275 à 400 V (sous puissance constante de 15 W)

Pour les Servalyt 2-4, un premier fractionnement a été réalisé en utilisant la petite cellule de focalisation. La focalisation a alors nécessité 4h30, la tension passant alors de 200 à 600 V sous 12 W. Un second fractionnement a été effectué en utilisant la grande cellule de focalisation. La séparation a alors été effectuée en 3h30, tension étant au départ de 450 V et se stabilisant à 320 V. Cette diminution du courant est restée inexpliquée, d'autant qu'une focalisation correcte des ampholytes a été observée.

Pour chacun des deux mélanges de gamme de pH basique testés, un seul fractionnement a été effectué, en utilisant la petite cellule de focalisation. Pour les Servalyt 9-11 la séparation a été effectuée en 2h30, la tension passant de 400 à 500 V. Pour les Pharmalyte 8-10,5, la focalisation était plus longue (3h30) et la tension plus élevée (de 550 à 750 V).

Annexe 2 : Electrolytes utilisés pour les mesures de flux électroosmotiques

Les différents électrolytes ont été préparés à une force ionique de 25 mM avant d'être dilués par 10 pour atteindre une force ionique de 2,5 mM. Ils ont été préparés suivant les données fournies par le logiciel Phoebus, dans une fiole jaugée de 50 mL où étaient introduits les volumes suivants. Le volume obtenu est alors complété avec de l'eau milliQ jusqu'au trait de jauge pour obtenir 50 mL de tampon.

- Electrolyte pH 3,19 : 10,12 mL d'acide formique 200 mM et 2,43 mL de Tris 500 mM
- Electrolyte pH 4,25 : 18,37 mL d'acide acétique 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.
- Electrolyte pH 5,25 : 46,77 mL de MES 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.
- Electrolyte pH 6,24 : 10,4 mL de MES 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.
- Electrolyte pH 6,97 : 13 ,62 mL de MOPS 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.
- Electrolyte pH 7,05 : 10,02 mL de MOPS 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.
- Electrolyte pH 8,42 : 6,63 mL de tricine 200 mM et 1,25 mL de soude 1M.

Un électrolyte borate de force ionique 20 mM a également été utilisé comme solution mère. Il a été obtenu en introduisant 19,36 mL d'acide borique à 200 mM et 2 mL de soude et en complétant à 100 mL avec de l'eau milliQ.

Annexe 3 : Réaction de dérivation au FITC

45 µL de FITC dilué dans l'acétone (0,4-2,8 mg/mL) ont été ajoutés à 450 µL de solution de protéine à 1,5 mg/mL en tampon carbonate de sodium (pH 9,2, I 25 mM). La solution obtenue a alors été laissée dans l'obscurité une nuit à température ambiante. Les concentrations finales étaient de 95 µM en α -lactalbumine et de 103-720 µM en FITC, soit un rapport molaire FITC/protéine variant entre 1,1 et 7,5.

Les différentes protéines ont ensuite été séparées du FITC n'ayant pas réagi par passage sur colonne d'exclusion stérique (Sephadex G25). Le contenu des différentes fractions a été analysé par ECZ-UV. La concentration des différentes isoformes des protéines a ainsi pu être évaluée. Pour cela, les aires corrigées des différents pics de protéines ont été mesurés dans les différentes fractions. Cependant, pour économiser les fractions, elles ont été diluées par deux avant leur analyse par électrophorèse capillaire. Une solution « étalon » de protéine non marquée de concentration connue a également été injectée.

Comme nous ne disposions pas de solution de protéine marquée de concentration connue, il n'était pas possible de calculer directement la concentration en protéine marquée à partir des aires corrigées des pics correspondants. Nous avons donc tout d'abord calculé le rendement de la réaction de dérivation à partir des aires des pics de protéines n'ayant pas réagi, de façon à connaître la masse totale de protéine marquée. Dans chacune des fractions, la concentration en protéine n'ayant pas réagi a pour cela été évaluée, à partir de l'aire corrigée du pic de protéine de la solution étalon :

$$c_{\text{protéine non marquée dans la fraction considérée}} = f \cdot c_{\text{protéine dans la solution étalon}} \frac{A_c \text{ protéine non marquée dans la fraction considérée}}{A_c \text{ protéine non marquée dans la solution étalon}}$$

Où f est le facteur de dilution des fractions avant leur analyse par ECZ-UV. Dans notre cas ce facteur vaut 2.

La quantité de protéine non marquée dans chacune des fractions est ensuite facilement calculée, à partir de la concentration précédente et du volume V de la fraction considérée. Elle est exprimée en µg :

$$m_{\text{protéine non marquée dans la fraction considérée}} = c_{\text{protéine non marquée dans la fraction considérée}} \cdot V$$

Le taux r de protéine ayant été marquée est obtenu à partir de l'équation ci-dessous :

$$r = 1 - \frac{\sum_{\text{fractions}} m_{\text{protéine non marquée dans la fraction } i}}{m_{\text{initiale de protéine dans le mélange réactionnel}}}$$

La masse totale de protéine marquée est ainsi calculée avec la relation suivante :

$$m_{\text{totale de protéine marquée}} = r \cdot m_{\text{initiale de protéine dans le mélange réactionnel}}$$

L'étape suivante consiste alors à calculer la quantité de protéine marquée dans une fraction donnée. Cette quantité est exprimée en µg. En cas de multimarquage, le pic de protéine marquée le plus intense est choisi pour effectuer les calculs.

La quantité globale de protéine marquée contenue dans l'ensemble des fractions étant connue grâce à la relation précédente, nous avons tout d'abord calculé le pourcentage de protéine marquée contenu dans chacune des fractions, en supposant que la concentration en protéine marquée est proportionnelle à l'aire corrigée du pic correspondant :

$$\%_{\text{protéine marquée dans la fraction } i} = \frac{A_c \text{ protéine marquée dans la fraction } i \cdot V_i}{\sum_{\text{fractions } j} A_c \text{ protéine marquée dans la fraction } j \cdot V_j}$$

La concentration globale en protéine marquée dans chacune des fractions est ensuite obtenue de la façon suivante :

$$c_{\text{protéine marquée dans la fraction } i} = \frac{m_{\text{totale de protéine marquée}} \cdot \%_{\text{protéine marquée dans la fraction } i}}{V_i}$$

Annexe 4 : Composés modèles utilisés en microsystèmes

Les données présentées dans le tableau suivant ont été obtenues sur le site internet de Sigma-Aldrich.

Composé	Formule semi-développée	Masse molaire (g/mol)	Caractéristiques spectrales
Fluorescéine	 	332,31	$\lambda_{\text{exc}}=490 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}}=514 \text{ nm}$ en fluorescence (0,1M Tris pH 8.0)
Rhodamine B	 	479,01	$\lambda_{\text{max}}=543 \text{ nm}$ en absorption
Sulforhodamine B	 	580,65	$\lambda_{\text{max}}=554 \text{ nm}$ en absorption

Annexe 5 : Montage microfluidique

Le montage microfluidique utilisé pour effectuer des séparations électrophorétiques sur microsystème est composé d'un microscope inversé Olympus, équipé d'une lampe à mercure. Différents objectifs ont été mis en œuvre : 4x, 10x, 40x. Différents cubes filtres peuvent être utilisés pour fixer la gamme de longueurs d'onde d'excitation. Dans la plupart des cas le cube filtre utilisé ici présentait une gamme de 460-490 nm. Seuls les marqueurs de pI utilisés en IEF ont nécessité l'utilisation d'un cube filtre de gamme de longueur d'onde 310-390 nm.

Deux potentiomètres programmables ont été utilisés pour appliquer les tensions au niveau de chacun des puits du microsystème : un modèle Labsmith HVS 448 et un modèle Micralyne permettant tous les deux de couvrir une gamme 0 à 6000V.

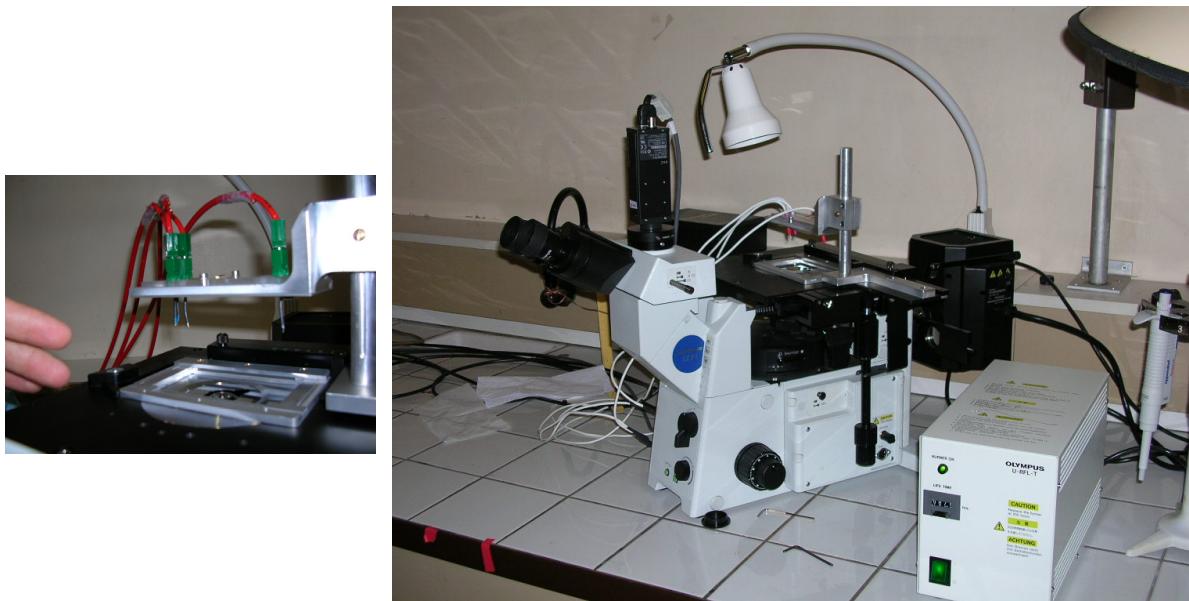


Figure 1 : Photographies du montage utilisé pour les séparations électrophorétiques en microsystèmes.

Deux microsystèmes différents ont été utilisés pour les séparations en électrophorèse de zone. Ils sont représentés en Figure 2.

Les premiers proviennent de la société Micralyne et présentent les caractéristiques suivantes :

- $l = 16 \text{ mm}$, $L = 95 \text{ mm}$, $e = 2,2 \text{ mm}$
- Microsystème de type simple croix, en verre de borosilicate
- Dimensions des canaux :
- longueur: - canal 4 (canal de séparation) : 8,089 cm
 - canal 1 : 0,939 cm

- canaux 2 et 3 : 0,482 cm.
- largeur: 50 μm
- épaisseur: 50 μm
- Diamètre des puits : 2 mm \pm 0,1mm

Pour éviter l'entrée de poussières dans les canaux et pour augmenter le volume des puits d'électrolytes, les puits étaient équipés de connectiques Upchurch.

Des puces en PDMS microfabriquées à l'UMR 168 de l'Institut Curie ont également été utilisées. Ces puces présentaient des canaux de séparation de 50 μm de largeur et 20 μm de profondeur. La longueur du canal de séparation (canal 4) était de 2 cm, les trois autres mesurant 1 cm.

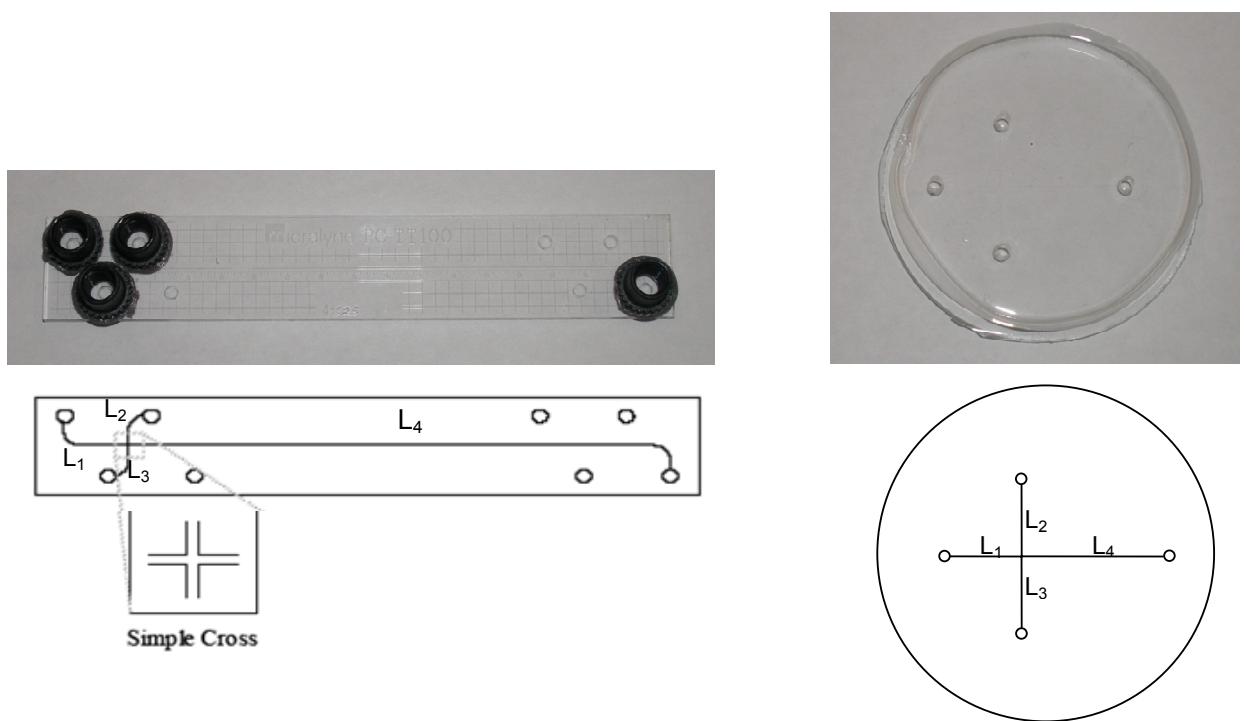


Figure 2 : photographies et représentations schématiques des puces d'électrophorèse de zone utilisées lors de cette thèse.

Annexe 6 : Injection en électrophorèse de zone en microsystèmes

Au cours de cette thèse, les injections en électrophorèse de zone ont été réalisées en mode « pinched », acronyme anglais de « pincé ». D'autres modes d'injection peuvent être utilisés [1] mais ne seront pas présentés ici.

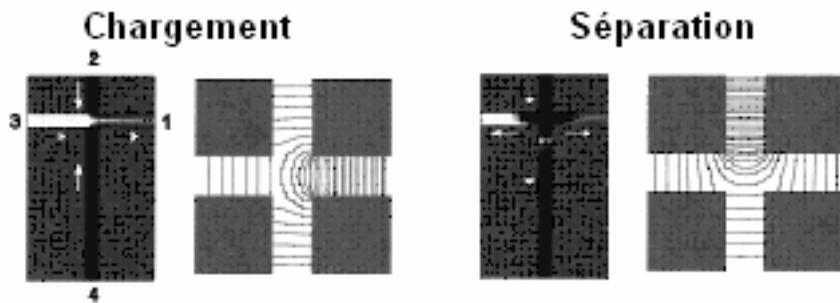


Figure 3 : Description et ligne de champ correspondant à une injection en mode « pinched ». Adapté de [1, 2]

Lors de la phase de chargement, une différence de potentiel est appliquée entre le réservoir 3 contenant l'échantillon et le réservoir 1 rempli d'électrolyte. L'échantillon se déplace ainsi continuellement du réservoir 3 vers le réservoir 1. Simultanément, deux potentiels de confinement sont appliqués aux réservoirs 2 et 4 (contenant de l'électrolyte de séparation) pour permettre de d'éviter la diffusion de l'échantillon au niveau de la « chambre d'injection ». Prenons l'exemple d'un microsystème en verre où l'échantillon à analyser est un mélange de composés suivant le flux électroosmotique. Le potentiel appliqué en 1 sera alors négatif et ceux en 2, 3 et 4 positifs, les potentiels appliqués en 2 et 4 étant plus faibles que celui appliqué en 3.

La seconde phase consiste en la séparation du mélange. Pour ce faire, une différence de potentiels est appliquée aux extrémités du canal entre les puits 2 et 4, les réservoirs 1 et 3 étant soumis à des potentiels de retour. Dans le cas de l'exemple précédent, le potentiel appliqué en 2 sera positif alors que les potentiels appliqués en 1, 3 et 4 seront négatifs (ceux en 1 et 3 étant moins négatifs que celui en 4). Comme le montre la Figure 3, le basculement de la phase de chargement à celle de séparation induit l'injection de l'échantillon.

Annexe 7 : Calcul du champ électrique appliqué dans un microsystème lors d'une séparation en électrophorèse de zone.

Le but de ce calcul est d'obtenir la valeur du champ électrique régnant dans les différents canaux de séparation, en fonction des potentiels électriques appliqués. Par convention, ces derniers seront calculés de la manière suivante :

$$E_i = \frac{V_0 - V_i}{l_i}$$

Où V_i est le potentiel appliqué dans le puits i , l_i la longueur du canal correspondant et V_0 le potentiel au croisement des canaux.

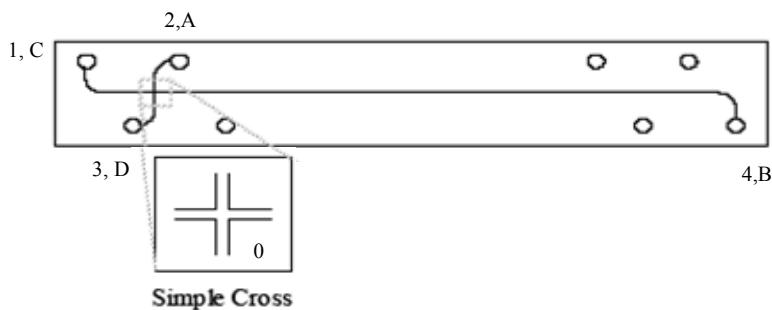


Figure 4 : Notations utilisées pour le calcul du champ électrique dans les puces d'électrophorèse de zone.
Les chiffres indiquent le numéro du puits et les lettres se réfèrent à la voie du générateur de tension habituellement utilisée pour appliquer les potentiels électriques.

Pour pouvoir obtenir les différents champs électriques, il nous faut donc calculer le potentiel V_0 . Pour cela, écrivons la loi des noeuds au point 0 :

$$i_1 + i_2 + i_3 + i_4 = 0$$

Avec d'après la loi d'Ohm :

$$i_k = \frac{V_k - V_0}{R_k}$$

où i_k est le courant passant dans le canal k , et R_k la résistance électrique de ce dernier. Nous allons supposer ici que les quatre branches du microsystème sont remplies d'un électrolyte de conductivité équivalente, et que les R_k sont proportionnelles à la longueur du canal considéré, la constante de proportionnalité étant identique pour les quatre canaux :

$$R_k = R_0 \cdot l_k$$

où R_0 est la résistance linéique des canaux remplis d'électrolyte.

L'expression de la loi des nœuds devient alors :

$$\frac{V_1 - V_0}{l_1} + \frac{V_2 - V_0}{l_2} + \frac{V_3 - V_0}{l_3} + \frac{V_4 - V_0}{l_4} = 0$$

D'où l'expression de V_0 en fonction des potentiels appliqués et de la longueur des différents canaux :

$$V_0 = \frac{\sum_{k=1}^4 \frac{V_k}{l_k}}{\sum_{k=1}^4 \frac{1}{l_k}}$$

Cette expression de V_0 peut ensuite être réinjectée dans l'expression des champs électriques donnée au début de cette annexe.

Annexe 8 : potentiels appliqués lors des séparations en électrophorèse de zone en microsystème

Les potentiels appliqués et les champs électriques en résultant sont présentés dans les tableaux suivants, pour les puces Micralyne et pour les puces en PDMS. L'échantillon est placé dans le puits 4, les trois autres étant remplis d'électrolyte de séparation.

Pinch			Séparation		
V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)
20			-618		
A,2	-790	1681	A,2	-1091	981
B,4	600	-72	B,4	-3000	294
C,1	500	-511	C,1	1500	-2256
D,3	550	-1099	D,3	-1091	981

Séparation			Séparation			Séparation		
V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)
236			1047			1440		
A,2	-120	739	A,2	890	326	A,2	1300	290
B,4	-3000	400	B,4	-3000	500	B,4	-3000	549
C,1	2000	-1878	C,1	2500	-1547	C,1	2500	-1129
D,3	-120	739	D,3	700	720	D,3	1300	290

Potentiels utilisés pour les séparations en électrophorèse de zone sur les puces Micralyne. Cas d'une « polarité négative », utilisée pour des composés négatifs en absence de flux électroosmotique.

Pinch			Séparation			Séparation		
V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)
-179			-757			-771		
A,2	-2000	1821	A,2	-1700	943	A,2	-1700	929
B,4	250	-214	B,4	-1900	571	B,4	-2200	714
C,1	250	-429	C,1	1700	-2457	C,1	1800	-2571
D,3	1000	-1179	D,3	-1700	943	D,3	-1700	929

Séparation			Séparation			Séparation		
V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)
-1000			-429			-143		
A,2	-1900	900	A,2	-1300	871	A,2	-1000	857
B,4	-3000	1000	B,4	-3000	1286	B,4	-3000	1429
C,1	1800	-2800	C,1	2600	-3029	C,1	3000	-3143
D,3	-1900	900	D,3	-1300	871	D,3	-1000	857

Séparation			Séparation			Séparation		
V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)	V0 calculé (V)	Vappliqué (V)	E calculé (V/cm)
143			429			714		
A,2	-500	643	A,2	0	429	A,2	500	214
B,4	-3000	1571	B,4	-3000	1714	B,4	-3000	1857
C,1	3000	-2857	C,1	3000	-2571	C,1	3000	-2286
D,3	-500	643	D,3	0	429	D,3	500	214

Potentiels utilisés pour les séparations en électrophorèse de zone sur les puces en PDMS. Cas d'une « polarité négative », utilisée pour des composés négatifs en absence de flux électroosmotique.

Références bibliographiques

- [1] Blas, M., Delaunay, N., Rocca, J.-L., *Electrophoresis* 2008, 29, 20-32.
- [2] Ermakov, S. V., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 3512-3517.

Résumé

Dans le cadre de la détection de nouveaux allergènes alimentaires, un microsystème pour la séparation bidimensionnelle de protéines par électrophorèse a été développé, ces deux dimensions étant la focalisation isoélectrique (IEF) et l'électrophorèse de zone (EZ). Ces deux modes de séparation ont été étudiées au format capillaire avant d'utiliser les résultats obtenus en microsystèmes.

La séparation de protéines par IEF a d'abord été réalisée. Nous avons montré que l'utilisation d'électrolytes constitués d'ampholytes d'intervalles étroits de pH (NC) permettait d'augmenter la résolution puis réalisé la séparation de protéines du lait en microsystèmes. Des microsystèmes en verre et en PDMS et plusieurs traitements de surface ont été comparés en utilisant une méthode de mesure de flux électroosmotique développée pour cela. Nous avons ensuite étudié la séparation de protéines par EZ en microsystèmes. Des NC ont de nouveau été utilisés, pour leur faible conductivité. Nous avons montré qu'ils permettaient de diminuer fortement l'adsorption des protéines puis nous avons réalisé la séparation de ces dernières en quelques secondes après avoir optimisé leur dérivation avec un marqueur fluorescent.

Enfin, différents schémas de microsystèmes ont été envisagés pour coupler les deux dimensions de séparation.

Summary

In the context of new food allergen detection, a microsystem dedicated to bidimensional electrophoretic protein separation has been developed, using isoelectric focusing (IEF) followed by zone electrophoresis (ZE). Both these separation modes have been investigated in capillary format before down-sizing the results obtained into microsystems.

IEF protein separation has first been performed. The use of electrolytes consisting of narrow pH cuts of carrier ampholytes (NC) has proven to increase resolution. Microchip milk protein separation has then been performed. Glass and PDMS microchips and several surface treatments have thus been compared, in particular through electroosmotic flow measurements using an original method. Then, microchip ZE protein separation has been investigated. NC have again been used, due to their low conductivity. We found that they allowed decreasing protein adsorption. Milk proteins have been separated within a few seconds after having optimized their derivatization with a fluorescent marker.

Several microsystem schemes have then been considered to couple the two separation modes.