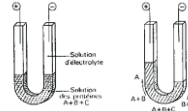


Formation CE-MS :
Electrophorèse Capillaire

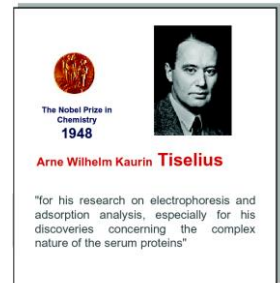
Contact : Yannick FRANCOIS, Lab. de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes,
1 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg
email: yfrancois@unistra.fr

UN PEU D'HISTOIRE ...

1937



Séparation de protéines
dans le sérum humain



d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

... ET LA SUITE

1939

Séparation de protéines
par électrophorèse sur papier

1954



1967

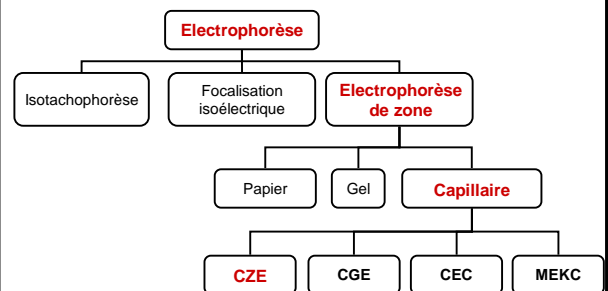
S. Hjerten : capillaires de 300 µm i.d.

1981

J. Jorgenson : capillaires de 75 µm i.d.

d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

Une grande famille



Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

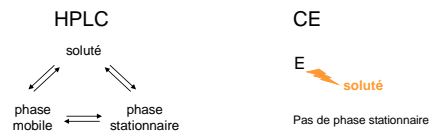
3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

Une technique séparative



☺ instrumentation : pas de pompe, pas de vanne d'injection

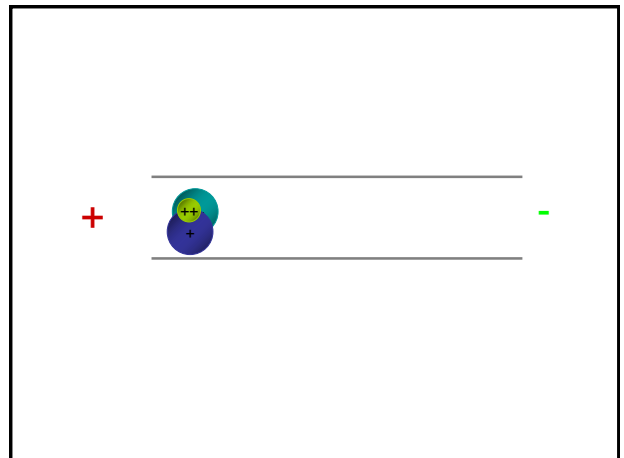
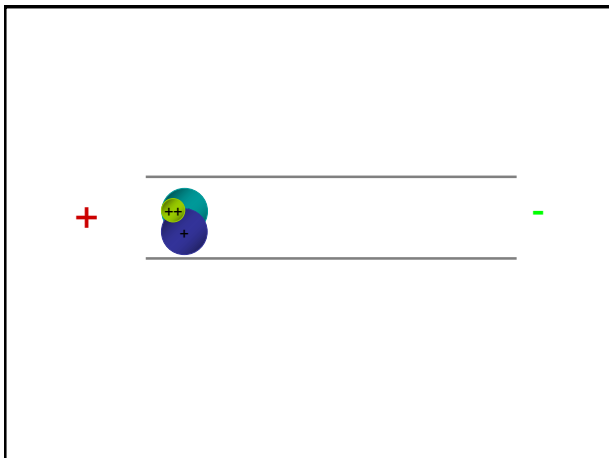
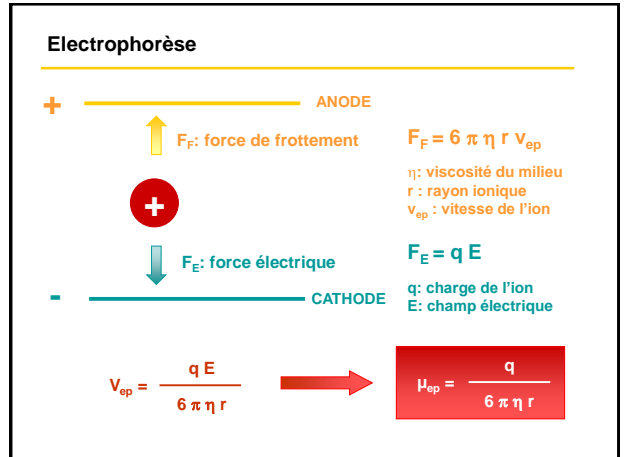
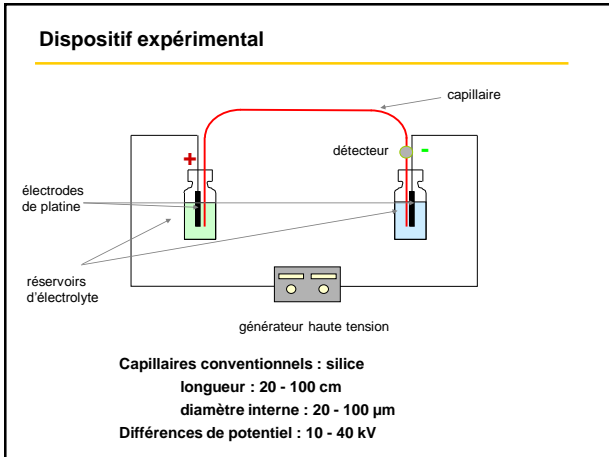
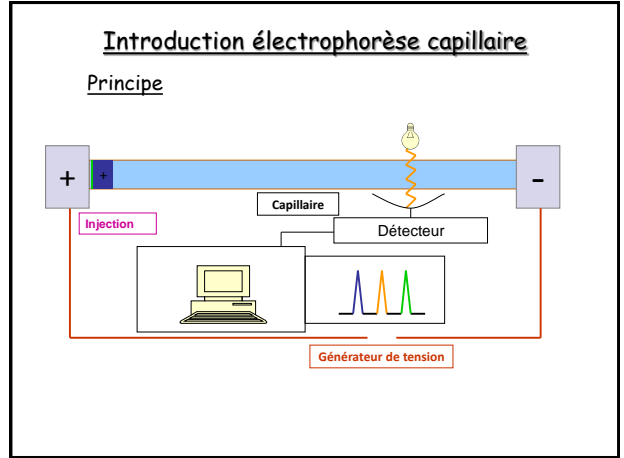
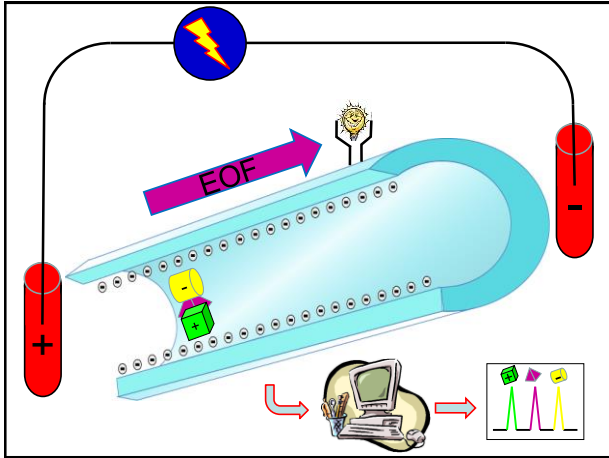
➤ MINIATURISATION

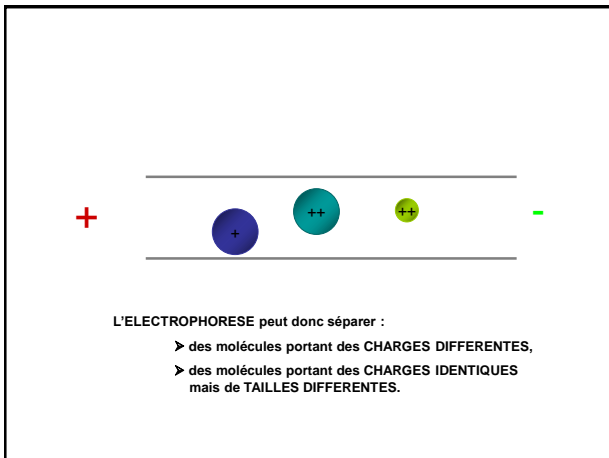
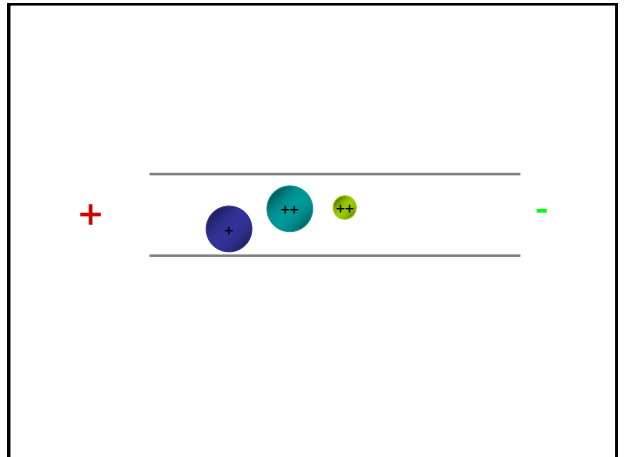
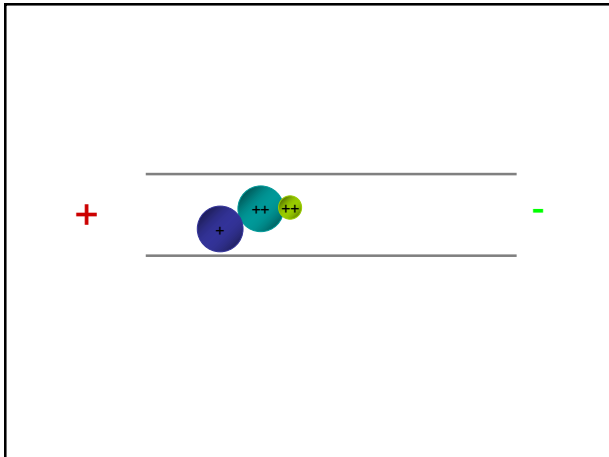
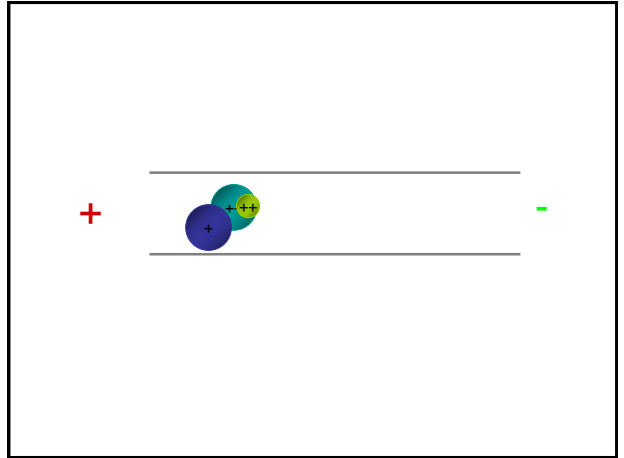
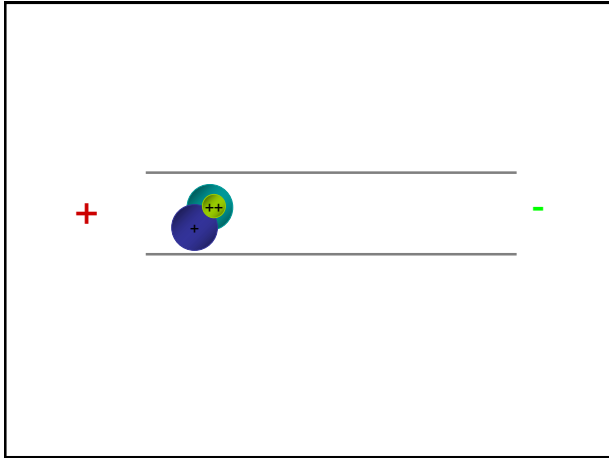
faibles volumes d'échantillon, d'électrolyte

➤ COÛT

EFFICACITE de séparation élevée

☹ faible SENSIBILITE DE DETECTION





Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

Electrosmose

Surface du capillaire chargée + Neutralisation par les ions de signe opposé de l'électrolyte

DOUBLE COUCHE

Origine du phénomène : orientation des molécules différente

- > à l'interface solide/liquide : ions adsorbés à la surface
- > au sein de la solution : ions distribués en fonction des charges électriques et de l'agitation thermique

↳ déplacement du solvant qui a lieu sous l'effet de l'application du champ électrique

DOUBLE COUCHE : le modèle de STERN

électrosmose

sein de la solution

couche diffuse

silanols de surface

distance

1/x

potentiel

ψ_0 ψ_s ζ δ

Flux électrosmotique

La chute de potentiel dans la double couche détermine la vitesse de déplacement du solvant :

$$V_{eo} = \frac{\epsilon \zeta E}{4 \pi \eta} \quad \Rightarrow \quad \mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta}$$

ζ : potentiel zéta
 ϵ : constante diélectrique du milieu
 η : viscosité de la solution

Ordre de grandeur : de 0,1 à 1cm.s⁻¹ pour des champs de l'ordre de 1500V.cm⁻¹.

BILAN

$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$

> capillaire de silice:

μ_{ep} μ_{eo} μ_{eo} μ_{ep}

temps

Mesure des mobilités

$t_0 \Rightarrow t_0 = L_d / v_{eo} = L_d / (\mu_{eo} \cdot E)$
 $= L_d \cdot L_t / \mu_{eo} \cdot V$

$t = L_d / v_{app} = L_d / (\mu_{app} \cdot E)$
 $= L_d \cdot L_t / (\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot V$

Efficacité de la séparation

↳ Elargissement de bande selon le modèle de Van Deemter s'exprime en termes de hauteur équivalente à un plateau théorique (H) :

$$H = X + B/u + C \cdot u$$

Chemins préférentiels (A):


Diffusion moléculaire (B) : fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

Transfert de masse (C) : influencé par le coefficient de partage et donc la solubilité relative du soluté dans la phase stationnaire

H_{opt} u_{opt}


Profils d'écoulement

HPLC
FLUX HYDRODYNAMIQUE : profil parabolique



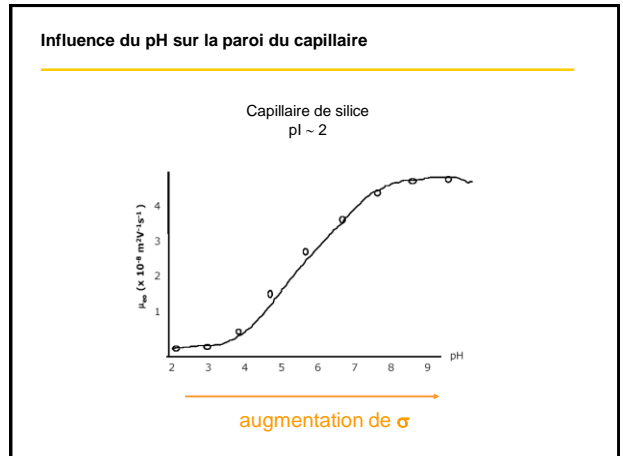
POMPE →

CE
FLUX ELECTROOSMOTIQUE : profil plat



+

← EFFICACITE ELEVEE

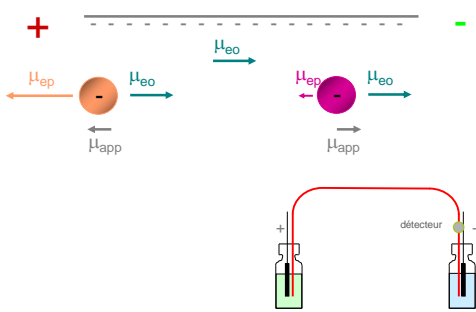


Modifier la surface, POURQUOI ?

- ✓ Réaliser des séparations « difficiles »
 - ▶ éviter les phénomènes d'adsorption de surface
- ▶
$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$$
- ✓ Réaliser des séparations plus rapides
- ✓ Obtenir une mobilité électroosmotique indépendante du pH

Modifier la surface, POURQUOI ?

Séparation d'anions :



Modifier la surface, COMMENT ?

Greffages « dynamiques » :

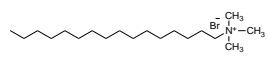
- ▶ Présence d'additifs dans l'électrolyte

Greffages permanents

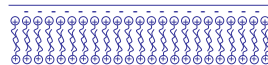
- ▶ Greffage chimique
 - 1- activation de la silice par un réactif de silanisation
 - 2- greffage par des groupements fonctionnels
- ▶ Immobilisation thermique

Amino « quenchers » : surfactants

CTAB



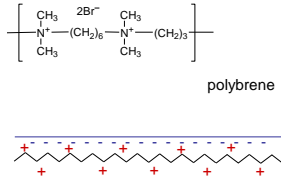
CTAB



	C ₁₈	C ₁₆	C ₁₄	C ₁₂
concentration (M) pour $\zeta = 0$	8.10 ⁻⁶	7.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁴	2,5.10 ⁻³

Effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée sur le potentiel ζ du quartz en présence de solutions d'acétate d'alkylammonium

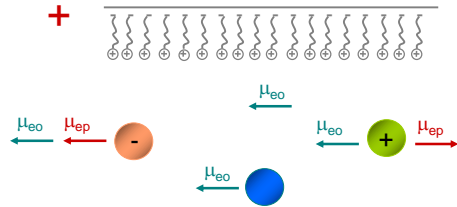
Amino « quenchers » : polymères polycationiques



BILAN

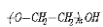
$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

➤ surface chargée positivement

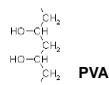


Autres additifs

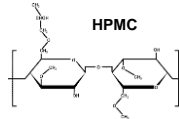
Polymères neutres hydrophiles



PEO



PVA

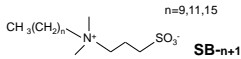


HPMC

Surfactants neutres

- Triton X-100
- Brij-35
- Tween 20

Surfactants zwitterioniques

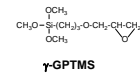


SB-n+1

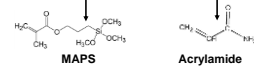
Greffages permanents

- Par liaison covalente

Silylation



Silylation et polymérisation



MAPS

Acrylamide

- Par immobilisation thermique

Alcool polyvinylique (PVA)

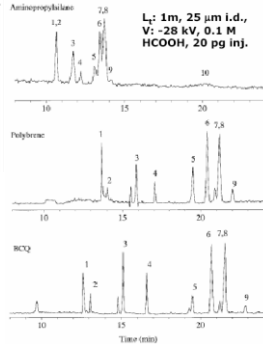
Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)

Insolubles dans les solutions aqueuses après chauffage

Modifier la surface, COMMENT ?

Table 1. Comparison of separation efficiencies for different capillary coatings*

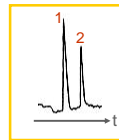
Peptides	APS	Theoretical plates	BCO	
1 Leu-enkephalin	556	62 000	185 000	352 000
2 Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000	380 000
3 Substance P _{1-4}}	548	76 000	249 000	505 000
4 Cholecystokinine _{1-15}}	418	49 000	273 000	312 000
5 Substance P _{1-9}}	553	29 000	355 000	355 000
6 Angiotensin I	453	31 000	220 000	237 000
7 Val ¹ I ⁷ Angiotensin III	442	26 000	152 000	152 000
8 ACTH _{1-16}}	482	60 000	111 000	256 000
9 pGlu ₄ MBP _{1-16}}	459	18 000	268 000	288 000



L_c: 1m, 25 μm i.d., V: -28 kV, 0.1 M HCOOH, 20 pg inj.

Rapid Commun. in Mass Spectrom., 1997, 11, 307

Facteurs de séparation



HPLC

CE

déplacement

k'

μ_{ep}

sélectivité

$$\alpha = k'_1/k'_2$$

$$\alpha = \mu_{ep,1}/\mu_{ep,2}$$

résolution

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{k' + 1} \sqrt{N}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$$

Influence du voltage

Limitation : Puissance dissipée

$$\frac{P}{L} = \frac{\Delta C r^2 V^2}{L^2}$$

L : longueur du capillaire

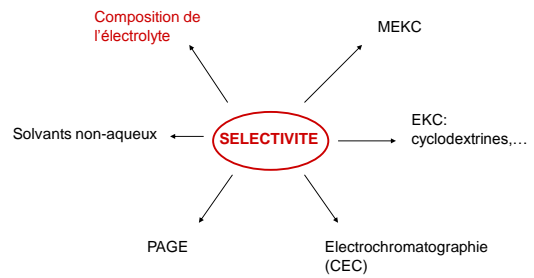
r : rayon du capillaire

C : concentration de l'électrolyte

Δ : conductance molaire de la solution

→ **capillaires de faibles diamètres**

AMELIORER LA SELECTIVITE



Facteurs affectant la mobilité électroosmotique

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

σ : densité de charge à la surface du capillaire

η : viscosité de la solution

δ : épaisseur de la double couche

► **Composition de l'électrolyte** : nature et concentration des ions, pH, solvants organiques

► **Nature du capillaire**

► **Température**

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

Facteurs affectant la mobilité électrophorétique

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

► **pH** : modification de l'intensité de la charge portée par les espèces

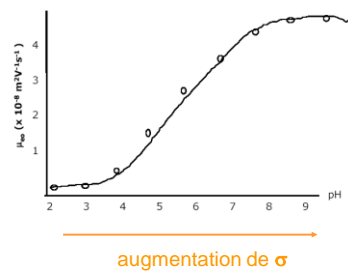
► **composition ionique de l'électrolyte** : influence sur les interactions entre les groupements ionisables des solutés et les ions de l'électrolyte (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , PO_4^{3-} , ...)

► **ajout de modificateur organique**

► **température**

Influence du pH sur la paroi du capillaire : μ_{eo}

Capillaire de silice



Notions de pK_A

$LH \leftrightarrow H^+ + L^-$

avec $pK_A = pH - \log \frac{[L^-]}{[HL]}$

Tampons couramment utilisés en électrophorèse capillaire

Solution tampon	pK _A
Phosphate	2.12 - 7.21 - 12.32
Citrate	3.06 - 4.74 - 5.40
Formate	3.75
Succinate	4.19 - 5.57
Acétate	4.74
Borate	9.24
Tampons zwitterioniques	
MES	6.15
HEPES	7.55
TRIS	8.30

Conductivité faible

Influence de la force ionique

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

σ : densité de charge à la surface du capillaire
 η : viscosité de la solution
 δ : épaisseur de la double couche

$$\delta = K \cdot (\epsilon T / \Sigma C_i z_i^2)^{1/2}$$

Influence de la force ionique

$\delta = K \cdot (\epsilon T / \Sigma C_i z_i^2)^{1/2}$

lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte
 > diminution de δ

Tampon phosphate (0.025-0.2M, pH 2.4), V: 30 kV, Ld: 0.5 m.

- 1: Bradykinin
- 2: Angiotensin II
- 3: TRH
- 4: LHRH
- 5: Bombesin,
- 6: Leu-enk
- 7: Met-enk.
- 8: Oxytocin
- 9: Dynorphin

Tech. Prot. Chem. II, 3-19 (1991).

Influence du modificateur organique

Polaires ($\epsilon > 30$)		Apolaires ($\epsilon < 30$)	
Protiques	Aprotiques	Protiques	Aprotiques
Eau	ACN	EtOH	THF
MeOH	DMF	PrOH	Dioxane
	DMSO		

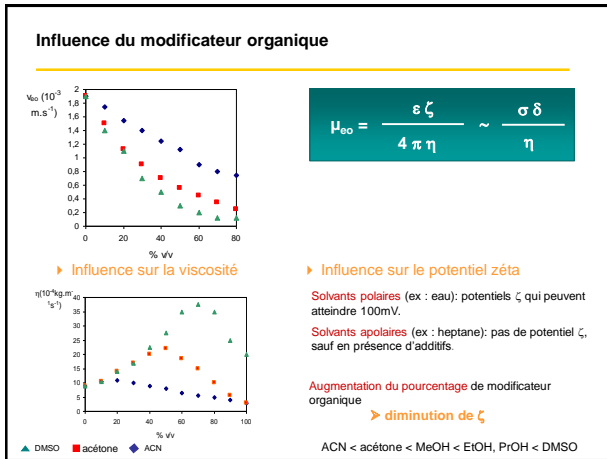
> Influence la mobilité et/ou les constantes de dissociation (pK_A, paires d'ions,...)

Influence du modificateur organique

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

- > Influence sur la viscosité
- > Influence sur le pH
- > Influence sur la solvation

Solvant	Cations	Anions
Eau	++	++
Méthanol	+/-	++
Ethanol	-	++
Acétonitrile	--	--

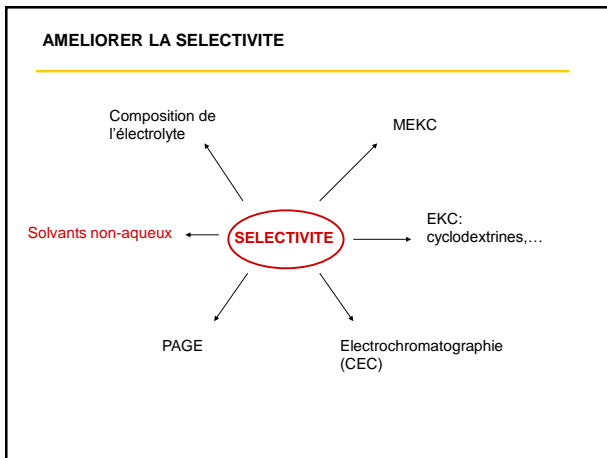


Règles générales :

On a DIMINUTION de la mobilité électroosmotique :

- ✓ lorsqu'on diminue le pH
 - diminution de σ
- ✓ lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte
 - diminution de δ
- ✓ lorsqu'on augmente le pourcentage de modificateur organique
 - diminution de ζ

ACN < acétone < MeOH < EtOH, PrOH < DMSO

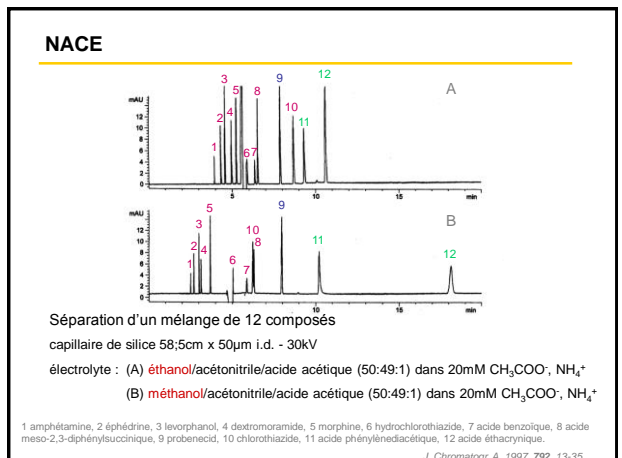
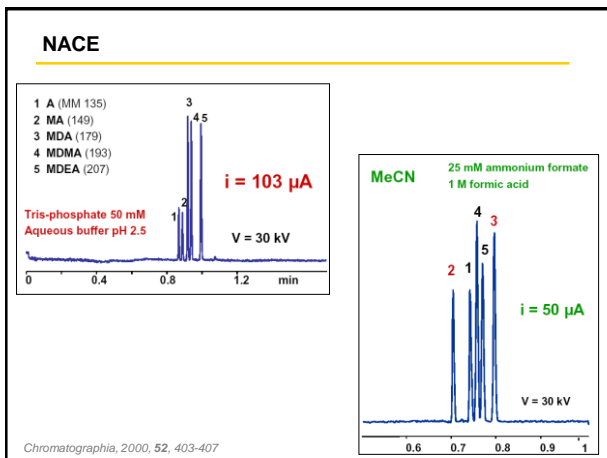


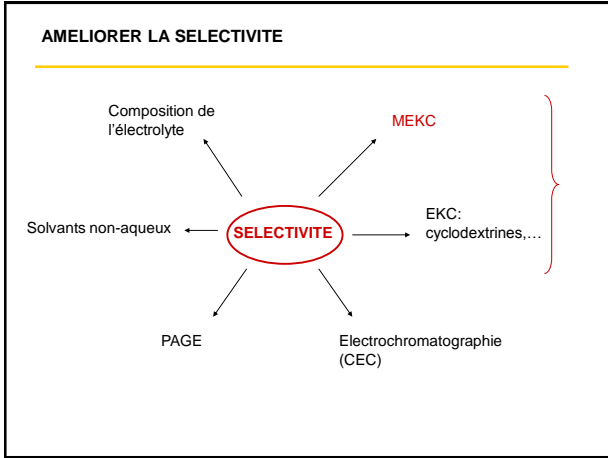
Intérêt des milieux non-aqueux

- ✓ faibles courants
- ❖ augmentation des diamètres des capillaires
 - └ semi-préparative
- ❖ augmentation de l'efficacité ($N/t \propto \epsilon/\eta^2$)

	ϵ/η	ϵ/η^2
eau	88,2	6924
méthanol	22,7	552
NMF	110,3	20075
acétonitrile	110,3	4136

- ✓ modification des sélectivités
- ✓ meilleure compatibilité avec la spectrométrie de masse
- ✓ augmentation des solubilités (ex: cyclodextrines)





Chromatographie électrocinétique

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- > électroosmose
- > électrophorèse
- > chromatographie

☞ Partage phase mobile/ phase « stationnaire » du soluté

☞ Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'une pseudo-phase stationnaire

➡ Pas de développement instrumental différent

➡ Séparation des molécules neutres

Séparation de molécules neutres

- > Mobilité non affectée par la présence d'un champ électrique
- > Co-élution de toutes ces molécules avec le flux électroosmotique

Stratégies :

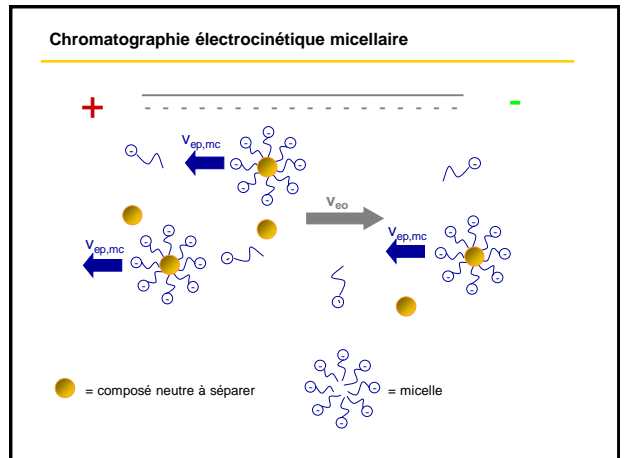
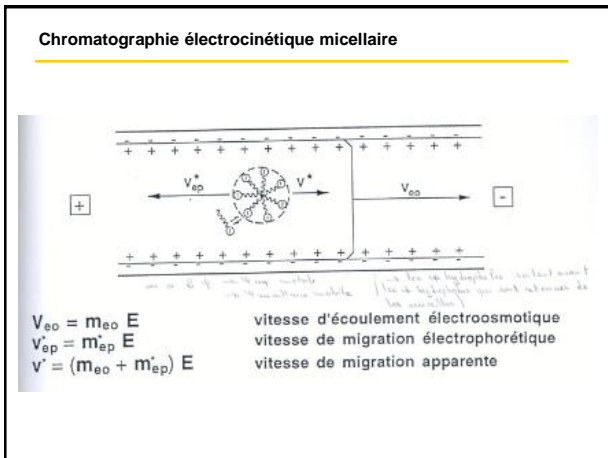
- Formation de complexes chargés
 - ex : composés faiblement hydrophiles en présence de tetrahexylammonium (THA⁺)
$$S + \text{THA}^+ \rightleftharpoons S(\text{THA})^+$$

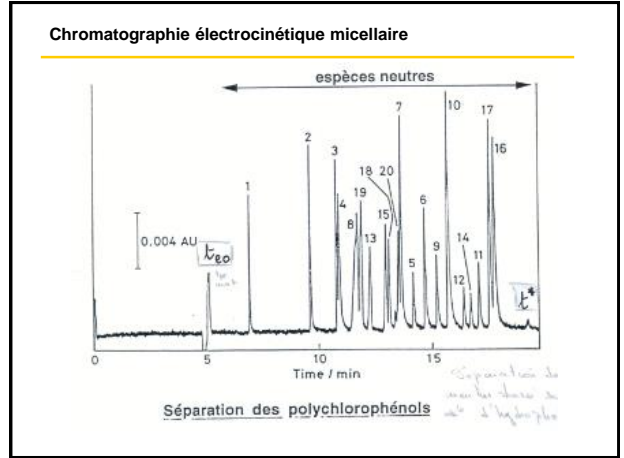
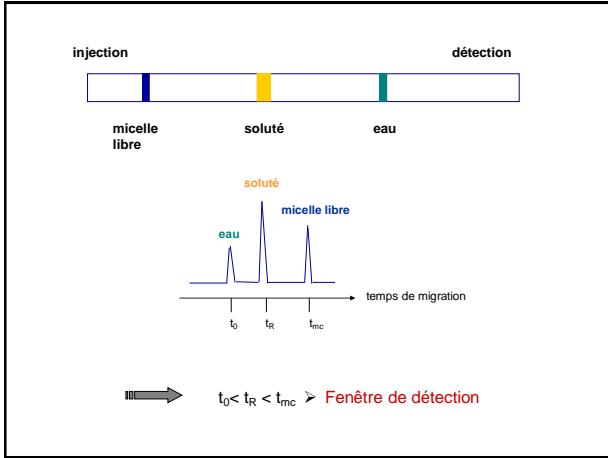
$$S(\text{THA})^+ + \text{THA}^+ \rightleftharpoons S(\text{THA})_2^{2+}$$
 - ex : catéchols en présence d'acide borique
- Micelles ioniques
 - > le plus couramment utilisé

Chromatographie électrocinétique micellaire

- > assez solubles dans l'électrolyte pour former des micelles
- > transparents à l'UV
- > micelles homogènes
- > micelles de faible viscosité

Surfactant	CMC(10 ⁻³ M) à 25°C dans l'eau
Sodium dodecylsulfate (SDS)	8.1
Sodium tetracyclisulfate (STS)	2.1 (50°C)
Sodium N-lauroyl-N-méthyltaurate (LMT)	8.7
Sodium cholate	13-15
Cetyltriméthylammonium bromide (CTAB)	0.92





Mobilité des solutés en MEKC

$$\mu_{\text{soluté}} = \frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}} \mu_{\text{eo}} + \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}} \mu_{\text{mc}}$$

fraction de soluté présent dans la micelle = $\frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$

fraction de soluté présent dans la phase aqueuse = $\frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$

$$k' = \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}}}$$

$$\frac{1}{1 + k'} = \frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}} \Rightarrow \mu_{\text{soluté}} = \frac{1}{1 + k'} \mu_{\text{eo}} + \frac{k'}{1 + k'} \mu_{\text{mc}}$$

$$\frac{k'}{1 + k'} = \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$$

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + (t_0/t_{\text{mc}})k'} t_0$$

Mobilité des solutés en MEKC

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + (t_0/t_{\text{mc}})k'} t_0$$

si $t_{\text{mc}} \rightarrow \infty \Rightarrow$ micelle = phase stationnaire

définition de t_R analogue à la définition donnée en chromatographie

$$t_R = (1 + k') t_0$$

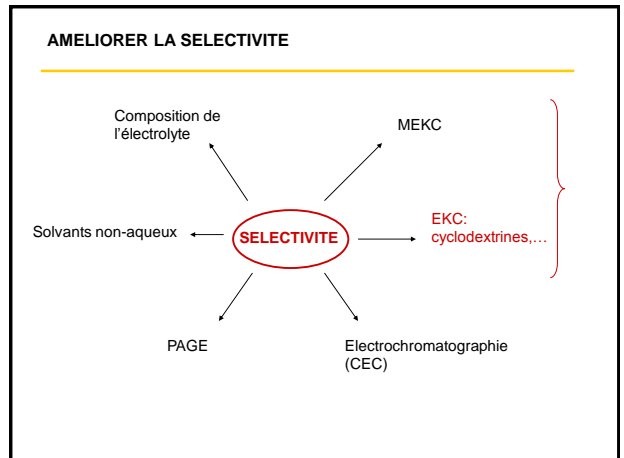
si $t_0 \rightarrow \infty \Rightarrow$ suppression du flux électroosmotique

les solutés auront une migration anodique

$$t_R = \frac{1 + k'}{k'} t_{\text{mc}}$$

Pseudo-phases utilisées en MEKC

- Micelles anioniques**
 - alkylsulfates, alkylsulfonates (C₁₂-C₁₈)
 - sels biliaires (cholate, taurocholate)
 - N-dodecanoyl-acide aminé
- Micelles cationiques**
 - alkyltriméthylammonium (C₁₀-C₁₈)
- Micelles mixtes**
 - octylglucoside - borate
 - SDS - N-dodécanoyl-acide aminé
 - SDS-Brij 35
 - octyltriméthylammonium-dodécyltriméthylammonium
- Micelles polymérisées**
 - poly(N-undécylényl-L-valinate)
- Polymères ioniques**
 - copolymères butylacrylate-butylméthacrylate-acide méthacrylique
 - copolymère butylméthacrylate-méthacryloyloxyéthyl-triméthylammonium
- Microémulsions**
 - tampon aqueux (86,6-91,1%)-SDS (6-1,5 %)-1-butanol (6,6 %) heptane, hexane, cyclohexane ou diéthylether (0,8 %) (p/p)
- Cyclodextrines ionisées**
- Dendrimères**
 - polyamidoamines



Séparations chirales (densité de charge identique)

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse

Principe reposant sur la reconnaissance chirale

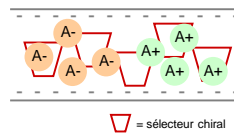
Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'un sélecteur chiral

➔ Pas de développement instrumental différent

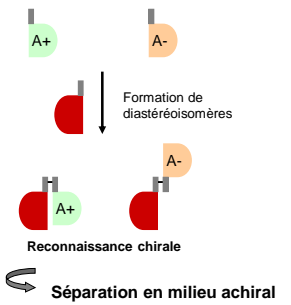
➔ Séparation des énantiomères

Séparations chirales (densité de charge identique)

Séparation directe



Séparation indirecte



Sélecteurs chiraux

Complexation de type inclusion

- ✓ α , β , γ -cyclodextrines
- ✓ éthers-couronnes
- ✓ antibiotiques macrocycliques

Partage dans des micelles

- ✓ acides biliaires
- ✓ α -hydroxy ou α -aminoacides à chaîne alkyle

Complexation de type chélation

- ✓ α -hydroxy ou α -aminoacides et métaux (Cu)

Formation de paires d'ions

- ✓ camphrosulfonates
- ✓ quinine et ses dérivés

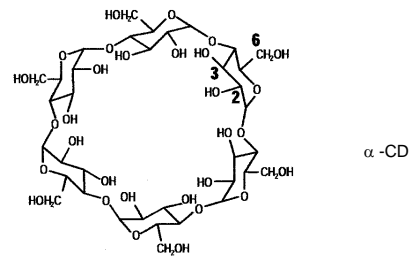
Association avec des polymères chiraux

- ✓ maltodextrines
- ✓ héparine, dextrans sulfonatés

Interaction par affinité

- ✓ protéines

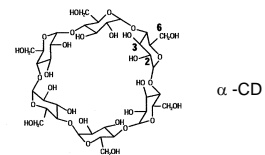
Les cyclodextrines



Caractéristiques des cyclodextrines

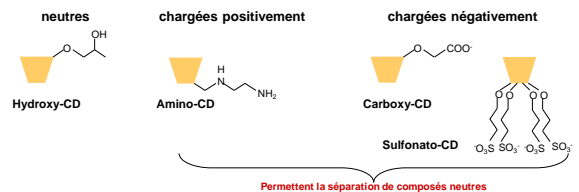
Cyclodextrine	α -CD	β -CD	γ -CD
nombre d'unités glucose	6	7	8
poids moléculaire	972.9	1135.0	1297.2
diamètre interne de la cavité/nm	0.47–0.52	0.62–0.64	0.75–0.83
diamètre/nm	1.46	1.54	1.75
hauteur de la cavité/nm	0.79–0.80	0.79–0.80	0.79–0.80
solubilité dans l'eau à 25°C	140mM	16mM	140mM

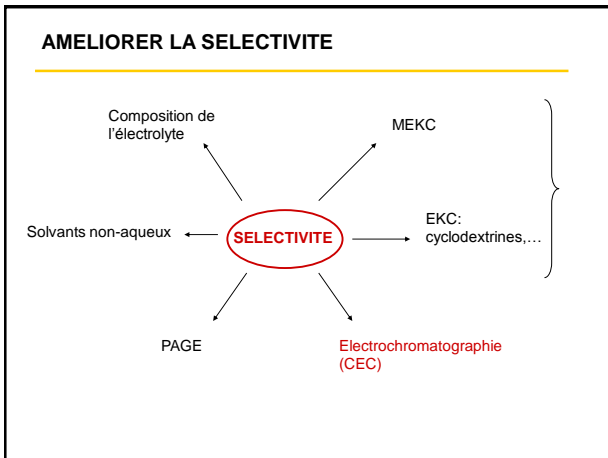
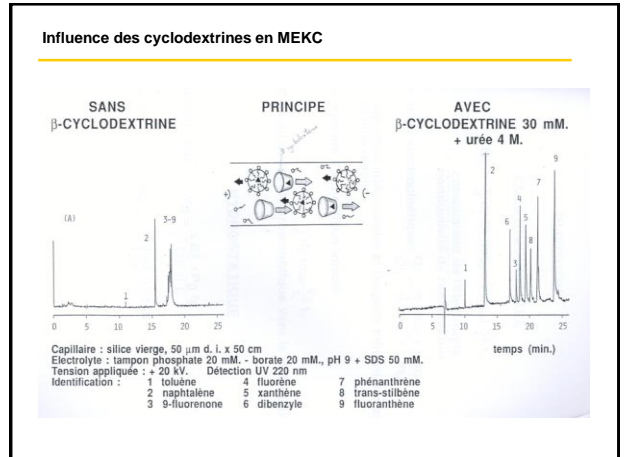
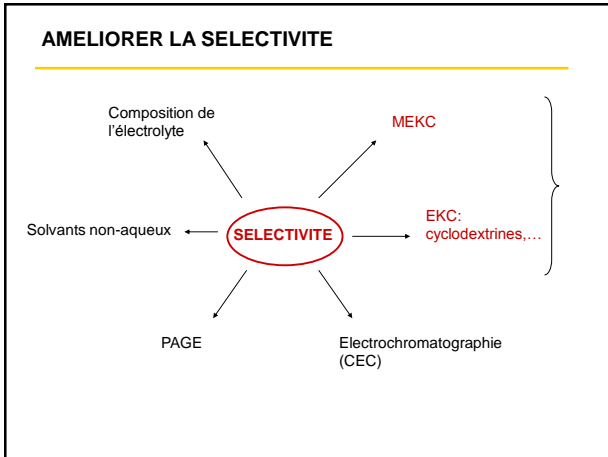
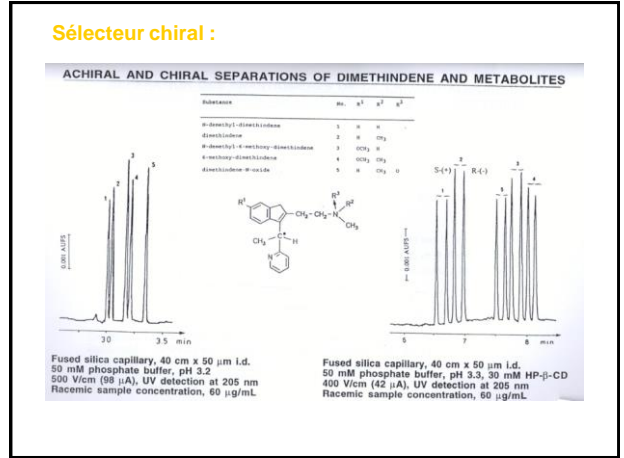
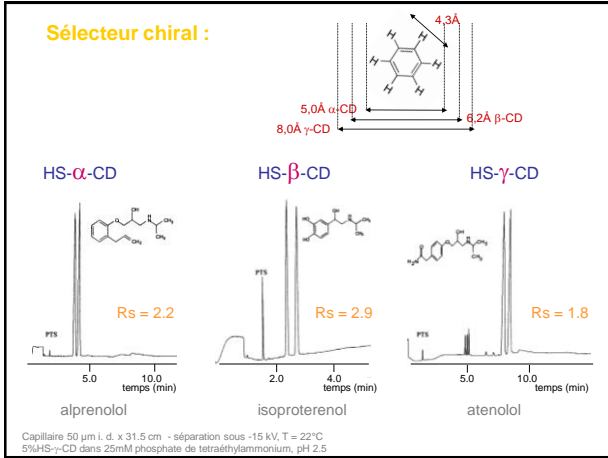
dans 4M urée : 89mM
dans 8M urée : 226mM



Il existe de nombreuses cyclodextrines modifiées :

➔ réaction avec les OH en positions 2,3 et 6





L'électrochromatographie

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse
- chromatographie

☞ Partage phase mobile/ phase stationnaire du soluté

☞ Mécanismes engendrés par la présence d'une phase stationnaire dans le capillaire

➡ Pas de développement instrumental différent, mais modification du capillaire

➡ **Séparation des molécules neutres**

L'électrochromatographie

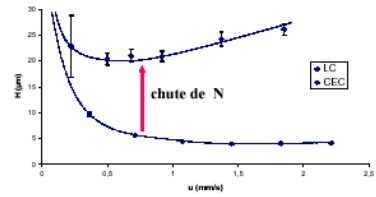
INTERET

- Sélectivité
- Capacité d'injection
- Très faible dispersion en phase mobile
- Très faible (absence de) perte de charge
- Utilisation de très fines particules
- Faible dispersion en phase stationnaire
- Très grande efficacité $h < 2$ pour $d_p < 5 \mu m$
- $N > 100\ 000 / m$
- Couplage avec la spectrométrie de masse

INCONVENIENTS

- Fabrication des colonnes
- Fragilité des colonnes
- Difficulté de contrôle du débit de la phase mobile
- Contraintes de composition de la phase mobile
- Difficultés de réalisation d'un gradient d'éluion
- Temps d'analyse assez élevés

Comparaison LC/CEC



Monolithe butyl. Phase mobile, tampon phosphate 5 mM pH 6,8 - acétonitrile (2/8). Composé, naphthalène.

L'électrochromatographie

HPLC

CEC

Rétention

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$$k_{CEC} = \frac{t_m - t_{eof}}{t_{eof}}$$

t_0 : temps de rétention du soluté

t_m : temps de migration du soluté

t_0 : temps d'éluion d'un soluté non-retenu

t_0 : temps de migration d'un soluté neutre et non-retenu

k_{CEC}

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Facteur de rétention: } k_C = \frac{t_m(1 + K_D) - t_{eof}}{t_{eof}} \\ \text{Facteur de vélocité } K_0 = \frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo, rempli}} \end{array} \right.$$

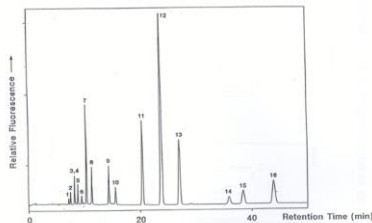
obtenue par expérience en CE dans les mêmes conditions d'électrolyte

Comparaison HPLC/ CE :

	HPLC	CE
Volumes de colonne classiques	4 mL	2 μ L
Volumes d'injection classiques	1-10 μ L	1-10 nL
Limites de détection	10^{-7} - 10^{-8} M	10^{-5} - 10^{-6} M

L'électrochromatographie

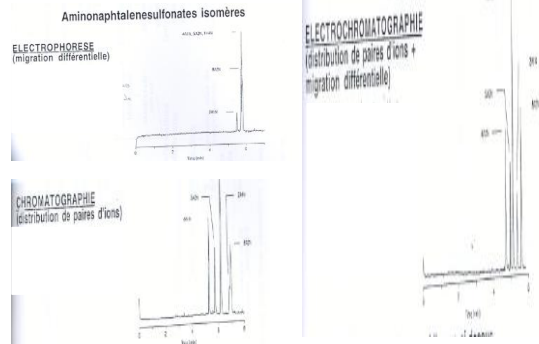
ELECTROCHROMATOGRAPHIE
colonne capillaire remplie



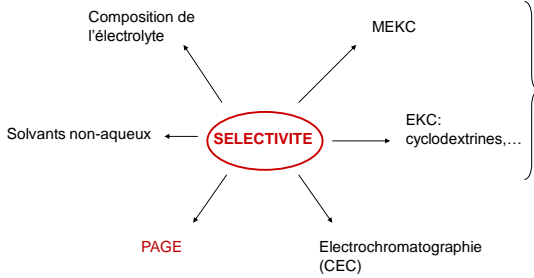
Colonne : silice vierge, 75 μm d.i. x 33 cm (partie remplie)
Phase stationnaire : silice C18, 3 μm . Phase mobile : ACN / NaBO₃ 4 mM (80 : 20) (v/v)
Tension appliquée : 15 kV. Détection : fluorescence laser, 257 / 400 nm. Injection électrocinétique : 5 kV, 5 s. Identification : 1 : naphthalène ; 2 : acénaphthylène ; 3 : acénaphthène ; 4 : fluorène ; 5 : phénanthrène ; 6 : anthracène ; 7 : fluoranthène ; 8 : pyrène ; 9 : benzo[*a*]anthracène ; 10 : chryseène ; 11 : benzo[*b*]fluoranthène ; 12 : benzo[*k*]fluoranthène ; 13 : benzo[*a*]pyrène ; 14 : dibenz[*a,h*]anthracène ; 15 : benzo[*ghi*]péryène ; 16 : indeno[1,2,3-*cd*]pyrène

C. Yan et al., 1995

Séparation en CEC de composés anioniques de mobilités voisines



AMELIORER LA SELECTIVITE



Electrophorèse en gel de polyacrylamide

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse

Principe reposant sur le « tamisage » de l'électrolyte à l'aide d'un polymère

Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'un polymère

➡ Pas de développement instrumental différent

➔ Séparation par exclusion stérique

Electrophorèse en gel de polyacrylamide



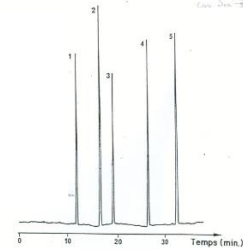
Ajout d'un polymère dans l'électrolyte pour créer un tamis dont on peut contrôler les mailles

Séparation des composés qui ont une répartition uniforme de la charge

Séparation suivant la masse ➔ gain en sélectivité

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

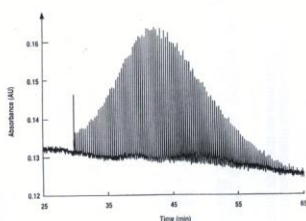
SEPARATION DE LA MYOGLOBINE ET DE SES FRAGMENTS



Capillaire: 75 µm d.l. x 20 cm; caractéristiques du gel: T=12,5%, C=3,3%.
 Electrolyte: tampon TRIS-phosphate 0,1 M, pH 6,9, SDS 3,5 mg/l (0,1%),
 urée 8 M V = 8 kV (I = 3,4 µA) Détection UV
 Identification: 1; fragment III (pH=2510); 2; fragment II (pH=6210); 3;
 fragment I (pH=8150); 4; fragments I et II (pH=14400); 5; myoglobine
 (pH=17000)

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

SEPARATION DE POLYNUCLEOTIDES.



Capillaire : µPAGE-5, 75 µm d.l. x 75 cm (détection, 50 cm), rempli de gel de polyacrylamide, 5% T, 5% C
 Electrolyte : tampon Tris-borate 100 mM, pH 8,3 + urée 7 M.
 Tension appliquée : 18 kV. Détection UV 260 nm
 Echantillon : acide polydéoxyadénylique p(dA), 20-150 bases.

(K. A. Turner, 1991)

Caractéristique des gels permanents et non permanents

CAPILLAIRES REMPLIS DE GELS PERMANENTS DE POLYACRYLAMIDES RETICULES

Préparation délicate
 Hétérogénéités
 Contraintes d'utilisation (électrolyte, stockage)
 Faible durée de vie
 Coût élevé
 Absorbance UV
 Excellente résolution des fragments d'ADN légers et lourds

CAPILLAIRES REMPLIS DE SOLUTIONS DE POLYMERES HYDROPHILES NON-CHARGES (CELLULOSES, AGAROSES)

Préparation simple
 Grande homogénéité
 Souplesse d'utilisation
 Renouvellement aisé
 Faible coût
 Transparence UV
 Bonne résolution des fragments légers d'ADN

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

INJECTION

Modes d'injection les plus courants : par injection directe dans le capillaire

- injection hydrodynamique
- injection électrocinétique

La quantité d'échantillon injectée Q est définie comme suit :

$$Q = l \cdot \pi r^2 \cdot C$$

avec l , la longueur de la zone échantillon
 r , le rayon du capillaire
 C , la concentration du soluté

Injection hydrodynamique

par siphonnage ou gravité,

réalisé en plaçant une extrémité du capillaire dans la solution-échantillon et en plaçant celle-ci à une hauteur supérieure à l'autre extrémité.

La longueur l du segment injecté est proportionnelle :

au temps d'injection t_{inj} ,

à la vitesse hydrodynamique v_{hd} , définie par la loi de Poiseuille

$$v_{hd} = \frac{\rho \cdot g \cdot r^2 \cdot \Delta h}{8 \eta \cdot L}$$

$$Q_{inj} = \frac{\rho \cdot g \cdot \pi r^4 \cdot \Delta h \cdot C \cdot t_{inj}}{8 \eta \cdot L}$$

Injection hydrodynamique

par différence de pression,

réalisé en appliquant aux extrémités du capillaire une différence de pression ΔP_0

La longueur l du segment injecté est proportionnelle :

au temps d'injection t_{inj} ,

Le volume d'échantillon injecté

$$V_{inj} = \frac{\pi r^4 \cdot \Delta P_0 \cdot t_{inj}}{8 \eta \cdot L}$$

Injection électrocinétique

ou injection par électromigration

réalisée en plaçant une extrémité du capillaire dans la solution-échantillon et en appliquant une différence de potentiel.

$$l = t_{inj} (v_{eo} + v_{ep})$$

$$Q_{inj} = \frac{(M_{eo} + M_{ep}) V \cdot \pi r^2 \cdot C \cdot t_{inj}}{L}$$

La mobilité électrophorétique intervenant dans l'équation, la **quantité injectée sera différente** pour tous les composés du mélange.

L'équation n'est valable que si la **conductivité de l'échantillon et celle du tampon sont identiques**.

Ce mode d'injection est particulièrement utile en **électrophorèse capillaire sur gel**.

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

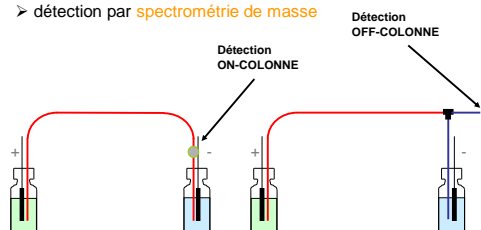
- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

DETECTION

LES PLUS COURANTS:

- détection UV
- détection par fluorescence
- détection par spectrométrie de masse



ON-COLONNE : MODE DIRECT

Détection directement sur le capillaire, à proximité d'une des extrémités

➤ opérée à travers une fenêtre réalisée par enlèvement de la gaine protectrice du capillaire.

➤ Détection UV

➤ nécessite l'utilisation de capillaires transparents jusqu'à 170nm si possible

équipe la plupart de appareils commerciaux

❖ sensibilité limitée à cause de la faible capacité de chargement des capillaires et de leur faible diamètre : $\sim 10^{-5}$ mol.L⁻¹

ex : phénol, LOD = 67 fmol

❖ développement de capillaires à bulle, en Z pour augmenter le trajet optique



ON-COLONNE : MODE DIRECT

Détection directement sur le capillaire, à proximité d'une des extrémités

➤ opérée à travers une fenêtre réalisée par enlèvement de la gaine protectrice du capillaire.

➤ Détection par fluorescence

➤ généralement bien adaptée aux capillaires de silice fondue qui présentent une faible luminescence

généralement réalisée par dérivatisation préalable des solutés :

- ❖ dérivés dansyl/fluorescein-thiocarbamyl des acides aminés
- ❖ fluorescamine pour les acides aminés, les peptides

ex : α -chymotrypsinogène, LOD = 2 fmol

domaine dynamique linéaire : 10^{-3} - 10^{-7} M

CE-LIF commercialisée avec un laser argon à 488nm

OFF-COLONNE

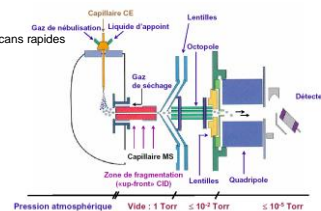
➤ Détection par spectrométrie de masse

➤ nécessite de concevoir une interface adaptée

⊙ assurer le maintien du champ électrique

⊙ diminuer les effets d'aspiration

⊙ utiliser des analyseurs permettant des scans rapides



Interface basée sur le mode ESI/MS

appliquée aux sels d'ammonium, amines, dipeptides

ex : pour les ions simples, LOD = 10 amol

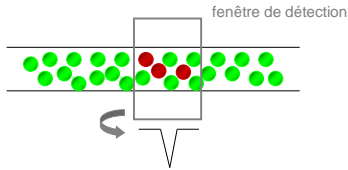
Méthode	LDD (mol)	LDD (M)	Avantages/ inconvénients
UV- Vis	10^{-13} - 10^{-16}	10^{-6} - 10^{-8}	Universel Possibilité d'information spectrale
Fluorescence	10^{-15} - 10^{-17}	10^{-7} - 10^{-9}	Sensible Requiert souvent une dérivatisation
Fluorescence induite par laser	10^{-18} - 10^{-20}	10^{-14} - 10^{-16}	Extrêmement sensible Requiert souvent une dérivatisation Cher
Ampérométrie	10^{-18} - 10^{-19}	10^{-10} - 10^{-11}	Sensible Sélective mais seulement pour analytes électroactifs Requiert une électronique spéciale et des modifications du capillaire
Conductivité	10^{-15} - 10^{-16}	10^{-7} - 10^{-8}	Universel Requiert une électronique spéciale et des modifications du capillaire
Spectrométrie de masse	10^{-16} - 10^{-17}	10^{-8} - 10^{-9}	Sensible Informations structurales
Détection indirecte (UV, fluorescence, ampérométrie)	10 - 100 moins qu'en direct		Universel Plus faible sensibilité qu'en direct

Optimisation de la sensibilité

1. Préconcentration en ligne avant séparation
2. Isotachophorèse (ITP)

ON-COLONNE : MODE INDIRECT

Déplacement d'une substance ionique (co-ion) du tampon par l'ion à analyser



Co-ion :

Charge: de même signe que les analytes

Mobilité: voisine de celle des analytes

Absorbance: forte

Concentration: ne doit pas induire une absorbance hors du domaine de linéarité du détecteur

Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique

Conductivité de la zone échantillon (κ_0) < Conductivité de l'électrolyte (κ)

Champs électriques $E_0 > E$

$$\Delta E = \frac{V}{L_0 + \frac{\kappa_0}{\kappa} L_0}$$

Limitations

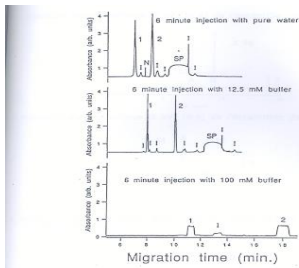
- Dispersion axiale (en présence d'électroosmose)
- Effet Joule

Conditions optimales (injection hydrodynamique)

- Tension faible
- $B < \kappa / \kappa_0 < 10$
- Volume injecté : x à 10

→ facteur de préconcentration: 8 à 10

Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique



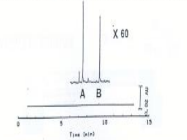
Capillaire : 75 μ m d.i. x 100 cm (détection, 85 cm)
 Electrolyte : tampon MES-His 100 mM, pH 6,1
 $V_e = 30$ kV, détection UV, 288 nm
 Injection hydrodynamique par gravité ($\Delta h = 15$ cm, volume = 100 nL)
 Echantillon : 1 : PTH-Arg $3,6 \cdot 10^{-5}$ M ; 2 : PTH-His $3,6 \cdot 10^{-5}$ M ;
 1 : impuretés ; SP : solvant échantillon

R.-L. Chien et coll., 1991

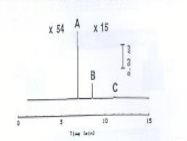
Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique

Injection électrocinétique

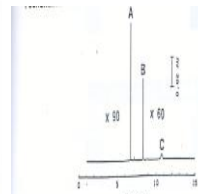
• Injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'électrolyte



• Injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'eau



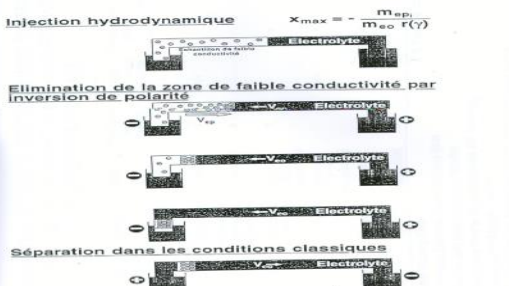
• Injection d'eau par gravité puis injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'eau



Capillaire: silice fonde, 75 μ m d.i. x 100 cm (détection, 75 cm)
 Electrolyte: tampon MES-HIS 100 mM, pH 6,2
 Tension appliquée: +30 kV ; détection UV 254 nm
 Lésion/capillaire: A: PTH-Arg $3,6 \cdot 10^{-5}$ M ; B: PTH-His $3,6 \cdot 10^{-5}$ M ; C: marqueur neutre

(R.-L. Chien et coll., 1991)

PRÉCONCENTRATION EN LIGNE DE GRANDS VOLUMES PAR AMPLIFICATION DU CHAMP ÉLECTRIQUE (solutés anioniques, capillaire en silice vierge)



R. L. Chien, D. S. Burgi, 1992
 M. Albert, L. Debusschère, C. Demasay, J. L. Rocca, 1997.

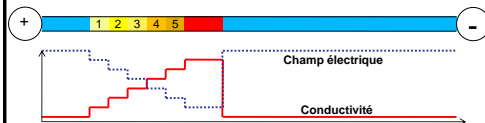
Etape de préconcentration

■ Intégration d'une phase transitoire d'isotachophorèse (ITP)

➢ Préconcentration des analytes dans un gradient de conductivité



- ✓ L'électrolyte support est un électrolyte terminal (HCOOH)
- ✓ L'échantillon contient un ion meneur (NH_4^+)



✓ Formation transitoire d'un gradient de conductivité

- ➔ Stabiliser les zones d'analytes
- ➔ Injection de larges zones d'échantillons

L'isotachophorèse (ITP)

$m_T < m_K < m_J < m_Z < m_L$

Résultats préconcentration

Etape de tITP

Capillaire silice fondue 60 cm x 75 µm d.i. (10 cm au détecteur) avec greffage dynamique HPC; Voltage : - 25 kV ;
 Température : 25°C ; Détection UV à 200 nm ; Electrolyte : acide formique 50 mM, pH 2,7 ; Echantillon : digeste de BSA 20 pmol/µL.

A : Echantillon avec plug de meneur, Volume d'injection 10% du capillaire
B : Echantillon sans plug de meneur, Volume d'injection 10% du capillaire

L'isotachophorèse (ITP)

Electrophorèse de zone

$V_0 = 0,5 \mu\text{L}$
 α -caséine 5 pmol / L

Isotachophorèse - électrophorèse de zone

$V_0 = 0,5 \mu\text{L}$
 α -caséine 15 pmol / L

ITP : LE : acétate d'ammonium 50 mM
 TE : bétaïne 50 mM - acétate 50 mM, pH 3,3
 EZC : électrolyte : bétaïne 50 mM - acétate 50 mM, pH 3,3

C. Schwer, 1993.

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire
 - 1.1 Mobilité électrophorétique
 - 1.2 Phénomène d'électroosmose
2. La séparation en électrophorèse capillaire
 - 2.1 Efficacité
 - 2.2 Résolution
3. L'amélioration de la sélectivité
4. L'analyse quantitative
 - 4.1 Injection
 - 4.2 Détection
 - 4.3 Mesure des surfaces de pics
5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

CIEF

$\text{pH}_A < \text{pI}_i < \text{pI}_j < \text{pI}_k < \text{pH}_C$

CARACTERISTIQUES

Séparations d'ampholytes
 Migration dans un gradient de pH, en absence d'électroosmose
 Trois électrolytes différents
 Vitesses de migration décroissantes
 Existence d'un état stationnaire
 Effet de concentration, fronts de séparation étroits
 Limitations : instabilité du gradient de pH
 convection
 Résolution : $\Delta(\text{pI}) = 0,05 \text{ pH}$

CIEF

STABILISATION DU GRADIENT DE PH

(vis-à-vis de la convection et de la diffusion)

Ampholytes porteurs de conductivité uniforme
 (Vesterberg, 1966)

Electrolytes à gradient de densité

Gels de polyacrylamide de faible concentration

Gradients de pH immobilisés
 (Righetti, Bjellquist, 1982-85)

Tubes capillaires

CIEF

ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE
(couplage IEF - PAGE)

Séparation des protéines selon leur point isoélectrique et leur masse moléculaire

1^{ère} dimension
IEF en gradient de pH immobilisé

Conditions classiques : gel mince de polyacrylamide, 20 x 0,15 cm
T - 3-4 %, C - 0,3 % ; pH 3-10
urée 8 M, DTT 10 mM,
CHAPS 1 % ou glycérol 5 %
Quantité d'échantillon protéique : 100 µg (1-5 mg/mL)
Durée de la focalisation : 16-20 h

Etape intermédiaire
Elimination de l'urée et des ampholytes
Dénaturation

Conditions classiques : tampon TRIS-phosphate pH = 7,
glycérol 40 %, DTT 60 mM, SDS 3 %

2^{ème} dimension
électrophorèse de zone en milieu dénaturant

Conditions classiques : gel mince de polyacrylamide,
20 x 30 x 0,15 cm
(T = 19 %, C = 0,3 %)
tampon TRIS-HCl, pH 8,6, SDS 0,1 %
Durée de la migration : 7-8 h

