

Université de Montréal

Impact du résidu voisin sur le pK_a des peptides et leurs mobilités en électrophorèse capillaire

Obayda Debs

Département de chimie
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et
postdoctorales en vue de l'obtention du grade
de Maître ès sciences (M.Sc.) en Chimie

Avril, 2016

©, Obayda Debs, 2016

Résumé

Tous les modèles théoriques, mathématiques et empiriques utilisés pour l'évaluation de la mobilité électrophorétique de peptides regroupent trois paramètres de base : la masse du peptide, son nombre de résidus (sa longueur) et sa charge. Or, ces modèles ont une faiblesse commune qui est le paramètre de charge (q). Lors de l'estimation de cette variable, l'usage d'approximation pour les constantes de dissociation acide (pK_a) des groupes ionisables des peptides entraîne une erreur sur ce calcul. Une solution utilisée par plusieurs auteurs est de développer les modèles pour la mobilité à bas pH seulement en assumant la protonation complète de tous les groupes acides et basiques.

Afin de comprendre l'effet du résidu acide aminé (a.a.) voisin sur l'ionisation des groupes carboxyles et amines terminaux (C' et N') d'un peptide, les valeurs de pK_a de plusieurs séries de peptides ont été déterminés par CE suite à l'optimisation d'une méthode. Les peptides étudiés étaient de type Z-X et X-Z où X est un ou plusieurs résidus voisins variable tandis que Z est un résidu invariable tel la phénylalanine, la glycine et l'alanine. L'objectif primaire de ce projet consistait à déterminer les valeurs réelles du pK_a des groupes C' et N' de 69 peptides afin d'élucider l'effet de leur environnement immédiat, i.e., le résidu voisin. Ce travail systématique de compilation des pK_a est une approche rarement utilisée. En ayant accès à ces valeurs, la source d'incertitude sur les constantes d'ionisation des peptides auquel font face beaucoup d'auteurs est éliminée. Ceci permet une analyse plus approfondie de leur comportement électrophorétique.

Pour la série de dipeptides étudiés, nous avons observé que plus l'hydrophobicité du résidu X augmentait, plus les pK_a C' et N' baissait selon le résidu Z. Les résidus X hydrophiles possèdent des chaînes latérales chargées ou très polaires qui influencent de façon plus importante le processus d'ionisation que les résidus X hydrophobes. Les données analysées ont aussi permis de déterminer que plus la distance du résidu X au C' ou N' est grande, plus son influence sur le pK_a diminue.

Également, le prolongement d'un peptide de 1 à 6 résidus, tel les oligoglycines, fait augmenter le pK_a -C' et diminuer le pK_a -N' via un processus expliqué par la réduction des interactions électrostatiques entre les fonctions C' et N'. Ces résultats illustrent que les pK_a C' et N' de peptides ne sont pas exacts lorsqu'ils sont basés uniquement sur l'identité de l'acide aminé terminal, comme c'est le cas pour l'approche classique de modélisation.

Les valeurs de pK_a de dipeptides obtenus par titrages potentiométriques ont été comparés aux pK_a déterminés par CE. Des écarts importants ont été obtenus ce qui a mis en lumière la nécessité de contrôler les protocoles expérimentaux de manière rigoureuse pour mieux comparer les résultats provenant de deux techniques.

Par la suite, à l'aide des mobilités de peptides obtenus expérimentalement à haut et bas pH, nous avons comparé les résultats de modélisations calculés pour les pK_a expérimentaux à ceux de la littérature afin d'évaluer les avantages du modèle d'Offord. Enfin, des simulations de séparations par CE de 9 peptides obtenues avec le programme informatique PeakMaster ont été comparées avec les résultats expérimentaux. Ceci a démontré l'utilité et la supériorité des pK_a expérimentaux comparativement aux pK_a les plus communément utilisés avec les approches traditionnelles.

Mots clés : Électrophorèse capillaire / mobilité peptidique / charge peptidique / modèle théorique / pK_a / simulation de séparation.

Abstract

All theoretical, mathematical and empirical models used to evaluate the electrophoretic mobilities of peptides use three basic parameters: the peptide mass, its number of residues (its length) and its charge. However, all models have a common flaw: the charge parameter (q). When estimating this variable, the use of approximations for the ionization constants (pK_a) leads to imprecise values for the calculation. One solution is to limit the development of mobility models to only low pH and assume full protonation of all acidic and basic groups.

In order to understand the effect of the neighboring amino acid (a.a.) residue on the terminal carboxylate and amine functions of a peptide (C' et N'), the pK_a values of multiple series of peptides were determined by capillary electrophoresis (CE) using an optimized method. The peptides studied were of the form $Z-X$ and $X-Z$, where X was one or multiple variable residues and Z was an invariable residue such as phenylalanine, glycine or alanine. The core of this project consisted of determining the actual C' and N' pK_a values for 69 peptides to elucidate the effect of their immediate microenvironment. i.e., the effect of their nearest neighbor. This systematic compilation of pK_a 's is an approach that is rarely used. With these values on hand, the uncertainty of the ionisation constant that most authors face is almost eliminated and the analysis of the electrophoretic behavior of peptides can be enhanced.

For the peptides studied, we observed that increasing the hydrophobicity of residue X lead to a decrease in C' and N' pK_a values, but to different degrees depending on the terminal residue (Z) studied. Hydrophilic X residues possess charged or highly polar side-chains, which influenced C' and N' ionisations to a greater degree than hydrophobic X residues. Additionally, the elongation of a peptide from one to six residues, such as the oligoglycine series studied, lead to an increase in pK_a-C' and a decrease in pK_a-N' , which might be explained by a diminishing electrostatic interaction between the C' and N' functional groups. These results illustrate that the C' and N' pK_a values for peptides are not accurate when based solely on the identity of the C' and N'

a.a. residues, which is the classical way peptide charge is estimated for modeling not only mobilities but also chemical and biological reactivity.

Potentiometric titration of dipeptides produced pK_a values that were compared to pK_a 's determined by CE. Significant discrepancies were obtained which brought to light the necessity of rigorously controlling experimental protocols when comparing results obtained with two techniques.

Mobility data for high and low pHs were calculated using experimental and literature tabulated pK_a values to estimate charge and to therefore understand the benefit gained when applying the Offord mobility model. Finally, simulations of separating 9 peptides by CE were carried out with the computer program PeakMaster and compared with experimental results. This showed the utility and superiority of our cumulated pK_a values versus the most widely cited approximate pK_a values from the literature.

Key words: Capillary electrophoresis / peptide mobility / peptide charge / theoretical models / pK_a / separation simulation.

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiv
1 • Introduction.....	1
1.1 Détermination du pK_a par titrage potentiométrique.....	5
1.2 Détermination du pK_a par électrophorèse capillaire.....	6
1.2.1 Description mathématique	7
1.2.2 Analyse graphique.....	10
1.3 Solutions tampons pour la CE	13
1.3.1 Construction de tableaux pour la préparation de tampons	13
1.3.2 Contrôle de la force ionique, du pouvoir tampon et de la température.....	15
1.3.3 Modification électrolytique du tampon.....	17
1.4 Les modèles de mobilité peptidique en CE	18
1.4.1 Paramètre de taille.....	19
1.4.2 Paramètre de charge	22
1.4.3 Valeurs des pK _a	23
1.4.4 Échelles d'hydrophobicité.....	24
1.4.5 Programmes de simulation informatique	25
1.5 Objectifs de l'étude	25
2 • Partie expérimentale.....	27
2.1 Produits et matériels	28
2.2 Appareillage.....	29
2.3 Détermination expérimentale du pK_a par CE.....	29
2.4 Détermination expérimentale du pK_a par POT	31
2.5 Détermination expérimentale de la mobilité limite.....	31
3 • Résultats et discussion	33

3.1	Choix des conditions expérimentales.....	34
3.2	Détermination des pK_a de peptides	37
3.2.1	Allure des électrophérogrammes.....	37
3.2.2	Choix de la méthode et reproductibilité	38
3.2.3	Provenance des erreurs.....	44
3.2.4	Effet de la force ionique sur les pK _a de peptides	46
3.3	Effet de la nature du résidu voisin sur l'ionisation du peptide.....	50
3.3.1	Origines des tendances observées pour les dipeptides.....	50
3.3.2	Effet de la distance du résidu variable et de la longueur du peptide.....	56
3.3.3	Comparaison des pK _a obtenus par CE et titrage potentiométrique (POT).	60
3.4	Implication sur les modèles de prédiction de la mobilité électrophorétique de peptides en CE.....	63
3.4.1	Comparaison des pK _a expérimentaux avec les pK _a de Rickard.....	63
3.4.2	Calculs avec modèles semi-empiriques choisis	66
3.4.3	Simulation de séparation en CE avec le logiciel PeakMaster	72
4	• Conclusion	76
5	• Références.....	82
6	• Annexe.....	xv

Liste des figures

- Figure 1 :** Courbe de titrage théorique d'un peptide amphotère par potentiométrie. La ligne solide noire (—) représente le résultat simulé d'une titration V_b versus pH [44]. La ligne solide bleue (—) représente la première dérivée des résultats V_b versus dpH/dV_b permettant de déterminer les points équivalents. 6
- Figure 2 :** Comportement graphique attendu des trois types de peptides analysés par CE dans cette étude. Soit (A) Amphotère (B) Mono acide / di base (C) Di acide / mono base. 12
- Figure 3 :** Graphiques de la loi d'Ohm permettant de déterminer le voltage de travail. Les différentes courbes représentent des tampons H_3PO_4/NaH_2PO_4 à pH 7,00 de différentes forces ioniques (I) tel qu'indiqué dans la légende du graphique. La ligne en tirets (---) représente la limite de puissance ($W = V \times i = 1,8$) établie qu'il ne faut pas dépasser. La barre verticale pointillée bleue (\cdots) représente la gamme de courants expérimentaux obtenus avec tous les tampons au voltage expérimental choisi de 15 kV. Les paramètres de la méthode sont $L_t = 31,2$ cm ; $L_d = 20,9$ cm 35
- Figure 4 :** Allure d'une série d'électrophérogrammes à plusieurs pH pour l'analyse d'un mélange du dipeptide FF et du marqueur de flux électro-osmotique DMSO. Le pic du DMSO n'est pas montré aux pH 2,60 et 3,03, car il migre plus loin. Paramètres de l'analyse : $I = 40$ mM ; $V = 15$ kV ; $L_t = 31,1$ cm ; $L_d = 21,2$ cm. 38
- Figure 5 :** Courbes de titrages par CE pour le dipeptide GG effectuée avec la méthode systématique en triplicata (haut) et alternative (bas). Les résultats de la régression non linéaire sont résumés dans l'encadré à l'intérieur de chaque graphique. Paramètres de l'analyse *idem* aux tableaux IV et V..... 43
- Figure 6 :** Étude de la distribution des erreurs moyennes pour les mobilités électrophorétiques d'une série de peptides amphotères dans leur état cationique (■), presque neutre (●), anionique (▲) et de la mobilité du EOF (○). La variation du EOF (*) avec le pH est présenté dans le coin supérieur droit du graphique. Paramètres de l'analyse *idem* au tableau V..... 45
- Figure 7 :** Effet de la force ionique sur les pK_a-N' (■) et pK_a-C' (●) du peptide FF déterminés par CE. Paramètres de l'analyse : I variable ; $V = 15$ kV ; $L_t = 31,3$ cm ; $L_d = 21,3$ cm. Les lignes en tirets (---) montrent des régressions tentatives, approximatives et non formelles. 48

- Figure 8 :** Effet de la force ionique sur les pK_a-N' (■) et pK_a-C' (●) du peptide AF déterminés par CE. Paramètres de l'analyse, idem figure 7. Les lignes en tirets (- -) montrent des régressions tentatives, approximatives et non formelles. 49
- Figure 9 :** Relation entre l'échelle d'hydrophobicité Kyte-Doolittle [130] et l'échelle de polarité de Grantham [145] pour les a.a. naturels. Les étiquettes au-dessus de chaque point donne l'identité de l'a.a. 51
- Figure 10 :** Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-N' des a.a. Gly, Ala et Phe présents en début de chaîne de divers dipeptides de type G-X, A-X et F-X. L'identité du résidu voisin est donnée dans les cercles pleins présents dans le graphique. Pour fin de simplification de la présentation, les barres d'erreurs ont été omises. Les erreurs varient généralement entre $\pm 0,01$ à $\pm 0,09$ avec quelques exceptions entre $\pm 0,11$ à $\pm 0,50$. La liste complète des valeurs de pK_a ainsi que leurs erreurs est présentée dans l'annexe 4. 53
- Figure 11 :** Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-C' de l'a.a. Phe présent en fin de chaîne de divers dipeptides de type X-Phe. L'identité du résidu voisin X est donnée dans les cercles pleins présents dans le graphique (nomenclature à une lettre)..... 54
- Figure 12 :** Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-N' de l'a.a. Gly présent en début de chaîne de divers tripeptides de forme Gly-Gly-X. L'identité du résidu voisin est donnée dans les cercles pleins (nomenclature à une lettre) présent dans le graphique. 57
- Figure 13 :** Variation des pK_a-C' (●) et pK_a-N' (■) d'oligoglycines G_n à 25°C en fonction de n, le nombre de résidus G. Toutes les valeurs sont corrigées pour la force ionique selon l'équation (7) pour pouvoir obtenir des pK_a thermodynamiques et les comparer aux valeurs de la littérature [149] (étoiles rouges et bleues)..... 59
- Figure 14 :** Comparaison des valeurs de pK_a-N' ($I = 40$ mM) obtenues par CE et POT pour les séries de dipeptides Phe-X (●), Ala-X (▲) et Gly-X (■). L'acide aminé X est représenté pas la lettre correspondante. La ligne en tirets (---) représente la concordance théorique parfaite entre les deux méthodes..... 61
- Figure 15 :** Comparaison entre les valeurs de pK_a de Rickard (○) et l'étendu des valeurs de pK_a obtenus expérimentalement par CE pour A) les fonctions acides (barres rouges, C' et chaînes latérales) et B) les fonctions basiques (barres bleues, N' et chaînes latérales) pour des a.a. choisis..... 64
- Figure 16 :** Corrélation des valeurs $q/M^{2/3}$ avec les mobilités électrophorétiques expérimentales pour tous les peptides analysés a haut pH (■ ; pH 9,0-11,6 ; 50 peptides) et bas pH (● ; pH 2,0 ; 63 peptides). Les valeurs pour (q) des carrés bleus

et cercles rouges ont été calculés avec les pK_a expérimentaux tandis que les valeurs pour les petits cercles gris (●) ont été calculées avec les pK_a de Rickard. Les peptides avec valeurs hors tendance sont identifiés et indiqués par des flèches. Une ligne bissectrice (---) est ajoutée pour un support visuel. Les résultats des régressions linéaires sont présentés au tableau VIII. 68

Figure 17 : Résultats de simulation de séparations électrophorétiques obtenus pour neuf peptides avec le programme PeakMaster comparés avec les résultats expérimentaux obtenu par CE. Les mobilités limites expérimentales ont été utilisées pour les deux simulations. A) Électrophérogramme simulé en utilisant les pK_a de Rickard B) Électrophérogramme simulé en utilisant les pK_a expérimentaux C) Électrophérogramme expérimental. Identification des pics : 1- GG, 2- GA, 3- GL, 4- FS, 5- FI, 6- GM, 7- FL, 8- FV et 9- FM. Paramètres de l'analyse : tampon phosphate pH = 2,50 ; I = 40 mM ; V = 15 kV ; L_t = 31,1 cm ; L_d = 21,2 cm ; concentration des peptides 0,5 à 2 mM..... 74

Liste des tableaux

Tableau I : Équations généralisées pour la détermination des pK_a par CE.	10
Tableau II : Modèles de mobilité en CE.	20
Tableau III : Liste des systèmes de tampons utilisés dans ce travail et leurs propriétés.	30
Tableau IV : Données typiques pour la détermination de pK_a par la méthode systématique pour les peptides FF et GG avec t_0 obtenu avec DMSO. Paramètres de l'analyse : $I = 40$ mM ; $V = 15$ kV ; $L_t = 31,2$ cm ; $L_d = 20,9$ cm.	40
Tableau V : Données typiques pour la détermination de pK_a par la méthode alternative pour les peptides GG, G ₃ , G ₄ , G ₅ , G ₆ et GP. Paramètres de l'analyse <i>idem</i> au tableau III.	41
Tableau VI : Comparaison des résultats de régressions non linéaires pour les deux méthodes d'acquisition de données utilisées lors de la détermination des pK_a de peptides.	44
Tableau VII : Comparaison des pK_a-N' de glycine dans quelques dipeptide Gly-X et tripeptides Gly-Gly-X avec des résidus variables X identiques.....	57
Tableau VIII : Comparaison des résultats de régressions linéaires pour les données de la figure 16 présentant la corrélation des valeurs $q/M^{2/3}$ avec les mobilités électrophorétiques expérimentales pour tous les peptides analysés a haut et bas pH.....	68
Tableau IX : Comparaison des valeurs de charges calculés avec les pK_a expérimentaux et les pK_a de Rickard pour les peptides hors tendances déterminés lors de la modélisation avec l'équation d'Offord dans la figure 16. Les pK_a surlignés permettent d'expliquer la déviation.	70
Tableau X : Comparaison des coefficients de corrélation linéaires (R^2) obtenus lors de l'analyse des données de mobilités expérimentales avec différents modèles rudimentaires de forme $\mu = Aq/M^n$ pour relier la masse molaire au rayon hydraté du peptide.	72

Liste des sigles et abréviations

a.a. Acide aminé.

Voir ci-dessous la nomenclature complète à 3 lettres et à 1 lettre :

A	Ala	Alaline
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

ANN Artificial neural networks (réseaux de neurones artificiels)

β Pouvoir tampon

C' Fonction acide terminale d'un acide aminé ou d'un peptide

CE Capillary electrophoresis (électrophorèse capillaire)

CE-ESI-MS Capillary electrophoresis with electrospray ionisation mass spectrometry (électrophorèse capillaire avec detection par ionisation électrospray et spectrométrie de masse)

DAD Diode-array detector (détecteur avec barrette de diodes)

DMSO Diméthyle sulfoxyde

D_i Diamètre interne

D_e Diamètre externe

E	Champ électrique
EOF	electroosmotic flow (flux électroosmotique)
exp	expérimentale
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à haute performance)
i	Courant
I	Force ionique
$\lambda_{\text{dét}}$	Longueur d'onde de détection
L_d	Longueur (du capillaire) jusqu'au détecteur
L_t	Longueur totale (du capillaire)
lit	Littérature
M^x	Masse molaire exposant x
MOx	Mesityl oxyde (oxyde de mésityle)
μ_x	Mobilité
n	Nombre de résidus dans un peptide
N'	Fonction amine terminale d'un acide aminé ou d'un peptide
N/A	N'est pas applicable dans la liste
N/D	Non déterminé ou non disponible
pI	Point isoélectrique
pK_a	Logarithme base 10 de la constante d'ionisation acide
POT	Potentiometric titration (titrage potentiométrique)
q	Charge
UV/Vis	Ultraviolet/Visible
V	Voltage

En mémoire de mes grands-parents A.D. et M.C.

Remerciements

Tout d'abord, je désire remercier ma directrice de recherche, la professeure Karen C. Waldron pour m'avoir reçu dans son groupe de recherche. Sa confiance constante dans mes travaux et la latitude qu'elle m'a accordée m'ont permis de développer une autonomie de pensée et une solide éthique de travail.

Je tiens pareillement à remercier le Département de Chimie de l'Université de Montréal qui m'a permis de finir ce projet académique suite à un long laps de temps. Un merci particulier aux membres du jury, les professeurs Pierre Chaurand et Pierre Thibault, qui ont pris le temps d'évaluer ce mémoire et partager leurs précieux commentaires. Je désire également remercier le Professeur Jeffrey Keillor qui m'a aimablement autorisé l'utilisation du micro-titrateur de son laboratoire de recherche pour deux mois.

Je veux aussi souligner les précieux commentaires que m'a offerts la poste doctorante Catherine Dartiguenave lors de résolution de problèmes. J'adresse ma reconnaissance à mes collègues de travail qui ont tous soutenu une atmosphère scientifique stimulante.

Finalement, je remercie ma famille et mes amis pour l'appui qu'ils m'ont apporté à travers mes études universitaires et pendant l'achèvement de ce projet.

1 • Introduction

L'analyse des peptides et protéines a toujours eu une place de choix dans le développement de méthode analytique. Ces biomolécules sont des mines d'information sur les divers processus biochimiques fondamentales dans la nature. De manière plus concrète, c'est aussi une classe de médicaments biologiques qui prend de plus en plus sa place dans le domaine pharmaceutique [1, 2].

La HPLC (chromatographie liquide à haute performance) est la méthode la plus répandue dans l'industrie pour les analyses puisqu'elle est prévalue dans les pharmacopées internationales. De plus, l'interface avec la MS (spectrométrie de masse) en a fait une technique importante dans l'analyse de biomolécules. Cependant, dans le répertoire de techniques à la portée d'un analyste se trouve la CE (électrophorèse capillaire) qui est parfaitement adaptée pour les biomolécules. Elle offre de multiples avantages dont la nécessité d'une faible quantité d'analyte, un petit volume d'injection, une haute efficacité et un grand pouvoir de résolution. Cette technique est apparue au début des années 80 et a considérablement évoluée depuis [3]. Ses prédécesseurs, incluent l'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse sur gel encore utilisé de nos jours. Depuis les années 1930, ces derniers ont permis le développement des théories fondamentaux sur l'électromigration et la séparation de composés chargés [4]. Elle est décrite pour usage officielle dans plusieurs pharmacopées internationales depuis le début des années 2000 [5].

Le travail séminal d'Offord [6] sur les modèles de mobilité des peptides en électrophorèse représente le point d'origine de cette étude. Ce dernier a exposé pour la première fois une version simplifiée (équation 1) du modèle fondamental de Stokes (équation 2) décrivant une sphère rigide et isolante en électrophorèse :

$$\mu = \frac{Aq}{M^{2/3}} \quad (1)$$

$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2)$$

où μ est la mobilité électrophorétique du peptide, A est une constante, q est la charge du peptide, M est sa masse molaire, η est la viscosité du milieu et r est le rayon hydrodynamique du peptide. En appliquant ce nouveau modèle à l'analyse des mobilités d'une série de peptides, Offord réussi à démontrer la validité empirique de cette

représentation mathématique du processus électrophorétique. Ainsi, il ne suffit plus que de deux paramètres physico-chimiques facilement accessibles, la charge et la masse molaire, afin d'avoir accès à une estimation de la mobilité électrophorétique d'un ion.

Depuis, de nombreux ouvrages dans la littérature scientifique en chimie analytique, polymère et colloïde, en biochimie et en pharmacie ont permis de confirmer le modèle. Ces derniers se sont penchés sur le sujet afin de développer une forme appropriée à leur besoin avec laquelle il serait possible de calculer les mobilités. Cet outil diagnostique puissant permettrait la construction de protocoles expérimentaux en évitant les étapes laborieuses de l'optimisation d'une séparation en CE. D'ailleurs, la mise au point de programmes informatiques pouvant calculer et simuler des électrophérogrammes développés par plusieurs groupes de recherche permet cette démarche [7-15].

Or, comme tout modèle théorique, celui d'Offord possède ses limites. Les comparaisons d'électrophérogrammes expérimentaux et simulés par ordinateur effectuées dans plusieurs publications dévoilent des lacunes. Par conséquent, plusieurs mises au point du modèle de base ont fait surface afin de les aborder. Dans la grande majorité des publications initiales dans le développement de ces modèles, l'emphase est surtout mise sur la représentation du paramètre de taille de l'analyte, soit la masse (M) [7, 11-14, 16-23]. Les variabilités des modèles mathématiques faisant intervenir différentes formes de dénominateurs sont à ce jour bien développés typiquement dans des conditions où le pH de travail est très acide afin que toutes les fonctions acides soient protonées. Cet aspect sera discuté en profondeur dans la section 1.3.

Plus récemment, un plus grand nombre de chercheurs se penchent sur le problème de la représentation, de la modification et du calcul de la charge du peptide en CE [18, 24-30]. Certes, pour calculer la charge d'un groupe ionisable il faut son pK_a , le pH, la force ionique (I) et la température (T) du milieu de travail. Les trois dernières informations sont facilement accessibles expérimentalement. Cependant, la détermination laborieuse des pK_a de peptides mène la majorité des auteurs à utiliser des tables d'approximations. De ce fait, cette pratique aboutie à des estimations imprécises de la charge ce qui restreint l'utilisation des modèles théoriques.

Voilà où s'inscrit ce projet dont le but premier est de comprendre la variabilité des pK_a de peptides et de mettre en lumière certains des mécanismes physico-chimiques. Ceci

permettra entre autres de minimiser les incertitudes sur le calcul de paramètres tel la charge réelle du peptide en solution, le rayon hydrodynamique, les forces d'attraction et de répulsion, la permittivité et le pH local, et d'estimer la forme du peptide en électrophorèse. À la base, ceci mènerait à une amélioration de l'interprétation de résultats en diminuant l'ambiguïté suite à l'utilisation de valeurs plus représentatives des peptides à l'étude [31]. Notamment, la charge des peptides pourra être mieux évaluée lors des simulations de séparations peptidiques avec les programmes informatiques où des valeurs de références appropriées pourront être utilisées et permettront aussi une meilleure simulation des électrophérogrammes. De même, les conclusions qui pourront être tirées de ces analyses permettront aussi une meilleure évaluation de la charge dans d'autres types de séparations tel l'électrochromatographie micellaire.

Dans le premier chapitre, la technique de détermination de pK_a par CE sera exposée incluant les effets de la force ionique et de la température sur l'ionisation. Nous ferons un rappel de la théorie sur la préparation, l'utilisation et la modification des solutions tampons sera rappelée. Par la suite, une brève revue des modèles de mobilité peptidique en CE sera présentée afin d'exposer les diverses formes mathématiques qui ont été testés lors des 50 dernières années. Dans le second chapitre, les protocoles expérimentaux seront présentés soit, la détermination du pK_a par CE, la détermination du pK_a par titrage potentiométrique (POT), la technique de calcul de pK_a (par CE), la détermination de la mobilité limite et les simulations par ordinateur d'électrophérogrammes à l'aide du programme PeakMaster développé par le groupe du Prof. Bohuslav Gaš [32, 33]. Enfin, dans le troisième chapitre, les résultats seront présentés et discutés.

1.1 Détermination du pK_a par titrage potentiométrique

Les techniques utilisées pour déterminer le pK_a d'un acide faible sont multiples et comprennent les titrages potentiométriques (POT) [34, 35], la spectrophotométrie moléculaire Ultraviolet/Visible (UV/Vis) [36, 37], la conductivité [38], la thermodynamique [39], la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire [40], les méthodes par dissolution [41], l'isotachophorèse (ITP) [42] et l'électrophorèse capillaire (CE) [43]. L'approche classique par POT sera utilisée dans ce travail afin de comparer certains résultats obtenus par notre technique de référence, la CE. Une introduction plus poussée est présentée à la prochaine section pour celle-ci.

Dans une analyse volumétrique par titrage, une solution de titrant ajoutée de manière contrôlée permet d'en analyser une autre tout en mesurant une propriété qui évolue au cours de cette opération. Le cas spécifique de la titration acido-basique fait intervenir la mesure du pH qui variera selon la nature du titrant et les propriétés acido-basiques de l'analyte en question.

Généralement, la POT offre une économie de temps et une facilité d'utilisation qui rend son application très commune. Dans sa forme rudimentaire, le montage est simple et nécessite des solutions à des concentrations contrôlées, de la verrerie usuelles de laboratoire, un pH mètre et un expérimentateur afin de contrôler la titration et noter les mesures. Un appareillage moderne permet d'effectuer des microtitrations automatisées qui permettent un meilleur contrôle de l'acquisition de données en plus grand nombre.

Suite à l'obtention de la courbe de titrage d'un peptide amphotère, une analyse graphique est nécessaire afin d'obtenir les pK_a tel que présenté dans la figure 1. L'approche de base consiste à déterminer en premier lieu les volumes équivalents. Ces derniers sont aisément obtenus en inspectant les pics de la première dérivée du graphique de titrage. En second lieu, le point de demi-équivalence est calculé afin de déterminer le pH de demi-équivalence qui équivaut au pK_a .

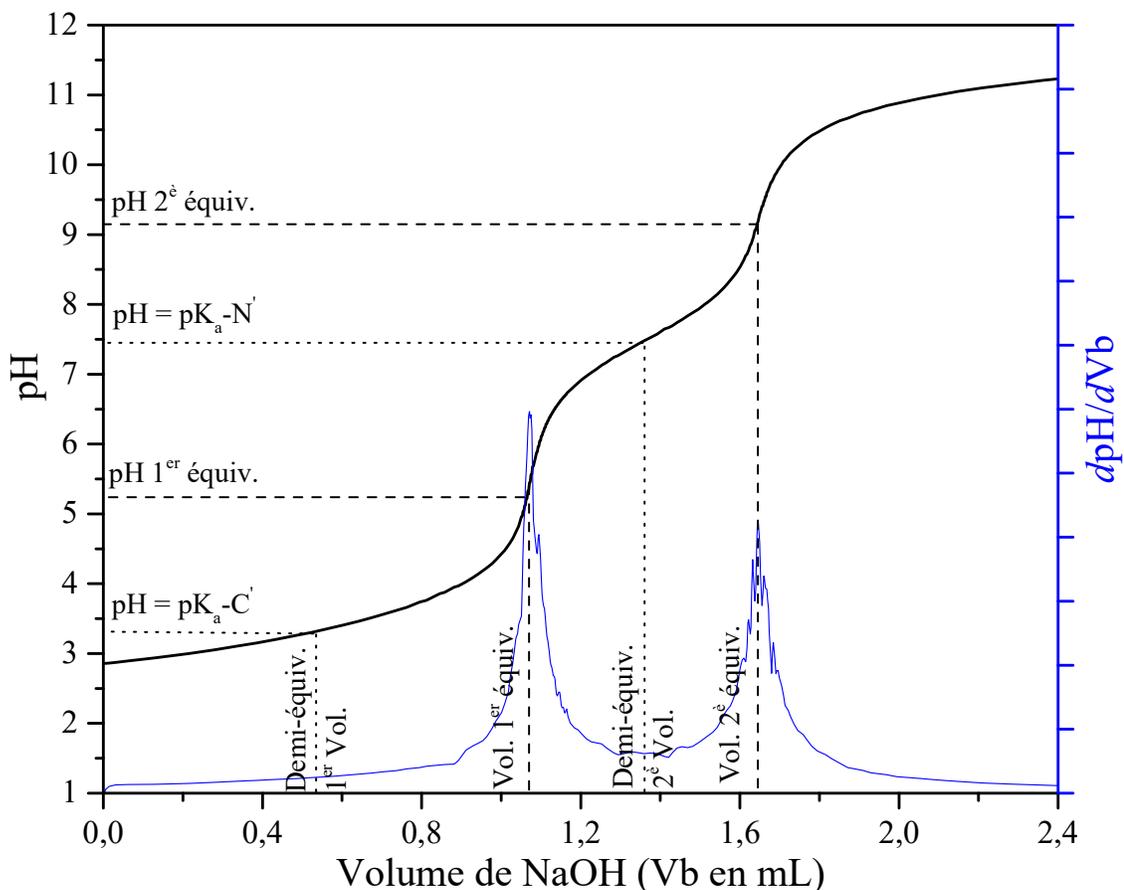


Figure 1 : Courbe de titrage théorique d'un peptide amphotère par potentiométrie. La ligne solide noire (—) représente le résultat simulé d'une titration V_b versus pH [44]. La ligne solide bleue (—) représente la première dérivée des résultats V_b versus dpH/dV_b permettant de déterminer les points équivalents.

1.2 Détermination du pK_a par électrophorèse capillaire

Dans ce mémoire, l'électrophorèse capillaire est privilégiée à toutes les autres techniques. D'ailleurs, tel qu'il sera discuté dans le chapitre trois, elle offre des avantages supérieurs aux autres techniques disponibles pour déterminer les pK_a .

La méthode est basée sur l'ionisation progressive d'un même résidu dans différents électrolytes de pH variable donnant ainsi un comportement parallèle à une courbe de titrage. Elle est surtout utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la mesure du pK_a de composés candidats dans la découverte de drogues [42, 45, 46]. De plus, cette méthode peut être utilisée pour l'analyse de composés peu solubles [42] ou labiles [47] en milieu aqueux puisque de faibles concentrations sont nécessaires si le composé possède un

chromophore en détection UV/Vis. Dans certains cas, des systèmes de tampons hydro-organiques (eau / méthanol et eau / acétonitrile) ont été testés pour améliorer la solubilité [48-50], pour examiner le comportement des composés [51, 52] ou pour permettre des études comparatives avec la HPLC [53]. L'analyse de composés non absorbant en UV/Vis tels les petites molécules organiques a aussi été étudiée [54, 55] avec l'utilisation de tampons contenant un chromophore qui permettent la détection indirecte.

La détection par absorption moléculaire en UV/Vis est prédominante en CE pour la détermination de pK_a . Cependant, la détection avec barrette de photodiodes (DAD) offre non seulement la possibilité d'identification d'un composé, mais aussi des calculs spectrophotométriques du pK_a [49, 56]. Plus récemment, l'interface de l'électrophorèse capillaire et de la spectrométrie de masse avec électronébulisation (CE-ESI-MS) a permis d'améliorer substantiellement l'identification des analytes. Conséquemment, le rendement de la méthode est d'avantage accru car, jusqu'à 50 composés peuvent être traités simultanément réduisant le temps d'analyse de manière drastique [57, 58].

Plusieurs sous techniques sont apparues afin de remédier à diverses difficultés expérimentales et ont aussi permis d'expédier la détermination de pK_a par CE. Certains auteurs ont testé des additifs qui réagissent de manière non-covalente avec la couche interne du capillaire donnant un flux électroosmotique constant et reproductible sur toute la gamme de pH [59-61]. L'application d'une pression constante dans le capillaire avec l'électrophorèse permet d'accélérer la séparation et la cueillette de données [45, 56, 62]. De surcroit, en combinaison avec la technique précédente, une approche avec l'ajout de 1 à 3 étalons internes acides ou basiques convenablement caractérisés a été développée permettant de réduire drastiquement l'analyse à aussi peu que 2 électrophérogrammes pour déterminer une valeur de pK_a [63]. Enfin, la compagnie CombiSep (Ames, IA, USA) a mis au point l'appareil cePRO 9600™ multiplexant 96 capillaires utilisées simultanément avec un système de détection DAD afin de déterminer les pK_a [64, 65].

1.2.1 Description mathématique

L'analyse des données nécessite des modèles mathématiques représentatifs du comportement électrophorétique des peptides investigués. Dans le cas de cette étude, trois

situations se présentent. La plus simple est celle du peptide amphotère contenant une fonction acide C-terminal et une fonction basique N-terminal. Ensuite, une chaîne latérale avec une fonction acide ou basique peut intervenir et donner des peptides avec trois fonctions ionisables. Ce qui suit est une présentation sommaire des équations qui mettent en relation les pK_a d'une substance ionogène (acide, basique, amphotère ou polyprotique) et la mobilité électrophorétique de cette substance en fonction du pH [66].

Pour un acide faible (HA), la constante de dissociation thermodynamique K_a est définie comme suit :

$$K_a^{th} = \frac{\gamma_{A^-} (H^+) [A^-]}{\gamma_{HA} [HA]} \quad (3)$$

Ici, γ est le coefficient d'activité et (H^+) est l'activité des protons en solution. En assumant que γ_{HA} est égale à un et en opérant le logarithme, l'équation (3) donne :

$$pK_a^{th} = pK_a' - \log \gamma_{A^-} \quad (4)$$

où K_a' est une constante d'acidité définie comme :

$$K_a' = \frac{(H^+) [A^-]}{[HA]} \quad (5)$$

Le coefficient d'activité de l'anion A^- en solution diluée peut être calculé à l'aide de l'équation suivante provenant de la théorie Debye Huckel :

$$-\log \gamma_{A^-} = \frac{Az^2 \sqrt{I}}{1 + Ba\sqrt{I}} + CI \quad (6)$$

Où A et B sont des paramètres variables en fonction de la constante diélectrique (ϵ) du solvant et de la température (T) du système étudié : $A = 1,88246 \times 10^6 / (\epsilon T)^{1/2}$ et $B = 50,29 \times 10^8 / (\epsilon T)^{1/2}$. Par la suite, z est la valence de l'ion, I est la force ionique du milieu, a est le rayon de l'ion hydraté et C une valeur obtenue expérimentalement via régression. En substituant l'équation (6) dans (4) il en résulte :

$$pK_a^{th} = pK_a' + \frac{Az^2 \sqrt{I}}{1 + aB\sqrt{I}} + CI \quad (7)$$

En CE, la mobilité (μ) d'un analyte est définie comme suit :

$$\mu = v/E \quad (8)$$

où v est la vitesse du soluté et E la force du champ électrique. La mobilité apparente (μ_{app}) est une somme de la mobilité électrophorétique effective de l'analyte (μ_{eff}) et du flux électro-osmotique (μ_{eo}) :

$$\mu_{app} = \mu_{eff} + \mu_{eo} \quad (9)$$

La mobilité effective peut être exprimée comme :

$$\mu_{eff} = \alpha Z \quad (10)$$

où α est la mobilité de l'acide complètement dissocié (A^-) et Z est la fraction de charge :

$$Z = \frac{-[A^-]}{[HA] + [A^-]} \quad (11)$$

En regroupant les équations (5), (10) et (11), la mobilité effective est :

$$\mu_{eff} = \alpha \frac{-K'_a}{K'_a + (H^+)} \quad (12)$$

Pour une base faible, l'équation analogue est la suivante :

$$\mu_{eff} = \beta \frac{(H^+)}{K'_b + (H^+)} \quad (13)$$

Un réarrangement et une substitution des identités (14a, b et c) dans les équations 12 et 13 donne les équations 15 et 16 avec lesquelles il est possible d'effectuer l'analyse graphique de données expérimentales pour un acide faible et une base faible en CE :

$$K_a = 10^{-pKa1} \quad (14a)$$

$$K_b = 10^{-pKa2} \quad (14b)$$

$$(H^+) = 10^{-pH} \quad (14c)$$

$$\mu_{eff} = \frac{\alpha 10^{-pKa}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}} \quad (\text{pour un acide faible}) \quad (15)$$

$$\mu_{eff} = \frac{\alpha 10^{-pH}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}} \quad (\text{pour une base faible}) \quad (16)$$

Pour des composés ioniques multivalents, une équation représentant la mobilité peut être dérivée en considérant toutes les espèces ioniques pouvant exister en solution [66]. Les équations modèles utiles pour les peptides étudiés contenant des acides faibles et des bases faibles sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : Équations généralisées pour la détermination des pK_a par CE.

Type de composé	Équation modèle
Mono acide	$\mu_{eff} = \frac{\alpha 10^{-pKa}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}}$
Mono base	$\mu_{eff} = \frac{\alpha 10^{-pH}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}}$
Mono acide / mono base	$\mu_{eff} = \frac{\alpha_1 10^{-2pH} + \alpha_2 10^{-pKa_1 - pKa_2}}{10^{-2pH} + 10^{-pKa_1 - pH} + 10^{-pKa_1 - pKa_2}}$
Di acide / mono base	$\mu_{eff} = \frac{\alpha_1 10^{-3pH} + \alpha_2 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pH} + \alpha_3 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pKa_3}}{10^{-3pH} + 10^{-pKa_1 - 2pH} + 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pH} + 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pKa_3}}$
Mono acide / di base	$\mu_{eff} = \frac{\alpha_1 10^{-3pH} + \alpha_2 10^{-pKa_1 - 2pH} + \alpha_3 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pKa_3}}{10^{-3pH} + 10^{-pKa_1 - 2pH} + 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pH} + 10^{-pKa_1 - pKa_2 - pKa_3}}$

1.2.2 Analyse graphique

Une approximation valide du comportement électrophorétique d'une molécule amphotère est une simple addition mathématique de celui d'un acide (AH) et d'une base (B). Donc, c'est une contribution provenant de deux ions successifs assumant une indépendance de ces derniers [66]. À bas pH, la molécule possède une charge nette positive HB⁺AH et une mobilité α_2 maximale positive telle que décrit dans la figure 2-A. De même manière, à haut pH, la molécule possède une charge nette négative BA⁻ et une mobilité α_1 négative. La mobilité limite de chaque forme ionisée d'un peptide est propre à cette dernière et représente une propriété physique dépendante de la structure, de la masse, du rayon hydrodynamique de la molécule (rayon de Stokes) ainsi que du milieu de travail.

Le pH où la mobilité est nulle indique le point isoélectrique de la molécule HB⁺A⁻. Par définition, le pK_a est le pH auquel 50% de chaque espèce d'un équilibre acido-basique est présente. Ce dernier se situe au point d'inflexion de chaque partie sigmoïdale de la courbe. Pour un peptide amphotère tel que décrit à la figure 2-A, pK_{a1} représente la dissociation du groupe C-terminal tandis que pK_{a2} est celui du groupe N-terminal. Un

raisonnement similaire peut être effectué pour la figure 2-B et la figure 2-C représentant les cas d'un mono acide/di base et d'un di acide/mono base qui seront rencontrés dans cette étude.

Cette confirmation visuelle simpliste subsiste en autant que la différence entre les pK_a de la molécule soit assez grande ($\Delta pK_a > 2$). Autrement, l'utilité du modèle se détériore puisque les points d'inflexion fusionnent et deviennent indistincts. Une régression non linéaire rigoureuse exécutée avec un programme informatique tel Microcal Origin® permet une différenciation de l'ordre d'une unité de pK_a avec une bonne précision. Le modèle possède certes une limite d'utilisation qui permet dans le meilleur des cas la résolution de 5 pK_a successifs [66, 67] sur la gamme de pH accessible en milieu aqueux et en CE.

Afin d'obtenir cette courbe expérimentalement, il faut déterminer les mobilités électrophorétiques (μ_{ep}) du peptide dans une série de tampons de différents pH. Comme le EOF est perpétuellement présent, l'analyte possède une mobilité apparente (μ_{app}). Lors de la séparation, il est nécessaire d'ajouter un marqueur neutre tel l'oxyde de mésityle (MOx) ou le diméthyle sulfoxyde (DMSO) afin de pouvoir mesurer la mobilité du EOF (μ_{eo}). En soustrayant cette valeur à μ_{app} , il est possible de calculer μ_{eff} du peptide d'intérêt (équation 17).

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{eo} = \frac{L_t L_d}{E} \left(\frac{1}{t_r} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (17)$$

où L_t est la longueur totale du capillaire, L_d est la longueur du capillaire jusqu'au détecteur, t_r et t_0 sont respectivement les temps de migration du soluté et du marqueur EOF.

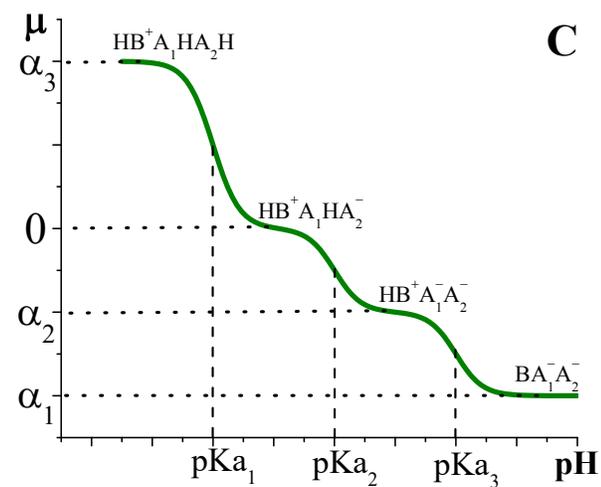
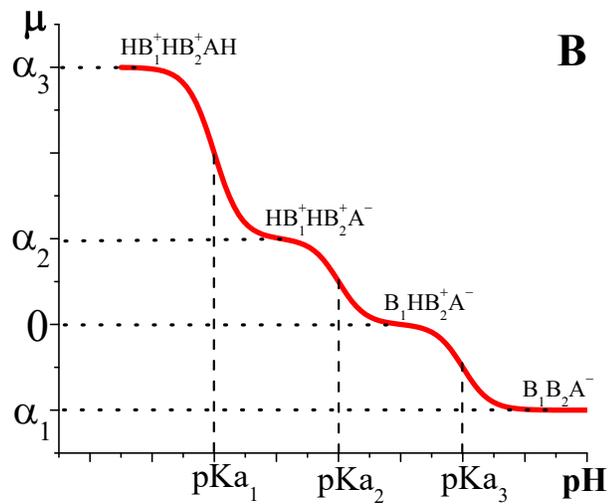
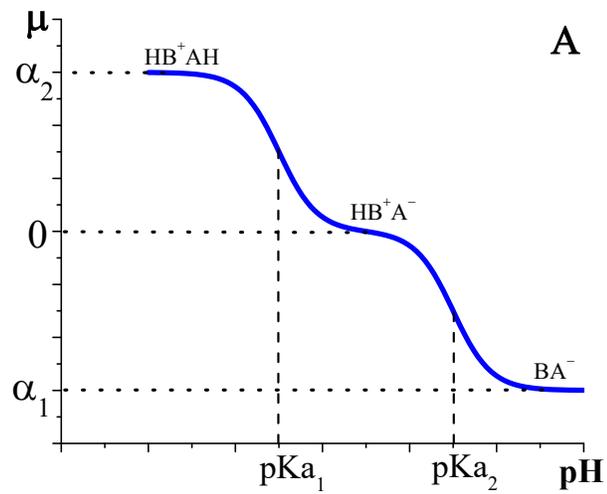


Figure 2 : Comportement graphique attendu des trois types de peptides analysés par CE dans cette étude. Soit (A) Amphotère (B) Mono acide / di base (C) Di acide / mono base.

1.3 Solutions tampons pour la CE

L'ionisation et par conséquent la mobilité électrophorétique d'un acide ou d'une base faible sont fortement influencées par leur environnement. En CE, cet environnement est le tampon caractérisé par un pH, une force ionique, une viscosité et une température de travail. Tous ces paramètres s'affectent entre eux et doivent nécessairement être contrôlés par l'expérimentateur afin d'obtenir des mobilités reproductibles et des pK_a thermodynamiquement correctes. La préparation de plusieurs solutions tampons est nécessaire afin de couvrir une gamme de pH adéquate à l'analyse d'un composé, soit $pK_a \pm 2$ unités de pH.

Pour cela, il faut des couples acide / base conjugués adaptés pour la technique. Tout produit ayant des propriétés acido-basiques peut servir de tampon, mais certaines restrictions s'appliquent en CE. Dans cette étude, de simples peptides (2-6 résidus) sont séparés et détectés par UV/Vis nécessitant des tampons transparents dans cette gamme de longueur d'onde (surtout vers 200 nm). Les interactions non spécifiques entre ces petits peptides et les composés du tampon sont souvent considérées négligeables et ne devraient produire aucune difficulté lors de l'analyse [68].

La liste des tampons de Good [69] en CE est suggérée et utilisée par plusieurs auteurs. Ils comprennent des composés organiques et inorganiques adéquats dû à leurs propriétés physico-chimiques : haute pureté disponible, solubilité, stabilité en solution, faible conductivité spécifique (faible mobilité), absorbance UV/Vis faible ou nulle, non toxique et invariabilité à la température. Ces tampons sont testés et éprouvés à travers la littérature chimique et biochimique dans une multitude de protocoles expérimentaux incluant les séparations par CE [70] et plus spécifiquement la détermination de pK_a [71].

1.3.1 Construction de tableaux pour la préparation de tampons

Les tableaux de préparation de tampons suggérés dans la littérature [72-74] sont vastes. Cependant, le contrôle de la force ionique dans ces dernières est souvent négligé ou éparse ce qui rend difficile la préparation d'une série de tampons couvrant une gamme étendue de pH. De plus, dans plusieurs de ces tables, l'ajout de sels inertes est préconisé

afin de contrôler la force ionique ce qui ne maximise pas la capacité du tampon. Alternativement, des recettes pour ces mêmes tampons peuvent être obtenues en utilisant des logiciels publics disponibles sur internet. Parmi les plus complets se trouve PeakMaster qui est extensivement utilisé par certains auteurs [68]. Néanmoins, pour mieux comprendre et contrôler la procédure expérimentale dans ce travail, les tableaux pour la préparation de tampons à force ionique constante ont été calculés suivant la procédure qui suit [73].

Soit les systèmes tampons suivants avec des contre-ions monovalents :



La force ionique de ces solutions se calcule comme suit :

$$I = \frac{1}{2} n(n-1)[HA^{(n-1)-}] + \frac{1}{2} n(n+1)[A^{n-}] \quad (19a)$$

$$I = \frac{1}{2} n(n+1)[BH^{n+}] + \frac{1}{2} n(n-1)[B^{(n-1)+}] \quad (19b)$$

Ayant I, il devient possible d'utiliser l'équation Debye-Hückel pour corriger le pK_a^0 thermodynamique afin obtenir le pK_a de travail tel que décrit précédemment dans l'équation (7).

Il est maintenant possible de calculer le rapport des constituants du tampon en utilisant l'équation Hensderson-Hasselbalch :

$$10^{(pH-pK_a)} = [A^{n-}]/[HA^{(n-1)-}] = x \quad (20a)$$

$$10^{(pH-pK_a)} = [B^{(n-1)+}]/[BH^{n+}] = x \quad (20b)$$

Les concentrations sont obtenues en substituant les équations (20a) dans (19a) et (20b) dans (19b) :

$$HA/A^- (n = 1) \rightarrow [HA] = I/x \text{ et } [A^-] = I \quad (21a)$$

$$BH^+/B (n = 1) \rightarrow [BH^+] = I \text{ et } [B] = xI \quad (21b)$$

Dans le cas d'un système divalent, l'expression se complexifie :

$$HA^-/A^{2-} (n = 2) \rightarrow [HA^-] = I/(1+3x) \text{ et } [A^{2-}] = I/(1+3x) \quad (22)$$

Cette méthode est valide pour des systèmes tampons usuels faisant intervenir deux composantes, pour des forces ioniques faibles à modérées (10-100 mM) et pour des pH se situant entre 3 et 11. Inévitablement, ces opérations deviennent moins exactes lorsque le pH est extrême puisqu'il est nécessaire d'ajouter la contribution de la concentration des

ions hydronium et hydroxyde au calcul de I menant à un processus itératif. De plus, si la valence des ions est grande (> 3) la correction Debye-Hückel devient plus complexe que ne le laisse prétendre les équations (20a) et (20b) [75]. Des tableaux représentatifs pour la préparation de solutions tampons utilisées dans ce travail sont présentés dans l'annexe 1.

1.3.2 Contrôle de la force ionique, du pouvoir tampon et de la température

Les processus acido-basiques sont certes affectés par la force ionique (I). L'utilisation de plusieurs solutions tampons faisant intervenir différents acides, bases et sels peut s'avérer désavantageuse. Toutefois, l'ajustement expérimental de I versus la concentration totale du tampon accroît considérablement la stabilité thermodynamique du système étudié. En ayant ce contrôle, la variabilité des coefficients d'activité est minimisée permettant une détermination efficace des pK_a .

Les modèles de Guggenheim, Pitzer, Scatchard et quasi-lattice sont utilisés par plusieurs auteurs [76-85] pour modéliser le comportement d'acides aminés en solution saline concentrée (100-1700 mM). Ces derniers sont une extension de la théorie Debye-Hückel qui s'avère une approximation plus utile pour décrire les effets à basse concentration (10-100 mM) [75]. La dépendance des pK_a sur I est naturellement une fonction du coefficient d'activité de l'espèce en solution ce qui est considérablement mieux développé dans les modèles plus formels. De plus, les interactions électrolyte / analyte qui contribuent au comportement non idéal de l'analyte y sont intégrées. Malencontreusement, la signification physico-chimique des multiples paramètres de régression dans les équations théoriques découle d'inférences qui ne font pas l'unanimité dans la communauté scientifique [75]. Par contraste, l'emploi de l'algorithme *mean spherical approximation* (MSA) permet l'intégration de représentations concrètes telles le diamètre, la concentration et la charge de l'analyte pour la modélisation de données [80].

Quoi qu'il en soit, la force ionique est associée à la concentration totale (c) des espèces qui permet d'évaluer le pouvoir tampon avec l'équation (23). Ce dernier est une estimation de la capacité du tampon à résister au changement de pH. Il est maximal lorsque

le $pH = pK_a$ et décroît exponentiellement plus il en est éloigné. De ce fait, un système tampon n'est utile qu'à $pK_a \pm 1$ unité de pH .

$$\beta = \frac{d[H^+]}{dpH} = 2,303 \left[\frac{c10^{-pK_a - pH}}{(10^{-pK_a} + 10^{-pH})^2} + 10^{-pH} + 10^{-pK_w + pH} \right] \quad (23)$$

La plage de I accessible est dictée par les limites d'utilisation pratique de la CE et s'étend de 10 à 100 mM. Le réchauffement joule est l'obstacle majeur à franchir puisqu'il affecte le EOF, la viscosité du tampon, la diffusion de l'analyte, l'efficacité et la reproductibilité de la séparation [86]. Les instruments CE modernes possèdent des dispositifs de refroidissement et de contrôle de la température du capillaire avec de l'air ou du liquide permettant d'atténuer l'effet Joule. Malgré cela, les propriétés électriques des solutions réelles étant imparfaites, une relation non linéaire peut se développer entre le courant et la différence de potentiel appliquée conduisant à la production d'un excès de chaleur. Ceci se traduit par une déviation à la linéarité de la loi d'Ohm. Plusieurs auteurs ont modélisé ce comportement en mesurant la température à l'intérieur du capillaire par une foule de techniques tel que revue en détail dans un récent article [87]. Selon le travail de Grushka *et al.* [86, 88, 89], la différence de température entre l'intérieur et l'extérieur du capillaire en fonction de la puissance générée pour un système avec réfrigération liquide est donnée par la relation simplifiée qui suit :

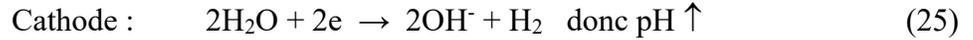
$$\Delta T = \frac{Vi}{\pi h R_e L_t} \quad (24)$$

Dans cette dernière, ΔT est la différence de température ($T_{\text{tampon}} - T_{\text{réfrigérant}}$), i le courant, h le coefficient de transfert thermique du liquide refroidisseur, R_e le rayon externe du capillaire et V le voltage.

En somme, pour minimiser la correction de l'équation (7) et les effets indésirables du réchauffement, la force ionique doit être judicieusement choisie. C'est un compromis qui doit être fait afin d'obtenir des solutions de faible et constante force ionique, une capacité tampon suffisante et un contrôle de la température pour prévenir le changement des propriétés du tampon et des analytes.

1.3.3 Modification électrolytique du tampon

Les propriétés des solutions tampons peuvent changer au cours de l'analyse dû aux réactions électrochimiques à l'électrode et à l'absorption du dioxyde de carbone provenant de l'air. Les réactions les plus communes sont celles de l'électrolyse de l'eau présentées aux équations (25) et (26). Celles-ci mènent à une accumulation d'ions hydroxydes à la cathode et d'ions hydronium à l'anode [90]. Ceci provoque une augmentation du pH à la cathode, une diminution du pH à l'anode, une hausse de la force ionique et une altération disproportionnée de la conductivité électrique des deux réservoirs de tampon menant à une discontinuité dans le transport du courant.



Plusieurs auteurs ont modélisé ces changements afin de comprendre les modifications du tampon dans les réservoirs et faciliter le choix des composantes pour un protocole expérimental [45, 90, 91]. L'équation qui suit permet de prévoir l'évolution du pH du tampon à l'anode avec le temps. Bien entendu, une équation similaire existe pour le réservoir à la cathode [91].

$$\frac{dpH}{dt} = - \left(\frac{SE}{V_a} \right) \left(\frac{[B]\mu_B - \frac{[A_f]\mu_f K_f^2}{(K_f + [H])^2} + [A_s]\mu_s}{\beta} \right) \quad (27)$$

$[A_f]$ = concentration de l'acide faible

$[A_s]$ = concentration de l'acide fort

$[B]$ = concentration de la base

β = capacité du tampon

E = champ électrique

μ_f = mobilité limite de A_f

μ_s = mobilité limite de l'acide fort

V_a = volume du réservoir à l'anode

K_f = constante d'ionisation de A_f

S = aire transversale du capillaire

t = temps

μ_b = mobilité limite de B

$[H]$ = concentration des protons

Diverses conclusions utiles peuvent être tirées de cette équation. La vitesse de baisse du pH est proportionnelle au diamètre interne du capillaire, la force du champ électrique, la mobilité des ions en solution (directement reliée au courant généré) et le temps de l'analyse. Par opposition, elle est inversement proportionnelle au volume du réservoir, à

la capacité du tampon et à la concentration des protons en solution. Voilà autant d'indices à considérer lors de la construction d'une méthode de séparation électrophorétique.

1.4 Les modèles de mobilité peptidique en CE

Les deux facteurs principaux contrôlant la mobilité sont la charge et la taille d'une molécule. Sous l'effet du champ électrique, la charge est à l'origine du déplacement électrophorétique tandis que la taille engendre une contrebalance avec la force frictionnelle de retardement. Ces derniers sont intégraux à tous les modèles présentés ci-dessous majoritairement dérivés des équations (1) et (2). Néanmoins, cette vision minimaliste ne tient pas compte des réalités thermodynamiques en solution où se déroulent des processus significatifs.

Tout d'abord, la théorie Debye-Hückel stipule qu'un ion mis en solution s'entoure d'un nuage d'ions de charge opposée formant ainsi une double couche électrique. Celle-ci affecte directement la représentation de la taille de l'ion dans le modèle. Elle peut être décrite sous certaines conditions limites de force ionique qui influence nettement sa formation. Ensuite, l'effet de relaxation qui a lieu lorsque le mouvement d'un ion déforme le nuage l'entourant qui doit se reformer créant ainsi une latence dans le déplacement. Enfin, la cataphorèse est le mouvement opposé de l'atmosphère ionique autour de l'ion menant à une hausse de la viscosité locale et de la force de retardement.

Un traitement rigoureux examiné par plusieurs auteurs [24, 25] met en relation tous ces paramètres pour donner une représentation intégrale du processus électrophorétique pour le cas général d'une particule colloïde.

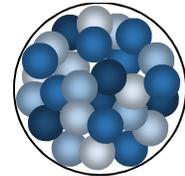
$$\mu = \frac{q}{6\pi\eta r} \times \frac{X(\kappa r)(1 + \kappa r_i)}{(1 + \kappa r + \kappa r_i)(f/f_0)} \quad \text{où} \quad \kappa = \left[\frac{2000Ne^2I}{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (28)$$

Dans cette équation, $X(\kappa r)$ est la fonction mathématique sigmoïdale d'Henry variant de 1,0 à 1,5 selon que κr varie de zéro (basse force ionique) à l'infini (haute force ionique), κ représente l'inverse de la longueur Debye ou l'épaisseur de la double couche électrique, r_i équivaut au rayon moyen des ions du tampon, r est le rayon hydrodynamique de la particule, (f/f_0) est un paramètre d'asymétrie de l'analyte, N est le nombre d'Avogadro, e

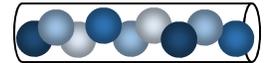
est la charge élémentaire, ϵ_0 est la permittivité du vide, ϵ_r est la permittivité du milieu de travail, k est la constante d'Avogadro et T la température en K.

Évidemment l'utilité expérimentale de l'équation (28) est assez restreinte due à sa complexité. Ceci réaffirme l'avantage des modèles simplifiés pour les analyses de routines. L'incertitude sur la forme du peptide en solution, son hydratation et sa taille subsiste dans ces modèles. Toutefois, trois cas sont reconnus possibles en solution [24, 25] :

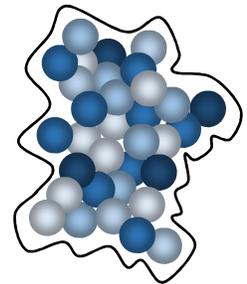
(1) Le peptide peut adopter une forme compacte sphérique avec un rayon proportionnel à $M^{1/3}$ (théorie de Stokes)



(2) Il peut aussi avoir une forme linéaire tel un polymère où les forces frictionnelles seraient additives et proportionnelles au nombre de monomères (n) équivalent à $M^{1,0}$.



(3) Enfin, il peut prendre la forme d'un ressort aléatoire idéal ($M^{0,5}$), asymétrique ($M^{0,65}$) ou un intermédiaire ($M^{0,5-0,65}$). Dans ce cas, les hélices alpha sont un exemple typique.



Un exemple des différents traitements mathématiques de ces trois représentations est rapporté à la section suivante avec la présentation des multiples modèles semi-empiriques qui ont été traités dans la littérature.

1.4.1 Paramètre de taille

D'après Offord [6], la friction hydraulique en solution est proportionnelle à la surface de la molécule en mouvement d'où la dépendance à $M^{2/3}$. Ceci est convenablement uni dans le premier modèle du tableau II qui a été corroboré par une multitude d'auteurs pour la séparation de peptides par CE. Mais, tel que manifeste dans ce même tableau, beaucoup d'autres ont aussi été testés [92].

Tableau II : Modèles de mobilité en CE.

Modèle	Équation ^a	Références
1	$\mu = \frac{Aq}{M^{2/3}}$	[6, 7, 11, 16, 19, 30, 93-100]
2	$\mu = \frac{A \log(1 + \bar{q})}{n^B}$	[7, 11, 13, 16-19]
3	$\mu = \frac{Aq}{k_1 M^{1/3} + k_2 M^{2/3} \cdot I^{1/2}}$	[20, 101]
4	$\mu = \frac{A \log(1 + Bq)}{M^C}$	[7, 8, 14, 102]
5	$\mu = \frac{Aq}{6\pi\eta r^2} \cdot \frac{1}{I^{1/2}}$	[21, 22, 29, 30]
6	$\mu = l(L)q(Q)w(W)c(CC)$	[12]
7	Réseaux de neurones artificiels	[23, 103-107]

a : Les variables sont définies et discutées dans le corps du texte.

C'est Grossman *et al.* [18] qui présentèrent le modèle 2 (tableau II) en 1989 avec une première permutation à l'équation classique. Pour la composante taille, le peptide est considéré comme une chaîne de n monomères avec exposant B variable entre -0,5 à -0,7. L'analyse donne une corrélation optimale avec B = -0,43, une valeur confirmée dans une autre publication [7] avec le modèle 4 où la masse se retrouve au dénominateur (C = -0,41). De là est apparu un débat concernant la valeur de l'exposant. Il a été noté par quelques auteurs [20, 24, 101] que la dépendance de la mobilité à $M^{2/3}$ est l'un des cas possibles dicté par la théorie Debye-Hückel-Onsager. Le développement mathématique de cette dernière fait intervenir des paramètres pour la force ionique, le type d'électrolyte et le type d'analyte dans le traitement de la mobilité.

Un bon nombre d'auteurs ont testés la validité des modèles 1, 2 et 4 en comparant les corrélations linéaires entre $M^{1/3}$, $M^{1/2}$ et $M^{2/3}$ dès lors reconnues comme trois modèles appropriés :

$M^{1/3}$ provient de la loi classique de Stokes

$M^{1/2}$ provient de la représentation polymère de Grossman [18]

$M^{2/3}$ provient de la description de surface d'Offord [6]

Certains donnent faveur à $M^{1/2}$ [18-20, 101], d'autres à $M^{2/3}$ [25, 93, 94]. Compton et O'Grady [20, 101] ont tenté de remédier à cette situation en présentant le modèle 3 où une sommation linéaire de deux formes est incorporée en plus de la prise en considération de la force ionique. D'après leurs analyses, ils concluent que l'origine de la dichotomie est une dépendance complexe de la mobilité sur M et I simultanément.

Ces résultats mitigés témoignent de la complexité réelle relative à la dépendance taille-mobilité. Pour cela, certains auteurs ont préféré prendre de nouvelles approches afin d'approfondir le sujet. Cross et Wong [30] ont utilisé la modélisation moléculaire afin d'extraire les rayons (r) de leurs peptides. Ils ont analysé leurs résultats avec l'équation (5) et ont démontré que la distribution statistique de la charge sur la molécule est un facteur secondaire majeur dans le calcul de la mobilité. Dans des publications subséquentes [21, 22], ils se sont concentrés sur le raffinement de leur paramètre de taille r en incorporant des modèles d'hydratation d'ions. Similairement, d'autres auteurs [31, 108-112] se sont acharnés sur les propriétés hydrodynamique des peptides afin de raffiner la représentation de la taille des composés en solution. Metral *et al.* [12] ont mis au point l'équation (6) qui est le produit de fonctions paramétrique représentant les propriétés physiques des peptides analysés, soit L la longueur du peptide équivalent au nombre de résidus, Q sa charge, W sa largeur équivalente à la masse moyenne des résidus et CC la position du centre de masse relatif au centre de charge. Cette approche de nature empirique a permis de soutenir qu'il n'est pas nécessaire de calculer des propriétés précises afin d'estimer la mobilité électrophorétique.

Récemment, les programmes informatiques à réseaux de neurones artificiels (ANN) ont été appliqués à l'analyse d'acides carboxylique [103, 106] puis aux peptides en CE [104, 105, 107, 113]. Contrairement aux autres modèles, les ANN se basent sur une multitude de descripteurs pour lesquelles de multiples corrélations mathématiques sont calculées par le programme. Ces descripteurs précis permettent de modéliser l'analyte et comprennent, entre autres, un facteur de forme, SF, la surface moléculaire, MSF, la densité électronique maximale sur un atome de la molécule, MED et la somme des polarisabilités atomiques, SAP. Ces variables encodent différents aspects topologiques, géométriques et électriques de la structure moléculaire. Elles sont utilisées dans des régressions multilinéaires qui servent à l'entraînement et à la programmation d'algorithmes pour les

ANN. Suite à l'entraînement du programme avec une série de peptides, celui-ci produit un modèle utilisant les différents descripteurs ciblés. Par la suite, une série de peptide complètement différents est testée pour déterminer la validité des prédictions du modèle généré lorsque comparées aux résultats expérimentaux. Des performances préliminaires prometteuses semblent justifier leur développement. Cependant, la même difficulté concernant le calcul et l'estimation de la charge est relevée par les auteurs de ces publications.

1.4.2 Paramètre de charge

Un peptide peut posséder plusieurs charges et, dépendant des pK_a de ces groupes, il aura plusieurs formes en solution. Puisque les équilibres acido-basiques sont rapides, le peptide migre avec une mobilité moyenne (μ_{moy}) qui est une somme pondérée de toutes ses formes ($\alpha_x\mu_x$) présentes en solution. Dans cette représentation, α_x est la fraction de charge et μ_x est la mobilité limite de la forme x :

$$\mu_{moy} = \alpha_0\mu_0 + \alpha_1\mu_1 + \alpha_2\mu_2 \dots + \alpha_n\mu_n \quad (29)$$

A priori, pour utiliser cette équation il faut avoir les pK_a de tous les groupes ionisables. Ceci n'étant pas toujours possible, une charge moyenne (\bar{q}) est approximée avec des données brutes provenant, entre autres, de tables de pK_a approximatifs. Ainsi, la mobilité devient une fonction de la mobilité limite (μ_{lim}^\pm) du peptide entièrement ionisé (q_{max}^\pm) [24].

$$\bar{\mu}_{moy} = \bar{\alpha}\mu_{lim}^\pm \quad avec \quad \bar{\alpha} = \frac{\bar{q}}{q_{max}^\pm} \quad (30)$$

En utilisant cette procédure, l'expérimentateur assume que la contribution de chaque charge à la mobilité est identique où qu'elle soit sur le peptide. En principe, ceci est inexact car chaque entité apporte une contribution singulière et doit être traitée séparément tel que décrit dans l'équation (29). Critiqué par certains [17, 24, 25, 27], il n'y a que le modèle 2 dans le tableau II qui fait usage de la relation 40. Les bonnes corrélations dérivées avec cette dernière sont dues à l'insensibilité de la fonction logarithmique aux erreurs de pK_a [28].

Les modèles 1, 3, 5 et 6 du tableau II présentent une relation linéaire entre la mobilité et la charge, ce qui est en accord avec la théorie fondamentale ; l'effet de la charge sur la mobilité est additif. Toutefois, les modèles 2 et 4 substituent cette relation par un terme logarithmique avec succès. Cette dépendance à $\log(1+q)$ est utilisée afin de considérer l'action décroissante qu'a l'augmentation de la charge sur la mobilité [18]. Cifuentes [24] n'accorde pas raison à l'inefficacité d'une partie de la charge, mais au rayon hydrodynamique qui augmente dû à l'hydratation accrue pour un ion multivalent. Une conclusion analogue est tirée dans le travail de Cross et Wong [29, 30]. De plus, il y a aussi été décrit que dans les structures compactes, les charges enfouies peuvent être invisibles au champ électrique et ne participeraient pas à la mobilité.

1.4.3 Valeurs des pK_a

La nécessité d'avoir des pK_a pour le calcul de la charge est un obstacle difficile à surmonter surtout pour les peptides car, peu de valeurs sont disponibles dans la littérature [7, 114, 115]. Quoiqu'accessible expérimentalement par une multitude de méthodes (voir section 1.1), peu d'auteurs se donnent la peine de mettre le temps, l'effort, le matériel et les ressources nécessaires pour y parvenir. Ils se sont résolus à utiliser des tables de pK_a avec des valeurs moyennes pour les peptides [16, 20, 116-121]. Le tableau dans l'annexe 2 contient les valeurs de Rickard [93] qui sont les plus utilisées dans la littérature. Il a été démontré que ces dernières menaient à des valeurs approximatives et inexactes de la charge [7, 93].

Le simple cas d'un dipeptide donne 20^2 structures possible lorsqu'on considère les 20 a.a. naturels. Assigner la même valeur de pK_a pour un même groupe ionisable (N', C' et chaîne latérale fonctionnelle) dans deux peptides différents néglige les effets drastiques qu'ont les différentes interactions physico-chimiques et intramoléculaires sur l'ionisation. Pourtant, il semble impossible de pouvoir déterminer les pK_a de tous les groupes ionisables dans tous les peptides surtout lorsqu'ils deviennent volumineux [15, 122, 123]. En conséquence, des auteurs ont tenté des approches informatiques pour modéliser la variation de l'ionisation afin de pouvoir calculer les pK_a [124-128]. La construction de ces derniers requiert une multitude d'algorithmes faisant intervenir des paramètres de structure et des variables d'interactions spécifiques. Conséquemment, l'utilité de ces

programmes n'est pas dans le raffinement du pK_a mais plutôt dans la signalisation et l'estimation du changement que l'ionisation d'un résidu subit dans son microenvironnement.

1.4.4 Échelles d'hydrophobicité

Les échelles d'hydrophobicité pour les a.a. abondent dans la littérature et sont établies de plusieurs manières. Les plus communes sont dérivées à partir des mesures de partitions octanol-eau, de solubilité, de tension de surface, de degré d'enfouissement dans les protéines globulaires, de rétention en HPLC, d'accessibilité au solvant, ou découlant d'approches combinatoires. Elles sont surtout exploitées dans certains programmes pour la prédiction de structures protéiques à partir de séquences primaires. Juretic et Lucin [129] ont comparés 88 échelles d'hydrophobicité d'origines diverses afin d'extraire l'essentiel de l'information qu'ils contiennent. La majorité de ces dernières se corrélaient bien ensemble et avec l'échelle Kyte et Doolittle [130] utilisée comme archétype dû à sa notoriété dans la littérature. Cette échelle est basée sur un amalgame de résultats expérimentaux accumulés par les auteurs ainsi que d'observations provenant de la littérature. Une composante majeure dans son établissement provient d'une analyse du degré d'enfouissement des résidus extrait d'une banque de structures protéiques. On s'y référera dans ce travail et ses valeurs se trouvent tabulées dans l'annexe 2.

Afin de mieux comprendre les mécanismes pouvant affecter la séparation de peptides en CE, certains auteurs se sont intéressés à leur hydrophobicité. Grossman *et al.* [18] ont vérifié cet effet avec cinq peptides ayant un a.a. de différence : AFK-X-KNG où X = glycine, alanine, isoleucine, leucine et tryptophane. À première vue, la mobilité de ces peptides diminuait plus le résidu X était hydrophobe. Cependant, il a été disputé qu'un facteur plus plausible, la taille du peptide X, en était la cause. Florance *et al.* [97] concluent leurs études différemment en attribuant la différence de mobilité entre les fragments peptidiques de la motiline à une discrimination hydrophobique menant à une baisse de la charge et de la mobilité. Des divergences similaires dans l'interprétation d'observations apparaissent ailleurs [131, 132] et des études plus poussées utilisant des séries de peptides plus abondantes sont préconisées.

1.4.5 Programmes de simulation informatique

L'informatisation des modèles de mobilité est une simple procédure que plusieurs auteurs ont réalisée pour prédire les séparations peptidiques et obtenir des électrophérogrammes permettant une comparaison visuelle des résultats [7-15]. Cependant, leur performance est nettement dépendante sur la qualité des valeurs d'entrée théoriques et expérimentales, sur le modèle utilisé et sur les corrélations supplémentaires introduites dans la programmation.

La construction la plus élémentaire utilise le modèle d'Offord (modèle 1) tel quel avec des valeurs d'entrée de base communes à tous les programmes : séquence primaire du peptide, pK_a des fonctions ionisables, pH de travail, voltage appliqué, dimensions du capillaire, valeur du EOF et une variable ajustable qui influencerait l'effet de la force ionique. À cela, Janini et al. [11] ont ajouté une fonction gaussienne pour considérer la forme des pics et leur élargissement avec le temps. Le logiciel public *PeakMaster* construit par le groupe de Gas [32, 33] incorpore une fonction similaire reposant sur la mobilité limite du peptide. De plus, les auteurs introduisent des corrections de symétrie de pic engendrées par les perturbations électrodynamiques du système tampon [133-135].

Le modèle 4 possédant une relation logarithmique a aussi été développé par Cifuentes et Poppe [7, 8, 24]. Ils ont mis au point le programme *System prediction of peptide migration in CE* (SPPMCE) où ils incorporent une fonction de correction du pK_a basée sur la proximité des centres ionisables. Le modèle 6 présenté par Metral et al. [12] est développé par Janini et al. [10] qui y incorporent des paramètres de forme du pic.

1.5 Objectifs de l'étude

Tel que discuté au début de ce chapitre, la connaissance des pK_a est primordiale pour le calcul de la charge sur un peptide et l'estimation de sa mobilité. Plusieurs auteurs utilisent des tables de pK_a approximatifs et se limitent à travailler à un pH acide afin de protoner toutes les fonctions acido-basiques. Ceci limite l'étendu des analyses possibles lorsque le comportement des peptides est étudié. L'objectif général de ce mémoire est de comprendre comment certaines propriétés des peptides font varier leur pK_a et l'impact de ces variations sur le calcul de leur mobilité électrophorétique.

Comme premier objectif spécifique de ce travail, une méthode pour la détermination de pK_a de peptides par CE sera développée afin de déterminer les pK_a d'une banque de peptides. Le deuxième objectif sera d'analyser les variations de pK_a observées pour les séries de peptides étudiés de type Z-X et X-Z où X est un ou plusieurs résidus voisins variable tandis que Z est un résidu terminal invariable tel phénylalanine, glycine et alanine. Les propriétés d'intérêt étaient l'hydrophobicité, la polarité ou la charge du résidu voisin, la distance du résidu variable et la longueur du peptide (son nombre de résidus). Un troisième objectif sera de déterminer les pK_a de certains peptides par titrage potentiométrique afin de comparer les résultats obtenus avec la CE et comprendre les différences observées. Finalement, un dernier objectif sera de tester l'amélioration qu'apportent les pK_a de peptides déterminés expérimentalement par CE sur les calculs de mobilités limites avec modèle d'Offord et d'une simulation informatique d'une séparation de peptides.

2 • Partie expérimentale

2.1 Produits et matériels

Les peptides Ala-Ala, Ala-Ala-Ala, Ala-Ala-Ala-Ala-Ala, Ala-Phe, Ala-Gly, Ala-Gly-Gly, Ala-His, Ala-Tyr, Asp-Phe, Phe-Ala, Phe-Phe, Phe-Phe-Phe-Phe-Phe, Phe-Gly, Phe-Gly-Gly, Phe-Gly-Gly-Phe, Phe-Leu, Phe-Met, Phe-Pro, Phe-Val, Gly-Ala, Gly-Ala-Ala, Gly-Glu, Gly-Phe, Gly-Gly, Gly-Gly-Ala, Gly-Gly-Phe, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-His, Gly-Gly-Ile, Gly-Gly-Leu, Gly-Gly-Val, Gly-His-Gly, Gly-Leu, Gly-Met, Gly-Pro, Gly-Tyr, His-Phe, His-Lys·HBr·½H₂CO₃, Lys-Phe·2HBr, Lys-Lys·2HCl, acétate de Lys-Trp-Lys, Leu-Phe, Leu-Gly-Gly, Leu-Leu-Leu, Met-Phe, acétate de Arg-Phe, acétate de Arg-Ala, Val-Phe, Val-Gly-Gly, Val-Lys·HCl, Trp-Gly, Tyr-Phe, Tyr-Phe, le tétraborate de sodium, l'acide borique, l'hydroxyde de sodium, le chlorure de potassium, l'acide acétique, l'acétate de sodium, le carbonate de sodium, le bicarbonate de sodium et l'oxyde de mésityle proviennent de Sigma Inc. (St-Louis, MO). Le phosphate de sodium monobasique et le phosphate de sodium tribasique ont été obtenus de Sigma-Aldrich Canada (Mississauga, ON, Canada). Le phosphate de sodium dibasique et l'acide phosphorique ont été obtenus d'Anachemia (Montréal, QC, Canada). Les peptides Ala-Asp, Ala-Glu, Ala-Leu, Ala-Met, Ala-Pro, Phe-asp, Phe-Glu, Phe-Ile·0,25AcOH, trifluoroacétate de Phe-Arg, Phe-Ser, Phe-Trp, Phe-Tyr, Ile-Phe, Leu-Met, Leu-Pro·HCl, Pro-Phe, Ser-Phe, Trp-Phe ont été achetés chez Bachem (Torrance, CA, USA). Les peptides Asp-Phe et Gly-Asp sont fournis par Fluka (Oakville, ON). Le peptide Gly-Tyr provient d'Aldrich Inc. (Milwaukee, WI). L'acide chlorhydrique a été obtenu de la compagnie BDH (Toronto, ON). L'eau distillée a été purifiée à l'aide d'un système Milli-Q (Millipore Canada, Nepean, ON, Canada) et a été utilisée dans la préparation de toutes les solutions tampons, de tous les échantillons et de toutes les solutions de rinçage. Les capillaires de silice fondue ont été achetés chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les filtres de Nylon (pores de 0,2-µm de diamètre) ont été achetés chez Chromatographic Specialties (Brockville, ON, Canada).

2.2 Appareillage

La séparation des peptides a été effectuée sur un système d'électrophorèse capillaire P/ACE-MDQ (SCIEX Inc., anciennement Beckman Coulter Inc.) avec une détection à 200 nm (lampe D₂). Les sept capillaires utilisés pendant les deux années de recherche avaient des longueurs faiblement différentes ; une longueur totale de $31,3 \pm 0,1$ cm, une longueur au détecteur de $21,1 \pm 0,2$ cm, un diamètre interne de 75 μm et un diamètre externe de 360 μm . Le pH-mètre utilisé pour la mesure du pH était un Accumet model 20 (Litho, USA) muni d'un thermocouple.

Toutes les analyses graphiques ont été entreprises avec le programme Origin 6.1 (OriginLab®, Northhampton, MA, USA). Les régressions non-linéaires utilisent une méthode basée sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt faisant appel à une minimisation simplexe des moindres carrés.

Les titrages potentiométriques ont été effectués avec un titrateur Metler Toledo DL 53 muni d'une électrode combinée Metler (Mississauga, Ontario). Le programme d'acquisition de l'appareil, DL WIN, permettait la dérivation mathématique des courbes de titrages.

2.3 Détermination expérimentale du pK_a par CE

Tous les peptides furent préparés à une concentration de 0,5 mg/L et entreposés à 4°C. Ils ont été dilués à (0,1 – 0,01 mg/L) pour l'injection et de l'oxyde de mésityle (0,2 % v/v) a été ajouté en tant que marqueur de flux électroosmotique.

Les tampons listés dans le tableau III ont été préparés avec une force ionique de 40 mM selon la méthode décrite dans la section 1.2.1 avec des tables similaires à celles présentées dans l'annexe 1. Les solutions étaient entreposées à 4°C pour une période d'utilisation maximale de 4 semaines.

Tableau III : Liste des systèmes de tampons utilisés dans ce travail et leurs propriétés.

Plage de pH	Système tampon		pK _a (25°C)	dpK _a /dT
	Acide	Base conjuguée		
2,0 – 3,6	H ₃ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	2,15	0,0044
3,7 – 5,7	CH ₃ CO ₂ H	CH ₃ CO ₂ Na	4,76	0,0002
5,8 – 8,3	NaH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄	7,20	-0,0028
8,0 – 9,0	H ₃ BO ₃	NaH ₂ B ₄ O ₇	9,23	-0,008
9,2 – 10,8	NaHCO ₃	Na ₂ CO ₃	10,33	-0,009
11,0 – 11,6	Na ₂ HPO ₄	Na ₃ PO ₄	12,33	-0,026

Un nouveau capillaire était traité avec 10 min × 20 psi de méthanol, 1 min × 20 psi d'eau, 20 min × 20 psi de NaOH 0,1 M, 1 min × 20 psi d'eau et 25 min × 15 psi de tampon afin d'atteindre un bon équilibre. En début de journée, le capillaire était équilibré avec 15 min × 20 psi de NaOH 0,1 M, 1 min × 20 psi d'eau et 25 min × 15 psi de tampon. Entre deux analyses utilisant le même tampon à un même pH, le capillaire était lavé avec 2 min × 15 psi de tampon. Entre deux analyses utilisant le même tampon à deux pH différents, le capillaire était lavé avec 5-10 min × 15 psi de tampon. Entre deux analyses utilisant deux tampons distincts à deux pH différents, le capillaire était lavé avec 1 min × 20 psi d'eau et 10-15 min × 15 psi de tampon.

L'injection du peptide s'effectuait hydrodynamiquement à 2 sec × 0,3 psi (correspondant à 12 nL) suivi de l'injection du tampon à 2 sec × 0,3 psi. La séparation avait lieu à 15 kV en mode positif avec une détection UV/Vis à 200 nm (lampe D₂). Lors des analyses, le capillaire était placé dans une cartouche et approximativement 50 % était en contact avec un liquide refroidissant circulant à 25,0 ± 0,1°C. Enfin, le changement des réservoirs tampons s'effectuait au plus à tous les 60 min d'analyses.

Pour construire les courbes décrites à la figure 2, les mobilités électrophorétiques d'un peptide sont déterminées à différents pH avec les tampons listés au tableau III. Les valeurs expérimentales obtenues permettent d'effectuer une régression non linéaire avec les équations décrites dans le Tableau I afin de déterminer les pK_a du peptide. Deux méthodes ont été testées pour obtenir les mobilités électrophorétiques, soit la méthode systématique et la méthode alternative développée pour cette étude.

La méthode systématique consistait à analyser chaque peptide en triplicata ($n = 3$) avec chaque tampon de pH déterminé. Ceci permettait ainsi de calculer une mobilité électrophorétique moyenne avec un écart type pour chaque valeur de pH testé.

Avec la méthode alternative, une série de six peptides étaient analysés l'un à la suite de l'autre avec le même tampon. Chaque peptide de la série était analysé une seule fois sauf le premier peptide qui était ré-analysé à la fin de la première série d'analyse des six peptides. En ayant ces deux mesures pour le premier peptide de la série, un écart était calculé et admis pour les mobilités de tous les six peptides de la série. Dans le cas de tampons acides, les temps d'analyse étant plus long, deux peptides au plus étaient analysés avec le même tampon et l'erreur était calculée de manière similaire.

2.4 Détermination expérimentale du pK_a par POT

Tous les peptides d'intérêt furent préparés à une concentration de 1,5 mM avec une solution contenant 1,5 mM de HCl et 38,5 mM de KCl. Un à trois aliquots de 30 mL furent titrés avec du NaOH 0,100 M à la température de la pièce (21-23 °C). L'extrapolation des pK_a a été effectuée manuellement en vérifiant la première dérivée des résultats de la courbe de titrage calculé par le programme d'acquisition du microtitrateur (voir figure 1 et l'exemple pour le dipeptide FF en annexe 3). Les données de volume et de pH du titrage imprimées dans un tableau était aussi vérifiées manuellement. En ayant les valeurs des points d'inflexion, les volumes de demi-équivalence pouvaient être calculés afin de déterminer les pK_a du peptide. Les erreurs expérimentales étaient calculées avec les deux ou trois résultats lorsque disponibles.

2.5 Détermination expérimentale de la mobilité limite

Des mélanges contenant de 2 à 11 peptides (0,1 - 0,01 mg/L) et du diméthyle sulfoxyde (0,2 % v/v) étaient injectés à 3 reprises. Deux pH limites furent utilisés pour s'assurer d'une protonation maximale (pH = 2,0) et d'une déprotonation maximale (pH = 11,6).

À pH acide, le peptide KK fut ajouté dans tous les mélanges comme étalon interne. À un pH de 2,0 ce dipeptide possède une charge effective se rapprochant à +3 et se déplace plus rapidement que tous les autres peptides analysés et fut utilisé pour déterminer les variations de mobilité entre les échantillons.

À pH basique, la majorité des fonctions acido-basiques sont presque entièrement déprotonés (>90%) à partir d'un pH \approx 9. Les valeurs de mobilités limites à haut pH ont été déterminées avec des pH intermédiaires entre 9,0 et 11,6 à différents moments lors de ce travail.

Il faut noter que les séries de peptides analysées aux deux pH n'étaient pas les mêmes dû aux restrictions d'inventaire au laboratoire. Or, un chevauchement de plus de 60% permettra d'effectuer les comparaisons d'intérêt.

3 • Résultats et discussion

3.1 Choix des conditions expérimentales

Une multitude de paramètres devaient être établis ou recherchés afin d'acquérir des données rapidement et de manière reproductible. Parmi les plus usuels en analyse, la température de travail est celle dictée par les conditions d'analyse normales soit 25°C. Elle est facile à obtenir et à contrôler instrumentalement et elle est communément utilisée dans la littérature, ce qui sera commode lors des comparaisons de certaines valeurs expérimentales.

La longueur d'onde de détection ($\lambda_{\text{dét}}$) de 200 nm est certes peu sélective, mais est choisie afin de détecter les peptides à courte chaîne utilisés dans ce travail et le marqueur de flux sans aucun problème de sensibilité [136]. De plus, comme la grande majorité des molécules organiques absorbent à cette λ , tout autre produit provenant d'une dégradation pouvant interférer ou fausser les données serait potentiellement visible sur les électrophérogrammes.

Les dimensions du capillaire de séparation ont un effet direct sur les paramètres d'analyse (E et V). De fait, elles interviennent dans plusieurs équations théoriques et doivent être rigoureusement contrôlées. Par exemple, dans l'équation (27), L_d et L_t permettent le calcul de la mobilité électrophorétique et dans l'équation (34) L_t donne accès à une estimation de la variation de la température dans le capillaire. La longueur totale utilisée (31 cm) est la plus courte employable sans tracas pour la cartouche de refroidissement de l'appareil P/ACE ; elle est considérablement plus courte que ce qui est communément utilisé pour des analyses en CE (40-70 cm). La raison primaire de ce choix est l'accélération de l'acquisition de données [47, 56, 137] .

Par contraste, un désavantage notable lors de l'utilisation d'un capillaire si court est la réduction de la longueur effective qui se trouve thermostatée par le liquide refroidisseur. Le design de la cartouche nécessite certes que les deux extrémités du capillaire ne soient pas intégrées au système de refroidissement afin qu'ils puissent tremper dans les fioles du tampon lors des analyses. Cette restriction inévitable mène à une thermorégulation de moins de 50 % de la longueur totale du capillaire. Ceci aggrave l'effet joule qui mène, entre autres, à l'élargissement des pics et à des valeurs de pK_a non-thermodynamiques.

Suite à cela, la détermination du voltage de travail devient possible. Ce paramètre est intrinsèquement relié au courant généré et à la chaleur dissipée dans le capillaire qui est aussi lié aux propriétés de transport électrique du tampon. Pour expédier le travail de recherche d'un voltage, certaines lignes directrices examinées dans la littérature sont suivies. La première stipule que la mobilité électrophorétique augmente de 2% par degré Celsius [86]. La seconde approxime à 5000-10 000 W/m²°C le coefficient de transfert thermique (h) d'un liquide refroidisseur [138]. La troisième prévoit une augmentation de la température au centre du capillaire de 0,2-3°C par 1 W/m de puissance dissipée [139] menant à un gradient de température.

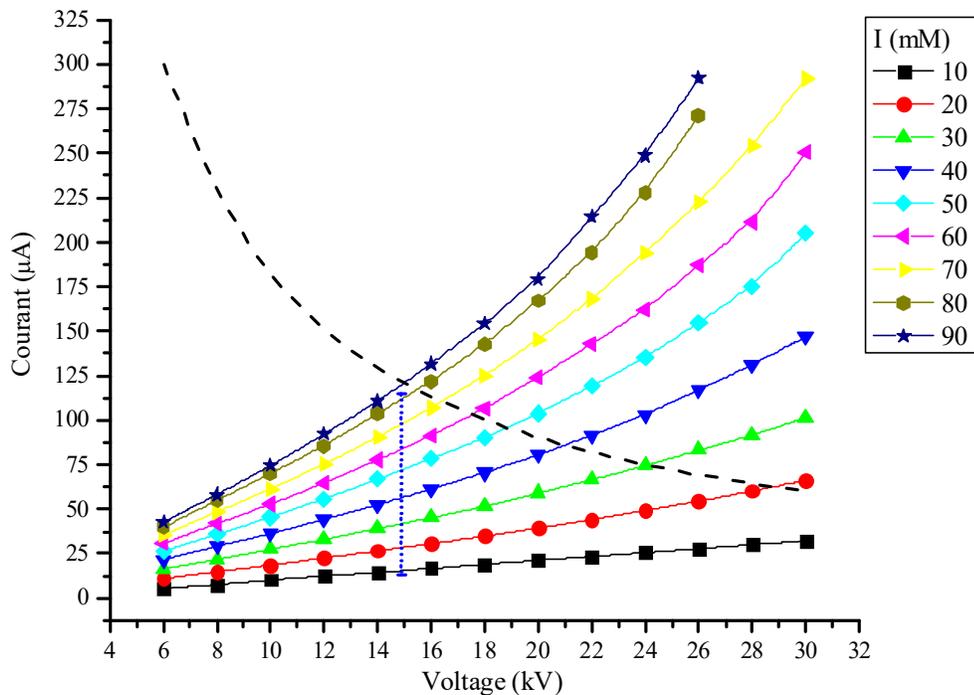


Figure 3 : Graphiques de la loi d'Ohm permettant de déterminer le voltage de travail. Les différentes courbes représentent des tampons H_3PO_4/NaH_2PO_4 à pH 7,00 de différentes forces ioniques (I) tel qu'indiqué dans la légende du graphique. La ligne en tirets (---) représente la limite de puissance ($W= V \times i = 1,8$) établie qu'il ne faut pas dépasser. La barre verticale pointillée bleue (⋯) représente la gamme de courants expérimentaux obtenus avec tous les tampons au voltage expérimental choisi de 15 kV. Les paramètres de la méthode sont $L_t = 31,2$ cm ; $L_d = 20,9$ cm

En admettant une variabilité thermique utilitaire de 0,5°C et en utilisant la valeur approximative de 5000 W/m²°C pour h (pire cas), il devient possible de calculer une puissance limite de travail avec l'équation (34). Une valeur de 1,8 W est obtenue pour la

limite de puissance (ligne pointillée dans la figure 3) ce qui permet de construire des graphiques d'Ohm afin de déterminer un voltage de travail où l'effet de la température serait minimal.

D'après la figure ci-dessus, la linéarité de la loi d'Ohm n'est pas respectée sur toute la gamme de voltage dû à une augmentation de température à l'intérieur du capillaire [86, 140, 141]. Plus la force ionique de l'électrolyte augmente, plus sa conductivité augmente et moins la réponse est linéaire. Afin de d'obtenir des mobilités reproductibles, il faut utiliser un tampon dont la force ionique se situe dans la portion linéaire sous la ligne de limite de puissance (ligne pointillée, figure 3). Un compromis doit être fait afin d'obtenir une capacité tampon adéquate tout en minimisant l'effet de gradient de température.

La majorité des auteurs utilisant la CE pour déterminer les pK_a travaillent avec une force ionique contrôlée variant entre 40-60 mM. Pour ce travail, une force ionique de 40 mM est choisie, ce qui est représenté par les triangles bleus sur la figure 3. Aussi, le voltage de travail préconisé n'est pas le voltage limite accessible de 21 kV, mais une valeur plus basse de 15 kV. Les justifications pour ce choix sont la différence de conductivité des autres systèmes tampons qui seront utilisés dans de ce travail et la gamme étendue de pH qui sera couverte (pH 2,0 à 11,6). De fait, une multitude d'études du même type que celle donnée dans la figure 3 auraient pu être effectuées à d'autres pH et avec d'autres tampons. Les résultats seraient inévitablement différents dû aux différentes propriétés de chaque solution. De plus, la grande mobilité des ions hydronium dans les solutions acides et les ions hydroxydes dans les solutions basiques limitent fortement le voltage applicable. De fait, les analyses expérimentales effectuées avec la gamme complète de tampons avec $I = 40$ mM ont donné des courants allant de $10 \mu A$ jusqu'à près de $100 \mu A$ (voir barre pointillée bleue sur la figure 3). Les pH extrêmes $< 2,5$ et > 11 ont souvent données des courant s'approchant de $100 \mu A$ ce qui nous situait très proche de la zone limite de linéarité pour le voltage expérimental choisi de 15 kV. Enfin, en travaillant à ce voltage, on se donne une marge de manœuvre qui permettra un travail expérimental sans limitations inutiles qui prend en considération la variabilité des tampons utilisés.

3.2 Détermination des pK_a de peptides

3.2.1 Allure des électrophérogrammes

Les séparations du peptide FF et du DMSO (marqueur du EOF) à plusieurs pH sont présentées dans la figure 4. Cette série d'électrophérogrammes montre le comportement attendu pour une molécule amphotère. Tout d'abord, au pH (5,14) \sim pI (5,1), le peptide est très faiblement chargé ou neutre et co-migre avec le DMSO rendant difficile la reconnaissance des pics. Ensuite, aux pH (6,29 - 9,89) $>$ pI, le peptide est chargé négativement ce qui le fait migrer à la suite du EOF et lui confère une mobilité négative. Enfin, aux pH (2,60 - 3,97) $<$ pI, le peptide est chargé positivement ce qui le fait migrer avant le EOF et lui confère une mobilité positive.

L'allure des pics change puisque différents tampons sont utilisés et ces derniers possèdent différentes propriétés optiques et électrodynamiques. Les caractéristiques spectrales du DMSO sont affectées par ces changements et son pic peut être positif ou négatif [133, 142]. Aussi, dû à la volatilité du DMSO, l'âge du mélange pour injection peut affecter la quantité présente et le pic détecté variera selon la concentration restante. La présence d'eau dans le mélange pour injection peut aussi servir de marqueur puisqu'aucune absorption n'est obtenue lorsque la zone d'eau migre dans la fenêtre de détection donnant parfois un pic négatif selon la nature du tampon. La superposition d'un pic positif (i.e., de DMSO) dans le creux d'un pic négatif résulte souvent en un mélange complexe de tous les effets décrits précédemment. Occasionnellement, pour s'assurer d'une assignation correcte des pics, chaque produit était injecté seul. La symétrie des pics est aussi affectée par la concentration injectée qui ne doit pas excéder 1% de la concentration du tampon [143]. Pour le protocole expérimental de ce travail, les concentrations des solutions de peptides préparées étaient de 0,01 à 0,1 mM représentant 0,025 à 0,25% de la concentration du tampon. La distorsion de pics occasionnellement observée dans certains électrophérogrammes ne semblait pas affecter les mobilités de manière significative.

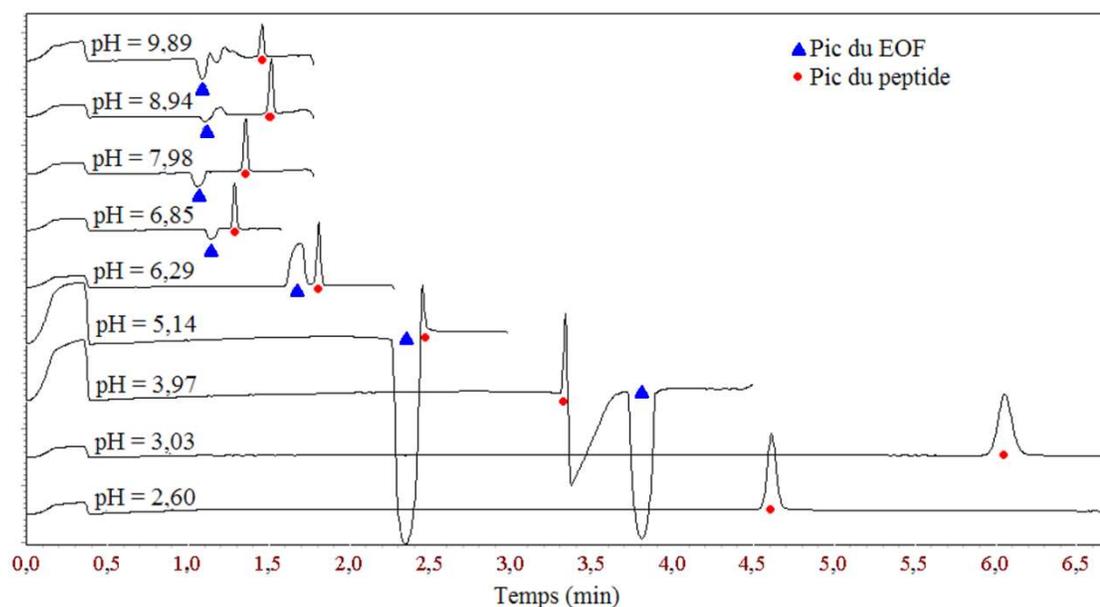


Figure 4 : Allure d'une série d'électrophérogrammes à plusieurs pH pour l'analyse d'un mélange du dipeptide FF et du marqueur de flux électro-osmotique DMSO. Le pic du DMSO n'est pas montré aux pH 2,60 et 3,03, car il migre plus loin. Paramètres de l'analyse : $I = 40 \text{ mM}$; $V = 15 \text{ kV}$; $L_t = 31,1 \text{ cm}$; $L_d = 21,2 \text{ cm}$.

3.2.2 Choix de la méthode et reproductibilité

L'acquisition des données pour construire une courbe de titrage pour chaque peptide par CE est la partie la plus longue de ce travail. En cueillant des données de manière systématique (i.e., classique) afin d'obtenir les valeurs de mobilité en triplicata pour chaque pH et calculer une erreur, l'analyse simultanée de deux peptides avec 20 tampons nécessite 60 injections. Les résultats d'une telle analyse pour les dipeptides FF et GG sont présentés dans le tableau IV et montrent la quantité de données obtenues. Ces deux peptides ont été analysés simultanément car leurs propriétés électrophorétiques et spectrales permettaient de facilement différencier les deux pics présents dans un électrophérogramme. En cas de doute sur l'assignation des pics, les spectres UV acquis par le détecteur DAD était comparés pour établir l'identité du peptide. Selon le tableau IV, on voit que l'erreur de la mobilité varie de 0,3 à 7,8 % RSD ($n = 3$) à travers la gamme de pH des tampons, excluant les données aberrantes à pH 4,82 et 5,69.

Pour accélérer la cueillette de données, la méthode alternative détaillée à la section 2.3 requérant une seule valeur de mobilité pour chaque pH est employée et permet

l'analyse en séquence d'une série de six peptides par jour. Ainsi on obtient seulement le 1/3 des données présentées au tableau IV pour chaque peptide. Le calcul de l'erreur sur chaque valeur de mobilité est basé sur les deux valeurs provenant d'un peptide analysé en début de série et en fin de série (7^{ème} analyse) pour chaque pH de travail. Les résultats partiels pour les peptides (G)₂₋₆ et GP sont montrés dans le tableau V et illustrent la convolution des données qui s'opère. Le peptide ré-analysé en fin de série est le GG où on voit que l'erreur sur la mobilité varie de 0,3 à 23,9 % RSD (n = 2) sans inclure les valeurs aux pH 5,80 et 6,29. Une différence marquée existe entre la gamme des erreurs relatives sur les mobilités obtenues avec les deux méthodes soit 0,3 - 7,8% pour la méthode systématique versus 0,3 - 23,9% pour la méthode alternative. Par contre, les médianes des erreurs relatives pour les deux méthodes étaient assez proches : 2,1% et 3,2% RSD respectivement pour la méthode systématique et alternative, les deux calculées à travers tous les pH.

La variabilité du EOF indiquée dans les Tableaux IV et V suit une tendance similaire pour les deux méthodes. Tel qu'attendu, le RSD est plus important à bas pH qu'à haut pH. Ceci est relié au degré d'ionisation des silanols à la paroi interne du capillaire qui est fortement affecté par le pH du tampon. Ce phénomène et ses répercussions sera plus amplement discuté à la section 3.2.3.

Tableau IV : Données typiques pour la détermination de pK_a par la méthode systématique pour les peptides FF et GG avec t_0 obtenu avec DMSO. Paramètres de l'analyse : $I = 40$ mM ; $V = 15$ kV ; $L_t = 31,2$ cm ; $L_d = 20,9$ cm.

pH*	FF (0,1 mM)			μ ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)	GG (0,1mM)			μ ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)	μ_{eof} ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)
	t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		
2,63	4,63	58,4	14,5	14,5 (7,4)	3,10	58,4	22,3	23,6 (4,8)	1,5 (11,4)
	4,95	57,3	13,5		2,85	57,3	24,3		
	4,16	38,2	15,6		2,79	38,2	24,2		
2,98	4,65	18,9	11,8	12,1 (1,8)	3,35	18,9	17,9	18,1 (1,1)	2,6 (11,1)
	4,93	28,7	12,3		3,50	28,7	18,3		
	5,33	46,0	12,1		3,72	46,0	18,0		
3,27	5,69	17,8	8,71	9,11 (5,5)	4,44	17,8	12,3	12,9 (5,4)	4,1 (2,2)
	5,40	16,0	8,94		4,24	16,0	12,6		
	5,50	20,3	9,67		4,23	20,3	13,7		
3,56	6,04	11,6	5,80	6,16 (7,8)	5,01	11,6	8,29	8,66 (7,4)	5,9 (0,71)
	5,92	13,0	6,71		4,86	13,0	9,40		
	6,17	12,5	5,96		5,15	12,5	8,30		
3,83	3,63	4,41	3,57	3,75 (4,4)	3,42	4,41	5,96	5,92 (2,3)	15,9 (0,17)
	3,65	4,50	3,78		3,58	4,50	5,76		
	3,78	4,73	3,90		3,71	4,73	6,02		
4,33	2,61	2,73	1,19	1,24 (4,9)	2,76	2,73	2,46	2,55 (4,8)	24,8 (0,27)
	2,72	2,85	1,23		2,83	2,85	2,50		
	3,08	3,25	1,30		2,88	3,25	2,69		
4,82	2,22	2,22	-0,0148	0,128 (157)	2,23	2,22	1,32	1,12 (26)	32,3 (0,04)
	2,25	2,27	0,271		2,27	2,27	0,910		
5,69	2,02	1,96	-1,09	-1,06 (3,2)	1,83	1,96	-0,351	-0,479 (23)	37,9 (0,05)
	1,97	1,92	-1,08		1,82	1,92	-0,557		
	1,91	1,86	-1,02		1,83	1,86	-0,528		
6,00	1,83	1,77	-1,53	-1,48 (3,7)	1,77	1,77	-0,708	-0,733 (4,4)	41,2 (0,01)
	1,81	1,75	-1,42		1,79	1,75	-0,769		
	1,83	1,76	-1,48		1,79	1,76	-0,722		
6,31	1,75	1,64	-2,73	-2,72 (0,6)	1,66	1,64	-1,17	-1,21 (3,6)	44,5 (0,01)
	1,73	1,63	-2,70		1,66	1,63	-1,26		
	1,73	1,62	-2,71		1,65	1,62	-1,21		
6,62	1,76	1,59	-4,57	-4,67 (2,2)	1,62	1,59	-1,94	-1,97 (1,7)	46,0 (0,02)
	1,75	1,58	-4,67		1,62	1,58	-2,00		
	1,74	1,56	-4,78		1,61	1,56	-1,99		
6,92	1,32	1,17	-7,12	-7,03 (1,3)	1,23	1,17	-2,95	-3,02 (2,4)	61,9 (0)
	1,31	1,17	-6,93		1,23	1,17	-3,06		
	1,32	1,17	-7,03		1,23	1,17	-3,06		
7,21	1,35	1,14	-10,1	-10,0 (1,1)	1,23	1,14	-4,63	-4,69 (1,1)	63,6 (0)
	1,34	1,14	-9,91		1,23	1,14	-4,73		
	1,35	1,14	-10,0		1,23	1,14	-4,72		
7,50	1,38	1,11	-13,1	-13,1 (0,3)	1,24	1,11	-6,98	-7,04 (0,7)	65,5 (0,006)
	1,38	1,10	-13,0		1,24	1,10	-7,08		
	1,38	1,10	-13,1		1,25	1,10	-7,06		
7,95	1,45	1,12	-15,3	-15,3	1,38	1,12	-12,6	-12,7	64,7

pH*	FF (0,1 mM)			μ ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)	GG (0,1mM)			μ ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)	μ_{eof} ($\times 10^{-5}$) moyenne (RSD %)
	t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		
8,55	1,46	1,12	-15,4	(0,5)	1,38	1,12	-12,9	(1,3)	(0)
	1,46	1,12	-15,4		1,38	1,12	-12,8		
	1,47	1,08	-18,1		1,64	1,08	-21,1		
8,86	1,46	1,09	-17,2	-17,6 (2,6)	1,65	1,09	-21,0	-21,3 (1,8)	66,9 (0,006)
	1,47	1,08	-17,6		1,65	1,08	-21,7		
	1,46	1,07	-1,80		1,67	1,07	-24,2		
9,24	1,45	1,07	-1,77	-17,9 (0,8)	1,66	1,07	-24,5	-24,4 (0,9)	67,7 (0)
	1,45	1,07	-18,0		1,66	1,07	-24,6		
	1,49	1,08	-18,6		1,83	1,08	-27,7		
9,6	1,48	1,08	-18,5	-18,5 (0,4)	1,84	1,08	-28,1	-28,1 (1,1)	67,1 (0)
	1,48	1,08	-18,5		1,84	1,08	-28,3		
	1,43	1,05	-18,8		1,80	1,05	-29,2		
11,4	1,43	1,04	-19,4	-19,0 (1,7)	1,81	1,04	-29,8	-29,5 (1,0)	69,4 (0,007)
	1,43	1,04	-18,9		1,80	1,04	-29,4		
	1,25	0,929	-20,1		1,57	0,929	-32,0		
9,6	1,26	0,927	-20,6	-20,4 (1,3)	1,57	0,927	-32,2	-32,3 (1,1)	78,2 (0,002)
	1,25	0,925	-20,4		1,57	0,925	-32,6		

* pH mesuré avec pH mètre calibré à 0,02 unité de pH

Tableau V : Données typiques pour la détermination de pK_a par la méthode alternative pour les peptides GG, G₃, G₄, G₅, G₆ et GP. Paramètres de l'analyse *idem* au tableau III.

pH*	GG (0,1 mM)			G ₃ (0,05 mM)			Autres peptides	GG, 7 ^{ème} analyse			RSD (%) ^a μ	RSD (%) ^b EOF
	t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)	t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		t_m (min)	t_0 (min)	μ ($\times 10^{-5}$) (cm^2/Vs)		
2,60	2,87	15,20	20,6	3,18	16,67	18,6	4 Afin de simplifier la présentation, les données des 4 autres peptides (G ₄ , G ₅ , G ₆ et GP) ne sont pas tabulées	3,10	18,41	20,0	2,1	7,7
2,91	2,99	9,95	17,1	3,28	11,27	16,2		3,02	12,49	18,6	5,0	13,0
3,31	4,22	10,03	10,0	4,13	10,31	10,6		4,40	15,10	11,9	11,2	16,2
3,48	3,01	5,23	10,3	3,15	5,41	9,68		3,30	6,11	10,2	0,5	5,2
3,81	3,3	4,46	5,73	3,23	4,30	5,60		3,30	4,550	6,07	4,1	2,8
3,97	2,340	2,63	3,43	2,75	3,35	4,71		2,95	3,66	4,82	23,9	10,3
4,47	2,30	2,48	2,39	2,32	2,50	2,25		2,37	2,58	2,45	1,7	1,3
4,94	2,10	2,18	1,39	2,06	2,14	1,56		2,23	2,13	1,54	17,7	1,0
5,80	1,93	1,87	-1,09	1,90	1,87	-0,678		1,79	1,76	-0,669	34,0	2,2
6,29	1,73	1,73	-5,79	1,77	1,70	-1,53		1,73	1,68	-1,71	56,6	1,3
6,49	1,73	1,67	-1,67	1,72	1,64	-2,04		1,72	1,65	-1,72	2,1	0,9
6,85	1,70	1,63	-2,70	1,70	1,58	-3,27		1,68	1,58	-2,65	1,4	1,3
7,15	1,64	1,49	-4,36	1,66	1,49	-5,03		1,65	1,50	-4,44	1,4	0,7
7,44	1,30	1,18	-6,14	1,32	1,17	-6,90		1,33	1,19	-6,35	2,3	1,3
7,80	1,30	1,13	-8,32	1,31	1,13	-9,05		1,28	1,13	-7,35	8,8	1,3
7,98	1,31	1,11	-10,1	1,35	1,12	-11,6		1,30	1,12	-9,36	4,6	0,4
8,26	1,60	1,19	-15,9	1,58	1,19	-15,3		1,60	1,19	-16,1	0,7	0,4
8,54	1,68	1,18	-18,5	1,62	1,18	-16,9		1,69	1,18	-18,4	0,3	0,4
8,83	1,81	1,18	-21,7	1,70	1,18	-19,2		1,80	1,18	-21,6	0,6	0,2
9,00	1,66	1,02	-27,6	1,73	1,18	-20,0		1,88	1,16	-24,2	9,2	0,5

* pH mesuré avec pH mètre calibré à 0,02 unités de pH

a. L'erreur est calculé avec les deux valeurs (n=2) de la mobilité du peptide GG et GG 7^{ème} analyse.

b. L'erreur est calculée avec les sept valeurs (n=7) du EOF des sept analyses effectuées à chaque pH.

Une comparaison de ces deux méthodes est effectuée ci-dessous afin de démontrer l'utilité et la validité statistique des résultats pour la méthode alternative. L'intérêt ici est de vérifier la reproductibilité de la détermination des pK_a avec les deux méthodes. Les régressions non linéaires pour le peptide GG avec les deux méthodes sont données à la figure 5 et les résultats sont résumés au tableau VI pour deux peptides, soit GG et FF. La comparaison du facteur de corrélation R^2 montre que la méthode systématique est supérieure à la méthode alternative. Par contraste, les valeurs des pK_a présentent un faible écart moyen de 2%, suggérant que les résultats obtenus avec ces deux méthodes sont équivalents. Par conséquent, la méthode alternative étant beaucoup plus rapide, elle a été utilisée pour les analyses subséquentes.

Le nombre de points expérimentaux nécessaire pour obtenir une courbe adéquate affecte nécessairement la qualité des résultats de la régression. Cependant, une exigence importante est l'espacement régulier de ces points sur l'axe des x (pH) pour effectuer une régression mathématique convenable. La plage de pH analysée pour le peptide GG dans la figure 5 est plus large pour la méthode systématique que la méthode alternative. En couvrant une gamme de pH plus basique dans la méthode systématique, la régression permet de calculer les mobilités limites du peptide plus adéquatement puisqu'on atteint un plateau à partir du pH 10. Pour cette raison, les valeurs de mobilité limite ne concordent pas entre les deux méthodes. Cette observation nous indique qu'il est possible d'obtenir les pK_a de peptides sans couvrir une large gamme de pH mais qu'il est préférable d'obtenir les mobilités limites de peptides en travaillant un projet séparé.

Tous les résultats de pK_a obtenus à $I = 40$ mM par CE sont tabulés dans l'annexe 4 avec certaines valeurs comparatives de la littérature. En validant l'utilisation de la méthode alternative discutée ci-haut, ce travail a nécessité l'acquisition d'approximativement 2000 au lieu de 6000 électrophérogrammes.

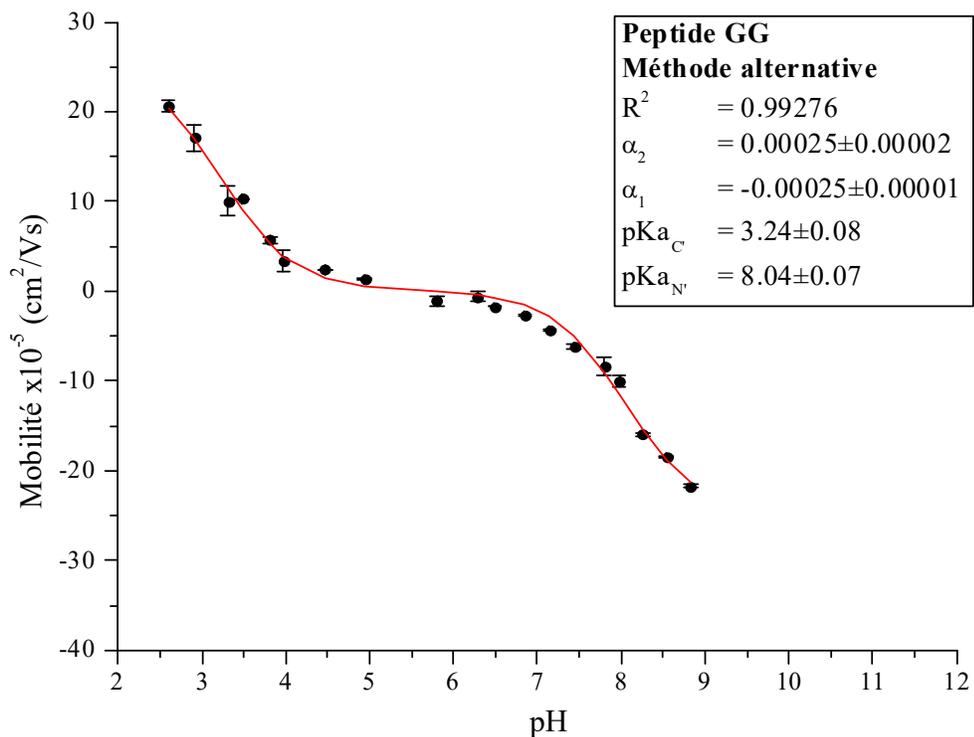
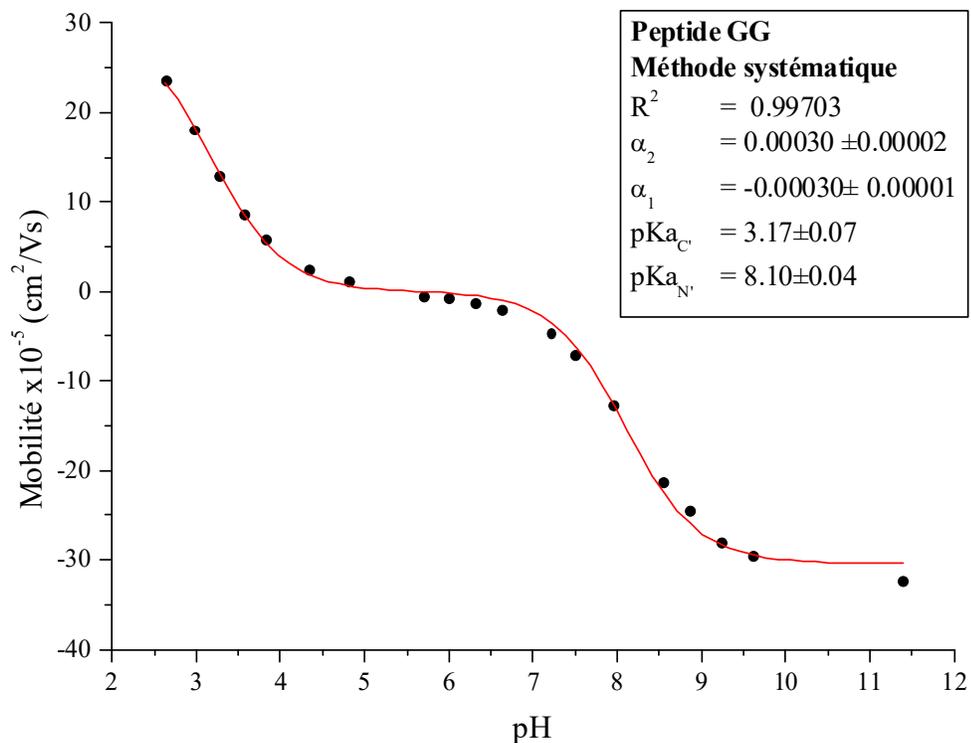


Figure 5 : Courbes de titrages par CE pour le dipeptide GG effectuée avec la méthode systématique en triplicata (haut) et alternative (bas). Les résultats de la régression non linéaire sont résumés dans l'encadré à l'intérieur de chaque graphique. Paramètres de l'analyse *idem* aux tableaux IV et V.

Tableau VI : Comparaison des résultats de régressions non linéaires pour les deux méthodes d'acquisition de données utilisées lors de la détermination des pK_a de peptides.

Peptide		FF		GG	
Fonction chimique		C'	N'	C'	N'
Méthode systématique	pK _a	3,27±0,06	7,17±0,03	3,13±0,07	8,15±0,04
	R ²	0,998		0,997	
Méthode alternative	pK _a	3,16±0,15	7,04±0,09	3,23±0,08	8,03±0,07
	R ²	0,990		0,993	
Écart entre pK _a (%)		1,5	1,3	1,3	0,6

3.2.3 Provenance des erreurs

La distribution des erreurs lors de l'acquisition de données est représenté à la figure 6. Tout d'abord, la variabilité du EOF (cercles ouverts) est en grande partie responsable de ces erreurs [144]. Aux pH élevés, l'erreur est faible car il y a peu de variation dans le EOF qui est très rapide dû à la déprotonation quasi-complète des silanols aux parois du capillaire donnant une double couche électrique stable et reproductible. Plus le pH diminue, plus les silanols sont protonés et plus la mobilité du EOF diminue. La difficulté d'obtenir un équilibre acido-basique stable avec les tampons dont le pH est autour du pK_a ~ 6 des silanols est la raison majeure de cette variabilité. À bas pH, les silanols sont presque entièrement protonés et le EOF est très faible. Encore-là, la stabilité de l'équilibre acido-basique des parois internes du capillaire est mise en cause. De plus, la diffusion longitudinale augmente avec le temps d'analyse ce qui ajoute une variance supplémentaire dans la mesure du EOF.

Tout ceci se répercute directement sur le calcul des mobilités électrophorétiques des peptides analysés et sur leurs erreurs relatives (carrés, cercles et triangles, sur la figure 6). Ces erreurs sont presque uniquement associées à la variation du EOF (cercles vides) et suivent une tendance similaire. Cependant, pour mieux comprendre les variations observées, trois domaines sont discernables et correspondent avec l'état de protonation générale du peptide dans la gamme de pH ciblée. À haut pH (triangles), l'erreur relative sur la mobilité est faible, car le peptide possède un temps de migration très faible dû au EOF élevé. Cependant, une faible variation des paramètres expérimentaux (pH, T et I) mènerait à un changement important de la mobilité puisque le peptide se retrouve à des pH

près de son $pK_{a-N'}$ et le comportement de la mobilité est en pente tel que visible dans la figure 5.

Aux pH proches du point isoélectrique du peptide (cercles remplis), la mobilité du peptide est quasi nulle ce qui rend sa détermination expérimentale plus difficile. Une faible variation positive ou négative mène à une grande erreur sur la valeur de cette dernière. De ce fait, même si elle est très large, l'effet de l'erreur relative n'est pas significative.

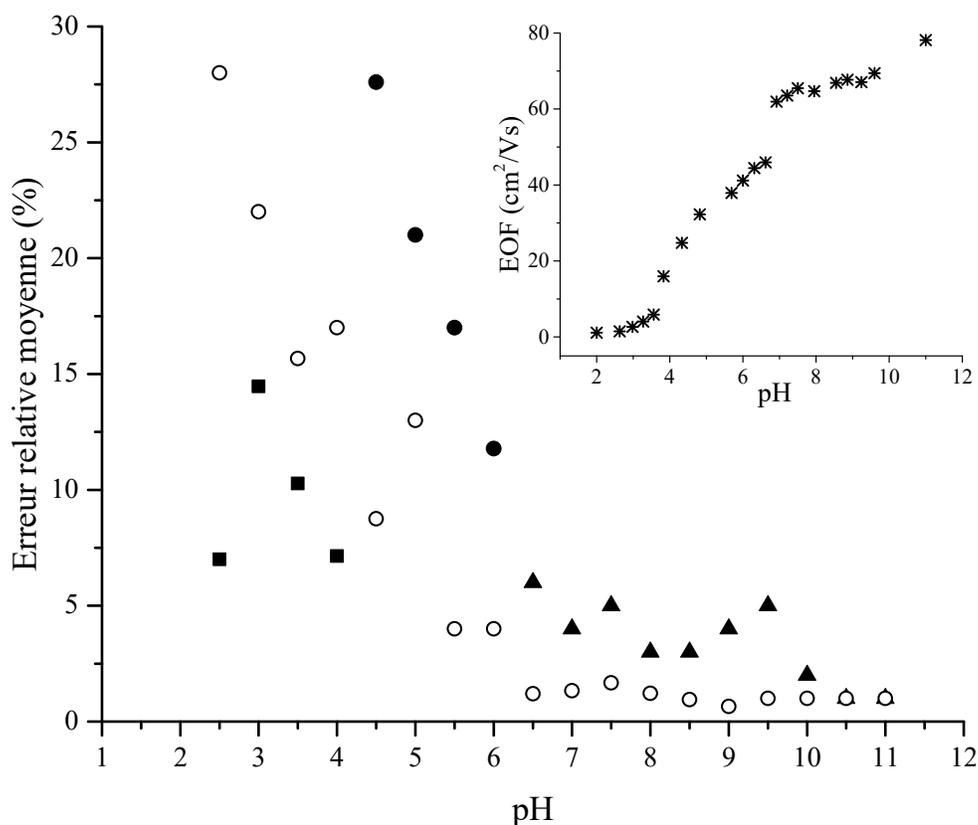


Figure 6 : Étude de la distribution des erreurs moyennes pour les mobilités électrophorétiques d'une série de peptides amphotères dans leur état cationique (■), presque neutre (●), anionique (▲) et de la mobilité du EOF (○). La variation du EOF (*) avec le pH est présenté dans le coin supérieur droit du graphique. Paramètres de l'analyse *idem* au tableau V.

Aux pH acides proches du $pK_{a-C'}$ (carrés, figure 6), le comportement est analogue aux pH élevés où la mobilité du peptide est élevée et très reproductible. Cependant, tel que discuté plus haut, le EOF varie grandement ce qui explique les grandes erreurs relatives.

Aux pH acide et basique extrêmes, l'ionisation du peptide est totale et sa mobilité atteint une limite. Ceci est représenté par un plateau dans la figure 5 et mis en évidence par le résultat de la régression des données de la méthode systématique. Par la suite, la variabilité est minimisée dans les séries d'analyses et l'erreur baisse. Ce comportement est aussi valide à bas pH même si le EOF est très faible et son instabilité est maximale.

3.2.4 Effet de la force ionique sur les pK_a de peptides

Une étude préliminaire de l'effet qu'a la force ionique sur l'ionisation des peptides diprotiques FF et AF est présentée ci-dessous. Le but visé est de déterminer la valeur expérimentale du pK_a à 40 mM par rapport à la valeur thermodynamique extrapolée à I → 0 mM. Les courbes de tendances présentées dans la figure 7 et la figure 8 sont interprétées avec l'équation Debye-Huckel (équation (7)). Le but n'étant pas d'effectuer une analyse mathématique mais de comprendre la variabilité du pK_a N' et C'. Les tendances obtenues sont les mêmes pour les deux analytes et sont celles attendues pour de simples dipeptides. Entre autres, elles permettent de vérifier qu'à l'état zwitterion, ces derniers se comportent telle une molécule neutre. Cette observation est aussi effectuée par plusieurs auteurs qui ont étudié le comportement de l'ionisation d'acides aminées et de dipeptides dans des milieux de différentes forces ioniques. [76-85].

La différence de comportement entre la fonction N' et C' est attribuable à la différence d'hydratation entre les réactifs et les produits pour chaque équilibre de déprotonation du peptide diprotique.



Celui du C' (réaction 31) est appelé isocoulombic puisque la charge nette des réactifs est la même que celle des produits formés tel que H₃N⁺-R-COOH est un cation et les produits formés sont H₃N⁺-R-COO⁻, une molécule considérée neutre et H⁺, un cation. Ainsi, la réaction part avec un cation et forme un cation. Ceci mène à un réarrangement minimal de la structure de l'eau dans le microenvironnement où se produit la réaction. Le

terme contribuant à la correction du pK_a-C' est ainsi linéaire ($z = 0$, équation 7). Étant donné les limites de force ionique pouvant être couvertes dans ce travail, une faible variation des pK_a est obtenue et les erreurs semblent grossièrement exagérées. De plus, les régressions tentatives (lignes hachurées) aux figures 7 et 8 sont des approximations simplistes afin de faire le parallèle entre la littérature citée et les résultats obtenus. Il serait possible de pousser l'interprétation de ces courbes en effectuant une analyse mathématique plus formelle qui dépasse le cadre de cette étude.

Par contraste, l'équilibre pour N' (réaction 32) implique le passage d'une espèce zwitterionique considérée neutre à deux espèces chargées qui mènent à un réarrangement important des molécules d'eau. Ceci ajoute une correction plus complexe au pK_a-N' ($z = -1$, équation 7). En somme, la fonction amine est plus sensible à la variation de la force ionique que la fonction acide carboxylique. Les peptides FF et AF montrent une variation totale de 0,34 et 0,35 unité pour le pK_a-C' comparativement à une variation de 0,43 et 0,45 pour pK_a-N' . Encore là, cette interprétation sommaire basée sur une hypothèse de restructuration dans le microenvironnement moléculaire est couverte par les mêmes auteurs cités ci-haut et revue de manière critique dans la publication de Sastre de Vicente [75].

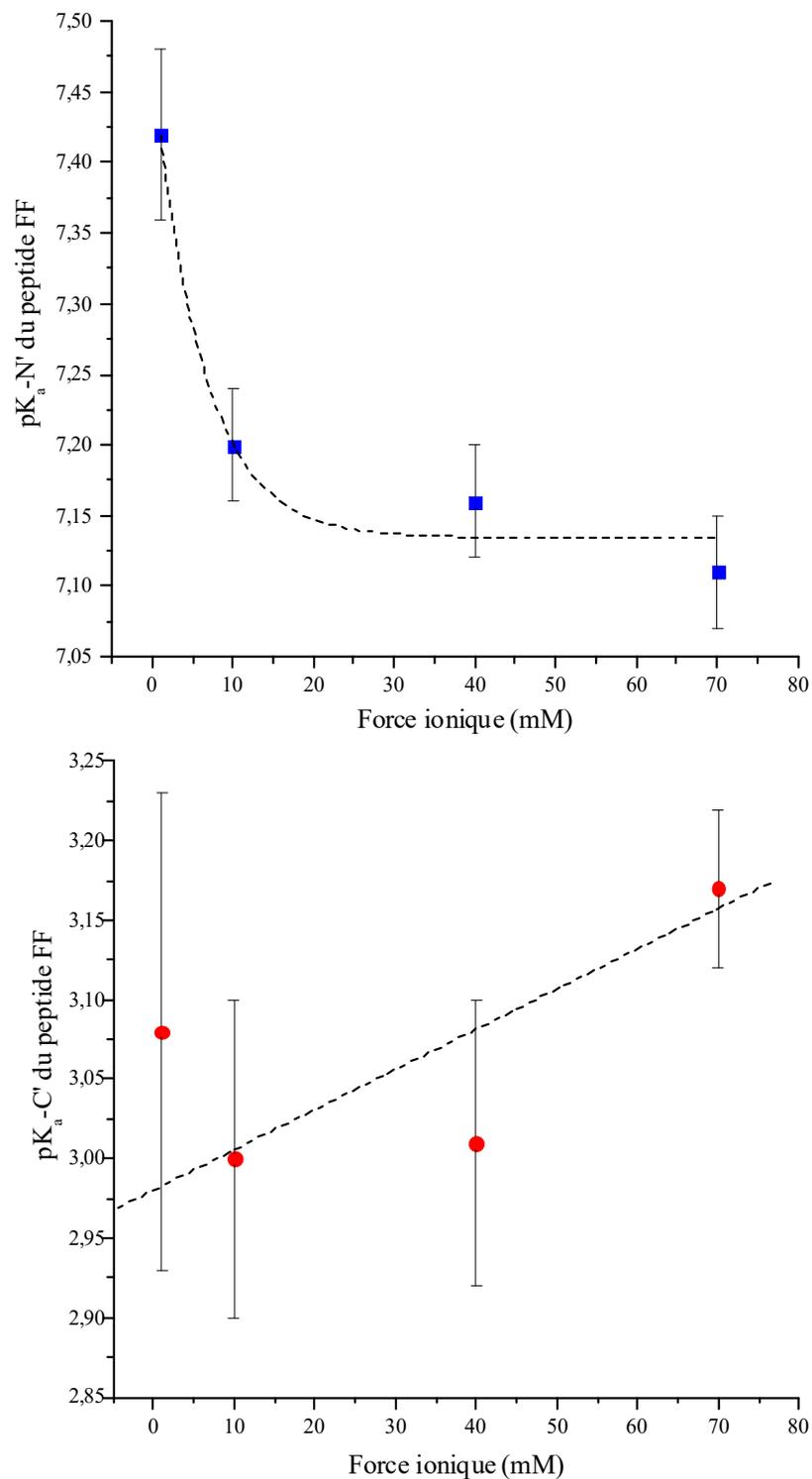


Figure 7 : Effet de la force ionique sur les pK_a-N' (■) et pK_a-C' (●) du peptide FF déterminés par CE. Paramètres de l'analyse : I variable ; V = 15 kV ; L_t = 31,3 cm ; L_d = 21,3 cm. Les lignes en tirets (---) montrent des régressions tentatives, approximatives et non formelles.

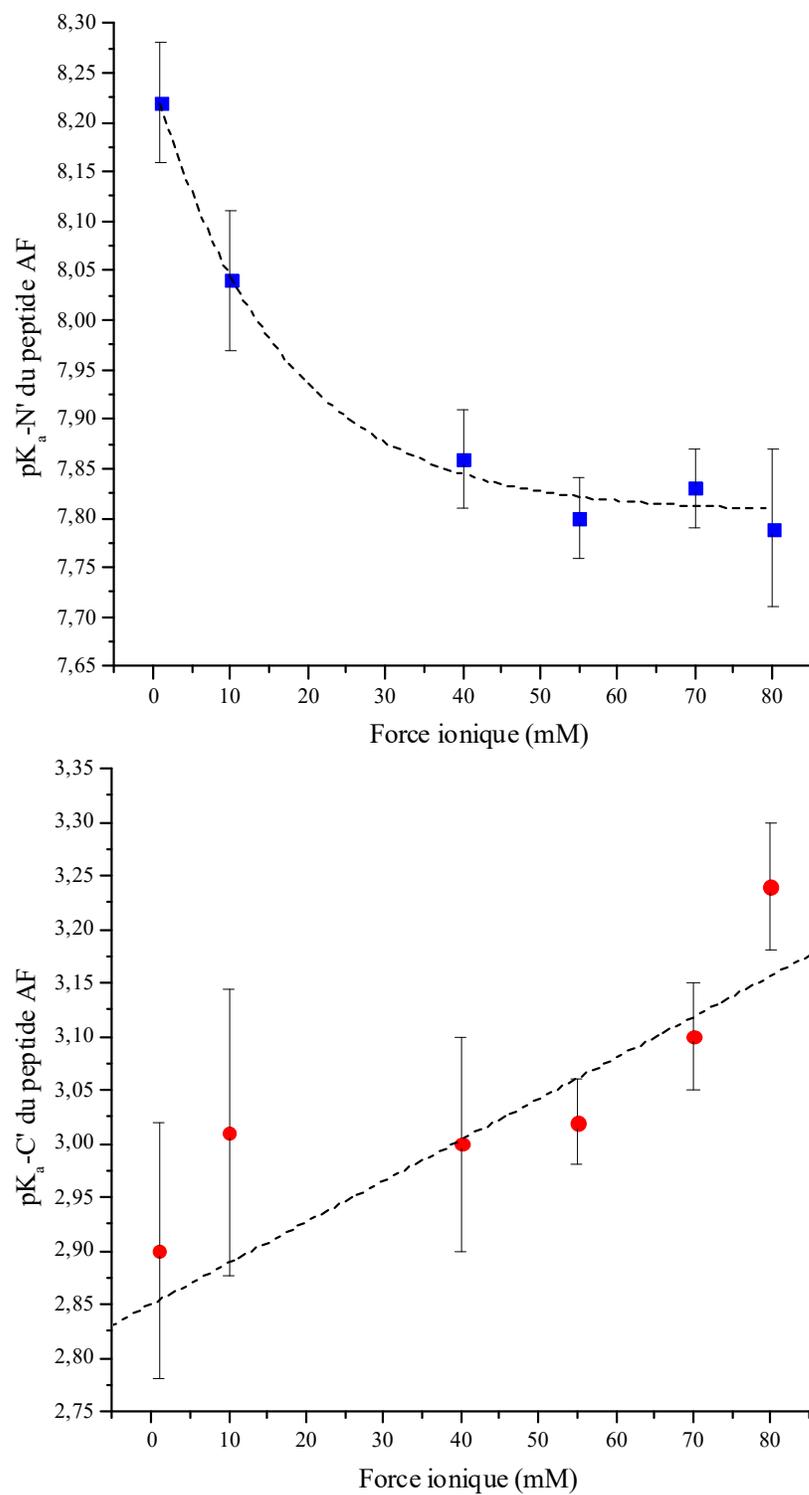


Figure 8 : Effet de la force ionique sur les pK_a-N' (■) et pK_a-C' (●) du peptide AF déterminés par CE. Paramètres de l'analyse, idem figure 7. Les lignes en tirets (---) montrent des régressions tentatives, approximatives et non formelles.

3.3 Effet de la nature du résidu voisin sur l'ionisation du peptide

3.3.1 Origines des tendances observées pour les dipeptides

Suite à la collecte de pK_a des différents peptides, une approche empirique fut utilisée afin de comprendre la provenance de la variabilité dans l'ionisation d'un même résidu. Le paramètre utilisé est l'hydrophobicité des a.a. tel que classifiés par l'échelle Kyte Doolittle [130] dont les valeurs sont tabulées à l'annexe 2. La figure 9 met en relation cette échelle avec les valeurs de polarité de Grantham [145] et permet de corréliser deux classifications des a.a. qui serviront dans la discussion qui suit. Il faut noter que la dépendance entre l'hydrophobicité et la polarité n'est pas linéaire et qu'il y a une dispersion des points. Les deux échelles sont de nature semi-empiriques et les valeurs proposées par chaque auteur demeurent une interprétation fondée sur des observations propre à chaque approche expérimentale. Grossman [18] est l'un des premiers auteurs ayant utilisé la classification de l'hydrophobicité des a.a. dans ses travaux impliquant les séparations peptidiques. Cependant, l'analyse effectuée était minimaliste et n'a jamais été développée davantage.

Des séries de dipeptides contenant le même a.a. en début de chaîne ou en fin de chaîne ont été analysées. Les graphiques représentant la variation des pK_a en fonction de l'hydrophobicité sont présentés aux figures 10 et 11. Dans le cas de la figure 10, le changement du $pK_{a-N'}$ des acides aminés Gly, Ala et Phe localisés au début de la chaîne est présenté en fonction de l'hydrophobicité du résidu voisin variable (X) en fin de chaîne. Ces graphiques montrent une tendance claire ; plus l'hydrophobicité du résidu (X) augmente, plus le $pK_{a-N'}$ du peptide Gl-X, Ala-X et Phe-X diminue. De surcroît, une tendance similaire bien que moins significative est observée à la figure 11 où la variabilité du $pK_{a-C'}$ de l'a.a. Phe est présentée en fonction de l'hydrophobicité du résidu voisin variable (X) en début de chaîne (e.g., X-Phe). Le $pK_{a-C'}$ diminue lorsque l'hydrophobicité du résidu (X) augmente. Pour visualiser simultanément les tendances et l'échelle de variabilité des trois a.a., toutes les données de la figure 10 ont été placées dans un seul graphique se trouvant à l'annexe 5.

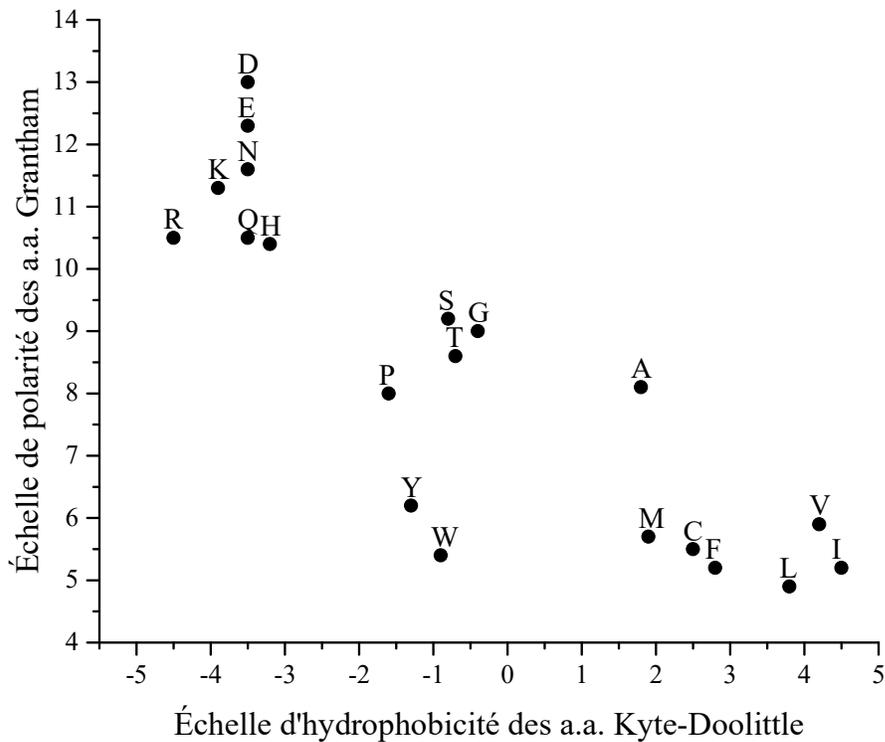


Figure 9 : Relation entre l'échelle d'hydrophobicité Kyte-Doolittle [130] et l'échelle de polarité de Grantham [145] pour les a.a. naturels. Les étiquettes au-dessus de chaque point donne l'identité de l'a.a..

Les publications de Urry [146, 147] décrivent le phénomène observé à la figure 10 comme une modification du pK_a induite par l'hydrophobicité. Dans ces travaux, des polypeptides de type $\text{poly}(f_V(\text{GVGIP}), f_K(\text{GKGIP}))$, où $f_V + f_K = 1$, sont synthétisés afin d'obtenir différents polymères dont l'hydrophobicité augmente avec f_V puisque la valine (V) est plus hydrophobe que la lysine (K). Suite à des titrages, l'analyse des modifications du pK_a des résidus de lysine dans ces différents polymères mène à la distinction de deux phénomènes régissant la variabilité de l'ionisation ; la répulsion électrostatique qui a lieu lorsque f_K est grand et l'effet hydrophobe qui a lieu lorsque f_V est grand.

De tout évidence, en milieu aqueux, l'hydratation des résidus hydrophobes diffère de celle des résidus hydrophiles sur le plan du nombre, de la géométrie et de l'orientation des molécules d'eau [21, 22, 148]. Chaque groupe tend à atteindre une hydratation adéquate nécessitant une énergie minimale. Lorsque deux résidus différents sont à proximité l'un de l'autre, il y aura compétition pour atteindre cet état propice. C'est cette

contrainte énergétique qui fera varier l'ionisation des résidus afin de s'adapter à leur microenvironnement.

Dans le cas de la fonction N' des dipeptides étudiés à la figure 10, il est possible d'observer que plus l'hydrophobicité du résidu voisin augmente, plus le pK_a diminue afin de favoriser cet équilibre énergétique. Ainsi, c'est le produit de la réaction acido-basique NH_3^+ / NH_2 qui est favorisé puisqu'il est neutre, moins polaire et donc plus hydrophobe. Ceci mène à une harmonisation de l'environnement qui provoque une baisse de la compétitivité dans l'hydratation et une minimisation de l'énergie du processus d'équilibre.

Ce raisonnement ne peut pas être appliqué dans le cas des fonctions C' étudiées puisqu'un autre mécanisme semble gouverner la variation du pK_a. L'effet inverse devrait être observé à la figure 11 où une augmentation du pK_a de la fonction acide devrait être obtenue. Ceci fut décrit par Urry dans une autre de ses publications où le comportement du résidu acide glutamique est vérifié de manière similaire à celle évoquée précédemment [147]. Dans ses publications, Urry utilise le même modèle expérimental et obtient des résultats nettement complémentaires pour la lysine (amine) et l'acide glutamique (carboxyle). Cependant, une interprétation différente doit être apportée pour la fonction C' en tenant compte des paramètres distincts utilisés dans l'étude présentée ici.

Tout d'abord, les études d'Urry sur les polypeptides contenant la lysine ou l'acide glutamique donnent tous deux une variabilité de 2 unités de pK_a. Ceci est fort différent des résultats obtenus dans le présente mémoire où le résidu N' donne des variations dans la constante d'ionisation de $\Delta pK_a \approx 0,5$ pour la glycine et $\Delta pK_a \approx 0,8$ pour la phénylalanine et l'alanine (en omettant l'effet de Arg) tel qu'observé dans la figure 10. Par contraste la variation pour le résidu C' de la phénylalanine observée dans la figure 11 est moindre avec $\Delta pK_a \approx 0,4$ unités. Il est apparent que l'échelle de variabilité énergétique accédée par le protocole d'Urry est bien plus large que celle observé ici. Ainsi, il faut concevoir que les résultats obtenus avec le protocole utilisé en électrophorèse capillaire représentent des mécanismes énergétiques plus discrets que ceux décrit par Urry.

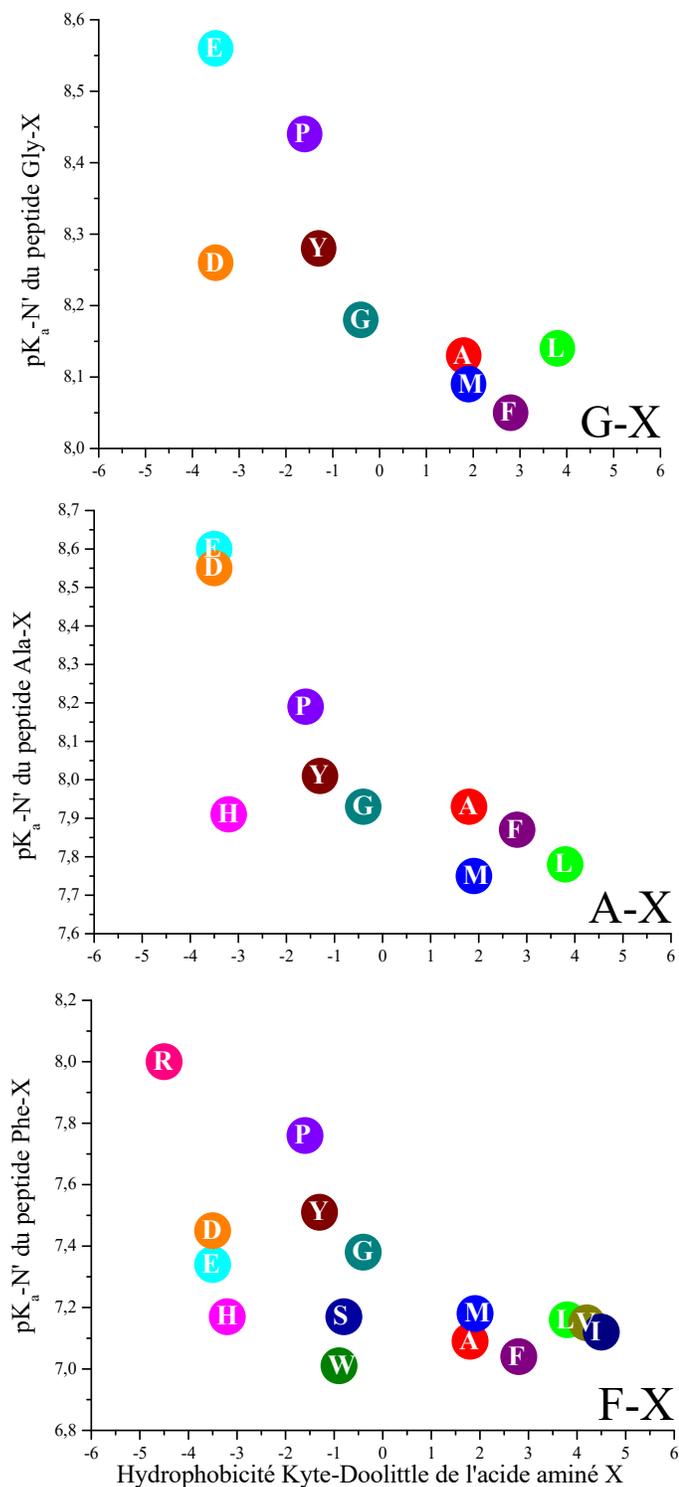


Figure 10 : Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-N' des a.a. Gly, Ala et Phe présents en début de chaîne de divers dipeptides de type G-X, A-X et F-X. L'identité du résidu voisin est donnée dans les cercles pleins présents dans le graphique. Pour fin de simplification de la présentation, les barres d'erreurs ont été omises. Les erreurs varient généralement entre $\pm 0,01$ à $\pm 0,09$ avec quelques exceptions entre $\pm 0,11$ à $\pm 0,50$. La liste complète des valeurs de pK_a ainsi que leurs erreurs est présentée dans l'annexe 4.

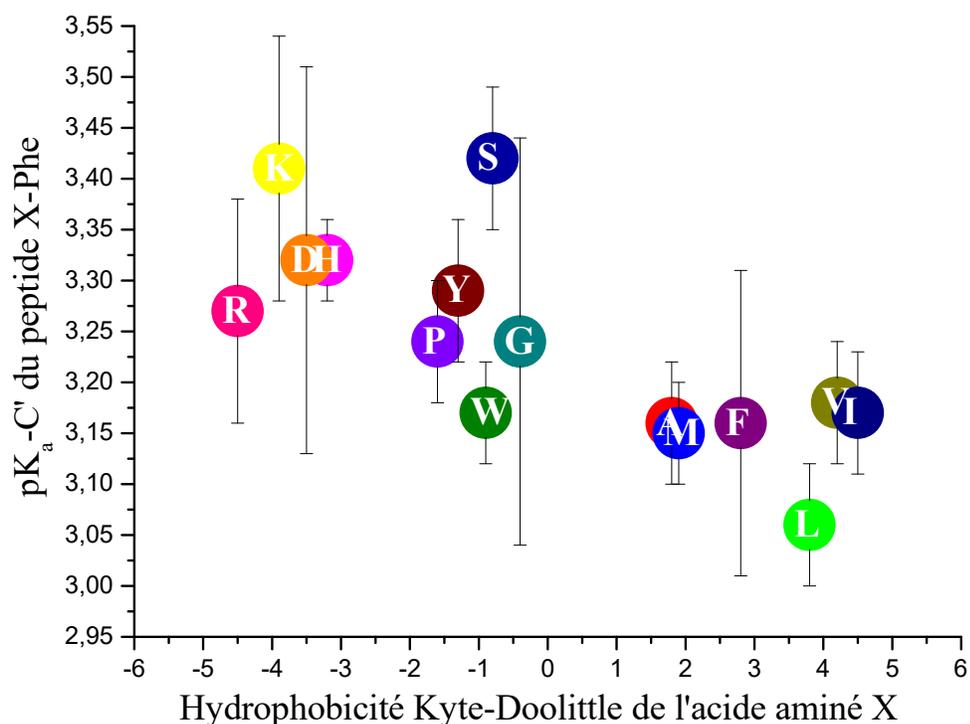


Figure 11 : Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-C' de l'a.a. Phe présent en fin de chaîne de divers dipeptides de type X-Phe. L'identité du résidu voisin X est donnée dans les cercles pleins présents dans le graphique (nomenclature à une lettre).

Selon les mêmes publications d'Urry, l'effet observé dans la figure 11 pourrait provenir d'une interaction électrostatique. Il ne faut pas oublier qu'en solution, la déprotonation du C' dans les dipeptides testés s'opère en présence de la fonction N' totalement protonée à proximité ce qui est une distinction importante par comparaison aux polypeptides étudiés par Urry. L'effet non-négligeable de cette charge voisine doit nécessairement faire partie de l'évaluation des tendances observées.

Si la somme des charges présentes sur les dipeptides étudiés est considérée, la diminution du pK_a-C' observée lors de l'accroissement de l'hydrophobicité du résidu voisin signifie une déprotonation accrue du carboxyle qui neutralise d'emblée la charge positive présente sur l'amine. Ceci mène graduellement à une diminution de la charge totale qui se traduit par une décroissance de la polarité absolue du dipeptide favorisant une hydratation non-compétitive entre ses différents domaines et conduisant plus facilement à une conformation d'énergie minimale. Donc, le raisonnement est similaire à celui déjà décrit pour les pK_a-N'.

Tel que déjà mentionné plus haut, la comparaison de la variation totale du pK_a entre la figure 10 et la figure 11 illustre que la sensibilité de la fonction carboxyle est inférieure à celle de la fonction amine vis-à-vis l'hydrophobicité du résidu voisin. Cette différence avait aussi été remarquée lors de l'étude de l'effet de la force ionique sur l'ionisation dans la section 3.2.4 indiquant qu'une interprétation similaire s'applique. D'ailleurs, c'est encore le postulat du réarrangement des molécules d'eau autour du peptide qui est à l'origine du phénomène observé.

Dans le même ordre d'idée, il existe aussi une différence caractéristique dans la variabilité du pK_a-N' des trois a.a. étudiés soit, phénylalanine et alanine ($\Delta pK_a \approx 0,8$) < glycine ($\Delta pK_a \approx 0,5$). Dans la majorité des échelles d'hydrophobicité présentes dans la littérature, la glycine est considérée très légèrement hydrophile par distinction de la chaîne latérale aromatique de la phénylalanine et la chaîne latérale aliphatique de l'alanine qui sont nettement hydrophobes. Les valeurs de l'échelle Kyte-Doolittle sont phénylalanine (2,8) > alanine (1,8) > glycine (-0,4). Ceci pourrait être à la base des différences indiquant qu'en milieu aqueux le pK_a-N' d'un résidu est plus affecté par les changements dans son microenvironnement plus il est hydrophobe.

Globalement, il est possible d'observer que la variabilité des pK_a est moindre lorsque le résidu voisin X est hydrophobe comparativement aux résidus hydrophiles ; soit lorsque les valeurs Kyte-Doolittle sont 4,5 à -0,9 dans la figure 10 et la figure 11. Les résidus hydrophobes ont tous des chaînes latérales neutres quel que soit la valeur du pH et sont de nature aliphatique ou aromatique. On peut inclure parmi eux les a.a. isoleucine jusqu'à tryptophane présents à la figure 9. Ainsi, les interactions avec la fonction ionisable N' ou C' sont assez modérées et mènent à de petites variations du pK_a .

Tel n'est pas le cas pour les résidus hydrophiles qui sont de natures plus diversifiées avec des chaînes latérales de polarité plus variable ou ionisable (acide ou basique) ; soit lorsque les valeurs Kyte-Doolittle sont -1,3 à -4,5 à la figure 10 et la figure 11. On peut inclure parmi eux les a.a. tyrosine jusqu'à arginine présents à la figure 9. Dans les séries de données expérimentales des figures 10 et 11, ce sont les pK_a obtenus pour les peptides ayant un a.a. avec une chaîne latérale ionisable de nature acide (Asp, Glu et Tyr) et basique (His, Lys et Arg). Dans ces cas, les interactions avec la fonction N' ou C' sont plus complexes d'un point de vue énergétique. On pourrait s'attendre à ce qu'il y ait des

forces électrostatiques répulsives ou attractives selon l'état ionisé de la chaîne latérale de l'a.a. voisin (X). Même dans un état neutre, les fonctionnalités de ces chaînes sont reconnues pour leur capacité à former des ponts hydrogènes qui affecteraient d'autant plus l'ionisation si la conformation peptidique permet une telle interaction. De plus, la polarité de ces chaînes étant plus grande, il est possible qu'un effet de champ intramoléculaire local s'opère et affectent l'ionisation. En somme, ces interactions possibles dans le cas des résidus hydrophiles sont plus prononcées que celle des résidus hydrophobes et mènent à la grande variabilité des pK_a obtenus.

L'hydrophobicité reste un outil puissant permettant de mettre en évidence les tendances présentées aux figures 10 et 11. L'analyse de ces figures a permis de distinguer différents mécanismes contribuant aux modifications des pK_a pour les dipeptides étudiés.

3.3.2 Effet de la distance du résidu variable et de la longueur du peptide

Les résultats d'une série de tripeptides de forme Gly-Gly-X ont aussi été analysés de manière similaire à la section précédente (3.3.1) pour la série Gly-X présentée à la figure 10. La variation du pK_a-N' de la glycine pour ces tripeptides est représentée à la figure 12. Quoique les résidus variables (X) ne sont pas tous analogues dans les deux séries (e.g., figures 10 et 12), une tendance comparable est obtenue lorsque (X) est hydrophobe : le pK_a-N' de la glycine diminue avec l'augmentation de l'hydrophobicité du résidu (X). La différence entre les peptides des deux séries correspond à une glycine. L'effet de l'hydrophobicité du résidu (X) est toujours existant même à une plus grande distance. Néanmoins, l'effet semble moins important puisqu'on obtient seulement une variation totale de 0,2 unités de pK_a pour la série de tripeptides versus 0,5 unités de pK_a pour la série de dipeptides. Il faut cependant admettre qu'un plus petit nombre de peptides a été analysé et que l'effet de l'hydrophobicité du résidu voisin (X) observé est restreint pour la série de tripeptides.

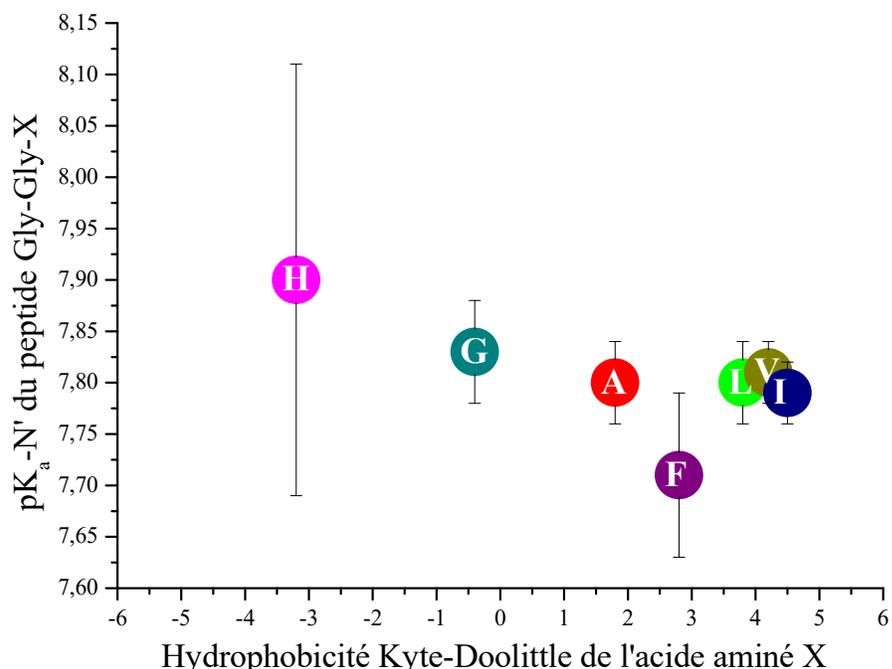


Figure 12 : Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-N' de l'a.a. Gly présent en début de chaîne de divers tripeptides de forme Gly-Gly-X. L'identité du résidu voisin est donnée dans les cercles pleins (nomenclature à une lettre) présent dans le graphique.

En outre, il est possible d'observer que les pK_a-N' obtenus pour la glycine dans le cas de la série des tripeptides sont $\sim 0,3$ unités plus acides que ceux de la série des dipeptides. Le tableau VII suivant permet de comparer l'effet de quatre résidus X communs aux deux séries de peptides. Cet effet est expliqué par le prolongement du peptide qui éloigne les fonctions terminales N' et C' l'une de l'autre menant à une baisse des interactions électrostatiques et provoquant une augmentation de l'acidité de N' [7, 149]. Due au nombre limité de peptides analysés, une comparaison analogue des pK_a-C' pour les dipeptides et tripeptides n'a pas été possible.

Tableau VII : Comparaison des pK_a-N' de glycine dans quelques dipeptide Gly-X et tripeptides Gly-Gly-X avec des résidus variables X identiques.

Identité du résidu X	N' pK_a Gly-X	N' pK_a Gly-Gly-X
Ala	8,13	7,80
Leu	8,14	7,80
Gly	8,15	7,83
Phe	8,04	7,80

Afin d'évaluer l'effet de la chaîne peptidique sur les pK_a , nous avons analysés une série d'oligoglycine G_n ($n = 1$ à 6). La figure 13 ci-dessous montre les tendances obtenues pour les pK_a-N' (haut de l'ordonnée) et pK_a-C' (bas de l'ordonnée). Conformément à la discussion précédente, on observe une baisse du pK_a-N' avec le nombre de glycines. Par contre, en éliminant l'effet du résidu voisin variable, le pK_a-C' augmente avec le nombre de résidus. Les valeurs de pK_a sont présentées à l'annexe 4 pour une petite série de A_n ($n = 2, 3$ et 5) et montrent des tendances similaires.

Ceci met en contraste la différence entre l'effet de l'hydrophobicité du résidu voisin variable sur le pK_a-C' présenté à la figure 11 et l'effet d'une diminution de l'interaction électrostatique avec la longueur du peptide (figure 13). Une relation empirique qui a permis à plusieurs auteurs d'expliquer cet effet est représenté par [7, 149]:

$$\Delta pK_{a,i} = Cq_j/D_{i,j} \quad (43)$$

où $\Delta pK_{a,i}$ est le changement du pK_a du résidu i , C est une constante propre au peptide étudié, q est la charge du résidu j et $D_{i,j}$ est la distance entre les centres d'interaction des résidus $i-j$.

Appliqué à la série des polyglycines, $D_{C'-N'}$ (et de manière réciproque $D_{N'-C'}$) correspond à la distance entre la fonction terminales $i = C'$ et la fonction $j = N'$ portant une charge $q_{N'} = +1$. Ainsi, en admettant une représentation linéaire simple des structures à l'étude, $D_{C'-N'}$ équivaut à 3 liens chimiques pour la glycine versus 18 liens pour l'hexaglycine. La glycine ne possède pas de groupement fonctionnel sur la chaîne latérale et n'est pas chirale ce qui lui confère une liberté structurale comparativement aux autres a.a.. Cette approche mathématique rudimentaire permet de comprendre en partie l'origine du changement dans les pK_a obtenu à la figure 13. En effet, un plateau est atteint pour les pK_a-N' et pK_a-C' après G_3 . Ceci porte à croire qu'après une certaine distance ($n > 3$; $D_{C'-N'} > 9$ liens chimiques), la charge présente en fin de chaîne affectera très peu l'ionisation.

Les valeurs de pK_a-C' et pK_a-N' d'oligoglycines déterminées par CE provenant de la publication de Plasson et Cottet [149] ont été ajoutées à la figure 13 (forme étoile) afin de corréler les tendances obtenues expérimentalement. On remarque qu'il n'y a pas une parfaite concordance entre les deux séries de valeurs. Ceci est probablement dû aux

différents protocoles utilisés et plus particulièrement à la différence de force ionique soit, 10 mM comparativement à la force ionique de 40 mM utilisée dans ce travail.

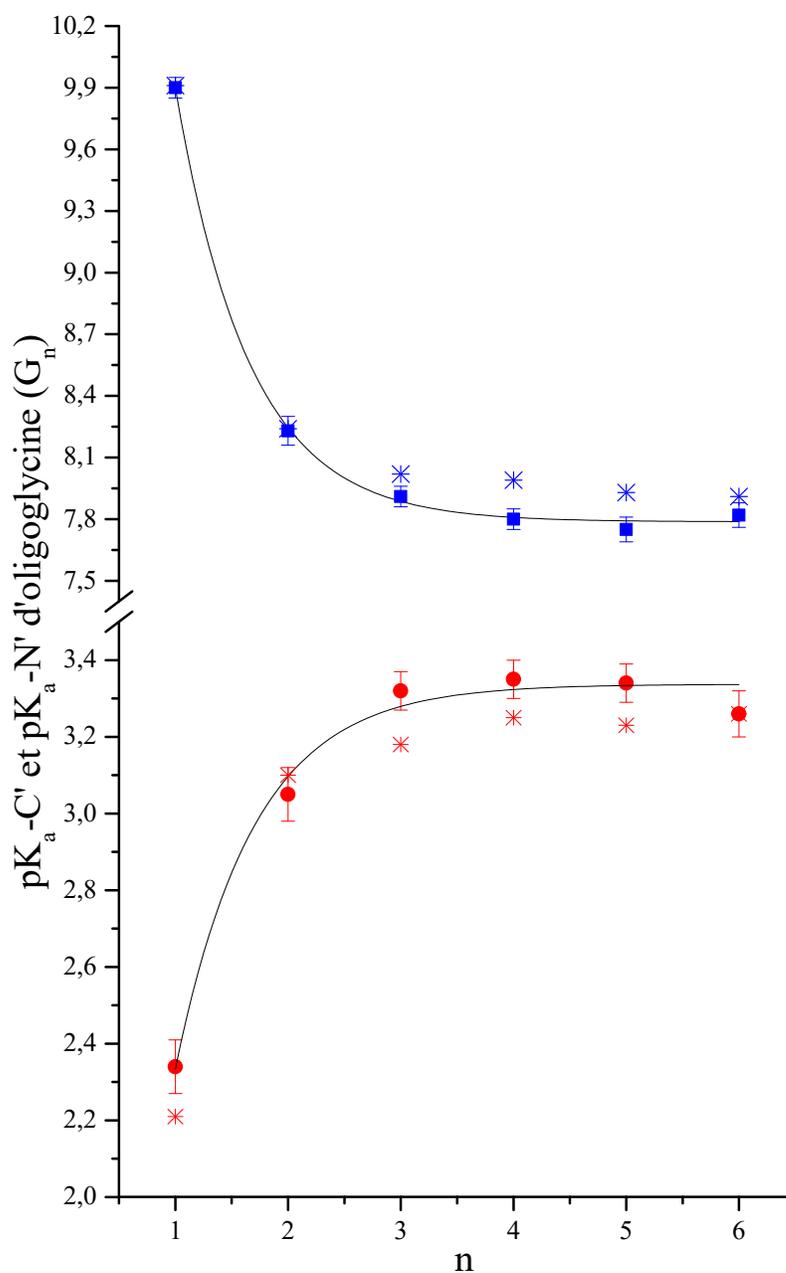


Figure 13 : Variation des pK_a -C' (●) et pK_a -N' (■) d'oligoglycines G_n à 25°C en fonction de n , le nombre de résidus G. Toutes les valeurs sont corrigées pour la force ionique selon l'équation (7) pour pouvoir obtenir des pK_a thermodynamiques et les comparer aux valeurs de la littérature [149] (étoiles rouges et bleues).

Plusieurs auteurs ont étudié le comportement des oligoglycines en CE [149-152] et ont rapporté des effets d'électromigration non-idéale attribués aux interactions avec les

tampers phosphates et borates utilisés de manière prédominante dans notre protocole. Ces effets dépendent de la force ionique, de la longueur du peptide et de la température facilitant la formation de complexes entre le peptide et le tampon. L'une des conséquences présumée est le changement de conformation qui peut varier d'une sphère compacte à un ressort aléatoire [150, 152] tel que présenté dans l'introduction de la section 1.3. Il va de soi que la mobilité électrophorétique sera aussi influencée par la conformation du peptide qui possède sa propre double couche électrique. Une forme plus compacte de l'hexaglycine (G_6) mènerait vraisemblablement à une distance $D_{C'-N'}$ (et de manière réciproque $D_{N'-C'}$) plus petite. De ce fait, des interactions électrostatiques plus importantes expliqueraient les pK_a expérimentaux qui dévient légèrement du comportement plateau de la figure 13.

Dans cette section, les résultats analysés ont permis de déterminer que la longueur d'un peptide peut influencer les propriétés acido-basique d'une fonction N' . De manière complémentaire, la longueur d'un peptide et plus spécifiquement la distance entre ses centres d'interaction affecte aussi les propriétés acido-basiques du peptide. Néanmoins, l'allongement d'un peptide mène inévitablement à la formation d'une structure secondaire plus flexible qui peut faciliter certaines interactions de complexation avec le tampon affectant les équilibres acido-basiques de C' et N' .

3.3.3 Comparaison des pK_a obtenus par CE et titrage potentiométrique (POT)

Les pK_a des séries de dipeptides Phe-X, Ala-X et Gly-X ont été déterminés par POT dans le but de les comparer avec celles obtenues par CE. La figure 14 met en évidence le déplacement systématique de 0,04 à 0,5 unités de pK_a entre les valeurs obtenues avec les deux techniques à l'exception du peptide Phe-Arg (divergence $\approx 0,8$). La POT a donné des résultats de pK_a généralement supérieurs à la CE et ces différences sont généralement supérieures aux erreurs de chaque méthode. Une multitude de publications [48, 153-155] discutent des facteurs pouvant expliquer ces écarts qui sont au plus de l'ordre de 0,3 unités de pK_a . Fondamentalement, ceux-ci reposent sur l'utilisation d'un protocole expérimental rigoureusement contrôlé pour la température, la force ionique et la concentration de l'analyte.

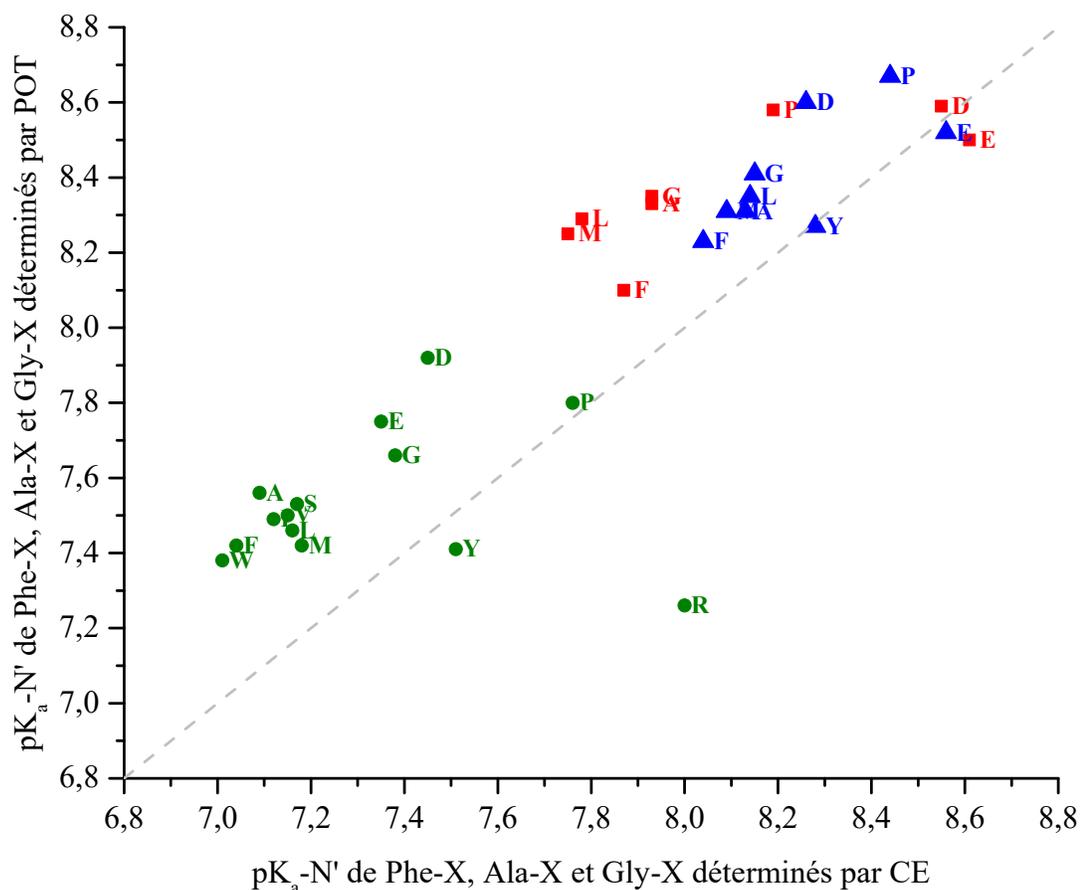


Figure 14 : Comparaison des valeurs de pK_a-N' ($I = 40 \text{ mM}$) obtenues par CE et POT pour les séries de dipeptides Phe-X (●), Ala-X (▲) et Gly-X (■). L'acide aminé X est représenté par la lettre correspondante. La ligne en tirets (---) représente la concordance théorique parfaite entre les deux méthodes.

Une première différence à noter entre les protocoles est le travail à la température de la pièce en POT (21-23 °C) comparativement à une température contrôlée à 25°C en CE. Due à une limitation instrumentale, nous avons été obligés de travailler à la température de la pièce lors des titrages potentiométriques. Cependant, cette différence de température n'a pu avoir causé une hausse du pK_a des fonctions amines de plus de 0,1 unité [34]. Pour ce qui est de la force ionique, elle a été ajustée à 40 mM dans les deux protocoles. Cependant, elle varie légèrement en POT puisque le titrant NaOH est ajouté ce qui additionne des ions et augmente légèrement le volume de la solution. Une limitation importante rencontrée en POT est la nécessité d'utiliser une concentration élevée de peptide afin d'effectuer un titrage adéquat sans faire intervenir des corrections importantes

de concentration et d'activité pour chaque aliquot de titrant ajouté. La concentration de peptide utilisée (1,5 mM) dans notre protocole s'est avérée limite pour ces corrections et semble avoir joué un rôle majeur dans la qualité des résultats acquis [34]. Une grande portion du biais systématique observée est possiblement dû à ces corrections d'activité qui n'ont pu être effectuées lors du traitement des données graphiques qui ont été effectuées visuellement. Une autre possibilité expliquant les différences avec la POT est la pureté de l'échantillon et la présence de contaminant pouvant fausser la mesure de pK_a . Enfin, le même lot de NaOH a été utilisé pour préparer toutes les solutions de titrant chaque journée de travail. Ce lot aurait pu être contaminé et aussi contribuer au biais systématique observé.

De surcroît, ces deux méthodes possèdent des particularités techniques qui peuvent mener à des sources d'erreurs spécifiques à chacune. Les silanols de la paroi interne du capillaire en CE possèdent un $pK_a \approx 6$ et commencent à s'ioniser à $pH > 3$ pour devenir presque entièrement ionisés à $pH \approx 8$. Il est reconnu que ces derniers peuvent interagir avec la fonction N' chargée du peptide, affecter son processus d'ionisation et la valeur du pK_a déterminée expérimentalement. Ce type d'interaction électrostatique est d'autant plus affecté par la nature et la concentration (force ionique) du tampon utilisé que par la charge de l'analyte. Ce phénomène pourrait être la raison du plus grand écart de 0,8 unités de pK_a observé dans la figure 14 pour le peptide Phe-Arg (cercle vert avec étiquette R) qui porte une charge positive sur la chaîne latérale du résidu arginine.

Dans le cas de la POT, l'étalonnage du titrant et l'utilisation d'eau sans carbonate sont deux précautions qui nécessitent un contrôle analytique rigoureux mais nécessaire afin d'obtenir des titrages constants. Enfin, la détermination efficace d'un pK_a par CE nécessite approximativement une vingtaine de points pour construire une courbe de titrage. Par contraste, en POT, l'électrode d'un microtitrateur automatisé peut générer des centaines de valeurs de pH pour produire une courbe de titrage. Voilà un autre élément contrastant les deux techniques du point de vue de la sensibilité qui peut être atteinte avec chacune.

Ces comparaisons permettent de réaliser l'étendu du travail expérimental nécessaire afin d'obtenir des valeurs de pK_a adéquates et équivalents avec deux techniques distinctes telles la CE et la POT. Il sera intéressant d'effectuer la juxtaposition avec la qualité des

valeurs de travail dans la discussion à la section suivant (3.4) qui traite de la modélisation de la mobilité électrophorétique des peptides.

3.4 Implication sur les modèles de prédiction de la mobilité électrophorétique de peptides en CE

3.4.1 Comparaison des pK_a expérimentaux avec les pK_a de Rickard

La majorité des publications qui traitent les modèles semi-empiriques pour la modélisation de la mobilité électrophorétique analysent des données expérimentales à bas pH, par exemple $pH \approx 2,5$ de façon à assurer une protonation maximale du peptide. Concrètement, ceci permet d'éviter l'utilisation de pK_a exactes pour effectuer de laborieux calculs de charges partielles nécessaires à des pH plus élevés. Un autre avantage majeur pour travailler à bas pH est la réduction du EOF qui minimise la correction de la μ_{eff} et permet généralement d'obtenir de meilleures résolutions.

Pour illustrer les limitations de l'utilisation des constantes d'ionisation approximatives pour la modélisation des séparation peptidiques par CE, la figure 15 compare l'étendu des valeurs de pK_a expérimentales avec les valeurs ponctuelles de Rickard [93] pour des a.a. choisis. A première vue, les valeurs des pK_a pour les fonctions carboxyles (figure 15-A) et amines (figure 15-B) provenant de notre banque de 69 peptides couvrent des plages de valeurs considérables soit : 1,8 unités de pK_a et 2,7 unités de pK_a respectivement. Il faut noter que l'étendue des valeurs pour un a.a. est directement reliée au nombre de peptides contenant cet a.a. ou à l'erreur expérimentale si une seule valeur était disponible. Ainsi, la multiplicité dans les séries de dipeptides Ala-X, Gly-X, Gly-Gly-X, Phe-X et X-Phe discutées au sous-chapitre précédent mène à une grande variabilité dans les pK_a (longues barres) pour les a.a. Ala, Gly et Phe sur la figure 15. Par contraste, si l'on prend en exemple les a.a. Ile, Val et Tyr qui étaient présents en plus petit nombre dans notre banque de peptides, ceux-ci donnent une plus petite variabilité (courtes barres). Malgré cela, l'intention de cette démonstration tient toujours puisqu'un échantillonnage de plus de 100 valeurs de pK_a a permis de construire la figure 15 et d'effectuer les observations qui suivent.

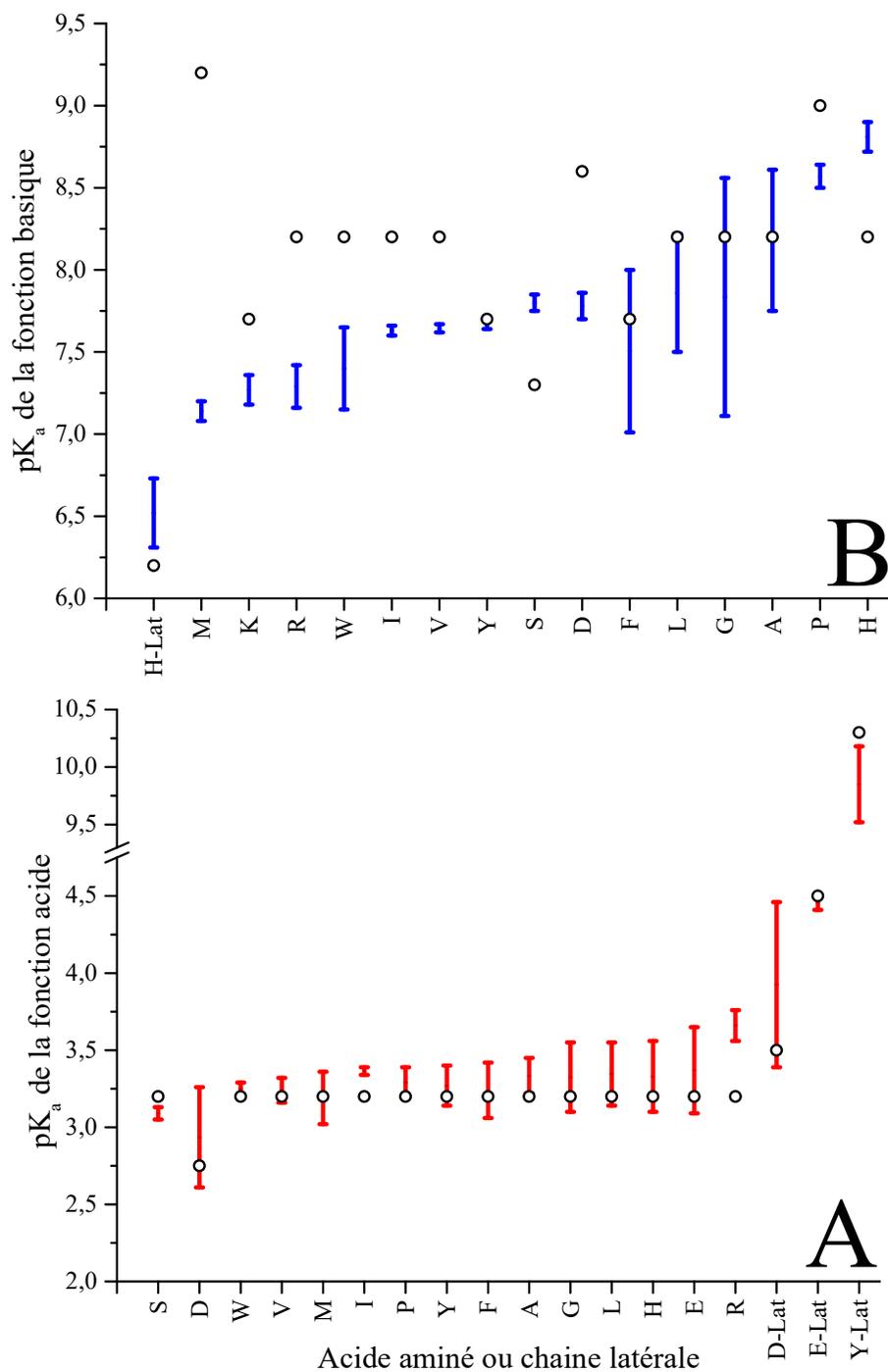


Figure 15 : Comparaison entre les valeurs de pK_a de Rickard (○) et l'étendu des valeurs de pK_a obtenus expérimentalement par CE pour A) les fonctions acides (barres rouges, C' et chaînes latérales) et B) les fonctions basiques (barres bleues, N' et chaînes latérales) pour des a.a. choisis.

La figure 15-A permet de voir que l'étendue des pK_a obtenus pour les fonctions carboxylates en C' et sur chaîne latérale n'est pas excessivement éloignée des valeurs de pK_a de Rickard listés dans l'annexe 2. La valeur de 3,2 est majoritaire, mais une variabilité est tout de même présente pour l'a.a. D considéré plus acide et les chaînes latérales fonctionnels D-lat, E-lat et Y-lat considérés moins acide. Ceci est due à la structure particulière de ces a.a et à la manière dont Rickard a choisi de leur attribuer ces différentes valeurs. Rappelons que celles-ci restent des estimations provenant de moyennes publiées afin de simplifier le travail d'investigation en CE. Les cercles représentant les valeurs ponctuelles de Rickard se situent pour la plupart à l'intérieur des barres rouges. Ceci appuie l'approche expérimentale de plusieurs auteurs qui préconise l'analyse de peptides à bas pH pour n'avoir qu'à effectuer les calculs de charge des fonctions carboxyles. L'ionisation de ces fonctions étant moins sensible à leur microenvironnement, les pK_a sont moins variables et l'erreur dans les calculs de la charge avec des pK_a approximatifs est amoindrie.

Cette assertion n'est pas toujours applicable et possède ses limites tel qu'il est possible de voir avec l'étendue des valeurs de pK_a en C' et de la chaîne latérale de l'a.a. Asp. Un calcul avec la valeur de pK_a Rickard sera plus facilement faussé due à la variabilité intrinsèque des pK_a des deux fonctions carboxyles à proximité l'une de l'autre. La répulsion électrostatique intramoléculaire ajoutée à l'effet du microenvironnement variable que subiraient ces deux fonctions dans des séquences peptidiques différentes mènerait inévitablement à des modifications du pK_a plus importantes. Il faut aussi noter que les valeurs de pK_a de Rickard se situent généralement au bas de la plage de pK_a obtenus par CE pour la majorité des a.a. dans la figure 15-A ce qui mèneraient, par exemple, à une surestimation de la charge si un calcul est effectué pour un $pH < 3,0$.

La fonction alcool présente sur la chaîne latérale de l'a.a. Tyr considérée comme un acide très faible est incluse dans la figure 15-A. L'étendue des pK_a expérimentaux pour cette fonction est légèrement en dessous de la valeur de Rickard. La particularité de cette chaîne latérale acide qui se déprotone à haut pH se démarque des autres fonctions acides des a.a. testés dans notre série de peptide. Il sera surtout probant de voir son comportement dans la modélisation effectué dans la section 3.4.2.

Par contraste, la figure 15-B expose un résultat différent pour les pK_a des fonctions amines en N' et sur chaîne latérale. D'importants écarts existent entre l'étendue des valeurs

expérimentales et les pK_a de Rickard. Ceci semble encore appuyer l'utilisation de protocoles d'analyses à bas pH afin de totalement protoner les fonctions amines et d'éviter tout traitement mathématique pour le calcul de charges partielles. Un écart maximal de l'ordre de 2 unités de pK_a est observé pour l'a.a. Met ce qui peut dramatiquement fausser un calcul de charge d'un peptide contenant ce résidu en N'. Les valeurs de pK_a de Rickard se situent généralement au haut et même bien au-dessus de la plage de pK_a déterminés par CE pour la majorité des a.a. dans la figure 15-B. Ceci mènerait, par exemple, à une sous-estimation de la charge si un calcul est effectué pour un pH neutre $\approx 7,0$.

Tel que discuté précédemment à la section 1.4.3, l'exigence d'avoir des pK_a pour le calcul de la charge est un obstacle difficile à surmonter pour l'analyse approfondie de peptides par CE. C'est en respectant des limitations de pH que beaucoup d'auteurs réussissent à développer des protocoles appropriés afin d'obtenir des données cohérentes avec les modèles étudiés. Dans une perspective d'application plus large, cette approche concertée limite le développement de séparations plus fines et complexe.

3.4.2 Calculs avec modèles semi-empiriques choisis

Depuis les 50 dernières années, les modèles présentés dans le tableau II à la section 1.4.1 ont permis à bien des auteurs d'examiner leurs données expérimentales afin de comprendre les différents mécanismes électrophorétiques régissant les mobilités peptidiques. La figure 16 présente une analyse selon le modèle de base d'Offord qui, rappelons-le, met en relation la mobilité électrophorétique et le rapport charge sur masse $q/M^{2/3}$. Dans cette figure, on compare le paramètre charge sur masse calculé à bas et haut pH avec la série de pK_a expérimentaux et les pK_a de Rickard. Les mobilités des peptides déterminées expérimentalement ainsi que les charges calculées en appliquant l'équation Henderson-Hasselbalch sont toutes tabulées en annexe 6 pour la série à bas pH et en annexe 7 pour la série à haut pH. Les résultats des régressions linéaires sont présentés dans le tableau VIII qui suit la figure.

A première vue, on aperçoit qu'il y a une superposition presque intégrale des points gris calculés avec les pK_a de Rickard sur les points bleus et rouge calculés avec les pK_a expérimentaux. En travaillant à des pH extrêmes, le calcul de la charge est peu affecté par

l'exactitude des valeurs de pK_a utilisés et les résultats obtenus avec les deux séries de pK_a sont nettement superposables. Dans le cas de la série acide (points rouges), en travaillant à un bas pH ($pH = 2,0$) on se situe en dessous de tous les pK_a des fonctions acido-basiques des peptides analysés. Pour une représentation visuelle, on se situe en dessous de toutes les valeurs dans la figure 15. On s'assure ainsi d'une protonation quasi-totale de toutes les fonctions acido-basiques présentes ; les fonctions amines posséderont toutes une charge complète positive +1, les fonctions carboxyles posséderont une charge partiellement négative ou s'approchant de 0, et le peptide possèdera une charge totale positive. De manière complémentaire, dans le cas de la série basique (points bleus), en travaillant à haut pH (9,0 à 11,6) l'inverse se produit ; on se situe majoritairement en dessus des pK_a des fonctions acido-basiques, une déprotonation quasi-totale se produit et les peptides posséderont tous une charge totale négative.

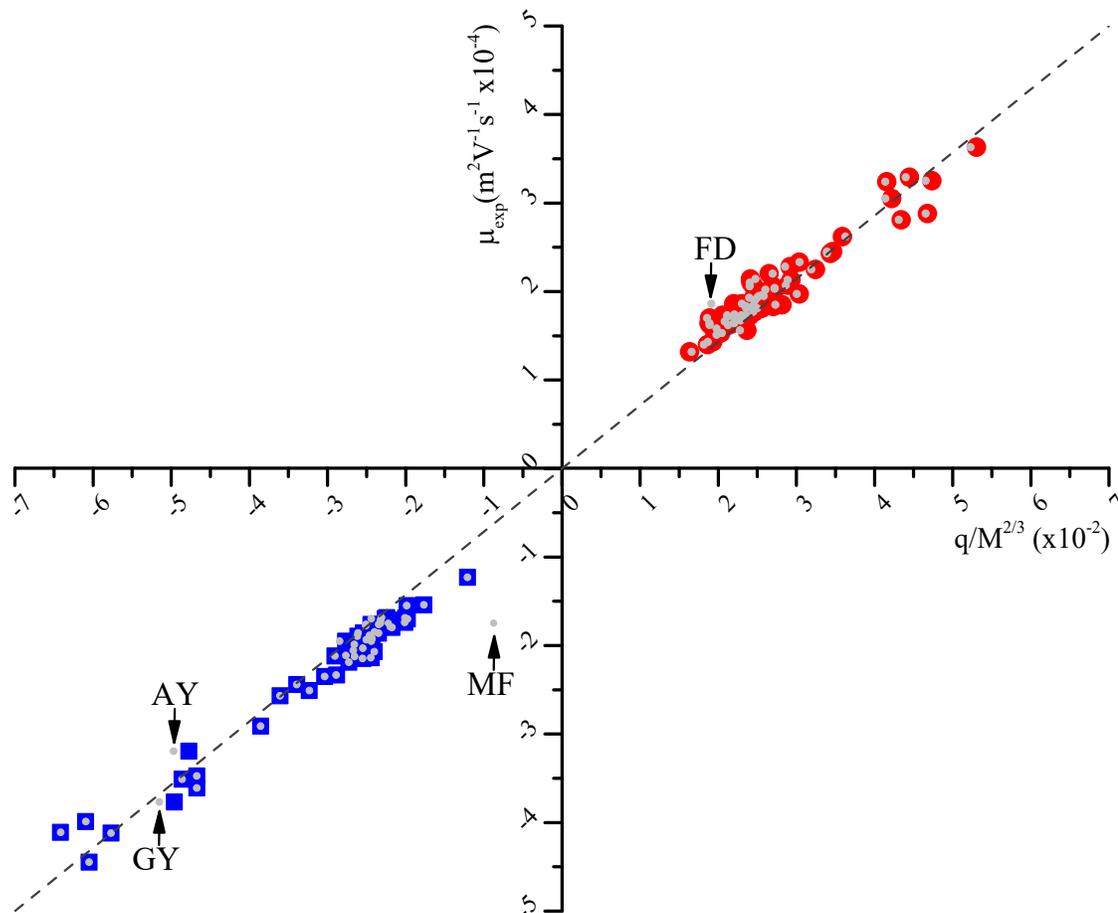


Figure 16 : Corrélation des valeurs $q/M^{2/3}$ avec les mobilités électrophorétiques expérimentales pour tous les peptides analysés a haut pH (■ ; pH 9,0-11,6 ; 50 peptides) et bas pH (● ; pH 2,0 ; 63 peptides). Les valeurs pour (q) des carrés bleus et cercles rouges ont été calculés avec les pK_a expérimentaux tandis que les valeurs pour les petits cercles gris (●) ont été calculées avec les pK_a de Rickard. Les peptides avec valeurs hors tendance sont identifiés et indiqués par des flèches. Une ligne bissectrice (---) est ajoutée pour un support visuel. Les résultats des régressions linéaires sont présentés au tableau VIII.

Tableau VIII : Comparaison des résultats de régressions linéaires pour les données de la figure 16 présentant la corrélation des valeurs $q/M^{2/3}$ avec les mobilités électrophorétiques expérimentales pour tous les peptides analysés a haut et bas pH.

Paramètres pour le calcul de la charge (marqueur correspondant sur la figure 16)	Résultats des régressions linéaires		
	Pente	Intercepte-y	R ²
Bas pH et pK_a expérimentaux (●)	$6,04 \times 10^{-3}$	$3,86 \times 10^{-5}$	0,930
Bas pH et pK_a de Rickard (●)	$6,13 \times 10^{-3}$	$3,79 \times 10^{-5}$	0,933
Haut pH et pK_a expérimentaux (■)	$6,30 \times 10^{-3}$	$3,74 \times 10^{-5}$	0,969
Haut pH et pK_a de Rickard (●)	$6,32 \times 10^{-3}$	$3,83 \times 10^{-5}$	0,953

Néanmoins, cette généralisation n'est pas toujours applicable puisqu'on observe des déviations pour certains points gris sur la figure 16 indiquées par des flèches avec les dipeptides. La déviation la plus flagrante est observée pour le peptide Met-Phe dans le cadran contenant les données basiques de cette figure. La cause de cette différence est due à la discordance entre les pK_a Rickard / expérimentaux tel que déjà observé dans la figure 15-B. Le tableau IX liste les 4 peptides hors tendances et met en évidence les différences de pK_a qui mènent à un calcul de charge erroné lorsque les valeurs de Rickard sont utilisées.

Le cas du peptide Met-Phe est particulièrement inexact puisqu'une différence de 2 unités existe entre le pK_a expérimentale et le pK_a de Rickard pour le fonction N' de l'a.a. Met menant à une erreur de 60% dans le calcul de la charge au pH expérimental. Une raison qui pourrait expliquer cette discordance est l'oxydation du peptide menant à la formation de méthionine sulfoxyde ou de méthionine sulfone. Il n'a pas été possible de trouver des valeurs de pK_a dans la littérature pour ces structures. Si cette oxydation a eu lieu, la structure du peptide serait directement affectée et le pK_a ne serait pas celui attendu. Les pK_a de l'a.a. Met libre sont 9,28 (N') et 2,12 (C') tandis que ceux du peptide Met-Met sont 7,5 (N') et 3,2 (C') [118]. Les valeurs obtenues expérimentalement pour le peptide Met-Phe se rapproche beaucoup plus de ceux du peptide Met-Met. La validité de la valeur du pK_a de Rickard pour N'-Met reste ainsi questionnable. Enfin, les autres peptides listés dans le tableau IX nous indiquent que même une différence plus petite de l'ordre de 0,5 unités peut mener à des écarts appréciables dépendant du pH de travail.

Suite à cette élaboration pour expliquer les divergences observées à la figure 16, il est maintenant possible de se concentrer sur les résultats de modélisation. Rappelons que ces derniers sont représentés par les carrés bleus pour l'analyse à haut pH (9,0-11,6) de 50 peptides et les cercles rouges pour l'analyse à bas pH (2,00) de 63 peptides sur cette figure avec un recouvrement de 45 peptides entre ces deux séries. Comme première observation, l'analyse des données expérimentales avec le modèle d'Offord donne une meilleure corrélation pour la régression linéaire à haut pH qu'à bas pH (voir tableau VIII). La dissimilitude entre les deux séries de peptides analysées est possiblement en cause. Les deux séries ont 45 peptides en communs et diffèrent par le nombre et la nature des autres peptides faisant partie du graphique. Une autre raison serait le pourcentage d'ionisation

des peptides qui diffère entre les deux séries. De fait, les peptides de la série à haut pH sont déprotonés de 93% à 100%, avec une majorité à 100%. Par comparaison, les peptides de la série à bas pH ont des états de protonation plus variable de 80% à 99%.

Tableau IX : Comparaison des valeurs de charges calculés avec les pK_a expérimentaux et les pK_a de Rickard pour les peptides hors tendances déterminés lors de la modélisation avec l'équation d'Offord dans la figure 16. Les pK_a surlignés permettent d'expliquer la déviation.

Peptide	pH de l'analyse	pK _a expérimentaux		pK _a Rickard		Δq relatif à q _{exp}
		Valeurs*	q _{exp} calculée	Valeurs*	q _{Rickard} calculée	
<i>Série acide</i>						
FD	2,0	C' : 3,23±0,13 N' : 7,45±0,08 L : 4,46±0,03	0,941	C' : 2,75 N' : 7,7 L : 3,5	0,818	13%
<i>Série basique</i>						
MF	9,00	C' : 3,15±0,05 N' : 7,14±0,06	-0,986	C' : 3,2 N' : 9,2	-0,387	61%
AY	11,28	C' : 3,40±0,10 N' : 8,01±0,04 L : 9,52±0,10	-1,982	C' : 3,2 N' : 8,2 L : 10,3	-1,904	4%
GY	11,28	C' : 2,26±0,01 N' : 8,28±0,23 L : 9,62±0,07	-1,978	C' : 3,2 N' : 8,2 L : 10,3	-1,904	4%

* C' = fonction carboxyle terminale, N' = fonction amine terminale, L = fonction acido-basique présente sur la chaîne latérale

Il faut admettre que les valeurs de charges (q) calculées avec les pK_a expérimentaux sont indirectement reliées aux valeurs de mobilités (μ_{exp}). Rappelons que cette mobilité est l'un des points expérimentaux utilisés pour effectuer la régression non-linéaire tel que présentée à la figure 5 dans la section 3.2.2 afin de déterminer les pK_a. Remarquablement, même avec le calcul de charge exacte accessible avec les pK_a expérimentaux nous n'obtenons pas de meilleures corrélations se rapprochant de R² = 1. Face à cela, il faut accepter les limitations du modèle d'Offord qui ne décrit pas tous les mécanismes régissant la mobilité électrophorétique d'un peptide.

Face à ces limitations, plusieurs auteurs font intervenir des représentations plus raffinées pour la taille du peptide tel que listé au tableau II. L'une des plus cohérente dans la représentation hydrodynamique d'un ion en solution est le calcul du niveau

d'hydratation et du rayon hydrodynamique qui est intégré dans l'équation (2). Ceci permet d'accéder à une représentation volumétrique plus rapprochée de l'état réel de l'ion en solution qui s'entoure naturellement de contre-ions de charge opposée et de molécules d'eau qui composent une sphère d'hydratation. Le traitement fondamental de ce mécanisme et de ses répercussions en CE a été tenté par certains auteurs avec succès [22, 108, 112, 156]. Essentiellement, plus un analyte est chargé plus son rayon hydrodynamique est grand signifiant que l'agglomérat de contre-ions, d'eau et d'autres espèces présentes affectent la mobilité de l'ion de manière complexe avec des effets de relaxation et de cataphorèse [19, 24, 157]. La sphère de contre-ions et d'eau entourant l'ion se déforme et se reforme avec le déplacement à travers le capillaire créant une latence dans le mouvement qui ralentit l'analyte. En parallèle, les contre-ions de charge opposé se déplacent dans le sens inverse et ajoute à ce ralentissement. Ces effets sont fortement reliés au degré d'ionisation du peptide.

Ainsi, le pourcentage d'ionisation différent entre les deux séries de peptides à la figure 16 mènerait aussi à des différences dans le niveau d'hydratation qui affecte directement la mobilité. Une autre indication de cette différence pourrait être interprétée par les pentes des régressions présentées au tableau VIII qui diffèrent de 4% ; $6,30 \times 10^{-3} > 6,04 \times 10^{-3}$, haut pH et bas pH respectivement. Finalement, même un peptide qui serait chargé +1 à bas pH ($H_3N^+-R-COOH$) et -1 à haut pH ($H_2N-R-COO^-$) ne possèdera pas une mobilité parfaitement symétrique due au déplacement de la position de la charge dans la structure du peptide qui n'aura pas la même conformation en solution dans ces deux états. Ces raisons permettent d'expliquer les divergences observées entre les deux séries présentées à la figure 16 et les résultats des régressions au tableau VIII.

Finalement, il est possible de comparer différents modèles de base tel que discuté à la section 1.4. Le tableau X liste les coefficients de corrélation (R^2) suite à des régressions linéaires (présentées dans l'annexe 8) avec le modèle de base $\mu = Aq/M^n$ faisant intervenir différents exposants au dénominateur pour relier la masse molaire au rayon hydraté du peptide. Le modèle d'Offord avec l'exposant 2/3 donne les meilleures corrélations. De plus, comme les corrélations pour l'exposant 1/2 étant aussi élevées ceci indique que les peptides analysés se comporte selon le modèle de ressort aléatoire

intermédiaire. Ceci corrobore les conclusions de plusieurs auteurs qui ont étudié le comportement électrophorétique de peptide en CE [6, 7, 11, 16, 19, 30, 93-100].

Tableau X : Comparaison des coefficients de corrélation linéaires (R^2) obtenus lors de l'analyse des données de mobilités expérimentales avec différents modèles rudimentaires de forme $\mu = Aq/M^n$ pour relier la masse molaire au rayon hydraté du peptide.

Exposant (n)	Coefficient de corrélation (R^2)	
	Analyse acide	Analyse basique
1	0,853	0,934
2/3	0,930	0,969
1/2	0,918	0,968
1/3	0,868	0,949

3.4.3 Simulation de séparation en CE avec le logiciel PeakMaster

L'un des objectifs visés par ce travail est de permettre une meilleure prédiction des séparations en CE avec une compréhension accrue du comportement d'ionisation des peptides selon les balises testées avec notre protocole expérimental. Certes, avec les observations effectuées aux sections précédentes, il serait possible de concevoir une échelle de pK_a variable pour les fonctions acido-basique d'un résidu selon le facteur d'hydrophobicité de son microenvironnement. Ce paramètre pourrait être intégré à un programme informatique prédictif qui calcul les pK_a de fonctions ciblées en ayant la structure moléculaire [124-128, 158, 159]. L'aboutissement de ce travail nous permet pour le moment d'utiliser la banque de pK_a accumulés et évaluer l'amélioration qu'apporte l'utilisation de données expérimentales lors d'une simulation avec le programme informatique PeakMaster [32, 33].

Un tel exemple est présenté à la figure 17 qui suit avec la séparation d'un mélange de 9 peptides à un $pH = 2,50$. L'électrophérogramme expérimentale au panneau C inclut l'identification des peptides et leur ordre de migration. Cet ordre est prédit exactement dans le panneau B qui représente l'électrophérogramme simulé avec les pK_a expérimentaux mais les temps de migration diffèrent pour quelques peptides. Par contre, cet ordre est incorrect pour les peptides 5, 6 et 7 dans le panneau A qui représente l'électrophérogramme simulée avec les pK_a de Rickard. En plus de cette divergence,

l'erreur moyenne sur le temps de migration prédit dans la simulation C est de 5% comparativement à 2% pour la simulation B.

Seule une échelle de concentration rudimentaire du type petit / moyen / grand peut être utilisée pour décrire la concentration des différents analytes avec le programme PeakMaster. Ainsi, tous les peptides ont été désignés avec une petite concentration pour les simulations aux panneaux B et C de la figure 17 et l'aspect des pics n'est donc pas un facteur comparatif. Néanmoins, la résolution prédite entre les pics des peptides 5 à 8 (FI, GM, FL et FV) au panneau B est comparable à celle obtenue expérimentalement ce qui n'est pas le cas pour la simulation au panneau A où tous les pics sont résolus à la base. Ceci illustre fort bien la capacité de prédiction accessible lorsque des pK_a expérimentaux sont utilisés.

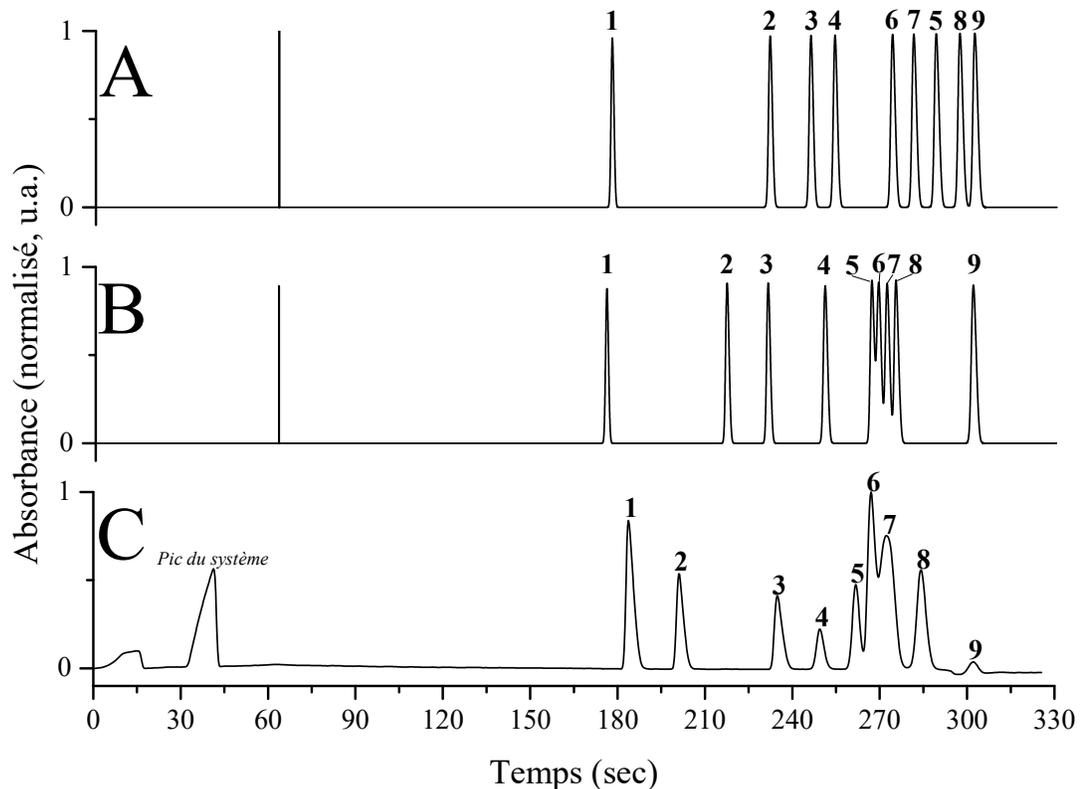


Figure 17 : Résultats de simulation de séparations électrophorétiques obtenus pour neuf peptides avec le programme PeakMaster comparés avec les résultats expérimentaux obtenu par CE. Les mobilités limites expérimentales ont été utilisées pour les deux simulations. A) Électrophérogramme simulé en utilisant les pK_a de Rickard B) Électrophérogramme simulé en utilisant les pK_a expérimentaux C) Électrophérogramme expérimental. Identification des pics : 1- GG, 2- GA, 3- GL, 4- FS, 5- FI, 6- GM, 7- FL, 8- FV et 9- FM. Paramètres de l'analyse : tampon phosphate pH = 2,50 ; I = 40 mM ; V = 15 kV ; L_t = 31,1 cm ; L_d = 21,2 cm ; concentration des peptides 0,5 à 2 mM.

Il faut aussi noter qu'au pH de travail (2,50), les N' sont entièrement protonés et les C' sont partiellement déprotonés. Ainsi, la charge totale du peptide calculée par le programme PeakMaster dépendra uniquement sur les pK_a -C'. Les différences subtiles obtenus avec les pK_a expérimentaux pour les 9 peptides analysés (3,02 - 3,34) permettent un premier niveau de discrimination dans la simulation du panneau B. Ceci n'est pas le cas pour la valeur de pK_a de Rickard unique (3,2) attribuée à tous les C' des 9 peptides d'où les divergences observées. Un deuxième niveau de discrimination provient des valeurs de mobilités limites désignées pour les peptides. Or, les valeurs expérimentales ($17,7 - 30,0 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) ont été utilisées pour les deux simulations afin de mettre en évidence l'effet qu'ont les différences de pK_a . Tel que déjà mentionné à la section

précédente, il faut reconnaître que les valeurs de charges (q) calculées avec les pK_a expérimentaux sont indirectement reliées aux valeurs de mobilité limites (μ_0) qui ont toutes permis d'obtenir la simulation B. Ces valeurs étant corrélées, la simulation est d'autant plus améliorée puisque les relations mathématiques entre celles-ci sont cohérentes.

Malgré l'utilisation des pK_a et des mobilités limites expérimentales, la simulation au panneau B ne donne pas une prédiction exacte de l'électrophérogramme expérimental au panneau C. Ceci peut s'expliquer en partie par l'erreur expérimentale sur les données utilisées pour la simulation, soit 1-2% pour les pK_a et 7-11% pour les mobilités limites. Il faut aussi considérer les limitations de la majorité des modèles mathématiques semi-empiriques qui ne décrivent pas tous les processus complexes qu'un analyte subit lors d'une séparation par CE. Notre travail s'est limité au paramètre de charge. Cependant, le paramètre de taille présent au dénominateur sous plusieurs formes dans les modèles de mobilité électrophorétiques publiés est une composante d'importance équivalente. Il est possible d'imputer une portion de l'erreur dans les simulations au traitement simpliste de la taille d'un peptide. Pour qu'une fonction décrivant la taille soit idéale, il faut qu'elle puisse représenter l'espace qu'occupe une molécule en solution. Ceci impliquerait une description beaucoup plus poussée des interactions intramoléculaires et intermoléculaires avec son environnement via ses groupes polaires, apolaires ou ionisés. Aussi à considérer, la double couche électrique propre à chaque analyte et la force de friction lors de son déplacement dans le capillaire [7, 24, 111]. Bien que la charge d'un peptide ait un impact important sur la mobilité, la taille demeure un paramètre tout aussi essentiel afin de prédire son comportement électrophorétique.

4 • Conclusion

De simples équations semi-empiriques permettent l'évaluation de la mobilité électrophorétique de peptides en CE. Des paramètres physico-chimiques de base telle la masse du peptide, son nombre de résidus (sa longueur) et sa charge calculée via ses pK_a et le pH de l'analyse permettent de prédire une séparation peptidique en quelques opérations mathématiques. L'accès à de telles informations sans aucun travail analytique en laboratoire permettrait le développement de méthodes analytiques avec un efficacité remarquable. Ajouté aux avantages reconnues de cette techniques, la CE offre un potentiel de rendement exceptionnel et des économies en dépenses pour n'importe quel développement analytique envisageable dans plusieurs industries telle la biopharmaceutique.

Dans ce travail, nous nous sommes acharnés à mieux comprendre le paramètre de charge utilisé dans les modèles mathématiques qui prédisent la mobilité électrophorétique. Plus spécifiquement, à mieux cerner la variation des pK_a de peptides dont l'estimation entraîne une mauvaise précision sur le calcul de la charge utilisé dans les modèles. Afin de comprendre l'effet de l'acide aminé voisin sur l'ionisation des groupes carboxyles et amines terminaux (C' et N') d'un peptide, les pK_a de plusieurs séries de peptides ont été déterminés par CE. Les composés étudiés étaient de type Z-X et X-Z où X est un ou plusieurs résidus voisins variables tandis que Z est un résidu invariable tel phénylalanine, glycine et alanine. Pour commencer, une méthode par CE a été développée et optimisée afin de déterminer les pK_a d'une série de 69 peptides. Puisqu'une grande plage de pH devait être couverte afin d'obtenir les pK_a et que les analyses a bas pH mènent a de très longs temps d'analyses, la longueur de capillaire la plus courte accessible (31 cm) avec l'appareil P/ACE MDQ a été utilisée. Le voltage et la force ionique ont été choisis judicieusement afin de minimiser le réchauffement joule. Avec une étude rudimentaire, l'effet de la force ionique sur les pK_a C' et N' a été déterminée afin de comprendre l'influence de ce paramètre sur les données recueillies. Deux méthodes d'acquisitions de données pour construire les courbes de titrage en CE ont été testées, soit une méthode systématique ou chaque mobilité électrophorétique était déterminée à trois reprises et une méthode simplifiée ou chaque mobilité était déterminée une seule fois. Nous avons démontré l'équivalence de ces deux méthodes ce qui a permis d'accélérer l'acquisitions

de données. Près de 2000 électrophérogrammes ont été acquis pour obtenir tous les pK_a de nos peptides.

Avec cette banque de pK_a expérimentaux, nous avons déterminé certaines tendances qui ont pu être expliquées via l'hydrophobicité, la polarité, l'état de charge, la distance et la longueur du résidu X. Pour la série de dipeptides étudiés, il a été déterminé que plus l'hydrophobicité du résidu X augmentait, plus les pK_a C' et N' baissait mais à des degrés différents dépendant du résidu étudié. La fonction N' donne des variations en unités de pK_a de $\sim 0,5$ pour la glycine et $\sim 0,8$ pour la phénylalanine et l'alanine ce qui indiquerait qu'un résidu hydrophobe serait plus affecté par la nature de son voisin qu'un résidu hydrophile. Par contraste la variation pour la fonction C' de la phénylalanine est moindre avec $\sim 0,4$ unités de pK_a . Tel que pour l'étude effectuée avec la variation de la force ionique, ceci confirme l'insensibilité des fonctions carboxyle relativement aux fonctions amines aux changements de leur microenvironnement. Il a aussi été observé que les résidus X hydrophiles possédant des chaînes latérales chargées ou très polaires influencent de façon plus importante le processus d'ionisation que les résidus X hydrophobes.

La comparaison des pK_a des séries Gly-X et Gly-Gly-X a permis de déterminer que plus la distance entre N' et le résidu X est grande, plus son influence sur le pK_a diminue puisque la variation des pK_a était de 0,5 unité pour les dipeptides versus 0,2 unité pour les tripeptides. Également, le prolongement d'un peptide tel dans le cas étudié des polyglycines G_n ($n = 1$ à 6) fait augmenter le pK_a -C' et diminuer le pK_a -N' via un processus expliqué par la réduction des interactions électrostatiques entre les fonctions C' et N'.

Les valeurs de pK_a de dipeptides obtenus via POT ont été comparés aux pK_a déterminés par CE. Des écarts importants ont été obtenus ce qui a mis en lumière la nécessité de contrôler les protocoles expérimentaux de manière rigoureuse pour mieux comparer des résultats provenant de deux techniques.

Par la suite, à l'aide des mobilités de peptides obtenus expérimentalement à haut et bas pH, des résultats de modélisations calculés avec les pK_a expérimentaux et les pK_a approximatifs de Rickard ont été comparés afin de comprendre le bénéfice obtenu lorsque le modèle d'Offord est utilisé. Il s'est avéré qu'à haut et bas pH lorsque les peptides sont presque entièrement déprotonés ou protonés, les pK_a de Rickard donnent d'assez bonne estimations. Toutefois, dès que le pH d'une analyse s'approchait d'un pK_a de Rickard

erroné, des déviations claires étaient observées dans les modélisations superposées. Même avec l'utilisation des pK_a expérimentaux, des déviations sont observées avec le modèle d'Offord. Il faut accepter les limitations des représentations semi-empiriques qui ne prennent pas en considération tous les processus affectant l'électromigration d'un ion en solution. En comparant différents modèles de forme $\mu = Aq/M^n$ nous avons déterminé que la série de peptides étudiées se comportait telle un ressort aléatoire intermédiaire puisque les exposants 1/2 et 2/3 ont donné les meilleures régressions linéaires.

Enfin, des simulations de séparations par CE de 9 peptides obtenues avec le programme informatique PeakMaster ont été comparées avec les résultats expérimentaux. Sans équivoque, le temps, l'ordre de migration et la résolution entre les peptides ont été mieux prédits avec les pK_a expérimentaux. Ceci a démontré l'utilité et la supériorité des pK_a expérimentaux cumulés versus les pK_a approximatifs de Rickard.

Ce travail systématique de compilation des pK_a est une approche rarement utilisée dû au temps et matériel nécessaire pour obtenir les données. De plus, le choix de travailler avec des séries de peptides cohérentes pour mieux cibler les variabilités du pK_a de résidus en particuliers est une approche qui n'a jamais été utilisée avec cette envergure antérieurement. En ayant accès à ces valeurs, la source d'incertitude sur les constantes d'ionisation des peptides auquel font face tous les auteurs est éliminée. Ceci a permis une analyse plus approfondie de leur comportement électrophorétique. Le retour sur l'investissement est manifeste avec les observations novatrices qui ont permis de mettre en évidence de manière concrète la variabilité du pK_a lorsque corrélée au paramètre d'hydrophobicité. Les résultats de ce travail pourraient guider d'autres auteurs dans l'interprétation de des résultats examinant le comportement de peptides en CE. Leurs observations feraient usage de notre analyse pour mieux cerner les variabilité réelles observées dans les séparations peptidiques.

Perspectives futures

L'effet des résidus hydrophobes sur la variation des pK_a étant moindre que les résidus hydrophiles, il serait probant de traiter ces deux de manière distinctes. Une étude pourrait être entreprise afin de comprendre comment la différence d'hydrophobicité entre deux résidus voisins affecte la structure et l'arrangement des molécules d'eau autour du dipeptide. Une approche de modélisation moléculaire afin de visualiser ce qui arrive dans le microenvironnement du C' et N' nous informerait des conformations idéales adoptées par un peptide et des différences dans l'hydratation et la structuration des molécules d'eau.

De grandes variations de pK_a-N' ont été observées pour le petit échantillon de dipeptides (Z-X) analysés contenant des résidus voisins (X) avec une chaîne latérale acide ou basique tels Asp, Glu, Tyr, Arg, His et Lys. Ici, le résidu X était aussi le résidu C' du dipeptide et la proximité du groupement polaire carboxylate a certes joué un rôle complexe et non négligeable dans la modulation du pK_a-N' . Il serait intéressant d'étudier une série de peptide ayant la forme $Z_1-X-Z_2-Z_2-Z_2$ où X est un résidu voisin avec une chaîne latérale acido-basique espacée du C' par des résidus Z_2 tel la Gly. De manière complémentaire, la série $Z_2-Z_2-Z_2-X-Z_1$ permettrait de considérer l'effet sur les pK_a-C' avec l'éloignement du groupement polaire amine.

Afin de poursuivre les travaux précédents avec une nouvelle piste, il serait aussi possible de concevoir le même type de peptide afin de vérifier cette fois-ci l'effet du résidu voisin sur les pK_a des chaînes latérales fonctionnelles. Ces dernières sont reconnues pour leur importance dans les sites catalytiques protéiques et une compréhension approfondie sur la modulation de leur pK_a serait un atout. Pour cela, la méthode pour déterminer les pK_a par CE devra être modifiée afin de mieux différencier les valeurs de pK_a rapprochées. Des études poussées pourraient être effectuées sur ce sujet à lui seul puisque peu d'auteurs ont confronté ou résolu cette limitation en CE.

Les difficultés rencontrées lors de la comparaison des pK_a déterminés par CE et POT ont malheureusement amoindri la quantité d'informations qui en a pu être extraites. Une étude plus strictement définie avec des protocoles plus développés permettrait d'effectuer de meilleures comparaisons entre ces deux techniques et comprendre les mécanismes subtils qui mènent à des différences dans le pK_a . Par extension, il serait aussi

probat d'effectuer une revue critique des différentes méthodes pour déterminer les pK_a de peptides et de comparer les valeurs disponibles pour construire des protocoles qui permettent de mieux cerner les différences obtenues.

L'amélioration du calcul de la charge était l'objectif primaire de ce travail avec l'accumulation de pK_a expérimentaux. Cette banque de pK_a peut être mise à profit dans plusieurs types d'études. Avec la multitude de modèles de mobilité électrophorétique, il serait intéressant d'approfondir les analyses afin de mieux cerner quelle représentation de la composante charge donne des résultats plus rapprochés de la réalité. De manière complémentaire, en ayant les pK_a expérimentaux, nous avons accès à des valeurs juste de la charge ce qui permettrait de mieux focaliser une étude de la représentation de la composante masse du peptide dans les modèles. Un calcul de charge exacte améliorerait d'autant plus les études théoriques plus poussées sur l'hydratation et la détermination du rayon hydrodynamique d'un ion en solution. Le cas des peptides susceptibles de former des structures secondaires tels des hélices α et des feuillets β serait particulièrement intéressant à examiner. L'intégration de la banque de pK_a expérimentaux dans un système à réseaux de neurones artificiels (ANN) permettrait une étude mathématique qui augmenterait les pouvoir prédictif d'un programme de calcul de pK_a . Ce dernier pourrait être adapté pour les structures peptidiques afin de tester sa capacité à calculer une constante d'ionisation.

Enfin, en ce qui concerne les simulations avec des programmes informatiques tel PeakMaster, les possibilités sont multiples. Un certain nombre de paramètres peuvent être intégrés dans les calculs effectués par le logiciel. N'importe lequel des résultats d'études proposées dans cette section de perspective pourrait potentiellement y être intégré afin d'augmenter son pouvoir prédictif. La valeur la plus probante serait celle du rayon hydrodynamique qui est une représentation bien plus exacte de l'espace qu'occupe un ion pendant une électromigration.

5 • Références

1. Morrison, C., *Fresh from the biotech pipeline—2015*. Nature Biotechnology, 2016. **34**(2): p. 129-132.
2. PhRMA, *2015 Biopharmaceutical research industry profile*. 2015, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America: Washington, DC.
3. Jorgenson, J. et Lukacs, K., *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*. Analytical chemistry, 1981. **53**(8): p. 1298-1302.
4. Camilleri, P., *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 1998, Boca Raton: CRC Press. 552pp.
5. Group, P.D., *ICH guideline Q4B annex 11 to note for evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on capillary electrophoresis – general chapter Harmonisation, I.C.o.*, Editor. 2010, European Medicines Agency.
6. Offord, R.E., *Electrophoretic mobilities of peptides on paper and their use in the determination of amide groups*. Nature, 1966. **211**(5049): p. 591-593.
7. Cifuentes, A. et Poppe, H., *Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography, A, 1994. **680**(1): p. 321-40.
8. Cifuentes, A. et Poppe, H., *Effect of pH and ionic strength of running buffer on peptide behavior in capillary electrophoresis: theoretical calculation and experimental evaluation*. Electrophoresis, 1995. **16**(4): p. 516-524.
9. Dose, E.V. et Guiochon, G.A., *High-resolution modeling of capillary zone electrophoresis and isotachopheresis*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(11): p. 1063-1072.
10. Janini, G.M., Metral, C.J. et Issaq, H.J., *Peptide mapping by capillary zone electrophoresis: How close is theoretical simulation to experimental determination*. Journal of Chromatography A, 2001. **924**(1-2): p. 291-306.
11. Janini, G.M., Metral, C.J., Issaq, H.J. et Muschik, G.M., *Peptide mobility and peptide mapping in capillary zone electrophoresis. Experimental determination and theoretical simulation*. Journal of Chromatography A, 1999. **848**(1-2): p. 417-433.
12. Metral, C.J., Janini, G.M., Muschik, G.M. et Issaq, H.J., *A computer method for predicting the electrophoretic mobility of peptides*. Journal of High Resolution Chromatography, 1999. **22**(7): p. 373-378.
13. Pennino, D.J., *Free-zone capillary electrophoresis. A simple computer program for predicting peptide migration times*. BioPharm, 1989. **2**(8): p. 41-44.
14. Simo, C. et Cifuentes, A., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry of peptides from enzymatic protein hydrolysis: Simulation and optimization*. Electrophoresis, 2003. **24**(5): p. 834-842.
15. Ullner, M., Jönsson, B. et Widmark, P.O., *Conformational properties and apparent dissociation constants of titrating polyelectrolytes: Monte Carlo simulation and scaling arguments*. Journal of Chemical Physics, 1994. **100**(4): p. 3365-3366.
16. Adamson, N.J., Riley, P.F. et Reynolds, E.C., *The analysis of multiple phosphoserine-containing casein peptides using capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1993. **646**(2): p. 391-398.
17. Castagnola, M., Cassiano, L., Rabino, R., Rossetti, D.V. et Bassi, F.A., *Peptide mapping through the coupling of capillary electrophoresis and high-performance*

- liquid chromatography: map prediction of the tryptic digest of myoglobin.* Journal of Chromatography, 1991. **572**(1-2): p. 51-58.
18. Grossman, P.D., Colburn, J.C. et Lauer, H.H., *A semiempirical model for the electrophoretic mobilities of peptides in free-solution capillary electrophoresis.* Analytical Biochemistry, 1989. **179**(1): p. 28-33.
 19. Surway, M.A., Goodall, D.M., Wren, S.A.C. et Rowe, R.C., *Oligoglycines and oligoalanines as tests for modeling mobility of peptides in capillary electrophoresis.* Journal of Chromatography, 1993. **636**(1): p. 81-6.
 20. Compton, B.J., *Electrophoretic mobility modeling of proteins in free zone capillary electrophoresis and its application to monoclonal antibody microheterogeneity analysis.* Journal of Chromatography, 1991. **559**(1-2): p. 357-366.
 21. Cross, F.R. et Wong, M.G., *Aqueous Capillary Electrophoresis of Peptides. Part 1: Conformation States, Volumes and Estimates of the Extent of Hydration.* Chromatographia, 2003. **58**(7-8): p. 427-437.
 22. Cross, F.R. et Wong, M.G., *Aqueous Capillary Electrophoresis of Peptides. Part 2: An Investigation of the Quantitative Determination of Hydration and Solvation Relationships.* Chromatographia, 2003. **58**(7-8): p. 439-447.
 23. Liu, K.P., Xia, B.B. et Zhang, X.Y., *Review of QSPR modeling of mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2008. **31**(11): p. 1808-1822.
 24. Cifuentes, A. et Poppe, H., *Behavior of peptides in capillary electrophoresis: effect of peptide charge, mass and structure.* Electrophoresis, 1997. **18**(12-13): p. 2362-76.
 25. Adamson, N.J. et Reynolds, E.C., *Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins.* Journal of Chromatography B, 1997. **699**(1-2): p. 133-147.
 26. Castagnola, M., Rossetti, D.V., Cassiano, L., Misiti, F., Pennacchietti, L., Giardina, B. et Messina, I., *Determination of peptide dissociation constants and Stokes radius at different protonation stages by capillary electrophoresis.* Electrophoresis, 1996. **17**(12): p. 1925-30.
 27. Castagnola, M., Rossetti, D.V., Corda, M., Pellegrini, M., Misiti, F., Olinas, A., Giardina, B. et Messina, I., *The pH dependence of predictive models relating electrophoretic mobility to peptide chemico-physical properties in capillary zone electrophoresis.* Electrophoresis, 1998. **19**(13): p. 2273-2277.
 28. Castagnola, M., Cassiano, L., Messina, I., Nocca, G., Rabino, R., Rossetti, D.V. et Giardina, B., *Capillary zone electrophoresis of peptides: prediction of the electrophoretic mobility and resolution.* Journal of Chromatography B, 1994. **656**(1): p. 87-97.
 29. Cross, R.F. et Garnham, N.F., *The problem with the offord equation: hydration - a statistical investigation of the effect of charge size and confirmation of the effect of charge distribution upon electrophoretic mobilities.* Chromatographia, 2001. **54**(9-10): p. 639-646.
 30. Cross, R.F. et Wong, M.G., *Objective testing for the dependence of electrophoretic mobilities upon size in capillary zone electrophoresis.* Chromatographia, 2001. **53**(7-8): p. 431-436.

31. Piaggio, M., Peirrotti, M. et Deiber, J., *Exploring the evaluation of net charge, hydrodynamic size and shape of peptides through experimental electrophoretic mobilities obtained from CZE*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(23): p. 4631-4647.
32. Vcelakova, K., Zuskova, I., Kenndler, E. et Gas, B., *Determination of cationic mobilities and pKa values of 22 amino acids by capillary zone electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(2): p. 309-317.
33. Hruška, V., Riesová, M. et Gaš, B., *A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: I. Mathematical model*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(6): p. 923-930.
34. Alberts, A. et Serjeant, E.P., *The Determination of Ionization Constants*. 1989, London: Chapman and Hall. 150pp.
35. Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W. et Tam, K.Y., *pH-metric log P and pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999. **20**(4): p. 631-641.
36. Poole, S.K. et Poole, C.F., *Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients*. *Journal of Chromatography B*, 2003. **797**(1-2): p. 3-19.
37. Ruiz, R., Rafols, C., Roses, M. et Bosch, E., *A potentially simpler approach to measure aqueous pKa of insoluble basic drugs containing amino groups*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. **92**(7): p. 1473-1481.
38. Mitchell, R.C., Salter, C.J. et Tam, K.Y., *Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: Part III. Resolution of multi-protic ionization systems*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999. **20**(1-2): p. 289-295.
39. Box, K., Bevan, C., Comer, J., Hill, A., Allen, R. et Reynolds, D., *High-throughput measurement of pKa values in a mixed-buffer linear pH gradient system*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(4): p. 883-892.
40. Butler, J.N., *Ionic equilibrium solubility and pH calculations*. 1998, New York: Wiley. 474pp.
41. Mussini, T., Covington, P., Longhi, P. et Rondinini, S., *Criteria for standardization of pH measurements in organic solvents and water + organic solvent mixtures of moderate to high permittivities*. *Pure and Applied Chemistry* 1985. **57**(6): p. 865-876.
42. Bartak, P., Bednaf, P., Stransky, Z., Bocek, P. et Vespalec, R., *Determination of dissociation constants of cytokinins by capillary zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **878**(2): p. 249-259.
43. Nowak, P., Woźniakiewicz, M. et Kościelniak, P., *Application of capillary electrophoresis in determination of acid dissociation constant values*. *Journal of chromatography A*, 2015. **1377**: p. 1-12.
44. Gutz, I.G.R. *CurTiPot – pH and Acid–Base Titration Curves: Analysis and Simulation freeware. Version 4.2.3*. 2016; Available from: http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html.
45. Jia, Z., Ramstad, T. et Zhong, M., *Medium-throughput pKa screening pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(6): p. 1112-8.
46. Mrestani, Y., Neubert, R., Munk, A. et Wiese, M., *Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*, 1998. **803**(1 + 2): p. 273-278.

47. Örnskov, E., Linusson, A. et Folestad, S., *Determination of dissociation constants of labile drug compounds by capillary electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003. **33**(3): p. 379-391.
48. Barbosa, J., Barron, D., Cano, J., Jimenez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V. et Toro, I., *Evaluation of electrophoretic method versus chromatographic, potentiometric and absorptiometric methodologies for determining pKa values of quinolones in hydroorganic mixtures*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2001. **24**(5-6): p. 1087-1098.
49. Jimenez-Lozano, E., Marques, I., Barron, D., Beltran, J.L. et Barbosa, J., *Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector*. Analytica Chimica Acta, 2002. **464**(1): p. 37-45.
50. Wang, D., Yang, G. et Song, X., *Determination of pKa values of anthraquinone compounds by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(3): p. 464-469.
51. Psurek, A. et Scriba, K.E.G., *Peptide separations and dissociation constants in nonaqueous capillary electrophoresis: Comparison of methanol and aqueous buffers*. Electrophoresis, 2003. **24**(5): p. 765-773.
52. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I. et Barbosa, J., *Electrophoretic behavior of peptides in capillary electrophoresis influence of ionic strength and pH in aqueous-organic media*. Journal of Chromatography A, 2001. **921**(1): p. 69-79.
53. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I. et Barbosa, J., *Evaluation of chromatographic versus electrophoretic behavior of a series of therapeutical peptide hormones*. Journal of Chromatography A, 2003. **985**(1-2): p. 411-423.
54. Hagberg, J., Duker, A. et Karlsson, S., *Determination of dissociation constants of low molecular weight organic acids by capillary zone electrophoresis and indirect UV detection*. Chromatographia, 2002. **56**(9-10): p. 641-644.
55. Mercier, J.P., Morin, P., Dreux, M. et Tambute, A., *Determination of weak (2.0-2.5) dissociation constants of non-UV absorbing solutes by capillary electrophoresis*. Chromatographia, 1998. **48**(7-8): p. 529-534.
56. Ishihama, Y., Nakamura, M., Miwa, T., Kajima, T. et Asakawa, N., *A rapid method for pKa determination of drugs using pressure-assisted capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug discovery*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002. **91**(4): p. 933-942.
57. Wan, H., Holmén, A.G., Wang, Y., Lindberg, W., Englund, M., Nagard, M.B. et Thompson, R.A., *High-throughput screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis and mass spectrometry*. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2003. **17**(23): p. 2639-2648.
58. Wan, H. et Ulander, J., *High-throughput pKascreening and prediction amenable for ADME profiling*. Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology, 2006. **2**(1): p. 139-155.
59. Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Carrupt, P.-A. et Veuthey, J.-L., *Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(17): p. 2374-2380.
60. Liskova, A., Lišková, A. et Křivánková, L., *Determination of dissociation constants of compounds with potential cognition enhancing activity by capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis, 2005. **26**(23): p. 4429-4439.

61. Ren, H., Wang, L., Wang, X., Liu, X. et Jiang, S., *Measurement of acid dissociation constants and ionic mobilities of 3-nitro-tyrosine and 3-chloro-tyrosine by capillary zone electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **77**: p. 83-87.
62. Wan, H., Holmen, A., Nagard, M. et Lindberg, W., *Rapid screening of pKa values of pharmaceuticals by pressure-assisted capillary electrophoresis combined with short-end injection*. Journal of Chromatography A, 2002. **979**(1-2): p. 369-377.
63. Cabot, J., Fuguet, E. et Rosés, M., *Internal standard capillary electrophoresis as a high-throughput method for pKa determination in drug discovery and development*. ACS Combinatorial Science, 2014. **16**(10): p. 518-525.
64. Zhou, C., Jin, Y., Kenseth, J.R., Stella, M., Wehmeyer, K.R. et Heinman, W.R., *Rapid pKa estimation using vacuum-assisted multiplexed capillary electrophoresis (VAMCE) with ultraviolet detection*. Journal Of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**(3): p. 576-589.
65. Gong, X., Figus, M., Plewa, J., Levorse, D., Zhou, L. et Welch, C., *Evaluation of multiplexed CE with UV detection for rapid pKa estimation of active pharmaceutical ingredients*. Chromatographia, 2008. **68**(3-4): p. 219-225.
66. Ishihama, Y., Oda, Y. et Asakawa, N., *Microscale determination of dissociation constants of multivalent pharmaceuticals by capillary electrophoresis*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1994. **83**(10): p. 1500-7.
67. Šolínová, V. et Kašička, V., *Determination of acidity constants and ionic mobilities of polyprotic peptide hormones by CZE*. Electrophoresis, 2013. **34**(18): p. 2655-2665.
68. Beckers, J.L. et Bocek, P., *The preparation of background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Golden rules and pitfalls*. Electrophoresis, 2003. **24**(3): p. 518-535.
69. Poole, C.F., *The essence of chromatography*. 2003, Amsterdam: Elsevier. 925pp.
70. Persat, A., Chambers, R. et Santiago, J., *Basic principles of electrolyte chemistry for microfluidic electrokinetics. Part I: Acid–base equilibria and pH buffers*. Lab On a Chip, 2009. **9**(17): p. 2437-2453.
71. Fuguet, E., Reta, M., Gibert, C., Rosés, M., Bosch, E. et Ràfols, C., *Critical evaluation of buffering solutions for pKa determination by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2008. **29**(13): p. 2841-2851.
72. Ellis, J.K. et Morrison, J.F., *Buffers of constant ionic strength for studying pH dependant processes*. Methods in Enzymology, 1982. **87**: p. 405-426.
73. Perrin, D.D. et Dempsey, B., *Buffers for pH and metal ion control*. 1974, London: Chapman and Hall. 176pp.
74. Stoll, V.S. et Blanchard, J.S., *Buffers, principles and practice*. Methods in Enzymology, 1990. **182**: p. 24-38
75. Sastre de Vicente, M., *Ionic strenght effects on acid-base equilibria. A review*. Current Topics in Solution Chemistry, 1997. **2**: p. 157-181.
76. Fiol, S., *Effect of the ionic strength on the protonation constants of threonine and methionine in NaCl at 25°C based on the Pitzer model*. Bulletin des Sociétés chimiques belges, 1995. **104**(3): p. 137-141.
77. Fiol, S., Brandariz, I. et de Vicente, M., *The protonation constants of glycine in artificial seawater at 25 °C*. Marine chemistry, 1995. **49**(2-3): p. 215-219.

78. Fiol, S., Brandariz, I. et de Vicente, M.S., *The ionization constants of α -alanine in NaCl at 25°C. Effect of the ionic strength based on three models*. Talanta, 1995. **42**(6): p. 797-801.
79. Fiol, S., Vilariño, T., Herrero, R., Sastre de Vicente, M.E. et Arce, F., *Protonation constants of valine, serine, and β -alanine in artificial seawater at 25 °C*. Journal of Chemical & Engineering Data, 1998. **43**(3): p. 393-395.
80. Vilarino, T., Fiol, S., Armesto, X.L., Brandazir, I. et Sastre de Vicente, M., *Effect of ionic strength on the protonation of various amino acids analysed by the mean spherical approximation*. Faraday, 1997. **93**(3): p. 413-417.
81. Vilarino, T., *An analysis of the morphology of pK versus ionic strength curves for simple equilibria: protonation of L-leucine in NaCl as an example*. Afinidad, 1999. **56**(482): p. 232-235.
82. Partanen, J., Juusola, P., Minkkinen, P. et Verraes, V., *Determination of the second stoichiometric dissociation constants of glycine in aqueous sodium or potassium chloride solutions at 298.15 K*. Canadian Journal of Chemistry, 2003. **81**(12): p. 1462-1470.
83. Alonso, P., Alonso, Barriada, J.L., Rodríguez, P., Brandariz, I. et Sastre de Vicente, M.E., *Acid base equilibrium constants for glycine in NaClO₄, KCl, and KBr at 298 K. Dependence on ionic strength*. Journal of Chemical & Engineering Data, 1998. **43**(5): p. 876-879.
84. Fiol, S., Brandariz, I., Herrero, R., Vilariño, T. et de Vicente, M.S., *The protonation constants of glycine in NaCl at 25 °C based on the pitzer and scatchard models data analysis by ridge regression*. Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie, 1994. **98**(2): p. 164-171.
85. Brandazir, I., Arce, F., Armesto, X.L., Penedo, F. et Sastre de Vicente, M., *Dependence of equilibrium constants of L-valine on ionic strength according to Guggenheim, Scatchard and Pitzer models*. Monatshefte für Chemie, 1993. **124**(3): p. 249-257.
86. Rathore, A.S., *Joule heating and determination of temperature in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography columns*. Journal of Chromatography A, 2004. **1037**(1-2): p. 431-443.
87. Gagliardi, L., Tascon, M. et Castells, C., *Effect of temperature on acid–base equilibria in separation techniques. A review*. Analytica Chimica Acta, 2015. **889**: p. 35-57.
88. Grushka, E., McCormick, R.M. et Kirkland, J.J., *Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations*. Analytical Chemistry, 1989. **61**(3): p. 241-146.
89. Palmieri, R.H., *Comparison of air and liquid cooling in capillary electrophoresis*. 1996, Beckman Instruments Inc.: Fullerton, CA.
90. Corstjens, H., Billiet, H., Frank, J. et Luyben, K., *Variation of the pH of the background electrolyte due to electrode reactions in capillary electrophoresis: theoretical approach and in situ measurement*. Electrophoresis, 1996. **17**(1): p. 137-43.
91. Bello, M.S., *Electrolytic modification of a buffer during a capillary electrophoresis run*. Journal of Chromatography A, 1996. **744**(a1-2): p. 81-91.

92. Mittermayr, S., Olajos, M., Chovan, T., Bonn, G.K. et Guttman, A., *Mobility modeling of peptides in capillary electrophoresis*. Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(5): p. 407-417.
93. Rickard, E.C., Strohl, M.M. et Nielsen, R.G., *Correlation of electrophoretic mobilities from capillary electrophoresis with physicochemical properties of proteins and peptides*. Analytical Biochemistry, 1991. **197**(1): p. 197-207.
94. Basak, S.K. et Ladisch, M.R., *Correlation of electrophoretic mobilities of proteins and peptides with their physicochemical properties*. Analytical Biochemistry, 1995. **226**(1): p. 51-8.
95. Bongers, J., Lambros, T., Felix, A.M. et Heimer, E.P., *Capillary zone electrophoresis of degradative and cyclic lactam derivatives of the growth hormone-releasing factor peptide*. Journal of Liquid Chromatography, 1992. **15**(6-7): p. 1115-28.
96. Deyl, Z., Rohlicek, V. et Adam, M., *Separation of collagens by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1989. **480**: p. 371-8.
97. Florance, J.R., Konteatis, Z.D., Macielag, M.J., Lessor, R.A. et Galdes, A., *Capillary zone electrophoresis studies of motilin peptides. Effects of charge, hydrophobicity, secondary structure and length*. Journal of Chromatography, 1991. **559**(1-2): p. 391-9.
98. Frenz, J., Wu, S.L. et Hancock, W.S., *Characterization of human growth hormone by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography, 1989. **480**: p. 379-391.
99. Langenhuizen, M.H.J.M. et Janssen, P.S.L., *Capillary zone electrophoresis of pharmaceutical peptides*. Journal of Chromatography, 1993. **638**(2): p. 311-318.
100. Van de Goor, T.A.A.M., Janssen, P.S.L., Van Nispen, J.W., Van Zeeland, M.J.M. et Everaerst, F.M., *Capillary electrophoresis of peptides. Analysis of adrenocorticotrophic hormone-related fragments*. Journal of Chromatography, 1991. **545**(2): p. 379-389.
101. Compton, B.J. et O'Grady, E.A., *Role of charge suppression and ionic strength in free zone electrophoresis of proteins*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(22): p. 2597-2602.
102. Simo, C., Soto-Yarritu, P.L. et Cifuentes, A., *Simulation and optimization of peptide separation by capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2002. **23**(14): p. 2288-2295.
103. Fatemi, M.H., *Prediction of the electrophoretic mobilities of some carboxylic acids from theoretically derived descriptors*. Journal of Chromatography A, 2004. **1038**(1-2): p. 231-237.
104. Jouyban, A., Majidi, M.R. et Asadpour-Zeynali, K., *Modeling the electrophoretic mobility of beta-blockers in capillary electrophoresis using artificial neural networks*. II Farmaco, 2005. **60**(3): p. 255-259.
105. Ma, W., Luan, F., Zhang, H., Zhang, X., Liu, M., Hu, Z. et Fan, B., *Accurate quantitative structure-property relationship model of mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis*. Analyst 2006. **131**(11): p. 1254-60.
106. Xue, C.X., Zhang, R.S., Liu, M.C., Hu, Z.D. et Fan, B.T., *Study of the quantitative structure-mobility relationship of carboxylic acids in capillary electrophoresis based on support vector machines*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2004. **44**(3): p. 950-957.

107. Yu, K. et Cheng, Y., *Machine learning techniques for the prediction of the peptide mobility in capillary zone electrophoresis*. *Talanta*, 2007. **71**(2): p. 676-682.
108. Deiber, J., Piaggio, M. et Peirotti, M., *Estimation of electrokinetic and hydrodynamic global properties of relevant amyloid-beta peptides through the modeling of their effective electrophoretic mobilities and analysis of their propensities to aggregation*. *Journal of Separation Science*, 2014. **37**(18): p. 2618-2624.
109. Deiber, J., Piaggio, M. et Peirotti, M., *Global conformations of proteins as predicted from the modeling of their CZE mobility data*. *Electrophoresis*, 2011. **32**(20): p. 2779-2787.
110. Deiber, J., Piaggio, M. et Peirotti, M., *Evaluation of the slip length in the slipping friction between background electrolytes and peptides through the modeling of their capillary zone electrophoretic mobilities*. *Electrophoresis*, 2013. **34**(18): p. 2648-2654.
111. Piaggio, M., Peirotti, M. et Deiber, J., *Estimation of global structural and transport properties of peptides through the modeling of their CZE mobility data*. *Journal of Separation Science*, 2010. **33**(16): p. 2423-2429.
112. Piaggio, M., Peirotti, M. et Deiber, J., *Analysis of the interplay among charge, hydration and shape of proteins through the modeling of their CZE mobility data*. *Electrophoresis*, 2009. **30**(13): p. 2328-2336.
113. Olajos, M., Chován, T., Mittermayr, S., Kenesei, T., Hajos, P., Molnár, I., Darvas, F. et Guttman, A., *Artificial neural network modeling of pH dependent structural descriptor-mobility relationship for capillary zone electrophoresis of tripeptides*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2008. **31**(15): p. 2348-2362.
114. Hirokawa, T., Kiso, Y., Gas, B., Zuskova, I. et Vacik, J., *Simulated quantitative and qualitative isotachophoretic indices of 73 amino acids and peptides in the pH range 6.4-10*. *Journal of Chromatography*, 1993. **628**(2): p. 283-308.
115. Wronski, M., *Concept of effective mass and hidden mass for calculation of mobility of organic anions and peptides*. *Journal of Chromatography A*, 1993. **657**(1): p. 165-173.
116. Greenstein, J.P. et Winitz, M., *Chemistry of the amino acids*. 1961, New York: Wiley. 2872pp.
117. Martell, A.E. et Smith, R.M., *Critical stability constants: Amino acids*. Vol. 1. 1974, London: Plenum Press. 469pp.
118. Perrin, D.D., *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution*. 1965, London: Butterworths. 473pp.
119. Serjeant, E.P. et Dempsey, B., *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution*. 1979, Oxford: Pergamon Press. 998pp.
120. Sillero, A. et Ribeiro, J.M., *Isoelectric points of proteins: theoretical determination*. *Analytical Biochemistry*, 1989. **179**(2): p. 319-25.
121. Skoog, B. et Wichman, A., *Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition*. *Trends in Analytical Chemistry*, 1986. **5**(4): p. 82-83.
122. Honig, B. et Nicholls, A., *Classical electrostatics in biology and chemistry*. *Science*, 1995. **268**(5214): p. 1144-1149.

123. Sternberg, U., Koch, F.T. et Mollhoff, M., *New approach to the semiempirical calculation of atomic charges for polypeptides and large molecular systems*. Journal of Computational Chemistry, 1994. **15**(5): p. 524-531.
124. Nielsen, J.E. et Vriend, G., *Optimizing the hydrogen bond network in Poisson-Boltzmann equation-based pKa*. Proteins, 2001. **43**(4): p. 403-412.
125. Van Vlijmen, H.W., Schaefer, M. et Karplus, M., *Improving the accuracy of protein pKa calculations: Conformational averaging versus the average structure*. Proteins, 1998. **33**(2): p. 145-158.
126. Yang, A.S., Gunner, M.R., Sampogna, R., Sharp, K. et Honig, B., *On the calculation of pKa in proteins*. Proteins, 1993. **15**(3): p. 252-265.
127. Zhang, S., Baker, J. et Pulay, P., *A reliable and efficient first principles-based method for predicting pKa values. 2. Organic acids*. The Journal of Physical Chemistry A, 2010. **114**(1): p. 432-442.
128. Liao, C. et Nicklaus, M., *Comparison of nine programs predicting pKa values of pharmaceutical substances*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2009. **49**(12): p. 2801-2812.
129. Juretic, D. et Lucin, A., *The preference functions method for predicting protein helical turns with membrane propensity*. Journal of Chemical Information and Modeling, 1998. **38**(4): p. 575-585.
130. Kyte, J. et Doolittle, R.F., *A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein*. Journal of Molecular Biology, 1982. **157**(1): p. 105-132.
131. Karim, M.R., Shinagawa, S. et Tagaki, T., *Electrophoretic mobilities of the complexes between sodium dodecyl sulfate and various peptides or proteins determined by free solution electrophoresis using coated capillaries*. Electrophoresis, 1994. **15**(1): p. 1141-1146.
132. Wilce, M.C.J., Aguilar, M. et Hearn, M.T.W., *Physicochemical basis of amino acid hydrophobicity scales: Evaluation of four new scales of amino acid hydrophobicity coefficients derived from RP-HPLC of peptides*. Analytical Chemistry, 1995. **67**(7): p. 1210-1219.
133. Bouskova, E., Presutti, C., Gebauer, P., Fanali, S., Beckers, J.L. et Bocek, P., *Experimental assessment of electromigration properties of background electrolytes in capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis, 2004. **25**(2): p. 355-359.
134. Gas, B., Coufal, P., Jaros, M., Muzikar, J. et Jelinak, I., *Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model*. Journal of Chromatography A, 2001. **905**(1-2): p. 269-279.
135. Stedry, M., Jaros, M. et Gas, B., *Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes*. Journal of Chromatography A, 2002. **960**(1-2): p. 187-198.
136. Becklin, R.R. et Desiderio, D.M., *The amount of ultraviolet absorbance in a synthetic peptide is directly proportional to its number of peptide bonds*. Analytical Letters, 1995. **28**(12): p. 2175-2190.
137. Gluck, S.J., Steele, K.P. et Benkoe, M.H., *Determination of acidity constants of monoprotic and diprotic acids by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1996. **745**(1-2): p. 117-125.

138. Jones, A.E. et Grushka, E., *Nature of temperature gradients in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1989. **466**: p. 219-225.
139. Watzig, H., *The measurement of temperature inside capillaries for electrophoresis using thermochromic solutions*. Chromatographia, 1992. **33**(9): p. 445-448.
140. Evenhuis, C., Guijt, R., Macka, M., Marriott, P. et Haddad, P., *Temperature profiles and heat dissipation in capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(8): p. 2684-2693.
141. Evenhuis, C., Musheev, M. et Krylov, S., *Universal method for determining electrolyte temperatures in capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(5): p. 1808-1814.
142. Beckers, J.L., Everaerts, F.M. et Ackermans, M.T., *Determination of absolute mobilities, pK values and separation numbers by capillary zone electrophoresis: effective mobility as a parameter for screening*. Journal of Chromatography, 1991. **537**(1-2): p. 407-28.
143. Shihabi, Z.K., *Effect of sample composition on electrophoretic migration. Application to hemoglobin analysis by capillary electrophoresis and agarose electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 2004. **1027**(1-2): p. 179-184.
144. Yang, L. et Yuan, Z., *Determination of dissociation constants of amino acids by capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis, 1999. **20**(14): p. 2877-2883.
145. Grantham, R. et Grantham, *Amino acid difference formula to help explain protein evolution*. Science, 1974. **185**(4154): p. 862-864.
146. Urry, D.W., Peng, S., D.C., G., Parker, T. et Harris, R.D., *Comparison of electrostatic and hydrophobic-induced pKa shifts in polypentapeptides. The lysine residue*. Chemical Physics Letters, 1994. **225**: p. 97-103.
147. Urry, D.W., Peng, S. et Parker, T., *Delineation of electrostatic and hydrophobic induced pKa shifts in polypentapeptides: The glutamic acid residue*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(16): p. 7509-7510.
148. Liu, D., Wittenbach, T., Barran, B.P. et Bowers, T.M., *Sequential hydration of small protonated peptides*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(28): p. 8458-8464.
149. Plasson, R. et Cottet, H., *Determination and modeling of peptide pKa by capillary zone electrophoresis*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(15): p. 5394-5402.
150. Allison, S., Pei, H., Allen, M., Brown, J., Kim, C.-I. et Zhen, Y., *Modeling the electrophoresis and transport of peptides: The effective sphere model and complex formation*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(16): p. 2439-2446.
151. Surway, M.A., Goodall, D.M., Wren, S.A.C. et Rowe, R.C., *Self-consistent framework for standardizing mobilities in free solution capillary electrophoresis. Applications to oligoglycines and oligoalanines*. Journal of Chromatography A, 1996. **741**(1): p. 99-113.
152. Allison, S., Pei, H., Twahir, U., Wu, H. et Cottet, H., *Modeling the electrophoresis of oligoglycines*. Journal of Separation Science, 2010. **33**(16): p. 2430-2438.
153. Roda, G., Dallanoce, C., Grazioso, G., Liberti, V. et De Amici, M., *Determination of acid dissociation constants of compounds active at neuronal nicotinic acetylcholine receptors by means of electrophoretic and potentiometric techniques*. Analytical Sciences, 2010. **26**(1): p. 51-54.

154. Sanz Nebot, V., Toro, I., Benavente, F. et Barbosa, J., *pKa values of peptides in aqueous and aqueous-organic media*. Journal of Chromatography A, 2002. **942**(1-2): p. 145-156.
155. Andrasi, M., Buglyo, P., Zekany, L. et Gaspar, A., *A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **44**(5): p. 1040-1047.
156. Piaggio, M., Peirotti, M. et Deiber, J., *Determination of the microenvironment-pH and charge and size characteristics of amino acids through their electrophoretic mobilities determined by CZE*. Electrophoresis, 2007. **28**(20): p. 3658-3673.
157. Robinson, R., *Electrolyte solutions*. 1955, New York: Academic Press. 512pp.
158. Holla'n, E. *Compudrug Chemistry Ltd.*; Available from: <http://www.compudrug.com/>.
159. IntelliGenetics. *CHARGPRO*. Available from: <http://intelligenetics.com/>.
160. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Toro, I. et Barbosa, J., *Migration behavior of therapeutic peptide hormones: Prediction of optimal separation by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(20): p. 4333-40.

6 • Annexe

Annexe 1

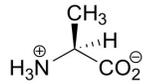
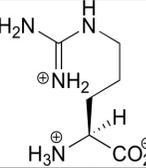
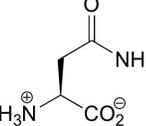
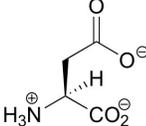
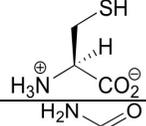
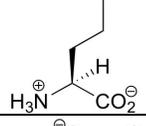
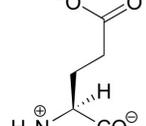
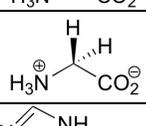
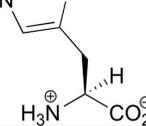
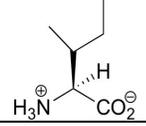
Tableaux type pour la préparation de tampons acétates (A) et phosphates (B) avec force ionique constante.

A					
Tampon acétate: CH ₂ CO ₂ H / CH ₂ CO ₂ Na					
Force ionique	40 mM				
Volume à préparer	50,00 mL				
Préparation des composantes du tampon					
Composantes	Propriété	[X] à Préparer	Volume à préparer	Quantité à diluer	Nom de la solution
CH ₂ CO ₂ H (solution)	17,4 mol/L	1,0 M	50 mL	2,875 mL	A
CH ₂ CO ₂ Na,3,H ₂ O (sel)	136,1 g/mol	0,40 M	50 mL	2,722 g	B
Préparation de la solution tampon					
pH du tampon	Volume (mL) à pipeter dans un ballon de 50,00 mL				
	Solution A		Solution B		
3,5	30,318		5,000		
3,6	24,082		5,000		
3,7	19,130		5,000		
3,8	15,195		5,000		
3,9	12,070		5,000		
4,0	9,587		5,000		
4,1	7,615		5,000		
4,2	6,049		5,000		
4,3	4,805		5,000		
4,4	3,817		5,000		
4,5	3,032		5,000		
4,6	2,408		5,000		
4,7	1,913		5,000		
4,8	1,519		5,000		
4,9	1,207		5,000		
5,0	0,959		5,000		
5,1	0,762		5,000		
5,2	0,605		5,000		
5,3	0,480		5,000		
5,4	0,382		5,000		
5,5	0,303		5,000		
5,6	0,241		5,000		
5,7	0,191		5,000		
5,8	0,152		5,000		
5,9	0,121		5,000		

B					
Tampon phosphate (pK₂): NaH₂PO₃ / Na₂HPO₃					
Force ionique	40 mM				
Volume à préparer	50,00 mL				
Préparation des composantes du tampon					
Composantes	Propriété	[X] à Préparer	Volume à préparer	Quantité à diluer	Nom de la solution
NaH ₂ PO ₃ ,H ₂ O (sel)	137,99 g/mol	0,50 M	25	1,725 g	A
Na ₂ HPO ₃ ,7H ₂ O (sel)	268,07 g/mol	0,35 M	25	2,346 g	B
Préparation de la solution tampon					
pH du tampon	Volume (mL) à pipeter dans un ballon de 50,00 mL				
	Solution A		Solution B		
5,7	3,447		0,263		
5,8	3,328		0,320		
5,9	3,189		0,386		
6,0	3,030		0,462		
6,1	2,851		0,547		
6,2	2,654		0,641		
6,3	2,441		0,742		
6,4	2,218		0,849		
6,5	1,988		0,958		
6,6	1,759		1,067		
6,7	1,536		1,173		
6,8	1,325		1,274		
6,9	1,129		1,367		
7,0	0,952		1,451		
7,1	0,795		1,526		
7,2	0,659		1,591		
7,3	0,542		1,647		
7,4	0,443		1,694		
7,5	0,360		1,733		
7,6	0,291		1,766		
7,7	0,235		1,793		
7,8	0,189		1,815		
7,9	0,151		1,833		
8,0	0,121		1,847		
8,1	0,097		1,859		
8,2	0,077		1,868		
8,3	0,062		1,875		
8,4	0,049		1,881		
8,5	0,039		1,886		

Annexe 2

Liste de propriétés choisies d'acides aminés.

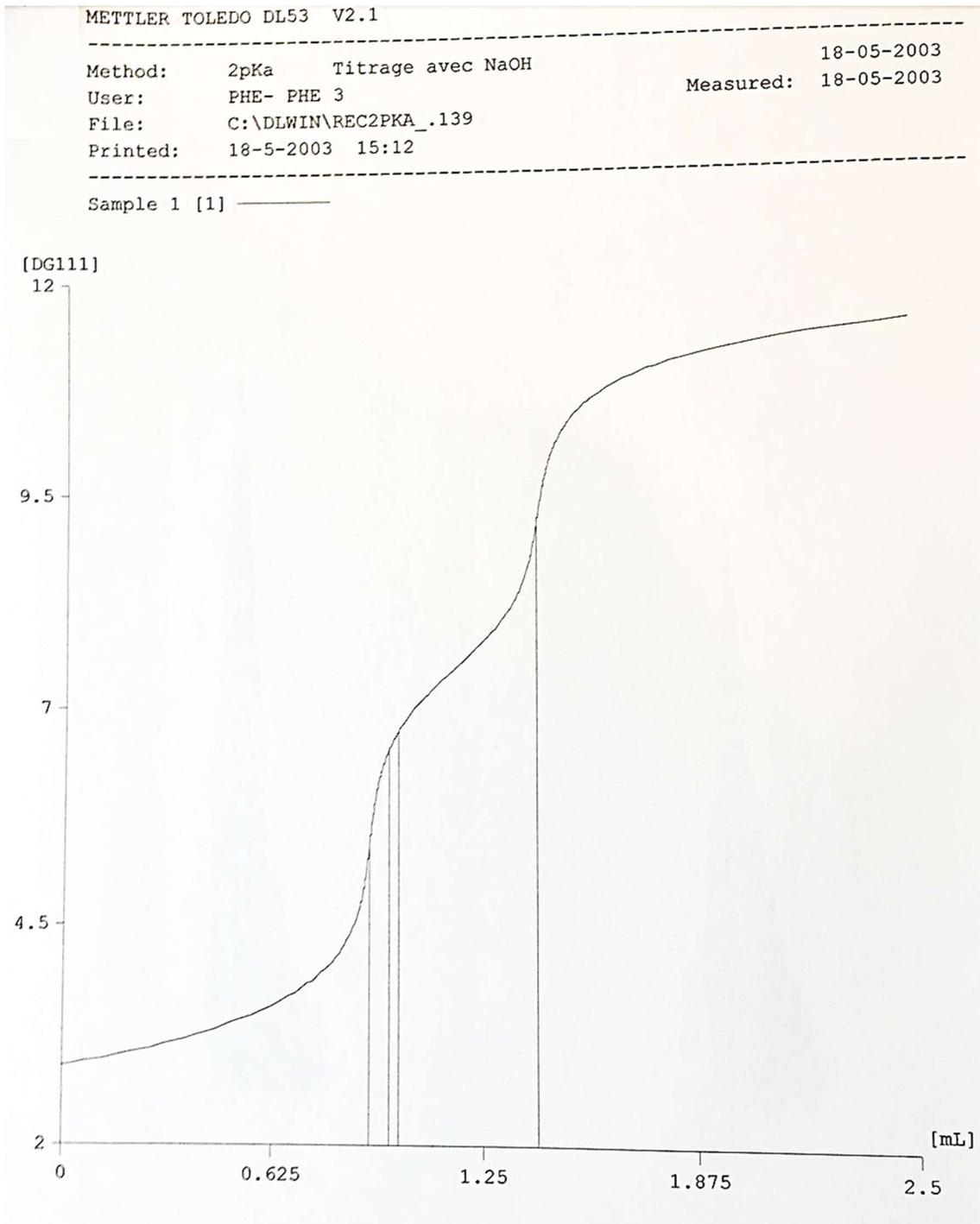
Structure de l'acide aminé	Nomenclature	pK _a de Rickard [93]			Hydrophobicité Échelle Kyte-Doolittle [130]	Polarité Échelle Grantham [145]
		N'	C'	L*		
	Alaline Ala A	8,2	3,2	-	1,8	8,1
	Arginine Arg R	8,2	3,2	12,5	-4,5	10,5
	Asparagine Asn N	7,3	2,75	-	-3,5	11,6
	Acide aspartique Asp D	8,6	2,75	3,5	-3,5	13,0
	Cystéine Cys C	7,3	2,75	10,3	2,5	5,5
	Glutamine Gln Q	7,7	3,2	-	-3,5	10,5
	Acide glutamique Glu E	8,2	3,2	4,5	-3,5	12,3
	Glycine Gly G	8,2	3,2	-	-0,4	9,0
	Histidine His H	8,2	3,2	6,2	-3,2	10,4
	Isoleucine Ile I	8,2	3,2	-	4,5	5,2

Structure de l'acide aminé	Nomenclature	pK _a de Rickard [93]			Hydrophobicité Échelle Kyte-Doolittle [130]	Polarité Échelle Grantham [145]
		N'	C'	L*		
	Leucine Leu L	8,2	3,2	-	3,8	4,9
	Lysine Lys K	7,7	3,2	10,3	-3,9	11,3
	Méthionine Met M	9,2	3,2	-	1,9	5,7
	Phénylalanine Phe F	7,7	3,2	-	2,8	5,2
	Proline Pro P	9,0	3,2	-	-1,6	8,0
	Sérine Ser S	7,7	3,2	-	-0,8	9,2
	Thréonine Thr T	8,2	3,2	-	-0,7	8,6
	Tryptophane Trp W	8,2	3,2	-	-0,9	5,4
	Tyrosine Tyr Y	7,2	3,2	10,3	-1,3	6,2
	Valine Val V	8,2	3,2	-	4,2	5,9

* Chaîne latérale avec fonction acido-basique

Annexe 3

Exemple de la courbe de titrage du peptide FF obtenu pas POT avec le graphique de la première dérivée et la tabulation des premiers points expérimentaux.

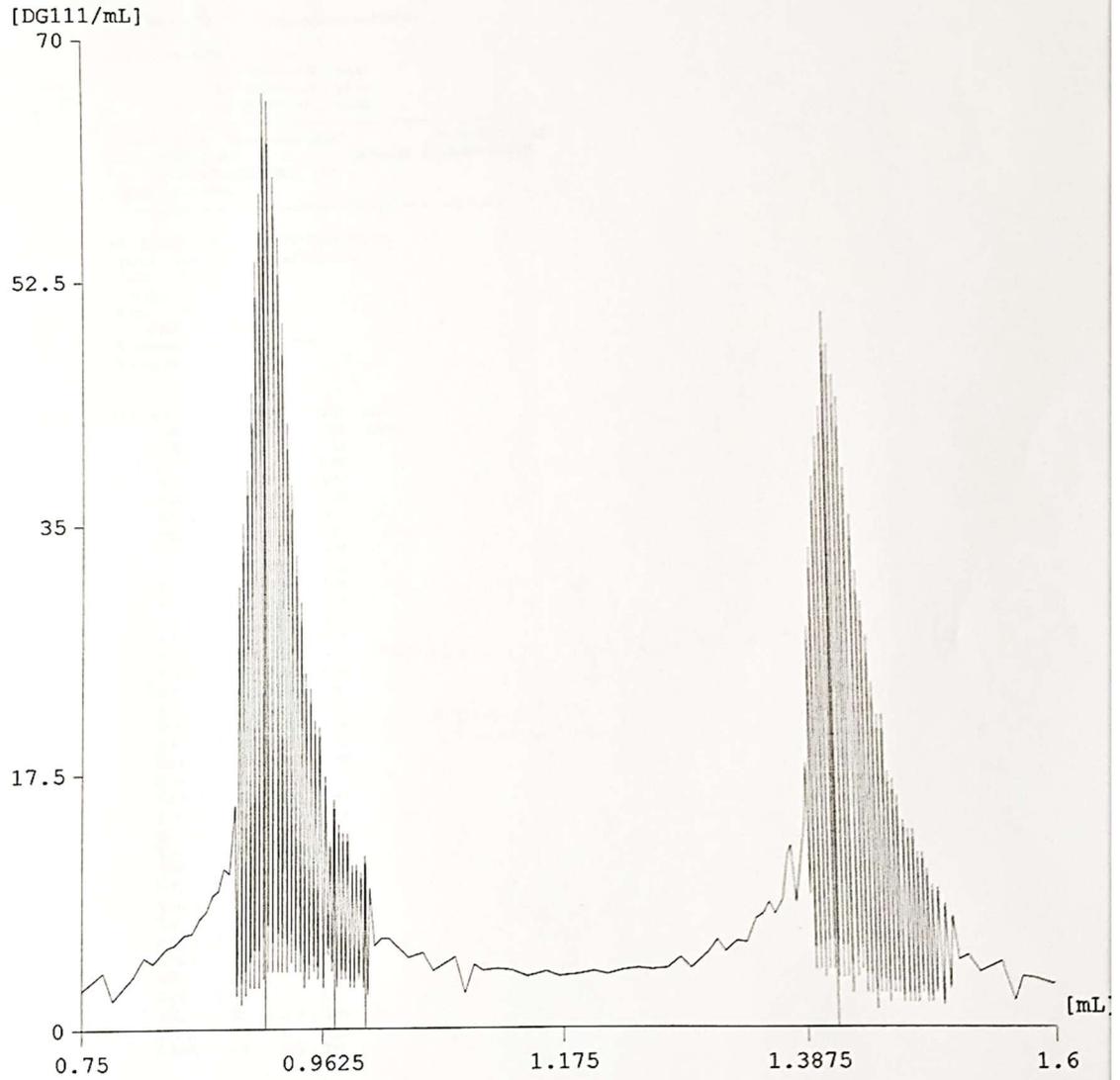


METTLER TOLEDO DL53 V2.1

Method: 2pKa Titration avec NaOH
User: PHE- PHE 3
File: C:\DLWIN\REC2PKA_.139
Printed: 18-5-2003 15:13

18-05-2003
Measured: 18-05-2003

Sample 1 [1] ———



METTLER TOLEDO DL53 V2.1

Method: 2pKa Titration avec NaOH 18-05-2003 13:45
User: PHE- PHE 3 Measured: 18-05-2003 14:23
File: CADLWIN\REC2PKA_139
Printed: 18-5-2003 15:14

RESULTS

No Sample-ID Sample amount and results

1 RC-Met-NH2 0.0 mL
R1 = 3.294 pH pKa1
R2 = 6.042 pH pKa2
R3 = 6.567 pH pKa3

Method: 2pKa Titration avec NaOH 18-05-2003 13:45
User: PHE- PHE 3 Measured: 18-05-2003 14:23
File: CADLWIN\REC2PKA_139
Printed: 18-5-2003 15:13

MEASURED VALUES EQP TITRATION [1]

Titrant NaOH 0.1 mol/L t = 1.0
Drive No. 0 2 mL
Sensor 10
Slope 7.005 mV/DG111
Zero point pH DG111
Temperature -58.15 M 25.0
Sample no.: 1

EQP	ET	Volume mL	Signal DG111	1st deriv. DG111/mL	Time min:s
ET1	0.0000	2.894			0:03
ET2	0.0000	2.894			0:04
	0.0020	2.893	-0.556		0:07
	0.0060	2.894	0.278		0:10
	0.0140	2.898	0.417		0:13
	0.0300	2.908	0.625		0:17
	0.0620	2.932	0.764		0:21
	0.1190	2.972	0.702		0:26
	0.1990	3.033	0.764		0:32
	0.2610	3.088	0.878		0:38
	0.3120	3.137	0.959		0:43
	0.3610	3.188	1.043		0:49
	0.4060	3.238	1.111		0:54
	0.4490	3.287	1.137		0:59
	0.4930	3.348	1.389		1:05
	0.5240	3.391	1.398		1:11
	0.5600	3.446	1.513		1:16
	0.5910	3.498	1.685		1:22
	0.6180	3.547	1.811		1:28
	0.6440	3.591	1.710		1:33
	0.6760	3.668	2.396		1:39
	0.6920	3.698	1.875		1:44
	0.7300	3.806	2.837		1:51
	0.7430	3.833	2.137		1:56
	0.7690	3.935	3.889		2:03
	0.7780	3.952	1.976		2:07
	0.7960	4.018	3.643		2:13
	0.8050	4.061	4.816		2:19
	0.8130	4.097	4.445		2:24
	0.8250	4.162	5.464		2:31
	0.8320	4.202	5.715		2:37
	0.8400	4.253	6.390		2:43
	0.8470	4.299	6.509		2:49
	0.8540	4.351	7.461		2:55
	0.8600	4.399	7.964		3:01

Annexe 4

Cumul des pK_a de peptides déterminés expérimentalement par électrophorèse capillaire (CE) et titrage potentiométrique (POT) avec inclusion des valeurs littéraires disponibles.

#	Peptide	Expérimental		Littérature									
		pK _a CE	pK _a POT	pK _a	I (mM) T (°C)	Méthode (Référence)*							
1	AA	C' : 3,34±0,08 N' : 7,93±0,06	3,49±N/A 8,33±N/A	3,30	100	POT							
				8,14	25	(a)							
				3,21	0	CE							
2	AAA	C' : 3,42±0,07 N' : 7,80±0,05	N/A	8,37	25	(b)							
				3,39	100	POT							
				8,03	25	(a)							
3	AAAAA	C' : 3,45±0,08 N' : 7,80±0,06	N/A	3,29	0	CE							
				8,26	25	(b)							
				3,42	100	POT							
4	AD	C' : 3,26±0,09 N' : 8,55±0,14 L : 3,99±0,11	3,74±0,03 8,59±0,04 3,76±0,04	7,94	25	(a)							
				8,10	25	(b)							
				N/A	N/A	N/A							
5	AE	C' : 3,09±0,10 N' : 8,61±0,09 L : 4,41±0,14	3,74±0,07 3,71±0,06 4,50±0,03	N/A	N/A	N/A							
				6	AF	C' : 3,16±0,06 N' : 7,87±0,08	3,31±0,01 8,10±0,04	N/A	N/A	N/A			
											7	AG	C' : 3,39±0,06 N' : 7,93±0,08
8	AGG	C' : 3,23±0,05 N' : 7,83±0,03	N/A										
				9	AH	C' : 3,49±0,16 N' : 7,91±0,06 L : 6,41±0,04	8,82±0,06 N/A	3,19	100	POT			
											10	AL	C' : 3,52±0,07 N' : 7,78±0,07
11	AM	C' : 3,36±0,05 N' : 7,75±0,06	3,41±0,03 8,25±0,07										
				12	AP	C' : 3,33±0,03 N' : 8,19±0,03	3,45±0,01 8,58±0,03	3,04	30	POT			
											13	AY	C' : 3,40±0,10 N' : 8,01±0,04 L : 9,52±0,10
14	DF	C' : 3,32±0,19 N' : 7,78±0,08 L : 3,39±0,12	N/A										
				15	FA	C' : 3,40±0,10 N' : 7,09±0,11	3,35±0,01 7,56±0,02	N/A	N/A	N/A			
											16	FD	C' : 3,23±0,13 N' : 7,45±0,08 L : 4,46±0,03

#	Peptide	Expérimental		Littérature		
		pK _a CE	pK _a POT	pK _a	I (mM) T (°C)	Méthode (Référence)*
17	FE	C' : 3,65±0,05 N' : 7,35±0,03 L : 4,51±0,06	3,88±0,03 7,75±0,02 N/A	N/A	N/A	N/A
18	FF	C' : 3,16±0,15 N' : 7,04±0,09	3,06±0,21 7,42±0,01	N/A	N/A	N/A
19	FG	C' : 3,30 ±0,10 N' : 7,38±0,06	3,35±0,06 7,66±0,02	3,12 8,17	100 25	POT (a)
20	FGG	C' : 3,10 ±0,10 N' : 7,20±0,07	N/A	N/A	N/A	N/A
21	FGGF	C' : 3,10±0,03 N' : 7,08±0,02	N/A	N/A	N/A	N/A
22	FH	C' : 3,10±0,29 N' : 7,17±0,07 L : 6,31±0,03	N/A	N/A	N/A	N/A
23	FI	C' : 3,34±0,03 N' : 7,12±0,01	3,49±0,01 7,49±0,01	N/A	N/A	N/A
24	FL	C' : 3,14 ±0,05 N' : 7,16±0,06	3,16±0,09 7,46±0,03	N/A	N/A	N/A
25	FM	C' : 3,02 ±0,06 N' : 7,18±0,07	3,25±N/A 7,42±N/A	N/A	N/A	N/A
26	FP	C' : 3,23±0,03 N' : 7,76±0,01	3,11±0,19 7,80±0,05	N/A	N/A	N/A
27	FR	C' : 3,66±0,10 N' : 8,00±0,50 L : 12,50±0,05	3,22±0,05 7,26±0,05 N/A	N/A	N/A	N/A
28	FS	C' : 3,09±0,04 N' : 7,17±0,01	3,37±0,01 7,53±0,01	N/A	N/A	N/A
29	FV	C' : 3,32±0,07 N' : 7,15±0,08	3,33±0,01 7,50±0,01	N/A	N/A	N/A
30	FW	C' : 3,25±0,04 N' : 7,01±0,01	3,26±0,02 7,38±0,02	N/A	N/A	N/A
31	FY	C' : 3,14±0,10 N' : 7,51±0,22 L : 9,99±0,06	3,39±0,03 7,41±0,02 N/A	N/A	N/A	N/A
32	GA	C' : 3,31±0,06 N' : 8,13±0,06	3,33±0,01 8,31±0,01	3,15 8,25	0 25	POT (a)
33	GAA	C' : 3,38±0,04 N' : 7,86±0,03	N/A	3,38 8,1	100 25	POT (a)
34	GD	C' : 2,61±0,23 N' : 8,26±0,11 L : 4,29±0,02	3,68±0,11 8,60±0,01 N/A	2,10 4,53 9,07	N/A	N/A
35	GE	C' : 3,29±0,50 N' : 8,56±0,06 L : 4,42±0,06	3,70±0,02 8,52±0,03 4,26±0,06	N/A	N/A	N/A
36	GF	C' : 3,24±0,20 N' : 8,04±0,50	3,20±0,10 8,23±0,01	3,12à8,17	100 25	POT (a)
37	GG	C' : 3,13±0,07 N' : 8,15±0,04	3,00±0,10 8,41±0,01	3,27 8,33	150 25	POT (a)
				3,10 8,24	0 25	CE (b)
38	GGA	C' : 3,13±0,07 N' : 7,80±0,04	N/A	N/A	N/A	N/A

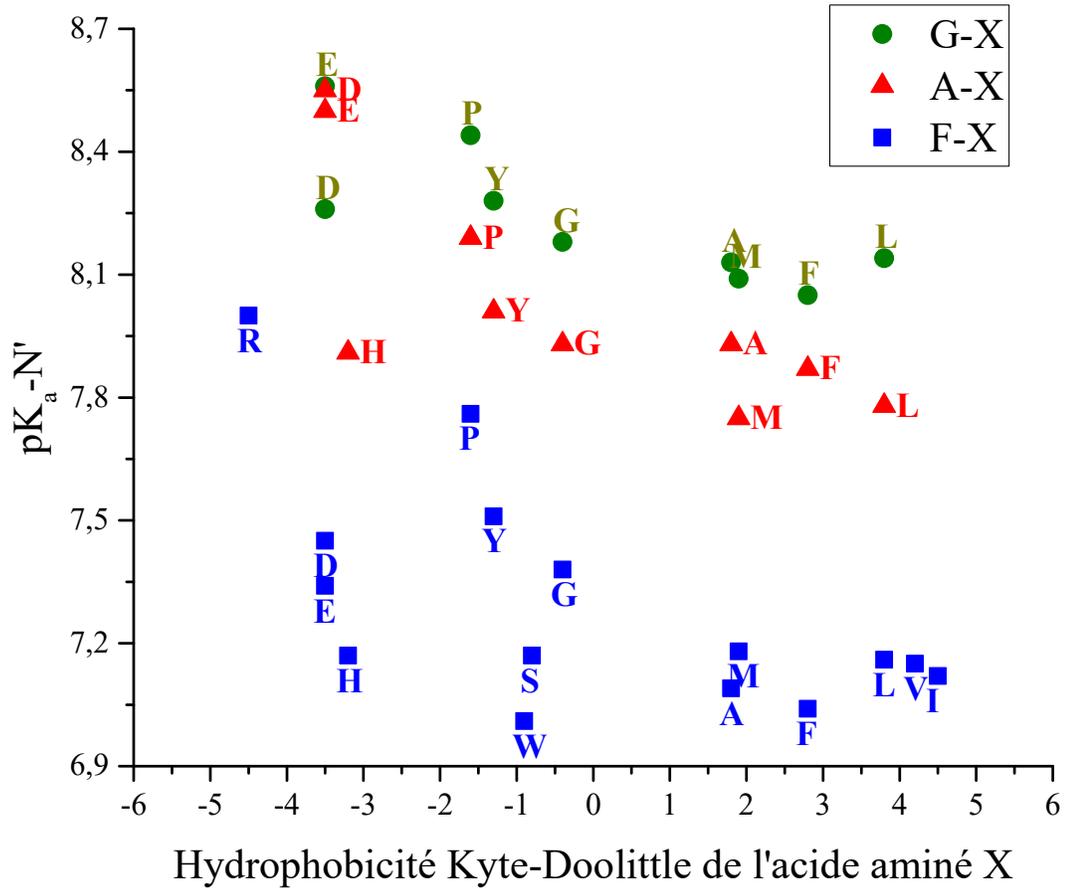
#	Peptide	Expérimental		Littérature		
		pK _a CE	pK _a POT	pK _a	I (mM) T (°C)	Méthode (Référence)*
39	GGF	C' : 3,22±0,08 N' : 7,71±0,08	N/A	3,07 8,04	0 25	CE (c)
40	GGG	C' : 3,40±0,05 N' : 7,83±0,05	N/A	3,28 8,00	110 25	POT (a)
				3,18 8,02	0 25	CE (b)
41	GGGG	C' : 3,34±0,05 N' : 7,72±0,05	N/A	3,05 7,75	N/A	POT (a)
				3,25 7,99	0 25	CE (b)
				3,05 7,70	N/A	POT (a)
42	GGGGG	C' : 3,42±0,05 N' : 7,68±0,05	N/A	3,23 7,93	0 25	CE (b)
				3,05 7,60	N/A	POT (a)
				3,26 7,91	0 25	CE (b)
43	GGGGGG	C' : 3,34±0,06 N' : 7,74±0,06	N/A	3,05 7,60	N/A	POT (a)
				3,26 7,91	0 25	CE (b)
44	GGH	C' : 3,55±0,18 N' : 7,91±0,21 L : 6,50±0,26	N/A	N/A	N/A	N/A
45	GGI	C' : 3,39±0,06 N' : 7,79±0,03	N/A	N/A	N/A	N/A
46	GGL	C' : 3,42±0,07 N' : 7,80±0,04	N/A	N/A	N/A	N/A
47	GGV	C' : 3,16±0,07 N' : 7,81±0,03	N/A	3,21 8,12	0 25	CE (c)
48	GHG	C' : 3,27±0,10 N' : 8,22±0,09 L : 6,51±0,09	N/A	N/A	N/A	N/A
49	GL	C' : 3,28±0,07 N' : 8,14±0,08	3,38±0,04 8,35±0,05	3,25 8,28	5 25	POT (a)
50	GM	C' : 3,09±0,07 N' : 8,09±0,08	3,37±0,02 8,31±0,01	N/A	N/A	N/A
51	GP	C' : 3,19±0,05 N' : 8,44±0,06	3,33±0,03 8,67±0,04	2,97 8,48	160 25	POT (a)
52	GY	C' : 2,26±0,01 N' : 8,28±0,23 L : 9,62±0,07	3,24±0,23 8,27±0,04 9,61±0,07	8,06 N/A	100 25	POT (a)
				N/A	N/A	N/A
53	HF	C' : 3,32±0,04 N' : 8,81±0,09 L : 6,73±0,01	N/A	N/A	N/A	N/A
54	IF	C' : 3,17±0,06 N' : 7,63±0,03	N/A	N/A	N/A	N/A
55	KF	C' : 3,41±0,13 N' : 7,27±0,09 L : 10,49±0,50	N/A	N/A	N/A	N/A
56	LF	C' : 3,06±0,06 N' : 8,14±0,08	N/A	N/A	N/A	N/A
57	LGG	C' : 3,25±0,06 N' : 7,68±0,04	N/A	N/A	N/A	N/A
58	LLL	C' : 3,55±0,03	N/A	N/A	N/A	N/A

#	Peptide	Expérimental		Littérature		
		pK _a CE	pK _a POT	pK _a	I (mM) T (°C)	Méthode (Référence)*
		N' : 7,50±0,03				
59	LM	C' : 3,22±0,03 N' : 7,71±0,02	N/A	N/A	N/A	N/A
60	LP	C' : 3,39±0,05 N' : 8,22±0,03	N/A	N/A	N/A	N/A
61	MF	C' : 3,15±0,05 N' : 7,14±0,06	N/A	N/A	N/A	N/A
62	PF	C' : 3,24±0,06 N' : 8,59±0,07	N/A	N/A	N/A	N/A
63	RF	C' : 3,27±0,11 N' : 7,29±0,13 L : 11,22±0,50	N/A	2,63 7,54 12,43	N/A 25	POT (a)
64	SF	C' : 3,42±0,07 N' : 7,80±0,04	N/A	N/A	N/A	N/A
65	VF	C' : 3,18±0,06 N' : 7,67±0,08	N/A	N/A	N/A	N/A
66	VGG	C' : 3,23±0,05 N' : 7,62±0,04	N/A	N/A	N/A	N/A
67	WF	C' : 3,17±0,05 N' : 7,15±0,01	N/A	N/A	N/A	N/A
68	WG	C' : 3,19±0,04 N' : 7,65±0,03		N/A 8,06	N/A 25	POT (a)
69	YF	C' : 3,29±0,07 N' : 7,67±0,02 L : 10,18±0,53	N/A	N/A	N/A	N/A

*Références (a) Perrin [118] (b) Plasson et Cottet [149] (c) Sanz-Nebot *et al.* [160]

Annexe 5

Effet de l'hydrophobicité du résidu voisin sur le pK_a-N' des a.a. Gly, Ala et Phe présents en début de chaîne de divers dipeptides de type G-X, A-X et F-X. L'identité du résidu voisin est donnée à côté de chaque point dans le graphique.



Annexe 6

Cumul des mobilités de peptides déterminés par CE à pH acide via régression non-linéaire (μ_0) et à pH 2,0 (μ_{exp}) avec calcul de la charge (q) pour modélisation.

#	Peptide	MM (g/mol)	q_{max} acide	μ_0 – via régression ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{-5}$		pH _{exp}	μ_{exp} au pH _{exp} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{-5}$		Calcul de q au pH _{exp}	
				Valeur	Erreur		Valeur	Erreur	avec pK _a exp	avec pK _a Rickard
1	AA	160	1	N/A	N/A	2,00	22,5	0,9	0,956	0,941
2	AAA	231	1	19,0	1	2,00	18,1	0,5	0,963	0,941
3	AAAAA	373	1	N/A	N/A	2,00	14,0	0,6	0,966	0,941
4	AD	204	1	N/A	N/A	2,00	18,3	0,3	0,947	0,818
5	AF	236	1	19,0	1	2,00	18,9	0,3	0,935	0,941
6	AG	146	1	22,0	2	2,00	24,5	3,0	0,961	0,941
7	AGG	203	1	24,0	1	2,00	20,4	0,9	0,944	0,941
8	AH	226	2	37,0	3	2,00	36,3	2,1	1,756	1,941
9	AL	202	1	17,0	1	2,00	18,5	1,4	0,971	0,941
10	AM	220	1	21,0	3	2,00	19,5	0,3	0,958	0,941
11	AP	186	1	N/A	N/A	2,00	21,3	0,4	0,955	0,941
12	AY	252	1	18,0	1	2,00	17,3	0,6	0,962	0,941
13	DF	280	1	18,0	2	2,00	16,2	0,4	0,915	0,910
14	FA	236	1	19,0	1	2,00	19,0	0,9	0,962	0,941
15	FD	280	1	N/A	N/A	2,00	18,6	1,5	0,941	0,818
16	FE	264	1	N/A	N/A	2,00	15,6	0,0	0,975	0,937
17	FF	312	1	N/A	N/A	2,00	15,3	0,7	0,935	0,941
18	FG	222	1	21,0	2	2,00	19,6	0,7	0,952	0,941
19	FGG	279	1	18,2	2	2,00	17,3	0,3	0,926	0,941
20	FGGF	426	1	16,0	1	2,00	13,2	1,0	0,926	0,941
21	FI	278	1	18,5	2	2,00	17,4	0,7	0,956	0,941
22	FL	278	1	19,0	2	2,00	16,7	0,7	0,932	0,941
23	FM	296	1	17,7	2	2,00	17,3	0,5	0,913	0,941
24	FP	262	1	N/A	N/A	2,00	17,1	0,6	0,944	0,941
25	FR	321	2	23,0	3	2,00	30,5	4,0	1,979	1,941
26	FS	252	1	21,0	2	2,00	18,3	2,6	0,925	0,941
27	FW	351	1	N/A	N/A	2,00	16,2	0,7	0,947	0,941
28	FY	328	1	N/A	N/A	2,00	15,1	1,9	0,932	0,941
29	GA	146	1	23,0	2	2,00	24,3	1,4	0,953	0,941
30	GAA	217	1	23,0	10	2,00	20,2	0,3	0,960	0,941
31	GD	190	1	28,0	6	2,00	21,4	2,8	0,798	0,818
32	GE	174	1	19,7	5	2,00	19,7	0,7	0,947	0,937
33	GG	132	1	30,0	2	2,00	26,2	0,3	0,931	0,941
34	GGA	203	1	20,2	1	2,00	20,3	2,7	0,943	0,941
35	GGF	279	1	17,0	1	2,00	16,4	2,3	0,934	0,941
36	GGG	189	1	21,5	3	2,00	22,8	1,3	0,962	0,941
37	GGGG	246	1	20,1	2	2,00	19,3	0,5	0,964	0,941
38	GGGGG	303	1	17,7	2	2,00	16,6	0,3	0,963	0,941
39	GGGGGG	360	1	17,1	2	2,00	17,0	1,3	0,956	0,941
40	GGH	269	2	N/A	N/A	2,00	32,5	0,9	1,973	1,941
41	GGI	245	1	N/A	N/A	2,00	20,6	1,5	0,961	0,941
42	GGV	231	1	23,0	2	2,00	19,3	0,3	0,935	0,941
43	GHG	269	2	N/A	N/A	2,00	28,8	0,3	1,949	1,941

#	Peptide	MM (g/mol)	q _{max} acide	μ ₀ – via régression (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)x10 ⁻⁵		pH _{exp}	μ _{exp} au pH _{exp} (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)x10 ⁻⁵		Calcul de q au pH _{exp}	
				Valeur	Erreur		Valeur	Erreur	avec pK _a exp	avec pK _a Rickard
44	GL	188	1	21,7	1	2,00	20,7	0,6	0,950	0,941
45	GM	206	1	19,5	2	2,00	22,0	1,4	0,925	0,941
46	GP	172	1	24,9	4	2,00	23,3	0,5	0,939	0,941
47	GY	238	1	17,0	3	2,00	17,7	1,4	0,948	0,941
48	HF	302	2	25,0	3	2,00	28,1	0,4	1,954	1,941
49	IF	278	1	19,0	1	2,00	17,1	0,4	0,937	0,941
50	KF	293	2	29,0	5	2,00	32,9	1,5	1,963	1,941
51	LF	278	1	17,0	1	2,00	16,5	0,8	0,920	0,941
52	LGG	245	1	21,0	1	2,00	21,0	0,2	0,947	0,941
53	LLL	357	1	17,1	0	2,00	14,3	0,7	0,973	0,941
54	LM	262	1	16,0	2	2,00	17,3	0,3	0,943	0,941
55	LP	228	1	22,0	2	2,00	19,5	0,6	0,961	0,941
56	MF	296	1	17,0	1	2,00	17,1	0,9	0,934	0,941
57	PF	262	1	17,8	1	2,00	18,3	0,7	0,946	1,000
58	RF	321	2	30,2	5	2,00	32,4	1,8	1,949	1,941
58	SF	252	1	19,6	1	2,00	18,1	0,4	0,963	0,941
60	VF	264	1	18,0	1	2,00	16,7	1,5	0,938	0,941
61	WF	351	1	N/A	N/A	2,00	16,4	0,6	0,937	0,941
62	WG	261	1	22,0	1	2,00	18,6	0,3	0,939	0,941
63	YF	328	1	15,0	1	2,00	15,8	0,5	0,951	0,941

Annexe 7

Cumul des mobilités de peptides déterminés par CE à pH basique via régression non-linéaire (μ_0) et à pH 9,0-11,6 (μ_{exp}) avec calcul de la charge (q) pour modélisation.

#	Peptide	MM (g/mol)	q_{max} basique	μ_0 – via régression ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{-5}$		pH _{exp}	μ_{exp} au pH _{exp} ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)		Calcul de q au pH _{exp}	
				Valeur	Erreur		Valeur	Erreur	avec pK _a , exp	avec pK _a Rickard
1	AA	160	1	N/A	N/A	11,60	-24,4	0,2	-1,000	-1,000
2	AAA	231	1	-20,5	0,2	11,28	-19,9	0,4	-1,000	-0,999
3	AD	204	2	-42,0	1	11,60	-41,2	0,2	-1,999	-2,000
4	AE	188	2	N/A	N/A	11,60	-39,9	0,3	-1,999	-2,000
5	AF	236	1	N/A	N/A	9,00	-17,0	0,1	-0,931	-0,863
6	AGG	203	1	-23,0	1	10,54	-23,4	0,4	-0,998	-0,995
7	AL	202	1	-19,5	13	11,60	-21,2	0,4	-1,000	-1,000
8	AY	252	2	-32,0	1	11,28	-31,9	0,6	-1,982	-1,904
9	DF	280	2	-32,0	1	11,60	-36,1	0,6	-2,000	-1,999
10	FA	236	1	-18,6	1	10,70	-19,0	1,0	-1,000	-0,997
11	FD	280	2	-34,0	1	11,44	-34,7	0,6	-2,000	-2,000
12	FE	264	2	-32,0	2	11,60	-35,1	0,2	-2,000	-2,000
13	FF	312	1	N/A	N/A	11,60	-18,0	0,2	-1,000	-1,000
14	FFFFF	753	1	N/A	N/A	11,60	-12,3	0,8	-1,000	-1,000
15	FGGF	426	1	-15,6	0,1	11,60	-15,4	0,1	-1,000	-1,000
16	FI	278	1	N/A	N/A	9,98	-17,6	0,5	-0,999	-0,995
17	FP	262	1	N/A	N/A	9,98	-19,2	0,6	-0,994	-0,995
18	FS	252	1	N/A	N/A	9,98	-19,4	0,6	-0,998	-0,995
19	FW	351	1	N/A	N/A	9,98	-16,9	0,5	-0,999	-0,995
20	GA	146	1	-24,0	1	11,60	-25,7	0,9	-1,000	-1,000
21	GAA	217	1	-21,0	1	10,54	-21,1	0,4	-0,998	-0,995
22	GD	190	2	-42,0	1	11,28	-44,5	0,8	-1,999	-1,999
23	GE	174	2	-40,0	1	11,60	-41,1	0,1	-1,999	-2,000
24	GF	222	1	N/A	N/A	11,60	-21,9	0,1	-1,000	-1,000
25	GG	132	1	-30,0	1	11,60	-29,1	0,1	-1,000	-1,000
26	GGA	203	1	-20,4	1	9,54	-19,5	0,3	-0,982	-0,956
27	GGF	279	1	-18,5	1	9,54	-16,9	0,3	-0,985	-0,956
28	GGG	189	1	-25,6	2	11,60	-23,5	0,8	-1,000	-1,000
29	GGGG	246	1	-21,2	1	11,60	-20,3	0,8	-1,000	-1,000
30	GGGGG	360	1	-16,3	1	11,60	-17,0	0,3	-1,000	-1,000
31	GGH	269	1	N/A	N/A	11,60	-20,7	0,4	-1,000	-1,000
32	GGI	245	1	N/A	N/A	9,54	-17,8	0,3	-0,983	-0,956
33	GGL	245	1	-18,3	1	9,54	-17,6	0,3	-0,982	-0,956
34	GGV	231	1	-19,7	1	9,54	-18,6	0,3	-0,982	-0,956
35	GHG	269	1	N/A	N/A	11,44	-18,5	0,3	-0,999	-0,999
36	GP	172	1	-22,7	2	11,60	-25,1	0,1	-0,999	-1,000
37	GY	238	2	-37,0	1	11,28	-37,7	0,6	-1,978	-1,904
38	HF	302	1	-17,0	1	10,70	-17,9	0,7	-0,987	-0,997
39	IF	278	1	-18,3	1	9,54	-17,5	0,3	-0,988	-0,956
40	LF	278	1	N/A	N/A	11,60	-18,6	0,1	-1,000	-1,000
41	LGG	245	1	-21,0	1	10,54	-21,5	0,4	-0,999	-0,995
42	LLL	357	1	-15,7	0,2	10,54	-15,5	0,2	-0,999	-0,995
43	LM	262	1	-19,7	1	10,54	-19,5	0,4	-0,999	-0,995
44	LP	228	1	-21,0	1	10,54	-20,6	0,4	-0,995	-0,995

#	Peptide	MM (g/mol)	q _{max} basique	μ ₀ – via régression (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)x10 ⁻⁵		pH _{exp}	μ _{exp} au pH _{exp} (m ² V ⁻¹ s ⁻¹)		Calcul de q au pH _{exp}	
				Valeur	Erreur		Valeur	Erreur	avec pK _a exp	avec pK _a Rickard
45	MF	296	1	N/A	N/A	9,00	-17,5	0,1	-0,986	-0,387
46	SF	252	1	-18,9	1	9,54	-18,9	0,3	-0,982	-0,994
47	VF	264	1	N/A	N/A	9,00	-17,1	0,1	-0,955	-0,863
48	VGG	231	1	-21,5	0,3	10,54	-21,2	0,3	-0,999	-0,995
49	WF	351	1	N/A	N/A	11,60	-17,4	1,3	-1,000	-1,000
50	WG	261	1	-21,3	0,3	10,54	-21,4	0,3	-0,999	-0,995

Annexe 8

Résultats des modélisations additionnelles avec le modèle de base $\mu = Aq/M^n$. Les graphiques des quatre exposants testés sont présentés avec les résultats des régressions directement dans chaque cadran acide (●) et basique (●). Respectivement (A) $n = 1$; (B) $n = 2/3$; (C) $n = 1/2$; (D) $n = 1/3$.

