

Université de Montréal

**L'étude des stratégies de séparations préparatrices de
protéines par électrophorèse capillaire**

Denis Santiagos

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 2015

© Denis Santiagos, 2015

Résumé

La protéomique est un sujet d'intérêt puisque l'étude des fonctions et des structures de protéines est essentiel à la compréhension du fonctionnement d'un organisme donné. Ce projet se situe dans la catégorie des études structurales, ou plus précisément, la séquence primaire en acides aminés pour l'identification d'une protéine. La détermination des protéines commence par l'extraction d'un mélange protéique issu d'un tissu ou d'un fluide biologique pouvant contenir plus de 1000 protéines différentes. Ensuite, des techniques analytiques comme l'électrophorèse en gel polyacrylamide en deux dimensions (2D-SDS-PAGE), qui visent à séparer ce mélange en fonction du point isoélectrique et de la masse molaire des protéines, sont utilisées pour isoler les protéines et pour permettre leur identification par chromatographie liquide and spectrométrie de masse (MS), typiquement. Ce projet s'inspire de ce processus et propose que l'étape de fractionnement de l'extrait protéique avec la 2D-SDS-PAGE soit remplacé ou supporté par de multiples fractionnements en parallèle par électrophorèse capillaire (CE) quasi-multidimensionnelle. Les fractions obtenues, contenant une protéine seule ou un mélange de protéines moins complexe que l'extrait du départ, pourraient ensuite être soumises à des identifications de protéines par cartographie peptidique et cartographie protéique à l'aide des techniques de séparations analytiques et de la MS. Pour obtenir la carte peptidique d'un échantillon, il est nécessaire de procéder à la protéolyse enzymatique ou chimique des protéines purifiées et de séparer les fragments peptidiques issus de cette digestion. Les cartes peptidiques ainsi générées peuvent ensuite être comparées à des échantillons témoins ou les masses exactes des peptides enzymatiques sont soumises à des moteurs de recherche comme MASCOT™, ce qui permet l'identification des protéines en interrogeant les bases de données génomiques.

Les avantages exploitables de la CE, par rapport à la 2D-SDS-PAGE, sont sa haute efficacité de séparation, sa rapidité d'analyse et sa facilité d'automatisation. L'un des défis à surmonter est la faible quantité de masse de protéines disponible après analyses en CE, due partiellement à l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire, mais due majoritairement au faible volume d'échantillon en CE. Pour augmenter ce volume, un capillaire de 75 μm était utilisé. Aussi, le volume de la fraction collectée était diminué de 1000 à 100 μL et les fractions étaient accumulées 10 fois; c'est-à-dire que 10 produits de séparations étaient contenu dans

chaque fraction. D'un autre côté, l'adsorption de protéines se traduit par la variation de l'aire d'un pic et du temps de migration d'une protéine donnée ce qui influence la reproductibilité de la séparation, un aspect très important puisque 10 séparations cumulatives sont nécessaires pour la collecte de fractions. De nombreuses approches existent pour diminuer ce problème (e.g. les extrêmes de pH de l'électrolyte de fond, les revêtements dynamique ou permanent du capillaire, etc.), mais dans ce mémoire, les études de revêtement portaient sur le bromure de *N,N*-didodecyl-*N,N*-diméthylammonium (DDAB), un surfactant qui forme un revêtement semi-permanent sur la paroi du capillaire. La grande majorité du mémoire visait à obtenir une séparation reproductible d'un mélange protéique standard préparé en laboratoire (contenant l'albumine de sérum de bovin, l'anhydrase carbonique, l' α -lactalbumine et la β -lactoglobuline) par CE avec le revêtement DDAB. Les études portées sur le revêtement montraient qu'il était nécessaire de régénérer le revêtement entre chaque injection du mélange de protéines dans les conditions étudiées : la collecte de 5 fractions de 6 min chacune à travers une séparation de 30 min, suivant le processus de régénération du DDAB, et tout ça répété 10 fois. Cependant, l'analyse en CE-UV et en HPLC-MS des fractions collectées ne montraient pas les protéines attendues puisqu'elles semblaient être en-dessous de la limite de détection. De plus, une analyse en MS montrait que le DDAB s'accumule dans les fractions collectées dû à sa désorption de la paroi du capillaire. Pour confirmer que les efforts pour recueillir une quantité de masse de protéine étaient suffisants, la méthode de CE avec détection par fluorescence induite par laser (CE-LIF) était utilisée pour séparer et collecter la protéine, albumine marquée de fluorescéine isothiocyanate (FITC), sans l'utilisation du revêtement DDAB. Ces analyses montraient que l'albumine-FITC était, en fait, présente dans la fraction collectée. La cartographie peptidique a été ensuite réalisée avec succès en employant l'enzyme chymotrypsine pour la digestion et CE-LIF pour obtenir la carte peptidique.

Mots-clés : Protéomique / Électrophorèse capillaire / Fractionnement / Bromure de didodecyl-diméthylammonium / Fluorescence induite par laser / Cartographie peptidique / Caractérisation de protéines.

Abstract

Proteomics is a field of growing interest because the study of protein function and structure is essential to understand how an organism operates. This project is concerned with structural studies, or more precisely the primary amino acid sequence for identification of proteins. Protein determination starts with a protein extract obtained from tissue or a biological fluid, which can contain more than 1000 distinct proteins. Analytical techniques like two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-SDS-PAGE), which separates proteins based on their isoelectric point and molar mass, are then used to isolate the different proteins and permit their identification by liquid chromatography and mass spectrometry (MS) typically. This project, inspired by the fractionation of a protein extract by 2D-SDS-PAGE, proposes to support or to replace it with multiple fractionations by capillary electrophoresis (CE) in a quasi-multidimensional scheme. The individual fractions, containing a single protein or a mixture of proteins much less complex than the original extract, would then be analyzed to identify the proteins by peptide mapping and by protein mass mapping using analytical separation techniques and MS. To obtain a peptide map of proteins isolated in a fraction, enzymatic or chemical proteolysis is carried out and the peptide fragments in the digest are separated. The generated peptide map is either compared to a second sample to reveal changes, or the exact masses of the peptides are submitted to search engine like MASCOT™, which permits the identification of proteins by interrogation of genomic data bases.

The exploitable advantages of CE compared to 2D-SDS-PAGE are its high separation efficiency, its rapid analysis and its easy automation. The challenge to overcome is its small quantity of mass available after CE fractionation due in part to protein adsorption on the capillary walls, but due mainly to the tiny sample volumes used in CE. To increase mass, a 75 μm ID capillary was used in this study. Also, the volume into which each fraction is collected was decreased from 1000 to 100 μL and each fraction was collected 10 times; in other words 10 injections of the protein mixture were made. On the other hand, protein adsorption leads to variations in peak area and migration time of a given protein which influences the repeatability of CE separations, a very important aspect since 10 cumulative separations are needed for fraction collection. There are numerous approaches to reduce this problem (e.g. using pH extremes for the background electrolyte, using dynamic or permanent capillary coatings, etc.)

but in this project, studies focused on didodecyldimethylammonium bromide (DDAB), a surfactant that forms a semi-permanent wall coating in the capillary. The majority of work presented here was aimed at obtaining a reproducible CE separation of a standard protein mixture prepared in house (containing bovine serum albumin, carbonic anhydrase, α -lactalbumin and β -lactoglobulin) while using the DDAB coating. Studies of this particular coating material revealed that it was necessary to regenerate the DDAB coating between each injection of the protein mixture under the studied conditions: collection of 5 fractions of 6 min each across a 30-min separation that followed the DDAB regeneration, repeated 10 times. However, CE-UV and HPLC-MS analyses of the collected fractions showed none of the expected proteins present; they seemed to be below the instrument detection limits. In addition, the MS analyses revealed that DDAB had accumulated in the collected fractions due to its desorption from the capillary walls. To confirm that our efforts to collect a certain protein mass were sufficient, CE coupled to laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) was used to separate and then collect the protein albumin labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) without the DDAB coating in the capillary. Analyses demonstrated that albumin-FITC was, in fact, present in the collected fraction. Peptide mapping was then successfully carried out using the enzyme chymotrypsin for digestion and CE-LIF for peptide mapping.

Keywords : Proteomics / Capillary electrophoresis / Fractionation /
Didodecyldimethylammonium bromide / Laser-induced fluorescence / Peptide mapping /
Protein characterization

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xvii
1. Introduction.....	1
1.1. Mise en contexte du projet en protéomique.....	1
1.2. L'électrophorèse capillaire (CE).....	9
1.2.1. Instrumentation générale.....	9
1.2.2. Électrophorèse capillaire de zone ou en solution libre (FSCE).....	11
1.2.3. Modes de détection.....	13
1.2.4. Qualité d'une séparation en CE.....	14
1.3. La séparation de protéines par CE.....	16
1.3.1. Méthodes employées pour diminuer l'adsorption des protéines en CE.....	19
1.3.1.1 Conditions de pH extrêmes.....	20
1.3.1.2 Revêtements permanents.....	20
1.3.1.3. Revêtements dynamiques.....	21
1.4. Objectives et approches expérimentales.....	24
1.4.1. Choix des protéines pour l'échantillon synthétique.....	25
1.4.2. Choix du revêtement.....	26
1.4.2.1. Mode de fonctionnement du revêtement composé des surfactants cationiques DDAB et DODAB.....	28

2. Partie expérimentale	32
2.1. Produits chimiques	32
2.2. Méthodes analytiques	32
2.2.1. Électrophorèse capillaire	32
2.2.1.1. Préparations des BGE	33
2.2.1.2. Mélange de solubilisation de protéine	33
2.2.1.3. Conditionnement d'un capillaire neuf	33
2.2.1.4. Séparation par CE sans revêtement du capillaire	34
2.2.1.5. Séparation par CE utilisant le DDAB comme revêtement du capillaire	34
2.2.1.6. Méthode de séparations par CE sans régénération (i.e., rafraîchissement) et avec régénération du revêtement	34
2.2.1.7. Méthodes de collecte de fractions en CE	35
2.2.2. Méthodes d'analyses par spectrométrie de masse	35
2.2.3. Digestions par la chymotrypsine	36
2.2.3.1. Digestion par la chymotrypsine libre	36
2.2.3.2. Digestion de protéine par chymotrypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde	36
3. Résultats et discussion	38
3.1. Choix des dimensions du capillaire	38
3.2. Étude du revêtement DDAB sans régénération	40
3.2.1 Effet de la température du capillaire sur la répétabilité du EOF	43
3.2.2. Effet de la température d'entreposage du DDAB sur la répétabilité du EOF	44
3.2.3. Effet du solvant du DDAB sur la répétabilité du EOF	45
3.2.4. Effet de la concentration du BGE (tampon) sur la répétabilité du EOF	46
3.3. Études du revêtement de DDAB avec régénération	49
3.3.1. Temps d'entreposage de la solution de DDAB	51

3.4. Mélange de solubilisation des protéines : utile ou entrave?.....	52
3.5. Collecte de fraction	54
3.5.1. Nombre de fractions collectées	55
3.5.2. Nombre de collectes	55
3.5.3. Volume minimal de tampon à l'anode pour garder un courant stable	56
3.5.4. Collecte de fraction de la séparation du mélange de protéines	57
3.5.5. Analyse des fractions collectées.....	62
3.5.5.1. Cartographie protéique par CE-UV des 5 fractions collectées.....	63
3.5.5.2. Cartographie protéique des fractions F2 et F3 par LC-MS	64
3.6. Séparations semi-préparatrice en électrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser	67
3.6.1. Calcul du facteur de dilution théorique causé par la collecte en CE	68
3.6.2. Étude de la reproductibilité de la séparation par CE-LIF de l'albumine-FITC.....	69
3.6.3. Estimation du facteur de dilution à l'aide d'une courbe d'étalonnage externe.	73
3.7. Digestion d'un produit de collecte par la chymotrypsine libre et immobilisée	78
4. Conclusion et travaux futurs.....	80
5. Références	83
Annexe 1. Méthode de calcul de la charge d'une protéine	87
Annexe 2 Exemple de calcul de la masse collectée après une séparation	88
Annexe 3 Données brutes d'application du DDAB sans régénération	89
Annexe 4. Données brutes des analyses par MS des fractions F2 et F3	92

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des protéines standards utilisées dans le mélange protéique synthétique.	25
Tableau 2. Facteur de dilution en fonction du diamètre interne du capillaire de L_T de 60 cm (L_D de 50 cm) si l'injection est de $5 \text{ s} \times 0,5 \text{ psi}$ et la concentration de l'analyte est de 1 mg/mL	39
Tableau 3. Répétabilité du temps de migration ($n=4$) de MO comme mesure de la stabilité du EOF lors de la régénération du DDAB après chaque injection.	50
Tableau 4. Mesures de la reproductibilité du courant électrophorétique en fonction du volume à l'anode (la sortie du capillaire) après 3 applications consécutives d'un voltage de -10 kV pendant 15 min.	57
Tableau 5. Concentrations des mélanges de protéines utilisés pour identifier le temps d'élution des protéines.	59
Tableau 6. Temps de migration moyen des protéines analysés à pH 5 en dopant la solution du mélange standard.	60
Tableau 7. Variation du temps de migration et de l'aire sous la courbe du BSA pour 10 injections d'une solution de mélange protéique.	61
Tableau 8. Fractions correspondantes à la collecte de fractions du mélange protéique ^a	63
Tableau 9. Variation du volume de solution par rapport à la longueur totale du capillaire avec un diamètre interne de $75 \text{ }\mu\text{m}$ si l'injection est de $5 \text{ s} \times 0,5 \text{ psi}$ et l'analyte est de 1 mg/mL (voir annexe 2 pour exemple de calcul).	66
Tableau 10. Évaluation de la reproductibilité des pics pour 3 injections de l'alb-FITC à $100 \text{ }\mu\text{M}$, séparés par CE-LIF.	70
Tableau 11. Estimation de la concentration de l'alb-FITC dans la fraction F1 après accumulation de dix injections de l'alb-FITC à $680 \text{ }\mu\text{M}$ à partir de la courbe d'étalonnage à la figure 27.	75
Tableau 12. Estimation de la concentration de l'alb-FITC dans la fraction F1 après accumulation de dix injections de l'alb-FITC à $680 \text{ }\mu\text{M}$ à partir de la courbe d'étalonnage à la figure 28.	77

Tableau A-13. Tableau de la charge portée par BSA (P02769) en fonction du pH obtenu avec le logiciel <i>PROTEIN CALCULATOR</i> v 3.3.	87
Tableau A-14. Variation du volume d'échantillon injecté en fonction du diamètre interne du capillaire de L_T de 60 cm (L_D de 50 cm) si l'injection est de 5 s \times 0,5 psi et la concentration de l'analyte est de 1 mg/mL.....	88
Tableau A-15. Suivi du EOF (temps de migration de MO, 1 mM, et l'aire du pic à $\lambda=240$ nm) pour 4 injections ^a après application du revêtement DDAB, 1 mM dissout dans l'eau en fonction de la concentration de BGE, de la température d'entreposage du DDAB et de la température du capillaire.....	89
Tableau A-16. Suivi du EOF (temps de migration de MO, 1 mM, et l'aire du pic à $\lambda=240$ nm) pour 4 injections ^a après l'application du revêtement DDAB, 1 mM dissout dans le BGE en fonction de la concentration de BGE, de la température d'entreposage du DDAB et de la température du capillaire.....	90

Liste des figures

Figure 1. Figure illustrant l'approche «bottom-up» et «top-down» pour l'identification des protéines [6].	2
Figure 2. Survol des techniques des stratégies d'analyses en protéomique, figure tiré de l'article de Chandramouli et al. [2].	3
Figure 3. Exemple d'analyse protéomique structurale par l'approche « <i>bottom-up</i> » [8].	5
Figure 4. A) Schéma du système proposé de fractionnement par CE d'un mélange de protéines (extrait) suivi des analyses protéomiques; B) Stratégie de fractionnement pour obtenir les sous-échantillons (e.g., 15 fractions où n = 5 pour chacun de 3 tampons) avant les analyses en protéomiques.	7
Figure 5. Schéma de base d'un système d'électrophorèse capillaire impliquant une collecte de fractions, montrant les dimensions typiques de la longueur totale(L_T), la longueur au détecteur (L_D) et du diamètre interne (DI).	10
Figure 6. Schéma combinant plusieurs modèles d'adsorption des protéines décrits par Stutz et al. [35].	17
Figure 7. Schéma présentant les différents types de revêtement dynamique ainsi que leurs modes d'actions.	22
Figure 8. Structure de la bétaine.	23
Figure 9. Structure simplifié du DDAB et du DODAB.	28
Figure 10. A) Coupe d'une micelle formée en solution aqueuse par des molécules comme le SDS. B) Bicouche formé lorsqu'une surface chargé est mise en contact avec à une solution contenant des surfactants comme le DDAB. Dans cette étude, il s'agit du capillaire qui possède des groupements silanols chargés.	29
Figure 11. Structure de l'oxyde mésityle, MO (4-méthyl-3-pentan-2-one), utilisé comme marquer du flux électro-osmotique.	41
Figure 12. Effet du revêtement DDAB sur le EOF. Injection du marqueur neutre, MO (1 mM) avec un BGE composé d'acétate de lithium, 50 mM, pH 5. Séparation dans un capillaire de diamètre interne de 75 μm , $L_T=60$ cm ($L_d=50$ cm) et la température du capillaire est de 25°C sous les conditions suivantes : a) sans revêtement à +10 kV, en b) avec le revêtement DDAB (1 mM dans l'eau) à +10 kV et en c) avec le revêtement DDAB (1 mM dans l'eau) à -10 kV.	41

- Figure 13. Électrophérogrammes de 4 injections consécutives de MO (1 mM). Le DDAB (1 mM) est dissout dans le tampon de séparation. Séparation dans un capillaire de diamètre interne de 75 μm , $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm). Conditions de séparations : tampon de l'acétate de lithium, 50 mM, pH 5; la température d'entreposage de la solution de DDAB, 25°C; température du capillaire, 15°C; volume injecté, 25 nL et la $\lambda=240$ nm. 42
- Figure 14. Courbes montrant les temps de migrations du MO (le marquer neutre) en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de la température du capillaire (T_{cap}) et de la température d'entreposage du DDAB (T_{ent}) sur la répétabilité du EOF. Pour ces séries de données, le solvant du DDAB 1 mM est l'eau et la concentration du tampon d'acétate de lithium à pH 5 est de 5 mM. 44
- Figure 15. Courbes montrant les temps de migrations du MO en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de du solvant du DDAB sur la répétabilité du EOF. Pour ces séries de données la concentration du tampon d'acétate de lithium à pH 5 est de 5 mM, la température du capillaire est de 15°C et la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C. 46
- Figure 16. Courbes montrant les temps de migrations du MO en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de la concentration du BGE, soit 5 ou 50 mM acétate de lithium. Pour ces séries de données, le solvant du DDAB à 1 mM est le BGE lui-même, la température du capillaire est de 15°C et la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C. 47
- Figure 17. Électrophérogrammes du mélange de solubilisation composés de l'acide glutamique (50 mM) et de l'arginine (50 mM). Les trois tracés représentent trois injections du mélange de solubilisation. Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), tampon utilisé est l'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 15°C, le volume de solution injectée est de 25 nL, voltage à -10 kV. 53
- Figure 18. Schéma expliquant la collecte de fraction où A représente la première condition de BGE (tampon) et F1, F2, etc., sont les noms des fractions pour cette condition de séparation. 55
- Figure 19. Suivi du courant lors de la séparation des protéines en effectuant une collecte de fraction dont les électrophérogrammes sont montrés sur la figure 20. Les graphiques sont décalés de -0,1 μA pour montrer les 10 courbes, sinon elles se chevauchent. 58
- Figure 20. Électrophérogrammes du mélange contenant: l' α -lac (37 μM), la β -lact (47 μM), la CA (34 μM) et la BSA (39 μM) injectés 10 fois. La collecte de fractions est faite à chaque 6 min pour obtenir 5 fractions. Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), tampon utilisé d'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la

solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 25°C, le volume de solution injectée est de 25 nL, voltage à -10 kV..... 58

Figure 21. Électrophérogrammes du mélange de protéines (E) et du mélange dopés par : la BSA (A), l' α -lac (B), la β -lact (C) et la CA (D). Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), tampon d'acétate de lithium à 5mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 25°C, le volume de solution injectée est de 25 nL, voltage à -10kV..... 60

Figure 22. Électrophérogrammes des analyses en triplicata des 5 fractions collectés du mélange des 4 protéines : BSA, CA, (β -lact) et α -Lac. Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), le tampon utilisé est l'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 25°C, le volume de solution injectée est de 25nL et le voltage à -10kV. Les injections sont placées en ordre de haut en bas en commençant par F1 et pour F5 2 injections ont été enregistrés..... 64

Figure 23. Électrophérogrammes obtenues par CE-LIF de trois injections d'une solution de 100 μ M de l'alb-FITC. Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D = 23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{ém}=520$ nm. Les électrophérogrammes sont décalés de 0,2 en RFU et 0,5 en min pour une meilleure lecture. Les zones A et B sont soupçonnées d'être des produits du marquage de l'alb-FITC. BI est le pic utilisé pour calculer le t_m 69

Figure 24. Électrophérogrammes de dix injections d'une solution de 680 μ M de l'alb-FITC avec collecte de fraction dans un volume de collecte de 100 μ L. Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D = 23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{ém}=520$ nm..... 71

Figure 25. Suivi du courant lors de l'accumulation de protéines alb-FITC (680 μ M). Les données sont décalées de 10 μ A pour permettre leur lecture..... 72

Figure 26. Électrophérogrammes d'une solution étalon de alb-FITC à 3 μ M (a) et de la fraction F1 (b) résultant d'une accumulation de 10 injections de alb-FITC à 680 μ M. Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D=23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{ém}=520$ nm. Les régions identifiées A, B, I, II, II et IV sont soupçonnées d'être des produits de marquage par le FITC. Le pic IV est le pic utilisé pour la quantification..... 73

Figure 27. Courbe de d'étalonnage externe de l'alb FITC selon l'aire du pic IV de la figure 26 a. Les barres d'erreur représentent la précision pour n=3 injections (avec un intervalle de confiance de 95%). L'équation de la régression linéaire simple de la courbe est : $y=1,34 \times 10^6 x - 6,9 \times 10^6$; $R^2 = 0,996$. Dans ce cas, «y» représente l'aire sous la courbe et «x» la concentration en μM 74

Figure 28. Courbe d'étalonnage externe de l'alb-FITC selon la hauteur du pic IV de la figure 26 a. Les barres d'erreur représentent la précision pour n=3 (avec un intervalle de confiance de 95%). L'équation de la régression linéaire simple de la courbe est : $y=2,2 \times 10^4 x - 7,0 \times 10^3$; $R^2 = 0,998$. Dans ce cas, «y» représente la hauteur du pic IV (figure 26) et «x» la concentration en μM . Le symbole «▲» représente la concentration de l'échantillon, soit le produit de la collecte. 76

Figure 29. Électrophérogrammes par CE-LIF montrant les cartes peptidiques de l'alb-FITC digéré par la CT en solution libre ainsi qu'immobilisée par le glutaraldéhyde (CT-GA). Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D=23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm et $\lambda_{\text{ém}} = 520$ nm. 79

Abréviations

Alb-FITC	Albumine dérivatisée avec la fluorescéine isothiocyanate
AFM	Microscopie à force atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
BGE	Électrolyte de fond (<i>Background Electrolyte</i>)
BSA	Albumine du sérum de bovin (<i>Bovine serum albumin</i>)
CA	Anhydrase carbonique (<i>Carbonic Anhydrase</i>)
CE	Électrophorèse capillaire (<i>Capillary electrophoresis</i>)
CMC	Concentration micellaire critique (<i>Critical Micelle Concentration</i>)
CT	Chymotrypsine
CT-GA	Chymotrypsine immobilisée par réticulation avec la glutaraldéhyde
CVC	Concentration vésiculaire critique (<i>Critical Vesicular Concentration</i>)
DDAB	Bromure de <i>N,N</i> -didodécyl- <i>N,N</i> -diméthylammonium (<i>N,N</i> - <i>Didodecyl-N,N</i> - <i>Dimethylammonium Bromide</i>)
DODAB	Bromure de dioctadécyldiméthylammonium (<i>DiOctaDecyldimethyl Ammonium Bromide</i>)
FSCE	Electrophorèse capillaire de zone ou en solution libre (<i>Free Solution Capillary Electrphoresis</i>)
GA	Glutaraldéhyde
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
μIMER	Micro-réacteur d'enzyme immobilisée (<i>Micro Immobilised Enzyme Reactor</i>)
α-lac	α-lactalbumine
β-lact	β-lactoglobuline
LC-TOF	HPLC couplée à un spectromètre de masse avec un analyseur par temps de vol (<i>HPLC coupled to a Time of Flight MS</i>)

<i>LIF</i>	Fluorescence induite par laser (<i>Laser-Induced Fluorescence</i>)
MALDI-MS	MS avec désorption/ionisation laser assistée par matrice (MS with <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
NMR	Résonance magnétique nucléaire (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
<i>PDA</i>	Barette de diode (<i>Photodiode Array</i>)
PEO	Oxyde de polyéthylène (<i>Poly(-ethylene oxide)</i>)
pI	Point isoélectrique
SDS-PAGE ou 1DE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec solubilisation par le dodécyl-sulfate et de sodium (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis by Sodium Dodecyl sulfate</i>)
2D-SDS-PAGE ou 2DE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec solubilisation par le dodécyl-sulfate de sodium en deux dimensions (<i>2D Polyacrylamide Gel Electrophoresis by Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Uniprot	Universal Protein Resource
<i>UV-vis</i>	Ultraviolet-Visible

À Linda

Remerciements

L'accomplissement de ce travail de recherche a nécessité la collaboration de plusieurs acteurs essentiels qu'il faut mentionner. Dans un premier temps, je tiens à remercier celle qui m'a offert cette opportunité en l'occurrence ma directrice de recherche en maîtrise la professeure Karen C. Waldron. Elle a su me guider et conseiller tout au long du processus menant à l'achèvement de ce travail. Ses conseils judicieux, sa grande expertise et sa grande disponibilité ont grandement contribué à la qualité de mon travail.

Je tiens également à remercier l'équipe du service d'analyse de l'université de Montréal qui m'ont fourni une aide précieuse tout au long de ma maîtrise. Mes remerciements vont également aux membres de mon groupe de recherche ainsi que celui du professeur Rochefort pour leur appui. Je ne voudrais pas oublier mes amis qui m'ont encouragé et supporté.

Finalement, le support, les encouragements et l'amour des membres de ma famille doivent être également soulignés. Un grand merci donc à mon père Jorge, ma mère Tomasita, mes frères Jimmy et Jeffrey ainsi qu'à ma conjointe Linda Men. Leur soutien a été infaillible tout au long de mes études.

1. Introduction

1.1. Mise en contexte du projet en protéomique

Les protéines sont des acteurs essentiels du fonctionnement de notre système biologique, en allant de la structure musculaire jusqu'au système immunitaire. Les protéines sont une classe de biomacromolécules qui jouent un rôle crucial dans la vie de toutes espèces vivantes, incluant les plantes, et elles catalysent de nombreuses réactions au niveau cellulaire. En fait, outre l'eau qui est la composante majeure, elles représentent 15 % (par poids) des constituants du corps humain [1]; par exemple, pour un corps de 70,7 kg, cela représente 10,6 kg de protéines. La présence dans le corps humain de certaines protéines peut être signe d'un événement heureux tel que la grossesse autant que d'un moment malheureux comme la maladie. Il est donc compréhensible de vouloir identifier et caractériser ce type de molécules dans un organisme. C'est un sujet tellement vaste et intéressant qu'un nom a été donné à cette science qui se charge de percer les mystères du protéome, il s'agit de la protéomique.

Le protéome peut être défini par l'ensemble des protéines dans un organisme vivant à un moment donné [2]. Ce qui attire le plus les scientifiques c'est qu'il n'y a pas une correspondance parfaite entre l'abondance des protéines et celle de l'ADN. Donc, l'étude du protéome vise à ériger un portrait plus fidèle de l'abondance et des modifications post-traductionnel des protéines présentes dans un organisme donné. Les études en protéomique visent à décrire les changements en terme d'expression protéique durant les différentes étapes de vies des cellules ainsi qu'à la détermination de la structure primaire des protéines dont la structure est inconnue et qui pourraient causer des maladies [3]. Les termes protéomique fonctionnelle et protéomique structurale sont définis, respectivement, par la recherche de la compréhension des différentes voies métaboliques dans une cellule et par la mise en relation de la structure primaire et tertiaire avec la fonction de la protéine. Dans les deux cas, il faut identifier et parfois quantifier les protéines dans un échantillon biologique. Les études décrites dans ce mémoire se situent plus spécifiquement dans la détermination des protéines selon leur structure avec meilleure exactitude. Premièrement, pour pouvoir étudier les protéines, elles ont besoin d'être isolées d'un tissu ou d'un fluide biologique. Il faut donc les séparer des

autres composantes de la cellule (les acides nucléiques, les lipides, les glucides, etc.) pour obtenir l'extrait protéique. Deuxièmement, l'extrait protéique obtenu peut être séparé ou non avant de le soumettre à des analyses chimiques qui servent à identifier leur structure primaire, c'est-à-dire la séquence d'acides aminés. Aussi, les structures secondaires et tertiaires des protéines sont étudiées par résonance magnétique nucléaire (NMR) ou par cristallographie [4].

Il y a deux approches principalement utilisées en protéomique structurale pour l'identification des protéines selon leur structure primaire : l'analyse «top down» et l'analyse «bottom up» [5]. Ces deux approches peuvent être décrites, respectivement, comme les analyses à partir d'une protéine intacte avec fragmentation dans le spectromètre de masse et les analyses à partir de produits de digestion (*i.e.*, l'hydrolyse des liens peptidiques) d'une protéine par une enzyme protéolytique ou par des réactifs chimiques [4]. Un schéma simplifié est présenté par Chait et *al.* [6] et est illustré dans la figure suivante.

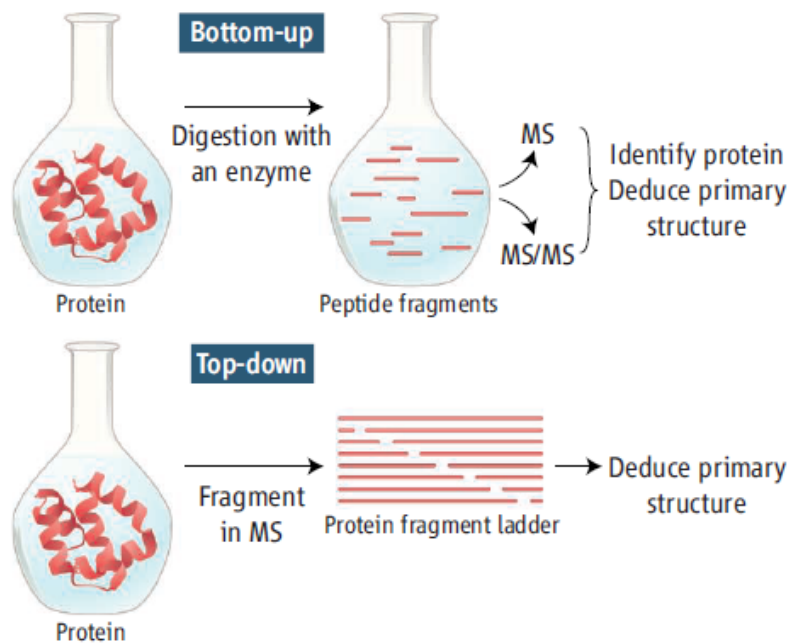


Figure 1. Figure illustrant l'approche «bottom-up» et «top-down» pour l'identification des protéines [6].

L'isolation d'une protéine à partir d'un extrait protéique est réalisée avec des techniques telles que l'électrophorèse sur gel en deux dimensions (2DE) ou la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Chandramouli et *al.* [2] tracent un portrait exhaustif qui décrit les techniques utilisés en protéomique.

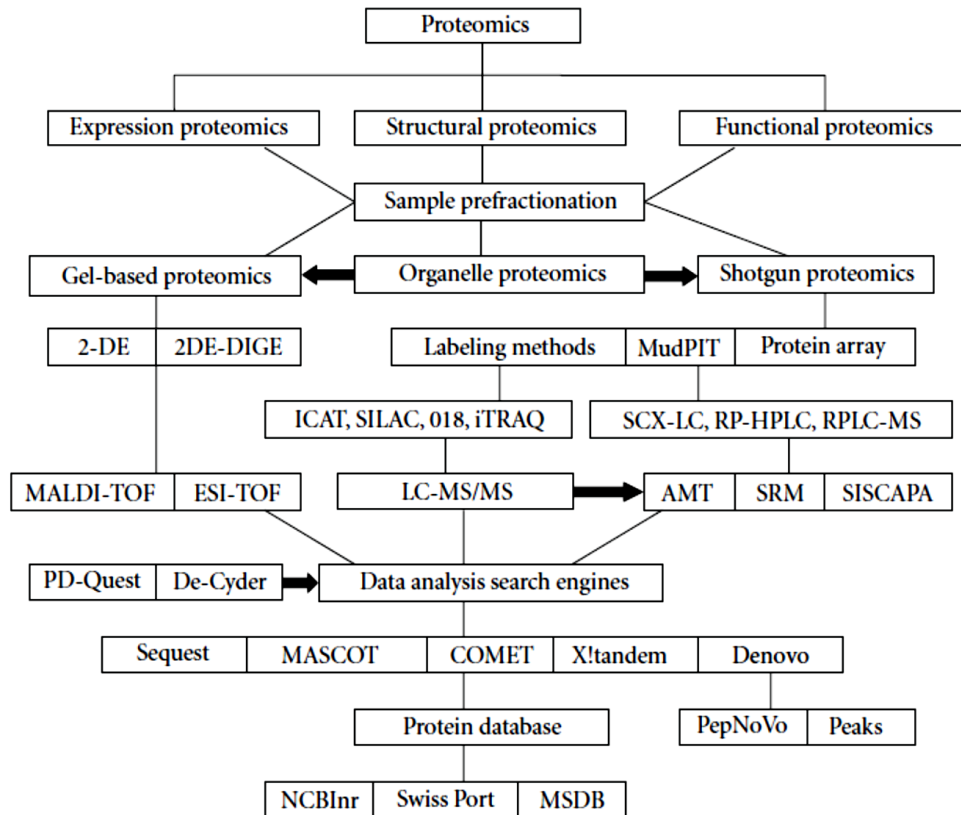


Figure 2. Survol des techniques des stratégies d'analyses en protéomique, figure tiré de l'article de Chandramouli et *al.* [2].

Dans la figure 2, les auteurs séparent les analyses protéomiques en deux soit les techniques basées sur la séparation d'un mélange protéique avec le 2DE avant son analyse en spectrométrie de masse (MS) et les analyses d'un mélange protéique sans simplification par 2DE, la voie «shotgun proteomics». Il est important de noter que les techniques utilisant la 2DE peuvent tout de même être utilisées avec l'approche «bottom-up» ainsi qu'avec l'approche «top-down». Le projet proposé présenté dans ce mémoire

est une variation du 2DE où l'électrophorèse capillaire (CE) a pour but de séparer un mélange protéique avant le séquençage par MS ou par digestion enzymatique.

Les techniques traditionnellement utilisées pour séparer les protéines en vue d'études structurales sont basées sur l'électrophorèse sur gel polyacrylamide (figure 2 la section à gauche du schéma) avec dénaturation par le dodécyl-sulfate de sodium en une dimension (SDS-PAGE ou 1DE) ou en deux dimensions (2D-SDS-PAGE ou 2DE) [7]. La 2DE est une méthode de fractionnement où les protéines sont séparées selon leur point isoélectrique (pI) dans la première dimension et ensuite selon leur masse molaire dans la deuxième dimension. Le résultat de cette séparation est nommé une carte protéique. Les bandes, qui contiennent souvent plus d'une protéine sont ensuite extraites du gel pour analyses protéomiques en mode « *top-down* » ou en mode « *bottom-up* ». Les spectromètres de masses de haute résolution mesurent les masses exactes des fragments produits dans l'appareil qui pourraient aider dans l'identification des protéines, ce qui est à la base de l'approche protéomique « *top-down* ». Dans l'approche « *bottom-up* », les protéines subissent la protéolyse par des enzymes ainsi la séparation des fragments peptidiques issue de cette digestion donne la carte peptidique. Cette séparation, ou cartographie peptidique, est faite soit par HPLC, par CE, par MS avec nébulisation électrostatique (ESI-MS), par MS avec désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS), ou par des techniques analytiques couplées (HPLC-MS, CE-MS, etc.). Ensuite, les cartes peptidiques peuvent être comparées à celles connues. Une autre option disponible est qu'après les analyses en MS, les masses peptidiques et le nom de la protéase utilisée sont introduites dans une base de données génomique pour identifier les protéines grâce aux moteurs de recherches tels que MASCOT™. Ce deuxième parcours possible est illustré à la figure 3 [8].

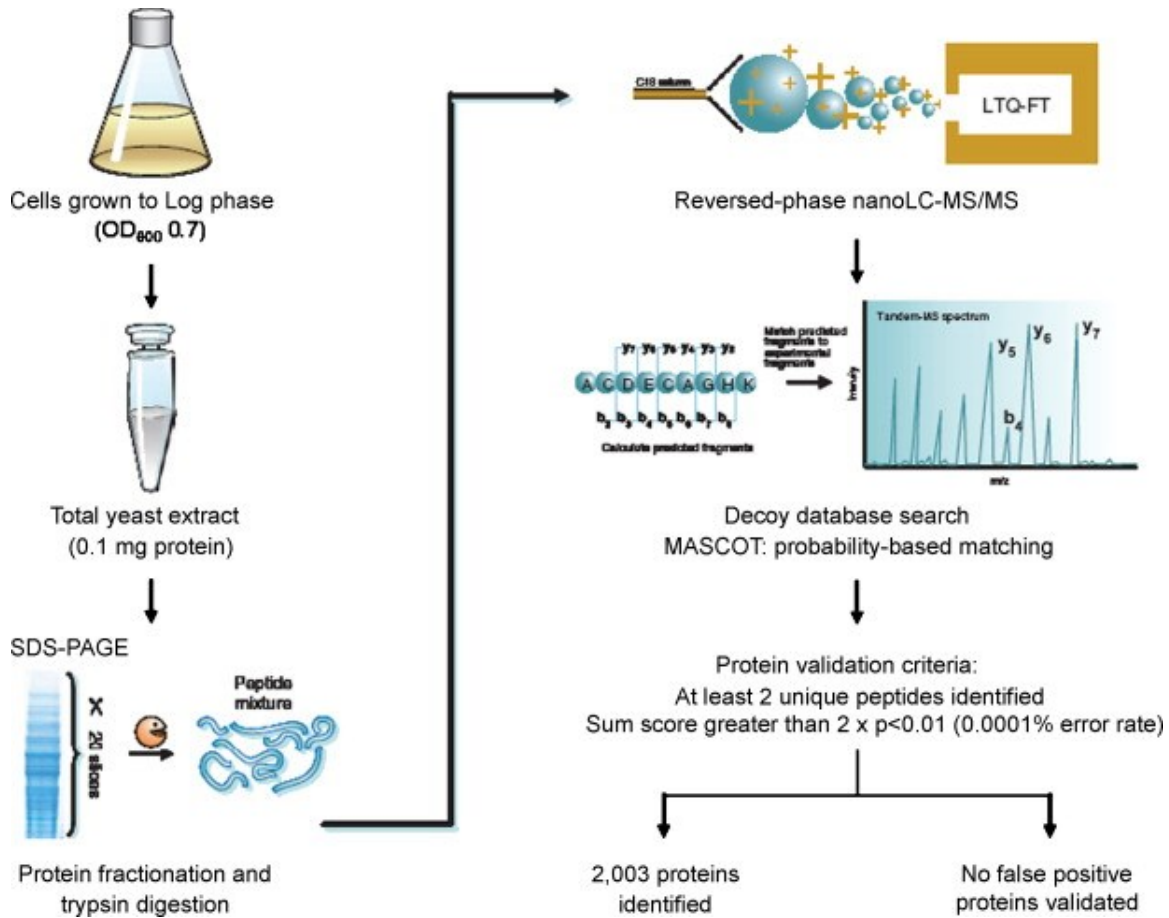


Figure 3. Exemple d'analyse protéomique structurale par l'approche « *bottom-up* » [8].

Le fractionnement sur gel par 1DE et 2DE entraîne plusieurs inconvénients tels que de longues analyses et des manipulations manuelles. En effet, son intégration dans un système fluide automatisé est difficile. La figure 3 illustre le processus en plusieurs étapes incluant la séparation par 1DE suivi d'une digestion par la trypsine, la protéase la plus couramment utilisée [9], suivi par la cartographie peptidique par nano-LC-MS/MS et enfin de l'identification des protéines avec la base de données MASCOT.

Les techniques de la figure 2 sont utilisées pour des analyses en protéomiques de type « *top down* » et « *bottom up* » comme le décrivent Xie et *al.* [10] et Wu et *al.* [11] dans leurs revues d'articles. Ces auteurs rapportent les travaux en chromatographie en une dimension et multidimensionnelles. La HPLC à phase inversée (RPLC) est la plus

utilisée lors des séparations à une dimension. D'un autre côté, la chromatographie multidimensionnelle exploite deux types d'interactions soit l'hydrophobicité et les interactions électrostatiques. L'exemple le plus commun, selon Xie *et al* [10], est la chromatographie échangeuse de cation (SCX) couplée à la RPLC utilisé pour séparer les protéines selon leur charge, en première dimension, puis selon leur hydrophobicité, en deuxième dimension. Les séparations chromatographiques sont suivis d'analyses par MS. Xie *et al* [10] indiquent qu'il y a un besoin de méthode plus sensible et rapide.

La CE pourrait répondre à ce besoin dans le futur. Elle a été utilisé pour séparer les protéines, comme le rapporte Lucy *et al.* [12] d'abord en utilisant la focalisation isoélectrique (CIEF). Cette technique permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI). Plus précisément, l'application de potentiel permet de faire migrer les protéines chargées jusqu'au point, dans un gradient de pH, dont le pH correspond au pI. Cependant, la CIEF se révèle complexe lors de l'extraction des bandes contenant les protéines qui cessent de migrer. Aussi, les protéines dont le pI n'est pas assez différent sont difficiles à séparer complètement; la résolution est estimée à 0,05 unités de pH.

Le système proposé dans ce mémoire, inspiré des séparations multidimensionnelles en HPLC et la 2DE, utilise la CE semi-préparatrice pour diviser un mélange de protéines en fractions, ou « sous-échantillons », moins complexes pour ensuite soumettre ces fractions aux identifications par cartographie peptidique et protéique, comme montré sur la figure 4 A. La CE prend avantage du format en colonne et du principe de l'électrophorèse. Elle est envisagée comme méthode de fractionnement semi-préparatrice afin de profiter de sa haute résolution, de sa rapidité d'analyse ainsi que de sa capacité d'être incluse dans un système fluidique. Ainsi, les fractions collectées (par exemple, dans une plaque multipuits à la figure 4A) pourraient être analysées en utilisant autant les approches « *top down* » et « *bottom-up* » pour déterminer la composition en protéine dans un échantillon biologique. La CE est reconnu pour son utilisation lors de séparations de molécules chargés et de peptides [2]. Cependant, son utilisation est moins courante, en ce qui concerne les protéines, dû à leurs interactions avec la paroi du capillaire (discussion plus élaborée sur ce sujet à la section 1.3). La CE semi-préparatrice a été étudiée par Yassine *et al.* [12] et leur article démontre la possibilité de séparer un

mélange de deux protéines à l'aide d'un capillaire de 100 μm enduit d'un revêtement pour diminuer l'adsorption des protéines sur la paroi interne du capillaire. Leur objectif était d'isoler chaque protéine, cependant l'objectif dans ce projet est d'obtenir plusieurs sous-échantillons à partir d'un extrait protéique (figure 4B) où chaque sous-échantillon aura moins de protéines différentes facilitant donc les analyses en protéomiques (figure 4A). Les sous-échantillons sont obtenues par la collecte de fractions en CE à des intervalles de collectes constant et ce pour différentes conditions de tampons (figure 4B). La redondance, c'est-à-dire le fait qu'une protéine se retrouve dans plus qu'un sous-échantillon (ou fraction), augmentera la probabilité de confirmer sa présence dans l'extrait biologique.

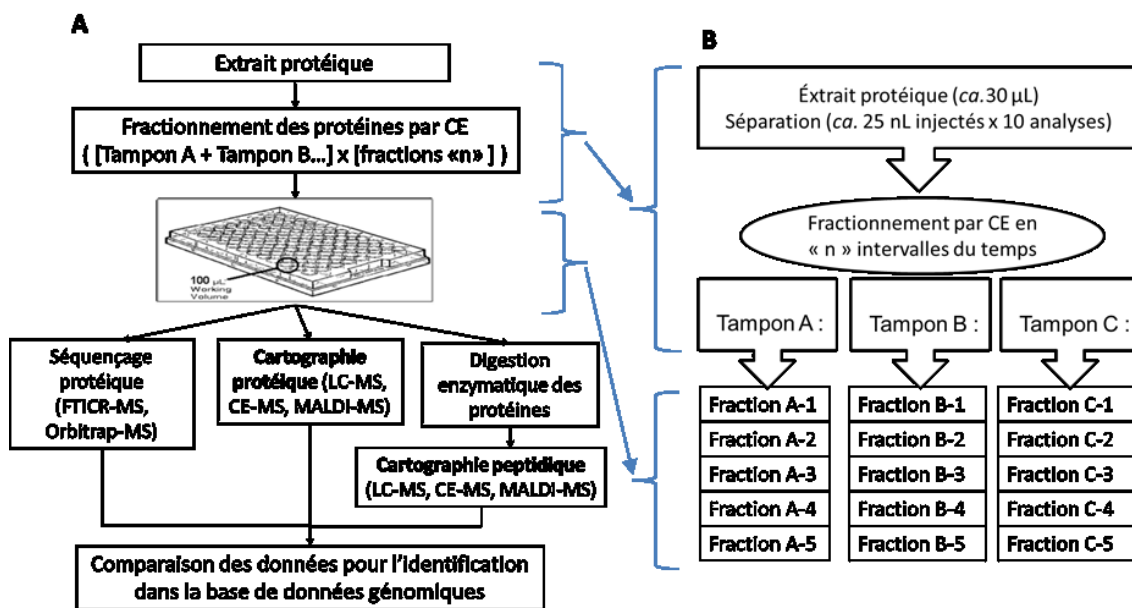


Figure 4. A) Schéma du système proposé de fractionnement par CE d'un mélange de protéines (extrait) suivi des analyses protéomiques; B) Stratégie de fractionnement pour obtenir les sous-échantillons (e.g., 15 fractions où $n = 5$ pour chacun de 3 tampons) avant les analyses en protéomiques.

Le développement du système de fractionnement proposé (figure 4) commence par l'introduction d'un mélange protéique dans le capillaire, ici un échantillon synthétique fait de quelques protéines standards dont les structures et les concentrations

sont connues au lieu d'un vrai extrait protéique. Différentes conditions de séparation, donc différents électrolytes de fond (BGE; souvent un tampon), sont envisagées pour le système proposé. Par exemple, le changement du pH d'un tampon pourrait permettre la différenciation des protéines par la dépendance des charges des chaînes latérales. La force ionique influe directement sur la séparation en CE et la nature du BGE peut agir sur la paroi du capillaire, mais aussi sur les interactions entre la protéine et la paroi interne du capillaire. Ces différentes conditions peuvent entraîner une modification des parois selon la présence ou non d'un revêtement. Ensuite, un nombre spécifique de fractions par injection est collecté à chaque condition de séparation telle qu'illustré à la figure 4B. Il s'agit donc de séparations à plusieurs dimensions, mais non pas multidimensionnelles dans le sens traditionnel puisque le même sous-échantillon ne subit pas une séparation orthogonale mais plutôt une analyse protéomique complète.

Du point de vue instrumentale, la CE est reconnue pour sa faible quantité d'échantillon injecté (*e.g.*, 10 nL) lors d'analyses requérant de la haute résolution menant à de faibles masses recueillies à la sortie de l'analyse. Pour une méthode de fractionnement semi-préparatrice, il est donc important d'en tenir compte et c'est pour cette raison que chaque fraction est collectée 10 fois. En d'autres mots, il faut accumuler une certaine masse de protéines pour les analyses protéomiques en aval et donc 10 injections sont faites pour chaque choix de tampon (BGE). La reproductibilité des séparations est donc primordiale pour accumuler les mêmes protéines dans une fraction donnée. Ainsi, lorsque les 10 injections sont complétées, le sous-échantillon peut être soumis à des analyses en vue de l'obtention des cartes peptidiques et protéiques.

La cartographie peptidique, réalisée par plusieurs techniques analytiques, est étudiée par notre groupe de recherche depuis plusieurs années; Migneault *et al.* [13-15] ont montré l'efficacité de la trypsine réticulée par le glutaraldéhyde en vue de son utilisation en cartographie peptidique par CE, HPLC et MALDI-MS; Bonneil *et al.* [16-18] et Dartiguenave *et al.* [19] ont montré que leur micro-réacteur d'enzymes immobilisées (μ IMER) contenant la trypsine greffée sur les billes de verre poreuses est efficace pour la cartographie peptidique rapide par CE; plus récemment, Ghafourifar *et al.* [20] ont étudié la protéase chymotrypsine, en format immobilisée via la

glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique par CE-UV, CE-MS et CE couplée à la fluorescence induite par laser (LIF). Ces techniques de microanalyses nécessitent des techniques de fractionnement comme celle présentée dans ce projet afin de diminuer le nombre différents de protéines dans un échantillon donné.

Un échantillon provenant d'un organisme vivant comporte une multitude de protéines, même dans de très petits organismes. Par exemple, Trost *et al.* [21] trouvaient plus d'une centaine de protéines dans un échantillon de *Listeria Monocytogenes*. C'est pour cette raison que le fractionnement multidimensionnel d'un extrait protéique est nécessaire. Le 2D-SDS-PAGE et la HPLC multidimensionnelle sont des sources d'inspirations pour l'approche proposée dans ce mémoire. La RPLC-SCX a pour but d'isoler, le plus que possible, chaque protéine contrairement à la méthode par CE présentée dans ce mémoire qui vise à diviser en plusieurs fractions un échantillon très complexe pour appliquer d'autres méthodes d'identification. Du point de vue instrumental, les quantités d'échantillon nécessaire lors de l'utilisation de cette stratégie semi-préparatrice sont de l'ordre du μL . De plus, la facilité à modifier un capillaire est un avantage par rapport aux techniques en HPLC qui nécessitent le changement de colonne pour modifier drastiquement la sélectivité de séparations.

1.2. L'électrophorèse capillaire (CE)

1.2.1. Instrumentation générale

En ce qui concerne ses composantes physiques, un appareil de CE (figure 5) est composé de deux réservoirs de tampon (BGE, électrolyte de fond), d'une source de haute tension allant jusqu'à ± 30 kV, de deux électrodes, d'un capillaire fait de silice fondue ayant un certain diamètre interne (DI), longueur totale (L_T) et longueur jusqu'au détecteur (L_D), et d'un détecteur, soit photométrique sur colonne comme illustré, soit par MS post-colonne. Il est important de noter que l'entrée du capillaire et la sortie du capillaire se situent à l'anode et à la cathode respectivement lorsque la paroi du capillaire n'est pas modifiée. L'échantillon est introduit de deux façons, soit par application de potentiel, soit par application de pression hydrodynamique à l'entrée, lorsque le réservoir de tampon est

remplacé par la fiole d'échantillon. Dans toutes les études faites dans ce projet, l'injection se faisait par application d'une différence de pression hydrodynamique de l'ordre de 35 mbar (0,5 psi) par rapport à la sortie du capillaire, donnant un volume d'environ 25 nL aux conditions de la figure 5.

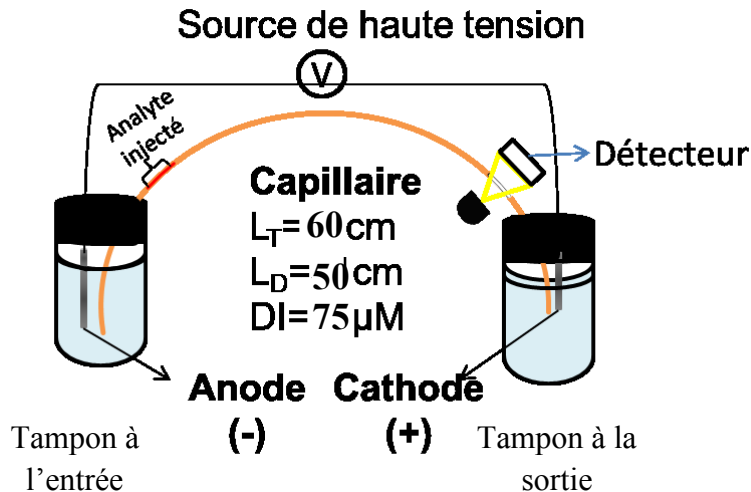


Figure 5. Schéma de base d'un système d'électrophorèse capillaire impliquant une collecte de fractions, montrant les dimensions typiques de la longueur totale (L_T), la longueur au détecteur (L_D) et du diamètre interne (DI).

L'électrophorèse « classique » est une technique qui a d'abord été introduite en utilisant un gel de polyacrylamide ou d'agarose comme support de tamassage, cependant le potentiel appliqué est limité par la dissipation de chaleur du support utilisé. L'incapacité à appliquer un voltage plus important augmente le temps d'analyse puisque la vitesse de migration est proportionnelle au voltage et l'élargissement des pics, à de faibles voltages, diminue la résolution [22]. L'utilisation d'un capillaire permet l'application de potentiel 100 fois plus élevé due à l'augmentation du rapport surface sur volume (*i.e.*, dans le capillaire versus le gel entre deux plaques de verre) qui permet de dissiper la chaleur et vient diminuer l'effet Joule. Aussi, ce qui permet l'application de voltage est la solution de BGE qui est un tampon la plupart du temps. En effet, l'application de voltage dans une solution aqueuse provoque l'hydrolyse de l'eau [23] ce

qui modifie la quantité d'ion hydroxyle et affecte ainsi le courant mesuré. Sans une solution tampon présente pour pallier à cet effet il n'y aurait pas de courant stable et la séparation ne sera pas reproductible. Donc, le tampon, ici, a pour but de maintenir le pH de la solution constant en absorbant les H^+ et OH^- formés par l'électrolyse de l'eau à chaque électrode la proportion d'ions constante et ainsi obtenir un courant constant. Ces paramètres sont importants pour la reproductibilité des séparations.

1.2.2. Électrophorèse capillaire de zone ou en solution libre (FSCE)

La CE regroupe un ensemble de techniques de séparation [22, 24] qui visent à caractériser, par diverses méthodes de détection et modes opératoires en électromigration, un échantillon en séparant ses composantes. Cette séparation est faite grâce aux mobilités différentielles d'analytes chargés sous l'effet d'un champ électrique, ou d'analytes neutres devenus chargés grâce à une complexation. Les protéines sont composées d'acides aminés dont certaines chaînes latérales sont ionisables et portent une charge nette, sauf à leur pI. La séparation en CE est régit par deux phénomènes : l'électro-osmose et l'électrophorèse. L'électro-osmose est issue d'interactions entre les silanols ionisables de la paroi du capillaire et les ions du BGE. Lorsque les silanols sont ionisés à des pH supérieur à 2, une double couche électrique se forme sur la paroi grâce à l'attraction des cations du BGE. Ces ions positifs forment alors une couche plus ou moins épaisse selon la force ionique du BGE et créent un potentiel nommé potentiel zêta (ζ). Les cations adjacents à la paroi restent immobiles tandis que les autres cations mobiles de la double couche électrique sont attirés vers la cathode et entraînent avec eux leurs sphères hydratées. Cela induit un écoulement de toute la solution connue comme le flux électro-osmotique (EOF). En d'autres mots, l'électro-osmose est le mouvement du BGE ce qui cause le mouvement de tous les solutés présents en solution. La vitesse électro-osmotique (v_{eo}) dépend de la mobilité électro-osmotique (μ_{eo}), défini par l'équation (1) :

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \frac{\varepsilon \zeta E}{\eta} \quad (1)$$

où ζ est le potentiel zêta, η est la viscosité du milieu, E est le champ électrique et ε est la constante diélectrique du BGE.

L'électrophorèse est le mouvement d'une molécule chargée dans un milieu donné dû à l'effet d'un champ électrique (E). Ce mouvement donne aux molécules chargées une vitesse électrophorétique (v_{ep}) qui est reliée à la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) par l'équation (2) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (2)$$

où la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) est définie par l'équation (3) qui dépend de la charge (q_i) et du rayon hydraté (r_i) du soluté i :

$$\mu_{ep} = \frac{q_i}{6\pi\eta r_i} \quad (3)$$

L'examen de cette équation permet d'affirmer que le mouvement des analytes est directement proportionnel au rapport charge sur rayon. La vitesse globale est définie par la vitesse apparente (équation (4)) qui est la somme des deux vitesses, soit la vitesse électrophorétique et la vitesse électro-osmotique :

$$v_{app} = v_{eo} + v_{ep} \quad (4)$$

La vitesse apparente, v_{app} , possède une direction résultante (vers l'anode ou la cathode) qui dépend fortement de l'EOF mais aussi de la charge et de la masse ou rayon hydrodynamique de l'analyte. Généralement en FSCE, l'ordre d'élution est les cations, les neutres puis les anions. Il est important de mentionner qu'un anion migre vers le détecteur seulement si l'EOF est plus grand que sa vitesse électrophorétique puisque cette vitesse a une direction opposée à l'EOF. En d'autres mots, lorsque la vitesse apparente d'un anion est définie, un signe négatif est attribué à la vitesse électrophorétique puisque sa charge globale est négative et qu'il est attiré par la borne positive soit l'anode. La description de ces paramètres permet donc d'estimer l'ordre de sortie des petites molécules lors de séparation en FSCE. En ce qui concerne les protéines, leur comportement sera discuté dans la section 1.3. De plus, ces paramètres sont influencés

par le choix de BGE puisqu'ils affectent l'EOF ainsi que la charge des espèces séparées. Par exemple, l'ajout d'un surfactant cationique au tampon causera l'inversion de l'EOF et, donc, l'ordre d'élution des solutés, un comportement qui sera discuté dans la section 1.4.2.

1.2.3. Modes de détection

Il y a plusieurs types de détecteurs couplés en ligne en CE. Les plus couramment utilisés [25] sont les détecteurs photométriques sur colonne basés sur l'absorbance moléculaire UV-vis et la fluorescence moléculaire. La MS est aussi utilisée, mais il s'agit d'un détecteur post-colonne.

Parmi les détecteurs d'absorbance, il y a ceux à longueur d'onde fixe, ceux à longueurs d'onde variables et ceux à multiples longueurs d'ondes de détection par barrette de diodes (PDA ; «photodiode array»). La source lumineuse dans les trois cas est une lampe de deutérium, lorsque l'absorbance est mesurée dans la région des UV (moins de 400nm). La cellule de détection est une section du capillaire dénudé de sa couche protectrice de polyimide (*i.e.*, la fenêtre de détection) et la détection de lumière transmise peut se faire à l'aide d'un détecteur à simple ou multiple photodiodes. Dans la plupart des études présentées dans ce mémoire, un détecteur PDA était utilisé. L'avantage de ce type de détecteur est la possibilité de suivre l'évolution de la séparation à plusieurs longueurs d'ondes et donc de pouvoir observer des espèces telles que les protéines ayant plus qu'une longueur d'onde maximale d'absorbance de détection. Par contre, le détecteur à longueur d'onde fixe, réglable à des cinq longueurs d'onde différentes ($\lambda = 200, 214, 254, 280$ ou 320 nm) dans l'instrument disponible pour ce projet, possède une limite de détection plus basse et donc une meilleure sensibilité. De façon générale, le détecteur PDA est utile lors d'élaboration de méthode parce qu'on peut voir le spectre d'absorbance pour chaque pic, ce qui aide à son identification, et celui à simple longueur d'onde est plus propice à la quantification d'une espèce connue.

La fluorescence induite par laser (LIF) était aussi utilisée comme technique de détection dans ce projet de maîtrise grâce à sa sélectivité et sa sensibilité accrue. En effet,

il est possible de détecter jusqu'à 10^{-12} M d'un soluté marqué avec un fluorophore de haut rendement quantique [26, 27]. Le principe de fonctionnement du détecteur LIF couplé à la CE consiste en une source de laser Ar^+ avec une longueur d'onde de 488 nm, où le faisceau d'excitation est amené par fibre optique vers la fenêtre de détection sur le capillaire. La longueur d'onde d'émission détectée est de 520 nm dans nos expériences, capté à un angle de 90° par rapport au faisceau d'excitation et focalisé sur un photomultiplicateur. Il faut aussi mentionner que les analytes doivent pouvoir fluorescer et dans ce travail la protéine était dérivée pour l'atteinte de ce critère. En fait, une protéine marquée avec le fluorophore isothiocyanate de fluorescéine (FITC) commercialement disponible était utilisée.

La MS peut être couplée en ligne au CE comme détecteur sensible et spécifique [28-33]. Lors du couplage de la MS avec la CE, le défi réside dans le maintien d'un voltage stable durant la séparation, mais de nombreuses interfaces alternatives pour CE-MS sont commercialement disponibles. De plus, selon la source d'ionisation, lors de l'analyse par MS, il existe d'autre défi à relever, par exemple le choix limité du BGE. Notamment, l'ionisation par ESI limite l'utilisation de certains sels dans le tampon qui entrent en compétition avec l'analyte durant l'ionisation [28]. Dans le travail présenté, il était question de détecter hors ligne, c'est-à-dire de faire quelques analyses des fractions collectées, par un système HPLC-ESI-MS au lieu de faire la CE-MS.

1.2.4. Qualité d'une séparation en CE

En CE, la qualité de séparation [24] est évaluée par deux paramètres : l'efficacité de séparation (N) et la résolution (R). Tout d'abord, N est fonction de la largeur d'un pic et est calculée par l'équation (5) :

$$N = 16 \left(\frac{t_a}{w} \right)^2 \quad (5)$$

où N est le nombre de plateaux théoriques, t_a est le temps de migration d'une molécule nommée « α » et w la largeur de la base du pic. Donc, plus les pics auront une base fine

meilleur sera l'efficacité. En effet, l'efficacité de séparation est fonction de la mobilité apparente de migration de la molécule donnée, μ_{app} en $m^2s^{-1}V^{-1}$, comme le démontre l'équation (6) :

$$N = \frac{\mu_{app} VL_d}{2DL_t} \quad (6)$$

où V est le voltage appliqué en volts, D est le coefficient de diffusion en m^2s^{-1} , L_d est la longueur au détecteur en m et L_t est la longueur totale du capillaire en m. La longueur totale du capillaire (L_t) est souvent la somme de la valeur de L_d et d'une constante (10 cm dans l'appareil utilisé pour ce projet). Il est important de mentionner ceci puisque le rapport L_d/L_t influence l'efficacité de séparation. En effet, l'équation (6) montre qu'une augmentation de la longueur du capillaire mène à une faible augmentation de l'efficacité. Par exemple, un capillaire de 40 cm indique un rapport L_d/L_t de 0,75 et un capillaire de 1 m un rapport de 0,99 ce qui augmente un peu la valeur de N si toutes les autres variables sont constantes. Selon Weinberger [22], à un moment donné l'augmentation de la longueur cessera d'influencer la résolution. En d'autres mots, lorsque L_t est grand le rapport L_d/L_t tend vers 1,0 et l'efficacité cesse d'être fonction de la longueur du capillaire. De plus, le coefficient de diffusion d'une protéine est plus petit que celui que d'une petite molécule ce qui se traduirait par une plus grande efficacité de séparation en théorie. Par exemple, les coefficients de diffusion [34] de l'albumine et la glycine sont de $0,059 \times 10^{-9} m^2/s$ et de $1,1 \times 10^{-9} m^2/s$, respectivement. Cependant, dû à l'adsorption non-spécifique des protéines sur la paroi du capillaire, un phénomène discuté dans la section 1.3, ceci n'est pas toujours observé expérimentalement.

L'efficacité de séparation permet aussi de calculer la résolution, R , entre deux pics a et b avec l'équation (7).

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{t_b}{t_a} - 1 \right) \quad (7)$$

La valeur de résolution doit être plus grande que 1,5 pour que deux pics soient considérés résolus et elle dépend de l'efficacité. En d'autres mots, deux pics sont séparés lorsque R

est suffisamment grand pour distinguer leurs bases et ainsi pouvoir intégrer l'aire de chacun de ces pics.

1.3. La séparation de protéines par CE

Les protéines sont de grosses molécules à la fois hydrophobiques et ioniques ce qui complique la tâche lors de leur séparation dans un capillaire de silice fondue. Lorsque le pH d'une solution protéique est inférieur aux valeurs de pI des protéines, ces dernières sont cationiques et il en découle des interactions assez fortes entre la paroi négative du capillaire et ces macromolécules. Ceci mène à un manque de reproductibilité des analyses dû à l'adsorption des protéines sur la silice fondue à $\text{pH} > 2$. Par ailleurs, cette adsorption de protéines sur la paroi du capillaire affecte l'efficacité de séparation puisqu'elle peut contribuer à l'élargissement des pics. Plusieurs modèles ont été décrits pour expliquer le phénomène d'adsorption des protéines, comme démontre la figure 6. Stutz *et al.* [35] présentent un schéma d'adsorption des protéines décrivant les interactions suivantes : protéines-protéines, protéines-paroi du capillaire ; molécule d'eau-protéine et protéines-contre ions.

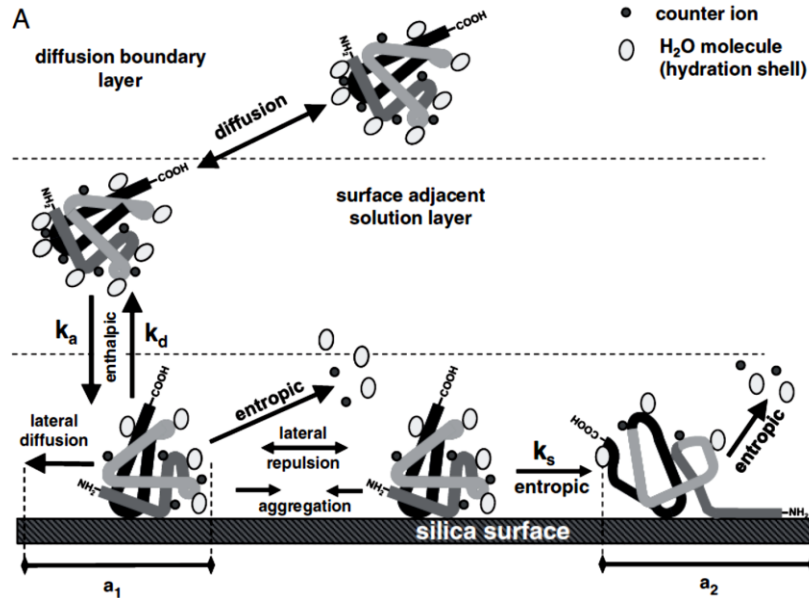


Figure 6. Schéma combinant plusieurs modèles d'adsorption des protéines décrits par Stutz *et al.* [35].

La figure 6 schématise le concept d'adsorption qui fait intervenir plusieurs acteurs mais aussi plusieurs types d'interactions comme : des interactions électrostatiques, des ponts hydrogènes, des interactions dipôle-dipôle, des forces de van der Waals et des effets hydrophobiques entre la silice et les protéines.

Dans le manuel «*Handbook of Capillary Electrophoresis*», Nolan *et al.* [25] dédie une dizaine de pages à expliquer les considérations pratiques ainsi qu'à introduire des calculs qui pourraient être utiles pour expliquer le comportement des protéines en CE. Dans ce mémoire, un bref aperçu sera donné. Il y a deux points importants qui reviennent dans les explications de Nolan *et al.* [25]; il s'agit de la structure ainsi que du comportement chimique des protéines dans une séparation en CE et ce sont des caractéristiques qui aideront à comprendre l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire.

L'étude de la structure de protéines mène à considérer la forme, la taille ainsi que la structure primaire de la protéine. Il existe deux types principaux de formes de protéines, soit les protéines fibreuses et globulaires. En soit, ces deux formes peuvent

interagir différemment avec une paroi chargée ainsi qu'avec les ions du milieu. Stutz *et al.* [35] mentionnent que les points de contact sont très importants puisqu'ils déterminent le type d'interaction qu'il pourrait exister autant avec la silice fondue qu'avec les molécules de l'environnement. Aussi, dans un même échantillon il est possible d'observer des protéines de tailles très différentes. En prenant la masse comme indicateur de taille, l'étendue des masses de protéines est vaste allant de quelques kDa à une centaine de kDa, dans un extrait protéique. De plus, la structure primaire d'une protéine est à considérer comme source de variabilité entre les protéines puisqu'elle donne des informations sur le comportement de la protéine dans un capillaire selon le pH et composition du BGE. En d'autres mots, l'identité des acides aminés composant la séquence protéique peut influencer l'adhésion de celle-ci due à la charge que chaque acide aminé peut porter à un pH donné.

Ceci introduit le deuxième point apporté par Nolan *et al.* [25], c'est-à-dire le comportement chimique de la protéine dans un capillaire en CE. Comme mentionnée précédemment, puisque les formes, les tailles et la séquence primaire des protéines sont très variables, il est très difficile de prédire le comportement des protéines dans un capillaire. En d'autres mots, il serait difficile de construire un modèle simple de comportement de telles biomolécules comme illustrée à la figure 6. Par exemple, une protéine A peut avoir un rapport de charge sur masse assez différent d'une protéine B et être détectée au même moment. Ce qui pourrait se traduire par l'adsorption de la protéine B sur la paroi du capillaire et donc un chevauchement du signal des deux protéines données. La cause de l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire peut être de différente nature soit électrostatique ou hydrophobique. En effet, l'examen des acides aminés qui composent les protéines permet d'observer tant des acides aminés hydrophobiques qu'ioniques. Aussi, les charges portées par les acides aminés ionisables peuvent être exposées ou non (*i.e.*, à l'extérieur ou à l'intérieur de la protéine), ce qui complique l'estimation de la charge globale portée par une protéine non dénaturée. En effet, Nolan *et al.* [25] mentionnent qu'il est difficile de prévoir la charge d'une protéine pour 4 raisons : 1) certains groupements sont inaccessibles aux solvants, 2) la différence qu'il peut y avoir entre le pK_a théorique et le pK_a expérimental, 3) les interactions spécifiques et non spécifiques de la protéine et 4) les effets des forces ioniques et de la

température. En d'autres mots, il ne sera pas surprenant d'observer une différence notable entre la charge globale calculée et celle trouvée expérimentalement. En somme, le comportement des protéines est difficile à prédire dû à la grande variabilité de tailles, de formes et de séquence primaire qu'il existe. Aussi, la charge globale de la protéine n'est pas calculée par un modèle mathématique simple.

1.3.1. Méthodes employées pour diminuer l'adsorption des protéines en CE

Une protéine peut interagir fortement avec la paroi du capillaire dû aux charges portées par ces deux acteurs. De plus, des interactions hydrophobiques entre la silice fondue et les protéines peuvent aussi avoir lieu. Bien que ce soient des forces faibles, il faut en tenir compte dû au grand nombre de groupements hydrophobes qui pourrait exister dans une protéine donnée et qui participent à ce type d'interaction. L'adsorption des protéines mène à un manque de reproductibilité des séparations comme décrit dans la section précédente. L'importance de la reproductibilité dans l'approche CE semi-préparatrice décrit dans la figure 4 est cruciale. Comme mentionné précédemment, pour augmenter la quantité (en masse) de protéines dans les fractions, de multiples collectes sont employées. Si les temps d'élution ne sont pas reproductibles dû à l'adsorption des protéines sur la silice fondue, les fractions seront mélangées. Il serait donc possible d'observer une protéine «X» parfois dans la fraction A-1 et parfois dans la A-2 ce qui n'est pas désiré.

Il existe plusieurs méthodes pour diminuer l'ampleur de ce phénomène d'adsorption et qui permettent d'augmenter la reproductibilité des séparations. Schwartz et Pritchett [36] regroupent ces méthodes en deux grandes catégories : les modifications des conditions de séparations (*e.g.*, le pH, les revêtements de la paroi, etc.) et les modifications des protéines. La modification des protéines vise à diminuer les interactions entre la paroi du capillaire et les protéines. Par exemple l'urée, un agent de dénaturation, vise à diminuer les ponts hydrogènes qui pourraient se former entre les groupements silanols de la silice fondue et la protéine [35]. Cependant, l'analyse de protéines natives est préférée dans ce projet. Selon, Schwartz et Pritchett [36], il y a trois types de modifications de conditions de séparations : les séparations sous des conditions

de pH extrêmes ($\text{pH} < 2$ et $\text{pH} > 11$), le revêtement permanent du capillaire et le revêtement dynamique du capillaire.

1.3.1.1 Conditions de pH extrêmes

Les séparations sous pH très acides ($\text{pH} < 2$) ou sous des pH très basiques ($\text{pH} > 11$) ont pour but de protoner ou déprotoner à 100% les silanols des parois du capillaire, respectivement. Le résultat d'un capillaire soumis à un pH plus petit que 2 serait que les protéines ne pourraient plus adhérer par interactions électrostatiques puisque la charge de la paroi serait neutralisée. Par le fait même, l'électro-osmose serait affectée puisque le potentiel zêta et la double couche électrique seraient très faibles. Par contre, tous les protéines ayant $\text{pI} > 2$ seraient cationiques et se déplaceraient assez rapidement vers la cathode. À l'autre extrême, les effets d'un pH très basique seraient que la paroi soit complètement déprotonée et qu'un nombre important de protéines seraient anioniques. Ainsi, la répulsion des silanols des parois du capillaire et des protéines serait observée. Pour les protéines, il y aurait un risque de dénaturation aux deux conditions de pH extrêmes dû à la modification de l'ionisation des chaînes latérales. Cette dénaturation pourrait mener à l'augmentation des interactions hydrophobes protéines-protéines.

1.3.1.2 Revêtements permanents

La suppression ou la diminution de l'interaction entre les protéines et la paroi du capillaire peuvent aussi être obtenues en appliquant un revêtement permanent. Les modifications permanentes font intervenir des liens covalents entre les silanols du capillaire et des molécules comme le méthylcellulose ou le polyéther, pour en nommer deux parmi plusieurs rapportées [35-39]. Alors, la paroi du capillaire ne serait plus composée de silanols, donc le comportement du capillaire serait modifié ce qui entraînerait différentes conséquences sur l'EOF. La compagnie Beckman-Coulter [36] a développé plusieurs capillaires avec des modifications covalentes qui exposent différents types de molécules dont celles chargées positivement («*eCAP Amine Capillary*») et celles qui ne présentent pas de charge globale («*eCAP Neutral Capillary*»). Lorsque la

charge de la paroi est positive, cela empêche l'adsorption des protéines cationiques. Puis, lorsque la charge de la paroi est masquée (charge globale neutre), par des groupements qui forment le revêtement, il n'y a pas d'adsorption de protéines par attraction électrostatique. Cependant, des interactions hydrophobes peuvent participer à l'adsorption de protéines. Aussi la charge de la paroi est neutralisée, il n'y a plus d'interactions entre les ions du tampon pour former une double couche électrique donc il n'y a plus d'électro-osmose. Sans EOF, les solutés vont migrer seulement par leur mobilité électrophorétique (voir équations (2) et (4)). En d'autres mots, un potentiel normal (avec injection à l'anode comme à la figure 5) permettra d'observer les cations et un potentiel inversé, les anions.

1.3.1.3. Revêtements dynamiques

Il existe d'autres approches pour diminuer l'adsorption des protéines qui nécessitent une modification réversible (non covalente), dites dynamique, des parois du capillaire et elles sont nommées à la figure 7. Donc, la différence principale entre les revêtements dynamiques et permanents est dans le type de lien qui se produit entre la paroi du capillaire et l'agent modificateur. Le premier fait appel à des interactions électrostatiques entre la molécule du revêtement et la silice fondue et le deuxième à des liens covalents.

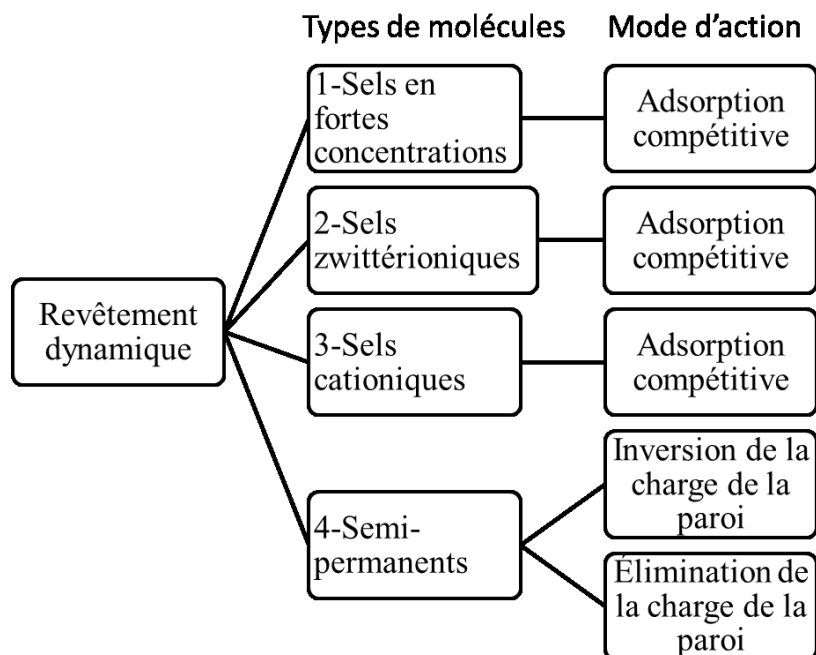


Figure 7. Schéma présentant les différents types de revêtement dynamique ainsi que leurs modes d'actions.

Dans cette section du mémoire, la description des approches dynamiques sont décrites pour un capillaire en silice fondue sans revêtement, mais il existe d'autres approches de ce type avec des capillaires dotés d'un revêtement permanent [36]. Il s'agit donc de présenter les différentes approches données sur la figure 7 soient l'ajout d'additifs comme des sels de phosphates, des sels zwitterioniques comme la bétaïne, les sels cationiques comme les amines quaternaires et les revêtements semi-permanents comme certains surfactants.

En ce qui concerne les sels en forte concentration (figure 7, type 1), le mode d'action est basé sur l'adsorption compétitive entre les cations du sel et les protéines cationiques sur la paroi. Par exemple, Lauer et McManigill [40] ont utilisé le K_2SO_4 à une concentration de 0,25 M pour améliorer la séparation de protéines en CE. Cependant, Pritchett et Schwartz [36] rapportent que de fortes concentrations de sel peuvent mener à un effet Joule important ce qui limite l'utilisation de capillaires de plus de 25 μm de diamètre interne. Les sels zwitterioniques (figure 7, type 2) fonctionnent généralement

aussi par l'adsorption compétitive des ions positifs, mais l'avantage est qu'ils n'augmentent pas la conductivité de la solution et il n'y a donc pas de réchauffement dû à l'effet Joule [36]. La bétaine (figure 8) est un exemple de molécule zwitterionique introduite dans le BGE pour réduire l'adsorption des protéines sur la paroi du capillaire [41].

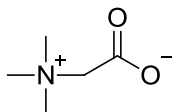


Figure 8. Structure de la bétaine.

Les sels cationiques, le troisième type de revêtement dynamique (figure 7), présentent une compétition pour les charges négatives des silanols. Les sels cationiques (figure 7, type 3) comme le 1,3-diaminopropane [42] ou le 1,5-diaminopropane sont ajoutés au BGE et s'accrochent sur la silice fondue par interaction électrostatique avec les silanols déprotonés pour empêcher l'adsorption des protéines. Bullock et Yuan [42] ont démontré qu'en augmentant la concentration du sel de 10 mM à 50 mM l'efficacité de la séparation d'une solution de protéines était améliorée donc l'adsorption de protéine diminuée.

Dans une autre catégorie, il y a les revêtements semi-permanents qui ne sont pas inclus dans le BGE. Les revêtements semi-permanents (figure 7, type 4) sont appelés ainsi puisque les interactions entre la paroi du capillaire et la molécule du revêtement font appel à des interactions plus faibles que les liens covalents, mais assez fortes pour ne pas se trouver dans le BGE. Le revêtement est appliqué durant l'étape de pré-conditionnement du capillaire et il n'est pas nécessaire de l'inclure dans le BGE. Le mode de fonctionnement de ce type de revêtement consiste à neutraliser la charge des silanols ou à inverser la charge de la paroi du capillaire. Lorsque la charge de la paroi est neutralisée, les protéines chargées ne pourront pas adhérer à la paroi du capillaire par attraction électrostatique et l'EOF est nul. Par ailleurs, l'inversion de la charge de la paroi aura pour effet de repousser les protéines cationiques de la paroi, mais les protéines

anioniques seront attirées par la paroi devenu positive. Aussi, l'inversion de charge de la paroi cause un inversement de la direction de l'EOF et la sortie du capillaire se retrouve alors à l'anode.

En effet, l'application d'un revêtement semi-permanent consiste souvent à une injection d'une solution contenant le composé qui s'absorbera ou interagira ensuite avec la paroi. Par exemple, Fermas *et al.* [43] présentent l'utilisation de l'oxyde de polyéthylène, un polymère de haute masse moléculaire ($M_r = 2000$), comme revêtement semi-permanent qui neutralise la charge de la paroi. D'un autre côté, Bateman *et al.* [44] ont décrit l'utilisation du polybrène, un composé cationique, qui interagit avec les silanols de la paroi du capillaire et expose une charge positive. L'utilisation de revêtement semi-permanent comporte des avantages tels que la facilité d'application du revêtement, du faible coût ainsi que de son caractère réversible. Par exemple, contrairement au revêtement permanent, le capillaire peut être utilisé ensuite dans d'autres séparations qui ne nécessitent pas de revêtement puisque son application est réversible en rinçant avec les solutions adéquates, tels le NaOH 1 M.

Par ailleurs, chaque type de revêtement comporte son lot de désavantages. Premièrement, un revêtement permanent nécessite une réaction chimique qui peut être complexe et lente. De plus, même si plusieurs de ces revêtements sont disponibles commercialement, l'achat de capillaire modifié est dispendieux. Pour ce qui est du revêtement dynamique, l'ajout du composé du revêtement dans le BGE peut être source de complication. En effet, une molécule comme le 1,3-diaminopropane peut devenir un contaminant lors des analyses suivant le fractionnement. Les méthodes employées dans ce projet pour réduire l'adsorption de protéine dans le capillaire sont décrites dans la prochaine section.

1.4. Objectives et approches expérimentales

Le but du projet était de développer une approche semi-préparatrice pour fractionner un mélange de protéines complexe destiné à l'analyse des protéines par cartographie peptidique et protéique. Plus précisément, un mélange de 4 protéines

standard était utilisé pour évaluer la faisabilité de l'approche où il fallait surmonter trois défis majeurs :

- 1) Obtenir des séparations reproductibles;
- 2) Éviter la perte de masse protéique due à l'adsorption de protéine sur la paroi du capillaire;
- 3) Obtenir des concentrations élevées de protéine dans les fractions collectées.

1.4.1. Choix des protéines pour l'échantillon synthétique

Avant de débiter l'étude de diverses conditions applicables au système semi-préparatif, il fallait choisir les protéines qui serviraient dans le mélange synthétique et ces protéines ont été sélectionnées parmi celles disponibles dans notre laboratoire. Dans le tableau 1 sont notées les différentes caractéristiques des quatre protéines sélectionnées : l'albumine du sérum de bovin (BSA), l'anhydrase carbonique (CA), l' α -lactalbumine (α -lac) et la β -lactoglobuline (β -lact).

Tableau 1. Caractéristiques des protéines standards utilisées dans le mélange protéique synthétique.

Protéines	Point isoélectrique (pI)	Masse molaire (kDa)	Charge (q) ^a à pH 5	Rapport q/MM ^b (g·mol) ⁻¹
α -lac	4,92	16,2	+0,9	$+0,56 \times 10^{-4}$
BSA	5,82	69,3	+23,4	$+3,4 \times 10^{-4}$
β -lact	5,4	18,4	+0,2	$+0,11 \times 10^{-4}$
CA	6,41	29,1	+13,7	$+4,7 \times 10^{-4}$

^a Données tirées de la base de donnée de «Universal Protein Resource (Uniprot)» [45]. Les séparations en CE ont été effectuées dans un tampon à pH 5.

^b Un exemple de calcul est présenté à l'annexe 1.

Le tableau 1 soulève deux points soit que les masses molaires varient de 16 à 69 kDa et que les valeurs de pI sont très similaires. La proximité des valeurs de pI peut devenir un défi à relever puisque cela peut se traduire par des charges similaires. En fait, le temps de migration des protéines est défini par leurs rapports de charge sur rayon (q/r), cependant le rayon est difficile à connaître. Alors, pour avoir une idée de l'ordre d'élution des protéines, il est plus facile de relier la masse molaire au rayon et c'est ce qui est illustré au tableau 1. La charge d'un polypeptide dépend du nombre de groupements ionisés à un pH donné selon le pKa des acides aminés ionisables. Ceci se révèle assez complexe en le calculant manuellement dû aux nombreux acides aminés dans les protéines, donc le logiciel *PROTEIN CALCULATOR v3.3* [46] disponible sur internet était utilisé (voir annexe 1). Les charges calculées pour un pH de 5 sont montrées dans le tableau 1. Cela se révèle être avantageux puisque cela implique un temps d'analyse court. En effet, des rapports de q/MM rapprochés indique que les cations seront observés à des temps de migration proches, contrairement au cas où les rapports seraient négatifs, positif et avec de grands écarts de valeurs. Cependant, il ne s'agit que d'une estimation de l'ordre espéré puisque le rayon n'est pas pris en compte.

Cette estimation permet de donner l'ordre « théorique » suivant dans une analyse par FSCE dans un capillaire nu (sans revêtement) : CA, BSA, α -lac et β -lact. Dans le cas présent, l'application du revêtement de capillaire de bromure de *N,N*-didodécyl-*N,N*-diméthylammonium (DDAB) inverse la direction du mouvement entraînée par l'électro-osmose donc l'ordre devrait être inversée, donc : β -lact, α -lac, BSA puis CA.

1.4.2. Choix du revêtement

Il était difficile de faire un choix de revêtement puisqu'il existe plusieurs types de méthodes et stratégies pour diminuer l'adsorption des protéines sur la paroi des capillaires en silice fondue (voir section 1.3.1). En fait, de nombreuses stratégies sont répertoriés dans divers recueils dédiés à la séparation de protéines par CE [35-39]. Parmi ces stratégies, il y a l'application de revêtement lié de façon non covalente. Dans ce cas, il s'agit d'un revêtement semi-permanent qui n'est pas présent dans le BGE. Ce fait est

important pour les analyses d'échantillons issues d'une collecte de fraction. Lors de l'analyse des collectes, la présence des composants du revêtement dans les fractions pourrait compliquer la matrice durant la digestion enzymatique ou même supprimer le signal de l'analyte dans des méthodes comme la MS. Donc, il est important de diminuer la quantité de composés de revêtement présente lors de la récupération d'échantillon. Un revêtement semi-permanent à l'avantage principal d'être simple à appliquer avec l'appareillage disponible puisqu'il ne nécessite pas de modification chimique préalable de la paroi du capillaire. En effet, une modification chimique du capillaire requiert plus de temps et de procédures. Aussi, en théorie, un revêtement semi-permanent à l'avantage de pouvoir se retirer complètement si on désire changer les conditions de séparation en CE. Ceci s'avère utile lorsqu'on veut appliquer une stratégie de fractionnement à plusieurs dimensions avec plusieurs tampons comme celle présenté en introduction (figure 4B). En somme, les trois avantages désirés dans le choix du revêtement sont les suivants ; i) l'absence du revêtement dans les fractions collectées et donc dans le BGE, ii) l'application réversible et iii) l'application simple de ce revêtement.

Ces trois avantages se retrouvent dans les revêtements à base de surfactant cationique utilisés par le groupe de Lucy [47]. Par contre, même si le surfactant composant le revêtement ne se retrouve pas dans le tampon de séparation son caractère semi-permanent pourrait impliquer une présence de cette molécule lors de la collecte des fractions. Il serait donc intéressant d'étudier sa présence lors de la collecte. Il est important de mentionner que l'utilisation de ce revêtement inverse la direction du EOF et ceci est à considérer. Dans leur article, le groupe de Lucy [47] présente les études portant sur le revêtement composé du surfactant bromure de *N,N* didodécyl-*N,N*-diméthylammonium (DDAB) et du bromure de dioctadecyldiméthylammonium (DODAB) montrés à la figure 9. L'application de ceux-ci consiste à injecter une solution de surfactant d'une concentration donnée avant la séparation des protéines sans implication de réactions chimiques.

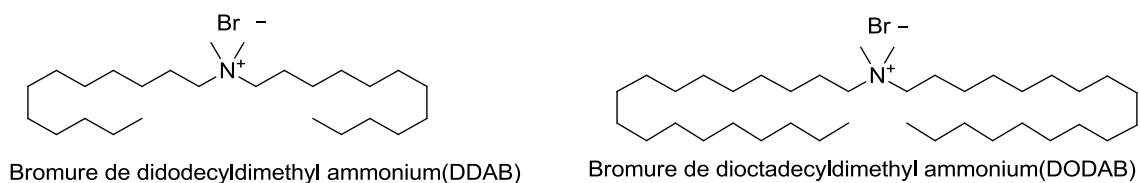


Figure 9. Structure simplifié du DDAB et du DODAB.

1.4.2.1. Mode de fonctionnement du revêtement composé des surfactants cationiques DDAB et DODAB

Les surfactants comme le DDAB et le DODAB (figure 9) ne sont pas du même type que ceux qui se retrouvent dans les études bioanalytiques comme le SDS. Selon Harris [34], un surfactant est « une molécule qui possède une tête polaire (ionique ou non) et une queue hydrophobe ». Dans le cas du DDAB, le revêtement utilisé dans les études présentées, le côté hydrophobe fait allusion aux deux queues composées de deux groupements didodécyl et la section polaire est composée de la tête d'ammonium tel que schématisé à la figure 9. Dans son livre, Harris [34] mentionne que lorsque les surfactants sont placés, comme le SDS, à des concentrations plus grande que la concentration critique micellaire (CMC), en solution aqueuse, ils ont tendance à former des micelles. Donc, les interactions hydrophobes sont confinées à l'intérieur de la micelle comme illustré à la figure 10 A.

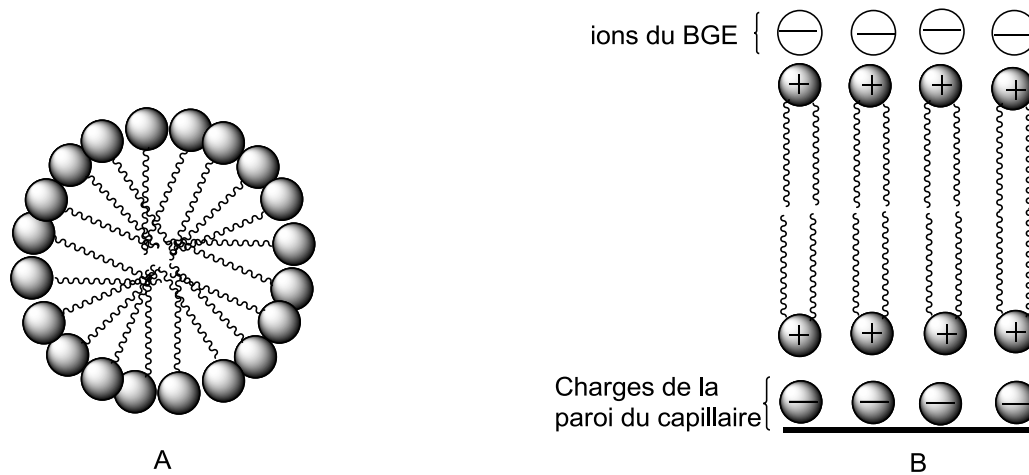


Figure 10. A) Coupe d'une micelle formée en solution aqueuse par des molécules comme le SDS. B) Bicouche formé lorsqu'une surface chargée est mise en contact avec à une solution contenant des surfactants comme le DDAB. Dans cette étude, il s'agit du capillaire qui possède des groupements silanols chargés.

Les micelles sont donc des sphères qui se forment en milieux aqueux dont l'intérieur est hydrophobe (figure 10A). Puis, lorsque la concentration est plus grande que la concentration vésiculaire critique (CVC), des vésicules sont formées. Les vésicules sont décrites comme une sphère ou d'autres formes dont l'intérieur est une ou plusieurs micelles inversées (*i.e.* une micelle dont l'intérieur est hydrophile). Cependant, les surfactants à deux queues, comme le DDAB, en solution aqueuse ne passent pas par une structure micellaire. En fait, ils forment des vésicules spontanément [48], donc lorsque la concentration en DDAB est assez grande pour former des structures, qui vise à confiner des interactions hydrophobiques, il forment des vésicules.

Dans un capillaire de silanols ionisés, les surfactants ne forment pas de vésicules, mais plutôt une bicouche lipidique comme illustré à la figure 10B. En fait, les têtes cationiques du DDAB adhèrent à la surface composée des anions de silanols (si $\text{pH} > 2$) et les queues hydrophobes sont confinées à l'intérieur de la bicouche. Des études faites par Baryla *et al* [49] en microscopie à force atomique (AFM) révèlent que la topographie d'un échantillon de silice fondue est uniforme ce qui suggère la formation de ces bicouches à la paroi du capillaire et non pas de vésicules.

Les surfactants sont utilisés de diverses façon en CE, dans ce cas-ci, ils possèdent la fonction de diminuer l'absorption des protéines sur le capillaire en empêchant les interactions entre les protéines et les groupements silanols de ce dernier. De plus, le revêtement composé de DDAB a pour effet d'inverser la direction de l'EOF et donc la direction résultante de la migration des molécules par rapport à la CE en solution libre. Selon Hjerten *et al.* [50], Tsuda fut le premier à rapporter l'inversement de l'EOF et c'est ce qui se produit dans ce cas-ci. Puisque les silanols sont maintenant masqués par la bicouche de DDAB, les ions positifs du tampon ne peuvent pas interagir avec les silanols. Donc, les ions négatifs du tampon viennent former une couche d'ions pour neutraliser la charge des têtes polaires du surfactant. Ceci cause une séparation de charge entre les charges positives des groupements polaire du DDAB et les anions du BGE et forment une nouvelle double couche électrique (figure 10B). En ce qui concerne la direction de la vitesse électrophorétique (équation (2)), elle devrait rester comme en FSCE. Cependant, la direction de la vitesse apparente pourrait être influencée par l'attraction des analytes anioniques sur la paroi du capillaire. Puisque l'EOF est maintenant dirigé vers l'anode, les anions devraient être les premiers à être détectés sauf s'ils sont fortement attirés par les cations de la paroi traitée. Pour ce qui est de l'ordre de sortie des analytes selon la taille, il restera le même, c'est-à-dire que les petites molécules négatives seront les premières à être détectés suivi des grandes molécules négative et des molécules neutres. Cet ordre peut être altéré puisque la paroi est maintenant fortement positive et que les molécules comme les protéines pourraient adhérer à la paroi ce qui causerait un temps de migration observé plus grand. Les cations devraient être détectés en commençant par les plus gros.

Pour obtenir un système de caractérisation de mélange protéique comme celui proposé à la figure 4, le système de fractionnement de ce mélange doit fournir des fractions avec des masses de protéines suffisantes pour effectuer la cartographie peptidique et protéique de ce mélange. Les efforts pour obtenir un système reproductible sont importants puisque de multiples injections sont nécessaires. En connaissant la possibilité d'adsorption des protéines sur la paroi d'un capillaire non traités et son effet sur la répétabilité du temps de migration de ces macromolécules, il est essentiel d'explorer des techniques comme le revêtement dynamique du capillaire par le DDAB.

Donc, ce mémoire décrit en premier lieu les efforts pour obtenir des séparations reproductibles lorsque la paroi du capillaire est traitée avec le DDAB. Ceci est suivi par la collecte de fraction de 4 protéines.

2. Partie expérimentale

2.1. Produits chimiques

L'anhydrase carbonique (CA), l'albumine du sérum de bovin (BSA), la β -lactoglobuline (β -lac), l'albumine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (BSA FITC), la L-arginine (R), la L-acide glutamique (E), le glutaraldéhyde (GA), le bromure de *N,N*-didodécyl-*N,N*-diméthylammonium (DDAB), la chymotrypsine (CT) et le phosphate de sodium monobasique et monohydrate provenaient de chez Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, États-Unis). L' α -lactalbumine (α -lac) et le l'oxyde de mésityle provenaient t de chez Fluka (Oakville, ON, Canada). L'hydroxyde de sodium, le phosphate de sodium dibasique anhydre proviennent de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Le méthanol provenait de chez BDH (West Chester, PA, États-Unis). L'acide chlorhydrique provenait de chez EMD Millipore (Gibbstown, NJ, États-Unis). Le chlorure de sodium, la glycine et l'acide acétique provenaient de chez Anachemia (Montréal, QC, Canada). L'acétate de lithium dihydraté provenait de chez Acros Organics (Geel, Belgique). L'eau distillée utilisée pour préparer toutes les solutions était purifiée par filtration et déionisation avec un système multi-cartouche de marque Millipore (Milford, MA, États-Unis).

2.2. Méthodes analytiques

2.2.1. Électrophorèse capillaire

Le système CE, muni des détecteurs PDA, UV et LIF, utilisé lors des études était le P/ACETM MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, États-Unis). Le système était piloté par le logiciel « 32 Karat version 7.0 » de Beckman Coulter. Les capillaires utilisés provenaient de chez Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, États-Unis). Les capillaires avaient un diamètre interne de 75 μ m avec des longueurs totales (L_T) et des longueurs au détecteur (L_D) précisées dans les résultats. Pour toutes les méthodes qui requéraient une application de voltage, il est important de noter qu'une rampe de 0,17 min (10,2 s) était nécessaire pour atteindre le voltage voulu. Toutes les injections d'échantillon suivaient la procédure suivante : injection d'échantillon par pression

hydrodynamique de 0,5 psi pendant 5 s suivi d'une injection de BGE par pression hydrodynamique de 0,5 psi pendant 5 s. Les lavages/rinçage étaient toujours réalisés à 20 psi. Les solutions tampons et les solutions de DDAB étaient filtrées en utilisant des filtres de Téflon ayant une porosité 0,2 μm (Chromatographic Specialties Inc., Brockville, ON). Les détecteurs utilisés étaient le PDA et LIF. Pour la détection en fluorescence, la longueur d'onde d'excitation était de 488 nm et celle d'émission était de 520 nm.

2.2.1.1. Préparations des BGE

Les BGE utilisés dans les séparations étaient les tampons suivants : acétate de lithium 5 mM à pH 5, acétate de lithium 50 mM à pH 5, et phosphate de sodium 50 mM à pH 6,9. Pour préparer ces tampons, les concentrations étaient calculées à l'aide de l'équation de Henderson–Hasselbalch et les pH étaient vérifiés au moyen d'un pH mètre. Lorsque l'ajustement des pH était nécessaire, une solution d'acide ou de base conjuguée était ajoutée.

2.2.1.2. Mélange de solubilisation de protéine

Pour augmenter la solubilité des protéines dans le mélange standard, un mélange de solubilisation était utilisé. Ce mélange était composé d'acide glutamique et d'arginine à une concentration de 50 mM chacun. Ensuite, les protéines étaient dissoutes dans ce mélange pour donner les concentrations indiquées dans la présentation des résultats.

2.2.1.3. Conditionnement d'un capillaire neuf

Le conditionnement d'un capillaire neuf consistait en des lavages successifs avec les solutions suivantes : méthanol pendant 3 min, eau déionisée pendant 2 min, NaOH 1 M pendant 2 min, eau purifiée pendant 2 min et BGE pendant 10 min. Ensuite, une application de voltage pendant 5 min à 15 kV était effectuée. Ce conditionnement était effectué avant l'utilisation d'un revêtement ou non.

2.2.1.4. Séparation par CE sans revêtement du capillaire

Avant l'injection d'échantillon, le capillaire était lavé avec une solution de HCl (0,1M) pendant 3 min, puis avec une solution de BGE pendant 3 min. L'injection de l'échantillon était faite comme décrite dans la section 2.2.1 et ensuite le potentiel était appliqué. Le voltage appliqué est précisé dans les résultats. Après la séparation, l'étape de post-conditionnement consistait à laver le capillaire avec du NaOH 1 M pendant 1 min, de l'eau déionisée pendant 1 min et avec du HCl 1 M pendant 2 min.

2.2.1.5. Séparation par CE utilisant le DDAB comme revêtement du capillaire

Préparation du revêtement DDAB

Le DDAB était d'abord dissout dans l'eau ou dans le BGE pour obtenir une solution de 1 mM. Cependant, une solution claire et homogène n'était pas obtenue automatiquement, donc la solution était soumise à deux cycles qui se décrivent comme suit : agitation par bain ultrason à 40°C pendant 30 min et 15 min d'agitation manuel (*i.e.* inversion du tube) pendant 15 min à température de la pièce (22°C).

Application du revêtement DDAB

Avant de commencer les injections du mélange de protéines, le revêtement DDAB était appliqué. Pour cela, le capillaire était lavé avec une solution NaOH 1 M pendant 20 min, avec de l'eau purifiée pendant 5 min, avec une solution de DDAB de 1 mM, dissout dans l'eau ou dans le BGE, pendant 5 min et finalement avec du BGE pendant 1 min. Cette procédure était appliquée au début d'une séquence d'injection.

2.2.1.6. Méthode de séparations par CE sans régénération (*i.e.*, rafraîchissement) et avec régénération du revêtement

La méthode avec et sans régénération diffère par la méthode de pré-conditionnement du capillaire. Plus précisément, pour une méthode sans régénération du

revêtement DDAB, la méthode consistait à injecter les échantillons sans un lavage supplémentaire entre chaque injection. Tandis que pour régénérer le revêtement, il fallait rincer le capillaire avec la solution de DDAB (1 mM) pendant 2 min et avec du BGE pendant 1 min. Ensuite, l'injection était faite comme décrite dans la section 2.2.1.

2.2.1.7. Méthodes de collecte de fractions en CE

La collecte de fractions, en CE-UV ou en CE-LIF, consistait à diviser le mélange en plusieurs fractions en arrêtant le voltage entre chaque fraction. Les fractions recueillies étaient le produit de l'éluion dû à l'application de potentiel électrique, contrairement à des méthodes qui nécessitent l'application de pression hydrodynamique. Pour obtenir plusieurs fractions, 5 réservoirs de 100 μ L de BGE étaient utilisés à la sortie du capillaire. Puisque la séparation se faisait pendant 30 min, il fallait arrêter le potentiel électrique après chaque 6 min d'application de potentiel pour obtenir les 5 fractions. Aussi, 12 s étaient nécessaires pour passer d'une fraction à l'autre (*i.e.* du réservoir 1 au réservoir 2, etc.). La première fraction correspondait donc aux 6 premières minutes d'applications de potentiel, la deuxième correspondait aux 6 minutes d'application de potentiel électrique suivantes et ainsi de suite. L'échantillon était injecté suivant la procédure décrite dans la section 2.2.1. Puis, le capillaire était placé dans deux réservoirs de BGE. Le réservoir à l'entrée du capillaire demeurait le même durant toute la collecte contrairement au réservoir placée après le détecteur qui était changée pour chaque fraction (*i.e.* 1 réservoir de 1000 μ L à l'entrée du capillaire et 5 réservoirs de 100 μ L à la sortie du capillaire).

2.2.2. Méthodes d'analyses par spectrométrie de masse

Les fractions F2 et F3 collectées (volume de 100 μ L) par CE-UV étaient soumises au Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal au Département de chimie. Ces fractions étaient suspectées de contenir des analytes. Les informations fournis au laboratoire de MS comportaient l'identité attendues des espèces présentes ainsi que leurs concentrations respectives. L'instrument utilisé était un appareil de HPLC couplée à un MS avec un analyseur en masse par temps de vol (LC-TOF)

d'Agilent Technologies. La source d'ionisation était en ESI positif. La colonne utilisée était une Poroshell 300SB-C8 (phase stationnaire hydrophobe provenant de chez Agilent Technologies), avec des dimensions de $2,1 \times 75$ mm et des particules de 5 μ m. Les éluants étaient l'eau et l'acétonitrile contenant chacun 0.1% d'acide formique. Le gradient d'éluion passait de 20% à 90% d'acétonitrile en 7 min suivi d'un plateau de 3 min à 90%. Le débit de la phase mobile était de 0.4 mL/min.

2.2.3. Digestions par la chymotrypsine

La digestion enzymatique (protéolyse de protéines) comportait deux formats d'enzymes, soit la chymotrypsine immobilisée avec le glutaraldéhyde (CT-GA) et la chymotrypsine (CT) libre en solution. Les deux méthodes étaient celles utilisés par Ghafourifar [20] dans notre laboratoire et sont décrites brièvement dans les sections suivantes. Après la digestion enzymatique, la cartographie peptidique des digestats étaient faites par CE-LIF.

2.2.3.1. Digestion par la chymotrypsine libre

La digestion en solution libre consistait à ajouter 15 μ L d'échantillon de protéine collectée à 15 μ L d'une solution de chymotrypsine d'une concentration de 1,3 mM. Cette solution était ensuite incubée pendant 4 h à 37°C avec agitation manuelle à chaque 30 min. Le rapport massique enzyme : substrat était de 1:1. La solution de digestion était conservée à -20°C avant l'analyse.

2.2.3.2. Digestion de protéine par chymotrypsine immobilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde

Immobilisation de CT par GA

Une solution de 0,15 mM de chymotrypsine était préparée dans un tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 6,4, puis 80 μ L de solution de glutaraldéhyde (2,5 % v/v dans l'eau) étaient ajouté goutte à goutte. La réaction était laissée pendant 2 h à 22°C sans agitation pour permettre la formation du solide. La solution était ensuite

centrifugée à 3000 rpm pendant 2 min et le surnageant était décanté. Les particules obtenues étaient lavées pour retirer l'excédent de GA et de CT qui n'avaient pas réagi. Le lavage se faisait avec les solutions suivantes : 3×200 µL de tampon phosphate de sodium, 3×200 µL de NaCl (500 mM) suivit de 200 µL de tampon. Une solution de 200 µL glycine (200 mM dissout dans le tampon phosphate) était ajoutée pour réagir avec l'excédent de GA pour 3 h à température pièce. Le produit final suivait un autre processus de lavage avec les solutions suivantes : 3×200 µL de tampon phosphate et 3×200 µL d'eau purifiée. Lorsque nécessaire, les particules obtenues étaient entreposées à -20°C dans 200 µL d'eau purifiée.

Digestion par l'enzyme immobilisée

Une solution de 81 µL de substrat était ajoutée à la solution contenant les particules de CT-GA dont le ratio substrat : enzyme est indiqué lors des digestions dans les résultats. La solution était ensuite incubée pendant 4 h à 37°C avec agitation manuelle à chaque 30 min. Un aliquot d'environ 100 µL de surnageant était prélevé et conservé à -20°C.

Cartographie peptidique des digestats

Les produits de la protéolyse par CT immobilisée ou CT libre en solution étaient soumis à des analyses par CE-LIF. Les aliquots de produits de digestions étaient laissés à 22°C pour obtenir une solution claire qu'on pouvait décanter. Les paramètres de la séparation par CE-LIF sont indiqués dans la section résultat.

3. Résultats et discussion

Comme décrit dans l'introduction, le but à long-terme de ce projet est de développer un système de fractionnement de mélange protéique à plusieurs dimensions en parallèle par CE. Pour atteindre cet objectif, il faut que les séparations en CE soit répétables puisqu'il est nécessaire de procéder à de multiples injections pour accumuler suffisamment de masse de protéines lors de la collecte de fractions. Ceci fut une étape exigeante, donc la majorité de ce chapitre porte sur la façon dont la répétabilité de séparation lors de l'utilisation du DDAB comme revêtement fut atteinte.

3.1. Choix des dimensions du capillaire

Puisque les protéines présentes dans le mélange synthétique ont été sélectionnées dans la section 1.4.1, il s'agit de choisir les dimensions du capillaire à utiliser. Les dimensions du capillaire influencent la quantité de matière disponible à la sortie du capillaire, la résolution entre les pics lors des séparations en CE ainsi que le temps d'analyse total.

Premièrement, la quantité de matière est un paramètre crucial dans ce cas puisqu'il s'agit de développer un procédé préparatif par CE dont le résultat de la séparation (*i.e.* les fractions collectées) sera analysé par MS et soumis à la cartographie peptidique. Il faut donc rendre disponible le plus d'analytes possible (le plus de masse de protéine) lors de la collecte des fractions. La CE a pour avantage, dans le cadre des séparations analytiques à haute résolution, de ne pas utiliser beaucoup d'échantillon (de l'ordre de 10 nL) dû au petit diamètre du capillaire qui peut aller de 2 à 100 microns. Les capillaires les plus couramment utilisés ont un diamètre interne de 50 et 75 microns. Par contre, pour une méthode semi-préparatrice ces petits volumes injectés sont un grand désavantage. Le tableau 2 montre la dépendance du volume d'échantillon injecté en fonction du diamètre interne du capillaire.

Tableau 2. Facteur de dilution en fonction du diamètre interne du capillaire de L_T de 60 cm (L_D de 50 cm) si l'injection est de 5 s \times 0,5 psi et la concentration de l'analyte est de 1 mg/mL.

Diamètre du capillaire (μm)	Volume du capillaire (nL)	Volume injecté (nL)	Masse injectée (ng)	Masse après 10 injections (ng)	Concentration à la sortie* (mg/mL)	Facteur de dilution
50	1180	4,9	4,9	49	$3,3 \times 10^{-05}$	3×10^5
75	2650	25	25	250	17×10^{-04}	$0,6 \times 10^5$

*volume du réservoir de collecte de 1,5 mL. Voir annexe 2 pour exemple de calcul.

Le tableau 2 montre une simulation calculée par le logiciel *CE expert* (Beckman-Coulter, Inc.). La durée et la pression d'injection, communément utilisées pour une séparation analytique, sont utilisées pour calculer les valeurs dans ce tableau. Évidemment, en doublant le temps d'injection ou la pression lors de l'injection, la masse injectée doublerait aussi. Cependant, des injections plus importantes causeraient un élargissement des pics qui se traduirait par une diminution de l'efficacité de séparation (N) et donc une détérioration de la résolution (équation 6 et 7). Un autre point important que révèle ce calcul est qu'une augmentation du diamètre interne du capillaire de 25 μm permet d'obtenir une concentration 5 fois plus élevée comme le montre le facteur de dilution. Il est important de mentionner que le volume du réservoir à la sortie peut être diminué et cette option était étudiée.

D'un autre côté, une augmentation du rayon interne (r en m) du capillaire mène à l'augmentation de l'effet Joule. Cet effet est observable suivant l'équation (8) :

$$\Delta T = (0.239Q/4k)r^2 \quad (8)$$

où ΔT est la variation de température ($^{\circ}\text{C}$) entre le centre et la paroi du capillaire, Q représente la puissance en watts/m^3 et k est la conductivité thermique [24]. Ceci aura pour effet de diminuer l'efficacité de la séparation et les pics seront moins résolus. En somme,

un compromis était nécessaire entre la quantité de matière disponible et la résolution de la séparation. Il est possible de travailler avec des capillaires de diamètre interne de 200 μm , mais pour maintenir un niveau de résolution élevé et pour collecter suffisamment de protéines un diamètre de 75 μm a été choisi.

La longueur du capillaire peut aussi affecter la résolution comme démontre l'équation (6) dans la section 1.2.4. Cependant, cette contribution n'est pas étudiée dans ce mémoire.

3.2. Étude du revêtement DDAB sans régénération

Le revêtement semi-permanent formé par le surfactant DDAB avait été étudié par plusieurs auteurs dont Gulcev *et al.* [47] et Mohabbati *et al.* [50]. La solution de DDAB a été préparée suivant les procédures de Gulcev *et al.* [47]. La procédure d'application du revêtement a été celui de Mohabbati *et al.* [50] à l'exception du BGE qui a été remplacé par l'acétate de lithium utilisé par Gulcev *et al.* [47]. Les tampons composés d'acétate de lithium montrent une conductivité plus faible que les tampons de phosphates ou d'acétates de sodium [51]. Ceci diminue donc l'effet Joule (équation (8)) et a pour but d'améliorer l'efficacité de séparation en CE.

Le revêtement DDAB est de type semi-permanent, c'est-à-dire qu'il ne se retrouve pas dans le BGE. Puisque l'idée de ne pas avoir à régénérer le revêtement (*i.e.* rinçage du capillaire avec la solution de DDAB entre chaque injection) semblait intéressante, il a été le point de départ de l'étude du système. La stabilité du EOF en présence du revêtement était étudiée en fonction de la température du capillaire, la température d'entreposage du capillaire, le solvant du DDAB ainsi que la concentration du tampon. Pour mesurer la stabilité du EOF en présence du revêtement, la répétabilité de l'analyse d'une molécule neutre était utilisée. Ceci permettait de suivre l'évolution du revêtement, puisque si la distribution de surfactant sur la paroi n'est pas reproductible ou si le revêtement tend à se détacher de la paroi du capillaire, les séparations n'auront pas des temps de migration reproductibles. Il faut se souvenir que la distribution de la double couche du surfactant sur la paroi du capillaire aura une influence directe sur le EOF. La

molécule neutre utilisée pour ces études était l'oxyde de mésityle (MO) montré à la figure 11 dont le maximum d'absorbance se trouve à une longueur d'onde de 240 nm [50].

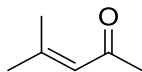


Figure 11. Structure de l'oxyde mésityle, MO (4-méthyl-3-pentan-2-one), utilisé comme marqueur du flux électro-osmotique.

Le MO était injecté pour vérifier que le revêtement était bien appliqué. Sur la figure 12 trois différentes expériences sont illustrées : a) analyse du MO, sans application de revêtement, avec un potentiel positif (10 kV), b) analyse de MO avec un capillaire enduit de revêtement de DDAB avec un potentiel positif (10 kV) et c) analyse de MO avec un capillaire enduit de revêtement de DDAB avec un potentiel négatif (10 kV).

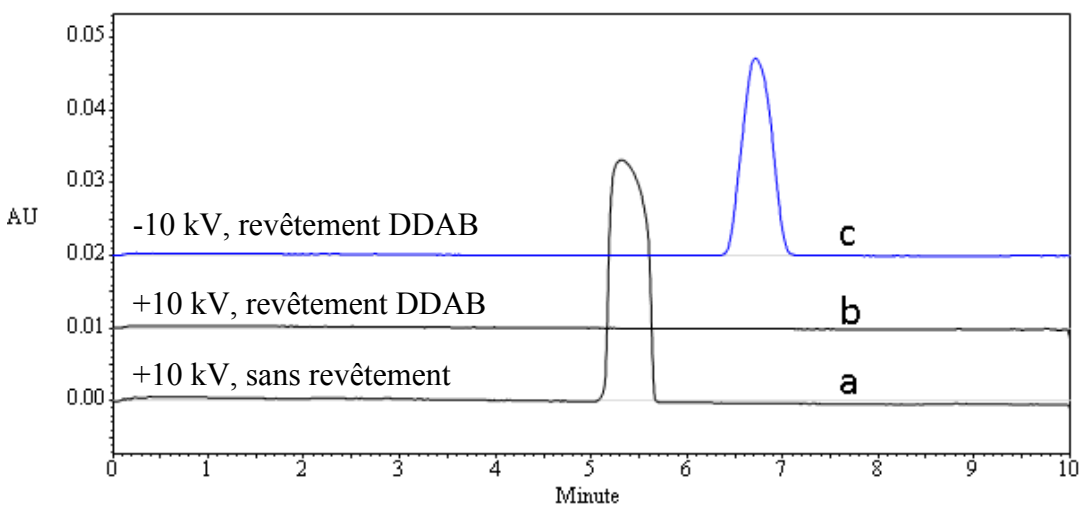


Figure 12. Effet du revêtement DDAB sur le EOF. Injection du marqueur neutre, MO (1 mM) avec un BGE composé d'acétate de lithium, 50 mM, pH 5. Séparation dans un capillaire de diamètre interne de 75 μm , $L_T=60$ cm ($L_d=50$ cm) et la température du capillaire est de 25°C sous les conditions suivantes : a) sans revêtement à +10 kV, en b) avec le revêtement DDAB (1 mM dans l'eau) à +10 kV et en c) avec le revêtement DDAB (1 mM dans l'eau) à -10 kV.

Les électrophérogrammes sur la figure 12 montrent que l'EOF est inversé lorsque le revêtement DDAB est appliqué. En effet, le MO est détecté à 5,4 min (fig. 12a) lorsque le potentiel appliqué est positif et que le revêtement n'est pas appliqué. Lorsque le revêtement est appliqué il est détecté à 6,9 min si le potentiel de séparation est inversé (fig. 12 c) et il ne l'est pas si le potentiel est positif. Une fois que l'application du revêtement est vérifiée à -10 kV, l'étude de répétabilité des injections de MO était évaluée en fonction de plusieurs paramètres : le solvant de la solution de DDAB (eau ou BGE), la température d'entreposage du DDAB, la concentration du BGE utilisé pour les séparations et la température du capillaire durant les séparations. Pour cela, 4 injections de MO (1 mM) ont été analysées sans méthode de préconditionnement entre chaque injection (*i.e.*, sans régénération du revêtement entre chaque analyse). Des exemples d'électrophérogrammes obtenus sont affichés à la figure 13 où on constate un manque de reproductibilité en termes de t_m et en aire du pic.

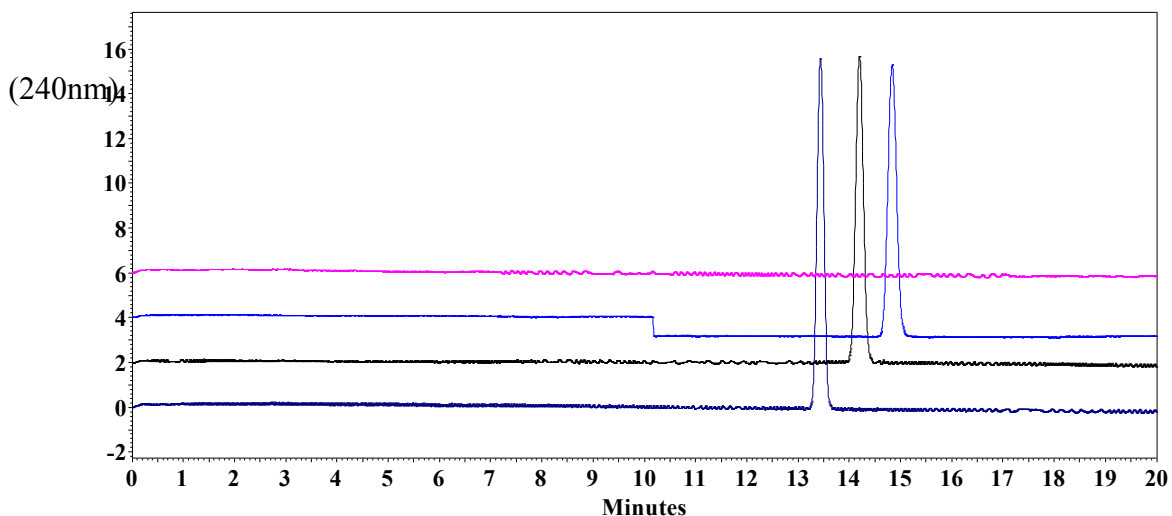


Figure 13. Électrophérogrammes de 4 injections consécutives de MO (1 mM). Le DDAB (1 mM) est dissout dans le tampon de séparation. Séparation dans un capillaire de diamètre interne de 75 μm , $L_T=60$ cm ($L_d=50$ cm). Conditions de séparations : tampon de l'acétate de lithium, 50 mM, pH 5; la température d'entreposage de la solution de DDAB, 25°C; température du capillaire, 15°C; volume injecté, 25 nL et la $\lambda=240$ nm.

Les valeurs d'aire du pic et de t_m du MO démontrant l'effet de ces 4 paramètres (solvant du DDAB, concentration du tampon, température du capillaire et température d'entreposage du DDAB) sur ces valeurs se trouvent dans les tableaux A-14 et A-15 dans l'annexe 3. Comme illustré à la figure 13, la différence des trois temps de migrations du MO (une injection ne montre pas de pic pour le MO) se traduit par une détérioration du revêtement du capillaire. Parmi les 16 séries de valeurs obtenues (4 combinaisons de 4 paramètres expérimentales), seulement 6 séries permettent d'observer le pic de MO lors de 3 injections ou plus. C'est pour cette raison que seulement 6 séries de valeurs sont utilisées pour tenter d'extraire les tendances observées sur l'effet de chaque paramètre modifié, les valeurs brutes sont brièvement présentées en annexe 3. Les 4 paramètres sont donc comparées avec les données utilisables, c'est-à-dire celles qui permettent d'observer le MO dans au moins 3 injections consécutives. Les données sont présentées dans les prochaines sections sous forme de graphiques qui contiennent les séries qui permettent d'extraire la tendance de chaque paramètre. Chaque point représente le t_m du MO après chaque injection sans régénération du revêtement DDAB. La tendance attendue serait donc une ligne droite qui montre une légère variabilité dû à la variabilité expérimentale.

3.2.1 Effet de la température du capillaire sur la répétabilité du EOF

Les analyses de protéines par CE rapportées dans la littérature, tel que la α -lactoglobuline [52], ont démontrées que la température du capillaire influence la vitesse de migration des molécules et parfois la sélectivité, mais ces deux critères ne sont pas à considérer pour l'instant. Cependant, l'idée que l'abaissement de température viendrait diminuer la désorption du revêtement et donc augmenter la stabilité du revêtement était intéressante. Due aux limitations de l'appareil, les températures du capillaire étudié étaient de 15°C et de 25°C, et ce pour deux différentes températures d'entreposage du DDAB : 25°C et 4°C (figure 14).

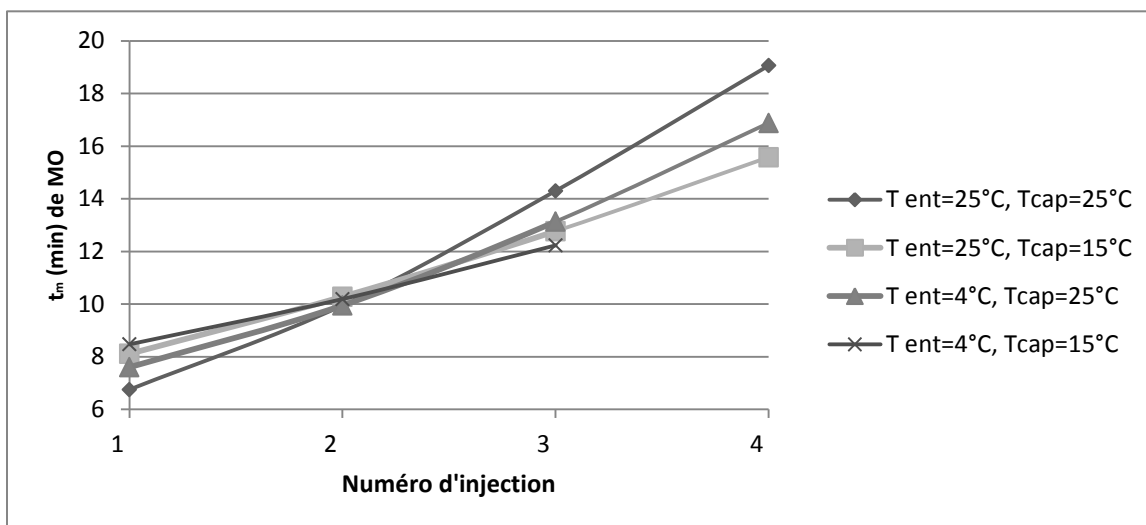


Figure 14. Courbes montrant les temps de migrations du MO (le marquer neutre) en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de la température du capillaire (T_{cap}) et de la température d'entreposage du DDAB (T_{ent}) sur la répétabilité du EOF. Pour ces séries de données, le solvant du DDAB 1 mM est l'eau et la concentration du tampon d'acétate de lithium à pH 5 est de 5 mM.

En observant les premières injections de MO des deux paires de données sur la figure 14, il est possible de noter que l'EOF est plus petit lorsque la température du capillaire est de 15°C puisque le t_m du MO est plus grand. Ceci est attendu comme décrit précédemment. Cependant, l'augmentation des temps de migration à chaque injection du MO, d'une injection à l'autre, se traduit par une dégradation du revêtement et donc un EOF instable.

3.2.2. Effet de la température d'entreposage du DDAB sur la répétabilité du EOF

L'entreposage à température de la pièce (25°C) et à température du réfrigérateur (4°C) étaient comparés à l'aide des paires suivantes sur la figure 14. En comparant la 1^{ère} injection de chaque série de données sur la figure 14, il est notable que lorsque la solution est entreposée à température de la pièce, le EOF est plus grand puisque le t_m est plus petit. En FSCE, plus l'ionisation des silanols (plus le pH est grand) est importante plus le EOF sera important. Ce qui reviendrait à dire que plus il y a de charges négatives sur la paroi

du capillaire plus le EOF est grand. Ce raisonnement pourrait s'appliquer au revêtement en remplaçant la quantité d'anions silanols du capillaire par la quantité de cations du DDAB. Donc, le fait de conserver la solution de DDAB à température pièce permettrait d'augmenter la charge globale du capillaire en formant une double couche formée par les surfactants plus denses et permettrait, par le fait même, d'augmenter le EOF. Cependant, l'augmentation des temps de migration (figure 14) du MO, d'une injection à l'autre, se traduit par une dégradation du revêtement et donc il s'agit d'un revêtement instable.

3.2.3. Effet du solvant du DDAB sur la répétabilité du EOF

Dans cette sous-section, l'influence du solvant du DDAB sur la répétabilité du EOF est présentée. Le solvant du surfactant était d'intérêt puisqu'il pouvait influencer l'adsorption des cations du DDAB sur la paroi du capillaire comme le montrent Westerlund *et al.* [50]. Ces auteurs démontrent que parfois le cation du solvant du DDAB, présent lors de son application, peut empêcher l'adsorption du surfactant sur la paroi du capillaire en adhérent aux anions de la paroi. L'eau et le BGE (acétate de lithium) ont été comparés comme solvant du DDAB pour évaluer l'effet de la présence du lithium présent dans le BGE sur la stabilité du revêtement comme montré sur la figure 15.

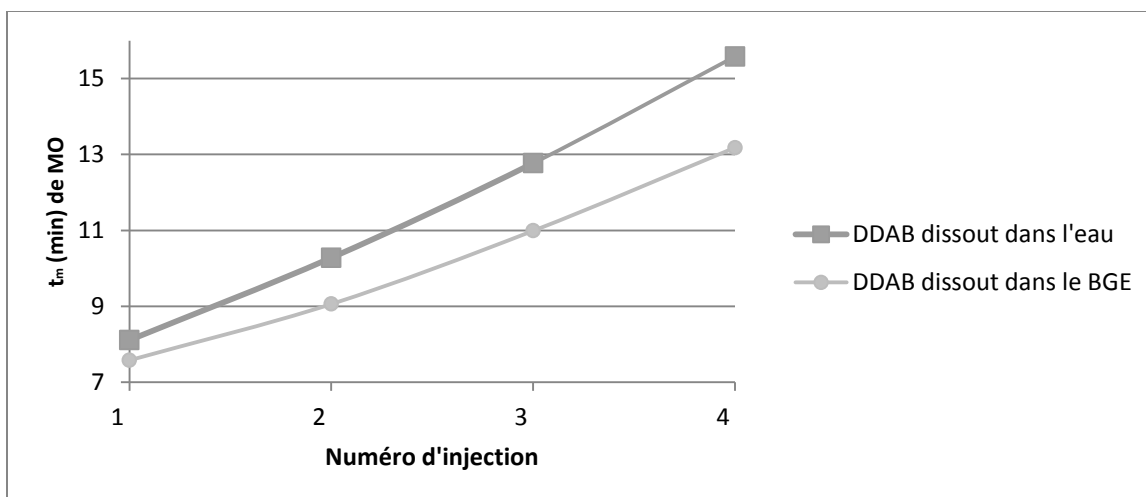


Figure 15. Courbes montrant les temps de migrations du MO en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de du solvant du DDAB sur la répétabilité du EOF. Pour ces séries de données la concentration du tampon d'acétate de lithium à pH 5 est de 5 mM, la température du capillaire est de 15°C et la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C.

Les temps de migration du MO observés à la figure 15 suggèrent que l'application du revêtement est possible lorsque le solvant utilisé est l'eau ou le tampon acétate à 5 mM, mais il n'est pas possible d'observer un EOF constant après plus d'une injection. En effet, les courbes sur la figure 15 montrent une augmentation du EOF après chaque injection malheureusement.

3.2.4. Effet de la concentration du BGE (tampon) sur la répétabilité du EOF

Yassine et Lucy [49] ont démontré que la stabilité du revêtement est améliorée lorsque le CVC diminue. Le CVC est diminué lorsque la force ionique du milieu est augmentée, c'est-à-dire la concentration du BGE. Il est important de mentionner que les termes CVC et CMC sont échangés dans différents articles, puisque comme mentionné précédemment, le DDAB n'a pas d'état micellaire (*i.e.* il forme des vésicules spontanément). Par exemple, Yassine et Lucy [53] notent que le DDAB possède un CVC de 0,014 mM pour un tampon acétate de force ionique à 8 mM (pH à 4) et il est de 0,35 mM [51] dans l'eau. Yassine et Lucy [53] décrivent deux explications sur la stabilité

du revêtement. La première explication implique que la désorption du revêtement du capillaire se produit lorsque la concentration du milieu est en dessous du CVC. Autrement dit, lorsque la concentration du milieu atteint le CVC, l'équilibre entre la désorption et l'adsorption est atteint. Ainsi, lorsque le CVC est petit il faut une concentration moins importante de DDAB pour que le revêtement reste adsorbé sur la paroi du capillaire. La deuxième explication décrit le CVC comme la réciproque de la constante d'équilibre du processus d'agrégation du surfactant sur la paroi du capillaire. En d'autres mots, un CVC plus petit indiquerait une agrégation plus thermodynamiquement stable. Nous avons regardé l'effet de deux concentrations du BGE sur la stabilité du EOF : 5 et 50 mM (figure 16).

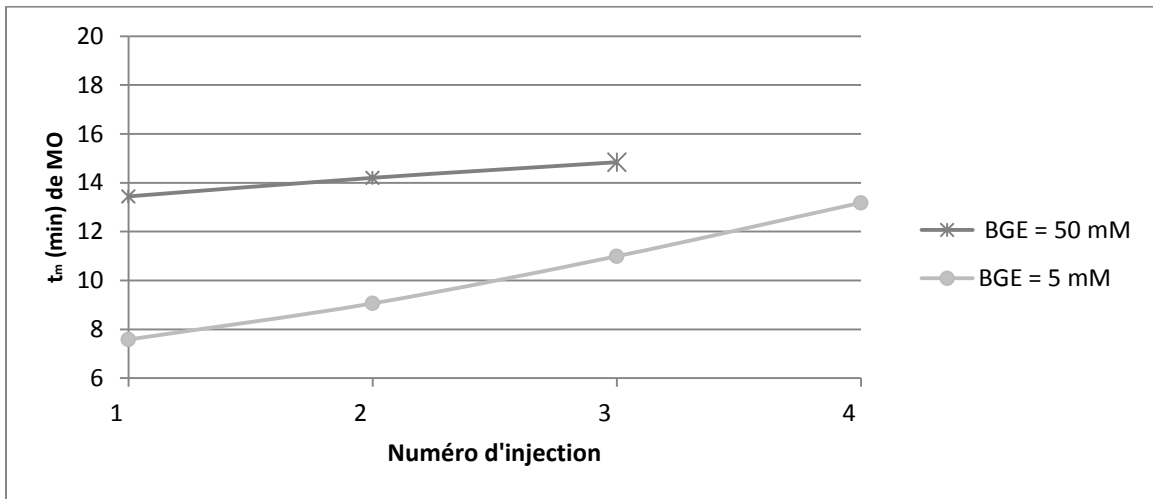


Figure 16. Courbes montrant les temps de migrations du MO en fonction du numéro d'injection aux conditions qui permettent de comparer l'effet de la concentration du BGE, soit 5 ou 50 mM acétate de lithium. Pour ces séries de données, le solvant du DDAB à 1 mM est le BGE lui-même, la température du capillaire est de 15°C et la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C.

L'analyse des courbes de l'utilisation du tampon d'acétate de lithium à 5 mM et à 50 mM (figure 16) relève que le t_m de MO est presque le double lorsque le BGE à 50 mM est utilisé par rapport à 5 mM, donc le EOF est moins important lorsque ce tampon était utilisé. De plus, l'augmentation de temps de migration du MO après chaque injection

indique que le revêtement tend à se désorber. Le résultat de la figure 16 pour le BGE à 50 mM semblait encourageant parce que la stabilité est meilleure, mais à la 4^e injection le MO n'était pas observé montrant que malgré la meilleure reproductibilité entre chaque injection, ces paramètres n'étaient pas aussi fiables qu'on espérait.

Les données dans des figures 14 à 16 démontrent qu'aucune combinaison de conditions étudiées ne menait à un EOF stable (t_m reproductible) sans l'utilisation d'une étape de régénération du revêtement. Il n'est pas possible d'affirmer qu'une combinaison de ces paramètres (*i.e.*, le solvant du DDAB, la concentration du BGE, la température d'entreposage de la solution de DDAB et la température du capillaire) ont permis de laisser de côté la régénération du revêtement entre chaque injection. De plus, il est important de remarquer que 5 des 6 séries de données utilisables sont obtenues en utilisant un tampon acétate avec une concentration de 5 mM comme BGE. En effet, seulement 6 séries de données parmi 16 (voir l'annexe 3) ont permis d'observer le MO après la 3^e injection. Ceci n'est pas attribuable à des erreurs expérimentales, puisque lors de chaque analyse la valeur était considérée acceptable que lorsque le courant était stable. En d'autres termes, toutes les analyses présentées ont été sélectionnées que lorsqu'il était possible d'appliquer un potentiel stable durant le temps d'analyse. Donc, le manque de reproductibilité du t_m de MO est attribuable à la dégradation du revêtement d'une séparation à l'autre. Il a donc été décidé de tenter les régénérations entre chaque injection.

3.3. Études du revêtement de DDAB avec régénération

Suite au manque de reproductibilité du t_m de MO notée lors des tentatives d'analyses sans régénération du revêtement entre chaque injection, l'étude de la régénération était entamée. Pour suivre la stabilité du EOF avec ce revêtement, le MO est injecté suite à la génération du revêtement ainsi qu'après chaque régénération du revêtement comme décrit dans la section 2.2.1f. Dans cette étude, les paramètres suivants avaient été fixés :

- Il a été choisi de conserver la solution de revêtement dans le réfrigérateur à 4°C;
- Le tampon est conservé à 5 mM, un choix fait en vue d'étude en MS. En effet, pour éviter la suppression ionique en ESI-MS dû à la présence de sel, une concentration faible de tampon est préférée pour les analyses en ESI-MS;
- Un pH de 5 est conservé comme lors des analyses précédentes;
- La température du capillaire est conservée à 25°C puisqu'il n'y a pas eu de différence marquée à 15°C ou à 25°C lors des études sans régénération du revêtement.

Le seul paramètre qui a varié était le solvant du surfactant DDAB par rapport aux études sans régénérations (section 3.2). En effet, comme mentionné plus tôt, le fait de générer un revêtement en présence de tampon permettrait d'augmenter la stabilité du revêtement et donc le EOF. Cependant, puisque la concentration du DDAB (1 mM) est plus importante que son CVC (0,35 mM dans l'eau), l'utilisation d'eau est aussi envisageable. De plus, l'utilisation d'eau simplifierait la tâche lors de changement de BGE puisque le même solvant serait utilisé pour le surfactant.

Avec la régénération du revêtement DDAB, le EOF (décrit par le t_m de MO) était très stable par rapport aux études sans régénération présentés à la section 3.2. Le tableau 3 présente les moyennes des t_m de MO observées lors de l'application du revêtement suivies de trois injections de MO, donc de 4 données.

Tableau 3. Répétabilité du temps de migration (n=4) de MO comme mesure de la stabilité du EOF lors de la régénération du DDAB après chaque injection.

Solvant pour DDAB	Entreposage	Temps de migration et aire du pic de MO	Moyenne	Écart-type	% RSD
Tampon ^a	4 jours à 4°C	t _m (min)	7,4	0,14	1,9
		Aire (x100)	222	0,1	0,4
Eau	4 jours à 4°C	t _m (min)	6,9	0,23	3,3
		Aire (x100)	179	1,8	9,8
Eau	17 jours à 4°C	t _m (min)	6,8	0,24	3,5
		Aire (x100)	159	0,9	5,5
Eau	21 jours à 4°C	t _m (min)	11,6	0,2	1,7
		Aire (x100)	1740	2,5	1,5

^a tampon acétate de lithium à 5 mM, pH = 5.

En comparant les données obtenues lors de solubilisation du revêtement de DDAB dans l'eau ou dans le tampon, il n'était pas possible de conclure qu'il y avait un avantage en termes de stabilité. En fait, les précisions des temps de migration varient de 1,7 à 3,8 %, lorsque le solvant utilisé était le tampon ou l'eau. Par contre, la précision de l'aire des pics est très bonne pour le DDAB dissout dans le tampon (0,4 % de RSD), tandis que dans l'eau la valeur de RSD atteint 9,8 % lorsque la solution est entreposée pendant 4 jours à 4°C. Ceci dit, les valeurs d'aire n'étaient pas très fiables puisque les intégrations se faisaient manuellement et qu'on peut obtenir des variations de 6 % à 10 % selon la façon dont les pics sont intégrés. Pour cette raison il n'est pas possible de confirmer la supériorité du solvant en se fiant à ce critère. Puisqu'il n'y a pas d'amélioration notable lors d'utilisation du tampon comme solvant du surfactant, l'eau est préférée. De plus, l'utilisation du même solvant pour différentes conditions viendrait diminuer la variabilité lors de l'application du revêtement DDAB. Aussi, l'utilisation de l'eau comme solvant est envisageable pour un tampon qui ne permettrait pas

normalement l'application du revêtement. Un exemple de cela a été accompli par Werterlund *et al.* [50] en 2008, où ils ont noté que l'application d'un revêtement n'était pas possible avec l'acétate d'ammonium, un tampon organique. L'explication de ce phénomène pourrait être, selon Westerlund, que l'ion ammonium serait en compétition avec les ions du revêtement pour interagir avec les silanols du capillaire. L'utilisation de l'eau comme solvant du DDAB se révélerait utile lors d'utilisation d'un BGE volatil puisque ceci rendrait la technique compatible avec certaines méthodes d'analyse par spectrométrie de masse.

3.3.1. Temps d'entreposage de la solution de DDAB

Le temps d'entreposage de la solution de DDAB (température d'entreposage est de 4°C) est d'intérêt puisqu'il pourrait influencer la stabilité du revêtement. Des études sur le temps d'entreposage ont été faites par le groupe de Gulcev *et al.* [47], mais pour le DODAB (voir figure 9). Ils en sont arrivés à la conclusion que le EOF dans un capillaire contenant ce revêtement pouvait être stable jusqu'à un maximum de 30 jours en régénérant le revêtement quotidiennement avec une solution neuve de surfactant. Les études portées sur le temps d'entreposage ont été effectués différemment dans l'étude présenté dans ce document. Tout d'abord, la solution de DDAB a été conservée pour en évaluer la stabilité et le capillaire a été régénéré à chaque jour avec cette solution et le t_m de MO analysé. C'est donc le temps d'entreposage de la solution qui était évalué et non celui du capillaire. D'après les données présentes sur le tableau 3, après 17 jours le revêtement présentait une reproductibilité pour le EOF (t_m de MO) semblable à celle d'après 4 jours de préparation de la solution. Lors de la 21^e journée la variation du temps de migration était moins grande (1,7 % de RSD), mais les temps de migration passent de 6,8 min à 11,6 min ce qui représente une diminution du EOF de 50 % par rapport à 17 jours d'entreposage. Il en est de même pour les aires des pics qui augmentent par un ordre de grandeur pour la même concentration de 1 mM et ce comportement n'est pas clair. Alors, il a été décidé que la solution ne serait pas entreposée que pour un maximum de 17 jours.

3.4. Mélange de solubilisation des protéines : utile ou entrave?

Afin de développer le système de fractionnement proposé, il était important de collecter des fractions contenant des protéines à des concentrations au moins aussi grandes que la limite de quantification du CE-UV ce qui explique le besoin d'injecter de grandes quantités de protéines. Cette section décrit une approche qui permettrait d'augmenter la solubilité des protéines dans le mélange synthétique de protéines afin d'augmenter la concentration de protéine injectée initialement. Le mélange de solubilisation était une option envisageable puisque selon l'article du groupe de Golovanov [54], il permettait d'augmenter la concentration de protéines en solution jusqu'à un facteur de 8,7 par rapport à une solution tampon. Le mélange de solubilisation est composé d'arginine et d'acide glutamique (concentration de 50 mM chaque) comme suggéré dans la référence [54]. Une évaluation de l'amélioration de la solubilité des protéines a été faite, mais que qualitativement. C'est-à-dire que, plusieurs mélanges de protéines avec des concentrations différentes n'ont pas été utilisés. Une étude planifiée n'a pas été faite puisqu'il fallait tout d'abord évalué si ce mélange n'influençait pas négativement la détection des protéines. Une des inquiétudes était que l'arginine absorbe à 200 nm et que le signal d'arginine pourrait interférer avec le signal des protéines en CE-UV. Pour cette raison un mélange de solubilisation qui ne contenait de protéines fut analysée par CE (figure 17), en premier lieu.

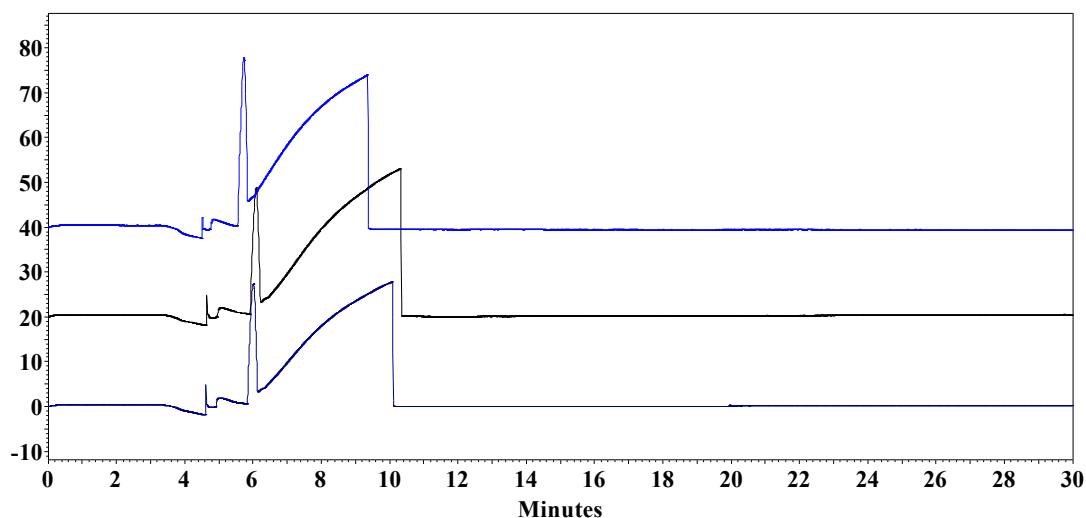


Figure 17. Électrophérogammes du mélange de solubilisation composés de l'acide glutamique (50 mM) et de l'arginine (50 mM). Les trois tracés représentent trois injections du mélange de solubilisation. Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), tampon utilisé est l'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 15°C, le volume de solution injectée est de 25 nL, voltage à -10 kV.

Les électrophérogammes de la figure 17 permettent d'observer plusieurs pics représentant l'arginine et l'acide glutamique présent dans le mélange de solubilisation lorsque la séparation est suivie à 200 nm. La plupart des protéines possèdent deux maxima d'absorbance [55] : une bande intense qui se situe à 200 nm qui provient des liens peptidiques (liens amides) et une bande faible qui se situe autour de 280 nm qui provient des acides aminés aromatiques. Il est possible de conclure que l'utilisation de ce mélange de solubilisation deviendrait une interférence puisqu'un signal est observé à 200 nm, la même longueur d'onde d'absorbance que les liens peptidiques des protéines, et il est donc laisser de côté.

Aussi, la présence d'un pic très large (à t_m de 6,1 à 10,1 min sur la figure 17) est expliquée par l'effet de la concentration d'un analyte sur le signal observé en CE. En générale, la concentration du BGE doit être au moins 50 fois plus importante que celle des espèces injectées, ce qui n'est pas le cas pour la concentration du mélange de solubilisation qui est 10 fois supérieure à celle du BGE. En d'autres mots, le BGE et

l'échantillon ne doivent pas posséder une composition trop différente en espèces chargées sinon cela cause un l'élargissement des pics [22]. Ceci s'explique par le champ électrique qui ne sera pas le même dans la zone l'échantillon que dans le reste du capillaire. En termes de pics, lorsque deux espèces sont incluses dans un mélange (l'arginine et l'acide glutamique) il est attendu d'observer aucun, un ou deux pics selon l'absorptivité à la longueur d'onde utilisée. Cependant, sur la figure 17, plusieurs pics sont observés ce qui pourrait être expliqué par l'élargissement de pic dû à la trop forte concentration des deux acides aminés du mélange de solubilisation.

En somme, l'interférence causée par l'absorption du mélange de solubilisation à 200 nm et la concentration trop élevée de ce mélange par rapport au BGE ne permettent pas son utilisation dans ce projet. Les concentrations maximales de protéines dans le mélange synthétique étaient de l'ordre de 40 μM .

3.5. Collecte de fraction

Avant d'expliquer la stratégie de collecte de fraction, il faut définir quelques termes utilisés pendant les études : **nombre de fractions collectées**, **nombre de collecte**, ainsi que le **volume minimale nécessaire à l'anode pour garder un courant stable**. Alors il sera possible d'évaluer la reproductibilité lors de la collecte avec l'indicateur de EOF et la reproductibilité de la séparation du mélange de protéines lors de la collecte. La figure 18 permet d'expliquer le mode de fonctionnement de la collecte. Il est important de noter que sur le montage présenté, l'anode et la cathode sont inversée puisque le EOF est inversé, grâce au revêtement du DDAB (régénéré après chaque injection), comme démontré par les électrophérogrammes de la figure 12 où le MO était détecté seulement lorsque le potentiel était inversé.

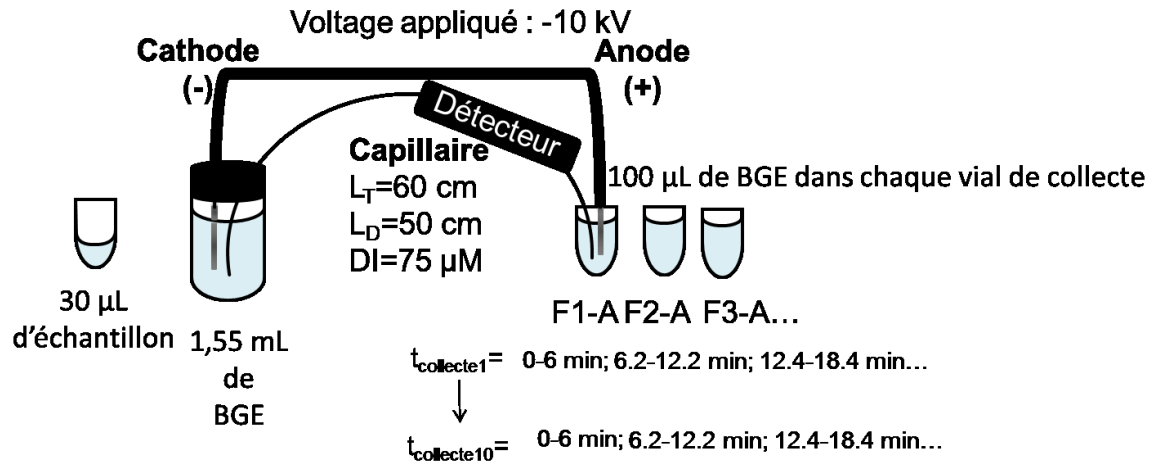


Figure 18. Schéma expliquant la collecte de fraction où A représente la première condition de BGE (tampon) et F1, F2, etc., sont les noms des fractions pour cette condition de séparation.

3.5.1. Nombre de fractions collectées

Le nombre de fractions collectées par séparation est un facteur déterminant puisque cela joue sur l'identité des protéines collectées dans chaque vial (F1, F2, F3, etc.). Le nombre de fractions collectées est le nombre de divisions faites au sein de la même séparation. Chaque division deviendra une fraction différente. Les séparations électrophorétiques sont faites durant 30 min et il a été décidé de les séparer en 5 fractions égales, soit des fractions de 6 min d'éluion sous un potentiel appliqué comme l'indique la figure 18 (et la figure 19). De plus, entre chaque fraction, une période de 0,2 min est nécessaire pour passer d'une fraction à l'autre où le potentiel est arrêté et redémarré et le vial de collecte est changé. À cette étape, ce choix était complètement arbitraire puisque qu'il s'agissait de démontrer qu'il était possible d'interrompre le potentiel pour changer de fraction et de revenir au même potentiel à la fraction suivante.

3.5.2. Nombre de collectes

Le nombre de collectes est le nombre de fois qu'une même fraction sera accumulée. Ceci influence directement la masse de protéines disponible pour les analyses en MS ou en cartographie peptidique. Cette fois-ci le choix a été fait en considérant qu'il

y aura une forte dilution lors de la collecte dans les vials de collecte de 100 μL , donc, la même séparation était répétée 10 fois pour compenser, un peu, la dilution. Ce choix est noté sur la figure 18 comme les collectes $t_{\text{collecte1}}$ à $t_{\text{collecte10}}$, le résultat est donc que la même fraction est accumulée 10 fois.

3.5.3. Volume minimal de tampon à l'anode pour garder un courant stable

Le volume de la solution à la sortie du capillaire (à l'anode) est un élément qui vient jouer sur la dilution effectuée durant la collecte. Dans l'appareil utilisé, le volume du réservoir à l'anode (sortie du capillaire) est de l'ordre du millilitre ce qui est très grand comparé au volume d'injection qui est de l'ordre du nanolitre. Pour cette raison, il a été tenté d'évaluer plusieurs volumes de réservoir différents à la sortie du capillaire en sachant qu'il faut maintenir un circuit électrique durant la séparation. Évidemment, la diminution du volume du réservoir de sortie entraîne une diminution de la dilution de la concentration d'une fraction collectée. Pour vérifier jusqu'à quel point le volume de tampon à la sortie du capillaire peut être diminué, le courant est pris comme indicateur de stabilité. Il faut se souvenir qu'une réaction d'hydrolyse de l'eau a lieu lors de l'application d'un potentiel électrique dans une solution aqueuse et c'est le tampon qui a pour rôle de maintenir un pH stable. Le courant est mesuré puisqu'il est directement proportionnel au champ électrique. En fait l'équation d'Ohm relie le voltage (V) appliqué à une résistance (R) et au courant (I) :

$$V = RI \tag{9}$$

La résistance dans la CE vient de la solution de séparation contenue dans le capillaire. Alors, si le tampon était soumis à des conditions qui modifieraient son pH (*i.e.*, durant l'électrolyse) les rapports d'ions en solution changeraient. Cela reviendrait à dire que la résistance serait modifiée et donc le courant varierait. Le tableau 4 présente le courant observé à la 15^e minute d'application d'un voltage de -10 kV en fonction du volume de BGE à la sortie du capillaire où on trouve l'anode.

Tableau 4. Mesures de la reproductibilité du courant électrophorétique en fonction du volume à l'anode (la sortie du capillaire) après 3 applications consécutives d'un voltage de -10 kV pendant 15 min.

Volume à l'anode (μL)	Courant (μA), Δt = 15 min			Moyenne	Écart-type	% RSD
	Essai 1	Essai 2	Essai 3			
20	-1,9	-2,9	-4,2	-3,0	1	33
40	-1,9	-2,2	-3,0	-2,4	0,6	30
100	-1,9	-2,0	-2,1	-2,0	0,1	5

Malheureusement, la variation du courant est trop marquée pour les volumes à l'anode plus petits que 100 μL, ce volume était donc utilisé pour le reste des expériences. Aussi, il est important de noter que les volumes des réservoirs à l'entrée et à la sortie du capillaire doivent toujours être au même niveau. Pour cette raison le volume à la cathode (entrée du capillaire) est de 1,55 mL.

3.5.4. Collecte de fraction de la séparation du mélange de protéines

La collecte de fraction est évaluée en injectant à dix reprises le mélange synthétique contenant 4 protéines et en interrompant l'analyse pour obtenir 5 fractions de 6 minutes d'éluion chaque. La figure 19 montre le suivi du courant lors de la séparation de protéines à -10kV avec collecte de fraction. Comme mentionné, le courant est un indice de la stabilité de la séparation dû à la relation qu'il existe entre le courant et le champ électrique appliqué. La figure 19 indique donc qu'il est possible d'appliquer un potentiel de façon intermittente. Il faut donc évaluer s'il est possible d'utiliser ces fractions comme analyte pour d'autres analyses telles que la cartographie peptidique et protéique. Ainsi, les électrophérogrammes des collectes de fractions sont illustrés à la figure 20. Ces électrophérogrammes démontrent une très bonne reproductibilité pour ce qui est du temps de migration et de l'aire des pics, malgré l'arrêt du voltage (4 fois) durant la séparation. Par contre, ces tracés ne permettent pas d'observer 4 pics distincts représentant les 4 protéines présentes dans le mélange synthétique et c'est pour cela qu'une tentative d'identification des temps de migrations de chaque protéine est présentée.

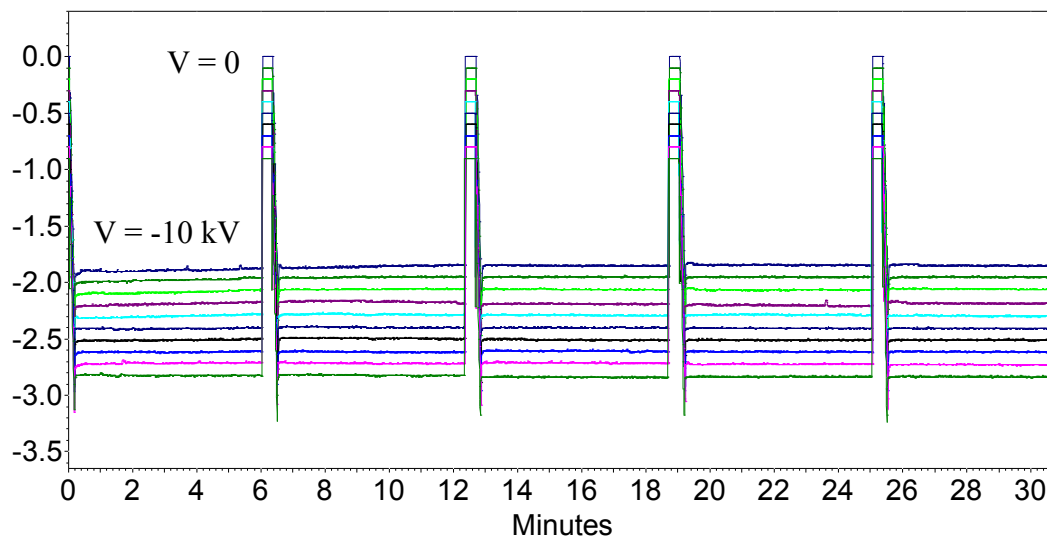


Figure 19. Suivi du courant lors de la séparation des protéines en effectuant une collecte de fraction dont les électrophérogrammes sont montrés sur la figure 20. Les graphiques sont décalés de $-0,1 \mu\text{A}$ pour montrer les 10 courbes, sinon elles se chevauchent.

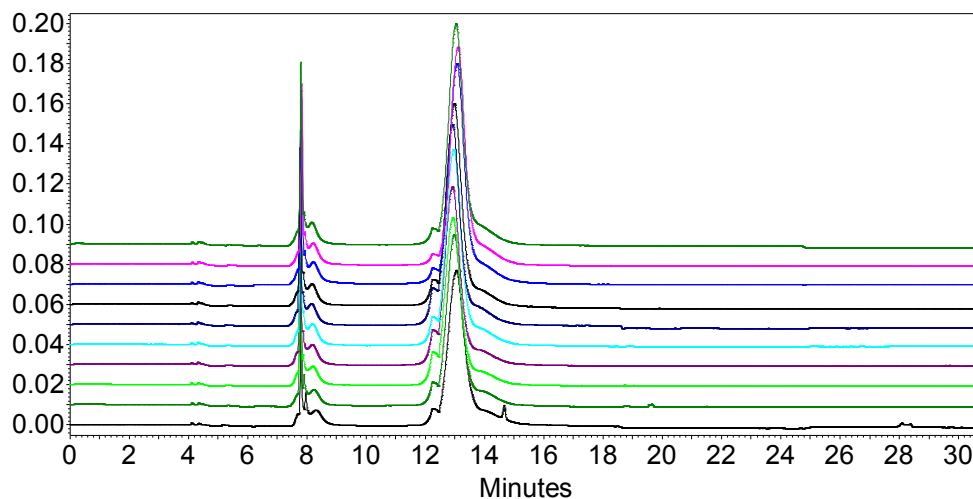


Figure 20. Électrophérogrammes du mélange contenant: l' α -lac ($37 \mu\text{M}$), la β -lact ($47 \mu\text{M}$), la CA ($34 \mu\text{M}$) et la BSA ($39 \mu\text{M}$) injectés 10 fois. La collecte de fractions est faite à chaque 6 min pour obtenir 5 fractions. Conditions de séparations : $L_T=60 \text{ cm}$ ($L_D=50 \text{ cm}$), tampon utilisé d'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C , la température du capillaire est de 25°C , le volume de solution injectée est de 25 nL , voltage à -10 kV .

Pour tenter d'identifier le temps de migrations des protéines de la solution utilisée lors de la collecte de fraction, des solutions dopées de protéines sont injectées dans la CE. Le dopage consiste à ajouter un volume constant (10 μL) d'une protéine à la solution du mélange protéique (15 μL) pour identifier le pic dont l'intensité augmente. Les concentrations des solutions obtenues sont décrites dans le tableau 5 et les électrophérogrammes obtenus sont illustrés à la figure 21.

Tableau 5. Concentrations des mélanges de protéines utilisés pour identifier le temps d'éluion des protéines

	Concentration en β -lact (μM)	Concentration en α -lact (μM)	Concentration en BSA (μM)	Concentration en CA (μM)
Mélange dopé en β -lact	236	114	120	96
Mélange dopé en α -lac	142	190	120	96
Mélange dopé en BSA	142	114	200	96
Mélange dopé en CA	142	114	120	160

*Le dopage est effectuée en ajoutant 10 μL de solution de protéines à un volume de 15 μL de mélange protéique ($V_{\text{totale}} = 25 \mu\text{L}$).

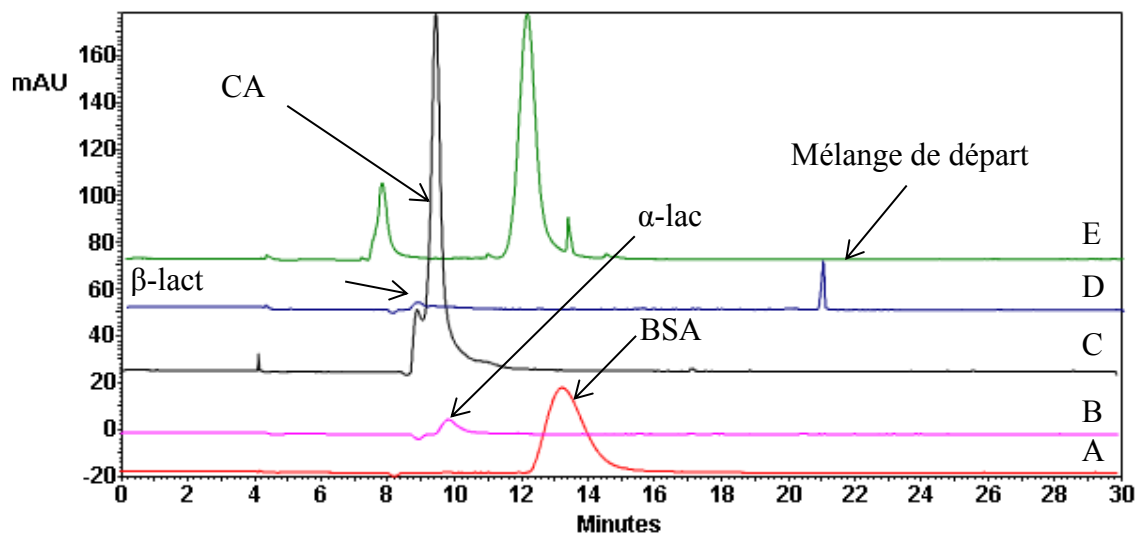


Figure 21. Électrophérogrammes du mélange de protéines (E) et du mélange dopés par : la BSA (A), l' α -lac (B), la β -lact (C) et la CA (D). Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), tampon d'acétate de lithium à 5mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 25°C, le volume de solution injectée est de 25 nL, voltage à -10kV.

Sur les électrophérogrammes à la figure 21 sont identifiés les pics qui sont susceptibles d'être les protéines. Par contre, on constate que les temps de migration ne sont pas similaires lorsqu'on compare les mélanges dopés et le mélange de départ. On se demande si la variabilité est due à une mauvaise reproductibilité. Donc, trois injections de chaque solution ont été faites pour évaluer la reproductibilité des séparations. Les temps moyens ainsi que les écarts relatifs sont montrés sur le tableau 6.

Tableau 6. Temps de migration moyen des protéines analysés à pH 5 en dopant la solution du mélange standard.

Protéines	t_m moyen (min)	Écart-type (n=3)	% RSD
α -lac	9,5	0,1	1,1
BSA	15	1,5	10
β -lact	9,3	0,4	4,3
CA	9,6	0,1	1,0

Le tableau 6 montre que les temps de migration des protéines ne varient pas de façon significative, sauf le BSA qui montre un RSD de 10%. Cependant, la correspondance entre les temps de migration du mélange de protéines aux figures 20 et 21 est loin d'être en accord. Puisque les mesures ne sont pas effectuées le jour même, les analyses suggèrent que la séparation n'est pas très reproductible d'un jour à l'autre. Il y a aussi possiblement un effet d'interaction entre les protéines. Cependant, les résultats du tableau 6 suggèrent que le groupement de pics autour de 8 min sur la figure 21 sont susceptibles d'être l' α -lac (B), la β -lact (C) et la CA puisqu'ils montrent des temps de migrations semblables, ce qui laisse la BSA représenté par le pic à 13 min sur la figure 21.

Les électrophérogrammes (figure 20) de la collecte de fraction semblent montrer une faible variation au niveau du temps de migration et de l'aire du pic de BSA pour 10 injections consécutives faites le jour même. En les calculant, ces paramètres ne dépassent pas 9% RSD comme le montre le tableau 7, et donc sont acceptables.

Tableau 7. Variation du temps de migration et de l'aire sous la courbe du BSA pour 10 injections d'une solution de mélange protéique.

BSA	Moyenne	Écart-type	RSD (%)
Temps (min)	12,9	0,3	2
Aire	$34,7 \times 10^5$	$2,97 \times 10^5$	9
Largeur (min)	3,2	0,2	6

Le pic du BSA est utilisé pour étudier la répétabilité de la séparation puisque cette protéine est séparée des 3 autres. Les précisions sur les temps de migration et d'aire sous le pic présentent des variations acceptables puisqu'elles sont de moins de 3% et de moins de 10%, respectivement. La largeur du pic est montrée pour illustrer que l'intégration est effectuée de la même façon pour le pic du BSA, ainsi l'intégration n'est pas un facteur qui pourrait influencer les valeurs d'aires sous le pic. Ceci indique que le revêtement de DDAB est efficace lorsque régénéré entre chaque injection, puisque les séparations sont répétables. Cependant, la séparation des 4 protéines n'est pas optimale. En effet, il semble que l' α -lac, la β -lact et la CA (en se fiant au t_m montré dans le tableau 6) ne sont

pas séparés dû au manque de sélectivité de la séparation. Ces 3 protéines se chevauchent dans un groupement de pics qui se trouvent entre 7 et 9 min (figure 21). Il serait intéressant d'améliorer la séparation, mais comme mentionnée dans l'introduction, l'objectif de cette stratégie n'est pas d'isoler chaque protéine, mais de présenter une méthode semi-préparatrice qui permettrait d'obtenir des mélanges simplifiés en protéines à partir de mélanges plus complexe.

3.5.5. Analyse des fractions collectées

Après la collecte de fractions, il faut évaluer si les efforts pour conserver suffisamment de protéine permettront de poursuivre avec les analyses en cartographie peptidique ou en MS. Tout d'abord, il faut connaître à quel moment les analytes sont recueillis, ou leurs temps de sortie (t_s), qui n'est pas équivalent au t_m parce qu'au moment de leur détection (t_m) ils doivent parcourir les derniers 10 cm du capillaire pour atteindre le réservoir de sortie. Ceci est calculé à partir de la vitesse apparente de la molécule et donc de leur temps de migration. Le chemin parcouru est égal à la longueur totale du capillaire (L_T) et non à la longueur au détecteur (L_D). De plus, il faut considérer qu'il y a un temps de pause entre les collectes. Donc, le temps de sortie des analytes (t_s) devrait se calculer à l'aide de l'équation (10) :

$$t_s = \frac{L_T}{v_{app}} \quad (10)$$

Cependant, ce temps de sortie calculé ne tient pas compte des 0,2 min de pause qu'il y a entre chaque collecte de 6 min. En effet, en calculant les temps de sortie d'une molécule qui serait détectée à $t_m=5,1$ min on trouve un temps de sortie de 6,1 min (pour un voltage constant -10 kV). Cependant, entre 6,0 et 6,2 min il y a une pause donc la vitesse de déplacement de la molécule devient 0. Pour ceci, la molécule aura une valeur de temps de 6,3 min (6,1 min + 0,2 min). Le temps de sorti pour une molécule qui est détectée à 5,1 min devient donc 6,3 min. Puisque la séparation comporte 5 compartiments différents (*i.e.*, les fractions F1 à F5), il faut aussi considérer les 4 pauses, soit : de 6,0 à 6,2 min, de 12,2 à 12,4 min, de 18,4 à 18,6 min et de 24,6 à 24,8 min. Ce qui revient à

dire que lorsque les valeurs de sortie correspondent au moment où la pause devrait avoir lieu il faut ajouter les 0,2 min multiplié par le nombre de pauses qui ont eu lieu. Par exemple, une molécule qui est détecté à 15,05 min, donne un temps de sortie de 18,1 min avec l'équation 10, puisqu'il y a eu 2 pauses de 0,2 min (de 6,0-6,2 min et 12,2-12,4 min) il devient 18,5 min. Puis, puisque 18,4 min correspondent à une pause on lui ajoute 0,2 min ce qui devient 18,7 min. Alors, une molécule détectée à 15,05 min est attendue dans la fraction 4.

Puisque le signal observé pour une molécule en CE est un pic d'une certaine largeur il faut en tenir en compte. Donc, pour trouver à quel moment une molécule est collectée il faut donc prendre le début et la fin du pic comme un temps de migration. Le tableau suivant présente les temps de sortie des pics par rapport aux temps de migration observés sur la figure 20.

Tableau 8. Fractions correspondantes à la collecte de fractions du mélange protéique^a.

Pic à t_m (min)	Sortie à t_s (min)	Fraction
7,3 - 8,3	9,0 - 10,2	F2
12,0 - 15,0	14,3 - 18,4	F3

a) $L_T=60\text{cm}$; $L_D=50\text{cm}$; Le calcul est effectué à partir des électrophérogrammes de la figure 20.

Le tableau 8 suggère que le BSA et les 3 autres protéines se trouvent dans deux fractions séparées, soit les fractions F3 et F2, respectivement. Il est donc question de vérifier ce calcul en analysant les 5 fractions, ce qui est présenté dans la prochaine section.

3.5.5.1. Cartographie protéique par CE-UV des 5 fractions collectées

Les fractions F1 à F5 ont été analysées en CE-UV toujours en utilisant un revêtement DDAB régénéré entre chaque injection. Les résultats des analyses sont montrés à la figure 22 et correspondent à un triplicata d'injection des 5 fractions obtenues.

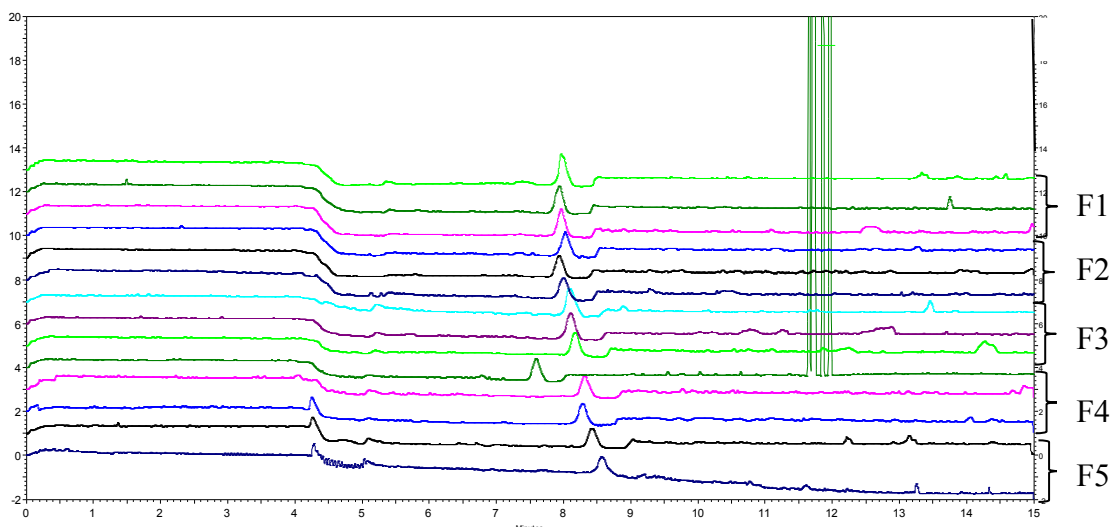


Figure 22. Électrophérogrammes des analyses en triplicata des 5 fractions collectés du mélange des 4 protéines : BSA, CA, (β -lact) et α -Lac. Conditions de séparations : $L_T=60$ cm ($L_D=50$ cm), le tampon utilisé est l'acétate de lithium à 5 mM et à un pH de 5, la température d'entreposage de la solution de DDAB est de 25°C, la température du capillaire est de 25°C, le volume de solution injectée est de 25nL et le voltage à -10kV. Les injections sont placées en ordre de haut en bas en commençant par F1 et pour F5 2 injections ont été enregistrés.

Comme calculé précédemment, les fractions contenant des protéines devraient être les fractions F2 et F3, ce qui n'est pas représentatifs des résultats obtenus à la figure 22. Les pics observés autour de 8,3 min sont présents dans toutes les analyses des fractions ce qui suggère que cette espèce est présente dans toutes les solutions. Cependant, le calcul de temps de sorti des protéines ne suggère pas qu'il y a des protéines dans toutes les fractions. Les résultats de la figure 22 suggèrent que les fractions collectées sont à de trop faibles concentrations pour être détectées par UV et que le pic à environ 8,3 min ne correspond pas à une des 4 protéines du mélange. Pour vérifier cette hypothèse, il a été envisagé de faire analyser les fractions F2 et F3 en LC-MS et ceci permettrait aussi d'identifier la masse molaire du pic obtenu puisqu'il se répéterait dans ces 2 fractions.

3.5.5.2. Cartographie protéique des fractions F2 et F3 par LC-MS

La LC-MS possède des limites de détection très basses et c'est pour cette raison qu'il avait été décidé d'analyser les fractions F2 et F3 par LC-MS. Aussi, puisque les solutions

contiennent des protéines connues, cela permet de regarder les chromatogrammes à des masses extraites. Les analyses par LC-MS ont été faites dans le Laboratoire Régionale de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal qui est situé au département de chimie. Malheureusement, les résultats qui sont montrés en annexe 4, n'ont pas permis de confirmer la présence de protéines dans les échantillons soumis. En fait, un seul signal était répété dans les deux fractions et il s'agit de m/z 382,4. En soustrayant la masse de brome (78,918 Da) dans la molécule de revêtement DDAB (461,359 Da), la masse du cation didodecyldiméthylammonium (DDA^+) est obtenue (382,4 Da) ce qui confirme que le revêtement se détachait durant les séparations. C'est possible que sa présence importante dans les fractions empêchait la détection des protéines par l'effet de suppression ionique dans l'ESI.

Les séparations lors de la collecte de fractions a été possible et ce fut démontré pas des courants stables et des variations d'aire et des temps de migrations de moins de 10% avec le capillaire munis du revêtement DDAB. Cependant, la collecte n'a pas permis de détecter par CE-UV ou LC-MS des traces de protéines. La LC-MS a révélé qu'une accumulation importante de DDAB se faisait durant la collecte de fraction. Ce revêtement semi-permanent pourrait donc être une entrave au développement du système semi-préparatif puisqu'il est contenu dans les fractions collectées dû à son détachement de la paroi du capillaire.

La limite de détection en BSA par CE-UV peut être estimée à 0,97 μ M en supposant une réponse linéaire avec le premier signal observé dans la figure 20 (*i.e.* $37 \mu\text{M} \times 0,002 \mu\text{A} \div 0,076 \mu\text{A}$). L'estimation du facteur de dilution est obtenu en considérant les caractéristiques du capillaire ainsi que la diminution du volume de BGE à la sortie du capillaire, comme démontre les valeurs du tableau 9 qui ont été calculées avec le logiciel *CE expert*.

Tableau 9. Variation du volume de solution par rapport à la longueur totale du capillaire avec un diamètre interne de 75 µm si l'injection est de 5 s × 0,5 psi et l'analyte est de 1 mg/mL (voir annexe 2 pour exemple de calcul).

Longueur totale ^a (cm)	Volume du capillaire (nL)	Volume injectée (nL)	Masse injectées (ng)	Masse après 10 injections (ng)	Concentration à la sortie ^b (mg/mL)	Facteur de dilution
31	1370	54	54	540	5,4X10 ⁻³	1,8X10 ²
60	2650	25	25	250	2,5X10 ⁻³	4,0X10 ²

^a La longueur de 60 cm est utilisée dans la sections 3.5 (séparations par CE-UV); la longueur de 31 cm est utilisée dans la section 3.6.

^bLe volume de tampon à la sortie est de 100 µL

Le tableau 9 permet d'observer que le facteur de dilution pour un capillaire de 60 cm est de 400 lorsque le vial à la sortie contient seulement 100 µL tampon. Ceci permet donc de supposer que la concentration du BSA, estimée à 0,093 µM lors de la collecte de fraction est dix fois plus basse que la limite de détection. Ceci justifie l'utilisation d'une méthode de détection plus sensible.

La question qui demeure est : quelle est la limite de détection du LC-MS utilisé? Cette question serait intéressante à étudier puisque cela permettrait de s'assurer de la quantité de protéine réellement collecté, c'est-à-dire d'évaluer le pourcentage de récupération de tout le processus. Aussi, des études plus poussées en LC-MS permettraient de s'assurer que le cation DDA⁺ n'a pas d'effet de suppression du signal durant l'ionisation en MS.

Malgré que les 10 injections soient reproductibles lors de la collecte et que les courants soient stables, il n'a pas été possible de prouver que le mélange synthétique était fractionné comme attendu. Seulement le DDAB, le composé utilisé pour assurer la reproductibilité, était détecté lors de la cartographie protéique par LC-MS. Ces résultats n'incitaient pas à poursuivre avec une digestion enzymatique et la cartographie peptidique, elles n'ont donc pas été faites. Il fallait trouver une autre piste pour vérifier la possibilité de faire la CE semi-préparatrice.

Pour évaluer que les efforts pour augmenter la masse de protéine disponible dans une fraction étaient suffisants, une technique de cartographie protéique avec une plus

basse limite de détection que la CE-UV était considérée. Aussi, puisque le DDA⁺ semble être l'espèce principale retrouvée dans la collecte et puisque la digestion de fractions pourrait être largement influencée par la présence de ce cation, une nouvelle approche n'utilisant pas ce revêtement semblait être nécessaire. Cette nouvelle approche servirait à démontrer qu'il est possible de collecter des quantités suffisantes de protéine pour permettre la cartographie protéique et peptidique. L'électrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser (CE-LIF) était donc choisi comme technique de séparation et d'analyse de fractions, mais sans revêtement de capillaire.

3.6. Séparations semi-préparatrice en électrophorèse capillaire couplée à la fluorescence induite par laser

La fluorescence induite par laser (LIF) est un mode de détection pour le CE plus sensible que la spectroscopie d'adsorption moléculaire ce qui permettrait de détecter des analytes 100 fois plus dilués. Un deuxième avantage que la fluorescence apporte est la spécificité de détection. L'aptitude à fluorescer n'est pas donnée à toutes les molécules à 22°C; il faut avoir une structure planaire ainsi que des électrons délocalisés. En utilisant des solutions standard, il est plus facile d'éliminer certaines molécules lors de l'étape d'identification de molécules qui ne fluoresce pas. Il a été décidé d'utiliser une solution synthétique qui ne contient qu'une seule protéine, l'albumine dérivée avec isothiocyanate de fluorescéine (alb-FITC). Ceci a pour but de simplifier l'étude de la collecte de fraction.

Le changement de méthode de détection induit les changements suivants à la stratégie présentée dans les sections précédentes :

- Changement de la longueur du capillaire de 60 cm à 31 cm;
- Utilisation du capillaire sans revêtement;
- Utilisation d'une seule protéine et non d'un mélange;
- Utilisation du tampon de séparation de 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9;
- Utilisation d'une seule fraction, puisque la collecte de fraction par interruption de courant a été démontré.

La diminution de la longueur de capillaire a pour effet de diminuer le temps d'analyse d'un échantillon ainsi que d'augmenter le volume d'injection pour les mêmes conditions d'injections comme vu dans le tableau 9.

Le tableau 9 permet d'observer qu'une longueur totale du capillaire de 31 cm diminue le facteur de dilution de moitié par rapport au capillaire de 60 cm. L'utilisation du capillaire sans revêtement se justifie par la présence importante du DDAB dans F2 et F3, lors des analyses en MS. Cependant, l'absence de revêtement pourrait affecter la reproductibilité des séparations dues à l'adsorption des protéines et ce phénomène a été vérifié en premier. Une seule protéine est utilisée dans ces études et non un mélange, non seulement pour pouvoir isoler le comportement d'une seule protéine et ne pas se soucier de la résolution des pics, mais aussi parce que seulement cette protéine marquée avec ce fluorophore était disponible au laboratoire. Le tampon phosphate est utilisé au lieu de l'acétate de lithium puisqu'il était déjà rapporté dans notre groupe pour l'analyse de l'alb-FITC [56]. Les avantages apportés par la CE-LIF permettent donc de l'envisager pour vérifier la présence de notre protéine fluorescente de départ lors de la collecte de fraction ainsi que d'en estimer la dilution lors de la collecte. De plus, cette étape permet d'évaluer la possibilité de tracer la carte peptidique de la collecte de fraction.

3.6.1. Calcul du facteur de dilution théorique causé par la collecte en CE

Le premier objectif était de confirmer que la collecte de fraction est applicable au système semi-préparatif proposé, c'est-à-dire que les efforts pour accumuler une quantité suffisante de protéine sont acceptables pour permettre les analyses comme la cartographie peptidique. Il fallait donc estimer le facteur de dilution impliqué dans ces étapes et le tableau 9 permet de l'estimer à 180. Puisque la CE-LIF possède une limite de détection jusqu'à 100 fois plus faible que la CE-UV, cette technique devrait pouvoir permettre la détection de l'alb-FITC après la collecte en se fiant au fait que dans les analyses par CE-UV un facteur de 10 était nécessaire pour arriver à la limite de détection estimée. Aussi, l'adsorption de la protéine sur la paroi du capillaire est à considérer, puisque si ce phénomène est trop important beaucoup de masse de protéines pourrait être perdu durant les collectes.

3.6.2. Étude de la reproductibilité de la séparation par CE-LIF de l'albumine-FITC

Il fallait vérifier que l'utilisation du capillaire sans revêtement n'affecterait pas de façon significative la reproductibilité des séparations par CE-LIF. Pour étudier cet impact une solution de l'alb-FITC a été injectée trois fois et les résultats sont présentés sur la figure 23.

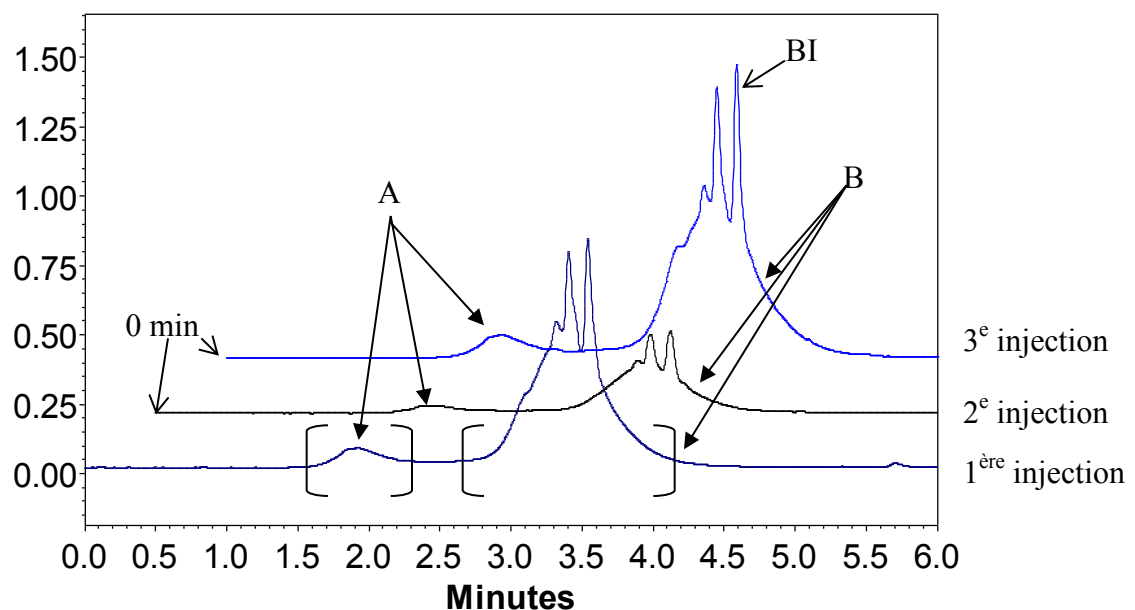


Figure 23. Électrophérogrammes obtenus par CE-LIF de trois injections d'une solution de 100 μM de l'alb-FITC. Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6,9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D = 23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm et $\lambda_{\text{ém}} = 520$ nm. Les électrophérogrammes sont décalés de 0,2 en RFU et 0,5 en min pour une meilleure lecture. Les zones A et B sont soupçonnées d'être des produits du marquage de l'alb-FITC. BI est le pic utilisé pour calculer le t_m .

Les données de la figure 23 sont utilisées pour étudier la reproductibilité de la séparation en termes d'aire sous les pics, de hauteur du pic ainsi que du t_m et ces valeurs sont montrées dans le tableau 10. Les pics qui sont nommés A et B sur la figure 23 sont le

produit du marquage multiple d'une protéine par un fluorophore, un phénomène bien connu [57]. En effet, les produits du marquage proviennent de la réaction avec le FITC avec les amines primaires des lysines et du groupement amine au N-terminal de la chaîne polypeptidique [58].

Tableau 10. Évaluation de la reproductibilité des pics pour 3 injections de l'alb-FITC à 100 μ M, séparés par CE-LIF.

Pic	A			B		
	t_m (min)	Aire	Hauteur	t_m (min)	Aire	Hauteur
Moyenne	1,93	$9,2 \times 10^4$	$4,8 \times 10^3$	3,55	$1,7 \times 10^6$	$5,1 \times 10^4$
Écart-type	0,02	$4,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$	0,09	$0,87 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$
% RSD	1,0	47	48	2,5	51	88

^aLes conditions de séparations sont décrites sur la figure 23.

^bLe t_m et la hauteur du pic B sont mesurés avec le pic BI sur la figure 23.

Le calcul de la variation du temps de migration dans le tableau 10 démontre une légère variation de 2,5% ou moins, pour les pics A et B. Ceci montrerait que le revêtement pour diminuer l'adsorption de cette protéine sur la paroi du capillaire n'est pas essentiel pour atteindre notre objectif. Cependant, ceci n'est pas le cas pour l'aire et la hauteur des pics qui varient de plus de 45% pour ces deux paramètres, ce qui pourrait être expliqué par l'adsorption de la protéine dans le capillaire. Ce phénomène entraînerait une diminution de la concentration disponible au moment de la collecte. En comparant aux valeurs du tableau 7, obtenus lors de dix injections du mélange protéique séparé avec un capillaire doté du revêtement DDAB, il y a une grande différence en termes de reproductibilité de l'aire sous le pic (51% vs 8,6%). La quantification était tout de même tentée. Cependant, la concentration de la solution d'alb-FITC de départ a été augmentée de 100 μ M à 680 μ M. Ceci est entrepris pour s'assurer que la quantité d'échantillon collectée serait suffisante sachant que le facteur de dilution théorique est de 180 et qu'il y aura de l'adsorption de protéine sur la paroi interne du capillaire. En d'autres mots, le facteur de dilution pourrait s'avérer être plus grand que 180.

Les électrophérogrammes obtenus en injectant 10 fois un échantillon de l'alb-FITC à une concentration de 680 μM sont illustrés à la figure 24.

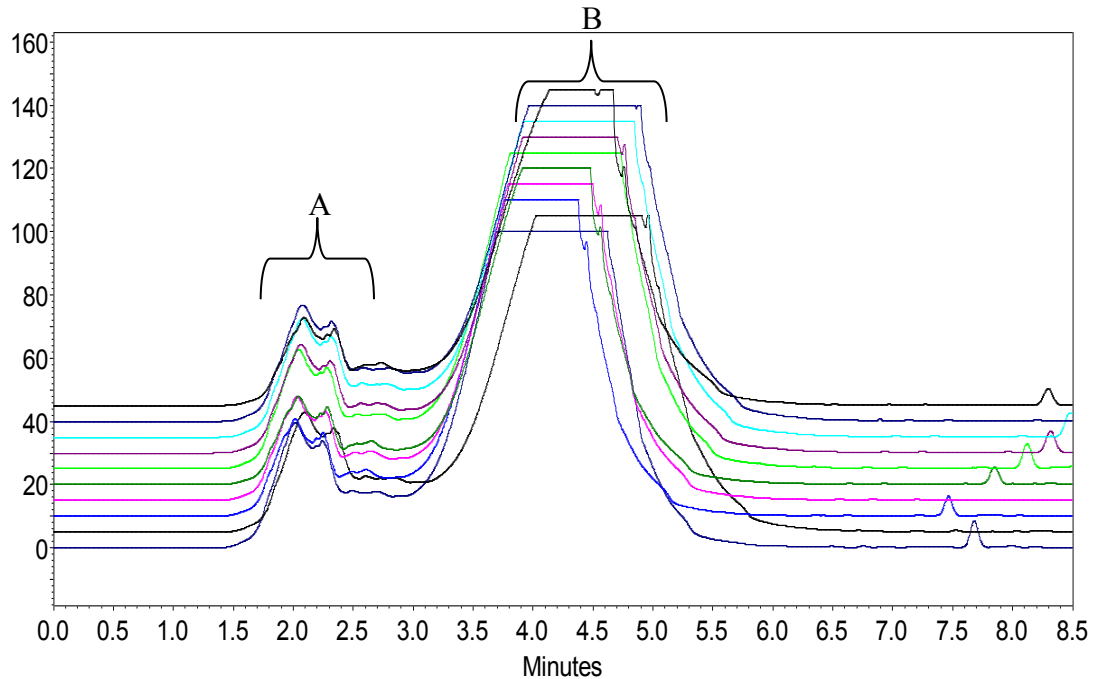


Figure 24. Électrophérogrammes de dix injections d'une solution de 680 μM de l'alb-FITC avec collecte de fraction dans un volume de collecte de 100 μL . Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D = 23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm et $\lambda_{\text{ém}} = 520$ nm.

La figure 24 montre que la séparation est plus reproductible en termes de temps de migrations qu'en termes de hauteur ou d'aire du pic, donc ces résultats sont similaires à ceux de la figure 23. Ceci pourrait être expliqué par l'adsorption de la protéine sur la paroi du capillaire à cette concentration élevée. Il sera tout de même tenté d'en estimer la vraie dilution en tenant compte que le facteur de dilution pourrait être surestimé. Le plafonnement du signal du pic entre 3,5 min à 5,0 min est causé par la saturation du détecteur. Ceci n'était pas un obstacle puisque le signal qui servirait lors de la quantification serait celui de l'analyse de la fraction qui serait diluée (concentration

estimée à 3,8 μM). Pour s'assurer de la stabilité des séparations, les signaux de courants sont enregistrés et sont illustrés sur la figure 25.

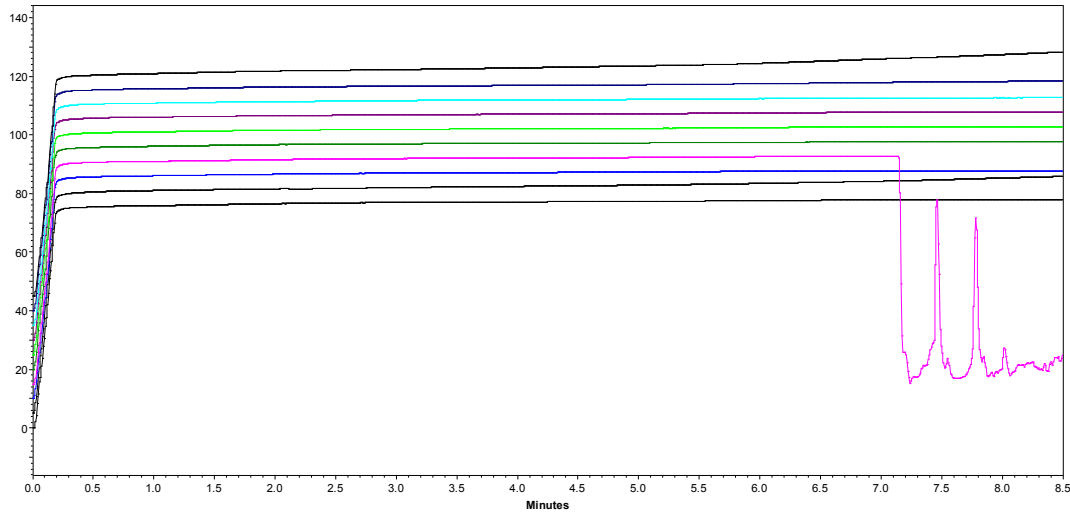


Figure 25. Suivi du courant lors de l'accumulation de protéines alb-FITC (680 μM). Les données sont décalées de 10 μA pour permettre leur lecture.

Comme mentionné précédemment, la collecte se fait dans un récipient contenant 100 μL de BGE et il n'y a pas d'interruption de courant puisqu'il n'y a pas plusieurs fractions cette fois. De plus, puisqu'il n'y a pas de revêtement pour inverser le EOF, le courant est positif. Les tracés illustrés sur la figure 25 représentent le courant de chaque séparation et démontrent que les séparations sont stables à l'exception de la 4^e injection où le courant est tombé à 7,0 min pour des raisons inconnues. Ceci sera à considérer lors de l'estimation de la dilution puisque la perte de courant signifie que la séparation ne se fait que partiellement. Autrement dit, tout analyte qui aura un temps de sortie plus grande que 7,1 min (*i.e.*, un t_m de 5,3 min) ne sera pas présent dans la collecte. Par contre, ceci représente une très faible portion de la protéine lors de la 4^e injection.

3.6.3. Estimation du facteur de dilution à l'aide d'une courbe d'étalonnage externe.

La fraction contenant les dix accumulations de l'alb-FITC a été réinjectée par CE-LIF pour en comparer le signal avec celui d'une solution étalon ayant une concentration de 3 μM d'alb-FITC (figure 26). Cette concentration d'étalon était choisie en considérant le facteur de dilution de 180 estimé dans le tableau 9. Ce facteur prédit une concentration après collecte de 3,8 μM étant donné que la concentration de départ était de 680 μM .

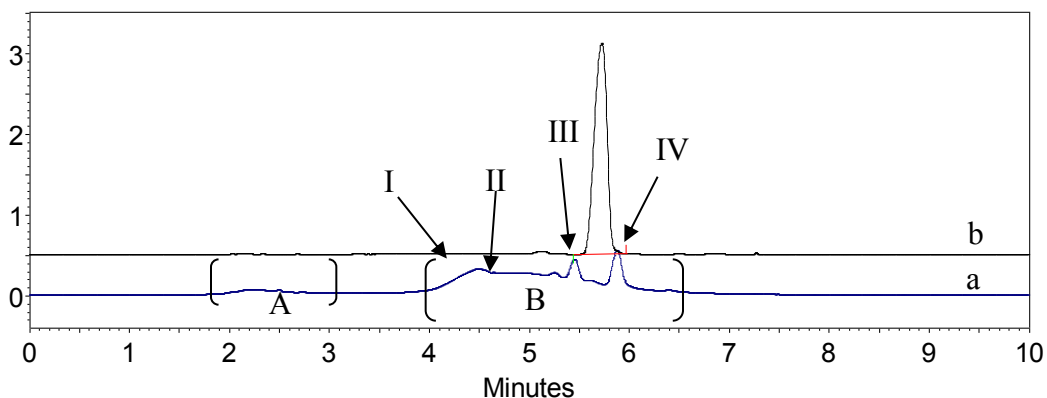


Figure 26. Électrophérogrammes d'une solution étalon de alb-FITC à 3 μM (a) et de la fraction F1 (b) résultant d'une accumulation de 10 injections de alb-FITC à 680 μM . Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6,9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D=23\text{cm}$), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém}}=520 \text{ nm}$. Les régions identifiées A, B, I, II, III et IV sont soupçonnées d'être des produits de marquage par le FITC. Le pic IV est le pic utilisé pour la quantification.

La comparaison des électrophérogrammes a et b de la figure 26, ainsi que celle de la figure 23, révèle des différences notables en termes d'intensité des pics et de la présence des pics. Le signal observé pour l'étalon de l'alb-FITC à 3 μM (figure 26 a) permet d'observer de multiples pics relativement similaire à ceux de la figure 23 où l'alb-FITC était à 100 μM . Ceci est expliqué par le marquage multiple de cette protéine lors de la réaction avec le FITC. Cependant, l'absence des autres produits de marquage dans la fraction F1 (figure 26 b) pourrait s'expliquer par la désactivation des espèces qui

n'apparaissent pas sur le tracé de la collecte, mais cette hypothèse est à explorer dans le futur.

La figure 26 b révèle aussi que l'aire du pic ne pourrait pas être utilisée avec confiance pour estimer la dilution, puisque seulement une espèce semble être observée dans la fraction F1. Cependant, une autre hypothèse plausible est que la paroi du capillaire soient contaminées avec l'alb-FITC qui se serait adsorbé et modifierait la sélectivité de la séparation et entraînerais le chevauchement des signaux I à IV (figure 26 a). D'un autre côté, si l'espèce observée dans la fraction F1 (figure 26 a) est bien une seule espèce elle pourrait être associée à l'espèce IV. En considérant cette dernière hypothèse, les courbes d'étalonnage direct ont été tracées pour l'aire du pic IV (figure 27) et la hauteur du même pic (figure 28) en fonction de la concentration. Les concentrations des standards utilisées sont les suivantes : 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 et 10 μM .

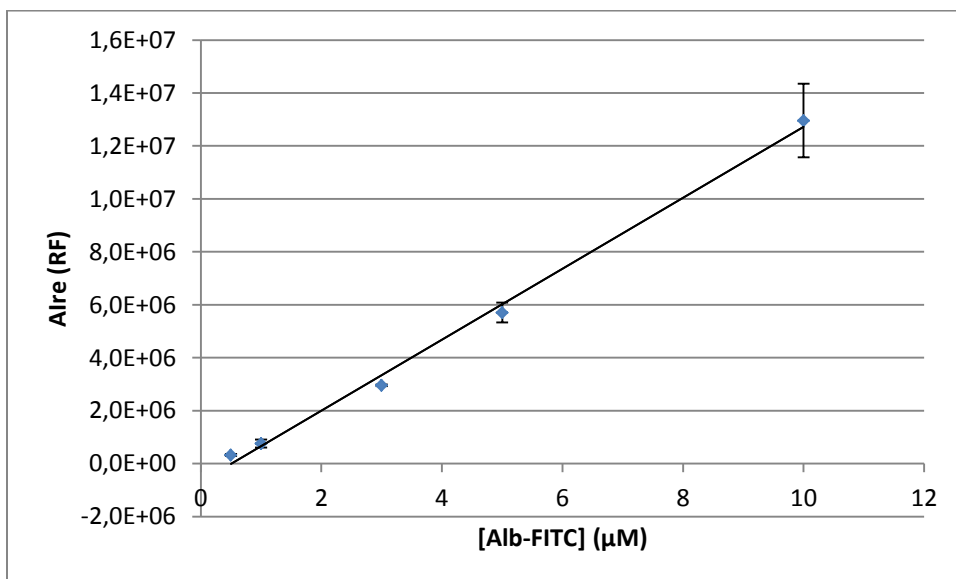


Figure 27. Courbe de d'étalonnage externe de l'alb FITC selon l'aire du pic IV de la figure 26 a. Les barres d'erreur représentent la précision pour n=3 injections (avec un intervalle de confiance de 95%). L'équation de la régression linéaire simple de la courbe est : $y=1,34 \times 10^6 x - 6,9 \times 10^6$; $R^2 = 0.996$. Dans ce cas, «y» représente l'aire sous la courbe et «x» la concentration en μM .

Les concentrations utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage sont choisies en se basant sur le facteur de dilution théorique calculée. En fait la concentration après la collecte devrait être de 3,8 μM ($680 \div 180$). Le coefficient de corrélation R^2 observée sur la figure 27 permet de considérer que l'aire du pic suit une relation linéaire pour cette gamme de concentration. Alors, l'aire du pic détecté, de la fraction F1 est mesurée lors de 3 injections de cette fraction par CE-LIF (tableau 11)

Tableau 11. Estimation de la concentration de l'alb-FITC dans la fraction F1 après accumulation de dix injections de l'alb-FITC à 680 μM à partir de la courbe d'étalonnage à la figure 27.

Fraction F1	Aire (RFU)	[BSA-FITC] trouvée (μM)	t_m (min)
Essai 1	2,3 x10 ⁶	2,2	5,73
Essai 2	2,1x10 ⁶	2,1	5,71
Essai 3	2,5 x10 ⁶	2,4	5,70
Moyenne	2,3 x10 ⁶	2,2	5,71
Écart-type	0,2 x10 ⁶	0,1	0,01
% RSD	9	5	0,2

À l'aide de la courbe d'étalonnage, la concentration d'alb-FITC dans la fraction F1 a été calculée et elle est de $2,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ($n=3$) (tableau 11), ce qui équivaut à une dilution d'un facteur de 308. Ce résultat implique que le facteur de dilution est 1,7 fois plus important que celui calculé, ce qui pourrait être expliqué par la possibilité d'adsorption de protéine sur la paroi du capillaire. Aussi, comme décrit précédemment, ce facteur pourrait être surestimé dû à la variation prononcée de l'aire du pic lors de la collecte comme illustré sur la figure 24.

Une deuxième estimation de la concentration de l'alb-FITC dans la fraction F1 était faite à partir de la hauteur du pic IV (figure 26 a) comme montrée dans la figure 28 et dans le tableau 12.

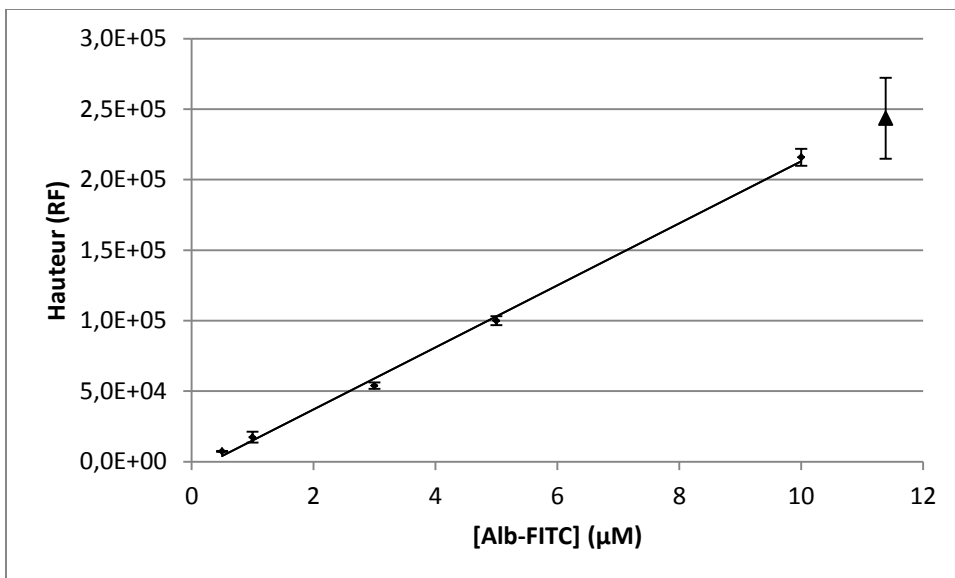


Figure 28. Courbe d'étalonnage externe de l'alb-FITC selon la hauteur du pic IV de la figure 26 a. Les barres d'erreur représentent la précision pour n=3 (avec un intervalle de confiance de 95%). L'équation de la régression linéaire simple de la courbe est : $y=2,2 \times 10^4 x - 7,0 \times 10^3$; $R^2 = 0,998$. Dans ce cas, «y» représente la hauteur du pic IV (figure 26) et «x» la concentration en μM . Le symbole «▲» représente la concentration de l'échantillon, soit le produit de la collecte.

La linéarité observée sur la courbe ($R^2=0,998$) qui relie la hauteur du pic IV (figure 26 a) et la concentration de l'alb-FITC est meilleur que celui de la relation qui relie l'aire du pic ($R^2=0,996$) et la concentration de cette protéine. Ceci pourrait s'expliquer par l'intégration de l'aire de plusieurs espèces (*i.e.*, espèces I à IV sur la figure 26) avec des facteurs de réponses différents. Cette relation linéaire entre la hauteur du pic et la concentration de l'alb-FITC était utilisée pour estimer la dilution de la solution injectée (tableau 12).

Tableau 12. Estimation de la concentration de l'alb-FITC dans la fraction F1 après accumulation de dix injections de l'alb-FITC à 680 μM à partir de la courbe d'étalonnage à la figure 28.

Fraction F1	Hauteur (RFU)	[ALB-FITC] trouvée (μM)	t_m (min)
Essai 1	$2,6 \times 10^5$	12,2	5,73
Essai 2	$2,6 \times 10^5$	12,1	5,71
Essai 3	$2,1 \times 10^5$	9,9	5,70
Moyenne	$2,4 \times 10^5$	11	5,71
Écart-type	$0,29 \times 10^5$	1	0,01
% RSD	12	11	0,18

Une concentration de $11 \pm 1 \mu\text{M}$ de l'alb-FITC dans la fraction F1 (tableau 12) implique que le facteur de dilution est de $(680 \mu\text{M} \div 11 \mu\text{M})$ 62, ce qui est beaucoup plus petit que celui calculé à théoriquement, qui est de 180. Ce résultat semble aberrant et il n'est pas très fiable dû fait qu'il soit obtenu en extrapolant la concentration du signal comme montrée sur la figure 28. De plus, à la concentration de l'échantillon pourrait s'ajouter la contamination de la solution concentrée en alb-FITC ($680 \mu\text{M}$) qui aurait pu s'accumuler sur la paroi du capillaire lors de la collecte. Cette contamination pourrait donc sous-estimer la valeur du facteur de dilution. La valeur du facteur de dilution pourrait donc être estimée entre 308 et 180. Une autre possibilité à considérer serait que le pic observée à la figure 26 b soit la somme du pic III et IV observée à figure 26 a. Ceci expliquerait donc la trop haute concentration trouvée dans le tableau 11.

Un signal était observé lorsque la fraction de l'alb-FITC était analysée démontrant un succès partiel. Cependant, il n'est pas possible d'identifier l'espèce issue d'un marquage multiple par le FITC à l'aide des étalons. Aucune analyse par LC-MS n'était faite. D'un autre côté, la détection de peptides fluorescents dans une carte peptidique réalisée par CE-LIF serait une bonne preuve que le pic observée à la figure 26 a est bien l'alb-FITC.

3.7. Digestion d'un produit de collecte par la chymotrypsine libre et immobilisée

Puisque la protéine alb-FITC avait été observée dans la fraction F1 avec une certaine confiance (figure 26 b), elle était soumise à la digestion enzymatique par deux méthodes : avec la chymotrypsine immobilisée et avec la chymotrypsine en solution. La caractérisation d'une protéine dans un échantillon biologique peut être souvent faite par sa carte peptidique, une technique qui a été étudiée dans notre laboratoire par Ghafourifar [20], Gan. [56] et Nguyen [59]. La cartographie peptidique consiste en la digestion d'une protéine par une enzyme protéolytique pour obtenir les fragments peptidiques qui sont séparés et détectés par une méthode comme la CE-UV, CE-LIF, CE-MS, la HPLC-MS ou la MALDI-MS.

Dans cette étude de digestion enzymatique, l'enzyme utilisée est la chymotrypsine (CT) qui hydrolyse les liens peptidiques du côté C-terminal des acides aminés suivant; la tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane. L'enzyme trypsine, le plus populaire pour les études protéomique, ne pouvait pas être utilisée dans cette étude parce que les chaînes latérales de lysine sont marquées avec le fluorophore FITC et donc ne sont pas reconnues par la trypsine comme sites d'hydrolyse. Les travaux précédents [20, 56, 59] ont démontrés l'avantage de l'utilisation des enzymes immobilisés et c'est pour cette raison que la CT était utilisée en solution homogène ainsi qu'en format immobilisé par le glutaraldéhyde (GA-CT). La digestion de la fraction F1 recueillie lors de l'accumulation de l'alb-FITC était donc soumise à la digestion par les deux formats de CT pour obtenir les cartes peptidiques dans la figure 29.

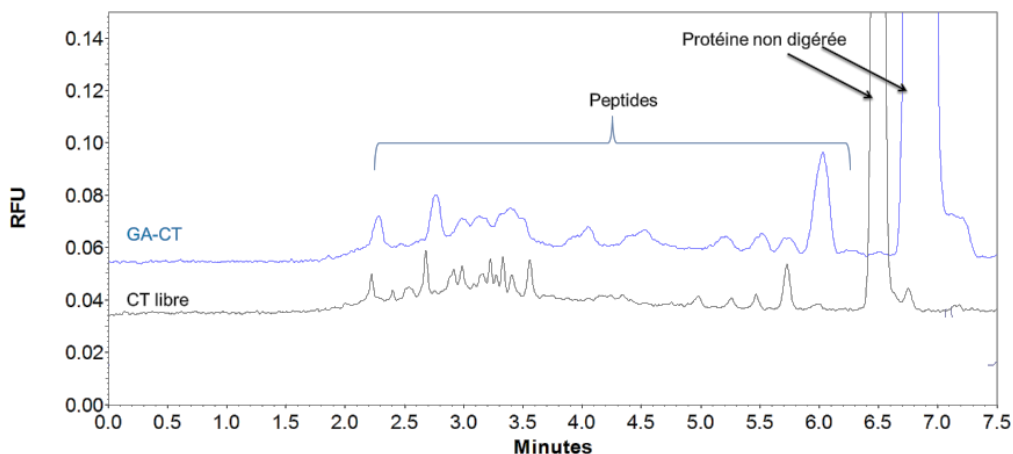


Figure 29. Électrophérogrammes par CE-LIF montrant les cartes peptidiques de l'alb-FITC digéré par la CT en solution libre ainsi qu'immobilisée par le glutaraldéhyde (CT-GA). Conditions de séparations : tampon: 50 mM de phosphate de sodium, pH 6.9, la séparation se fait à +20 kV, les dimensions du capillaire sont de 31 cm de longueur totale ($L_D=23$ cm), température du capillaire ajusté à 25°C. La détection est fait par LIF avec $\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{ém} = 520$ nm.

La figure 29 illustre la réussite non seulement de la digestion par les enzymes grâce à l'apparition des pics de peptides fluorescents, mais aussi que la fraction F1 avait vraiment une quantité suffisante de l'alb-FITC collectée par CE semi-préparatrice. Cette dernière collecte de fraction sans l'utilisation du DDAB démontre la faisabilité de l'approche de CE semi-préparatrice pour la protéomique. Par contre, une meilleure quantification est nécessaire pour vérifier les limitations de la concentration de départ en protéine. Ceci implique une amélioration de la détection des protéines natives dans les fractions par LC-MS.

4. Conclusion et travaux futurs

Les études en protéomique s'intéressent aux fonctions ainsi qu'à l'identification des protéines. Ce projet proposé une méthode semi-préparatrice utilisant la CE à plusieurs dimensions en parallèle et s'inscrit dans les efforts pour identifier des protéines autant par l'analyse des protéines («top-down») que par l'analyse des peptides («bottom up») obtenues lors de digestion protéiques. La stratégie présentée consiste donc à simplifier un mélange de protéines en plusieurs fractions, ou sous-échantillons moins complexe, pour permettre l'identification de celles-ci en exploitant la redondance d'une protéine dans plus d'une fraction. Pour cela, il fallait commencer par démontrer qu'il était possible de séparer des protéines de façon reproductible pour permettre plusieurs collectes consécutives. Aussi, il était nécessaire de prouver qu'il était possible de collecter suffisamment de protéines pour les traiter par cartographie peptidique ou protéique. Ensuite, il fallait les traiter par cartographie peptidique et/ou protéique. Finalement, il fallait tenter de présenter plusieurs dimensions en parallèle et ainsi démontrer l'exploitabilité de la redondance d'une protéine dans des fractions différentes.

Tout d'abord, l'étude du revêtement de DDAB sans régénération a montré que le manque de répétabilité est attribuable à la dégradation du revêtement donc que la régénération du revêtement est nécessaire entre chaque injection. Les résultats des études de régénération du revêtement entre chaque injection ont démontrés une bonne répétabilité de la séparation d'un mélange protéique à dix reprises lorsque le volume de sortie est de 100 μ L. Cependant, il n'a pas été possible de vérifier la collecte de fractions parce les protéines n'ont pas été observées dans les fractions collectées ni par CE-UV, ni par LC-MS. En d'autres termes, il semblait que les concentrations de protéines collectées étaient plus basses que les limites de détections du CE-UV et du LC-MS. Il serait donc envisageable d'explorer des techniques de préconcentration pour augmenter la concentration finale des protéines collectées, comme l'utilisation de l'enrichissement par extraction sur phase solide («Zip-tip») ou par évaporation du solvant sous vide. Cette dernière risque de donner une solution avec une concentration de sels de tampons, l'acétate de lithium et le DDAB dans les études avec le revêtement, trop concentrée.

Aussi, l'utilisation d'un capillaire de 100 μm serait intéressante pour augmenter la masse de protéine injectée comme fait par Lucy *et al.* [12].

La LC-MS est reconnue pour être une technique très sensible, donc la possibilité qu'il y ait suppression du signal des protéines lors de l'ionisation dans l'ESI-MS est à considérer. En effet, un signal très important provenant du DDA^+ était observé. Il serait donc intéressant soit d'utiliser l'ultrafiltration avec une membrane de porosité appropriée pour enlever les traces de DDAB, soit d'optimiser les conditions chromatographiques qui pourraient mieux séparer le DDA^+ des protéines en LC-MS, soit d'optimiser le revêtement pour qu'il ne détache pas de la paroi durant les séparations CE.

Puisque les essais avec le revêtement DDAB ne permettaient d'observer les protéines ni par CE-UV ni par LC-MS, donc ni de tracer une carte protéique, la LIF fut introduite comme méthode de détection. Aussi, il semblait intéressant de ne pas utiliser de revêtement DDAB simplement pour démontrer la possibilité de tracer la carte protéique ainsi que la carte peptidique de l'alb-FITC. Ceci permettait d'étudier l'approche sans ajouter un contaminant qui pourrait influencer la digestion de la protéine ou l'analyse par LC-MS. La collecte de fraction par CE-LIF a servi à démontrer que le facteur de dilution se situait autour de 308. Les temps de migration de l'alb-FITC permettaient de se demander si l'utilisation d'un revêtement était vraiment nécessaire puisqu'il présentait une précision pour le temps de migration acceptable. Cependant, la précision (les valeurs de RSD) de la hauteur et l'aire des pics avec DDAB versus sans revêtement permettent d'affirmer qu'il semble profitable d'utiliser un revêtement pour être quantitatif. Puisqu'un pic de protéine a été détecté par CE-LIF après la collecte, il serait intéressant de tenter une séparation d'un mélange de protéines fluorescentes à différentes conditions de BGE afin de poursuivre les séparations CE semi-préparatrices à plusieurs dimensions.

Les cartes peptidiques de l'alb-FITC collectée issues de la digestion de la protéine par la CT libre et CT-GA ont pu être tracées. Les électrophérogrammes semblaient représenter des digestions partielles de la protéine alb-FITC, et donc l'espoir que le système proposé pourrait marcher.

Étant donné les conclusions exposées précédemment, il serait intéressant d'utiliser la CE-LIF avec le revêtement de DDAB pour un mélange plus complexe puisque les limites de détections sont plus basses pour ce mode de détection et que le DDAB est «invisible» avec cette méthode de détection. Par contre, il faudrait vérifier que la présence de DDAB n'empêcherait pas la digestion enzymatique. Aussi, puisque les analyses ont démontré que le revêtement s'écoulait après chaque injection, il serait intéressant d'essayer de travailler avec un revêtement permanent pour conserver la méthode de détection par CE-UV.

Finalement, pour poursuivre les travaux, une stratégie complète qui inclurait plusieurs conditions de BGE démontrerait la faisabilité de l'approche proposée. Par exemple, une première collecte de fraction effectuée à de bas pH (plus petit que 2) de mélange standard de protéines. Puis, la collecte de fraction par un revêtement comme le DDAB, c'est-à-dire semi permanent et réversible, pourrait être effectué. Pour diminuer la dégradation du revêtement, un sel zwitterionique en forte concentration pourrait augmenter la force ionique du milieu et ainsi augmenter la stabilité de ce revêtement. Une vérification de son interférence lors de la digestion serait important, évidemment. Pour finir ce processus de fractionnement, la séparation de ce même mélange à haut pH pourrait compléter la gamme de séparation. Ensuite, chaque collecte pourrait être analysée par cartographie peptidique ou protéique pour tenter d'en identifier les composantes et exploiter la redondance d'une protéine donnée.

5. Références

1. Malina, R.M., *Variation in body composition associated with sex and ethnicity*, in *Human Body Composition*, Heymsfield, S.N., Lohman, T.G., Wang, Z. et Going, S.B., Editors. 2005, Human Kinetics: Champaign. 271-297.
2. Chandramouli, K. et Qian, P.-Y., *Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity*. *Human Genomics and Proteomics*, 2009, **1**(1): 1-22.
3. Lefkovits, I., *Functional and structural proteomics: a critical appraisal*. *Journal of Chromatography B*, 2003, **787**(1): 1-10.
4. Voet, D. et Voet, J.G., *Biochemistry*. 3rd ed. 2004, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. pp. 1591.
5. Savaryn, J., Catherman, A., Thomas, P., Abecassis, M. et Kelleher, N., *The emergence of top-down proteomics in clinical research*. *Genome Medicine*, 2013, **5**(6): 53.
6. Chait, B.T., *Mass Spectrometry: bottom-up or top-down?* *Science*, 2006, **314**(5796): 65-66.
7. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, **250**(10): 4007-4021.
8. Khan, M.F., Bennett, M.J., Jumper, C.C., Percy, A.J., Silva, L.P. et Schriemer, D.C., *Proteomics by mass spectrometry—go big or go home?* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, **55**(4): 832-841.
9. Ning, Z., Zhou, H., Wang, F., Abu-Farha, M. et Figeys, D., *Analytical aspects of proteomics: 2009–2010*. *Analytical Chemistry*, 2011, **83**(12): 4407-4426.
10. Xie, F., Smith, R.D. et Shen, Y., *Advanced proteomic liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2012, **1261**(0): 78-90.
11. Wu, Q., Yuan, H., Zhang, L. et Zhang, Y., *Recent advances on multidimensional liquid chromatography—mass spectrometry for proteomics: from qualitative to quantitative analysis—A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2012, **731**(0): 1-10.
12. Yassine, M.M. et Lucy, C.A., *Preparative capillary zone electrophoresis using a dynamic coated wide-bore capillary*. *Electrophoresis*, 2006, **27**(15): 3066-3074.
13. Migneault, I., Dartiguenave, C., Vinh, J., Bertrand, M.J. et Waldron, K.C., *Two glutaraldehyde-immobilized trypsin preparations for peptide mapping by capillary zone electrophoresis, liquid chromatography, and mass spectrometry*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2008, **31**(6): 789-806.
14. Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. et Waldron, K.C., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. *BioTechniques*, 2004, **37**(5): 790-6, 798.
15. Migneault, I., Dartiguenave, C., Vinh, J., Bertrand, M. et Waldron, K.C., *Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2004, **25**(9): 1367-78.
16. Bonneil, E., Mercier, M. et Waldron, K.C., *Reproducibility of a solid-phase trypsin microreactor for peptide mapping by capillary electrophoresis*. *Analytica Chimica Acta*, 2000, **404**(1): 29-45.
17. Bonneil, E. et Waldron, K.C., *Characterization of a solid-phase extraction device for discontinuous on-line preconcentration in capillary electrophoresis-based peptide*

- mapping*. Journal of Chromatography. B Biomedical sciences and applications, 1999, **736**(1-2): 273-87.
18. Bonneil, E. et Waldron, K.C., *On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations*. Talanta, 2000, **53**(3): 687-99.
 19. Dartiguenave, C., Hamad, H. et Waldron, K.C., *Immobilization of trypsin onto 1,4-diisothiocyanatobenzene-activated porous glass for microreactor-based peptide mapping by capillary electrophoresis: effect of calcium ions on the immobilization procedure*. Analytica Chimica Acta, 2010, **663**(2): 198-205.
 20. Ghafourifar, G., Fleitz, A. et Waldron, K.C., *Development of glutaraldehyde-crosslinked chymotrypsin and an in situ immobilized enzyme microreactor with peptide mapping by capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2013, **34**(12): 1804-1811.
 21. Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland, J. et Jänsch, L., *Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species*. Proteomics, 2005, **5**(6): 1544-1557.
 22. Weinberger, R., *Practical Capillary Electrophoresis*. 2nd ed. 2000, Boston: Academic Press, Inc. pp. 462.
 23. Corstjens, H., Billiet, H.A.H., Frank, J. et Luyben, K.C.A.M., *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): 137-143.
 24. Baker, D.R., *Capillary Electrophoresis*. 1995, New York: John Wiley & Sons, Inc. pp. 244.
 25. Palmieri, R. et Nolan, J., *Protein capillary electrophoresis: theoretical and experimental considerations for methods development*, in *Handbook of Capillary Electrophoresis*, Landers, J.P., Editor. 1994, CRC Press, Inc: Florida. 325-368.
 26. Chen, D.Y. et Dovichi, N.J., *Yoctomole detection limit by laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B, 1994, **657**(2): 265-269.
 27. Gilman, S.D. et Ewing, A.G., *Analysis of single cells by CE with on-column derivatization and LIF detection*. Analytical Chemistry, 1995, **67**(1): 58-64.
 28. Seger, C., Sturm, S. et Stuppner, H., *Mass spectrometry and NMR spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques - state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations*. Natural Product Reports, 2013, **30**(7): 970-987.
 29. Zhao, S.S., Zhong, X., Tie, C. et Chen, D.D.Y., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for analysis of complex samples*. Proteomics, 2012, **12**(19-20): 2991-3012.
 30. Ramautar, R., Heemskerk, A.A.M., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M., Busnel, J.-M. et Mayboroda, O.A., *CE-MS for proteomics: advances in interface development and application*. Journal of Proteomics, 2012, **75**(13): 3814-3828.
 31. Hommerson, P., Khan, A.M., de Jong, G.J. et Somsen, G.W., *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application*. Mass Spectrometry Reviews, 2011, **30**(6): 1096-1120.
 32. Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P. et Křivánková, L., *Recent advances in CE-MS: synergy of wet chemistry and instrumentation innovations*. Electrophoresis, 2011, **32**(1): 43-51.
 33. Haselberg, R., de Jong, G.J. et Somsen, G.W., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010*. Electrophoresis, 2011, **32**(1): 66-82.
 34. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. 6th ed. 2003, New York: Freeman. pp. 744.

35. Stutz, H., *Protein attachment onto silica surfaces – a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*. *Electrophoresis*, 2009, **30**(12): 2032-2061.
36. Schwatz, H. et Pritchett, T., *Separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis : application to analytical biotechnology*. 1994, Fullerton California: Beckman Instruments, Inc.
37. El Rassi, Z., *Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: an update covering 2007–2009*. *Electrophoresis*, 2010, **31**(1): 174-191.
38. Doherty, E.A.S., Meagher, R.J., Albarghouthi, M.N. et Barron, A.E., *Microchannel wall coatings for protein separations by capillary and chip electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2003, **24**(1-2): 34-54.
39. Dolník, V., *Capillary electrophoresis of proteins 2005–2007*. *Electrophoresis*, 2008, **29**(1): 143-156.
40. Lauer, H.H. et McManigill, D., *Capillary zone electrophoresis of proteins in untreated fused silica tubing*. *Analytical Chemistry*, 1986, **58**(1): 166-170.
41. Bushey, M.M. et Jorgenson, J.W., *Capillary electrophoresis of proteins in buffers containing high concentrations of zwitterionic salts*. *Journal of Chromatography A*, 1989, **480**(0): 301-310.
42. Bullock, J.A. et Yuan, L.-C., *Free solution capillary electrophoresis of basic proteins in uncoated fused silica capillary tubing*. *Journal of Microcolumn Separations*, 1991, **3**(3): 241-248.
43. Fermas, S., Daniel, R. et Gonnet, F., *The polyethylene oxide capillary coating is compatible with capillary electrophoresis–mass spectrometry analysis of basic proteins*. *Analytical Biochemistry*, 2008, **372**(2): 258-260.
44. Bateman, K.P., Kelly, J.F., Thibault, P., Ramaley, L. et White, R.L., *Glycoprotein analysis by capillary zone electrophoresis–electrospray mass spectrometry*, in *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*, Thibault, P. et Honda, S., Editors. 2003, Humana Press, Inc.: Totowa. 219-240.
45. Magrane, M. et UniProt-Consortium. *UniProt knowledgebase: a hub of integrated protein data*. Consulté en janvier 2010]; Available from: <http://database.oxfordjournals.org/content/2011/bar009.abstract>.
46. Putnam, C. *Protein Calculator v 3.3*. Consulté le 10 juin 2010]; Available from: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>.
47. Gulcev, M.D., McGinitie, T.M., Bahnasy, M.F. et Lucy, C.A., *Surfactant bilayer coatings in narrow-bore capillaries in capillary electrophoresis*. *Analyst*, 2010, **135**(10): 2688-2693.
48. Svitova, T.F., Smirnova, Y.P., Pisarev, S.A. et Berezina, N.A., *Self-assembly in double-tailed surfactants in dilute aqueous solutions*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1995, **98**(1–2): 107-115.
49. Baryla, N.E., Melanson, J.E., McDermott, M.T. et Lucy, C.A., *Characterization of surfactant coatings in capillary electrophoresis by atomic force microscopy*. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**(19): 4558-4565.
50. Mohabbati, S., Hjertén, S. et Westerlund, D., *Studies on the analytical performance of a non-covalent coating with N,N-didodecyl-N,N-dimethylammonium bromide for separation of basic proteins by capillary electrophoresis in acidic buffers in 25- and 50- μ m capillaries*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, **390**(2): 667-678.
51. Brody, J.R. et Kern, S.E., *History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis*. *Analytical Biochemistry*, 2004, **333**(1): 1-13.

52. Rush, R.S., Cohen, A.S. et Karger, B.L., *Influence of column temperature on the electrophoretic behavior of myoglobin and alpha-lactalbumin in HPCE*. Analytical Chemistry, 1991, **63**(14): 1346-1350.
53. Yassine, M.M. et Lucy, C.A., *Factors affecting the temporal stability of semipermanent silayer coatings in capillary electrophoresis prepared using double-chained surfactants*. Analytical Chemistry, 2004, **76**(11): 2983-2990.
54. Golovanov, A.P., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A. et Lian, L.-Y., *A simple method for improving protein solubility and long-term stability*. Journal of the American Chemical Society, 2004, **126**(29): 8933-8939.
55. Goldfarb, A.R., Saidel, L.J. et Mosovich, E., *The ultraviolet absorption spectra of proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1951, **193**(1): 397-404.
56. Gan, S.M. *Détermination du rendement de digestion et de la recouvrement des peptides issus d'un microréacteur enzymatique par CE-LIF*. Mémoire de Maîtrise, au Département de chimie. 2010: Université de Montréal.
57. Craig, D.B. et Dovichi, N.J., *Multiple labeling of proteins*. Analytical Chemistry, 1998, **70**(13): 2493-2494.
58. Banks, P.R. et Paquette, D.M., *Monitoring of a conjugation reaction between fluorescein isothiocyanate and myoglobin by CZE*. Journal of Chromatography A, 1995, **693**: 145-154.
59. Nguyen, Q.V. *Développement d'un microréacteur à base d'enzyme protéolytique réticulée avec le glutaraldéhyde pour la cartographie peptidique*. Mémoire de maîtrise, au Département de chimie. 2008: Université de Montréal.

Annexe 1. Méthode de calcul de la charge d'une protéine

Exemple de calculs de la charge d'une protéine en fonction du pH.

Tout d'abord, pour trouver la charge de la protéine, il faut connaître sa structure primaire. Pour ceci, il faut faire appel à la littérature ou aux outils informatiques actuels. Prenons l'exemple de la protéine BSA ou l'albumine de sérum de bovin pour chercher sa séquence primaire.

a) Trouver l'origine de la protéine :

Le site du fournisseur, dans ce cas *Sigma-Aldrich*, donne des informations sur l'origine de la molécule. Puis, une recherche est faite sur le site d'Uniprot.org qui permet au chercheur de trouver plusieurs paramètres importants tel que le point isoélectrique. Le BSA a l'identifiant P02769 dans ce site.

b) Trouver la séquence de la protéine :

La séquence d'acides aminés est trouvée dans sous la rubrique «*Sequences*» du site *Uniprot.org*

c) Calculer la charge à différent pH :

Sous la rubrique «*Sequences*», la séquence d'acide aminé peut être copiée et collée dans l'outil *PROTEIN CALCULATOR v3.3*. [46]. L'outil permet de sélectionner le pH ou de fournir un tableau de pH en fonction de la charge comme montré dans le tableau suivant.

Tableau A-13. Tableau de la charge portée par BSA (P02769) en fonction du pH obtenu avec le logiciel *PROTEIN CALCULATOR v 3.3*.

pH	Charge
4.00	74.9
4.50	47.7
5.00	23.4
5.50	9.7
6.00	2.2
6.50	-4.1
7.00	-9.9
7.50	-15.1
8.00	-22.2
8.50	-33.6
9.00	-47.8
9.50	-65.3
10.00	-88.7

Annexe 2 Exemple de calcul de la masse collectée après une séparation

Tableau A-14. Variation du volume d'échantillon injecté en fonction du diamètre interne du capillaire de L_T de 60 cm (L_D de 50 cm) si l'injection est de 5 s \times 0,5 psi et la concentration de l'analyte est de 1 mg/mL.

Diamètre du capillaire (μm)	Volume du capillaire (nL)	Volume injecté (nL)	Masse injectée (ng)	Masse après 10 injections (ng)	Concentration à la sortie* (mg/mL)	Facteur de dilution
50	1180	4,9	4,9	49	$3,3 \times 10^{-05}$	3×10^5
75	2650	25	25	250	17×10^{-04}	$0,6 \times 10^5$

*volume du réservoir de collecte de 1,5 mL.

Le logiciel *CE Expert* permet de calculer la masse d'un analyte injecté avec les valeurs de pressions et des dimensions de capillaire mentionnée dans le tableau A-2. En considérant que la masse injectée est récupéré à 100%, la concentration obtenue en divisant la masse par le volume de la fraction qui peut être estimée à 1,5 mL (le volume du vial contenant le tampon). Puis, le facteur de dilution est obtenu en divisant la concentration de la solution injectée par la concentration obtenue à fin et en multipliant le tout par 10, dû aux 10 injections effectuées.

Annexe 3 Données brutes d'application du DDAB sans régénération

Tableau A-15. Suivi du EOF (temps de migration de MO, 1 mM, et l'aire du pic à $\lambda=240$ nm) pour 4 injections^a après application du revêtement DDAB, 1 mM dissout dans l'eau en fonction de la concentration de BGE, de la température d'entreposage du DDAB et de la température du capillaire.

C _{BGE}	T _{entrepos.}	T _{cap.}	Temps de migration (min) et Aire (x10 ³) du pic MO				
			1 ^{er} inj.	2 ^e inj.	3 ^e inj.	4 ^e inj.	
50 mM	25°C	25°C	t _m	7,66	N/D	1,65	N/D
			Aire	109	N/D	174	N/D
		15°C	t _m	20	0	20	0,31
			Aire	N/I	N/I	N/I	N/I
	4°C	25°C	t _m	9,54	N/D	N/D	N/D
			Aire	121	N/D	N/D	N/D
		15°C	t _m	13,45	N/D	PP	PP
			Aire	233	N/D	PP	PP
5 mM	25°C	25°C	t _m	6,75	9,95	14,3	19,06
			Aire	83,7	108	137	167
		15°C	t _m	8,11	10,28	12,77	15,58
			Aire	55,5	56,6	62,3	74,4
	4°C	25°C	t _m	7,6	9,95	13,13	16,88
			Aire	84,7	86,2	111	135
		15°C	t _m	8,47	10,19	12,23	Erreur
			Aire	53,2	45,5	52,1	Erreur

^a Séparation à -10 kV dans un capillaire de D.I. = 75 μ m, L_T = 61 cm et de L_D = 51 cm avec un tampon d'acétate de lithium à pH 5.

^b N/D : aucun signal détecté qui pourrait être attribué à MO

^c N/I ; n'est pas intégré.

^d PP : plusieurs pics détectés à 240nm.

^e erreur : erreur d'acquisition

Tableau A-16. Suivi du EOF (temps de migration de MO, 1 mM, et l'aire du pic à $\lambda=240$ nm) pour 4 injections^a après l'application du revêtement DDAB, 1 mM dissout dans le BGE en fonction de la concentration de BGE, de la température d'entreposage du DDAB et de la température du capillaire.

C _{BGE}	T _{entrepos.}	T _{cap.}	Temps de migration (min) et Aire (x10 ³) du pic MO				
			1 ^{er} inj.	2 ^e inj.	3 ^e inj.	4 ^e inj.	
50 mM	25°C	25°C	t _m	8,69	N/D	N/D	N/D
			Aire	61,8	N/D	N/D	N/D
		15°C	t _m	13,44	14,2	14,84	N/D
			Aire	150	146	144	N/D
	4°C	25°C	t _m	11,34	N/D	PP	12,413
			Aire	232	N/D	PP	199
		15°C	t _m	N/D	N/D	N/D	N/D
			Aire	N/D	N/D	N/D	N/D
5 mM	25°C	25°C	t _m	8,18	N/D	7,05	N/D
			Aire	152	N/D	191	N/D
		15°C	t _m	7,58	9,06	10,99	13,18
			Aire	163	167	214	221
	4°C	25°C	t _m	8,48	N/D	2,04	N/D
			Aire	125	N/D	193	N/D
		15°C	t _m	9,12	N/D	PP	N/D
			Aire	94,8	N/D	PP	N/D

^a Séparation à -10 kV dans un capillaire de D.I. = 75 μ m, L_T = 61 cm et de L_D = 51 cm avec un tampon d'acétate de lithium à pH 5.

^b N/D : aucun signal détecté qui pourrait être attribué à MO

^c N/I ; n'est pas intégré.

^d PP : plusieurs pics détectés à 240nm.

^e erreur : erreur d'acquisition

La lecture des tableaux 14 et 15 est complexe puisque ces 16 séparations étaient répétées chacune 4 fois et donc les tendances ne sont pas faciles à déceler à partir des données brutes. Pour simplifier l'analyse des résultats, les données pertinentes ont été extraites et montrées sur les Figure 14 à 17. Les données sont pertinentes lorsque la séparation permet de détecter au moins 3 valeurs consécutives de t_m du MO. Lorsque les pics ne sont pas détectés (N/D dans les tableaux 14 et 15) et qu'il y a au moins un t_m observé, cela signifie que le EOF change entre chaque injection de MO. Lorsque les pics sont détectés 1 fois sur 2, une hypothèse possible est que le pic provient de l'injection précédente. Par

exemple, dans la première série d'injection du tableau 14 la première injection donnait un pic dont le t_m est de 7,66 min, la seconde injection ne donnait aucun pic et la troisième donnait un pic à 1,65 min. Par ailleurs, l'observation de plusieurs pics (PP) pouvait se traduire par la détection du MO qui provenait de l'injection précédente (voir 4^e série de données dans le tableau 14). Puis, lorsqu'un pic n'était pas intégré (N/I) cela signifiait qu'une augmentation de la ligne de base était observée, mais ne permettait pas d'affirmer qu'il s'agissait d'un pic de MO. Alors, les injections qui ont permis d'observer le pic de MO à 3 injections consécutives ont été utilisées pour tracer les courbes sur les figures 14 à 17.

Annexe 4. Données brutes des analyses par MS des fractions F2 et F3

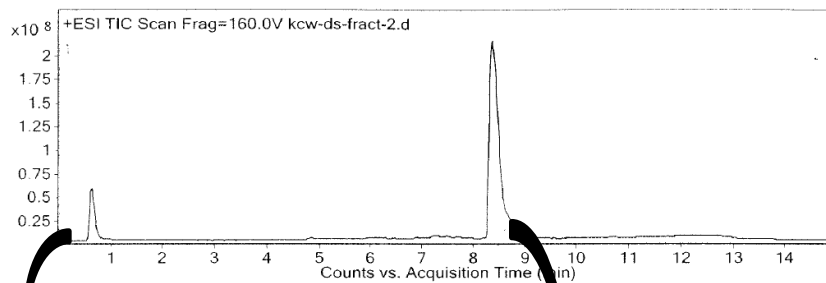
Analyse en MS de la fraction F2 obtenue lors de la collecte effectuée avec un capillaire muni d'un revêtement DDAB. Les masses molaires des protéines sont listées dans le tableau 1.

Data File	kcw-ds-fract-2.d	Sample Name	kcw-ds-fract-2
Sample Type	Sample	Position	P1-D3
Analysis Date	4/14/2011 2:02:43 PM	User Name	Marie-Christine
Acq Method	LCprot_20_90_15min.m	DA Method	LCprot_20_90_15min.m

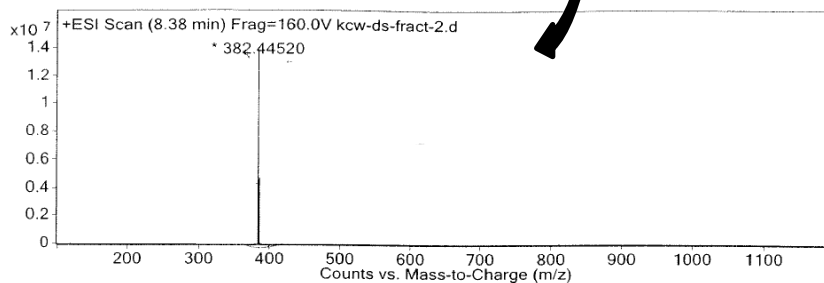
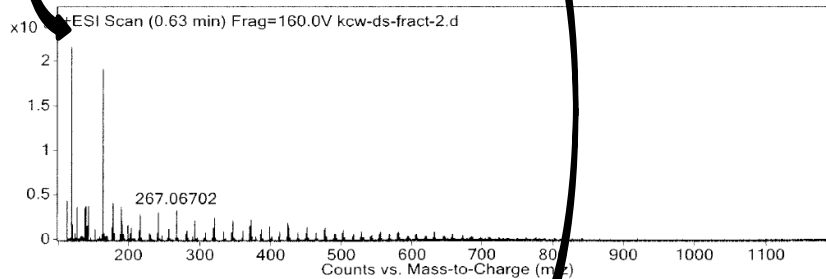
Comment

Formula

User Chromatograms



User Spectra



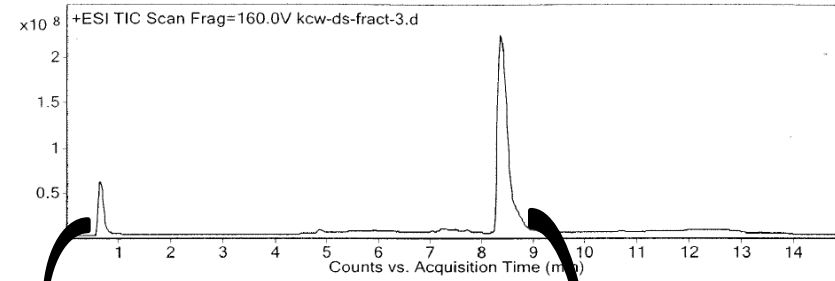
Analyse en MS de la fraction F3 obtenue lors de la collecte effectuée avec un capillaire muni d'un revêtement DDAB.

Data File	kcw-ds-fract-3.d	Sample Name	kcw-ds-fract-3
Sample Type	Sample	Position	P1-D4
Analysis Date	4/14/2011 2:19:11 PM	User Name	Marie-Christine
Acq Method	LCprot_20_90_15min.m	DA Method	LCprot_20_90_15min.m

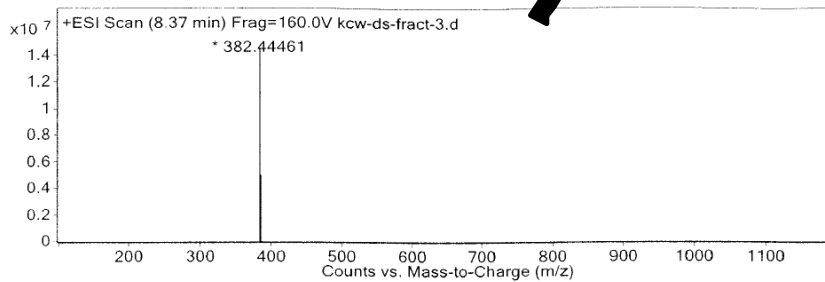
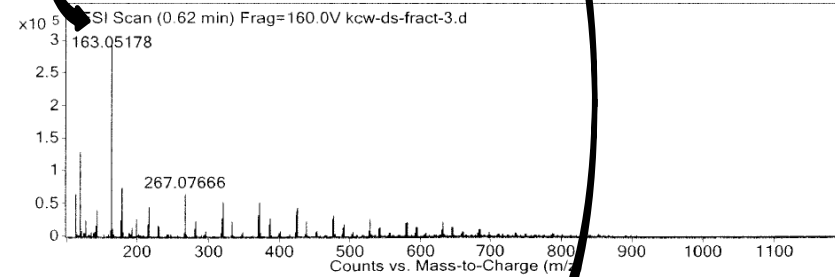
Comment

Formula

User Chromatograms



Use Spectra



Note. Les fractions F2 et F3 correspondent aux sous-échantillons obtenues lors de la collecte de fraction d'un mélange de protéines illustrés à figure 20.