

Nouvelles méthodologies analytiques en électrophorèse capillaire

Application à la caractérisation de polymères et de polypeptides

Hervé Cottet

Résumé L'électrophorèse capillaire est une technique performante pour la séparation et la caractérisation des polymères ou polypeptides de synthèse. Selon le polymère considéré (uniformément chargé, chargé à(aux) l'extrémité(s) de la chaîne ou non chargé) et selon l'hétérogénéité de sa composition (masse molaire, composition chimique, fonctionnalité, architecture macromoléculaire), différents modes de séparation peuvent être mis en œuvre (séparation en milieu libre, en présence de gel ou de solution de polymère enchevêtré, en mode micellaire). Plusieurs applications utilisant de nouvelles méthodologies analytiques en électrophorèse capillaire sont présentées : séparation selon la fonctionnalité et la masse molaire de polypeptides synthétiques en milieu non aqueux, caractérisation de systèmes polymères complexes composés de copolymères diblocs associatifs, séparation bidimensionnelle de polyélectrolytes de différents taux de charge et de différentes masses molaires, étude de la conformation de polypeptides à partir de la modélisation des mobilités électrophorétiques.

Mots-clés **Électrophorèse capillaire, polymères, copolymères, polyélectrolytes, séparations bidimensionnelles, conformation.**

Abstract **New analytical strategies in capillary electrophoresis: application to the characterization of polymers and polypeptides**

Capillary electrophoresis is a powerful separation technique for the characterization of synthetic polymers. According to the nature of the polymer (evenly charged, end-charged or uncharged) and to the heterogeneity of its composition (molar mass, chemical composition, functionality distributions or differences in macromolecular architectures), different modes of separation can be implemented (in free solution, in gel or entangled polymer solution, in micellar mode). Different examples of applications using new analytical strategies in capillary electrophoresis are presented: separation according to the functionality and the molar mass of synthetic polypeptides in non aqueous electrolytes, characterization of complex polymer systems constituted of associative dibloc copolymers, bidimensional separation of polyelectrolytes differing in their chemical charge rate and molar masses, study of the polypeptide conformations from the modelling of electrophoretic mobilities.

Keywords **Capillary electrophoresis, polymers, copolymers, polyelectrolytes, bidimensional separation, conformation.**

Séparation sous champ électrique dans une veine liquide

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative analytique basée sur la migration différentielle d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique. Dans son mode le plus répandu (électrophorèse capillaire de zone), le capillaire de fin diamètre (typiquement 50 μm) ainsi que les flacons situés à l'entrée et à la sortie du capillaire sont remplis d'un même électrolyte de séparation (*figure 1*). Généralement, les séparations sont réalisées dans des capillaires en silice fondue de 30 à 100 cm de longueur. De par la dimension du diamètre interne du capillaire, l'EC est une méthode séparative miniaturisée consommant peu d'électrolyte et nécessitant de faibles volumes d'échantillon : le volume total du capillaire représente généralement moins d'un μL , tandis que les volumes d'échantillon injectés sont de l'ordre de quelques nL. Une fois injectés, les solutés de l'échantillon acquièrent un état d'ionisation qui dépend de leurs propriétés acido-basiques et du pH de l'électrolyte.

Sous l'influence du champ électrique constant appliqué lors de la séparation électrophorétique, les solutés chargés migrent vers le point de détection. Les champs électriques appliqués sont généralement très élevés (~ 500 à 1 000 V/cm) afin d'obtenir des séparations rapides. Il en résulte un pouvoir résolutif élevé, dû notamment à de grandes efficacités de séparation. La détection s'effectue souvent par absorbance UV, directement au travers du capillaire. Il existe aussi d'autres modes de détection, tels que la fluorescence induite par laser, la spectrométrie de masse ou la conductimétrie.

En l'absence de flux électro-osmotique, les espèces cationiques et anioniques ne peuvent être détectées simultanément puisqu'elles migrent en sens opposé. En revanche, en présence d'un tel flux, la détection simultanée de cations et d'anions est possible (*figure 2*). Lorsqu'on utilise un capillaire de silice vierge en milieu basique, les groupements silanols sont ionisés (silanolates) et génèrent une charge négative à la surface interne du capillaire. La double couche de contre-ions en vis-à-vis de cette surface

chargée est mobilisée sous l'influence du champ électrique. Par effet de viscosité, ce mouvement des contre-ions est à l'origine d'un flux de solvant cathodique nommé flux électro-osmotique (FEO) [1]. Dans ce cas, les cations migrent dans le même sens que le FEO tandis que les anions migrent à contre-flux. En conséquence, les cations sont détectés en premier, les espèces neutres en second et les anions en dernier (*figure 2*).

Les polymères de synthèse : mélanges complexes de (macro)molécules hétérogènes

Les biopolymères (ADN et protéines, par exemple) sont généralement peu polydisperses : leur masse molaire et leur composition chimique sont souvent bien définies. De par l'imperfection intrinsèque des réactions de polymérisation, les polymères synthétiques présentent en revanche plusieurs sources d'hétérogénéité ; on citera notamment la distribution en masse molaire, la distribution en fonctionnalité (nature chimique des extrémités des chaînes macromoléculaires), la distribution en composition chimique (notamment dans le cas de copolymères), ou encore les différences d'architecture macromoléculaire (chaînes linéaires, chaînes branchées ou hyperbranchées, copolymères blocs ou statistiques...).

L'utilisation de l'EC pour la séparation des biopolymères (ADN, protéines, polysaccharides) est désormais bien établie [2]. En revanche, son utilisation pour la séparation et la caractérisation des polymères synthétiques ionisés (polyélectrolytes) ou ionisables (polymères neutres pouvant être chargés par interaction avec des molécules chargées) a été relativement peu considérée et reste méconnue des chimistes des polymères. Pourtant, les avantages de l'EC pour la séparation des biopolymères (efficacité de séparation élevée, absence de phase stationnaire, absence d'interactions parasites, séparation en milieu ouvert, rapidité des analyses) restent valables pour les polymères synthétiques [3-4]. Par ailleurs, comme nous allons le montrer par la suite, les mécanismes de séparation étant très différents de ceux rencontrés en chromatographie, l'EC s'avère être complémentaire d'autres méthodes séparatives plus couramment utilisées dans ce domaine telles que la chromatographie d'exclusion stérique ou la chromatographie d'interaction [5]. Enfin, compte tenu de la complexité croissante des architectures macromoléculaires développées actuellement (copolymère di- ou multiblocs, copolymères séquencés ou statistiques, latex ou colloïdes décorés par des bras macromoléculaires, polymères branchés ou hyperbranchés, structures macromoléculaires associatives...), la caractérisation complète des polymères de synthèse nécessite l'utilisation de techniques expérimentales complémentaires.

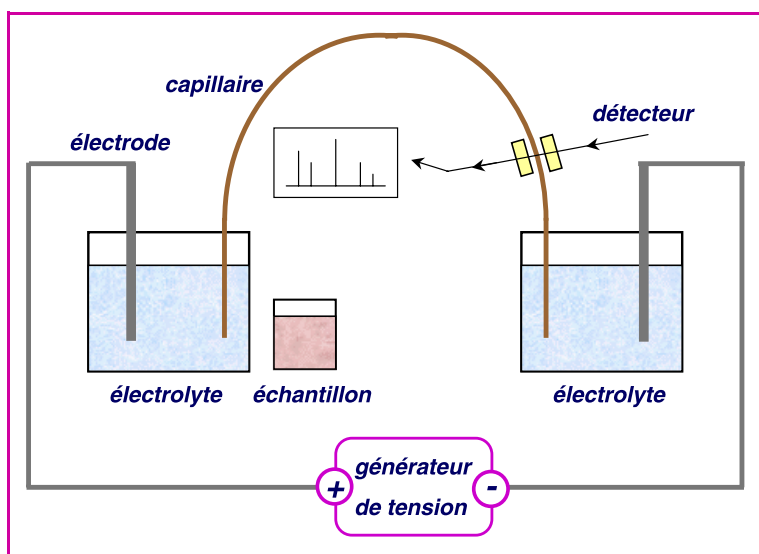


Figure 1 - Schéma de principe d'un appareillage d'électrophorèse capillaire (EC).

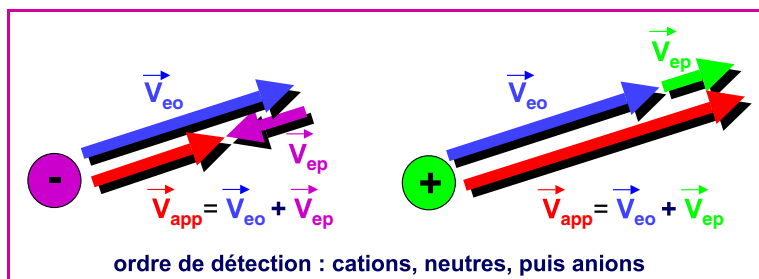


Figure 2 - Schéma expliquant l'ordre de détection des cations et des anions en électrophorèse capillaire lors de la migration en présence d'un flux électro-osmotique cathodique (capillaire en silice vierge, milieu basique).

Le vecteur bleu représente la vitesse électro-osmotique, le vecteur rouge : la vitesse apparente des ions, et les vecteurs mauve et vert : les vitesses électrophorétiques effectives relatives aux ions considérés. La vitesse apparente des solutés est définie comme la somme vectorielle (ou algébrique) de la vitesse électro-osmotique et de la vitesse effective.

Séparation de polypeptides synthétiques selon la fonctionnalité et la masse molaire

La caractérisation de la distribution en fonctionnalité des macromolécules représente un enjeu pour le chimiste des polymères. En effet, la croissance des chaînes macromoléculaires s'effectue généralement par leurs extrémités. La connaissance de la répartition de ces chaînes en fonction de la nature chimique des extrémités nécessite la séparation de ces différentes populations. Parmi les techniques séparatives utilisées dans ce but, on citera notamment la chromatographie dans les conditions critiques (c'est-à-dire à la transition entre le régime d'exclusion stérique et le régime de chromatographie d'interaction).

L'électrophorèse capillaire permet aussi des séparations selon la fonctionnalité, notamment dans le cas de polymères ionisés à leurs extrémités. Un exemple d'application de l'EC en mode non aqueux (électrolyte de séparation à base d'un mélange méthanol/acétonitrile) pour la séparation de polypeptides synthétiques [6-8] est présenté *figure 3*. Les poly(trifluoroacétyl-L-lysines) (PTLL) sont des polypeptides précurseurs de la poly(L-lysine), synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle des N-carboxyanhydrides (NCA) correspondants, selon la réaction (1) présentée *figure 3*. La croissance de la chaîne macromoléculaire se fait par attaque nucléophile de la fonction amine terminale du polypeptide sur le NCA. Le polymère terminé par une fonction amine est qualifié de polymère vivant puisque la croissance de sa chaîne peut se poursuivre. Cependant, des réactions de terminaison (ou de désactivation, notées (2) dans la *figure 3*) peuvent modifier la fonctionnalité du polymère [6-8] ; ne pouvant plus croître, il est alors appelé polymère désactivé (ou polymère mort). Dans l'exemple présenté, la fonction N-terminale du polypeptide (représentée par

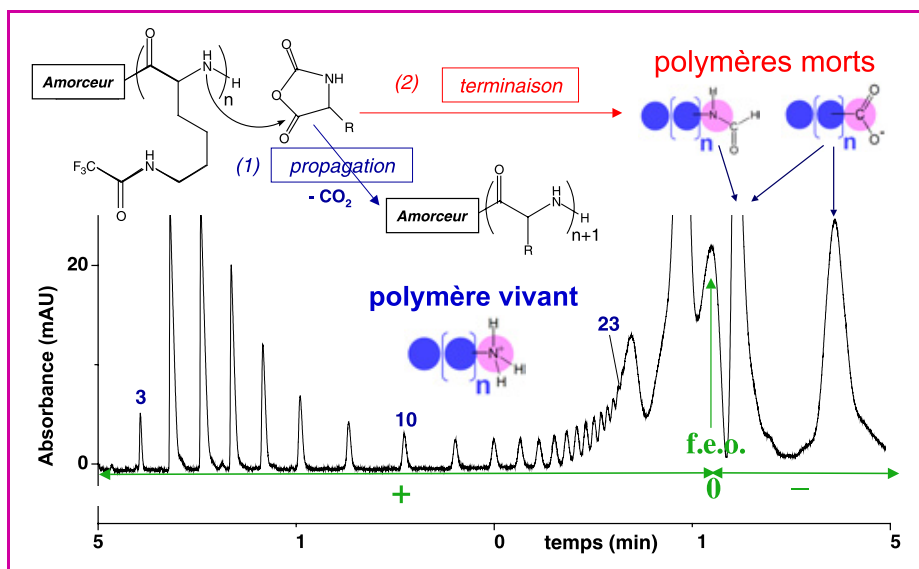


Figure 3 - Séparation selon la fonctionnalité et la masse molaire des poly(trifluoroacetyl-L-lysines) (PTLL) par électrophorèse capillaire en milieu non aqueux.

Capillaire en silice vierge, 48 cm (39,8 cm jusqu'au détecteur) x 50 µm. Électrolyte : 1 M acide acétique, 20 mM acétate d'ammonium dans un mélange méthanol/acétonitrile (87,5:12,5 v/v). Tension appliquée : + 30 kV. Échantillon : 5 g/L dans un mélange électrolyte/méthanol (50:50 v/v). Injection hydrodynamique : 17 mbar, 3 s. Détection UV à 200 nm. Identification : le nombre indiqué représente le degré de polymérisation des PTLL vivantes. feo : flux électro-osmotique, mAU : milliunités d'absorbance.

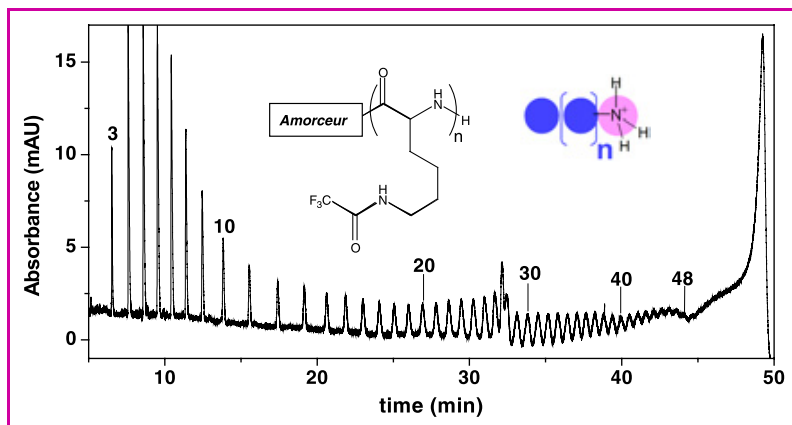


Figure 4 - Séparation des oligomères vivants des poly(trifluoroacetyl-L-lysines) (PTLL) par électrophorèse capillaire en milieu non aqueux.

Électrolyte : 1 M acide acétique, 20 mM acétate d'ammonium et 30 mM d'acide trifluoroacétique dans un mélange méthanol/acétonitrile (87,5:12,5 v/v). Autres conditions identiques à la figure 3.

commodité d'écriture côté droit de la macromolécule sur la figure 3) peut être une fonction amine (polymère vivant), une fonction N-formyle ou une fonction carboxylique (polymères morts) [6-8]. Ces familles de polypeptides de différentes fonctionnalités ont pu être identifiées grâce au couplage en ligne de l'EC avec la spectrométrie de masse [7]. Dans un électrolyte à base d'acide acétique (faiblement acide), la fonction amine N-terminale du polymère vivant est complètement protonée. Les polymères vivants sont cationiques et détectés avant le FEO [6-8]. Les oligomères des polymères vivants sont séparés et détectés dans l'ordre croissant de leur degré de polymérisation (n). En effet, plus celui-ci est élevé et plus la mobilité

électrophorétique (rapport charge sur masse) est faible pour un état d'ionisation donné. Les polymères morts sont en revanche détectés près du FEO comme des espèces neutres ou légèrement anioniques. La figure 4 montre le pouvoir résolutif élevé qu'il est possible d'atteindre en EC sur l'exemple de la séparation des polymères vivants des PTLL. La séparation est possible jusqu'à des degrés de polymérisation d'environ 50 monomères (soit ~ 10 000 g/mol).

En résumé, l'EC en milieu libre (c'est-à-dire dans un électrolyte ne contenant pas de gel) permet la séparation selon la fonctionnalité et selon la masse molaire de polymères ou oligomères chargés à leur(s) extrémité(s). Comme le montre cet exemple, et contrairement à certaines idées reçues, l'EC n'est pas limitée aux séparations en milieu aqueux. Par ailleurs, comme le montre l'exemple précédent, les séparations en milieu non aqueux dans des tampons volatils permettent le couplage de l'EC avec la spectrométrie de masse [7].

Caractérisation de systèmes polymères complexes : exemple des copolymères diblocs associatifs

Un second exemple d'application de l'EC concerne la caractérisation des copolymères diblocs associatifs [9-11]. Ces copolymères (souvent amphiphiles) ont tendance à s'associer sous forme de micelles macromoléculaires formées d'un cœur hydrophobe et de bras hydrophiles (voir figure 5, composé 1). Dans l'exemple présenté figure 5, le bloc hydrophobe est composé de poly(acétate de vinyle) (PVAc) et le bloc hydrophile, de poly(acide acrylique) (PAA) [10]. Ces copolymères diblocs sont obtenus par polymérisation successive des deux blocs au cours de laquelle, il n'est pas rare qu'une certaine proportion d'homopolymères de chacun des deux blocs soit obtenue (figure 5). Par ailleurs, ce système macromoléculaire complexe peut présenter une certaine quantité de copolymères diblocs libres en solution. En effet, compte tenu de la polydispersité de chacun des deux blocs, il est fréquent que certaines chaînes macromoléculaires composées d'un bloc hydrophile long et/ou d'un bloc hydrophobe court ne

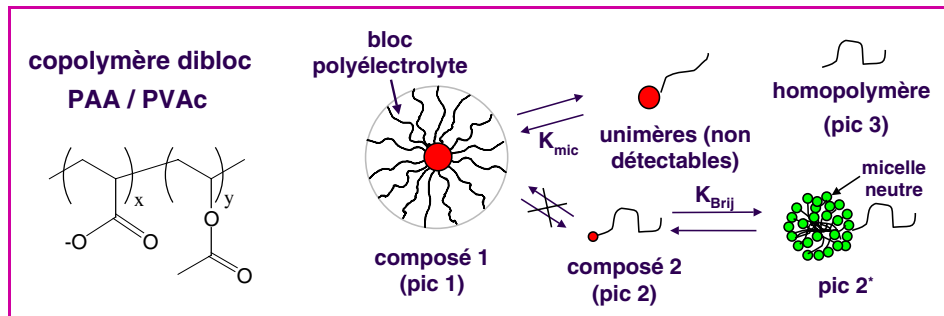


Figure 5 - Les différentes populations de (co)polymères pouvant coexister en solution dans le cas de copolymères diblocs associatifs. PAA : poly(acide acrylique), PVAc : poly(acétate de vinyle).

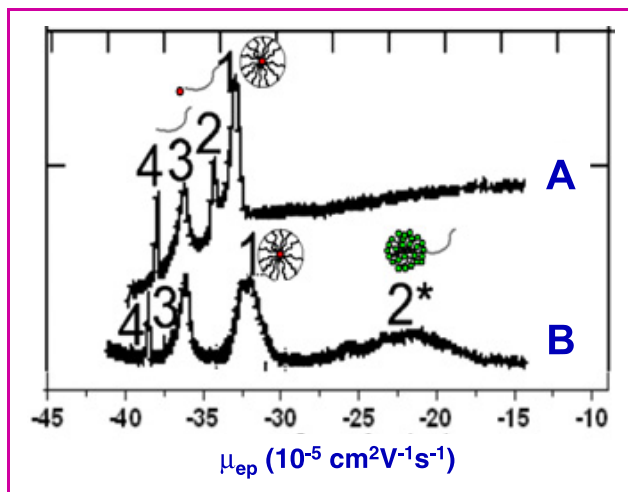


Figure 6 - Électrophérogramme en échelle de mobilité effective (μ_{ep}) montrant la séparation des différentes populations de (co)polymères présentes dans un échantillon de copolymères diblocs associatifs poly(acétate de vinyle-b-acide acrylique) de degrés de polymérisation moyens (115-140).

Capillaire en silice vierge, 33,5 cm (25 cm jusqu'au détecteur) \times 50 μ m. Électrolytes : (A) 160 mM borate de sodium, pH 9,2. (B) Électrolyte A + 5 mM polyoxyéthylène-23-dodécyl éther (Brij 35). Tension appliquée : + 8 kV. Échantillon : 10 g/L dans l'eau. Injection hydrodynamique : 17 mbar, 3 s. Détection UV à 200 nm. Identification des pics : voir figure 5.

puissent pas former de micelles (composé 2, figure 5) [10-11]. On notera que généralement, les concentrations micellaires critiques de ces systèmes sont très faibles, si bien que les chaînes de copolymère dibloc non associées en solution mais en équilibre avec la micelle sont présentes à des concentrations très faibles (voir figure 5, unimères non détectables).

L'électrophérogramme A de la figure 6 montre la séparation obtenue par EC dans le cas d'un copolymère poly(acétate de vinyle-b-acide acrylique) de degrés de polymérisation moyens (115-140). Le tampon borate utilisé comme électrolyte de séparation permet l'ionisation complète des monomères acide acrylique. Quatre pics sont détectés par ordre croissant de mobilité : le pic 1 correspond aux micelles de copolymères associatifs, le pic 2 aux chaînes de copolymères diblocs trop hydrophiles pour s'auto-associer, le pic 3 aux homopolymères polyélectrolytes (poly(acide acrylique)) et enfin, le pic 4 aux ions acétate. Compte tenu des différences de taux de charge et/ou de structure entre les populations présentes dans le mélange, la séparation de ces différentes populations de (co)polymères est obtenue aisément dans un milieu ouvert (milieu libre, sans gel) [10-11]. L'identification des pics 1 et 2 a été possible par ajout de tensioactif neutre dans l'électrolyte (électrophérogramme B, figure 6). En effet, en présence de micelles neutres, la mobilité du pic 2 est considérablement ralentie compte tenu de la formation d'un complexe copolymère/micelle neutre (pic 2*). En revanche, la mobilité du pic 1 (micelle de copolymères) et du pic 3 (homopolymère polyélectrolyte) est peu affectée par la présence des micelles de tensioactif neutre.

Ce second exemple illustre bien le potentiel de l'EC pour la caractérisation de systèmes polymères complexes composés de différentes populations. Cette application n'est pas limitée aux copolymères anioniques et peut aussi s'appliquer aux copolymères cationiques. Dans le cas de copolymères neutres, il est parfois possible d'obtenir des séparations en présence de micelles de tensioactifs chargés [4].

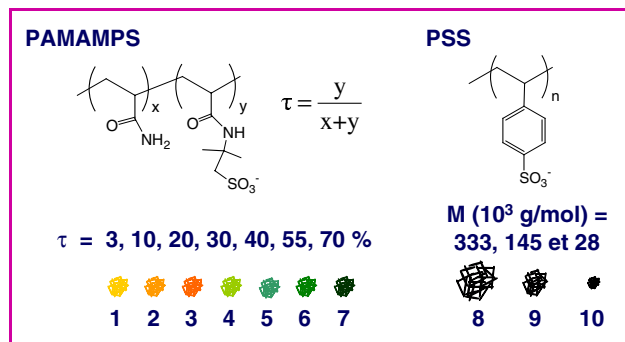


Figure 7 - Structure chimique d'un mélange de dix polyélectrolytes de différents taux de charge et de différentes masses molaires.

Les polyélectrolytes 1 à 7 sont des copolymères statistiques d'acrylamide et de 2-acrylamido-2-méthyl-propane sulfonate (PAMAMPS) de différents taux de charge τ . Les polyélectrolytes 8, 9 et 10 sont des poly(styrènesulfonates) (PSS) de différentes masses molaires comprises entre $28 \cdot 10^3$ et $333 \cdot 10^3$ g/mol.

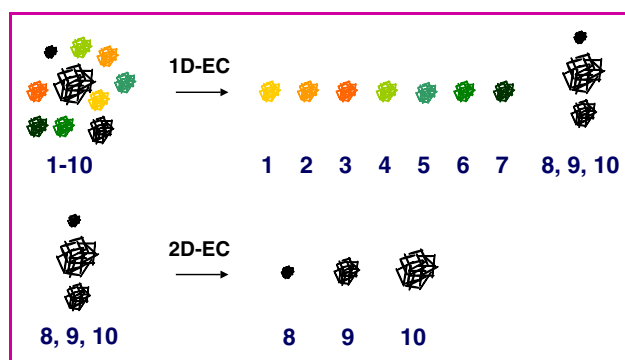


Figure 8 - Principe de la séparation bidimensionnelle du mélange de dix polyélectrolytes selon le taux de charge (en première dimension, 1D-EC) et la masse molaire (en seconde dimension, 2D-EC).

La première dimension de la séparation s'effectue en milieu libre, la seconde en présence d'une solution de polymères enchevêtrés (réseau séparateur).

Séparation bidimensionnelle de polyélectrolytes selon le taux de charge et la masse molaire

En milieu libre, l'EC permet de séparer les polymères chargés selon leur taux de charge, indépendamment de leur masse molaire. En présence d'une solution de polymères enchevêtrés ou de gel réticulé (réseau séparateur), il est possible de séparer les polyélectrolytes selon leur masse molaire. Récemment, il a été montré que ces deux modes de séparation peuvent être couplés pour réaliser des séparations bidimensionnelles par EC [12-14].

Considérons un mélange de dix polyélectrolytes constitué de (i) sept copolymères statistiques anioniques d'acrylamide et de 2-acrylamido-2-méthyl-propane sulfonate (PAMAMPS) de différents taux de charge τ compris entre 3 et 70 % (figure 7, composés 1 à 7), et (ii) de trois poly(styrènesulfonate) (PSS) de différentes masses molaires comprises entre $28 \cdot 10^3$ et $333 \cdot 10^3$ g/mol (figure 7, composés 8 à 10). La séparation bidimensionnelle par EC consiste à séparer en première dimension le mélange de polyélectrolytes selon leur taux de charge en milieu libre, puis à séparer les composés 8 à 10 en seconde dimension selon leur masse molaire en présence d'une solution de polymères enchevêtrés (figure 8).

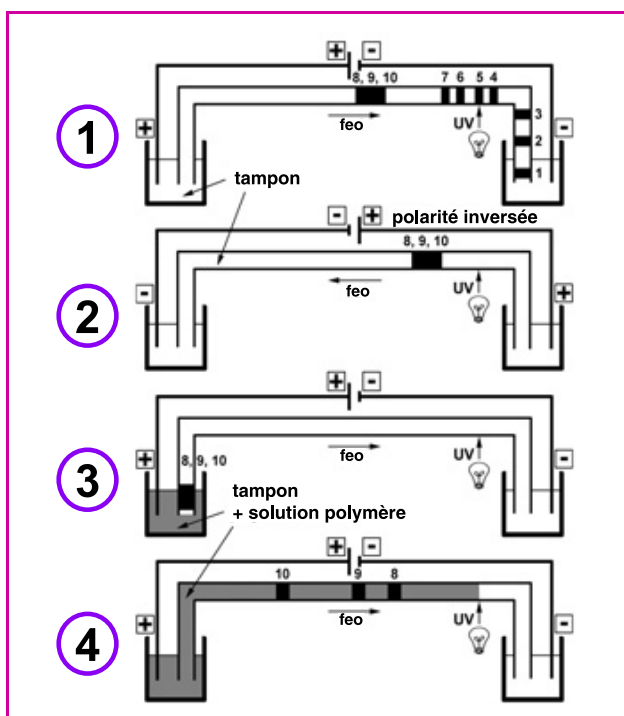


Figure 9 - Les quatre étapes impliquées dans la séparation bidimensionnelle de polyélectrolytes par électrophorèse capillaire. (1) : séparation selon le taux de charge par EC en milieu libre ; (2) : la fraction contenant les polyélectrolytes de taux de charge élevé et de différentes masses molaires est isolée dans le capillaire ; (3) : le polymère séparateur entre dans le capillaire par flux électro-osmotique ; (4) : séparation selon la masse molaire en présence du polymère séparateur.

Les quatre étapes clés permettant la mise en œuvre de cette séparation bidimensionnelle dans un seul capillaire sont décrites figure 9. La première étape consiste à réaliser une séparation des dix polyélectrolytes selon leur taux de charge en milieu libre (première dimension) dans un capillaire en silice vierge. Compte tenu de la migration des solutés (anions) à contre-flux électro-osmotique (voir figure 2, cas des anions), les polyélectrolytes de taux de charge le plus élevé (de plus grande mobilité effective) sont détectés en dernier. Les fractions 1 à 7, correspondant à des polyélectrolytes de différents taux de charge, sont séparés en milieu libre, tandis que les polymères de la fraction 8-10 (polyélectrolytes de différentes masses molaires) ne sont pas séparés. À la fin de la première étape, les fractions 1 à 7 sont évacuées côté sortie du capillaire et la fraction d'intérêt (fraction 8 à 10) est isolée dans le capillaire. Lors de la deuxième étape, la polarité de la séparation est inversée de façon à faire revenir la fraction 8-10 en tête de capillaire. À l'étape 3, le flacon d'électrolyte placé côté entrée du capillaire est remplacé par un flacon contenant le deuxième milieu de séparation, constitué du premier électrolyte auquel est ajouté un polymère neutre jouant le rôle de réseau séparateur. En polarité positive (flux électro-osmotique dirigé vers la sortie du capillaire), le réseau séparateur entre dans le capillaire avec une vitesse apparente égale à celle du flux électro-osmotique. Les solutés ayant une mobilité apparente plus faible que celle du flux électro-osmotique (migration à contre-flux), le second milieu de séparation dépasse la fraction 8-10, entraînant la séparation des polymères selon leur masse molaire (seconde dimension, étape 4). L'électrophérogramme correspondant aux étapes décrites est présenté figure 10. La première dimension de la

séparation s'effectue avant 4,65 min. L'ensemble des dix polyélectrolytes sont détectés après le flux électro-osmotique dans l'ordre des taux de charge croissants. Les polyélectrolytes 8 à 10 de différentes masses molaires ne sont pas séparés en milieu libre. Vers 6 min, la fraction d'intérêt 8-10 repasse devant le détecteur après avoir été isolée dans le capillaire (étape 2). Enfin, la séparation des polymères 8 à 10 selon la masse molaire est réalisée en présence d'un polymère séparateur (étape 4).

Cette nouvelle méthodologie permet de réaliser des séparations bidimensionnelles par électrophorèse en contournant la difficulté technique que représente le couplage de deux capillaires. Ces séparations constituées de séparations orthogonales entre elles (c'est-à-dire basées sur des caractéristiques moléculaires différentes) permettent une meilleure caractérisation des mélanges complexes de polymères. Au-delà de l'application aux polymères synthétiques, les séparations bidimensionnelles par EC réalisées dans un seul capillaire ouvrent de nombreuses possibilités pour la séparation des mélanges complexes, ou encore pour le couplage en ligne de la purification et de la séparation de mélanges de solutés.

Une autre approche bidimensionnelle innovante a été proposée pour la caractérisation des polymères. Elle consiste à coupler une première dimension de séparation électrophorétique avec une seconde dimension permettant la détermination des rayons hydrodynamiques des solutés séparés en première dimension [15]. Cette seconde dimension consiste à réaliser l'analyse de la dispersion de Taylor. Cette méthode absolue (sans étalonnage) de détermination des rayons hydrodynamiques (ou des coefficients de diffusion) est basée sur la dispersion d'une bande de soluté dans un tube capillaire ouvert sous l'influence d'un profil dispersif de vitesse (écoulement laminaire, profil parabolique des vitesses).

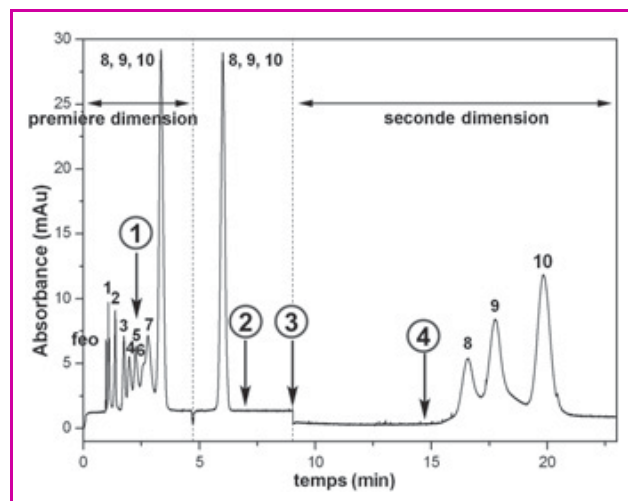


Figure 10 - Séparation bidimensionnelle de dix polyélectrolytes selon leur taux de charge (première dimension) et leur masse molaire (deuxième dimension).

Capillaire en silice vierge, 30 cm (20 cm jusqu'au détecteur) x 50 μ m. Électrolyte : tampon borate de sodium 80 mM, pH 9,2 (première dimension) ; tampon borate de sodium 80 mM, pH 9,2 contenant 0,2 g/100 mL d'hydroxyéthylcellulose (seconde dimension). Tension appliquée : t = 0-4,65 min, + 20 kV (première dimension) ; t = 4,65-9,05 min, - 20 kV ; t > 9,05 min, + 6 kV (seconde dimension). Injection hydrodynamique : 0,5 psi (« pound per square inch »), 3 s. Détection UV à 214 nm. L'état de la séparation aux quatre différentes étapes est décrit schématiquement dans la figure 9. Identification des pics : voir figure 7 ; feo : flux électro-osmotique.

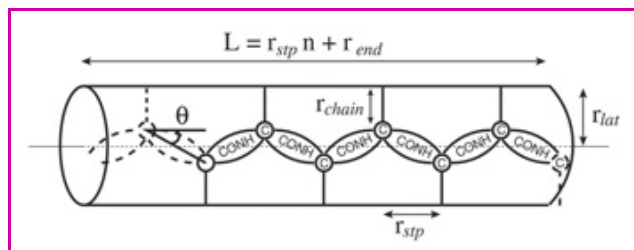


Figure 11 - Représentation schématique d'un oligopeptide dans une géométrie cylindrique.

L : longueur totale du cylindre, r_{lat} : rayon du cylindre, r_{chain} : longueur de la chaîne latérale, r_{stp} : distance entre deux monomères (ou résidus), r_{end} : longueur des extrémités de la chaîne, θ : angle de repliement de la chaîne principale.

Étude de la conformation de polypeptides à partir de la modélisation des mobilités électrophorétiques

L'étude et la modélisation de la mobilité électrophorétique permettent d'obtenir des informations quantitatives sur les paramètres géométriques moléculaires (et la conformation) des polymères étudiés [16]. Ces informations sont particulièrement intéressantes, notamment dans le cas des polypeptides dont les propriétés peuvent être très dépendantes de la structure géométrique. Un polypeptide est un polymère d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques planes et rigides. Pour un nombre limité de monomères (ou résidus), l'oligopeptide peut être représenté comme un cylindre de longueur totale L et de rayon latéral r_{lat} dépendant de la longueur de la chaîne latérale r_{chain} et du repliement de la chaîne principale quantifié par l'angle θ (voir figure 11). Toute variation de la conformation du peptide induit une variation de ces paramètres qui sont reliés entre eux selon les équations suivantes (valeurs en Å) :

$$r_{lat} = r_{chain} + 1,9 \sin(\theta + 15^\circ) \quad (1)$$

$$L = r_{end} + 3,64n \cos\theta \quad (2)$$

où r_{end} correspond à la longueur des groupements terminaux (un groupement -H et un groupement -OH dans le cas de peptides, soit 2 Å). Le coefficient de friction hydrodynamique γ_h de ce cylindre est directement relié à L et r_{lat} selon :

$$\gamma_h = \frac{3\pi\eta L}{\ln \frac{L}{2r_{lat}} + 0,312 + 1,13 \frac{r_{lat}}{L} + 0,4 \frac{r_{lat}^2}{L^2}} \quad (3)$$

La mobilité électrophorétique à dilution infinie $\mu^{0,\infty}$ s'exprime comme le rapport de la charge du soluté q divisée par le coefficient de friction hydrodynamique :

$$\mu^{0,\infty} = q/\gamma_h \quad (4)$$

En combinant les équations (1) à (4), il est possible d'exprimer la mobilité électrophorétique à dilution infinie en fonction des paramètres θ , n et r_{chain} . L'ajustement non linéaire des données expérimentales de mobilité en fonction de n (voir figure 12) permet par conséquent d'en déduire les paramètres géométriques indépendants θ et r_{chain} dans des conditions données de température et de solvant. La figure 12 présente les données expérimentales de mobilité électrophorétique dans le cas de polyglycines, poly-L-alanines, poly-L-valines, poly-L-leucines, poly-L-isoleucines et poly-L-phénylalanines, ainsi que les courbes d'ajustement

non linéaire obtenues à l'aide des équations (1) à (4). Les données quantitatives correspondantes de θ et r_{chain} et r_{lat} sont reportées dans le tableau. Elles montrent que la chaîne principale est d'autant plus étirée (θ petit) que la chaîne latérale est encombrée.

Tableau - Paramètres géométriques d'oligopeptides obtenus à partir des valeurs expérimentales de mobilités électrophorétiques à dilution infinie.

r_{lat} , r_{chain} et θ ont été déterminés par ajustement non linéaire des mobilités électrophorétiques en fonction de n à partir des équations (1) à (4). Conditions électrophorétiques : voir figure 12.

		r_{chain} (Å)	θ	r_{lat} (Å)	R
polyglycines	G	1,00	40,6	2,57	0,9996
poly-L-alanines	A	1,72	34,1	3,16	0,9999
poly-L-valines	V	3,19	31,7	4,57	0,9998
poly-L-leucines	L	4,07	21,8	5,21	0,9989
poly-L-isoleucines	I	3,28	27,7	4,57	0,9993
poly-L-phénylalanines	F	5,12	0,1	5,61	0,9978

Cette approche montre qu'il est possible d'obtenir des grandeurs quantitatives sur les paramètres géométriques caractéristiques de la conformation du peptide en fonction du soluté considéré (nature et nombre de résidus) et des paramètres opératoires tels que la température ou la nature du solvant [16]. Contrairement aux méthodes non séparatives (telles que le dichroïsme circulaire) qui donnent une information moyenne sur l'ensemble des peptides constituant le mélange, l'EC permet d'obtenir des informations sur la conformation de chaque peptide (pris individuellement) présent dans le mélange injecté, sans avoir à purifier ou à isoler chaque peptide.

Conclusion

L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative analytique bien adaptée pour la caractérisation des polymères de synthèse ionisés ou ionisables. Compte tenu des

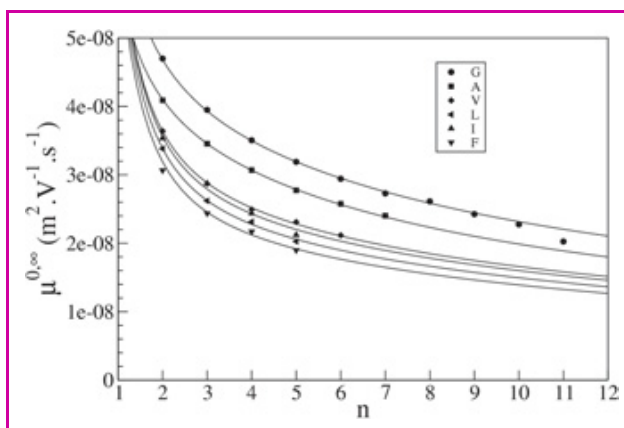


Figure 12 - Variation de la mobilité électrophorétique à dilution infinie d'oligopeptides en fonction du degré de polymérisation n à 50 °C dans un électrolyte aqueux.

Les symboles représentent les données expérimentales de mobilité. Les lignes continues représentent les courbes obtenues par ajustement non linéaire des données expérimentales selon l'équation (1). Conditions électrophorétiques : capillaire en silice vierge, 50 μm x 60 cm (50 cm jusqu'au détecteur). Electrolyte : tampons triéthylamine de forces ioniques comprises entre 10 et 100 mM, pH 11,50. Tension appliquée : 10 à 15 kV. Température : 50 °C. Détection UV à 200 nm. Identification des peptides : voir tableau.

mécanismes de séparation très différents de ceux rencontrés en chromatographie liquide (exclusion stérique ou chromatographie d'interaction), l'EC s'avère être complémentaire des méthodes chromatographiques. Elle apporte de nouvelles potentialités, notamment pour la caractérisation de systèmes polymères complexes constitués de populations hétérogènes en composition, en masse molaire ou en architecture. Les séparations électrophorétiques sont réalisées dans une veine liquide, sans phase stationnaire, ce qui permet de limiter les interactions parasites. Compte tenu du diamètre interne des capillaires utilisés (~ 50 µm), les séparations sont réalisées dans un format miniaturisé (efficacité élevées, temps d'analyse relativement courts, faibles quantités injectées). Différents modes d'utilisation de l'EC pour la caractérisation des polymères peuvent être mis en œuvre : séparation en milieu libre ou en gel, séparation en mode micellaire, séparations bidimensionnelles ; chacun de ces modes pouvant être réalisé en milieu aqueux, hydro-organique ou non aqueux. Ces séparations permettent d'obtenir des informations sur les différentes sources d'hétérogénéité des (co)polymères telles que la distribution de composition chimique, la distribution en fonctionnalité ou la distribution en masse molaire.

Compte tenu de la complexification des architectures macromoléculaires synthétisées par les chimistes des polymères, la demande de caractérisation ne cesse de croître et le développement de nouvelles méthodologies de séparation est rendu nécessaire afin d'agrandir la palette des méthodes disponibles. De nombreuses potentialités de l'EC restent à découvrir dans le domaine de la caractérisation des polymères de synthèse. Parmi celles-ci, on citera notamment l'opportunité d'élargir le champ d'applications par l'utilisation de la détection conductimétrique qui présente un caractère plus universel que la détection par absorbance UV-visible, ou encore la possibilité d'obtenir des informations sur la répartition des charges le long de la chaîne de polymères (copolymères statistiques, à blocs ou séquencés).

Remerciements

L'auteur remercie le Ministère de la Recherche pour son soutien concernant le développement des méthodes électrophorétiques bidimensionnelles (ACI Jeunes Chercheurs n° 4093).

Références

- [1] Grossman P.D., Colburn J.C., *Capillary electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, **1992**.
- [2] *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, P.G. Righetti (ed.), CRC Press, Boca Raton, **1996**.
- [3] Engelhardt H., Martin M., *Adv. Polym. Sci.*, **2004**, *211*, p. 165.
- [4] Cottet H., Simó C., Vayaboury W., Cifuentes A., *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1068*, p. 59.
- [5] Kok W.T., Stol R., Tijssen R., *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, p. 468A.
- [6] Cottet H., Vayaboury W., Kirby D., Giani O., Taillades J., Schué F., *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, p. 5554.
- [7] Simo C., Cottet H., Vayaboury W., Giani O., Pelzing M., Cifuentes A., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, p. 335.
- [8] Souaïd E., Cottet H., *Electrophoresis*, **2005**, *26*, p. 3300.
- [9] Cottet H., Gareil P., Guenoun P., Muller F., Delsanti M., Lixon P., Mays J.W., Yang J., *J. Chromatogr. A*, **2001**, *939*, p. 109.
- [10] Morel A., Cottet H., In M., Deroo S., Destarac M., *Macromolecules*, **2005**, *38*, p. 6620.
- [11] Jacquin M., Muller P., Lizarraga G., Bauer C., Cottet H., Théodoly O., *Macromolecules*, **2007**, *40*, p. 2672.
- [12] Cottet H., Biron J.-P., Taillades J., *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1051*, p. 25.
- [13] Cottet H., Biron J.-P., *Macromol. Chem. Phys.*, **2005**, *206*, p. 628.
- [14] Cottet H., Biron J.-P., Brevet CNRS-Université de Montpellier 2, WO 2005/024410, **2005**.
- [15] Cottet H., Le Saux T., Brevet CNRS-Université de Montpellier 2, FR 06 08112, **2006**.
- [16] Plasson R., Cottet H., *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, p. 6047.



Hervé Cottet, récipiendaire en 2006 du **prix de la division Chimie analytique de la SFC**, est professeur à l'IUT de Montpellier depuis septembre 2007 et effectue ses recherches au sein de l'IBMM dans l'équipe « Dynamique des systèmes biomoléculaires complexes »*.

* Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR CNRS 5247, Université de Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Case courrier 1706, 34095 Montpellier Cedex 5.
Courriel : hcottet@univ-montp2.fr

Idealp-Pharma is a French company, based in Lyon, and which provides personalized solutions in drug discovery. Founded in the year 2000, Idealp-Pharma is a self funded private company. Idealp-Pharma is a multidisciplinary team of 56 people, mainly chemists, but also medicinal chemists, biologists, cheminformatic, analytical scientists. Idealp-Pharma integrates the different aspects of hit generation, hit to lead, lead optimization process, exploratory preclinical development and strategy in regulatory preclinical development. Idealp-Pharma has won the confidence of many well-known pharma and biotechnology companies. Our multidisciplinary scientist team is responsible for over 20 clinical candidates. Following collaboration with Idealp-Pharma, one of our biotech customers has today 2 products in clinical trials.



IDEALP-PHARMA

Bât. CEI – 66 Bd Niels Bohr – BP 2132 – 69603 Villeurbanne Cedex
www.idealp-pharma.com info@idealp.com