



HAL
open science

Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles.

Thomas Le Saux

► **To cite this version:**

Thomas Le Saux. Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles.. Chemical Sciences. Chimie ParisTech, 2004. English. NNT: . pastel-00001054

HAL Id: pastel-00001054

<https://pastel.hal.science/pastel-00001054>

Submitted on 21 Feb 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Thèse de Doctorat
de
l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie**

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre

Spécialité : Chimie Analytique

présentée par

Thomas LE SAUX

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris VI

Détermination des paramètres d'interaction non-covalente en solution par les méthodes électrophorétiques capillaires. Champ d'application et performances. Rationalisation des protocoles.

Soutenue le 5 Novembre 2004

Devant le jury composé de :

| | |
|------------------------------|------------|
| M. Christophe Tribet | Rapporteur |
| M. Philippe Morin | Rapporteur |
| Mme Martine Beljean-Leymarie | |
| Mlle Séverine Duteil | |
| M. Ludovic Jullien | |
| Mlle Anne Varenne | |
| M. Pierre Gareil | |

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Daniel Lincot pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Electrochimie et de Chimie Analytique de l'ENSCP

Je tiens à remercier M. Pierre Gareil, Professeur à l'ENSCP, pour m'avoir encadré et soutenu au cours de ce travail et pour m'avoir fait profiter de ses connaissances. Je le remercie chaleureusement pour sa confiance et les discussions que nous avons partagées autour du bureau ovale.

Je remercie Mlle Anne Varenne, Maître de Conférences à l'ENSCP, pour avoir encadré ce travail et m'avoir fait profiter de ses conseils, de son bon sens et de sa disponibilité au cours de ces travaux.

Je tiens à remercier vivement MM. Christophe Tribet, Chargé de Recherches du CNRS au Laboratoire de Physico-Chimie Macromoléculaire de L'ESPCI, et Philippe Morin, Professeur à l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans, pour avoir accepté de rapporter sur ce mémoire et de participer au jury de cette thèse.

Je remercie Mme Martine Beljean-Leymarie, Professeur à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de Caen, pour sa participation au jury et pour m'avoir soutenu lors de mes débuts en Chimie Analytique.

Je remercie Mlle Séverine Duteil, Ingénieur de Recherches à Sanofi-Aventis, pour m'avoir donné l'occasion, avec M. Laurent Siret, d'étudier le système Héparine-ATIII et pour me faire l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je remercie M. Ludovic Jullien, Professeur au Laboratoire Processus et d'Activation Sélectif par Transfert d'Energie Uni-électronique ou Radiative de L'ENS d'avoir accepté de participer à ce jury.

Enfin, je remercie vivement tous les membres du laboratoire (passés et présents) et plus particulièrement les étudiants (passés et présents) du laboratoire (et des autres) sans qui l'ambiance serait sans doute un peu moribonde : Jean-Marc, Yannis, Jean, Frédéric, Jorgen, Meriem, Nazaré, Denis, Stéphanie, Sophie-s, Leonardo, Rodrigo, Aurélie, Nicolas, Laurent, et tous les autres.

| | |
|----------------------------|---|
| Introduction générale..... | 1 |
|----------------------------|---|

| | |
|--------------------------------|---|
| Chapitre 1. Bibliographie..... | 5 |
|--------------------------------|---|

| | |
|---|----------|
| 1. EQUILIBRES CHIMIQUES ET ISOTHERME D'ADSORPTION..... | 5 |
|---|----------|

| | |
|--|----|
| 1.1 EQUILIBRES MULTIPLES SUCCESSIFS [1]..... | 5 |
| 1.2 MODELES DE SITES. [2]..... | 6 |
| 1.2.1 Cas général de l'adsorption de ligands sur un substrat..... | 6 |
| 1.2.2 Modèle des sites indépendants et d'énergies identiques [2]. | 8 |
| 1.2.3 Extensions du modèle de sites indépendants : | 16 |
| 1.2.3.1 Equilibre chimique de type 1 :1..... | 16 |
| 1.2.3.2 Nombre de classes de sites indépendants supérieur à 1..... | 17 |
| 1.2.3.3 Notion de coopération..... | 19 |
| 1.2.3.4 Modèle de compétition..... | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 2 METHODES ELECTROPHORETIQUES DE DETERMINATION DES CONSTANTES D'INTERACTION..... | 23 |
|---|-----------|

| | |
|--|----|
| 2.1 METHODE DE L'INJECTION DIRECTE..... | 24 |
| 2.2 METHODES BASEES SUR LA VARIATION DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE..... | 29 |
| 2.2.1 Electrophorèse capillaire d'affinité (ECA)..... | 29 |
| 2.2.1.1 Cas d'une interaction monomoléculaire..... | 29 |
| 2.2.1.2 Cas de complexations d'ordres supérieurs..... | 32 |
| 2.2.1.3 Cas de deux ligands compétitifs pour un même substrat..... | 33 |
| 2.2.1.4 Cas des cinétiques lentes..... | 35 |
| 2.2.1.5 Méthodes de remplissage partiel du capillaire..... | 36 |
| 2.2.2 Electrophorèse d'affinité et de vacance..... | 39 |
| 2.3 METHODES BASEES SUR LA QUANTIFICATION D'AIRES DE PICS DE VACANCE..... | 42 |
| 2.3.1 Méthode des pics de vacance..... | 42 |
| 2.3.2 Méthode d'Hümmel et Dreyer..... | 44 |
| 2.4 METHODES BASEES SUR L'ANALYSE FRONTALE..... | 46 |
| 2.4.1 Analyse frontale électrocinétique continue..... | 46 |
| 2.4.2 Analyse frontale avec injection en mode hydrodynamique..... | 48 |
| 2.4.3 Protocoles particuliers de l'analyse frontale..... | 49 |
| 2.4.3.1 Injection électrocinétique sélective..... | 49 |
| 2.4.3.2 Ajout de polymère réticulé..... | 50 |
| 2.5 EXEMPLES D'APPLICATIONS..... | 51 |
| 2.6 CONCLUSION..... | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 3 REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES..... | 54 |
|--|-----------|

Chapitre 2. Caractérisation d'une distribution liposomale par électrophorèse capillaire..... 59

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | INTRODUCTION | 59 |
| 2 | LIPOSOMES | 60 |
| 2.1 | DEFINITION, STRUCTURE ET CLASSIFICATION | 60 |
| 2.2 | UTILISATION DES LIPOSOMES..... | 61 |
| 2.3 | LIPOSOMES ET ELECTROPHORESE CAPILLAIRE..... | 63 |
| 2.3.1 | <i>Situation actuelle.....</i> | <i>63</i> |
| 2.3.2 | <i>Détermination de la concentration en forme libre d'un soluté en équilibre avec une phase liposomale.....</i> | <i>67</i> |
| 2.3.2.1 | Méthodes électrophorétiques applicables à la détermination directe ou indirecte de concentrations de formes libres en équilibre avec une forme associée..... | 67 |
| 2.3.2.2 | Modèles réactionnels..... | 69 |
| 3 | CARACTERISATION DES LIPOSOMES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE..... | 71 |
| 4 | DETERMINATION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE LA CONCENTRATION LIBRE D'UN SOLUTE EN PRESENCE D'UNE PHASE LIPOSOSOMALE..... | 76 |
| 4.1 | CHOIX D'UNE METHODE ELECTROPHORETIQUE..... | 76 |
| 4.2 | ANALYSE FRONTALE COUPLEE A UNE INJECTION ELECTROKINETIQUE CONTINUE..... | 77 |
| 4.3 | PROTOCOLE INTEGRE D'INJECTION DIRECTE SELECTIVE EN MODE ELECTROKINETIQUE COUPLEE A UNE PRECONCENTRATION EN LIGNE..... | 80 |
| 4.3.1 | <i>Application au méthylparabène.....</i> | <i>87</i> |
| 4.3.2 | <i>Application à l'éthylparabène.....</i> | <i>88</i> |
| 4.3.3 | <i>Application au propylparabène.....</i> | <i>92</i> |
| 4.3.4 | <i>Relation log P-K'.....</i> | <i>95</i> |
| 4.3.5 | <i>Application à la détermination de la concentration d'un principe actif libre dans une formulation liposomale.....</i> | <i>95</i> |
| 5 | CONCLUSION..... | 100 |
| 6 | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 101 |
| 7 | ANNEXES..... | 103 |
| | ANNEXE 1 : ECHANTILLONS..... | 103 |
| | ANNEXE 2 : INSTRUMENTATION..... | 104 |
| | ANNEXE 3 : TAMPONS ET MARQUEURS | 105 |

| | | |
|--|--|------------|
| Chapitre 3. Modélisation des profils électrophorétiques : une nouvelle approche de l'électrophorèse capillaire d'affinité..... | | 107 |
| 1 | INTRODUCTION..... | 107 |
| 2 | MODELISATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES..... | 109 |
| 2.1 | MODÈLE DE MIKKERS [3] | 109 |
| 2.2 | MODÈLE DE ERNY ET COLL..... | 115 |
| 2.3 | DISCUSSION | 117 |
| 3 | RESULTATS ET DISCUSSION..... | 119 |
| 3.1 | SYSTEMES β -CYCLODEXTRINE-NAPROXENE ET β -CYCLODEXTRINE-NAPHTALENE-2-SULFONATE. ... | 119 |
| 3.1.a | <i>Etude de la dispersion par électromigration en l'absence de ligand.....</i> | <i>121</i> |
| 3.1.b | <i>Etude de la dispersion par électromigration en présence de ligand.....</i> | <i>125</i> |
| 3.1.c | <i>Estimation de la concentration en ligand libre dans la zone de substrat.....</i> | <i>130</i> |
| 3.2 | SYSTEME β -CYCLODEXTRINE-ADAMANTANE-1-CARBOXYLATE | 135 |
| 3.2.a | <i>Etude de la dispersion par électromigration en l'absence de ligand.....</i> | <i>136</i> |
| 3.2.b | <i>Etude de la dispersion par électromigration en présence du ligand.....</i> | <i>138</i> |
| 3.2.c | <i>Influence du temps de formation du complexe à l'équilibre sur les mobilités observées de l'adamantane-1-carboxylate</i> | <i>141</i> |
| 4 | CONCLUSION :..... | 142 |
| 5 | ANNEXES..... | 143 |
| | ANNEXE A1 : CALCUL DE CORRECTION DE FORCE IONIQUE SUR LA VALEUR DE pK_A DU TAMPON CARBONATE DE SODIUM [20]..... | 143 |
| | ANNEXE A2 : MODELISATION DU TEMPS DE MIGRATION EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE. | 144 |
| | ANNEXE A3 : SOLUTIONS TAMPONS ET ANALYTES..... | 147 |
| 6 | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 148 |

| | | |
|---|--|-----|
| Chapitre 4. Développement de l'analyse frontale pour la caractérisation de l'interaction entre un polysaccharide sulfaté (l'héparine) et une protéine cible (l'antithrombine III) | | 151 |
|---|--|-----|

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | INTRODUCTION..... | 151 |
| 2 | COAGULATION ET THROMBOSE [1-3]..... | 152 |
| 2.1 | CASCADE DE LA COAGULATION | 152 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 2.2 | INHIBITION DE LA COAGULATION..... | 154 |
| 2.3 | THROMBOSE | 154 |
| 2.4 | FIBRINOLYSE | 154 |
| 3 | HEPARINE..... | 155 |
| 3.1 | STRUCTURE DE L'HEPARINE..... | 155 |
| 3.2 | DIFFERENTS TYPES D'HEPARINE | 157 |
| 3.3 | MECANISME D'ACTION DE L'HEPARINE | 158 |
| 3.4 | AUTRES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'HEPARINE [7, 13] | 159 |
| 3.5 | HEPARINE ET ELECTROPHORESE CAPILLAIRE : | 159 |
| 4 | ETUDE DES CONSTITUANTS DU SYSTEME PAR ELECTROPHORESE DE ZONE | 160 |
| 4.1 | ANTITHROMBINE SEULE..... | 160 |
| 4.2 | HEPARINE SEULE | 162 |
| 4.3 | MELANGE HEPARINE-ANTITHROMBINE-III..... | 165 |
| 4.4 | CONCLUSION SUR L'ETUDE PAR INJECTION DIRECTE EN ELECTROPHORESE DE ZONE | 167 |
| 5 | MISE AU POINT DE L'ANALYSE FRONTALE..... | 168 |
| 5.1 | INJECTIONS HYDRODYNAMIQUES..... | 168 |
| 5.2 | INJECTION ELECTROCINETIQUE..... | 171 |
| 5.2.1 | <i>Vérification de la linéarité de la hauteur des paliers de concentration de l'ATIII</i> | <i>172</i> |
| 5.2.2 | <i>Application à la modélisation de l'interaction entre l'ATIII et l'héparine.</i> | <i>174</i> |
| 5.2.3 | <i>Méthode rapide de détermination d'une constante</i> | <i>179</i> |
| 5.2.4 | <i>Conclusion sur la mise au point de la méthode d'analyse frontale.....</i> | <i>181</i> |
| 6 | APPLICATIONS DU PROTOCOLE D'ANALYSE FRONTALE DEVELOPPE | 182 |
| 6.1 | CARACTERISATION PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE MICELLAIRE DE L'ANTITHROMBINE III..... | 182 |
| 6.2 | ETUDE DE L'INFLUENCE DU PH ET LA FORCE IONIQUE DU MILIEU | 183 |
| 6.3 | DETERMINATION DES PARAMETRES D'INTERACTION (CONSTANTE ET NOMBRE DE SITES) ENTRE LES OLIGOSACCHARIDES HEPARINIQUES AFFINS ET L'ATIII. | 185 |
| 6.3.1 | <i>Exploitation des mesures : Adsorption de l'antithrombine III sur les dérivés hépariniques.....</i> | <i>189</i> |
| 6.3.2 | <i>Exploitation des mesures : adsorption des dérivés hépariniques sur l'antithrombine III.....</i> | <i>193</i> |
| 7 | DISCUSSION SUR L'ANALYSE FRONTALE..... | 195 |
| 8 | DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'INTERACTION ENTRE DES PEPTIDES CONSENSUS DE L'ANTITHROMBINE III ET LES DERIVES HEPARINIQUES AFFINS. | 197 |
| 9 | CONCLUSION..... | 203 |
| 10 | ANNEXES..... | 205 |
| | ANNEXE 1 : SPECTRE DE L'ANTITHROMBINE III. | 205 |
| | ANNEXE 2 : REPRESENTATION DES ISOTHERMES ET DIAGRAMMES DE LINEARISATION DES DONNEES EXPERIMENTALES POUR LA DETERMINATION DES CONSTANTES D'ASSOCIATION. | 206 |

| | |
|---|------------|
| ANNEXE 3 : PREPARATION DES ELECTROLYTES ET MARQUEURS | 219 |
| ANNEXE 4 : SEQUENCE DE L'ANTITHROMBINE III HUMAINE [35] | 222 |
| 11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 223 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 5. Détermination de seuils d'agrégation pour les tensioactifs absorbants ou transparents en uv, neutres ou chargés..... | 227 |
|---|------------|

| | |
|---|------------|
| 1 INTRODUCTION | 227 |
| 2 REACTIFS ET PRODUITS | 233 |
| 3 CAS DE TENSIOACTIFS ABSORBANT EN UV..... | 233 |
| 3.1 CARACTERISATION DES ECHANTILLONS COMMERCIAUX DE TENSIOACTIF PAR ELECTROPHORESE DE ZONE | 233 |
| 3.2 DETERMINATION DE LA CMC DE L'OCTYLBENZENESULFONATE ET DU DODECYLBENZENESULFONATE PAR LES METHODES CLASSIQUES..... | 235 |
| 3.2.1 Conductométrie..... | 235 |
| 3.2.2 Mesure de tension superficielle..... | 237 |
| 3.3 ANALYSE FRONTALE..... | 238 |
| 3.3.1 Octylbenzènesulfonate..... | 238 |
| 3.3.2 Dodécylbenzènesulfonate..... | 244 |
| 3.3.3 Protocole rapide de détermination de CMC d'un tensioactif pur..... | 247 |
| 4 CAS DE TENSIOACTIFS TRANSPARENTS EN UV..... | 247 |
| 4.1 EQUILIBRES ENTRE UN MARQUEUR NEUTRE ET UNE SOLUTION DE TENSIOACTIF..... | 247 |
| 4.2 CAS D'UN TENSIOACTIF ANIONIQUE : LE SDS..... | 250 |
| 4.3 CAS D'UN TENSIOACTIF CATIONIQUE : LE BROMURE DE TETRADECYLTRIMETHYL-AMMONIUM..... | 253 |
| 4.4 CAS D'UN TENSIOACTIF NEUTRE : LE BRIJ 35..... | 257 |
| 5 CONCLUSION | 260 |
| 6 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 262 |
| 7 ANNEXE: PREPARATION DES ELECTROLYTES SUPPORTS..... | 264 |

| | |
|---|------------|
| Conclusion générale et perspectives..... | 265 |
|---|------------|

Introduction générale

Les interactions non-covalentes sont impliquées dans de nombreux équilibres chimiques en solution tels que complexation, partage entre deux phases liquides ou agrégation. La modélisation de ces équilibres, au moyen de constantes, permet ainsi de mieux appréhender certains processus chimiques, biologiques ou encore pharmacologiques. Plusieurs méthodes ont été développées afin de déterminer ces paramètres et peuvent être classées en deux catégories en distinguant les méthodes spectroscopiques et les méthodes séparatives [1].

La première catégorie de méthodes est représentée, notamment, par la spectrométrie ultraviolet-visible, la fluorimétrie, la résonance magnétique nucléaire, la résonance de spin électronique, ou encore le dichroïsme circulaire [1-2]. Le principal avantage des méthodes spectroscopiques est de ne pas séparer dans l'espace les formes liées et libres, respectant ainsi strictement l'équilibre global de la complexation envisagée. Ces méthodes imposent cependant que les formes liées et libres aient des propriétés spectrales suffisamment discriminées, et ce, dans un milieu d'étude compatible avec l'exploitation des spectres.

Les méthodes séparatives reposent sur la détermination de la forme libre considérée en équilibre avec la (les) forme(s) liée(s). Les méthodes séparatives présentent comme avantage de pouvoir étudier des équilibres impliquant des espèces contenant éventuellement des impuretés, sans, en principe, nuire à la qualité de la détermination. Parmi ces méthodes, se trouvent la dialyse (méthodes des équilibres de dialyse) et l'ultrafiltration. Ces deux méthodes ont comme principal inconvénient de recourir à l'emploi de membranes dont l'inertie physico-chimique vis à vis des constituants n'est pas toujours vérifiée [1]. Enfin il est largement fait appel aux méthodes chromatographiques (notamment en modes d'exclusion stérique, d'échange d'ions ou de polarité de phases inversée). Développée depuis une vingtaine d'année [3], l'électrophorèse capillaire constitue une alternative particulièrement intéressante aux méthodes chromatographiques pour l'évaluation des constantes d'équilibre [2,4] depuis le début des années 90.

En effet, de par son automatisation, sa miniaturisation ainsi que son efficacité de séparation, l'électrophorèse capillaire permet d'envisager des déterminations rapides utilisant des quantités d'échantillons réduites. Ensuite, cette méthode permet d'opérer dans des

conditions proches des conditions physiologiques (pH, force ionique), en milieu entièrement aqueux. Enfin, l'électrophorèse capillaire ne présente pas les inconvénients associés à l'utilisation d'une phase solide (membranes, immobilisation d'un constituant, phases stationnaires diverses) autre que la paroi du capillaire. Tous ces avantages font que l'électrophorèse capillaire a trouvé de nombreuses applications de détermination de constantes, et est en passe de devenir une méthode de routine pour l'évaluation des paramètres d'interaction (notamment par les méthodes de l'injection directe et d'affinité).

La première partie de cette thèse est consacrée à un bref rappel des modèles de complexation en solution ainsi qu'à la description des méthodes électrophorétiques de détermination de constantes d'interaction. Parmi les méthodes électrophorétiques, trois apparaissent particulièrement attractives : l'injection directe, l'électrophorèse capillaire d'affinité, et l'analyse frontale électrophorétique, dont certaines mises en œuvre expérimentales sont d'apparition plus récente [6]. Les quatre parties suivantes vont présenter l'étude de quelques systèmes interactifs au moyen de ces trois méthodes.

Les structures vésiculaires font actuellement l'objet de recherches intenses dans le domaine de la physique (caractérisation des membranes), de la biologie (modèles cellulaires) ou du secteur pharmaceutique (vectorisation de principes actifs). Parmi les différentes structures vésiculaires se trouvent les liposomes. Au cours de la deuxième partie, nous présenterons le développement d'une méthode électrophorétique s'apparentant à l'injection directe qui permet de caractériser l'équilibre existant pour un soluté entre une phase aqueuse et une phase liposomale, tout en s'affranchissant des difficultés inhérentes au système (sensibilité de détection, adsorption des liposomes).

Parmi les méthodes électrophorétiques de détermination de constantes, l'électrophorèse capillaire d'affinité est certainement celle qui a connu le plus grand essor. Cette méthode, de mise en œuvre expérimentale et de traitement des données simples, exploite la variation de mobilité d'un substrat sous l'effet de sa complexation avec un ligand. L'estimation classique des mobilités à partir des sommets des pics électrophorétiques, peut néanmoins conduire à des valeurs de mobilité erronées lorsque le profil du pic électrophorétique n'est pas symétrique. Cette situation se rencontre notamment lorsque la dispersion par électromigration est importante. Aussi, dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés à évaluer l'impact de la modélisation des profils électrophorétiques par la fonction de Haarhoff – Van der Linde sur la détermination des constantes de complexation.

Dans une quatrième partie, nous nous attacherons à l'application de l'analyse frontale électrophorétique capillaire pour la détermination de constantes d'interaction entre un polymère polysaccharidique et une protéine cible. Ce type d'interaction protéine-sucre est en effet impliqué dans de nombreux processus physio-pathologiques, notamment dans le domaine cardiovasculaire, où les propriétés complexantes d'un polysaccharide sulfaté (l'héparine) vis-à-vis de l'antithrombine III sont actuellement mises à profit dans le traitement des thromboses.

Les tensioactifs sont des composés amphiphiles dont les propriétés stabilisantes, solubilisantes, homogénéisantes et dégraissantes trouvent des applications dans de nombreux domaines. Une des propriétés essentielles des tensioactifs est la faculté de s'auto-agréger au delà d'une concentration-seuil appelée concentration micellaire critique. Cette concentration est classiquement repérée par conductométrie, absorptiométrie UV ou mesure de tension superficielle. Plus récemment, l'électrophorèse capillaire est apparue bien adaptée à la mesure de ces concentrations micellaires critiques. C'est pourquoi, au cours de la dernière partie, nous nous intéresserons à l'introduction de l'analyse frontale électrophorétique comme nouvelle méthode pour la mesure des seuils d'agrégation.

Références bibliographiques.

- [1] B. Sébille, R. Zini, C. Vidal-Madjar, N. Thuaud, J.-P. Tillement, *J. Chromatogr.*, 531, 51-77, 1990.
- [2] K. Rundlett, D. Armstrong, *J. Chromatogr A.*, 721, 173-186, 1996.
- [3] J. Jorgenson, K. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53, 1298-1302, 1981.
- [4] J. Kraak, S. Busch, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 608, 257-264, 1992.
- [5] Y.-H. Chu, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 57, 3524-3525, 1992.
- [6] J. Gao, P. Dubin, B. Muhoberac, *Anal Chem*, 69, 2945-2951, 1997.

Chapitre 1. BIBLIOGRAPHIE

1. Equilibres chimiques et isotherme d'adsorption.

1.1 Equilibres multiples successifs [1]

Considérons un système chimique constitué de deux espèces, le substrat et le ligand, pouvant s'associer avec formation de complexes moléculaires. L'étude d'un tel système consiste à observer les propriétés physico-chimiques d'au moins une de ces espèces sous l'effet des variations de leurs concentrations. Le modèle général qui permet de décrire l'interaction entre les deux partenaires est donné par l'équation bilan suivante :



Cet équilibre est régi par la loi d'action de masse et il est possible de définir la constante de formation globale telle que :

$$\beta_{mn} = \frac{[S_m L_n]}{[S]^m [L]^n} \quad (2)$$

Néanmoins, dans la plupart des systèmes, on est généralement confronté au cas où l'un des partenaires, par exemple le substrat S, ne s'auto-agrège pas et le schéma réactionnel général donné par l'équation 1 se simplifie selon l'équation 3 :



Les équations de conservation de la matière s'écrivent alors :

$$[S]_{\text{tot}} = [S] + \sum_{i=1}^n [S L_i] \quad (4)$$

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + \sum_{i=1}^n i [S L_i] \quad (5)$$

La constante globale de formation se simplifie alors également telle que :

$$\beta_{1n} = \frac{[SL_n]}{[S][L]^n} \quad (6)$$

Pour ce système on définit également les équilibres successifs de complexation et les constantes de formations successives K_i correspondantes pour tout i compris entre 1 et n :



et

$$K_{ii} = \frac{[SL_i]}{[SL_{i-1}][L]} \quad (8)$$

On note également la correspondance qui existe entre les constantes de formation globale et successives :

$$\beta_{1i} = \prod_{j=1}^{j=i} K_{1j} \quad (9)$$

Pour ces équilibres en solution, on définit le nombre moyen \bar{n} de ligands liés par molécule de substrat tel que :

$$\bar{n} = \frac{[L]_{\text{tot}} - [L]}{[S]_{\text{tot}}} = \frac{\sum_{i=1}^n i\beta_{1i}[L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_{1i}[L]^i} \quad (10)$$

La méthode expérimentale de détermination des différentes constantes a donc pour premier objet de déterminer $[L]$ pour différents rapports stoechiométriques. Puis l'ajustement non linéaire de la courbe $\bar{n} = f([L])$ permet d'accéder aux différentes constantes.

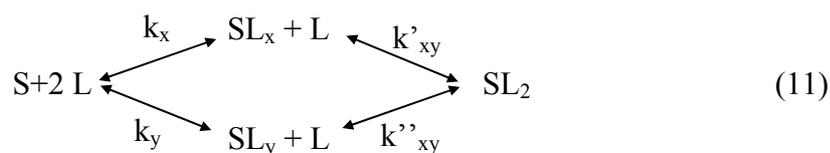
1.2 Modèles de sites. [2]

1.2.1 Cas général de l'adsorption de ligands sur un substrat.

Dans le cas d'un système constitué par deux partenaires dont au moins l'un est de grande dimension moléculaire, et est susceptible de se coordonner à plusieurs entités du second partenaire, l'espèce possédant le plus grand nombre de sites

potentiels d'interaction (le plus souvent, de plus grande dimension) tient le rôle de substrat (S) tandis que l'autre considéré comme ne présentant qu'un seul mode de liaison possible, sera considéré comme le ligand (L). Cette situation concerne tout particulièrement les systèmes d'intérêt biologique (interaction protéine - petite molécule). Pour ce modèle, on considère que le substrat présente n sites d'interaction avec le ligand. Ainsi, excepté le cas d'une interaction de stoechiométrie 1:1 correspondant à l'existence d'un site sur chacun des partenaires, les rôles du substrat et du ligand ne sont pas symétriques. En particulier, le nombre de sites n défini dans ce modèle correspond au nombre de sites sur le substrat et non sur le ligand. Ceci montre que le choix des rôles joués par le substrat et le ligand, dans un modèle de sites, est fondamental pour une bonne interprétation des résultats.

Lorsque le substrat possède deux sites d'interaction ($n = 2$) x et y, il est alors possible de former les complexes SL_x , SL_y et SL_2 selon le schéma réactionnel [2] :



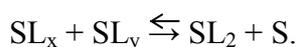
Pour ce système, les constantes de formation successives K_{11} et K_{12} sont reliées aux constantes ligand-site tel que :

$$K_{11} = k_x + k_y \quad (12)$$

et

$$K_{12} = \frac{[SL_2]}{([SL_x] + [SL_y])[L]} = \frac{a_{xy} k_x k_y}{K_{11}} \quad (13)$$

où $a_{xy} = \frac{k'_{xy}}{k_y} = \frac{k''_{xy}}{k_x}$ représente la constante de l'équilibre :



et mesure l'interdépendance des sites x et y. Lorsque les sites x et y sont indépendants, on a alors $a_{xy} = 1$.

1.2.2 Modèle des sites indépendants et d'énergies identiques [2].

Par rapport aux modèles des équilibres successifs et général de sites, ce modèle est plus éloigné de la réalité, mais il permet néanmoins de décrire de façon simple les systèmes complexes. En effet, considérons toujours un substrat possédant n sites d'interaction avec le ligand, mais d'énergies identiques. L'interaction élémentaire entre un site s sur le substrat et le ligand L peut se traduire par l'équilibre :



Comme pour les équilibres en solution, cet équilibre élémentaire est gouverné par la loi d'action de masse, son application conduit à la définition de la constante d'association du ligand L avec les sites s ou constante intrinsèque :

$$k = [L-s] / ([L] [s]) \quad (15)$$

Les équations de conservation s'écrivent pour ce système:

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + [L-s] \quad (16)$$

$$[s]_{\text{tot}} = [s] + [s]_{\text{liés}} = [s] + [L-s] = n [S]_{\text{tot}} \quad (17)$$

La constante k peut être calculée directement (méthode directe) à partir de chaque système chimique de composition chimique fixée ($[L]_{\text{tot}}$ et $[S]_{\text{tot}}$ connues), à partir de :

$$k = \frac{[L-s]}{[L][s]} = \frac{[L]_{\text{tot}} - [L]}{[L](n[S]_{\text{tot}} - [L]_{\text{tot}} + [L])} \quad (18)$$

La procédure expérimentale a pour objet de déterminer $[L]$, concentration libre du ligand. Le calcul nécessite de faire des hypothèses successives sur n . La valeur de n la plus probable est celle minimisant la dispersion sur les valeurs de k obtenues pour tous les systèmes chimiques de compositions différentes étudiés. La valeur de k retenue est la moyenne des valeurs obtenues pour ces différents systèmes.

Comme dans le modèle des équilibres successifs, il est également possible d'introduire le taux d'association moyen \bar{n} du ligand L sur le substrat S, ce qui permet ensuite d'accéder aux paramètres k et n de l'interaction. Ainsi, \bar{n} est défini par :

$$\bar{n} = \frac{[L]_{\text{liés}}}{[S]_{\text{tot}}} = n \frac{[s]_{\text{liés}}}{[s]_{\text{tot}}}$$

or comme $[s]_{\text{liés}} = [L-s] = k \cdot [s] \cdot [L]$, on en déduit:

$$\bar{n} = n \frac{k[L][s]}{[s] + [L-s]} = n \frac{k[L]}{1 + k[L]} \quad (19)$$

Pour le modèle multisites d'énergies identiques, l'occupation de l'un des sites du substrat n'influe théoriquement pas sur celle des autres et le système est décrit exhaustivement par les deux paramètres k et n, tandis qu'une telle description dans le modèle des équilibres successifs impose de calculer les n constantes de stabilités successives (K_{1i}) correspondant aux formations des complexes SL_i depuis $i = 1$ jusqu'à $i = n$.

Ces deux modèles sont toutefois en correspondance directe. Ainsi, la formule de l'isotherme (19) peut se recalculer à partir l'expression de K_{1i} en fonction de k [2] :

$$K_{1i} = \frac{n-i+1}{i} k \quad (20)$$

En effet, l'introduction de cette expression de K_{1i} dans l'expression (9) de β_{1i} conduit à:

$$\beta_{1i} = \prod_{j=1}^i K_{1j} = k^i \cdot \prod_{j=1}^i \frac{n-j+1}{j} = k^i \frac{n!}{i!(n-i)!} \quad (21)$$

et l'expression (10) du taux moyen d'association du ligand sur le substrat devient :

$$\bar{n} = \frac{[L]_{\text{liés}}}{[S]_{\text{tot}}} = \frac{\sum_{i=1}^n i \beta_{1i} [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \beta_{1i} [L]^i} = \frac{\sum_{i=1}^n i \frac{n!}{i!(n-i)!} k^i \cdot [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{i!(n-i)!} k^i \cdot [L]^i} \quad (22)$$

Cette expression (22) du taux moyen d'association du ligand sur le substrat peut être simplifiée. Considérons tout d'abord le dénominateur :

$$1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{i!(n-1)!} k^i [L]^i = \sum_{i=0}^n C_i^n 1^{n-i} (k[L])^i = (1 + k[L])^n \quad (23)$$

Pour simplifier le numérateur, dérivons à présent la fonction $f(k[L]) = (1+k[L])^n$ en fonction de $k[L]$ en employant l'expression (23) :

$$\frac{d(1 + (k[L])^n)}{dk[L]} = \frac{d(1 + \sum_{i=1}^n \frac{n!}{i!(n-1)!} (k[L])^i)}{dk[L]} \quad (24)$$

soit :

$$n \cdot (1 + k[L])^{n-1} = \sum_{i=1}^n i \frac{n!}{i!(n-1)!} (k[L])^{i-1} \quad (25)$$

en multipliant chacun des deux membres par $k[L]$, on retrouve la formule du numérateur de l'expression (22) :

$$n \cdot k[L] \cdot (1 + k[L])^{n-1} = \sum_{i=1}^n i \frac{n!}{i!(n-1)!} (k[L])^i \quad (26)$$

Ainsi, l'introduction des équations 23 et 25 dans l'équation 22 conduit de nouveau à l'équation 19 :

$$\bar{n} = \frac{n \cdot k[L] \cdot (1 + k[L])^{n-1}}{(1 + k[L])^n} = n \frac{k[L]}{1 + k[L]} \quad (19)$$

Le graphe $\bar{n} = f([L])$ est appelé isotherme d'adsorption du ligand L sur le substrat S (relation de Langmuir, figure 1). Cette courbe a une allure hyperbolique. La tangente à l'origine de cette courbe donne la valeur du produit $n \cdot k$. La courbe présente également une asymptote horizontale qui est égale au nombre de sites sur le substrat. $[L]_{\text{tot}}$ et $[S]_{\text{tot}}$ étant connues par préparation du système et $[L]$ étant déterminée expérimentalement, le tracé expérimental direct de cette courbe, après calcul de \bar{n} , permet la détermination de k et n par ajustement non linéaire.

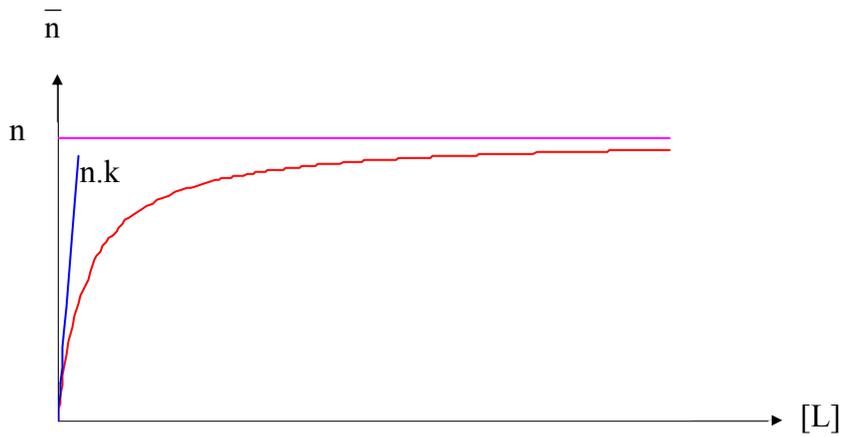


Figure 1 : Représentation schématique de l'isotherme d'adsorption d'un ligand sur un substrat.

\bar{n} : taux moyen d'association du ligand sur le substrat ; n : nombre de sites sur le substrat, k : constante d'interaction ligand-site (ou constante intrinsèque) ; $[L]$: concentration en ligand libre.

Cette isotherme peut également être linéarisée en vue d'une détermination plus simple des paramètres d'interaction par régression linéaire. Trois méthodes de linéarisation de l'isotherme fondées sur des réarrangements de cette relation (19) sont ainsi couramment décrites [2,3]. L'intérêt de ces méthodes est d'attribuer un poids statistique différent pour les points expérimentaux.

La première méthode est la méthode appelée « x-réciproque » ou diagramme de Scatchard. Elle s'appuie sur la relation:

$$\frac{\bar{n}}{[L]} = nk - \bar{n}k \quad (27)$$

En représentant graphiquement $\frac{\bar{n}}{[L]} = f(\bar{n})$, on obtient une droite de pente $-k$, le rapport de l'ordonnée à l'origine sur la pente donnant le nombre de sites d'interaction n .

La deuxième méthode dite « y-réciproque » repose sur la relation :

$$\frac{[L]}{\bar{n}} = \frac{1}{nk} + \frac{[L]}{n} \quad (28)$$

Le nombre de sites n est égal à l'inverse de la pente de la droite obtenue en représentant $([L] / \bar{n}) = f([L])$. La constante k est alors donnée par le rapport de la pente sur l'ordonnée à l'origine.

La troisième méthode dite « double-réciproque » (ou de Benesi-Hildebrand) est basée sur la relation :

$$\frac{1}{\bar{n}} = \frac{1}{nk[L]} + \frac{1}{n} \quad (29)$$

en traçant $(\bar{n})^{-1} = f([L]^{-1})$, on obtient une droite de pente $(nk)^{-1}$ et d'ordonnée à l'origine n^{-1} . De ce fait, la constante k est accessible en divisant l'ordonnée à l'origine par la pente de la droite.

Pour chacune de ces méthodes, l'accès aux divers paramètres est effectué par ajustement linéaire de la droite obtenue selon la méthode des moindres carrés. Cet ajustement est généralement réalisé depuis les données brutes.

Cette démarche présuppose que les variances de la grandeur mesurée (σ_{y_i}) soient non liées aux niveaux de la variable indépendante (x_i), cette dernière étant supposée connue sans erreur ($\sigma_{x_i} = 0$). En pratique, ce cas est rarement vérifié et certains auteurs ont suggéré, notamment pour la détermination de paramètres d'interaction par électrophorèse capillaire, l'ajustement linéaire des droites obtenues par régression pondérée [4].

Pour un modèle de type $y' = a + b.x'$ (comme c'est le cas pour les méthodes de linéarisation), la régression pondérée consiste à attribuer à chaque niveau i de concentration en ligand effectué (n niveaux au total) un poids statique w_i ($w_i = C/\sigma_i$, avec C constante de proportionnalité et σ_i variance du niveau i .), puis à résoudre le système d'équations [2] :

$$\begin{cases} a.\Sigma w_i + b.\Sigma(w_i.x_i') = \Sigma(w_i.y_i') \\ a.\Sigma(w_i.x_i') + b.\Sigma(w_i.x_i'^2) = \Sigma(w_i.x_i'.y_i') \end{cases}$$

où x' et y' représentent les variables transformées en abscisse et en ordonnée. Plusieurs propositions ont été formulées pour C . Les plus courantes aboutissent aux expressions de w_i :

$$w_i = \frac{1}{\sigma_i^2} ; w_i = \frac{1/\sigma_i^2}{\sum(1/\sigma_i^2)} ; \text{et } w_i = \frac{n/\sigma_i^2}{\sum(1/\sigma_i^2)}$$

Dans le cas d'une interaction de type 1 :1, l'isotherme de complexation est de type : $y = \frac{x}{m + nx}$, où x est la variable indépendante (dans les méthodes électrophorétiques, x est identifié à la concentration en ligand libre, ou à défaut, à la concentration totale en ligand) et y est la grandeur mesurée (variation de mobilité, d'aire de pic, de hauteur de palier dans les méthodes électrophorétiques). Les différentes méthodes de linéarisation consistent en la transformation des variables x et y. Le tableau 1 regroupe les diverses transformations de ces variables ainsi que la variance associée aux variables transformées.

| Méthode | Abscisse | | Ordonnée | |
|-------------------|----------|------------------|----------|---|
| | x' | $\sigma_{x'}^2$ | y' | $\sigma_{y'}^2$ |
| X-réciproque | y | σ_y^2 | y/x | $(y^2 \sigma_x^2)/x^4 + \sigma_y^2/x^2$ |
| Y-réciproque | x | σ_x^2 | x/y | $\sigma_x^2/y^2 + x^2 \cdot \sigma_y^2 / y^4$ |
| Double-réciproque | 1/x | $\sigma_x^2 / 4$ | 1/y | σ_y^2 / y^4 |

Tableau 1 : Variables transformées et variances correspondantes pour les trois méthodes de linéarisation x-réciproque, y-réciproque, et double-réciproque.

x' : variable transformée pour les abscisses, y' : variable transformée pour l'axe des ordonnées ; $\sigma_{x'}^2$: variance de la variable transformée en abscisse ; $\sigma_{y'}^2$: variance de la variable transformée en ordonnée ; x : variable indépendante ; y : variable dépendante ; σ_x^2 : variance de la variable x ; σ_y^2 : variance de la variable y .

En supposant que les erreurs des variables x et y soient indépendantes ($\sigma_{xy} = 0$), le calcul de σ_i conduit aux expressions rassemblées dans le tableau 2 [2].

| Méthode | x-réciproque | y-réciproque | double-réciproque |
|------------|---|---|---|
| σ_i | $\sigma_{yi}^2 \left(\frac{n^2}{m^2} + \frac{1}{xi^2} \right) + \frac{yi^2 \sigma_{xi}^2}{xi^4}$ | $\sigma_{xi}^2 \left(\frac{1}{yi^4} + n^2 \right) + \frac{xi^2 \cdot \sigma_{yi}^2}{yi^4}$ | $\frac{m^2 \sigma_{xi}^2}{xi^4} + \frac{\sigma_{yi}^2}{yi^4}$ |

Tableau 2 : Variance σ_i du niveau i en fonction des variables non-transformées (y et x) pour les trois méthodes de linéarisation [2].

xi : variable indépendante au niveau i ; yi : variable dépendante au niveau i ; σ_{xi}^2 : variance de la variable x au niveau i ; σ_{yi}^2 : variance de la variable y au niveau i ; m et n : paramètres de l'isotherme d'association.

En général, on admet que la variable non transformée x est connue sans erreur ($\sigma_{xi}^2 = 0$). Ainsi, les expressions rassemblées tableau 2 se trouvent simplifiées, la méthode double-réciproque conduisant au traitement statistique le plus simple. Néanmoins on constate que pour la méthode x -réciproque, la variable transformée en abscisse n'est pas connue sans erreur, ce qui rend très complexe l'exploitation statistique. De plus, il est à noter que l'usage de la régression pondérée doit être réservé au cas où l'on possède suffisamment de données expérimentales. En effet, σ_{yi} n'étant jamais connue, il est indispensable, indépendamment d'une description suffisante de l'isotherme, d'estimer σ_{yi} et y_i (par \bar{y}_i) correctement et pour chaque niveau i , c'est à dire par au moins cinq répétitions par niveau (σ_{yi} étant estimée à $n - 1$ degrés de liberté) rendant ainsi les déterminations extrêmement fastidieuses.

D'après les équations précédentes, la détermination du nombre de site sur le substrat n'est donc possible que si l'on est capable, expérimentalement, de déterminer directement la concentration en forme libre $[L]$ de l'espèce jouant le rôle de ligand. Cette possibilité est liée au mode de détection choisi et à la mise en œuvre de la méthode donnant accès à la forme libre. Lorsque cette détermination directe de $[L]$ n'est pas possible, il faut alors pouvoir déterminer expérimentalement la forme libre du substrat $[S]$, puis calculer $[L]$ à partir des bilans matières (16) et (17) :

$$[L] = [L]_{\text{tot}} - n [S]_{\text{tot}} + n [S] \quad (30)$$

Après réarrangement de l'équation (15), on obtient alors :

$$([S]_{\text{tot}} - [S]) / [L]_{\text{tot}} = k[S] / (1 + nk[S]) \quad (31)$$

Cette relation, représentée graphiquement figure 2, ressemble à l'équation de l'isotherme d'adsorption du ligand sur le substrat (équation (5)). En portant $\bar{n}_s = ([S]_{\text{tot}} - [S]) / [L]_{\text{tot}}$ (qui correspond formellement au taux moyen d'association du substrat sur le ligand) en fonction de $[S]$, on obtient K et n par ajustement non linéaire.

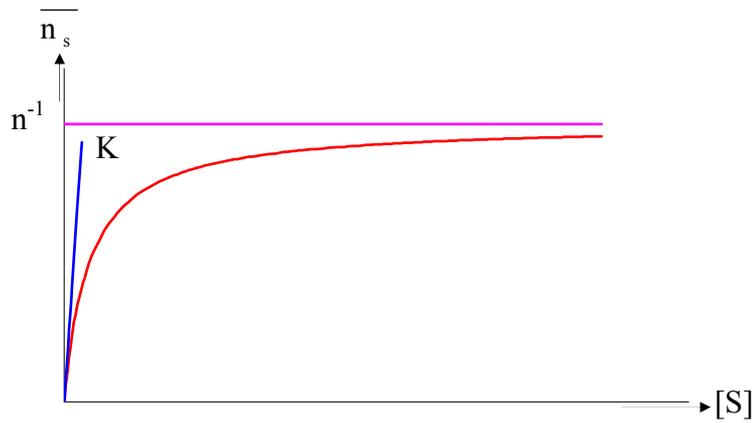


Figure 2 : Représentation schématique de la fonction $\bar{n}_s = ([S]_{\text{tot}} - [S]) / [L]_{\text{tot}} = f([S])$ conformément à l'équation 11.

n : nombre de sites sur le substrat, k : constante d'interaction, $[S]$: concentration en substrat libre.

Tout comme l'équation (19), l'équation (31) peut être également linéarisée. La méthode x-réciproque s'appuie sur la relation:

$$\frac{\bar{n}_s}{[S]} = k - n.k.\bar{n}_s \quad (32)$$

En représentant graphiquement $\frac{\bar{n}_s}{[S]} = f(\bar{n}_s)$, on obtient une droite d'ordonnée à l'origine k , le rapport de la valeur absolue de la pente sur l'ordonnée à l'origine donnant le nombre de sites d'interaction n .

La méthode y-réciproque repose sur la relation :

$$\frac{[S]}{\bar{n}_s} = \frac{1}{k} + n.[S] \quad (33)$$

Le nombre de sites n est égal à la pente de la droite obtenue en représentant $([S] / \bar{n}_s) = f([S])$. La constante k est alors donnée par l'inverse de l'ordonnée à l'origine.

La méthode double-réciproque est basée sur la relation :

$$\frac{1}{\bar{n}_s} = \frac{1}{k[S]} + n \quad (34)$$

en traçant $(\bar{n}_s)^{-1} = f([S]^{-1})$, on obtient une droite de pente k^{-1} et d'ordonnée à l'origine n .

1.2.3 Extensions du modèle de sites indépendants :

1.2.3.1 Equilibre chimique de type 1 :1.

Dans le cas d'un complexe de stœchiométrie 1 :1, on a alors $[s] = [S]$ et le modèle d'adsorption d'un ligand sur un site du substrat est identique au modèle de complexation monomoléculaire. L'écriture des bilans-matière donne :

$$[S]_{\text{tot}} = [S] + [SL] \quad (35)$$

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + [SL] \quad (36)$$

Si $[L]$ est déterminée expérimentalement, on accède à $[SL]$ par :

$$[SL] = [L]_{\text{tot}} - [L] \quad (37)$$

puis à $[S]$ par :

$$[S] = [S]_{\text{tot}} - [SL] \quad (38)$$

$$[S] = [S]_{\text{tot}} - [L]_{\text{tot}} + [L] \quad (39)$$

Si $[S]$ est déterminée expérimentalement, on accède à $[SL]$ par :

$$[SL] = [S]_{\text{tot}} - [S] \quad (35 \text{ bis})$$

Puis à $[L]$ par:

$$[L] = [L]_{\text{tot}} - [SL] \quad (36 \text{ bis})$$

$$[L] = [L]_{\text{tot}} - [S]_{\text{tot}} + [S] \quad (39 \text{ bis})$$

Pour une interaction monomoléculaire, les méthodes graphiques de linéarisation (droite d'équation $y = a.x + b$) conduisent à étudier les fonctions rassemblées dans le tableau 3:

| Méthode | Coordonnées transformées $y'=f(x')$ | K |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|
| x-réciproque | $[SL] / [L] = f([SL])$ | -a |
| y-réciproque | $[L] / [SL] = f([L])$ | $\frac{a}{b}$ |
| double – réciproque | $[SL]^{-1} = f([L]^{-1})$ | $\frac{b}{a}$ |

Tableau 3 : Méthodes graphiques de linéarisation dans le cas d'une interaction monomoléculaire.

a : coefficient directeur ; b : ordonnée à l'origine

Enfin, un calcul direct de K peut être également effectué pour chaque système en utilisant la relation (19), en prenant dans ce cas $n = 1$.

1.2.3.2 Nombre de classes de sites indépendants supérieur à 1.

Lorsque le substrat possède m ($m > 1$) classes de sites de type i , la transformation de l'isotherme d'adsorption par les différentes méthodes de linéarisation décrites ci-dessus aboutit généralement à l'obtention de courbes non-linéaires, la méthode x-réciproque étant la plus sensible pour la détection de telles situations [2]. A titre d'exemple, la figure 3 donne un exemple de diagramme obtenu pour le système β_2 -bloquant ICI 118551 et l'acide $\alpha 1$ -glycoprotéine

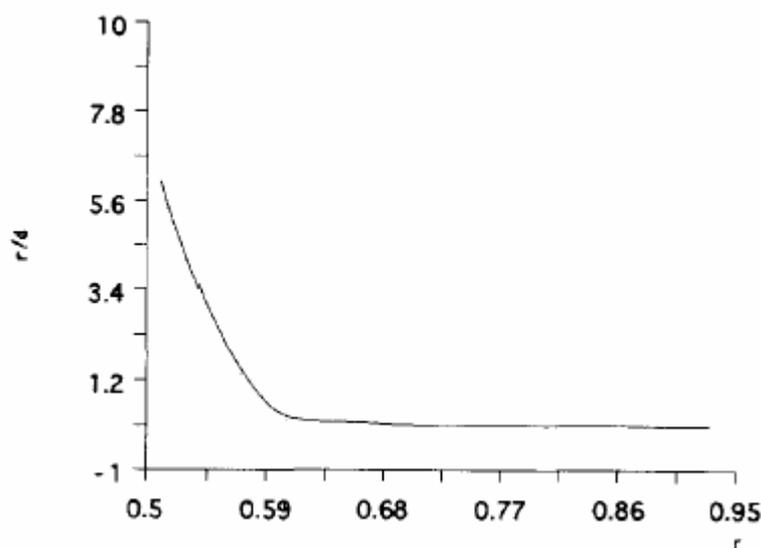


Figure 3 : Diagramme de scatchard obtenu pour le système ICI 118551 – acide $\alpha 1$ -glycoprotéine obtenu en électrophorèse capillaire par la méthode d'Hummel et Dreyer [5]

r : taux d'association de l'ICI 118551 sur l'acide α 1-glycoprotéine.

Le taux moyen d'association du ligand sur le substrat exprimé selon les différentes classes de sites devient :

$$\bar{n} = \sum_{j=1}^m \frac{n_j k_j [L]}{1 + k_j [L]} \quad (40)$$

Dans une représentation de Scatchard, $\bar{n} / [L] = f([L])$, l'ordonnée à l'origine aura pour valeur $\sum n_j k_j$ tandis que l'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses aura pour valeur $\sum n_j$, la connaissance du système permettant souvent d'estimer *a priori* cette dernière valeur, notamment pour les systèmes chimiques simples. Bien qu'il soit préconisé dans certains cas de déterminer les constantes depuis les divers segments de pente obtenus dans un diagramme x-réciproque, il est toutefois préférable d'ajuster les données de façon non linéaire selon l'équation (40) [6], du fait que l'intégralité des points expérimentaux peut être prise en compte dans le calcul.

Pour illustrer cette démarche, nous avons simulé l'interaction 1 : 2 entre un ligand et un substrat tel que $k_1 = 400$, $n_1 = 1$ et $k_2 = 4$, $n_2 = 1$. Pour ce système, les deux classes de sites sont représentées par un site et les constantes k_1 et k_2 sont différentes d'un facteur égal à 100. Ces constantes intrinsèques donc équivalentes aux constantes de formations successives K_1 et K_{12} telles que $K_{11} = 400$ et $K_{12} = 4$ (le site le plus fort correspondant à l'équilibre K_{11} et le site le plus faible correspondant à K_{12}). Pour ce système le taux moyen d'association a donc été calculé à partir de l'équation 10 au moyen des constantes K_{11} et K_{12} .

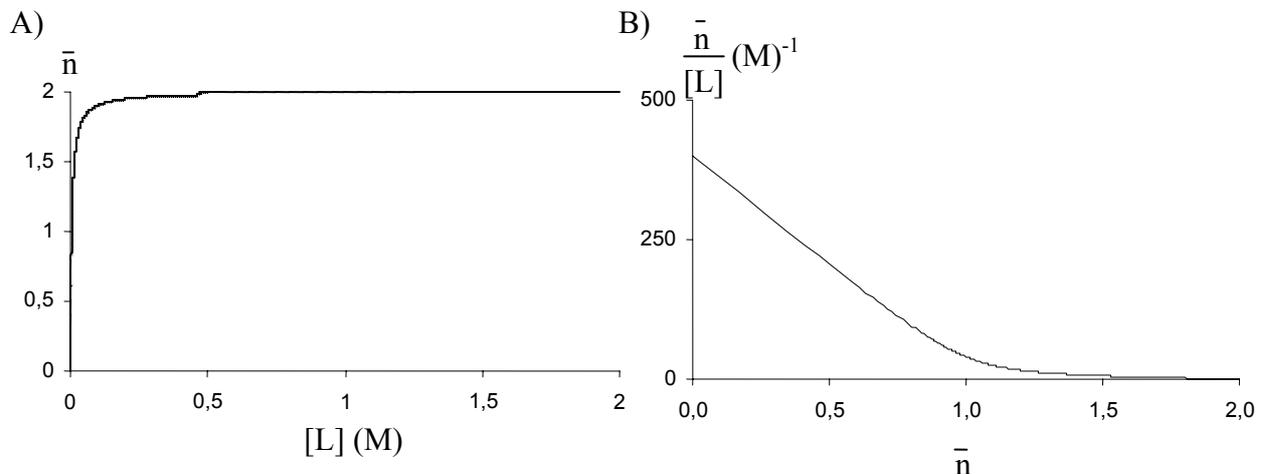


Figure 4 : Représentation de l'isotherme (A) et du diagramme x-réciproque (B) pour un système substrat-ligand simulé avec $K_{11} = 400$ et $K_{12} = 4$ à partir du calcul de \bar{n} (équation 10).

La régression linéaire pour les domaines de \bar{n} compris entre 0 et 0,75 et entre 1,5 et 2 conduit aux estimations suivantes :

- $y = -384 x + 399$ pour \bar{n} compris entre 0 et 0,75 d'où $k_1 = 384$ et $n = 1$ dans le modèle de sites indépendants et pour le site fort.
- $y = -10,7 x + 20,7$ pour \bar{n} compris entre 1,5 et 2 d'où $k_2 = 10$ et $\Sigma n = 2$ dans le modèle de sites indépendants et pour le site faible.

Ajustée selon l'équation 40, le diagramme de l'isotherme (figure 4A) conduit aux valeurs suivantes :

- i. $k_1 = 396$ et $n_1 = 1$
- ii. $k_2 = 4$ et $n_2 = 1$

Ces dernières valeurs sont ainsi très proches des valeurs attendues. Notons également que la segmentation du diagramme de Scatchard peut être retenue en vue d'une première estimation rapide du nombre total de sites (stoechiométrie) et des constantes d'interaction, ces paramètres intervenant notamment pour l'initialisation de l'ajustement du diagramme de l'isotherme à partir de la relation 40. Lorsque le nombre total de sites calculés pour les sites forts et les sites faibles (équivalent à la stoechiométrie SL_n) n'est pas trop élevé ($\Sigma n_j \leq 4$), la démarche la plus satisfaisante (d'un point de vue thermodynamique) est d'ajuster les isothermes selon le modèle des équilibres successifs au moyen de l'équation 10.

Enfin, dans le cas de l'existence de sites d'interaction différents sur le substrat, on peut définir une constante globale K_g , relative aux constantes intrinsèques k_i des différents types de sites i , par [7] :

$$K_g = \Sigma(n_j.k_j) \quad (41)$$

1.2.3.3 Notion de coopération

Pour un substrat possédant un pool de sites d'interaction avec un ligand (et d'énergies initialement identiques lorsque ces sites sont vacants), la coopération est une description de l'influence de l'occupation de l'un des sites du substrat sur l'interaction du ligand avec les sites restants disponibles. La coopération est représentée par trois états :

- l'état non-coopératif pour lequel l'occupation du site n'influe pas sur les sites restant disponibles, c'est-à-dire que les sites sont indépendants.
- l'état coopératif pour lequel l'occupation d'un des sites favorise l'occupation des sites restant disponibles, c'est-à-dire que les complexes d'ordres supérieurs sont stabilisés.
- l'état anti-coopératif pour lequel l'occupation d'une des sites gêne l'occupation des sites restant disponibles, c'est-à-dire que les complexes d'ordres inférieurs sont stabilisés.

Pour un substrat macromoléculaire, les systèmes coopératifs et anticoopératifs sont généralement dus à un changement de conformation de la molécule de substrat [8], modifiant ainsi l'accès du ligand en solution pour les sites vacants. Dans le cas d'un système non-coopératif où les sites sur le substrat sont indépendants et d'énergies identiques, les constantes de formation successives correspondantes peuvent être calculées par la relation 20. A partir de cette relation, les valeurs relatives des ces constantes de formation successives les unes par rapport aux autres peuvent être ramenées à la constante k d'interaction ligand-site (tableau 3).

| N | K_{11} | K_{12} | K_{13} | K_{14} |
|---|----------|----------|----------|----------|
| 2 | 2 k | 1/2 k | | |
| 3 | 3 k | k | 1/3 k | |
| 4 | 4 k | 3/2 k | 2/3 k | 1/4 k |

Tableau 3 : Valeurs relatives des constantes successives dans le cas de systèmes substrat-ligand.

n : nombre de sites d'interaction sur le substrat ; k : constante d'interaction ligand-site.

En fonction de la valeur du rapport des constantes de formations successives $K_{1(i+1)} / K_{1i}$, on retrouve les trois états de la coopération :

- i- les systèmes non-coopératifs pour lesquels la valeur du rapport $K_{1(i+1)} / K_{1i}$ est égale à la valeur prévue par la relation 20 ou le tableau 3
- ii- les systèmes coopératifs pour lesquels la valeur du rapport $K_{1(i+1)} / K_{1i}$ est supérieure à la valeur prévue par la relation 20 ou le tableau 3
- iii- les systèmes anti-coopératifs pour lesquels la valeur du rapport $K_{1(i+1)} / K_{1i}$ est inférieure à la valeur prévue par la relation 20 ou le tableau 3

La représentation de l'isotherme ou des diagrammes obtenus par les méthodes mathématiques de linéarisation permet de détecter les différentes situations de la coopérativité. La figure 5

donne un exemple de chacun des systèmes coopératif, non-coopératif et anti-coopératif. Dans cette figure, chaque système a été simulé au moyen de la relation 10.

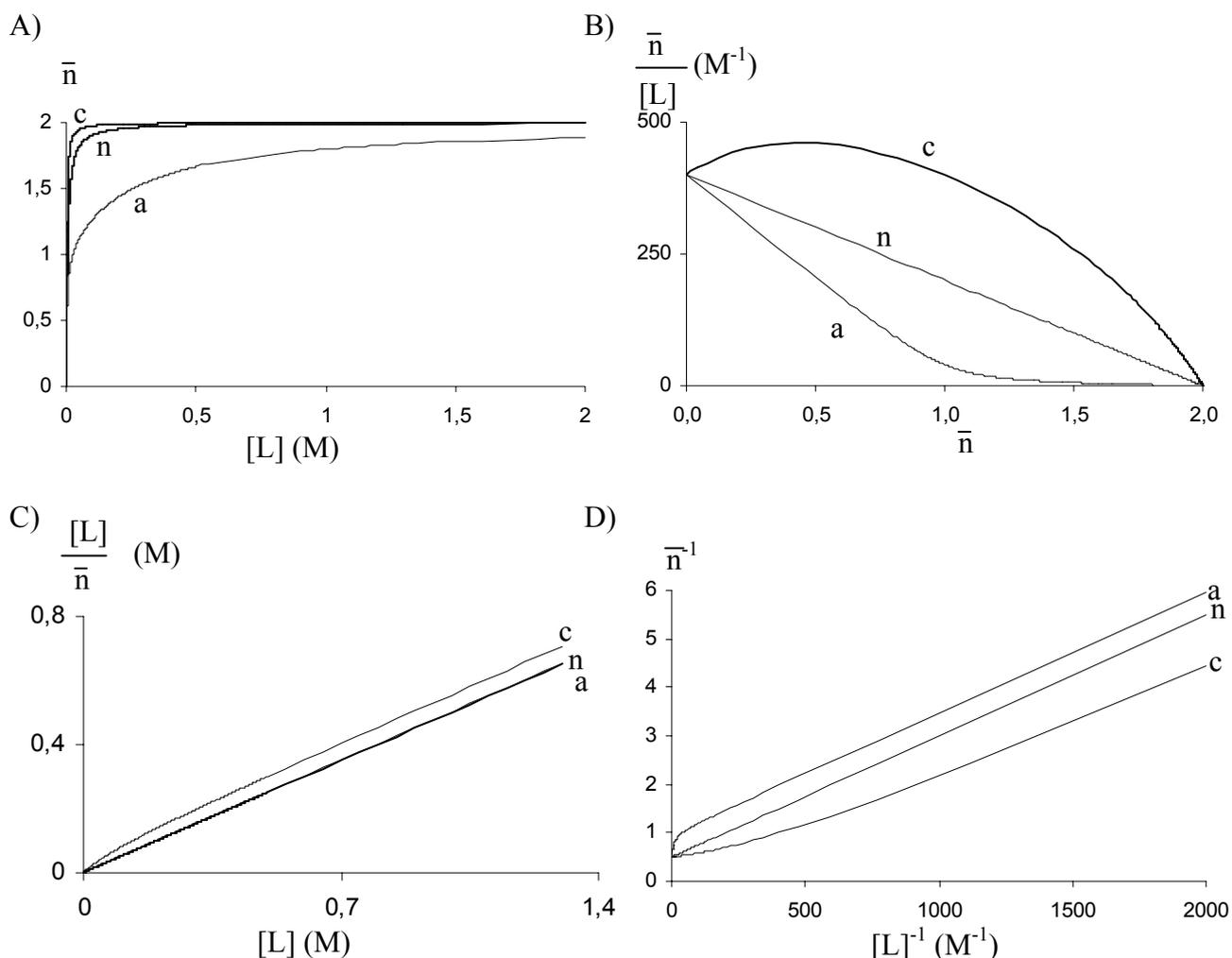


Figure 5 : Représentation de l'isotherme et des diagrammes obtenus par les méthodes mathématiques de linéarisation pour trois systèmes simulés à deux sites de type coopératif (c), non-coopératif (n), et anti-coopératif (a).

A : représentation de l'isotherme ; B : diagramme x-réciproque ; C : diagramme y-réciproque ; D : diagramme double réciproque.

Paramètres des simulations : $K_{11} = 400$ (c, n, a) et $K_{12} = 400$ (c) ; $K_{12} = 100$ (n) et $K_{12} = 4$ (a) ; calcul de \bar{n} d'après l'équation 10.

La figure 5 montre que toutes les représentations ne sont pas équivalentes pour détecter la présence du caractère coopératif. Aussi les deux représentations les plus sensibles sont la représentation de l'isotherme et le diagramme correspondant à la méthode x-réciproque. Enfin, il est à noter que dans le cas d'un système non-coopératif, l'ensemble des méthodes de linéarisation conduit à un seul segment de droite pour chacune des représentations.

D'autres modèles d'interaction ligand-site ont été développés pour décrire la coopération d'un système, parmi ceux-ci mentionnons les équations de Hill [8] et de McGhee-von Hippel modifiée par Lohman et Mascotti [9].

L'équation de Hill est définie par [8] :

$$\bar{n} = \frac{c_1 \cdot [L]^z}{1 + c_2 \cdot [L]^z} \quad (41)$$

où z est une mesure de la coopérativité dans le cas où le substrat possède au moins deux sites et c_1 et c_2 sont des constantes reliées à la constante intrinsèque et au nombre de sites d'interactions. Ainsi pour un système non coopératif, z vaut 1, pour un système anti-coopératif z est inférieur à 1 et pour un système coopératif, z est supérieur à 1.

L'équation de McGhee-van Hippel modifiée par Lohman et Mascotti s'écrit [9] :

$$\bar{n} = [L] \times \frac{1 - (n+1)\bar{n} + R}{(2(1-n\bar{n}))^2} \times \left(k(1-n\bar{n}) \cdot 2 \cdot \omega \cdot \frac{(1-n\bar{n})^2}{2\omega-1} + \bar{n} + R \right)^{n-1} \quad (43)$$

avec $R = \sqrt{(1 - (n+1)\bar{n})^2 + 4 \cdot \omega \cdot \bar{n}(1 - n\bar{n})}$

Dans cette équation, k est la constante ligand site, n est le nombre de site sur le substrat et ω est une mesure de la coopérativité ($\omega > 1$ pour un système coopératif, $\omega = 1$ pour un système non-coopératif, $\omega < 1$ pour un système anticoopératif). Lorsque le système est non-coopératif, ω vaut 1 et l'équation de McGhee-von Hippel se réduit à :

$$\bar{n} = [L] \cdot K(1 - n\bar{n}) \left(\frac{1 - n\bar{n}}{1 - (n-1)\bar{n}} \right)^{n-1} \quad (44)$$

Comme exemple de système coopératif, citons le système hémoglobine-oxygène. L'hémoglobine possède quatre sites d'interaction avec O_2 , conduisant aux formations des formes liées de l'hémoglobine (Hb) : Hb, HbO₂, HbO₄, HbO₆ et HbO₈. et dont les constantes de formation successives en fonction de la pression de O_2 sont respectivement : 1 ; 1,76, 1,31 et 17,7 [10].

Comme exemple de système non-coopératif, citons le cas des anticorps IgG, dont la structure moléculaire en forme de Y présente deux sites d'interaction identiques pour certaines petites molécules [11].

Comme exemple de système anticoopératif, citons la fixation du polymère polyacrylate modifié hydrophobe 150-1C12 [12] sur l'albumine de sérum bovin.

1.2.3.4 Modèle de compétition.

Lorsque l'on introduit dans le système un substrat qui possède n sites d'affinités pour deux ligands A et B, il s'établit un équilibre de compétition pour les deux ligands régi par les deux constantes k_a et k_b . Pour chacun des ligands, les expressions des taux moyens d'association des ligands A et B sur le substrat aboutissent à :

$$\bar{n}_a = \frac{nk_a[A]}{1+k_a[A]+k_b[B]} \quad (45)$$

et

$$\bar{n}_b = \frac{nk_b[B]}{1+k_a[A]+k_b[B]} \quad (46)$$

L'insertion de 46 dans l'expression 45 aboutit à :

$$\bar{n}_a = \frac{nk'_a[A]}{1+k'_a[A]} \quad (47)$$

avec $k'_a = \frac{k_a}{1+k_b[B]}$. De ce fait si [B] est maintenue constante, on est ramené au cas de

l'équation (19)

2 Méthodes électrophorétiques de détermination des constantes d'interaction.

Plusieurs méthodes de détermination des constantes d'interaction, dérivant pour la plupart de méthodes chromatographiques [7], ont été décrites en électrophorèse capillaire, notamment au début [13-14] et au milieu des années 1990 [15-17]. Parmi ces méthodes [6, 18-23], on distingue les méthodes faisant appel à l'électrophorèse de zone pour lesquelles de faibles volumes d'échantillons sont

injectés, et les méthodes basées sur l'analyse frontale (ou frontière mobile) électrophorétique pour lesquelles les volumes injectés sont plus importants. La première catégorie de méthodes regroupe cinq méthodes principales :

- la méthode par injection directe (I.D.), qui quantifie directement les formes complexée et libre
- les méthodes basées sur l'électrophorèse d'affinité qui mesurent la variation de la mobilité électrophorétique du substrat (électrophorèse capillaire d'affinité, E.C.A.) et du ligand (électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance, E.C.A.V.) sous l'effet de la variation de la concentration en ligand dans l'électrolyte.
- les méthodes fondées sur la détermination des aires de pics de vacance (Hümmel-Dreyer, H.D., pics de vacances, P.V.).

2.1 Méthode de l'injection directe.

Egalement appelée électrophorèse hors équilibre de mélanges équilibrés (Non Equilibrium Electrophoresis of Equilibrated Sample Mixtures), cette méthode consiste à injecter dans un capillaire rempli par de l'électrolyte support un mélange préincubé du substrat et du ligand additionné ou non d'un marqueur non interactif vis à vis de chacune des espèces en solution. Si le complexe et le substrat ont des mobilités suffisamment différentes, la migration aboutit à la formation de pics représentatifs de la molécule de marqueur, du substrat libre, du complexe et du ligand libre. Un étalonnage de l'aire réduite du pic de ligand libre réalisé par injection du ligand seul permet ensuite de déduire la concentration en ligand libre pour les différents mélanges substrat-ligand injectés. La figure 6 représente schématiquement la mise en oeuvre expérimentale pour ce protocole, d'après [23].

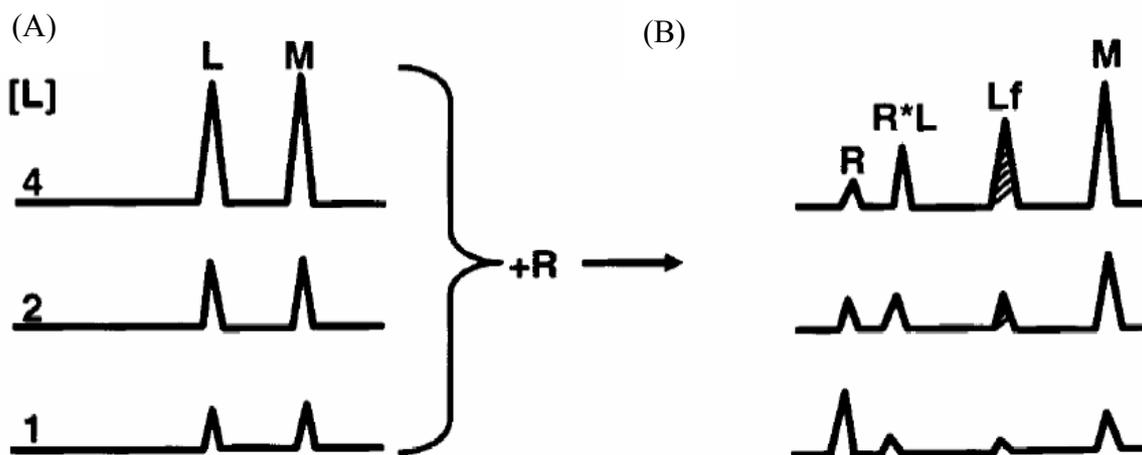


Figure 6 : Représentation schématique de la mise en œuvre expérimentale de l'injection directe.

A. Etalonnage de l'aire réduite du pic de ligand libre.

B. Mélanges substrat (R)-ligand, aux concentrations correspondantes en A.

L = ligand ; Lf = ligand libre ; M = marqueur ; R = substrat ; R*L = complexe substrat-ligand. D'après [23].

L'accès à la concentration en ligand libre permet ensuite par l'écriture du modèle des équilibres successifs ou d'interaction multisites d'énergies identiques, de quantifier l'interaction (voir partie 1).

Comparée aux autres méthodes, l'injection directe ne nécessite que de faibles quantités du substrat et du ligand, puisque seulement quelques nL des deux partenaires sont injectés par essai. De plus, en l'absence de comigration avec le ligand libre, le substrat (en général une protéine) n'a pas besoin d'être pur si les impuretés de l'échantillon ne complexent pas le ligand. Ce mode opératoire peut permettre en outre de suivre la cinétique de complexation par injection répétées au cours du temps d'un mélange substrat-ligand.

Cependant pour être valide, la méthode requiert que les complexes formés soient stables au cours de la migration électrophorétique. En particulier, il est nécessaire que l'aire réduite du pic de ligand mesurée soit effectivement représentative du ligand libre initialement injecté et donc que la dissociation du complexe au cours de la migration soit négligeable (et par conséquent, cinétiquement lente en regard du temps de migration). Ainsi, Heegard et Kennedy [24] ont recommandé que la constante de dissociation (k' (s^{-1})) correspondante doit être inférieure à $0,105 / t$ (où t est le temps global de la séparation en secondes), si l'on tolère une dissociation maximale de 10% du complexe au cours de la séparation. Ce dernier résultat peut

se démontrer en tenant compte d'une cinétique de réaction d'ordre 1 pour la dissociation du complexe SL. Ainsi, la vitesse de réaction de dissociation du complexe est définie par :

$$v = -\frac{d[SL]}{dt} = k'[SL] \quad (44)$$

où k' est la constante de vitesse. Si l'on définit x l'avancement de la réaction tel que :
 $x = [SL]_0 - [SL]$ on en déduit :

$$v = \frac{dx}{dt} = k'([SL]_0 - x) \quad (45)$$

et par suite :

$$\int_{x=0}^{x=t} \frac{dx}{[SL]_0 - x} = \int_{t=0}^{t=t} k' \cdot dt, \quad (46)$$

d'où

$$\ln \frac{[SL]_0}{[SL]} = k' \cdot t \quad (47)$$

Pour une dissociation maximale de 10% au cours de la séparation ($[SL] = 0,9 \cdot [SL]_0$), on obtient donc $k' = \ln(1/0,9) / t$, soit $k' = 0,1054 / t$.

Comme exemples d'interactions étudiées par ce protocole, on trouve les systèmes héparine-peptide de synthèse [26], peptide-ADN [27]. La figure 7 illustre les migrations obtenues dans le cas du système héparine-peptide SAP dimer [25]. Pour ce système, ni l'héparine, polysaccharide sulfaté, ni le complexe ne sont détectés sur la durée de la migration. A mesure que la concentration en héparine augmente dans les mélanges préincubés (24 heures), on observe une décroissance de l'aire du pic du peptide libre, ce qui traduit la complexation du peptide par le polysaccharide.

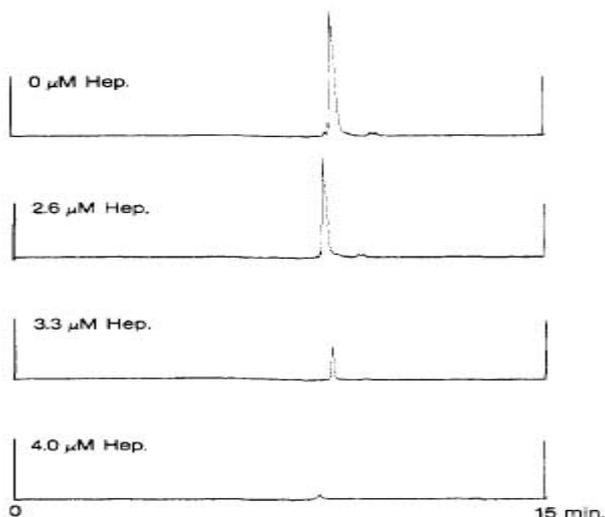


Figure 7 : Quantification de l'interaction Héparine-Peptide SAP par la méthode de l'injection directe.

Appareil d'électrophorèse capillaire Applied Biosystems 270A. Capillaire en silice vierge de 72 cm (longueur utile de 50 cm) de diamètre interne 50 μm . Electrolyte support : citrate de sodium 20 mM de pH 2,5 d'origine Applied Biosystems). Tension appliquée : 20kV (I comprise entre 17 and 20 μA). Température comprise entre 30,1 and 30,4 $^{\circ}\text{C}$. Injection de l'échantillon par dépression pendant 5 s correspondant à 18 nL. Echantillons : peptide SAP-1 à 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en présence héparine (concentrations indiquées sur la figure) D'après [25].

Lorsque la constante de vitesse de dissociation (k') est élevée, le complexe se dissocie au cours de la migration. Cette dissociation conduit, quand seule une espèce est détectée, à l'obtention d'électrophérogrammes en forme de U, les deux bords étant limités par le pic du complexe et du soluté libre. La figure 8 donne un exemple d'électrophérogramme ainsi obtenu pour le système de la protéine SSB liante d'ADN simple brin d'*E. coli* [28].

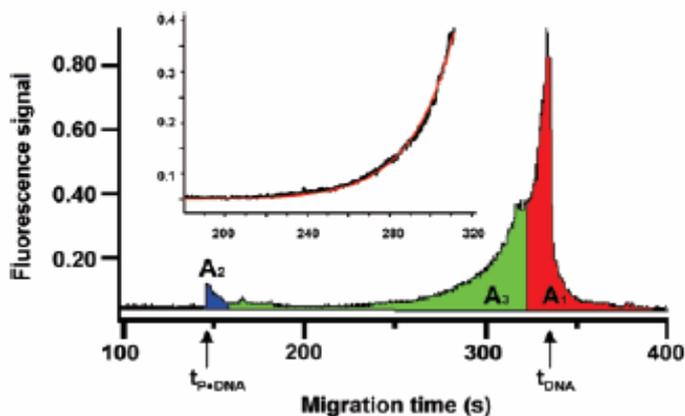


Figure 8 : Electrophérogramme du mélange ADN simple brin et protéine SSB liante d'*E. coli* par le protocole de l'injection directe.

Conditions opératoires : non précisées. Identification : A1 : monomère libre d'ADN ; A3 : monomère libre d'ADN résultant de la dissociation du complexe ADN-SSB ; A2 : protéine SSB libre. D'après [28].

La connaissance du temps de migration du soluté libre et du complexe permet ensuite d'ajuster la forme du pic obtenu par une fonction mathématique, comportant la constante de dissociation.

Cette technique a été également appliquée à d'autres systèmes ADN-protéine comme par exemple celui impliquant la thrombine humaine (figure 9) [29].

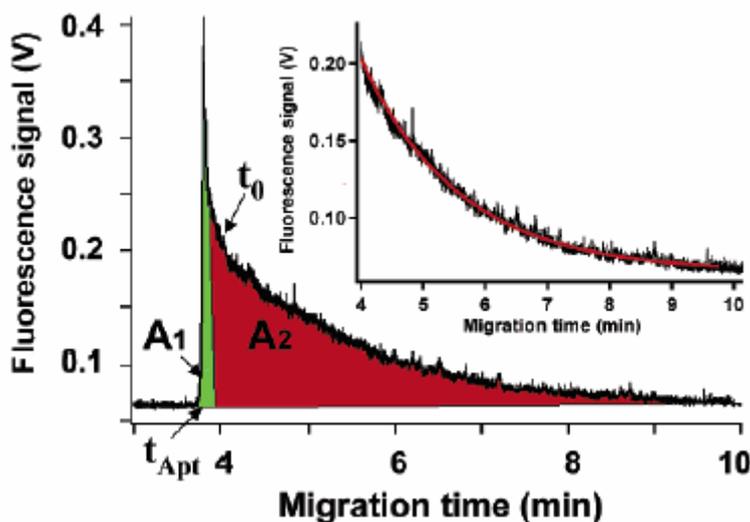


Figure 9 : Electrophérogramme du mélange ADN simple brin et thrombine humaine par le protocole de l'injection directe.

Capillaire en silice vierge : 20 μm d.i. x 33 cm (longueur utile 33 cm (détection post-colonne)). Electrolyte support : tampon borate de sodium 25 mM pH 9,4 contenant 200 nM de la protéine SSB d'*E. coli*. Tension appliquée : 13,2 kV. Température : ambiante. Détection par fluorescence à 520 nm (longueur d'onde d'excitation : 488 nm). Injection hydrodynamique : 9,1 mbars, 1 s. Identification : A1 : ADN simple brin libre ; A2 : ADN simple brin lié. D'après [29]

Dans ce dernier exemple, la protéine n'est pas détectée, et les portions d'aires A1 (sous le pic modélisé et symétrique de sommet t_{apt}) et A2 (égale à l'aire totale sous le pic diminuée de l'aire A1) ont été attribuées à l'ADN libre et complexé respectivement, le rapport de ces aires permettant d'évaluer la constante d'équilibre d'association K . L'accès à k' permet, après avoir estimé K , de calculer également la constante de vitesse de formation k_1 . Pour cette méthode, la valeur de la constante cinétique de formation est conditionnée par la valeur de la constante d'interaction K (déterminée à partir des aires A1 et A2). Il serait ainsi très souhaitable que la constante d'interaction soit déterminée de façon indépendante, par

exemple par une autre méthode électrophorétique appropriée. En outre, il est regrettable que les auteurs ne fournissent pas d'indications sur la détermination du temps t_0 qu'un repérage de la partie exponentielle du pic détecté, ni ne discutent les effets de la dispersion par électromigration (celle-ci modifiant la forme du pic lorsque la mobilité du co-ions de l'électrolyte est différente de la mobilité du composé injecté) sur la détermination des constantes cinétiques.

2.2 Méthodes basées sur la variation de la mobilité électrophorétique.

2.2.1 Electrophorèse capillaire d'affinité (ECA)

L'électrophorèse capillaire d'affinité consiste à conditionner le capillaire avec un électrolyte contenant un des partenaires, généralement le ligand, et à injecter un faible volume de substrat (notons dès à présent que ce protocole expérimental est identique à celui de la méthode de Hummel et Dreyer, détaillée plus loin). Sous l'effet de la complexation par le ligand, on observe la variation de mobilité électrophorétique $\mu_{epS,i}$ du substrat. Cette variation de mobilité est ensuite reliée aux constantes globales de formation β , à la mobilité des complexes formés et à la concentration de ligand libre dans la zone de substrat. Ainsi, un des avantages majeurs de cette méthode, réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire de connaître avec précision la concentration de substrat injecté (par exemple une protéine) [14]. L'électrophorèse capillaire d'affinité est certainement la méthode de détermination de constantes qui a connu le plus grand succès, principalement en raison de la simplicité de sa mise en oeuvre et de l'accès aux données expérimentales (intégration automatisée). C'est pourquoi, il est aujourd'hui presque impossible de répertorier exhaustivement les applications effectuées dans ce mode. Enfin mentionnons que la complexation devant se réaliser dynamiquement et au cours de la migration dans le capillaire, l'électrophorèse d'affinité ne sera bien adaptée qu'aux cinétiques rapides de formation et de dissociation du complexe.

2.2.1.1 Cas d'une interaction monomoléculaire

Dans le cas d'une interaction 1 :1, la variation de mobilité observée du substrat $\mu_{epS,i}$ peut être décrite en fonction de la constante de complexation K du substrat par le ligand, de la mobilité $\mu_{epS,0}$ du substrat libre et de la mobilité μ_{epSL} du complexe formé. Ainsi :

$$v_i \cdot \mu_{epS,i} = \frac{[S]}{[S]_t} \mu_{epS,0} + \frac{[SL]}{[S]_t} \mu_{epSL} \quad (48)$$

avec $\mu_{epS,0}$ mobilité du substrat en l'absence de ligand et v facteur correctif (de viscosité et de force ionique, voir ci-après). De cette expression, on déduit:

$$v_i \cdot \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K[L]} \quad (49)$$

Cette équation représente l'isotherme d'association. Comme dans le modèle d'interaction multisites, l'expression de l'isotherme peut être ajustée de façon non-linéaire, ou être transformée selon les méthodes x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque en vue d'un ajustement linéaire (droite d'équation $y' = a \cdot x' + b$). Les réarrangements de l'isotherme aboutissent respectivement [30] aux expressions rassemblées dans le tableau 3.

| Méthode | Coordonnées transformées $y'=f(x')$ | K | $\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}$ |
|------------------------|---|--------------------|----------------------------|
| Isotherme | $v_i \cdot \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K[L]} = f([L])$ | Ajustement n.l. | Ajustement n.l. |
| x- réciproque | $\frac{v_i \cdot \mu_{epSi} - \mu_{epS,0}}{[L]} = -K(v_i \cdot \mu_{epSi} - \mu_{epS,0}) + K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}) = f(v_i \cdot \mu_{epSi} - \mu_{epS,0})$ | -a | $\frac{b}{a}$ |
| y- réciproque | $\frac{[L]}{v_i \cdot \mu_{epS,i} - \mu_{epS,0}} = \frac{[L]}{\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}} + \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0})} = f([L])$ | $\frac{a}{b}$ | $\frac{1}{a}$ |
| double – réciproque | $\frac{1}{v_i \cdot \mu_{epS,i} - \mu_{epS,0}} = \frac{1}{K(\mu_{epSL} - \mu_{epS,0})} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}} = f([L]^{-1})$ | $\frac{b}{a}$ | $\frac{1}{b}$ |

Tableau 3 : Caractéristiques des représentations de l'isotherme et accès aux paramètres K et μ_{epSL} du système

Ajustement n.l. : paramètre obtenu par ajustement non-linéaire ; a et b : respectivement coefficient directeur et ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire obtenue dans le cas des méthodes de linéarisation.

A la différence de l'ajustement non linéaire de l'isotherme, les méthodes de régression linéaire ne présupposent pas la connaissance de la mobilité du complexe. Ce dernier paramètre peut ainsi être ajusté dans le calcul. Le tableau 3 rassemble les coordonnées transformées de chacune des trois méthodes ainsi que l'accès à la constante K et à la différence ($\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}$). Pour ces méthodes de linéarisation de l'isotherme, Rundlett et coll.

[3, 31] ont en particulier souligné le fait de n'être valides que si le calcul tient compte de la variation de mobilité et non de la variation de temps de migration.

Pour la détermination des paramètres d'interaction par ACE dans le cas d'une interaction monomoléculaire, Bowser et coll [32, 33] ont évalué, par simulations numériques, l'intérêt d'effectuer les différentes méthodes de linéarisation ou un ajustement non linéaire de l'isotherme en fonction de la concentration en ligand, de la constante d'interaction et de la largeur de l'intervalle de variation de la mobilité électrophorétique du substrat, les régressions simulées étant pondérées (facteur de pondération $w_i = 1/\sigma(y_i')$, où y' est la variable transformée) ou non. Les conclusions de ces études sont :

- que l'ajustement non-linéaire de l'isotherme est la méthode minimisant les erreurs lorsque la concentration en ligand n'est pas dans l'intervalle optimal de substrat complexé (entre 20 et 80 % de substrat complexé) ou lorsque que l'étendue de la variation de la mobilité électrophorétique du substrat est restreinte.
- que l'ajustement des diagrammes linéaires par régressions non-pondérées est recommandé du fait que la fonction de pondération est difficile à évaluer dans les conditions expérimentales, que la pondération conduit à des paramètres très voisins de ceux obtenus par la régression non pondérée, et enfin que la pondération choisie influe sur les valeurs finales des paramètres calculés.

Pour être juste, la méthode implique que la variation de mobilité observée ne doit être due qu'à la complexation par le ligand. En particulier, la méthode nécessite de corriger à mesure que la concentration en ligand augmente la variation de mobilité observée de la variation de la force ionique et de la variation de la viscosité de l'électrolyte [34]. Dans la majorité des cas, seule la variation de viscosité est appréciée (ce qui est justifié lorsque le ligand est faiblement concentré par rapport à l'électrolyte support ou que le ligand est neutre) et l'expression du terme correctif se réduit à : $v = \eta_i / \eta_0$, avec η_i viscosité de l'électrolyte contenant le ligand au niveau i et η_0 , viscosité de l'électrolyte en l'absence de ligand [6].

En théorie, la méthode impose également de connaître la concentration en ligand libre dans la zone de substrat. Cette concentration n'étant pas connue, l'approximation $[L] = [L]_i$ est généralement employée dans les différentes expressions de l'isotherme. Rundlett et coll. [4] ont souligné que cette hypothèse n'était valable que si la concentration du ligand est nettement supérieure à la concentration en substrat introduite, ou si la constante d'interaction

était faible. Lorsque qu'aucun des deux critères ci-dessus n'est vérifié, il est recommandé de calculer la concentration en ligand libre. Plusieurs propositions ont été formulées pour ce calcul. Ainsi, Rundlett et coll. ont préconisé d'effectuer ce calcul par itération ou par développement des séries de Taylor [3]. Poppe a proposé de résoudre le système d'équations de frontière mobile pour le substrat et pour le ligand [35]. Rundlett et coll. ont également recommandé de retrancher la fraction liée du ligand à sa concentration totale [4]. Notons pour cette dernière approche que le capillaire est assimilé à un système fermé et par conséquent, cette approche n'apparaît pas pertinente. Enfin, Galbusera et coll. [36] considèrent l'électrophorèse d'affinité comme un régime de migration à l'équilibre, avec $[L] = [L]_t$. Pour ce modèle il est alors nécessaire que les variations de mobilité s'affranchissent du temps de formation des espèces à l'équilibre. Quelques unes de ces recommandations ont été évaluées au cours des présents travaux dans le chapitre 3.

2.2.1.2 Cas de complexations d'ordres supérieurs.

Pour un système substrat – ligand formant des complexes mono (SL) et bimoléculaires (SL₂), la mobilité du substrat peut être décrite en fonction de la concentration en ligand L selon l'équation :

$$v \cdot \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + K_{11}[L] \cdot \mu_{epSL} + K_{11} \cdot K_{12} \cdot [L]^2 \cdot \mu_{epSL_2}}{1 + K_{11}[L] + K_{11}K_{12}[L]^2} \quad (50)$$

Au moyen de cette équation, Bowser et coll. [37] ont pu mettre en évidence et quantifier une interaction 1 :2 entre les substrats 4,4'-biphénol ou 4-phénylphénol et le ligand hydroxypropyle- β -cyclodextrine (complexes d'inclusion). La figure 10 donne les représentations des isothermes d'association obtenues pour chacun de ces deux systèmes.

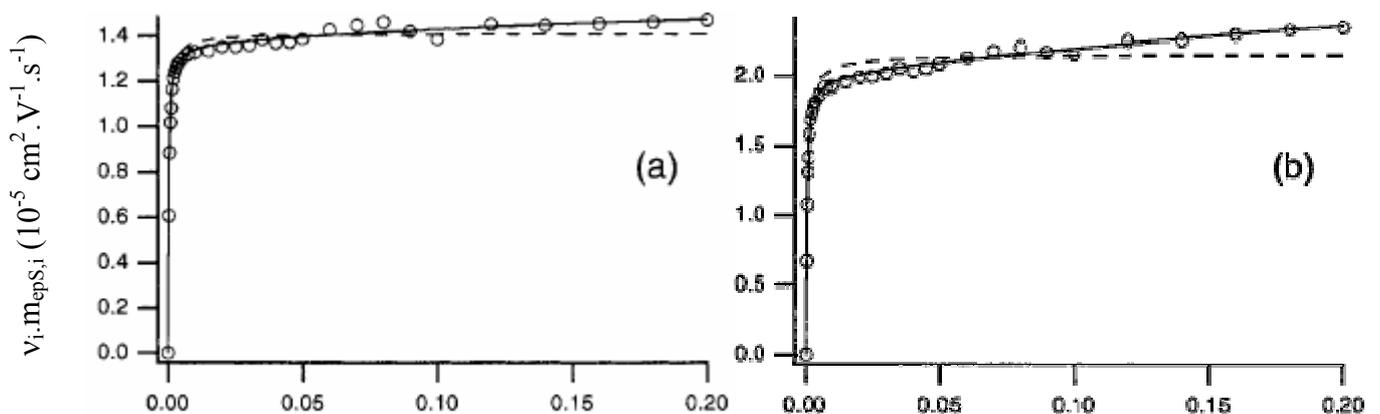


Figure 10 : Isotherme d'association des systèmes phénylphénol (a) et 4,4'-biphénol (b) et hydroxypropyle- β -cyclodextrine en milieu phosphate de sodium 20 mM de pH 11 par électrophorèse capillaire d'affinité.

Pointillés : isotherme d'association ajustée selon un modèle d'interaction monomoléculaire ; trait plein : isotherme d'association ajustée selon l'équation 50. D'après [37].

Cette expression (53) de l'isotherme peut être généralisée aux équilibres de type 1 :n et l'expression de l'isotherme devient :

$$v_i \cdot \mu_{epS} = \frac{\sum_{i=0}^n \beta_{1i} [L]^i \cdot \mu_{epSLi}}{\sum_{i=0}^n \beta_{1i} [L]^i}, \text{ avec } \beta_{10} = 1, \text{ et } \mu_{epSL0} = \mu_{epS,0}. \quad (51)$$

Pour détecter des interactions d'ordres supérieurs, il est nécessaire que les formes du substrat complexé 1 :1 à 1 :n aient des mobilités suffisamment différenciées les unes par rapport aux autres. La détection des interactions d'ordre supérieur sera donc favorisée quand le ligand apporte une charge au substrat. Selon l'équation 51, lorsque le système étudié est non-coopératif et que les formes complexées ont la même mobilité électrophorétique, l'ensemble des diagrammes de linéarisation conduit à l'obtention d'une droite. Dans ce cas, il n'est pas possible de détecter des complexes 1 : n. Notons que cela reste possible par les méthodes basées sur l'analyse frontale ou la quantification d'aires de pics (sections 2.3 et 2.4).

2.2.1.3 Cas de deux ligands compétitifs pour un même substrat.

Pour un système comportant deux ligands compétitifs L et L' formant tous deux un complexe 1 :1 avec un substrat, la mobilité du substrat peut être décrite en fonction des concentrations en ligand L et en ligand L' selon l'équation :

$$v \cdot \mu_{epS} = \frac{\mu_{epS,0} + K_{SL} [L] \mu_{epSL} + K_{SL'} [L'] \mu_{epSL'}}{1 + K_{SL} [L] + K_{SL'} [L']} \quad (52)$$

Cette équation a ainsi été appliquée à la modélisation de la mobilité du phénol, du paranitrophénol, et de l'acide benzoïque dans un tampon borate de sodium 160 mM de pH 9,2 contenant la β -cyclodextrine et de l'hydroxypropyle- β -cyclodextrine [38] et à la modélisation de la mobilité du phénol, du 2-naphtol et du 1-naphtol dans un tampon borate de sodium 160 mM de pH 9,2 contenant de l'hydroxypropyle- β -cyclodextrine et de la sulfobutylether- β -

cyclodextrine [39]. A titre d'exemple, la figure 11 donne la modélisation de la mobilité de ces trois derniers systèmes.

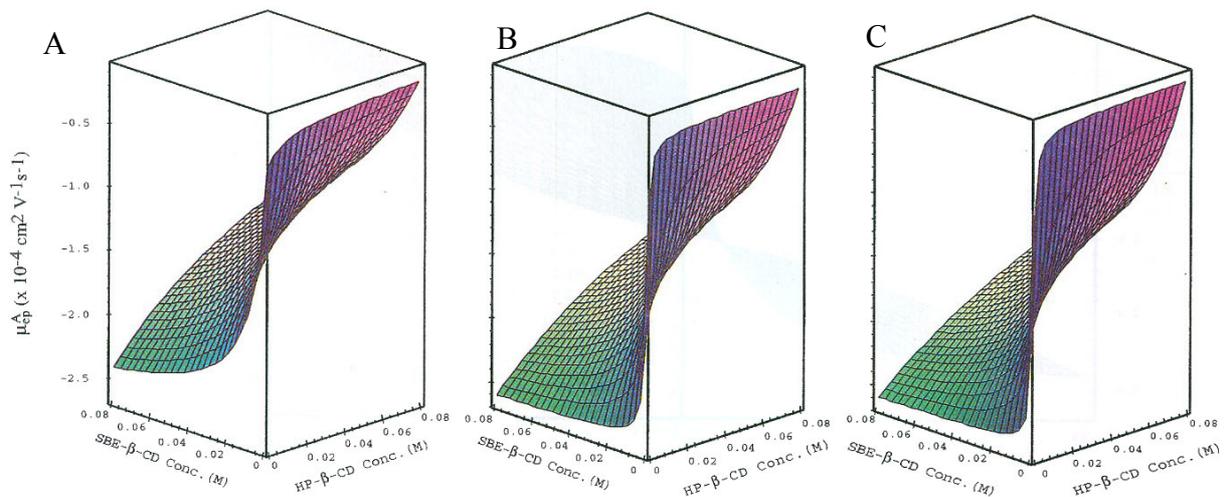


Figure 11 : modélisation de la mobilité de phénol (A), du 2-naphtol (B) et du 1-naphtol (C) dans un tampon borate de sodium 160 mM de pH 9,2 contenant de l'hydroxypropyle-β-cyclodextrine et de la sulfobutylether-β-cyclodextrine.

D'après [39].

Lorsque le système comporte deux ligands L et L', dont les complexations monomoléculaires avec le substrat tendent à modifier la mobilité de ce dernier dans le même sens, la mobilité corrigée du substrat $v \cdot \mu_{ep,S}$ peut varier, en supposant que la forme complexe SL ait la mobilité la plus élevée en valeur absolue, depuis $\mu_{ep,S,0}$ jusqu'à la mobilité du complexe $\mu_{ep,SL}$. Pour ce système, il existe une concentration de ligand L particulière (dite concentration « dengsu ») telle que la mobilité effective du substrat $v \cdot \mu_{ep,S}$ soit égale à la mobilité $\mu_{ep,SL'}$ du complexe SL' . Ainsi, à cette concentration de L, la mobilité du substrat $v \cdot \mu_{ep,S}$ n'est plus sensible à l'effet de la concentration en L'. A titre d'illustration, la figure 12 présente la simulation d'un système à deux ligand L et L' compétitif pour un même substrat.

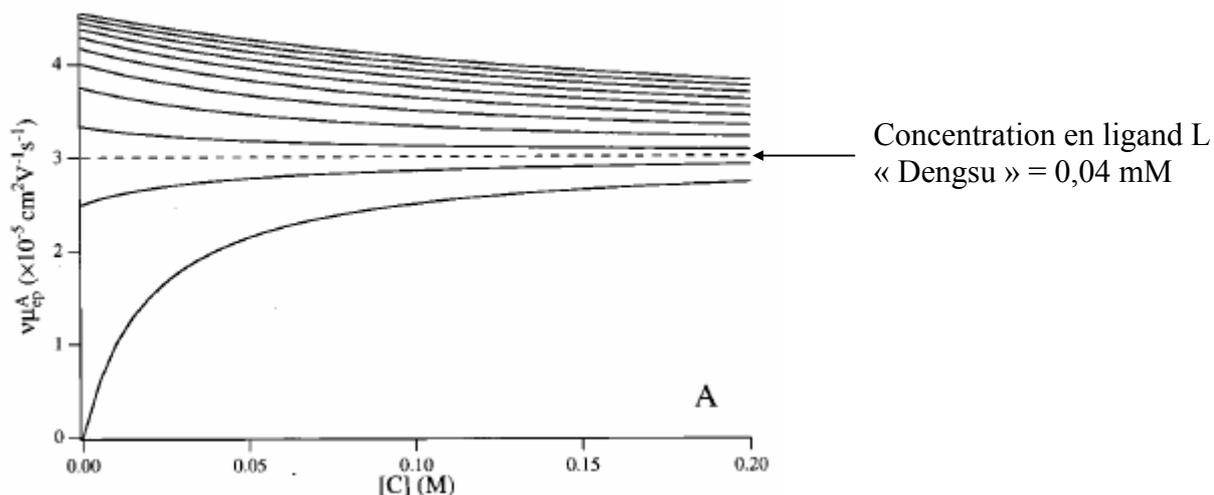


Figure 12 : Simulation de la mobilité corrigée d'un substrat A en interaction avec deux ligands L et C dont la mobilité des complexes AL et AC sont de même sens.

Paramètres de la simulation : $K_{AL} = 50 \text{ M}^{-1}$; $K_{AC} = 50 \text{ M}^{-1}$; $\mu_{epA,0} = 0. \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mu_{epAL} = 5. \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mu_{epAC} = 3. \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Concentration en ligand L constante dans la gamme 0 – 0,2 mM par incréments de 0,02 mM de bas en haut. D'après [40].

Enfin notons que Bowser et coll. [40] ont décrit l'évolution théorique de l'isotherme d'association dans le cas de la présence de deux ligands compétitifs pour le même substrat, et ou l'un des ligands peut former un complexe 1 : 2, ou encore lorsque les deux ligands sont eux-mêmes interactifs entre eux.

2.2.1.4 Cas des cinétiques lentes

L'électrophorèse d'affinité est adaptée aux cinétiques rapides de formation et de dissociation de complexe. Lorsque la dissociation du complexe est lente en regard du temps de migration ou que la migration électrophorétique est brève (électrophorèse sur puces) en regard de la constante de dissociation, c'est-à-dire quand le rapport $\ln 2 / k_{off}$ (avec k_{off} , constante de vitesse de dissociation) est supérieur à 1% du temps total de migration, le profil du pic de substrat peut être déformé (élargissement, traînée, division partielle, disparition) [24]. On peut alors se demander quel est l'impact de telles déformations sur la détermination des constantes d'interaction par électrophorèse capillaire d'affinité.

Une première réponse a été fournie par Chu et coll. pour l'interaction de l'anhydrase carbonique II bovine et d'un arylsulfonamide (noté 1 figure 11). Pour ce système, un élargissement du pic de substrat a ainsi été observé pour les concentrations en ligand dans l'électrolyte voisines de la mi-complexation [41]. Pour ce système les auteurs ont ainsi attribué cet élargissement à une cinétique de dissociation lente du complexe, telle que la

constante de vitesse correspondante k_{off} soit comparable au temps de migration du substrat. Par simulation du mode ECA, les auteurs ont ainsi évalué la constante de vitesse de dissociation, ainsi que la constante d'association entre l'anhydrase carbonique bovine et l'arylsulfonamide (et par suite la constante de vitesse de formation du complexe). Néanmoins, il est très fortement regrettable que le détail de la simulation employée n'ait pas été développé.

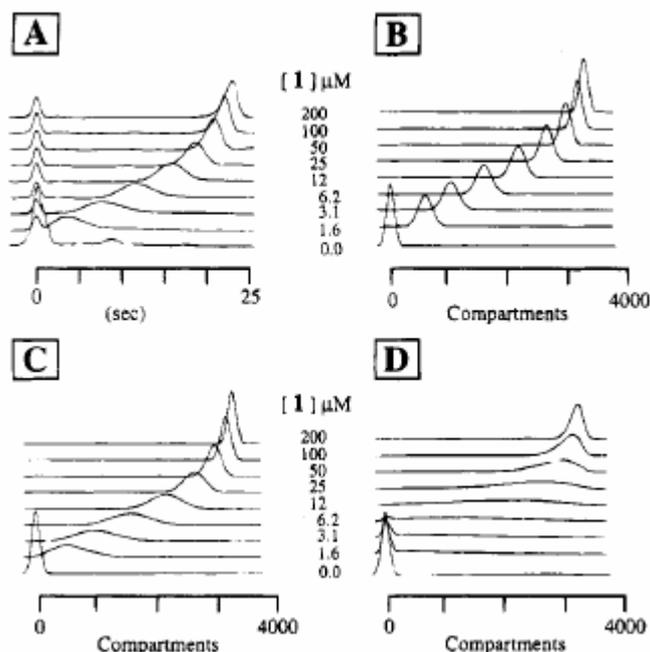


Figure 11 : Electrophérogrammes expérimentaux (A) et simulés (B-D) de l'anhydrase carbonique bovine dans un électrolyte contenant un arylsulfonamide (noté 1) en concentration croissantes.

Conditions expérimentales : non précisées, excepté : électrolyte support : tris 25 mM - glycine 192 nM pH 8,3.

Paramètres de la simulation : constantes k_{off} (s^{-1}) / k_{on} ($10^5 M. s^{-1}$) : 1,0 / 1,5 (B) ; 0,10 / 0,15 (C) ; 0,010 / 0,015 (D).

2.2.1.5 Méthodes de remplissage partiel du capillaire.

Un des inconvénients majeurs de l'électrophorèse capillaire d'affinité est la consommation (relativement) importante du ligand. En effet, le ligand doit être présent dans le capillaire au moment de l'injection du substrat et l'introduction de ligand doit être continue simultanément à la migration du substrat. Dans le cas où le ligand possède une mobilité apparente supérieure à celle du substrat (quelque soit sa forme), il serait envisageable de n'introduire le ligand qu'après l'injection du substrat (ou inversement de n'introduire que le ligand avant l'injection du substrat). Cependant, il devient alors nécessaire de corriger la variation de mobilité du substrat de la viscosité et/ou de la force ionique du milieu au cours de

la migration du substrat. Afin de réduire encore le volume de ligand consommé ainsi que le temps nécessaire à la détermination d'une constante, des méthodes de remplissage partiel ont été développées [42-44] et plus récemment revues [45]. La représentation schématique de ces méthodes est donnée figure 12.

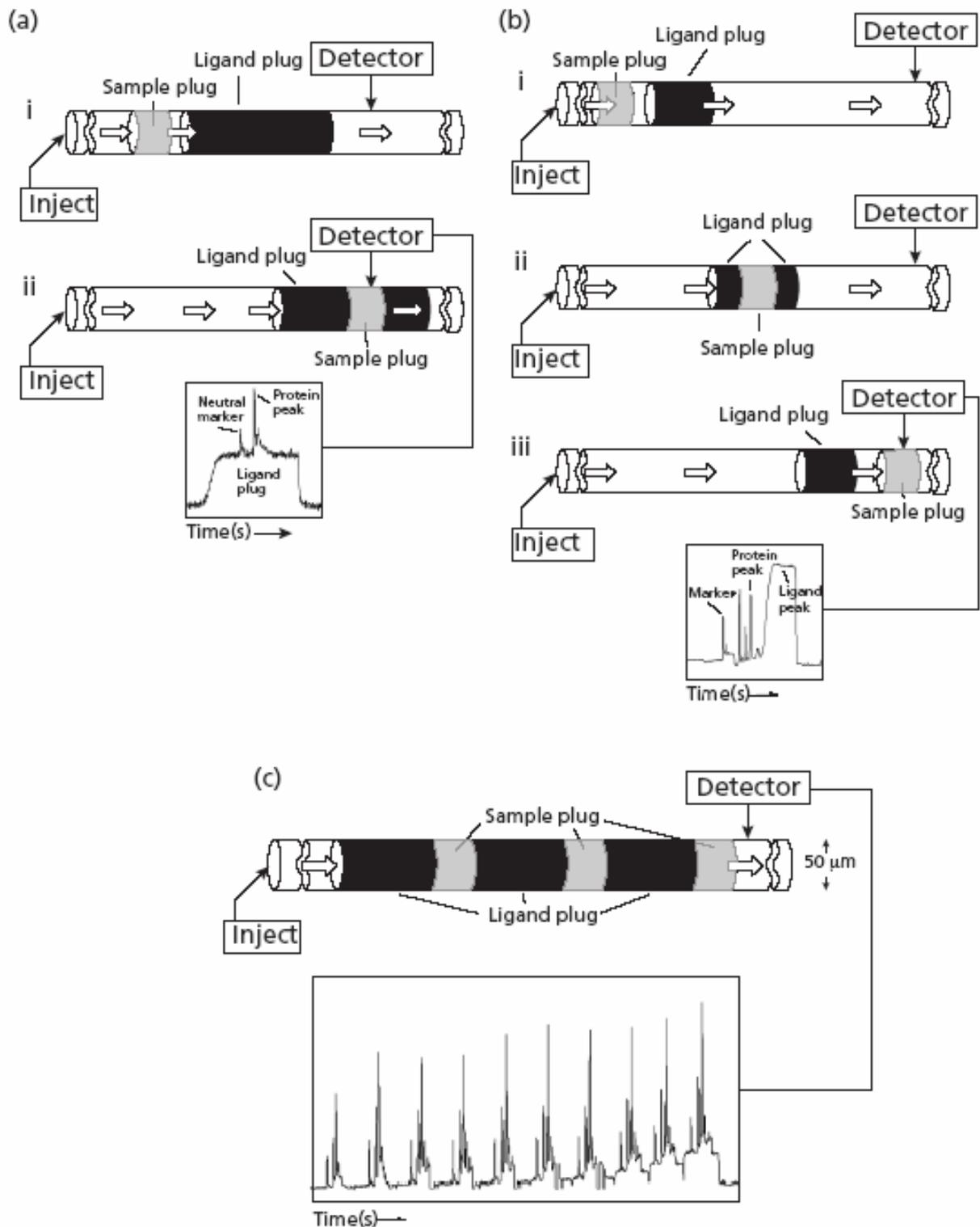


Figure 12 : protocoles d'électrophorèse d'affinité par les méthodes de remplissage partiel.

A : méthode de remplissage partiel du capillaire ; B : méthode de remplissage partiel avec traversée de la zone de ligand par le substrat ; C : méthode de remplissage partiel séquentielle (multiplug). D'après [45]

Dans le protocole de remplissage partiel (figure 12.a), le capillaire est rempli initialement avec de l'électrolyte support, puis un large créneau de ligand est introduit dans le capillaire et le substrat est injecté simultanément à un marqueur de flux électroosmotique inerte par l'entrée du capillaire. Au cours de la migration électrophorétique, la zone de substrat traverse le créneau de ligand, sans que le substrat ne ressorte de ce créneau. Comme dans le cas de l'ECA classique, la variation de mobilité observée pour le substrat est corrélée à la concentration du ligand et à la constante K. La figure 12a présente également un électrophérogramme typique obtenu dans ce mode.

Le protocole précédent a été modifié (figure 12.b) en vue de réduire encore la zone de ligand injectée et par suite sa consommation. Ce nouveau protocole est quasiment identique au précédent excepté que le substrat traverse le créneau de ligand de part en part. Néanmoins, pour ce protocole, le substrat ne passe qu'une fraction du temps de la migration observée en présence du ligand, c'est-à-dire à l'équilibre avec sa forme complexée, le substrat étant sous forme libre (puisque l'on suppose une cinétique rapide pour l'équilibre considéré) durant le restant de sa migration, dans l'électrolyte support seul (lorsque le substrat a traversé le créneau de ligand). Ainsi, ce protocole conduit à quantifier l'interaction avec un écart de mobilité observé maximal qui est égal à seulement une fraction de l'écart de mobilité entre la forme libre et complexée du substrat ($\mu_{epS,0} - \mu_{epSL}$), ce qui n'est pas favorable à une détermination précise de la constante [33].

Enfin, le troisième protocole (figure 12.c) est un développement du premier protocole qui consiste à remplir le capillaire en semi-continu par divers couples successif d'une zone courte de substrat et d'un créneau de ligand en concentration variable (méthode « multiplug »). La figure 5c présente également un électrophérogramme typique obtenu dans ce mode.

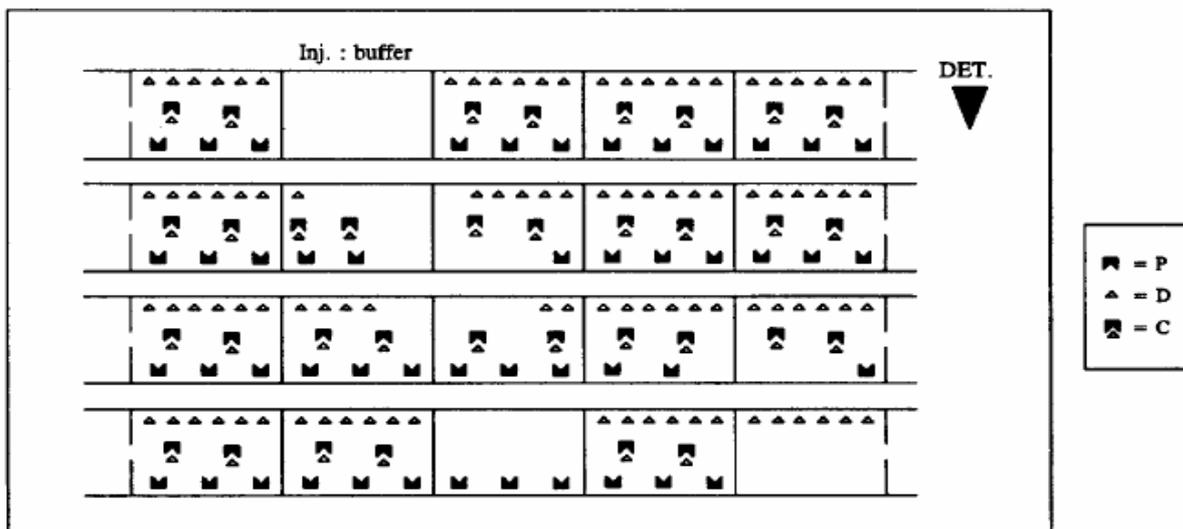
Ces protocoles présentent comme principal avantage d'abaisser fortement la consommation de ligand et pour la méthode c de réduire le temps nécessaire à l'évaluation de la constante. Quelques développements récents de ces protocoles ont par ailleurs été mis en œuvre pour la synthèse de substrat ou de ligand en ligne, intégrée à la détermination de la constante d'interaction correspondante (voir section 2.5). Notons toutefois que les méthodes

de remplissage partiel nécessitent une bonne connaissance préalable des caractéristiques électrophorétiques des partenaires de l'interaction, tant sous leurs formes libres que complexées, et sont globalement assez compliquées à mettre en œuvre (programmation des injections et enregistrement simultané des données). Ainsi, ces méthodes ne semblent pas si bien adaptées à un criblage des déterminations de constantes par les appareillages d'électrophorèse commercialement disponibles.

2.2.2 Electrophorèse d'affinité et de vacance

L'électrophorèse capillaire d'affinité et de vacance a été présentée par Busch [46]. Cette méthode, identique à la méthode des pics de vacance, consiste tout d'abord à conditionner un capillaire avec un électrolyte support contenant le substrat et le ligand, en ne faisant varier la concentration d'un seul des deux partenaires (par exemple le substrat), puis à injecter un faible volume d'électrolyte support seul avant l'application de la tension séparative (figure 9). Les migrations résultant de ce protocole conduisent à détecter un pic de vacance pour le ligand et un pic de vacance pour le substrat (figure 13) lorsque les deux partenaires sont détectés.

A)



B)

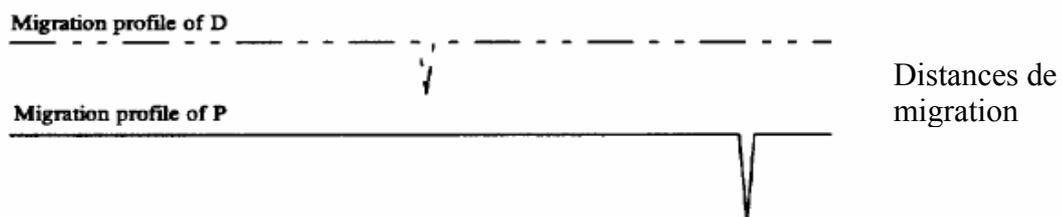


Figure 13 : Représentations schématiques d'une migration électrophorétique selon le protocole de l'électrophorèse d'affinité et de vacance (A) et des profils de concentration isochrones correspondants (B) d'après [46].

P : substrat ; D : Ligand ; C : complexe

Dans le cas d'une interaction monomoléculaire, Busch et coll ont établi la relation entre la mobilité de chacun des pics de vacance et la constante K :

$$- \text{ Pour le substrat : } v_i \cdot \mu_{epS,i} = \frac{[S]}{[S]_t} \mu_{epS,0} + \frac{[SL]}{[S]_t} \mu_{epSL} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \cdot K \cdot [L]}{1 + K[L]} \quad (53)$$

$$- \text{ Pour le ligand : } v_i \cdot \mu_{epL,i} = \frac{[L]}{[L]_t} \mu_{epL,0} + \frac{[SL]}{[L]_t} \mu_{epSL} \quad (54)$$

La position des pics de vacance des deux partenaires sur l'électrophérogramme dépend donc des proportions relatives des deux partenaires introduites initialement. Néanmoins, au contraire de l'électrophorèse d'affinité, la concentration en ligand libre [L] ne peut pas être supposée égale à la concentration introduite dans l'électrolyte support dans le cas de l'électrophorèse d'affinité et de vacance, et doit donc être calculée. La concentration totale de ligand dans le capillaire s'écrit :

$$[L]_t = [SL] + [L] = \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]} [S]_t + [L] \quad (55)$$

ce qui permet, après réarrangement de cette expression, de calculer l'expression de la concentration en ligand libre [L] dans l'électrolyte support contenant les deux partenaires :

$$[L] = -1 + K \cdot [L]_t - K[S]_t + \sqrt{(4 \cdot K \cdot [L]_t + \frac{(1 - K \cdot [L]_t) + K \cdot [S]_t)^2}{2 \cdot K}} \quad (59)$$

Pour l'estimation de la constante K, le calcul nécessite d'effectuer des itérations successives sur K, [L] et μ_{SL} . L'initialisation par les paramètres K et μ_{epSL} permet de calculer [L] (équation (56)), les deux valeurs K et [L] étant ensuite elles-mêmes introduites dans le calcul de la mobilité du pic de vacance de L observé. Le calcul itératif total s'arrête lorsque les valeurs de K, [L] et μ_{SL} aboutissent à une mobilité du pic de vacance $v_i \cdot \mu_{epL,i}$ convergente vers la mobilité expérimentale observée du pic de ligand.

A titre d'exemple, la figure 14 présente des électrophérogrammes obtenus par le protocole de l'électrophorèse d'affinité et de vacance pour le système vancomycine / n-acétyl-D-alanyl-D-alanyl. Dans cet exemple, seule la vancomycine est détectée.

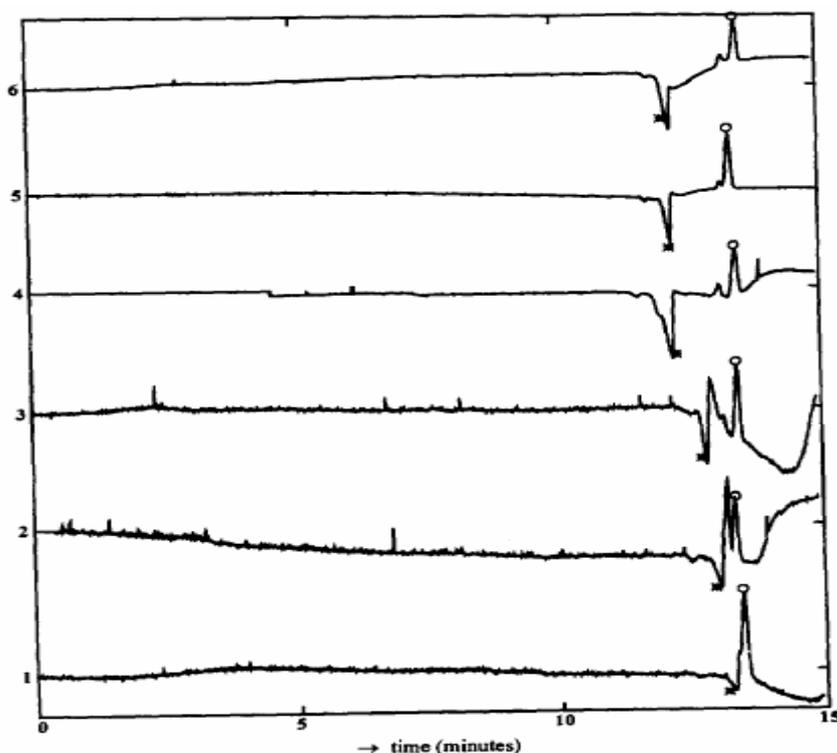


Figure 14 : Electrophérogrammes expérimentaux du système vancomycine / n-acétyl-D-alanyl-D-alanyl obtenus par le protocole de l'électrophorèse d'affinité et de vacance.

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 76,3 cm (longueur utile 46,9 cm). Electrolyte support : tampon phosphate 50 mM de pH 6,0 contenant le n-acétyl-D-alanyl-D-alanyl à 50 μM et la vancomycine en concentrations variables (de bas en haut) : 14 μM ; 28 μM ; 35 μM ; 123 μM ; 178 μM ; 232 μM . Tension appliquée : 13 kV. Température : 27°C. Détection par absorbance UV à 215 nm de la vancomycine. Injection hydrodynamique de l'électrolyte support (169 mbars, 1,5 s). Identification : \circ : oxyde de mésityle ; * : pic de vacance de la vancomycine. D'après [46].

En plus du calcul de la constante K, les auteurs mentionnent que la mobilité du pic de substrat est reliée à la proportion de substrat libre et de substrat lié. Ainsi, comme la proportion de substrat lié est égale à la quantité de ligand lié (pour une interaction monomoléculaire), la mobilité du pic de substrat peut être reliée à un modèle multisites.

Pour la détermination de constantes, il ressort que la méthode de l'électrophorèse d'affinité et de vacance consomme des quantités importantes de ligand et de substrat, ces derniers devant être tous deux introduits dans l'électrolyte support, et de surcroît impose un calcul extrêmement fastidieux pour la détermination de la constante d'interaction K. Elle présente donc peu d'intérêt pratique.

2.3 Méthodes basées sur la quantification d'aires de pics de vacance.

2.3.1 Méthode des pics de vacance

La mise en œuvre expérimentale de la méthode des pics de vacance est identique celle de la méthode d'électrophorèse d'affinité et de vacance. Elle consiste tout d'abord à conditionner un capillaire avec un électrolyte support contenant le substrat et le ligand, en ne faisant varier la concentration d'un seul des deux partenaires (par exemple le substrat), puis à injecter un faible volume d'électrolyte support seul avant l'application de la tension séparative. Néanmoins, la méthode des pics de vacance exploite cette fois l'aire du pic de vacance obtenu pour l'espèce détectée, ici le ligand. En effet, il apparaît que l'aire de ce pic est proportionnelle à la concentration de ligand libre dans le mélange ligand-substrat remplissant le capillaire.

Pour la détermination de la concentration en ligand libre, l'étalonnage (figure 15) de l'aire de du pic de vacance consiste à injecter dans le capillaire, préalablement rempli du mélange substrat-ligand, de l'électrolyte support contenant des concentrations croissantes de ligand. Le ligand injecté compense partiellement ou totalement le défaut de ligand libre de l'électrolyte support. Ainsi, on observe un pic de vacance dont l'aire de vacance décroît, puis pour les concentrations de ligand injectées supérieures à la concentration de ligand libre dans le mélange ligand-substrat remplissant le capillaire, un pic de ligand positif. Le graphe de l'aire du pic de vacance du ligand en fonction de la concentration en ligand injecté est une droite. L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses donne la concentration de ligand libre dans le mélange ligand-substrat remplissant le capillaire (figure 15).

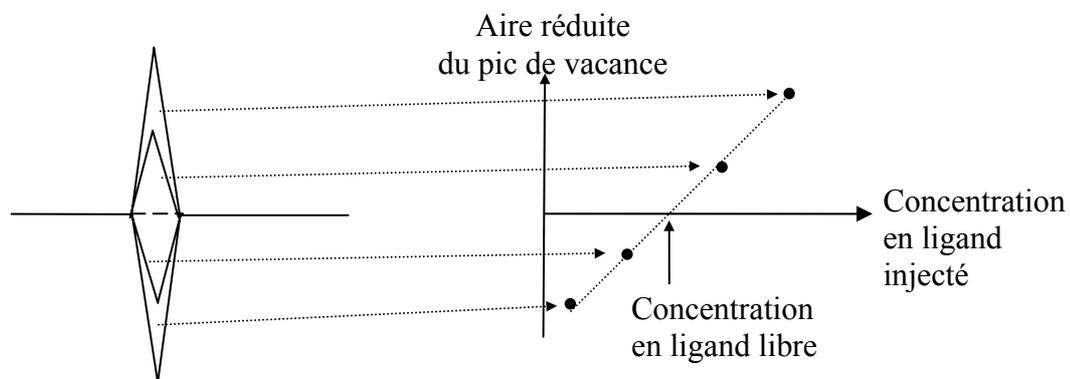


Figure 15 : Etalonnage interne de l'aire du pic de vacance obtenu pour le ligand libre par la méthode des pics de vacances .

Adapté de [16]

L'écriture du bilan matière pour le ligand dans le mélange ligand-substrat remplissant le capillaire s'écrit :

$$[L]_{\text{total}} = [L]_{\text{libre}} + [L]_{\text{lié}} \quad (57)$$

Ce bilan permet ainsi déterminer la concentration en ligand lié, et par suite d'accéder au taux moyen d'association du ligand sur le substrat, la concentration totale de substrat étant connue par préparation. Les données expérimentales peuvent ainsi être exploitées dans les différents modèles (équilibres successifs, modèle multisites).

A titre d'exemple, la figure 16 donne les électrophérogrammes obtenus pour le système albumine sérique bovine et la warfarine par le protocole des pics de vacance.

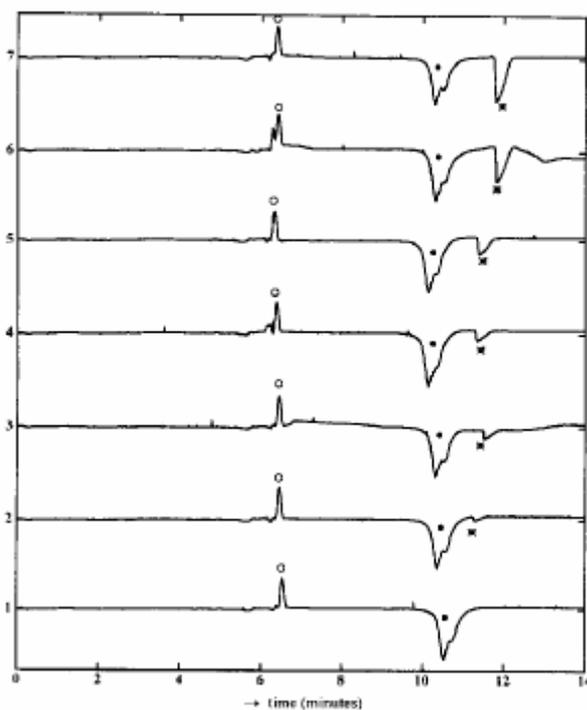


Figure 16 : Electrophérogrammes expérimentaux du système albumine de sérum bovin (ASB) – warfarine par la méthode des pics de vacance.

Conditions expérimentales : capillaire en silice vierge 50 mm d.i. x 50 cm (longueur utile 30 cm). Tension appliquée : 10 kV. Electrolyte support : 67 mM tampon phosphate pH 7,4 contenant l'albumine sérique bovine à 40 μM et la warfarine en concentrations (de bas en haut) : 102 μM ; 136 μM ; 204 μM ; 272 μM ; 509 μM ; 611 μM ; 815 μM . Injection hydrodynamique de l'électrolyte support (169 mbars, 1,5 s). Détection par absorbance UV à 215 nm. Identification : \circ : Oxyde de mésityle ; \bullet : Complexe ASB-warfarine et ASB libre ; x : warfarine libre. D'après [16].

Pour la détermination de constantes d'interaction, cette méthode présente comme inconvénients de consommer des quantités importantes de substrat et de ligand (comme pour la méthode d'électrophorèse d'affinité et de vacance) et de nécessiter un étalonnage fastidieux. En effet, il est nécessaire pour cette méthode d'estimer la concentration en ligand libre pour chaque mélange substrat-ligand par au moins deux injections de ligand (en concentration variable) supplémentaires (le nombre total de migrations étant ainsi multiplié par environ 3 par rapport au nombre au nombre de mélanges substrat-ligand à étudier).

2.3.2 Méthode d'Hümmel et Dreyer

De mise en œuvre expérimentale identique à la méthode d'électrophorèse d'affinité, la méthode de Hümmel et Dreyer consiste à préconditionner le capillaire avec un électrolyte support contenant le ligand puis à injecter le substrat. Ce protocole conduit à observer un pic pour le ligand (qui est détecté dans ce protocole) dont l'aire réduite (A_1) est proportionnelle à la quantité de ligand consommée pour la formation du complexe SL, et par suite à la concentration de SL. L'étalonnage de la l'aire réduite du pic de vacance est réalisé par étalonnage interne ou externe.

L'étalonnage interne consiste à injecter dans le capillaire, rempli d'un électrolyte contenant le ligand à concentration fixe, le substrat en mélange avec des concentrations variables de ligand (figure 17). La quantité de ligand injecté compense partiellement ou totalement la consommation de ligand de l'électrolyte support. Ainsi cette méthode conduit à l'obtention d'une droite pour l'aire réduite du pic de vacance en fonction de la concentration en ligand introduite avec le substrat. L'intersection cette droite avec l'axe des abscisses donne la concentration en ligand lié.

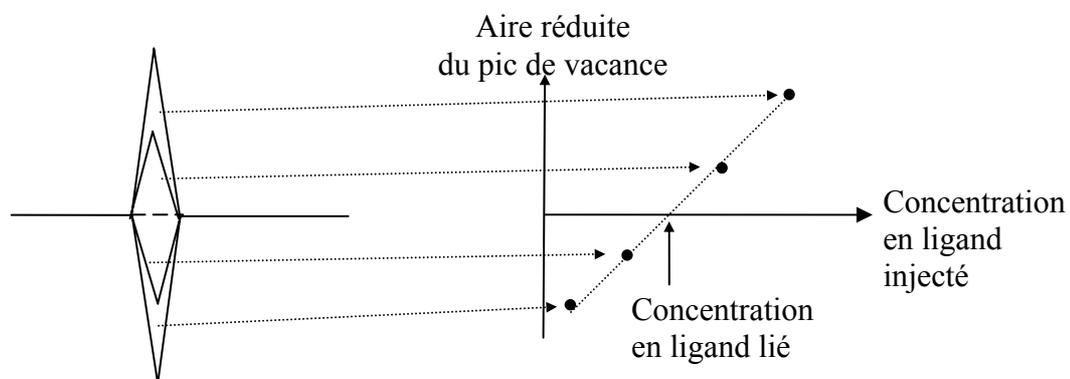


Figure 16 : Etalonnage interne de l'aire du pic de vacance obtenu pour le ligand lié par la méthode d'Hümmel-Dreyer.

Adapté de [16].

L'étalonnage externe consiste à injecter l'électrolyte support seul (c'est-à-dire exempt de substrat et de ligand) dans un capillaire préalablement rempli de l'électrolyte support contenant des concentrations variables de ligand. L'aire réduite du pic de vacance (obtenu pour le ligand) est alors attribuée à la concentration du ligand dans l'électrolyte support remplissant le capillaire. Ceci permet d'évaluer la concentration en ligand lié lors des injections du substrat par proportionnalité avec l'aire du pic étalon.

La concentration totale de substrat injectée étant connue expérimentalement, l'accès à la concentration de ligand lié (par l'une ou l'autre des deux méthodes d'étalonnage) permet de calculer le taux moyen d'association du ligand par molécule de substrat, puis quantifier l'interaction par le modèle multisites ou par le modèle des équilibres successifs.

La figure 18 donne un exemple d'application de cette méthode pour le système albumine de sérum bovin / warfarine. Dans cet exemple, la warfarine (ligand) a été injectée (simultanément à l'albumine (substrat)) en concentrations croissantes dans un capillaire contenant la warfarine à concentration fixe. Ainsi, on observe le pic de vacance pour la warfarine liée qui est d'abord négatif et qui devient positif.

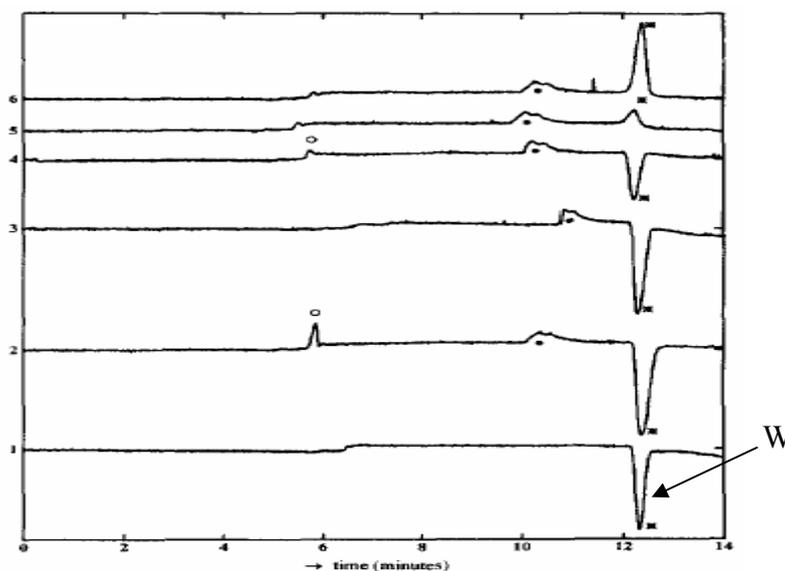


Figure 18 : électrophérogrammes du système sérum albumine bovine (ASB) et warfarine (W) par la méthode de Hummel et Dreyer.

Conditions expérimentales : capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 50 cm (longueur utile 30 cm). Electrolyte support : 67 mM tampon phosphate pH 7,4 contenant 309 μM de warfarine. Tension appliquée : 10 kV. Détection UV à 315 nm. Injection hydrodynamique de l'échantillon : 169 mbars, 1,5 s. Echantillons injectés (de bas en haut) : tampon phosphate

contenant l'ASB et la warfarine (μM): 0/0 ; 42/0 ; 42/259 ; 42/388 ; 42/518 ; 42/576. Identification : \circ : artéfact ; \bullet : ASB (complexe et libre) ; x : warfarine. D'après [16].

2.4 Méthodes basées sur l'analyse frontale.

Contrairement aux méthodes reposant sur l'électrophorèse de zone pour laquelle un faible volume d'échantillon est injecté, l'analyse frontale consiste à injecter, dans un capillaire ne contenant que l'électrolyte support, un large volume d'un mélange substrat-ligand préalablement préincubé. L'injection du créneau long permet au cours de la migration de ne séparer que partiellement les partenaires de l'interaction, conservant ainsi l'intégrité de l'équilibre considéré. Il existe deux variantes pour cette méthode qui diffèrent par le mode d'introduction de l'échantillon.

2.4.1 Analyse frontale électrocinétique continue.

L'analyse frontale électrocinétique continue consiste à injecter en permanence un mélange substrat-ligand pré-incubé, mis en solution dans le milieu d'étude (en général, il s'agit d'un tampon pH) sous l'effet de l'application du champ électrique [15]. La migration du mélange dans l'électrolyte de séparation constitué du milieu d'étude, simultanément à son injection, conduit à la formation de fronts de migration séparés selon les différences de mobilité des formes considérées. Lorsque toutes les espèces en solution sont détectées, comme le montre la figure 19, il apparaît trois fronts de migration pour l'échantillon injecté. Si le ligand a la mobilité apparente la plus élevée, le premier front marque l'arrivée devant le détecteur du ligand libre seul, à sa concentration d'équilibre avec le substrat. Il apparaît ensuite un deuxième puis un troisième front de migration marquant l'arrivée du complexe SL et du substrat S en équilibre, de sorte qu'à partir de ce dernier front, l'ensemble des formes en équilibre se trouvent détectées en continu (figure 19). Ces trois fronts de migration se prolongent sur l'électrophérogramme par trois paliers de concentration successifs. Par étalonnage de la hauteur du premier palier réalisé en injectant le ligand seul, il est possible de déterminer la concentration du ligand libre dans le mélange substrat-ligand, puis par l'écriture des bilans matière, d'en déduire les paramètres de l'interaction (voir paragraphe 1).

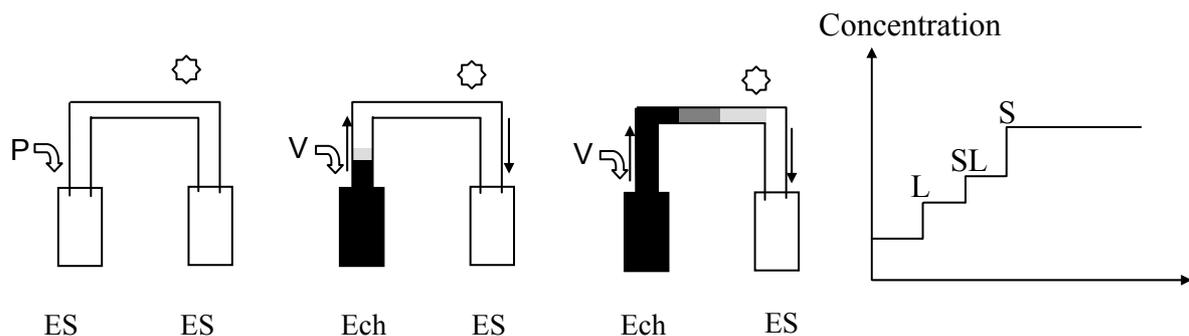


Figure 19 : Représentation schématique de l'analyse frontale électrocinétique continue : mise en œuvre expérimentale et électrophérogramme.

Cas de deux partenaires interactifs S et L formant un complexe SL. Détection des espèces et formes dans l'ordre des mobilités croissantes : L, SL, S. Noir : L + S + SL ; gris foncé : L + SL ; gris clair : L. P : application d'une pression ; V : application d'une tension.

La figure 20 montre un exemple de séparation obtenus par ce protocole dans le cas du système β -lactoglobuline / polystyrène sulfonate. Cette série d'électrophérogrammes permet d'apprécier qualitativement l'influence de la masse moléculaire du polymère sur la mobilité électrophorétique du complexe β -lactoglobuline - polystyrène sulfonate. En particulier, on note que la mobilité des complexes (appréciée au point d'inflexion du front correspondant) décroît avec la masse moléculaire du polymère.

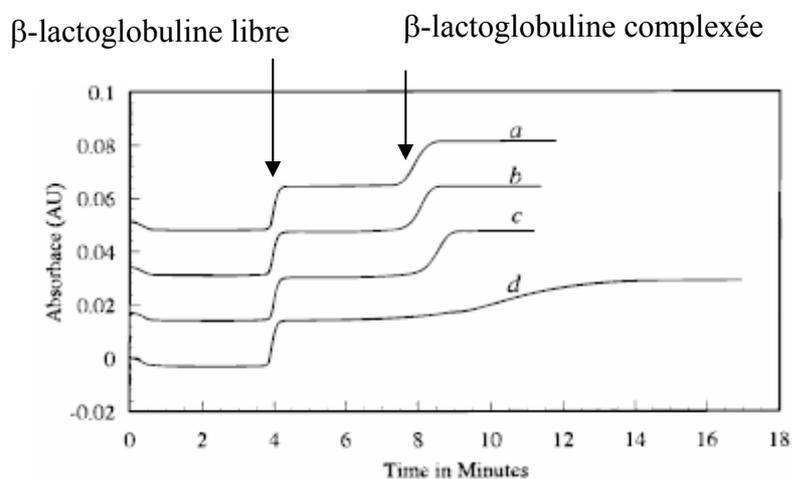


Figure 20 : électrophérogrammes expérimentaux de la β -lactoglobuline en interaction avec des polystyrène sulfonate de différentes masses moléculaire.

Capillaire en silice vierge $50 \mu\text{m} \times 27 \text{cm}$ (longueur utile 20cm). Electrolyte de séparation : phosphate de sodium de pH 6,7 et de force ionique 50mM . Tension appliquée : 7kV . Longueur d'onde de détection non précisée. Echantillon : β -lactoglobuline ($0,83 \text{g.L}^{-1}$) et polystyrène sulfonate ($0,1 \text{g.L}^{-1}$) de masse moléculaire en poids : 710k (a) ; 88k (b) ; 31k (c) ; $5,4 \text{k}$ (d). D'après [47].

2.4.2 Analyse frontale avec injection en mode hydrodynamique.

Le transport lors de la séparation se faisant par migration, l'injection du mélange substrat-ligand peut être réalisée selon ce même mode de transport, c'est-à-dire en mode électrocinétique. Toutefois, il existe une variante qui consiste à injecter en mode hydrodynamique, un créneau « long » du mélange substrat-ligand, qui migre dans l'électrolyte de séparation. En supposant toujours que le ligand ait la mobilité apparente la plus importante et que le substrat ait la plus faible, cette approche conduit à l'obtention d'un électrophérogramme constitué de cinq paliers de concentration si toutes les formes sont détectées (figure 21). Le premier palier est le reflet de la concentration à l'équilibre du ligand libre et le dernier du substrat libre. Comme pour la méthode précédente, l'estimation des paramètres d'interaction est réalisée par l'écriture des bilans matière, à partir de l'étalonnage de la hauteur des paliers pour les formes libres du ligand et, ou, du substrat.

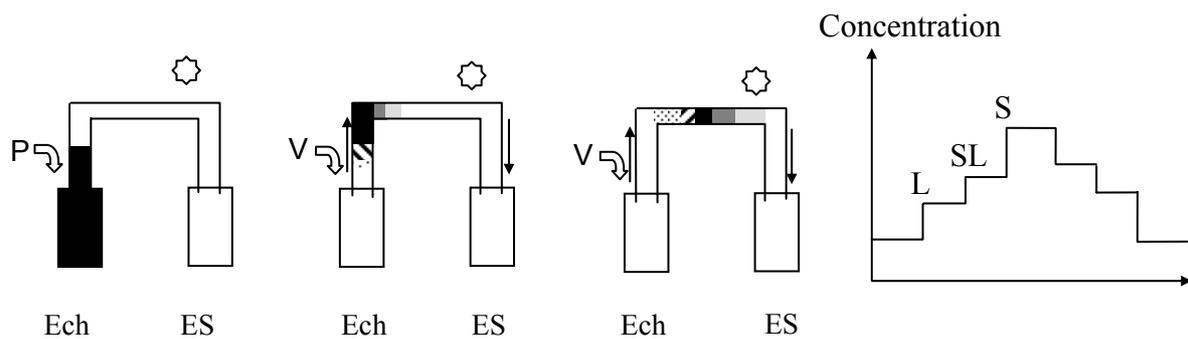


Figure 21 : mise en oeuvre expérimentale de l'analyse frontale régulière et électrophérogramme.

Cas de deux partenaires interactifs S et L formant un complexe SL. Détection des espèces et formes dans l'ordre des mobilités croissantes : L, SL, S. Noir : L + S + SL ; gris clair : L ; gris foncé : L + SL ; aire hachurée: S + SL ; aire pointillée : S.

La figure 22 présente une série d'électrophérogrammes expérimentaux obtenus lorsque la longueur du créneau injecté varie pour le système albumine sérique humaine / warfarine. Cette mise en œuvre par injection hydrodynamique, illustre en particulier la nécessité de l'optimisation de la durée de l'injection hydrodynamique de l'échantillon. Ainsi, pour cet exemple, il apparaît indispensable d'injecter l'échantillon au moins 60 s afin d'éviter une dissociation du complexe à cause de la séparation totale des constituants au cours de la migration.

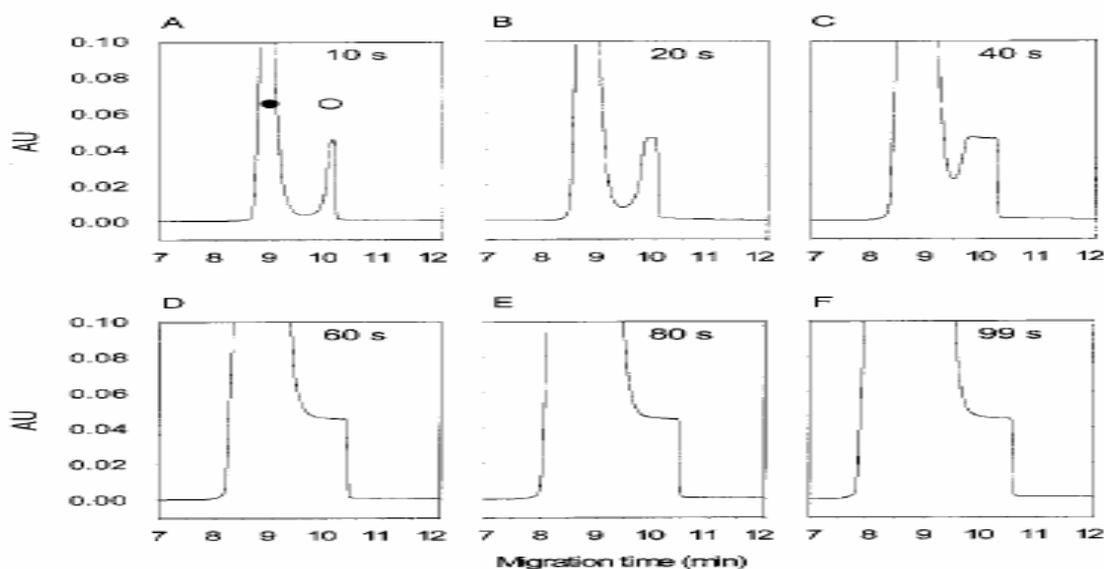


Figure 22 : Electrophérogrammes expérimentaux obtenus selon le protocole de l'analyse frontale avec injection en mode hydrodynamique en fonction de la longueur du créneau injecté pour le système albumine humaine (●) – warfarine(○).

Capillaire en silice vierge 50 μm x 57 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon phosphate de sodium 67 mM de pH 7,4. Tension appliquée : 15 kV. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique de l'échantillon à 34,5 mbars : 10 s (A) ; 20 s (B) ; 40 s (C) ; 60 s (D) ; 80 s (E) ; 99 s (F). Echantillon : mélange albumine à 57 μM et warfarine à 595 μM . D'après [48].

2.4.3 Protocoles particuliers de l'analyse frontale.

2.4.3.1 Injection électrocinétique sélective.

Une première extension de l'analyse frontale a été énoncée par Ohara et coll. [49] pour le dosage des énantiomères R et S du vérapamil en interaction avec l'albumine sérique humaine ($pI = 4,9$ [50]) dans un milieu mimant les conditions physiologiques (tampon phosphate de sodium de pH = 7,4 et de force ionique 0,17 M) (figure 23). L'injection électrocinétique du mélange, dans un capillaire en silice vierge préalablement rempli avec un électrolyte acide (pH 2,5) générant un flux électroosmotique résiduel faible, permet d'introduire sélectivement le vérapamil cationique à l'état libre (figure 23), la protéine libre et le complexe étant tout deux anioniques. Ainsi, des créneaux longs des énantiomères libres du vérapamil sont injectés similairement au protocole de l'analyse frontale électrocinétique continue, préservant ainsi l'équilibre étudié. Pour ce protocole, le flacon échantillon peut être assimilé à un « réservoir à l'équilibre » de l'interaction étudiée. Comme pour l'analyse frontale, la hauteur des fronts obtenus pour les deux énantiomères permet ensuite d'accéder à leur concentration libre, sans qu'il soit nécessaire de connaître le volume de soluté injecté (comme cela aurait été le cas si l'exploitation avait été basée sur une aire des pics dans le cas d'injection de créneaux courts).

Enfin, notons que cette méthode est exempte de contraintes cinétiques et permet de séparer physiquement les zones du substrat (la protéine) et du ligand (le vérapamil) tout en autorisant la détermination de la forme libre et à l'équilibre du ligand.

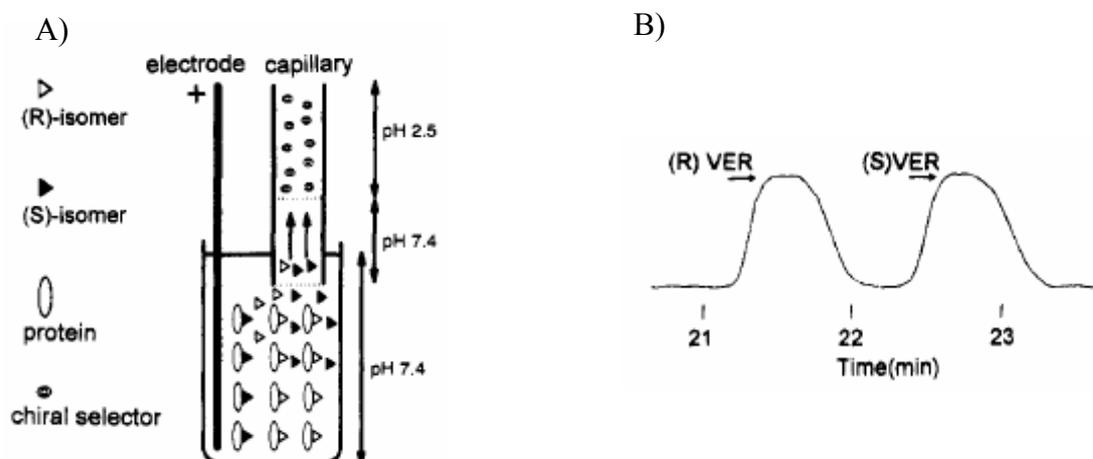


Figure 23 : Représentation schématique du protocole d'injection sélective électrocinétique (A) et électrophérogrammes expérimentaux obtenus pour le système vérapamil / albumine sérique humaine (B).

Capillaire en silice vierge 75 μm d.i. x 63 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support remplissant initialement le capillaire : tampon 50 mM phosphate de sodium pH 2,5 contenant 40 mM d'heptakis (2,3,6-tri-O-méthyl)- β -cyclodextrine. Injection hydrodynamique (pression non indiquée, 3 s) d'un petit volume de tampon phosphate de sodium pH 7,4 (force ionique 0,17 M) puis injection électrocinétique de l'échantillon incubé en tampon phosphate de sodium pH 7,4 (force ionique 0,17 M) (18 kV, 30 s). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. D'après [49]

2.4.3.2 Ajout de polymère réticulé.

Pour la détermination de constantes par analyse frontale, il est nécessaire que le ligand libre ait une mobilité suffisamment différenciée de celles du complexe et du substrat, afin d'obtenir un palier de concentration stable et représentatif du ligand libre seul. Lorsque cette condition n'est pas vérifiée en milieu libre, un polymère, non interactif vis-à-vis des partenaires, peut être ajouté à l'électrolyte à une concentration supérieure au seuil d'enchevêtrement [50-51]. Ainsi, les mailles de polymère formées vont freiner préférentiellement la migration électrophorétique des espèces volumineuses tandis que la migration des espèces, dont le diamètre hydrodynamique est inférieur à la taille de blob ξ_b (ou diamètre de maille), n'est pas affectée. L'ajout de polymère permet ainsi d'améliorer la séparation du complexe et du ligand libre. Cette solution apparaît donc particulièrement adaptée à l'étude de l'interaction entre une petite molécule et une macromolécule. A titre d'exemple, la figure 24 montre les

électrophérogrammes en mode frontal (injection hydrodynamique) du système warfarine / albumine sérique obtenus en présence et en l'absence de dextran.

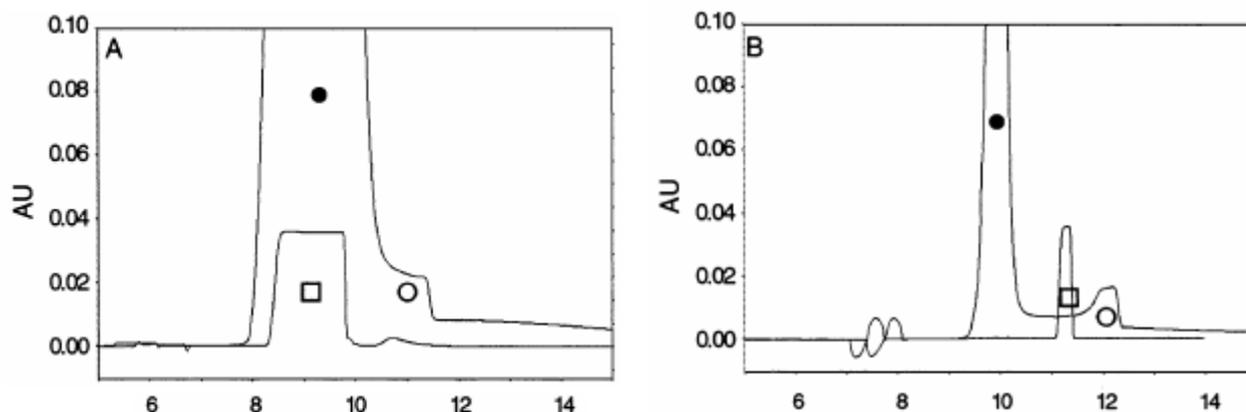


Figure 24 : Electrophérogrammes du système warfarine / sérum albumine humaine en mode frontal (injection hydrodynamique) dans un tampon phosphate (A) contenant du dextran (B).
 Conditions expérimentales : capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 57 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon phosphate de sodium 67 mM de pH 7,4 (A) contenant 5 % m/m de dextran (200 000 Da). Tension appliquée : 15 kV. Température interne du capillaire estimée par la méthode de Kok [52] : 37°C. Détection UV à 200 nm. Injection hydrodynamique de l'échantillon sous 34,5 mbars : 60 s (A) ; 99 s (B). Echantillon : albumine sérique humaine (54 μM) et warfarine (200 μM). Identification : ● : sérum albumine (libre et complexée) ; ○ : warfarine libre ; □ : étalonnage de la hauteur de palier de la warfarine libre. D'après [51].

Dans cet exemple, le polymère polysaccharidique enchevêtré freine la migration électrophorétique de la protéine (sous forme libre et complexée avec la warfarine), ce qui permet ainsi d'augmenter la séparation entre la warfarine libre et complexée. Néanmoins, on sur la figure 24 B que la séparation obtenue dans ces conditions est presque totale. Il aurait donc été préférable d'injecter un volume d'échantillon plus élevé en mode hydrodynamique, ou d'effectuer l'injection en mode électrocinétique.

2.5 Exemples d'applications

La section suivante regroupe quelques exemples d'applications de la détermination de constantes par électrophorèse capillaire. Ces exemples ont été retenus en raison de leur publication récente, de leur originalité (partenaires de l'interaction, équilibres complexes) ou de la mise en œuvre expérimentale, certaines des méthodes électrophorétiques trouvant encore assez peu d'exemples d'application (méthode de l'injection directe, d'Hummel-Dreyer, des pics de vacance, ou de l'analyse frontale en mode d'injection électrocinétique continue).

| Système | Méthode | Réf | Remarques supplémentaires |
|--|---------|------|---|
| Anticorps / Rhinovirus | I.D. | [53] | Particule virale |
| Héparine / Peptide de l'amyloïde P | I.D. | [54] | Comparaison avec la SPR et la calorimétrie |
| Polymères / peptides | ECA | [55] | Affinités multiples, polymère |
| Antibiotiques (Van, Teic, Ris) / D-ala-D-ala | ECA | [56] | Dérivation en ligne de l'antibiotique, remplissage partiel. |
| Lectines de <i>Pleurotus ostreatus</i> / α -lactose-1-phosphate | ECA | [57] | |
| Antibiotique / F-moc-D-Ala-D-Ala | ECA | [58] | Synthèse en ligne Fmoc-D-Ala-D-Ala, remplissage partiel |
| Dérivés 2,4 dinitrophénolés / Anticorps | ECA | [59] | Modèles multisites / Equilibres successifs. |
| Albumine sérique humaine native et modifiée / Warfarin, Flurbiprofen, Surprofen, Ibuprofen | ECA | [60] | Modifications sélectives des sites d'interaction de la protéine |
| Fucoïdane / antithrombine III | ECA | [61] | Polysaccharide sulfaté d'origine marine |
| Fucoïdane / protéine C4 du complément | ECA | [62] | Protéine C4 |
| Protéine SSB / Oligonucléotide | ECA | [63] | Détection par polarisation de fluorescence |
| Warfarine-furosemide / albumine de sérum bovin | ECAV | [64] | Mise en évidence de compétition pour les deux ligands |
| Carvediol / α 1-glycoprotéine (AGP) | H-D | [65] | Comparaison avec H-D par CLHP |
| Albumine sérique / Principes actifs | AF | [66] | |
| Haptène / Anticorps | AF | [67] | |

| | | | |
|---|-------|---------|--------------------------------|
| Pectines / β -lactoglobuline | AFCEC | [68] | |
| Polystyrène sulfonate, polyacrylates / SAB, β -lactoglobuline | AFCEC | [69] | Isotherme de McGhee von Hippel |
| Polystyrènes sulfonates / β -lactoglobuline | AFCEC | [70-71] | Isotherme de McGhee von Hippel |
| Polyacrylates modifiés hydrophobes / sérum albumine bovine | AFCEC | [12-72] | Isotherme de Hill |

Tableau 4 : Exemples de détermination de constantes d'interaction par électrophorèse capillaire

Abréviations : I.D. : injection directe ; ECA : électrophorèse capillaire d'affinité ; ECAV : électrophorèse capillaire d'affinité de vacance ; AF : analyse frontale en mode hydrodynamique ; AFCEC : analyse frontale continue électrophorétique capillaire ; CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

2.6 Conclusion

Au cours de cette section, nous avons décrit les principales méthodes de détermination de constantes d'interaction par électrophorèse capillaire. Parmi ces méthodes, l'injection directe, l'électrophorèse d'affinité et l'analyse frontale semblent les plus attractives en raison leur faible consommation de produits (injection directe), de leur mise en œuvre simple (injection directe et ECA) ou de l'accès à \bar{n} (injection directe et analyse frontale), et par suite aux différents modèles. Une brève comparaison des avantages et inconvénients de ces trois méthodes (tableau 5) montre que ces méthodes doivent être considérées comme complémentaires les unes des autres.

| | Injection directe | Electrophorèse d'affinité | Analyse frontale |
|--|--------------------|------------------------------|--------------------|
| Consommation de ligand | Faible | Elevée | Moyenne |
| Consommation de substrat | Faible | Faible | Moyenne |
| Concentrations connues | Ligand et Substrat | Ligand | Ligand et Substrat |
| Cinétique de l'interaction | Dissociation lente | Rapide | Indifférente |
| Déterminations multi substrats simultanées | Non | Oui | Non |
| Modèles d'interaction exploitables | Tous | 1 : 1, équilibres successifs | Tous |

Tableau 5 : Comparaison des trois méthodes électrophorétiques les plus attractives pour la détermination de constantes d'interaction.

Au contraire, les méthodes de Hummel-Dreyer, des pics de vacances, et de l'électrophorèse d'affinité et de vacance semblent moins attractives. En effet, ces méthodes nécessitent d'introduire le ligand et le substrat dans l'électrolyte support, ce qui entraîne de fortes consommations de chacun des partenaires, ou nécessitent un traitement complexe des données expérimentales (électrophorèse d'affinité et de vacance). De plus, les méthodes de Hummel-Dreyer et des pics de vacances nécessitent de quantifier des aires des pics de vacances et ne devraient ainsi être appliquées que lorsque seule l'espèce quantifiée est détectée, afin d'éviter toute contribution parasite de l'électrolyte support pour ce pic.

3 Référence bibliographiques

- [1] B. Trémillon, *Electrochimie analytique et réactions en solution*, Ed Masson, Paris, 1993
- [2] K. Connors, *Binding Constants – the measurement of molecular complex stability*, Wiley and sons, New York, 1987
- [3] K. Rundlett, D. Armstrong, *Electrophoresis*, 18, 2194-2202, 1997
- [4] K. Rundlett, D. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 721, 173-186, 1996
- [5] M. Quaglia, E. Bossu, C. Dell'Aquila, M. Guidotti, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 15, 1033-039, 1997
- [6] Y. Tanaka, S. Terabe, *J. Chromatogr. B*, 768, 81-92 ; 2002
- [7] B. Sébille, R. Zini, C. Vidal-Madjar, N. Thuaud, J.-P. Tillement, *J. Chromatogr.*, 531, 51-77, 1990
- [8] J. Xia, P. Dubin, *J. Chromatogr. A*, 667, 311-315, 1994
- [9] J. McAfee, S. Edmondson, I. Zegar, J. Shriver, *Biochemistry*, 35, 4034-4045, 1996
- [10] J. McAfee, S. Edmondson, I. Zegar, J. Shriver, *Biochemistry*, 35, 4034-4045, 1996
- [11] W.-L. Tseng, H.-T. Chang, S.-M. Hsu, R.-J. Chen, S. Lin, *Electrophoresis*, 23, 836-846, 2002
- [12] I. Porcar, H. Cottet, P. Gareil, C. Tribet, *Macromolécules*, 32, 3922-3929, 1999

- [13] J. Kraak, S. Busch, H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 608, 257-264, 1992
- [14] Y.-H. Chu, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 3524-3525
- [15] J. Gao, P. Dubin, B. Muhoberac, *Anal Chem*, 69, 2945-2951, 1997
- [16] M. Busch, L. Carels, H. Boelens, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 777, 311-328, 1997
- [17] M. Busch, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 777, 329-353, 1997
- [18] R. Guijt-van Duijn, J. Frank, G. van Dedem, E. Baltussen, *Electrophoresis*, 21, 3905-3918, 2000
- [19] K. Rundlett, D. Armstrong, *Electrophoresis*, 22, 1419-1427, 2001
- [20] K. Shimamura, S. K. Kasai, *Anal. Biochem*, 251, 1-16, 1997
- [21] N. Heegaard, *Electrophoresis*, 24, 3879-3891, 2003
- [22] X. He, Y. Ding, D. Li, B. Lin, *Electrophoresis*, 25, 697-711, 2004
- [23] N. Heegaard, S. Nilsson, N. Guzman, *J. Chromatogr. B*, 715, 29-54, 1998
- [24] N. Heegaard, R. Kennedy, *Electrophoresis*, 20, 3122-3133, 1999
- [25] Heegaard N., Robey F., *Anal. Chem.*, 64, 2479-2482, 1992 ;
- [26] Heegaard N., *Electrophoresis*, 19, 442-446, 1998
- [27] Li C., Martin L., *Anal. Biochem.*, 263, 72-78, 1998
- [28] Berezovski M., Krylov S., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 13674-13675, 2002
- [29] Berezovski M., Nutiu R., Li Y., Krylov S., *Anal. Chem.*, 75, 1382-1386, 2003
- [30] N. Heegaard, M. Nissen, D. Chen, *Electrophoresis*, 23, 815-822, 2002
- [31] K. Rundlett, D. Armstrong, *Anal. Chem*, 67, 2088-2095, 1995

- [32] M. Bowser, D. Chen, *J. Phys. Chem. A*, 102, 8063-8071, 1998
- [33] M. Bowser, D. Chen, *J. Phys. Chem. A*, 103, 197-202, 1999
- [34] P. McKibbin, D. Chen, *Electrophoresis*, 23, 880-888, 2002
- [35] Poppe H., *J. Chromatogr. A*, 831, 105-121, 1999
- [36] C. Galbusera, M. Thachuck, E. de Lorenzi, D. Chen, *Anal. Chem.* 74, 1903-1914, 2002
- [37] Bowser M., Chen D., *Anal. Chem.*, 70, 3261-3270, 1998
- [38] X. Peng, M. Bowser, P. McKibbin, G. Bebault, J. Morris, D. Chen, *Electrophoresis*, 18, 706-716, 1997
- [39] A. Kranack, M. Bowser, P. McKibbin, D. Chen, *Electrophoresis*, 19, 388-386, 1998
- [40] M. Bowser, A. Kranack, D. Chen, *Anal. Chem.*, 70, 1076-1084, 1998
- [41] Chu Y.-H., Avila L., Gao J., Whitesides G., *Acc. Chem. Res.*, 28, 461-468, 1995
- [42] Heintz J., Hernandez M., Gomez F., *J. Chromatogr. A*, 840, 261-268, 1999
- [43] Kaddis J., Mito E., Heintz J., Plazas A., Gomez F., *Electrophoresis*, 24, 1105-1110, 2003
- [44] Zhang Y., Gomez F., *J. Chromatogr. A*, 897, 339-347, 2000
- [45] Brown A., Silva I., Chinchilla D., Hernandez L., Gomez F., *LC-GC Europe*, 32-40, Janvier 2004
- [46] M. Busch, H. Boelens, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 775, 313-326, 1997
- [47] J. Gao, P. Dubin, B. Muhoberac, *J. Phys. Chem. B*, 102, 5529-5535, 1998
- [48] J. Ostergaard, N. Heegaard, *Electrophoresis*, 24, 2903-2913, 2003
- [49] T. Ohara, A. Shibukawa, T. Nagakawa, *Anal. Chem.*, 67, 3520-3525, 1995
- [50] J. Ostergaard, C. Schou, C. Larsen, N. Heegaard, *Electrophoresis*, 23, 2842-2853, 2002

- [51] J. Ostergaard, C. Schou, C. Larsen, N. Heegaard, *Anal. Chem.*, 75, 205-214, 2003
- [52] W. Kok, *Chromatographia*, 51 (supp), S24-S27, 2000
- [53] : V. Okun, R. Mosher, D. Blass, E. Kenndler, *Anal. Chem*, 73, 3900-3906, 2001
- [54] : M. Hernaiz, L. Lebrun, Y. Wu, J. Sen, R. Linhardt, N. Heegaard, *Eur. J. Biochem*, 269, 2860-2867, 2002.
- [55] : F. Progent, M. Taverna, I. Le Potier, F. Gopée, D. Ferrier, *Electrophoresis*, 23, 938-944, 2002
- [56]: M. Azad, C. Silverio, Y. Zhang, V. Villareal, F. Gomez, *J. Chromatogr. A*, 1027, 193-202, 2004.
- [57]: R. Brechtel, H. Wätzig, H. Rudiger, *Plant. Sci*, 160, 1025-1033, 2001
- [58] Y. Zhang, C. Kodoma, C. Zurita, F. Gomez, *J. Chromatogr. A*, 928, 233-241, 2001
- [59] H. Seung Kim, J. Austin, D. Hage, *Electrophoresis*, 23, 956-963, 2002
- [60] M. Mammen, F. Gomez, G. Whitesides, *Anal. Chem*, 67, 3526, 3535, 1995
- [61] F. Erim, J. Kraak, *J. Chromatogr. B*, 710, 205-210, 1998
- [62] A. Varenne, P. Gareil, S. Collic-Jouault, R. Daniel, *Anal. Biochem*, 315, 152-159, 2003
- [63] B. Tissot, B. Montdargent, L. Chevolot, A. Varenne, S. Descroix, P. Gareil, R. Daniel, *Biochimica et Biophysica acta*, 1651, 5 – 16, 2003.
- [64] X. Chris LE, Q.-H. Wan, M. Lam, *Electrophoresis*, 23, 903-908, 2002.
- [65] J. Oravcova, D. Sojkova, W. Linder, *J. Chromatogr. B*, 682, 349-357, 1996
- [66] J Ostergaard, C. Schou, C. Larsen, N. Heegaard, *Electrophoresis*, 23, 2842-2853, 2002
- [67] Busch M., Boelens H., Kraak J., Poppe H., Meekel A., Resmini M., *J. Chromatogr.*, 744, 195-203, 1996

[68] M. Girard, S. Turgeon, S. Gauthier, *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 6043-6049, 2003

[69] T. Hattori, K. Kimura, E. Seyrek, P. Dubin, *Analytical Sciences*, 17 supp, i193-i195, 2001

[70] Gao J., Dubin P., Muhoberac B., *Anal Chem*, 69, 2945-2951, 1997

[71] Hallberg R., Dubin P., *J. Phys. Chem. B*, 102, 8629-8633, 1998

[72] Porcar I., Gareil P., Tribet C., *J. Phys. Chem B*, 102, 7906-7909, 1998.

Chapitre 2. CARACTERISATION D'UNE DISTRIBUTION LIPOSOMALE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

1 Introduction

Les liposomes sont des vésicules à base de phospholipides non toxiques et biodégradables. En thérapeutique, cette structure vésiculaire est mise à profit pour aider à la solubilisation des principes actifs et pour transporter ces derniers vers leurs cibles d'action. Pour un système liposome – principe actif, il est important de connaître les fractions libre et incluse du principe actif afin de caractériser sa distribution d'un point de vue thermodynamique et cinétique. Selon les concentrations, cette distribution peut être limitée par la solubilité du principe actif dans la phase aqueuse. Actuellement, excepté la chromatographie d'exclusion stérique qui permet de séparer et de quantifier la forme libre dans un protocole intégré, la plupart des méthodes utilisées pour accéder aux caractéristiques de la distribution nécessitent de coupler une technique séparative (dialyse, ultracentrifugation, ultrafiltration) à une technique de quantification (généralement la chromatographie haute performance en phase liquide). Récemment, quelques travaux préliminaires ont montré qu'une technique électrocinétique basée sur le principe des séparations par chromatographie électrocinétique micellaire pouvait constituer une alternative aux méthodes usuelles pour la détermination de la forme libre ou de la distribution dans un protocole intégré.

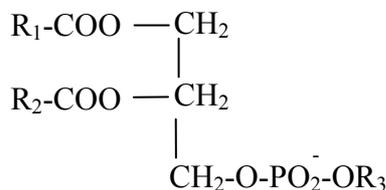
L'objectif de ce chapitre est d'étudier la faisabilité de l'application d'une technique électrophorétique à la caractérisation de la distribution d'un soluté dans une formulation liposomale. Pour ce système, les difficultés à contourner sont liées à l'adsorption des liposomes sur la paroi du capillaire et à la sensibilité de détection des solutés sous leur forme libre. Ce chapitre présente tout d'abord de brefs rappels bibliographiques sur les liposomes et leurs possibilités d'étude par électrophorèse capillaire, ainsi que les modèles de distribution des principes actifs dans un système liposomal. Un protocole intégré de séparation, préconcentration et de détection, en vue de la détermination de la fraction libre d'un soluté en équilibre avec une phase liposomale, est décrit par la suite. Ce protocole a été appliqué à l'étude de la distribution pour des molécules-modèles d'hydrophobie variable, puis il a été appliqué à la détermination de la concentration libre d'un principe actif dans une formulation liposomale.

2 Liposomes

2.1 Définition, structure et classification

Découverts dans les années 1960 par A. Bangham [1], les liposomes sont des vésicules sphériques dont la paroi est formée par une ou plusieurs membranes de bicouches lipidiques. Ces bicouches sont constituées de phospholipides et résultent de la propriété d'auto-agrégation de ces phospholipides en solution. En effet les phospholipides sont des composés amphiphiles composés d'esters d'acides gras et du glycérol ou du sérinol (2-amino-1,3-propanediol) et appartiennent soit aux glycérophospholipides, soit aux sphingolipides. Les structures chimiques des principaux phospholipides de ces deux catégories sont représentées dans la figure 1.

A)



R₁, R₂ : chaînes aliphatiques d'acides gras

C_{12:0} : acide laurique (L) C_{14:0} : acide myristique (M)

C_{16:0} : acide palmitique (P) C_{18:1} : acide oléique (O)

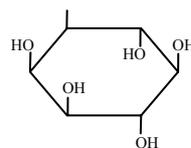
C_{18:0} : acide stéarique (S) C_{18:2} : acide linoléique (L)

R₃ : -CH₂-CH₂-N⁺-(CH₃)₃ : phosphatidylcholine (PC)

-CH₂-CH(NH₃⁺)COO⁻ : phosphatidylsérine (PS)

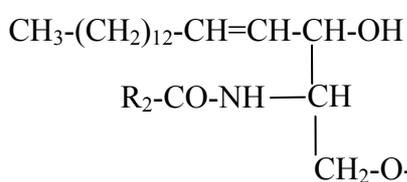
-CH₂-CH₂-NH₃⁺ : phosphatidyléthanolamine (PE)

-CH₂-CHOH-CH₂OH : phosphatidylglycérol (PG)



: phosphatidylinositol (PI)

B)



R₂ : chaîne aliphatique d'acides gras

R₃ : PO₃⁻-CH₂-CH₂-N⁺-(CH₃)₃ : sphingomyéline (SM)

Glucose ou Galactose : cérébroside

βGlc-βGal-βGal-NAc... : ganglioside (GM)
'NeuNAc

Figure 1 : Structure chimiques des principaux phospholipides : A) Glycérophospholipides ; B) Sphingolipides.

Ces phospholipides placés en solution et à une concentration supérieure à une valeur de concentration seuil (concentration d'agrégation critique ou CAC) forment des agrégats. Ce type de comportement est analogue à celui des tensioactifs et de leurs micelles, mais diffère cependant de celui des tensioactifs par deux points majeurs. Tout d'abord, comparées aux tensioactifs usuels, les valeurs de CAC sont nettement inférieures dans les cas des phospholipides. Ainsi pour les lécithines (mélange de phosphatidylcholines naturelles) les valeurs de CAC sont inférieures à 10^{-6} M dès que le nombre de carbones de la chaîne excède 10 [2]. Ensuite, à la différence des micelles de tensioactifs, les vésicules formées dans le cas des phospholipides ont des tensions superficielles nulles, à l'origine d'une aptitude spontanée à combler un orifice local (cicatrisation). Les bicouches ainsi formées entourent une cavité interne aqueuse conférant ainsi au liposome une structure vésiculaire particulière. En fonction de la taille de ces vésicules et de la lamellité de leur paroi, on distingue trois catégories de vésicules représentées figure 2 : les petites vésicules unilamellaires (S.U.V. pour « small unilamellar vesicles ») de diamètre moyen compris entre 0,02 et 0,08 μm [3], les grosses vésicules unilamellaires (L.U.V. pour « large unilamellar vesicles ») de diamètre moyen compris entre 0,08 et 1 μm [4], et les grosses vésicules multilamellaires (M.L.V. pour « multilamellar vesicles ») de diamètre compris entre 0,4 et 5 μm [3].

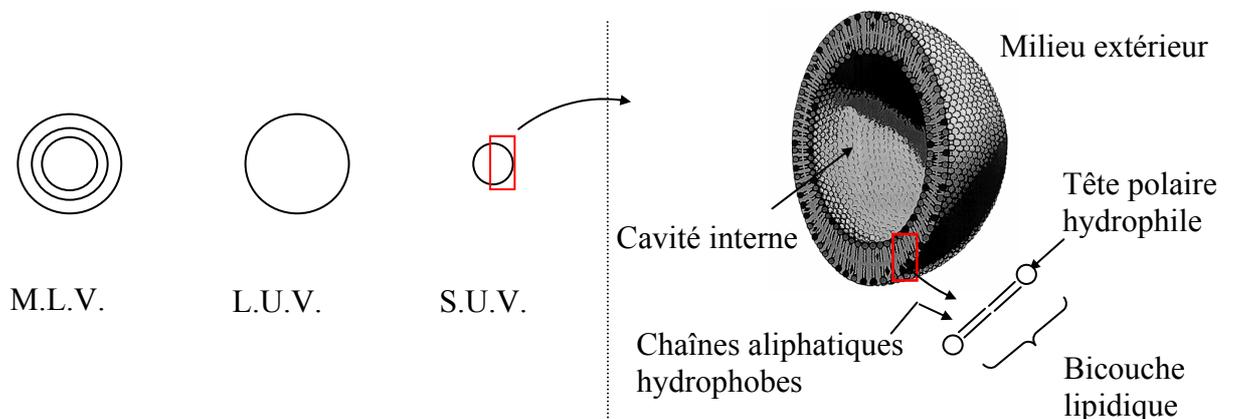


Figure 2 : Représentation schématique des différents types de liposome. [2,5]

2.2 Utilisation des liposomes

Cette structure vésiculaire est à l'origine des applications de plus en plus variées des liposomes, dont il n'est plus possible de faire un inventaire exhaustif. En effet, la structure vésiculaire permet d'encapsuler des molécules d'hydrophobie extrêmement diverse, la

répartition du soluté pouvant s'effectuer dans la cavité interne dans le cas des solutés hydrophiles, dans la bicouche lipidique pour les solutés hydrophobes, ou encore à l'interface de ces deux milieux. Parmi les applications on trouve premièrement une utilisation comme modèles cellulaires ou modèles des membranes cellulaires [6], la structure en bicouche des liposomes leur étant très voisine. Ainsi des liposomes ont été employés comme substitut de globules rouges après encapsulation d'hémoglobine [7]. Les liposomes servent également en thérapeutique comme agent de vectorisation de principes actifs. Enfin ils sont utilisés comme réactifs analytiques.

Concernant leur utilisation en thérapeutique, l'encapsulation des principes actifs présente certains avantages sur les formulations traditionnelles. Parmi les avantages essentiels, mentionnons tout d'abord la solubilisation de principes actifs d'hydrophobie variée. Ensuite, les liposomes permettent le franchissement des barrières lipidiques membranaires hydrophobes. Ils assurent une protection du principe actif de l'action enzymatique ou immunologique de l'organisme de l'hôte. L'encapsulation des principes actifs permet de diminuer la toxicité du principe actif, comme c'est par exemple le cas de la doxorubicine cardiotoxique [8], ou le cas l'amphotéricine B néphrotoxique [9]. Elle permet également une accumulation du liposome aux sites d'actions désirés, cette dernière pouvant être réalisée par greffage sur la membrane liposomale d'anticorps, d'hormones ou de carbohydrates. Enfin les liposomes permettent une libération modulable de la forme encapsulée. In vitro, il est intéressant de noter que cette dernière propriété est intimement liée à la composition de la paroi membranaire. Ainsi pour les phospholipides constitutifs de la membrane, un des critères essentiels est la température de transition de phase [3]. En dessous de cette température les phospholipides, et par suite les liposomes, sont considérés comme solides, c'est à dire dans un état de gel avec des chaînes linéaires solides. Au dessus de cette température, les chaînes d'acides gras, et par suite les liposomes, sont considérées comme fluides, la bicouche lipidique étant moins épaisse dans cette dernière configuration. L'addition de phospholipides chargés permet, par répulsion électrostatique, d'éviter la fusion des vésicules, l'addition de cholestérol augmente la stabilité de la particule, tandis que la présence de lysophosphatidylcholine (fonction hydroxyle en 1 ou 2 du glycérol libre) augmente fortement la perméabilité de la membrane et doit en général être absente de la formulation.

Pour ces applications (systèmes soluté-liposome), la détermination dans la formulation finale de la quantité libre du soluté inclus présente plusieurs intérêts. Tout d'abord, elle

permet de vérifier le degré d'inclusion du soluté dans le liposome pour une formulation donnée. Ensuite, le développement d'une méthode de quantification doit permettre entre-autres d'étudier l'influence sur la fraction libre, de la composition des liposomes ou de la matrice avec par exemple la présence de protéines plasmatiques (modification directe de la membrane liposomale par incorporation, ou déplacement compétitif de l'équilibre d'inclusion par complexation du soluté aux protéines).

2.3 Liposomes et électrophorèse capillaire.

2.3.1 Situation actuelle

Depuis quelques années, l'électrophorèse capillaire constitue une technique d'étude des liposomes. Inversement, les liposomes peuvent constituer des pseudo-phases pour les séparations électrocinétiques capillaires.

L'électrophorèse capillaire apparaît bien adaptée à la caractérisation des liposomes. Ainsi, le comportement des liposomes a été étudié en électrophorèse dans des capillaires en silice vierge par Roberts et coll [10]. Dans cette étude, il a été montré qu'en dépit de l'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire, les données électrophorétiques pouvaient être reliées aux caractéristiques physiques (charge de la double couche et distribution en taille) du liposome après saturation de la paroi du capillaire par ces liposomes. Ainsi en électrophorèse de zone, les auteurs font état de la possibilité de relier l'allure du pic obtenu à la distribution en taille des particules liposomales (figure 3).

Par ailleurs cette étude a montré que les liposomes étaient stables sous des champs électriques élevés utilisés en électrophorèse capillaire, la rupture du liposome n'intervenant que pour des champs supérieurs à $1,5 \text{ kV.cm}^{-1}$ [11]. Depuis l'étude de Roberts et coll, le comportement électrophorétique a été approfondi dans de nombreuses études. Ces études ont permis de mettre en relation les mobilités électrophorétiques avec la charge de surface de la particule liposomale [12]. Une étude plus approfondie de la mobilité électrophorétique des liposomes a par ailleurs été menée [13]. Il en ressort que le comportement électrophorétique des liposomes diffère de celui des petits ions et de celui des colloïdes sphériques, notamment du fait de leur déformabilité et d'une possible polarisation induite par l'application du champ électrique.

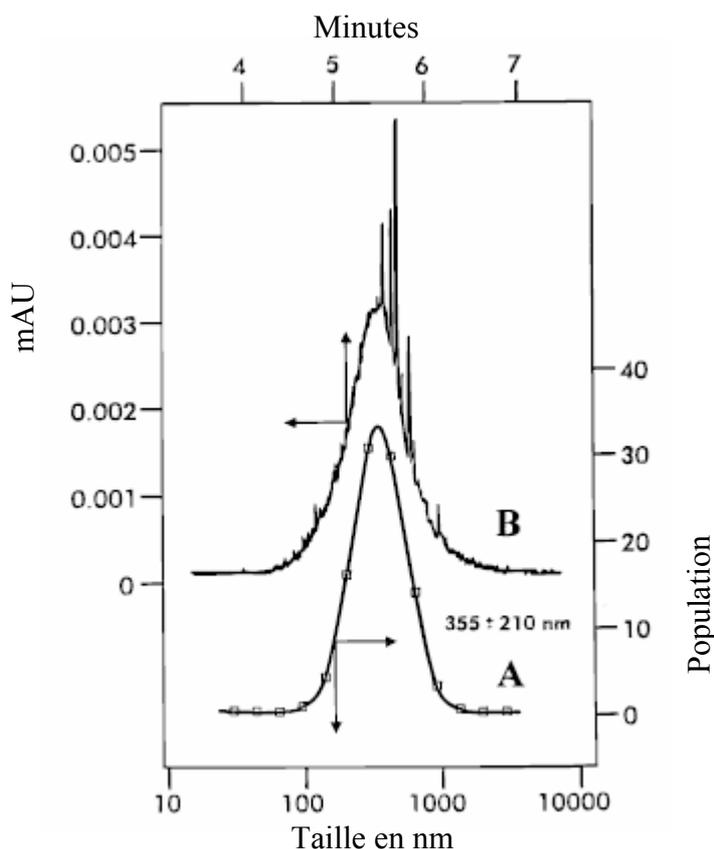


Figure 3 : relation entre la distribution en taille des particules de liposome par diffusion de lumière (A) et la mobilité électrophorétique (B) d'après [10].

Liposomes : Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), dicetylphosphate (DCP), cholesterol et 1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetraméthylindodicarbocyanine (DiI-C18(C5)) en proportion 7 : 2 : 2 : 1.

Capillaire en silice vierge de 75 μm de diamètre de 60 cm de longueur totale. Electrolyte support : tampon phosphate 9,5 mM de pH 7,4. Tension appliquée : 20 kV

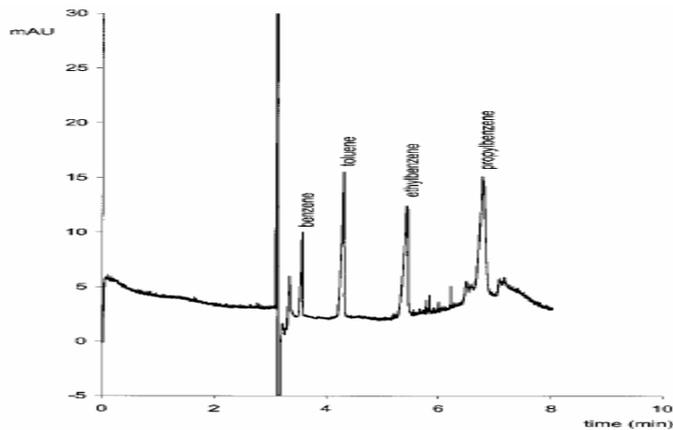
Dans l'étude de Roberts et coll, les auteurs mentionnent également la possibilité d'utiliser les liposomes comme des phases stationnaires. Déjà pratiquée en chromatographie en phase liquide, cette utilisation en électrophorèse capillaire a été introduite en 1995 par Zhang et coll. [14]. Comparé à la chromatographie, l'électrophorèse présente l'avantage que les liposomes restent libres en solution. Ainsi, l'utilisation des liposomes en milieu libre évite une déformation éventuelle, engendrée par le flux hydrodynamique, pour des particules fixées. Ensuite, il n'est pas nécessaire d'immobiliser les liposomes sur des billes de silice, cette opération étant susceptible de modifier la particule (taille et forme), ou son accessibilité au milieu extérieur. L'utilisation des liposomes comme pseudo-phase stationnaire en électrophorèse capillaire a permis d'étudier l'interaction de peptides ainsi que de principes actifs (warfarine, acide salicylique, sulfasalazine) avec les liposomes [14]. Dans cette étude, les interactions entre les solutés et les liposomes ont été quantifiées au moyen du facteur de rétention spécifique K_s :

$$K_s = \frac{k'}{[P]_t} \quad (1)$$

où k' est le facteur de rétention et $[P]_t$ est la concentration totale en monomères de phospholipides dans l'électrolyte support. Il est cependant à noter que dans cette étude, le capillaire n'a été rempli que partiellement avec la solution liposomale. En effet, même à une concentration faible en phospholipides (25 mM en phospholipides totaux), les particules entraînent une perturbation de la ligne de base par diffusion de la lumière.

Sur le modèle du SDS en chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MECC), l'utilisation des liposomes comme agent de séparation ionique (chromatographie électrocinétique liposomale capillaire (LECC)) a par ailleurs été mise à profit pour la séparation de composés organiques tels que des alkylbenzènes, de stéroïdes et des dérivés phénoliques [5] (figure 4).

A)



B)

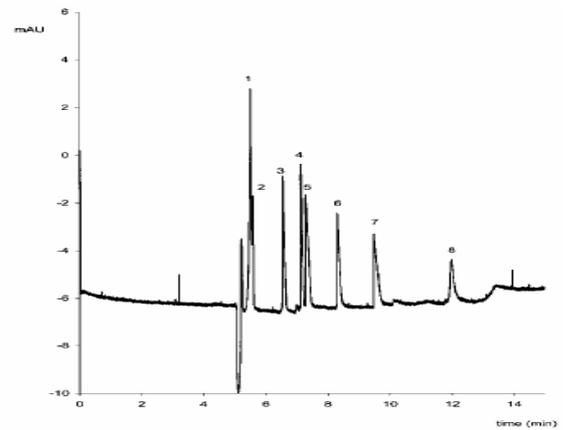


Figure 4: Exemples de séparations par chromatographie électrocinétique liposomale micellaire [5] de dérivés benzéniques (A) et de dérivés stéroïdiens (B).

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 68,5 cm (longueur utile 60 cm)

Conditions opératoires :

A : dérivés benzéniques : benzène, toluène, éthylbenzène, propylbenzène.

Electrolyte de séparation : tampon AMPSO 50 mM, pH 8,3 contenant 3 mM de phospholipides (POPC/PS : 80/20). Tension appliquée : 30 kV ; Détection UV à 210 nm. Température : 25°C.

B : dérivés stéroïdiens à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$: 17-isoaldostérone (1) ; aldostérone (2) ; 21-déoxycortisol (3) ; androstènedione (4) ; corticostérone (5) ; testostérone (6) ; 17-hydroxyprogestérone (7) ; progestérone (8).

Electrolyte de séparation : CHES 50 mM, pH 9,0 contenant 3 mM de phospholipides (POPC/PS : 80/20). Tension appliquée : 20 kV. Détection UV à 254 nm. Injection

hydrodynamique de l'échantillon (mélange des stéroïdes en milieu eau-méthanol 90 :10, v/v) : 50 mbars, 10 s.

Pour toutes ces applications, il faut noter la très faible concentration des liposomes dans le milieu de séparation (3 mM en phospholipides totaux). De plus, pour ces séparations, les auteurs ne mentionnent pas les effets de l'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire. En particulier pour le cas de la séparation de stéroïdes, les mêmes auteurs se servent des mêmes liposomes (POPC/PS (80/20) 3mM) comme agent de greffage semi-permanent de phospholipides sur la surface du capillaire pour la séparation des mêmes composés stéroïdiens [15]. La séparation obtenue est montrée figure 5.

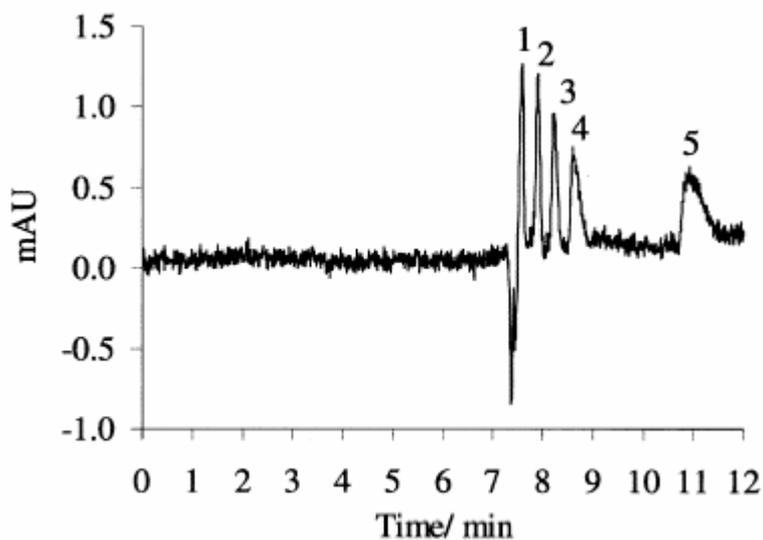


Figure 5 : Séparation de composés stéroïdiens par électrochromatographie sur un capillaire greffé liposome [15]

Capillaire greffé liposome (POPC/PS, rapport molaire 80/20), 30 μm d.i. x 60 cm (longueur utile : 51,5 cm). Electrolyte de séparation : tampon HEPES 40 mM, pH 7,4. Tension appliquée : 20 kV. Détection UV à 245 nm. Température 25°C. Injection hydrodynamique : 50 mbars, 10 s. Echantillon : composés stéroïdiens dans HEPES 40 mM, pH 7,4 / Méthanol (80 :20, v/v) : aldostérone (1) à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; androstènedione (2) à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; testostérone (3) à 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; 17a-hydroxyprogestérone (4) à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; progestérone (5) à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Bien que les auteurs aient employé un capillaire de diamètre interne réduit (30 μm), la séparation obtenue ne présente qu'une très faible efficacité (10000 plateaux. m^{-1}). Ceci laisse présager que l'utilisation de capillaires greffés liposomes n'est pas prometteuse dans des capillaires de diamètre identique ou supérieur.

2.3.2 Détermination de la concentration en forme libre d'un soluté en équilibre avec une phase liposomale.

La caractérisation de la distribution d'un soluté dans une phase liposomale impose de déterminer la concentration de la forme libre ou incluse de ce soluté dans une formulation liposomale. Depuis quelques années, l'électrophorèse est apparue très attractive pour la détermination de concentrations à l'état libre avec une perturbation minimale ou nulle de l'équilibre en solution. En effet, en comparaison des autres méthodes, l'électrophorèse présente plusieurs avantages. A condition que l'équilibre étudié modifie la mobilité de l'un des partenaires d'un équilibre, l'électrophorèse permet tout d'abord l'étude d'équilibres en milieu libre dans des solvants variés (eau, milieux organiques et mélanges de solvants) sans qu'il soit nécessaire d'immobiliser par greffage l'un des partenaires de l'équilibre. Ensuite, la rapidité de cette technique ainsi que sa miniaturisation et son automatisation permettent des analyses à haut débit tout en ne consommant que de faibles quantités de réactifs.

2.3.2.1 Méthodes électrophorétiques applicables à la détermination directe ou indirecte de concentrations de formes libres en équilibre avec une forme associée.

En électrophorèse capillaire, plusieurs méthodes ont été développées en vue de la détermination de constantes d'associations non-covalentes [16, chapitre 1]. Ces méthodes sont a priori toutes applicables aux systèmes liposome-soluté. Une première catégorie de méthodes consiste à séparer de façon partielle ou totale la forme libre et la forme associée dans le mélange de partenaires interactifs (méthodes de l'injection directe et de l'analyse frontale), puis à quantifier directement une des fractions libres. Une seconde catégorie regroupe les méthodes pour lesquelles on observe une variation de la concentration de l'un des partenaires, participant à l'équilibre, introduit dans l'électrolyte, sous l'effet de la complexation in situ par le second partenaire injecté comme analyte (méthodes d'Hummel-Dreyer et des pics de vacance). Ces deux catégories de méthodes conviennent donc pour la détermination directe des concentrations en forme libre. La troisième catégorie rassemble les méthodes pour lesquelles on observe une modification de la mobilité électrophorétique d'un des partenaires sous l'effet de son interaction in situ avec le deuxième (méthode de l'électrophorèse d'affinité ou LECC dans le cas du système soluté-liposome considéré). La mise en oeuvre expérimentale de ces méthodes est rappelée dans le tableau 1.

| Méthode | Accès à la concentration libre | Mode | Electrolyte de migration | Injection | Grandeur Mesurée | Cinétique |
|-------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|-----------|-------------------|--------------|
| Injection directe | Directe | Zone | ES | S+L | Aires des pics | Lente |
| Hummel-Dreyer | Directe | Zone | ES + S | S + L | Aires des pics | Rapide |
| Pics de vacance | Directe | Zone | ES + L + S | ES | Aires des pics | Rapide |
| Analyse frontale | Directe | Frontière mobile | ES | S + L | Hauteur de palier | Indifférente |
| Affinité / LECC | Indirecte | Zone | ES+ L | S | Mobilités | Rapide |

Tableau 1 : Principales méthodes électrophorétiques permettant la détermination d'une forme libre en équilibre avec une forme associée, directement ou indirectement après détermination de la constante d'interaction.

ES : électrolyte support, S : soluté, L : liposome

Le choix de la méthode repose également sur les caractéristiques thermodynamiques et cinétiques de la distribution, les caractéristiques physico-chimiques des partenaires (solubilité dans l'électrolyte support, possibilités de détection) et les quantités disponibles des produits. Ainsi, excepté le cas de l'injection directe, les méthodes de zone requièrent des cinétiques rapides de distribution du soluté entre la phase aqueuse et la phase liposomale, l'équilibre devant se réaliser dynamiquement au cours de la migration électrophorétique. Au contraire, l'injection directe requiert une très forte affinité pour le liposome ou une cinétique de distribution lente, l'intégrité du complexe devant être respectée au cours de la migration. Enfin l'analyse frontale n'exige pas de pré-requis aussi critique du point de vue thermodynamique ou cinétique.

L'électrophorèse de zone par injection directe a ainsi été appliquée à la détermination d'oligonucléotides à l'état libre dans des formulations liposomales [17]. L'électrophorèse de zone en mode LECC a été appliquée à la détermination de constantes de distribution de composés aromatiques neutre, de β -bloquants, d'antidépresseurs tricycliques et d'autres

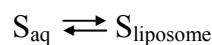
molécules d'intérêt thérapeutique dans des liposomes SUV de 37 nm de diamètre à base de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), et de cholestérol en proportions molaires 46/24/30 [18]

L'électrophorèse a également été employée récemment comme technique purement analytique pour quantifier la forme libre de la danorubicine et du danorubicinol, après extraction sélective de la forme libre sur une phase solide à accès restreint [19].

2.3.2.2 Modèles réactionnels

Pour un système soluté-liposome, on s'intéresse à une molécule susceptible de se distribuer entre une phase aqueuse et une phase liposomale. Sur la base des modèles développés pour les systèmes micellaires [20], la réaction peut être décrite soit selon un équilibre de distribution soit selon un équilibre de complexation.

Dans le cas du modèle de distribution qui est celui employé en MECC ou en LECC, on considère l'équilibre de distribution biphasique:



où S_{aq} et $S_{liposome}$ représentent respectivement le soluté dans la phase aqueuse et dans la phase liposomale. Cet équilibre est décrit par la constante de distribution

$$K_d = \frac{[S]_{liposome}}{[S]_{aq}} \quad (2)$$

La méthode de LECC (ou MECC) permet d'accéder directement à k' , facteur de rétention, qui est lui-même relié à K_d par l'expression :

$$K_d = k' \frac{V_{aq}}{V_{liposome}} \quad (3)$$

Ce rapport peut être exprimé en fonction du volume molaire partiel \bar{v} d'un phospholipide dans l'état agrégé selon :

$$\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{liposome}}} = \frac{1 - \bar{v}([P]_t - \text{CAC})}{\bar{v}([P]_t - \text{CAC})} \quad (4)$$

où $[P]_t$ est la concentration totale en phospholipides.

Dans le cas de liposomes formulés à partir de plusieurs phospholipides, \bar{v} peut être calculé à partir des volumes molaires partiels \bar{v}_i des différents phospholipides composants et de leurs fractions molaires x_i :

$$\bar{v} = \sum x_i \bar{v}_i \quad (5)$$

Finalemment :

$$K_d = k' \frac{1 - \bar{v}([P]_t - \text{CAC})}{\bar{v}([P]_t - \text{CAC})} \quad (6)$$

Dans le cas d'un équilibre de complexation, on considère une interaction monomoléculaire entre un soluté S et un liposome :



Cet équilibre est décrit par la constante K_c :

$$K_c = \frac{[S\text{-Liposome}]}{[S][\text{Liposome}]} \quad (7)$$

Ce modèle a déjà été mis à profit pour la détermination de constantes d'interaction entre un liposome et des oligonucléotides d'ARN par LECC [21].

Si l'on se réfère au modèle d'agrégation micellaire, la relation qui lie la concentration en liposome à celle des phospholipides est telle que :

$$[\text{Liposome}] = \frac{[P]_t - \text{CAC}}{n} \quad (8)$$

avec n , nombre moyen d'agrégation des phospholipides.

Du fait de la faible valeur du seuil d'agrégation des phospholipides en regard de la concentration généralement introduite, la concentration en liposomes peut être considérée

comme étant proportionnelle à la concentration totale en phospholipides, si bien que la constante de complexation peut être ré-exprimée comme :

$$K' = \frac{[S-P]}{[S][P]} \quad (9)$$

où [P] représente la concentration en phospholipides libres. Comme le soluté peut se répartir à la fois dans la cavité aqueuse et dans la bicouche lipidique, on peut supposer que les liposomes (et par conséquent les phospholipides) restent disponibles pour la distribution du soluté dans le cas où $[P]_t$ est au moins égal à $[S]_t$, et dans ce cas $[P] \approx [P]_t$

Bien que les différents modèles ne reposent pas sur le même phénomène, toutes les constantes précédemment décrites sont néanmoins en correspondance :

$$K_d = K_c [\text{Liposome}] = K_c [P] / n = K' [P] \quad (10)$$

3 Caractérisation des liposomes par électrophorèse capillaire

Selon les données communiquées par Aventis [22, 23] et conformément à la littérature qui rapporte une utilisation des liposomes comme agent de séparation ionique similairement aux tensioactifs ioniques [5], les cinétiques d'échanges entre le liposome et le milieu extérieur aqueux sont rapides. Dès lors le choix de la méthode électrophorétique ne dépendra que des contraintes du système liées à la détection et l'adsorption des liposomes et du soluté sur la paroi du capillaire.

Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer la mobilité électrophorétique des liposomes. Le faible pourcentage de phospholipide chargé (4% en masse) dans la composition du liposome laisse prévoir que la charge de ce dernier est faible. Ce dernier aspect est extrêmement défavorable. En effet, compte tenu de la structure phospholipidique du liposome, on peut s'attendre à une forte adsorption du liposome sur la paroi du capillaire par interaction de type Van der Waals avec les fonctions siloxane de la silice. Afin d'évaluer la mobilité du liposome, des dilutions du liposome dans un tampon phosphate de sodium 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique constante (50 mM) ont été injectées en mode zone (figure 6).

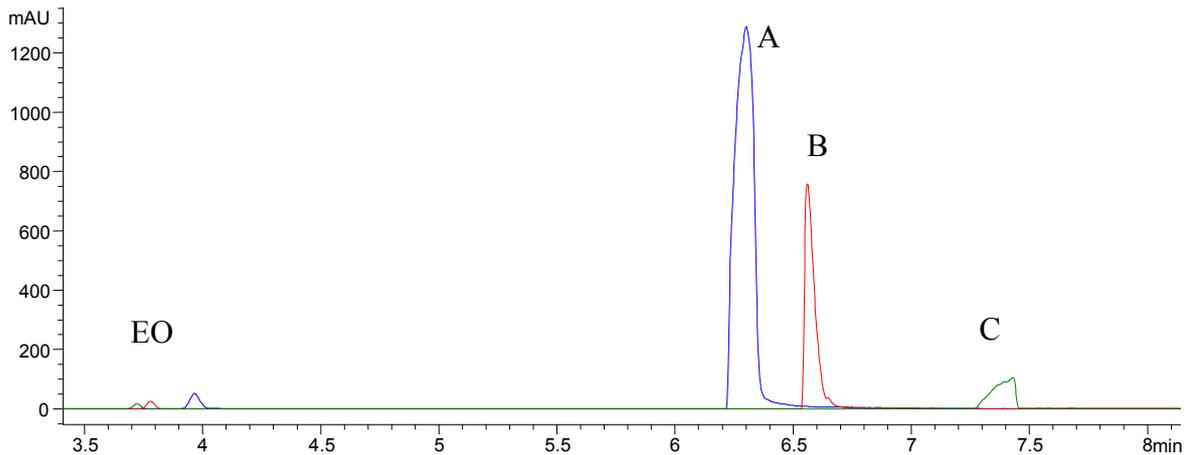


Figure 6 : Electrophérogrammes du liposome placebo en mode zone

Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate de sodium 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM. Tension appliquée : + 10 kV ($I = 19 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : Liposome placebo dilué 1/2 (concentration équivalente en phospholipides : 64,4 mM) (A), dilué au 1/5 (concentration équivalente en phospholipides : 25,7 mM) (B), et dilué au 1/10 (concentration équivalente en phospholipides : 12,9 mM) (C) Injection hydrodynamique de formamide (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s). Identification : EO : formamide.

Dans des capillaires en silice vierge de 50 μm de diamètre, les injections du liposome placebo montrent que le liposome a, comme attendu, tendance à s'adsorber sur la paroi du capillaire. Ainsi, pour les concentrations les plus élevées en phospholipides, le pic du liposome est légèrement déformé avec une traînée arrière. Pour la dilution au 1/10, le pic du liposome présente une traînée inversée. Ceci traduit certainement une rupture du liposome, alors faiblement concentré au cours de la migration électrophorétique, les phospholipides libres ayant certainement une mobilité électrophorétique plus faible, en valeur absolue (comme c'est le cas des tensioactifs libres par rapport à leurs micelles). Ceci semble confirmé par deux points. Tout d'abord, l'injection de concentration encore plus faible (dilutions au 1/20 ; 1/50 ; 1/100) du liposome ne permet pas de détecter ce dernier. Même si l'on admet que la détection du liposome résulte à la fois de son absorption UV et d'une variation d'indice du milieu, le niveau d'absorbance pour l'injection au 1/10 laisse supposer que la détection reste assez sensible pour le liposome dilué au 1/20. En outre, on note une très forte dégradation du flux électroosmotique entre deux injections du liposome dilué au demi, dégradation qu'une procédure de nettoyage du capillaire par percolation sous 935 mbars d'une solution de soude 0,1 M pendant 5 minutes ne permet pas de restaurer. Une restauration satisfaisante du flux nécessite soit de faire percoler du méthanol pur, soit de faire percoler une solution concentrée de SDS simultanément à l'imposition du champ électrique, comme cela a déjà été montré

dans le cas de l'adsorption de protéines basiques [24]. Cette dernière procédure de lavage du capillaire a été retenue entre les injections de la figure 6 en percolant tout d'abord une solution de SDS 60 mM en milieu tampon phosphate-borate pH 8,5 sous 935 mbars pendant 1 minute (environ 4 volumes de capillaire) puis en appliquant simultanément une tension de 15 kV et une pression de 50 mbars pendant 5 minutes. Les mobilités électrophorétiques mesurées au sommet des pics du liposome en fonction de sa concentration et les distributions de mobilités correspondantes sont données tableau 2.

| Dilution | $m_{\text{éo}}$ ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} au sommet ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} du massif ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) |
|----------|---|---|---|
| 1/2 | 38,6 | -14,2 | -13,8 - -15,2 |
| 1/5 | 40,5 | -17,0 | -16,9 - -17,1 |
| 1/10 | 41,1 | -20,4 | -19,9 - -20,5 |

Tableau 2 : mobilités électrophorétiques mesurées figure 6 au sommet du pic de liposome et distribution en mobilité en fonction de la concentration du liposome.

Conditions expérimentales : voir figure 6.

nota : les mobilités calculées tiennent compte de la correction pour la longueur effective de migration, du fait de l'introduction hydrodynamique de l'échantillon.

On constate que les mobilités électrophorétiques du liposome ont tendance à augmenter avec la dilution. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce comportement. Tout d'abord, il est possible que la particule liposomale change de forme ou de taille sous l'effet de la dilution. Une adsorption préférentielle du phospholipide neutre pourrait également conduire à une augmentation apparente de la densité de charge de la particule liposomale en suspension. Néanmoins, la forme du pic assez symétrique, notamment aux fortes concentrations, laisse supposer que l'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire est assez faible et probablement réversible. Enfin, on peut supposer que la mobilité électrophorétique calculée dans des capillaires en silice vierge est surestimée, les phénomènes chromatographiques parasites étant ici négligés.

Afin de borner la mobilité du liposome par une limite inférieure, une seconde série d'expérience a été réalisée dans des capillaires greffés polyéthylène glycol. Ce type de revêtement permet de diminuer le flux électroosmotique (flux électroosmotique résiduel testé dans les mêmes conditions inférieur à $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Le liposome a été injecté en solution diluée au demi (figure 7) dans ce capillaire.

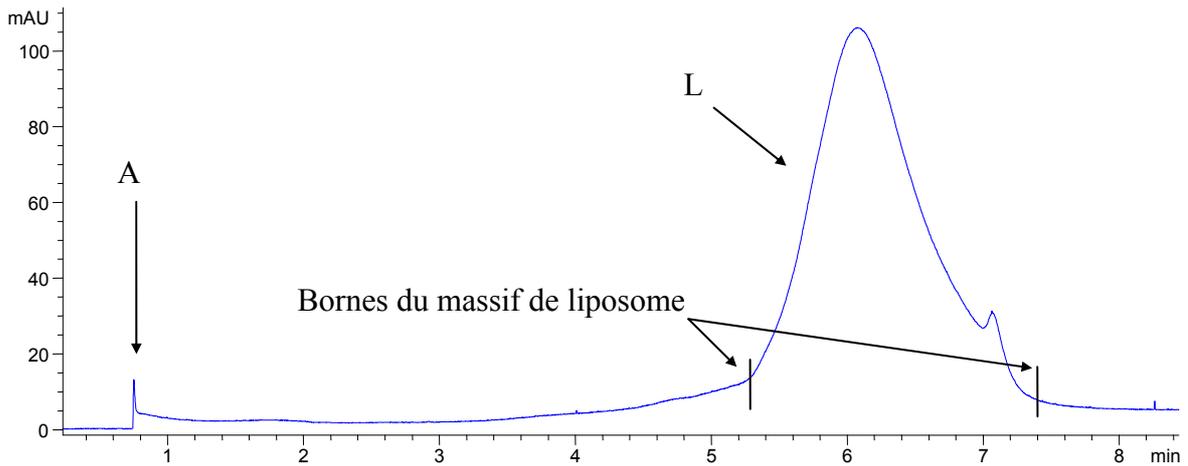


Figure 7 : Electrophérogramme du liposome placebo en mode zone dans un capillaire PEG.

Capillaire greffé PEG, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM. Tension appliquée : - 20 kV ($I = 39 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : liposome placebo dilué au $\frac{1}{2}$ (concentration équivalente en phospholipides : 64,4 mM). Injection hydrodynamique de l'échantillon (30 mbars, 2 s). Identification : A : artéfact, L : massif du liposome.

La figure 7 montre pour le liposome un pic principal présentant un épaulement. Ce dernier pourrait refléter la présence d'une sous-population de particules de plus grande taille ou de composition différente. Les valeurs de mobilités calculées au sommet et aux bornes du profil électrophorétique sont données dans le tableau 3.

| m_{ep} au sommet ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} du massif ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) |
|--|--|
| -12,7 | -14,9 - -10,4 |

Tableau 3 : mobilités apparentes au sommet du pic principal de liposome et distribution en mobilité

Conditions expérimentales : voir figure 7.

nota : les mobilités calculées tiennent compte de la correction pour la longueur effective de migration, du fait de l'introduction hydrodynamique de l'échantillon.

Les particules liposomales ont donc une mobilité électrophorétique supérieure ou égale à $10,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Pour un flux électroosmotique résiduel de $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, on retrouve une distribution en mobilités similaire à celle calculées précédemment avec un capillaire en silice vierge.

Le modèle de Henry peut être utilisé en première approximation pour calculer le potentiel zêta (ζ) de ces particules, à partir de leur mobilité électrophorétique [25]. Ce modèle s'applique idéalement à des particules sphériques, imperméables au solvant, placées dans un électrolyte présentant un continuum de charges. Il néglige l'effet de la relaxation des ions de

l'électrolyte autour de la particule migrant sous l'action du champ électrique (ce qui n'est justifié que pour les valeurs de ζ inférieures à 25 mV), ainsi que les interactions particule-paroi du capillaire. Le potentiel zêta est alors relié à la mobilité électrophorétique μ_{ep} de la particule par la relation 11 :

$$\zeta = \frac{3\eta\mu_{ep}}{2\varepsilon_r\varepsilon_0f(\kappa R)} \quad (11)$$

dans laquelle η est la viscosité du milieu ($0,88 \cdot 10^{-3}$ Pa.s), ε_r est la permittivité relative de l'eau (78), ε_0 est la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12}$ C².N⁻¹.m⁻²), κ est l'inverse de la longueur de Debye (m⁻¹) et $f(\kappa R)$ est la fonction de Henry définie par :

$$f(\kappa R) = 1 + \frac{(\kappa R)^2}{4} - \frac{5(\kappa R)^3}{48} + \frac{(\kappa R)^4}{96} + \frac{(\kappa R)^5}{96} - \frac{11}{96} \exp(\kappa R) \int_{\infty}^{\kappa R} \frac{\exp(-t)}{t} dt \quad (12)$$

En fonction de la valeur du produit κR , la fonction de Henry connaît deux cas limites :

- i. $\kappa R \ll 1$ (cas limite de Hückel), dans ce cas la fonction prend pour valeur 1
- ii. $\kappa R \gg 1$ (cas limite de Smoluchowski), dans ce cas la fonction prend pour valeur 1,5

Dans l'eau à 25°C, κ est une fonction de la force ionique F de l'électrolyte selon $\kappa = 3,288 F^{0,5}$ (nm⁻¹). Pour le liposome placebo, le produit κR ($\kappa R = 3,288 (0,05)^{0,5} \times 30 = 22$) est très supérieur à 1. Dans ces conditions, la fonction de Henry $f(\kappa R)$ tend vers 1,5 et par connaissance de la mobilité de particule liposomale, il est possible d'estimer son potentiel ζ à partir de la relation 11.

La relation 11 conduit, pour une mobilité moyenne estimée de $-13,5 \cdot 10^{-5}$ cm².V⁻¹.s⁻¹, à une valeur de ζ de -16,7 mV. La relaxation semble donc pouvoir être négligée pour ce type de particules. A titre de comparaison, le tableau 4 donne les mobilités électrophorétiques de quelques particules liposomales de 110 nm de diamètre et de diverses compositions en phospholipides [5]. Comme précédemment, nous avons estimé le potentiel ζ de ces particules liposomales à partir de la relation (11) (tableau 4). Parmi ces particules, il apparaît que seuls les liposomes de composition POPC/PS 100/0 répondent au critère sur le potentiel ζ permettant de négliger la relaxation. La mobilité des liposomes étudiés ici apparaît néanmoins intermédiaire entre celles des liposomes POPC/PS 100/0 et 90/10, ce qui est cohérent sur la base des densités de charges et malgré les différences de taille (30 et 110 nm), si l'on considère en première approche que la mobilité des particules de grande taille ($\kappa R \gg 1$) ne dépend que de leur densité de charge. Notons enfin que si la relaxation et les interactions avec

la paroi semblent pouvoir être négligées (compte tenu de la bonne symétrie du pic observé pour le liposome), l'hypothèse de ce modèle sur l'imperméabilité au solvant apparaît plus critique.

| Lipides | Composition molaire | Mobilité ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | Potentiel ζ (mV) estimé par la relation 11 |
|-----------|---------------------|--|---|
| POPC / PS | 70/30 | -40,9 | -52,1 |
| POPC / PS | 80 /20 | -40,8 | -52,0 |
| POPC / PS | 90 / 10 | -36,4 | -46,4 |
| POPC | 100 | -8,4 | -10,7 |
| POPC / PA | 80 /20 | -40,8 | -52,0 |
| POPC / CL | 80 /20 | -41,3 | -52,6 |
| POPC / PG | 80 /20 | -40,0 | -51,0 |

Tableau 4 : Mobilité électrophorétique effective de quelques particules liposomales de 110 nm de diamètre [5].

Capillaire en silice vierge (longueur totale de 58,5 cm, longueur utile de 50 cm). Tampon CHES-HCl 50 mM de pH 9,0. Tension appliquée : 20 kV. Température : 25°C.

POPC : 1-palmitoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine ; PS : phosphatidylsérine ; PA : acide phosphatidique ; CL : cardiolipine ; PG : phosphatidylglycérol.

4 Détermination par électrophorèse capillaire de la concentration libre d'un soluté en présence d'une phase liposomale.

4.1 Choix d'une méthode électrophorétique

La forte intensité du signal obtenu lors de la caractérisation directe des liposomes par électrophorèse de zone (paragraphe 3.1) ne semble pas compatible avec des méthodes électrophorétiques où le liposome serait présent dans l'électrolyte (affinité, pics de vacance). En effet, dans ce cas la détection sensible d'un soluté n'est pas réalisable. En outre, on sait au vu des travaux déjà réalisés dans la littérature que de telles conditions de migration conduiraient à un équilibre de l'analyte entre trois phases : le liposome, le milieu aqueux extérieur, et la bicouche adsorbée. Enfin, la mise en oeuvre expérimentale des méthodes de zone implique qu'un électrolyte support soit ajouté à la préparation liposomale. Compte tenu de la faible solubilité dans l'eau du principe actif (3 mg. L⁻¹ dans l'eau, soit 3,5 μM [22-23]) et de sa faible absorbance, la méthode d'Hümmel-Dreyer n'apparaît pas non plus envisageable pour la détermination du principe actif libre. Le choix de la méthode doit donc se porter soit

sur l'injection directe, soit sur l'analyse frontale. Selon les données fournies par Aventis, on sait que la cinétique de distribution du système principe actif-liposome est rapide, ce qui rend ce système incompatible *a priori* avec la méthode de l'injection directe. Le choix a donc été porté sur l'analyse frontale qui présente en outre l'avantage de permettre d'effectuer les mesures en l'absence d'un déplacement de l'équilibre de distribution.

Les méthodes ont été mises au point avec des solutés modèles choisis parmi une série de composés homologues non-toxiques (parahydroxybenzoate de méthyle, d'éthyle et propyle). Ces composés présentent une hydrophobie modulable selon la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'ester. Le tableau 5 donne les valeurs de log P du méthyl- (MePB), de l'éthyl- (EtPB) et du propylparabène (PrPB). Facilement disponibles et souvent utilisés dans les formulations pharmaceutiques, ils permettent de modéliser la distribution de solutés neutres en fonction de leur hydrophobie entre une phase aqueuse et une phase liposomale.

| Parabène | Méthyl- | Ethyl- | Propyl- |
|----------|---------|--------|---------|
| log P | 1,67 | 2,11 | 2,60 |

Tableau 5 : Hydrophobie des parabènes modèles [26].

4.2 Analyse frontale couplée à une injection électrocinétique continue.

L'analyse frontale électrocinétique continue consiste à injecter en continu en mode électrocinétique un mélange soluté-liposome pré-incubé, mis en solution dans le milieu d'étude (en général, il s'agit d'un tampon pH). La migration du mélange dans l'électrolyte de séparation constitué du milieu d'étude, simultanément à son injection, conduit à la formation de fronts de migration séparés selon les différences de mobilités des formes considérées. Théoriquement, il apparaît alors deux fronts de migration pour l'échantillon injecté en supposant que les liposomes vides aient la même mobilité que les liposomes contenant le soluté : un front de migration pour la forme libre seule puis un second front représentatif de la forme libre du soluté en équilibre avec le liposome.

Afin de permettre la détection du soluté à l'état libre, et pour limiter au maximum la partie du capillaire remplie avec le liposome (risque d'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire), les échantillons ont été introduits par le côté court du capillaire. La figure 8 montre des électrophérogrammes obtenus lors de l'introduction électrocinétique en mode frontal de mélanges méthylparabène-liposome placebo.

Les électrophérogrammes présentent dans l'intervalle de temps exploré un front attribué au méthylparabène libre. Le méthylparabène étant neutre, ce front est attendu en premier, avant celui des liposomes chargés négativement. L'augmentation du temps de détection du front de MePB avec la concentration en liposomes est liée à la diminution de l'électroosmose due à l'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire. Pour les concentrations en phospholipides inférieures à environ 15 mM, cette adsorption empêche la détection du front du liposome. Pour les concentrations en phospholipides supérieures à environ 15 mM, le flux se rétablit à un niveau proche de celui observé en l'absence de liposomes ($m_{éo} \sim -40 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), sans doute en raison de la saturation de la paroi du capillaire par les phospholipides anioniques. Dans ces conditions, le front de liposome peut être détecté. La figure 8 montre également que la hauteur du palier de concentration suivant le front de migration du méthylparabène libre décroît lorsque la concentration en liposome augmente.

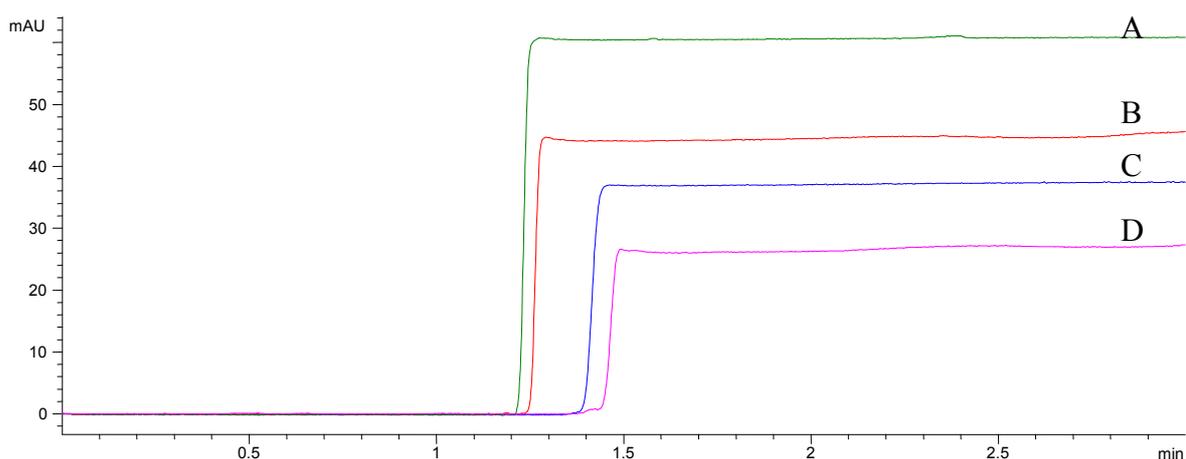


Figure 8 : Electrophérogrammes en mode frontal de mélanges méthylparabène-liposome
 Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate de sodium 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM. Tension appliquée : -10 kV ($I = 19 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm. Echantillons : mélanges méthylparabène 1 mM et phospholipides dans le tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM aux concentrations (calculées par rapport à l'acide gras majoritaire $\text{C}_{18:2}$): 0 mM (A) ; 2,7 mM (B) ; 5,15 mM (C) ; 10,5 mM (D). Lavage entre les essais par percolation d'une solution de SDS 150 mM dans l'eau puis application simultanée de 20 kV et 50 mbars pendant 5 min.

Un étalonnage simple de la hauteur de palier du méthylparabène libre réalisé en l'absence de liposome (figure 3A) permet d'estimer la fraction du méthylparabène libre en fonction de la concentration totale en phospholipides. Cet étalonnage suppose une réponse linéaire du détecteur sur la gamme d'absorbance obtenue (0-61 mUA), compte tenu de la

transparence du tampon phosphate à la longueur d'onde de détection (254 nm). La figure 9 représente l'évolution de la fraction libre calculée comme le rapport des hauteurs du palier de MePB en fonction de la concentration totale en phospholipides. Les points expérimentaux ont été ajustés par régression non-linéaire à un réarrangement de l'équation (9) représentative d'une interaction de 1 : 1 entre le soluté et les phospholipides, sous la forme :

$$\frac{[M]}{[M]_t} = \frac{1}{1 + K'[P]_t} \quad (13)$$

Cet ajustement permet d'estimer la constante K' à 114 M⁻¹.

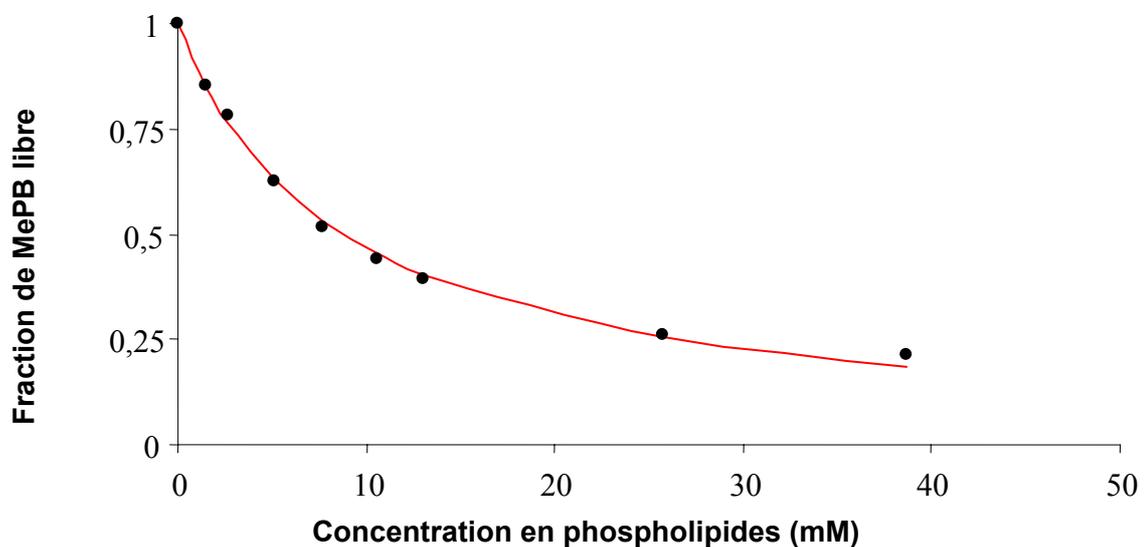


Figure 9 : Variation de la fraction de méthylparabène (MePB) libre en fonction de la concentration en phospholipide (calculée par rapport à l'acide gras majoritaire) (●) et ajustement des points expérimentaux à un modèle d'interaction de type 1 : 1 (—) (équation 13)
Conditions expérimentales : voir figure 8

Ainsi, il semble que le modèle d'interaction de type 1 : 1 entre le soluté et le phospholipide permette la description du système interactif soluté-liposome. L'expérience réalisée sur le système liposome-méthylparabène montre néanmoins que l'analyse frontale souffre ici de la faible sensibilité de détection UV. Ainsi, en l'état, elle semble peu adaptée à l'étude de l'incorporation de solutés d'hydrophobie plus élevée et donc a fortiori à celle du principe actif dans la formulation liposomale non diluée. Un nouveau protocole a donc été développé, applicable à la détermination de la concentration à l'état libre d'un soluté plus hydrophobe ainsi qu'à sa détection plus sensible. Afin de pallier le manque de sensibilité de la détection UV, il est nécessaire soit de recourir à un autre mode de détection (fluorescence

induite par laser, spectrométrie de masse), soit de préconcentrer le soluté. C'est cette seconde solution qui a été développée ici.

4.3 Protocole intégré d'injection directe sélective en mode électrocinétique couplée à une préconcentration en ligne.

Plusieurs méthodes de préconcentration [27] ont été développées en électrophorèse capillaire. Selon que le soluté est neutre ou chargé, on cherche classiquement à exploiter respectivement les techniques mettant en jeu un réactif complexant chargé (micelles de tensioactifs, cyclodextrines ioniques...) ou les techniques de préconcentration par amplification de champ électrique.

Les solutés d'intérêt pour cette étude, neutres et hydrophobes, relèvent d'une préconcentration par des micelles chargées. D'une façon générale, cette technique consiste à balayer sous champ électrique un large volume de soluté neutre injecté à l'entrée du capillaire par des micelles chargées. Les micelles assurent ainsi par interactions hydrophobes à la fois la préconcentration du soluté et son transport jusqu'à la fenêtre de détection.

A cette étape de préconcentration, il apparaît très souhaitable d'associer un protocole d'injection sélective du soluté neutre permettant d'éviter l'introduction des liposomes dans le capillaire, tout en préservant l'équilibre chimique. Cette approche permettrait en effet d'éviter toute adsorption des liposomes sur la paroi du capillaire. D'après les expériences réalisées précédemment en mode d'électrophorèse de zone, les particules liposomales ont une mobilité supérieure (en valeur absolue) à $10 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et on peut supposer que, compte tenu de leurs caractéristiques (diamètre et potentiel ζ), la mobilité électrophorétique des particules de liposome est peu sensible à l'incorporation du soluté. Dès lors, il apparaît réalisable d'introduire sélectivement le soluté sous forme libre par injection électrocinétique en présence d'un écoulement électroosmotique cathodique de vitesse inférieure et opposée à la vitesse de migration des liposomes anioniques. Ceci peut être réalisé dans des capillaires greffés polyacrylamide ou PEG disponibles commercialement ou encore dans des capillaire en silice vierge remplis d'un électrolyte faiblement acide. Les capillaire greffés présentent néanmoins l'inconvénient d'offrir une moins bonne sensibilité UV du fait de l'absorbance du greffage. Les capillaires en silice vierge ont donc été retenus.

L'étape de préconcentration (suivant l'injection sélective) visant à regrouper le soluté dans un faible volume final, il est évident que le signal issu de cette étape est proportionnel au volume de soluté libre injecté. En effet, selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \ell C_p = \varepsilon \ell \frac{C_0 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot l_i}{V_p} \quad (14)$$

avec ε coefficient d'extinction molaire du soluté, ℓ longueur du trajet optique au travers du capillaire, C_p concentration du soluté dans la zone préconcentrée, V_p volume de la zone préconcentrée, r rayon du capillaire, l_i longueur de la zone injectée correspondant à la distance parcourue par le solvant pendant l'injection électrocinétique, et C_0 concentration du soluté dans l'échantillon. L'obtention de résultats quantitatifs impose donc de s'affranchir des variations de volume injecté, soit au moyen d'un étalon interne, soit par détermination de la longueur l_i . L'utilisation d'un étalon interne reviendrait à ajouter un soluté supplémentaire neutre et très hydrophile aux mélanges MePB-liposomes. Compte tenu de la structure vésiculaire des liposomes, il ne serait cependant pas certain que l'étalon interne ne se distribue pas dans les particules. Nous avons donc préféré la détermination directe de l_i , équivalente à la détermination de la vitesse moyenne de l'écoulement électroosmotique durant l'injection électrocinétique. Pour cela nous avons développé un protocole de détermination de la longueur de la zone injectée, intégré à celui de l'injection et de préconcentration. Ce protocole, adaptation de la méthode de Willams et Vigh [28] pour la détermination de la mobilité électroosmotique, est décrit schématiquement figure 10, et les paramètres expérimentaux sont donnés tableau 6.

Ainsi, dans ce nouveau protocole, le capillaire a été initialement (A) conditionné (4 minutes sous 935 mbars, soit 16 volumes de capillaire) avec un tampon formiate de sodium (pH 4,00) de façon à permettre ultérieurement une injection électrocinétique sélective par l'entrée du capillaire (par entraînement par le flux électroosmotique, avec $m_{\text{é}0} \approx 6.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) du soluté sous forme libre.

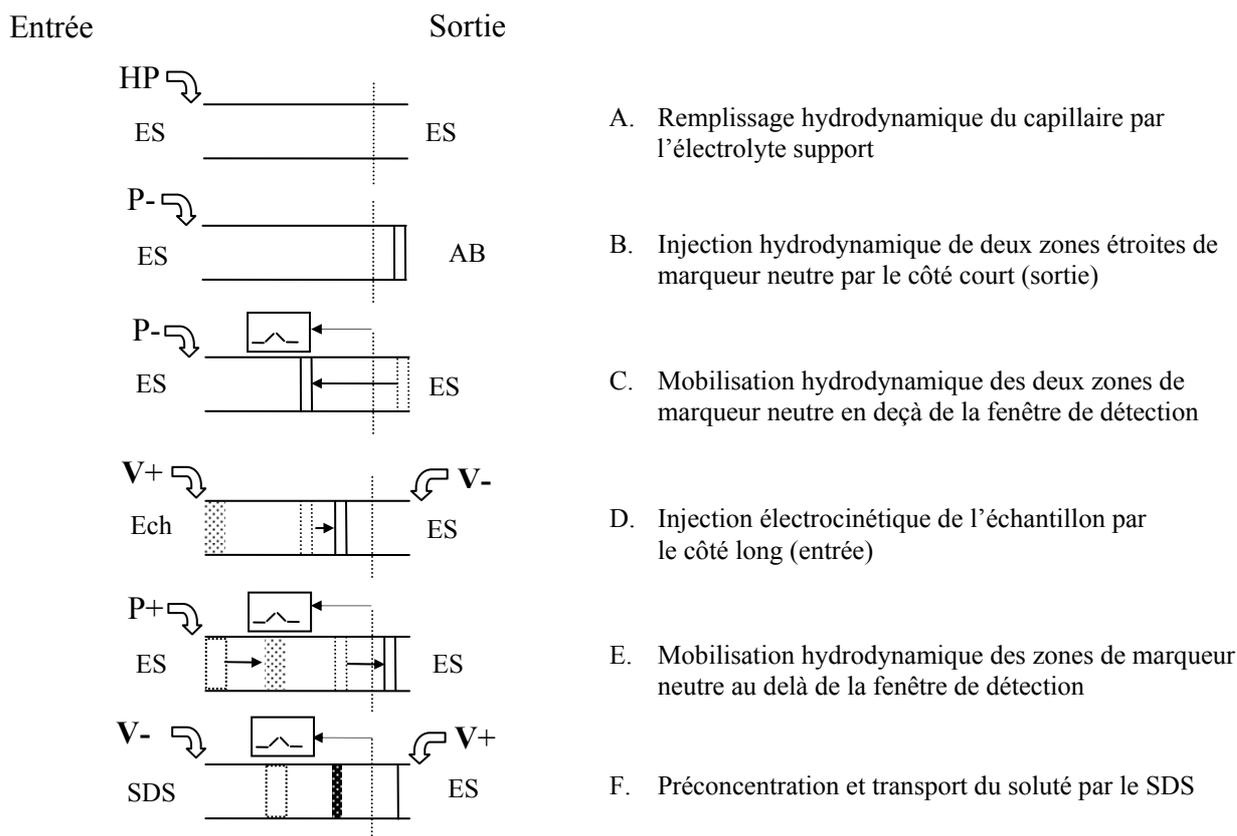


Figure 10 : Protocole intégré d'injection électrocinétique sélective de détermination du volume injecté, de préconcentration et de transport du soluté préconcentré vers le détecteur

ES : électrolyte support ; Ech : échantillon ; SDS : solution de SDS ; V+ : application d'un potentiel positif à l'électrode considérée ; V- : application d'un potentiel négatif à l'électrode considérée ; HP : application d'une haute pression ; P+ : application d'une pression positive ; P- : application d'une pression négative. \rightarrow  : symbolise l'initialisation du chronomètre simultanément au début de l'acquisition des données.

Dans la seconde étape (B) deux zones de marqueur neutre sont injectés par pression (P_m) par la sortie du capillaire (longueur sortie-fenêtre de détection $l_s = 8,5$ cm). Puis (C) ces derniers sont mobilisés dans le capillaire en deçà de la fenêtre de détection par application d'une pression P constante (P) pendant une durée t_{p1} (voir figure 11). Comme il n'est pas possible d'imposer au capillaire une variation de la pression en créneau parfait, nous avons effectué une rampe linéaire pour la montée en pression ainsi que pour la descente. Pour chacune des rampes, les points d'inflexions correspondants (t_{r11} et t_{r12} respectivement) sont calculés comme la demi-somme des points de début et de fin de la rampe de pression considérée. Ainsi, la durée de l'application de la pression est calculée comme : $t_{p1} = t_{r12} - t_{r11}$. Pour cette étape, on veille à ce que la distance finale (l_1) entre la fenêtre de détection et le sommet du second pic soit supérieure à la longueur (l_i) de la zone injectée dans l'étape d'injection électrocinétique. Sous application de la pression constante P , l'enregistrement de

cette première étape de mobilisation permet de connaître la vitesse de mobilisation (v_{m1}). Comme le sommet du pic est repéré, il est en théorie nécessaire de calculer la largeur des zones injectées (ω), le trajet parcouru par le sommet du second pic étant ici de ($l_s - 0,5\omega$).

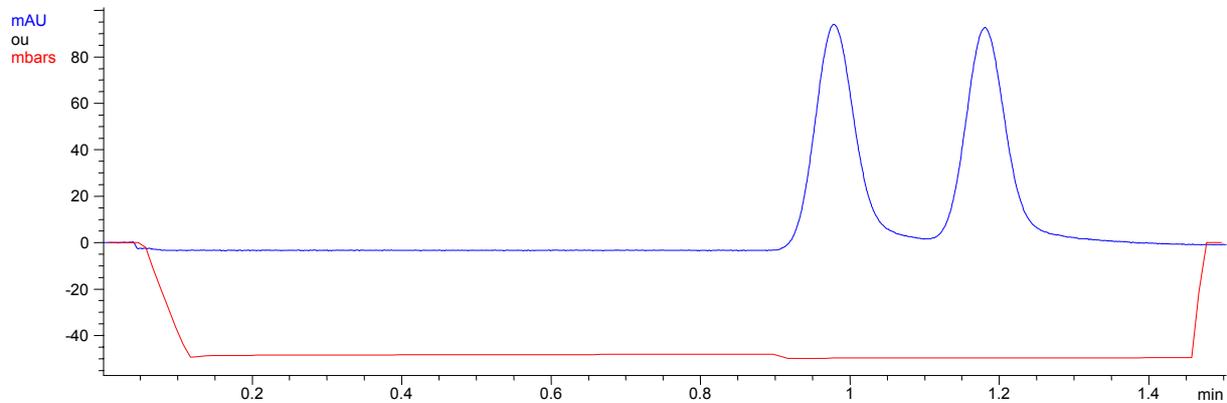


Figure 11 : Détection des deux zones de marqueur neutre au cours de leur première mobilisation hydrodynamique (étape C du protocole, figure 10) et enregistrement simultané de la pression appliquée à l'entrée du capillaire.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 et de force ionique 100 mM. Pression appliquée : -50 mbars. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injections hydrodynamiques du marqueur neutre (-1 mbar, 2 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 12 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 2 s). Marqueur neutre : alcool benzylique 3,2 mM (0,033 % v/v) dans l'électrolyte support.

En vue de minimiser la seconde période de mobilisation, la distance entre les zones de marqueur doit être faible. Le faible volume de marqueur neutre introduit hydrodynamiquement sous 1 mbar pendant 2 s (0,1 nL environ, soit $5 \cdot 10^{-3}$ cm) permet de négliger la demi-largeur du deuxième pic injecté (0,03% de la longueur $l_s = 8,5$ cm) dans l'évaluation de la vitesse de mobilisation. On a ainsi :

$$v_{m1} = \frac{l_s}{t_{12} - t_{r11}} \quad (15)$$

avec t_{12} temps de mobilisation de la seconde zone de marqueur dans la première étape de mobilisation (C).

| Etape | Pression (mbars) appliquée à l'entrée | Tension (kV) appliquée à l'entrée | Durée (s) | Solution | |
|-------|---|---|-----------|----------|--------|
| | | | | Entrée | Sortie |
| A | 935 | 0 | 240 | ES | ES |
| B | -1 | 0 | 2 | ES | AB |
| | -50 | 0 | 12 | ES | ES |
| | -1 | 0 | 2 | ES | AB |
| C | -50 | 0 | 90 | ES | ES |
| D | 0 | 10 | 120 | Ech | ES |
| E | 50 | 0 | 37 | ES | ES |
| F | 0 | -10 | 300 | SDS | ES |

Tableau 6 : Paramètres expérimentaux du protocole intégré utilisé pour le méthylparabène

AB : Alcool benzylique 0,33% v/v dans l'eau ; ES : électrolyte support (formiate-méthanol 90/10 v/v) ; Ech : Echantillon ; SDS : solution de SDS 75 mM dans l'eau.

Cette vitesse permet ainsi de connaître à la fois la distance finale du sommet du second pic de marqueur en deçà de la fenêtre de détection (l_1) et la distance séparant le sommet des deux pics (l_p) :

$$l_1 = t_{p1} \cdot v_{m1} - l_s \quad (16)$$

$$l_p = (t_{12} - t_{11}) \cdot v_{m1} \quad (17)$$

avec t_{11} temps de mobilisation de la première zone de marqueur dans la première étape de mobilisation.

Ensuite, la tension d'injection est appliquée (D) sur l'échantillon placé à l'entrée du capillaire. Il en résulte la migration des deux zones de marqueur neutre conjointement à l'introduction sélective du soluté neutre d'intérêt sous forme libre sur la distance l_i .

L'étape suivante (E) consiste à mobiliser à nouveau les zones de marqueur de façon à les faire repasser devant la fenêtre de détection (figure 12). Comme la distance l_p entre les deux pics est connue, l'enregistrement de cette étape permet d'évaluer la nouvelle vitesse de mobilisation (v_{m2}) :

$$v_{m2} = \frac{l_p}{t_{21} - t_{22}} \quad (18)$$

avec respectivement t_{21} et t_{22} temps de mobilisation de la première zone et de la seconde zone de marqueur neutre dans la seconde étape de mobilisation (E). Cette vitesse permet de calculer la distance entre le second pic et la fenêtre de détection après l'injection électrocinétique de l'échantillon (l_2) :

$$l_2 = v_{m2} \cdot t_{22} \quad (19)$$

et par suite la longueur de la zone injectée :

$$l_i = l_1 - l_2 \quad (20)$$

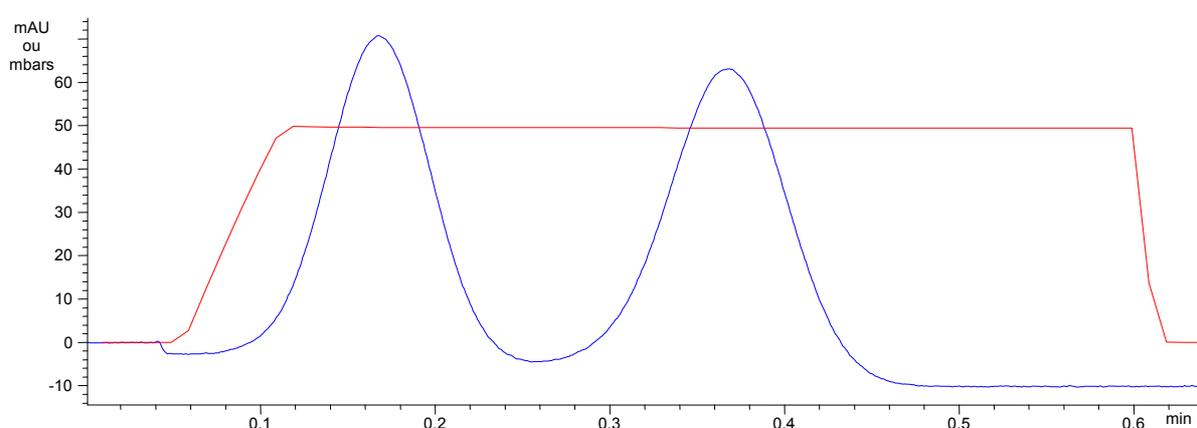


Figure 12 : Détection des deux zones de marqueur neutre au cours de leur seconde mobilisation hydrodynamique (étape E du protocole figure 10) et enregistrement simultané de la pression appliquée à l'entrée du capillaire.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 et de force ionique 100 mM. Pression appliquée : 50 mbars. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique du marqueur neutre (-1 mbar, 2 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 12 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 2 s), s suivies de l'injection électrocinétique sélective du MePB libre présent dans un mélange MePB 1 mM – liposome (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 64,4 mM) (10 kV, 120 s). Marqueur neutre : alcool benzylique 3,2 mM (0,033 % v/v) dans l'électrolyte support.

Suite à ces étapes, une solution de SDS 75 mM est introduite électrocinétiquement sous une tension de -10 kV et en continu par l'entrée du capillaire (F). Compte tenu de l'affinité du soluté neutre pour les micelles anioniques, cette solution micellaire permet à la fois de le focaliser (donc de le reconcentrer) dans le front de migration du SDS puis de le transporter jusqu'à la fenêtre de détection (figure 13). Enfin, l'introduction du SDS sous champ électrique participe à la procédure de lavage du capillaire en vue de l'analyse d'un nouvel échantillon. Dans l'étape finale de transport, les zones de marqueur neutres sont susceptibles d'être de nouveau détectées, le flux électroosmotique étant cette fois dirigé vers l'entrée. Afin

d'éviter que ces zones ne perturbent la mesure (par comigration ou par déstabilisation des micelles), nous avons employé comme marqueur neutre l'alcool benzylique. En effet ce dernier, légèrement hydrophobe ($\log P = 0,92$), est, comme le méthylparabène, focalisé par le front arrivant de SDS. Ceci évite ainsi tout contact entre l'alcool benzylique et le soluté. Au final, le pic de méthylparabène a été quantifié à partir d'une aire (A_c) corrigée de la longueur l_i et du temps de migration t_{MePB} du pic de MePB telle que :

$$A_c = \frac{A}{t_{MePB} \cdot l_i} \quad (21)$$

avec A aire brute du pic de MePB.

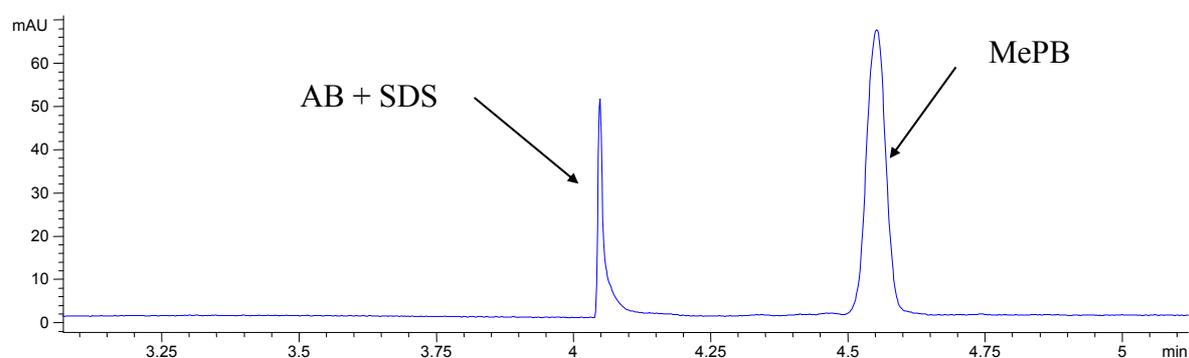


Figure 13 : Electrophérogramme du méthylparabène libre dans un milieu liposomal obtenu après application du protocole intégré décrit figure 10

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support remplissant initialement le capillaire : tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 et de force ionique 100 mM. Introduction électrocinétique continue sous une tension appliquée de -10 kV ($I_{\text{initiale}} = 40 \mu\text{A}$) d'une solution de SDS 75 mM dans l'eau. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm. Injections hydrodynamiques du marqueur neutre (-1 mbar, 2 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 12 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 2 s), suivies de l'injection électrocinétique sélective du MePB libre présent dans un mélange MePB 1 mM – liposome (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 64,4 mM) (10 kV, 120 s). Marqueur neutre : alcool benzylique 3,2 mM (0,033 % v/v) dans l'électrolyte support. Identification : AB+SDS : alcool benzylique reconcentré dans le front de SDS ; MePB : méthylparabène.

Par ailleurs, il est à noter que ce protocole intégré est compatible avec l'incubation initiale du mélange soluté-liposome dans un tampon différent de celui remplissant initialement le capillaire, comme cela a déjà été montré pour l'injection sélective des énantiomères du vérapamil libre dans des mélanges vérapamil-albumine humaine [29]. Ainsi, les échantillons injectés ont été préparés dans le même tampon formiate de sodium mais à une concentration 50 fois plus faible. Cette dilution du tampon permet à la fois de se rapprocher

des conditions de formulation du principe actif liposomal et d'assurer une discontinuité de champ électrique entre les deux zones. Dans ces conditions, le champ électrique se trouve amplifié dans la zone échantillon d'un facteur équivalent à celui du rapport des conductivités des deux milieux, c'est-à-dire ici de la dilution de l'électrolyte support, minimisant les risques d'introduction parasite de liposome.

4.3.1 Application au méthylparabène.

Un étalonnage de l'aire corrigée A_c a été effectué en fonction de la concentration en méthylparabène dans l'échantillon initial pour trois niveaux de concentration. Ces trois niveaux ont été répétés une fois. La courbe d'étalonnage obtenue est montrée figure 14.

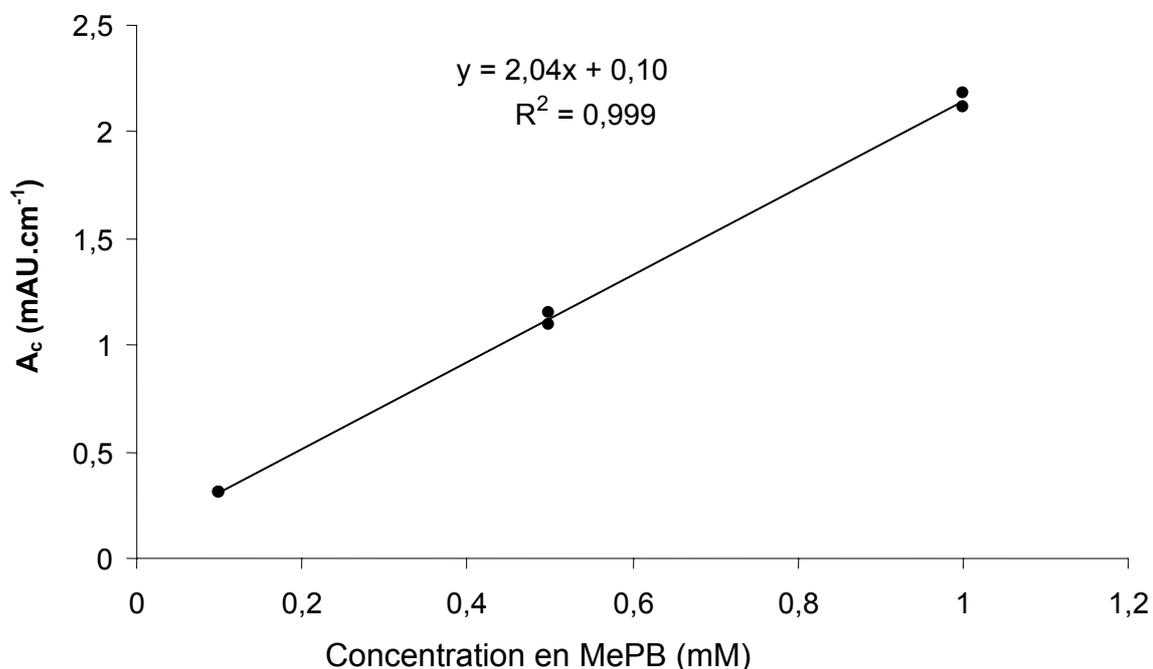


Figure 14 : Droite d'étalonnage de l'aire corrigée A_c en fonction de la concentration en méthylparabène (MePB)

Conditions opératoires : voir figure 13 et tableau 6

La droite obtenue montre une bonne linéarité entre l'aire corrigée et la concentration initiale en MePB. Cet étalonnage a donc été employé pour la détermination de la concentration en MePB libre de mélanges MePB-liposomes dans un milieu tampon formiate de force ionique constante (2 mM). Ces mélanges ont une concentration en méthylparabène fixée (1 mM) et des concentrations en liposome variables (dans la gamme 2,6 – 60 mM). Ces solutions liposomales de méthylparabène étudiées ont été préparées à partir des solutions-mère de liposome à 128,8 mM (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire) et de méthylparabène à 2 mM. L'évolution de la fraction en méthylparabène

libre en fonction de la concentration en phospholipides est représentée figure 15. Le point théorique de coordonnées (0 ; 1) a été ajouté aux points expérimentaux.

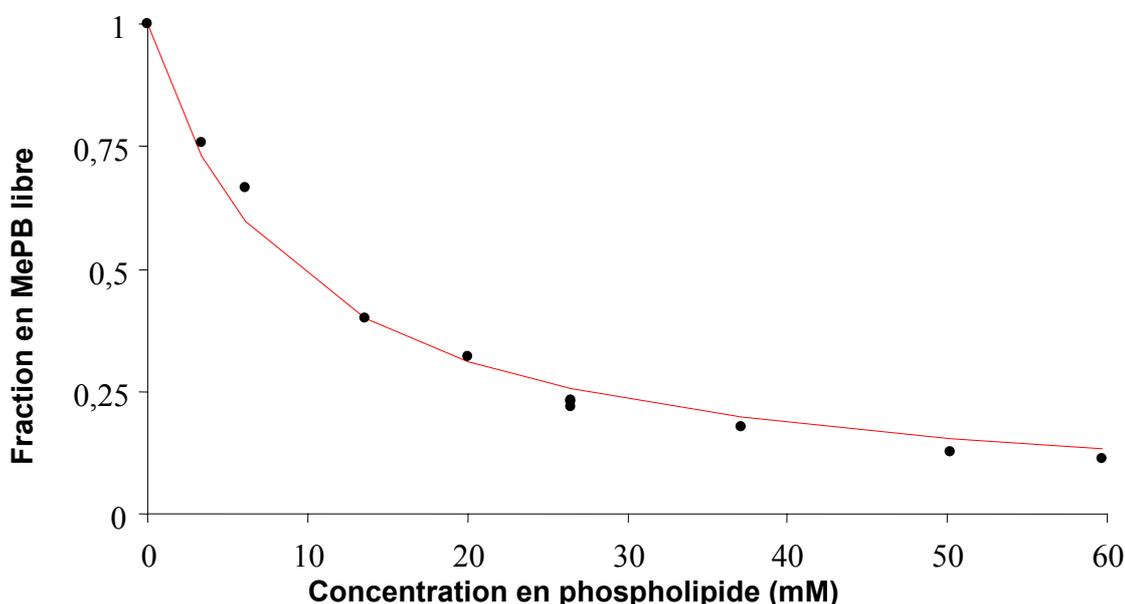


Figure 15 : Variation de la fraction de méthylparabène (MePB) libre en fonction de la concentration en phospholipide (calculée par rapport à l'acide gras majoritaire) (●) et ajustement des points expérimentaux à un modèle d'interaction de type 1 :1 (—) (équation 13) Conditions expérimentales : voir figure 13 et tableau 6

Comme pour les expériences effectuées en mode frontal, les données expérimentales obtenues ont été ajustées par régression non-linéaire en utilisant le modèle d'interaction 1 :1 (équation 13). La valeur de K' calculée est égale à 105 M^{-1} , ce qui est extrêmement proche de la valeur trouvée par analyse frontale ($K' = 114 \text{ M}^{-1}$). Ce résultat porte crédit aux méthodes électrophorétiques utilisées et souligne le fait que l'incorporation du méthylparabène (neutre) dans le liposome est peu sensible à la variation de pH (4 et 7) et de force ionique du milieu (2 et 50 mM). Ce dernier point a par ailleurs déjà été constaté dans le cas l'incorporation de solutés neutres (desméthyl diazepam, dexaméthasone, métolazone, oxazepam et hydrocortisone) dans des liposomes à base de POPC (1palmitoyl-2oleoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) ou de jaune d'oeuf de poule (phosphatidylcholine 70%, phosphatidyléthanolamine 21% et autres constituants phospholipidiques 9%) [30].

4.3.2 Application à l'éthylparabène

Homologue du méthylparabène, l'éthylparabène (EtPB) est un peu plus hydrophobe du fait de la présence d'un CH_2 supplémentaire dans la chaîne hydrocarbonée ($\log P = 2,11$, tableau 5). De ce fait, l'éthylparabène est davantage incorporé dans les micelles de SDS que le

méthylparabène. Cette caractéristique est favorable à la préconcentration du composé, mais a également pour conséquence le fait que dans les conditions utilisées pour le méthylparabène, l'éthylparabène migre dans le front de SDS. Pour éviter cette comigration, il est nécessaire de diminuer le facteur de rétention de l'éthylparabène par les micelles de SDS dans les conditions de migration finales. Ceci peut être obtenu soit en diminuant la concentration de la solution de SDS, soit en ajoutant un modificateur polaire dans l'électrolyte support remplissant initialement le capillaire. Parmi ces deux solutions, la seconde présente l'avantage supplémentaire de stabiliser l'électrosmose vers les faibles valeurs et a donc été retenue. 10% méthanol ont finalement été ajoutés à l'électrolyte support (mélange tampon formiate-méthanol 90/10 v/v). Cependant, l'ajout de méthanol augmente la viscosité et la durée des étapes de mobilisation hydrodynamique a été augmentée proportionnellement à la variation de viscosité du milieu hydroorganique. Le tableau 7 regroupe l'ensemble des paramètres du protocole intégré d'injection sélective électrocinétique, de mesure du volume injecté, de préconcentration et de transport de l'éthylparabène au détecteur, décrit figure 10.

| Etape | Pression (mbars) appliquée à l'entrée | Tension (kV) appliquée à l'entrée | Durée (s) | Solution | |
|-------|---|---|-----------|----------|--------|
| | | | | Entrée | Sortie |
| A | 935 | 0 | 240 | ES | ES |
| B | -1 | 0 | 2 | ES | AB |
| | -50 | 0 | 14 | ES | ES |
| | -1 | 0 | 2 | ES | AB |
| C | -50 | 0 | 100 | ES | ES |
| D | 0 | 15 | 60 | Ech | ES |
| E | 50 | 0 | 42 | ES | ES |
| F | 0 | -15 | 420 | SDS | ES |

Tableau 7 : Paramètres expérimentaux du protocole intégré utilisé pour l'éthylparabène (EtPB).

AB : Alcool benzylique 0,03% v/v dans l'électrolyte support ; ES : électrolyte support (mélange tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,0-méthanol 90 :10 (v/v)) ; Ech : Echantillon : mélanges EtPB 1 mM – Liposomes en concentrations variables dans le tampon formiate de sodium 2,9 mM de pH 4,0 (force ionique 2 mM) ; SDS : solution de SDS 75 mM dans l'eau.

Les solutions liposomales d'éthylparabène étudiées ont été préparées à partir de la solution liposomale placebo diluée au 1/25 (concentration en phospholipides calculée par

rapport à l'acide gras majoritaire : 2,6 mM) contenant l'éthylparabène à 2 mM. A partir de cette solution, ont été préparées sept échantillons de concentration fixe en éthylparabène (1 mM), et de concentrations différentes en liposomes (dans la gamme 2,6 – 26 mM) dans un milieu tampon formiate de force ionique constante (2 mM). La figure 16 présente à titre d'exemple un électrophérogramme de la fraction libre d'éthylparabène obtenu par application du protocole intégré décrit tableau 7.

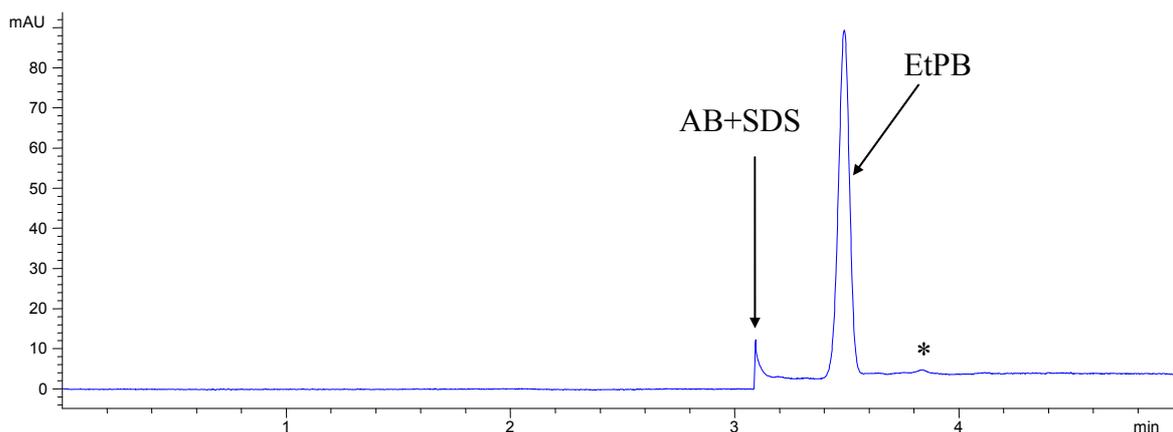


Figure 16 : Electrophérogramme de l'éthylparabène libre en milieu liposomal obtenu après application du protocole intégré décrit figure 10.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support remplissant initialement le capillaire : mélange tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 (force ionique 100 mM)-méthanol 90 :10 v/v. Introduction électrocinétique continue sous une tension appliquée de -15 kV ($I_{\text{initiale}} = -50 \mu\text{A}$) d'une solution de SDS 75 mM dans l'eau. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm. Injections hydrodynamiques du marqueur neutre (-1 mbar, 2 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 14 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 2 s), suivies de l'injection électrocinétique sélective (15 kV, 60 s) de l'éthylparabène libre présent dans une solution liposomale (concentration en phospholipides calculées à partir de l'acide gras majoritaire : 26 mM) contenant 1 mM d'éthylparabène. Marqueur neutre : alcool benzylique 3,2 mM (0,033 % v/v) dans l'électrolyte support. Identification : AB+SDS : alcool benzylique reconcentré dans le front de SDS ; EtPB : éthylparabène ; * : pic non identifié.

Comme dans le cas du méthylparabène, l'aire corrigée du pic a été étalonnée à partir de dilutions d'une solution-mère d'éthylparabène 1 mM dans l'eau. La figure 17 présente l'étalonnage obtenu pour six injections réparties sur 3 niveaux de concentrations.

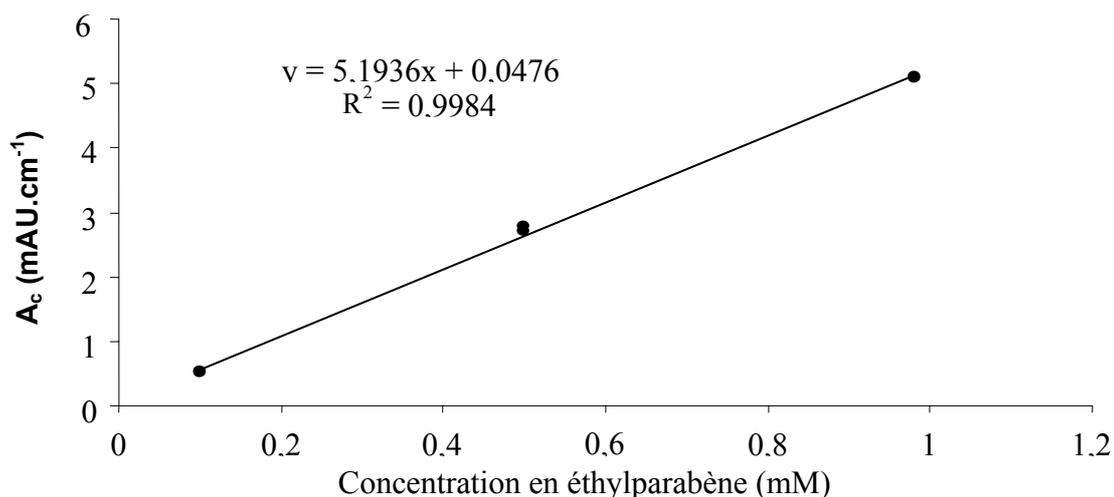


Figure 17 : Droite d'étalonnage de l'aire corrigée A_c en fonction de la concentration en éthylparabène (EtPB).

Conditions expérimentales : voir figure 16 et tableau 7

Cet étalonnage, qui présente une bonne linéarité, a permis de calculer la concentration d'éthylparabène libre dans un milieu liposomal, comme par exemple pour l'échantillon étudié figure 16 pour lequel la concentration en éthylparabène libre a été évaluée à 0,14 mM. Comme pour le méthylparabène, les points expérimentaux ont été ajustés en utilisant le modèle d'interaction 1:1 (équation 13, voir figure 18). La régression non-linéaire des données expérimentales conduit à $K' = 203 \text{ M}^{-1}$.

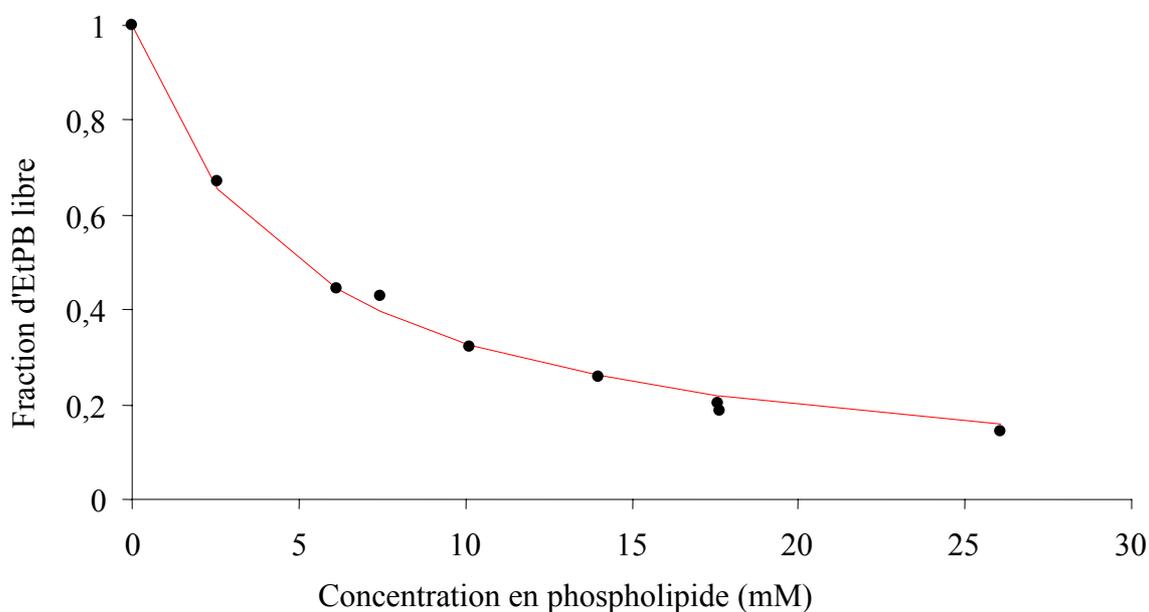


Figure 18 : Variation de la fraction d'éthylparabène (EtPB) libre en fonction de la concentration en phospholipide (calculée par rapport à l'acide gras majoritaire) (●) et ajustement des points expérimentaux à un modèle d'interaction de type 1:1 (—) (équation 13)
Conditions expérimentales : voir figure 16 et tableau 7.

4.3.3 Application au propylparabène

Comparé à l'éthylparabène, le propylparabène (PrPB) possède une hydrophobie encore augmentée ($\log P = 2,60$, tableau 5), qui permet de se rapprocher du cas du principe actif. Afin d'éviter une comigration du propylparabène et du SDS, la proportion de méthanol a été de nouveau augmentée dans le milieu hydro-organique. Ainsi, le milieu remplissant initialement le capillaire était un mélange tampon formiate 144,4 mM de pH 4,00 (force ionique 100 mM) - méthanol 80 : 20, v/v. Comme dans le cas précédent, les durées des étapes de mobilisation hydrodynamique ont été augmentées afin de pallier l'augmentation de viscosité du milieu. L'ensemble des paramètres expérimentaux pour le protocole intégré d'injection sélective électrocinétique, de mesure du volume injecté, de préconcentration et de détection est donné dans le tableau 8.

| Etape | Pression (mbars) appliquée à l'entrée | Tension (kV) appliquée à l'entrée | Durée (s) | Solution | |
|-------|---|---|-----------|----------|--------|
| | | | | Entrée | Sortie |
| A | 935 | 0 | 240 | ES | ES |
| B | -1 | 0 | 3 | ES | AB |
| | -50 | 0 | 17 | ES | ES |
| | -1 | 0 | 3 | ES | AB |
| C | -50 | 0 | 131 | ES | ES |
| D | 0 | 15 | 75 | ES | Ech |
| E | 50 | 0 | 55 | ES | ES |
| F | 0 | -15 | 420 | SDS | ES |

Tableau 8 : Paramètres expérimentaux du protocole intégré utilisé pour le propylparabène (PrPB).

AB : Alcool benzylique 4,8 mM (0,05% v/v) dans l'électrolyte support; ES : électrolyte support (formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,0 - méthanol 80/20 v/v) ; Ech : Echantillon : mélanges PrPB 1 mM – Liposomes en concentration variables dans le tampon formiate de sodium 2,9 mM de pH 4,0 (force ionique 2 mM) ; SDS : solution de SDS 75 mM dans l'eau.

Les solutions liposomales de propylparabène étudiées ont été préparées à partir de la solution liposomale placebo diluée au 2/25 (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 10,3 mM) contenant le propylparabène à 2 mM. A partir de cette solution, ont été préparées neuf échantillons de concentration fixe en propylparabène (1 mM), et de concentrations différentes en liposomes (dans la gamme 5,1 – 30,7 mM) dans un milieu tampon formiate de force ionique constante (2 mM). La figure 19 présente à titre

d'exemple un électrophérogramme de la fraction libre de propylparabène, obtenu pour une solution liposomale (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 30,7 mM) contenant le propylparabène à 1 mM.

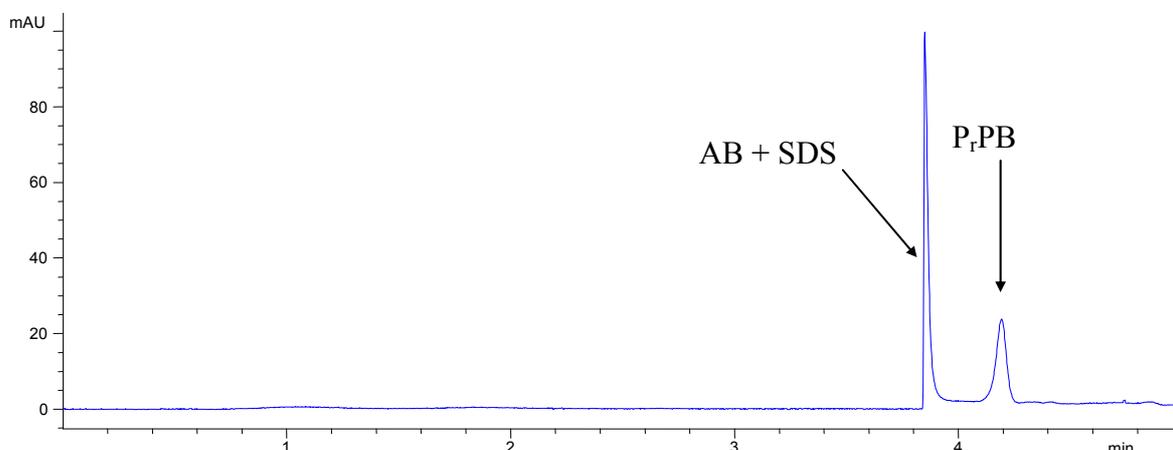


Figure 19 : Electrophérogramme du propylparabène libre dans un milieu liposomal, obtenu après application du protocole intégré décrit figure 10

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support remplissant initialement le capillaire : mélange tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 (force ionique 100 mM)-méthanol 80 :20 v/v. Introduction électrocinétique continue sous une tension appliquée de -15 kV ($I_{\text{initiale}} = 40 \mu\text{A}$) d'une solution de SDS 75 mM dans l'eau. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm. Injections hydrodynamiques du marqueur neutre (-1 mbar, 3 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 17 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 3 s), suivies de l'injection électrocinétique sélective (15 kV, 60 s) du propylparabène libre présent dans une solution liposomale (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 30,7 mM) contenant le propylparabène à 1 mM. Marqueur neutre : alcool benzylique 4,8 mM (0,05 % v/v) dans l'électrolyte support. Identification : AB+SDS : alcool benzylique reconcentré dans le front de SDS ; PrPB : propylparabène.

Comme le propylparabène n'est que peu soluble dans l'eau, l'étalonnage de l'aire corrigée en fonction de la concentration en propylparabène a été réalisé par dilution d'une solution-mère de propylparabène 2 mM préparée dans un mélange eau-méthanol 90 : 10 (v/v). L'étalonnage montré figure 20 de l'aire corrigée en fonction de la concentration en propylparabène a été effectué pour huit injections réparties sur quatre niveaux de concentrations. La droite d'étalonnage donnée figure 20 permet d'évaluer la concentration en propylparabène libre dans cet échantillon étudié à 0,05 mM.

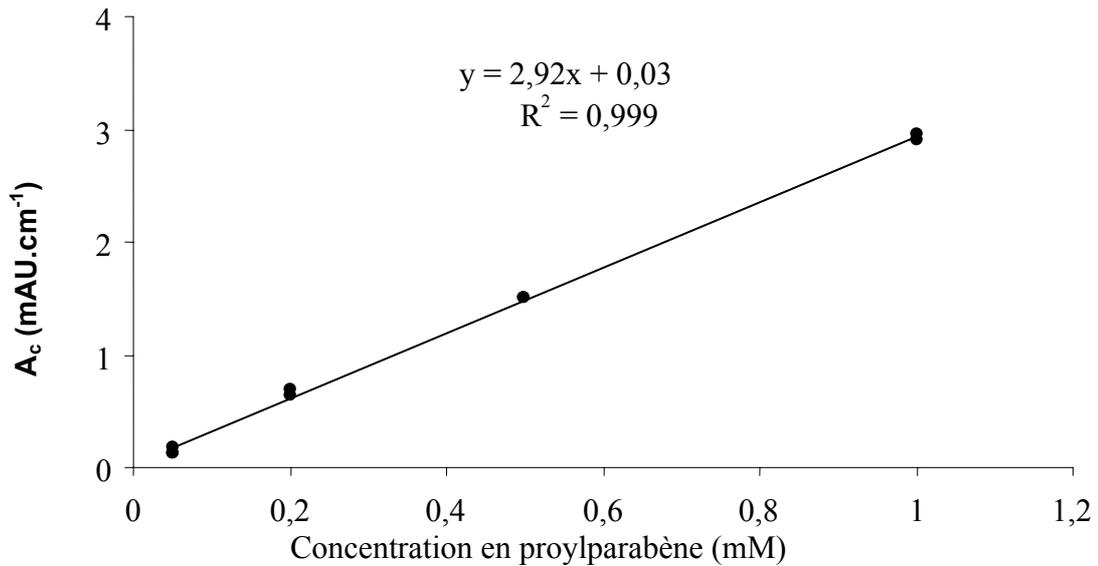


Figure 20 : Droite d'étalonnage de l'aire corrigée A_c en fonction de la concentration en propylparabène (PrPB).

Conditions expérimentales : voir figure 19 et tableau 8

Comme dans le cas précédent, les données expérimentales ont été ajustées en utilisant le modèle d'interaction 1 :1 (figure 21). La régression non-linéaire effectuée conduit à une valeur de K' égale à 651 M^{-1} , qu'il soit tenu compte ou non du point théorique de coordonnées (0 ; 1). Enfin, notons que les résultats expérimentaux obtenus par électrophorèse capillaire sont en bon accord avec ceux obtenus par Aventis-Pharma par ultrafiltration et chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée ($K' = 789 \text{ M}^{-1}$).

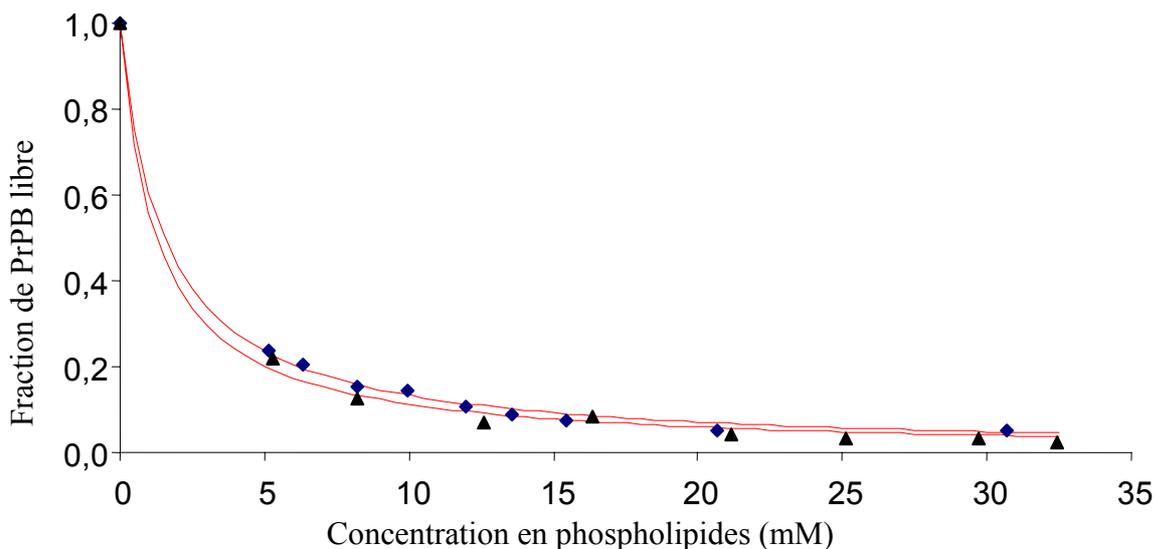


Figure 21 : Variation de la fraction de propylparabène libre en fonction de la concentration en phospholipide (♦ : mesure par électrophorèse capillaire ; ▲ : mesure par ultrafiltration-chromatographie en phase liquide à polarité de phases inversée) et ajustement des points expérimentaux à un modèle d'interaction 1 :1 (—) (équation 13)

Conditions expérimentales pour l'électrophorèse capillaire : voir figure 19 et tableau 8.

4.3.4 Relation log P-K'

Les valeurs de constantes K' de complexation 1 :1 calculées précédemment pour les trois alkylparabènes homologues s'incluant dans un liposome de phospholipides de composition donnée ont été corrélées au caractère hydrophobe des composés, estimé par leur constante de partage P entre l'octanol et l'eau. La figure 22 montre les résultats obtenus pour les graphes $K' = f(P)$, et $\log K' = f(\log P)$.

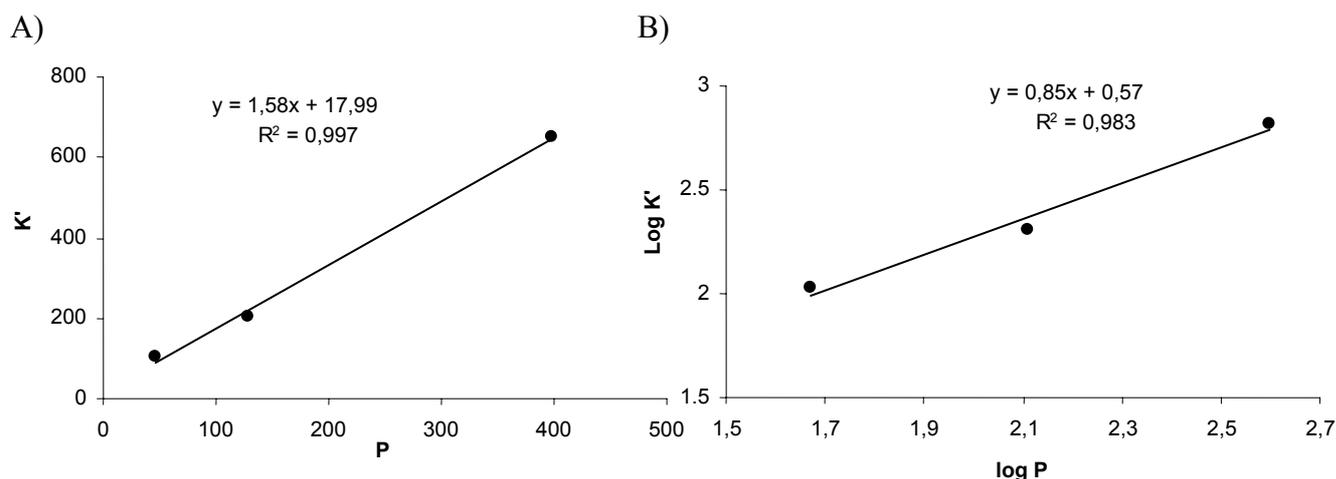


Figure 22 : Relations $K' = f(P)$ (A) et $\log K' = f(\log P)$ (B)

K' : constante de complexation 1 :1 parabène-phospholipide. P : coefficient de partage des parabènes entre l'eau et l'octanol.

La figure 22 montre qu'il existe une relation linéaire entre P et K' . Dès lors, on en conclut que l'incorporation d'un soluté neutre dans ce liposome s'effectue essentiellement par interaction hydrophobe, ce qui a par ailleurs déjà été constaté par Burns [18, 31] pour des liposomes constitués d'un mélange DPPC/Chol./DPPG en proportions molaires 7 :2 :1.

4.3.5 Application à la détermination de la concentration d'un principe actif libre dans une formulation liposomale.

Le principe actif d'intérêt est une molécule neutre de masse moléculaire $861,9 \text{ g.mol}^{-1}$ et faiblement soluble (3 mg. L^{-1} dans l'eau, soit $3,5 \text{ }\mu\text{M}$, et $3,2 \text{ mg. L}^{-1}$ dans la phase aqueuse liposomale contenant du maltose et du chlorure de sodium en l'absence de phospholipides, soit $3,7 \text{ }\mu\text{M}$). La valeur de sa constante de partage octanol/eau ($\log P = 3,2$) montre que la molécule est assez hydrophobe [22, 23].

L'extrapolation des corrélations $K' = f(\log P)$ du paragraphe 4.3.4 au principe actif ($\log P = 3,2$) conduit aux estimations suivantes de la constante de complexation K' :

- $K' = 2522 \text{ M}^{-1}$ et $\log K' = 3,4$ à partir de la corrélation linéaire $K' = f(P)$

- $K' = 1950 \text{ M}^{-1}$ et $\log K' = 3,3$ à partir de la corrélation linéaire $\log K' = f(\log P)$

Pour une concentration totale en phospholipides de 128,8 mM calculée par rapport à l'acide gras majoritaire dans la formulation standard, on peut estimer la fraction de principe actif libre (équation 13) entre 0,31 % ($K' = 2522 \text{ M}^{-1}$) et 0,40 % ($K' = 1950 \text{ M}^{-1}$), soit pour une concentration initiale de 5,8 mM (donnée dans la formulation), une concentration libre entre 1,8 et $2,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Ce calcul suppose que l'équilibre de distribution n'est pas perturbé par la limite de solubilité du principe actif dans la phase aqueuse externe aux liposomes. La mesure directe de la concentration libre du principe actif a alors été effectuée.

L'ensemble des paramètres expérimentaux pour le protocole intégré d'injection électrocinétique sélective, de mesure du volume injecté, de préconcentration et de détection est donné dans le tableau 9.

| Etape | Pression (mbars) appliquée à l'entrée | Tension (kV) appliquée à l'entrée | Durée (s) | Solution | |
|-------|---|---|-----------|----------|--------|
| | | | | Entrée | Sortie |
| A | 935 | 0 | 240 | ES | ES |
| B | -1 | 0 | 3 | ES | AB |
| | -50 | 0 | 19 | ES | ES |
| | -1 | 0 | 3 | ES | AB |
| C | -50 | 0 | 138 | ES | ES |
| D | 0 | 15 | 110 | Ech | ES |
| E | 50 | 0 | 57 | ES | ES |
| F | 0 | -15 | 420 | SDS | ES |

Tableau 9 : Paramètres expérimentaux du protocole intégré utilisés pour le principe actif (Pa)
 AB : Alcool benzylique 6,5 mM (0,067 % v/v) dans l'électrolyte support ; ES : électrolyte support : tampon formiate 144,4 mM de pH 4,0 - méthanol 80 : 20 (v/v) ; Ech : Echantillon : mélanges Pa – Liposome en concentrations variables et en rapports stoechiométriques constants dans le tampon formiate de sodium 2,9 mM de pH 4,0 (force ionique 2 mM) ; SDS : solution de SDS 75 mM dans l'eau.

L'application du protocole décrit tableau 9 pour l'injection de la formulation totale conduit à la détection des phospholipides dans le front de SDS (figure 23).

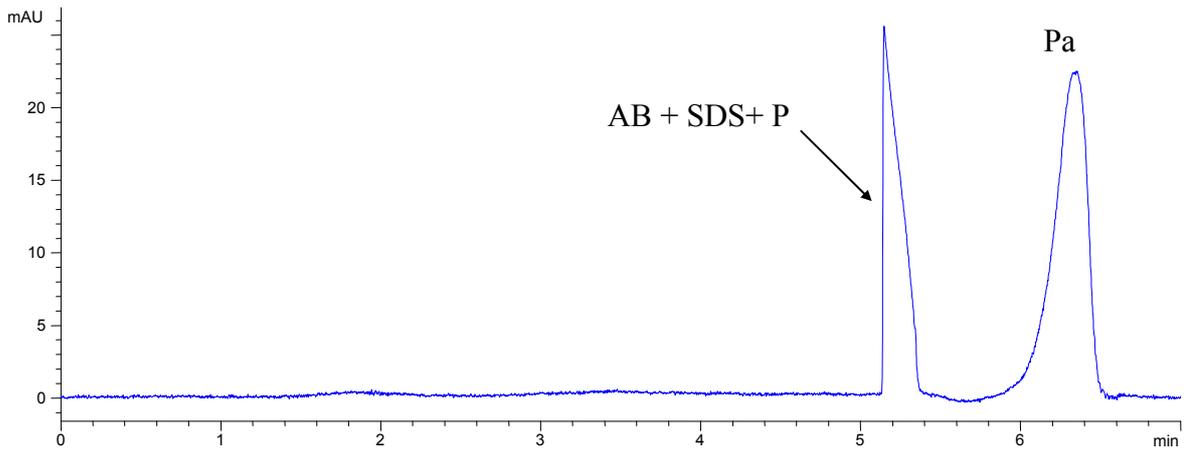


Figure 23 : Electrophérogramme du principe actif libre en milieu liposomal, obtenu après application du protocole intégré décrit figure 10.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support remplissant initialement le capillaire : mélange tampon formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,00 (force ionique 100 mM)-méthanol 60 :40 v/v. Introduction électrocinétique continue sous une tension appliquée de -15 kV ($I_{\text{initiale}} = 31 \mu\text{A}$) d'une solution de SDS 75 mM dans l'eau. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 254 nm. Injections hydrodynamiques du marqueur neutre (-1 mbar, 3 s), de l'électrolyte support (-50 mbars ; 17 s), du marqueur neutre (-1 mbar ; 3 s), de l'électrolyte support (- 50 mbars, 138 s) suivies de l'injection électrocinétique sélective (15 kV, 110 s) du principe actif libre présent dans une solution liposomale (concentration en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 128,8 mM) contenant le principe actif à 5,8 mM. Marqueur neutre : alcool benzylique 6,5 mM (0,067 % v/v) dans l'électrolyte support. Identification : AB+SDS+P : alcool benzylique et phospholipides reconcentrés dans le front de SDS ; Pa : principe actif.

La détection des phospholipides pourrait s'expliquer par une adsorption des liposomes à l'extérieur du tube de silice. Une étape de lavage de la surface extérieure a donc été incorporée au protocole précédent. Cette étape, consécutive à l'injection du principe actif libre, consiste à immerger dans du méthanol pendant 1 minute l'extrémité du capillaire qui a été en contact avec la solution liposomale. L'application du protocole modifié conduit à l'électrophérogramme représenté figure 24 pour la formulation standard (concentration totale en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 128,8 mM).

L'introduction de l'étape de lavage des électrodes et de la surface externe du capillaire par le méthanol permet de retrouver pour le front de SDS un signal ayant la forme d'un pic étroit. Par ailleurs, on constate que l'application du protocole modifié conduit à une diminution du pic attribué au principe actif, le principe actif devant cette fois être introduit uniquement par le flux électroosmotique.

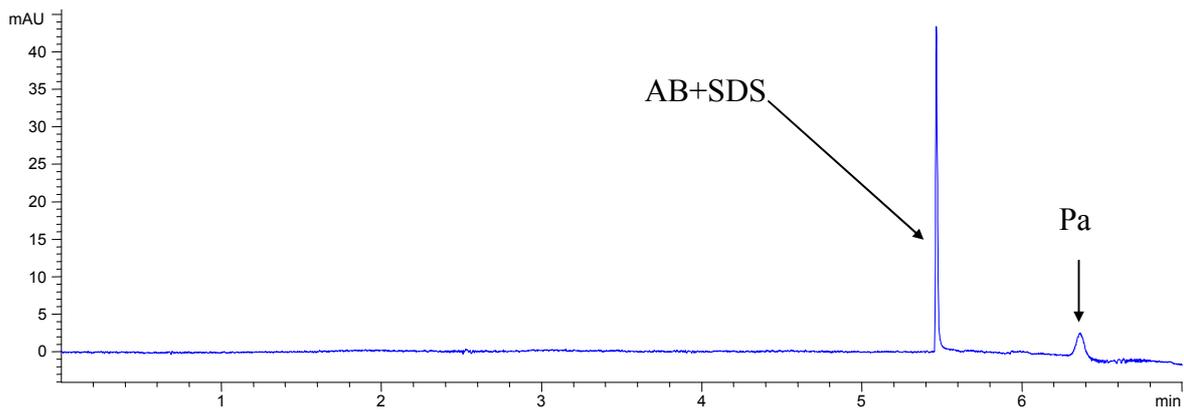


Figure 24 : Electrophérogramme du principe actif libre en milieu liposomal, obtenu après application du protocole intégré modifié.

Conditions opératoires : voir figure 23, sauf addition d'une étape de lavage supplémentaire (étape D') de l'extrémité d'entrée du capillaire dans du méthanol pendant 1 minute, après l'étape D de protocole décrit fig. 10.

L'étalonnage de l'aire corrigée A_c du pic de principe actif a été réalisé à partir de dilutions d'une solution-mère méthanolique de principe actif à $2,7 \cdot 10^{-4}$ M. Pour les trois niveaux de concentrations préparés (2,7, 13,5 et 27. 10^{-6} M) en flacon de polypropylène, les solutions étalons contiennent respectivement 1, 5 et 10% de méthanol dans le tampon formiate 2,9 mM de pH 4,0. La courbe correspondante à ces trois niveaux est représentée figure 25.A.

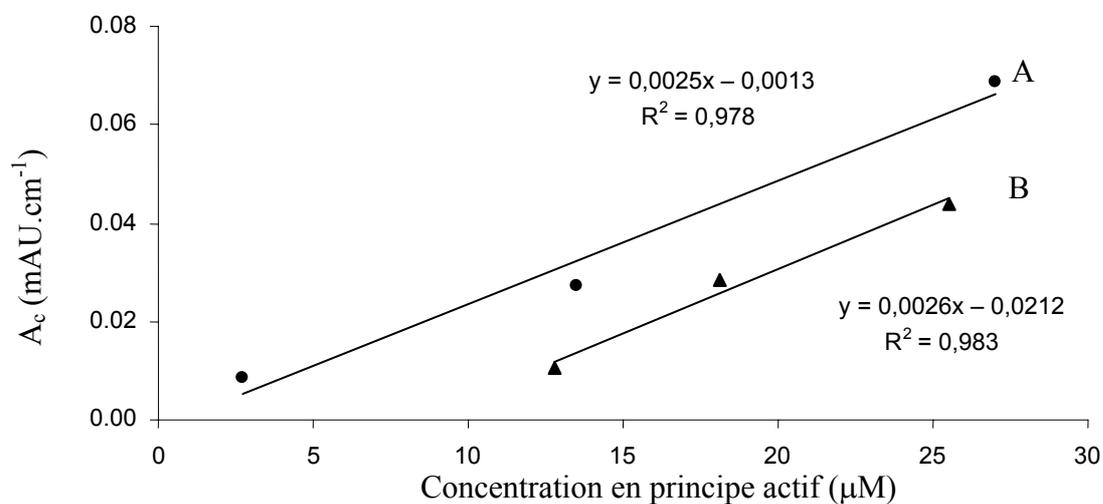


Figure 25 : Droite d'étalonnage de l'aire corrigée A_c en fonction de la concentration en principe actif

Conditions expérimentales : voir figure 24 et tableau 9

A : Solutions-étalon préparées par nos soins ; B : solutions-étalon préparées par Aventis.

La bonne linéarité de l'étalonnage (figure 25.A) permet de calculer une concentration en principe actif libre égale à $8,3 \cdot 10^{-6}$ M pour l'essai décrit figure 24. Deux déterminations supplémentaires ont été effectuées à partir de deux autres injections indépendantes de

l'échantillon. Elles conduisent à des concentrations en principe actif libre de $9,8 \cdot 10^{-6}$ M et $10,7 \cdot 10^{-6}$ M ce qui ne permet pas de considérer l'une de ces valeurs comme aberrante. Ainsi la moyenne des trois déterminations vaut $9,6 \cdot 10^{-6}$ M \pm $2,9 \cdot 10^{-6}$ M (pour un risque de 5%) soit une fraction libre de 0,17 % par rapport à la concentration totale du principe actif formulé qui nous a été confiée (5,8 mM). Cette concentration est cependant supérieure à la solubilité du principe actif rapportée dans la phase aqueuse des solutions liposomales contenant du maltose et du NaCl en l'absence de phospholipides.

Nous avons ensuite cherché à nous rapprocher des conditions de la distribution non limitée par la solubilité du principe actif en diluant la formulation liposomale au demi (2,9 mM de principe actif dans 64,4 mM de phospholipides (concentration calculée par rapport à l'acide gras majoritaire)) puis au quart (1,45 mM de principe actif dans 32,2 mM de phospholipides (concentration calculée par rapport à l'acide gras majoritaire)). Ces solutions ont été injectées selon le protocole de la figure 24. Néanmoins, seule la première des deux dilutions permet de détecter le principe actif libre, alors en concentration estimée à $1,3 \cdot 10^{-6}$ M, soit une fraction libre de principe actif de 0,045% par rapport à la concentration totale du principe actif, ce qui est cette fois en dessous du seuil de solubilité du principe actif rapportée dans la phase aqueuse des solutions liposomales contenant du maltose et du NaCl en l'absence de phospholipides.

Parmi les raisons qui pourraient expliquer les résultats élevés de la détermination directe de la concentration en principe actif libre, citons :

- un lavage incomplet du tube externe
- la possibilité d'introduire des agrégats de principe actif non solubilisés par le liposome et restant en suspension dans la formulation standard
- une augmentation de la solubilité du principe actif par interactions avec des phospholipides neutres ou monomères
- une imprécision de l'étalonnage.

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, un second étalonnage de l'aire corrigée a été effectué. Pour ce nouvel étalonnage, on dispose de solutions hydro-organiques, préparées selon le même mode opératoire par Aventis-Pharma, de principe actif à 13,5 μ M et 27 μ M (contenant respectivement 5 et 10 % de méthanol) et conditionnées en flacons de verre. La nouvelle droite d'étalonnage (figure 25.B), obtenue au moyen de ces solutions-étalons et

d'une solution-étalon supplémentaire à 18,1 μM que nous avons préparé par dilution de la solution à 27 μM , est parallèle à la première droite d'étalonnage précédente (figure 25.A). Néanmoins, cette nouvelle droite d'étalonnage présente un biais à l'origine (figure 25.B). Ce biais semble indiquer un défaut de principe actif dans les solutions-étalon par rapport aux concentrations attendues et pourrait s'expliquer par une adsorption du principe actif sur la paroi en verre des flacons de ces solutions-étalon. Une détermination supplémentaire de la concentration en forme libre de principe actif formulé de l'échantillon déjà étudié conduit à trouver une concentration égale à 17,1 μM selon l'étalonnage de la figure 25.B et égale à 9,2 μM selon l'étalonnage de la figure 25.A. Cette dernière valeur est en bon accord avec les déterminations précédentes (9,6 $\mu\text{M} \pm 2,9.\mu\text{M}$), et indique une bonne stabilité de la préparation liposomale de principe actif sur la durée séparant ces déterminations (2 mois environ).

5 Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons cherché à évaluer les possibilités de l'électrophorèse capillaire pour la détermination de concentrations libres dans des systèmes de distribution d'un soluté entre une phase aqueuse et une phase liposomale. Nous avons ainsi mis au point un protocole intégré original qui contribue à pallier le manque de sensibilité de détection pour les solutés de faible coefficient d'extinction.

L'application de ce protocole nous a ainsi permis de déterminer directement les concentrations libres de solutés modèles (méthyl- éthyl- propylparabène) et par suite de caractériser chacun des systèmes soluté-liposomes modèles par une constante de complexation. L'électrophorèse capillaire apparaît ainsi bien adaptée à l'étude de ces systèmes, en dépit des contraintes inhérentes aux liposomes liées par exemple à l'adsorption des phospholipides sur la paroi du capillaire, ou de la réfringence des solutions liposomales étudiées.

Concernant l'application au principe actif, la détermination directe de la concentration du principe actif libre conduit à une valeur supérieure à la solubilité de la molécule rapportée à 25°C dans la phase aqueuse de la formulation liposomale, en l'absence de phospholipides. Cependant, cette solubilité peut être notablement augmentée par la présence de phospholipides monomère, la présence du principe actif devant également diminuer le seuil d'agrégation comme c'est le cas avec les marqueurs micellaires vis-à-vis de la concentration

micellaire critique des tensioactifs [32]. En complément de la méthode électrophorétique mise au point dans cette étude, il serait envisageable de coupler en ligne la méthode frontale en l'associant à une méthode de détection plus sensible telle que la spectrométrie de masse.

6 Références bibliographiques

- [1] A. Bangham, R. Horne, *J. Mol. Biol.*, 8, 660-668, 1964
- [2] P. Machy, L. Leserman, dans *Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie*, INSERM ed., pp 6-7, 1987.
- [3] J. Delattre, P. Couvreur, F. Puisieux, *Les liposomes : aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, Ed Inserm, 1993
- [4] S. Chatterjee, D. Banerjee, dans *Liposome Methods and Protocols*, S. Basu, M. Basu, Humana Press ed., p 7, 2002,.
- [5] S. Wielmer, J. Hautala, J. Holopainen, P. Kinnunen, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis*, 22, 1305-1313, 2001
- [6] F. Castelli, C. Messina, M. Sarpetrio, R. Pignatello, G. Puglisi, *Thermochimica Acta*, 227-234, 2003.
- [7] P. Gaber, P. Yager, J.-P. Sheridan, *FEBS Lett.*, 153, 285-288, 1983
- [8] H. Idani, J. Matsuoka, T. Yasuda, K. Kobayashi, N. Tanaka, *Int. J. Cancer*, 88, 645-651, 2000
- [9] H. Fukui, T. Koike, A. Saheki, S. Sonoke, Y. Tomii, J. Seki, *International Journal of Pharmaceutics*, 263, 51-60, 2003
- [10] M. Roberts, L. Locascio-Brown, W. MacCrehan, R. Durst, *Anal. Chem.*, 68, 3434-3440, 1996
- [11] D. Chang, *Biophys. J.*, 56, 641-652, 1989
- [12] A. Phayre, V. Farfano, M. Hayes, *Langmuir*, 18, 6499-6503, 2002

- [13] M. Pysher, M. Hayes, Langmuir, sous presse
- [14] Y. Zhang, R. Zhang, S. Hjertén, P. Lundahl, Electrophoresis, 16, 1519-1523, 1995
- [15] J. Hautala, M. Lindén, S. Wiedmer, S. Ryhänen, M. Säily, P. Kinnunen, M.-L. Riekkola, J. Chromatogr. A, 1004, 81-90, 2003.
- [16] M. Busch, L. Carels, H. Boelens, J. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A, 777, 311-328, 1997
- [17] D. Chen, D. Cole, G. Srivatsa, J. Pharm. Biomed. Anal., 22, 791-801, 2000
- [18] S. Burns, G. Khaledi, J. Pharmaceut. Sc., 91, 1601-1612, 2002
- [19] N. Griese, G. Blaschke, J. Boos, G. Hempel, J. Chromatogr. A, 979, 379-388, 2002
- [20] M. Schwarz, R. Neubert, H. Rüttinger, J. Chromatogr A, 745, 135-143, 1996
- [21] J. McKeon, M. Khaledi, J. Chromatogr. A, 1004, 39-46, 2003.
- [22] Aventis Pharma, données internes.
- [23] N. Bargmann-Leyder, P. Denis, C. Bégos, L. Darroman, L. Duhau, poster.
- [24] B. Verzola, C. Gelfi, P. Righetti, J. Chromatogr. A, 868, 85-99, 2000
- [25] S. Radko, A. Chrambach, Electrophoresis, 23, 1957-1972, 2002
- [26] <http://www.logP.com>
- [27] J. Quirinio, S. Terabe, J. Cap. Elec, 4, 233-245, 1997
- [28] B. Williams, G. Vigh, Anal. Chem., 68, 1174-1180, 1996
- [29] T. Ohara, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Anal. Chem., 67, 3520-3525, 1995
- [30] E. Boija, A. Lundquist, J. Pla, C. Engvall, P. Lundahl, J. Chromatogr A, 1030, 273-278, 2004.

[31] S. Burns, A. Agbodjan, G. Morteza, G. Khaledi, J. Chromatogr. A., 973, 167-176, 2002

[32] C.-E. Lin, M. Chen, H. Huang, H. Chen, J. Chromatogr. A, 924, 83-91, 2001

7 Annexes

Annexe 1 : Echantillons

La solution liposomale placebo a été obtenue par reconstitution du lyophilisat fourni par Aventis avec 12 mL d'eau d'origine Cooper (Melun, France) pour préparation injectable. Selon les données fournies par Aventis [22], les liposomes sont constitués d'un mélange de lécithine de soja neutre (96% en masse), dont le phospholipide majoritaire est le dilinoleylphosphatidylcholine neutre (DLPC, chaînes d'acides gras en C_{18:2}, MM = 776 Da), et de phosphatidylglycerol de soja anionique (4% en masse), dont le phospholipide majoritaire est le dilinoleylphosphatidylglycérol (DLPG, chaînes d'acides gras en C_{18:2}, MM = 780 Da). Calculée par rapport aux acides gras majoritaires, la solution liposomale reconstituée a une concentration totale en phospholipides de 128,8 mM. Les particules ainsi reconstituées sont unilamellaires et ont diamètre moyen de 30 nm. Elles appartiennent donc à la classe des SUV.

Une solution-mère à 2 mM de méthylparabène d'origine Sigma a été préparée dans un tampon phosphate de sodium 46,2 mM de pH 7,0. La solution-étalon à 1 mM en méthylparabène a été préparée par dilution de cette solution avec de l'eau. Les solutions liposomales de méthylparabène étudiées par analyse frontale ont été préparées à partir de la solution-mère de méthylparabène dans le tampon phosphate par dilution de celle-ci avec la solution du liposome placebo et de l'eau. Par ailleurs, une solution à 2mM de méthylparabène d'origine Sigma a été préparée dans l'eau. Cette solution a été utilisée pour la préparation des solutions d'étalonnage et des solutions liposomales (gamme de concentration en phospholipides (calculée par rapport à l'acide gras majoritaire) de 3,3 à 59,7 mM) de méthylparabène dans un tampon formiate de sodium 2,6 mM de pH 4,0 et de force ionique constante (2 mM) étudiées par le protocole intégré.

Une solution d'éthylparabène à 1 mM a été réalisée dans l'eau et sert à la préparation des solutions étalons. En outre, une solution d'éthylparabène à 2 mM a été préparée dans l'eau contenant 4% v/v de la solution de liposome placebo (concentration équivalente en

phospholipides : 5,1 mM). Cette solution a été soumise à agitation douce et laissée au repos (environ 24 heures) à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à dissolution complète de l'éthylparabène. Les mélanges éthylparabène-liposome ont été préparés par dilution de la solution précédente avec la solution de liposome placebo et le tampon formiate de sodium 2,9 mM de pH 4,0.

Une solution aqueuse de propylparabène 2 mM contenant 10% de méthanol v/v a été utilisée pour réaliser les solutions étalons. En outre, une solution de propylparabène à 2 mM a été préparée dans l'eau contenant 8% v/v de la solution de liposome placebo (concentration équivalente en DPLC 10,3 mM). Cette solution a été soumise à agitation douce et laissée au repos (environ 24 heures) à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à dissolution complète du propylparabène. Les mélanges propylparabène-liposome ont été préparés par dilution de la solution précédente avec la solution de liposome placebo et le tampon formiate de sodium 2,9 mM de pH 4,0.

Les solutions étalons de principe actif ont été préparés à partir d'une solution méthanolique à $2,45 \cdot 10^{-4}$ M diluée dans le tampon formiate 2,9 mM de pH 4,0. Les mélanges principe actif-liposome étudiés ont été préparés à partir d'une solution-mère de principe actif formulée à 5,8 mM en principe actif total. Cette solution a été obtenue par reconstitution des lyophilisats fournis par Aventis avec de l'eau d'origine Cooper (Melun, France) pour préparation injectable. La solution-mère ainsi reconstituée possède la même composition en phospholipides que la solution placebo (concentration totale en phospholipides calculée par rapport à l'acide gras majoritaire : 128,8 mM).

Annexe 2 : Instrumentation

Les capillaires employés pour les migrations électrophorétiques ont un diamètre interne de 50 μm et une longueur totale de 35 cm (longueur utile de 8,5 cm du côté court et de 26,5 cm du côté long). Les capillaires en silice vierge utilisés proviennent de la société Phymep (Paris, France). Les capillaires greffés polyacrylamide proviennent de la société Microsolv (Eatontown, NJ, USA). Les capillaires PEG proviennent de la société Agilent (Massy, France). L'appareil d'électrophorèse est un modèle HP 3D CE d'Agilent Technologies (Massy, France). Cet appareil exécute l'intégralité des commandes nécessaires aux migrations électrophorétiques réalisées (injection, imposition de tension, conditionnement du capillaire) et autorise l'accomplissement de séquences d'analyses. Il est équipé d'une

lampe au deutérium ainsi que d'une barrette de diodes. La détection a été effectuée à 200 et 254 nm. La température a été fixée à 25°C.

Annexe 3 : Tampons et marqueurs

Pour la caractérisation du liposome placebo et les migrations effectuées en mode frontal, les tampons phosphate de pH mesuré 7,05 et force ionique 50 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 9,98 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1,34 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

Les échantillons caractérisés en mode frontal ont été préparés à partir d'une solution mère de tampon phosphate $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 = 2,62 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, de pH 7,0 et de force ionique 100 mM.

Les tampons formiate de sodium 144,4 mM de pH 4,0 et de force ionique 100 mM ont été préparés à partir du sel monosodique d'origine Acros et de l'acide formique d'origine Riedel - de Haën. Une solution d'acetate de sodium 100 mM a été acidifiée par l'acide formique jusqu'à obtention du pH désiré. La solution tampon finale est telle que :

$$[\text{HCOOH}] = 44,4 \text{ mM et } [\text{NaHCOO}] = 100 \text{ mM}$$

Le tampon formiate 2,9 mM de pH 4,0 (force ionique 2 mM) utilisé pour la préparation des mélanges soluté-liposome a été obtenu par dilution au 1/50^e du tampon précédent.

Le marqueur neutre de flux électroosmotique utilisé est soit le formamide d'origine Fluka, soit l'alcool benzylique d'origine Aldrich. Une solution de formamide à $8,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (0,03% v/v) dans le tampon phosphate a été utilisée pour déterminer le flux électroosmotique lors de la caractérisation du liposome placebo. Les solutions d'alcool benzylique utilisées lors de l'application du protocole intégré d'injection électrocinétique sélective, de détermination du volume injecté, de préconcentration et de transport du soluté vers le détecteur ont été préparées dans l'électrolyte support remplissant initialement le capillaire ; les concentrations de ces solutions sont détaillées dans les légendes des figures.

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) utilisé lors de l'étape de préconcentration et de transport au détecteur dans le protocole intégré est d'origine Fluka. Une solution à 75 mM a été fraîchement préparée dans l'eau pour chaque utilisation.

Chapitre 3. MODELISATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES : UNE NOUVELLE APPROCHE DE L'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE

1 Introduction.

L'électrophorèse d'affinité est certainement la méthode qui connaît le plus grand succès pour la détermination des constantes d'interaction non covalentes. Brièvement, cette méthode consiste à observer la variation de mobilité d'un substrat sous l'effet de sa complexation avec un ligand. Dans le cas simple d'une interaction monomoléculaire, la mobilité effective observée du substrat $\mu_{epS,i}$ est ainsi reliée à la constante de complexation K et à la concentration au niveau i du ligand libre ($[L]_i$) dans la zone de substrat selon :

$$v_i \cdot \mu_{epS,i} = \frac{\mu_{epS,0} + \mu_{epSL} \cdot K \cdot [L]_i}{1 + K[L]_i} \quad (1)$$

où $\mu_{epS,0}$ est la mobilité du substrat sous forme libre, et μ_{epSL} est la mobilité du complexe et v_i un facteur correctif. Pour être juste, la méthode nécessite en effet que la variation observée résulte exclusivement de la formation du complexe. Ainsi, il est nécessaire de s'affranchir des contributions externes telles que les variations de la viscosité et/ou de la force ionique de l'électrolyte support dues à l'augmentation de la concentration en ligand. Lorsque seule la viscosité varie, toutes les mobilités calculées sont extrapolées à une même viscosité η_0 , qui est généralement celle de l'électrolyte support (en l'absence de ligand) et le facteur correctif devient dans ce cas :

$$v_i = \eta_i / \eta_0 \quad (2)$$

avec η_i viscosité du milieu contenant le ligand au niveau i . L'ajustement par régressions linéaires (méthodes x-réciproque, y-réciproque et double réciproque) ou non-linéaires pour plusieurs niveaux de concentration du ligand permet d'accéder à la détermination de la constante de complexation.

La méthode implique donc d'après l'équation (1) d'estimer la mobilité du substrat ainsi que de connaître la concentration libre du ligand dans la zone occupée par le substrat (c'est-à-dire là où se produit la complexation). En général, cette concentration n'est pas

connue strictement, mais il est d'usage d'assimiler la concentration de ligand libre dans la zone de substrat à la concentration totale du ligand introduite dans l'électrolyte support.

La mobilité effective de substrat est généralement calculée à partir du temps de migration $t_{mS,i}$ au sommet du pic électrophorétique du substrat par la relation :

$$|\mu_{epS,i}| = \frac{lL}{U} \left| \frac{1}{t_{\epsilon_0}} - \frac{1}{t_{mS,i}} \right| \quad (3)$$

où l est la longueur utile du capillaire, L sa longueur totale, t_{ϵ_0} le temps de migration d'un marqueur neutre, et U la tension appliquée.

Cependant, il est classique d'observer en électrophorèse capillaire des profils de distribution fortement asymétriques engendrés par les effets de la dispersion par électromigration. De tels profils se rencontrent notamment quand le substrat injecté possède une mobilité électrophorétique différente de celle du co-ion l'électrolyte. Cette différence de mobilité est à l'origine d'une variation locale de conductivité, et par suite de champ électrique, entre les zones substrat et électrolyte support. Ainsi en électrophorèse, le calcul de mobilité à partir du temps de migration au sommet peut-il introduire une erreur systématique importante. Généralement, les profils électrophorétiques obtenus sont intermédiaires aux cas limites:

- i. du profil gaussien
- ii. du profil triangulaire

Récemment, il a été montré [1] que la fonction de Harhoff – Van der Linde (HVL) permet une bonne description des profils électrophorétiques intermédiaires aux profils limites précédents lorsque la dispersion par électromigration est la source principale de la dyssymétrie de pic (figure 1).

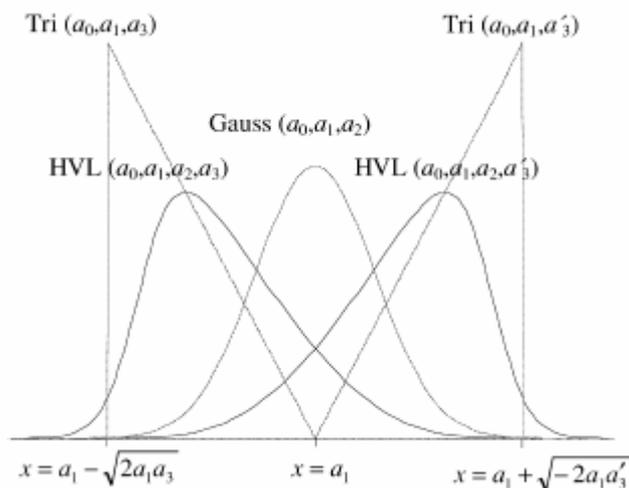


Figure 1 : Principaux modèles de profils de distributions électrophorétiques d'un analyte : modèles Gaussien, Haarhof van der Linde et triangulaires de mêmes paramètres a_0 et a_1 . [2]
 a_0 : aire du pic, a_1 : centre du pic gaussien ou de la composante gaussienne, a_2 : écart-type de la gaussienne ou de la composante gaussienne ; a_3, a_3' : paramètre de dissymétrie du pic.

Aussi, au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à évaluer l'intérêt pour l'électrophorèse d'affinité d'une telle modélisation des profils électrophorétiques par la fonction mathématique de HVL en vue d'une détermination plus satisfaisante des mobilités électrophorétiques et donc des paramètres d'interaction.

2 Modélisation des profils électrophorétiques

Dans le cas simple d'ions monovalents et entièrement dissociés (c'est-à-dire électrolytes forts), la dissymétrie de distribution a été modélisée par Mikkers et par la suite de façon plus mathématique par Erny [1] (figure 1). Ces modèles sont évidemment assez éloignés des situations rencontrées dans la plupart des séparations (électrolyte faible et éventuellement multivalents), mais ils permettent de saisir assez facilement comment sont reliées les différentes distributions aux caractéristiques du système étudié (composition de l'électrolyte support, mobilité et concentration de l'analyte injecté).

2.1 Modèle de Mikkers [3]

Dans le modèle présenté par Mikkers, la migration électrophorétique d'un analyte S, entièrement ionisé, est étudiée dans un électrolyte support, électrolyte fort, constitué de j ions et d'un contre-ion B, les ions considérés étant monovalents et non interactifs. On suppose de plus que la migration modifie les concentrations de l'électrolyte support de telle sorte que

la fonction de régulation de Kohlrausch (KRF) soit respectée. La fonction de régulation de Kohlrausch stipule :

$$\text{KRF} = \sum_i \frac{z_i C_i}{\mu_i} = \omega \quad (4)$$

avec z_i : valence de l'ion i ; C_i : concentration de l'ion i ; μ_i : mobilité de l'ion i ; ω : constante invariante dans le temps et dans l'espace.

Il est à noter que la fonction de régulation de Kohlrausch a été également généralisée [4] au cas d'électrolytes faibles par l'introduction des mobilités effectives pour les espèces considérées, et de termes correctifs pour le transport des ions H^+ et OH^- . Cependant, le modèle (non détaillé ici) devient alors rapidement très complexe.

Les frontières mobiles séparant les différentes zones du capillaire contenant des espèces différentes obéissent à l'équation de la frontière mobile. Pour un co-ion j entre une zone I et une zone II cette équation s'écrit :

$$C_j^{II} \cdot E^{II} \cdot \mu_j - C_j^I \cdot E^I \cdot \mu_j = v (C_j^{II} - C_j^I) \quad (5)$$

avec C_j^i ($i = I$ ou II) : concentration du co-ion j dans la zone considérée ; μ_j mobilité effective du co-ion j ; E^i ($i = I$ ou II) : champ électrique dans la zone considérée ; v : vitesse de l'interface entre I et II.

Adaptée au cas de la frontière entre la zone de substrat S et celle de l'électrolyte support, l'équation (5) de la frontière mobile devient (figure 2) :

$$C_j^E \cdot E^E \cdot \mu_j - C_j^S \cdot E^S \cdot \mu_j = \mu_s \cdot E^S \cdot (C_j^E - C_j^S) \quad (6)$$

avec μ_s : mobilité du substrat ; E^S : champ électrique dans la zone du substrat, E^E : champ électrique dans la zone électrolyte support.

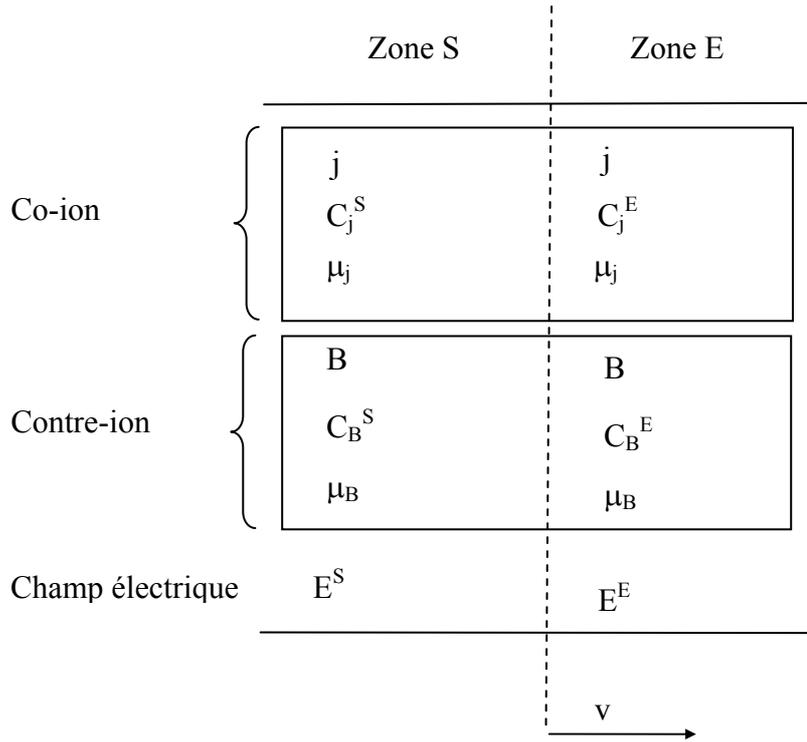


Figure 2 : représentation schématique de la frontière mobile pour un même co-ion j entre les zones S et E

La transformation de l'équation 6 précédente conduit à :

$$C_j^S = C_j^E \frac{\mu_S - \mu_j \beta}{\mu_S - \mu_j} \quad (7)$$

avec $\beta = E^E/E^S$.

Dans ce système, la fonction de régulation de Kohlrausch s'écrit :

$$\frac{C_S^S}{\mu_S} - \frac{C_B^S}{\mu_B} + \sum_j \frac{C_j^S}{\mu_j} = -\frac{C_B^E}{\mu_B} + \sum_j \frac{C_j^E}{\mu_j} \quad (8)$$

La condition d'électroneutralité ($|z_i| = 1$) dans chacune des zones impose :

$$\sum C_i = 0 \quad (9)$$

Comme le contre-ion est commun, l'électroneutralité est traduite

- dans la zone de substrat par : $C_S^S + \sum C_j^S = C_B^S$ (10.a)

et

- dans la zone de l'électrolyte support par : $\sum C_j^E = C_B^E$ (10.b)

Combinées avec l'expression (8), les expressions (10.a) et (10.b) conduisent à la nouvelle expression de la fonction de régulation de Kohlrausch :

$$C_s^S.k_s + \sum_j C_j^S.k_j = \sum_j C_j^E.k_j \quad (11)$$

avec $k_i = \frac{1}{\mu_B} - \frac{1}{\mu_i}$

La combinaison de (11) avec (7) conduit à :

$$\sum_j \left(C_j^E.k_j \frac{\mu_j(1-\beta)}{\mu_s - \mu_j} \right) = -C_s^S.k_s \quad (12)$$

dont on déduit l'expression de la valeur du champ E^S dans la zone du substrat :

$$E^S = \frac{E^E}{1 + \frac{C_s^S.k_s}{\sum_j C_j^E.k_j \frac{\mu_j}{\mu_s - \mu_j}}} \quad (13)$$

L'expression 13 traduit la variation du champ électrique dans la zone du substrat lorsque la concentration de celui-ci augmente, ce qui est en accord avec le fait que les pics deviennent d'autant plus dissymétriques que la concentration injectée du substrat est importante.

Dans le cas d'un électrolyte composé d'un seul co-ion, l'expression 13 permet de facilement prévoir le champ électrique dans la zone de substrat par rapport au champ dans l'électrolyte support. Ainsi :

- Si $|m_s| = |m_j|$ alors $E^E = E^S$
- Si $|m^S| > |m_j|$ alors $E^S < E^E$
- Si $|m^S| < |m_j|$ alors $E^S > E^E$

L'expression du champ électrique permet d'estimer la vitesse de migration du substrat :

$$v_s = \mu_s.E^S = \mu_s \frac{E^E}{1 - a_s C_s^S} \quad (14)$$

avec

$$a_s = - \frac{k_s}{\sum_j C_j^E.k_j \frac{\mu_j}{\mu_s - \mu_j}} \quad (14bis)$$

Cette expression de la vitesse de migration peut être introduite dans l'équation de transport [5] définie par :

$$\frac{\partial}{\partial t} C_s^S(x, t) = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_s \frac{\partial}{\partial x} C_s^S(x, t) - v_s(x, t) C_s^S(x, t) \right) \quad (15)$$

où D_s est le coefficient de diffusion du substrat. Si on néglige la contribution de la dispersion par diffusion, l'introduction de (14) dans l'expression (15) précédente conduit à :

$$\frac{\partial}{\partial t} C_s^S(x, t) = -\mu_s E^E \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{C_s^S(x, t)}{1 - a_s C_s^S(x, t)} \right) \quad (16)$$

Cette équation différentielle a été résolue par Mikkers [5] et conduit à l'expression approchée de C_s^S selon la distance x parcourue:

$$C_s^S(x, t) = \frac{1}{a_s} \left(1 - \sqrt{\frac{x_{\max} - l_0}{x - l_0}} \right) \quad (17)$$

où l_0 est la largeur du créneau de substrat injecté, et x_{\max} est la position spatiale du sommet du pic. La distribution ci-dessus est une fonction triangle rectangle orienté montant ou descendant. Le tableau 1 résume les caractéristiques de ces deux types de distributions possibles. L'équation de la conservation de la masse pour le substrat ainsi que l'intégration de l'équation 17 permettent de calculer l'intervalle x_{\min} - x_{\max} , où x_{\min} est la position du début ou de la fin du pic.

Le tableau 1 montre en particulier que dans des conditions données, les profils obtenus débutent à une valeur constante de x_{\min} (dans le cas d'une distribution montante) ou se terminent à une valeur constante de x_{\max} (dans le cas d'une distribution descendante) mais que la largeur à la base de ces profils augmente avec la concentration du soluté injecté. Le sens de la dissymétrie du pic de substrat peut être prévu par l'introduction du concept de vitesse de pente P_s comme montré par Gebauer et coll [6-7]. La vitesse de pente est définie par :

$$P_s = \left(\frac{dv_s}{dC_s^S} \right)_{C \rightarrow 0} \quad (18)$$

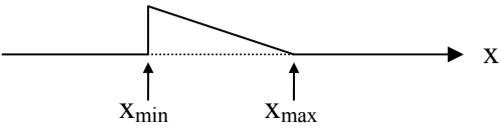
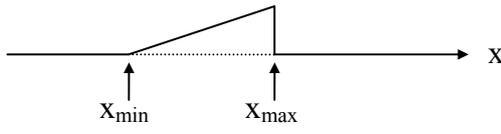
| Distribution descendante (fronting) | Distribution montante (tailing) |
|--|---|
|  |  |
| $x_{\max} = \mu_S \cdot E^E \cdot t$ $x_{\max} - x_{\min} = 2\sqrt{-C_S^0 \cdot a_S \cdot l_0 \cdot \mu_S \cdot E^E \cdot t}$ $C_S^S(x, t) = \frac{1}{a_S} \left(1 - \sqrt{\frac{x_{\max} - l_0}{x - l_0}} \right)$ pour $x < x_{\max}$ $a_S < 0, P_S < 0$ | $x_{\min} = \mu_S \cdot E^E \cdot t$ $x_{\max} - x_{\min} = 2\sqrt{C_S^0 \cdot a_S \cdot l_0 \cdot \mu_S \cdot E^E \cdot t}$ $C_S^S(x, t) = \frac{1}{a_S} \left(1 - \sqrt{\frac{x_{\max} - l_0}{x - l_0}} \right)$ pour $x > x_{\min}$ $a_S > 0, P_S > 0$ |

Tableau 1 : Caractéristiques des distributions montante et descendante de l'équation 17 selon le modèle de Mikkers [5]

P_S : vitesse de pente, voir texte.

Le pic sera descendant quand P_S est négatif, et montant quand P_S est positif. L'introduction de l'expression de la vitesse du substrat (14), conduit à la nouvelle expression de la vitesse de pente :

$$P_S = \left(\frac{dv_S}{dC_S^S} \right)_{C \rightarrow 0} = \frac{d}{dC_S^S} \left(\frac{\mu_S \cdot E^E}{1 - a_S \cdot C_S^S} \right)_{C \rightarrow 0} = \left(\frac{a_S \cdot \mu_S \cdot E^E}{(1 - a_S \cdot C_S^S)^2} \right)_{C \rightarrow 0} = a_S \cdot \mu_S \cdot E^E \quad (18\text{bis})$$

Le sens de la dissymétrie dépend donc du signe de a_S et par conséquent des différences de mobilité entre les co-ions et le substrat. Ceci explique notamment que dans un électrolyte composé d'au moins deux co-ions (et d'un seul contre-ion), trois pics consécutifs peuvent être de dissymétries opposées. La figure 3 illustre une telle situation pour la séparation d'anions (caproate, acétate, pyrazole-2,3-dicarboxylate, maléate) en présence de deux co-ions (salicylate et formiate)

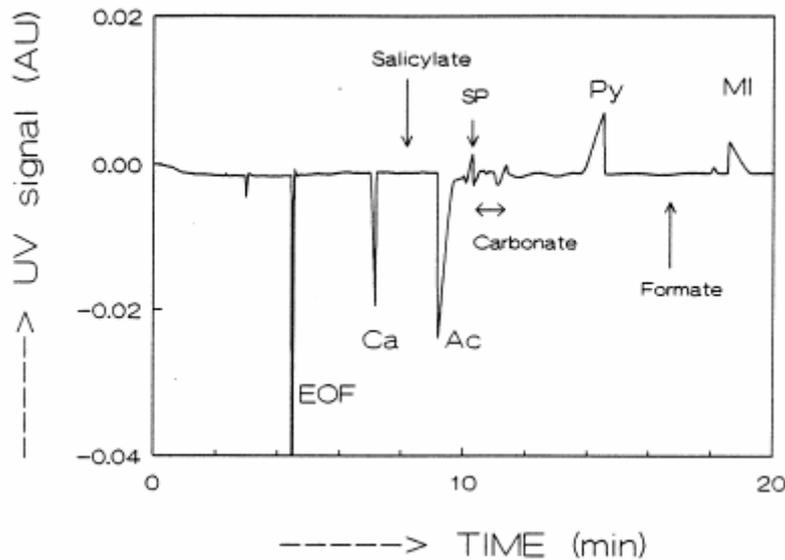


Figure 3 : Electrophérogramme d'une séparation d'acides organiques obtenue en présence de deux co-ions [8].

Capillaire en silice vierge 75 μm x 57,1 cm (longueur utile 46,7 cm). Electrolyte support : acide formique 5 mM, acide salicylique 5 mM et tris 20 mM (pH 8,1). Tension appliquée : 15 kV. Température : 25°C. Injection hydrodynamique de l'échantillon : 3,4 mbars, 3s. Echantillon : Caproate (Ca) 1 mM ; Acétate (Ac) 1 mM, pyrazole-2,3-dicarboxylate (Py) 1 mM et maléate (M1) 1 mM. Détection UV à 214 nm.

2.2 Modèle de Erny et coll.

Récemment, Erny et coll. [1-2] ont montré que les pics électrophorétiques pouvaient être ajustés par la fonction de Harhoff - Van der Linde (HVL). Cette fonction de HVL s'écrit :

$$f(t) = \frac{\frac{a_0 a_2^2}{a_1 a_3} \left[\frac{1}{a_2 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(t-a_1)^2}{2a_2^2}\right) \right]}{\frac{1}{\exp\left(\frac{a_1 a_3}{a_2^2}\right) - 1} + \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t-a_1}{a_2 \sqrt{2}}\right) \right)} \quad (21)$$

avec a_0 : aire du pic ; a_1 : centre du pic de la composante gaussienne ; a_2 : écart-type de la composante gaussienne ; a_3 : mesure de la dissymétrie du pic ; erf : fonction erreur. La fonction de distribution de Harhoff – Van der Linde connaît deux cas limites que Erny et coll. ont superposé aux conditions limites de la distribution triangulaire précédente du modèle de Mikkers :

- i. $a_2 \gg a_1 \cdot |a_3|$. Dans ce cas, la fonction se ramène à une distribution gaussienne
- ii. $a_2 \ll a_1 \cdot |a_3|$. Dans ce cas, la fonction se ramène à la fonction triangulaire, et l'intervalle

$x_{\min} - x_{\max}$ est égal à $\sqrt{2a_1 |a_3|}$.

Dans la fonction de HVL, la partie entre crochets du numérateur correspond à la composante gaussienne, tandis que le dénominateur correspond à la composante de dissymétrie. Pour la fonction de HVL, Erny et coll [1-2] ont montré que le paramètre a_1 correspond au temps de migration de l'analyte S en l'absence de toute contribution dispersive (électromigration et diffusion, notamment). Ainsi :

$$a_1 = x_{\min} = \mu_S \cdot E^E \cdot t \quad (22)$$

L'identification de la largeur obtenue dans le second cas limite avec la largeur du pic triangulaire permet de calculer l'expression de a_3 dans le cas où un seul co-ion j est présent :

$$a_3 = 2l_0 \frac{C_S^0}{C_j^E} \frac{(\mu_S - \mu_B) \cdot (\mu_S - \mu_j)}{\mu_S \cdot (\mu_j - \mu_B)} \quad (23)$$

On note en particulier dans cette expression de a_3 , que le coefficient dépend de la longueur du créneau injectée (l_0) et du rapport des concentrations de l'espèce S injectée (C_S^0) à celle du co-ion j dans l'électrolyte support. Aussi, le coefficient a_3 caractérise le sens de la distribution et est négatif quand le pic est de dissymétrie montante, et positif quand le est de dissymétrie descendante.

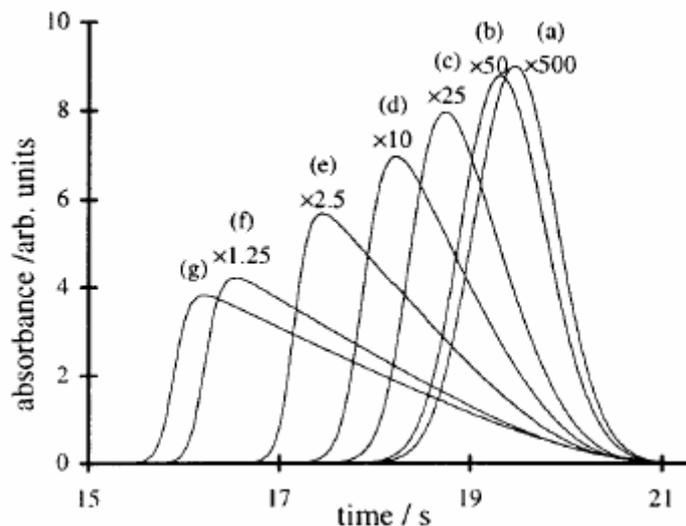


Figure 4 : Simulation de profils électrophorétiques par la fonction de HVL pour une concentration de substrat injectée croissante [1]

La figure 4 illustre la transition du pic gaussien au pic triangulaire par augmentation de la concentration injectée. Dans cette figure, les échelles des pics simulés aux faibles concentrations ont été agrandies (facteur indiqué au dessus du pic). Elle met en évidence, pour

la méthode d'électrophorèse capillaire d'affinité, les effets de la concentration en substrat injecté lorsque le sommet du pic est repéré.

2.3 Discussion

Pour une détermination non biaisée des paramètres d'interactions par les méthodes fondées sur les variations de mobilités (électrophorèse d'affinité et d'affinité et vacance), il apparaît donc nécessaire de limiter dans la mesure du possible les effets de la dispersion par électromigration lorsque le temps de migration est repéré au sommet du pic.

Ceci peut impliquer l'injection du substrat à une concentration très faible en regard de la concentration des co-ions de l'électrolyte, et d'effectuer préférentiellement les migrations dans un électrolyte support constitué d'un co-ion possédant une mobilité électrophorétique dans l'intervalle de la variation de la mobilité électrophorétique effective du substrat (relation 13).

Pour l'électrophorèse d'affinité, il n'est pas toujours possible en pratique de répondre à ces deux conditions, les électrolytes choisis devant être également obligatoirement inertes vis-à-vis de chacun des constituants de l'interaction étudiée afin d'éviter toute interaction compétitive parasite. Ainsi, le choix d'un électrolyte peut être conditionné par le système d'étude. Par exemple, dans le cas de la caractérisation de complexes dont la formation résulte d'interactions hydrophobes (micelles, liposomes, cyclodextrines...), les électrolytes doivent être hydrophiles. En outre du point de vue de la détection, lorsque le substrat absorbe peu dans l'UV, il peut être nécessaire de recourir à la détection UV indirecte, ce qui limite encore le choix des co-ions chromophores (espèces hydrophiles ou inorganiques pour le cas précédent).

Ainsi il n'est pas toujours possible de limiter le phénomène de dispersion par électromigration, et nous avons donc cherché à évaluer l'intérêt pour l'électrophorèse capillaire d'affinité de la modélisation des pics électrophorétiques du substrat dans le cas de distributions dissymétriques par une fonction mathématique. Par rapport au modèle de Mikkers, le modèle de HVL est plus proche des profils électrophorétiques expérimentaux observés et sera donc par la suite utilisé pour décrire les pics électrophorétiques. Cette modélisation permet en effet en théorie de déterminer l'ensemble des caractéristiques du pic électrophorétique obtenu (aire ; centre de la composante gaussienne, variance de la

composante gaussienne, coefficient de dissymétrie) et par suite d'estimer la mobilité du substrat de façon plus satisfaisante par le paramètre a_1 du pic modélisé.

Pour illustrer cette démarche, nous avons choisi d'étudier l'inclusion de solutés chargés (2-naphtalènesulfonate, forme ionisée du naproxène, adamantane-1-carboxylate) (figure 5) pour deux niveaux de concentration afin d'évaluer l'impact de la dissymétrie sur les paramètres calculés de leur inclusion dans la β -cyclodextrine.

La β -cyclodextrine est constituée par un enchaînement oligosaccharidique d'unité D-(+)-glycopyrannose (figure 6A). La molécule a une forme de cône tronqué (figure 6B). Les résidus saccharidiques sont disposés tels que les groupements hydroxyle sont exposés au solvant aqueux et les groupements C-H sont dirigés vers l'intérieur de la cavité. Cette cavité interne permet donc l'inclusion de solutés hydrophobes. La stabilité des complexes formés dépend essentiellement de trois facteurs : la taille du soluté, celui-ci devant pouvoir rentrer physiquement dans la cavité, son hydrophobie et son aptitude à former des liaisons hydrogène avec les groupements hydroxyle de la cyclodextrine. C'est d'ailleurs cette dernière contribution qui est à l'origine de la séparation d'énantiomères.

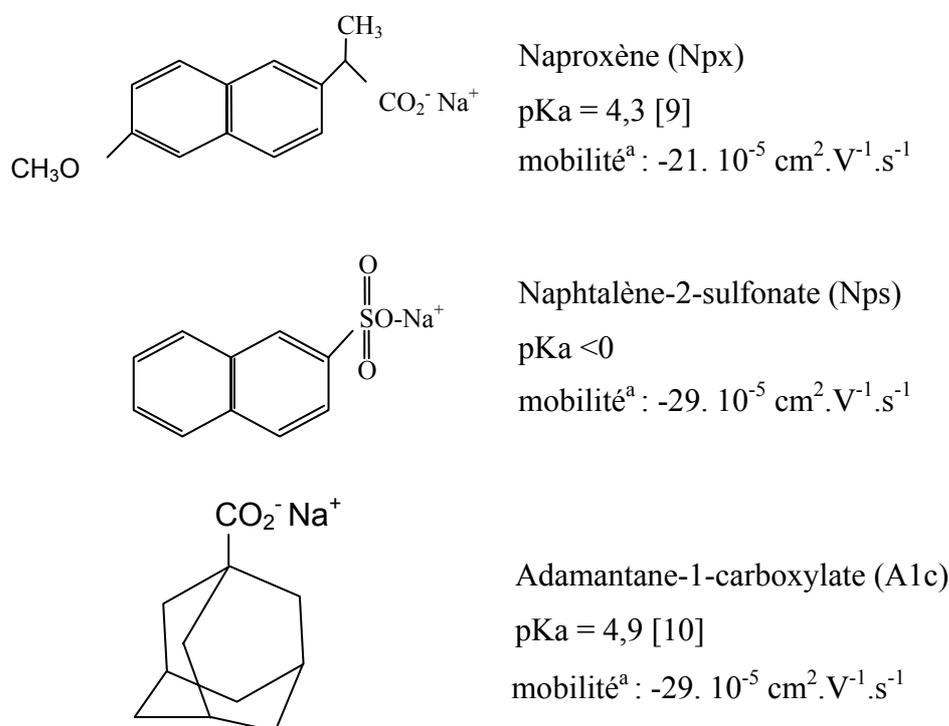


Figure 5 : Structure des molécules étudiées et paramètres physicochimiques

a : valeur de mobilité observée dans un tampon carbonate de sodium de pH 10,1 et de force ionique 50 mM à 25°C (ce travail, voir plus loin). b : valeur de mobilité observée dans un tampon chromate éthanolamine de pH 10,1 et de force ionique 15 mM à 25°C (ce travail, voir plus loin).

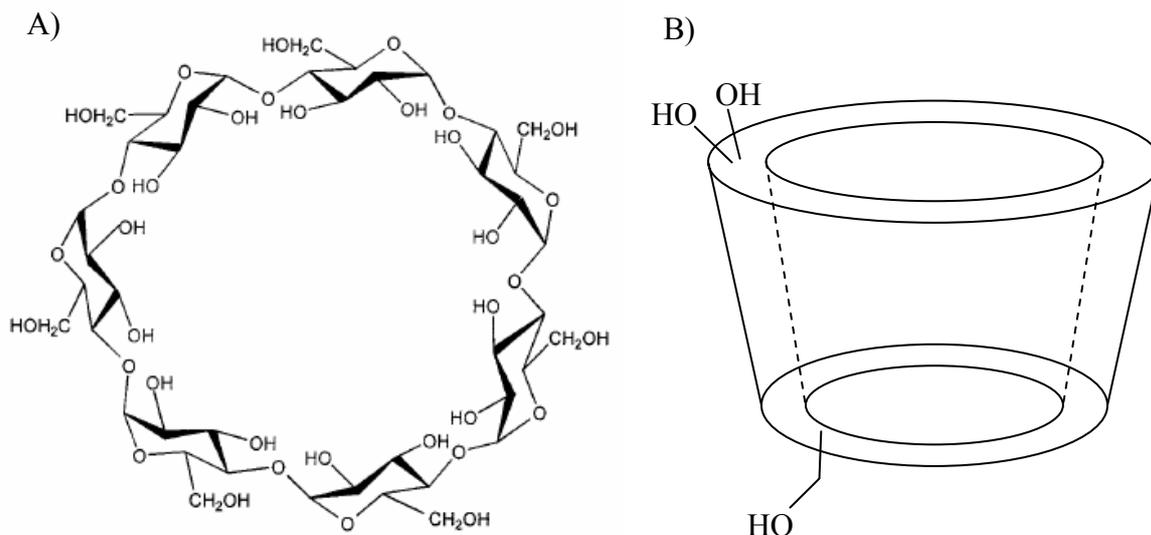


Figure 6 : structure moléculaire (A) et schématique (B) de la β -cyclodextrine.

Ces systèmes-modèle ont été retenus ici pour plusieurs raisons. Tout d'abord ces systèmes ont été caractérisés par de nombreuses méthodes physicochimiques [11]. Ensuite, ils permettent de bien illustrer les contraintes concernant la nature de l'électrolyte de séparation à retenir pour quantifier l'interaction soluté – β -cyclodextrine, le choix devant alors se porter sur un électrolyte très hydrophile. Enfin, la β -cyclodextrine libre, du fait de sa charge nulle, ne subit qu'un transport par électroosmose. En particulier, lorsque la β -cyclodextrine passe de la zone de l'électrolyte support à la zone du substrat et inversement, la β -cyclodextrine ne subit pas de déplacement du fait de la migration des ions constitutifs de l'électrolyte support. Ainsi, la cyclodextrine ne rentre pas dans les équations généralement utilisées pour décrire les migrations électrophorétiques (Loi d'Ohm, fonction de régulation de Kohlrausch, électroneutralité). Enfin, sa présence dans l'électrolyte de séparation n'en modifie pas sa force ionique, ce qui simplifie les corrections à apporter à la mobilité du substrat observé et permet d'utiliser le facteur correctif de la mobilité observée tel que présenté équation 2.

3 Résultats et discussion

3.1 Systèmes β -cyclodextrine-naproxène et β -cyclodextrine-naphtalène-2-sulfonate.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi un pH élevé pour l'électrolyte de séparation afin d'obtenir les solutés sous forme entièrement ionisée. Les constantes d'association calculées de la cyclodextrine avec les anions ne dépendent donc pas du pH dans

cette zone. Ce pH permet de plus d'obtenir un flux électroosmotique stable et élevé conduisant à des séparations rapides (séparation d'anions en mode contre-électroosmotique). Afin que l'électrolyte reste inerte vis à vis des deux partenaires (β -cyclodextrine, naproxène ou naphthalène-2-sulfonate), cet électrolyte doit être hydrophile. Le choix aurait pu se porter sur un tampon borate ou phosphate. Néanmoins, dans le premier cas, on peut envisager une complexation de la cyclodextrine avec les ions borate par les fonctions hydroxyle des monomères de glucose constitutifs de la cyclodextrine. Dans le cas du phosphate, un tampon reposant sur la première protonation ($pK_a = 12,3$) générerait, pour un pouvoir tampon acceptable, des courants élevés du fait de la valence 2 et 3 des ions phosphate du couple mis en jeu. Dans le cas de la seconde protonation, compte tenu des mobilités absolues à dilution infinie [12] des ions phosphate HPO_4^{2-} ($\mu^\circ = 61,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$) et $H_2PO_4^-$ ($\mu^\circ = 34,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$) pour ce couple acido-basique, on peut supposer que la dissymétrie du pic due à l'électromigration, qu'on se propose d'étudier, ne serait pas trop prononcée. Nous avons donc finalement choisi un tampon carbonate de sodium de pH mesuré 10,1 et de force ionique 50 mM ($pK_a = 10,0$ à la force ionique de 50 mM, voir calcul en annexe A1). Cet électrolyte répond aux contraintes imposées par la cyclodextrine (électrolyte support très hydrophile, absence de complexation des partenaires) et permet d'escompter une dispersion par électromigration importante. En effet, pour cet électrolyte, les mobilités absolues μ° des ions HCO_3^- et CO_3^{2-} sont respectivement de 46,1 et 71,8. $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ (soit respectivement 41,2 et 61,3. $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ à la force ionique de 50 mM selon le modèle empirique de Friedl [13]), ce qui permet de prévoir un écart de mobilité important entre le naproxène (mobilité de $-21 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ dans le tampon carbonate de pH 10,1 et de force ionique 50 mM) ou le naphthalène-2-sulphonate (mobilité de $-29 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ dans le tampon carbonate de pH 10,1 et de force ionique 50 mM) et le co-ion carbonate (mobilité effective prévue du co-ion carbonate de $-52,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$ dans le tampon carbonate de sodium de pH 10,1 et de force ionique 50 mM). Enfin, pour mesurer le flux électroosmotique nous avons choisi le formamide comme marqueur neutre car ce composé est très hydrophile, et de ce fait, ne doit pas être inclus dans la cyclodextrine. De plus, ce marqueur a été injecté en amont de la zone échantillon, ce qui évite tout contact entre les solutés anioniques et le marqueur neutre.

3.1.a Etude de la dispersion par électromigration en l'absence de ligand

La figure 7 montre les électrophérogrammes obtenus pour le naproxène (0,15 et 5 mM) et le naphthalène-2-sulphonate (0,15 et 2 mM) dans le tampon carbonate en l'absence de β -cyclodextrine, les concentrations maximales injectées étant à la limite de la solubilité observée pour chacun des deux solutés dans le tampon carbonate.

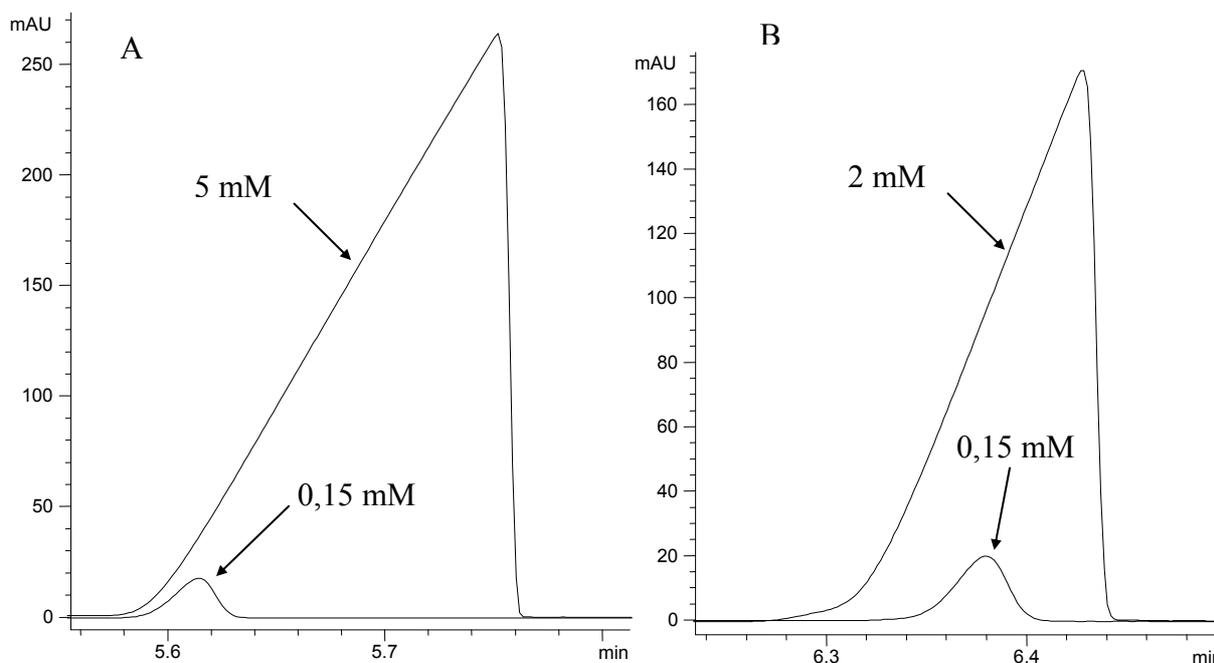
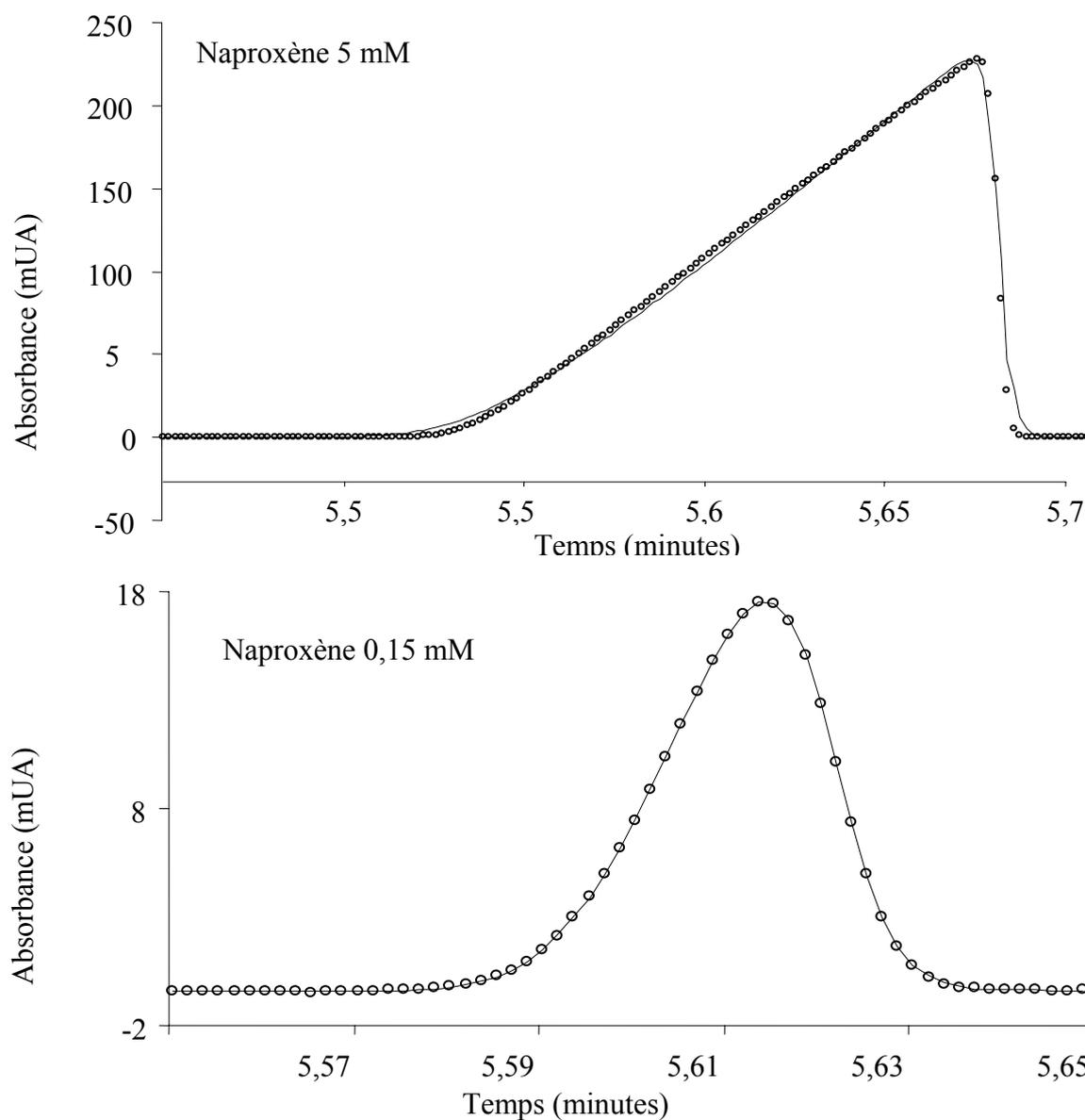


Figure 7 : électrophérogrammes du naproxène (A) et du naphthalène-2-sulfonate (B) à deux concentrations injectées différentes.

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 58,5 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon carbonate de sodium 25,1 mM de pH 10,1 et de force ionique 50 mM. Tension appliquée : 20 kV ($I = 26,4 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Injection hydrodynamique de l'échantillon : 30 mbars, 2s. Détection par absorbance UV à 231 nm (A) et 227 nm (B). Echantillons de naproxène (A) à 0,15 et 5 mM dans l'électrolyte support, et de naphthalène-2-sulfonate (B) à 0,15 et 2 mM dans l'électrolyte support.

Pour chacun des solutés, les électrophérogrammes présentent, comme attendu, un profil de distribution triangulaire, dont la largeur à la base augmente avec la concentration du soluté. Pour la concentration injectée la plus faible de chacun des deux solutés, on constate que le profil est plus symétrique avec toutefois une traînée avant. On constate également comme cela est prévu par la théorie (tableau 1 et relation 23) que le sommet du pic se déplace vers les temps de migrations plus élevés lorsque la concentration injectée augmente. Le décalage en temps entre le sommet du pic et le temps de migration réel du soluté est moins important pour la plus faible concentration de soluté injectée. Par suite l'erreur commise sur le calcul de la mobilité est moindre dans ce cas. La figure 7A montre également dans le cas du naproxène, une bonne coïncidence entre les débuts de pic (noté x_{min} dans le tableau 1) pour les deux

concentrations injectées comme cela est attendu (tableau 1). Dans le cas du naphthalène-2-sulfonate, le début des deux pics correspondant aux deux concentrations injectées coïncident moins bien, mais ceci peut toutefois s'expliquer par une légère variation de l'électroosmose entre les deux injections. La figure 8 montre les ajustements effectués par la fonction de Harhoff – Van der Linde pour chacun des pics électrophorétiques, ce qui permet ensuite de calculer la mobilité électrophorétique du substrat en l'absence de ligand.



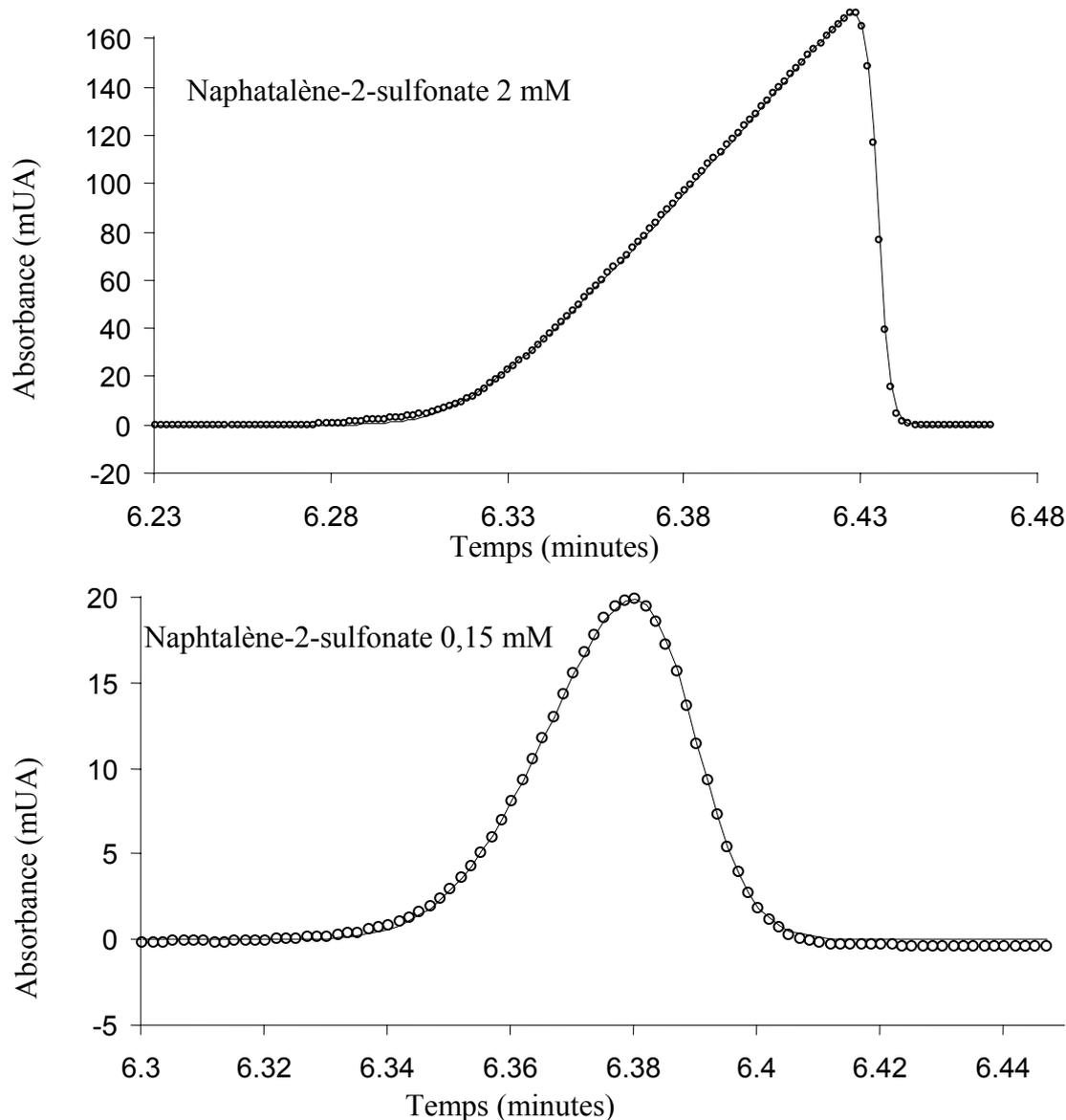


Figure 8 : ajustements par la fonction de Harhoff – Van der Linde des profils électrophorétiques du naproxène et du naphthalène-2-sulfonate à différentes concentrations dans les conditions expérimentales de la figure 7.

o : Données expérimentales ; - : Profil ajusté par HVL

Ces ajustements ont été réalisés au moyen du logiciel Peak Fit v4.11 (version d'évaluation) (SPSS, Chicago, USA) par la méthode de minimisation des résidus (méthode I) du fait qu'un seul composé (le naproxène ou le naphthalène-2-sulfonate) est attendu sous le profil électrophorétique. Les ajustements effectués sur chacun des pics montrent que la fonction de HVL décrit de façon satisfaisante les profils électrophorétiques obtenus. Les paramètres de l'ajustement sont donnés dans le tableau 2. Pour chaque soluté, on remarque que le paramètre de dissymétrie a_3 est négatif et augmente en valeur absolue avec la concentration injectée.

| Soluté | | Paramètres HVL | | | |
|--------|---------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| | | a ₀ (mUA. min) | a ₁ (min) | a ₂ (min) | a ₃ |
| Npx | 0,15 mM | 0,4 | 5,60 | 0,0087 | -0,00004 |
| | 5 mM | 17,4 | 5,54 | 0,0163 | -0,00173 |
| Nps | 0,15 mM | 0,6 | 6,37 | 0,0120 | -0,00006 |
| | 2 mM | 9,5 | 6,30 | 0,0128 | -0,00086 |

Tableau 2 : Paramètres de la fonction HVL pour les ajustements des profils du naproxène (Npx) et du naphthalène-2-sulfonate (Nps) à différentes concentrations dans les conditions expérimentales de la figure 7.

Les paramètres a₁ ajustés pour chaque concentration injectée permettent de calculer la mobilité du naproxène et du naphthalène-2-sulfonate en l'absence de β-cyclodextrine (Tableau 3)

| Soluté | | Mobilité calculée au sommet du pic (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹) | Mobilité calculée à partir du paramètre a ₁ (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹) |
|--------|---------|--|--|
| Npx | 0,15 mM | -21,8 | -21,7 |
| | 5 mM | -22,6 | -21,7 |
| Nps | 0,15 mM | -29,2 | -29,1 |
| | 2 mM | -29,5 | -29,1 |

Tableau 3 : mobilités des pics électrophorétiques calculées à partir du sommet du pic et à partir du paramètre a₁ pour le naproxène et le naphthalène-2-sulfonate injectés à différentes concentrations dans les conditions expérimentales de la figure 7.

Npx : naproxène ; Nps : naphthalène-2-sulfonate

A concentration nulle de β-cyclodextrine, on constate que les mobilités calculées à partir du temps de migration considéré au sommet du pic électrophorétique ou depuis le paramètre a₁ diffèrent peu. On remarque cependant que l'écart de mobilité calculé est très faible pour une concentration injectée de 0,15 mM, en raison de la faible dissymétrie observée. De plus, dans le cas du naproxène, on constate que la correction apportée par la fonction de HVL est plus importante pour le naproxène injecté à 5 mM que pour le naphthalène-2-sulfonate injecté à 2 mM. Ceci peut s'expliquer d'une part par la différence de concentration injectée mais aussi par la différence de mobilité entre le co-ion et l'analyte, plus faible dans le cas du naphthalène-2-sulfonate que dans celui du naproxène.

3.1.b Etude de la dispersion par électromigration en présence de ligand

Afin d'étudier l'influence du profil de pic de soluté sur les paramètres d'interaction déterminés par électrophorèse capillaire d'affinité, les deux solutés ont ensuite été injectés à ces deux concentrations dans le tampon carbonate de sodium contenant la β -cyclodextrine en concentrations croissantes. La figure 9 montre les électrophérogrammes obtenus pour la concentration injectée la plus élevée.

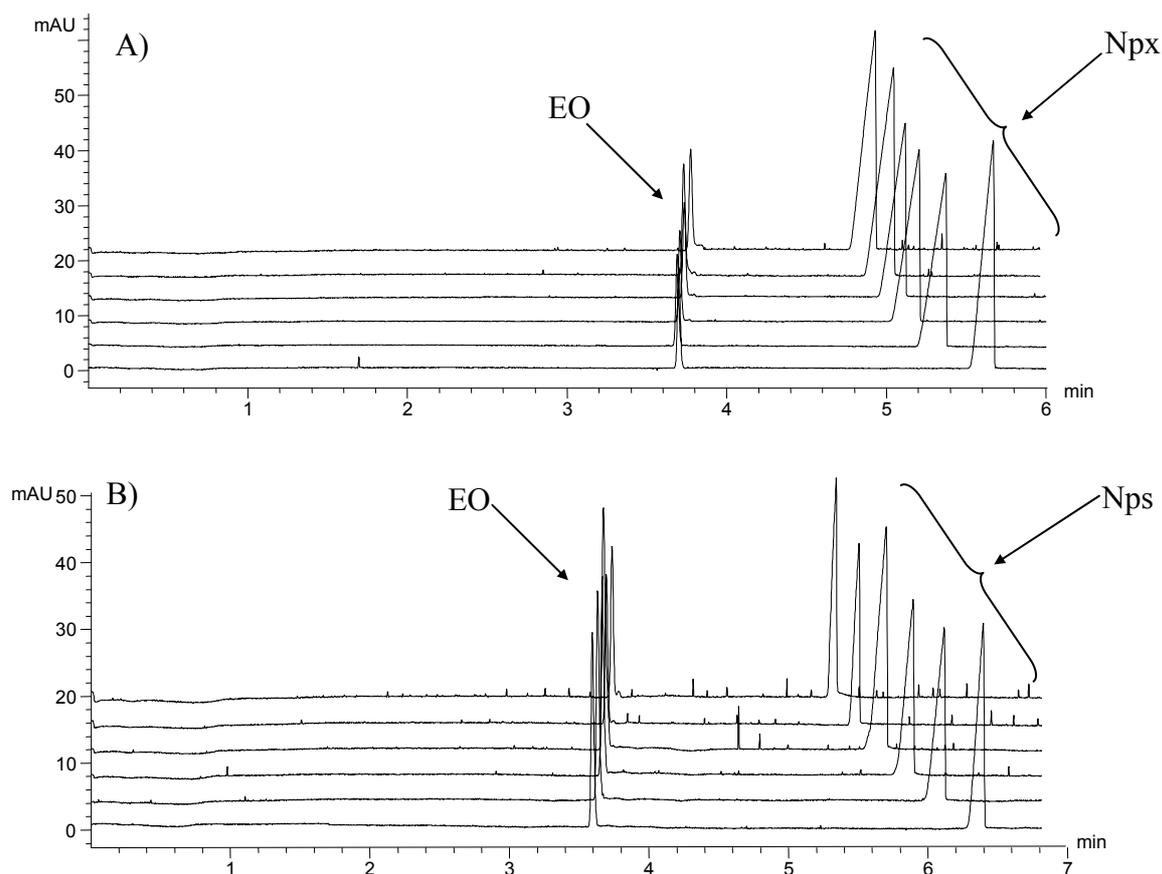


Figure 9 : Electrophérogrammes du naproxène (A) et du naphtalène-2-sulfonate (B) en présence de β -cyclodextrine en concentration variable.

Capillaire en silice vierge 50 μ m d.i. x 58,5 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon carbonate de sodium 25,1 mM de pH 10,1 et de force ionique 50 mM contenant la β -cyclodextrine aux concentrations suivantes (de bas en haut) : 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 mM. Tension appliquée ; 20 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique : du marqueur neutre (30 mbars, 2 s), de l'électrolyte support (30 mbars, 2 s), de l'échantillon (30 mbars, 2 s) et de l'électrolyte support (30 mbars, 2 s). Marqueur neutre : solution de formamide à 0,03% (v/v) dans l'électrolyte support. Echantillon : solution de naproxène à 5 mM dans l'électrolyte support (A) ; solution de naphtalène-2-sulfonate 2 mM dans l'électrolyte support (B).

Les électrophérogrammes présentent tout d'abord le pic de marqueur neutre (formamide) puis le pic de naproxène (A) ou de naphtalène-2-sulfonate (B). A mesure que la

concentration en cyclodextrine augmente dans l'électrolyte de séparation, on constate que le pic de marqueur neutre se déplace lentement vers les temps plus élevés. Cette diminution de l'électroomose est due à l'augmentation de la viscosité de l'électrolyte avec la concentration en β -cyclodextrine. De ce fait, il est nécessaire pour les calculs de constante d'inclusion de corriger la mobilité électrophorétique du soluté de la variation de viscosité liée à la concentration en β -cyclodextrine. La viscosité de l'électrolyte à différentes concentrations en β -cyclodextrine a donc été évaluée au moyen de l'appareil d'électrophorèse. Pour cela, le marqueur neutre a été injecté dans le capillaire préalablement rempli avec l'électrolyte support, puis transporté jusqu'au détecteur par application d'une surpression. La figure 10 présente la variation du temps de détection du marqueur neutre en fonction de la concentration en β -cyclodextrine.

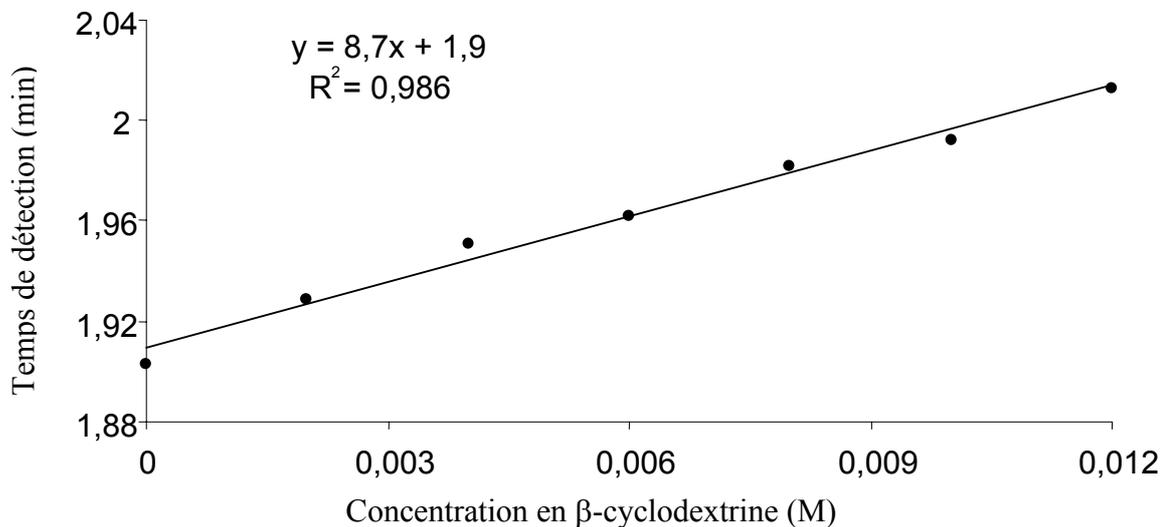


Figure 10 : Variation du temps de détection du marqueur neutre en fonction de la concentration en β -cyclodextrine

Injection du marqueur neutre dans le capillaire par le côté fenêtre de détection puis mobilisation hydrodynamique jusqu'à la fenêtre de détection par application d'une pression constante (50 mbars).

Le temps de détection du formamide, et par suite la viscosité, (cette dernière étant directement proportionnelle à ce temps selon la loi de Poiseuille) peut être approchée par une fonction linéaire de la concentration de la cyclodextrine, telle que :

$$t_i = 8,7 [\beta\text{-CD}]_i + 1,9 \quad (24)$$

avec t_i : temps de détection du formamide (min) ; $[\beta\text{-CD}]_i$: concentration de la β -cyclodextrine (M).

La relation mathématique établie permet de calculer le facteur correctif v_i comme le rapport du temps estimé par la relation 24 à une concentration en cyclodextrine donnée à celui en l'absence de cyclodextrine. Ainsi le facteur de correction v_i sur la viscosité intervenant dans les calculs de la constante (relation 2) a été calculé comme :

$$v_i = \frac{t_i}{t_0} = \frac{8,7[\beta-CD] + 1,9}{1,9} \quad (25)$$

A mesure que la concentration en β -cyclodextrine augmente, on constate sur la figure 9 que la mobilité des solutés anioniques diminue. Ceci est lié à la formation progressive des complexes d'inclusion quand la concentration en β -cyclodextrine augmente. En effet par rapport au soluté libre, l'inclusion de ce soluté dans la cyclodextrine résulte en un complexe dont la taille augmente alors que la charge du complexe, uniquement apportée par le soluté chargé, reste constante. Ainsi $|\mu_{epS,0}| > |\mu_{epSL}|$. La figure 11 illustre schématiquement la migration observée dans le cas du naproxène.

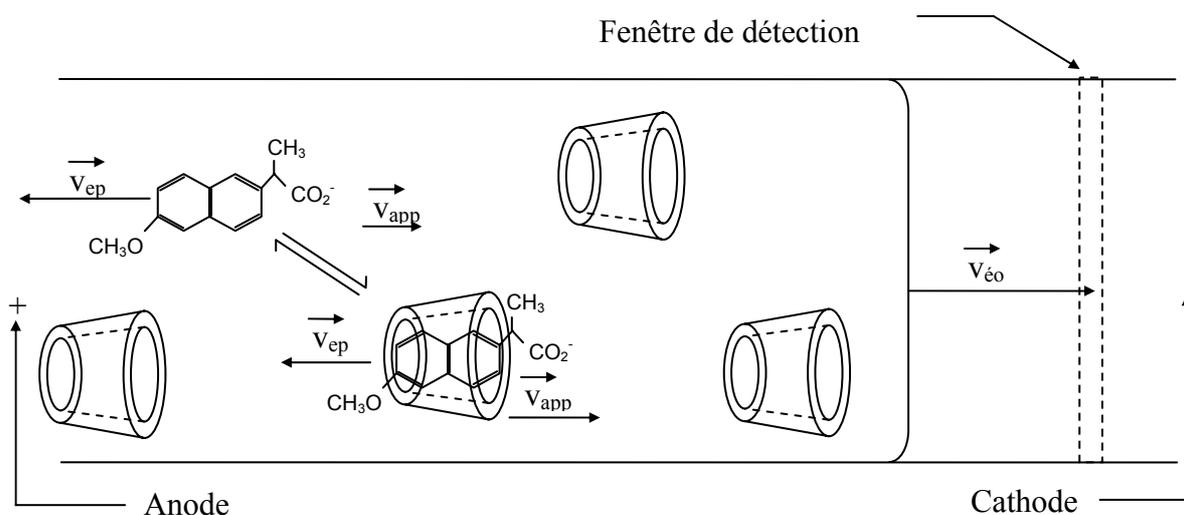


Figure 11 : représentation schématique de la migration du naproxène en présence de β -cyclodextrine.

La variation de la mobilité électrophorétique des deux solutés-modèle, chacun aux deux niveaux de concentration, a ensuite été corrélée avec la concentration de la cyclodextrine par ajustement non-linéaire de la relation 1, en assimilant la concentration en β -cyclodextrine libre à sa concentration totale introduite dans l'électrolyte support. Les variations de la mobilité effective du naproxène et du naphthalène-1-sulfonate en fonction de la concentration de la β -cyclodextrine, équivalentes aux isothermes de distribution de la β -CD entre sa forme libre et sa forme complexée sont représentées sur les figures 12 et 13 en tenant compte ou non

de la correction apportée au temps de migration observé du substrat. Sur ces isothermes, chaque point correspond à la moyenne des deux répétitions successives effectuées pour chaque niveau de concentration en β -cyclodextrine et pour chaque concentration de soluté injecté.

Concernant l'allure des isothermes, dans le cas où le soluté est injecté à la plus faible concentration (0,15 mM), on constate que l'ajustement des profils électrophorétiques par la fonction de Harhoff-Van der Linde n'apporte pas de correction significative à l'isotherme d'association de la β -cyclodextrine. Ceci s'explique par la faible largeur du pic observé, même dans le cas le plus défavorable où le soluté a la mobilité effective la plus faible (c'est-à-dire aux concentrations les plus élevées en β -cyclodextrine) par rapport à la mobilité du co-ion carbonate (ce qui en théorie engendre les profils les plus dissymétriques).

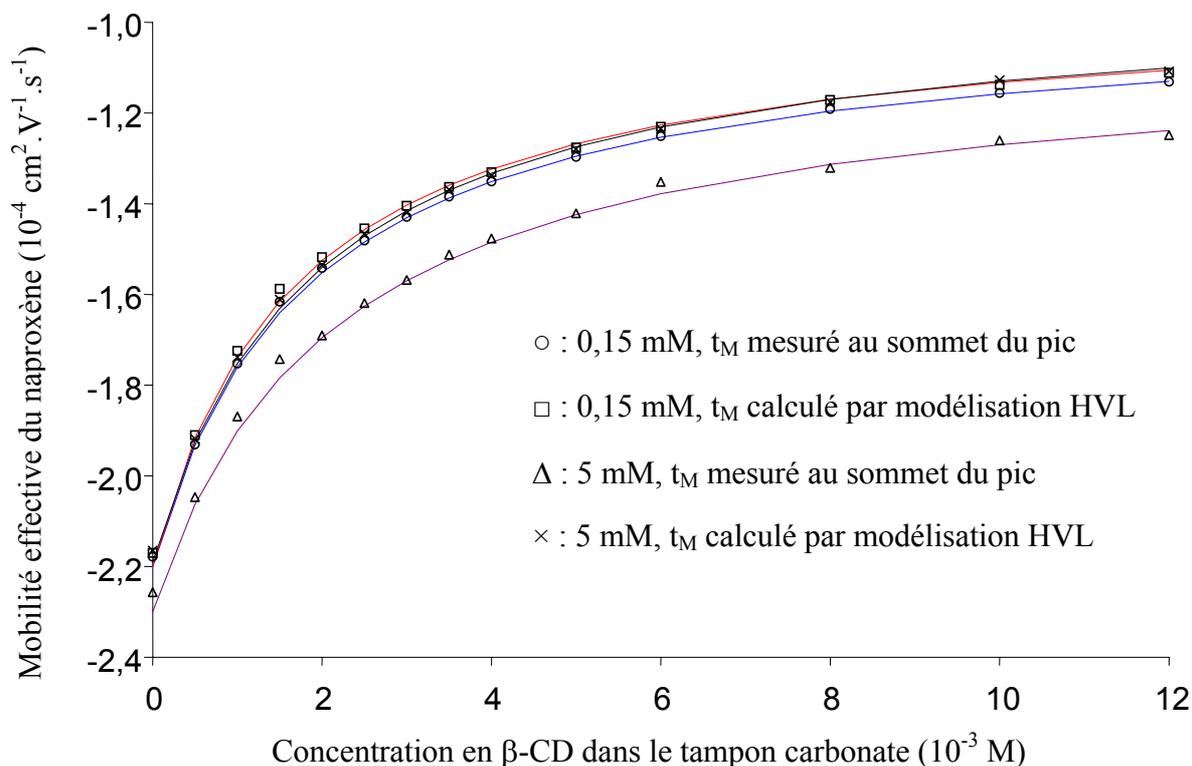


Figure 12 : Isothermes d'association de la β -cyclodextrine avec le naproxène pour deux concentrations injectées de naproxène (0,15 mM (○ et □) et 5 mM (Δ et ×)) et en fonction de la méthode de détermination du temps de migration du naproxène.

Nota : Les valeurs de mobilités effectives données en ordonnée sont corrigées des variations de viscosité, dues à la concentration de la β -cyclodextrine (équation 25)

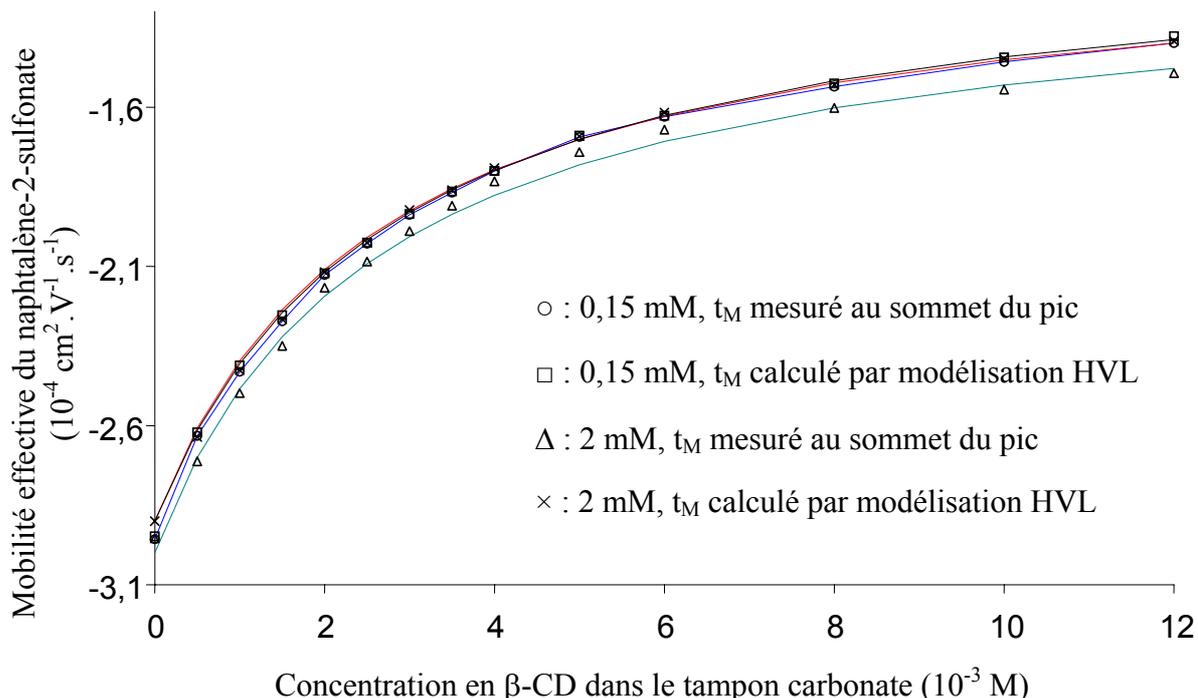


Figure 13 : Isothermes d'association de la β -cyclodextrine avec le naphthalène-2-sulfonate pour deux niveaux de concentrations de naphthalène-2-sulfonate (0,15 mM (○ et □) et 2 mM (△ et ×)) et en fonction de la méthode de détermination du temps de migration du naphthalène-2-sulfonate.

Nota : Les valeurs de mobilités effectives données en ordonnée sont corrigées des variations de viscosité, dues à la concentration de la β -cyclodextrine (équation 25)

En revanche, dans le cas où le soluté est injecté à la plus forte concentration (5 ou 2 mM), on constate que l'isotherme établie à partir des mobilités calculées directement à partir du sommet du pic diffère notablement de celle établie à partir des mobilités calculées en modélisant les profils par la fonction de HVL. De plus, l'isotherme établie pour les concentrations élevées de substrat diffère d'autant plus de l'isotherme obtenue pour la concentration de substrat la plus faible que la concentration en β -cyclodextrine augmente. Cette tendance est liée à la différence de mobilité effective du substrat et du co-ion carbonate, qui s'accroît à mesure que fraction molaire du complexe soluté- β -cyclodextrine augmente.

L'ajustement non-linéaire de chaque isotherme d'association permet également d'accéder aux paramètres de l'interaction correspondants (tableau 4). On constate que l'ajustement de l'isotherme établie à partir des mobilités calculées en modélisant les pics par la fonction de HVL permet de retrouver des valeurs de paramètre d'interaction (constante d'association K et mobilité électrophorétique de la forme complexe μ_{SL}) cohérentes entre le niveau bas et le niveau haut de substrat injecté. La correction de mobilité par HVL permet pour la plus grande concentration injectée de calculer une mobilité du complexe identique à celle obtenue à la

concentration injectée la plus faible. Concernant la constante d'interaction calculée pour le naproxène, la correction de mobilité permet de ramener la valeur calculée pour une concentration de 5 mM vers les valeurs obtenues à 0,15 mM. Néanmoins, on note que la constante calculée pour le naphthalène-2-sulfonate à partir des mobilités corrigées pour la concentration de 2 mM est légèrement plus éloignée des trois autres.

| Soluté | Naproxène | | | | naphthalène-2-sulfonate | | | |
|---|-----------|-----|------|-----|-------------------------|-----|------|-----|
| | 0,15 mM | | 5 mM | | 0,15 mM | | 2 mM | |
| Mesure du temps de migration | S | HVL | S | HVL | S | HVL | S | HVL |
| K (M ⁻¹) | 556 | 587 | 468 | 531 | 388 | 379 | 386 | 363 |
| μ _{SL} (10 ⁻⁵ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹) | -10 | -10 | -11 | -10 | -11 | -11 | -12 | -11 |

Tableau 4 : Paramètres d'association déterminés par ajustement non-linéaire de l'isotherme (relation 1) pour le naproxène et le naphthalène-2-sulfonate en fonction de la concentration injectée des analytes.

S : temps de migration mesuré au sommet du pic ; HVL : temps de migration mesuré par le paramètre a₁ obtenu par la modélisation du pic par la fonction de HVL

Pour les concentrations de substrat les plus élevées, les isothermes, établies à partir des mobilités du substrat calculées en ajustant les profils électrophorétiques par la fonction de HVL, recouvrent de façon quasi-parfaite celles établies pour la concentration injectée la plus faible. Ainsi, il apparaît que le niveau de concentration de naproxène ou de naphthalène-2-sulfonate injecté n'a que peu d'influence sur la forme de l'isotherme. Ceci revient à considérer que la concentration en β-cyclodextrine libre reste constante, y compris lorsque celle-ci est du même ordre de grandeur, voire inférieure, à la concentration du substrat injecté. Ce dernier résultat contredit les recommandations de certains auteurs, à propos des corrections à apporter à la concentration du ligand introduite dans l'électrolyte, en fonction de la concentration de substrat injectée.

3.1.c Estimation de la concentration en ligand libre dans la zone de substrat

Dans le mode de l'électrophorèse capillaire d'affinité, la concentration libre du ligand dans la zone de substrat est généralement assimilée à celle introduite dans l'électrolyte support. Cependant, quelques auteurs ont émis comme restriction sur la précédente hypothèse de n'être valide que si la concentration en substrat introduite est faible en regard de la concentration en

ligand ou de la constante d'interaction. Aussi, différentes recommandations ont été proposées pour estimer la concentration en ligand libre.

Selon la démarche proposée par Rundlett et coll. [14] puis reprise par Guillaume et coll. [15], la concentration en ligand libre peut être calculée comme la différence entre la concentration totale du ligand introduite dans l'électrolyte support et la concentration du complexe, soit pour une interaction monomoléculaire :

$$[L] = [L]_t - [SL] \quad (26)$$

La concentration en complexe est calculée à partir d'un réarrangement de la relation 1 :

$$v_i \cdot \mu_{epS,i} = \frac{[S]}{[S]_t} \mu_{epS,0} + \frac{[SL]}{[S]_t} \mu_{epSL} \quad (27)$$

où $[S]$ représente la concentration en substrat libre et $[S]_t$ la concentration totale en substrat injectée. De cette expression, on en déduit :

$$[SL] = [S]_t \frac{v_i \cdot \mu_{epS,i} - \mu_{epS,0}}{\mu_{epSL} - \mu_{epS,0}}, \quad (28)$$

la mobilité du complexe pouvant être approchée par ajustement non-linéaire de l'isotherme.

Lorsque cette dernière équation est appliquée à notre étude, le calcul des concentrations en ligand libre dans la zone de substrat dans le cas du naproxène à 5 mM et le naphatalène-2-sulfonate à 2 mM, conduit à des valeurs négatives. Ceci montre que cette démarche, qui ne tient pas compte du caractère dynamique de la migration électrophorétique (et donc du caractère ouvert du système assimilé ici au capillaire) n'est pas valide.

Prenons maintenant l'équation de la frontière mobile pour le ligand dans une zone de substrat telle qu'écrite par Busch (figure 14) [14] :

$$[L]_t (\mu_L - v_i \mu_{S,i}) = [L] (\mu_L - v_i \mu_{S,i}) + [SL] (\mu_{SL} - v_i \mu_{S,i}) \quad (29)$$

En remplaçant l'expression de $[SL]$ (28) dans l'expression 29, on aboutit à l'expression de $[L]$ dans la zone du soluté :

$$[L] = [L]_t - [S]_t \frac{v_i \mu_{S,i} - \mu_S}{\mu_{SL} - \mu_S} \times \frac{\mu_{SL} - v_i \mu_{S,i}}{\mu_L - v_i \mu_{S,i}} \quad (30)$$

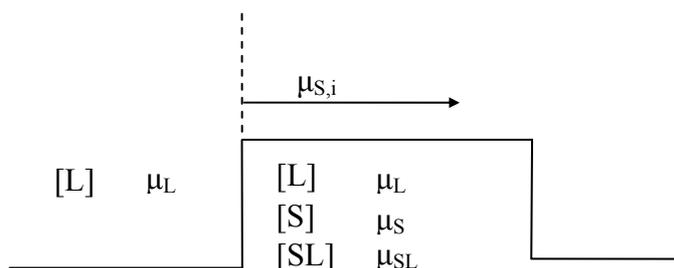


Figure 14 : Illustration de la frontière mobile pour le ligand dans une zone de substrat [16].

Bien que plus satisfaisant que le modèle simple précédent proposé par Guillaume et coll., le calcul aboutit à nouveau pour la concentration la plus faible en cyclodextrine et la plus élevée en substrat à une valeur négative de la concentration en β -cyclodextrine libre dans la zone de substrat.

Parmi les raisons qui pourraient expliquer ce résultat, mentionnons que certaines hypothèses admises pour établir la relation 30 ne sont pas obligatoirement vérifiées :

- le champ électrique est supposé constant dans les deux zones
- le pH est supposé constant dans les deux zones
- les flux de matières entrant et sortant sont égaux.

Compte tenu de la dissymétrie des pics observés, la première hypothèse n'est sûrement pas vérifiée. En outre, le système se comporte comme un système d'accumulation du ligand dans la zone de substrat, c'est-à-dire que les flux de matière entrant et sortant ne sont pas égaux. Ce dernier point peut être établi d'après la relation 1 en assimilant la zone de substrat à un créneau. En effet, si la mobilité effective du substrat observée est constante pour les deux niveaux de substrat injecté, alors la concentration C_L^S de ligand libre dans la zone de substrat est constante. La relation 26 impose également que les proportions de substrat libre et lié soient constantes. Ainsi, quand la concentration totale en substrat augmente, la concentration en substrat complexé $[C_{SL}^S]$ augmente également. L'écriture du bilan-matière pour le ligand dans la zone de substrat s'écrit :

$$[C_L^S]_t = [C_L^S] + [C_{SL}^S] \quad (31)$$

Ainsi quand la concentration en substrat injecté augmente, la concentration totale de ligand dans la zone de substrat augmente. C'est ce dernier point que nous avons voulu vérifier expérimentalement.

Pour cela nous avons inversé les rôles de substrat et de ligand joués par le naproxène ou le naphthalène-2-sulfonate et la β -cyclodextrine dans les expériences précédentes. L'électrolyte est cette fois constitué du tampon carbonate contenant le naphthalène-2-sulphonate ou le naproxène et la β -cyclodextrine est injectée (figure 15). On note que ce protocole est identique à celui décrit pour la méthode de Hümmel et Dreyer. Dans cette configuration, l'obtention d'un pic de vacance est attendue à la mobilité du ligand libre, c'est-à-dire ici le naproxène ou le naphthalène-2-sulfonate, et dont l'aire est proportionnelle à la quantité de ligand consommé par la β -cyclodextrine [14].

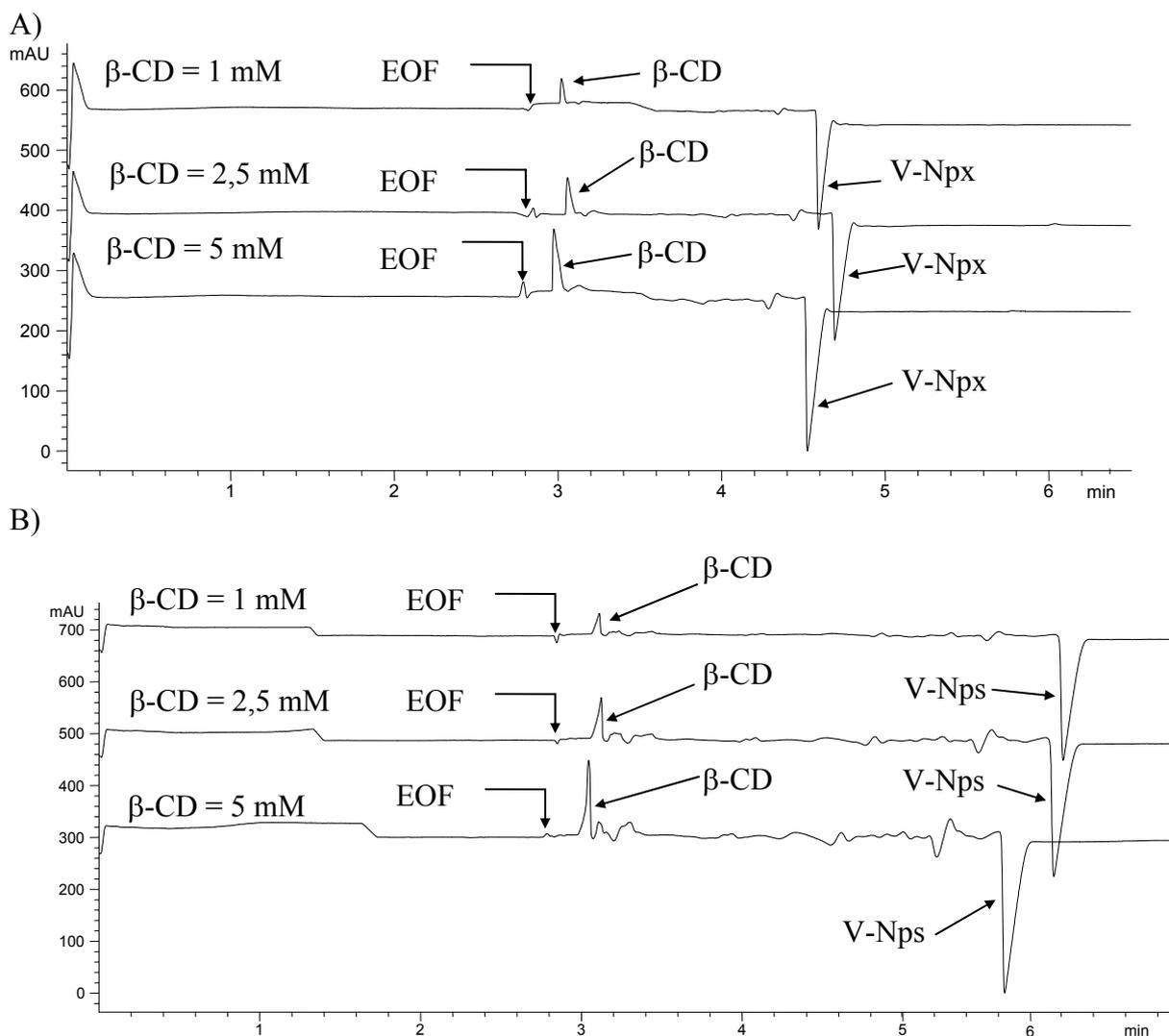


Figure 15 : Electrophérogrammes de la β -CD obtenus avec des électrolytes contenant du naproxène (A) ou du naphthalène-2-sulfonate (B).

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon carbonate de sodium 25,1 mM de pH 10,1 et de contenant 1 mM de naproxène (A) ou de naphthalène-2-sulfonate (B). Tension appliquée : 10 kV ($I = 40 \mu\text{A}$ (A) ; $I = 44 \mu\text{A}$ (B)). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 231 nm (A) ou 227 nm (B). Injection hydrodynamique : de l'échantillon (30 mbars, 2 s), puis de l'électrolyte support (30 mbars, 2 s). Echantillon : Solution de β -CD dans le tampon carbonate de sodium de pH 10,1 à la concentration indiquée sur la figure. Identification : EOF : perturbation du signal à l'électroosmose ; V-Npx : pic de vacance du naproxène ; V-Nps : pic de vacance du naphthalène-2-sulfonate.

Les électrophérogrammes présentent tout d'abord une perturbation à l'électroosmose, puis le pic de la β -cyclodextrine complexée (repérée ici que par sa complexation avec le ligand), puis le pic de vacance du ligand (c'est-à-dire ici le naproxène ou le naphthalène-2-sulfonate). La mobilité du pic de β -cyclodextrine a été évaluée à partir du paramètre a_1 du pic électrophorétique correspondant. Le calcul conduit à une valeur de mobilité pour le pic de β -cyclodextrine non significativement différente dans l'électrolyte contenant le naproxène ($4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, CV = 1% pour les trois essais de la figure 15) ou le naphthalène-2-sulfonate ($4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, CV = 4% pour les trois essais de la figure 15) pour chaque concentration de substrat injecté. Ainsi, d'après la relation 1, la concentration en ligand libre est constante. Or, on constate que l'aire du pic de vacance augmente avec la concentration de la β -cyclodextrine injectée, c'est-à-dire que le ligand est consommé en plus grande quantité, ce qui correspond à une augmentation de la concentration en complexe (traduite également par l'augmentation simultanée du pic de β -cyclodextrine observé). Ainsi, dans la zone de substrat on observe une accumulation de ligand.

Une des raisons qui pourrait expliquer cette accumulation de ligand (le naproxène ou le naphthalène-2-sulfonate) dans la zone du substrat (la β -cyclodextrine) est que le champ électrique est plus fort dans la zone de substrat que dans l'électrolyte support, comme cela est attendu par la relation 13. Ainsi, dans la zone de substrat, le ligand et le complexe ont une mobilité apparente plus grande que dans la zone de l'électrolyte support. Dans la zone de substrat, lorsque le ligand et le complexe rencontrent à nouveau la zone de l'électrolyte support, cette différence de mobilité permet aux espèces ioniques de s'accumuler dans la zone de substrat à l'interface des deux zones (stacking). Cette accumulation provoque une surconcentration locale des partenaires à l'interface, favorisant ainsi la stabilité du complexe formé, ce qui compense au moins partiellement la consommation de ligand par le substrat. La figure 16 illustre cette hypothèse en assimilant la zone du substrat à un créneau.

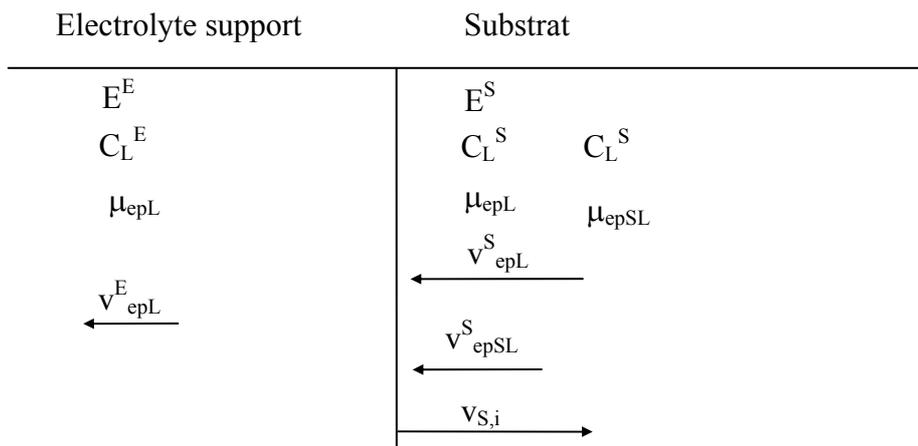


Figure T6 : Représentation schématique de l'interface entre la zone de substrat et la zone d'électrolyte support.

C_L^S : concentration de ligand dans la zone de substrat ; C_L^E : concentration de ligand dans la zone de l'électrolyte support ; E^S : champ électrique dans la zone du substrat ; E^E : champ électrique dans la zone de l'électrolyte support ; μ_{epL} : mobilité électrophorétique du ligand ; v_{epL}^S : vitesse du ligand dans la zone de substrat ; v_{epL}^E : vitesse du ligand dans la zone de l'électrolyte support ; $v_{S,i}$: vitesse de l'interface entre la zone de substrat et de l'électrolyte support.

En première conclusion, il semble que le calcul des mobilités du substrat à partir des profils électrophorétiques ajustés par la fonctions de HVL permette de s'affranchir dans les cas étudiés du biais observé lorsque les concentrations de substrat injectées sont importantes par rapport à la concentration du ligand dans l'électrolyte support. Cette dernière remarque semble ainsi confirmer l'approche de l'électrophorèse capillaire d'affinité formulée par Galbusera et coll [17]. Dans cette approche, la concentration en ligand libre dans la zone de substrat est considérée comme égale à celle introduite dans l'électrolyte support et l'écart de mobilité observé entre deux niveaux de concentrations de substrat injectés (pour une même concentration en ligand) résulte de la différence de temps requis pour que le complexe soit formé à sa concentration d'équilibre. Nous avons alors cherché dans ce qui suit à évaluer l'importance de cette correction dans le cas d'une constante d'association plus élevée et quand la concentration de substrat injectée devient largement supérieure à la concentration du ligand dans l'électrolyte support.

3.2 Système β -cyclodextrine-adamantane-1-carboxylate

Parmi les solutés s'incluant dans la β -cyclodextrine, l'adamantane-1-carboxylate apparaît très intéressant pour évaluer l'importance de la correction apportée par la modélisation des profils électrophorétiques par la fonction de HVL. Ce système a déjà étudié par Kwak et coll [18]. en électrophorèse capillaire dans un électrolyte de pH 11,3 composé de chromate de sodium 5

mM, de bromure d'hexadécyltriméthylammonium 0,2 mM et de concentrations variables de β -cyclodextrine. Dans cet électrolyte, l'adamantane-1-carboxylate a été détecté par absorbance UV indirecte, l'anion chromate jouant le rôle de chromophore. Dans ces conditions, la constante d'inclusion a alors été déterminée égale à $10^{4,4} \text{ M}^{-1}$ à partir de la variation de mobilité de l'adamantane-1-carboxylate observée sous l'effet de la concentration en β -cyclodextrine dans l'électrolyte support. En raison de sa forte affinité pour la β -cyclodextrine, l'adamantane-1-carboxylate a été retenu comme composé-modèle pour cette nouvelle étude.

Comme précédemment, les composants de l'électrolyte support ne doivent pas entrer en compétition avec le substrat pour l'inclusion dans la cyclodextrine. Ainsi, si le choix du chromate (ion inorganique) comme chromophore a été conservé, nous avons également choisi de modifier légèrement les autres conditions de l'électrolyte support proposé par Kwak et coll. [16]. Tout d'abord, nous avons utilisé un électrolyte dépourvu d'hexadécyltriméthylammonium. En effet, bien que Kwak et coll mentionnent que l'ammonium quaternaire n'entre pas en compétition avec l'adamantane-1-carboxylate pour la β -cyclodextrine, la présence de ce composé cationique est toutefois susceptible de perturber l'équilibre du système, l'hexadécyltriméthylammonium pouvant s'insérer dans la β -cyclodextrine et interagir avec l'adamantane-1-carboxylate par sa chaîne hydrocarbonée. De plus, il semble indispensable de tamponner convenablement l'électrolyte. Pour cela nous avons ajouté à l'électrolyte support l'éthanolamine ($\text{pK}_a = 9,5$ à 25°C dans l'eau). Très polaire, cette dernière ne risque pas de s'inclure dans la cyclodextrine, et permet d'assurer un véritable pouvoir tampon à électrolyte support pour un pH de 10.

3.2.a Etude de la dispersion par électromigration en l'absence de ligand

Comme dans le cas précédent nous avons modélisé les pics électrophorétiques obtenus par la fonction de Harhoff – Van der Linde. Les ajustements de profils de l'adamantane-1-carboxylate à 0,2 et 2 mM obtenus en l'absence de β -CD sont montrés figure 17. Les paramètres de l'ajustement sont donnés tableau 5.

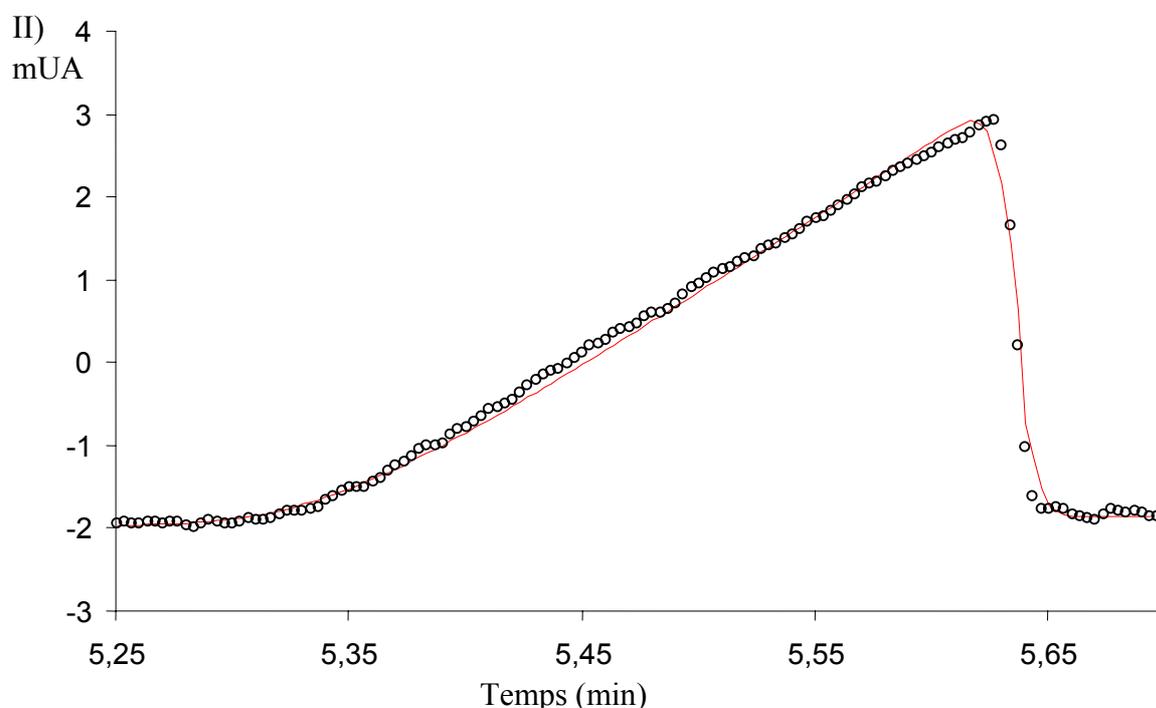
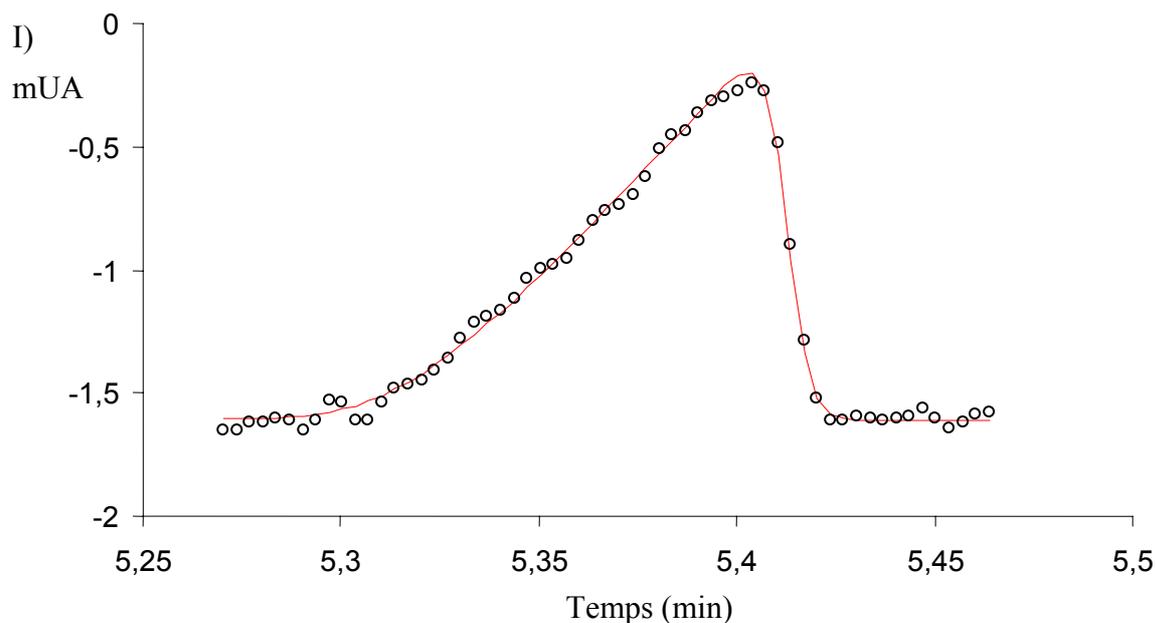


Figure 17 : ajustement par la fonction de HVL des pics électrophorétiques de l'adamantane-1-carboxylate injecté à 0,2 mM (I) et 2 mM (II).

O : points expérimentaux ; - : profil ajusté par la fonction de HVL

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 58,5 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon chromate de sodium 5 mM et éthanolamine 20,8 mM de pH 10 et de force ionique 15 mM Tension appliquée : 20 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 272 nm. Injection hydrodynamique : marqueur neutre (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 6 s) et électrolyte support (30 mbars, 2 s). Marqueur neutre : solution de formamide à 0,03% (v/v) dans l'électrolyte support. Echantillon : solution d'adamantane-1-carboxylate de sodium à $2 \cdot 10^{-4}$ M (I) et à $2 \cdot 10^{-3}$ M (II) dans l'eau.

| Soluté | | Paramètres HVL | | | |
|--------|--------|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| | | a ₀ (mUA. min) | a ₁ (min) | a ₂ (min) | a ₃ |
| A1c | 0,2 mM | 0,08 | 5,32 | 0,0161 | -0,00089 |
| | 2 mM | 0,80 | 5,35 | 0,03573 | -0,00829 |

Tableau 5 : Paramètres de la fonction HVL pour les ajustements des profils de l'adamantane-1-carboxylate (A1c) à deux niveaux de concentrations dans les conditions expérimentales de la figure 17.

On constate que la fonction de HVL décrit de façon satisfaisante les pics électrophorétiques obtenus. On note toutefois que l'ajustement est un peu moins bon que pour le naproxène et le naphtalène-2-sulfonate en raison d'un rapport signal-bruit plus faible ici.

3.2.b Etude de la dispersion par électromigration en présence du ligand

Comme dans la partie précédente, nous avons injecté le substrat (ici l'adamantane-1-carboxylate) à deux niveaux de concentration (0,2 et 2 mM). La figure 18 présente les électrophérogrammes obtenus pour l'injection de la concentration la plus faible dans l'électrolyte contenant la β -cyclodextrine en concentrations variables. Compte tenu de la faible sensibilité de la détection indirecte, nous avons dû injecter un volume plus important d'adamantane-1-carboxylate (5 nL, soit environ 0,3 cm). Afin de minimiser la contribution de la largeur du créneau injecté, la solution d'adamantane-1-carboxylate a été préparée dans l'eau, ce qui permet de préconcentrer l'adamantane-1-carboxylate avant sa migration dans l'électrolyte support. Néanmoins, cette méthode conduit à détecter un pic d'injection. Pour repérer l'électroosmose, nous avons injecté une courte zone de formamide en amont de la zone de substrat.

Les électrophérogrammes enregistrés à 272 nm présentent tout d'abord une perturbation du signal à l'électroosmose (EO) (confirmée à 200 nm), liée à l'injection de formamide. On détecte ensuite un pic système (Pic Inj.) dû à l'injection de l'échantillon dont la matrice (eau) diffère de l'électrolyte support, puis l'adamantane-1-carboxylate (A1c). A mesure que la concentration en β -cyclodextrine croît, le pic de l'adamantane-1-carboxylate se déplace vers les mobilités électrophorétiques faibles, du fait de la formation progressive du complexe β -cyclodextrine-adamantane-1-carboxylate. Les isothermes déterminées à partir de la variation de mobilité de l'adamantane-1-carboxylate injecté à 0,2 et 2 mM sont représentées figure 19, en considérant ici que la viscosité de l'électrolyte est constante compte tenu des faibles

concentrations de β -cyclodextrine introduites (10^{-5} à 2.10^{-4} M). Les paramètres de l'interaction obtenus par ajustement non-linéaire de ces isothermes sont donnés tableau 3.

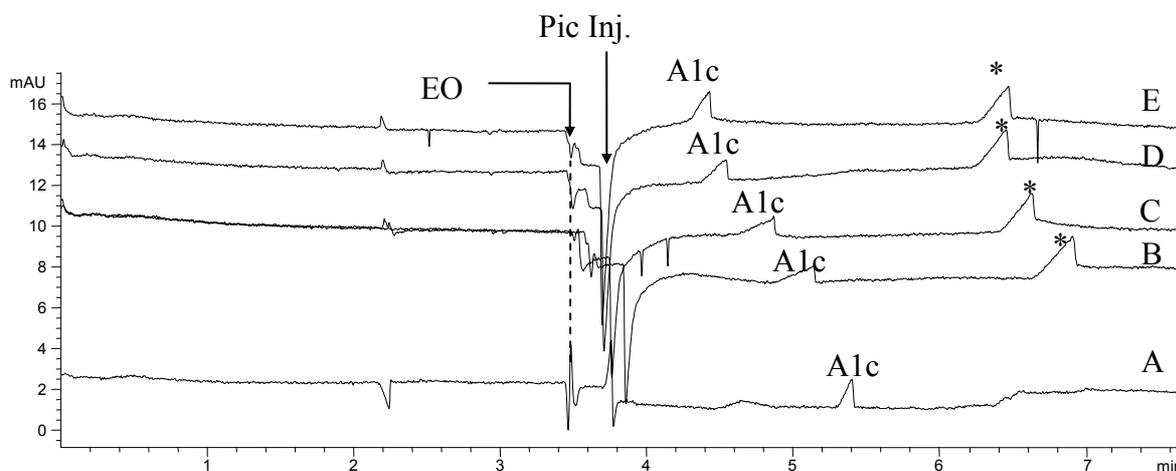


Figure 18 : Electrophérogrammes de l'adamantane-1-carboxylate obtenus avec des électrolytes contenant des concentrations variables de β -cyclodextrine.

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 58,5 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon chromate de sodium 5 mM et éthanolamine 20,8 mM de pH 10,0 et de force ionique 15 mM contenant la β -cyclodextrine au concentration suivantes (de bas en haut) : 0 M (A) ; 3.10^{-5} M (B) ; 4.10^{-5} M (C) ; $7,5.10^{-5}$ M (D) ; $1,05.10^{-4}$ M (E). Tension appliquée : 20 kV. Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 272 nm. Injection hydrodynamique : marqueur neutre (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 6 s) et électrolyte support (30 mbars, 2 s). Marqueur neutre : solution de formamide à 0,03% (v/v) dans l'électrolyte support. Echantillon : solution d'adamantane-1-carboxylate de sodium à 2.10^{-4} M dans l'eau. Identification : EO : électroosmose ; A1c : Adamantane-1-carboxylate ; * : pic non identifié (identique à [16]).

Dans le cas de l'isotherme obtenue pour la plus faible concentration en substrat (0,2 mM) et avec ajustement du profil électrophorétique par la fonction de HVL, on retrouve une valeur de la constante d'inclusion (tableau 6) en excellent accord avec les données de la littérature ($K = 2 - 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ [10-19]). Cependant, malgré la correction sur le temps de migration apportée par l'ajustement du profil par la fonction de HVL, on constate que les isothermes établies à partir des deux concentrations injectées d'adamantane-1-carboxylate ne se recouvrent pas. Ainsi, les valeurs trouvées pour les paramètres de l'interaction diffèrent notablement entre les concentrations de substrat injecté. Toutefois cette correction tend à rapprocher, pour la concentration la plus élevée de substrat injecté, la valeur de la constante d'interaction de celle obtenue à la plus faible concentration (tableau 6). On note également que la différence de mobilité calculée aux deux niveaux de concentration se réduit à mesure que la concentration en β -cyclodextrine augmente. Ainsi, les points obtenus aux concentrations de $10,5$ et $17,5 \cdot 10^{-5}$ M en β -cyclodextrine sont pratiquement confondus pour les deux concentrations

d'adamantane-1-carboxylate injectées lorsque le temps de migration du substrat est évalué par le paramètre a_1 de la fonction de Haarhoff – Van der Linde.

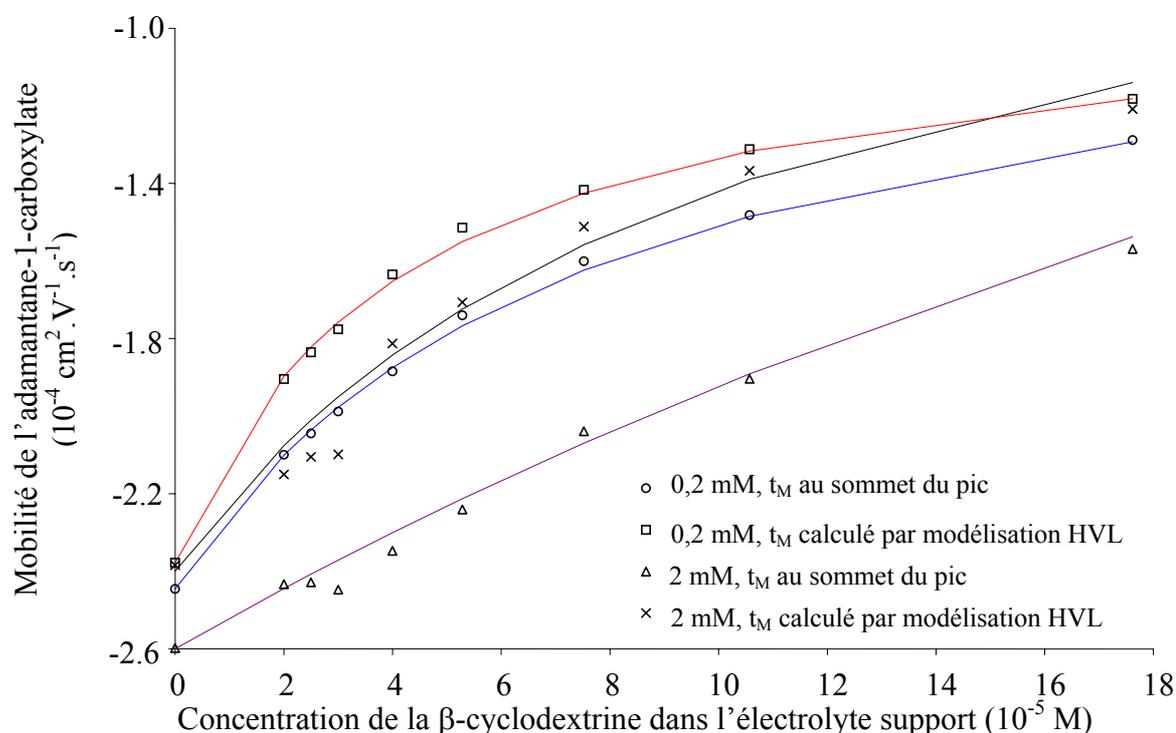


Figure 19 : Isothermes d'association de la β -cyclodextrine avec l'adamantane-1-carboxylate pour deux niveaux de concentrations d'adamantane-1-carboxylate (0,2 mM (\circ et \square) et 2 mM (\triangle et \times)) et en fonction de la méthode de détermination du temps de migration. Conditions expérimentales : voir figure 18.

| Soluté | Adamantane-1-carboxylate | | | |
|---|--------------------------|-------|------|------|
| | 0,2 mM | | 2 mM | |
| Concentration | | | | |
| Mesure du temps de migration | S | HVL | S | HVL |
| K (M^{-1}) | 13200 | 23900 | 1900 | 8700 |
| m_{SL} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | -10 | -10 | -13 | -4 |

Tableau 6 : Paramètres d'association de l'adamantane-1-carboxylate déterminés par ajustement non-linéaire de l'isotherme (relation 1) à deux niveaux de concentrations du soluté S : temps de migration mesuré au sommet du pic ; HVL : temps de migration mesuré par le paramètre a_1 obtenu par la modélisation du pic par la fonction de HVL. Conditions expérimentales : voir figure 18.

3.2.c Influence du temps de formation du complexe à l'équilibre sur les mobilités observées de l'adamantane-1-carboxylate

Les isothermes tendant à se confondre pour les concentrations de ligand les plus élevées, on peut supposer que l'écart de mobilité observé pour les concentrations de β -cyclodextrine les plus basses est lié à la formation du complexe à sa concentration d'équilibre [17]. Nous avons donc évalué le temps nécessaire pour former entièrement le complexe à sa concentration d'équilibre, en supposant que la concentration libre de ligand était égale à celle C_L^E introduite dans l'électrolyte support, que le facteur correctif v_i était égal 1, et que le champ électrique était constant dans l'ensemble du capillaire. Le flux relatif F_r de la cyclodextrine par rapport à l'adamantane-1-carboxylate s'écrit alors :

$$F_r = C_L^E \cdot v_{L/S} \cdot S = C_L^E \cdot \mu_{S,0} \cdot E \cdot S \quad (32)$$

avec S section du capillaire, et $\mu_{S,0}$ mobilité absolue de l'adamantane-1-carboxylate. Dans ces conditions, la quantité de substrat lié peut se calculer à partir du volume injecté v_{inj} (connu dans les conditions expérimentales) et de la constante K comme :

$$q_{SL} = [SL] \times v_{inj} = [S]_t \frac{KC_L^E}{1 + KC_L^E} \times v_{inj} \quad (33)$$

Le temps nécessaire à la formation du complexe t_f peut ainsi se déduire du rapport des expressions 32 et 33 en supposant la réaction de formation du complexe quantitative jusqu'à sa concentration d'équilibre. Ce temps peut ainsi se calculer d'après la relation :

$$t_f = \frac{q_{SL}}{F_r} = \frac{[S]_t \cdot K \cdot v_{inj}}{\mu_{S,0} \cdot E \cdot S \cdot (1 + K \cdot C_L^E)} \quad (34)$$

Nous avons ainsi calculé le temps nécessaire à la formation du seul complexe dans des conditions expérimentales représentatives du système adamantane-1-carboxylate – β -cyclodextrine. Pour chaque concentration en β -cyclodextrine, nous avons exprimé le temps relatif t_r nécessaire à la formation du complexe par rapport au temps de migration observé du substrat :

$$t_r = \frac{t_f}{t_{mS,i}} \times 100 \quad (35)$$

Le calcul a ainsi été mené dans le cas de l'adamantane-1-carboxylate aux concentrations injectées 0,2 et 2 mM (figure 20) en tenant compte de la mobilité électroosmotique observée pour chaque essai.

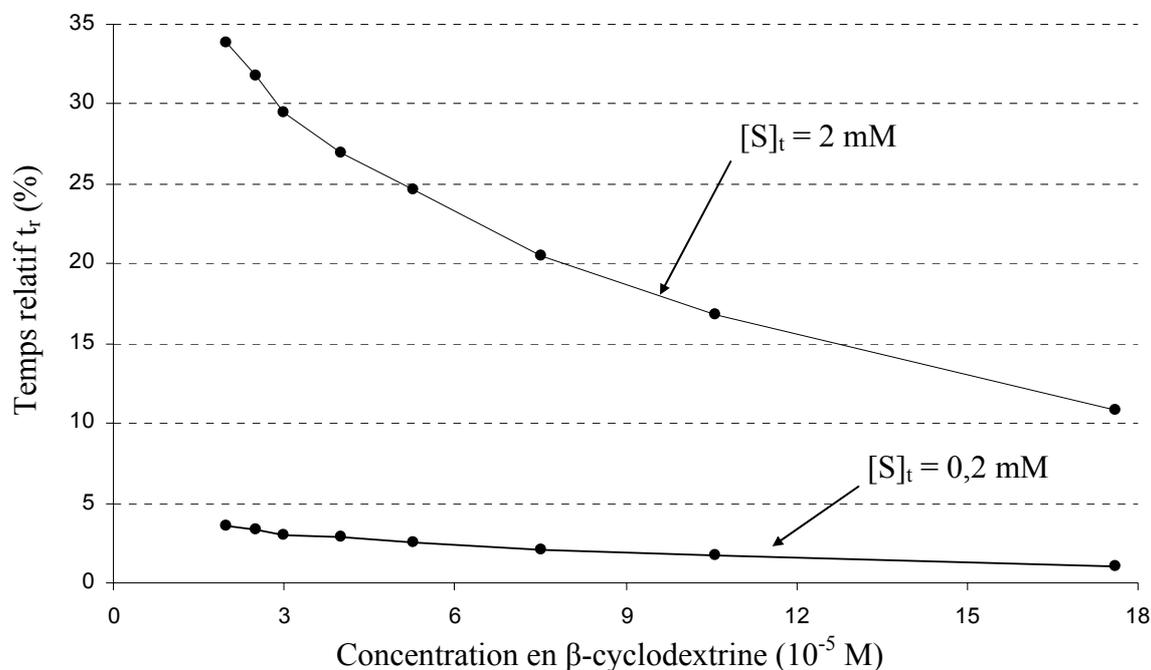


Figure 20 : Temps relatif de la migration nécessaire à la formation du complexe SL à sa concentration d'équilibre dans le cas du système adamantane-1-carboxylate – β -cyclodextrine. Paramètres utilisés pour le calcul : $K = 23900$; $\mu_{S,0} = -24,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $v_{inj} = 5,4 \text{ nL}$; capillaire en silice vierge $50 \mu\text{m d.i.} \times 58,5 \text{ cm}$ (longueur utile : $48,7 \text{ cm}$) ; $U = 20 \text{ kV}$.

Le calcul montre ainsi que le temps relatif nécessaire pour la formation du complexe à sa concentration d'équilibre est d'autant plus important que la concentration en β -cyclodextrine (ligand) est faible, et peut représenter ici pour la plus grande concentration en substrat injecté jusqu'à un tiers du temps de migration observé. Ceci pourrait expliquer au moins partiellement que les écarts de mobilités observés pour les deux niveaux de concentrations du substrat soient plus importants aux faibles concentrations en β -cyclodextrine (voir annexe A2 pour la modélisation du temps de migration en électrophorèse capillaire d'affinité selon cette approche).

4 Conclusion :

Au cours de cette étude, il est apparu que la fonction de HVL décrivait correctement les pics électrophorétiques obtenus. La modélisation de ces pics permet d'évaluer de façon plus satisfaisante le temps de migration de solutés chargés en interaction avec un ligand neutre. Le

temps de migration calculé à partir du centre de la composante gaussienne du pic électrophorétique expérimental permet ainsi d'évaluer la mobilité électrophorétique correspondante, indépendamment des effets de la dispersion par électromigration. Cette démarche permet de corriger les isothermes d'association obtenues et les paramètres d'interaction alors calculés sont en bon accord avec les valeurs de constantes de la littérature obtenues par d'autres méthodes, et ce en dépit d'une concentration injectée en substrat élevée par rapport à celle du ligand (jusqu'à dix fois cette concentration). Ceci amène à reconsidérer la concentration en ligand libre dans la zone de substrat pour de tels cas, et montre que les corrections apportées à cette concentration en considérant le système comme fermé sont inappropriées. La correction apportée par la modélisation du profil électrophorétique sur le temps de migration du substrat trouve toutefois ses limites lorsque le temps de formation du complexe ne peut plus être négligé vis-à-vis du temps de migration observé. A ce stade, il apparaît également nécessaire d'estimer la concentration en ligand libre dans la zone de substrat. Une des méthodes possibles pour un tel calcul pourrait être l'établissement de l'équation de la frontière mobile, mais en tenant compte de la variation de champ électrique entre les zones du substrat et de l'électrolyte support.

5 Annexes

Annexe A1 : calcul de correction de force ionique sur la valeur de pK_a du tampon carbonate de sodium [20]

Pour un tampon carbonate de sodium de force ionique 50 mM, il est nécessaire de corriger la valeur du pK_a (10,32 à 25°C et à force ionique nulle [10]) pour le calcul du pH de cet électrolyte support. La correction intervient :

- sur les coefficients d'activité des espèces en solution par la formule :

$$\log \gamma_i = -0,51z_i^2 \frac{I_c^{0,5}}{1 + B.a.I_c^{0,5}} \quad (A1.1)$$

où a est un paramètre dimensionnel de l'ion et B , une constante valant $0,33.10^{10} \text{ m}^{-1}$ en solution aqueuse à 25°C.

- puis sur la constante d'équilibre du couple acido-basique par :

$$K = K^\circ \cdot f^1(\gamma_i) \quad (A2.2)$$

Le tableau ci dessous regroupe le paramètre a ainsi que la valeur de γ_i pour chaque ion de l'électrolyte support :

| Ion | Paramètre a (nm) [20] | γ_i calculé (relation A1.1) |
|--------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| H ⁺ | 0,9 | 0,854 |
| HCO ₃ ⁻ | 0,4 | 0,816 |
| HCO ₃ ²⁻ | 0,4 | 0,464 |

Par application de la formule (A2.2) on obtient, pour une force ionique de 50 mM : $pK_a = 10,0$.

Annexe A2 : Modélisation du temps de migration en électrophorèse capillaire d'affinité.

La modélisation du temps formation du complexe présentée pour l'adamante-1-carboxylate à sa concentration d'équilibre a été développée en vue de modéliser le temps de migration en électrophorèse capillaire.

Ainsi, à partir des hypothèses déjà introduites (la concentration libre de ligand est égale à celle C_L^E introduite dans l'électrolyte support, le facteur correctif v_i vaut 1, le champ électrique E est constant dans l'ensemble du capillaire, et la réaction de formation du complexe est quantitative l'équilibre), il est possible d'exprimer la distance d_1 parcourue par le substrat durant le temps t_f de formation du complexe en assimilant la mobilité $\mu_{s,f}$ du substrat durant cette période à la mobilité moyenne du substrat libre et de la mobilité du substrat à la concentration d'équilibre :

$$d_1 = t_f \times ((\mu_{s,f}) + \mu_{\epsilon_0}) \times E \quad (A2.1)$$

Comme on suppose que la réaction de formation du complexe à sa concentration d'équilibre est quantitative, la mobilité du substrat durant cette période passe donc de $\mu_{s,0}$ à $\mu_{s,i}$ selon une fonction linéaire du temps. Ainsi dans l'équation A2.2, la mobilité $\mu_{s,f}$ peut se calculer comme :

$$\mu_{s,f} = \frac{\int_0^{t_f} (a.t + b).dt}{t_f} \quad (A2.2)$$

avec $a = \frac{\mu_{S,i} - \mu_{S,0}}{t_f}$ et $b = \mu_{S,0}$, dont on déduit l'expression de $\mu_{S,f}$:

$$\mu_{S,f} = 0,5(\mu_{S,0} + \mu_{S,i}) \quad (\text{A2.3})$$

Pour la distance restante à parcourir jusqu'à la fenêtre de détection, $d_2 = l - d_1$, le substrat migre à la mobilité du substrat à l'équilibre avec le complexe. En supposant toujours que la concentration en ligand libre est égale à celle introduite dans l'électrolyte support, on déduit le temps de migration t_{eq} du substrat à l'équilibre pour cette seconde partie :

$$t_{eq} = \frac{d_2}{E(\mu_{epS,i} + \mu_{\epsilon_0})} \quad (\text{A2.4})$$

Afin d'apprécier la validité du modèle développé, nous l'avons appliqué aux migrations observées de la figure 18 en tenant compte de la mobilité électroosmotique observée, les paramètres de l'interaction (constante K de formation du complexe, et mobilité du complexe) étant ceux calculés à la plus faible concentration d'adamantane-1-carboxylate après modélisation des pic électrophorétiques par la fonction de Haarhoff – Van der Linde. La figure A2.1 ci-dessous montre l'écart relatif entre les temps de migration ainsi calculés t_M^{calc} et les temps de migration observés t_M^{obs} pour chaque concentration en β -cyclodextrine et pour les deux concentrations d'adamantane-1-carboxylate injectées.

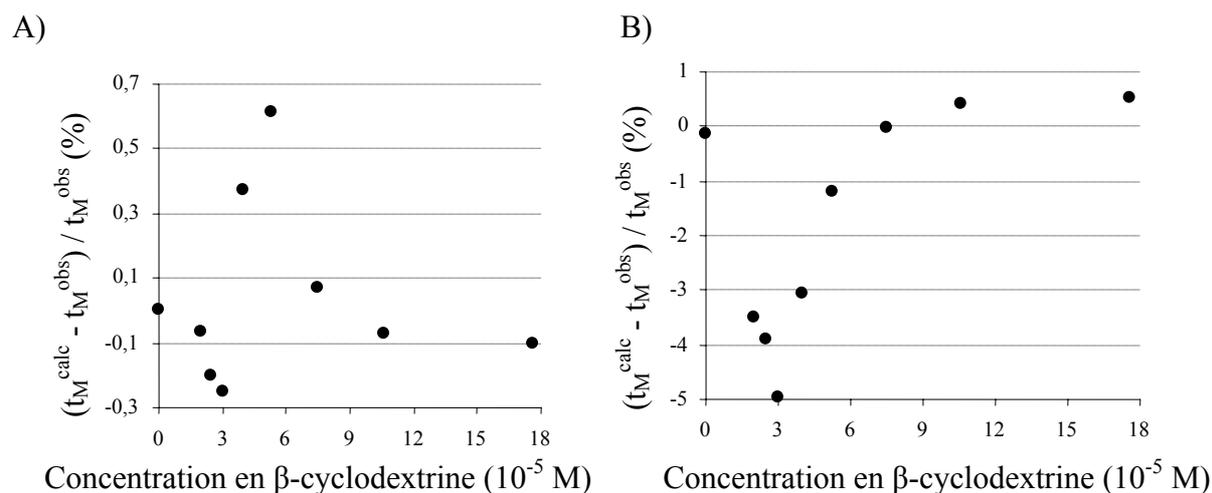


Figure A2.1 : Ecart relatif entre le temps de migration calculé (t_M^{calc}) et le temps de migration observé (t_M^{obs}) de l'adamantane-1-carboxylate injecté à 0,2 mM (A) et à 2 mM (B) en fonction de la concentration en β -cyclodextrine dans le tampon chromate-éthanolamine de pH 10,0 et de force ionique 15 mM

Paramètres utilisés pour le calcul : $K = 23900$; $\mu_{S,0} = -24,7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $\mu_{SL} = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; $v_{inj} = 5,4 \text{ nL}$; diamètre du capillaire : $50 \text{ } \mu\text{m}$; longueur totale : $58,5 \text{ cm}$; longueur utile : $48,7 \text{ cm}$; $U = 20 \text{ kV}$.

La figure A2.1 montre que le modèle développé permet une bonne prévision du temps de migration du substrat en fonction de la concentration en β -cyclodextrine dans l'électrolyte support, l'écart relatif entre les valeurs prévues et observées étant inférieur à 5%. Néanmoins, la mobilité étant une fonction inverse du temps, une erreur de 5% sur le temps de migration peut entraîner un écart important entre la mobilité effective observée et estimée par notre modèle. Aussi, nous avons essayé de modéliser les isothermes obtenues pour les conditions de la figure 19 :

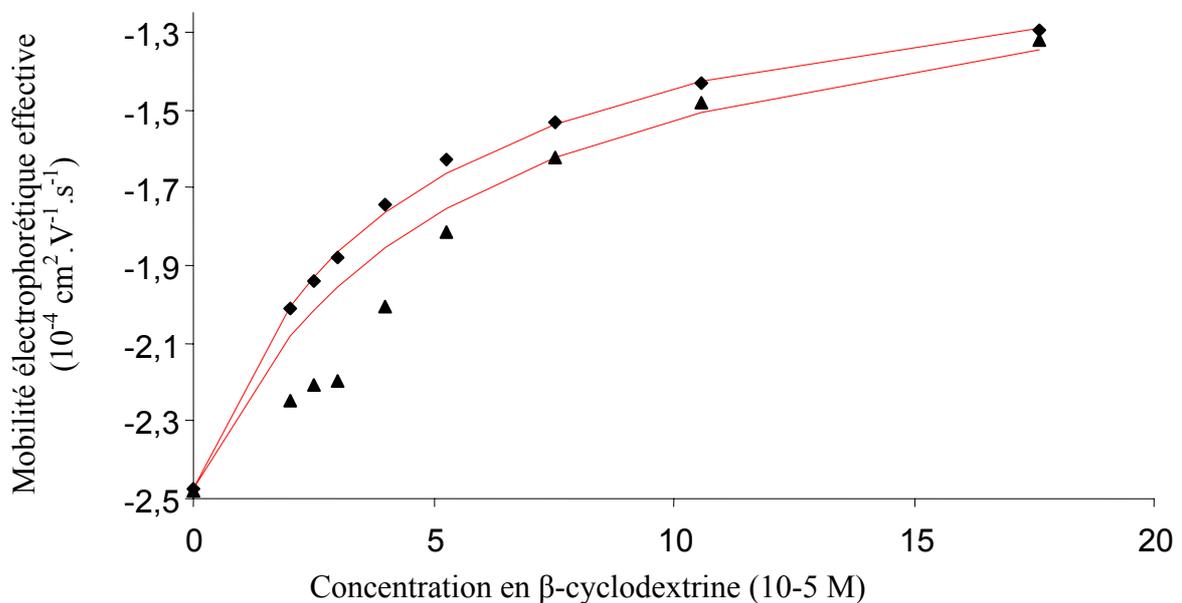


Figure A2.2 : Isothermes d'association observées (points) et modélisée (trait plein) pour une concentration d'adamantane-1-carboxylate injectée de 0,2 mM (◆) et 2 mM (▲).

La figure A2.2 montre que pour la concentration en adamantane-1-carboxylate de 0,2 mM, les mobilités calculées et observées sont très voisines, ce qui montre que dans ce cas, la concentration en ligand libre peut effectivement être assimilée à celle introduite dans l'électrolyte support. En revanche, dans le cas où le soluté est injecté à la plus forte concentration (2 mM), on constate que l'isotherme corrigée du temps de mise en équilibre du système diffère des points expérimentaux aux concentrations en β -cyclodextrine les plus faibles. Un raffinement du modèle précédent, considérant dans le calcul du temps de formation du complexe que seule la concentration de ligand lié ($[SL]$) de l'équilibre entre L_t et S_t est effective pour la formation du complexe à l'équilibre, ne permet pas de corriger le

biais entre les valeurs théoriques et les valeurs observées pour la mobilité du substrat. Il apparaît donc nécessaire de calculer la concentration de ligand libre dans la zone de substrat pour chaque concentration totale de ligand et de substrat.

Annexe A3 : solutions tampons et analytes

Le tampon carbonate de sodium de pH mesuré 10,1 et de force ionique 50 mM utilisé comme électrolyte de séparation a été préparé à partir des sels de carbonate monosodiques et dissodiques aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaHCO}_3] = 12,71 \text{ mM et } [\text{Na}_2\text{CO}_3] = 12,43 \text{ mM}$$

Le tampon chromate-ethanolamine de pH mesuré 10,1 et de force ionique 15 mM utilisé comme électrolyte de séparation a été préparé à partir du dichromate de sodium et d'éthanolamine aux concentrations suivantes :

$$[\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7] = 2,5 \text{ mM et } [\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CHOH}] = 20,8 \text{ mM}$$

Une solution-mère de naproxène 5 mM a été préparée dans le tampon carbonate. Cette solution a été diluée pour la préparation des solutions de naproxène à 1 mM et à 0,15 mM par dilution de la solution-mère à 5 mM avec le tampon carbonate de sodium. Les solutions à 0,15 et 5 mM ont été directement injectées dans le capillaire de séparation lorsque le naproxène tient le rôle de substrat.

Une solution mère de naphthalène-2-sulfonate 2 mM a été préparée dans le tampon carbonate. Cette solution a été diluée pour la préparation des solutions de naphthalène-2-sulfonate à 1 mM et à 0,15 mM par dilution de la solution-mère à 2 mM avec le tampon carbonate de sodium. Les solutions à 0,15 et 2 mM ont été directement injectées dans le capillaire de séparation lorsque le naphthalène-2-sulfonate tient le rôle de substrat.

Une solution-mère d'adamantane-1-carboxylate de sodium 2 mM a été préparée dans l'eau à partir de l'acide carboxylique correspondant neutralisé par une solution de soude 0,1 mM. La solution à 0,2 mM a été préparée à partir de la solution-mère précédente par dilution avec de l'eau.

6 Références bibliographiques

- [1] G. Erny, E. Bergström, D. Goodall, S. Grieb, *Anal. Chem.*, 73, 4862-4872, 2001
- [2] G. Erny, E. Bergström, D. Goodall, *J. Chromatogr. A*, 959, 229–239, 2002
- [3] F. Mikkers, *Anal. Chem.* 71, 522-533, 1999
- [4] P. Gebauer, P. Bocek, *Anal. Chem.* 69, 1557-1563, 1997
- [5] F. Mikkers, F. Everaerts, T. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169, 1-10, 1979
- [6] P. Gebauer, P. Bocek, *Anal. Chem.* 69, 1557-1563, 1997
- [7] P. Gebauer, P. Borecka, P. Bocek, *Anal. Chem.* 70, 3397-3406, 1998
- [8] J. Beckers, P. Gebauer, P. Bocek, *J. Chromatogr. A*, 916, 41-49, 2001
- [9] F. Lelièvre, P. Gareil, *J. Chromatogr. A*, 735, 311-320, 1996
- [10] M. Eftink, M. Andy, K. Bystrom, H. Perlmutter, D. Kristol, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 6765-6772, 1989
- [11] M. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, 98, 1875-1917, 1998
- [12] M. Jaros, M. Stedry, V. Hruska, I. Zuskova, B. Gas, T. Hirokawa, *Peakmaster 5 database*, 2003.
- [13] W. Friedl, J. Reijenga, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 709, 163-170, 1995
- [14] K. Rundlett, D. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 721, 173-186, 1996
- [15] Y. Guillaume, E. Peyrin, *Anal. Chem.*, 71, 2046-2052
- [16] M. Bush, J. Kraak, H. Poppe, *J. Chromatogr. A.*, 777, 329-353, 1997
- [17] C. Galbusera, M. Thachuck, E. De Lorenzi, D. Chen, *Anal. Chem.*, 74, 1903-1914, 2002
- [18] E.-S. Kwak, F. Gomez, *Chromatographia*, 43, 659-662, 1996

[19] W. Cromwell, K. Bystrom, M. Eftink, *J. Phys. Chem.*, 89, 326-332, 1985

[20] B. Tremillon, D. Inamm, *Reaction in solution*, Wiley et sons, Chichester, 1997

Chapitre 4. DEVELOPPEMENT DE L'ANALYSE FRONTALE POUR LA CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE UN POLYSACCHARIDE SULFATE (L'HEPARINE) ET UNE PROTEINE CIBLE (L'ANTITHROMBINE III)

1 Introduction

Les interactions polysaccharide-protéine jouent un rôle prépondérant dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Leur connaissance devrait ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments et permettre une meilleure évaluation de leur mécanisme d'action. Dans le domaine cardiovasculaire, des travaux sont actuellement réalisés pour mieux comprendre les actions anticoagulantes et antithrombotiques complexes de l'héparine. Ce polysaccharide sulfaté d'origine animale présente en effet une affinité particulière pour l'antithrombine-III (ATIII), inhibiteur de la thrombine, enzymes jouant un rôle central dans le processus de la coagulation.

Afin de mieux appréhender les propriétés de l'héparine, il est intéressant d'évaluer l'interaction de ce polysaccharide avec sa cible. Dans ce but, l'électrophorèse capillaire apparaît comme une méthode de choix. En effet, cette technique présente l'avantage de ne nécessiter que de très petites quantités d'échantillon, d'opérer en solution en l'absence de tout solide susceptible de modifier l'interaction, autre que la paroi du capillaire. Elle permet en outre d'opérer dans des milieux de composition proche du milieu biologique. Déjà étudiée par électrophorèse capillaire d'affinité, il apparaît intéressant pour cette étude de mettre en œuvre une méthode qui permette de préincuber les mélanges ATIII-polysaccharide et d'accéder au modèle d'interaction multisite (méthode de l'injection directe ou de l'analyse frontale).

La première partie de ce chapitre est consacrée à une étude bibliographique présentant les mécanismes de la coagulation dans leur ensemble avec les cibles d'action de l'héparine.

La deuxième partie de ce chapitre est dédiée à l'évaluation des constantes d'interaction entre l'antithrombine-III et quelques fractions hépariniques et à l'étude de l'influence du pH et de la force ionique sur cette interaction entre l'antithrombine III et l'héparine.

Enfin, nous proposons une approche de détermination de constante entre l'héparine et un peptide basique dont la séquence est issue du site consensus de l'antithrombine III pour l'héparine.

2 Coagulation et thrombose [1-3]

L'apparition d'une brèche vasculaire génère un mécanisme de défense qui lutte contre la perte du sang hors du système circulatoire. Ce mécanisme est d'ampleur variable selon l'importance de la lésion.

Si de petits vaisseaux capillaires sont lésés, le mécanisme mis en jeu est l'hémostase primaire. L'hémostase primaire est le phénomène physiologique qui aboutit à la formation du clou plaquettaire. L'hémostase primaire fait intervenir les vaisseaux, les plaquettes et des glycoprotéines plasmatiques (fibrinogène et facteur de Willebrand).

Si des vaisseaux d'une taille plus importante sont lésés, le mécanisme de l'hémostase primaire est renforcé par la coagulation plasmatique. La coagulation plasmatique aboutit à la conversion du sang, fluide et circulant, en une masse insoluble et immobile avec formation d'un caillot, grâce à la transformation, sous l'action enzymatique de la thrombine, du fibrinogène, protéine du sang soluble à l'état normal, en fibrine. Cette transformation du fibrinogène met en jeu une série de réactions enzymatiques faisant appel à de multiples facteurs plaquettaires et vasculaires. La coagulation est de ce fait indissociable de l'hémostase primaire.

2.1 Cascade de la coagulation

Le mécanisme final et visible de la coagulation est la transformation du fibrinogène en fibrine, appelée fibrinoformation. L'enzyme qui catalyse cette réaction est la thrombine. Cette enzyme provient de la thrombinoformation, sous l'action du facteur X activé (facteur Xa), qui consiste en l'activation d'un précurseur inactif, la prothrombine. Le facteur Xa est l'enzyme clé de la coagulation. Cette enzyme provient elle-même de l'activation de son précurseur, le facteur X. Il existe deux voies d'activation du facteur X : la voie tissulaire (ou exogène) et la voie endogène. Ces deux voies sont représentées dans le schéma 1.

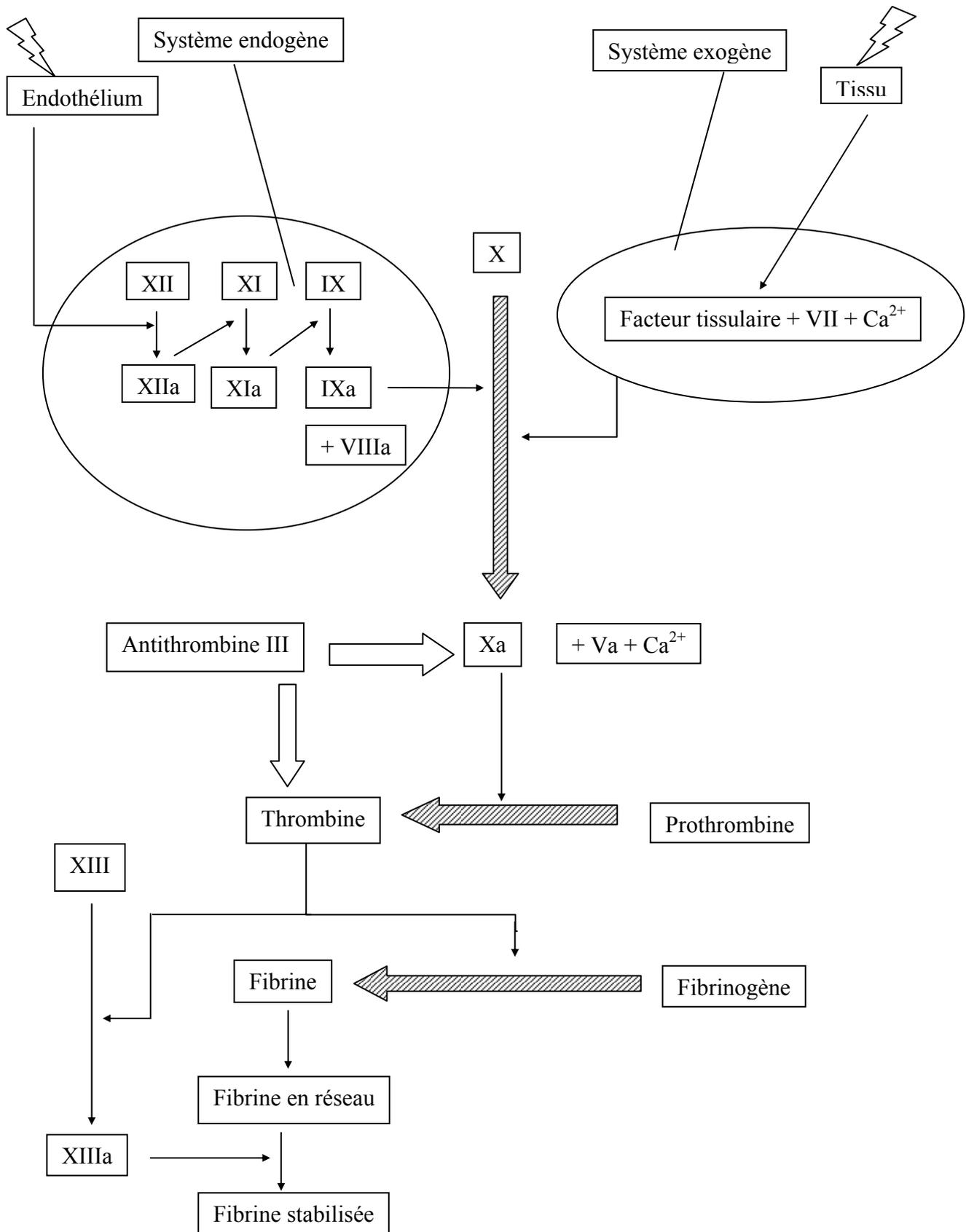


Schéma 1 : Principales étapes de la coagulation

Dans ce schéma, les flèches en grisé indiquent les étapes fondamentales de la coagulation. L'action inhibitrice de l'antithrombine-III sera traitée plus loin.

2.2 Inhibition de la coagulation

Le phénomène de la coagulation est soumis à un contrôle par des inhibiteurs physiologiques dont les principaux sont représentés par la protéine C, la protéine S, et l'antithrombine-III. La protéine C et la protéine S sont des protéines vitamine K dépendantes. Elles inactivent par clivage les facteurs Va et VIIIa, deux facteurs qui accélèrent fortement le processus de la coagulation. L'antithrombine-III est la protéine plasmatique antithrombotique la plus importante. Elle forme un complexe inhibiteur irréversible avec la thrombine et un avec le facteur Xa. Ainsi, cette protéine inhibe les étapes charnières de la coagulation.

2.3 Thrombose

La thrombose est la coagulation du sang à un moment et dans un endroit indésirable, à l'origine d'une morbidité certaine [4]. De nombreux facteurs sont impliqués dans l'apparition d'une thrombose. Ainsi le ralentissement circulatoire d'un territoire favorise la formation de caillot. Ce facteur est important à prendre en compte pour les sujets alités. Les lésions ou les modifications vasculaires constituent un second facteur car c'est l'intégrité physique de l'endothélium qui empêche les plaquettes d'adhérer. Enfin une hypercoagulabilité peut être à l'origine des thromboses. Cette hypercoagulabilité peut être due à une adhésion ou une agrégation excessive des plaquettes, à une diminution du pouvoir inhibiteur des enzymes de régulation de la coagulation, à des modifications des mécanismes de la fibrinolyse. Il existe trois types de traitement des thromboses : les traitements anticoagulants, les traitements antiagrégants, les traitements thrombolytiques. Dans la première catégorie de traitements, se trouvent les traitements à base d'héparine [4].

2.4 Fibrinolyse

La formation d'un caillot de bonne qualité, formé au moment de la coagulation permet à une lésion vasculaire de cicatrifier. La fibrinolyse assure la dissolution du caillot une fois que la cicatrisation est terminée. Comme la coagulation, la fibrinolyse met en jeu une cascade enzymatique, toutefois moins complexe. L'enzyme principale de la fibrinolyse est la plasmine. La plasmine catalyse la dégradation de la fibrine. Cette enzyme provient d'un

précurseur, le plasminogène. La transformation du plasminogène est assurée par différents activateurs : l'activateur tissulaire du plasminogène, le facteur de Hageman, l'urokinase.

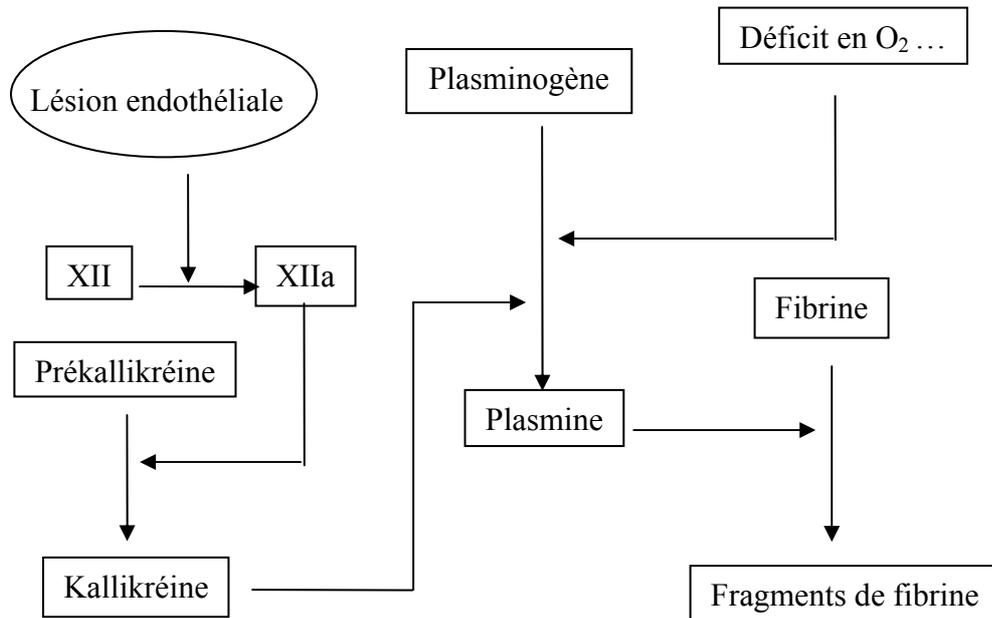


Schéma 2 : Principales étapes de la fibrinolyse

3 Héparine

L'héparine est un glycosaminoglycane découvert en 1916 par Mac Lean, qui l'a isolé à partir de cellules hépatiques canines. D'origine animale, cette substance très hétérogène est principalement synthétisée et stockée dans le poumon, le foie, la peau et la muqueuse intestinale [5]. Lors de sa biosynthèse, l'héparine, de nature polysaccharidique, est liée par des liaisons covalentes et ioniques à une matrice protéique [6]. Le procédé d'extraction de l'héparine, mis en œuvre sur des cellules de la muqueuse intestinale de porc, utilise des ions ammonium quaternaire, permettant ainsi de rompre les liaisons entre le polysaccharide et la matrice protéique.

Agissant principalement sur l'antithrombine, ce polysaccharide trouve des applications thérapeutiques [2-4]. Ainsi l'héparine sert de médicament à titre préventif et curatif des thromboses.

3.1 Structure de l'héparine

Après son extraction, l'héparine se présente sous la forme d'un mélange polysaccharidique. Sa masse moléculaire moyenne est de 15000 Da, et sa dispersion massique

s'étend de 3000 à 40000 Da. L'héparine a pour structure principale un enchaînement linéaire de séquences de disaccharides (voir figure 1) [1], qui constitue le motif de base. Ces disaccharides qui représentent plus de 80% de la structure de l'héparine, sont constitués par une hexosamine, l' α -D-glucosamine liée à un acide uronique par liaison α -1,4. L'acide uronique, lié à la glucosamine par liaison β -1,4, est soit l'acide β -D-glucuronique, soit l'acide α -L-iduronique (voir figure 2). Il est à noter que la glucosamine peut selon les cas être N-sulfonée ou N-acétylée, et que le carbone en position 6 peut être sulfaté ou hydroxylé (voir figure 1) [7].

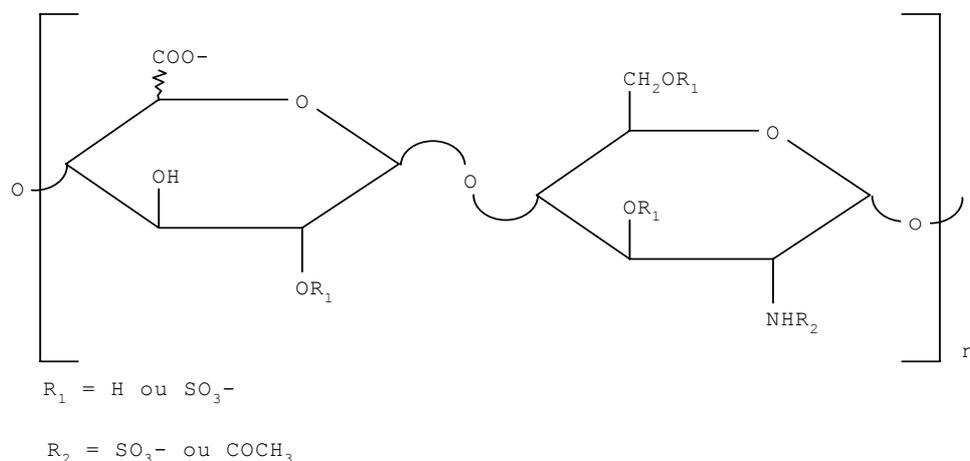


Figure 1 : Motif dissaccharidique de l'héparine [1, 7]

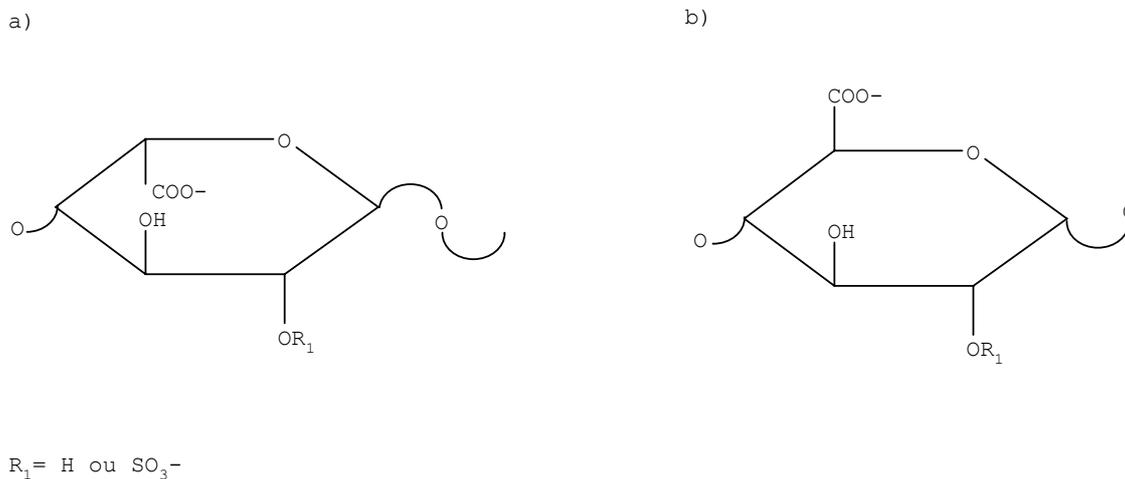


Figure 2 : Les différents types d'acides uroniques [7] :

- a) acide α -L-iduronique
- b) acide β -D-glucuronique

Du fait de ces groupements sulfate et N-sulfonate, l'héparine est un polyélectrolyte très fortement chargé négativement sur tout le domaine de pH. Cette charge est en outre

renforcée par celle des groupements carboxylate en milieu peu acide. En solution, des cations se lient non spécifiquement à l'héparine pour en réduire sa densité de charge. Par ailleurs des phénomènes de relargage d'ions lors de la complexation de l'héparine avec des peptides [8] semblent indiquer que les interactions électrostatiques doivent avoir un rôle prépondérant dans la stabilisation de ces complexes.

3.2 Différents types d'héparine

Bien que les héparines soient toutes constituées par un enchaînement polysaccharidique, certaines héparines ont la particularité de posséder un enchaînement pentasaccharide spécifique, mis en évidence par Petitou et coll. [9-11], qui leur confère une haute affinité pour l'antithrombine. Les héparines qui possèdent cette séquence, agissent sur le même site que les héparines de basse affinité, mais de façon plus spécifique. Ainsi, le complexe binaire antithrombine-héparine de haute affinité, présente une constante apparente de formation d'environ $5.10^7 \text{ mol.L}^{-1}$ contre $5.10^4 \text{ mol.L}^{-1}$ pour un complexe antithrombine-héparine de basse affinité [12, 13]. Aussi, ce pentasaccharide (voir figure 3) est identifié comme site spécifique de liaison à l'antithrombine. De masse 1500 Da, il est désormais obtenu par synthèse [14] et actuellement commercialisé (Arixtra) pour ses propriétés anti-Xa résultant de sa liaison à l'antithrombine III. Un autre pentasaccharide modifié, de demi-vie très allongée (5 jours) (Idraparinux) est actuellement à l'étude.

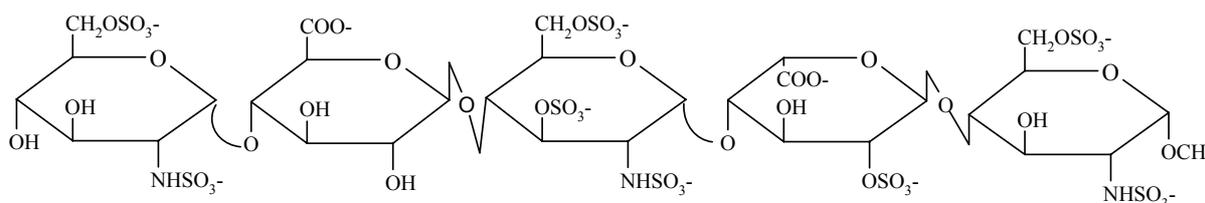
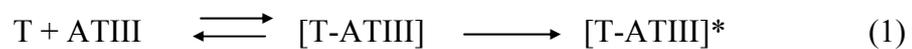


Figure 3 : Motif pentasaccharidique spécifique [9]

D'autre part, l'héparine est également commercialisée sous une forme particulière, dite de basse masse moléculaire (4000 à 5000 Da), obtenue à partir de l'héparine standard par dépolymérisation contrôlée, par voie enzymatique ou chimique. Ces HBMM ou Héparines de Basses Masses Moléculaires agiraient en potentialisant préférentiellement l'activité inhibitrice de l'antithrombine pour le facteur Xa.

3.3 Mécanisme d'action de l'héparine

La cible d'action principale de l'héparine est l'antithrombine-III (ATIII). L'antithrombine-III est une enzyme composée de 432 amino-acides et de masse moléculaire 57875 +/- 32 Da [13] de la famille des serpines (serine proteinase inhibitor), qui, comme nous l'avons vu, forme des complexes inhibiteurs notamment avec la thrombine. Cependant, au contraire des autres serpines, l'action de l'antithrombine-III est relativement lente. Elle comporte deux étapes principales [15]. Dans un premier temps, la thrombine s'associe rapidement à l'antithrombine pour former un complexe réversible non covalent. Puis dans une seconde étape irréversible, le complexe subit un réarrangement qui conduit à sa stabilisation. Le schéma réactionnel est donc le suivant :



En présence d'héparine, la vitesse d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine-III est largement augmentée. L'action de l'héparine se situe au niveau de l'antithrombine-III. L'héparine complexe l'antithrombine-III, la formation du complexe s'effectue en deux étapes. Dans un premier temps l'héparine se lie à l'antithrombine-III par son site pentasaccharidique. Puis dans un second temps l'antithrombine-III complexée change de conformation [16]. Le complexe ATIII-héparine est plus actif que l'antithrombine-III seule. Il est capable de former un complexe ternaire avec la thrombine aboutissant après réarrangement au complexe inactif et irréversible thrombine-antithrombine-III et à la libération de l'héparine. L'antithrombine III a ainsi un rôle d'inhibiteur suicide tandis que l'héparine tient le rôle de catalyseur.

Une seconde action sur le facteur Xa, par le même mécanisme, a été également mentionnée pour les héparines qui possèdent le pentasaccharide de liaison spécifique à l'antithrombine [10].

La complexation de l'héparine avec l'antithrombine-III engage au moins deux types d'interactions. Des interactions électrostatiques ont été mises en évidence par le rôle protecteur de l'héparine vis à vis de réactions chimiques sur des résidus lysine de peptides. Bien que nécessaires, ces interactions électrostatiques ne contribuent cependant pas de façon majoritaire à l'enthalpie libre de formation du complexe héparine-antithrombine-III. Ainsi, les interactions non-ioniques représentent, à pH et force ionique physiologiques, environ 60% de l'enthalpie libre totale de formation [17].

3.4 Autres activités biologiques de l'héparine [7, 13]

La forte densité de charges négatives ainsi que la flexibilité de la chaîne polysaccharidique permettent à l'héparine d'interagir avec une grande variété de récepteurs protéiques (facteurs de croissance, protéines de la matrice extracellulaire et de l'inflammation...). Il en résulte que l'héparine possède en plus de son activité anticoagulante et antithrombotique de nombreuses propriétés biologiques. Ainsi, l'antithrombine est capable d'inhiber la croissance de cellules musculaires lisses, d'augmenter la prolifération de cellules endothéliales. Elle agit en outre sur le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la cicatrisation, la prolifération cellulaire et l'inflammation. In vitro, l'héparine protège les lymphocytes T de leur infection par le virus du SIDA. Ces propriétés biologiques de l'héparine sont d'ailleurs sans doute à l'origine de ses effets secondaires dans le traitement des thromboses, pour lequel ont été rapportés des cas d'alopécie, d'ostéoporose, et de thrombopénies ; ces dernières sont soit précoces et peu profondes, soit retardées avec une origine immunoallergique.

La mise en évidence et l'évaluation des activités pharmacologiques de l'héparine passent par la détermination des constantes d'affinité de ce polysaccharide sulfaté avec ses récepteurs potentiels.

3.5 Héparine et électrophorèse capillaire :

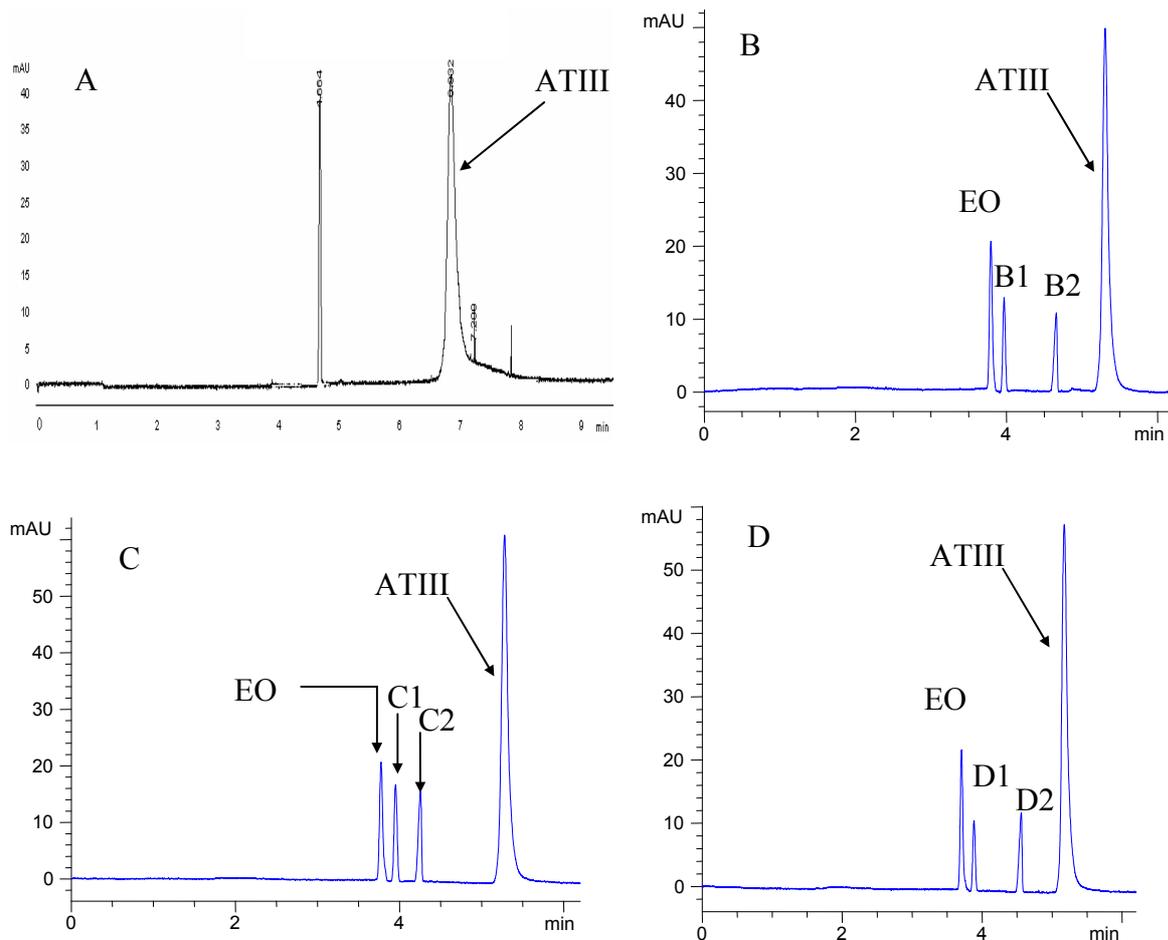
Depuis quelques années, l'électrophorèse est apparue très intéressante pour l'étude de l'interaction entre l'héparine et diverses protéines. En effet, du fait du fort caractère anionique du polysaccharide sulfaté, les propriétés électrophorétiques de celui-ci sont nettement différenciées de celles d'une protéine cible, ou que l'interaction des deux partenaires polysaccharide et protéine permet de modifier de façon conséquente les propriétés électrophorétiques de cette dernière. L'électrophorèse a ainsi été appliquée dans divers modes (injection directe et électrophorèse d'affinité essentiellement) à l'étude de l'interaction entre l'héparine et diverses protéines cibles. Parmi quelques applications de l'électrophorèse on trouve l'étude de l'interaction de l'héparine avec le dimère de la protéine amyloïde du sérum par le protocole de l'injection directe [18], avec le précurseur de la protéine amyloïde par électrophorèse d'affinité [19], avec la fibronectine [20] ou avec l'antithrombine III par électrophorèse d'affinité [13, 21-22]. Enfin la complexation de l'héparine avec la sérum albumine bovine a également été étudiée par analyse frontale électrocinétique continue [23].

4 Etude des constituants du système par électrophorèse de zone

Le but de cette première série d'expériences est de caractériser le comportement électrophorétique des constituants du système d'interaction afin de mieux appréhender la méthode électrophorétique de détermination des constantes d'interaction à mettre en œuvre pour l'étude de la complexation héparine-antithrombine-III.

4.1 Antithrombine seule

Différents échantillons d'antithrombine III ont été utilisés au cours de ce travail. Chaque échantillon d'antithrombine-III a été analysé qualitativement par électrophorèse de zone afin de contrôler la pureté du produit, après avoir réalisé un spectre UV de l'antithrombine III (Annexe 1) qui a permis de choisir à 200 nm la longueur d'onde de détection de la protéine. Les électrophérogrammes obtenus sont ceux donnés figure 3.



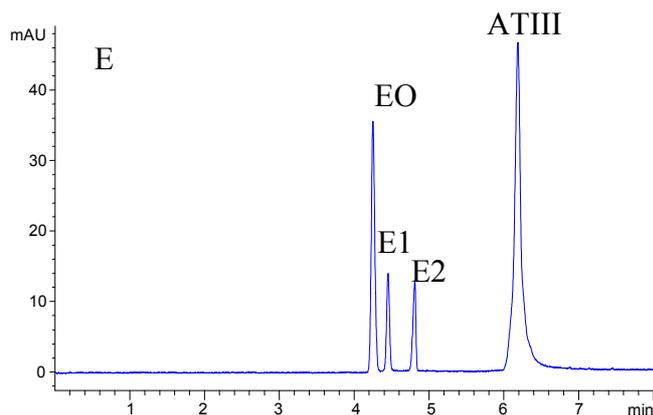


Figure 3 : Electrophérogrammes des échantillons d'antithrombine-III étudiés provenant d'origine commerciale et de lots différents.

Capillaires en silice vierge, 50 μm , d.i. x 50 cm (A) (longueur utile 41,5 cm) ou 35 cm (B-E) (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte de séparation : tampon phosphate de sodium 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Température : 25°C. Tension appliquée : 20 kV (A) (intensité mesurée : 49 μA) ou 10 kV (B-E) (intensité mesurée : 35 μA). Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique : marqueur neutre (A : 50 mbars, 2s ; B-E : 30 mbars, 2s), électrolyte support (A : 50 mbars, 2s ; B-E : 30 mbars, 2 s), échantillon (A : 50 mbars, 2 s ; B-E : 30 mbars, 2 s), électrolyte support (A : 50 mbars, 2 s ; B-E : 30 mbars, 2 s) ; échantillon : antithrombine III d'origine Chromogenix à $1,4 \cdot 10^{-5}$ M (A, lot n° 4291) ou $9 \cdot 10^{-6}$ M (B, lot n° N110613; C, lot n° P0401; D, lot n° N110831) ou d'origine Hyphen-Biopep à $1 \cdot 10^{-5}$ M (E, lot n° 19511R). Marqueur neutre : alcool benzylique 0,003% (A-D) ou formamide 0,03% (E).

L'ATIII donne un pic assez symétrique et bien défini, ce qui traduit une faible interaction avec la paroi dans ces conditions. La mobilité électrophorétique est voisine de $-11 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Il apparaît que les lots B, C, D et E d'antithrombine-III ne sont pas purs. Chacun de ces lots présente deux impuretés dont l'une pourrait être commune en raison des valeurs de mobilités électrophorétiques effectives voisines pour les impuretés de ces lots (voir tableau 1). Les faibles valeurs de mobilités de ces impuretés laissent supposer qu'elles pourraient être de nature protéique. En outre, les impuretés B1, C1, D1 et E1 pourraient être identiques.

| Echantillon | Temps de migration (min) | m_{app} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | Attribution |
|-------------|--------------------------|---|--|--------------|
| A | 4,66 | 36,5 | 0 | Alcool benz. |
| | 6,83 | 25,2 | -11,3 | ATIII |
| B | 3,79 | 39,6 | 0 | Alcool benz. |
| | 3,97 | 38,3 | -1,3 | B1 |
| | 4,66 | 32,7 | -6,9 | B2 |
| | 5,31 | 28,7 | -10,9 | ATIII |
| C | 3,77 | 39,8 | 0 | Alcool benz. |
| | 3,95 | 38,5 | -1,3 | C1 |
| | 4,25 | 35,8 | -4,0 | C2 |
| | 5,28 | 28,8 | -11,0 | ATIII |
| D | 3,71 | 40,6 | 0 | Alcool benz. |
| | 3,88 | 39,2 | -1,4 | D1 |
| | 4,54 | 33,5 | -7,1 | D2 |
| | 5,18 | 29,4 | -11,2 | ATIII |
| E | 4,26 | 35,6 | 0 | Formamide |
| | 4,46 | 34,4 | -1,2 | E1 |
| | 4,81 | 31,8 | -3,8 | E2 |
| | 6,19 | 24,7 | -10,9 | ATIII |

Tableau 1 : Temps de migration relevés des pics observés sur les électrophérogrammes de la figure 3 et mobilités apparentes m_{app} et électrophorétiques m_{ep} calculées correspondantes. Conditions opératoires : voir figure 3

4.2 Héparine seule

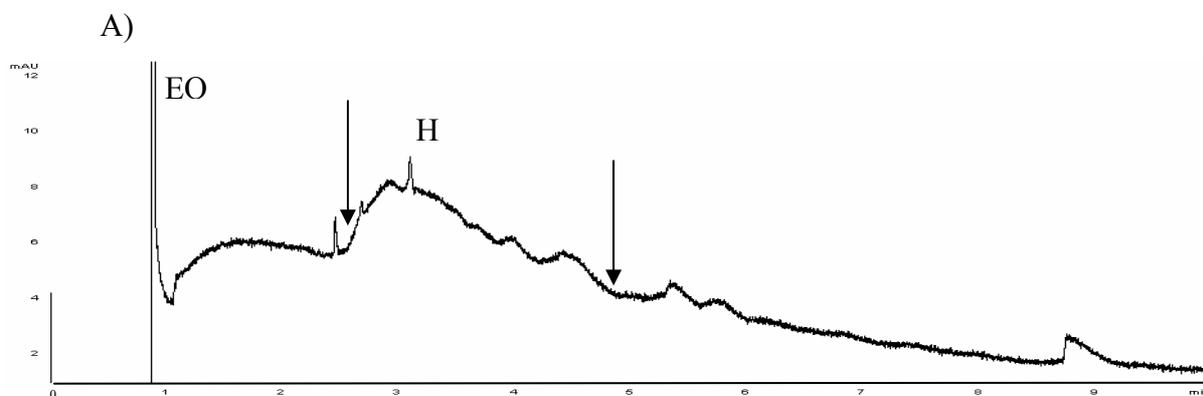
Différentes héparines (standard, basse masse, et fractions oligosaccharidiques) ont été utilisées. Le tableau 2 présente les dénominations, la masse moléculaire moyenne (approchée pour raison de confidentialité) et la taille de ces polysaccharides. De par leur procédé d'obtention (non détaillé ici pour raison de confidentialité), certaines de ces fractions sont attendues très affines pour l'antithrombine III. Ces fractions sont repérées dans le tableau 2 par un astérisque à côté du nombre de résidus saccharidiques. Enfin, en plus du procédé standard de purification, certaines de ces fractions oligosaccharidiques ont subi une ou plusieurs étapes de purifications supplémentaires.

| Dénomination | Masse moléculaire moyenne | Nombre de résidus saccharidiques | Procédé de purification |
|--------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Tetra | 1200 | 4 | Standard |
| Hexa-A | 1800 | 6* | Standard |
| Hexa-B | 1800 | 6* | Avancée |
| Hexa-C | 1800 | 6* | Standard |
| Octa-A | 2400 | 8 | Standard |
| Octa-B | 2400 | 8* | Standard |
| Deca-A | 3000 | 10 | Standard |
| Deca-B | 3000 | 10* | Standard |
| Deca-C | 3000 | 10* | Avancée |
| H-1 | 4200 | 14 | Standard |
| H-2 | 5400 | 18 | Standard |
| H-3 | 15000 | 50 | Standard |

Tableau 2 : Caractéristiques des héparines étudiées.

* : fractions attendues affines pour l'antithrombine III.

De par le procédé d'obtention des héparines, les polysaccharides possèdent tous une insaturation sur le dernier résidu saccharidique. Néanmoins, dans les conditions opératoires retenues pour l'ATIII (figure 3), la présence de cette insaturation n'est pas suffisante pour permettre la détection des héparines de basse masse et standard. C'est pourquoi le comportement électrophorétique des héparines H-1 et H-3 a été caractérisé dans des conditions d'électrolyte différentes, permettant leur détection par absorbance UV indirecte (figure 4).



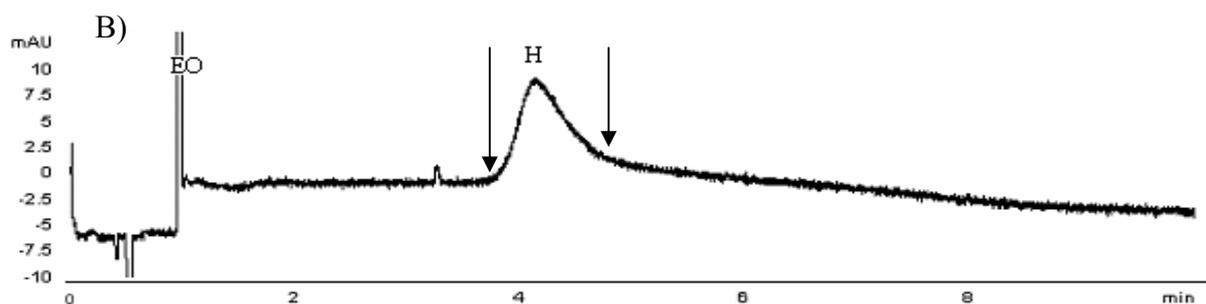
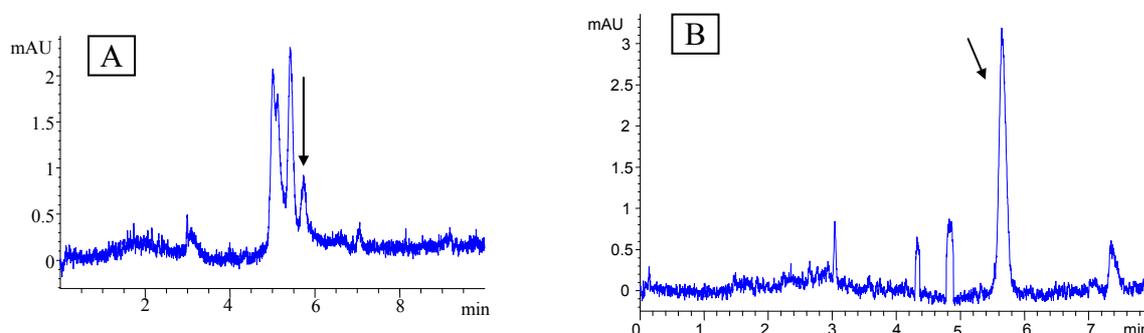


Figure 4 : Electrophérogrammes des héparines H-1 (A) et H-3 (B) avec détection par absorbance UV indirecte.

Capillaire en silice vierge : 50 μm d.i. x 34,5 cm (détection, 26 cm). Electrolyte de séparation : tampon Bis-Tris 20 mM, anisate 10 mM (pH 6,41). Injection hydrodynamique : eau (50 mbars, 5 s), héparine H-3 2 mg.mL^{-1} ($1,33.10^{-4}$ M) dans l'eau (50 mbars, 3 s) (A) ; eau (50 mbars, 5 s), héparine H-1 4 mg. mL^{-1} ($9,19.10^{-4}$ M) dans l'eau (B). Tension +30 kV ($I = 9,8 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection : absorbance UV indirecte (référence : 250 nm, signal 450 nm). D'après les travaux de Moo Young Kim au Laboratoire [24]. Identification : EO : signal électroosmotique ; H : héparine.

En raison de leur polydispersité, les héparines H-1 et H-3 conduisent à des profils électrophorétiques assez étalés, s'étendant en mobilité électrophorétique de -39 à $-43 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (mobilité au sommet : $-40 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour l'héparine H-1 et de -37 à $-41 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (mobilité au sommet : $-39 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) pour l'héparine H-3. Les héparines sont donc plus mobiles, en valeur absolue, que l'ATIII dans ces conditions, ce qui permet d'escompter une séparation de l'ATIII libre et du complexe ATIII-héparine.

Les oligosaccharides, attendus très affins pour l'antithrombine III (Hexa-A, Hexa-B, Hexa-C, Octa-B, Deca-B et Deca-C), ont été caractérisés par électrophorèse de zone capillaire à des concentrations de l'ordre du millimolaire, autorisant leur détection en mode d'absorption UV directe (figure 5).



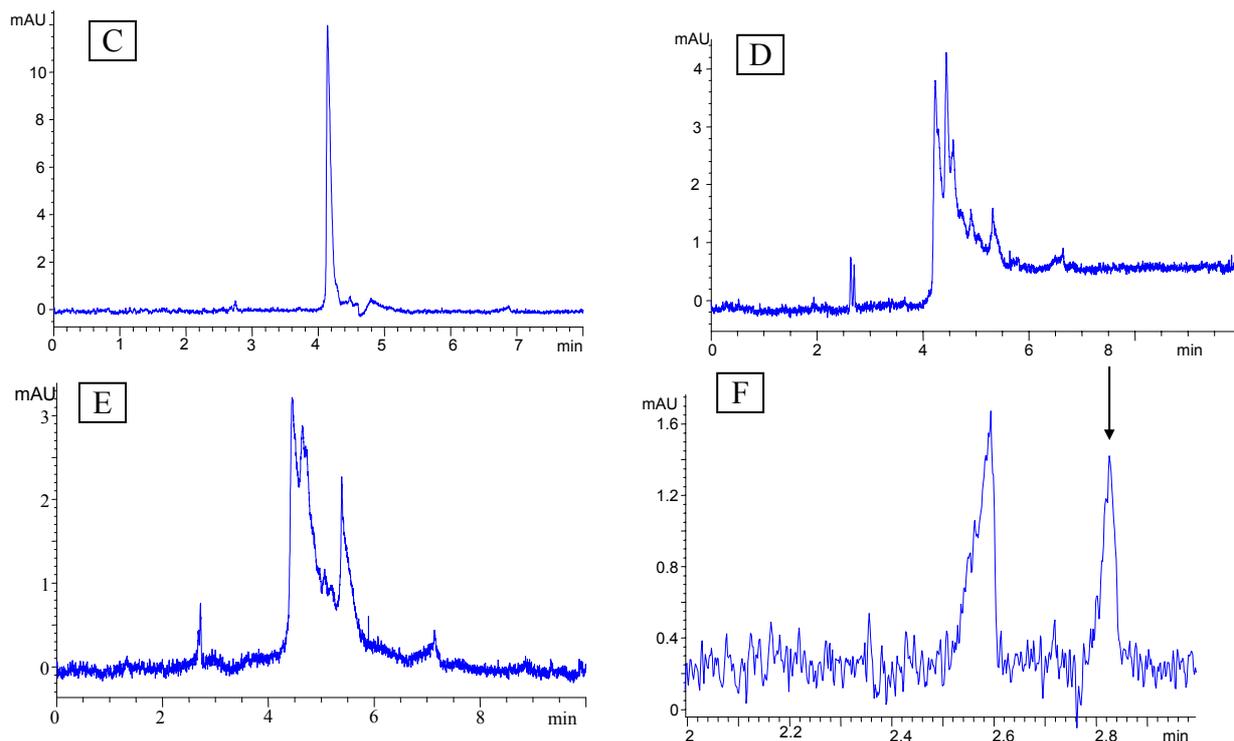


Figure 5: Electrophérogrammes des oligosaccharides hexa, octa et décasaccharides.

Capillaire greffé polyacrylamide (Microsolv), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Tension appliquée : - 10 kV ($I = 17 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm, excepté (F) à 193 nm. Echantillons : hexa-A $2,79 \cdot 10^{-3}$ M (A), hexa-B $1,1 \cdot 10^{-3}$ M (B), hexa-C $3,6 \cdot 10^{-3}$ M (C), octa-B $2,52 \cdot 10^{-3}$ M (D), deca-B $1,8 \cdot 10^{-3}$ M (E); deca-C $1,6 \cdot 10^{-4}$ M (F). Injection hydrodynamique de l'échantillon 30 mbars, 2 s

nota : Les flèches repèrent le pic pour lequel le pourcentage d'aire correspond approximativement au taux de chaînes actives de l'échantillon (voir §7.3.1.).

Contrairement aux migrations effectuées pour l'héparine standard H-3 et pour l'héparine H-1 montrées précédemment pour lesquelles un seul massif large était obtenu, les migrations effectuées pour ces nouveaux dérivés conduisent à la détection de pics plus étroits et partiellement résolus. Ceci traduit sans doute une polydispersité plus faible des chaînes hépariniques isolées. En particulier pour les dérivés les plus purifiés (Fig.5 B et F), des pics distincts apparaissent.

4.3 Mélange héparine-antithrombine-III

Afin d'avoir une première estimation de la stabilité des complexes ATIII-héparine, nous avons dans un premier temps procédé par injection directe de mélanges pré-incubés pendant 2 heures à température ambiante, suivie d'une séparation des constituants par

électrophorèse de zone. Cet essai a été réalisé pour l'héparine H-3 et l'héparine H-1. Les électrophérogrammes obtenus sont représentés figure 6.

Les pics de l'antithrombine-III sur ces deux électrophérogrammes sont en comparaison de ceux de la figure 3 mal définis, ce qui met en évidence un phénomène de complexation, mais il n'a pas été possible dans ces conditions opératoires de séparer totalement la forme libre de la (des) forme(s) complexée(s) de l'antithrombine-III, cette (ces) dernière(s) devant se dissocier durant la séparation. Ce type de comportement est ainsi identique à celui décrit pour la liaison d'ADN avec la protéine SSB liante [25] ou la thrombine [26].

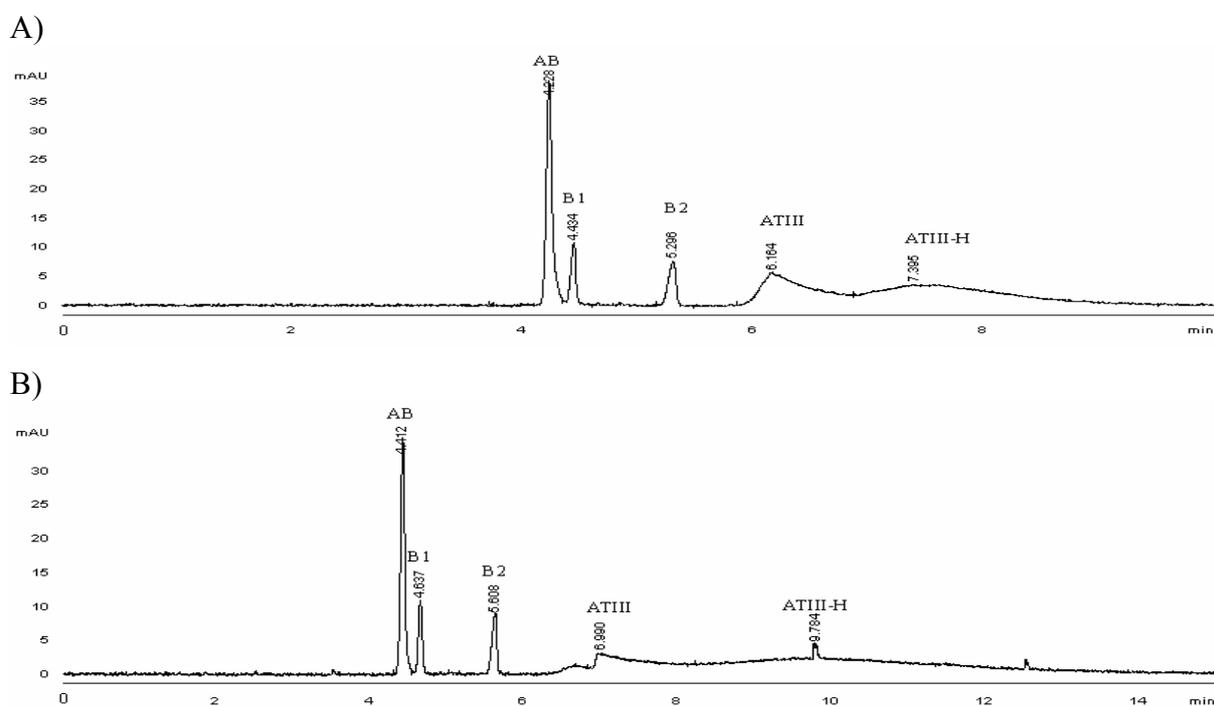


Figure 6 : Electrophorèse de zone de mélanges pré-incubés ATIII-héparine

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,9 cm)

Electrolyte de séparation : tampon phosphate de sodium 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 10 kV ($I = 35 \mu\text{A}$). Température : 25°C

Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : ATIII (lot B) $7,8 \cdot 10^{-6}$ M et héparine H-1 $9,1 \cdot 10^{-5}$ M (A) ; ATIII (lot B) $7,8 \cdot 10^{-6}$ M et héparine H-3 $9,1 \cdot 10^{-5}$ M (B), incubés pendant 2h à la température ambiante (A et B). Injection hydrodynamique: alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2s). Identification : AB : alcool benzylique ; B1 : impureté B1 ; B2 : impureté B2 ; ATIII : antithrombine III libre ; ATIII-H : complexes ATIII-héparines.

Les électrophérogrammes obtenus montrent que les impuretés ne sont pas ou peu complexées par les héparines étudiées. En effet, les aires de pic pour les impuretés B1 et B2 de l' ATIII (lot B) ne sont pas (ou sont très peu) modifiées en présence d'héparine.

En revanche, en présence d'héparine (non détectée à ce niveau de concentration), le comportement électrophorétique de l'ATIII est profondément modifié. On observe :

- i) un premier massif dont le sommet a une mobilité égale (cas de l'héparine H-1) ou proche (cas de l'héparine H-3) de celle de l'ATIII libre.
- ii) Un second massif très étalé correspondant à la présence de formes complexées ATIII-héparines.
- iii) Une jonction en forme de U entre les deux massifs qui met en évidence la formation d'ATIII libre pendant la migration, par dissociation du complexe formé lors de l'incubation.

En raison de l'étalement important des massifs obtenus pour l'antithrombine III libre et les formes complexées avec l'héparine, il est délicat de mesurer de façon précise les mobilités correspondantes à la protéine libre et complexée. Toutefois, la comparaison, pour les deux héparines, des mobilités calculées au sommet de ces massifs suggère que les complexes majoritaires ATIII-H-3 sont plus chargés que les complexes majoritaires ATIII-H-1 : en effet, la mobilité effective calculée au sommet du massif ATIII-H-1 est inférieure en valeur absolue à celle calculée au sommet du massif ATIII-H-3 (tableau 3).

| Echantillon | Fraction héparinique | m_{ep} impureté B1 ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} impureté B2 ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} ATIII ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | m_{ep} complexes ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) |
|-------------|----------------------|--|--|--|--|
| B | Sans | -1,3 | -6,9 | -10,9 | |
| | H-1 | -1,0 | -6,6 | -10,9 | -15,1 |
| | H-3 | -1,3 | -7,0 | -12,4 | -18,6 |

Tableau 3 : Mobilités électrophorétiques effectives au sommet des massifs ATIII-H-1 et ATIII-H-3 et pour les impuretés 1 et 2 de l'échantillon B d'antithrombine-III en absence et présence des héparines H-3 et H-1

Conditions opératoires : voir figure 10.

4.4 Conclusion sur l'étude par injection directe en électrophorèse de zone

Comme attendu, l'injection directe de mélanges ATIII-héparine a permis de montrer qu'à la longueur d'onde choisie pour la détection ($\lambda = 200 \text{ nm}$), seules les formes libres et complexées de l'antithrombine-III sont détectées dans le tampon phosphate de sodium. Les formes complexées sont détectées après l'ATIII libre, ce qui est en accord avec les mobilités de l'ATIII libre et des héparines. D'autre part, le pic obtenu pour le complexe ATIII-héparine

est assez mal défini, sans doute en raison de l'hétérogénéité de l'héparine et de la dissociation dynamique du complexe. De ce fait, la méthode de l'injection directe ne peut être retenue pour la détermination des paramètres de l'interaction (constante intrinsèque et nombre de sites) entre l'héparine et l'antithrombine III. La méthode la plus appropriée pour la détermination des paramètres de l'interaction entre l'ATIII et l'héparine devrait donc être celle de l'analyse frontale. Cette méthode présente l'avantage de ne pas déplacer l'équilibre de complexation, présente une consommation des partenaires moins importante que les méthodes Hummel-Dreyer ou des pics de vacance, n'a en outre pas de pré-requis sur la cinétique de l'interaction étudiée et permet, par comparaison à l'électrophorèse d'affinité, d'accéder au modèle d'interaction multisites.

5 Mise au point de l'analyse frontale

L'analyse frontale peut être mise en œuvre selon deux variantes qui diffèrent par le mode d'introduction de l'échantillon dans le capillaire. Il est possible d'injecter un créneau long de mélange substrat-ligand en mode hydrodynamique, ou d'injecter en continu l'échantillon sous l'application du champ électrique. En comparaison des injections réalisées dans le mode électrocinétique, le mode d'injection hydrodynamique nécessite de plus faibles volumes d'échantillon (15 μL contre 50 μL), évite tout contact entre les électrodes sous tension et l'échantillon constitué de matériel protéique présumé fragile et a donc été préféré dans un premier temps.

5.1 Injections hydrodynamiques

Les différents essais de mise au point de la méthode avec les injections hydrodynamiques ont tout d'abord été effectués avec un capillaire de 50 cm de longueur totale (tableau 4).

| Durée d'injection de l'échantillon (s) | Volume occupé par l'échantillon (nL) | Longueur de capillaire occupé par l'échantillon (cm) | Longueur utile corrigée restant pour la séparation (cm) |
|--|--------------------------------------|--|---|
| 90 | 159 | 8,1 | 32,9 |
| 100 | 177 | 9,0 | 32,0 |
| 110 | 194 | 9,9 | 31,1 |
| 120 | 212 | 10,8 | 30,2 |

| | | | |
|-----|-----|------|------|
| 150 | 265 | 13,5 | 27,5 |
| 180 | 318 | 16,2 | 24,8 |
| 200 | 353 | 18,0 | 23,0 |
| 300 | 530 | 27,0 | 14,0 |

Tableau 4 : Essais de mise au point de la méthode d'analyse frontale à partir d'injections hydrodynamiques avec un capillaire de 50 cm de longueur.

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μm d.i. x 50 cm (longueur utile 41,5 cm)

Electrolyte de séparation : tampon phosphate de sodium 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 20 kV ($I = 50 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique : alcool benzylique (50 mbars, 2 s), électrolyte support (50 mbars, 2 s), échantillon (50 mbars, durée indiquée dans ce tableau), électrolyte support (50 mbars, 2 s). Echantillon : mélange ATIII (lot A) $1,45 \cdot 10^{-5}$ M + héparine H-2 $7,32 \cdot 10^{-5}$ M incubé pendant 2h à la température ambiante.

Sur les électrophérogrammes obtenus (figure 7), il est possible de distinguer deux fronts de migration. Le premier front est attribué à l'antithrombine-III qui a la mobilité apparente la plus importante, tandis que le deuxième est attribué au complexe ATIII-héparine. Les électrophérogrammes qui donnent le moins de déformation au niveau du palier de concentration en ATIII, semblables à celui montré sur la figure 7, sont obtenus avec un temps d'injection de 120 s. La durée de la séquence (injection-migration-rinçage) est alors de l'ordre de 30 minutes. Cependant le palier de concentration de l'antithrombine-III libre n'est pas suffisamment marqué, condition nécessaire pour une détermination des concentrations à l'équilibre. Ce comportement suggère soit un phénomène d'adsorption de l'antithrombine libre sur la paroi du capillaire, soit une longueur de capillaire insuffisante pour assurer une séparation adéquate des formes à l'équilibre. D'autre part, la faible étendue du palier de la forme complexée semble indiquer qu'il serait préférable de choisir une durée d'injection plus élevée.

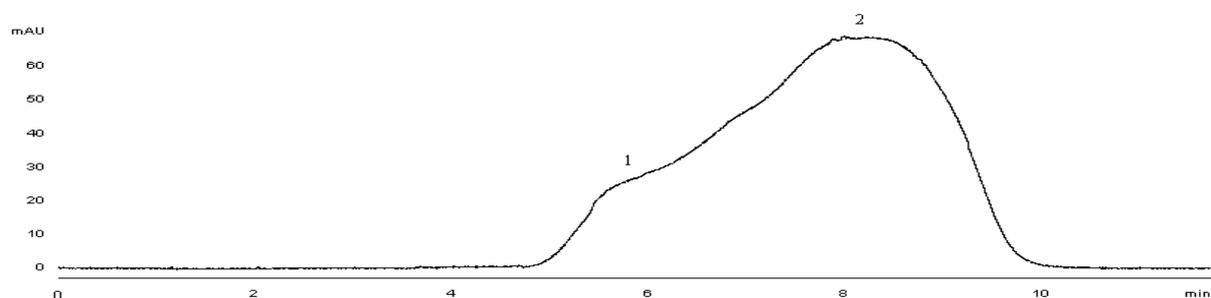


Figure 7 : Analyse frontale à partir d'une injection hydrodynamique

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μm d.i. x 50 cm (longueur utile 41,5 cm)

Electrolyte de séparation : tampon phosphate de sodium 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 20 kV ($I = 50 \mu\text{A}$). Température : 25°C

Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique : échantillon (50 mbars, 120 s), électrolyte support (50 mbars, 2 s). Echantillon : mélange ATIII (lot A) $1,45 \cdot 10^{-5}$ M + héparine H-2 $7,32 \cdot 10^{-5}$ M incubé pendant 2h à la température ambiante. Identification : 1 : palier de l'ATIII libre ; 2 : palier du complexe ATIII-héparine H-2.

Au vu de ces considérations, une série d'expériences a été menée dans un capillaire de 100 cm de longueur. Les conditions opératoires indiquées dans le tableau 5 aboutissent à des migrations longues, imposant une durée minimale de séquence d'analyse (injection-migration-rinçage) supérieure à 90 minutes. D'autre part, les électrophérogrammes obtenus (non montrés) ne permettent pas de conclure à l'obtention de meilleures conditions pour la détermination de la concentration en antithrombine libre. Deux hypothèses pourraient expliquer cette observation : une contribution accrue des phénomènes d'adsorption sur la paroi du capillaire et/ou une séparation totale des constituants (comme cela est le cas pour l'injection directe).

| Durée d'injection de l'échantillon (s) | Volume occupé par l'échantillon (nL) | Longueur de capillaire occupé par l'échantillon (cm) | Longueur utile corrigée restant pour la séparation (cm) |
|--|--------------------------------------|--|---|
| 180 | 159 | 8,1 | 83,1 |
| 240 | 212 | 10,8 | 80,4 |
| 300 | 265 | 13,5 | 77,7 |
| 500 | 442 | 22,5 | 68,7 |
| 600 | 530 | 27,0 | 64,2 |
| 700 | 618 | 31,5 | 59,7 |
| 800 | 706 | 36,0 | 55,2 |

Tableau 5 : Essais de mise au point de la méthode d'analyse frontale à partir d'injection hydrodynamiques avec un capillaire de 100 cm de longueur.

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μ m d.i. x 100 cm (longueur utile 91,5 cm)

Electrolyte de séparation : tampon phosphate de sodium 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée = + 20 kV (I = 25 μ A). Température : 25°C
 Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique : alcool benzylique (50 mbars, 2 s), électrolyte support (50 mbars, 2 s), échantillon (50 mbars, durée indiquée dans ce tableau), électrolyte support (50 mbars, 2 s). Echantillon : mélange ATIII (lot A) $1,45 \cdot 10^{-5}$ M + héparine H5300 $7,32 \cdot 10^{-5}$ M incubé pendant 2h à la température ambiante.

C'est pour ces raisons que la méthode d'analyse frontale par injection électrocinétique a été développée. En effet cette méthode permet d'utiliser la totalité de la longueur utile du capillaire pour la séparation et de commencer la séparation pendant l'injection elle-même.

5.2 Injection électrocinétique

Pour réaliser ces expériences, un capillaire de 35 cm de longueur a été utilisé pour limiter les phénomènes d'adsorption [27] de la protéine sur la paroi du capillaire. L'injection est réalisée en continu et simultanément à la séparation des fronts de migration à l'intérieur du capillaire. Avec ce mode d'injection, des électrophérogrammes tels que celui montré sur la figure 8 A, ont été obtenus.

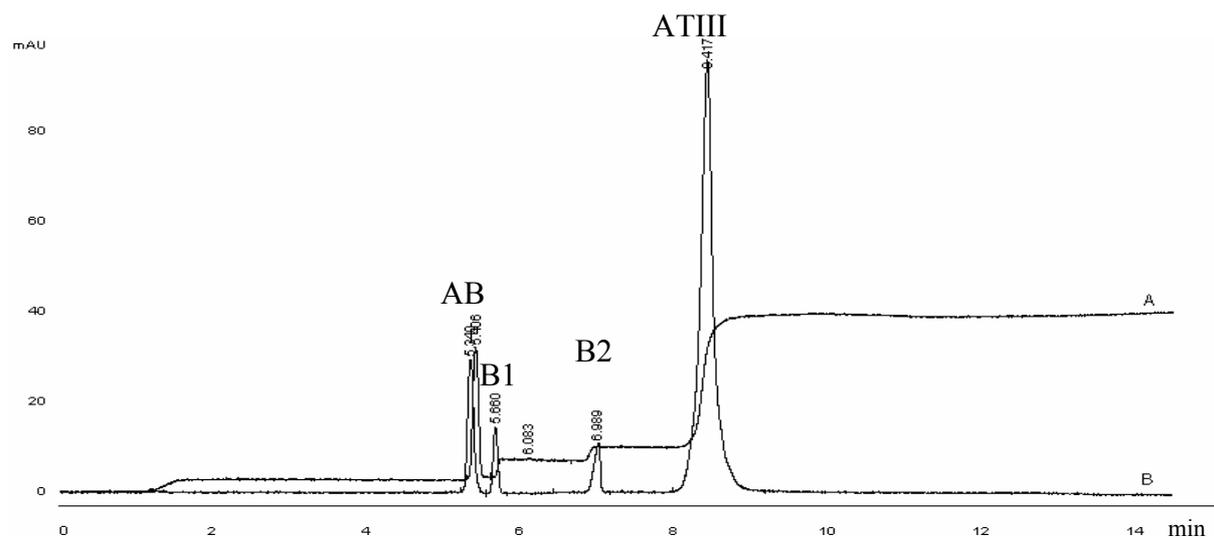


Figure 8 : Superposition d'un électrophérogramme en mode d'analyse frontale à partir d'une injection électrocinétique continue (A) et d'un électrophérogramme en mode zone pour l'antithrombine-III seule (B).

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm)

Electrolyte support : tampon phosphate 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 10 kV ($I = 37 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), ATIII (30 mbars 2 s), suivie d'une injection électrocinétique continue d'ATIII (A) ; injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), ATIII (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s) (B).

Concentration de l'ATIII (lot B) : $3,45 \cdot 10^{-6}$ M (A), $1,45 \cdot 10^{-5}$ M (B).

Les figures 8A et 8B illustrent expérimentalement pour l'antithrombine-III la correspondance existant entre les électrophérogrammes obtenus dans les mêmes conditions d'électrolyte support en mode zone (injection hydrodynamique de très petit volume) et en mode d'analyse frontale (injection électrocinétique continue) : le temps mesuré au point d'inflexion du front de migration de l'antithrombine-III coïncide assez bien, comme le prévoit la théorie, avec le temps de migration du soluté en électrophorèse de zone.

Lors des essais successifs d'injections électrocinétiques continues, il s'est avéré que la protéine avait également tendance à s'adsorber sur la paroi du capillaire. Plusieurs méthodes de régénération ont été expérimentées, notamment avec une solution de SDS 60 mM dans le tampon phosphate utilisé pour l'étude, selon un protocole optimisé par P. G. Righetti et coll. [28]. Cependant, les meilleurs résultats en terme de rapidité et de mise en équilibre du capillaire ont été obtenus en appliquant un protocole de rinçage hydrodynamique sous pression de 950 mbars avec NaOH 0,1 M pendant 1 minute, de l'eau distillée pendant 0,5 minute et l'électrolyte support pendant 5 minutes.

5.2.1 Vérification de la linéarité de la hauteur des paliers de concentration de l'ATIII

La méthode d'analyse frontale par injection électrocinétique continue présentée précédemment a été mise à profit en vue de la détermination des constantes d'interaction. Dans un premier temps, nous avons vérifié la linéarité de la réponse, ici la hauteur des paliers de concentration de l'antithrombine-III libre en fonction de sa concentration dans l'échantillon injecté. Quelques électrophérogrammes-type sont montrés sur la figure 9.

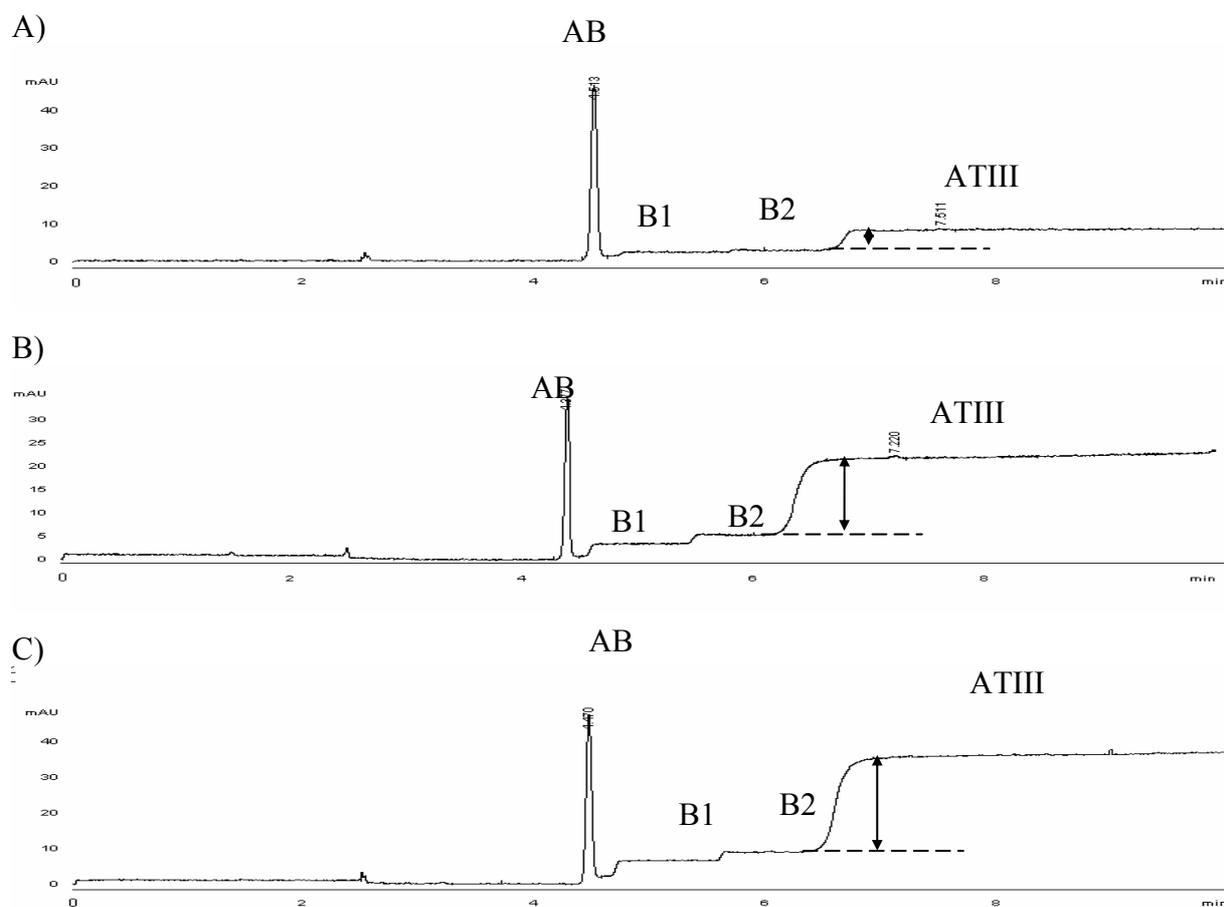


Figure 9 : Electrophérogrammes représentant des fronts de migration de l'ATIII (injectée seule) pour différentes concentrations injectées

Capillaire en silice vierge (Beckman), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm)
 Electrolyte support : tampon phosphate 45 mM pH 7,05, de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée = + 10 kV (I = 37 μA). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), ATIII (30 mbars 2 s), suivie d'une injection continue électrocinétique. Concentration de l'ATIII (échantillon B) : $6,9 \cdot 10^{-7}$ M (A), $1,72 \cdot 10^{-6}$ M (B), $2,76 \cdot 10^{-6}$ M (C) dans l'électrolyte support. Identification : AB : alcool benzylique ; B1 : palier de concentration de l'impureté B1 ; B2 : palier de concentration de l'impureté B2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII

Une légère dérive du palier de concentration de la protéine est observée, ce qui traduit la tendance de celle-ci à s'adsorber sur les parois du capillaire. Aussi, la mesure de la hauteur des paliers de concentration a été effectuée pour une mobilité électrophorétique fixe de $-13 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, à partir de la tangente du palier en ce point et en prenant comme ligne de base le palier de concentration prolongé de la seconde impureté. Les résultats des deux mesures obtenues à partir de deux injections d'échantillons d'ATIII seule pour une série de sept niveaux, effectuée au cours d'une même journée sont représentés figure 10. Les données ont été soumises à un traitement statistique conduisant à une droite de régression linéaire d'équation : $y = 9,04 \cdot 10^6 x - 1,31$ avec $R^2 = 0,99$, comme le montre la figure 10. La hauteur de palier mesurée peut donc être considérée comme proportionnelle à la concentration de l'ATIII dans l'échantillon injecté.

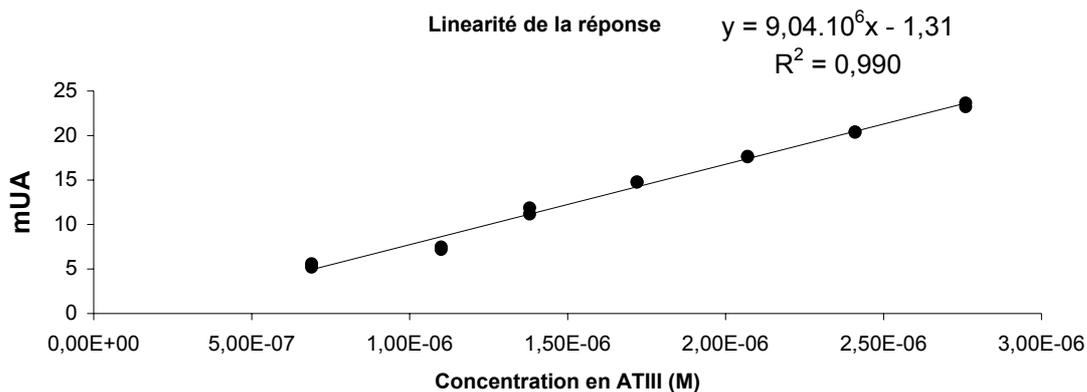


Figure 10 : Corrélation entre la hauteur des paliers de concentration des fronts de migration de l'ATIII et la concentration injectée de l'ATIII (7 niveaux de concentration dupliqués).

Dès lors, pour les déterminations de constantes ultérieures, nous avons effectué l'étalonnage de la hauteur de palier de concentration pour l'antithrombine-III libre avec

seulement deux niveaux de concentration aux extrémités de la gamme, complétés par un point de contrôle en son milieu.

5.2.2 Application à la modélisation de l'interaction entre l'ATIII et l'héparine.

Des mélanges ATIII-héparine H-1, de concentration constante en ATIII ($3,45 \cdot 10^{-6}$ M) et de concentrations variables, réparties sur sept niveaux, en héparine H-1 (de $4,8 \cdot 10^{-6}$ M à $2,12 \cdot 10^{-5}$ M) ont été préparés dans le milieu d'étude et laissés à incuber pendant deux heures à température ambiante, puis introduits en continu à l'entrée du capillaire en mode électrocinétique. Des électrophérogrammes semblables à ceux de la figure 11 ont été obtenus.

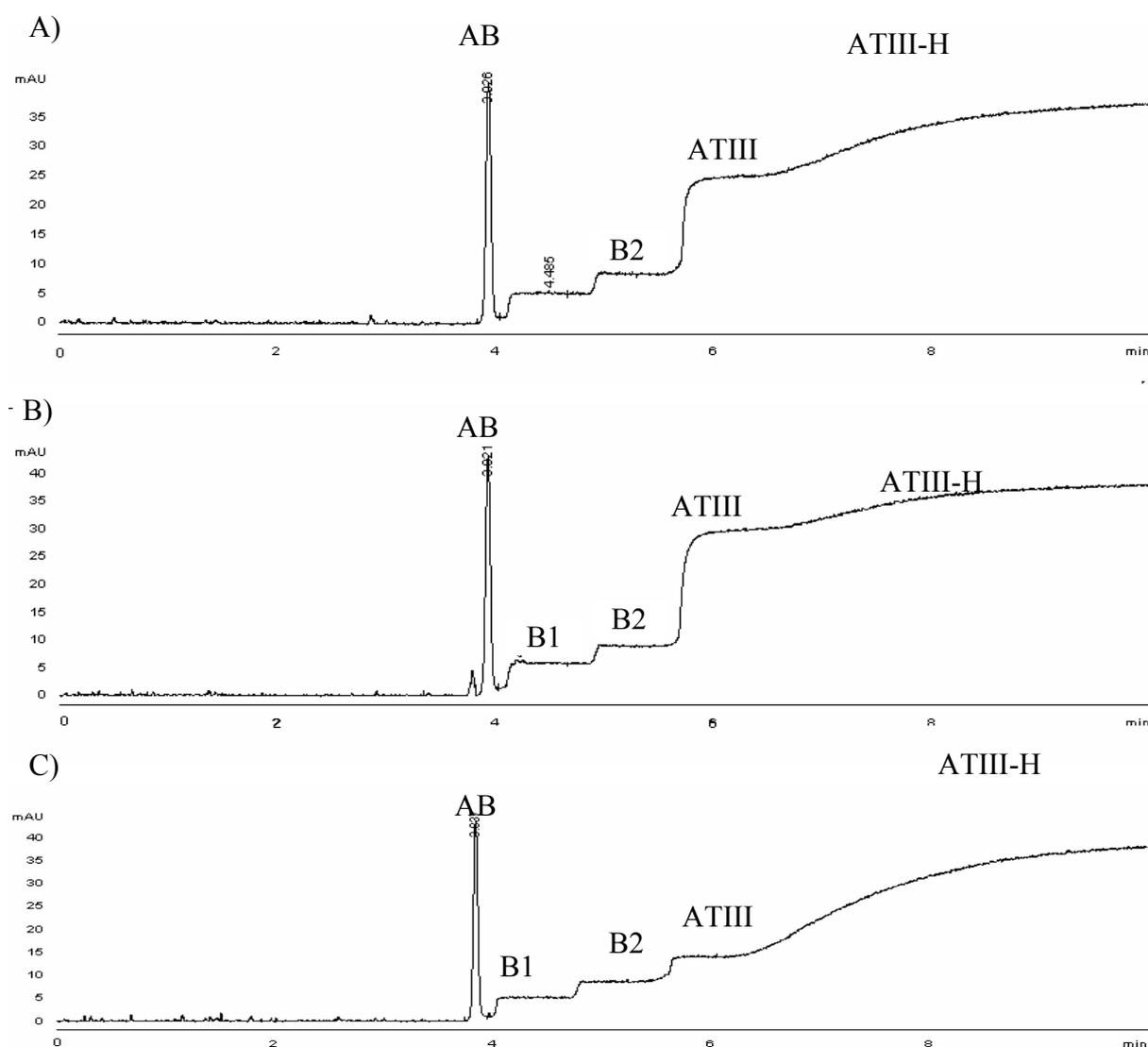


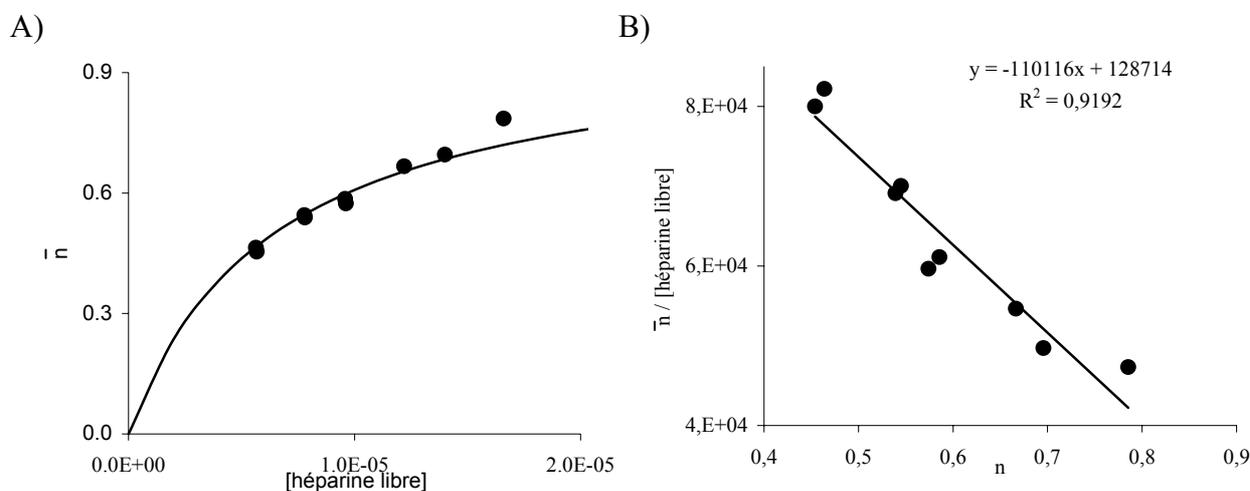
Figure 11 : Electrophérogrammes de mélanges ATIII-héparine H-1 en proportions variables injectés en continu en mode électrocinétique

Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 μ m d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm)

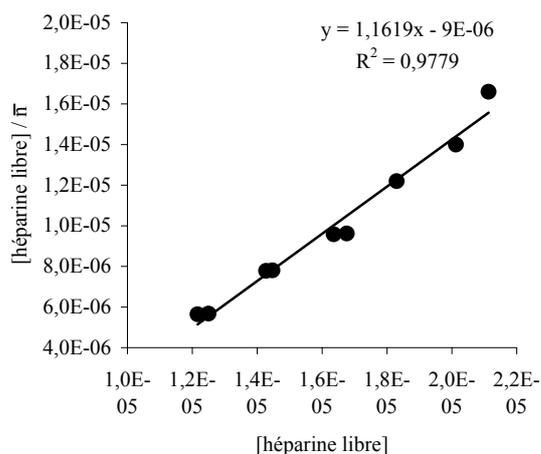
Electrolyte support : tampon phosphate 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 10 kV ($I = 37 \mu\text{A}$). Température : 25°C . Détection par absorbance UV à 200 nm. Échantillons : mélanges ATIII (lot B) $3,45 \cdot 10^{-6}\text{M}$ + héparine H-1 $4,8 \cdot 10^{-6}\text{M}$ (A), $7,5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ (B), $2,12 \cdot 10^{-5}\text{M}$ (C). Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars 2 s), suivie d'une injection continue électrocinétique de l'échantillon. Identification : AB : alcool benzylique ; B1 : palier de concentration de l'impureté B1 ; B2 : palier de concentration de l'impureté B2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII libre ; ATIII-H : front de migration des formes complexes ATIII-héparine.

Les électrophérogrammes présentent quatre fronts de migration. Les deux premiers correspondent aux impuretés B1 et B2 de l'échantillon. Le troisième front est attribué à l'antithrombine-III libre, et le quatrième au complexe. Pour des concentrations initiales croissantes d'héparine, la hauteur des deux premiers paliers de concentration ne varie pas, ce qui confirme une conclusion de l'étude par électrophorèse de zone, à savoir que l'héparine ne complexe pas les deux impuretés B1 et B2. Les concentrations en antithrombine libre sur le troisième palier ont été déterminées à partir de trois solutions-étalon d'ATIII de concentrations $6,9 \cdot 10^{-7}\text{M}$, $1,72 \cdot 10^{-6}\text{M}$, et $2,76 \cdot 10^{-6}\text{M}$ donnant une droite de régression linéaire selon la méthode des moindres carrés avec $R^2 = 0,99$.

En admettant que l'héparine complexe l'antithrombine dans un rapport 1 : 1 [13], les données expérimentales obtenues ont été exploitées selon les équations établies dans la partie théorique en faisant jouer à l'héparine le rôle de ligand et à l'ATIII celui de substrat. Cette exploitation, identique à celle menée en l'électrophorèse capillaire d'affinité [22] (où le ligand héparinique est introduit dans le capillaire), conduit aux représentations graphiques sous les formes isotherme, x-réciproque (ou de Scatchard), y-réciproque et double réciproque (figure 12).



C)



D)

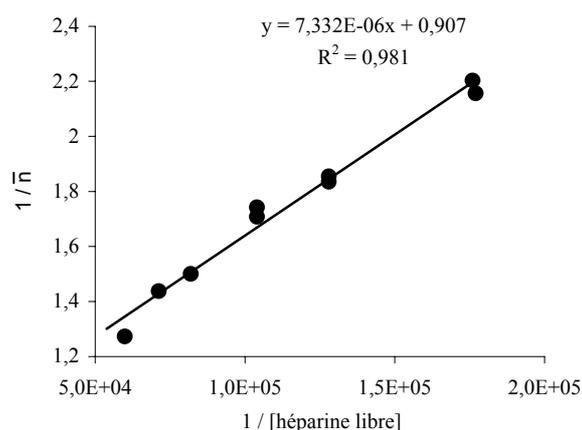


Figure 12 : Représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction ATIII-héparine H-1 par analyse frontale sous les formes de l'isotherme (A), x-réciproque (ou de Scatchard) (B), y-réciproque (C) et double réciproque (D) pour le modèle de complexation 1 : 1.

Conditions opératoires d'obtention des données : voir figure 11. Le tracé représenté figure 12A correspond à l'équation de l'isotherme avec $n = 1$ et $\log K = 5,19$ (valeur obtenue par le calcul direct, voir tableau 6).

La linéarité acceptable des représentations graphiques B-D vérifie l'hypothèse selon laquelle l'héparine H-1 se lie à l'antithrombine en formant un complexe de stœchiométrie 1 : 1 avec une constante de formation K , dont les estimations numériques par les différentes méthodes de linéarisation, sont rassemblées dans le tableau 6. On remarque également (figure 12.A) que les taux d'association moyens expérimentaux de l'héparine sur l'ATIII ne dépassent pas la valeur de 0,8, ce qui est cohérent avec l'hypothèse faite sur la stœchiométrie.

| Méthode | x-réciproque | y-réciproque | Double-réciproque | Calcul direct |
|--------------------|--------------|--------------|-------------------|---------------|
| Valeur de $\log K$ | 5,04 | 5,11 | 5,09 | 5,19 |

Tableau 6 : Estimations de la constante d'association ($\log K$) par les différentes méthodes de linéarisation et par le calcul direct

Les données expérimentales ont ensuite été exploitées selon le modèle plus général de l'adsorption multisites du ligand ATIII sur le substrat héparinique. Dans ce modèle les rôles joués par le substrat et le ligand ne sont pas symétriques. En particulier le nombre de sites est déterminé sur l'espèce prise comme le ligand. La représentation des données pour ce modèle par la méthode de linéarisation selon le mode x-réciproque est montrée figure 13.

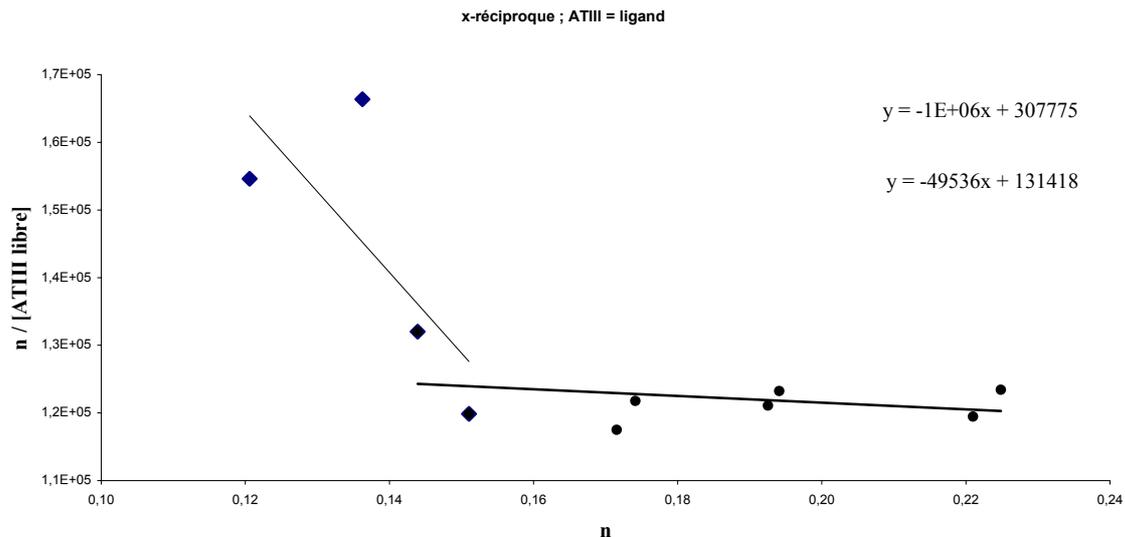


Figure 13 : Représentation des données expérimentales obtenues pour la détermination de l'interaction ATIII-héparine H-1 par analyse frontale sous la forme x-réciproque pour le modèle d'adsorption multisites de l'ATIII sur l'héparine.
Conditions opératoires d'obtention des données : voir figure 15.

Cette représentation des données fait apparaître une tendance de l'antithrombine à se lier sur l'héparine par l'intermédiaire de 2 classes de sites d'affinités différentes. Ce comportement, pourrait s'expliquer par la polydispersité de l'héparine. La détermination des paramètres des deux segments de droites conduit aux valeurs :

$$\begin{array}{ll} \log K_1 = 6,0 & n_1 = 0,31 \\ \log K_2 = 4,7 & \Sigma n = 2,65 \end{array}$$

Une seconde série de mesures (comportant 16 points répartis en 8 niveaux) réalisée sur ce même échantillon a donné les résultats suivants :

$$\begin{array}{ll} \log K_1 = 6,3 & n_1 = 0,23 \\ \log K_2 = 5,5 & \Sigma n = 0,57 \end{array}$$

En dépit d'une dispersion assez importante, ces résultats suggèrent l'existence, parmi la population des sites de l'échantillon héparinique d'environ 10 à 30% de sites de haute affinité tels que $\log K = 6,0 - 6,3$ et de 70 à 90% de sites d'affinité plus faible, tels que $\log K = 4,7 - 5,5$.

Plusieurs séries de mesures similaires à celles décrites ci-dessus ont été réalisées avec l'héparine H-3 et les oligosaccharides (non caractérisées par électrophorèse de zone) tétra et

octa-A alors disponibles. Les graphes de linéarisation des données, exploitées selon le modèle 1 :1, sont présentés en annexe A2. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 7.

| Héparine | Nb de mesures/ niveaux | Méthode de calcul | | | |
|----------|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|
| | | x-réciproque | y-réciproque | Double-réciproque | Calcul direct |
| H-1 | 9 / 7 | 5,1 +/- 0,06 | 5,1 | 5,1 | 5,2 +/- 0,1 |
| H-1 | 16 / 8 | 5,0 +/- 0,1 | 5,0 | 5,0 | 5,2 +/- 0,2 |
| H-3 | 10 / 5 | 6,1 +/- 0,2 | 6,1 | 6,2 | 6,1 +/- 0,15 |
| Octa-A. | 10 / 6 | 3,1 +/- 0,5 | 3,1 | 3,1 | 2,9 +/- 0,15 |
| Tétra. | 6 / 4 | log K < 2 | | | |

Tableau 7 : Valeurs estimées de la constante d'association (log K) pour l'héparine de basse masse moléculaire H-1, l'héparine standard H-3, les oligosaccharides tétra et octa-A d'héparine pour le modèle de complexation 1 :1.

Il est à noter que seule la méthode x-réciproque permet d'approcher facilement un intervalle de confiance pour un risque $\alpha = 0,05$ sur K, en supposant que l'écart des points à la linéarité est le reflet de l'incertitude sur la concentration de l'ATIII libre estimée et que les variables portées en abscisse et en ordonnée ne sont pas liées. En effet les autres méthodes de linéarisation font intervenir pour le calcul de K le rapport de deux variables aléatoires non indépendantes. Enfin pour la fraction tétrasaccharidique, la faible variation de la hauteur de palier de concentration en ATIII libre pour les mélanges réalisés ne permet d'approcher la valeur de K que très grossièrement.

Par comparaison avec la littérature [13], qui rapporte, dans le modèle d'interaction 1 :1, $\log K = 7,7$ pour le pentasaccharide et $\log K = 4,7$ pour une héparine de basse affinité, l'héparine H-1 se situerait globalement plutôt vers les basses affinités, tandis que l'héparine H-3 occuperait une position intermédiaire entre les basses et les hautes affinités. D'autre part la valeur de $\log K$ de 6,5 obtenue par ailleurs au Laboratoire [22] pour H-3 en milieu tampon phosphate de pH 7,05 et de force ionique 50 mM par la méthode de variation des mobilités, n'est pas incompatible avec celle, plus faible, estimée ici en milieu phosphate plus concentré, une augmentation de la force ionique du milieu traduisant une réduction des interactions électrostatiques ATIII-héparine, par un effet compétiteur accru des ions phosphate vis-à-vis

de l'héparine. Une étude complémentaire de l'influence de la force ionique apparaît de ce point de vue très intéressante (voir chapitre 7.2).

Des réserves doivent cependant être émises concernant l'exactitude des déterminations : d'une part le titre de la solution mère d'antithrombine III n'est garanti que par l'activité enzymatique de cette solution donnée par le fabricant, celle-ci n'a pas été vérifiée ; d'autre part l'héparine étant hétérogène, les calculs de constantes ont été effectués à partir des masses moléculaires moyennes en poids (plus précises que celles indiquées tableau 2) disponibles pour ces échantillons.

Le temps nécessaire pour déterminer les paramètres de l'interaction ATIII-héparine, avec 5 niveaux de concentration et étalonnage de la hauteur de palier de l'antithrombine III, est de 6 heures, réparties en 2 heures de préparation de l'échantillon, 2 heures de rinçage et de régénération du capillaire et 2 heures de migration.

5.2.3 Méthode rapide de détermination d'une constante

Le protocole d'analyse frontale précédent a été modifié de façon à permettre des déterminations encore plus rapides des constantes d'interaction. Dans ce but, l'injection du mélange interactif par l'entrée du capillaire a été remplacée par une injection côté « fenêtre de détection » du capillaire. La longueur de la migration est alors réduite à 8,5 cm. Quelques électrophérogrammes obtenus avec l'héparine H-3 par ce protocole sont représentés figure 14.

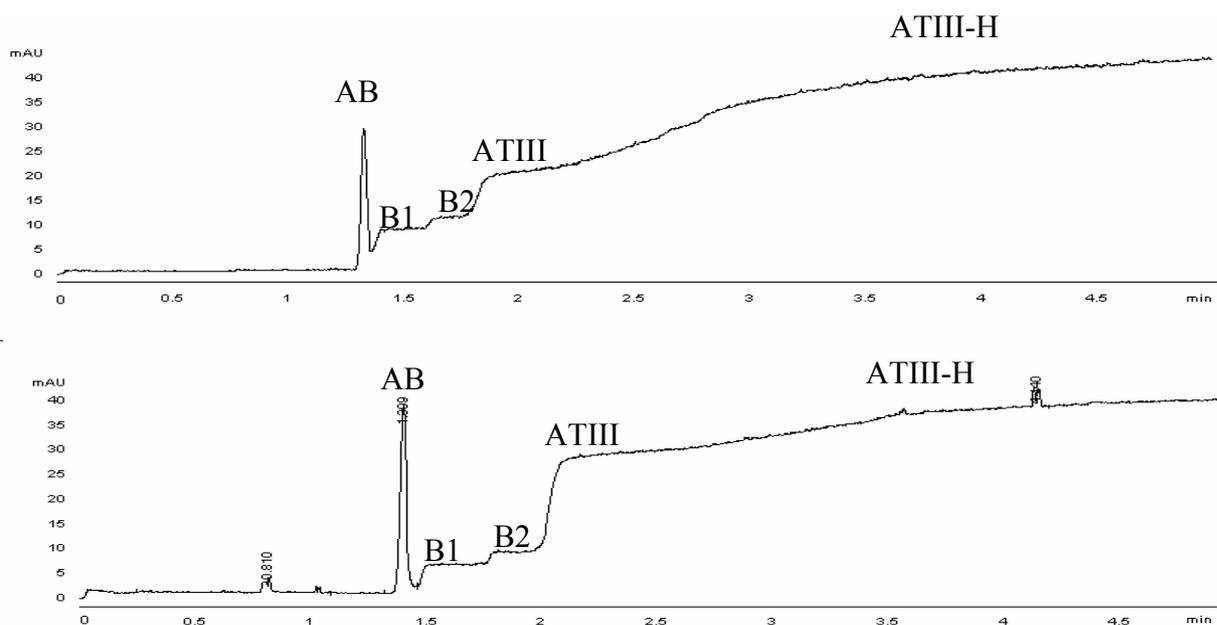


Figure 14 : Electrophérogrammes de mélanges ATIII-héparine H-3 injectés en continu en mode électrocinétique du côté « fenêtre de détection » du capillaire

Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 µm d.i. x 35 cm (longueur utile 8,5 cm)

Electrolyte support : tampon phosphate 45 mM de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3). Tension appliquée : -10 kV ($I = 37\mu\text{A}$). Détection par absorbance UV à 200 nm. Température : 25 °C. Echantillons : mélange ATIII $3,45 \cdot 10^{-6}$ M + héparine H-3, $1,5 \cdot 10^{-6}$ M (A), $3,5 \cdot 10^{-6}$ M (B). Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (-30 mbars, 2 s), électrolyte support (-30 mbars, 1 s), échantillon (-30 mbars, 1 s), suivie d'une injection électrocinétique continue de l'échantillon. Identification : AB : alcool benzylique ; B1 : palier de concentration de l'impureté B1 ; B2 : palier de concentration de l'impureté B2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII ; ATIII-H : palier de concentration du complexe ATIII-héparine.

Une nouvelle détermination de la constante pour l'héparine de basse masse moléculaire H-1 a été effectuée par ce protocole. Les valeurs de log K évaluées par les diverses méthodes de calcul sont rassemblées dans le tableau 8. Les mesures effectuées se révèlent sensiblement plus dispersées que pour une injection effectuée par l'entrée du capillaire. Ceci pourrait provenir des conditions de température sensiblement différentes dans lesquelles cette détermination a été effectuée, la plus grande partie de la longueur utile du capillaire dans ce cas se trouvant à l'extérieur de la cartouche thermorégulée, et donc sensible à la température ambiante.

Ces valeurs de log K se situent pour certaines légèrement en dehors de l'intervalle de confiance évalué précédemment pour une injection effectuée par l'entrée du capillaire. Cette approche originale peut toutefois être recommandée pour une première détermination rapide d'une constante d'interaction, notamment dans une stratégie de criblage de nouveaux récepteurs ou ligands. Ainsi ce protocole ramène la durée de détermination d'une constante à 4,5 heures (pour 5 niveaux de concentration et étalonnage de la hauteur du palier de l'antithrombine III), réparties en 2 heures de préparation de l'échantillon, 2 heures de rinçage et de régénération du capillaire et 0,5 heure de migration, au lieu de 6 heures pour les mêmes échantillons analysés par l'entrée du capillaire (2h de préparation, 2 heures de rinçage et de régénération du capillaire et 2 heures de migration).

| Nb de mesures/ niveaux | Methode de calcul | | | |
|---------------------------|-------------------|-------------|------------------|---------------|
| | x-réiproque | y-réiproque | Double-réiproque | Calcul direct |
| 10 / 8 | 4,8 +/- 0,3 | 4,8 | 5,0 | 5,2 +/- 0,1 |

Tableau 8 : Valeurs estimées de la constante d'association (log K) pour l'héparine de basse masse moléculaire H-1 par le protocole d'injection côté « fenêtre » de détection dans le modèle d'interaction 1 :1.

Conditions opératoires : voir figure 14

5.2.4 Conclusion sur la mise au point de la méthode d'analyse frontale

Au cours de cette partie, nous avons étudié par électrophorèse capillaire les interactions développées par quelques fractions hépariniques avec l'antithrombine-III.

La méthode retenue pour cette étude a été celle de l'analyse frontale. Après optimisation de différents paramètres tels que longueur du capillaire, mode d'injection, tension appliquée, concentration des échantillons, régénération du capillaire, il s'est avéré que les meilleurs résultats en terme de qualité des mesures (allure des fronts de migration obtenus pour les mélanges héparine-antithrombine-III), de durée requise pour une détermination de constantes d'interaction, et de consommation d'échantillon ont été obtenus en utilisant un capillaire de 35 cm de longueur, l'échantillon étant injecté en continu en mode électrocinétique simultanément à sa migration par application d'une tension de + 10 kV. L'obtention d'électrophérogrammes propices à la détermination de constante par ce protocole laisse par ailleurs supposer que la dérive du palier de l'antithrombine III, observée en mode d'injection hydrodynamique (figure 7), serait liée à une dissociation du complexe au cours de la migration électrophorétique. Une détermination de constante avec une bonne fiabilité (intervalle de confiance estimé à environ 0,1 unité logarithmique) nécessite alors environ 6 à 7 heures (comprenant décongélation et préparation des échantillons, séparations, étalonnage et rinçage des capillaires) pour cinq niveaux de concentration. Un protocole rapide a été proposé, consistant à introduire l'échantillon du côté fenêtre de détection du capillaire. Ce protocole permet de réduire la durée de la migration d'un facteur trois, ce qui ramène la durée totale de la procédure à environ 4,5 heures.

Cette approche par analyse frontale électrophorétique en mode d'injection électrocinétique continue peut être retenue comme méthode de choix pour l'évaluation dans

des études ultérieures de l'influence d'autres paramètres tels que la nature de la fraction héparinique et de la cible, le milieu d'étude (pH, force ionique), la température, afin d'affiner les connaissances actuelles sur ce polysaccharide sulfaté dont les propriétés biologiques et thérapeutiques restent encore à explorer.

6 Applications du protocole d'analyse frontale développé

Au moyen du protocole d'analyse frontale précédent, il semble intéressant d'étudier l'influence du milieu (pH et force ionique), de la taille des oligosaccharides et de leur mode de purification sur l'interaction entre l'antithrombine III et l'héparine. Cependant, l'antithrombine III existe sous deux isoformes majoritaires α (rapportée comme majoritaire pour les échantillons commerciaux de la protéine [29]) et β qui présentent des affinités différentes pour l'héparine (l'isoforme β étant la plus affine). Pour ces nouvelles applications, nous avons dans un premier temps caractérisé la protéine par chromatographie électrocinétique micellaire [30].

6.1 Caractérisation par électrochromatographie micellaire de l'antithrombine III

Pour cette étude, l'échantillon d'antithrombine III C et E ont été utilisés. Ces lots d'antithrombine III (origine Chromogenix ou Hyphen-Biopep) ont été caractérisés par chromatographie électrocinétique micellaire (figure 15) selon le protocole de Dönges et coll. [28] qui permet de séparer les isoformes α et β de la protéine.

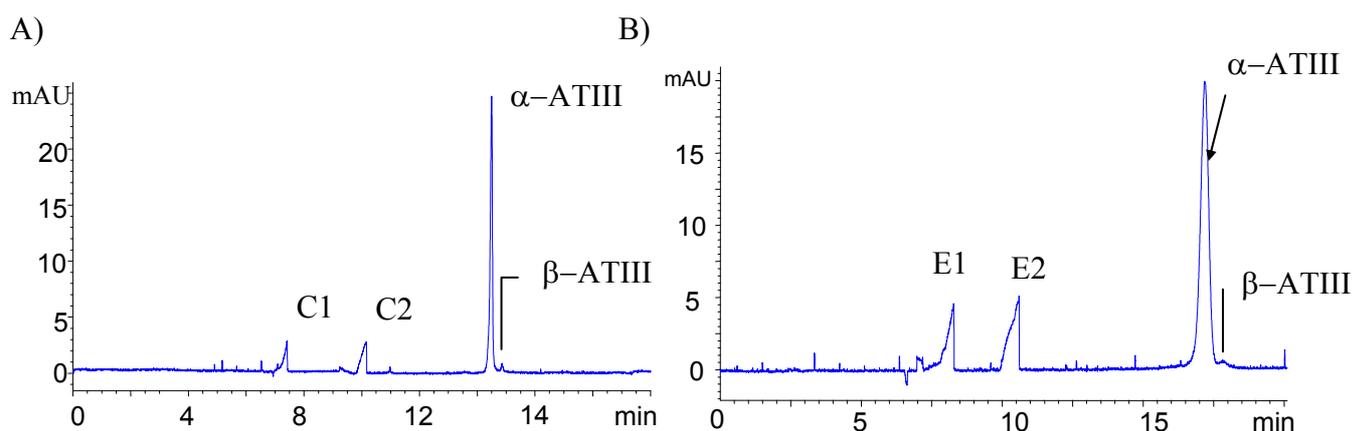


Figure 15 : Caractérisation des échantillons d'antithrombine III par chromatographie électrocinétique micellaire

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 70 cm (longueur utile 62,5 cm) (A), 50 μm d.i. x 58,5 cm (longueur utile 50 cm) (B). Electrolyte support : tampon borate de sodium 60 mM de pH 9,0 contenant 40 mM de dodécylsulfate de sodium, 20 mM de β -cyclodextrine, et 1 mM de diaminopentane . Tension appliquée : + 20 kV ($I = 23 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par

absorbance UV à 200 nm. Injection hydrodynamique de l'échantillon C d'ATIII d'origine Chromogenix $1,75 \cdot 10^{-5}$ M, 50 mbars, 1 s (A), de l'échantillon E d'ATIII d'origine Hyphen-Biopep $1,28 \cdot 10^{-5}$ M, 30 mbars, 2s (B). Identification : C1, C2, E1, E2: impuretés; α -ATIII: isoforme α de l'antithrombine III; β -ATIII: isoforme β de l'antithrombine III.

Ces deux isoformes diffèrent par le nombre de chaînes osidiques greffées sur la protéine. L'isoforme α est la plus glycosylée avec quatre chaînes osidiques sur les positions Asn-96, Asn-135, Asn-155, et Asn-192, l'isoforme β ne possédant que trois ramifications (Asn-96, Asn-155, et Asn-192) [30]. De ce fait ces isoformes ont pu être séparées par chromatographie électrocinétique micellaire. Plus hydrophile que l'isoforme β , l'isoforme α est la moins retenue. Les expériences réalisées en MECC montrent que les échantillons sont constitués de l'isoforme α de l'antithrombine III à 97% pour l'échantillon Chromogenix et à 98,5% pour l'échantillon Hyphen-Biopep. Enfin cette série d'expériences permet d'éliminer l'albumine comme impureté potentielle de ces lots (pour C1, C2, E1, E2), cette dernière migrant après l'antithrombine III dans les conditions de l'expérience [29].

6.2 Etude de l'influence du pH et la force ionique du milieu

Pour cette étude nous avons déterminé la constante d'interaction entre l'ATIII (lot C) et un nouveau lot de l'héparine H-1 dans différents électrolytes (pH de 6,45 à 7,05 et force ionique de 50 à 150 mM). Pour cela, le protocole mis au point dans la partie précédente a été appliqué à l'identique avec ce nouveau lot d'héparine H-1. Les régressions linéaires alors obtenues sont indiqués en annexe A2. A titre d'exemple, les électrophérogrammes obtenus dans un tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM sont montrés figure 16. Comme dans la partie précédente, les électrophérogrammes présentent tout d'abord le pic de marqueur neutre, puis les deux fronts de migration des impuretés C1 et C2, le front d'antithrombine III libre et le front du complexe ATIII- héparine. On constate de plus que les impuretés présentes dans l'échantillon protéique ne complexent pas le polysaccharide, la hauteur de ces paliers ne variant pas sous l'effet de l'addition d'héparine dans le milieu.

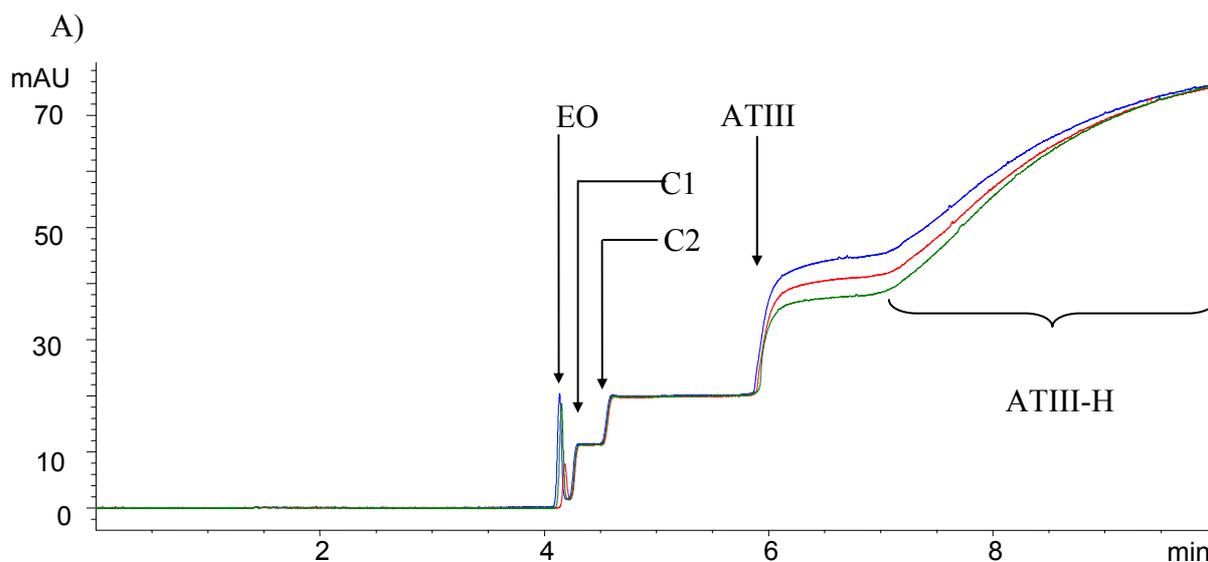


Figure 16: Electrophérogrammes en mode frontal de mélanges ATIII-H-1 en proportions variables injectés en continu en mode électrocinétique.

Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm)
 Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 10 kV ($I_{\text{moyenne}} = 22 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : ATIII 7.10^{-6}M + H-1 $1,3.10^{-5}\text{M}$, $1,5.10^{-5}\text{M}$, $1,7.10^{-5}\text{M}$ (de haut en bas) ; Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars 2 s), suivie d'une injection continue électrocinétique de l'échantillon. Identification : EO : Alcool benzylique; C1 : palier de concentration de l'impureté C1 ; C2 : palier de concentration de l'impureté C2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII libre ; ATIII-H-1 : front de migration des formes complexes ATIII-héparine.

Les résultats des déterminations effectuées en fonction du pH du tampon phosphate à force ionique constante (50 mM) ont été exploités selon le modèle multisites d'énergies identiques (tableau 9) en faisant jouer à l'antithrombine III le rôle de ligand.

| | | | |
|-------|--------------|------|------|
| pH | 6,45 | 6,78 | 7,05 |
| log K | 6,05 et 5,14 | 6,12 | 5,94 |
| n | 0,50 et 0,81 | 0,44 | 0,40 |

Tableau 9 : Paramètres de l'interaction entre l'ATIII (ligand) et l'héparine H-1 (substrat) en milieu phosphate de pH variable et de force ionique constante (50 mM)

Nota : pour chaque paramètre, les valeurs indiquées sont la moyenne des paramètres calculés par les trois méthodes de régression linéaire.

Composition des électrolytes : voir annexe A3.

Pour pH = 6,45, les mesures laissent apparaître deux affinités (une affinité forte et une plus faible) de valeurs voisines du lot d'héparine H-1 précédent. Aussi, compte tenu de la valeur des nombres de sites trouvés pour chacune des deux affinités, il semble pour ce nouveau lot d'héparine H-1 que 80 % des chaînes hépariniques possèdent le site d'interaction

faible, et que 50 % possèdent le site fort au pH de 6,45. A mesure que le pH du milieu augmente, on constate que l'affinité faible n'est plus détectée et que le nombre de sites calculés pour la forte affinité diminue. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le caractère anionique de l'antithrombine III (de point isoélectrique 5,1) augmente, ce qui accroît ainsi les répulsions électrostatiques entre la protéine et les chaînes du polysaccharide sulfaté. Concernant la haute affinité, il semble que le pH n'ait que peu d'influence sur la valeur de la constante obtenue. L'influence de la force ionique a ensuite été étudiée (tableau 10).

| | | | |
|--------|------|------|---------------------|
| I (mM) | 50 | 100 | 150 |
| log K | 6,12 | 6,38 | Résultats dispersés |
| n | 0,44 | 0,36 | |

Tableau 10 : Paramètres de l'interaction entre l'ATIII (ligand) et l'héparine H-1 (substrat) en milieu phosphate de force ionique I variable et de pH constant (6,78).

Nota : pour chaque paramètre, les valeurs indiquées sont la moyenne des paramètres calculés par les trois méthodes de régression linéaire.

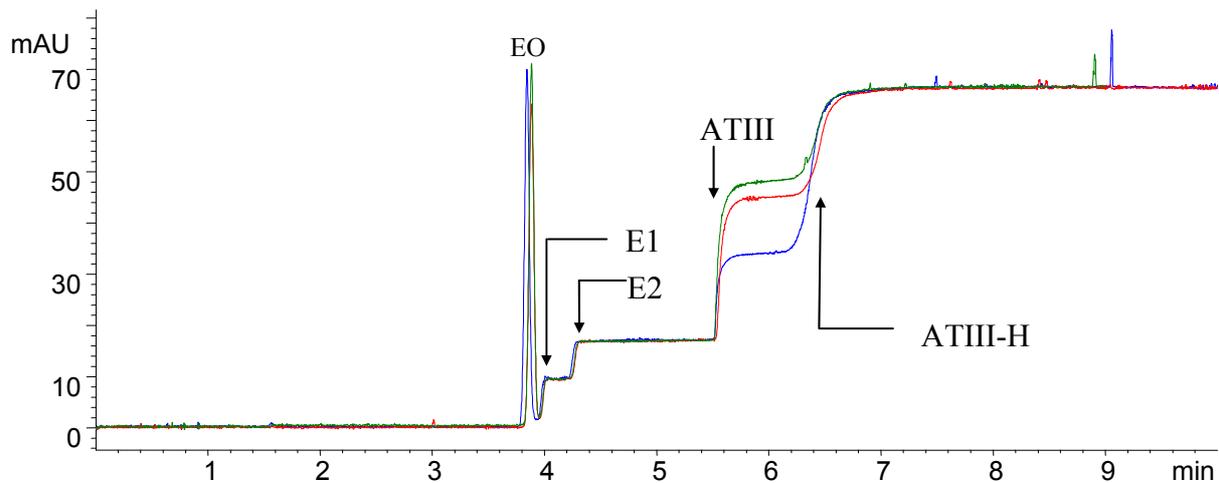
Composition des électrolytes en annexe A3.

A la plus forte force ionique étudiée, les électrophérogrammes ne présentent aucune anomalie visible. Néanmoins, il n'a pas été possible de calculer une valeur pour la constante entre l'ATIII et l'héparine, les résultats étant alors très dispersés. Parmi les hypothèses possibles, mentionnons une possible transition de phase pour l'antithrombine III, comme c'est le cas pour la protéine albumine de masse moléculaire et de pI proches [31]. De ce point de vue, une étude par turbidimétrie serait très intéressante. Aussi, il semble que la constante de haute affinité augmente légèrement avec la force ionique du milieu ce qui serait compatible avec les données de la littérature pour lesquelles on trouve que les interactions non-ioniques représentent, à pH et force ionique physiologiques, environ 60% de l'enthalpie libre totale de formation [17]

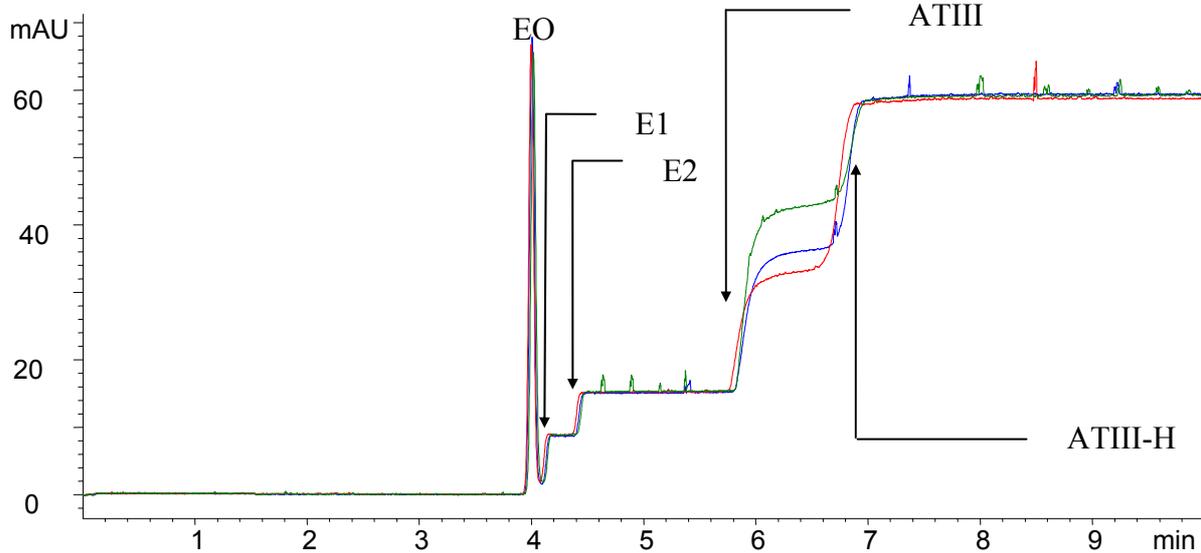
6.3 Détermination des paramètres d'interaction (constante et nombre de sites) entre les oligosaccharides hépariniques affins et l'ATIII.

Cette étude a pour but d'évaluer l'impact du processus de purification et de la longueur de la chaîne héparinique sur les paramètres de l'interaction (constante et nombre de sites actifs) avec la protéine cible (ATIII). La figure 17 montre les électrophérogrammes expérimentaux obtenus lors de l'injection des mélanges ATIII (échantillon E) – oligosaccharides supposés affins.

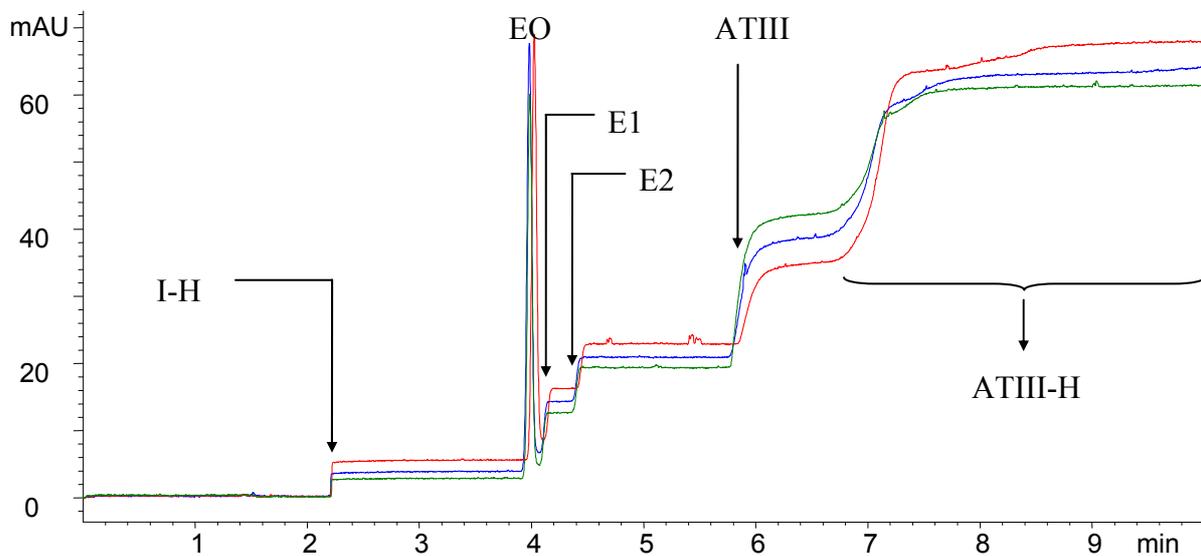
A)



B)



C)



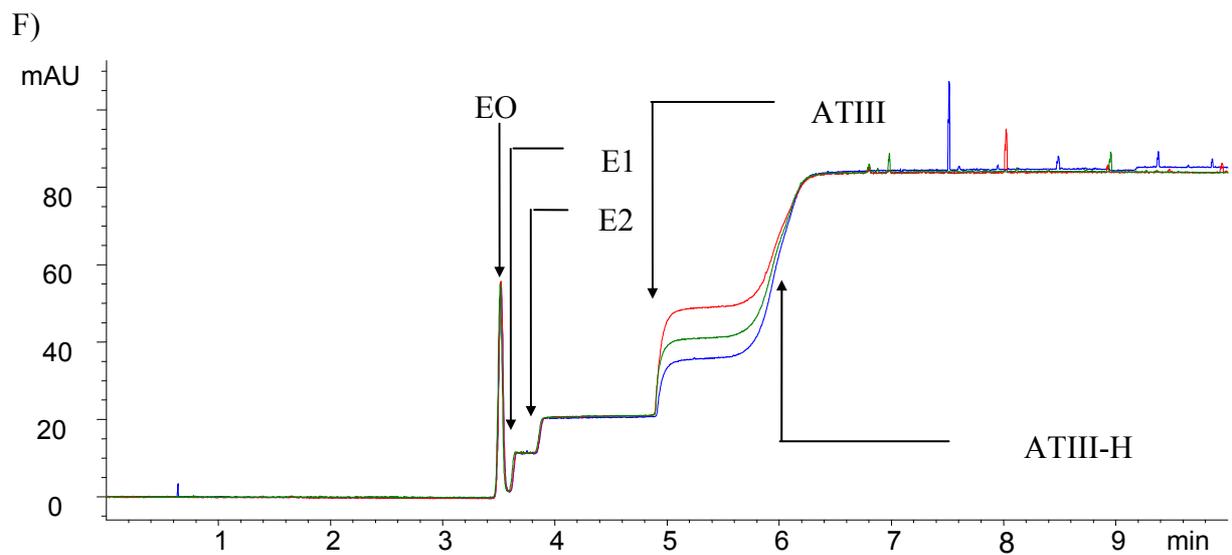
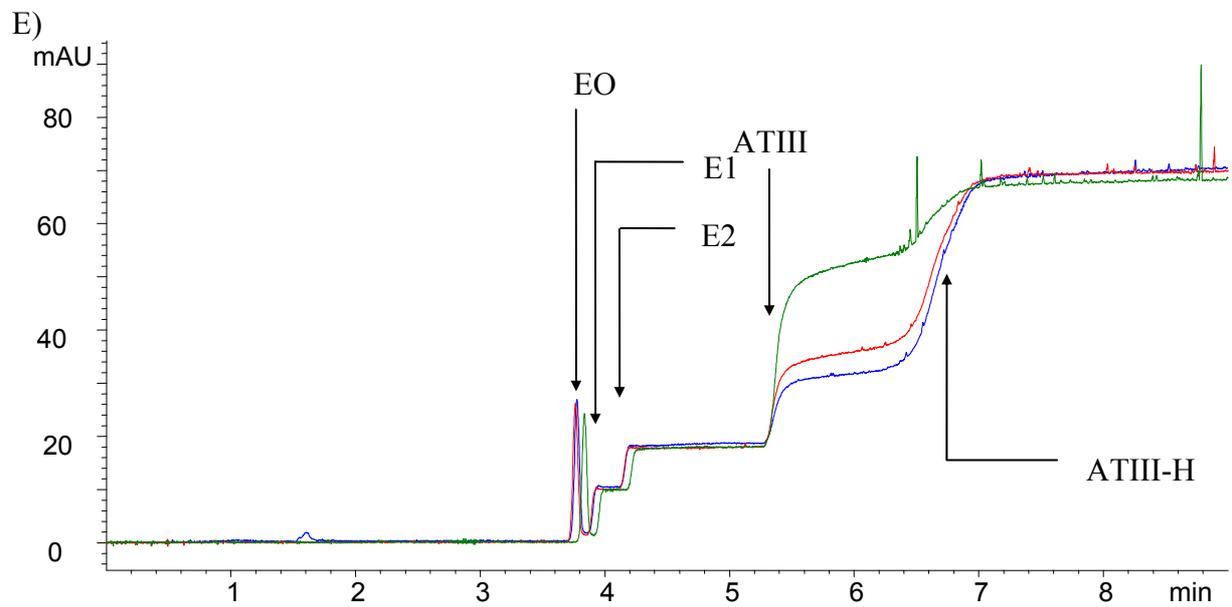
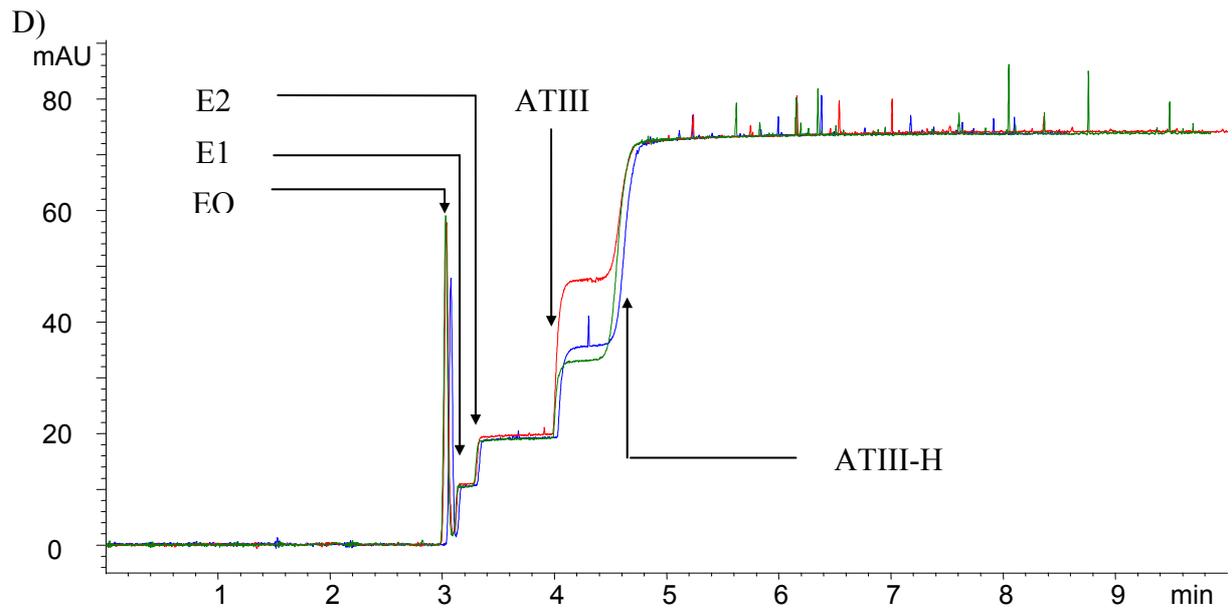


Figure 17: Electrophérogrammes en mode frontal de mélanges ATIII-oligosaccharides de l'héparine affins en proportions variables injectés en continu en mode électrocinétique.

Capillaire en silice vierge (Phymep), 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm)
Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Tension appliquée : + 10 kV ($I_{\text{moyenne}} = 22 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons :

(A) ATIII 4.10^{-6} M + hexa-A $8,5.10^{-6}$ M, $1,09.10^{-5}$ M, $7,15.10^{-5}$ M (de haut en bas);
(B) ATIII $4.3 \cdot 10^{-6}$ M + hexa-B $2,2.10^{-6}$ M, $3,3.10^{-5}$ M, $3,7.10^{-5}$ M (de haut en bas) ;
(C) ATIII $4.3 \cdot 10^{-6}$ M + hexa-C $8,9.10^{-5}$ M, $1,2.10^{-4}$ M, $1,7.10^{-4}$ M (de haut en bas) ;
(D) ATIII $4,5.10^{-6}$ M + octa-B $7,0.10^{-6}$ M, $1,08.10^{-5}$ M, $1,17.10^{-5}$ M (de haut en bas) ;
(E) ATIII 4.10^{-6} M + deca-B $8,5.10^{-6}$ M, $1,09.10^{-5}$ M, $7,15.10^{-5}$ M (de haut en bas) ;
(F) ATIII $5,25.10^{-6}$ M + deca-C $6,4.10^{-6}$ M (A), $8,0.10^{-6}$ M (B), $9,2.10^{-6}$ M (C) (de haut en bas).
Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars 2 s), suivie d'une injection continue électrocinétique de l'échantillon. Identification : EO : Alcool benzylique (A) formamide (B-F); E1 : palier de concentration de l'impureté E1 ; E2 : palier de concentration de l'impureté I2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII libre ; ATIII-H : front de migration des formes complexes ATIII-héparine ; I-H : front de migration de l'impureté du dérivé héparinique hexa-C.

Excepté pour l'échantillon hexa-C, les électrophérogrammes en mode frontal des mélanges de l'ATIII et des nouveaux dérivés hépariniques présentent une allure similaire à ceux obtenus précédemment avec l'héparine H-1. La hauteur des paliers des impuretés E1 et E2 de l'ATIII ne varie pas avec l'augmentation de la concentration en dérivé héparinique. Ceci montre que les oligosaccharides de l'héparine ne complexent pas les deux impuretés, aux concentrations de polysaccharide étudiées. De ce fait la présence de ces impuretés dans l'échantillon n'affecte pas les mesures d'interaction effectuées pour l'antithrombine III. En plus des fronts décrits précédemment, l'hexasaccharide hexa-C présente un front supplémentaire de mobilité $+31,1.10^{-5} \text{ cm}^2. \text{V}^{-1}. \text{s}^{-1}$ au point d'inflexion (figure 17-C). Cet échantillon possède donc une impureté cationique susceptible d'interagir avec le polysaccharide anionique, et donc de perturber la mesure effectuée sur l'antithrombine III. Néanmoins, la hauteur h du palier de concentration pour cette impureté cationique est proportionnelle à la concentration du polysaccharide ($h(\text{mAU}) = 32068 \times (M)$, $R^2 = 0,997$). Dans le cas où il existerait une interaction entre l'héparine et cette impureté cationique, la concentration de l'héparine disponible pour la complexation avec l'antithrombine III resterait donc proportionnelle à la concentration introduite.

Comparés à ceux obtenus pour l'héparine H-1, les électrophérogrammes obtenus pour les nouveaux dérivés hépariniques présentent un front très peu étalé pour la forme complexe ATIII-polysaccharide. Ceci est cohérent avec la plus faible dispersité de ces dérivés hautement purifiés. Les mobilités électrophorétiques des formes complexes des différents dérivés hépariniques ont été calculées au point d'inflexion de leur front de migration (Tableau 11).

| Dérivé | Hexa-A | Hexa-B | Hexa-C | Octa-B | Deca-B | Deca-C |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Mobilité électrophorétique de la forme complexée ($10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) | -15,5 | -15,7 | -16,3 | -16,5 | -17,2 | -17,3 |

Tableau 11 : mobilité au point d'inflexion du front du complexe ATIII-héparine pour les oligosaccharides de l'héparine affins.

Nota : Les valeurs calculées tiennent compte de la correction pour la longueur effective de migration, du fait de l'introduction hydrodynamique de l'échantillon.

Mis à part l'hexasaccharide hexa-C, la mobilité électrophorétique des complexes augmente sensiblement avec la longueur de l'oligosaccharide, ce qui pourrait s'expliquer par un accroissement de la charge du complexe ATIII-Héparine, les masses de ces complexes n'augmentant que d'environ 1% par dissaccharide supplémentaire. On remarque en outre que la mobilité du complexe ATIII-hexa-C est proche de celle du complexe ATIII-octa-B, ce qui pourrait traduire un taux de sulfate plus élevé pour l'hexa-C.

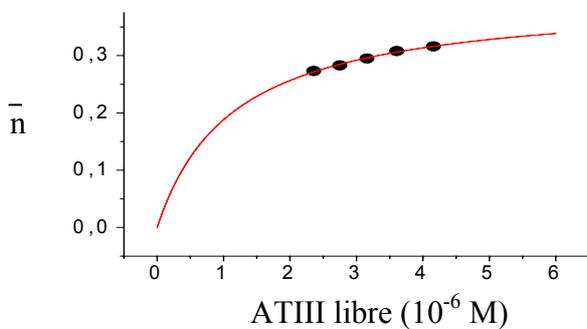
Pour l'exploitation des mesures, nous avons choisi le modèle d'interaction multisites d'énergies identiques. Nous avons donc effectué les exploitations en inversant successivement les rôles joués par l'antithrombine III et les dérivés hépariniques.

6.3.1 Exploitation des mesures : Adsorption de l'antithrombine III sur les dérivés hépariniques.

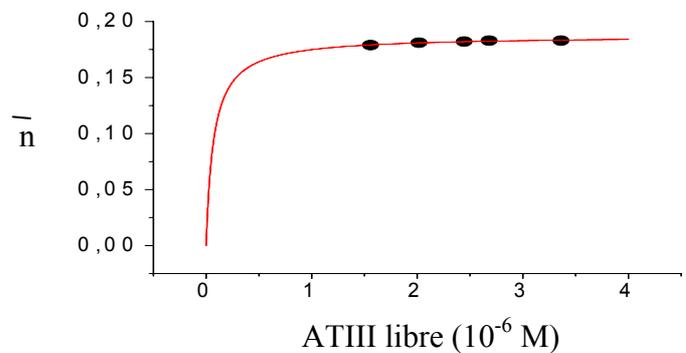
L'exploitation des données expérimentales pour les électrophérogrammes obtenus a tout d'abord été effectuée en prenant l'ATIII comme ligand et le dérivé héparinique comme substrat ce qui donne accès au nombre de sites d'interaction de l'ATIII sur le dérivé héparinique. L'ATIII étant expérimentalement directement quantifiée, ce choix permet de limiter les hypothèses initiales sur le modèle réactionnel. La représentation des isothermes (figure 18) montre que, pour les hautes affinités obtenues avec les échantillons hexa-A, hexa-B, octa-B, et deca-C, il serait souhaitable d'effectuer des mélanges ATIII-polysaccharide supplémentaires en vue d'obtenir une gamme de concentration de l'ATIII libre typiquement centrée autour de la valeur de K^{-1} c'est-à-dire dans l'intervalle $5 \cdot 10^{-8} - 1,5 \cdot 10^{-6}$ M. Ceci représente un abaissement de jusqu'à 40 fois la concentration d'ATIII libre la plus basse réalisée dans cette série d'expériences. Il serait ainsi nécessaire, en plus de contrôler parfaitement les concentrations initiales introduites pour chacun des deux partenaires dans des volumes restreints, d'augmenter la réponse pour l'ATIII. Pour ce faire, il serait possible par exemple de choisir une longueur d'onde de détection en dessous de 200 nm, d'utiliser des

capillaires avec cellule de détection « bulle », ou de diamètre plus important, ou encore de recourir à l'utilisation d'une cellule en Z. Parmi ces solutions, la dernière semble la plus satisfaisante. En effet, le spectre de l'antithrombine (Annexe 1) montre que la détection de l'ATIII à son maximum d'absorbance permet d'envisager un accroissement de sensibilité de seulement environ 1,5, le recours à une cellule bulle autorisant un gain de sensibilité d'un facteur 2,5 et la cellule en Z d'un facteur 15. L'ajustement non linéaire des isothermes d'association et les différentes méthodes de linéarisation conduisent aux résultats regroupés dans le tableau 12. Nous avons comparé ces résultats avec ceux obtenus pour l'héparine H-1 dans les mêmes conditions expérimentales.

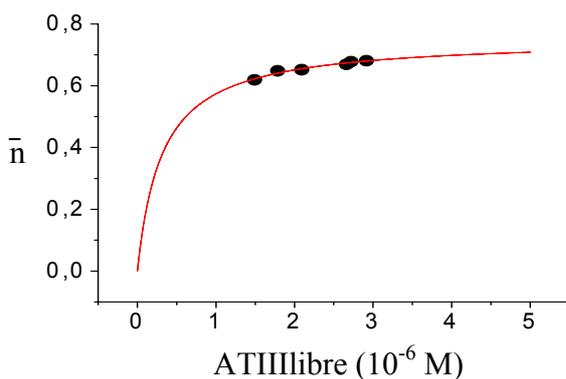
A) Héparine H-1



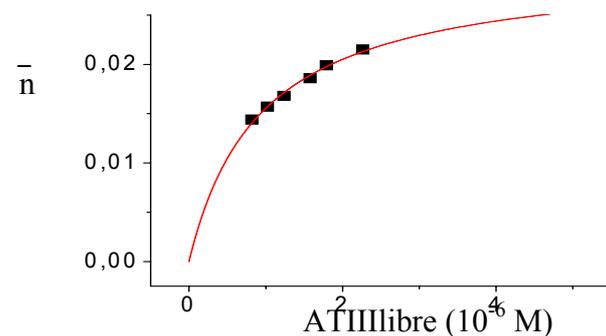
B) Hexa-A



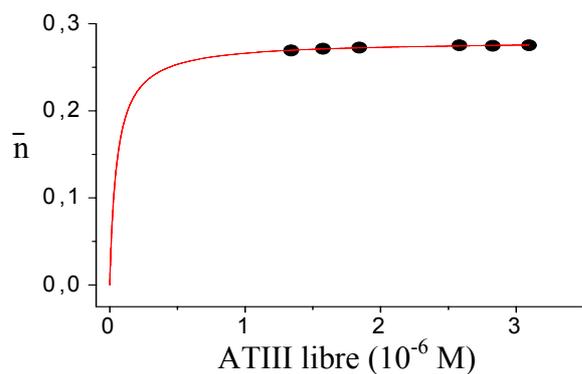
C) Hexa-B



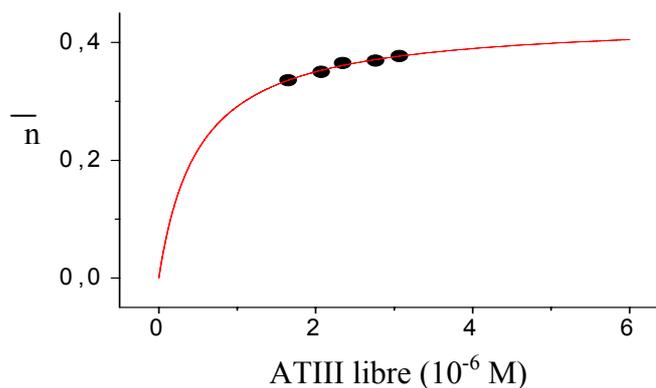
D) Hexa-C



E) Octa-B



F) Deca-B



G) Deca-C

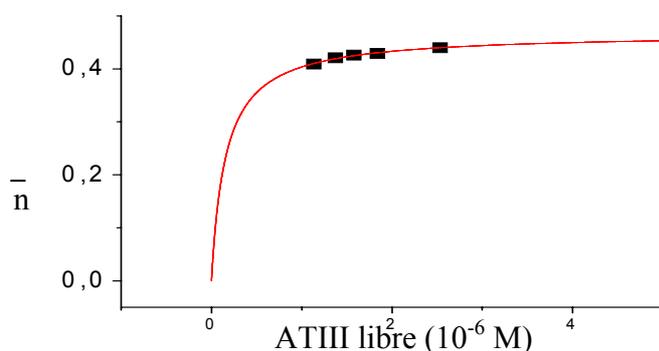


Figure 18 : Isothermes d'association du ligand antithrombine III (ATIII) et des différents substrats hépariniques affins.

Conditions expérimentales : voir figure 17.

Pour la détermination des paramètres d'interaction entre l'ATIII et un échantillon polysaccharidique, l'ensemble des méthodes de calculs, qui accordent un poids statistique différent aux points expérimentaux [32], conduit à l'obtention de valeurs homogènes. Une répétition de la détermination de la constante d'interaction entre l'ATIII et l'héparine H-1 permet d'évaluer la précision des mesures de constante à environ 0,1 unité logarithmique. Bien que les différentes méthodes d'ajustements linéaires et non linéaires de l'isotherme conduisent à des valeurs homogènes, on note que les valeurs obtenues par le calcul direct diffèrent. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la constante déterminée par les premières méthodes est de type ligand-site (constante intrinsèque) tandis que le calcul direct prend en compte l'intégralité de la population héparinique (constante globale).

| Dérivé | Méthode | A. N. L. | x-réci. | y-réci. | double-réci. | Cal. direct. |
|--------|----------------|----------|---------|---------|--------------|--------------|
| H-1 | log K | 5,94 | 5,94 | 5,94 | 5,94 | 5,12 |
| | n | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 | |
| | R ² | 0,99 | 0,98 | 0,99 | 0,99 | |
| Hexa-A | log K | 7,15 | 7,10 | 7,14 | 7,12 | 4,99 |
| | n | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,19 | |
| | R ² | 0,96 | 0,97 | 0,99 | 0,97 | |
| Hexa-B | log K | 6,50 | 6,49 | 6,51 | 6,50 | 5,94 |
| | n | 0,75 | 0,76 | 0,75 | 0,75 | |
| | R ² | 0,96 | 0,95 | 0,99 | 0,96 | |
| Hexa-C | log K | 6,03 | 6,04 | 6,03 | 6,06 | 4,13 |
| | n | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | |
| | R ² | 0,99 | 0,97 | 0,99 | 0,99 | |
| Octa-B | log K | 7,28 | 7,27 | 7,30 | 7,28 | 5,27 |
| | n | 0,28 | 0,28 | 0,28 | 0,28 | |
| | R ² | 0,97 | 0,97 | 0,99 | 0,98 | |
| Deca-B | log K | 6,29 | 6,28 | 6,30 | 6,30 | 5,43 |
| | n | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 | |
| | R ² | 0,97 | 0,97 | 0,99 | 0,98 | |
| Deca-C | log K | 6,80 | 6,80 | 6,82 | 6,81 | 5,67 |
| | n | 0,47 | 0,47 | 0,47 | 0,47 | |
| | R ² | 0,98 | 0,98 | 0,99 | 0,98 | |

Tableau 12 : Paramètres de l'interaction entre le ligand ATIII (ligand) et les oligosaccharides de l'héparine affins (substrat) calculés selon les différentes méthodes mathématiques.

A.N.L. : ajustement non-linéaire, x-réci : x-réciproque, y-réci : y-réciproque ; double-réci : double-réciproque.

Conditions expérimentales : voir figure 17.

Pour un dérivé héparinique de taille donnée, lorsque l'on compare les dérivés issus des différents procédés de purification, on constate que les lots qui ont subi une purification avancée ont un nombre de sites plus élevé (hexa-B par rapport à l'hexa-A, déca-C par rapport au déca-B). Cette étape permettrait donc d'opérer un enrichissement de l'échantillon en espèces actives, indépendamment de la force finale de l'interaction.

Lorsque l'on compare les dérivés hexa-A, octa-B, et deca-B qui ont été préparés selon le même protocole, on note que les affinités intrinsèques (mesurées par ajustement non-linéaire ou par les méthodes de linéarisation) sont similaires pour l'hexasaccharide et l'octasaccharide mais que celle du décasaccharide est légèrement plus faible. En revanche, le nombre de sites actifs augmentent de l'hexasaccharide au décasaccharide, ce qui traduit l'augmentation de la probabilité de trouver un site affiné dans la chaîne oligosaccharidique. La valeur de $\log K$ obtenue par le calcul direct (constante globale) augmente également, ce qui traduit l'augmentation globale de l'interaction. Ceci suggère, outre la nécessité de comporter le site affiné, l'existence d'une taille optimale pour le polysaccharide. De plus, ces résultats montrent que la liaison entre l'antithrombine III et le site sur le dérivé héparinique ne serait pas exclusivement gouvernée par interactions électrostatiques, la charge du décasaccharide étant, de par la présence de groupements sulfates supplémentaires, certainement plus importante que pour les dérivés de plus petite taille. Cette dernière remarque est en bon accord avec les mobilités des complexes ATIII-dérivé héparinique (tableau 11), et avec les données de la littérature pour lesquelles on trouve que les interactions non-ioniques représentent, à pH et force ionique physiologiques, environ 60% de l'enthalpie libre totale de formation [17].

Enfin, toutes les déterminations de paramètres d'interaction effectuées conduisent à un nombre de sites fractionnaire sur le dérivé héparinique, ce qui revient à considérer que seule une partie des chaînes oligosaccharidiques est active vis-à-vis de l'ATIII [33]. En outre, il est intéressant de mettre en relation les estimations du nombre de sites avec les profils des héparines données au paragraphe 5.2.. En particulier pour les dérivés hexa-A, deca-C, et hexa-B on trouve que le rapport de l'aire de l'un des pics (repéré par une flèche sur les électrophérogrammes) à l'aire totale des pics constituant le massif héparinique correspond à la fraction active calculée à partir des différentes régressions.

6.3.2 *Exploitation des mesures : adsorption des dérivés hépariniques sur l'antithrombine III.*

L'antithrombine III étant directement détectée, la protéine est considérée dans modèle multi-sites d'énergies identiques comme le ligand et les oligosaccharides de l'héparine comme le substrat. Les calculs ont ensuite été reconduits (dans un modèle d'interaction multisites d'énergies identiques) en tenant compte de la fraction active du polysaccharide [33] et d'une interaction monomoléculaire [34] entre l'ATIII et les oligosaccharides, après

inversion des rôles substrat-ligand. Cette inversion des rôles joués par les deux partenaires permet maintenant de calculer le nombre de sites sur l'antithrombine III. L'ensemble des calculs est résumé dans le tableau 13.

| Dérivé | Méthode | A. N. L. | x-réci. | y-réci. | double-réci. | Cal. direct. |
|--------|----------------|----------|---------|---------|--------------|--------------|
| H-1 | log K | 5,94 | 5,94 | 5,94 | 5,94 | 5,96 |
| | n | 1,01 | 1,01 | 1,01 | 1,01 | |
| | R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | |
| Hexa-A | log K | 7,13 | 7,14 | 7,14 | 7,19 | 7,12 |
| | n | 0,98 | 0,98 | 0,98 | 0,92 | |
| | R ² | 0,99 | 0,91 | 0,98 | 0,97 | |
| Hexa-B | log K | 6,50 | 6,50 | 6,50 | 6,52 | 6,50 |
| | n | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 0,75 | |
| | R ² | 0,99 | 0,96 | 0,99 | 0,99 | |
| Hexa-C | log K | 6,06 | 6,07 | 6,05 | 6,08 | 6,05 |
| | n | 0,99 | 0,98 | 1,00 | 0,97 | |
| | R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | |
| Octa-B | log K | 7,29 | 7,29 | 7,29 | 7,32 | 7,28 |
| | n | 0,99 | 0,99 | 0,98 | 0,96 | |
| | R ² | 0,98 | 0,91 | 0,99 | 0,96 | |
| Deca-B | log K | 6,30 | 6,29 | 6,29 | 6,29 | 6,29 |
| | n | 1,00 | 1,01 | 1,00 | 1,00 | |
| | R ² | 0,99 | 0,97 | 0,99 | 0,99 | |
| Deca-C | log K | 6,80 | 6,80 | 6,81 | 6,80 | 6,81 |
| | n | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,01 | |
| | R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | |

Tableau 13: Paramètres de l'interaction entre les les oligosaccharides de l'héparine affins (ligands) et l'antithrombine III (substrat) calculés selon les différentes méthodes mathématiques.

A.N.L. : ajustement non-linéaire, x-réci : x-réciproque, y-réci : y-réciproque ; double-réci : double-réciproque. Voir figures en annexe

Après inversion des rôles du substrat et du ligand joués par la protéine et le polysaccharide, les différentes régressions effectuées sur l'ensemble des points expérimentaux conduisent toutes à une droite, et à un site d'interaction unique sur l'antithrombine, ce qui

confirme une interaction de stoechiométrie 1 :1 dans l'intervalle de concentrations étudiées. Par ailleurs toutes les méthodes conduisent à la même valeur de la constante d'affinité. En particulier, on note que les valeurs trouvées par le calcul direct coïncident bien avec la valeur trouvée avec l'ensemble des autres méthodes, ce qui est cohérent avec le fait que seule la fraction active de l'héparine a été prise en compte dans le calcul. Enfin, l'ajustement non-linéaire de l'équation (chapitre 1, 30) aboutit également aux mêmes paramètres d'interaction avec un nombre de sites calculés sur la protéine de 1, ce qui est conforme à la littérature [35].

7 Discussion sur l'analyse frontale

L'électrophorèse capillaire en mode frontal apparaît bien adaptée à l'étude des interactions entre l'antithrombine III et les oligosaccharides de l'héparine affins. Ainsi, la méthode frontale permet de quantifier des interactions ATIII-héparine de constantes globales de formation voisines de 10^7 M. De telles déterminations par électrophorèse d'affinité imposeraient d'introduire dans l'électrolyte support l'héparine dans une gamme typiquement centrée sur l'inverse de la constante d'association, soit $5 \cdot 10^{-8}$ M – $5 \cdot 10^{-7}$ M. Ceci nécessiterait d'injecter l'ATIII à une concentration maximale de 10^{-7} M, ce qui ne permet pas de détecter la protéine. En outre, l'analyse frontale est plus informative du fait qu'elle permet d'accéder au taux d'association de l'ATIII sur l'héparine et par conséquent d'être exploitée par le modèle d'interactions mutisites. Ainsi, la méthode de l'analyse frontale a permis pour les dérivés hépariniques affins, d'accéder à la part active du polysaccharide dans les échantillons, ce que l'électrophorèse d'affinité ne permet pas. Comme avantage supplémentaire de l'analyse frontale, notons que la méthode n'a pas de pré-requis sur la cinétique de l'interaction à étudier. Ainsi l'analyse frontale en mode d'injection électrocinétique nous a permis de quantifier l'interaction, entre l'ATIII et le décasaccharidique deca-A, (figure 19.i, tableau 14) qu'il n'est pas possible de quantifier dans des conditions de milieu similaires par électrophorèse d'affinité (figure 19 ii), en raison de la formation irréversible du complexe ATIII-héparine.

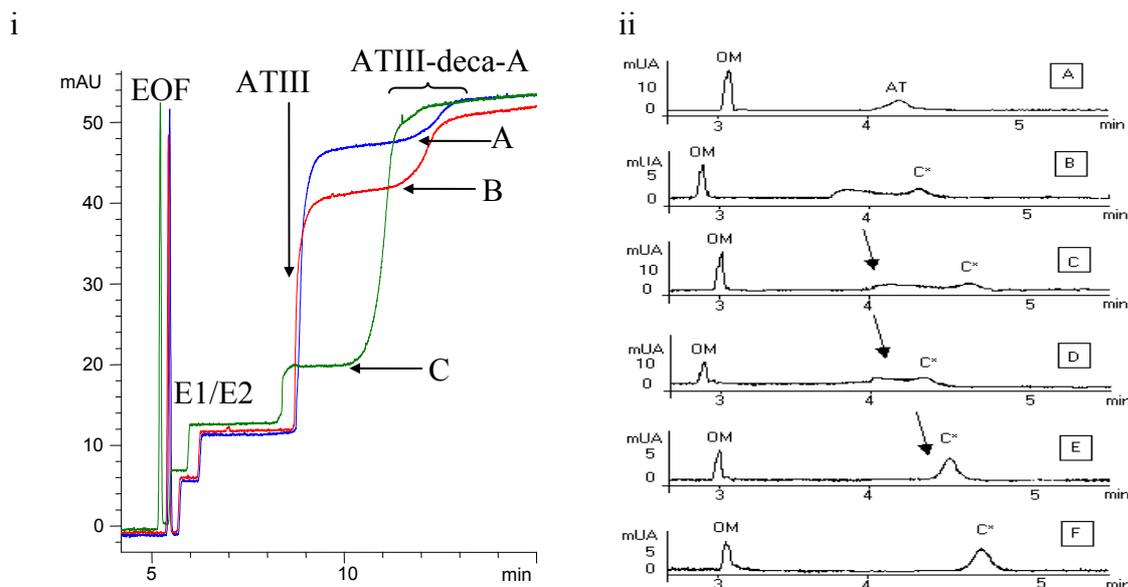


Figure 19 : Electrophérogammes en mode frontal (i) et en mode d'affinité* (ii) du système ATIII – deca-A.

Capillaire en silice vierge 50 μm i.d. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate de sodium de pH 7,05 et de force ionique 100 mM (Annexe 3)(i) ; tampon phosphate de sodium de pH 7,4 et de force ionique 100 mM (ii) contenant le deca-A à : 0 M ; 5.10^{-9} M (B) ; 10^{-8} M (C) ; 10^{-7} M (D) ; 10^{-6} M (E) ; 10^{-5} M (F). Tension appliquée : 10 kV. Injection : i : marqueur neutre (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 2 s) suivie d'une injection électrocinétique continue de l'échantillon ; ii : marqueur neutre (25 mbars, 2 s), électrolyte support (50 mbars, 5 s), échantillon (50 mbars, 2 s), électrolyte support (50 mbars, 5s). Marqueur neutre : i : formamide 0,03 % (v/v) dans l'électrolyte support ; ii : oxyde de mésityle 0,2 % dans l'électrolyte support. Echantillon : i : ATIII (lot E) $4,1.10^{-6}$ M et deca-A : $4,1.10^{-6}$ M (A) ; $8,2.10^{-6}$ M (B) ; $3,2.10^{-5}$ M (C) ; ii : ATIII à 10^{-5} M. Identification : EOF : pic du marqueur neutre (formamide) ; E1/E2 : Paliers de concentration des impuretés E1 et E2 ; ATIII : palier de concentration de l'ATIII libre ; ATIII-Deca-A : palier de concentration du complexe ATIII-Deca-A ; OM : pic de marqueur neutre (oxyde de mésityle) ; AT : pic de l'ATIII ; C* : Complexe irréversible ATIII-Deca-A. *: d'après [21]

| Ligand = antithrombine III | | | | |
|------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|------------------|
| Diagramme de linéarisation : | Ajustement Non-linéaire | x-réiproque | y-réiproque | double-réiproque |
| log k | 6,14 | 6,16 | 6,17 | 6,16 |
| n | 0,19 | 0,19 | 0,19 | 0,19 |
| R ² | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| Ligand = Déca-A actif | | | | |
| Diagramme de linéarisation : | Ajustement non-linéaire | x-réiproque | y-réiproque | double-réiproque |
| log k | 6,17 | 6,16 | 6,17 | 6,14 |
| n | 0,98 | 1,00 | 0,99 | 1,05 |
| R ² | 0,99 | 0,98 | 0,99 | 0,99 |

Tableau 14 : Paramètres d'interaction entre l'antithrombine III et le dérivé décasaccharide Deca-A dans le modèle d'interaction multisites d'énergies identiques.

Conditions expérimentales : voir figure 19 i.

Néanmoins, il apparaît que l'analyse frontale est inadaptée à la détermination d'interactions faibles entre l'antithrombine III et l'héparine. En effet, suivant les lots, le titre de la solution-mère de l'ATIII est compris entre 6,5 et $8,7 \cdot 10^{-5}$ M, ce qui correspond, pour une complexation à hauteur de 50% pour l'ATIII (en admettant également une dilution aux trois-quarts de la solution-mère d'ATIII pour l'apport du tampon et de l'héparine) à une constante de complexation comprise entre $K = 10^{4,2}$ et $K = 10^{4,3} \text{ M}^{-1}$. De fait, il devient délicat de quantifier une constante globale inférieure à 10^3 M^{-1} (seule la partie montante de l'isotherme pouvant être décrite), alors que ce cas est favorable (excepté la variation de force ionique du milieu) pour la mise en œuvre de l'électrophorèse capillaire d'affinité (grand excès de ligand par rapport au substrat injecté). De plus, les déterminations par analyse frontale sont nettement plus fastidieuses que par la méthode de l'affinité. En effet, la méthode de l'analyse frontale exige l'étalonnage de la hauteur de palier par au moins trois niveaux de concentrations répétés deux fois (soit six injections au total), tandis que la mobilité de l'ATIII libre peut être raisonnablement évaluée par seulement deux injections. Enfin, à présent, le logiciel de traitement des données ne permet pas de quantifier automatiquement la hauteur du palier tandis que le temps de migration de l'ATIII, injectée en mode de zone, est facilement accessible depuis un logiciel intégrateur, ce qui permet de limiter les erreurs.

8 Détermination de la constante d'interaction entre des peptides consensus de l'antithrombine III et les dérivés hépariniques affins.

Au vu de l'influence constatée du pH et de la force ionique du milieu ainsi que de l'influence de la longueur de la chaîne oligosaccharidique sur l'interaction de ATIII avec le polysaccharide sulfaté, cette association n'est pas exclusivement gouvernée par des phénomènes électrostatiques. Afin de confirmer cette observation, il apparaît intéressant d'étudier l'interaction de l'héparine avec des peptides dont la séquence (tableau 15) est issue du site actif cationique de l'ATIII (hélice 5 : acides aminés GLN-118 – LYS-136, figure 20 et séquence en annexe 4), et dont l'interaction avec l'ATIII devrait être exclusivement gouvernée par interaction électrostatique.

| Peptide | Séquence |
|---|---|
| AV20K (MM = 2240,6 g.mol ⁻¹) | Ala-Ala-Ala-Phe-Ala- <u>Lys</u> -Leu-Asn-Cys- <u>Arg</u> -Leu-Tyr- <u>Arg</u> - <u>Lys</u> -Ala-Asn- <u>Lys</u> -Ser-Ser- <u>Lys</u> |
| FR19H (MM = 2693,9 g.mol ⁻¹) | Phe-Phe-Phe-Ala- <u>Arg</u> -Leu-Asn-Cys-Arg-Leu-Tyr- <u>Arg</u> - <u>Arg</u> - Ala-Asn- <u>Lys</u> -Ser-Ser- <u>Arg</u> |

Tableau 15 : Séquence des aminoacides constitutifs des peptides AV20K et FR19H.

Nota : les acides aminés basiques sont soulignés dans le tableau 15.

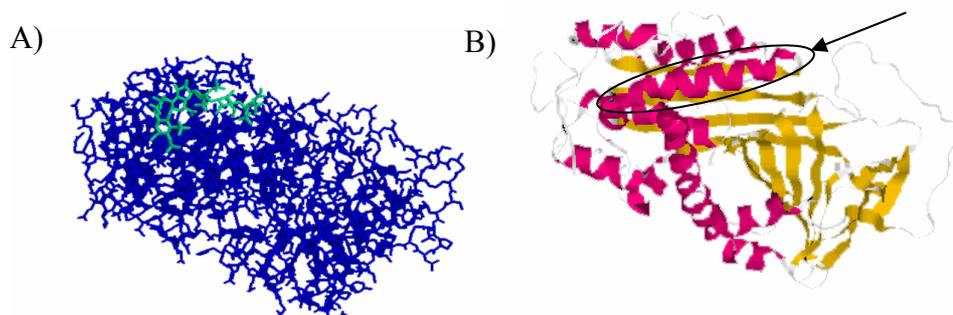


Figure 20 : Interaction du pentasaccharide spécifique de l'héparine (en vert) avec l'antithrombine III (en bleu) (A) et structure moléculaire de l'antithrombine III activée (B). [34].

Nota : la structure moléculaire de l'ATIII de la figure 20.B est identique à celle de la figure 20.A excepté que le pentasaccharide a été retiré. L'hélice 5 contenant le site cationique spécifique du pentasaccharide est encerclée figure 20 B.

Ces peptides comportent dans leur séquence au moins huit acides aminés basiques et possèdent à pH 7,05 une charge nominale positive proche de 6. De ce fait il n'a pas été possible de les caractériser par électrophorèse de zone dans des capillaires en silice vierge, les peptides interagissant très fortement avec la silice chargée négativement de ces capillaires. Un lavage des capillaires en silice vierge par une solution d'héparine concentrée n'a également pas permis de restituer le flux électroosmotique initial, ce qui montre que la paroi des capillaires ne peut pas être régénérée. Une détermination de la constante d'interaction peptide-héparine n'est donc pas envisageable par électrophorèse de zone (en mode d'affinité, Hummel-Dreyer, ou vacance) dans ce type de capillaire. L'utilisation d'un capillaire greffé amine a permis d'obtenir l'électrophérogramme montré figure 21 pour le peptide AV20K, conduisant à un pic encore très étalé. L'emploi de ce type de capillaires ne peut néanmoins pas être retenu pour l'évaluation de la constante d'interaction avec l'héparine, du fait cette fois-ci du caractère anionique du polysaccharide.

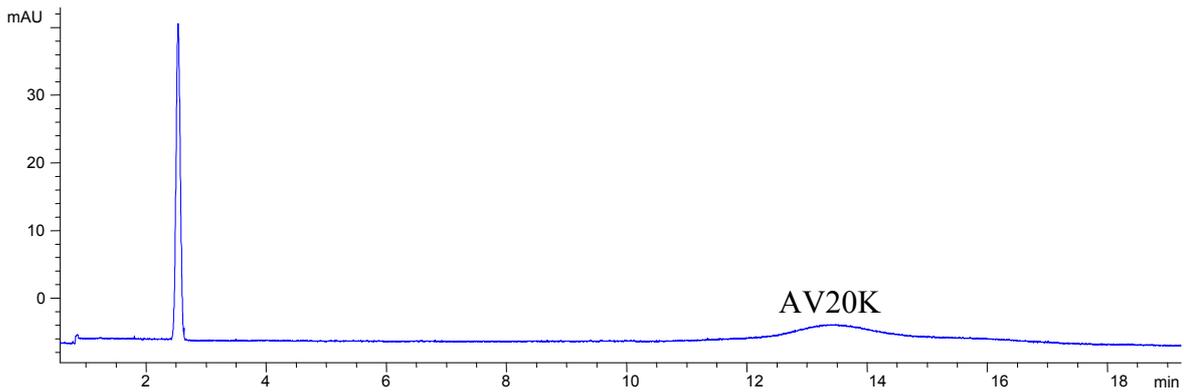


Figure 21 : Electrophorèse de zone du peptide AV20K en capillaire greffé amine.

Capillaire greffé amine (Beckman), 50 μm d.i. x 62,5 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Tension appliquée : 20 kV ($I = 17 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : peptide AV20K à 1 mg. mL⁻¹. Injection hydrodynamique coté fenêtre de détection : Formamide (30 mbars, 2 s) ; électrolyte support (30 mbars, 2 s) ; peptide (30 mbars, 2 s) ; électrolyte support (30 mbars, 2 s).

Du fait de la faible sensibilité de détection UV des peptides AV20K et FR19H nous avons eu recours au dérivé fluorescéine du peptide AV20K, AV20K-f, dont l'absorption UV est également fortement augmentée. Ce peptide a été injecté en mode frontal dans un capillaire en silice vierge du côté fenêtre de détection, de façon continue par application d'un champ électrique, espérant que la saturation partielle de la paroi du capillaire entre l'extrémité d'injection et la cellule de détection permettrait ainsi une mesure de hauteur de front de migration. Dans ce protocole d'injection, la majeure partie du capillaire située au-delà de la cellule de détection reste alors remplie avec l'électrolyte support seul et sert de pompe électroosmotique. La figure 22 présente les électrophérogrammes obtenus lors de l'introduction selon ce protocole du peptide AV20K-f seul (A) ou en présence de dérivé héparinique hexa-B (B). Dans les deux cas, les électrophérogrammes montrent l'apparition d'un front de mobilité proche de l'électroosmose (mobilité attendue repérée par une flèche sur la figure 22). Le retard et l'étalement prononcés de ce front (attendu à un temps bien inférieur à celui du signal électroosmotique) pourraient traduire l'adsorption du peptide sur la paroi du capillaire. L'allure de l'électrophérogramme obtenu pour le mélange peptide - dérivé héparinique ne permet pas l'estimation de la concentration du peptide à l'état libre.

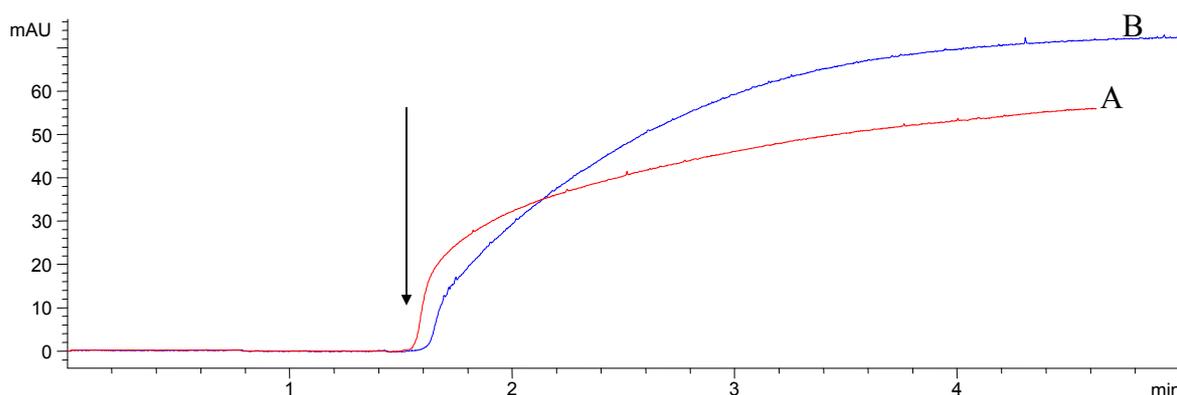


Figure 22 : Electrophérogrammes en mode frontal du peptide AV20K-f seul (A) ou en présence du dérivé héparinique hexa-B (B).

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : tampon phosphate 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Tension appliquée : -20 kV ($I = 17 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm. Echantillons : peptide AV20K-f à 0,1 mg. mL⁻¹ seul (A), ou en présence du dérivé héparinique hexa-B 4,4.10⁻⁴ M. Injection côté fenêtre de détection.

Face à ce constat, un nouveau protocole a été développé, visant à la fois à pallier l'adsorption du peptide sur la paroi du capillaire et à permettre sa détection sensible après préconcentration.

Dans ce nouveau protocole, le capillaire a été initialement rempli avec un tampon formiate de sodium légèrement acide (pH 4,00, $\mu_{\text{eo}} < 10 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) de façon à réduire ultérieurement l'adsorption du peptide sur la paroi du capillaire et d'autre part de permettre une injection électrocinétique sélective par l'entrée du capillaire (en mode co-électroosmotique) du peptide libre chargé positivement. En effet, dans ces conditions, l'héparine libre chargée négativement n'est pas injectée. A l'issue de cette injection une partie du peptide complexé peut toutefois être faiblement injecté si la charge de l'héparine ne compense pas celle du peptide. Néanmoins, il peut être supposé que la mobilité du complexe peptide-héparine est nettement inférieure à celle du peptide libre et par conséquent que la quantité du complexe injecté peut être, dans un premier temps, négligée par rapport à celle du peptide libre. Enfin lors de l'injection électrocinétique, le peptide injecté peut se trouver adsorbé sur la paroi du capillaire. Nous avons ensuite introduit électrocinétiquement et en continu une solution micellaire de SDS par l'entrée du capillaire. Compte tenu de la forte affinité du peptide basique pour les micelles anioniques, cette solution micellaire permet à la fois de désorber le peptide de la paroi et de le focaliser (donc de le reconcentrer) dans le front de migration du SDS. Ce protocole est compatible avec l'incubation initiale du mélange peptide – dérivé héparinique dans un tampon de nature différente de celui remplissant

initialement le capillaire, par exemple un tampon proche des conditions physiologiques. La figure 23 présente les électrophérogrammes obtenus par ce protocole pour différentes concentrations du peptide FR19H.

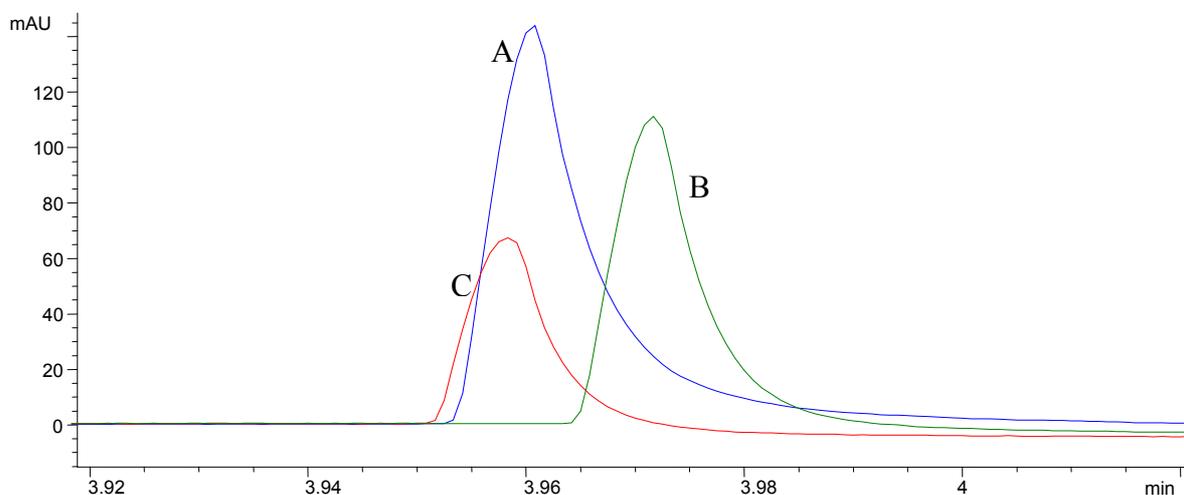


Figure 23 : Electrophérogrammes en mode zone du peptide FR19H après injection électrocinétique sélective en mode électrocinétique et transport par le SDS.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm) rempli initialement du tampon formiate de sodium 72,9 mM de pH 4,00 et de force ionique 50 mM (Annexe 3). Echantillons : peptide FR19H dans un tampon phosphate de sodium 23,4 mM de pH 7,05 et de force ionique 50 mM aux concentrations : 0,1 mg. mL^{-1} ($3,7 \cdot 10^{-5}$ M) (A), 0,075 mg. mL^{-1} ($2,8 \cdot 10^{-5}$ M) (B), 0,05 mg. mL^{-1} ($1,9 \cdot 10^{-5}$ M) (C). Injection : Echantillon (10 kV, 20 s), électrolyte (30 mbars, 2s). Introduction électrocinétique continue, après injection, d'une solution de SDS 75 mM en tampon formiate de sodium 72,9 mM de pH 4,00 (force ionique 50 mM) sous une tension appliquée de - 15 kV (courant initial $I_{\text{init}} = 26 \mu\text{A}$). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 200 nm.

Les électrophérogrammes montrent l'apparition d'un pic, pour une mobilité électrophorétique équivalente à celle du SDS. Ce pic présente une légère traînée arrière, qui révèle une adsorption résiduelle du peptide à la surface du capillaire. Il est à noter qu'en absence de peptide, l'introduction continue de SDS conduit à la détection d'un pic (variation de l'indice de réfraction ?) traduisant la discontinuité des milieux. De ce fait, un étalonnage de l'aire réduite du pic du peptide FR19H en fonction de sa concentration injectée présente une linéarité satisfaisante ($\text{aire réduite} = 196,8 [\text{peptide} (\text{mg. mL}^{-1})] + 2,8$; $R^2 = 0,99$), mais dans un domaine de concentration assez étroit (0,025 – 0,075 mg. mL^{-1} , figure 24).

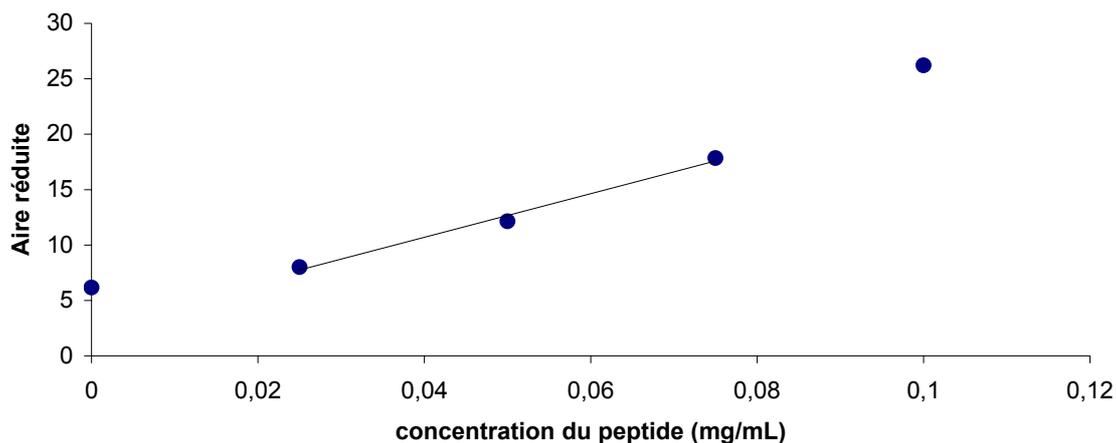


Figure 24 : Variation de l'aire réduite du pic du peptide FR19H en fonction de sa concentration.

Conditions opératoires : voir figure 23.

Nous avons étudié le système peptide FR19H - dérivé héparinique hexa-B, avec le protocole d'injection et de préconcentration décrit précédemment. Les proportions étudiées expérimentalement sont données tableau 16.

| | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|
| Concentration en peptide FR19H (10^{-5} M) | 3,7 | 3,7 | 3,7 | 3,7 | 3,7 |
| Concentration en dérivé hexa-B (10^{-5} M) | 0,36 | 0,74 | 1,24 | 1,48 | 1,97 |

Tableau 16 : mélanges FR19H-hexa-B réalisés.

A partir de l'étalonnage dans la gamme $0,25-0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ obtenu pour le peptide seul, la représentation de Scatchard, établie pour le modèle d'interaction multi-sites en prenant le peptide comme ligand et en supposant que seul le peptide libre est injecté, est montrée figure 25. Ce graphe semble présenter deux parties linéaires (pour \bar{n} compris entre 1,5 et 1,7, puis pour \bar{n} supérieur à 1,7). Ceci suggère que le peptide puisse se lier au dérivé héparinique sur deux sites selon $\log K_1 = 5,9$ pour le site fort et $\log K_2 = 4,0$ pour le site faible. Les nombres de sites correspondant étant respectivement de l'ordre de 2 et 4, ceci suggère également l'existence de complexe d'ordres supérieurs (S_nL_m , avec n et m supérieurs ou égaux à 1).

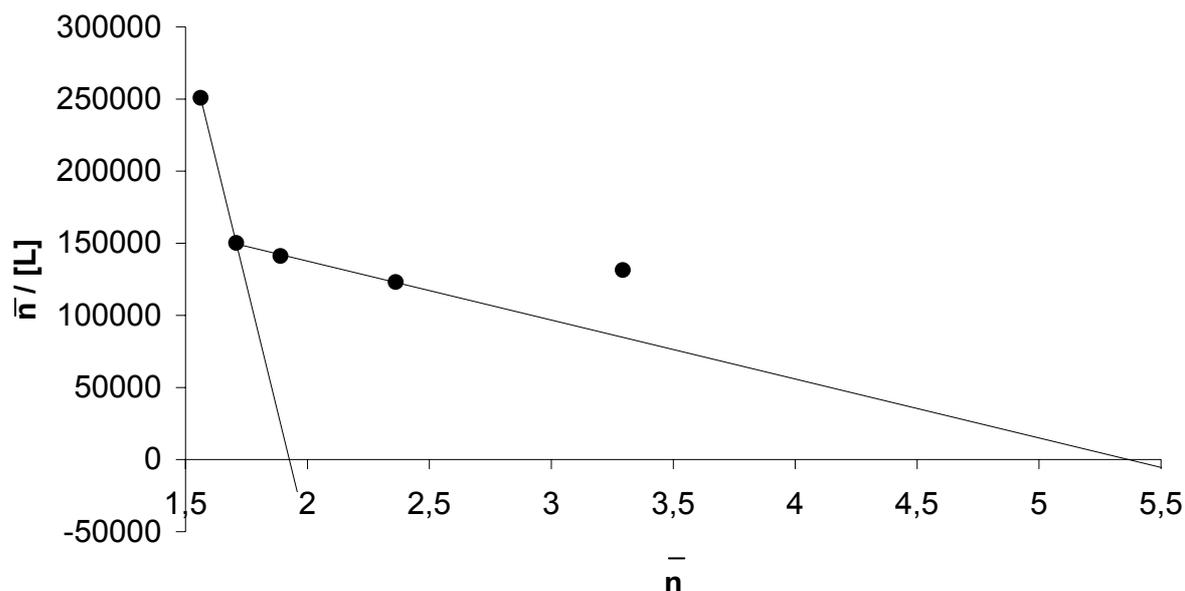


Figure 25 : Représentation de Scatchard des données expérimentales du système peptide FR19H – hexa-B.

Ces résultats préliminaires semblent indiquer la faisabilité de la détermination par électrophorèse capillaire de constantes d'interactions entre un peptide très basique et un polysaccharide, par l'utilisation d'un protocole électrocinétique d'injection sélective, puis de préconcentration et transport au détecteur par une solution micellaire.

9 Conclusion

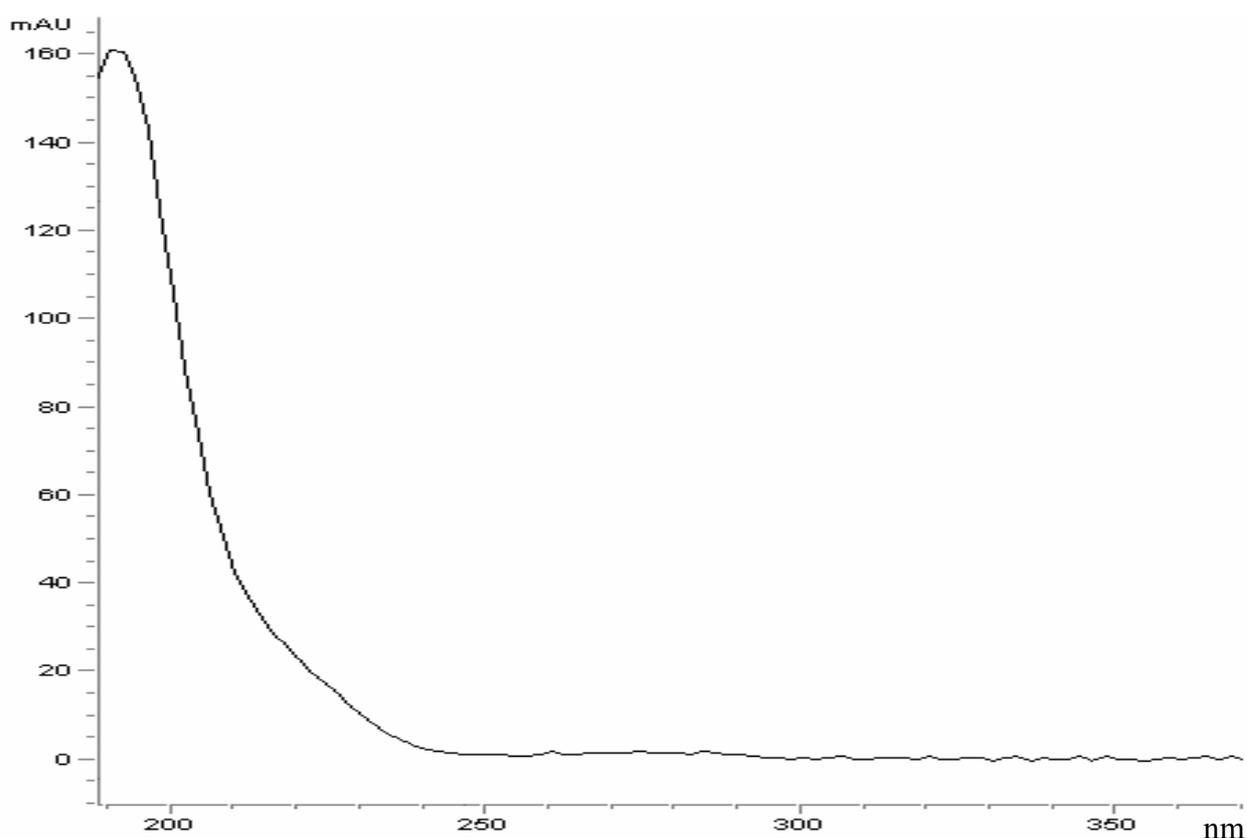
Cette étude a montré pour la première fois la détermination des paramètres d'interactions entre l'antithrombine III et l'héparine par la méthode de l'analyse frontale électrophorétique capillaire. Cette méthode est globalement rapide (une constante d'interaction peut être estimée en une journée) et consomme assez faiblement chacun des deux partenaires de l'interaction. Elle nous a ainsi permis de quantifier l'interaction avec l'ATIII pour plusieurs polysaccharides. Cette méthode semble également bien adaptée à l'étude de l'influence du milieu (pH et force ionique) et du protocole d'obtention de l'héparine sur l'interaction entre le polysaccharide sulfaté et l'antithrombine III. Par comparaison avec l'électrophorèse d'affinité où seule une constante globale de l'interaction est déterminée, l'accès au modèle d'interaction multisites d'énergies identiques par la méthode de l'analyse frontale nous a permis, lorsque l'antithrombine III tient le rôle de ligand, d'évaluer le taux de chaînes hépariniques actives dans quelques échantillons de polysaccharide. D'autre part, l'inversion des rôles substrat-ligand joués par les deux partenaires dans le modèle multisites permet de confirmer la

présence sur la protéine d'un site unique de liaison avec le polysaccharide. Les paramètres d'interaction ainsi obtenus (constante intrinsèque et taux de chaînes actives) pour les fractions affines ont également présenté une corrélation certaine avec les activités biologiques de l'antithrombine III (résultats non montrés pour raison de confidentialité). Ainsi, l'analyse frontale apparaît particulièrement intéressante pour la quantification de l'interaction entre l'ATIII et le polysaccharide sulfaté, excepté pour le cas d'interactions faibles. Appliquée à de nouveaux échantillons hépariniques, cette méthode devrait permettre d'évaluer rapidement l'impact de nouveaux processus de purification du polysaccharide sur ses caractéristiques interactives envers l'ATIII, notamment en vue de l'obtention de composés plus affins.

10 Annexes

Annexe 1 : Spectre de l'antithrombine III.

Afin de déterminer la longueur d'onde pour laquelle la sensibilité de détection pour l'antithrombine est la meilleure, un spectre d'absorbance UV a été réalisé sur l'appareil d'électrophorèse capillaire au moyen de la barrette de diodes. Le spectre présenté ci-dessous a été obtenu à partir d'une injection d'antithrombine à l'entrée du capillaire et migration de celle-ci en mode électrophorèse de zone.



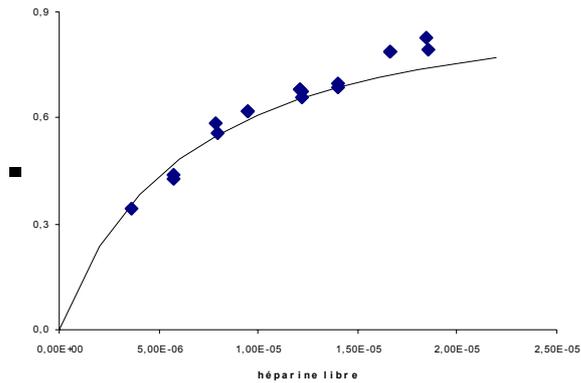
Spectre UV de l'antithrombine III obtenu lors de sa migration électrophorétique en mode zone.
Conditions opératoires : voir figure 7A

Ce spectre permet de choisir la longueur d'onde de 200 nm comme longueur d'onde de détection de l'antithrombine III.

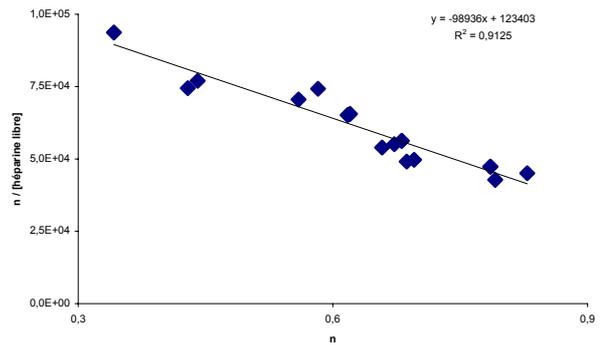
Annexe 2 : Représentation des isothermes et diagrammes de linéarisation des données expérimentales pour la détermination des constantes d'association.

1. Héparine H-1 (premier lot), deuxième série de mesures

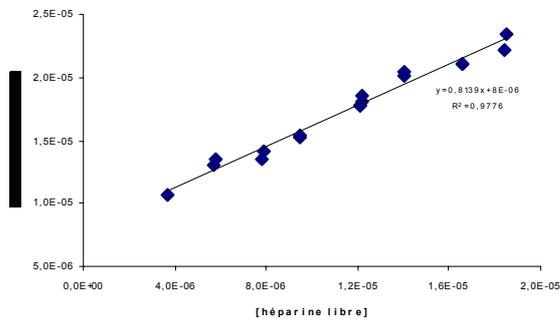
Isotherme



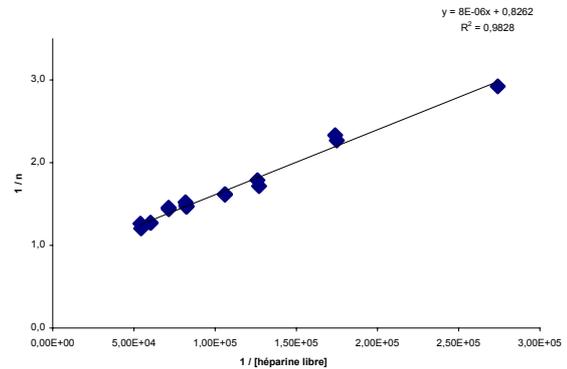
x-réciproque



y-réciproque

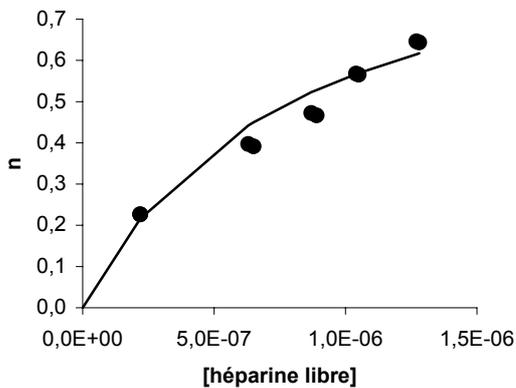


double-réciproque

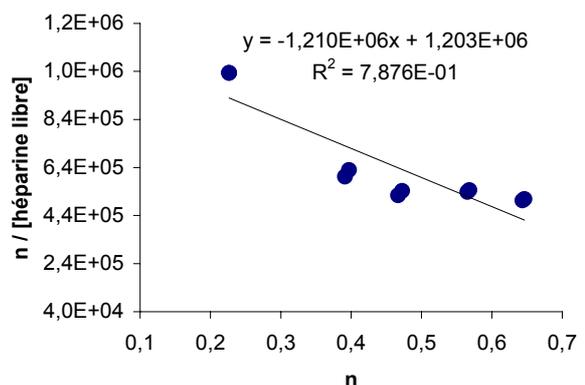


2. Héparine H-3

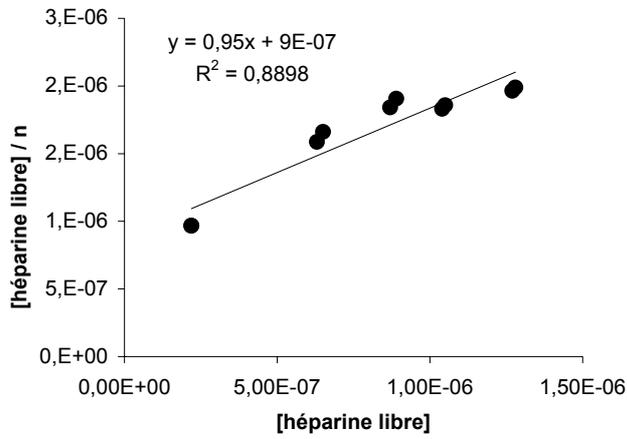
Isotherme



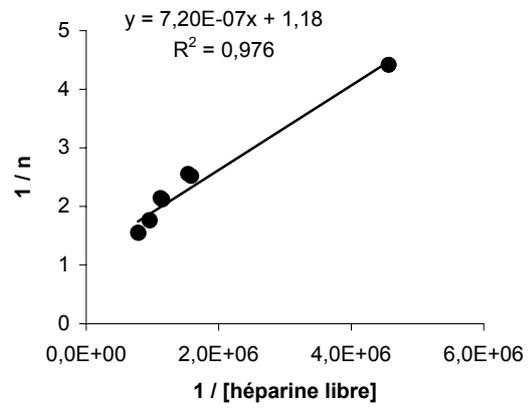
x-réciproque



y-réiproque

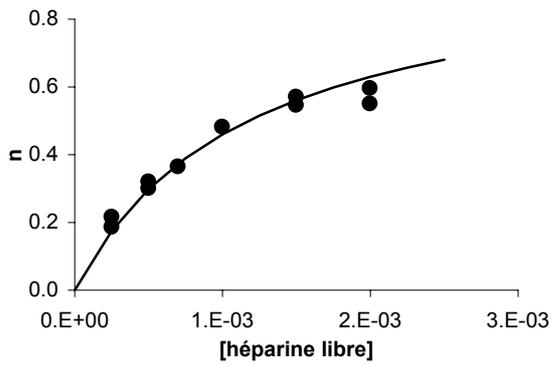


double réiproque

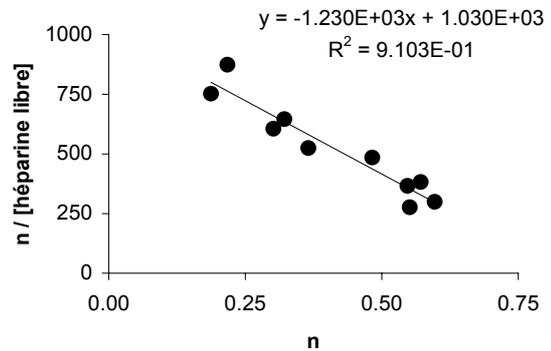


3. Octa-A

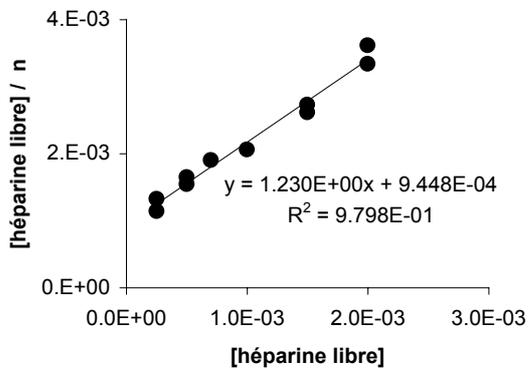
Isotherme



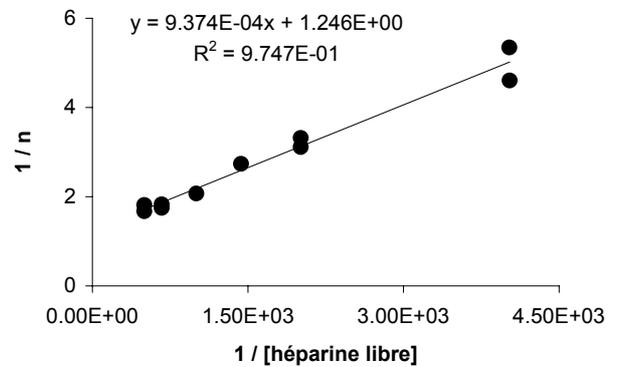
x-réiproque



y-réiproque



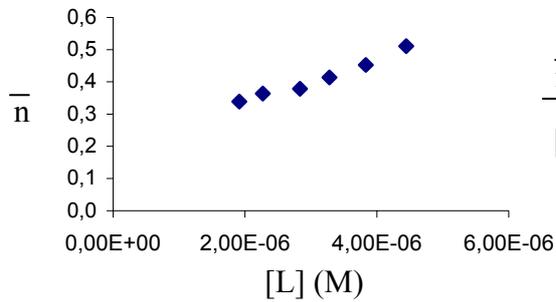
double-réiproque



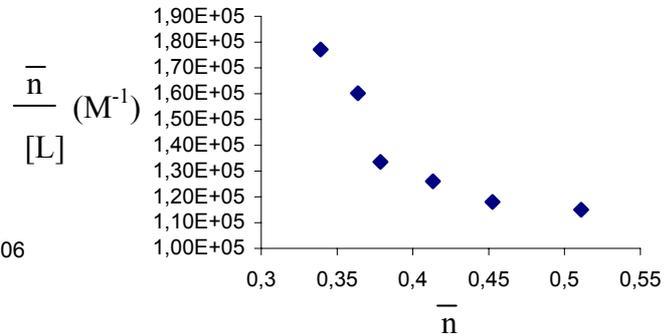
4. Héparine H-1 (deuxième lot) : Ligand = Antithrombine III

4.a. pH = 6,45 ; I = 50 mM

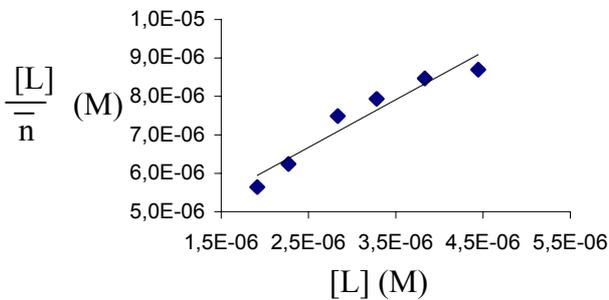
Isotherme



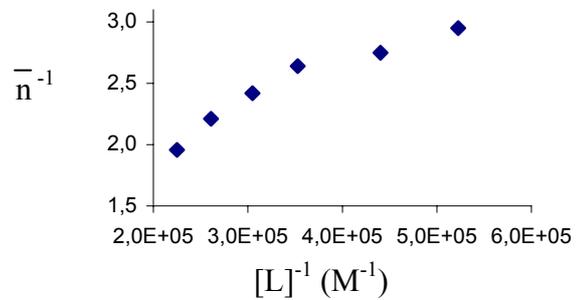
X-réciproque



Y - réciproque

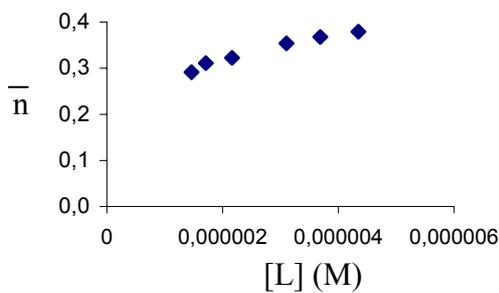


Double réciproque

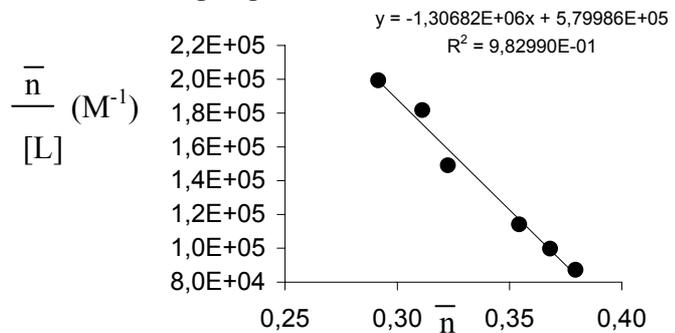


4.b. pH = 6,78 ; I = 50 mM

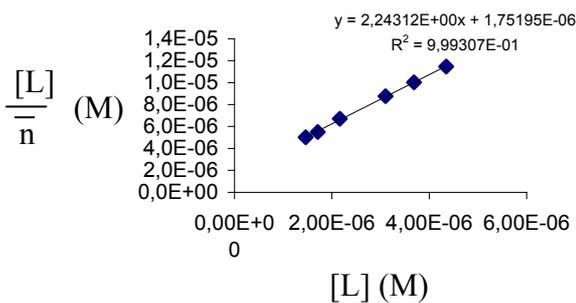
Isotherme



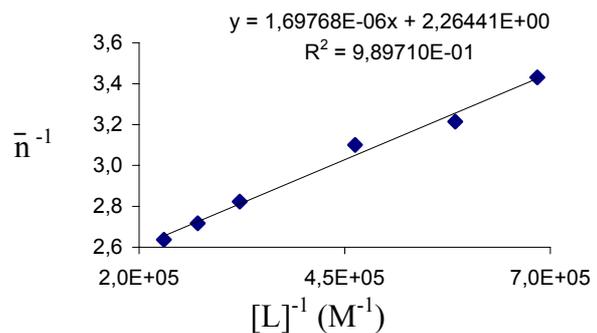
X-réciproque



Y-réciproque

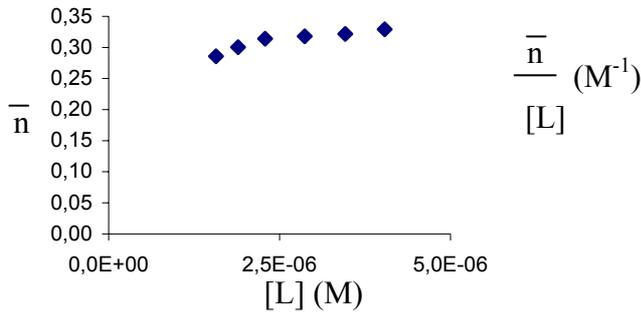


Double réciproque

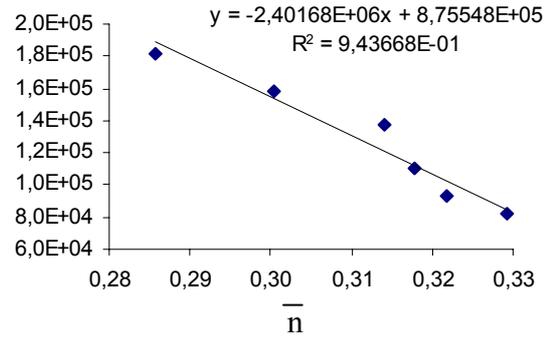


4.c. $pH = 7,05 ; I = 50 \text{ mM}$

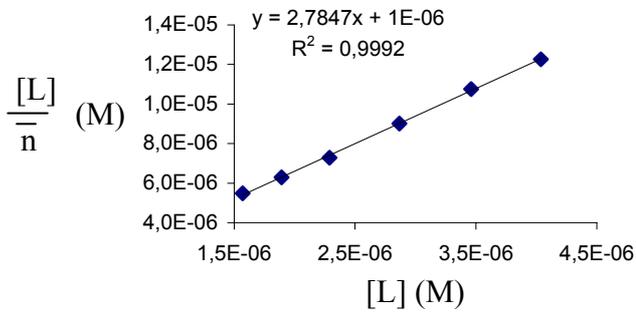
Isotherme



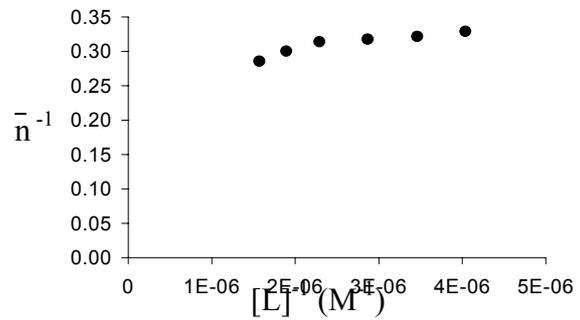
X-réciproque



Y-réciproque

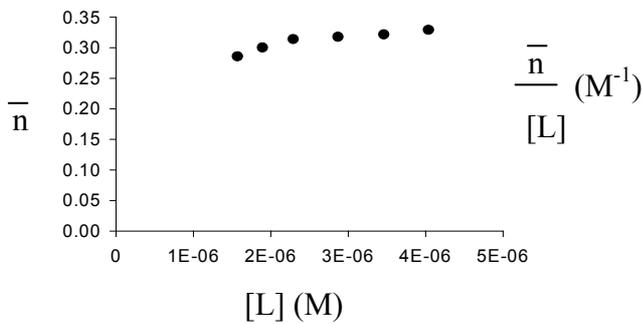


Double réciproque

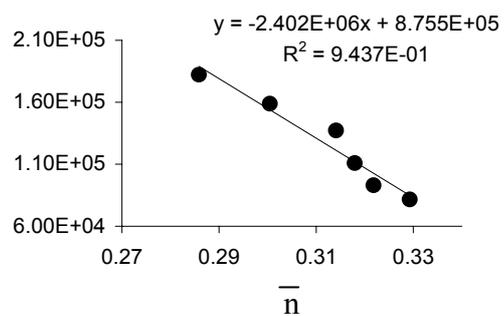


4.c. $pH = 6,78 ; I = 100 \text{ mM}$

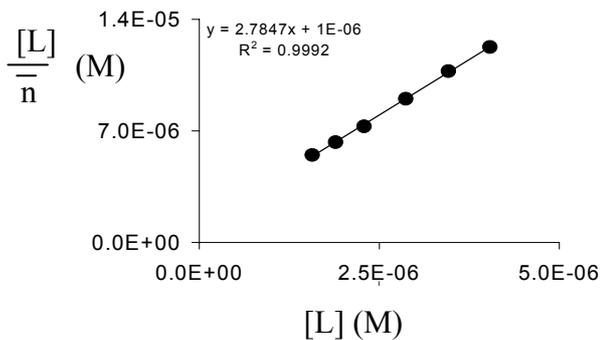
Isotherme



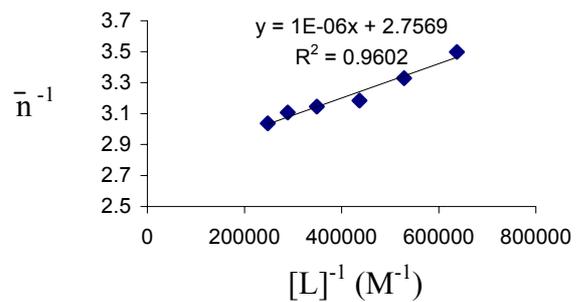
X-réciproque



Y-réciproque

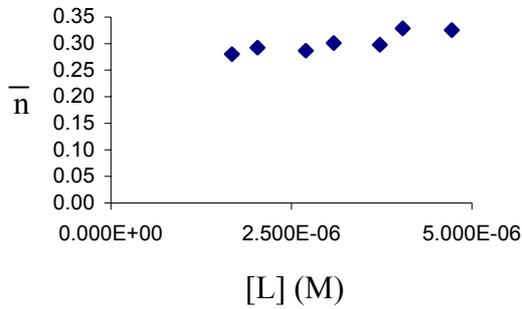


Double-réciproque

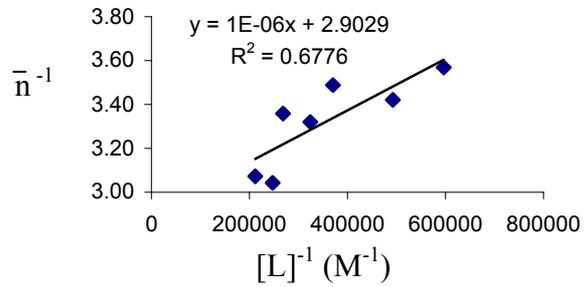
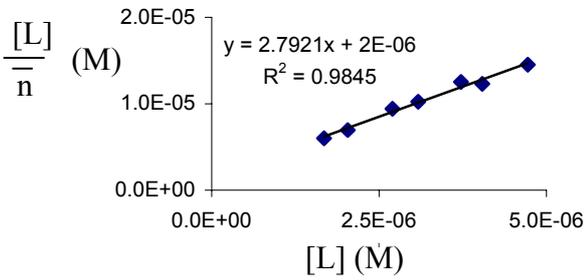
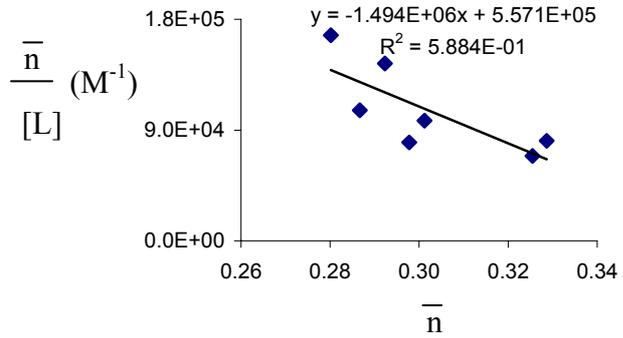


4.c. $pH = 6,78 ; I = 150 \text{ mM}$

Isotherme



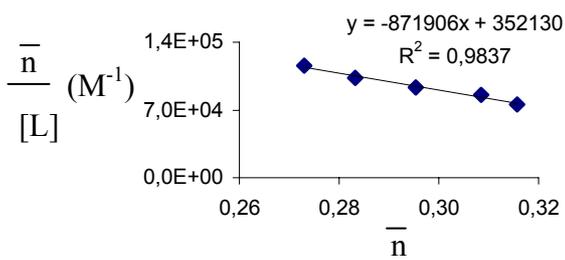
X-réciproque



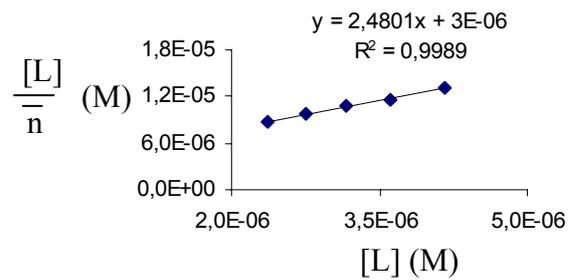
5. Héparine H-1, deuxième lot : $pH = 7,05 ; I = 50 \text{ mM}$

5.a. Ligand = Antithrombine III

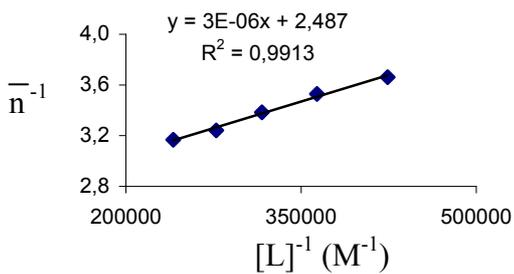
X-réciproque



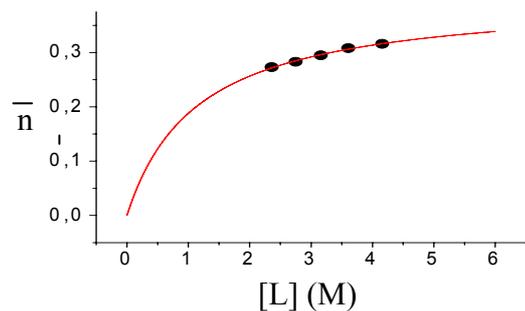
Y-réciproque



Double-réciproque

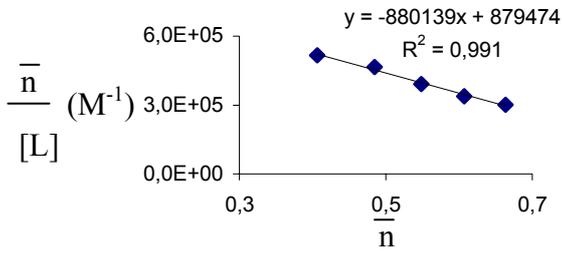


Ajustement non linéaire de l'isotherme.

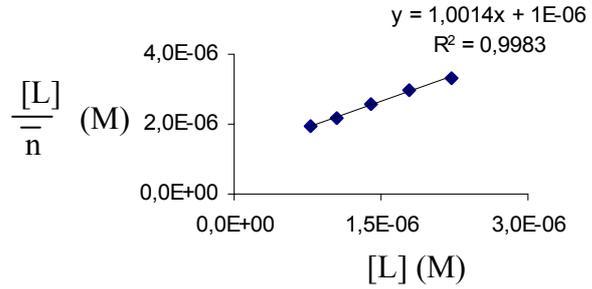


5.b Ligand = Héparine

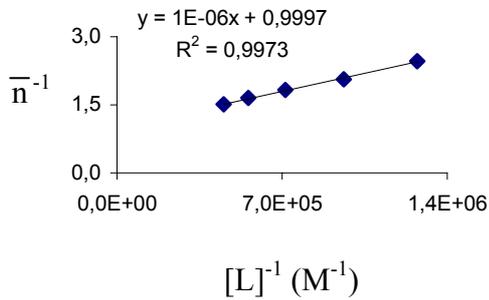
X-réiproque



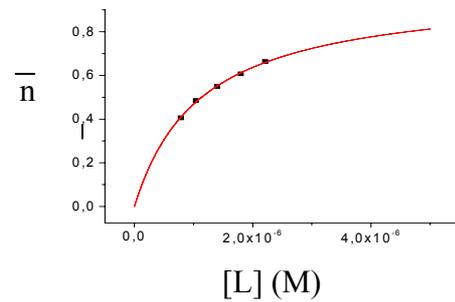
Y-réiproque



Double-réiproque



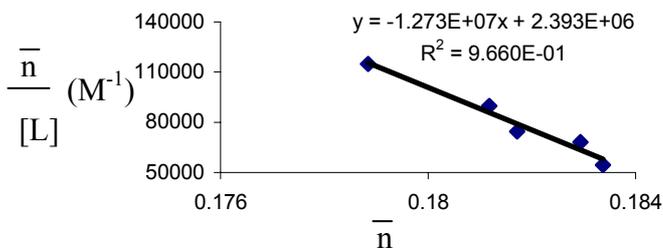
Ajustement non-linéaire



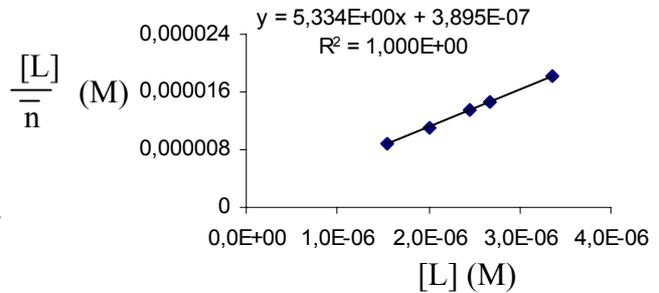
6. Hexa-A

6.a. ligand = Antithrombine III

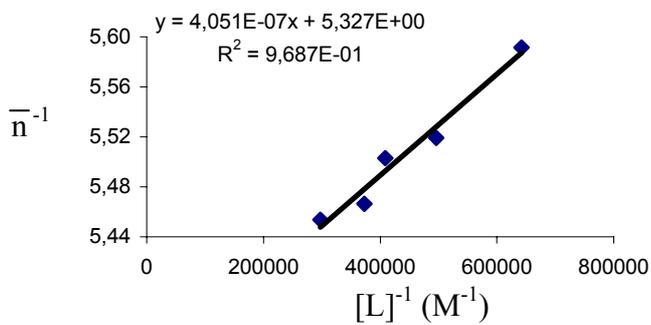
X-réiproque



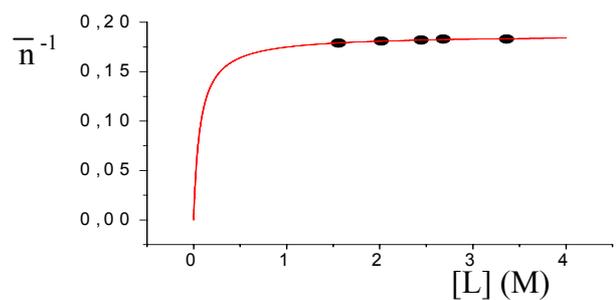
Y-réiproque



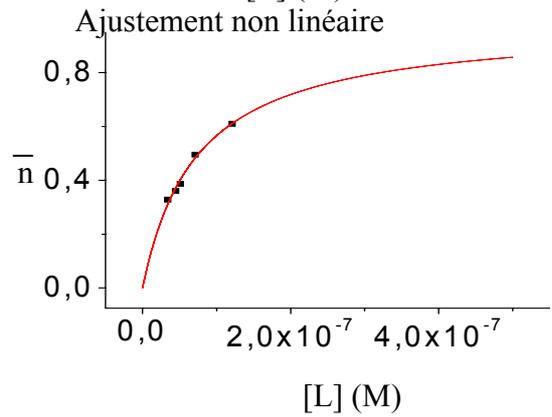
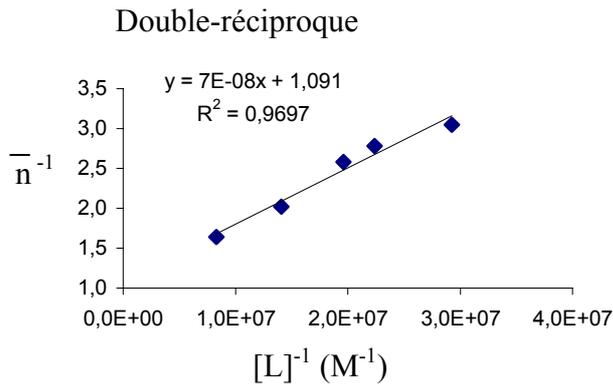
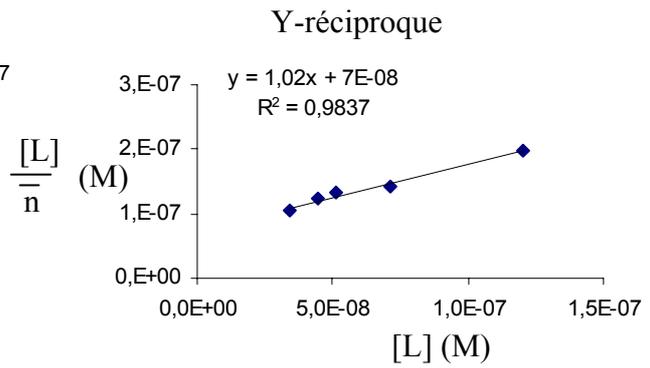
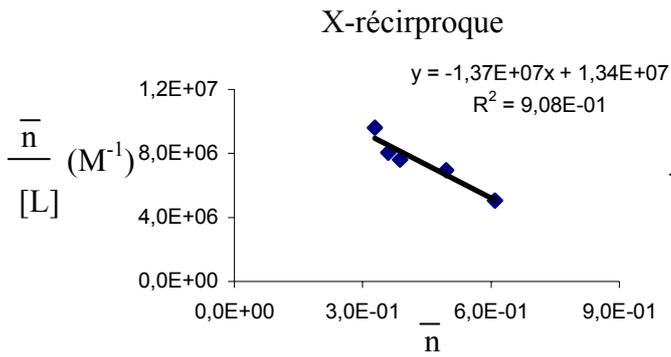
Double-réiproque



Ajustement non-linéaire

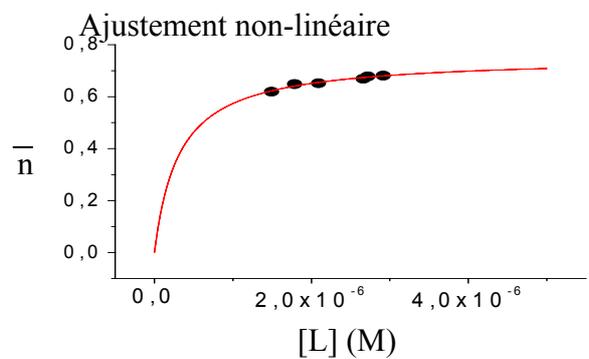
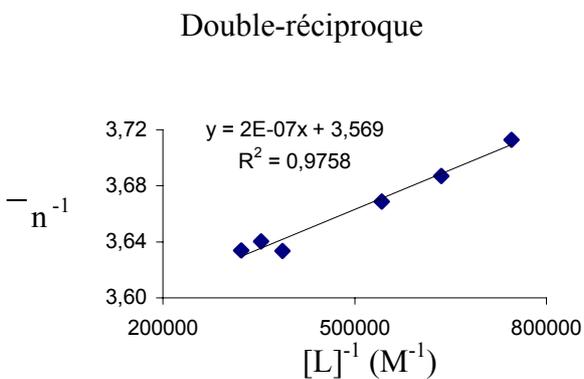
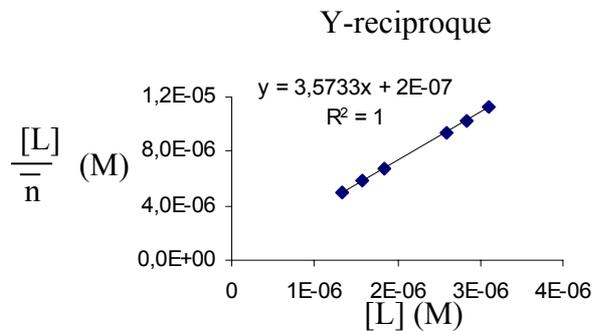
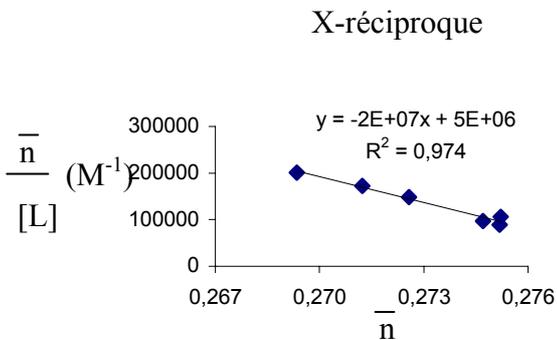


6.b. Ligand = héparine



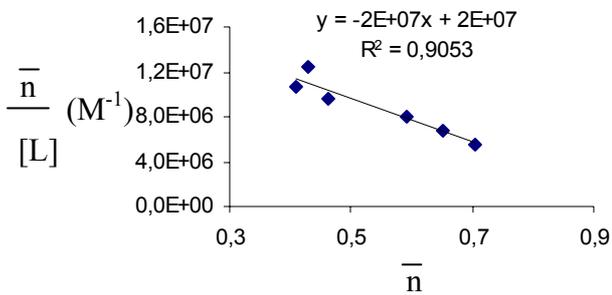
7. Hexa-B

7.a. Ligand = antithrombine III

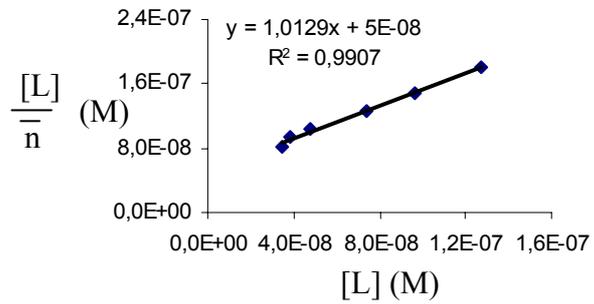


7.b. Ligand = héparine

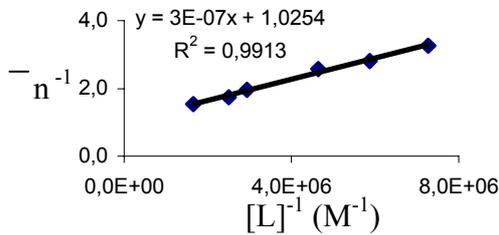
X-réiproque



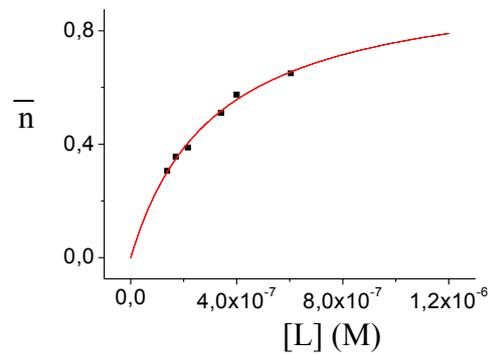
Y-réiproque



Double-réiproque



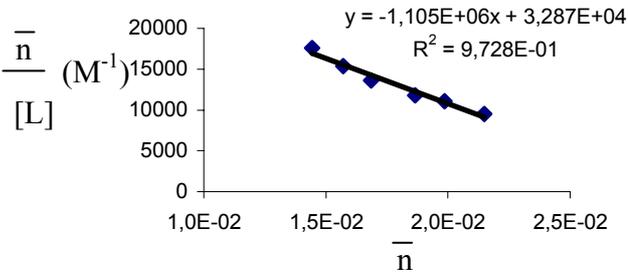
Ajustement non-linéaire



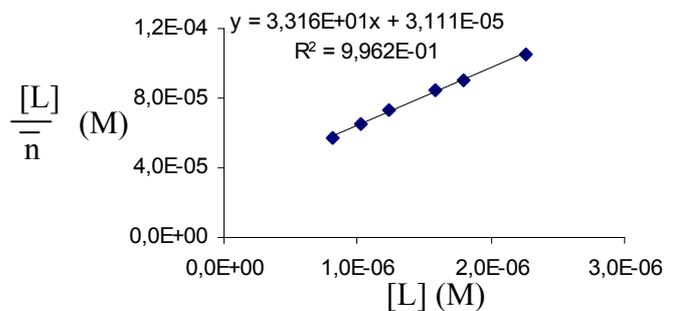
8. Hexa-C

8.a. Ligand = Antithrombine III

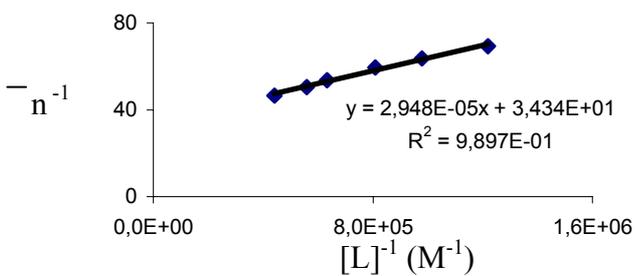
X-réiproque



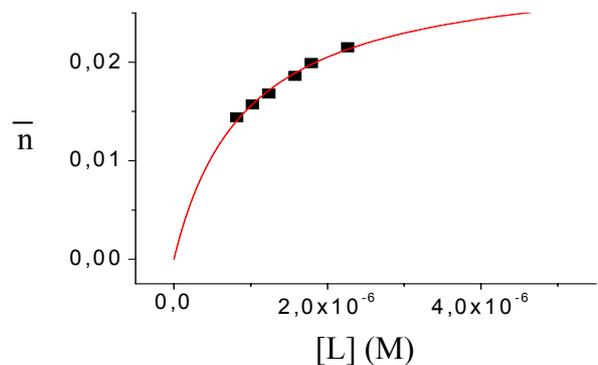
Y-réiproque



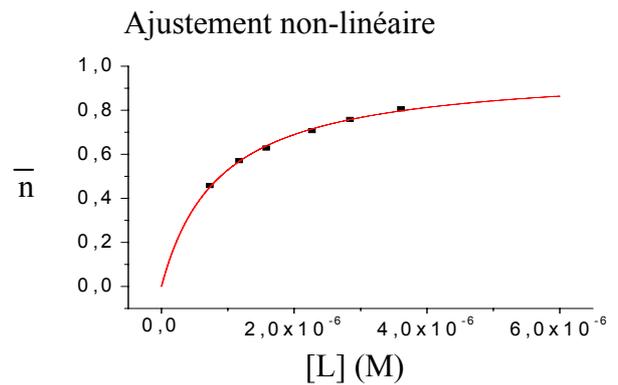
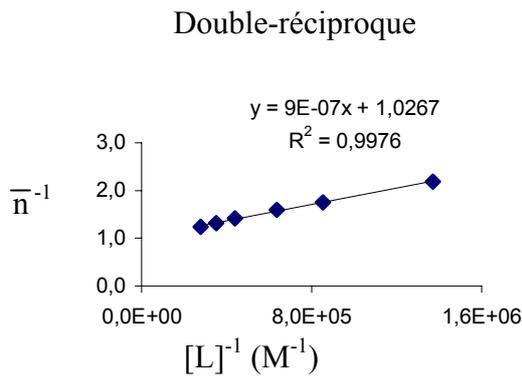
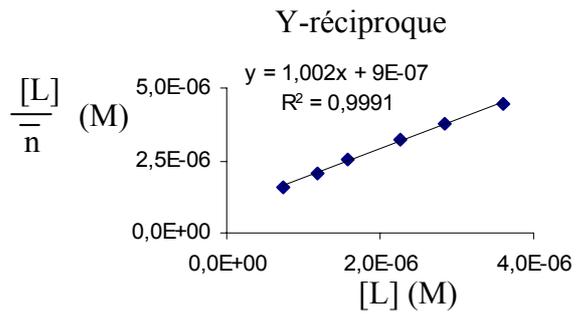
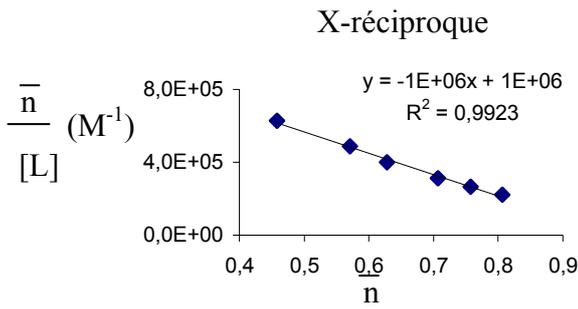
Double-réiproque



Ajustement non-linéaire

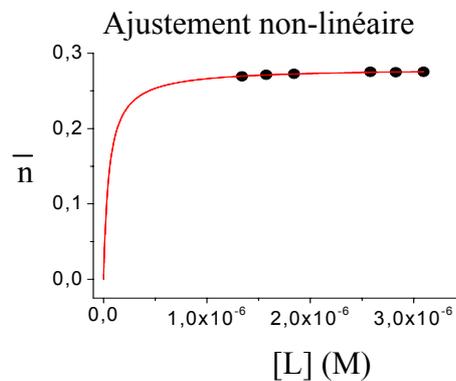
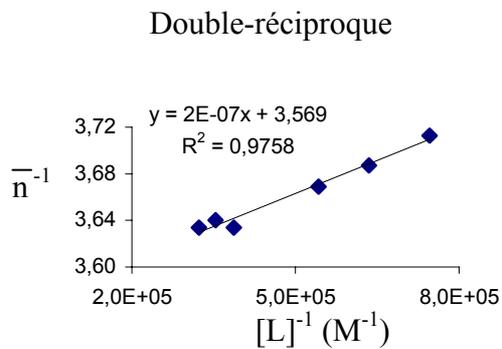
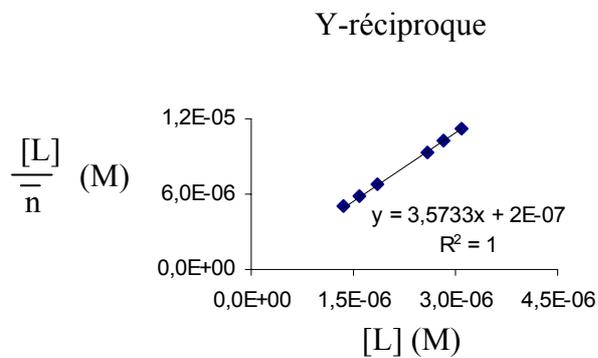
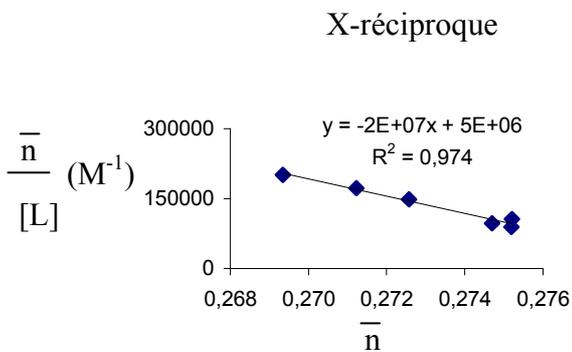


8.b. Ligand = héparine



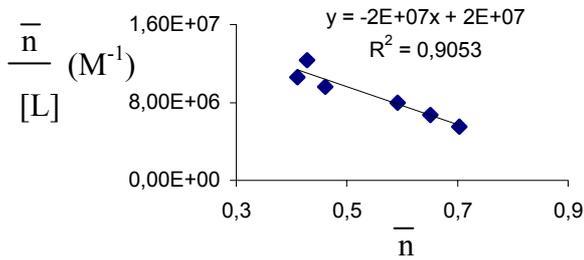
9. Octa-B

9.a. Ligand = Antihrombine III

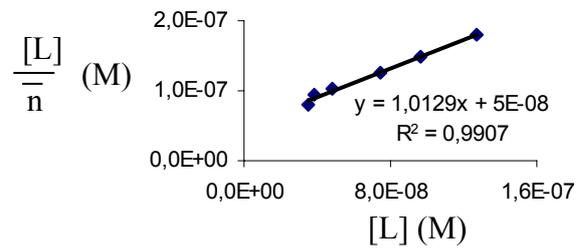


9.b. Ligand = héparine

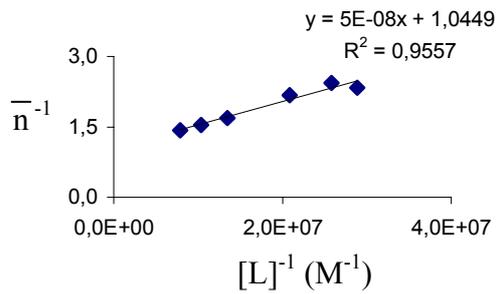
X-réciproque



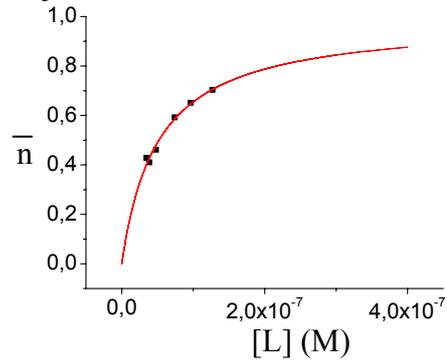
Y-réciproque



Double-réciproque



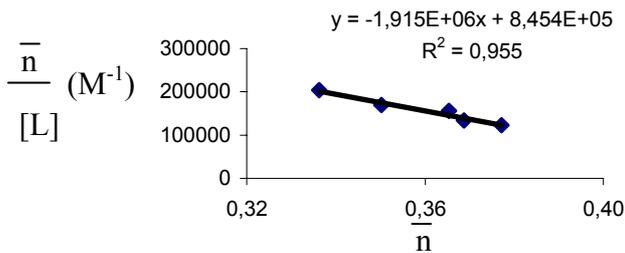
Ajustement non-linéaire



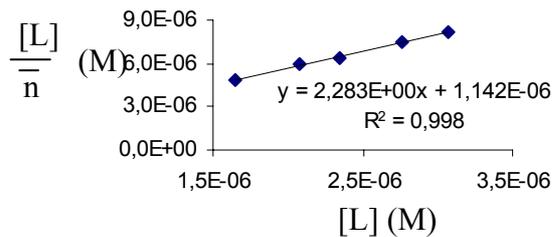
10. Deca-B

10.a. Ligand = Antithrombine III

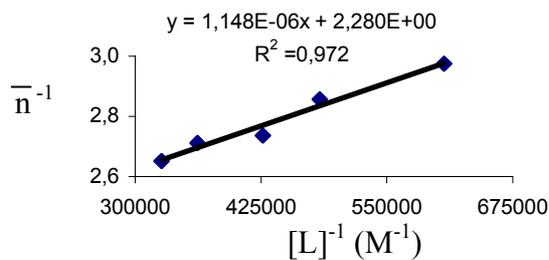
X-réciproque



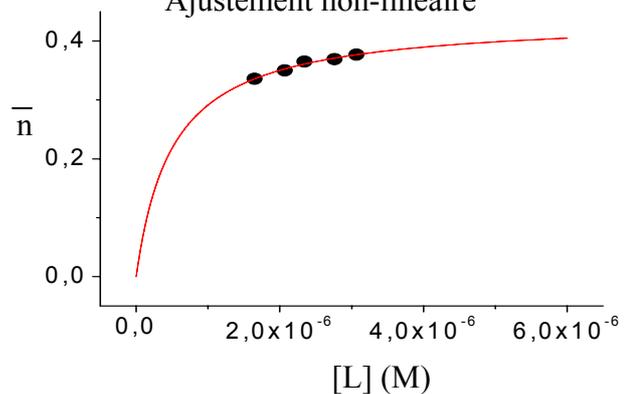
Y-réciproque



Double-réciproque

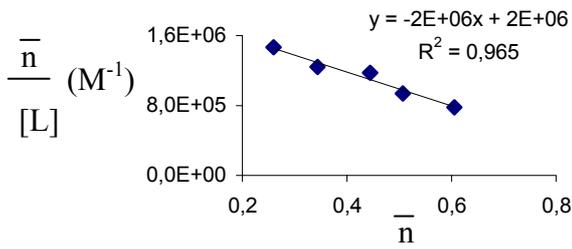


Ajustement non-linéaire

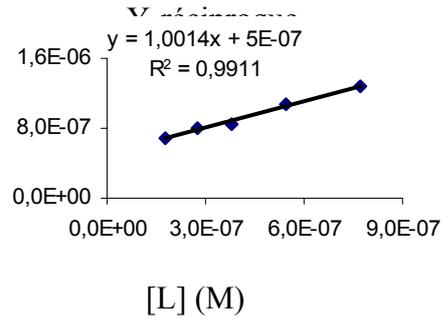


10.b. Ligand = héparine

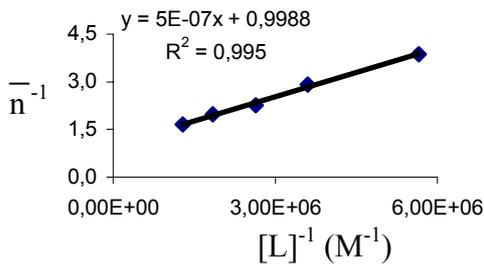
X-réciproque



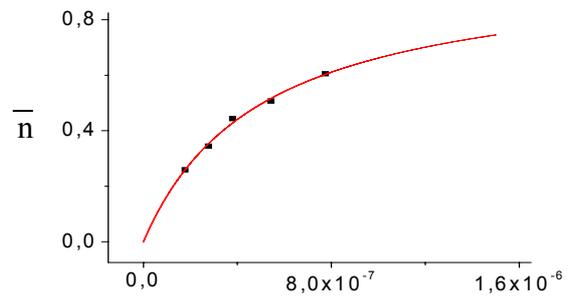
$\frac{[L]}{\bar{n}}$ (M)



Double-réciproque



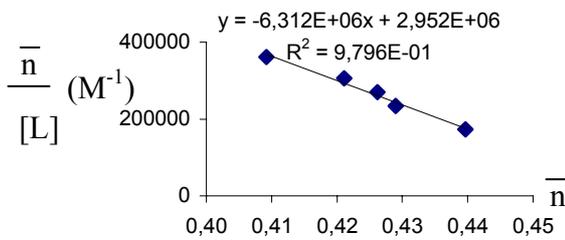
Ajustement non-linéaire



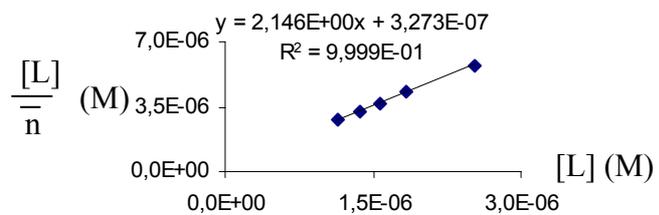
11. Deca-C

11.a. Ligand = antithrombine III

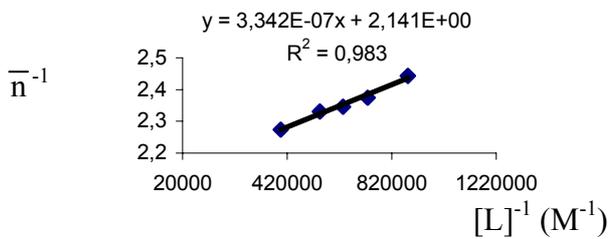
X-réciproque



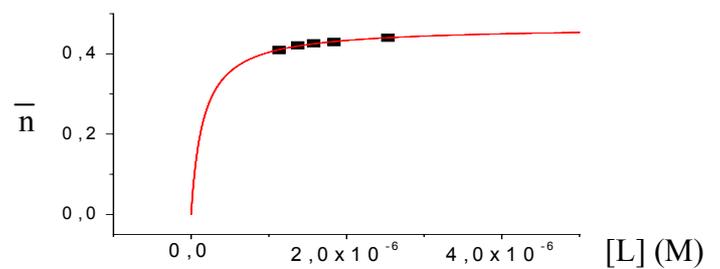
Y-réciproque



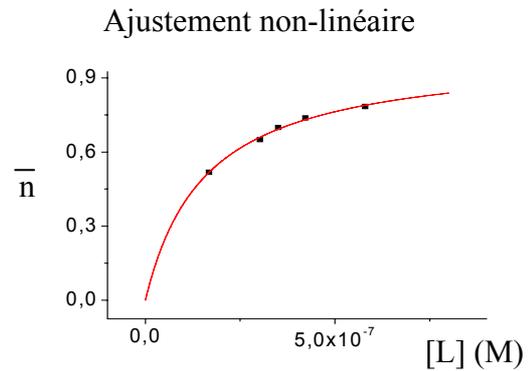
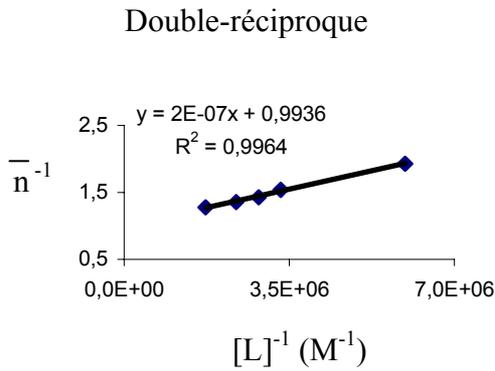
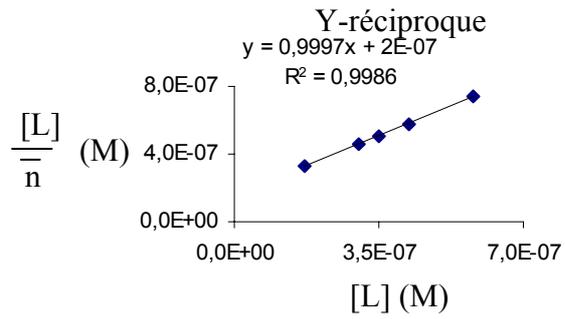
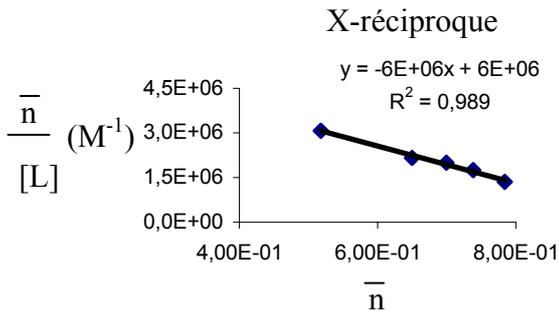
Double-réciproque



Ajustement non-linéaire



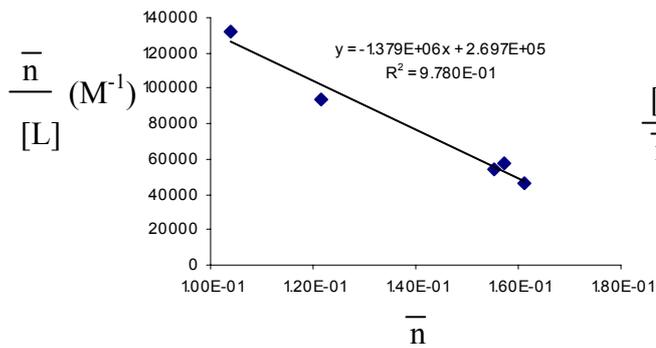
11.b. Ligand = Héparine



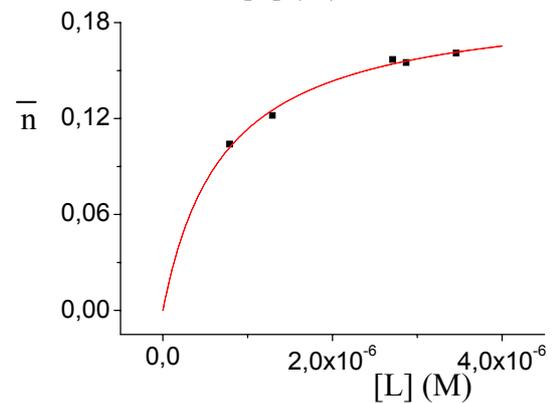
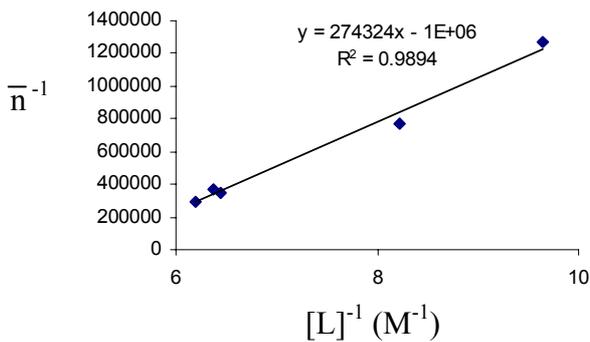
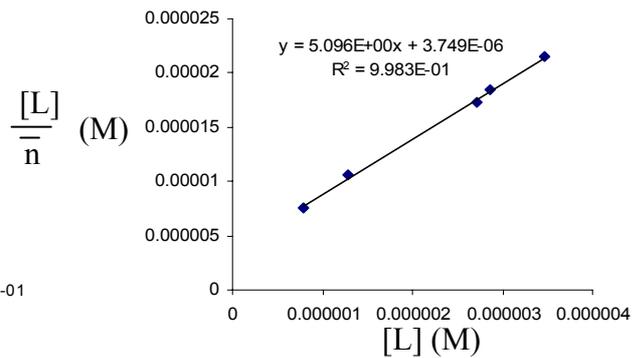
12. Deca-A

12.a. Ligand = Antithrombine III

X-réiproque



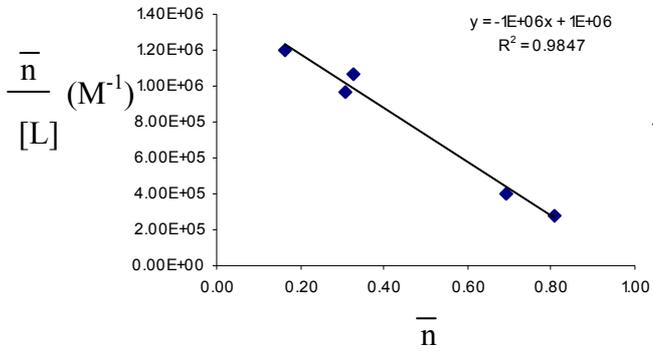
Y-réiproque



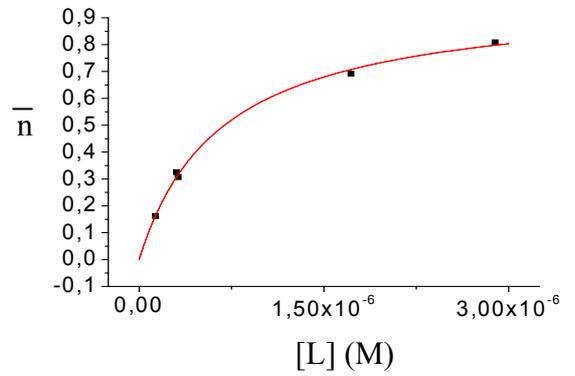
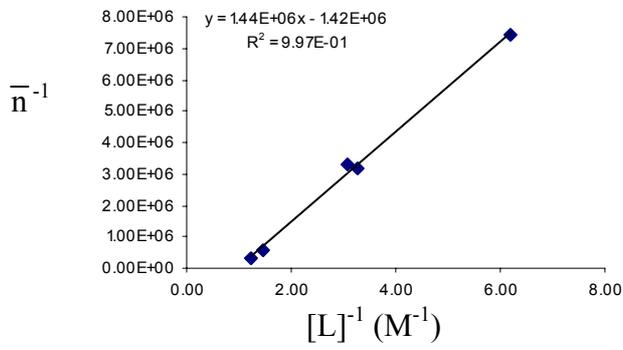
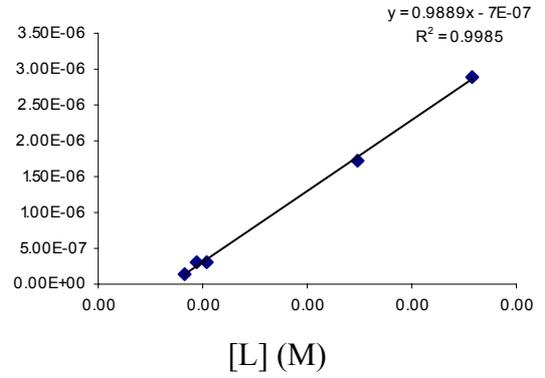
12.b. Ligand = Héparine

X-réciproque

Y-réciproque



$\frac{[L]}{n}$ (M)



Annexe 3 : Préparation des électrolytes et marqueurs.

L'eau utilisée pour la préparation des électrolytes de séparation, le rinçage des capillaires et le nettoyage de l'appareillage provient d'un système Alpha Q de Millipore (Molsheim, France). Elle est de qualité ultrapure (résistivité de 18,2 MΩ.cm).

Le tampon phosphate de sodium de pH mesuré 7,05 et force ionique 100 mM utilisé pour la caractérisation de l'antithrombine III a été préparé à partir des sels monosodiques et dissodiques d'origine Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 1,73 \cdot 10^{-2} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 2,76 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

Pour la caractérisation des dérivés hépariniques et les migrations effectuées en mode frontal, les tampons phosphate de pH mesuré 7,05 et force ionique 50 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 9,98 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1,34 \cdot 10^{-2} \text{ M.}$$

Les tampons phosphate de pH mesuré 6,78 et force ionique 50 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 16,6 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 11,1 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Les tampons phosphate de pH mesuré 6,78 et force ionique 100 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 28,7 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 23,7 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Les tampons phosphate de pH mesuré 6,78 et force ionique 150 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 40,6 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 36,4 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Les tampons phosphate de pH mesuré 6,45 et force ionique 50 mM utilisés comme électrolyte de séparation ont été préparés à partir des sels monosodique et dissodique d'origine Sigma, aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 24,9 \cdot 10^{-3} \text{ M et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 8,4 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Le tampon formiate de sodium 72,9 mM de pH 4,00 et de force ionique 50 mM utilisé comme électrolyte de séparation a été préparé par addition d'acide formique d'origine Riedel-deHaën (Saint Quentin Fallavier, France) à une solution de formiate de sodium d'origine Acros Organics (Noisy le Grand, France) à la concentration de $5,00 \cdot 10^{-2}$ M jusqu'à l'obtention du pH désiré.

La solution de dodécylsulfate de sodium 50 mM d'origine Fluka (Saint Quentin Fallavier, France) utilisée lors de la préconcentration du peptide a été fraîchement préparée dans l'électrolyte formiate de sodium décrit ci-dessus.

Le marqueur neutre de flux électroosmotique utilisé est soit le formamide, d'origine Fluka, soit l'alcool benzylique d'origine Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Une solution de formamide à $8,4 \cdot 10^{-3}$ M (0,03%) ou d'alcool benzylique à $3,2 \cdot 10^{-4}$ M (0,003%) dans le tampon phosphate a été utilisée pour déterminer le flux électroosmotique lors des migrations électrophorétiques.

Les échantillons d'antithrombine-III humaine de masse moléculaire 57875 Da proviennent de la société Chromogenix ou Hyphen-Biopep. Des solutions dans l'eau à $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($8,64 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pour l'échantillon Chromogenix, et $3,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($6,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) pour l'échantillon Hyphen Biopep ont été préparées. Pour chacun des échantillons, les solutions ont été fractionnées par parties aliquotes de 10 μL . Ces fractions ont été conservées au congélateur à -30°C . Elles ont été décongelées, puis laissées à reposer pendant 1 heure et demie à température ambiante avant toute utilisation.

Calcul de correction de force ionique sur la valeur de pH [37]

Pour un électrolyte support de force ionique I_c , il est nécessaire de corriger la valeur du pK_a (donnée pour 7,21 à 25°C et à force ionique nulle [38]) pour le calcul du pH de cet électrolyte support. La correction intervient :

- sur les coefficients d'activité des espèces en solution par la formule :

$$\log \gamma_i = -0,51z_i^2 \frac{I_c^{0,5}}{1 + B.a.I_c^{0,5}} \quad (27)$$

Où a est un paramètre dimensionnel de l'ion et B, une constante valant $0,33.10^{10} \text{ m}^{-1}$ en solution aqueuse à 25°C.

- puis sur la constante d'équilibre du couple acido-basique par :

$$K = K^\circ \cdot f(\gamma_i) \quad (28)$$

Le tableau ci dessous regroupe le paramètre a ainsi que la valeur de γ_i pour chaque ion de l'électrolyte support :

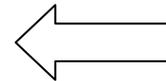
| Ion | Paramètre a (nm) | γ_i ($I_c = 50 \text{ mM}$) | γ_i ($I_c = 100 \text{ mM}$) |
|---------------------------|------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| H^+ | 0,9 | 0,854 | 0,826 |
| H_2PO_4^- | 0,4 | 0,816 | 0,770 |
| HPO_4^{2-} | 0,4 | 0,444 | 0,351 |

Ce qui conduit pour le pKa du phosphate à :

- pKa = 6,86 pour une force ionique de 50 mM
- pKa = 6,76 pour une force ionique de 100 mM

Annexe 4 : Séquence de l'Antithrombine III humaine [35]

His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg
Asp Ile Pro Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro
Glu Lys Lys Ala Thr Glu Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys
Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val Trp Glu Leu Ser
Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln His
Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu
Ser Pro Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys
Leu Gly Ala Cys Asn Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu
Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser Glu Lys Thr Ser Asp
Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys Arg Leu
Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala
Asn Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu
Thr Tyr Gln Asp Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys
Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys Glu Asn Ala Glu Gln Ser
Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe
Lys Gly Leu Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr
Arg Lys Glu Leu Phe Tyr Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys
Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly Lys Phe Arg Tyr
Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu Pro
Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro
Lys Pro Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu
Thr Pro Glu Val Leu Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu
Glu Met Met Leu Val Val His Met Pro Arg Phe Arg Ile
Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln Asp Met
Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu
Pro Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val
Ser Asp Ala Phe His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu
Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala Ser Thr Ala Val Val Ile
Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val Thr Phe Lys
Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro
Cys Val Lys



Site de liaison au
pentasaccharide

11 Références bibliographiques

- [1] M.-C. Bourin, U. Lindahl, *Biochem. J.*, 289, 313-330, 1993.
- [2] J. Bernard, J.-P. Lévy, B. Varet, Clauvel J.-P., J.-D. Rain, Y. Sultan, *Hématologie*, 8ème édition, Masson, Paris, 1996.
- [3] J.-P. Lévy, B. Varet, *Hématologie pour le praticien*, Ed Simep, Paris, 1988.
- [4] A. Chan, L. Berry, H. O'Brodivich, P. Klement, L. Mitchell, Baranowski B., Monagle P., Andrew M., *J. Biol. Chem.*, 272 (35), 22111-22117, 1997.
- [5] L. Rodén, dans J. Lennarz, *The biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum Press, New York, 267-371, 1980.
- [6] G. Peijler, G. Bäckström, U. Lindahl, M. Paulsson, M. Dziadek, S. Fujiwara, R. Timpl, *J. Biol. Chem.*, 262 (11), 5036-5043, 1987.
- [7] S. Duteil, Thèse de l'Université Paris VI, 2000.
- [8] D. Mascotti, T. Lohman, *Biochemistry*, 34, 2908-2915, 1995.
- [9] U. Dessai, M. Petitou, I. Björk, S. Olson, *J. Biol. Chem.*, 273 (13), 7478-7487, 1998.
- [10] P. Duchaussoy, G. Jaurand, P.-A. Driguez, I. Lederman, M.-L. Ceccato, F. Gouvernec, J.-M. Strassel, P. Sizun, M. Petitou, J.-M. Herbert, *Carb. Res.*, 317, 85-99, 1999.
- [11] P. Duchaussoy, G. Jaurand, P.-A. Driguez, I. Lederman, M.-L. Ceccato, F. Gouvernec, J.-M. Strassel, P. Sizun, M. Petitou, J.-M. Herbert, *Carb. Res.* 317, 63-84, 1999.
- [12] M. Lee, A. Lander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2268-2272, 1991.
- [13] K. Gunnarson, L. Valtcheva, S. Hjerén, *Glycoconj. J.*, 14, 859-862, 1997.
- [14] A. Tuong, F. Uzabiaga, M. Petitou, J.-C. Lormeau, C. Picard, *Carb. Lett.*, 1, 55-60, 1994.

- [15] S. Olson, J. Shore, *J. Biol. Chem.*, 257 (24), 14891-14895, 1982.
- [16] S. Olson, K. Srinivasan, I. Björk, D. Shore, *J. Biol. Chem.* 256 (21), 11073-11179, 1981.
- [17] U. Dessai, M. Petitou, I. Björk, S. Olson, *J. Biol. Chem.*, 273 (13), 7478-7487, 1998.
- [18] N. Heegaard, F. Robey, *Anal. Chem.*, 64, 2479-2482, 1992.
- [19] J. McKeon, L. Holland, *Electrophoresis*, 25, 1243-1248, 2004.
- [20] J. Liu, S. Abid, M. Hail, M. Lee, J. Hangeland, N. Zein, *Analyst*, 123, 1455-1459, 1998.
- [21] F. Perreau, Rapport de DEA de chimie Analytique de l'Université Paris 6, 2000.
- [22] A. Varenne, P. Gareil, S. Collic-Jouault, R. Daniel, *Anal. Biochem.*, 315, 152-159, 2003.
- [23] T. Hattori, K. Kimura, E. Seyrek, P. Dubin, *Anal. Chem.*, 295, 158-167, 2001.
- [24] M. Young-Kim, A. Varenne, R. Daniel, P. Gareil, *J. Sep. Sci.*, 26, 1154-1162, 2003
- [25] M. Berezovski, S. Krylov, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 13674-13675, 2002.
- [26] M. Berezovski, R. Nutiu, Y. Li, S. Krylov, *Anal. Chem.*, 75, 1382-1386, 2003.
- [27] J. Gao, P. Dubin, B. Muhoberac, *Anal. Chem.*, 69, 2945-2951, 1997.
- [28] B. Verzola, C. Gelfi, P. G. Righetti, *J. Chromatogr. A*, 868, 85-99, 2000.
- [29] R. Dönges, J. Römisch, H. Strauss, D. Brazel, *J. Chromatogr. A*, 924, 303-313, 2001.
- [30] S. Brennan, P. George, R. Jordan, *FEBS Lett.*, 219, 431-436, 1987.
- [31] E. Seyrek, P. Dubin, C. Tribet, E. Gamble, *Biomacromolecules*, 4, 273-282, 2003.
- [32] K. Rundlett, D. Armstrong, *J. Chromatogr. A*, 721, 173-186, 1996.
- [33] P. Grootenhuis, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. van Boeckel, *Nature Struct. Biol.*, 2, 736-739, 1995.

- [34] H. Conrad, Heparin-binding Proteins, Academic Press, San Diego, CA, 1998, 203-208.
- [35] K. Belzar, T. Dafforn, M. Petitout, R. Carell, J. Huntington, J. Biol. Chem., 275 (12), 8733-8741, 2000.
- [36] L. Jin, J. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. Pike, R. Carrell, modèle moléculaire établi par diffraction aux rayons X depuis le complexe ATIII-pentasaccharide cristallisé (modèle n° : 1AZX), 13 janvier 1999, disponible sur internet depuis le site <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [37] B. Trémillon, Electrochimie analytique et réactions en solution, tome 1, Masson, Paris, 13-19, 1993.
- [38] A. Ringbom, Les complexes en chimie analytique, Dunod, Paris, 273, 1967.

Chapitre 5. DETERMINATION DE SEUILS D'AGREGATION POUR LES TENSIOACTIFS ABSORBANTS OU TRANSPARENTS EN UV, NEUTRES OU CHARGES

1 Introduction

Les tensioactifs sont des composés amphiphiles constitués par deux parties de polarité opposées. La première partie, hydrophobe, est généralement constituée par une ou deux chaîne(s) hydrocarbonée(s) plus ou moins longue(s). La seconde partie, polaire ou ionique, est fortement hydrophile (figure 1).

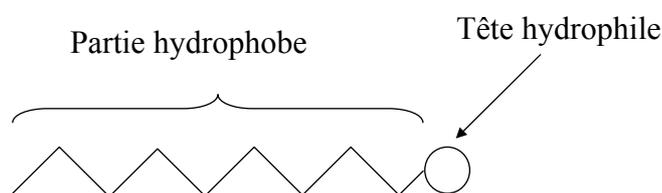


Figure 1 : Représentation schématique d'un monomère de tensioactif.

Selon la nature de la tête polaire, on distingue les tensioactifs ioniques et les tensioactifs non – ioniques, la classe des tensioactifs ioniques pouvant elle-même se subdiviser en fonction de la charge de la tête polaire (cationique, anionique ou zwitterionique). La figure 2 donne des exemples de tensioactifs fréquemment utilisés en électrophorèse.

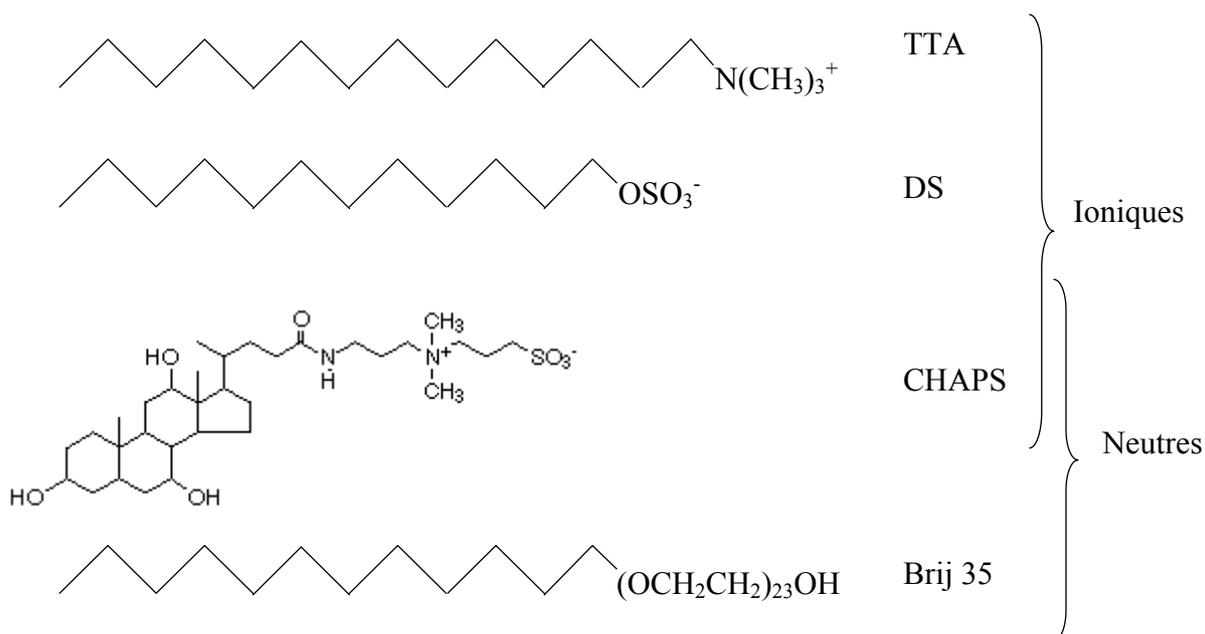


Figure 2 : Structures moléculaires de quelques tensioactifs.

TTA : tétradécyltriméthylammonium ; DS : dodécylsulfate ; Brij 35 : polyoxyéthylène-23-lauryléther ; CHAPS : 3-[(3cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate.

Placés en solution ces composés forment, au-delà d'une concentration appelée concentration micellaire critique, une pseudophase constituée d'agrégats (micelles). Selon la nature du solvant, la partie hydrophile (milieu aqueux) ou la partie hydrocarbonée (milieu solvant apolaire) est orientée vers l'extérieur de la micelle. En milieu aqueux, cette concentration micellaire critique dépend notamment du milieu (pH [1], force ionique [2], température [1], nature du tampon [2], nature du contre-ion [3] et composition hydro-organique [4] essentiellement). La pseudophase formée permet notamment de solubiliser des composés hydrophobes et les propriétés d'agrégation des tensioactifs trouvent de nombreuses utilisations industrielles. L'emploi des tensioactifs dans les formulations d'encapsulation [5-7] montre qu'il est également d'intérêt de pouvoir déterminer la valeur seuil de l'agrégation non seulement dans des conditions de milieu variées mais contenant éventuellement plusieurs tensioactifs en mélange. Dans le secteur analytique ces propriétés ont été employées notamment en électrophorèse capillaire pour la séparation de composés neutres [8], ou pour la mise en œuvre de la préconcentration en ligne des échantillons [9]. Pour ces des derniers exemples, la connaissance de la CMC du tensioactifs employé dans les conditions analytiques apparaît comme un paramètre clé pour l'optimisation des conditions opératoires.

Pour accéder aux valeurs des seuils d'agrégation, différentes techniques peuvent être mises en œuvre : conductométrie [10], mesure de tension de surface [11], voltampérométrie cyclique [12], potentiométrie [13], RMN [14], diffusion de lumière [15], spectrophotométrie [16], fluorimétrie [17]. Parmi les techniques disponibles, l'électrophorèse capillaire s'est plus récemment révélée être adaptée à la mesure de ces seuils. Trois principales méthodes électrophorétiques, que nous allons brièvement développer, ont été décrites.

Une première méthode, présentée par Cifuentes et coll. [18], consiste à observer la variation du courant lors de l'application de la tension sur un capillaire rempli successivement par des solutions d'un tensioactif chargé à des concentrations encadrant la valeur de CMC. Cette approche revient à effectuer une mesure miniaturisée de la conductivité spécifique de ces solutions et n'est applicable qu'aux tensioactifs chargés. La conductivité spécifique σ ($S.m^{-1}$) est liée aux paramètres électrophorétiques selon la loi d'Ohm par la relation :

$$V = \frac{L.I}{\pi.r^2.\sigma} \quad (1)$$

Avec L : longueur du capillaire ; I : intensité mesurée, V : tension appliquée, r : rayon du capillaire ;

La conductivité spécifique d'une solution s'écrit :

$$\sigma = F \sum_i (z_i \mu_i c_i) \quad (2)$$

avec z_i : charge de l'ion i ; μ_i : mobilité de l'ion i ; c_i : concentration de l'ion i . Pour une solution suffisamment diluée de tensioactif dans un électrolyte support et de concentration inférieure à la CMC, la conductivité spécifique est égale à la somme des conductivités apportées par chacune des espèces en solution et s'écrit donc :

$$\sigma = \sigma_{ES} + \sigma_{tensio} + \sigma_{CI} \quad (3)$$

avec σ_{ES} : conductivité de l'électrolyte support, σ_{tensio} : conductivité apportée par le tensioactif, et σ_{CI} : conductivité apportée par le contre-ion. Avant l'agrégation du tensioactif, la conductivité de la solution augmente proportionnellement à sa concentration. Lorsque le tensioactif s'agrège, la conductivité de la solution s'écrit :

$$\sigma = \sigma_{ES} + \sigma_{mono} + \sigma_{mic} + \sigma_{CI} \quad (4)$$

avec σ_{mono} : conductivité apportée par le monomère de tensioactif ; σ_{mic} : conductivité apportée par les micelles. Au delà de la CMC, la concentration en monomère de tensioactif devient constante tandis que la concentration des micelles augmente proportionnellement à c_i / n , avec n nombre d'agrégation. Du fait de la condensation des contre-ions sur les micelles, la mobilité des micelles est inférieure à n fois la mobilité du monomère, et la concentration du contre-ion libre en solution est inférieure à la concentration totale du contre-ion introduite. Ainsi, on observe une rupture de la proportionnalité de la conductivité à la concentration en tensioactif pour une valeur de concentration égale à la CMC.

Cette méthode est donc plus sensible lorsque les courants mesurés sont élevés c'est-à-dire pour les tensions appliquées les plus élevées, et les diamètres de capillaire les plus importants. Néanmoins pour être exploitables, les mesures doivent être effectuées à température constante, c'est-à-dire pour des puissances dissipées compatibles avec la capacité de thermorégulation du système, soit en général moins de 2 W.m^{-1} [18].

Une seconde méthode, que nous nommerons par la suite méthode de mobilité, est issue de la chromatographie électrocinétique micellaire et a été décrite par Jacquier et coll [19] en prenant comme exemple la détermination de la CMC du SDS puis étendue au cas des tensioactifs cationiques. Pour le premier cas présenté, cette méthode consiste à observer la variation de la mobilité effective μ_{eff} d'un soluté neutre hydrophobe (le naphthalène) placé dans une solution de tensioactif. Les équilibres considérés pour cette méthode sont illustrés figure 3.

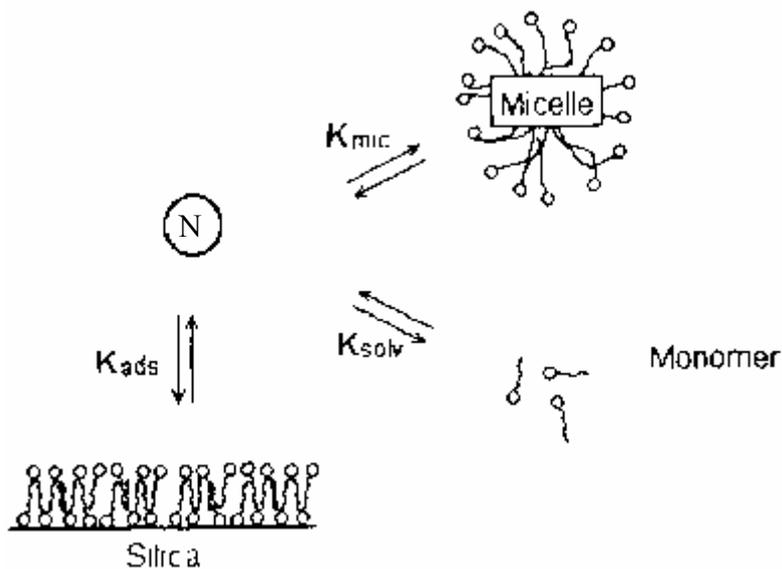


Figure 3 : Equilibres mis en jeu dans la chromatographie électrocinétique micellaire [Jacquier].

Dans ce système la mobilité électrophorétique du marqueur neutre N peut s'écrire :

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[N-T]}{[N]_t} \mu_{N-T} + \frac{[N-M]}{[N]_t} \mu_{N-M} \quad (5)$$

avec μ_{N-T} : mobilité électrophorétique du complexe marqueur-monomère de tensioactif, et μ_{N-M} : mobilité électrophorétique du marqueur en phase micellaire.

En dessous de la CMC, la mobilité du marqueur neutre N n'est modifiée que du fait de son association avec le monomère de tensioactif. Comme la constante de cette association est généralement faible, la mobilité apparente du marqueur reste quasiment constante et égale à la mobilité électroosmotique.

Au dessus de la CMC, le marqueur s'inclut dans la phase micellaire et la mobilité effective du marqueur neutre augmente rapidement avec la concentration totale du tensioactif.

L'intersection des deux courbes obtenues donne la valeur de la CMC. La figure 4 illustre la variation de mobilité observée pour le naphthalène en présence de SDS dans un tampon borate de sodium 30 mM et permet d'estimer la CMC à 5,3 mM dans ce milieu.

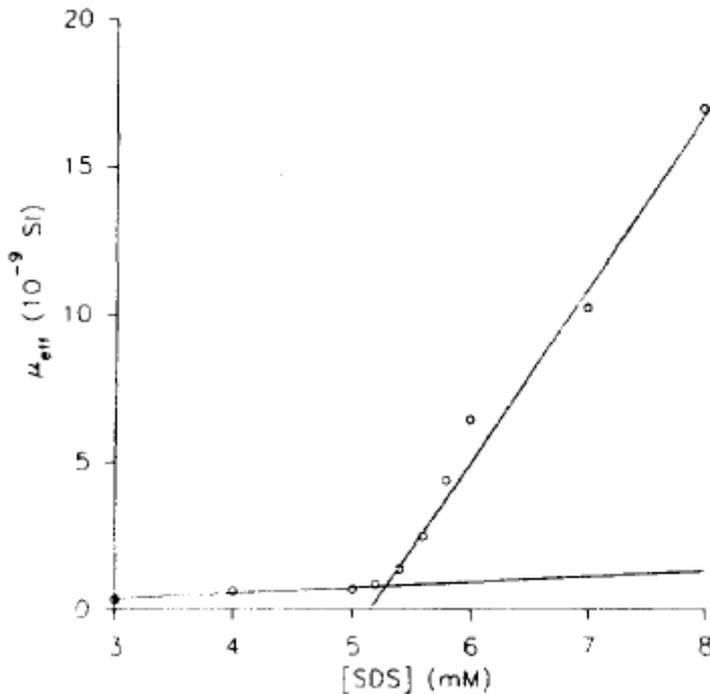


Figure 4 : mobilité du naphthalène $5 \cdot 10^{-4}$ M en présence de dodécylsulfate de sodium.

Capillaire en silice vierge $50 \mu\text{m} \times 57 \text{cm}$ (longueur utile : 50 cm). Electrolyte support : borate de sodium 30 mM de pH 9,2. Détection UV à 214 nm. Température : 25°C . Tension appliquée : non précisée.

La troisième méthode, que nous nommerons par la suite méthode chromatographique électrophorétique micellaire, consiste à observer la variation du facteur de rétention k d'un soluté M dans un électrolyte contenant des micelles de tensioactif. Le facteur de rétention k s'écrit :

$$k = \frac{n_{mic}}{n_{aq}} = K \frac{V_{mic}}{V_{aq}} = K \frac{\bar{v}([T]_t - CMC)}{1 - \bar{v}([T]_t - CMC)} \approx K\bar{v}([T]_t - CMC) \quad (6)$$

avec n_{aq} le nombre de moles du soluté M dans la phase aqueuse, n_{mic} le nombre de moles du soluté M dans la phase micellaire, K le coefficient de partage du soluté M entre la phase aqueuse et la phase micellaire, \bar{v} le volume molaire partiel du tensioactif et $[T]_t$ la concentration totale en tensioactif.

Le facteur de rétention k du soluté M est relié à sa mobilité effective par la relation :

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{1}{1+k} \mu_0 + \frac{k}{1+k} \mu_c \quad (7)$$

avec μ_0 : mobilité du soluté en l'absence de micelles et μ_c : mobilité du complexe en phase micellaire.

En traçant la courbe $k = f([T]_t)$, on obtient une droite dont l'intersection avec l'axe des abscisses donne la valeur de la CMC. La figure 5 montre un exemple de telles courbes pour le tensioactif dodécylsulfate de sodium.

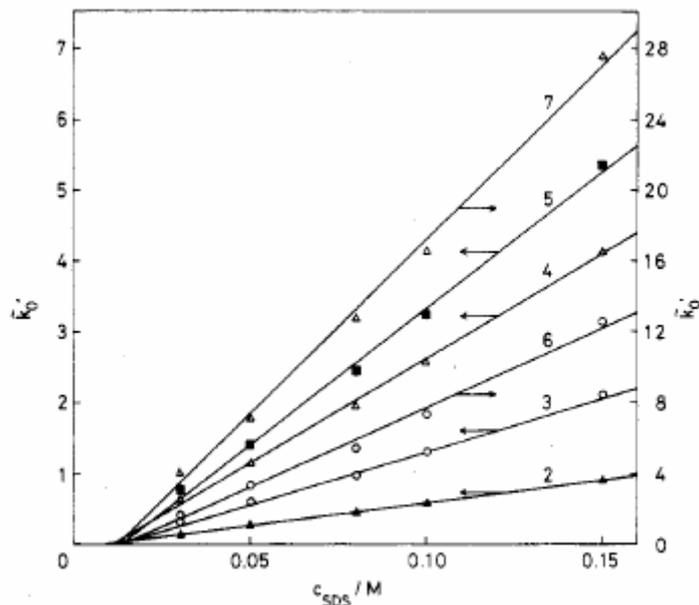


Figure 5 : courbes $k = f([T]_t)$ pour le dodécylsulfate de sodium. [20]

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 65 cm (longueur utile 50 cm). Electrolyte support : tampon borate de sodium 100 mM et phosphate de sodium 50 mM de pH 7,0 contenant le dodécylsulfate de sodium en concentrations variables. Tension appliquée : 15 kV. Température : 35°C. Détection par absorbance UV à 210 nm. Identification : résorcinol (2) ; phénol (3) ; para-nitroaniline (4) ; nitrobenzene (5) ; toluène (6) ; 2-naphtol (7).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à l'évaluation de l'analyse frontale électrophorétique capillaire comme nouvelle méthode pour la détermination des seuils d'agrégations dans le cas de tensioactifs purs et impurs. La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude de tensioactifs anioniques absorbant en UV. Puis nous nous intéresserons à l'application de l'analyse frontale électrocinétique capillaire à la détermination des seuils d'agrégation dans le cas de tensioactifs anioniques, cationiques et neutres.

2 Réactifs et produits

L'octylbenzènesulfonate de sodium (97%) et le dodécylbenzènesulfonate de sodium (pureté non spécifiée), le Brij 35 (pureté non spécifiée), le TTABr (99%), l'éthylparabène ainsi que le marqueur neutre (alcool benzylique, 99%) proviennent de la société Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Le tétraborate de sodium (99%) ainsi que le formamide (99%) proviennent de la société Fluka (St Quentin-Fallavier, France). L'eau utilisée pour la préparation des électrolytes de séparation, le rinçage des capillaires et le nettoyage de l'appareillage provient d'un système Alpha Q de Millipore (Molsheim, France). Elle est de qualité ultrapure (résistivité de 18,2 M Ω .cm). Les autres réactifs utilisés sont de qualité pour analyses.

3 Cas de tensioactifs absorbant en UV.

Introduite récemment par Gao et coll. [21], l'analyse frontale électrophorétique capillaire consiste à introduire de façon continue l'échantillon dans le capillaire de séparation sous l'effet du champ électrique. Cette méthode conduit à la formation de fronts de migration selon la mobilité des formes en solution. La séparation résultante n'étant que partielle, l'exploitation des fronts de migrations obtenus permet de quantifier les différentes formes en solution sans perturber les équilibres chimiques impliqués. Cette méthode a ainsi déjà été employée avec succès pour la mesure des concentrations à l'équilibre dans le cas de systèmes interactifs classiques mettant en jeu deux partenaires (chapitre II). Appliquée au système auto-associatif du tensioactif, la méthode doit donc également permettre de quantifier la forme libre, seule en solution avant l'agrégation du tensioactif, puis à l'équilibre au-delà de la formation des agrégats. Pour cette étude, les tensioactifs analysés concerneront les deux molécules de la série des alkylbenzènesulfonates de sodium (l'octylbenzènesulfonate de sodium, C8, et le dodécylbenzènesulfonate de sodium C12) qui comportent un chromophore permettant leur détection directe par suivi du signal UV.

3.1 Caractérisation des échantillons commerciaux de tensioactif par électrophorèse de zone

Avant d'effectuer la détermination des concentrations micellaires critiques par analyse frontale, les lots d'échantillons ont été caractérisés par électrophorèse de zone en vue de recueillir des informations sur la mobilité des produits ainsi que sur leurs puretés. La figure 6 montre les migrations effectuées en zone dans le tampon borate 20 mM de pH 9,2 à 25°C.

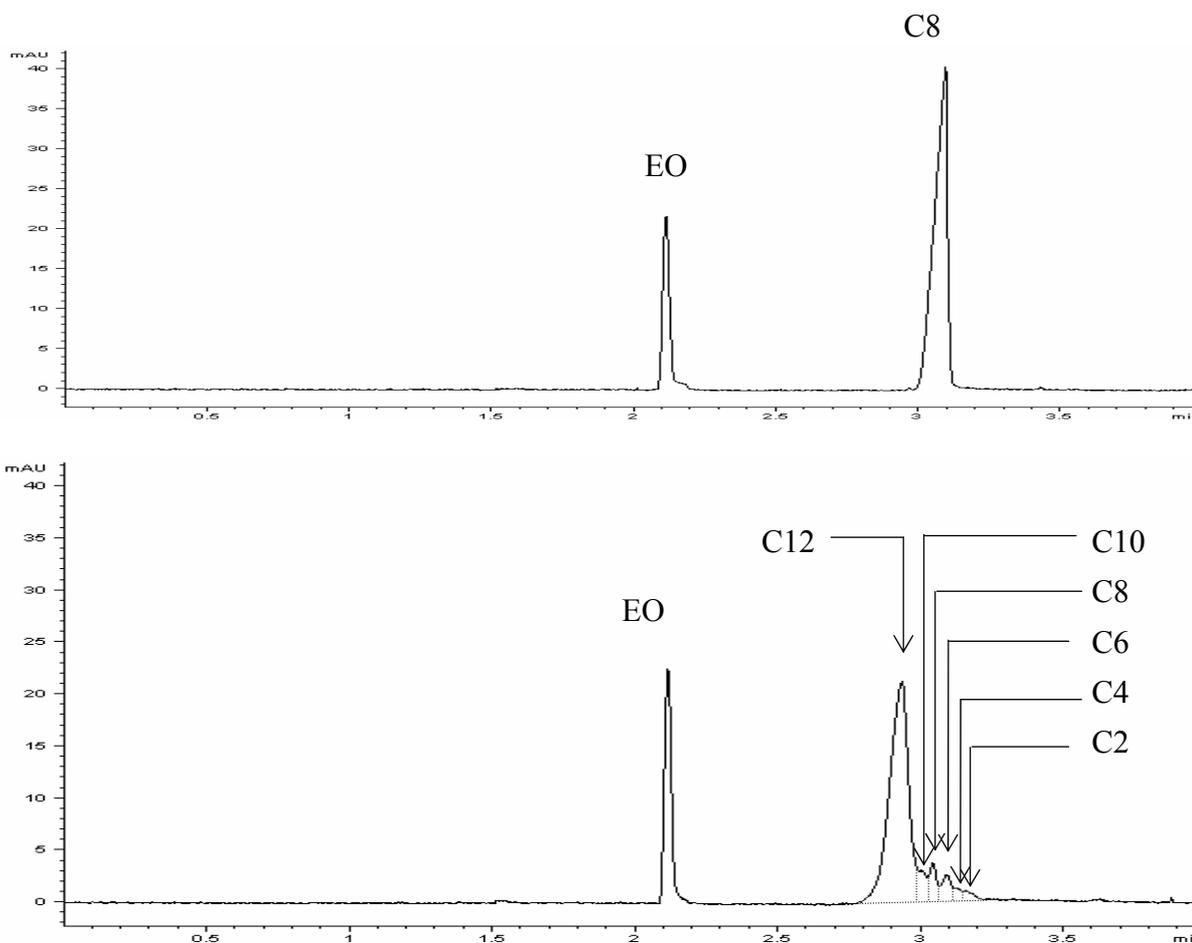


Figure 6 : Electrophorèse de zone des échantillons d’octyl- et de dodécylbenzènesulfonate de sodium.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2 et de force ionique 10 mM. Tension appliquée : +10 kV ($I = 5 \mu\text{A}$). Détection par absorbance UV à 200 nm. Température : +30 °C. Echantillons : Octylbenzènesulfonate de sodium 0,1 mM (A) ; Dodécylbenzènesulfonate de sodium 0,1 mM (B). Injection hydrodynamique d’alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s). Attribution : EO : alcool benzylique, C12 : dodécylbenzènesulfonate de sodium, C10 : décylbenzènesulfonate de sodium, C8 : octylbenzènesulfonate de sodium, C6 : hexylbenzènesulfonate de sodium, C4 : butylbenzènesulfonate de sodium, C2 : éthylbenzènesulfonate de sodium.

Les électrophérogrammes présentent deux pics principaux. Tout d’abord le pic de marqueur neutre qui est injecté en amont de la zone échantillon, puis un second pic qui correspond au tensioactif majoritaire. L’injection d’une courte zone d’électrolyte support entre le marqueur neutre et l’échantillon permet d’éviter toute interaction entre les solutés injectés. Les électrophérogrammes obtenus montrent dans le cas du tensioactif en C12 que le produit est impur. Le dopage de la solution de C12 par une solution de C8 permet par augmentation de l’absorbance du troisième pic d’identifier le C8 comme une des impuretés de l’échantillon. De plus une série d’expériences (non montrées) réalisées en électrophorèse de

zone dans un électrolyte support constitué d'un tampon borate de force ionique 50 mM laisse supposer, compte tenu du dé-triplement du pic de C12, que le tensioactif principal est au moins constitué d'un mélange des trois isomères de position (o,m,p) de la chaîne alkyle sur le noyau aromatique. Une série d'expériences en milieu cyclodextrine pourrait apporter une confirmation du dernier résultat. Après intégration des aires de pics de l'échantillon de C12, on peut conclure que le dodécylbenzènesulfonate présente une teneur approximative de 85% en dodécylbenzènesulfonate, ce dernier résultat étant sous évalué du fait des différences de coefficient d'extinction molaire. En outre, les électrophérogrammes montrent une forte influence de la dispersion par électromigration repérée par la forme triangulaire des pics qui amène à surévaluer les valeurs de mobilités effectives calculées. La mobilité de l'octylbenzènesulofonate ($m_{ep} = -25,1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et du dodécylbenzènesulfoante ($m_{ep} = -22,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ont été évaluées à 30°C au sommet des pics principaux pour des échantillons de concentrations injectées de 0,05 mM et 0,1 mM respectivement.

| | | | | | | |
|---|------|------|------|------|------|------|
| Temps de migration au sommet du pic (min) | 2,93 | 3,00 | 3,04 | 3,09 | 3,12 | 3,16 |
| Attribution | C12 | C10 | C8 | C6 | C4 | C2 |
| % aire du pic de C12 | 84 | 4 | 8 | 3 | 2 | 1 |

Tableau 1: Composition approximative de l'échantillon de dodécylbenzènesulfonate (C12) d'après l'électrophérogramme de la figure 6.

3.2 Détermination de la CMC de l'octylbenzènesulfonate et du dodécylbenzènesulfonate par les méthodes classiques.

Afin d'évaluer les performances de l'analyse frontale électrophorétique capillaire, nous avons tout d'abord évalué le seuil d'agrégation des deux tensioactifs dans les conditions de milieu de l'électrophorèse (c'est-à-dire dans un tampon borate 20 mM de pH 9,2 (force ionique 10 mM) par deux méthodes classiques, la conductométrie et la mesure de tension superficielle.

3.2.1 Conductométrie

Les mesures de conductivité spécifique ont été effectuées à 30°C dans le tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2 au moyen de l'appareil CDM210 équipé d'une cellule XE100 (Radiometer Analytical). Préalablement aux mesures de conductivité, la constante de cellule du conductimètre a été déterminée par une solution de KCl 0,1 M à la température de 30°C. Pour le dodécylbenzènesulfonate, la mesure a été réalisée par ajouts successifs d'une solution

0,1 M de tensioactif dans le tampon. Pour l'octylbenzènesulfonate, la solubilité du produit ne permet pas de préparer une solution concentrée, la conductivité a donc été évaluée par dilution d'une solution mère 20 mM de tensioactif dans le tampon borate par ajouts successifs de tampon borate à la solution-mère. Les résultats des mesures de conductométrie pour chacun des tensioactifs sont représentés figure 7.

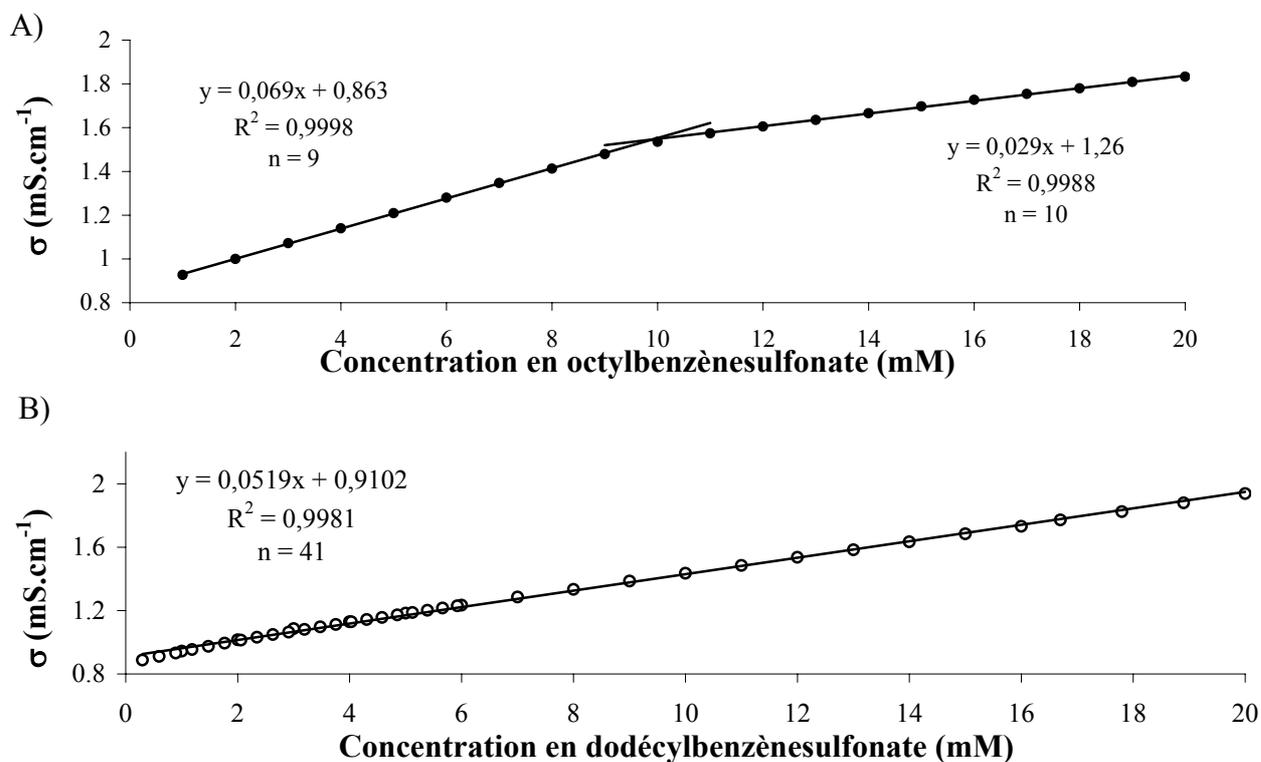


Figure 7 : Variation de la conductivité spécifique σ de solutions d'octylbenzènesulfonate de sodium (A) et de dodécylbenzènesulfonate de sodium (B) en milieu borate de sodium 20 mM de pH 9,2 à 30°C.

Pour l'échantillon d'octylbenzènesulfonate, la conductivité présente deux tendances linéaires, de pentes différentes de part et d'autre d'une concentration-seuil de 9,8 mM, en fonction de la concentration de l'échantillon. Cette rupture traduit le passage du tensioactif de la forme monomère seule à un équilibre en solution avec la forme micellaire. La pente plus faible dans la deuxième partie du graphe s'explique essentiellement par la condensation des contre-ions sur la micelle, cette condensation contribuant à abaisser la concentration en ions sodium libres dans le milieu. Le tableau 2 rassemble les valeurs des coefficients de régression des deux droites, ainsi que les intervalles de confiance à 95% pour chacun des paramètres. Ces intervalles permettent ensuite de déterminer un intervalle de confiance à 95% pour la valeur de la CMC par intersection des deux droites les plus éloignées de la droite moyenne. On trouve une CMC dans l'intervalle de confiance 8,9 – 11 mM pour un risque de 5%.

| | Pente (mS.cm ⁻¹ .mM ⁻¹) | Intervalle de confiance 95% | Ordonnée à l'origine (mS.cm ⁻¹) | Intervalle de confiance 95% |
|----------|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
| Droite 1 | 0,069 | +/- 0,0010 | 0,863 | +/- 0,0058 |
| Droite 2 | 0,029 | +/- 0,0011 | 1,26 | +/- 0,017 |

Tableau 2: Paramètres de régression pour les droites obtenues par conductométrie pour l'octylbenzènesulfonate.

Le dodécylbenzènesulfonate a été analysé selon les mêmes conditions que pour l'octylbenzènesulfonate mais les mesures de conductivité ne permettent pas, comme dans le cas du C8 d'aboutir à une valeur mesurable de la CMC (figure 7B). Néanmoins on peut remarquer que dans l'intervalle de concentration 0,3-2 mM, les points expérimentaux sont tous situés en dessous de la droite de régression globale établie pour l'ensemble des points, alors qu'ils sont tous au dessus de cette droite dans l'intervalle 2-20 mM. Ceci traduit une répartition non aléatoire des points expérimentaux autour de ces droites, et donc probablement deux tendances, distinctes mais non significativement discernables, pour chacun des intervalles avec un seuil d'agrégation voisin de 2 mM.

3.2.2 Mesure de tension superficielle.

Afin de conforter les résultats obtenus par la conductométrie, les solutions ont été étudiées en tension de surface. Les mesures de tension superficielle ont été effectuées dans la gamme de concentration 0 – 20 mM pour chacun des tensioactifs dissous en milieu borate 20 mM et de pH 9,2. Ces mesures ont été réalisées à 30°C à l'aide d'un appareil Krüss KS210ST (Palaiseau, France) équipé d'une lame de platine par dilution des solutions échantillons par l'électrolyte support. Les courbes expérimentales obtenues pour chacun des tensioactifs sont représentées sur la figure 8.

Pour l'octylbenzènesulfonate, la courbe présente une rupture à la linéarité dans l'intervalle 3–10 mM avec passage par un minimum situé vers 7,5 mM. La courbe expérimentale confirme donc le passage de la forme monomère à un équilibre monomère-micelle dans cet intervalle de concentration. La forme en V du graphe de la tension superficielle s'explique par la présence d'impuretés dans la solution de mesure et le palier final est atteint à partir d'une concentration de 10 mM. Néanmoins, la méthode ne permet de déterminer de façon fiable la CMC du fait de son extrême sensibilité à la pureté de la solution

de mesure, la pureté du produit, évaluée par électrophorèse de zone n'étant pas *a priori* à remettre en cause.

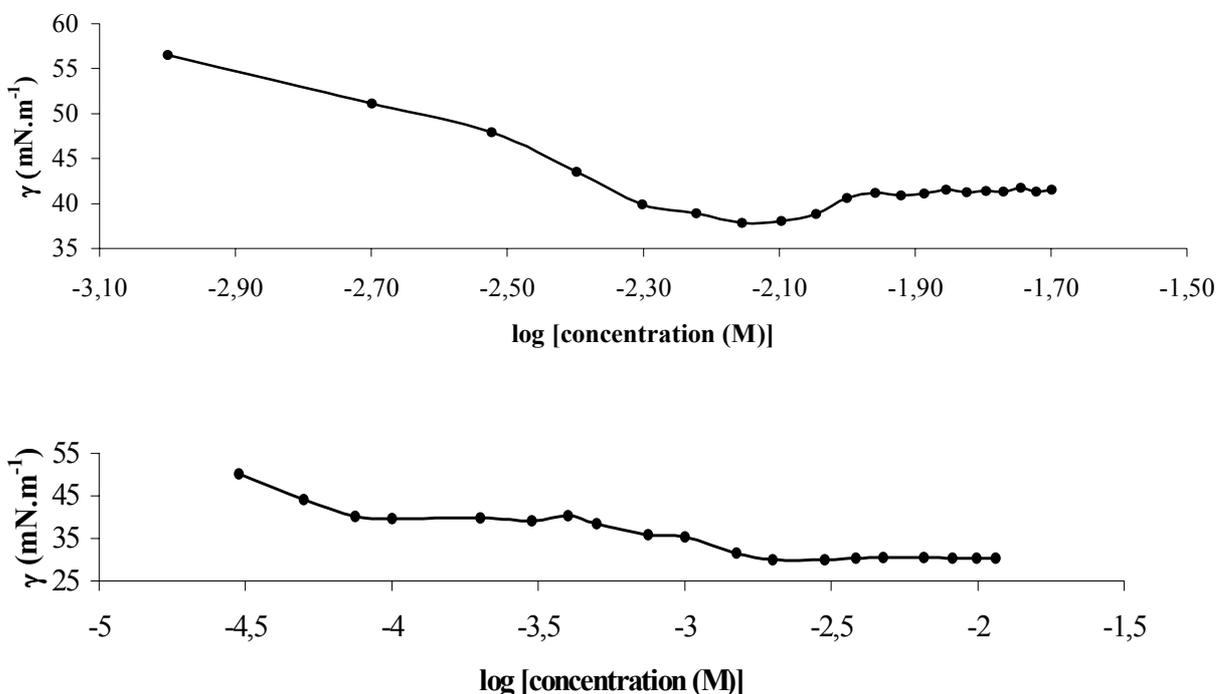


Figure 8 : Variation de la tension superficielle γ des solutions d'octylbenzènesulfonate (A) et de dodécylbenzènesulfonate (B) en fonction de la concentration, en milieu borate de sodium 20 mM de pH 9,2 à 30°C.

En raison de cette sensibilité de la méthode à la pureté des solutions de mesure, les courbes de tension de surface établies pour le dodécylbenzènesulfonate sont difficilement exploitables, du fait de la complexité initiale de la composition de l'échantillon de tensioactif à étudier. Finalement, les mesures de tension de surface ne semblent pas bien adaptées à l'investigation des phénomènes d'agrégation dès que les produits à étudier ne sont pas extrêmement purs et *a fortiori* pour les mélanges de tensioactifs.

3.3 Analyse frontale

3.3.1 Octylbenzènesulfonate.

Comme pour les séparations en mode d'électrophorèse de zone, l'électroosmose est repérée par injection d'une courte zone de marqueur neutre (alcool benzylique) en amont de la zone échantillon. Les électrophérogrammes montrés figure 9 présentent donc tout d'abord le pic de marqueur neutre puis les fronts de migration de l'échantillon. Selon la concentration des échantillons injectés, il apparaît pour l'échantillon aux concentrations inférieures à 9 mM,

les fronts de concentration F1 (mobilité mesurée au point d'inflexion : $-21.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1} < \mu < -13,7.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$) et F3 (mobilité mesurée au point d'inflexion : $-46,7.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1} < \mu < -41,5.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$), les fronts de concentration F1, F2 (mobilité mesurée au point d'inflexion : $-38,2.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1} < \mu < -35,1.10^{-5} \text{ cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$), et F3 apparaissant pour les concentrations en tensioactif supérieures à 10 mM. Ces électrophérogrammes montrent par les paliers successifs (P1, P3 ; P1, P2, P3) que le tensioactif se réarrange sous différentes formes selon sa concentration initiale en solution.

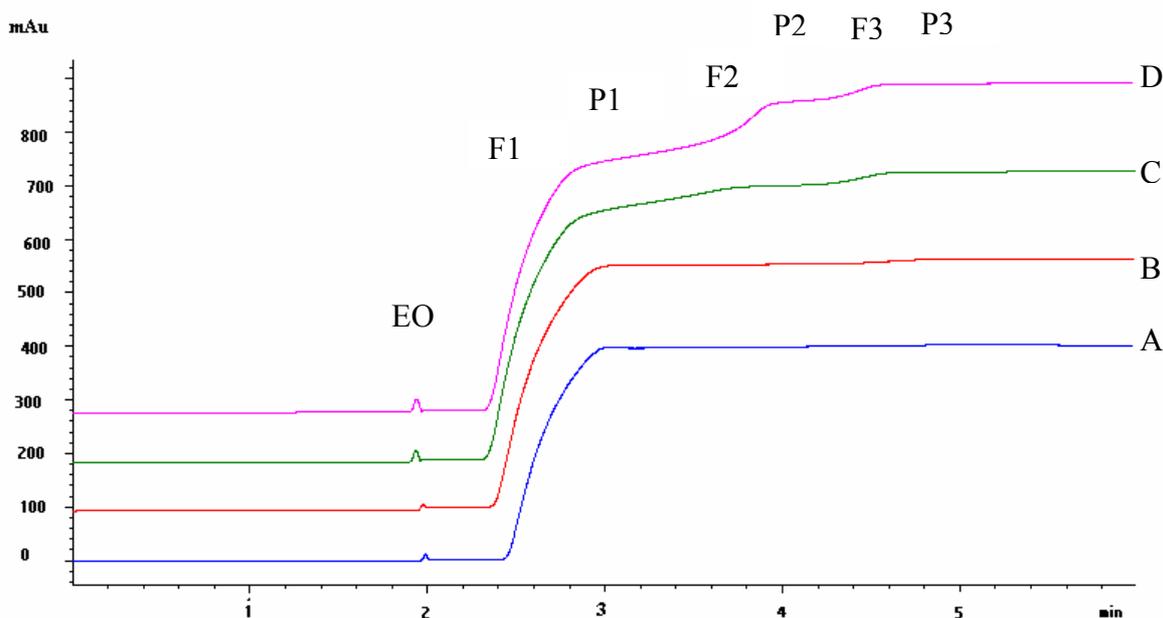


Figure 9: Analyse frontale électrophorétique par injection électrocinétique continue d'échantillons d'octylbenzènesulfonate de sodium dans le tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon borate de sodium pH 9,2 et de force ionique 10 mM. Tension appliquée : +10 kV ($I = 5 \mu\text{A}$). Détection par absorbance UV à 230 nm. Température : +30 °C. Echantillons d'octylbenzènesulfonate de sodium: 7mM (A) ; 9 mM (B) ; 11 mM (C) ; 13 mM (D) ; Injection hydrodynamique d'alcool benzylique (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 2 s), puis injection électrocinétique continue de l'échantillon sous +10 kV. Attribution : EO : alcool benzylique ; F1, F2, F3 : fronts de migration des formes monomère, micelle et oligomère respectivement ; P1, P2, P3 : paliers de concentration correspondants.

Suite à l'estimation pour chaque injection de l'électroosmose au temps de sortie du marqueur neutre, l'évaluation de la mobilité au point d'inflexion pour chacun des fronts montre une décroissance des valeurs de mobilité calculées avec l'augmentation de la concentration en tensioactif.

Ceci pourrait être dû premièrement à une adsorption du tensioactif sur la paroi du capillaire par des interactions de type Van der Waals. Cette adsorption aurait pour effet d'augmenter, dans la partie du capillaire remplie par l'échantillon, la densité des charges de surface et par suite le flux électroosmotique. Ainsi, l'augmentation du flux électroosmotique au cours de la migration dans la partie contenant le tensioactif amènerait à sous-évaluer la valeur de la mobilité électrophorétique du soluté, le flux électroosmotique étant repéré par le marqueur neutre injecté en amont de l'échantillon. L'électroosmose a donc été mesurée pour chacune des concentrations étudiées par injection d'un faible volume de formamide (3 nL) dans un capillaire initialement équilibré avec les solutions de tensioactif. Les résultats montrent en réalité une baisse de la valeur de la mobilité électroosmotique en fonction de la concentration en tensioactif, en accord avec la théorie qui prévoit une augmentation de l'épaisseur de la double couche avec la force ionique du milieu. L'hypothèse de l'adsorption du tensioactif sur la paroi du capillaire n'est donc pas établie.

Deuxièmement, il faut considérer la variation de la viscosité du milieu avec la concentration en tensioactif qui abaisserait la mobilité électrophorétique effective du soluté dans la partie du capillaire remplie par l'échantillon. Pour écarter cette seconde hypothèse, nous avons effectué des mesures de viscosité spécifique ($\eta_{spé} = [\eta_{sol} - \eta_{réf}] / \eta_{réf}$) des échantillons d'octylbenzènesulfonate. Les valeurs de viscosité spécifique évaluées pour 4 niveaux de concentrations (4, 8, 12 et 16 mM) du tensioactif C8 par percolation sous 50 mbars de ces solutions dans le capillaire préalablement rempli du tampon borate 10 mM ($\eta_{réf} = 0,75 \cdot 10^{-3}$ Pa.s mesurée à 30°C) ne montrent qu'une faible variation de la viscosité spécifique de l'échantillon à la limite du seuil de confiance pour chacune des mesures (évalué à +/- 0,023 pour une série de 3 mesures répétées sur un niveau de concentration), ce qui ne permet pas d'expliquer la variation de mobilité observée pour le front de migration F1.

Enfin il faut considérer la discontinuité du champ électrique entre la partie de capillaire remplie par l'électrolyte support seul et la partie remplie par l'échantillon. En effet la valeur de conductivité de l'électrolyte support seul est toujours inférieure à celle de l'électrolyte support additionné de l'échantillon. Ainsi, l'application de la tension séparative, impose pour chacune des deux parties du capillaire, deux zones de champs électriques non équivalentes avec un champ fort dans la partie du capillaire remplie avec l'électrolyte support seul et un champ électrique d'autant plus faible dans la partie remplie par l'échantillon que la concentration en tensioactif augmente. La diminution du champ électrique dans la partie

échantillon amène alors à diminuer la vitesse de migration de l'interface soluté-électrolyte, le flux électroosmotique restant alors quasiment constant dans les premiers temps de la migration comme le prouve l'évaluation expérimentale de m_{ϵ_0} ($74 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à $78 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) après repérage du temps de sortie du marqueur neutre.

La comparaison des valeurs de mobilités calculées au point d'inflexion du front F1, avec les valeurs de mobilités calculées pour le monomère d'octylbenzènesulfonate en mode d'électrophorèse de zone permet d'attribuer ce front au monomère libre. Aussi, les valeurs calculées coïncident d'autant mieux que les échantillons sont peu concentrés. Dans ce cas en effet, les différences de conductivité entre les parties du capillaire situées de part et d'autre de la frontière mobile sont minimales, rapprochant ainsi les conditions de migration en analyse frontale des conditions en mode d'électrophorèse de zone. La hauteur du front F1 est donc représentative de la concentration en monomère libre dans la solution. L'exploitation des mesures a donc été menée sur le palier I à 230 nm en vue de conserver une réponse linéaire du détecteur (figure 10). Afin de vérifier la linéarité du détecteur, nous avons exploité la hauteur du palier P3 qui comporte toutes les formes de l'échantillon en fonction de la concentration totale en tensioactif (figure 11). Cette exploitation montre que la réponse du détecteur est linéaire dans la gamme de concentration étudiée et de plus que les différentes formes libres ou agrégées du tensioactif ont le même coefficient d'extinction.

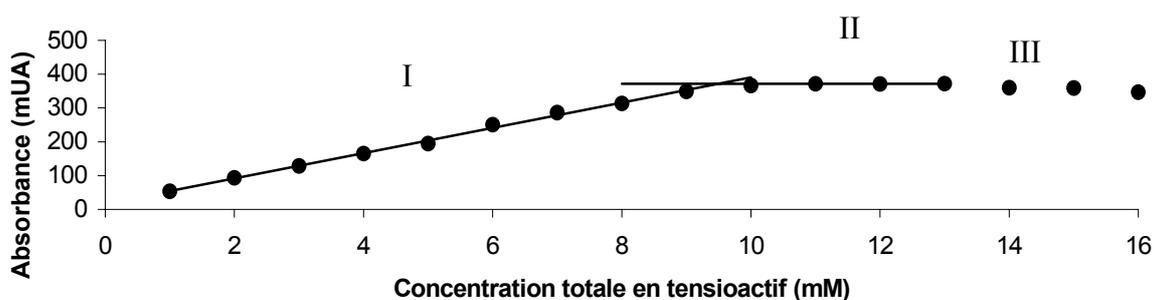


Figure 10 : Variation de la hauteur du palier P1 mesurée à $-31 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en fonction de la concentration totale en tensioactif.

Conditions expérimentales voir figure 9 excepté $\lambda = 230 \text{ nm}$.

L'exploitation de la hauteur du palier P1 montre que la hauteur de ce palier évolue linéairement avec la concentration du tensioactif dans la partie I de la courbe. Puis, à partir de 9,5 mM, on observe une stagnation (partie II) de la hauteur de ce palier et enfin une diminution (partie III). La bonne linéarité du détecteur dans la gamme étudiée (cf figure 11), montre que la saturation du palier (partie II de la figure 10) traduit le maintien de la

concentration de la forme monomère à une concentration fixe, c'est à dire que la CMC du produit a été atteinte. Aussi la partie I de la figure 10 peut donc servir de courbe étalon pour la concentration en monomère libre et l'intersection des droites de régression (paramètres de ces droites donnés tableau 3) des parties I et II de la figure 10 permet de déterminer une valeur de la CMC.

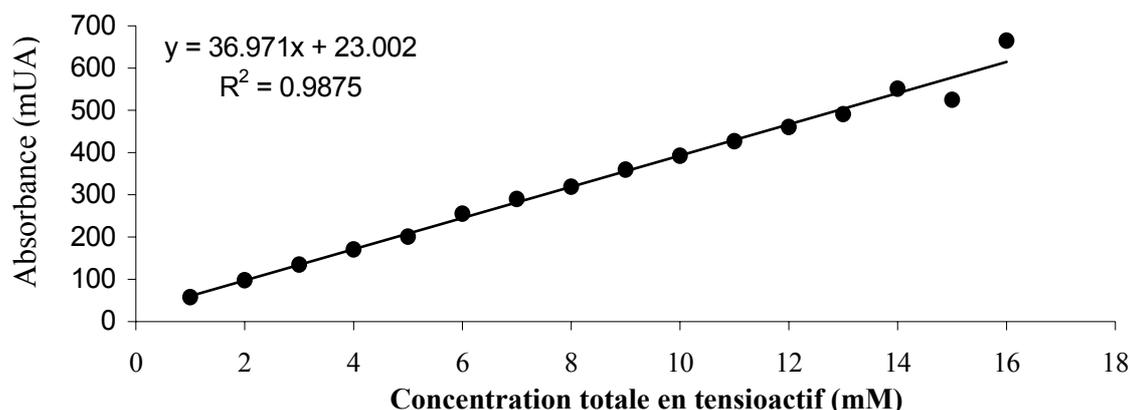


Figure 11 : Variation de la hauteur du palier P3 mesurée à $-51.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en fonction de la concentration du tensioactif.

Conditions expérimentales : voir figure 9, excepté $\lambda = 230 \text{ nm}$.

| Concentration (mM) | Coefficient de régression R^2 | Pente (UA. mM^{-1}) | Ordonnée à l'origine (UA) | Point d'intersection (CMC) (mM) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1 - 9 | 0,997 (n = 9) | $37,4 \pm 1,9^*$ | $17 \pm 10^*$ | 9,5 |
| 11 - 13 | Valeur moyenne (n = 3) | 0 | $371,6 \pm 1,5^*$ | $8,7 - 10,3^*$ |

Tableau 3 : Paramètres des droites de régression de la variation d'absorbance du palier P1 mesuré à $-31.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en fonction de la concentration totale en tensioactif.

* : intervalle de confiance à 95%

Les droites de régression établies pour la hauteur du palier P1 permettent de mesurer la CMC comme de 9,5 mM avec l'intervalle de confiance 8,7 – 10,3 mM pour 5% de risque, ce qui est comparable aux valeurs obtenues par les autres méthodes, avec chevauchement des intervalles calculés. Afin de confirmer ce résultat, nous avons également exploité les résultats selon la méthode de conductivité décrite par Cifuentes et coll [18] en vue d'obtenir une évaluation indépendante de la mesure de CMC. Pour cela, nous avons reporté le courant

mesuré au palier P3, pour lequel l'ensemble des formes du tensioactif sont repérées, en fonction de la concentration totale de tensioactif. La figure 12 donne la variation de ce courant mesuré en fonction de la concentration totale en octylbenzènesulfonate. Les paramètres des droites de régression obtenues sont donnés dans le tableau 4 et permettent d'évaluer la CMC de l'octylbenzènesulfonate par cette méthode à 9,5 mM, ce qui est bon accord avec les mesures effectuées par analyse frontale.

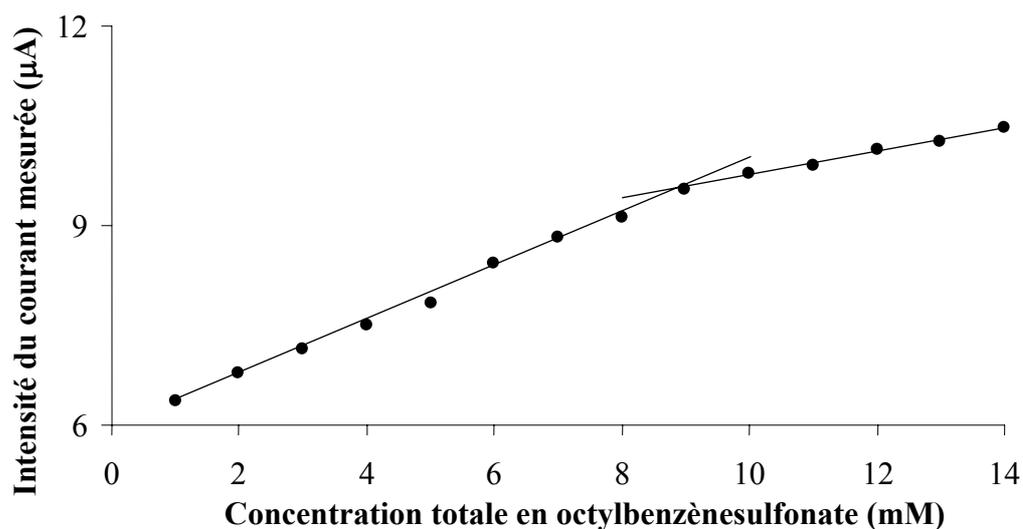


Figure 12 : Variation du courant mesuré sur le palier P3 en fonction de la concentration totale en tensioactif.

Conditions expérimentales : voir figure 9.

| Concentration (mM) | Coefficient de régression R^2 | Pente ($\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1}$) | Ordonnée à l'origine (μA) | Point d'intersection (CMC) (mM) |
|--------------------|---------------------------------|--|--|---------------------------------|
| 1 - 9 | 0,997 (n = 9) | $0,40 \pm 0,02^*$ | $5,9 \pm 0,1^*$ | 9,5 |
| 10 - 14 | 0,996 (n = 5) | $0,18 \pm 0,02^*$ | $8,0 \pm 0,3^*$ | 6,5 - 13,9* |

Tableau 4 : paramètres de régression des droites de régression de l'intensité mesurée en fonction de la concentration totale de tensioactif.

*: intervalle de confiance à 95 %

Enfin, la partie III de la courbe figure 10 traduit une diminution de la CMC par augmentation de la force ionique du milieu, phénomène qui est déjà connu pour d'autres tensioactifs comme le SDS. Ainsi, il est possible de quantifier la concentration en monomère libre pour chaque concentration totale en tensioactif. Pour les migrations effectuées au dessus de ce seuil de 9,5 mM, on note sur les électrophérogrammes l'apparition du front de migration

F2 qui est dès lors attribué aux micelles. Enfin il faut noter sur les électrophérogrammes la présence constante du front F3 dont la mobilité au point d'inflexion, est environ le double de la mobilité du monomère, et qui pourrait être représentatif de l'apparition de formes agrégées intermédiaires du tensioactif, avec notamment un accroissement significatif de ce palier pour des concentrations voisines puis supérieures à la CMC.

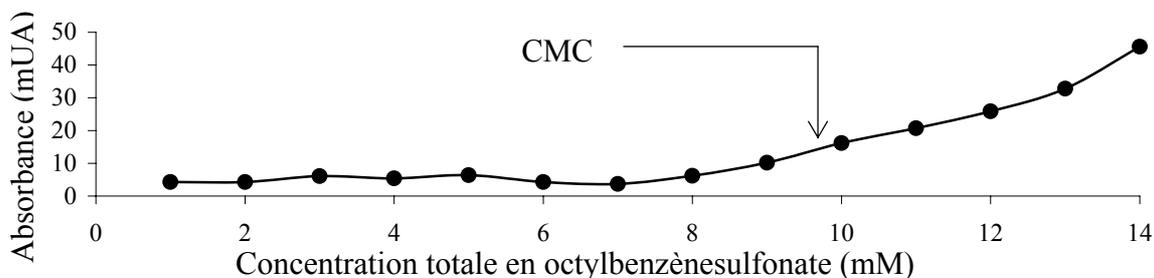


Figure 13 Variation de la hauteur du palier P3 en fonction de la concentration totale de tensioactif.

Conditions expérimentales : voir figure 9

3.3.2 Dodécylbenzènesulfonate.

Les migrations effectuées pour le dodécylbenzènesulfonate (figure 14) reprennent le protocole de celles accomplies pour l'octylbenzènesulfonate avec le repérage de l'électrosmose par injection hydrodynamique de marqueur neutre.

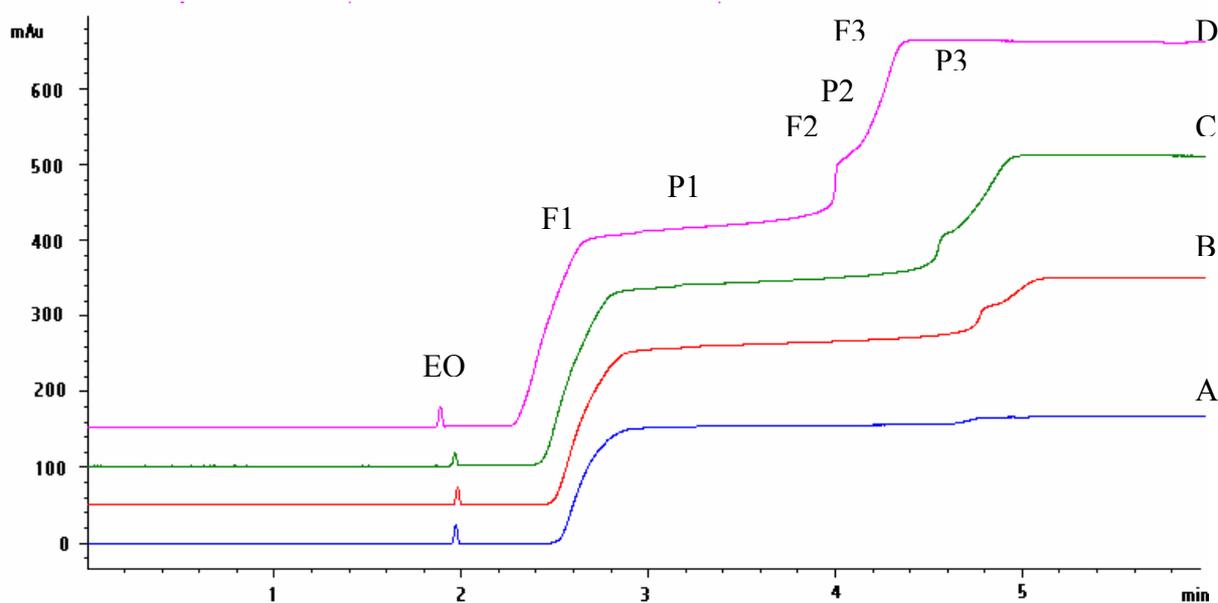


Figure 14: Analyse frontale électrophorétique par injection électrocinétique continue d'échantillons de dodécylbenzènesulfonate de sodium dans le tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2.

Capillaire en silice vierge, 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon borate de sodium pH 9,2 et de force ionique 10 mM. Tension appliquée : +10 kV ($I = 5 \mu\text{A}$). Détection par absorbance UV à 200 nm. Température : +30 °C. Echantillons de dodécylbenzènesulfonate de sodium: 2 mM (A) ; 4 mM (B) ; 6 mM (C) ; 8 mM (D). Injection hydrodynamique de formamide (30 mbars, 2 s), électrolyte support (30 mbars, 2 s), échantillon (30 mbars, 2 s), puis injection électrocinétique continue de l'échantillon sous +10 kV. Attribution : EO : formamide ; F1, F2, F3 : fronts de migration des formes monomère, micelle et agrégées mixtes respectivement ; P1, P2, P3 : paliers de concentration correspondants

Différents fronts de migration, F1, F2 et F3, apparaissent en fonction de la concentration initiale de l'échantillon. Pour les concentrations initiales de l'échantillon inférieures à 0,5 mM, les électrophérogrammes ne présentent que le seul front F1 dont la mobilité mesurée au point d'inflexion décroît en valeur absolue ($-20,1$ à $-17,6 \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) lorsque la concentration du tensioactif augmente. La comparaison des valeurs de mobilité pour le point d'inflexion de ce front avec la mobilité du dodécylbenzènesulfonate évaluée en électrophorèse de zone, permet d'attribuer ce front au monomère seul. Pour les concentrations supérieures à 0,5 mM, les électrophérogrammes présentent suite à ce front F1, le front de migration F2 dont la mobilité mesurée au point d'inflexion varie avec la concentration de $-46,0$ à $-44 \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ce front pourrait regrouper les formes agrégées du dodécylbenzènesulfonate. Pour les concentrations supérieures à 3mM, les électrophérogrammes présentent le front F3 ($-46,8$ à $-47,4 \cdot 10^{-5} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) en plus des fronts F1 et F2. Ce front de migration devrait correspondre aux formes agrégées mixtes du dodécylbenzènesulfonate de sodium et de ses impuretés.

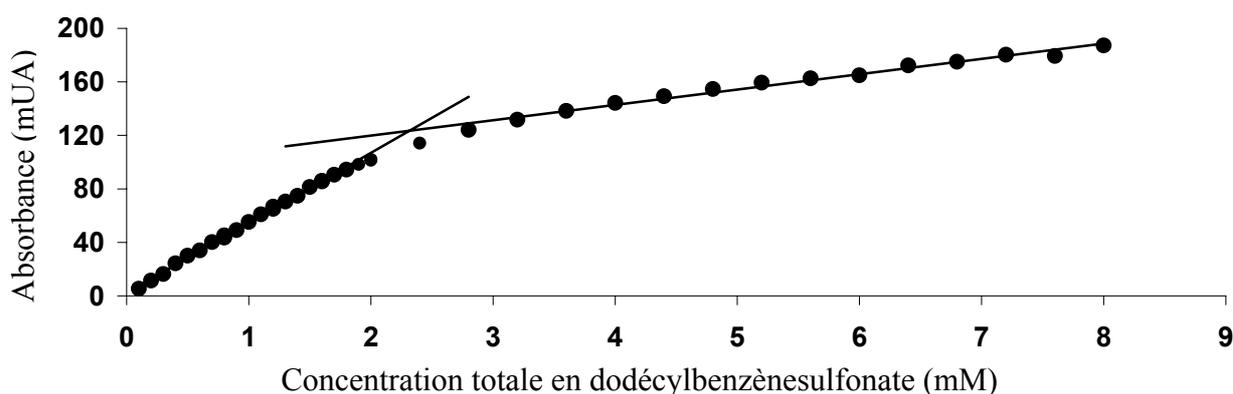


Figure 15 variation de la hauteur du palier de concentration P1 mesurée à $-37 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en fonction de la concentration totale en dodécylbenzènesulfonate dans la gamme 0,1-8 mM
Conditions expérimentales : voir figure 14 excepté $\lambda = 222 \text{ nm}$.

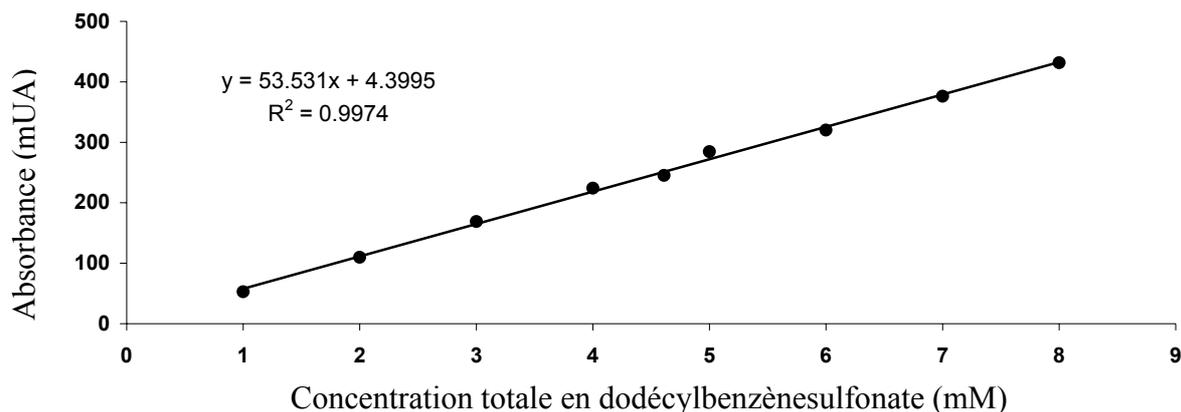


Figure 16: Evolution de la hauteur du palier de concentration P3 mesurée à $-51.10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ en fonction de la concentration totale en dodécylbenzènesulfonate dans la gamme 2-13 mM

Conditions expérimentales : voir figure 14 excepté $\lambda = 222 \text{ nm}$.

A l'inverse de l'octylbenzènesulfonate, l'exploitation de la hauteur du palier de concentration P1 dans l'intervalle de concentration 0,1-8 mM (figure 15) ne permet pas de conclure à une saturation. Elle montre néanmoins une rupture de pente pour le palier de concentration du monomère, le détecteur fournissant alors réponse linéaire dans le domaine de concentration d'intérêt (voir figure 16). Les paramètres des deux droites alors obtenues sont donnés dans le tableau 5.

| Concentration (mM) | Coefficient de régression R^2 | Pente (UA, mM^{-1}) | Ordonnée à l'origine (UA) | Point d'intersection (CMC) (mM) |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 0,1 - 2 | 0,998 (n = 21) | $52,4 \pm 1,1$ | $2,2 \pm 1,6$ | 2,30 2,0 – 2,9* |
| 2,7 – 8 | 0,984 (n = 14) | $11,5 \pm 0,9$ | 97 ± 5 | |

Tableau 5 : Paramètres de régression des droites obtenues pour la hauteur du palier P1 en fonction de la concentration totale de tensioactif.

*: Intervalle de confiance à 95 %

Cette rupture de pente est obtenue dans l'intervalle de concentration totale en tensioactif de 2-3 mM, avec intersection des deux droites de régression à 2,3 mM. Au delà de la valeur seuil de 2,3 mM, la plus faible valeur de pente pour la hauteur du palier P1 traduit un accroissement moindre de la concentration des espèces migrant à la vitesse du front F1. Elle devrait correspondre à la formation des micelles de dodécylbenzènesulfonate et à l'augmentation de la concentration des impuretés tensioactives à chaînes plus courtes qui

n'ont pas encore micellisé. Au fur et à mesure que leur concentration augmente, ces impuretés doivent progressivement s'incorporer aux micelles de dodécylbenzènesulfonate de sodium, formant ainsi des micelles mixtes, correspondant au front de migration F3.

3.3.3 Protocole rapide de détermination de CMC d'un tensioactif pur.

Les migrations effectuées avec l'octylbenzènesulfonate montrent que seulement 4 niveaux de concentration peuvent suffire pour une détermination fiable de la valeur seuil d'agrégation d'un tensioactif anionique absorbant dans l'UV, tel que l'octylbenzènesulfonate, à condition qu'il soit suffisamment pur. Ainsi, une première migration effectuée pour une concentration supérieure à la CMC permet d'estimer cette CMC en considérant le rapport des hauteurs des fronts de migration du monomère (front F1) et de la micelle en équilibre avec le monomère (front F3). L'estimation plus fine de la CMC peut être obtenue par trois migrations supplémentaires effectuées pour des niveaux de concentrations inférieurs à cette CMC. Ces migrations permettent d'établir une droite d'étalonnage pour la hauteur du front du monomère de tensioactif, et de vérifier la linéarité du détecteur à la longueur d'onde de détection.

Un protocole similaire est également applicable pour le cas où le tensioactif n'est pas pur. Comme dans le cas précédent, il est nécessaire de procéder en premier lieu à une évaluation du seuil d'agrégation par le rapport des hauteurs des paliers P3 et P1 pour une concentration supérieure à ce seuil. Il faut ensuite réaliser huit migrations dont les concentrations effectués dans un intervalle d'au moins 5 mM sont réparties de part et d'autre du seuil précédemment évalué. L'intersection des deux droites obtenues permet d'obtenir la valeur seuil.

4 Cas de tensioactifs transparents en UV

Comme c'est le cas pour les méthodes d'électrophorèse de zone, la détermination de concentration-seuil d'agrégation pour les tensioactifs transparents en UV par l'analyse frontale électrophorétique capillaire requiert l'utilisation d'un marqueur neutre. Il est donc nécessaire dans un premier temps de s'intéresser aux équilibres pouvant être mis en jeu dans un système soluté - tensioactif.

4.1 Equilibres entre un marqueur neutre et une solution de tensioactif

Décrits initialement pour la détermination de CMC par les méthodes d'électrophorèse de zone, les équilibres chimiques s'instaurant entre un marqueur N (neutre ou chargé selon la charge du tensioactif à étudier) et une solution de tensioactif restent identiques pour l'analyse

frontale. Le marqueur peut ainsi interagir avec le tensioactif monomère et les micelles (lorsque celles-ci existent en solution) et le système peut être décrit par les équations suivantes :

- Pour l'interaction entre le marqueur et le monomère de tensioactif T :



- Pour l'interaction entre le marqueur et la micelle :



- Pour la conservation de la masse pour le marqueur:

$$[N_t] = [N] + [NT] + [NM] \quad (10)$$

- Pour la conservation de la masse pour le tensioactif:

$$[T_t] = [T] + [NT] + n.[NT_n] + n.[T_n] \quad (11)$$

Où $[N_t]$ est la concentration totale de marqueur, $[T_t]$ est la concentration totale de tensioactif, et n est le nombre d'agrégation.

Lorsque $[T_t] < \text{CMC}$, seul l'équilibre a est mis en jeu et la variation de la concentration du marqueur peut être calculée en supposant une interaction 1:1 entre le marqueur et le tensioactif :

$$[N_t] = [N] + [NT] = [N] (1 + K_T [T]) \quad (12)$$

Dont on déduit :

$$\frac{[N]}{[N_t]} = \frac{1}{1 + K_T [T]} \quad (13)$$

La concentration libre en tensioactif monomère peut être calculée comme une solution positive de l'équation :

$$K_T [T]^2 + [T] (K_T ([N_t] + [T_t]) + 1) - [T_t] = 0 \quad (14)$$

K_T est généralement faible (de l'ordre de 5 M^{-1} selon [Jacquier]). Dans ce cas, comme les concentrations $[N_t]$ et $[T_t]$ sont faibles en regard de la constante K_T , on peut admettre que $[T] = [T_t]$

Lorsque $[T_t] > \text{CMC}$, le bilan matière pour N s'écrit lorsque $[N]$ est petite comparée à l'inverse des constantes K_T et K_M :

$$[N_t] = [N] + [NT] + [NM] = [N] (1 + K_T [\text{CMC}] + K_M ([T_t] - \text{CMC}) / n) \quad (15)$$

Dont on déduit:

$$\frac{[N]}{[N_t]} = \frac{1}{1 + K_T [\text{CMC}] + K_M \frac{[T_t] - \text{CMC}}{n}} \quad (16)$$

La figure 17 présente l'évolution de la fraction libre du marqueur en fonction de la concentration totale de tensioactif d'après les équations 13 et 16 pour différentes valeurs de K_T et K_M et en prenant $n = 60$ et $\text{CMC} = 6 \text{ mM}$, ces deux dernières valeurs étant représentatives du SDS en milieu de faible force ionique.

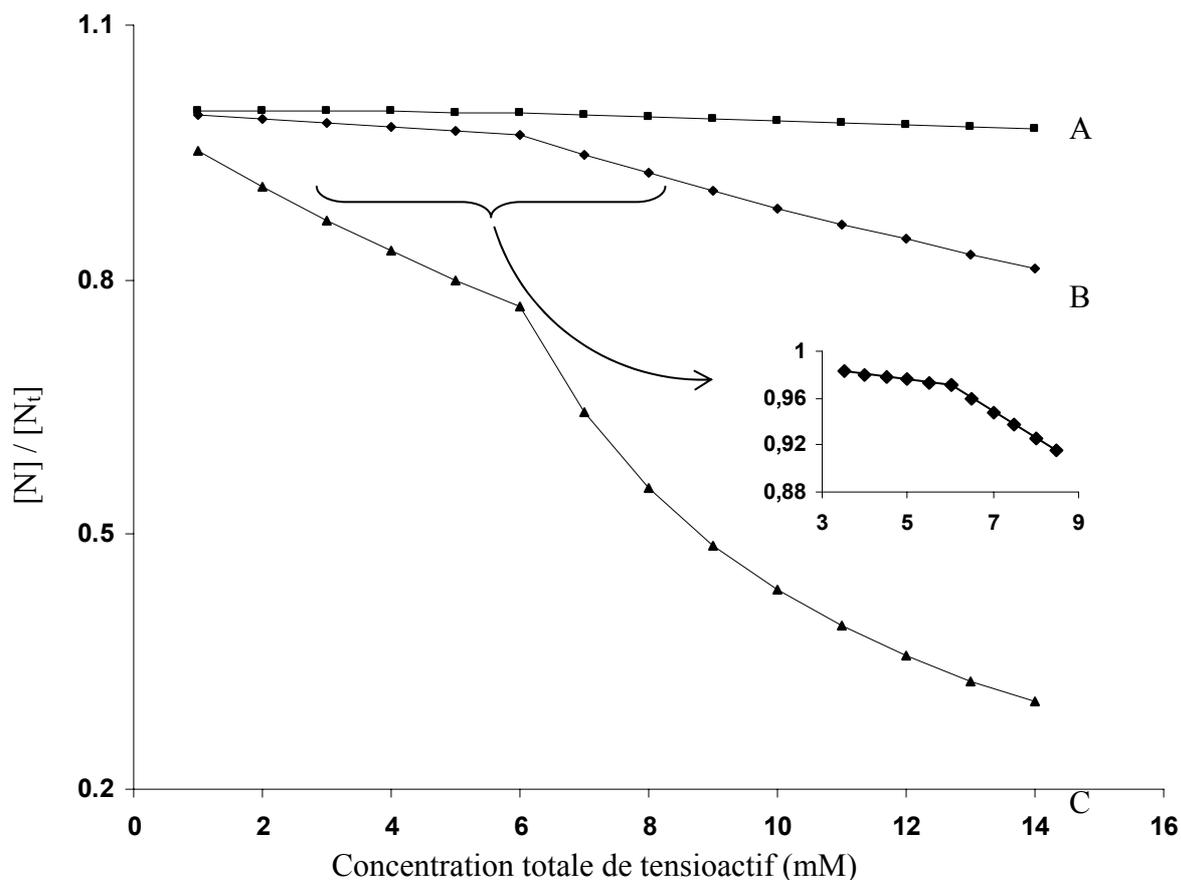


Figure 17 : Variation de la fraction libre de marqueur libre $[N] / [N_t]$ en fonction de la concentration totale de tensioactif.

Paramètres de la simulation : $K_T = 0,5$ et $K_M = 150$ (A) ; $K_T = 5$ et $K_M = 1500$ (B) ; $K_T = 50$ et $K_M = 15000$ (C) ; CMC = 6 mM (A,B,C) et $n = 60$ (A,B,C).

La figure 17 montre que la détermination de la fraction libre de marqueur neutre pour différentes concentrations de tensioactif doit permettre la détermination de la CMC au point anguleux entre les deux domaines de concentration du SDS. Cette figure montre par ailleurs que la détection de la CMC est rendue plus aisée pour les constantes d'association les plus élevées, c'est-à-dire avec un marqueur d'hydrophobie élevée. Néanmoins, il apparaît plus judicieux d'employer un marqueur d'hydrophobie intermédiaire (figure 10B) en vue d'une exploitation simplifiée, les deux variations de la fraction libre du marqueur répartis de part et d'autre de la CMC pouvant être assimilées à des droites. En comparaison de la méthode d'électrophorèse de zone proposée par Jacquier et coll, où les équilibres d'association doivent s'établir instantanément (ce qui requiert l'usage d'un marqueur très hydrophobe mais également suffisamment soluble pour permettre sa détection sensible), la méthode de l'analyse frontale permet d'incuber le milieu réactionnel avant son injection et n'a donc pas de prérequis quant à la cinétique d'incorporation du marqueur dans les micelles. Ainsi, la méthode de l'analyse frontale apparaît plus souple quant au choix du marqueur neutre. Enfin, il faut noter que l'ajustement non-linéaire des courbes de la fraction libre du marqueur en fonction de la concentration en tensioactif peut permettre d'évaluer les constantes K_T et K_M/n .

4.2 Cas d'un tensioactif anionique : le SDS

Afin de démontrer la possibilité de déterminer la concentration micellaire critique pour un tensioactif anionique transparent, nous avons choisi de mettre au point la méthode de l'analyse frontale pour le SDS. Ce système a été retenu comme modèle car ce tensioactif est l'un des plus utilisés sur le plan applicatif dans différents domaines. Dans l'eau à 25°C, la CMC du SDS est donnée à 8,1 mM [22]. Néanmoins, placé dans un électrolyte, la CMC est abaissée du fait d'un accroissement de l'écrantage des charges sur la tête ionique par le contre-ion à l'origine d'une répulsion électrostatique entre les monomères de tensioactif.

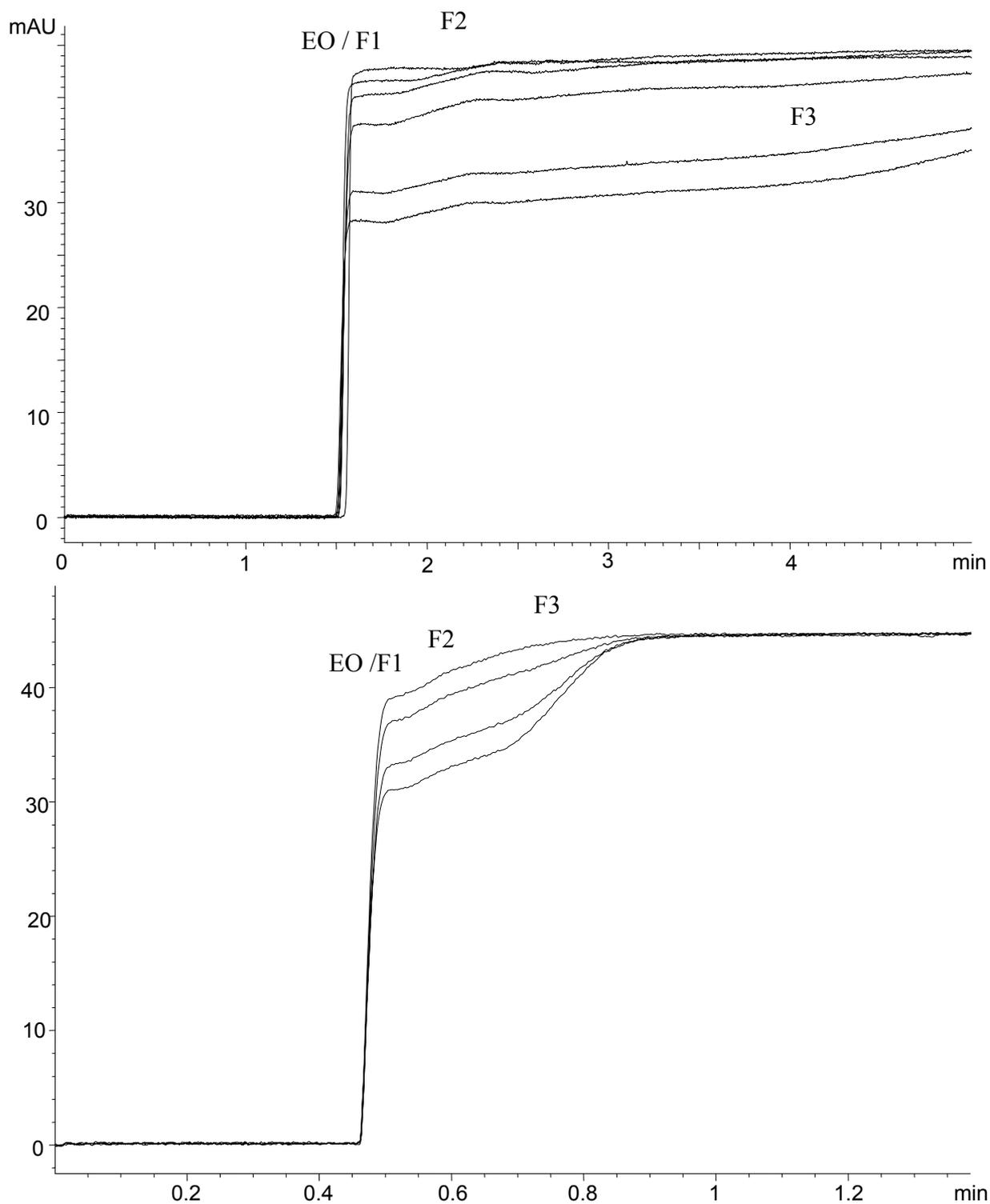


Figure 18 : Electrophérogammes de l'éthylparabène (EP) en mélanges avec le SDS en concentrations variables injectés en mode frontal du côté entrée du capillaire (A) ou du côté fenêtre de détection (B).

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm (A) ou 8,5 cm (B)). Electrolyte support : Tampon phosphate de sodium 2,8 mM de pH 6,9 et de force ionique 5 mM. Tension appliquée : + 25 kV (A) ; - 25 kV (B). Intensité initiale : 4 μA . Détection par absorbance UV à 256 nm. Echantillons : EP à 0,67 mM dans l'électrolyte support contenant le SDS (de haut en bas) à 1, 3, 5, 7, 9 et 10 mM (A) et 6 ,7 ,8 ,9 mM (B). Introduction

hydrodynamique de l'échantillon (30 mbars, 2s), puis injection continue de l'échantillon sous +25 kV (A) ou -25 kV (B). Attribution : EO : flux électroosmotique ; F1 : front de l'EP libre ; F2 : front du complexe EP – monomère de SDS ; F3 : front de migration du complexe EP – micelles.

La méthode impose aussi de choisir un composé marqueur. Pour le SDS, le choix aurait pu se porter sur un composé organique cationique, ces derniers étant très affins pour les micelles polyanioniques. Néanmoins, une adsorption du marqueur sur la paroi du capillaire est alors à redouter, celle-ci étant très gênante pour un étalonnage précis de la hauteur du palier de marqueur libre. Nous avons donc choisi d'utiliser un marqueur neutre d'hydrophobie intermédiaire, à savoir l'éthylparahydroxybenzoate de méthyle ou éthylparabène (EP). En effet, la molécule est moyennement hydrophobe ($\log P = 2,11$ [23]) et reste suffisamment soluble dans l'eau à 25°C (environ 5 mM [24]) pour permettre sa détection sensible. La figure 18 montre les électrophérogrammes obtenus lors de l'injection de l'EP à concentration constante en mélange avec des concentrations variables de SDS.

Dans les conditions expérimentales (capillaire en silice vierge, électrolyte support neutre), l'application d'une tension positive à l'anode conduit à créer un écoulement électroosmotique cathodique. Dans ces conditions, on détecte successivement les espèces neutres puis les espèces anioniques dans l'ordre des mobilités électrophorétiques croissantes. Les électrophérogrammes de la figure 18A présentent tout d'abord un front F1 à la mobilité électroosmotique ($\mu_{\text{éo}} = 70 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) qui est attribué à l'éthylparabène libre. Après ce front, on détecte, en fonction de la concentration initiale de SDS introduite, un (ou deux) front(s) de migration (F2 et F3). Pour les concentrations initiales de SDS inférieures à 6 mM, seul le front F2 de mobilité au point d'inflexion de $-22 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est détecté, puis pour les concentrations de SDS initiales supérieures à 7 mM, le front de migration F3 de mobilité au point d'inflexion d'environ $-50 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est détecté en plus des fronts F1 et F2 précédents. Ainsi, le front F2 est attribué au complexe EP – monomère de SDS, et le front F3 est attribué au complexe EP – micelles. Afin de mieux apprécier l'apparition de ces fronts, les mélanges EP – SDS ont également été injectés par le côté fenêtre de détection (figure 18B). La superposition des paliers obtenus après le front F3 montre que les différentes formes du marqueur ont des coefficients de réponse identiques ce qui permet de contrôler la constance de la concentration initiale d'éthylparabène introduite d'un essai à l'autre.

La hauteur du front attribué à l'EP libre (F1) a ensuite été exploitée en fonction de la concentration de SDS dans l'électrolyte (figure 19). Comme l'EP a été introduit à une

concentration constante et que la hauteur du front F1 est proportionnelle à la concentration d'EP libre (droite d'étalonnage : $y \text{ (mUA)} = 43,4 \times \text{(mM)}$), la variation de la hauteur du front F1 est directement proportionnelle à la fraction libre d'EP dans les mélanges EP-SDS. Bien que théoriquement cette variation de la fraction libre d'éthylparabène soit attendue comme hyperbolique (voir section 4.1), la figure 19 montre que cette variation peut être assimilée à deux segments de droite dont l'intersection donne la valeur de la CMC. Pour cette série d'expériences, la CMC du SDS a été évaluée à 6,1 mM dans le tampon phosphate de sodium de pH 6,9 et de force ionique 5 mM. Ce dernier résultat est en excellent accord avec la méthode de mobilité pour laquelle Jacquier et coll [4] ont trouvé une CMC de 6,9 mM dans les mêmes conditions d'électrolyte.

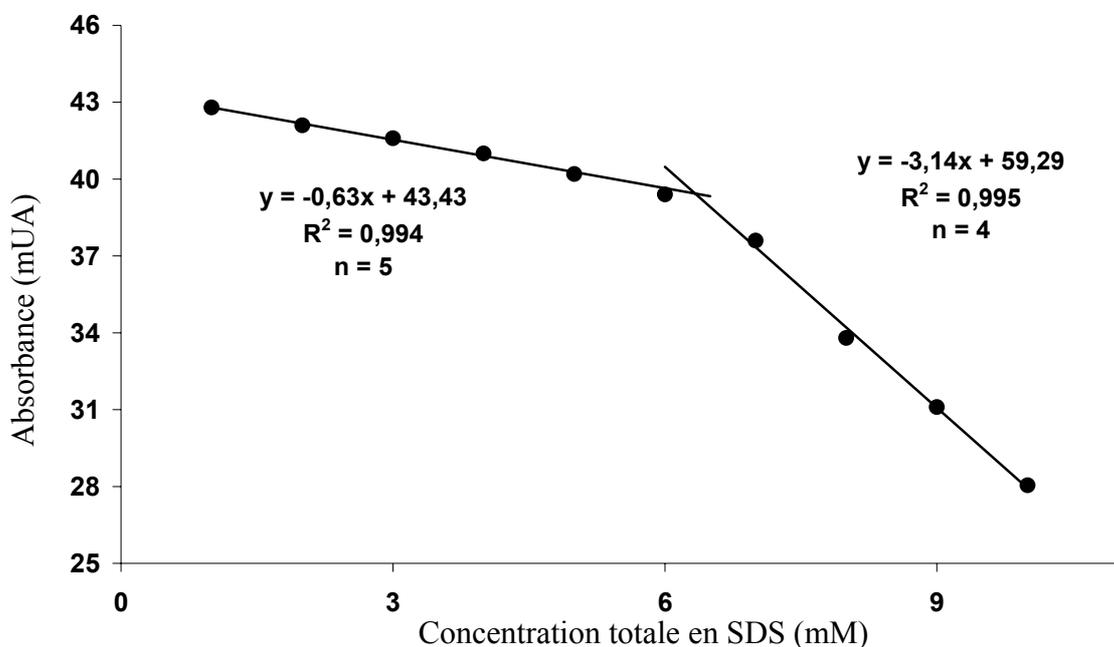


Figure 19 : Variation de la hauteur du palier du front de migration F1 mesurée à mobilité fixe de $-7 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Conditions expérimentales : voir figure 18A.

4.3 Cas d'un tensioactif cationique : le bromure de tétradécyltriméthyl-ammonium

Afin de démontrer la possibilité de déterminer la concentration micellaire critique pour un tensioactif cationique transparent, nous avons choisi de mettre au point la méthode de l'analyse frontale pour le TTABr. Du fait de la charge positive sur la partie hydrophile de ce tensioactif, les monomères de TTABr s'adsorbent fortement sur la paroi anionique du capillaire, cette adsorption conduisant à une inversion du flux électroosmotique [25]

notamment mise à profit pour la séparation d'anions [26]. Cette adsorption est cependant néfaste pour la détermination de la CMC par le protocole employé pour le SDS, et les migrations selon ce protocole résulteraient en une inversion progressive du flux électroosmotique simultanément à l'introduction du tensioactif. Cette inversion du flux électroosmotique empêcherait ainsi toute mesure de la hauteur du front de marqueur à l'état libre, ou des fronts correspondants au tensioactif monomère et aux micelles, à moins d'inverser la polarité de la tension appliquée en cours d'analyse. En admettant que ce protocole puisse être appliqué, la fraction libre du marqueur résulterait d'un échange à trois partenaires : le marqueur, le tensioactif en solution (sous forme de monomère et de micelles lorsque celles-ci existent) et le tensioactif adsorbé sur la paroi, et le modèle théorique précédemment présenté deviendrait inadapté. Ce problème peut cependant être évité en effectuant les migrations dans un capillaire greffé aminé. Ce revêtement assure un écoulement électroosmotique anodique du fait des charges positives sur la surface interne du capillaire et permet, par répulsion électrostatique entre la paroi et le tensioactif, de minimiser les interactions du tensioactif avec la paroi. Par application d'une tension négative à l'entrée du capillaire greffé aminé, les migrations sont alors effectuées en mode contre-électroosmotique pour les espèces cationiques, et sont ainsi symétriques de celles obtenues précédemment pour le SDS. Les migrations conduisent donc à détecter les espèces dans l'ordre de leurs mobilités électrophorétiques croissantes, c'est-à-dire en premier le marqueur neutre libre, puis le monomère de tensioactif et enfin les micelles. Comme pour le SDS, la méthode impose également d'utiliser un marqueur neutre pour déterminer la CMC du TTABr. Les critères de choix du marqueur restent identiques à ceux requis pour le cas du SDS, et l'éthylparabène, apparaissant là encore bien adapté pour cette nouvelle étude, a donc été retenu. La figure 20 présente les migrations obtenues lors de l'injection continue, par application de la tension séparative, de mélanges d'éthylparabène en concentration fixe et de TTABr en concentrations variables par le côté fenêtre de détection dans le capillaire greffé aminé.

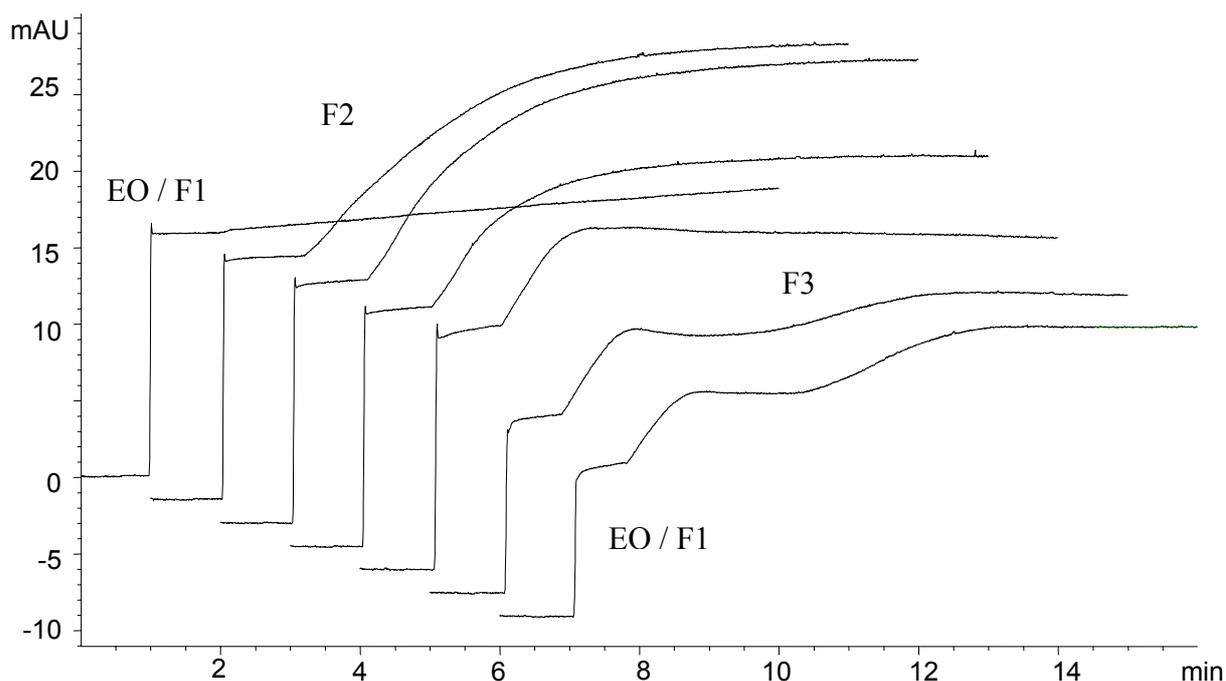


Figure 20 : Electrophérogrammes de l'éthylparabène (EP) en mélanges avec le TTABr en concentrations variables injectés en mode frontal du côté fenêtre de détection.

Capillaire greffé aminé Beckman 50 μm x 62,5 cm (longueur utile 8,5 cm). Electrolyte support : Tampon phosphate de sodium 7,3 mM de pH 6,4 et de force ionique 10 mM. Tension appliquée : + 15 kV. Intensité initiale 6,4 μA . Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 256 nm. Echantillon : éthylparabène 0,33 mM et TTABr en concentrations variables (de gauche à droite) : 0 ; 0,75 ; 1,25 ; 1,50 ; 2 ; 3 ; 3,5 mM. Introduction hydrodynamique de l'échantillon (30 mbars, 2s) puis injection électrocinétique continue (+15 kV). Attribution : EO : électroosmose ; F1, F2, F3 : palier respectivement du marqueur libre, du marqueur associé au monomère de tensioactif et associé au micelles.

Lorsque le marqueur est injecté seul, on détecte seulement le front F1 de marqueur libre à un temps correspondant à l'électroosmose ($m_{\text{éo}} = -35 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Le front F1 ainsi obtenu présente une légère dérive de l'absorbance qui suggère que le marqueur s'adsorbe faiblement sur la paroi du capillaire, probablement par interaction hydrophobe avec le revêtement interne. Lorsque le TTABr est présent dans les échantillons, les électrophérogrammes présentent pour les concentrations en TTABr inférieures à 1,25 mM un front supplémentaire de migration F2, de mobilité au point d'inflexion comprise entre $-20,6$ et $-22,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, attribué au complexe marqueur-monomère de tensioactif. La dissymétrie ainsi que l'étalement de ce front montre que la présence de tensioactif favorise l'adsorption du marqueur, probablement du fait de l'adsorption première du tensioactif. Pour les concentrations comprises entre 1,25 mM et 2 mM de tensioactif, la hauteur du palier de concentration du complexe éthylparabène-monomère tend à diminuer, ce qui suggère

l'apparition de petits agrégats oligomériques, le marqueur pouvant alors s'inclure dans ces agrégats et avoir un coefficient d'adsorption diminué sous cette forme. Pour les concentrations supérieures à 2,25 mM, un troisième front F3 dont le point d'inflexion correspond à une mobilité de $-33 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est détecté. Ce dernier front est attribué aux micelles de tensioactif. La décroissance de l'absorbance totale sur le palier de ce front, à partir duquel toutes les formes en solutions sont détectées, semble confirmer que le coefficient d'absorption de l'éthylparabène est plus faible sous forme incluse (dans les agrégats oligomériques et dans les micelles) que sous forme libre. Néanmoins, pour la détermination de la CMC de ce tensioactif, c'est le premier front de migration qui est exploité, le marqueur étant détecté seul, ce qui permet de s'affranchir de la variation du coefficient d'absorption, l'injection des échantillons par le côté fenêtre de détection permettant de limiter encore les effets de l'adsorption du tensioactif sur la paroi du capillaire. La figure 21 montre l'évolution de la hauteur du palier de concentration obtenue pour le front F1 en fonction de la concentration totale de tensioactif.

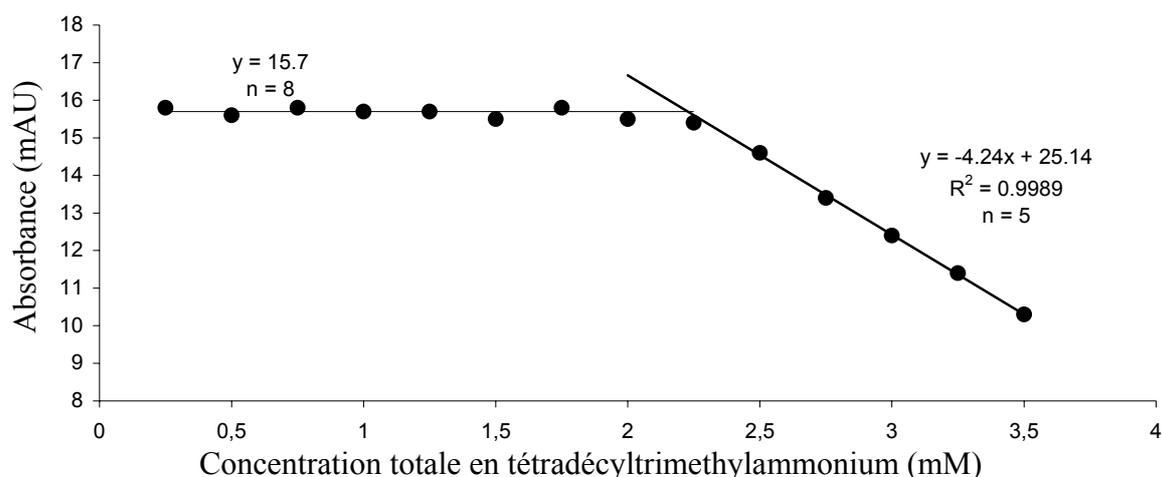


Figure 21 : Variation de la hauteur du palier du front de migration F1 mesurée à une mobilité électrophorétique fixe de $-9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Conditions expérimentales : voir figure 20

Pour les concentrations de tensioactif comprises entre 0,25 et 2 mM, la figure 21 montre que la hauteur du front de marqueur libre est constante. Pour les concentrations totales de tensioactif supérieures à 2,25 mM de tensioactif, la hauteur de ce front diminue linéairement du fait de l'incorporation du marqueur dans les micelles. Comme dans le cas du SDS, l'intersection des deux droites obtenues permet d'accéder à la valeur de la CMC dans l'électrolyte support. On trouve ainsi une valeur égale à 2,25 mM dans le tampon phosphate de sodium 7,3 mM de pH 6,4, ce qui est en bon accord avec les données de la littérature, qui

rapporte une valeur de la CMC du TTABr de 3,5 mM dans l'eau [27] et de 1,6 mM dans un tampon phosphate de sodium 70 mM de pH 6 [28].

4.4 Cas d'un tensioactif neutre : le Brij 35.

En comparaison des deux cas précédents où la charge du tensioactif permettait de différencier sous l'application du champ électrique les différentes formes du marqueur, la détermination de la CMC d'un tensioactif neutre nécessite l'utilisation d'un marqueur chargé. Ce marqueur doit en outre pouvoir s'associer aux micelles formées, par interaction hydrophobe. La molécule doit donc être amphiphile, ionique et détectable en UV. Nous avons donc porté notre choix sur un tensioactif ionique, ce dernier étant introduit à une concentration nettement inférieure à sa CMC. Afin de minimiser les interactions parasites du tensioactif marqueur avec la paroi du capillaire, nous avons choisi d'utiliser pour les migrations un capillaire en silice vierge rempli d'un électrolyte support légèrement basique et un tensioactif-marqueur anionique, l'octylbezésulfonate de sodium. Comme exemple de tensioactif neutre, nous avons choisi d'étudier le Brij 35 (figure 2), couramment utilisé pour diverses applications.

Dans cette configuration, le protocole développé pour le SDS conduirait à détecter en premier le front de tensioactif neutre sous forme libre et sous forme micellisée (lorsque les micelles existent), puis le front des complexes marqueur-monomère de tensioactif et finalement le marqueur libre. Compte tenu de la polysdispersité du Brij 35 et des électrophérogrammes obtenus pour les tensioactifs SDS et TTABr, on peut redouter que les fronts des formes du marqueur associé aux micelles ou au monomère de tensioactif soient diffus, ce qui rendrait difficile l'établissement de la ligne de base pour le front de marqueur libre. De ce fait, il nous est apparu plus judicieux de quantifier la hauteur du front de marqueur libre lorsque seule cette forme du marqueur est présente. Pour cela nous avons développé un nouveau protocole de l'analyse frontale, que nous avons appelé analyse frontale électrophorétique capillaire continue de vacance. Contrairement au protocole classique de l'analyse frontale électrophorétique capillaire continue, qui consiste à injecter l'échantillon en continu dans le capillaire, ce nouveau protocole consiste à injecter en continu l'électrolyte support seul dans le capillaire rempli de l'échantillon. Dans ce cas, la migration électrophorétique conduit à détecter des fronts de migration décroissants, dans l'ordre des mobilités apparentes décroissantes. La figure 22 compare de façon schématique ces protocoles.

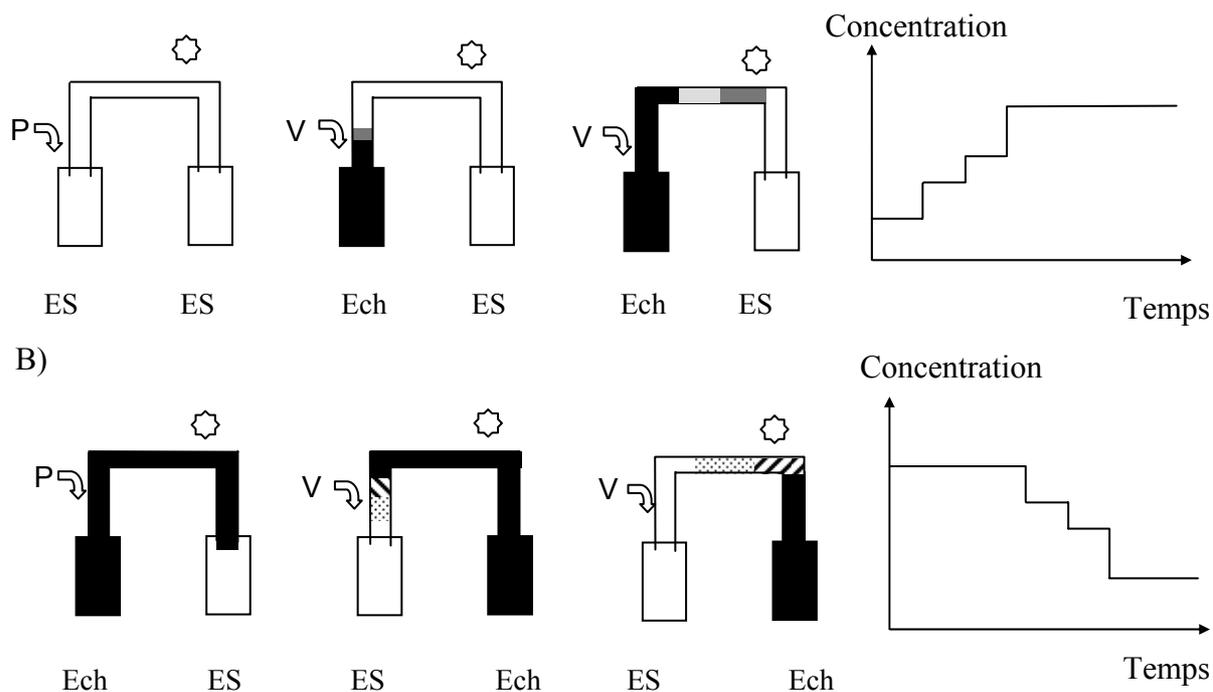


Figure 22 : Protocoles expérimentaux de l'analyse frontale électrophorétique : classique (A) et de vacance (B)

Cas de trois formes 1, 2, 3 dans l'ordre des mobilités apparentes décroissantes. Gris foncé : 1 ; gris clair : 1+2 ; noir : 1+2+3 ; zone hachurée : 2+3 ; zone pointillée : 3.

ES : électrolyte support ; Ech : échantillon ; P : application d'une pression ; V : application d'une tension.

Appliqué au cas d'un tensioactif neutre en équilibre avec un marqueur anionique, les migrations effectuées dans un capillaire en silice vierge selon le protocole de l'analyse frontale électrophorétique de vacance conduisent donc à détecter en premier la vacance du monomère et des micelles (lorsque celles-ci existent), puis des associations monomère-marqueur et enfin celle du marqueur libre. La figure 23 montre les électrophérogrammes obtenus par application du protocole de vacance au système Brij 35-octylbenzènesulfonate de sodium. Afin de minimiser la concentration de l'octylbenzènesulfonate dont la présence pourrait modifier la CMC du Brij 35 et de conserver une sensibilité de détection satisfaisante pour le marqueur, l'octylbenzènesulfonate a été détecté à 193 nm.

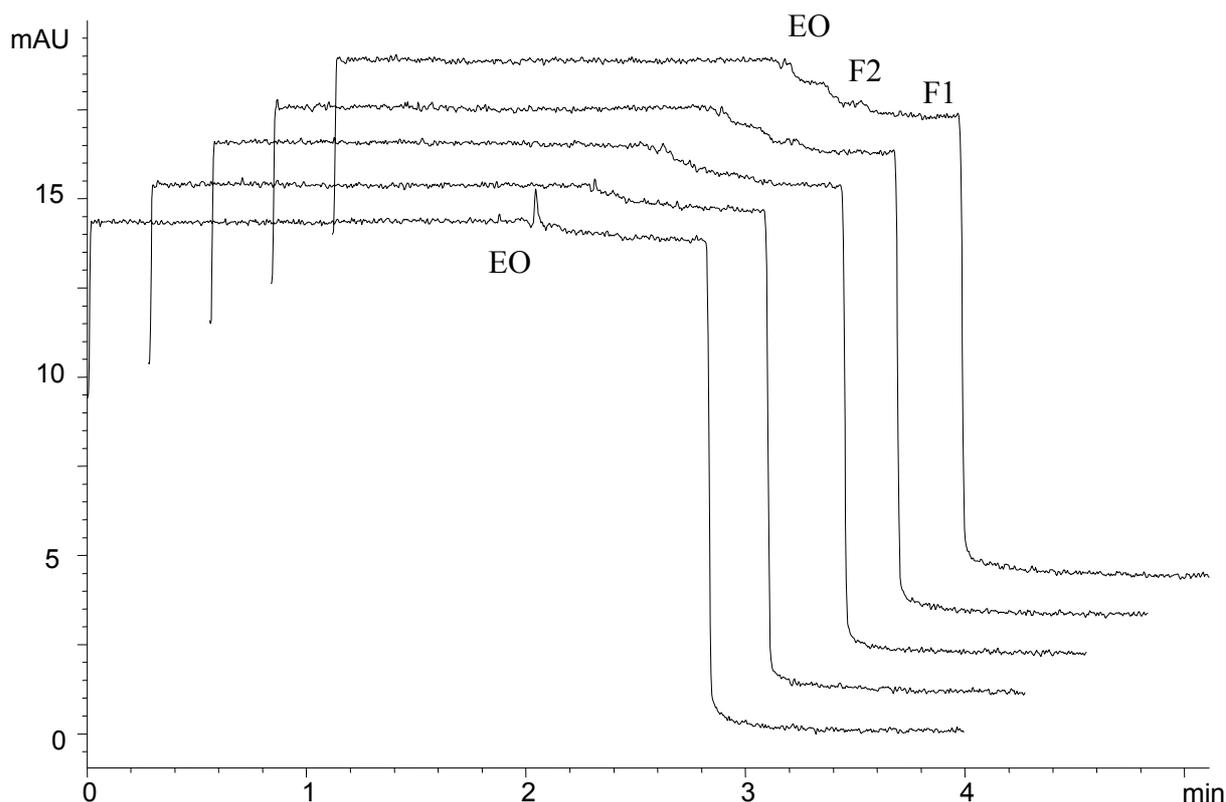


Figure 23 : Analyse frontale électrophorétique de vacance du système Brij 35-octylbenzènesulfonate.

Capillaire en silice vierge 50 μm d.i. x 35 cm (longueur utile 26,5 cm). Electrolyte support : tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2 et de force ionique 10 mM. Tension appliquée : 10 kV (intensité initiale : 5 μA). Température : 25°C. Détection par absorbance UV à 193 nm. Remplissage initial du capillaire par une solution de SOBS 0,064 mM contenant le Brij 35 en concentration variables : de gauche à droite : 0,05 ; 0,07 ; 0,09 ; 0,13 ; 0,015 mM. Introduction hydrodynamique de l'électrolyte support (30 mbars, 2 s) puis injection électrocinétique continue de celui-ci par application de la tension séparative. Attribution : EO : électrosmose ; F1 : front de migration du SOBS libre ; F2 : front de migration des associations SOBS-Brij 35.

Les électrophérogrammes présentent en premier un petit pic vers 2,05 min qui est lié à l'électrosmose. Pour les concentrations en tensioactif totales inférieures à 0,09 mM, les électrophérogrammes présentent un unique front de vacance de mobilité comprise entre -20 et $-22 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ correspondant au SOBS libre. Puis pour les concentrations de tensioactif supérieures à 0,09 mM, on détecte deux fronts de vacance supplémentaires de mobilités intermédiaires à celles de l'électrosmose et du SOBS libre. La variation de la hauteur du front de migration du SOBS libre en fonction de la concentration totale en Brij 35 est montrée figure 24.

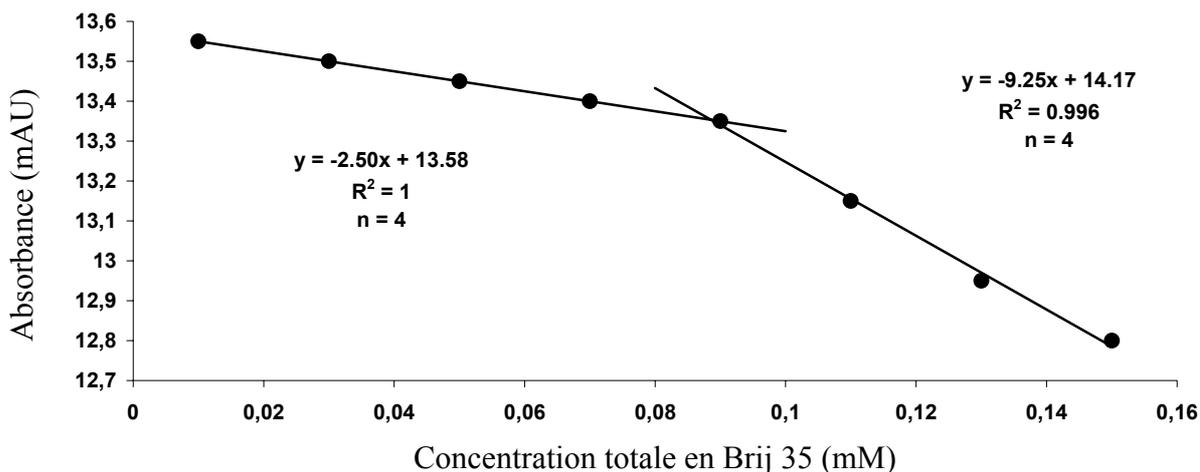


Figure 24 : Variation de la hauteur du front de migration F1 en fonction de la concentration totale de Brij 35 mesurée à mobilité électrophorétique fixe de $-17. 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Conditions expérimentales : voir figure 23

Pour les concentrations inférieures à 0,09 mM, la figure 24 montre que la hauteur du front de SOBS libre décroît légèrement, probablement du fait de l'interaction du marqueur avec les monomères de Brij 35. Pour les concentrations supérieures à 0,09 mM, la décroissance plus prononcée de la hauteur du front de SOBS libre montre l'incorporation du marqueur dans les micelles de Brij 35. L'intersection des deux droites donne une valeur de CMC de 0,089 mM, ce qui est bon accord avec la CMC donnée à 0,09 mM dans la littérature [27].

5 Conclusion

L'analyse frontale électrocinétique capillaire est une méthode qui paraît particulièrement bien adaptée à l'étude des phénomènes d'agrégation des tensioactifs. En effet, de par sa miniaturisation, l'électrophorèse présente une consommation d'échantillon minime, et la préparation des solutions échantillon, indépendante les unes des autres, limite le risque d'erreur systématique.

Dans le cas où les tensioactifs sont directement détectables, l'analyse frontale électrophorétique capillaire permet, par comparaison avec les méthodes classiques (conductométrie, tension de surface), de déterminer de façon fiable les valeurs seuil de l'agrégation que ceux-ci soient purs (cas de l'octylbenzènesulfonate) et impurs (cas du dodécylbenzènesulfonate). Par comparaison avec les autres méthodes électrophorétiques, l'analyse frontale apparaît également être, dans le cas où les tensioactifs absorbent en UV, la méthode de choix. En effet, cette méthode est apparue plus précise que la méthode de mesure

des courants, et permet d'éviter l'utilisation d'un marqueur dont la détection, nécessaire pour les méthodes de zone, peut être délicate selon le niveau d'absorbance généré par la solution de tensioactif à étudier. La méthode d'analyse frontale permet également d'observer la présence de phénomènes transitoires telles que la formation de agrégats intermédiaires. Enfin, dans le cas d'un tensioactif pur, la CMC peut être valablement approchée en un seul essai, à condition que les coefficients d'extinction des différentes formes du tensioactif soient peu différentes.

Pour les tensioactifs transparents en UV, la méthode nécessite, comme pour les méthodes de zone, l'utilisation d'un marqueur. Selon la charge du tensioactif, le marqueur est soit neutre (pour les tensioactifs cationiques et anioniques) soit chargé (tensioactifs neutres). En comparaison des autres méthodes électrophorétiques qui recourent à des marqueurs fortement hydrophobes, la méthode de l'analyse frontale permet d'utiliser des marqueurs plus hydrophiles ce qui présente l'avantage de moins perturber la micellisation (les marqueurs étant moins interactifs avec les tensioactifs) et d'offrir un choix plus large de marqueurs. Enfin cette méthode permet de préincuber les mélanges marqueur-tensioactif, et est ainsi adaptée aux systèmes dont la cinétique d'incorporation du marqueur est lente ou inconnue. Elle devrait être ainsi particulièrement intéressante pour la caractérisation de polymères amphiphiles de hautes masses moléculaires.

6 Références bibliographiques

- [1] D. Myers, *Surfactant Science and technology*, VCH, New York, 1998
- [2] B. C. Paul, S. S. Islam, K. Ismail, *J. Phys. Chem. B*, 102, 7807- 7812, 1998
- [3] E. Ahuja, J. Foley, *Anal. Chem.*, 67, 2315- 2324, 1995.
- [4] J. Jacquier, P. Desbène, *J. Chromatogr. A*, 743, 307-314, 1996
- [5] I. Uchegbu, A. Florence, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 58, 1-55, 1995
- [6] A. Abogdjan, G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 1004, 145-153, 2003
- [7] C Tondre, C. Caillet, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 93, 115-134, 2001
- [8] S. Terabe, K. Otsuka, K. Uchikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem*, 56, 111-113, 1984
- [9] J. Quirinio, S. Terabe, *J. Cap. Elec*, 4, 233-245, 1997
- [10] P.R. Martin, G. Prieto, C. Rega, L.M. Varela, F. Sarmiento, V. Mosquera, *Langmuir* 14, 4422-4426, 1998.
- [11] S. Helvacı, S. Peker, G. Özdemir, *Colloids and surface B : Biointerfaces*, 35, 225-233, 2004
- [12] A.B. Mandal, B.U. Nair, *J. Phys. Chem.*, 95, 9008-9013, 1991.
- [13] T. Nakashima, T. Anno, H. Kanda, Y. Sato, T. Kuroi, H. Fujii, S. Nagadome, G. Sugihara, *Colloids Surf. B*, 24, 103-110, 2003.
- [14] T. Lee, K. Woo, *J. Colloid Interface Sci.*, 169, 34-38, 1995.
- [15] N. Santos, A. Silva, M. Castanho, J. Martins-Silva, C. Saldanha, *ChemBioChem*, 4, 96-100, 2003.
- [16] C. Maeder, G.M.J. Beaudoin III, E.K. Hsu, V.A. Escobar, S.M. Chambers, W.E. Kurtin, M.M. Bushey, *Electrophoresis*, 21, 706-714, 2000.

- [17] C. Akbay and S. Shamsi, *Electrophoresis*, 25, 622-634, 2004.
- [18] A. Cifuentes, J. Bernal, J. Diez-Masa, *Anal. Chem.*, 69, 4271-4274, 1997.
- [19] J. Jacquier, P. Desbène, *J. Chromatogr. A*, 718, 167-175, 1995.
- [20] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57, 834-841, 1985.
- [21] J. Gao, P. Dubin, B. Muhoberac, *Anal. Chem.*, 69, 2945-2951, 1997.
- [22] C.-E. Lin, *J. Chromatogr. A*, 1037, 467-468, 2004.
- [23] <http://www.logP.com>
- [24] Merck Index, Merck, Whitehouse Station, 12 ed. 1996.
- [25] T. Kaneta, S. Tanaka, H. Yoshida, *J. Chromatogr.* 538, 385-391, 1991.
- [26] W. Jones, P., Jandik, *J. Chromatogr.* 546, 445-458, 1991.
- [27] H. Nishi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 735, 3-27, 1996.
- [28] C.-E. Lin, T.-Z. Wang, T.-C. Chiu, C.-C. Hsueh, *J. High Resolution Chromatogr.* 22, 265-270, 1999.

7 Annexe: Préparation des électrolytes supports

Le tampon borate de sodium 20 mM de pH 9,2 et de force ionique 10 mM, utilisé comme électrolyte support, a été préparé à partir de tétraborate de sodium (d'origine Fluka) en concentration :

$$[\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7] = 5 \text{ mM}$$

Le tampon phosphate de sodium 2,8 mM de pH 6,9 et de force ionique 5 mM, utilisé comme électrolyte support, a été préparé à partir des sels de phosphate monosodiques et dissodiques aux concentration suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 1,7 \text{ mM et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 1,1 \text{ mM}$$

Le tampon phosphate de sodium 7,3 mM de pH 6,4 et de force ionique 10 mM, utilisé comme électrolyte support, a été préparé par dilution au tiers d'une solution-mère de dihydrogénophosphate et d'hydrogénophosphate de sodium aux concentrations suivantes :

$$[\text{NaH}_2\text{PO}_4] = 8,8 \text{ mM et } [\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 2,1 \text{ mM}$$

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de systèmes interactif variés (distribution liposomale, complexation par inclusion, protéine-polysaccharide, auto-agrégation,) par trois méthodes électrophorétiques (injection directe, électrophorèse capillaire d'affinité et analyse frontale électrophorétique continue).

Ainsi, dans une première application, nous nous sommes intéressé à la caractérisation de l'interaction d'un analyte avec une phase liposomale. Pour de tels systèmes, les difficultés de caractérisation sont liées d'une part à la forte affinité de l'analyte pour la phase liposomale (ce qui engendre une concentration en analyte libre faible) et à l'adsorption du liposome sur la paroi du capillaire. Pour contourner ces difficultés, nous avons développé un protocole original d'introduction électrocinétique sélective et de préconcentration en ligne. Par ce protocole, nous avons réussi à caractériser les systèmes modèles liposome-parabènes par l'introduction d'une constante de complexation entre le liposome et le soluté. Les résultats obtenus ont ainsi montré une bonne corrélation entre les constantes de complexation et l'hydrophobie des solutés évaluée par le log P. Ce protocole a également été appliqué à la détermination de la concentration libre d'un principe actif dans une formulation liposomale.

Ensuite nous avons évalué l'intérêt de la modélisation des profils électrophorétiques par la fonction de Haarhof - Van der Linde lorsque la dispersion par électromigration est importante, dans le cadre de l'électrophorèse d'affinité, méthode qui requiert la détermination de mobilités électrophorétiques. Cette modélisation a été appliquée à l'étude de l'inclusion de solutés anioniques dans la β -cyclodextrine. Il ressort de cette étude que la mobilité du substrat anionique peut être calculée indépendamment des effets de la dispersion par électromigration. Ainsi, la concentration en ligand libre dans la zone de substrat peut être assimilée à la concentration de ligand dans l'électrolyte support, lorsque la concentration en substrat n'excède pas dix fois cette concentration. La modélisation trouve toutefois ses limites lorsque la concentration en substrat devient nettement disproportionnée par rapport à la concentration en ligand et que le temps nécessaire à la formation du complexe à sa concentration d'équilibre ne peut plus être négligé vis-à-vis du temps de la migration observée. Dans ce dernier cas, il apparaît nécessaire de calculer la concentration en ligand libre.

Dans une troisième application, nous avons eu l'occasion de déterminer, pour la première fois, la constante d'interaction entre l'héparine, polysaccharide sulfaté, et l'antithrombine III par analyse frontale électrocinétique continue. Cette approche nous a ainsi permis dans un premier temps d'évaluer le nombre de chaînes actives du polysaccharide lorsque la protéine joue le rôle de ligand. Dans un second temps, nous avons inversé les rôles joués par les deux partenaires, ce qui nous a permis cette fois de déterminer, conformément à la littérature, un site unique d'interaction sur la protéine. La mise en œuvre expérimentale retenue de l'analyse frontale électrocinétique continue nous a en outre permis de quantifier l'interaction entre le polysaccharide et la protéine, même lorsque l'interaction met en jeu une ou plusieurs étapes cinétiquement lentes ou irréversibles.

Enfin, nous avons démontré la faisabilité de l'analyse frontale électrocinétique capillaire pour la détermination de concentrations-seuil d'agrégation pour les tensioactifs. Il ressort que cette méthode s'avère particulièrement adaptée à l'étude de tensioactifs ioniques qui absorbent en UV car elle ne nécessite pas, à la différence des méthodes électrophorétiques classiques (variation de mobilité, variation des facteurs de rétention), l'usage d'un marqueur susceptible de perturber le phénomène d'agrégation. Cette nouvelle méthode a ainsi permis de mesurer la concentration-seuil d'agrégation pour un tensioactif pur et également pour un mélange de tensioactifs. Pour les tensioactifs transparents en UV, la méthode nécessite de recourir à l'emploi d'un marqueur neutre. Par comparaison avec les autres méthodes électrophorétiques (excepté la mesure de courant qui ne nécessite pas de marqueur), la méthode de l'analyse frontale autorise l'emploi d'un marqueur moins hydrophobe, ce qui élargit le choix du marqueur et perturbe l'équilibre d'agrégation dans une moindre mesure. Enfin pour la détermination de la concentration micellaire critique d'un tensioactif neutre, nous avons mis au point le nouveau protocole d'analyse frontale de vacance. Ce protocole nous a permis, pour la première fois en électrophorèse capillaire, de mesurer le seuil d'agrégation d'un tensioactif neutre (Brij 35).

Différentes études peuvent être envisagées dans la continuité de ces travaux. Concernant l'étude de la modélisation des profils électrophorétiques, il semble particulièrement intéressant d'appliquer les modèles de la frontière mobile pour le calcul de la concentration de ligand libre dans la zone de substrat au cours de la migration électrophorétique.

D'un point de vue instrumental, plusieurs voies peuvent être envisagées. Tout d'abord, il semble particulièrement intéressant de coupler l'électrophorèse capillaire avec une technique de détection (spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire) qui permette de recueillir en ligne des informations structurales sur les complexes formés simultanément à la détermination des constantes d'interactions. Pour de tels couplages, la méthode de l'analyse frontale semble particulièrement attractive car elle devrait permettre d'observer les différents partenaires à l'équilibre sur une période longue. Enfin, il semble intéressant d'étudier dans quelle mesure les méthodes de détermination de constantes électrophorétiques peuvent être adaptées pour l'électrophorèse sur puces. Cette technique émergente depuis une dizaine d'années semble en effet particulièrement attractive pour la détermination de constantes d'interactions (séparations extrêmement rapides, volumes d'échantillon réduits, possibilités de couplage en ligne avec la spectrométrie de masse, dérivations intégrées, possibilités de séparations simultanées...) et pourrait constituer l'avenir de l'analyse interactomique.

Publications acceptées

- 1.- Frontal analysis continuous capillary electrophoresis determination of aggregation thresholds of UV absorbing anionic surfactants,
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
J. Chromatogr. A, 1038, 272-282, 2004
- 2.- Determination of the aggregation threshold of non-UV-absorbing, neutral or charged surfactants by frontal- and vacancy-frontal analysis continuous capillary electrophoresis
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
J. Chromatogr. A; 1041, 219-226, 2004
- 3.- Ultrashort partial filling technique in capillary electrophoresis for infinite resolution of tramadol enantiomers and its metabolites with highly sulfated cyclodextrins
S. Rudaz, Th. Le Saux, J. Prat, P. Gareil, J.-L. Veuthey
Electrophoresis, 25, 2761-2771, 2004
- 4.- Determination of critical micelle concentrations.
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
In Electrokinetic chromatography: Theory, Instrumentation and applications, John Wiley & Sons, à paraître.

Publications soumises ou à soumettre

- 5.- Determination of binding parameters for biological (drug-protein) systems. comparison between affinity and frontal analysis continuous capillary electrophoresis;
T. Le Saux, A. Varenne, F. Perreau, S. Duteil, L. Siret, P. Gareil
Anal. Biochem.
- 6 - Frontal analysis continuous capillary electrophoresis for the determination of binding parameters for biological systems. Study of the binding properties of heparin to antithrombin.
T. Le Saux, A. Varenne, S. Duteil, L. Siret, P. Gareil¹
Anal Biochem.
- 7 - Peak shape modelling: a new insight into affinity capillary electrophoresis
Th. Le Saux, A. Varenne, P. Gareil
Electrophoresis
- 8 - Characterization of liposomal distribution by capillary electrophoresis.
T. Le Saux, A. Varenne, N. Bargmann-Leyder, L. Duhau, P. Gareil,
Journal of Chromatography A

Communications orales

- 1 - Interest of capillary electrophoresis for the determination of binding constant and stoichiometry of the interaction between bioactive sulfated polysaccharides and proteins
A. Varenne, T. Le Saux, S. Duteil, L. Siret, R. Daniel, P. Gareil
International MM 2003 Symposium, Separation and characterization of natural and synthetic macromolecules, Amsterdam, The Netherlands, 5- 7 Février 2003 :
- 2 - Interêt de l'analyse frontal électrophorétique pour la détermination de paramètres d'interaction. Application à des systèmes biologiques et agrégatifs.
T. Le Saux, A. Varenne, S. Duteil, L. Siret, P. Gareil.
SEP 2003, Techniques Séparatives et Couplages, Lyon, France, 13-15 mai 2003
- 3 - Détermination de constantes d'interaction par électrophorèse capillaire.
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
Journée scientifique du Club Ile-de-France de l'AFSEP, Paris, France, 10 Décembre, 2003

- 4 - Les méthodes séparatives pour la détermination des constantes d'interaction non covalentes : de la chromatographie à l'électrophorèse capillaire.
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
Journée thématique de la SFCBA, Paris, France, 5 février 2004
- 5 - Infinite resolution of Tramadol enantiomers in capillary electrophoresis with highly sulfated cyclodextrins using ultrashort partial filling.
S.Rudaz, Th. Le Saux, J. Prat, P. Gareil, J.-L. Veuthey
14th International symposium on capillary electroseparation techniques, ITP'04, Rome, Italie, 12-15 septembre 2004
- 6 - Zonal and frontal capillary electrophoretic methods for the determination of non-covalent binding parameters
T. Le Saux, A. Varenne, P.Gareil, S. Duteil, L. Siret
25th International Symposium on Chromatography, ISC'04, Paris, France, 4-8 Octobre 2004.

Communications sous forme de poster

- 1 - Etude de l'agrégation des tensioactifs par analyse frontale en électrophorèse capillaire. Comparaison aux méthodes classiques.
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
SEP'03, Lyon, France, Mai 13-15, 2003
- 2 - Investigation of Surfactant Aggregation By Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. Comparison with classical Methods.
Th Le Saux, A. Varenne, and P. Gareil
HPLC 2003, Nice, France, Juin 15-19, 2003
- 3 - Binding Constant and Stoichiometry Determinations by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. The Case of low molecular Weight Heparin Antithrombin Systems.
Th Le Saux, A. Varenne, S. Duteil, L. Siret, and P. Gareil
HPLC 2003, Nice, France, Juin 15-19, 2003
- 4 - Capillary electrophoresis determination of binding parameters for bioactive sulfated polysaccharide / protein systems.
Th Le Saux, A. Varenne, S. Duteil, L. Siret, and P. Gareil
HPLC 2003, Nice, France, Juin 15-19, 2003
- 5 - Determination of the aggregation threshold of non UV-absorbing, neutral or charged surfactants by frontal- and vacancy-frontal analysis continuous capillary electrophoresis
T. Le Saux, A. Varenne, P. Gareil
ISC'04, 5th International Symposium on Chromatography, Paris, 4-8 octobre 2004
- 6 - Peak shape modelling : a new insight into affinity capillary electrophoresis for proper binding constant determination.
T. Le Saux, A. Varenne, P. Gareil
ISC'04, 5th International Symposium on Chromatography, Paris, 4-8 octobre 2004
- 7 - Frontal analysis continuous capillary electrophoresis (FACCE) for the determination of binding parameters of heparin to antithrombin
T.Le Saux, A. Varenne, P. Gareil, G. Perrret, M. Couder, L. Duhau
ISC'04, 5th International Symposium on Chromatography, Paris, 4-8 octobre 2004

Résumé

Les interactions non-covalentes en solution jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus chimiques, biologiques, pharmacologiques. Il est donc d'intérêt de pouvoir quantifier ces interactions. Parmi les méthodes de quantification disponibles, l'électrophorèse capillaire semble particulièrement bien adaptée (miniaturisation, absence de phase stationnaire). Au cours de ces travaux, plusieurs systèmes modèles ont été caractérisés au moyen de trois méthodes électrophorétiques (injection directe, électrophorèse d'affinité et analyse frontale): la distribution d'un soluté dans une phase liposomale, l'interaction entre un polysaccharide (héparine) et une protéine (antithrombine III), les seuils d'agrégation de tensioactifs, l'inclusion de petites molécules dans la β -cyclodextrine. Pour chacun de ces modèles, une attention particulière a été portée aux spécificités des méthodes électrophorétiques utilisées et à l'intérêt de certaines modélisations.

Summary

Noncovalent molecular interactions are widely encountered and are involved in numerous domains such as chemistry, biology, pharmacology. It is therefore of a great interest to quantify such interactions. Among the different methods of quantification, capillary electrophoresis appears to be particularly attractive (miniaturization, no need of stationary phase). During this work, many model-systems have been characterized by three electrophoretical methods (direct injection, affinity capillary electrophoresis, frontal analysis): distribution of a solute into a liposomal phase, interaction between a polysaccharide (heparin) and a target protein (antithrombin III), surfactant aggregation threshold, host-guest complexation with β -cyclodextrin. For each system, a particular attention has been focused on method specificity and modelization.