



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : Chimie, Biologie, Santé

---

Présentée et soutenue par *Audrey RODAT*  
Le 26 février 2009

**Titre :** *Mise au point d'un système CE-LIF intégré et application à l'analyse de biomolécules*

---

### JURY

*M Michel Bergon - Professeur de l'U.P.S., Toulouse - Président*  
*M Luc Deneroy - Directeur de recherche C.N.R.S., Lyon - Rapporteur*  
*M Hervé Cottet - Professeur à l'I.B.M.M., Montpellier - Rapporteur*  
*M François Couderc - Professeur de l'U.P.S., Toulouse - Directeur de thèse*

---

**Ecole doctorale :** Sciences de la matière  
**Unité de recherche :** I.M.R.C.P. / Picometrics  
**Directeur(s) de Thèse :** M François Couderc



# Remerciements...

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire Picometrics basé à Toulouse et au laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique (I.M.R.C.P.) à l'université Paul Sabatier de Toulouse. Je tiens à remercier respectivement les deux directeurs M. Bernard Feurer et Mme. Monique Mauzac pour m'avoir accueillie dans ces laboratoires.

Je souhaite remercier M. Luc Deneroy et M. Hervé Cottet pour avoir pris le temps de corriger ce manuscrit de thèse et M. Michel Bergon pour avoir présidé ce jury.

J'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse M. François Couderc pour son soutien durant ces trois années de thèse. Vos explications et vos précieux conseils en électrophorèse capillaire et en fluorescence ainsi que vos connaissances bibliographiques m'ont beaucoup apporté.

Un grand merci à tous mes collègues pour leur soutien quotidien notamment Arnaud, Fabien, Jacques, Jocelyne, Jordi, Julie, Marie-Carmen, Michel, My-Dung, Nabila, Nadège, Nathalie, et Pierre. Qu'ils trouvent ici le témoignage de toute mon amitié.

Je souhaite également remercier Jérôme, toute ma famille et amis pour leur soutien et leur confiance. Merci de m'avoir accompagnée dans cette aventure.



**Résumé :**

La détection par Fluorescence Induite par Laser (LIF) est la technique de détection la plus sensible et la plus sélective pour l'Electrophorèse Capillaire (CE). Grâce à un nouvel arrangement optique, la détection LIF a été intégrée à un appareil commercial de CE : ce système utilise une bille qui focalise le faisceau laser dans le capillaire et un demi-ellipsoïde placé sur la fenêtre du capillaire afin de collecter la fluorescence. Les performances de ce nouveau détecteur ont été comparées au montage colinéaire déjà existant et commercialisé par la société Picometrics. Afin de répondre aux attentes du contrôle qualité de produits pharmaceutiques, une application sur l'analyse d'immunoglobulines a été optimisée par CE-LIF. Deux techniques sont mises au point avec notre nouveau détecteur : la première est l'analyse des immunoglobulines marqués au FITC (488 nm) ou au TAMRA (532 nm), la seconde est l'analyse des immunoglobulines à 266 nm (fluorescence native).

**Mots clés :** fluorescence induite par laser, électrophorèse capillaire, demi-ellipsoïde, immunoglobuline G, contrôle qualité

**Abstract :**

Laser Induced Fluorescence (LIF) detection is the most sensitive and selective detection technique for Capillary Electrophoresis (CE). Thanks to a new optical arrangement, LIF detection was integrated into a commercial CE instrument : this system uses a ball lens to focus the laser beam on the capillary and a half ellipsoid placed on the capillary window to collect the fluorescence. The performance of this new arrangement was compared to the existing colinear arrangement commercialized by Picometrics. An application on immunoglobulins analysis was optimized in CE-LIF in order to meet the expectations of the pharmaceuticals products quality control. Two techniques were focused with the new detector : the first one is the analysis of FITC labelled immunoglobulin (488 nm) or of TAMRA labelled immunoglobulin (532 nm), the second one is the analysis of immunoglobulin at 266 nm (native fluorescence).

**Keywords :** laser induced fluorescence, capillary electrophoresis, half ellipsoid, immunoglobulin G, quality control

# SOMMAIRE

<b>1. Introduction générale.....</b>	<b>10</b>
<b>2. Etude bibliographique.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. La fluorescence : principes et paramètres .....</b>	<b>13</b>
2.1.1. Le processus de fluorescence .....	13
2.1.2. Spectre d'excitation de fluorescence.....	14
2.1.3. Les fluorophores.....	15
2.1.3.1. Les fluorophores intrinsèques .....	15
2.1.3.2. Les fluorophores extrinsèques.....	16
2.1.4. Le laser .....	16
2.1.4.1. Principe du laser [6] .....	16
2.1.4.2. Les différents lasers.....	17
2.1.5. Description de différents montages optiques appliqués à la détection de fluorescence induite par laser .....	20
2.1.5.1. Les détecteurs commercialisés [9] .....	20
2.1.5.1.1. Le détecteur LIF Beckman-Coulter.....	20
2.1.5.1.2. Le détecteur Picometrics Zétalif [10].....	21
2.1.5.2. Les détecteurs « home made » (fabriqués en laboratoire) [15].....	23
<b>2.2. Structure et analyse de la pureté des anticorps recombinants.....</b>	<b>26</b>
2.2.1. Introduction .....	26
2.2.2. Fonctions et structure des anticorps .....	27
2.2.2.1. Structure générale des immunoglobulines .....	27
2.2.2.1.1. Chaînes lourdes .....	27
2.2.2.1.2. Chaînes légères.....	28
2.2.2.1.3. Domaines.....	28
2.2.2.1.4. Structure tertiaire des immunoglobulines .....	29
2.2.2.1.5. Classes et sous-classes des immunoglobulines .....	31
2.2.2.1.6. Production des anticorps monoclonaux.....	34
2.2.2.1.7. Instabilités des anticorps .....	37
2.2.2.2. Fonctions des anticorps .....	38
2.2.2.3. Le marché des anticorps monoclonaux (AcM) .....	40

2.2.3.	Analyses des anticorps .....	41
2.2.3.1.	Analyses des anticorps par électrophorèse.....	42
2.2.3.1.1.	Analyses des anticorps par SDS-PAGE.....	43
2.2.3.1.2.	Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) .....	47
2.2.3.1.3.	Electrophorèse capillaire sodium dodecyl sulfate (détection UV et LIF) 54	
2.2.3.2.	La chromatographie liquide .....	72
<b>3.</b>	<b><i>Développement d'un nouvel arrangement optique permettant d'intégrer la détection de fluorescence induite par laser à l'intérieur de l'électrophorèse capillaire .....</i></b>	<b>74</b>
<b>3.1.</b>	<b>Présentation du nouveau montage optique.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2.</b>	<b>Le demi ellipsoïde.....</b>	<b>76</b>
<b>3.3.</b>	<b>Les Lois de Descartes .....</b>	<b>76</b>
3.3.1.	$n_1 < n_2$ .....	77
3.3.2.	$n_1 > n_2$ .....	78
<b>3.4.</b>	<b>Application de la loi de Descartes au montage optique avec demi-ellipsoïde... 79</b>	
<b>3.5.</b>	<b>Optimisation et validation du montage optique .....</b>	<b>80</b>
3.5.1.	Présentation du montage avec deux PMT .....	80
3.5.2.	Choix de l'interface capillaire /demi-ellipsoïde .....	81
3.5.3.	Choix du matériau du demi-ellipsoïde .....	81
3.5.4.	Alignement du capillaire à l'intérieur du demi-ellipsoïde .....	82
3.5.5.	Détermination des distances.....	83
3.5.5.1.	Instrumentation.....	83
3.5.5.2.	Conditions expérimentales .....	84
3.5.5.3.	Détermination de la distance optimale bille-demi ellipsoïde.....	84
3.5.5.4.	Détermination de la distance optimale demi ellipsoïde-fibre cœur liquide 85	
3.5.6.	Comparaison montage colinéaire/montage demi-ellipsoïde .....	85
3.5.6.1.	Tests effectués à 633 nm .....	86
3.5.6.2.	Tests effectués à 488 nm .....	86
3.5.6.3.	Tests effectués à 410 nm .....	87

3.5.6.4.	Tests effectués à 325 nm .....	88
3.5.6.5.	Tests effectués à 266 nm .....	88
3.5.6.6.	Conclusion.....	89
3.5.7.	Amélioration de la longueur d'onde 266 nm .....	90
3.5.8.	Tests du montage à l'intérieur de l'électrophorèse capillaire Agilent .....	91
3.5.8.1.	Tests de température.....	92
3.5.8.2.	Tests de répétabilité et de linéarité.....	94
<b>3.6.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>95</b>
<b>4.</b>	<b><i>Optimisation de séparations de molécules d'intérêt biologiques avec notre détecteur LIF 96</i></b>	
<b>4.1.</b>	<b>Séparation d'anticorps marqués par CE-LIF à 488 nm et 532 nm.....</b>	<b>97</b>
4.1.1.	Instrumentation.....	97
4.1.2.	Réactifs utilisés .....	97
4.1.3.	Mise au point de la méthode d'analyse d'un IgG2a-FITC par CE/LIF (488nm)	98
4.1.3.1.	L'injection .....	98
4.1.3.2.	Pré -injection.....	99
4.1.3.3.	Dilution de l'échantillon.....	101
4.1.3.3.1.	Dilution de l'échantillon dans le SDS .....	101
4.1.3.3.2.	Dilution de l'échantillon dans le LiDS.....	102
4.1.3.3.3.	Comparaison du milieu de dilution de l'IgG2a-FITC.....	103
4.1.3.4.	Puissance du laser.....	104
4.1.3.5.	Répétabilité d'injection .....	110
4.1.3.6.	Courbe de calibration .....	111
4.1.3.7.	Limite de détection de l'échantillon non réduit .....	111
4.1.3.8.	Limite de détection de l'échantillon réduit .....	113
4.1.3.9.	Cinétique de réduction de l'IgG2a-FITC .....	115
4.1.4.	Mise au point de la méthode d'analyse d'un IgG-TAMRA par CE/LIF (532nm)	119
4.1.4.1.	Limite de détection de l'échantillon non réduit .....	119
4.1.4.2.	Répétabilité de l'injection .....	121
4.1.4.3.	Limite de détection de l'échantillon réduit .....	122
4.1.5.	Conclusion.....	123
<b>4.2.</b>	<b>Séparation d'anticorps par CE-LIF à 266nm (fluorescence native) .....</b>	<b>123</b>

4.2.1.	Instrumentation.....	124
4.2.2.	Réactifs utilisés .....	124
4.2.3.	Mise au point de la méthode d'analyse d'IgG par CE/LIF à 266 nm .....	124
4.2.3.1.	Optimisation de la puissance du laser .....	125
4.2.3.2.	Limite de détection de l'échantillon non réduit .....	126
4.2.3.3.	Limite de détection de l'échantillon réduit .....	128
4.2.3.4.	Action de la PNGase F sur l'IgG control standard Beckman .....	129
4.2.3.5.	Cinétique de réduction de l'IgG control standard Beckman .....	131
4.2.3.6.	Comparaison détection UV et LIF (fluorescence native) sur l'analyse d'anticorps	132
4.2.3.7.	Comparaison de différents IgG .....	135
4.2.3.8.	Cinétique de réduction de l'IgG de sérum de rat .....	137
4.2.3.9.	Mesure de la taille des immunoglobulines par électrophorèse capillaire	138
4.2.3.10.	Analyses d'anticorps pharmaceutiques .....	139
4.2.4.	Conclusion.....	141
<b>5.</b>	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>142</b>
<b>6.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>145</b>
<b>7.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>178</b>

## **1.      *Introduction générale***

La détection par fluorescence induite par laser (LIF) peut être couplée à une électrophorèse capillaire afin d'atteindre une bonne sensibilité. L'objectif de ma thèse industrielle (convention CIFRE entre la société Picométrics de Toulouse et le laboratoire IMRCP de Toulouse) est de développer et valider un nouveau montage optique afin d'intégrer la détection LIF à l'intérieur d'une CE Agilent. Pour atteindre cet objectif, une bille est utilisée afin de focaliser le faisceau laser à l'intérieur du capillaire et un demi-ellipsoïde est collé au niveau de la fenêtre de détection afin de récolter la fluorescence.

A partir de ce nouveau montage optique, une application sur l'analyse des anticorps monoclonaux recombinants a été développée. En effet, les anticorps monoclonaux recombinants appartiennent à une classe de médicaments très utilisée ces dernières années dans le traitement de certains cancers, de maladies inflammatoires ou auto-immunes. De ce fait, l'industrie pharmaceutique est soumise au contrôle de la qualité de ces médicaments. Elle est demandeuse de techniques toujours plus sensibles et plus rapides.

L'ensemble de ces travaux s'articule en trois chapitres.

Le premier chapitre est une étude bibliographique. Après avoir défini la fluorescence induite par laser, l'ensemble des détecteurs de fluorescence commercialisés ou fabriqués en laboratoire sont décrits. Puis, la structure et les fonctions des immunoglobulines sont précisées. En dernier point, les différentes techniques analytiques permettant le contrôle de la qualité des anticorps monoclonaux recombinants sont énoncées.

Le second chapitre est consacré au développement et à la validation du nouveau montage optique permettant l'intégration de la détection LIF à l'intérieur de la CE. Les performances de ce détecteur sont comparées au montage colinéaire déjà existant.

Dans le troisième chapitre, nous avons développé, à partir du montage optique intégré à la CE, deux méthodes d'analyse d'immunoglobuline pour leur contrôle qualité. La première méthode est l'analyse des immunoglobulines marquées soit au FITC (analyse à 488 nm) soit au TAMRA (analyse à 532 nm). Cette méthode permet d'atteindre une bonne sensibilité mais une étape de marquage avant analyse est indispensable. La seconde méthode est l'analyse des immunoglobulines à 266 nm (fluorescence native). Cette méthode est beaucoup plus rapide (car sans étape de marquage) mais la sensibilité est inférieure.

Enfin, une conclusion générale résumera l'ensemble de ces travaux.

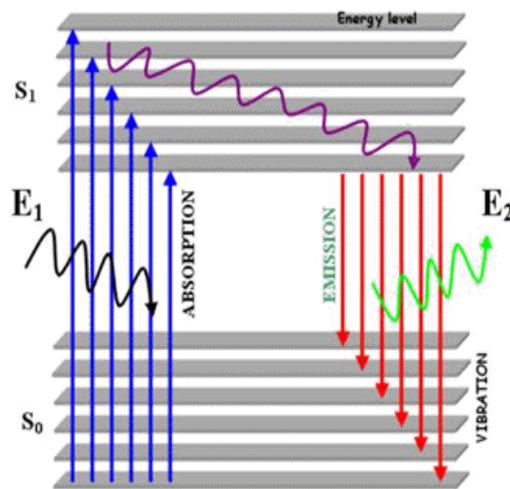
## **2. *Etude bibliographique***

## 2.1. La fluorescence : principes et paramètres

La fluorescence est une émission de photons provoquée par une radiation électromagnétique [1].

### 2.1.1. Le processus de fluorescence

La fluorescence est le résultat d'un processus à trois étapes qui se produit sur certains fluorophores (hydrocarbures ou hétérocycles) ou colorants fluorescents [2, 3]. Le processus est illustré par le diagramme de Jablonski. *Figure 1*



*Figure 1: diagramme de Jablonski  
avec  $S_0$  l'état fondamental et  $S_1$  l'état singulet excité [4]*

Stade 1 : L'excitation :

Un photon d'énergie  $h\nu$  est fourni par une source extérieure telle qu'un laser ou une lampe incandescente créant un état singulet excité  $S_1$ .

Stade 2 : Etat excité :

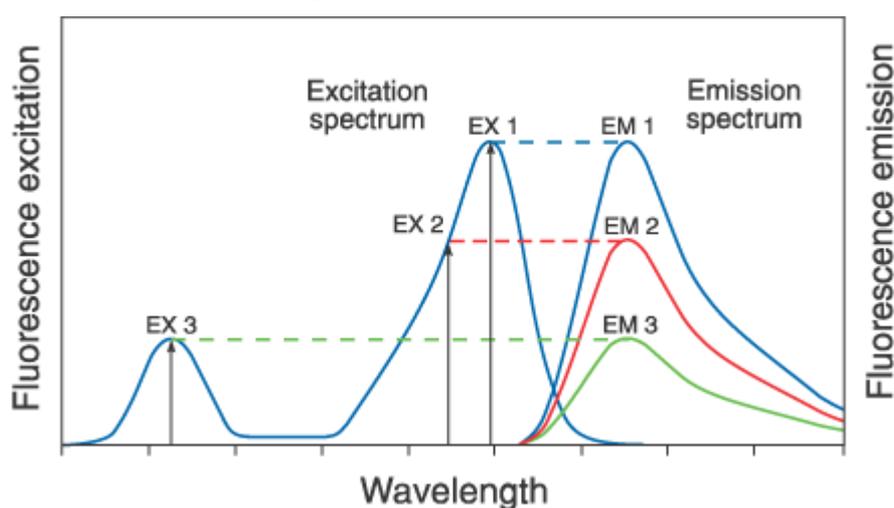
La durée de vie de l'état excité (durée pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état fondamental) est de 1 à 10 nanosecondes. Pendant ce temps, le fluorophore subit des changements de conformation et est sujet également à de multiples interactions avec son environnement moléculaire (par exemple le solvant).

Stade 3 : Emission de fluorescence :

Un photon est émis, renvoyant le fluorophore à son état fondamental  $S_0$ . Les molécules retournent donc à l'état fondamental par émission de fluorescence. A cause de l'énergie de dissipation, l'énergie de ce photon  $h\nu_{em}$  est plus faible que l'énergie du photon d'excitation  $h\nu_{ex}$ . La longueur d'onde d'émission est donc plus grande que la longueur d'onde d'excitation. La différence d'énergie  $h\nu_{ex} - h\nu_{em}$  est appelée déplacement de Stokes. Le déplacement de Stokes est fondamental en fluorescence car il permet aux photons d'émission d'être isolés des photons d'excitation. L'intensité du spectre de fluorescence dépend de la population de molécules se trouvant à l'état excité. Dans certains cas, le retour à l'état fondamental est interdit par les règles de la mécanique quantique (passage de  $S_1$  à  $T_1$  (état triplet excité)), l'émission est alors très lente, de l'ordre de la seconde et on parle de phosphorescence.

### 2.1.2. Spectre d'excitation de fluorescence

Le spectre d'excitation est obtenu en fixant la longueur d'onde d'émission et en faisant défiler les longueurs d'onde d'excitation. Le spectre obtenu est en principe identique au spectre d'absorption du fluorophore étudié. La comparaison des spectres d'absorption et d'excitation permet entre autre de savoir si le fluorophore est pur. La présence d'impuretés provoque une modification dans le spectre d'excitation plus facilement détectable que dans le spectre d'absorption [4]. L'intensité d'émission est proportionnelle à l'amplitude du spectre d'excitation de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation. *Figure 2*



*Figure 2 : L'excitation d'un fluorophore à trois longueurs d'onde (Ex1, Ex2, Ex3) ne change pas le profil de l'émission mais entraîne des variations de l'intensité de la fluorescence (Em1, Em2, Em3) qui correspond à l'amplitude du spectre d'excitation. [5]*

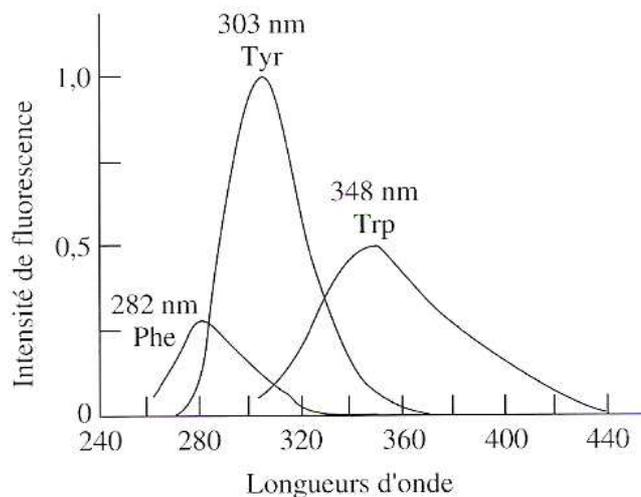
### 2.1.3. Les fluorophores

Les marqueurs de fluorescence sont de petites molécules qui subissent des changements dans leurs paramètres de fluorescence suite à leur interaction avec des molécules. Ils se divisent en deux parties : les fluorophores intrinsèques et les fluorophores extrinsèques.

#### 2.1.3.1. Les fluorophores intrinsèques

Les fluorophores intrinsèques sont naturels. Ils incluent les acides aminés aromatiques, nicotinamide adenine dinucleotide, flavines, dérivés pyridoxals, chlorophylles.... La fluorescence intrinsèque des protéines est due au tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Les groupes indoles des résidus tryptophane participent généralement à 90% dans la fluorescence totale des protéines.

La *figure 3* représente les spectres de fluorescence du Trp, Tyr et Phe à une longueur d'onde d'excitation de 270 nm ; les composés sont dilués dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7.



*Figure 3 : Spectres de fluorescence des Trp, Tyr, Phe dilués dans du tampon phosphate 0.1M à pH 7. La longueur d'onde d'excitation est de 270 nm [4]*

Le *tableau 1* résume les principales caractéristiques de l'absorption et de l'émission de ces trois acides aminés aromatiques dans une protéine.

Fluorophore	Conditions	Absorption		Fluorescence	
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max} (\times 10^{-3})$ $M^{-1}.cm^{-1}$	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Phi_F$
Trp	pH7	280	5,6	348	0,2
Tyr	pH7	274	1,4	303	0,1
Phe	pH7	257	0,2	282	0,04

*Tableau 1 : Caractéristiques de l'absorption et de l'émission du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine dans un tampon phosphate 0.1 M à pH 7 [6]*

En fluorescence native, l'émission de la tyrosine est souvent réduite par des interactions entre la chaîne peptidique et le transfert d'énergie vers le tryptophane. L'émission de la phénylalanine est observée seulement lorsque la protéine manque de résidus tryptophane et tyrosine. La fluorescence du tryptophane est réduite par la présence d'iodure, d'acrylamide, de dioxygène ou de ponts disulfures.

### **2.1.3.2. Les fluorophores extrinsèques**

Les fluorophores extrinsèques sont additionnés à l'échantillon pour produire de la fluorescence. Ils sont utilisés lorsque la molécule d'intérêt n'est pas fluorescente ou lorsque la fluorescence native n'est pas adaptée. Ils incluent le chlorure de dansyl, les dérivés réactifs de rhodamine ou de fluorescéine... [2, 7] Le nombre de fluorophores a considérablement augmenté ces dernières années [8].

### **2.1.4. Le laser**

Le mot LASER signifie : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation .

#### **2.1.4.1. Principe du laser [6]**

Le principe du laser consiste à exciter les électrons d'un milieu, puis à y déclencher l'émission de photons en cascade sous forme de rayons lumineux.

Le dispositif du laser consiste en un réservoir d'électrons (milieu fertile qui peut être solide, liquide ou gazeux) appelé milieu actif, associé à une source excitante qui élève les électrons à des niveaux d'énergie supérieurs. Cette excitation du milieu actif est appelée « pompage ».

Dans un second temps, l'injection de lumière dans le milieu provoque des collisions entre électrons excités et photons. Lors de ces collisions, les électrons excités retournent à leur niveau d'énergie initial en émettant de nouveaux photons. Ce processus d'émission stimulée produit l'amplification de la lumière. Deux miroirs situés aux extrémités du laser réfléchissent les photons émis. Ainsi la lumière se densifie à chaque parcours. L'un des deux miroirs est semi-réfléchissant, ce qui permet à une fraction de la lumière d'être extraite à chaque aller – retour.

La lumière laser doit sa cohérence au fait que les photons du milieu naissent sur le passage d'autres photons qui sont en phase avec eux dans leur déplacement. De plus, les photons obtenus par émission stimulée ont la même énergie et la même direction que les photons incidents, ce qui explique la pureté chromatique et la directivité du faisceau ; les photons qui ne se déplacent pas dans l'axe du miroir vont se perdre dans les parois opaques.

#### **2.1.4.2. Les différents lasers**

On classe les lasers selon cinq familles, en fonction de la nature du milieu excité.

##### ✓ Lasers à solide :

Les lasers à solide utilisent des cristaux comme milieu d'émission des photons (le plus connu est le laser à rubis). Ce sont les lasers les plus puissants. Ils permettent d'obtenir des puissances de l'ordre du kW en continu et du GW en pulsé. Ils sont capables d'émettre aussi bien dans le visible que dans l'UV ou les rayons X. Ils sont utilisés pour des applications tant scientifiques qu'industrielles, en particulier pour la soudure, le marquage et la découpe de matériaux.

##### ✓ Lasers à liquide :

Dans les lasers à liquide, le milieu d'émission est un colorant inorganique renfermé dans une fiole de verre. Le rayonnement émis peut aussi bien être continu que discontinu suivant le mode de pompage. Les fréquences émises peuvent être réglées à l'aide d'un prisme régulateur. Le choix du colorant détermine essentiellement la couleur du rayon qu'il émettra.

✓ Lasers à gaz :

Le milieu générateur de photons est un gaz contenu dans un tube en verre ou en quartz. Le faisceau émis est particulièrement étroit et la fréquence d'émission est très « pure ». Les plus connus sont les lasers à hélium néon (633 nm) ou hélium cadmium (325 nm, 442 nm).

✓ Lasers à semi-conducteurs :

Les lasers à semi-conducteurs utilisent principalement des diodes afin de produire un faisceau lumineux. Le pompage se fait à l'aide d'un courant électrique. Ces lasers sont peu coûteux et très compacts. Leurs domaines d'applications sont nombreux : lecteurs optiques (CD), télécommunications, imprimantes, pointeurs, etc.

✓ Lasers à électrons libres :

Ce type de lasers utilise les électrons d'un plasma afin de produire un rayonnement. Ils sont principalement utilisés pour la recherche car leur fréquence peut être ajustée, allant de l'infrarouge aux rayons X.

✓ Diode laser DPSS :

Une diode laser est une jonction de semi-conducteurs. Ses caractéristiques sont proches de celles des lasers conventionnels. La plus faible longueur de la cavité, quelques centaines de micromètres au lieu de quelques dizaines de centimètres, entraîne une plus grande divergence du faisceau et des raies d'émission plus éloignées les unes des autres, ce qui facilite la création de lasers monomodes (une seule raie d'émission) par filtrage. Les avantages sont sa compacité et ses faibles tensions de service et puissance consommée.

Les différentes sources laser utilisées pour la détection de fluorescence sont répertoriées dans le *tableau 2*. J'ai pu au cours de mon travail de doctorat me familiariser avec la plupart de ces lasers.

Longueurs d'onde (nm)	Type de laser	Puissance du laser (mW)
266	Diode (DPSS)	>2
325	Gaz (HeCd)	15
355	Diode (DPSS)	>2
410	Diode (CW)	>20
442	Gaz (HeCd)	>30
473	Diode (CW)	>30
488	Gaz (Ar ion)	25 à 30
514	Gaz (Ar ion)	15
532	Diode (CW)	25
594	Gaz (HeNe)	2
633	Gaz (HeNe)	>10
635	Diode (CW)	10 à 25
650	Diode (CW)	10 à 25
780	Diode (CW)	25 à 40

*DPSS : laser solide pompé par diode*

*CW : laser continu*

*Tableau 2: Différentes sources de laser utilisées pour la détection de fluorescence de 266nm à 780 nm*

Le choix pour l'utilisation d'un laser dépend de plusieurs critères :

- La longueur d'onde d'émission du laser :

Elle doit correspondre à une des longueurs d'ondes qui constituent le spectre d'absorption du composé à analyser.

- La distribution spatiale de la lumière émise par le laser :

Pour qu'une excitation soit efficace, le faisceau laser doit être concentré sur une petite surface du capillaire dont le diamètre interne est compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$ . La lumière émise par les lasers continus tel que le laser Argon ont une bonne cohérence spatiale avec un diamètre moyen du faisceau inférieur à 1 mm. Ils sont facilement focalisables sur des surfaces réduites.

A l'inverse des lasers continus, les lasers pulsés présentent une faible cohérence spatiale et sont difficilement focalisables sur de petites surfaces.

- La puissance de la lumière émise :

En première approche, on peut penser qu'il est préférable d'utiliser un laser de forte puissance. Néanmoins, certains lasers qui émettent de fortes puissances lumineuses génèrent en même temps des lumières parasites. De ce fait, la puissance du laser doit être optimisée afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

## 2.1.5. Description de différents montages optiques appliqués à la détection de fluorescence induite par laser

Un détecteur LIF est constitué de deux parties principales :

- un agencement optique destiné à focaliser la lumière du laser sur la cellule de détection ;
- un dispositif qui permet de collecter et de mesurer la fluorescence émise.

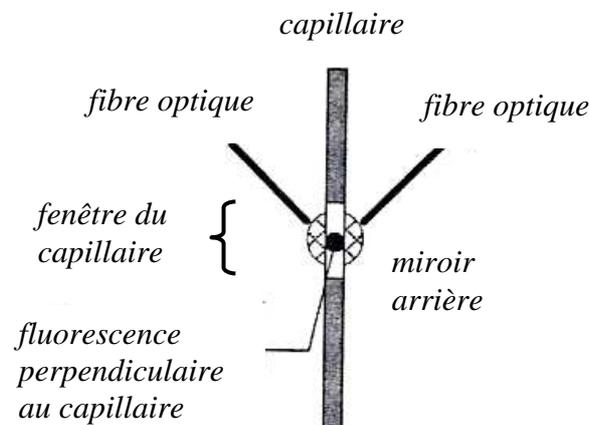
Plusieurs auteurs décrivent des montages optiques qui se différencient par la combinaison des éléments optiques, le positionnement du dispositif de focalisation par rapport à celui de la collection de la fluorescence et par l'utilisation de cellules de détection de différentes natures.

### 2.1.5.1. Les détecteurs commercialisés [9]

Il existe deux détecteurs commercialisés pouvant être couplés à l'électrophorèse capillaire :

#### 2.1.5.1.1. Le détecteur LIF Beckman-Coulter

Il est utilisé sur les instruments d'électrophorèse capillaire Beckman MDQ. Deux longueurs d'onde d'excitation sont disponibles : 488 nm (laser argon) et 635 nm (diode). La *figure 4* représente le montage optique :



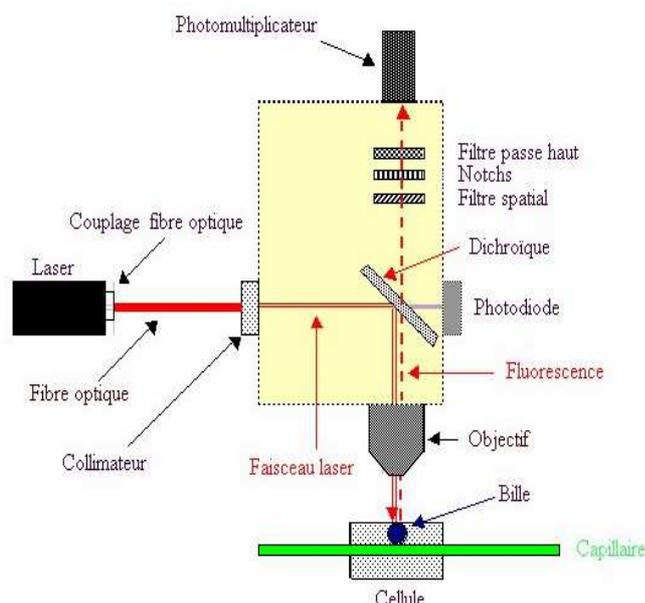
*Figure 4 : montage optique du LIF MDQ Beckman Coulter : la fluorescence est récoltée de manière perpendiculaire au capillaire grâce à un miroir*

Deux fibres optiques d'excitation illuminent le capillaire aux deux longueurs d'onde des lasers. La fluorescence émise est récoltée de manière perpendiculaire au capillaire grâce à un

miroir. La fluorescence passe à travers des filtres puis arrive au niveau du tube photomultiplicateur (PMT) qui transforme l'énergie lumineuse en signal électrique.

### 2.1.5.1.2. Le détecteur Picometrics Zétalif [10]

Il peut être couplé aux instruments d'électrophorèse capillaire et nanoLC de manière externe. Il ne présente qu'une seule longueur d'onde d'excitation. Différentes longueurs d'onde d'excitation sont disponibles : de 266 nm à 780 nm, selon les lasers et filtres optiques disponibles. La *figure 5* représente le montage optique :



*Figure 5 : Montage optique colinéaire du LIF Picometrics Zetalif. Le faisceau laser est focalisé à l'intérieur d'une bille, ce qui permet d'illuminer une petite partie du capillaire.*

Le principe du détecteur est basé sur un montage optique colinéaire [11, 12, 13, 14]. L'énergie lumineuse provenant d'une source laser est collectée par une fibre optique qui l'oriente sur le miroir dichroïque. Ce miroir possède la particularité de ne laisser traverser que certaines longueurs d'onde. Il réfléchit le faisceau laser vers l'objectif du microscope qui le focalise vers la bille placée au niveau de la fenêtre de détection du capillaire (*figure 6*). La fluorescence émise par la solution à l'intérieur du capillaire est récoltée par la bille (*figure 7*) puis vers l'objectif du microscope.

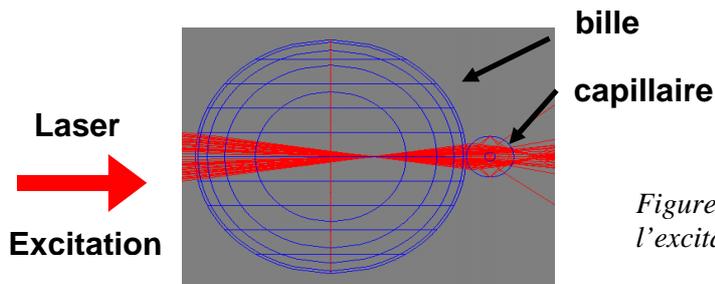


Figure 6 : principe de la bille lors de l'excitation

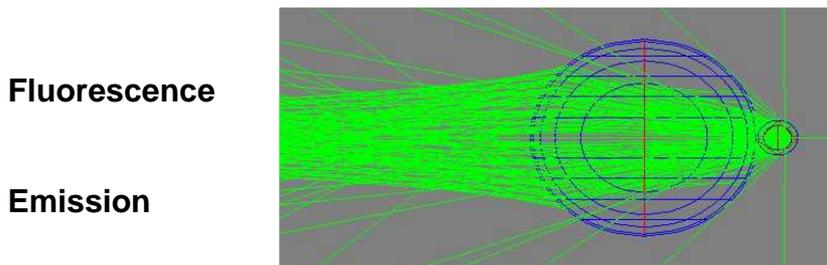


Figure 7 : principe de la bille lors de l'émission

Après avoir traversé le miroir dichroïque, la fluorescence émise passe à travers un jeu de filtres. Il y a deux types de filtres : le spatial et les spectraux

- Le filtre spatial :

La fluorescence contient des faisceaux de lumière non collimatés qui peuvent provenir de la réflexion du faisceau laser sur les parois des éléments optiques qui constituent le système de détection.

Comme la détection de la fluorescence s'effectue dans le plan optique image du capillaire, on peut facilement l'isoler des radiations parasites (qui sont excentrées) à l'aide d'un filtre spatial ou d'un diaphragme.

L'énergie lumineuse restante est ensuite filtrée à travers des filtres spectraux afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

- Les filtres spectraux :

Ce sont des filtres qui absorbent spécifiquement certaines longueurs d'ondes, leurs caractéristiques essentielles sont : leur bande passante et leur densité optique.

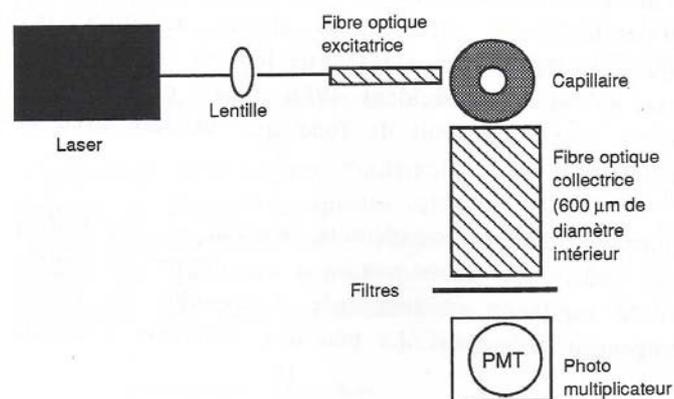
Les filtres notchs sont centrés sur la longueur d'onde du laser, c'est à dire que toute radiation lumineuse dont la longueur d'onde est proche de celle du laser est arrêtée. Son rôle consiste à éliminer les résidus du rayonnement laser qui traversent le dichroïque et le filtre spatial.

Le filtre passe haut, quant à lui, est complémentaire des notchs car, il élimine les radiations lumineuses parasites.

A la sortie des filtres, le photomultiplicateur amplifie le signal et le transmet à l'enregistreur sous forme d'un signal électrique mesurable. Le PMT est constitué d'un tube sous vide, et qui possède une photocathode (cathode photosensible) et une anode réceptrice. La photocathode et l'anode réceptrice sont séparées par plusieurs électrodes appelées dynodes. Lorsque la photocathode reçoit un photon, elle propage des électrons sur la première dynode. Chaque dynode a la propriété d'émettre sur la dynode suivante 2 à 5 fois plus d'électrons qu'elle n'en reçoit. Ceux-ci se déplacent alors en cascade vers l'anode réceptrice sous l'effet d'une tension électrique (400 à 2500 V). Le flux d'électrons obtenu est à l'origine d'un courant électrique mesurable.

### 2.1.5.2. Les détecteurs « home made » (fabriqués en laboratoire) [15]

Zare et al [16] utilisent pour la première fois un laser Argon 488 nm. Il utilise un montage optique orthogonal avec des fibres optiques *Figure 8*.



*Figure 8 : Montage optique de Zare et al [9]*

Mais ce montage est peu efficace à cause des phénomènes d'absorption, de diffusion de la lumière fluorescente à l'intérieur de la fibre optique de collection et de la difficulté à aligner des fibres optiques devant le capillaire.

Afin de réduire la diffusion du faisceau incident au niveau du capillaire, Kurosu [17] utilise une cellule classique d'HPLC à circulation de liquide dans laquelle le capillaire est immergé *figure 9*.

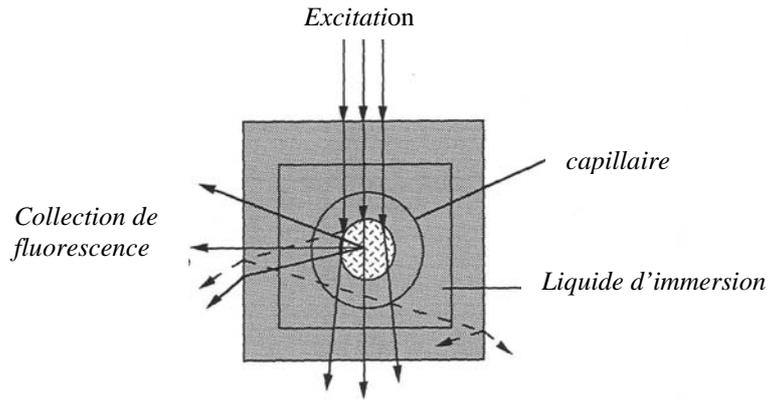


Figure 9 : Montage optique de Kurosu et al : le capillaire est immergé dans une cellule HPLC. [17]

Le liquide d'immersion doit posséder un indice de réfraction proche de celui du capillaire (par exemple le propanol). Le problème de cette cellule de détection immergée est l'augmentation du bruit de fond : les rayons du faisceau laser provoquent la luminescence des parois de la cellule. Ce montage n'a pas connu de développement ultérieur.

Dovich et al [18] décrivent un détecteur LIF basé sur la modification de l'appareil commercial de cytométrie de flux. La figure 10 montre le montage optique :

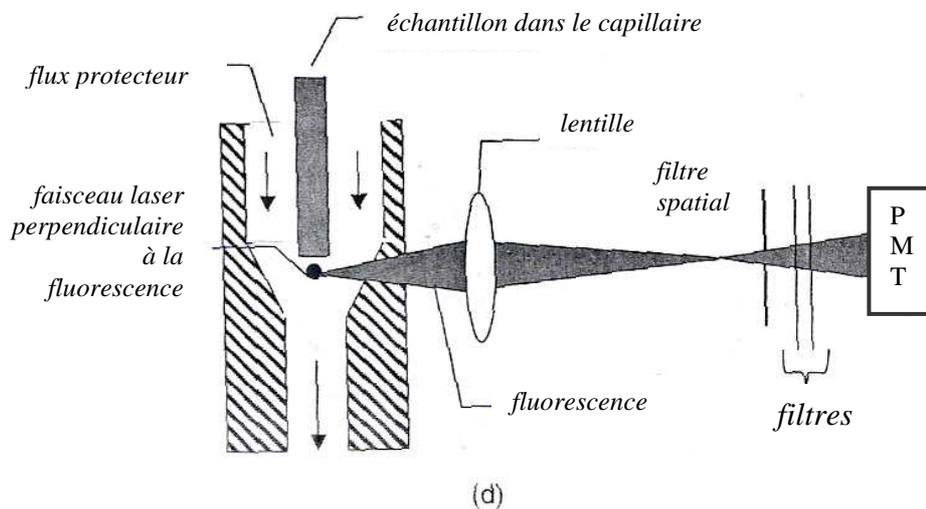
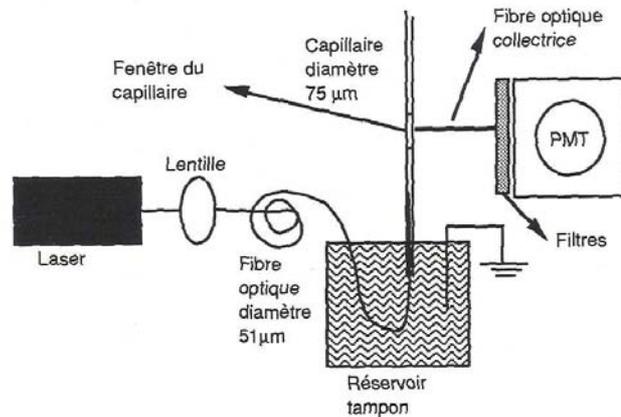


Figure 10 : Montage optique de Dovich et al basé sur la modification de l'appareil commercial de cytométrie de flux [18]

L'extrémité cathodique du capillaire est introduite dans une cellule à circulation en quartz. Le liquide circulant dans cette chambre est identique à l'électrolyte de séparation. Pour refermer le circuit électrolytique, une électrode en acier inoxydable en contact avec le capillaire est

soudée à la cellule de circulation. Ce détecteur n'a jamais été industrialisé pour la CE ni la nanoLC.

Taylor et Yeung [19] décrivent un montage optique orthogonal où l'excitation se fait dans l'axe de migration à l'aide d'une fibre optique *figure 11*.



*Figure 11: Montage optique orthogonal de Taylor et Yeung [19]*

5 à 10 mm de la fibre d'excitation est introduite dans le capillaire du côté cathodique. La fluorescence émise est récoltée par une fibre collectrice de manière orthogonale. Ce montage présente des inconvénients :

- la fibre d'excitation étant insérée dans le capillaire, le flux électro-osmotique est perturbé;
- la fibre d'excitation peut être contaminée par les composés fluorescents ;
- l'exposition des analytes à la lumière excitatrice étant longue, le phénomène de photodégradation peut se produire de façon plus efficace;
- mise en œuvre du système difficile.

Enfin, Hernandez et al [20] ont utilisé un microscope confocal *figure 12*.

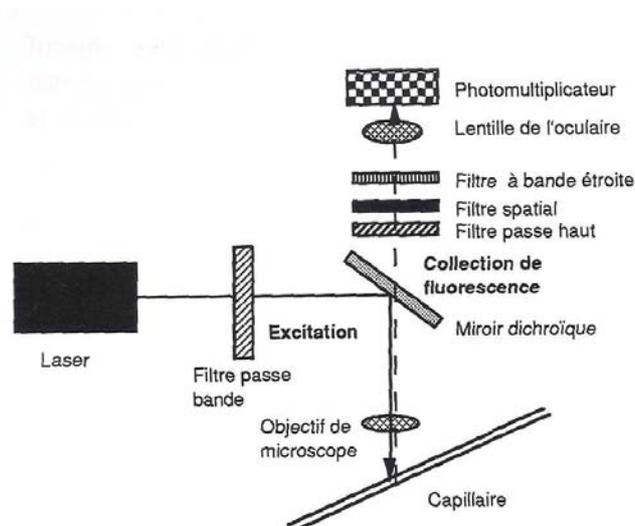


Figure 12 : Montage optique de Hernandez : ce montage est basé sur le principe d'un microscope confocal [20]

Dans ce montage, le faisceau laser est réfléchi sur un miroir dichroïque dont l'angle d'incidence est de  $45^\circ$ . Le faisceau est focalisé sur le capillaire à l'aide de l'objectif d'un microscope à courte ouverture numérique. La fluorescence émise est collectée par le même objectif, passe le miroir dichroïque, passe à travers une série de filtres puis le PMT.

Le faisceau laser est focalisé sur une petite portion du capillaire. Cependant, ce montage optique entraîne une mauvaise reproductibilité à cause de l'ajustement de l'objectif du microscope par rapport à la fenêtre de détection du capillaire.

Nous venons de décrire les différents montages optiques appliqués à la détection de fluorescence induite par laser. De tous ces montages, seuls le détecteur Picométrics et le détecteur Beckman Coulter ont été commercialisés.

## 2.2. Structure et analyse de la pureté des anticorps recombinants

### 2.2.1. Introduction

L'immunothérapie comprend un grand nombre de molécules utilisées comme produits pharmaceutiques. Les anticorps monoclonaux recombinants forment la nouvelle classe de médicaments qui se développent le plus actuellement. Ces molécules sont employées pour tuer des cellules ou organismes (cellules cancéreuses, bactéries) ou pour neutraliser des molécules solubles (les cytokines dans les maladies chroniques ou les toxines dans les

infections). Etant spécifiques, les anticorps agissent avec un effet maximum tout en ayant des effets secondaires réduits. Il existe au moins trente anticorps monoclonaux sur le marché pharmaceutique et de nombreux sont en phase avancée d'essais cliniques. [21-23]

Par la suite, nous allons étudier les fonctions et la structure des immunoglobulines puis présenter les différentes techniques analytiques permettant d'assurer le contrôle qualité de ces molécules.

## **2.2.2. Fonctions et structure des anticorps**

Un anticorps ou immunoglobuline est une protéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes appelés antigènes tels les bactéries et les virus. Les immunoglobulines sont produites dans le plasma mais aussi dans les liquides biologiques de l'organisme.

En 1975, George Köhler et César Milstein travaillant au Laboratoire de Biologie Moléculaire de Cambridge, ont décrit une technique permettant de produire une quantité infinie d'anticorps de spécificité déterminée. Cette technique a révolutionné l'immunologie et a fourni des outils précieux à la biologie et à la médecine. Les anticorps monoclonaux ont une structure identique à celle des anticorps naturels. Leur originalité réside dans le fait qu'ils sont homogènes, c'est-à-dire que toutes les molécules d'une préparation sont identiques. En conséquence, leur réaction avec l'antigène sera toujours la même. C'est cette constance dans la nature et dans leurs effets qui les rend aussi utiles. [24]

### **2.2.2.1. Structure générale des immunoglobulines**

Les anticorps sont des glycoprotéines formées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères assurant une flexibilité de la molécule. Ces chaînes forment une structure en Y. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même que les deux chaînes légères.

#### **2.2.2.1.1. Chaînes lourdes**

Elles varient selon les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines : chaîne lourde  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$  pour les IgG, IgA, IgM, IgD, ou IgE respectivement. Chaque chaîne lourde comporte une séquence d'environ 450 acides aminés (poids moléculaire : 50 kDa). Elles sont reliées entre elles par une ou plusieurs liaisons covalentes (ponts disulfures). Une

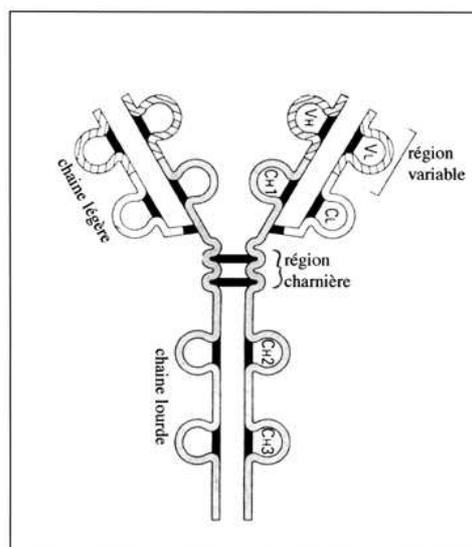
zone flexible de la chaîne lourde située à mi-distance environ des extrémités de la chaîne lourde est appelée zone charnière. Cette zone charnière confère à la chaîne lourde une grande flexibilité, facilitant ainsi son interaction avec l'antigène.

#### 2.2.2.1.2. Chaînes légères

Dans une molécule d'immunoglobuline donnée, les chaînes légères sont identiques, soit de type  $\kappa$ , soit de type  $\lambda$ . Ceci est dû au fait qu'un lymphocyte B donné produit soit des chaînes  $\kappa$ , soit des chaînes  $\lambda$ , mais pas les deux à la fois. Les chaînes légères sont composées d'environ 220 acides aminés (poids moléculaire : 25 kDa). Chaque chaîne légère est reliée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Environ les 2/3 des immunoglobulines ont deux chaînes légères  $\kappa$  et 1/3 deux chaînes légères  $\lambda$ .

#### 2.2.2.1.3. Domaines

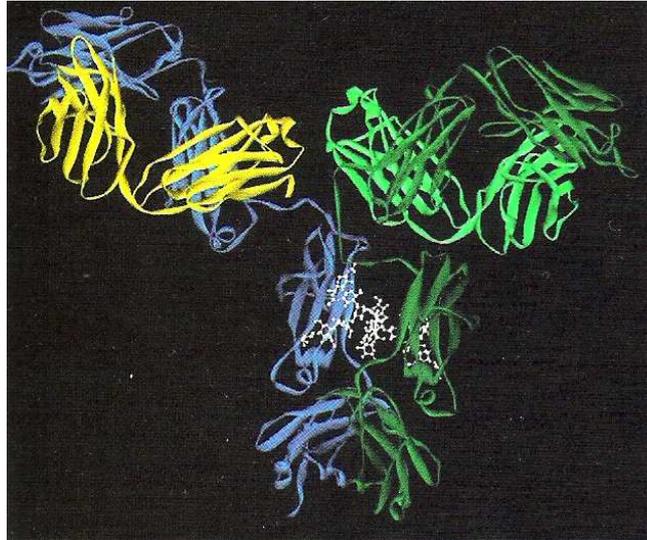
Outre les ponts disulfures qui unissent les chaînes lourdes entre elles et les chaînes légères aux chaînes lourdes, il existe des ponts disulfures sur chaque chaîne lourde et sur chaque chaîne légère. Ces ponts créent des régions d'environ 110 acides aminés appelées domaines. Chaque chaîne lourde présente 4 domaines (sauf les IgM qui en ont 5) et chaque chaîne légère, 2 domaines. *figure 13*



*Figure 13 : organisation des chaînes de l'IgG en domaines : la chaîne lourde présente 4 domaines et la chaîne légère 2 domaines*

#### 2.2.2.1.4. Structure tertiaire des immunoglobulines

La diffraction aux rayons X [25] a fourni des données sur la conformation de molécules entières d'IgG, ce qui a permis d'établir la structure du squelette  $\alpha$ -carboné et de construire par ordinateur des modèles atomiques de cette classe d'immunoglobuline *figure 14 et 15*



*Figure 14 : modèle en ruban d'une molécule d'IgG montrant la structure polypeptidique des quatre chaînes : les deux chaînes lourdes sont en vert foncé et bleu foncé ; les deux chaînes légères sont en jaune et vert clair ; la chaîne saccharidique est représentée en blanc [25]*

En raison de la mobilité de la région charnière, la molécule peut prendre la forme d'un Y ou d'un T, ce que l'observation au microscope électronique a confirmé. Les chaînes lourdes sont colorées en bleu et vert foncé. Les sites de liaison à l'antigène se trouvent à l'extrémité des bras de l'Y formé par la molécule et sont constitués par des domaines des chaînes lourdes et légères. La région charnière étendue et dépliée se trouve au centre de la molécule. Les unités glucidiques liées par une liaison  $\beta$ -N-osidique aux chaînes lourdes sont montrées sous forme de boules et de tiges. Bien que les oligosaccharides ne comptent que pour 2-3% du poids moléculaire d'IgG, ils sont indispensables à l'expression des fonctions effectrices.

Des enzymes peuvent agir sur l'immunoglobuline et générer des fragments :

- La papaïne hydrolyse le site de la région charnière et génère 2 fragments Fab (encore capables de se lier à l'antigène) et un fragment Fc (constitué par les domaines CH2 et CH3). *Figure 15c*
- La pepsine découpe le région Fc en petits fragments après la région charnière et génère le fragment  $F(ab')^2$  capable de se lier à l'antigène. *Figure 15c*

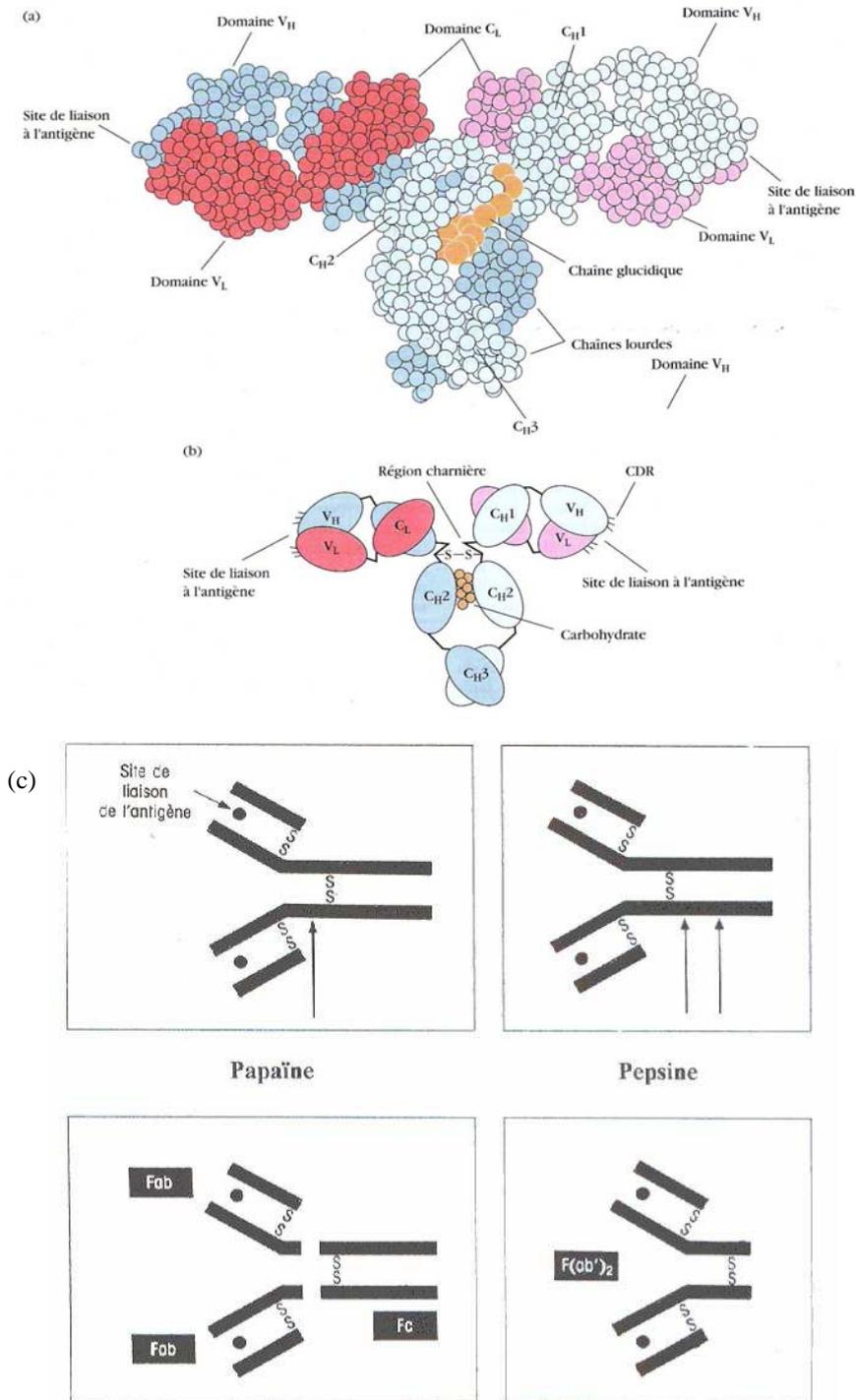
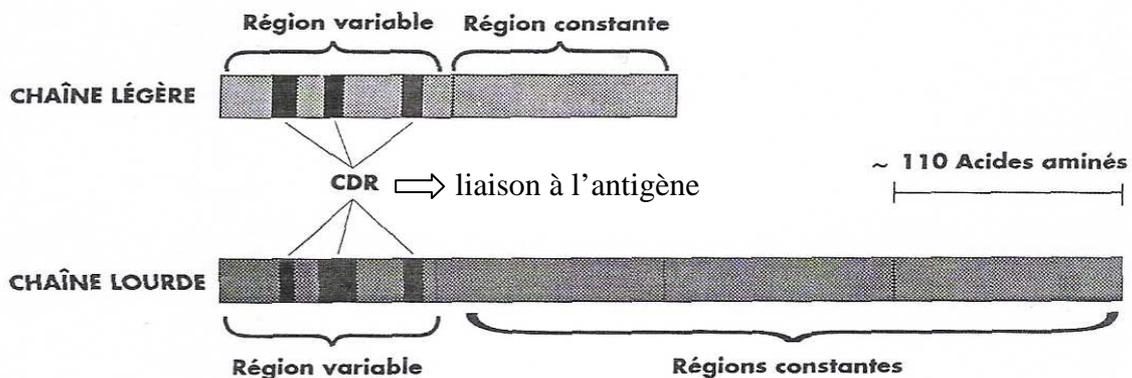


Figure 15 : a/ Modèle de la molécule d'IgG, basé sur une analyse cristallographique par rayon X, montrant les associations des domaines. Chaque boule pleine représente un résidu amino acide ; les boules brunes plus grosses sont des carbohydrates (glucides) Les deux chaînes légères sont représentées en rouge clair, les deux chaînes lourdes en bleu. b/ Représentation schématique montrant les interactions entre les domaines des chaînes lourdes et des chaînes légères. c/ action de la papaïne et de la pepsine sur une immunoglobuline [25].

Les chaînes d'anticorps sont variables dans leur domaine amino-terminal (ou N-terminal), en revanche presque identiques dans la région carboxy-terminal (ou C-terminal).

Donc chaque chaîne d'anticorps présente une région variable (V) et une région constante (C). Les régions variables de la chaîne légère et de la chaîne lourde s'associent pour former le site de fixation de l'antigène. C'est l'hétérogénéité des régions variables qui fournit les bases structurales de l'ensemble des sites utilisés par l'animal pour développer une réponse immunitaire efficace. L'hétérogénéité de séquence n'est pas disséminée au hasard dans les régions variables mais concentrée dans les régions entrant en contact direct avec l'antigène. Donc la variabilité la plus forte est trouvée dans trois régions de la chaîne légère et de la chaîne lourde dites régions hypervariables. Ces régions forment le site réel de fixation de l'antigène et sont appelées « régions déterminant la complémentarité » ou CDR. *figure 16* [26]



*Figure 16 : Présentation des régions hypervariables des anticorps*

#### **2.2.2.1.5. Classes et sous-classes des immunoglobulines**

La nature des chaînes lourdes détermine la classe et la sous-classe des immunoglobulines.

Chez l'homme, on distingue, comme vu précédemment, 5 classes d'immunoglobulines ayant chacune un type de chaîne lourde différent : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Au sein d'une même classe d'immunoglobulines, il peut exister des sous-classes correspondant à des variations structurales de la chaîne lourde à l'intérieur de la classe. Ainsi, il existe 4 sous-classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) caractérisées, respectivement, par les chaînes lourdes  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  et  $\gamma 4$  et 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) avec des chaînes lourdes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . [27] (*tableau 3*)

	<b>IgG</b>	<b>IgA</b>	<b>IgM</b>	<b>IgE</b>	<b>IgD</b>
Chaînes lourdes	$\gamma_i$	$\alpha_i$	$\mu$	$\epsilon$	$\delta$
Sous-classes	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgA1, IgA2			
Poids moléculaires (KDa)	150	160 400	950	190	185
Localisation	sang	Muqueuses sécrétions	Lymphocyte B, sang	Basophiles mastocytes	Lymphocyte B
Rôles	Neutralisation des toxines, bactéries et virus	Agglutination neutralisation des bactéries, virus	Agglutination, voie classique du complément	Allergies, neutralisation de parasites	Activation du lymphocyte B

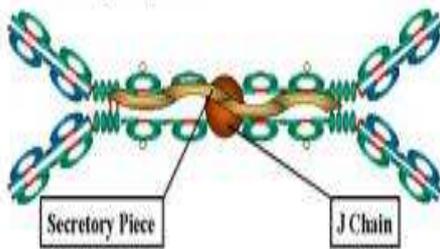
Tableau 3 : Propriétés (poids moléculaires, localisation et rôles) des différentes immunoglobulines : IgG, IgA, IgM, IgE, IgD

Chaque classe d'immunoglobuline va être étudiée plus précisément : [28]

<b>IgG</b>	
<p><b>* Structure</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• la région Fc contient des sucres (3 % du poids moléculaire de la molécule).</li> <li>• les IgG<sub>1</sub> sont les plus nombreux (70 %). Les IgG<sub>1</sub> et les IgG<sub>3</sub> se fixent au complément et sont transférés au travers du placenta.</li> <li>• les IgG<sub>2</sub> (nombre plus faible) présentent une spécificité élevée vis-à-vis des antigènes. Les IgG<sub>2</sub> sont l'agent essentiel de la neutralisation des toxines bactériennes, élément prédominant pendant la réaction secondaire.</li> <li>• les IgG<sub>4</sub> n'activent pas le complément et ne se lient pas aux macrophages.</li> </ul>

## IgA

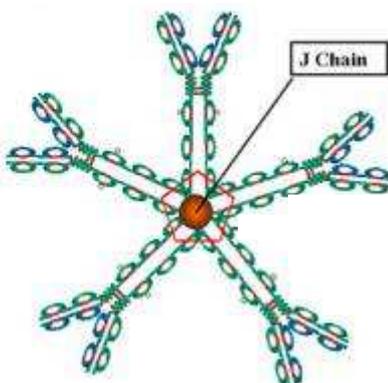
### \* Structure



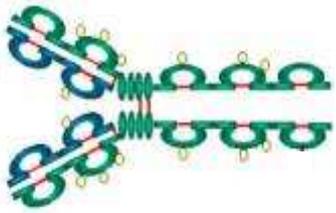
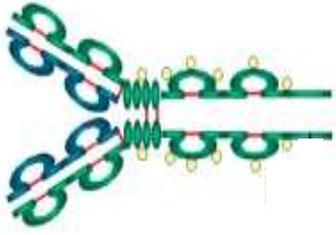
- deux formes :
  - IgA sérique : représentés par deux molécules opposées reliées par une chaîne J de jonction. La chaîne J est un polypeptide présent dans les IgA et IgM qui facilite la polymérisation. Elle est synthétisée par les cellules B mais n'est pas codée par les gènes de l'immunoglobuline.
  - IgGA sécrétoire : possède une pièce sécrétoire en plus de la chaîne J. La pièce sécrétoire d'un poids moléculaire de 64 kDa protège des protéolyses (augmente la durée de vie des IgA).
- les IgA ne fixent pas le complément.
- pas d'action bactéricide.
- ils empêchent l'adhérence des bactéries aux muqueuses et donc limitent l'invasion bactérienne dans le colostrum (montée de lait après l'accouchement). Ils tapissent le tube digestif des nouveaux nés.
- localisation : mucus intestinal, mucus bronchique, larmes, salive.

## IgM

### \* Structure



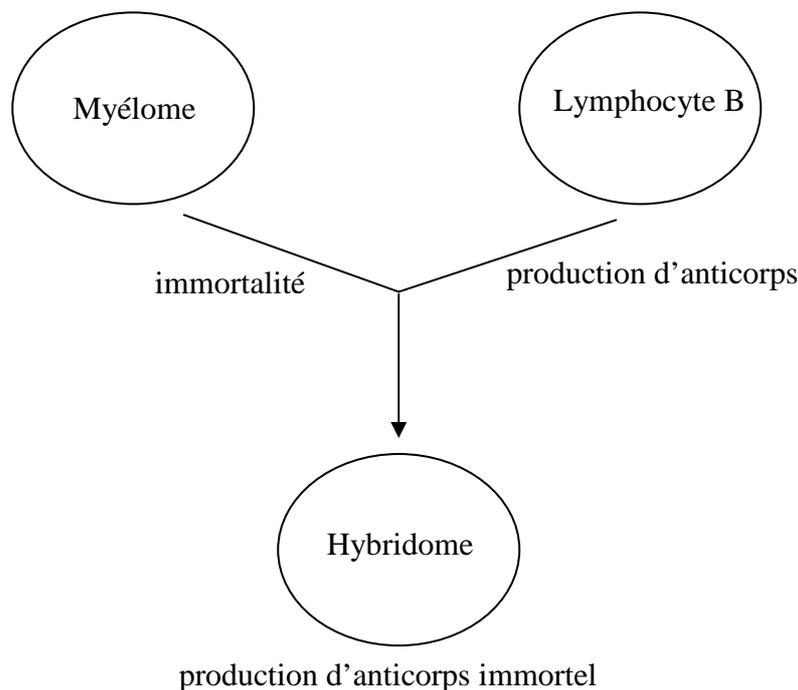
- structure pentamérique : 5 unités d'Ig réunies par des liaisons S-S et par une chaîne J de jonction.
- la partie Fc présente une glycosylation importante : 12 % du poids moléculaire de la molécule.
- structure présente chez tous les vertébrés à l'exception des vertébrés les plus primitifs qui n'ont que des IgM uniques et non avec des structures pentamériques.
- importante capacité d'agglutination entre les branches des IgG.
- ils fixent fortement le complément.
- activité lytique et bactéricide.
- c'est la classe qui se différencie en premier lors d'une infection : cela permet de dater une infection.

<p style="text-align: center;"><b>IgE</b></p> <p><b>* Structure</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• rôle important dans les infections parasitaires : leur dosage permet de déterminer l'infection parasitaire par des helminthes dont le ténia.</li> <li>• ils activent différentes cellules cytotoxiques dont les éosinophiles dits IgE dépendants.</li> <li>• ils interviennent dans la réaction allergique, ils se fixent sur la paroi des mastocytes.</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>IgD</b></p> <p><b>* Structure</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• peu abondants.</li> <li>• localisés sur la membrane des lymphocytes.</li> <li>• permet d'identifier dans le sérum si un patient est atteint de myélome.</li> <li>• ils jouent un rôle dans la différenciation des lymphocytes B.</li> <li>• pas d'activité bactéricide.</li> </ul>

#### 2.2.2.1.6. Production des anticorps monoclonaux

Au début des années 1970, il était possible de faire pousser in vitro plusieurs types cellulaires au laboratoire, parmi lesquels des lymphocytes B tumoraux appelés myélomes ou plasmocytomes. Ces cellules ont la capacité de se reproduire indéfiniment, à la différence des lymphocytes B normaux. En conséquence, de telles cellules sont clonogéniques (c'est-à-dire qu'une cellule peut se multiplier pour former des clones, soit in vitro, soit in vivo, après injection dans un animal approprié). En 1975, Köhler et Milstein fusionnent la propriété de

croissance in vitro et la clonogénicité de la lignée cellulaire myélomateuse avec la propriété de synthèse d'anticorps des lymphocytes B. *figure 17*. Lorsque le processus de fusion est terminé, les cellules filles sont appelées hybridomes (cellules hybrides qui ont hérité de certaines des caractéristiques des deux parents et qui poussent aussi rapidement que des cellules malignes). Donc cette technique d'hybridation produit des cellules productrices d'immunoglobulines immortalisées. Cependant, elles ne permettent pas de choisir quel lymphocyte va être immortalisé. Pour surmonter cela, des globules rouges de mouton ont été injectés à une souris. Après plusieurs injections, le système immunitaire de la souris a développé des clones de lymphocytes B capables de produire des anticorps qui reconnaissent cet antigène. Les lymphocytes de la rate de la souris ont été fusionnés avec la lignée myélomateuses. Même avec une telle technique où l'animal est sensibilisé pour produire des anticorps spécifiques, de nombreux lymphocytes produisant des anticorps non intéressants sont fusionnés également. Une fusion d'une cellule de myélome et d'un lymphocyte B est réussie lorsqu'une colonie où un clone unique de cellules d'hybridomes produisant un anticorps unique est établi. Cet anticorps est appelé « anticorps monoclonal ».



*Figure 17: De la fusion d'une cellule de myélome et d'une cellule productrice d'anticorps résulte un hybridome immortel producteur d'anticorps [24]*

L'anticorps anti-CD3 (Orthoclone OKT3®, muromonab-CD3) est un représentant de cette première génération d'anticorps monoclonaux murins. Il est utilisé dans le traitement aigu après une greffe d'organe et a été le premier anticorps monoclonal admis pour l'usage thérapeutique chez l'homme. Le muromonab-CD3 doit être utilisé en association avec d'autres médicaments immunosuppresseurs pour prévenir la réponse immunitaire contre l'anticorps murin. Les anticorps humains anti-murins peuvent toutefois apparaître et affaiblir l'effet thérapeutique.

La constatation selon laquelle la réaction immunitaire du patient contre les anticorps de souris compromet l'efficacité thérapeutique a conduit au développement de stratégies visant à diminuer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux [29, 30].

Tout d'abord, des anticorps monoclonaux chimères ont été développés. Ils sont constitués d'une partie murine variable et d'une partie humaine constante *Figure 18*. La réponse anti-anticorps a ainsi considérablement diminuée. Par exemple, le rituximab (Mabthera ®) et le cétuximab (Erbix ®) n'induisent que rarement la formation d'anti-anticorps. En revanche, la formation d'anti-anticorps atteint 61% avec l'infliximab (Remicade®), corrélée à une diminution de son efficacité thérapeutique. La formation d'anticorps humains anti-murins reste un problème même si les anticorps monoclonaux chimères se sont solidement implantés dans la pratique clinique.

La poursuite des efforts de recherche a conduit au développement d'anticorps humanisés. Dans ces anticorps, toutes les séquences d'acides aminés provenant de la souris sont remplacées par des séquences humaines, à l'exception des régions CDR responsables de la liaison avec l'antigène. Des anti-anticorps anti-humains sont toutefois produits mais leur incidence est relativement faible par rapport à celle constatée avec les anticorps chimères. Par exemple, l'alemtuzumab (Mab-Campath ®) induit des anti-anticorps anti-humains avec une incidence de l'ordre de 1,9%.

Par la suite, des anticorps entièrement humains ont été développés afin de diminuer l'immunogénicité des anticorps monoclonaux thérapeutiques. Deux principales méthodes peuvent être utilisées : [31]

- des souris porteuses d'un défaut immunitaire peuvent être reconstruites à l'aide de tissu fœtal humain ; l'immunisation de ces souris génère des anticorps humains.
- les anticorps humains peuvent être produits par l'intermédiaire de souris transgéniques produisant des anticorps entièrement humains.

Ces anticorps entièrement humains conservent toutefois une séquence d'acides aminés étrangère pour l'organisme (idiotypé). L'organisme peut donc répondre à la présence de cette région par la formation d'anticorps humains anti-humains.

Le développement successif d'anticorps chimères, humanisés puis entièrement humanisés a permis de diminuer l'immunogénicité des anticorps initialement murins.

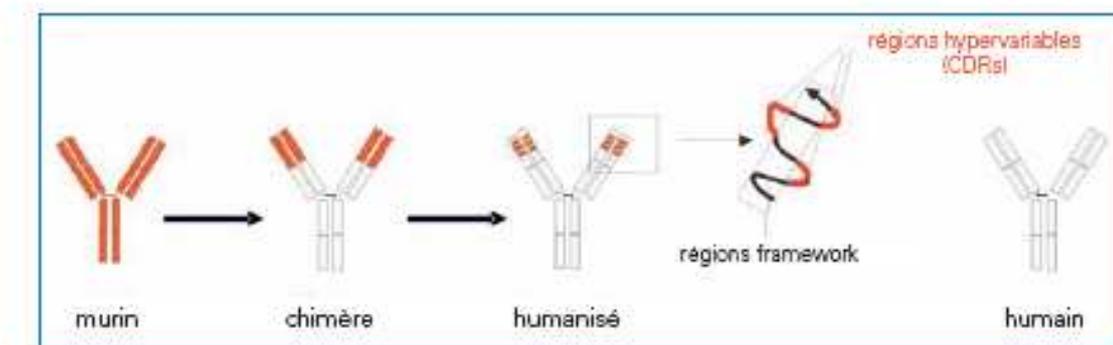


Figure 18 : Passage de l'anticorps murin à l'anticorps chimère puis humanisé puis entièrement humanisé. Les séquences de souris sont représentées en rouge ; les séquences humaines en blanc.

#### 2.2.2.1.7. Instabilités des anticorps

En moyenne, les anticorps sont plus stables que les autres protéines. Cependant, ils subissent des phénomènes de dégradations physiques et chimiques. Ces instabilités peuvent être observées dans les états liquides, congelés ou lyophilisés.

##### - Instabilités physiques

L'instabilité physique la plus courante est l'agrégation d'anticorps. Les agrégats sont la conséquence des interactions protéine-protéine. La présence d'agrégats peut entraîner des conséquences sérieuses comme une insuffisance rénale, des réactions anaphylactiques, maux de tête, fièvre. Par conséquent, le taux d'agrégats contenu dans une immunoglobuline commercialisée est limité à moins de 5 %. Le taux d'agrégat dépend de la concentration de la protéine, de la viscosité, du pH et de la température. Le taux d'agrégats augmente avec la concentration de la protéine.

Autres instabilités physiques : sous l'effet d'un changement de température, les anticorps peuvent être dénaturés. De plus les anticorps s'adsorbent sur de nombreuses surfaces. Cette adsorption peut réduire la concentration de l'anticorps en solution [27].

### - Instabilités chimiques

Elles peuvent être de natures diverses : perte de fonction amide des chaînes latérales des acides aminés, oxydation, fragmentation.

1) La perte de fonction amide des anticorps est courante. Par exemple, l'anticorps monoclonal recombinant HER2 présente différentes formes : Asn30 transformé en aspartate sur une chaîne légère ou sur les deux chaînes légères et Asn55 transformé en iso-aspartate sur les chaînes lourdes.

2) La méthionine, la tyrosine, l'histidine et la cystéine sont des résidus oxydables contenus dans les protéines. Ainsi l'oxydation des protéines peut se produire sur ces acides aminés durant leur stockage.

3) La fragmentation se produit essentiellement lors du processus de fabrication. Les séquences Asp-Gly, Asp-Pro et Asn-Ser sont les séquences les plus couramment scindées. Les traitements acides, basiques, la température, le stockage peuvent accélérer la fragmentation. La fragmentation peut induire la perte d'une chaîne légère, d'un fragment Fab, la séparation entre la chaîne lourde et la chaîne légère, le clivage des ponts disulfures. [27]

#### **2.2.2.2. Fonctions des anticorps**

Les immunoglobulines ou anticorps sont des protéines complexes utilisées par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries ou les virus. Sécrétées par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes, elles reconnaissent les antigènes de manière spécifique. Leurs fonctions effectrices résultent des interactions entre les régions constantes des chaînes lourdes et les protéines du sérum ou les récepteurs membranaires. Donc toutes les classes d'immunoglobulines n'ont pas les mêmes fonctions [32].

Selon les différentes immunoglobulines, on répertorie différents modes d'action *figure 19*:

- la reconnaissance de l'antigène : de nombreux virus et bactéries exercent leur pathogénicité après fixation sur les cellules de l'organisme. Les bactéries utilisent des adhésines (molécules d'adhésion aux membranes cellulaires). Les virus possèdent des protéines de fixation sur leur enveloppe externe. Les anticorps anti-adhésines et anti-protéines de la capsid virale bloquent l'action de ces agents pathogènes en se liant sur les molécules de fixation.

- les anticorps protègent d'autre part l'organisme en déclenchant la cascade du complément. Il s'agit d'un ensemble de protéines du plasma dont l'activation permet de détruire des bactéries par perforation et de faciliter la phagocytose.
- un anticorps peut se lier à des cellules du système immunitaire par sa partie constante et engager le déroulement de la réponse immunitaire. [26, 33]
- l'opsonisation est un facteur important des défenses antibactériennes. Des protéines, appelées récepteurs du Fc (FcR), capables de se lier à la région constante des molécules de la plupart des sous-classes d'IgG sont présentes à la surface des macrophages et des neutrophiles. Bien que l'interaction entre un FcR et la région Fc d'une molécule d'IgG donnée soit très faible, la liaison simultanée des Fc de différentes molécules d'anticorps complexées à une même cible, telle qu'une cellule bactérienne, produit une interaction de force significative. Le résultat immédiat est la liaison du pathogène à la membrane du phagocyte. Cette liaison du FcR par fixation à un réseau de régions Fc d'anticorps initie une voie de transduction d'un signal qui conduit à la phagocytose du complexe antigène-anticorps. A l'intérieur du phagocyte, le pathogène devient la cible de divers processus, tels qu'une digestion enzymatique, un dommage oxydatif ou des effets d'altération de la membrane provoqués par des peptides antibactériens. Tous ces processus se combinent pour assurer une mort probable des pathogènes phagocytés à la suite de leur reconnaissance.
- de nombreux anticorps peuvent traverser les tissus épithéliaux. Cette capacité de transfert dépend de la région constante des Ig. Même si les systèmes circulatoires maternel et fœtal sont séparés, les anticorps peuvent traverser le placenta. Ce transfert est très important, il permet au fœtus de se défendre contre des pathogènes. Ce transfert correspond à l'immunité passive.

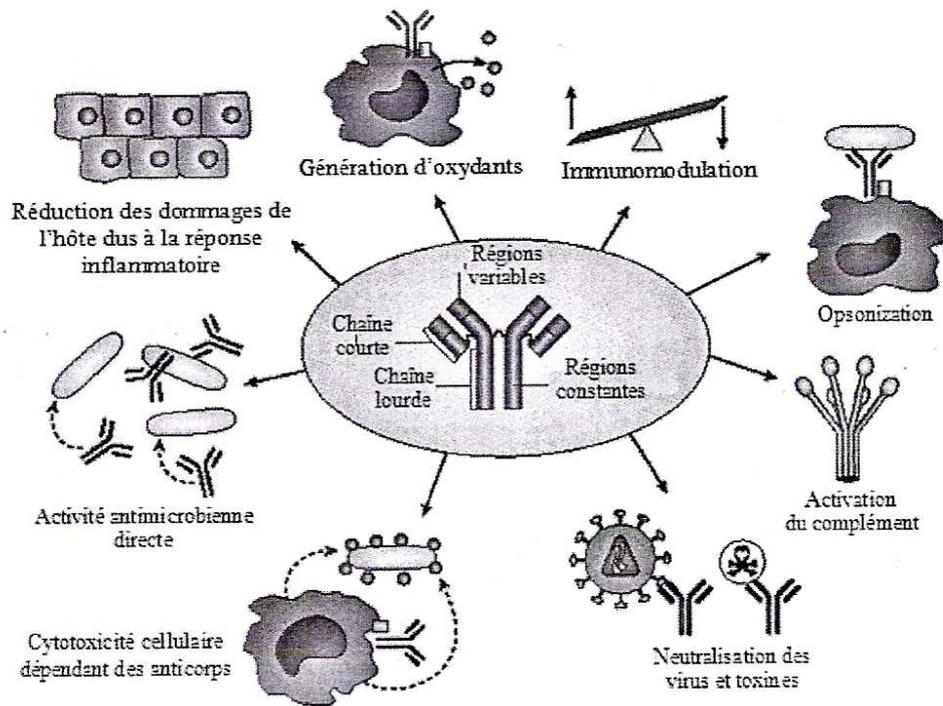


Figure 19 : Les différentes fonctionnalités des anticorps dans l'organisme [33]

### 2.2.2.3. Le marché des anticorps monoclonaux (AcM)

Le succès commercial des anticorps monoclonaux durant les deux dernières années a entraîné le début de l'aire de « la ruée vers l'or » [34]. En effet, des traitements qui étaient considérés comme impossibles il y a quelques années, sont devenus possibles aujourd'hui grâce aux anticorps monoclonaux recombinants.

Les ventes globales d'anticorps monoclonaux (AcM) en 2006 se sont élevées à 20,6 milliards de dollars (tableau 4). Les anticorps monoclonaux correspondent à la classe biologique ayant les meilleures ventes en 2006 suivis par les vaccins, l'érythropoïétine, l'insuline et l'interféron.

Le tableau montre les différents succès commerciaux des anticorps.

Nom générique	Marque FDA	Sociétés	Indication	Ventes milliards \$		
				2004	2005	2006
	Approval					
Rituximab c CD20	Rituxan 1997	Roche	leucémie, lymphome, RA	2,8	3,2	4,7
infiximab c TNFa	Remicade 1998	J&J	CD, UC, AS, RA, Ps, PsA	2,1	3,5	4,2
Trastuzumab hz HER2	Herceptin 1998	Roche	cancer du sein	1,3	1,65	3,14
Bevacizumab VEGF hz	Avastin 2004	Roche	cancer du colon, cancer du poumon	0,55	1,3	2,4
Adalimumab h TNFa	Humira 2002	Abbott	RA, PsA, AS, CD	0,85	1,4	2,04
Cetuximab c EGFR	Erbitux 2004	Bristol Myers Squibb Merck KgA	cancer colon HNC	0,26	0,94	1,1
Palivizumab hz RSV	Synagis 1998	MedImmune Astra Zeneca	RSV	0,95	1,1	1,1
Omalizumab hz VEGF	Xolair 2003	Roche, Novartis	allergie asthme	0,19	0,36	0,52
Ranibizumab hz VEGF	Lucentis 2006	Novartis, Roche	dégénération			0,38
Abeiximab c CD3	ReoPro 1994	J&J, Lilly	inhibiteur thrombose	0,36	0,3	0,28
Natalizumab hz a4 integrin	Tysabri 2004/2006	Biogen Idec, Elan	sclérose en plaques			0,06
Panitumumab h EGFR	Vectibix 2006	Amgen	cancer colon			0,04

Tableau 4 : Les meilleures ventes d'anticorps monoclonaux 2004-2006 [34]

Le rituxan, avec 4,7 milliards de dollars de ventes, est le plus grand succès commercial des produits biologiques en 2006. Dans ce marché florissant, ce sont les AcM utilisés en oncologie (cetuximab, bevacizumab, trastuzumab) qui représentent la plus grosse part des ventes. Cette tendance des produits oncologiques à dominer le marché va continuer même si les produits destinés au traitement de l'arthrite, des maladies inflammatoires et auto-immunes devraient connaître une forte croissance et prendre à terme, 40 % du marché d'ici 2010. [33]

### 2.2.3. Analyses des anticorps

Garnick et al [35] ont examiné le rôle du contrôle de la qualité en biotechnologie. Les biotechnologies utilisent des organismes vivants pour la fabrication de médicaments. De ce fait, ces organismes peuvent synthétiser des molécules qui peuvent provoquer des effets secondaires importants. Le contrôle de la qualité en biotechnologie diffère du contrôle qualité traditionnel par trois points :

- 1/ le développement et la caractérisation des organismes de production des biomolécules ;
- 2/ le contrôle du processus de fermentation et de culture cellulaire ;
- 3/ le contrôle du processus de purification et du produit final.

Donc le contrôle qualité en biotechnologie ne s'arrête pas à l'identification du produit final. La pureté, la stabilité, la caractérisation du composé obtenu et les opérations de purification doivent être étudiées avec précision. *Tableau 5*

<b>Caractéristiques</b>	<b>Propriétés de l'analyse</b>	<b>Méthodes d'analyse</b>
<b><i>Caractéristiques physiques et chimiques</i></b>	Pureté	Electrophorèse ou CE
		HPLC phase inverse
		HPLC exclusion de taille
	Intégrité/poids moléculaire	Electrophorèse ou CE
		Spectrométrie de masse
		HPLC exclusion de taille
		Diffusion de lumière
	Identification	cIEF
		Cartographie peptides
HPLC échangeuse d'ions		
<b><i>Activités</i></b>	Liaison antigène	Immunoassay
	Méthodes biologiques	Prolifération des cellules
		Cytotoxicité
<b><i>Produits liés aux impuretés</i></b>	Aggrégations / fragments	Electrophorèse ou CE
		HPLC exclusion de taille
<b><i>Produits liés aux impuretés et aux contaminations</i></b>	Cellule hôte protéine	Immunoassay
	Cellule hôte DNA	Hybridation DNA
		Fluorescence
	Protéine A	Immunoassay
	Cellule de culture	Immunoassay
	Virus	Microscopie électronique
Analyses in vivo / in vitro		

*Tableau 5 : Exemple de contrôle de la qualité de la production des anticorps monoclonaux recombinants [36]*

Différentes techniques analytiques existent pour le contrôle de la qualité des anticorps monoclonaux recombinants. Ces techniques vont être présentées dans les paragraphes suivants [37-38-39]. Elles doivent toujours progresser et être automatisées afin de répondre aux attentes du contrôle qualité des produits pharmaceutiques.

### **2.2.3.1. Analyses des anticorps par électrophorèse**

L'intégrité et l'identité des anticorps monoclonaux doivent être testés à tous les stades du processus de fabrication (culture cellulaires, purification, caractérisation des produits, remise des lots). A chaque étape, la production correcte de l'anticorps doit être confirmée. Les

anticorps sont des mélanges hétérogènes d'isoformes de charges et de tailles. Les méthodes électrophorétiques sont utilisées pour tester la pureté, l'identité et l'intégrité des anticorps. Les méthodes électrophorétiques communément utilisées sont le SDS-PAGE, l'électrophorèse capillaire avec détection UV ou LIF (tests de pureté et d'intégrité) et le cIEF (test d'identité).

### 2.2.3.1.1. Analyses des anticorps par SDS-PAGE

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'action d'un champ électrique.

Les molécules se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge nette  $z$ , à une vitesse  $v$  proportionnelle à cette charge :

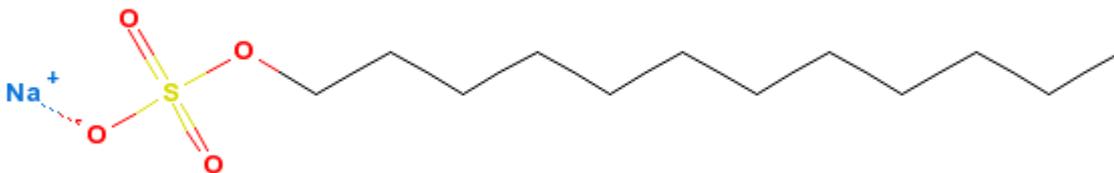
$$v = E.z / f$$

où  $E$  est le champ électrique

$f$  est la force de friction

La technique SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. [40]

De façon sommaire on peut dire qu'en présence d'un excès de sodium dodecyl sulfate (SDS) et d'un agent réducteur (2-mercaptoéthanol) les protéines sont dénaturées et se lient au SDS par des liaisons hydrophobe : 1.4 g de SDS / g de protéine [41-42]. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure. Le SDS (*figure 20*) enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques.



*Figure 20 : Formule développée du sodium dodecyl sulfate*

En conséquence :

- les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure quaternaire et la structure tridimensionnelle native est fortement affectée;
- les protéines n'ont plus de ponts disulfures : elles sont sous forme monomères ;

- la charge intrinsèque de la protéine est masquée. Il en résulte un complexe SDS-protéine avec une charge constante. Donc la mobilité électrophorétique du complexe est proportionnelle au poids moléculaire de la protéine.

Les protéines sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Le gel est obtenu par polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. (figure 21)

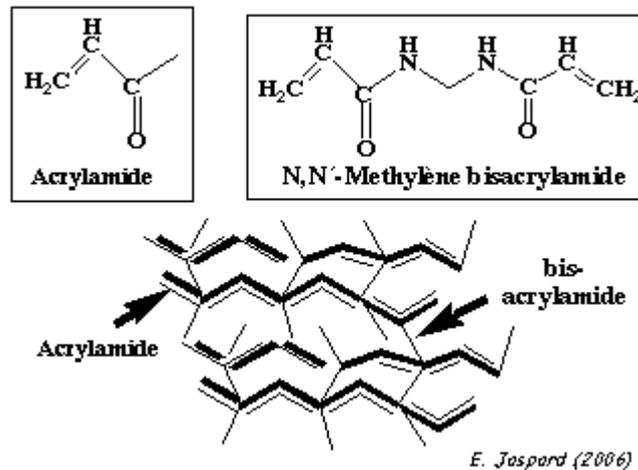


Figure 21: Formules développées de l'acrylamide et du bis-acrylamide et maillage du polymère obtenu

Plus le pourcentage d'acrylamide et de bis-acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées.

Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Le gel est coulé entre deux plaques de verre. Les échantillons sont déposés dans des puits. La plaque est déposée dans une cuve d'électrophorèse contenant un tampon électrolytique conducteur. La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs de taille qui sont des protéines standards de masses molaires connues.

De ce fait, l'électrophorèse en gel polyacrylamide à une dimension permet d'identifier et de caractériser de nombreuses protéines. La séparation est basée sur la migration des molécules chargées à travers une matrice sous l'action d'un champ électrique.

L'électrophorèse en gel polyacrylamide et SDS est le système le plus populaire d'analyses en routine des protéines ; il permet d'analyser la taille et donc la pureté des protéines [43-44-45].

Afin de visualiser les protéines par SDS-PAGE, différentes méthodes de détection peuvent être utilisées : la coloration à l'argent en natif, le permanganate d'argent, la coloration

à l'argent avec ammoniac, le bleu de Coomassie (CBB R-250 et CBB G-250), la méthode zinc inverse et cuivre inverse. Le *tableau 6* décrit l'ensemble de ces techniques.

Ces différentes techniques de coloration sont comparées par Gonzalez et al [46] pour l'analyse d'un IgG par SDS/PAGE deux dimensions. Le but de cette étude est de comparer les différents protocoles de visualisation des protéines dans la première dimension du gel afin d'obtenir la meilleure sensibilité sur les différents composés de l'échantillon et dans la deuxième dimension du gel afin de déterminer leur poids moléculaire. Dans la première dimension, l'utilisation du bleu de Coomassie ou de la coloration à l'argent en natif permet d'atteindre une limite de détection de 3 pmol et 13 pmol respectivement. L'utilisation de la coloration à l'argent avec ammoniac et permanganate, la méthode zinc inverse et cuivre inverse entraîne une mauvaise sensibilité sur la première dimension. Les auteurs montrent que la meilleure méthode en 2 dimensions est la coloration au bleu de Coomassie pour la première dimension et la coloration au permanganate d'argent pour la seconde dimension. Cette méthode permet d'atteindre une limite de détection de 2-3 pmol.

Méthode	Fixation	Lavage	Coloration	Références
<b>Coloration à l'argent natif</b>	20 min dans 50% méthanol, 5% acide acétique	10 min dans 50% méthanol; 10 min dans l'eau	1 min dans 0,02% de thiosulfate de sodium 1 min dans l'eau (X2) 20 min dans 0,1% de nitrate d'argent 1 min dans l'eau (X2) développement dans 0,04% de formol, 2% carbonate de potassium 5 min dans l'acide acétique pour terminer le développement	[47]
<b>Permanganate d'argent</b>	20 min dans 50% méthanol, 20% acide acétique, 0,1% formaldéhyde, 2% acide cuprique, 1% chlorure de zinc	10 min dans 5% d'acide acétique, 10% méthanol	5 min dans 0,01% de permanganate de potassium, 0,01% d'hydroxyde de potassium laver à l'eau (X3) 5 min lavage dans 5% d'acide acétique, 10% éthanol 5 min lavage 10% éthanol 5 min lavage dans l'eau (X2) 20 min dans 0,2% de nitrate d'argent, lavage à l'eau	[48]
<b>Coloration à l'argent avec ammoniac</b>	30 min dans glutaraldéhyde	Toute une nuit dans l'eau	15 min solution d'argent avec ammoniac (1,4% d'hydroxyde d'ammonium, 0,076% d'hydroxyde de sodium, 0,78% de nitrate d'argent); 2 min lavage à l'eau; développement dans 0,005% d'acide citrique, 0,019% de formaldéhyde; 1H lavage dans l'eau (X3)	[49]
<b>CBB R-250</b>			Toute une nuit dans une solution de CBB R-250 (0,25% CBB R-250, 50% méthanol, 10% acide acétique); puis dans 5% méthanol, 7,5% d'acide acétique	[26]
<b>CBB G-250</b>			Toute une nuit dans une solution de CBB G-250 (80 mL de CBB G-250 0,1%, 2% d'acide phosphorique, 10% solution sulfate d'ammonium et 20mL de méthanol); puis dans 25% méthanol	[50]
<b>Coloration zinc inverse</b>		30 s dans l'eau	15 min dans 200 mM imidazole, 0,1% SDS; 30-40 s dans 200 mM de sulfate de zinc; 1 min lavage dans l'eau (X3)	[51]
<b>Coloration cuivre inverse</b>		10-15 min dans l'eau	10 min 0,19M Tris-chlorure (pH 8,8) 5min 0,3M chlorure de cuivre 3 lavage dans l'eau	[52]

Tableau 6 : Quelques protocoles de fixation et de coloration en SDS-PAGE

La méthode SDS-PAGE est utilisée pour mesurer et quantifier les immunoglobulines en contrôle qualité [53, 54]. Cependant, elle présente des inconvénients : méthode longue,

gamme de pH limitée, chère, méthode non automatisée. Donc, cette méthode peut être de plus en plus transférée en électrophorèse capillaire.

### 2.2.3.1.2. Capillary Isoelectric Focusing (cIEF)

L'appareillage d'électrophorèse capillaire nécessite : (figure 22)

- un générateur de courant haute tension,
- deux électrodes (anode et cathode) qui plongent dans des flacons contenant le tampon de séparation. Elles sont reliées au courant haute tension,
- un capillaire de silice fondue thermostaté dont les extrémités plongent dans le tampon de séparation. Le capillaire comporte une fenêtre de détection,
- un système d'injection,
- un détecteur,
- un système d'acquisition des données.

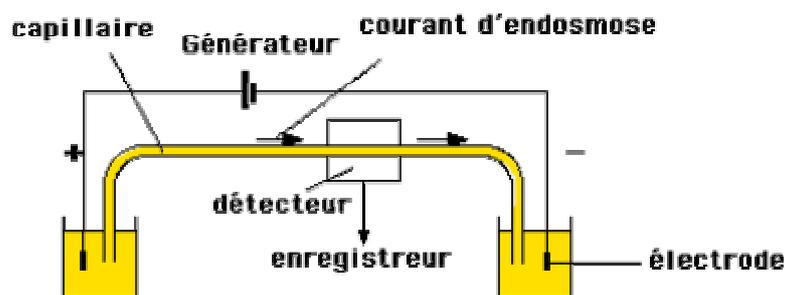


Figure 22 : Montage électrophorèse capillaire

Le système Capillary Isoelectric Focusing (cIEF) est une technique d'électrophorèse capillaire haute résolution qui permet de séparer des protéines selon leur point isoélectrique.

Un gradient de pH est formé à l'intérieur d'un capillaire grâce à des ampholytes. Les ampholytes sont des molécules qui peuvent se comporter à la fois comme acide et base. Ils forment ainsi un gradient de pH (pH 3-10 par exemple). Le capillaire est rempli d'ampholytes et de soluté (figure 23A). Une tension électrique est appliquée avec une solution basique à la cathode et une solution acide à l'anode (figure 23B). Les ampholytes et le soluté migrent jusqu'à devenir neutre (à leur pI) (figure 23B'). Ce processus est appelé la focalisation. Un état d'équilibre est atteint. Par application de pression, les ampholytes et le soluté migrent et passent devant la fenêtre de détection (figure 23C) ou la source ESI d'un spectromètre de masse (figure 23C').

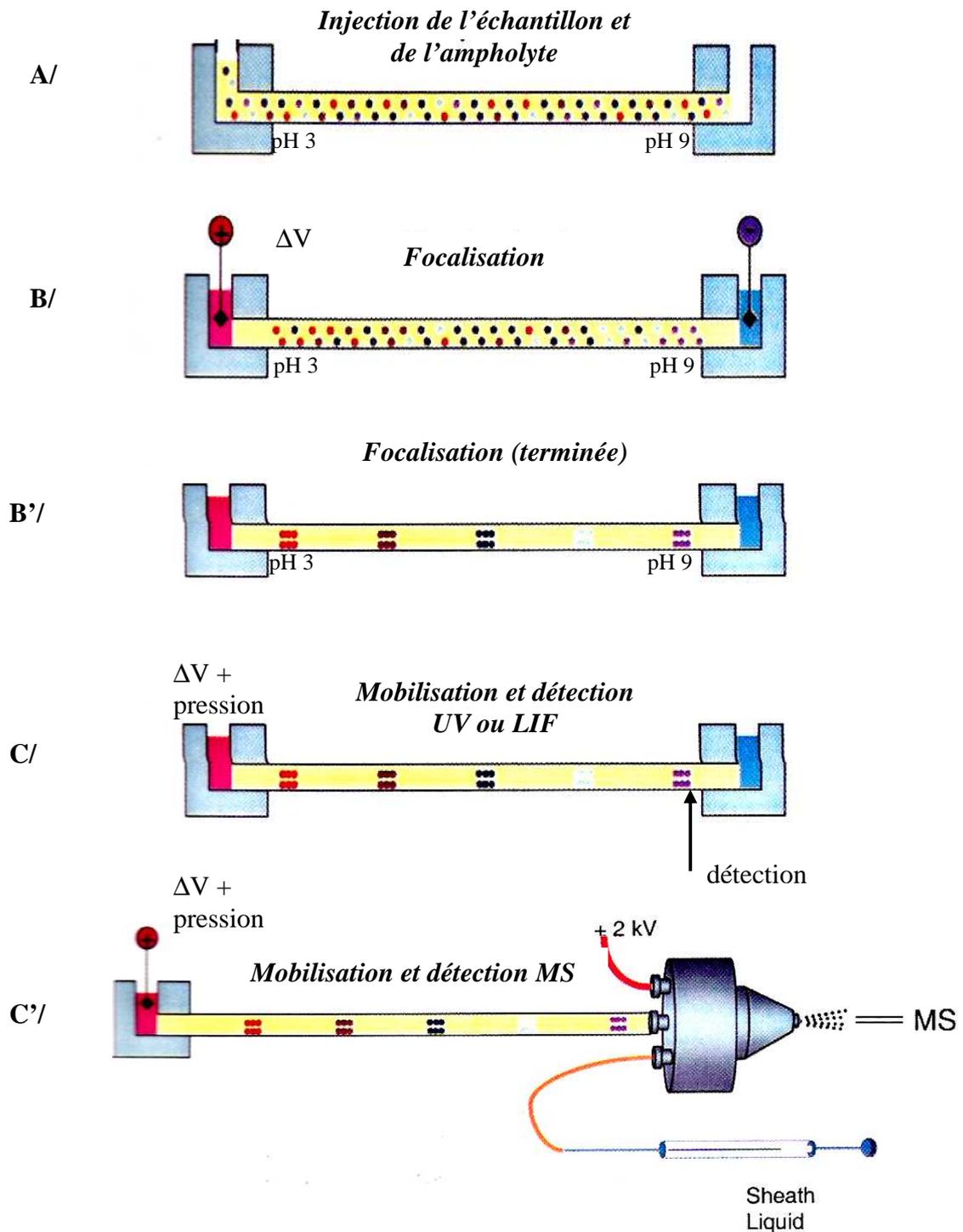
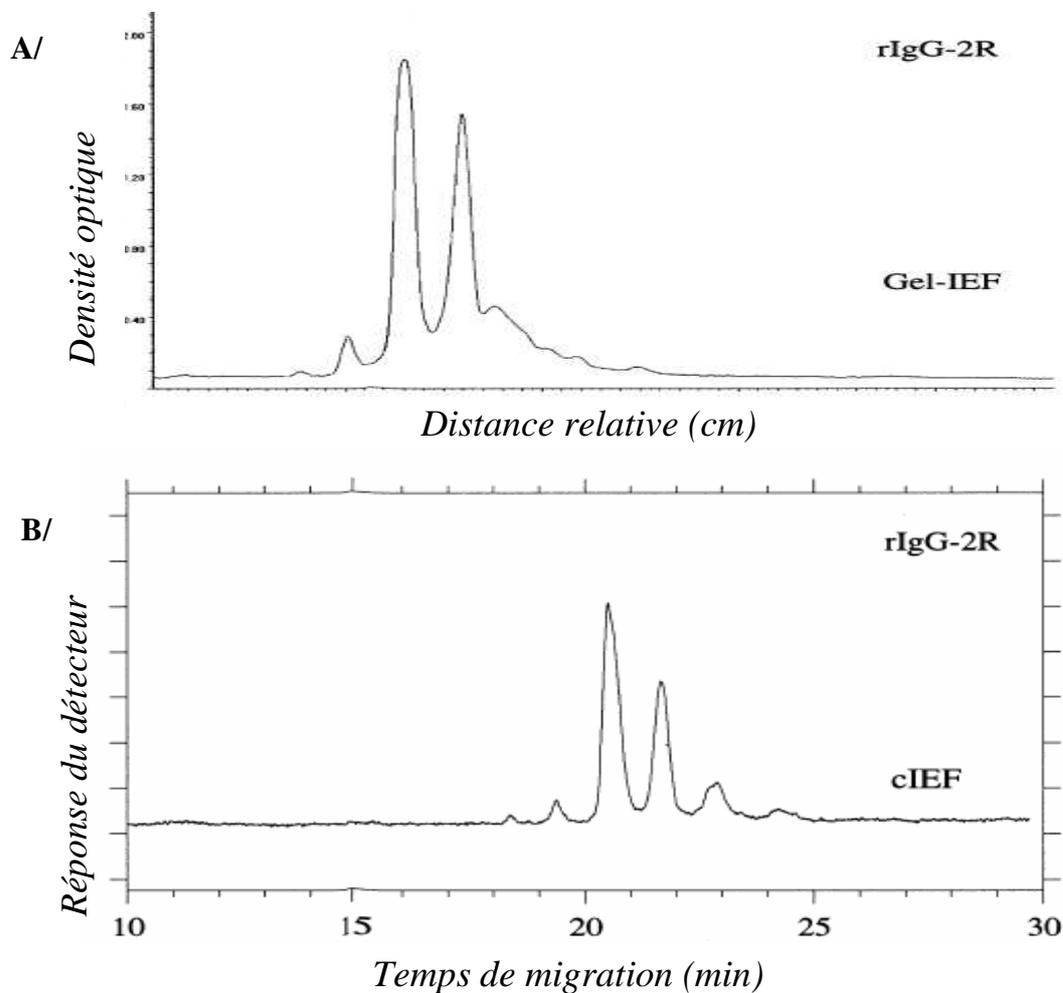


Figure 23 : Principe du cIEF A/ injection de l'échantillon et de l'ampholyte ; B et B'/ Focalisation ; C et C'/ Mobilisation et détection [55]

De nombreuses approches de l'analyse des protéines par cIEF sont décrites dans la littérature.

Par exemple, nous pouvons citer les travaux de Tang et al [56] qui ont développé une méthode d'analyse d'immunoglobulines recombinantes en routine par cIEF. Un capillaire

greffé polyméthyl siloxane est utilisé afin de supprimer le flux électro-osmotique. Le catholyte est une solution à 20 mM de NaOH dans 0,4 % méthylcellulose. L'anolyte est une solution de 120 mM d'acide phosphorique dans 0,4 % de méthylcellulose. La méthode comprend deux étapes : la première étape est une étape de focalisation : une tension de 30 kV est appliquée ; les protéines migrent jusqu'à leur point isoélectrique. Dans une deuxième étape, une faible pression de 0,5 psi est appliquée en plus de la tension de 30 kV. Les protéines migrent et sont détectées par un détecteur UV à 280 nm. Cette méthode est comparée à une méthode de gel IEF avec une coloration au bleu de Coomassie. Les isoformes des immunoglobulines recombinantes sont quantifiés en scannant le gel avec un densitomètre. La *figure 24* compare l'analyse d'une immunoglobuline recombinante par gel-IEF et par cIEF.



*Figure 24: Comparaison des méthodes gel-IEF avec une coloration au bleu de Coomassie (A) et cIEF avec une détection UV à 280 nm (B) pour l'analyse d'une immunoglobuline recombinante*

La méthode cIEF présente de nombreux avantages :

- temps d'analyse rapide : inférieur à 30 minutes ;
- détection directe en UV à 280 nm ;
- automatisation possible ;
- données électroniques et donc possibilité d'archivage.

Cependant, la résolution de chaque isoforme de la protéine dépend de la capacité de l'ampholyte à former un gradient suffisant à l'intérieur du capillaire. De plus, les auteurs ne comparent pas la sensibilité atteinte avec les deux méthodes. L'analyse par cIEF semblant moins sensible que la méthode gel IEF (détection bleu de Coomassie), certains isoformes peuvent ne pas être détectés par cIEF par manque de sensibilité.

Hunt et *al* [57] ont également développé une méthode afin d'identifier un anticorps de l'antigène humain CD20 (le C2B8) par cIEF avec une détection à 280 nm. Le but de leur travail est de valider la méthode d'analyse qui sera utilisée en routine pour le contrôle qualité. Un électrophérogramme de l'analyse par cIEF du C2B8 est montré *figure 25*. Un capillaire BioCAP LPA est utilisé avec une longueur totale de 24 cm et une longueur effective de 19.5 cm. Les trois solutions d'ampholytes Pharmalyte 8-10.5, Bio-Lyte 7-9, Bio-Lyte 3-10 sont utilisées respectivement avec un rapport 8:1:1. Le C2B8 et l'ampholyte sont injectés à 6,8 bar pendant 40 s. Le C2B8 est analysé à 10 mM ; l'échantillon contient un marqueur de pI 8,4. Une tension de 10 kV est appliquée pendant 6 min avec une solution de 20 mM d'acide phosphorique à l'anode et une solution de 40 mM de NaOH à la cathode. Puis une tension de 15 kV est appliquée pendant 20 min.

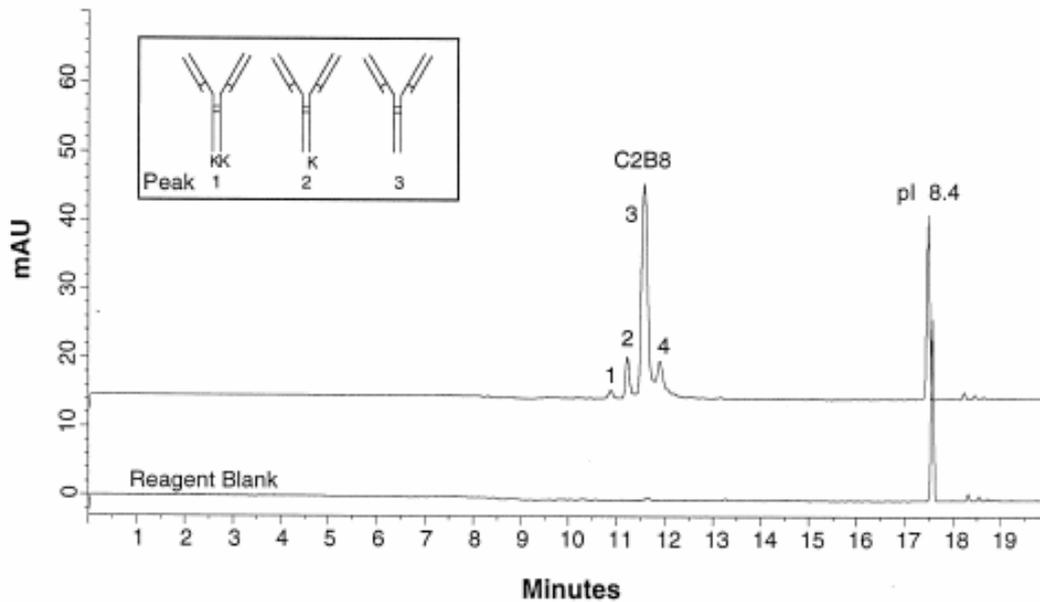


Figure 25: Analyse par cIEF de l'anticorps C2B8 à 10mM. La détection est réalisée à 280 nm. Un marqueur de pI 8.4 est utilisé. Les pics 1,2 et 3 représentent le C2B8 avec respectivement 2,1 et 0 lysines. Le pic 4 n'est pas identifié. [57]

Les isoformes du C2B8 migrent entre 10 et 13 min et sont séparés selon leur point isoélectrique. Les pics 1, 2 et 3 représentent le C2B8 avec respectivement 2, 1 et 0 lysines à l'extrémité C-terminal. La caractérisation du pic 4 n'a pas été donnée. La comparaison avec un « blanc » montre qu'il n'y a pas de composant dans la préparation de l'échantillon qui interfère avec le C2B8. Afin de valider cette méthode, la précision, les limites de quantification et de détection, la linéarité, la spécificité, la robustesse, et la stabilité sont étudiées. La LOD et la LOQ obtenues sur le pic principal sont respectivement de 2 et 8  $\mu\text{g/mL}$ .

Cette sensibilité atteinte en cIEF avec une détection UV est souvent insuffisante. Une détection LIF permet d'augmenter la sensibilité. Liu et al. analysent différentes protéines [58-59] par cIEF-UV et par ce qu'ils appellent cIEF-LCW-LIF-WCID (capillary isoelectric focusing-liquid core waveguide-laser induced fluorescence-whole column imaging detection) : montage présenté dans la figure 26. Le système est composé de trois unités : une unité d'illumination laser, une unité de séparation et une unité de détection.

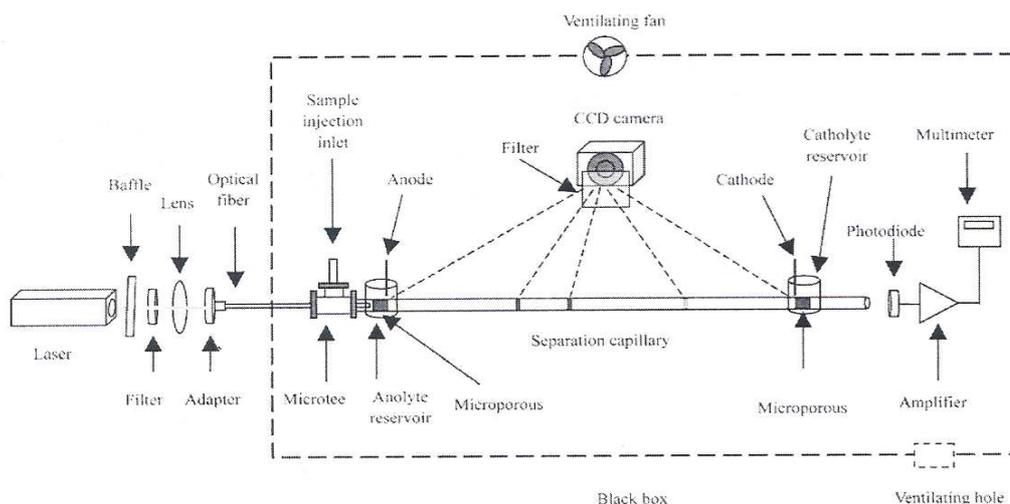


Figure 26: Schéma du montage expérimental CIEF-LCW-LIF-WCID avec trois unités : l'unité laser, l'unité de séparation et l'unité de détection.

La lumière d'excitation est directement introduite à une extrémité du capillaire. Un capillaire Teflon AF 2400 est utilisé (indice de réfraction de 1,29-1,31), ce qui permet une réflexion totale de la fluorescence des molécules à l'intérieur du capillaire, une limitation de l'adsorption des protéines et une élimination du flux électro-osmotique. Différents types de protéines sont analysées. Les modes de détection UV et LIF (laser 488 nm) sont alors comparés. La limite de détection atteinte avec une détection UV est de  $10^{-6}$  M pour la HSA (sérum albumine humaine) et de  $9,1 \times 10^{-8}$  M pour la BSA (sérum albumine bovine). Afin d'augmenter la sensibilité et de limiter les problèmes de précipitation, la détection LIF est utilisée. La limite de détection atteinte est de  $2,2 \times 10^{-10}$  M pour la HSA-FITC et de  $8,1 \times 10^{-12}$  M pour la BSA-NanoOrange. La détection LIF permet donc de gagner un facteur 10 000 par rapport à la détection UV. Ce facteur pourrait être augmenté en utilisant un montage LIF plus efficace ; en effet, ce montage présente des inconvénients comme la diffusion de la lumière fluorescente à l'intérieur de la fibre optique de collection, la difficulté à aligner la fibre optique devant le capillaire ainsi que la photodégradation des molécules.

La cIEF peut également être couplée à un spectromètre de masse. La cIEF donne donc une séparation basée sur les pI et la MS apporte une mesure de masse avec une bonne précision. Cependant, le couplage est difficile du fait de la faible volatilité des ampholytes.

Zhou et al [60] décrivent ce couplage. L'ampholyte utilisé pour le cIEF perturbant l'ionisation electrospray, une chromatographie liquide phase inverse est introduite entre l'électrophorèse

capillaire et la MS afin d'éliminer les ampholytes. Pour cela, une membrane de micro dialyse est introduite entre la cellule cathodique et le capillaire cIEF.

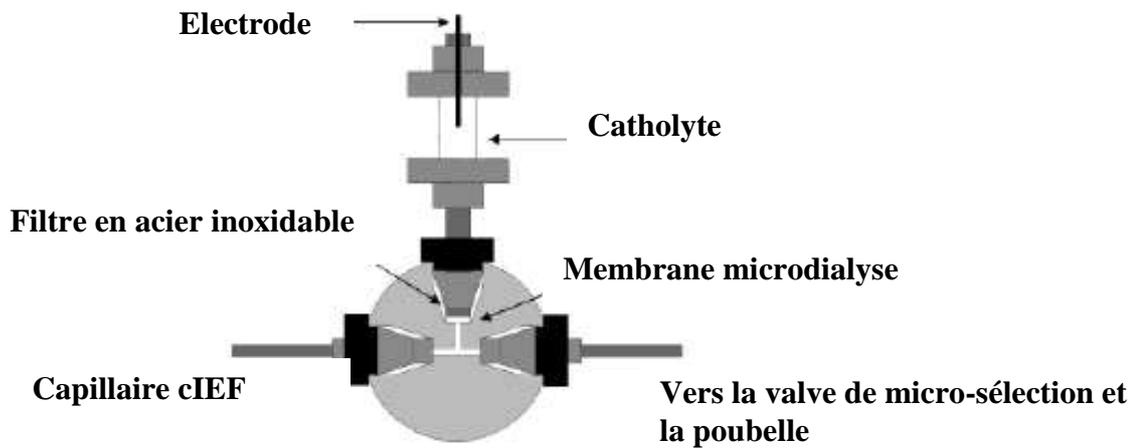


Figure 27 : Membrane microdialyse entre la cellule cathodique et le capillaire cIEF

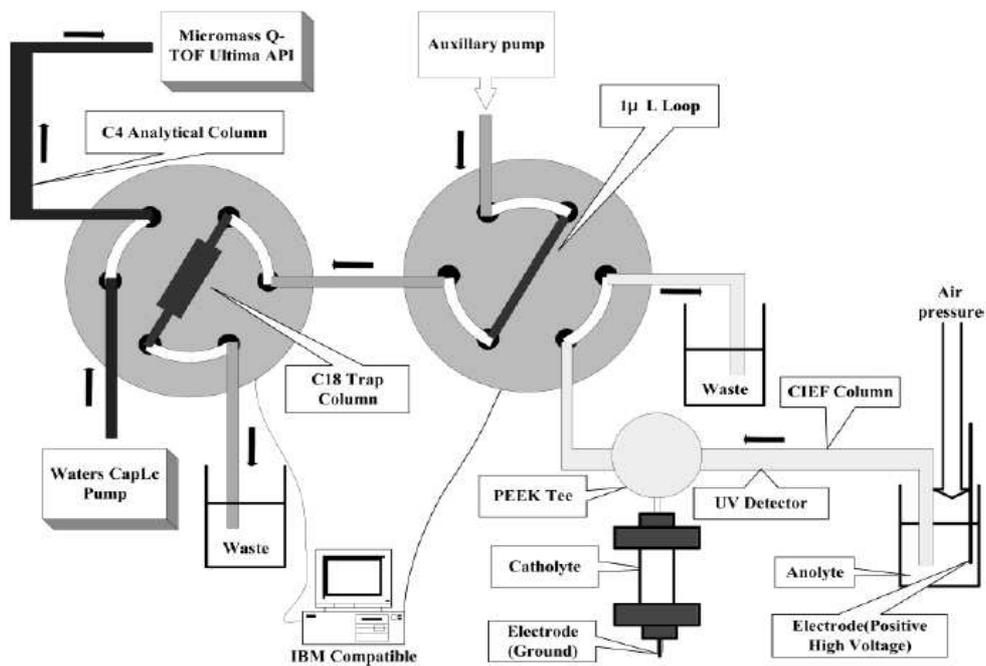


Figure 28: Système cIEF-RPLC-MS

Durant l'étape de focalisation, les protéines ne traversent pas la membrane, par contre le catholyte traverse la membrane puis va vers une poubelle. Après la focalisation, les protéines sont poussées de manière hydrodynamique à travers la membrane puis vers une valve qui les transfèrent vers une RPLC (colonne C18). La fraction protéique est donc séparée par RPLC.

Grâce à une seconde valve, la fraction protéique collectée est ensuite lavée par une solution de 94,9% d'eau, 5,0% d'acétonitrile et 0,1% d'acide acétique puis séparée sur une colonne C4. L'échantillon élué à travers cette dernière colonne est alors envoyé dans la source API-ESI du spectromètre de masse. *Figures 27 et 28.* Cette technique permet de caractériser et de quantifier les protéines, cependant ce montage est très complexe à mettre en œuvre. Le paragraphe suivant décrit l'analyse des anticorps par électrophorèse capillaire avec une détection UV ou LIF.

#### **2.2.3.1.3. Electrophorèse capillaire en présence de sodium dodecyl sulfate (détection UV et LIF)**

La séparation des composés par électrophorèse capillaire résulte de deux mécanismes de transport, le flux électro-osmotique et le flux électrophorétique.

##### **- Le flux électro-osmotique : (figure 29)**

Le transport de l'électrolyte tampon à travers la colonne capillaire est engendré par le flux électro-osmotique (EOF). L'origine de ce flux est due à l'existence d'une double couche électrique créée à l'interface solide-liquide. En général, lorsque le pH du tampon est supérieur à 3, les groupements silanols de la paroi sont chargés négativement. Les ions positifs du tampon sont alors attirés par les groupements silanols : il se forme une double couche à la surface de la silice qui induit une différence de potentiel appelé zêta. A la suite d'encombrement stérique, certains groupements silanols restent libres. Pour cette raison, une seconde couche de charges positives plus mobiles se forme le long de la paroi.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué aux extrémités du capillaire, la double couche électrique est mise partiellement en mouvement, donnant naissance à un flux de liquide à travers le capillaire, appelé flux électro-osmotique.

Comme la surface est chargée négativement, ce qui est généralement le cas d'un capillaire en silice fondue, les contre-ions positifs solvatés dans la couche diffuse se déplacent dans la direction du champ électrique, entraînant le liquide vers la cathode. Par contre, les contre-ions localisés dans la couche rigide restent immobiles sous l'influence du champ électrique.

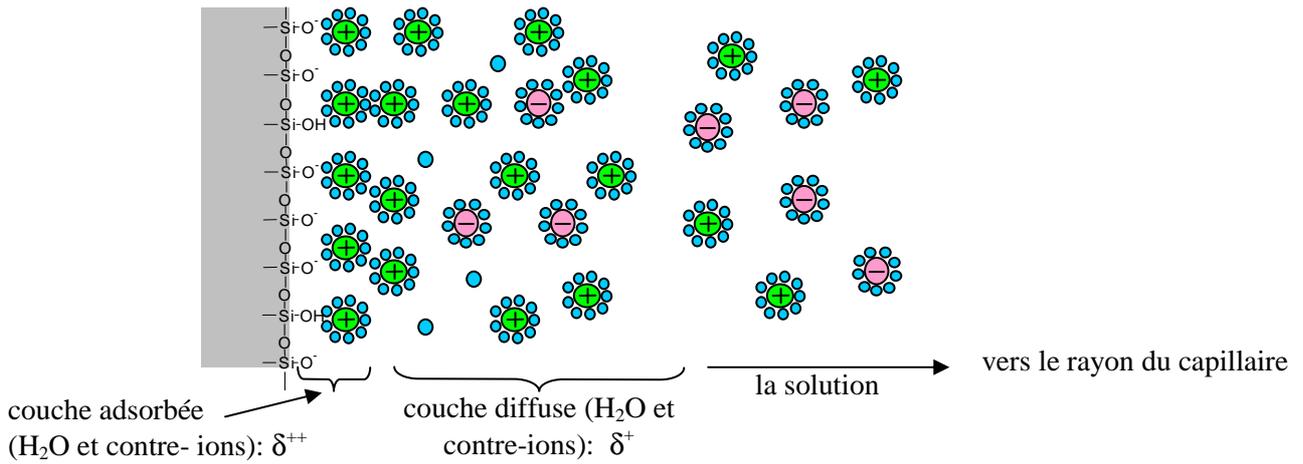


Figure 29 : Schéma du flux électro-osmotique

Le flux électro-osmotique est fonction des propriétés du tampon :

- nature ;
- force ionique ;
- pH ;
- viscosité.

On écrit :

$$V_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = (\epsilon\zeta / \eta) \cdot V/L$$

$V_{eo}$  : vitesse électro-osmotique ( $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ou  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ )

$\mu_{eo}$  : mobilité électro-osmotique ( $\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )

$E$  : champ électrique ( $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

$\epsilon$  : constante diélectrique du tampon

$\zeta$  : potentiel zêta de la surface du capillaire (V)

$\eta$  : viscosité du milieu (Pa.s)

$V$  : tension appliquée (V)

$L$  : longueur totale du capillaire (cm).

- L'électromobilité : (figure 30)

Une espèce chargée en solution soumise à un champ électrique  $E$  se déplace dans le milieu électrophorétique avec une vitesse électrophorétique :

$$V_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \mu_{ep} \cdot (V/L_{tot})$$

$\mu_{ep}$  : mobilité électrophorétique

$L_{tot}$  : longueur totale du capillaire

$V$  : tension appliquée aux extrémités du capillaire

Ce type de transport par électromigration s'effectue pour un cation dans le sens du champ électrique ( $\mu_{ep}$  est positif) et pour un anion dans le sens opposé à celui-ci ( $\mu_{ep}$  est négatif). Une molécule neutre, n'étant pas soumise au phénomène d'électromigration, se déplace à la vitesse du flux électro-osmotique.

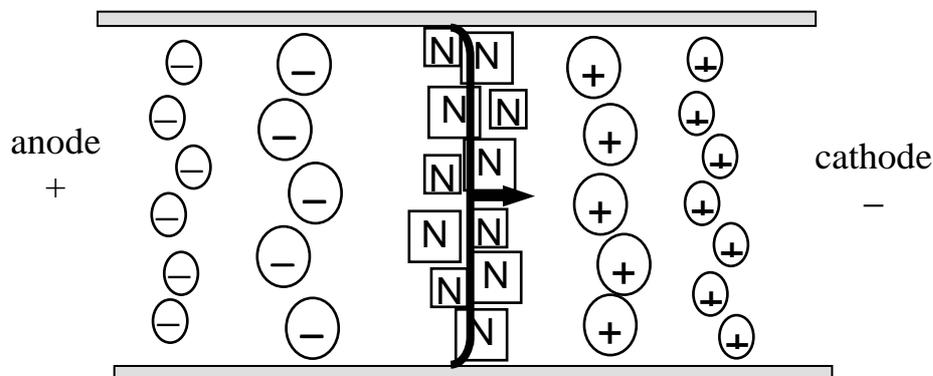


Figure 30: Schéma du flux électrophorétique

La mobilité électrophorétique est affectée par :

- le pH, qui modifie la charge portée par les espèces en solution,
- la composition ionique de l'électrolyte qui influence les interactions entre les groupements ionisables des solutés et les ions de l'électrolyte,
- la température.

L'électrophorèse capillaire regroupe plusieurs modes de séparation qui permettent de différencier les espèces chimiques selon leur charge électrique et leur masse (électrophorèse de zone), leur hydrophobie (électrophorèse micellaire) et leur masse (électrophorèse en gel).

\* **Electrophorèse capillaire de zone :**

L'électrophorèse capillaire de zone constitue le mode de séparation le plus simple à mettre en œuvre et le plus utilisé. La séparation des espèces est réalisée dans un capillaire rempli par un

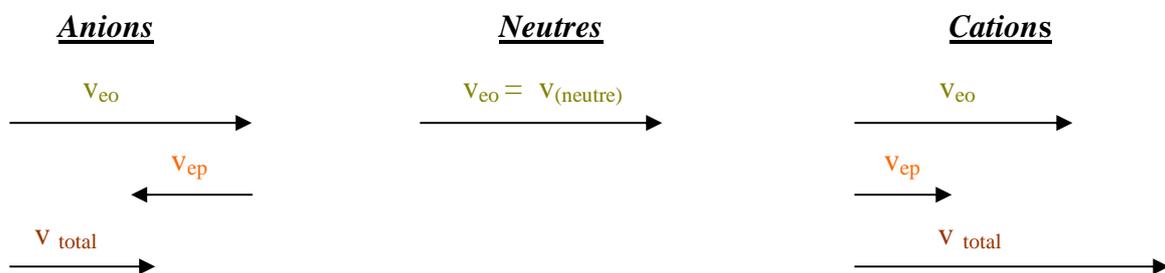
électrolyte tampon de pH et de force ionique fixés. Les espèces chimiques migrent à des vitesses différentes selon leur charge apparente et leur rayon hydrodynamique.

Le mouvement d'un soluté chargé dans l'électrolyte est la résultante de deux phénomènes :

- la migration électro-osmotique,
- la migration électrophorétique.

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

$$v_{\text{app}} = (\mu_{\text{eo}} + \mu_{\text{ep}}) \cdot E$$



En électrophorèse capillaire de zone, les principaux paramètres d'optimisation de la séparation sont liés à la composition du tampon : pH, force ionique, nature et concentration d'un agent complexant, ajout d'un solvant organique. La tension appliquée et la température représentent des paramètres secondaires dans l'optimisation d'une séparation.

\* La chromatographie électrocinétique micellaire :

La chromatographie électrocinétique micellaire (CEM) est une technique électrophorétique qui permet la séparation de solutés neutres et/ou chargés. La séparation est réalisée à l'aide d'un tampon électrophorétique auquel est ajouté un tensioactif anionique ou cationique à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc). Le tensioactif le plus utilisé est le dodécylsulfate de sodium (SDS) et les micelles ont une mobilité électrophorétique négative.

La vitesse de migration d'un soluté est fonction de son coefficient de partage entre le cœur hydrophobe des micelles et la phase aqueuse ionique. L'ordre de migration des solutés correspond à une échelle d'hydrophobie croissante.

*\* L'électrophorèse capillaire en gel:*

Le principe de l'électrophorèse capillaire en gel repose sur la séparation de macromolécules en fonction de leur taille dans un gel constitué de polymère (polyacrilamide, agarose..). Ce mode s'applique essentiellement à la séparation d'oligonucléotides, d'oligosaccharides, de fragments d'ADN simple brin ou double brin ou à la séparation de protéines et glycoprotéines possédant des densités de charge très proches et qui peuvent ainsi être difficilement séparées en électrophorèse capillaire de zone sur la base de leur rapport masse sur charge.

Par la suite, nous appellerons :

- électrophorèse capillaire en gel (CGE : capillary gel electrophoresis) lorsque le gel est fixé à l'intérieur du capillaire et qu'il ne peut pas être enlevé ;
- électrophorèse capillaire non gel (CE-SDS-NGS : capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving) lorsque le gel est remplacé après chaque analyse.

**\* CE/UV**

L'électrophorèse capillaire-sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) offre une méthode rapide, sensible et quantitative pour analyser des biomolécules. Cette technique est en pleine expansion afin de remplacer la traditionnelle méthode en gel SDS-PAGE. Elle offre une solution automatique et complète pour caractériser et contrôler la pureté des protéines. Les complexes protéines / SDS possèdent des rapports masse / charge identiques. Les protéines sont donc séparées selon leur poids moléculaire.

L'absorption UV est le mode de détection le plus commun de l'électrophorèse capillaire. Les complexes protéines-SDS peuvent être détectés à différentes longueurs d'onde : 280 nm (absorption de la lumière par les cycles aromatiques des acides aminés tryptophane et tyrosine), 220 nm (absorption de la lumière par les liaisons peptiques) et 200 nm (la meilleure sensibilité). Le problème de la détection à faible longueur d'onde (200 nm ou 220 nm) est l'absorption de la lumière par la matrice (polymère) utilisée pour la séparation des protéines. A ces longueurs d'onde, la sensibilité est donc réduite à cause du bruit de fond chimique. [61]

Les premiers travaux en CGE ont été réalisés par Cohen et Karger en 1987 [62]. Ils utilisent un gel polyacrilamide polymérisé sur le capillaire de silice fondue de 75 µm de diamètre interne. Ils analysent des fragments de myoglobines et un mélange de protéines. Cette application est limitée par la faible durée de vie du capillaire et par la faible sensibilité

en UV (l'utilisation du polyacrylamide à 214 nm est fortement limitée en raison de sa forte absorbance à cette longueur d'onde).

Afin de remédier à ces problèmes, l'acrylamide a été remplacé par d'autres polymères UV-transparent comme le polyéthylène oxyde ou le dextrane : [63]

Dans ce cas, un capillaire greffé peut être utilisé pour supprimer le flux électro-osmotique et pour minimiser l'adsorption des protéines à la surface du capillaire. Guttman et al [64-65] utilisent un capillaire greffé eCAP SDS 200 de diamètre interne 100  $\mu\text{m}$ . Ils analysent 65 protéines biologiques par SDS-PAGE et par CGE. Le logarithme du poids moléculaire des protéines est tracé en fonction de la distance de migration relative (pour les analyses SDS-PAGE) et en fonction du temps de migration (pour les analyses CGE). Les auteurs comparent ensuite le poids moléculaire estimé (basés sur les courbes de calibration précédentes) et le poids moléculaire décrit dans la littérature de différentes protéines. Pour de nombreuses protéines, le poids moléculaire estimé par SDS-PAGE et CGE et le poids moléculaire décrit dans la littérature sont en corrélation : par exemple, l' $\alpha$ -lactalbumine a un poids moléculaire de 14 200 Da décrit dans la littérature [66], et un poids moléculaire estimé de 14 250 Da par CGE et 14 200 Da par SDS-PAGE. Par contre, pour certaines protéines le poids moléculaire estimé est en désaccord avec celui de la littérature : par exemple, la pepsine a un poids moléculaire décrit dans la littérature de 34 700 Da [66], et un poids moléculaire estimé de 85 000 Da par CGE et 45 000 Da par SDS-PAGE. Les auteurs expliquent cette différence par une modification de la chaîne polypeptidique (glycosilation, phosphorylation). Ces groupes ne se lient pas au SDS avec le rapport 1:1:4, entraînant un changement dans le rapport charge/masse. Le temps de migration est donc augmenté ou diminué entraînant une estimation du poids moléculaire trop élevée ou trop petite.

D'autres travaux sont réalisés avec un capillaire non greffé :

Par exemple, on peut citer les travaux de Ganzler et al [41], Lausch et al [63] et Benedek et al [67]. Ce dernier utilise un tampon 100 mM Tris-2-(N-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES) pH 8,5 avec une solution de polymère poly(éthylène oxyde) (PEO) en présence de SDS avec un capillaire non greffé afin de séparer différentes protéines. La séparation est améliorée lors de l'augmentation du poids moléculaire du PEO et lors de l'augmentation de sa concentration. Une solution de 3 % de PEO 100 000 est le meilleur compromis. Les avantages de ce tampon sont l'utilisation d'un capillaire non greffé, le PEO est transparent aux rayonnements UV et la préparation de la solution SDS-PEO est simple et stable.

Le dextrane et le PEO (*figure 31*) sont étudiés avec plus de précision par Guttman et al [68] : ils étudient l'influence de la température sur la migration et l'efficacité de séparation de différentes protéines de poids moléculaire entre 14 400 et 97 400 Da. Le polymère dextrane est un polysaccharide flexible comprenant des liaisons  $\alpha(1-6)$  majoritairement tandis que le PEO est un polymère linéaire constitué de petites unités de monomères.



*Figure 31 : structures dextrane et PEO*

La chaîne dextrane est relativement flexible due aux liaisons  $\alpha$  mais peu mobile due à son encombrement. A température ambiante, la mobilité des chaînes est faible et la formation d'une structure organisée est gênée : dans ce cas, l'efficacité de séparation des protéines est faible (pics larges). Lorsque la température augmente, les chaînes deviennent plus mobiles, augmentant leurs proximités et formant une structure organisée : alors l'efficacité de séparation est augmentée. A contrario, à température ambiante, l'hélice flexible du PEO est plus mobile que la structure dextrane. Une structure orientée est donc formée à température ambiante sous l'action d'un champ électrique. En augmentant la température, l'efficacité de séparation est diminuée due à une structure désorientée (grande mobilité de la chaîne de polymère, processus de relaxation plus rapide).

Vincentelli et al [69] utilisent la CE-SDS-NGS afin de séparer et caractériser les isoformes F(ab')<sub>2</sub> d'un IgG1 anti Fc $\gamma$ RI. Cet anticorps est incubé à 37°C dans un tampon 1,5 M citrate de sodium (pH 3,5) avec de la pepsine avec un rapport 20:1. L'hydrolyse est stoppée en augmentant le pH à 7,2. Cet anticorps est tout d'abord analysé par SDS-PAGE. L'analyse de IgG1 avant l'action de la pepsine montre une bande majoritaire correspondant à un poids moléculaire de 150 kDa. L'analyse du même IgG1, après une incubation avec la pepsine pendant 20 min, montre une bande correspondant à un poids moléculaire de 100 kDa (correspondant aux fragments F(ab')<sub>2</sub>). Ce même IgG est analysé par électrophorèse capillaire (détection 200 nm) à l'aide d'un tampon 20 mM CHES pH 9,5. Cinq isoformes du fragment F(ab')<sub>2</sub> sont alors identifiés. Ces différentes formes ont le même poids moléculaire de 100 kDa mais diffèrent essentiellement par leurs charges. Une cinétique de l'action de la pepsine sur l'IgG1 a été réalisée (*Figure 32*).

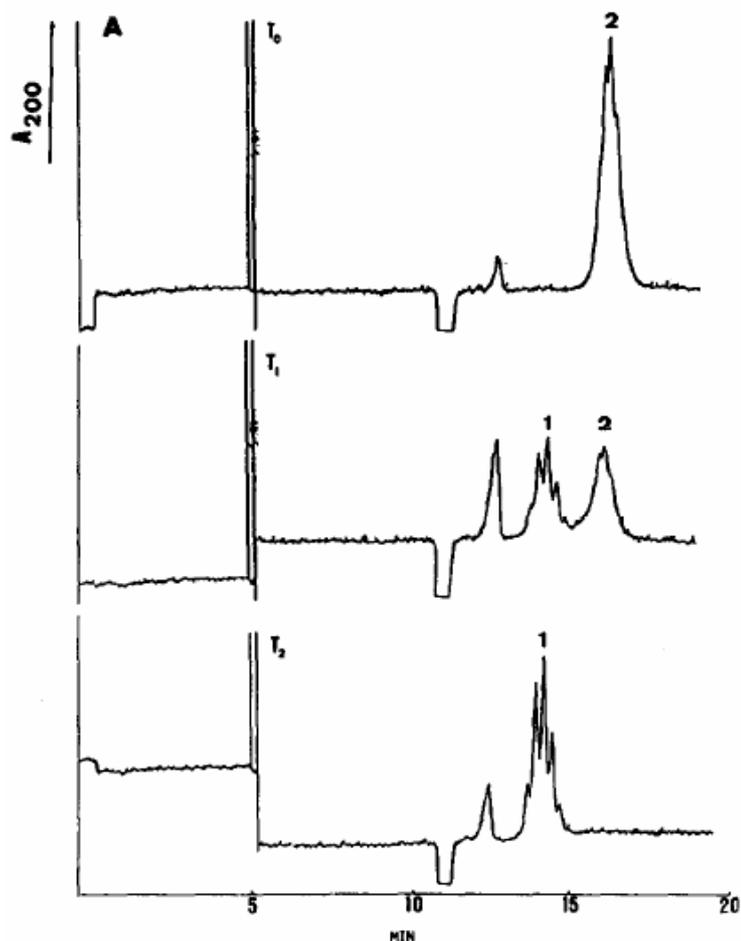


Figure 32 : Analyses CE de la cinétique de l'action de la pepsine sur un IgG1. Tampon 20 mM CHES (pH 9,5), voltage 15 kV pendant 5 min puis 3 kV.  $T_0$  = Analyse du standard IgG1 sans action de la pepsine ;  $T_1$  = Analyse du standard IgG1 après 10 min d'action de la pepsine ;  $T_2$  = Analyse du standard IgG1 après 20 min d'action de la pepsine.

L'analyse de l'IgG, sans pepsine, montre différents pics ayant un temps de migration de 16 min (figure  $T_0$ , pic 2). Après action de la pepsine pendant 10 min (figure  $T_1$ ), le pic 2 décrit précédemment diminue, tandis que de nouveaux pics correspondant à  $F(ab')_2$  (pics 1) apparaissent à 14 min. Après une action de la pepsine pendant 20 min (figure  $T_2$ ), le pic 2 a totalement disparu et le pic 1 a augmenté en intensité.

Cette cinétique montre que l'hétérogénéité de  $F(ab')_2$  n'est pas due à un résidu d'IgG non protéolysé.

Après 10 ans de développement, l'électrophorèse capillaire pour l'analyse des protéines est passée des laboratoires Recherche et Développement aux laboratoires contrôle

qualité. De nombreuses entreprises utilisent l'électrophorèse capillaire pour le contrôle qualité de nombreux médicaments : Inerfergen® (Amgen), Enbrel® (Immunex) et Synagis® (MedImmune). De plus, Genentech a décrit dans la littérature l'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour l'analyse de plusieurs anticorps thérapeutiques. L'électrophorèse capillaire peut être considérée comme une technique d'analyse pharmaceutique utilisée en routine.

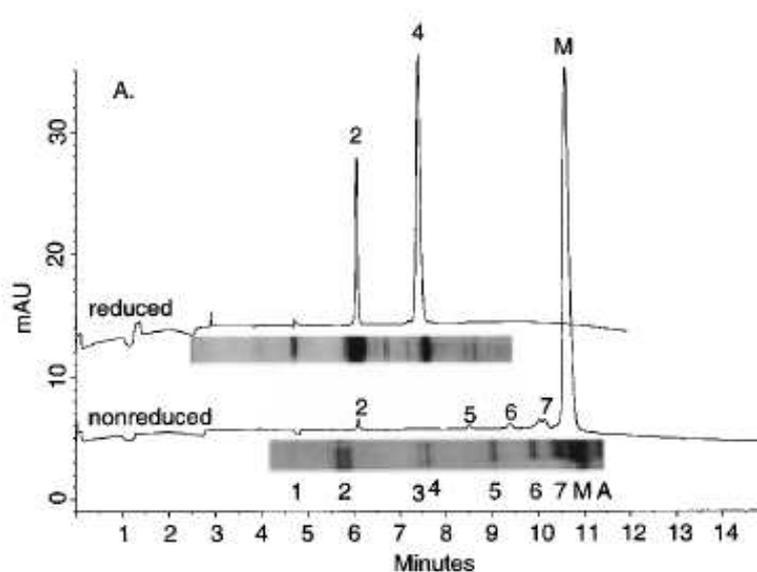
Good et al [55] décrivent les différentes étapes de validation d'une méthode CE-SDS-NGS afin d'analyser la pureté de la carboxypeptidase B en contrôle qualité. Cette méthode est développée afin de transposer la méthode SDS-PAGE existante à la méthode CE-SDS-NGS. Les différentes étapes sont : la préparation de l'échantillon, l'optimisation des conditions électrophorétiques (voltage, longueur du capillaire, type de tampon électrophorétique, température), la validation de la méthode d'analyse. La validation comprend :

- la linéarité/ la limite de quantification : elles définissent la plage où les données peuvent être générées ;
- la précision : elle estime la variabilité sur la préparation de l'échantillon et sur l'analyse ;
- la robustesse : elle décrit les différents paramètres de la méthode qui peuvent être ajustés sans affecter les données ;
- la spécificité : elle assure que la méthode mesure seulement ce qu'il est attendu de mesurer.

Afin de simplifier les analyses, deux gels SDS sont commercialisés : le gel BioRad CE-SDS run buffer et Beckman SDS-MW gel buffer. Ils sont utilisés pour l'analyse qualitative et quantitative des anticorps. Han et al [70] comparent ces deux gels SDS lors de la séparation d'un anticorps monoclonal. La comparaison est effectuée sur cinq injections avec chaque type de gel. Le gel Beckman SDS-MW permet d'atteindre une meilleure résolution que le gel Biorad CE-SDS run buffer.

Le gel BioRad CE-SDS est utilisé par Hunt et Nashebeh [54] qui utilisent la méthode CE-SDS-NGS pour remplacer la méthode SDS-PAGE utilisée pour le contrôle qualité des anticorps. Cette technique permet de suivre la pureté des anticorps (par exemple, quantification de la chaîne légère et lourde, détection des fragments protéolytiques) et la détermination des impuretés. La détection utilisée est la fluorescence native à 220 nm et le marquage au tetraméthylrhodamine (5-TAMRA) (l'analyse des anticorps marqués au 5-TAMRA sera développée dans la partie suivante). La séparation est réalisée sur un capillaire

de silice fondue de 24 cm de longueur totale et 19,4 cm de longueur effective. L'échantillon est injectée à -10 kV pendant 15 s.



*Figure 33 : Séparation par CE-SDS-NGS d'un rMAb thérapeutique non réduit et réduit comparée au SDS-PAGE avec une détection à la coloration à l'argent.*

*M, monomère ; A, agrégat. Conditions : CE Bio-Rad BioFocus 3000, tampon Biorad SDS, capillaire de silice fondue 50 $\mu$ m ID et 375  $\mu$ m OD, longueur totale 24 cm, longueur effective 19,5 cm ; injection - 10kV pendant 15 s [54]*

La *figure 33* compare l'analyse d'un rMAb par CE-SDS-NGS (capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate-nongel sieving) et par SDS-PAGE (détection coloration à l'argent). En ce qui concerne l'échantillon non réduit, une bonne corrélation existe entre les pics de CE-SDS-NGS et de SDS-PAGE exceptée pour les pics 3, 4 et l'agrégat qui ne sont pas détectés en CE. L'analyse de l'échantillon réduit montre une bonne résolution sur la chaîne légère et lourde cependant les espèces mineures ne sont pas détectées. Cette méthode est donc limitée par le manque de sensibilité. La limite de détection atteinte sur le pic principal est de 500 ng/mL. Cette limite est comparable à celle obtenue lors de la détection avec le bleu de Coomassie et 50 fois inférieure à celle obtenue avec la coloration à l'argent. Cette limite de détection est seulement citée, l'électrophérogramme n'est pas montré ; les auteurs auraient pu expliquer la manière dont la LOD est mesurée.

Le même tampon CE-SDS BioRad est utilisé par Lee et *al* [71]. Ils quantifient par CE l'IgG<sub>1</sub> de murine et ses sous-classes IgG2a et IgG2b [72]. L'injection de l'échantillon est hydrodynamique : 50 mbar pendant 160 s. Le voltage est de - 17,5 kV. La détection est

effectuée à 220 nm. Les anticorps sont dilués dans un tampon 100 mM Tris-HCl pH 9,2 contenant 1% de SDS. Une courbe de calibration avec un coefficient de corrélation de  $r^2 = 0,9999$  est obtenue. Cependant, la répétabilité de l'aire du pic principal sur 6 analyses est seulement de 11 à 16%. Une valeur inférieure à 5% est nécessaire pour valider une méthode. La viscosité du tampon (43 cP) et le temps d'injection important peuvent expliquer cette mauvaise répétabilité. Les auteurs injectent pendant plus d'une minute car ils veulent atteindre une bonne sensibilité en détection UV. Donc cette méthode est limitée par sa répétabilité d'injection. Ces mêmes auteurs étudient [73] la séparation de différents IgG provenant de divers animaux et plus particulièrement les différentes conditions agissant sur le complexe SDS-anticorps. Ils montrent que des conditions de pH élevé et des forces ioniques élevées ainsi qu'un traitement thermique augmentent la rupture des liaisons des anticorps.

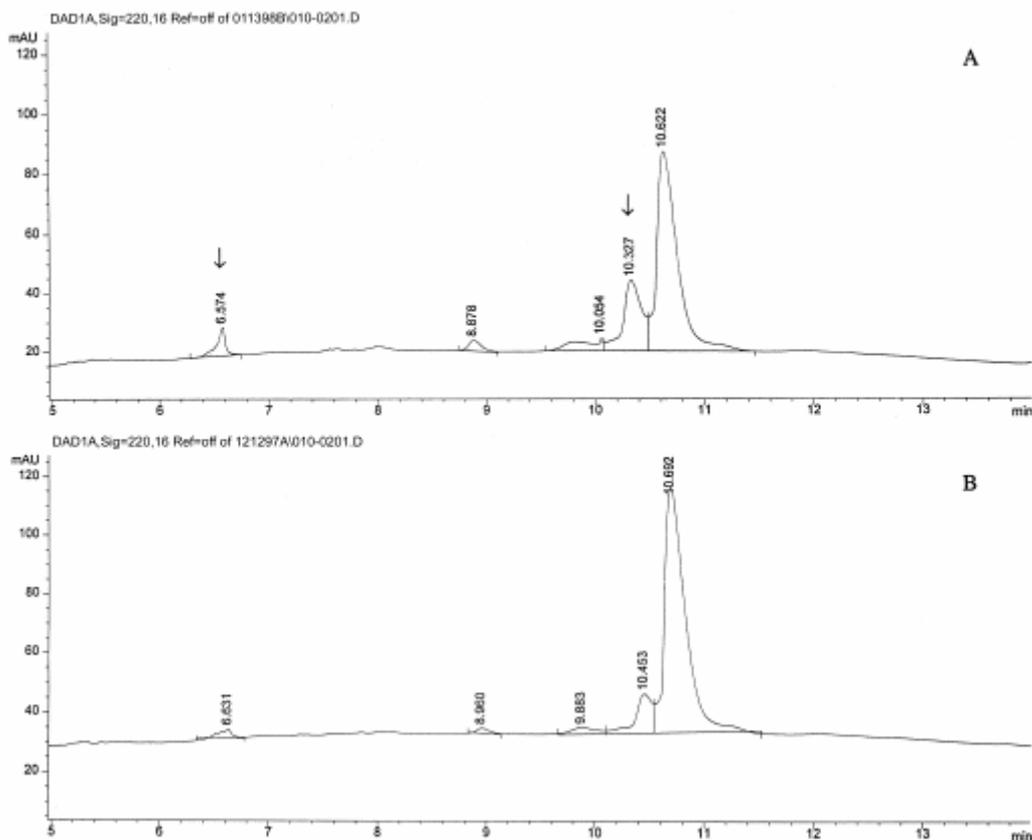
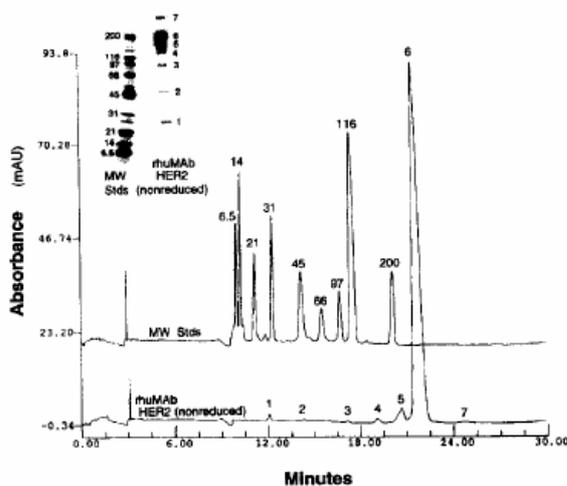


Figure 34: Electrophérogramme d'un anticorps monoclonal murin dilué dans du PBS pH 8,0 (A) et 6,8 (B). Les complexes SDS-anticorps sont incubés à 50°C pendant 17H. Les flèches indiquent la chaîne légère ( $t_m = 6,574$  min) et le complexe 1 chaîne légère / 2 chaînes lourdes ( $t_m = 10,327$  min).

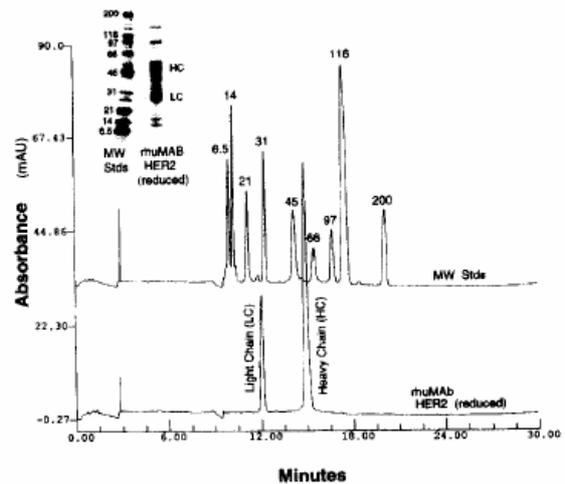
La figure 34 montre un électrophérogramme d'un anticorps monoclonal dilué dans du PBS pH 8 (A) et 6,8 (B) respectivement incubé à 50°C pendant 17 heures. La rupture des liaisons

de l'anticorps est augmentée à pH 8. En particulier, les auteurs observent une augmentation des pics correspondant à la chaîne légère (6,574 min) et au complexe 1 chaîne légère / 2 chaînes lourdes (10,323 min). Les auteurs indiquent qu'une augmentation du pH ou de la force ionique du tampon affaiblit les liaisons entre les chaînes légères et lourdes.

Les trois techniques vues précédemment (SDS-PAGE coloration à l'argent, cIEF avec une détection UV et CE-SDS-NGS avec une détection UV) sont comparées par Hunt et al [74]. Un anticorps recombinant (HER2) est analysé. La méthode CE-SDS-NGS est comparée à la méthode SDS-PAGE. Sept pics sont détectés par CE-SDS-NGS pour l'échantillon non réduit (*figure 35*) ; ces résultats sont en corrélation avec les bandes SDS-PAGE. Pour l'échantillon réduit, des espèces mineures sont détectées en SDS-PAGE et pas en CE-SDS-NGS (*figure 36*). La limite de détection sur le pic principal est de 0,5 µg/mL (LOD démontrée par un électrophérogramme).



*Figure 35: Analyse du HER2 par SDS-PAGE et CE-SDS-NGS non réduit (en bas) et de marqueurs de taille (en haut)*



*Figure 36 : Analyse du HER2 par SDS-PAGE et CE-SDS-NGS réduit (en bas) et de marqueurs de taille (en haut)*

De plus, les auteurs analysent HER2 après 27 jours de stockage à 5°C et à 37°C. A 37°C, l'aire des pics 1 à 5 augmente. Ces analyses montrent que la rupture des liaisons de l'anticorps peut être provoquée par une température élevée de stockage. L'analyse de ce même anticorps par cIEF permet d'atteindre une LOD de 2 µg/mL soit 4 fois inférieure à la LOD atteinte par CE-SDS-NGS.

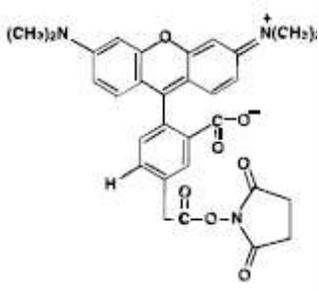
La méthode CE-SDS-NGS avec une détection UV est donc une méthode utilisée pour l'analyse d'anticorps ; une bonne corrélation existe entre les méthodes SDS-PAGE et cette

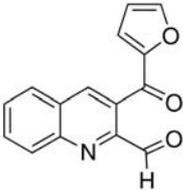
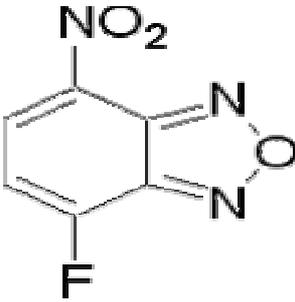
dernière. Cependant, la principale limite à cette méthode d'analyse est la sensibilité. Les LOD atteintes sur le pic principal d'IgG sont comparables à celle obtenue avec le bleu de Coomassie mais 50 fois inférieure à celle obtenue avec la détection à l'argent. La détection LIF, décrite dans le paragraphe suivant, permet de remédier à ce manque de sensibilité.

### \* CE/LIF

La CE/LIF avec un marqueur précolonne permet d'atteindre des limites de détection inférieures à la coloration à l'argent. Pour cela, le marqueur doit être fluorescent, avoir une longueur d'onde d'excitation accessible via une source laser, ne pas altérer les propriétés de l'analyte, permettre d'atteindre d'excellentes limites de détection et réagir rapidement avec l'analyte. Le tableau 7 décrit les procédures de marquage utilisées dans la littérature pour les immunoglobulines avec différents marqueurs (5-TAMRA SE, Nano Orange, FQ, NBD-F, NBD-Cl).

### \* Marquage précolonne

Marqueur	Procédure de dérivatisation	Détection	Références
<p>5-TAMRA SE</p>  <p><i>Structure 5-TAMRA SE</i></p>	<p>(a) La protéine est diluée dans du tampon sodium bicarbonate ;</p> <p>(b) La protéine est dérivatisée avec le fluorophore de 30 min à 2 H à 30°C;</p> <p>(c) Le complexe protéine-fluorophore passe à travers une seconde colonne Sephadex G25 afin d'éliminer l'excès de marqueur ;</p> <p>(d) enfin, l'échantillon peut être réduit à l'aide de mercapto-éthanol.</p>	<p>LIF 488 nm ou 532 nm</p>	<p>[54], [75]</p>

Marqueur	Procédure de dérivation	Détection	Références
<p>FQ</p>  <p><i>Structure FQ</i></p>	<p>9 <math>\mu\text{L}</math> de protéine à une concentration <math>3 \times 10^{-5} \text{M}</math> et 1 <math>\mu\text{L}</math> de NaCN à une concentration de 20 mM sont ajoutés à 50 nmol d'une solution de FQ. La réaction s'effectue à 25°C pendant 15 min et à 65°C pendant 3 min puis stoppée dans un bain de glace. Le protocole de marquage est plus rapide qu'avec le 5-TAMRA-SE. Le colorant est fluorogénique ce qui évite l'étape de purification</p>	LIF 488 nm	[76], [77]
<p>NBD-F</p>  <p><i>Structure NBD-F</i></p>	<p>300 à 700 <math>\mu\text{L}</math> de protéine à 1 mg/mL sont mélangés à 300 à 600 <math>\mu\text{L}</math> de solution de NBD-F à 0,2 mg/mL. Le mélange est chauffé 5 min à 50°C. 1 mL de tampon (0.1M Tris à pH 8,1, 5% 2-mercapto-éthanol et 2,5% de SDS) est ajouté. Le mélange est chauffé 1 min à 100°C puis refroidit. Le marqueur fluorescent est très sensible à l'environnement hydrophobe (fluorescence peu en milieu aqueux, plus fluorescent en milieu hydrophobe).</p>	LIF 488 nm	[78]

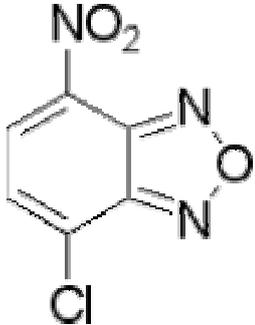
Marqueur	Procédure de dérivation	Détection	Références
NBD-Cl  <i>Structure NBD-Cl</i>	140 µL de protéine à 10 mg/mL sont mélangés à 40 µL de solution de NBD-Cl à 50 mg/mL. Le mélange est chauffé 10 min à 45°C. 600 µL de tampon (5% 2-mercaptoéthanol et 5% SDS) sont ajoutés. Le mélange est chauffé 15 min à 100°C. Ce marqueur a les mêmes propriétés que le précédent, cependant il est moins cher et moins réactif.	LIF 488 nm	[79]
Nano Orange	L'immunoglobuline est incubée avec le marqueur à 90-96°C pendant 10 min puis refroidit naturellement pendant 20 min. Aucune purification n'est effectuée. C'est un marquage non covalent.	LIF 488 nm	[58], [59]

Tableau 7 : le marquage précolonne covalent et non covalent des immunoglobulines

La détection LIF est le mode de détection pour l'électrophorèse capillaire le plus sensible et le plus sélectif. Comme nous l'avons vu, deux détecteurs commerciaux couplés à la CE sont disponibles :

- 1) le détecteur LIF Beckman-Coulter avec deux longueurs d'onde disponibles : 488 nm et 635 nm.
- 2) le détecteur Picometrics avec toute une gamme de lasers disponibles de 266 nm à 780 nm.

Hunt et *al* [54] utilisent le détecteur LIF Beckman-Coulter couplé à la CE afin d'analyser un anticorps monoclonal thérapeutique. Le 5-TAMRA.SE est utilisé comme marqueur. La procédure de marquage est décrite dans le tableau 7. La *figure 37* montre l'analyse du rMab marqué au 5-TAMRA.SE par CE-SDS-NGS détection LIF (laser argon 488 nm) et par SDS-PAGE. Les conditions d'analyses sont décrites *figure 37*. Il existe une bonne corrélation entre les bandes du gel SDS-PAGE et les différents pics obtenus par CE-

SDS-NGS (LIF). A l'exception du pic n°3, tous les pics sont attribués. Les pics n°2 et 4 correspondent respectivement à la chaîne légère et lourde ; cette attribution est vérifiée par l'analyse de l'échantillon réduit. La limite de détection sur le pic principal est de 9,4 ng/mL. Cependant, cette LOD n'est pas explicitement démontrée.

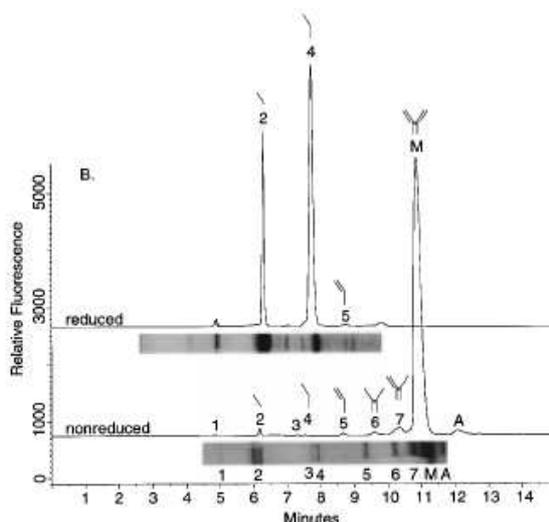


Figure 37 : Séparations CE-SDS-NGS de rMAB marqués au 5-TAMRA. SE. M, monomère ; A, agrégat. Conditions : CE Bio-Rad BioFocus 3000, tampon Biorad SDS, capillaire de silice fondue 50  $\mu\text{m}$  ID et 375  $\mu\text{m}$  OD, longueur totale 24 cm, longueur effective 19,5 cm ; injection – 10kV pendant 15s détection LIF avec un laser ion argon (3,5 mW), excitation 488 nm, émission 560 +/- 20 nm [51]

Cette méthode est utilisée dans le but de détecter des impuretés. Ces impuretés peuvent provenir de contaminations lors de la fabrication du médicament. Donc, une protéine recombinante est ajoutée à l'échantillon à 0,5, 1 et 5 %. Le pic correspondant à la protéine avec un taux de 0.05 % peut être détecté. [54]

Un autre marqueur, le FQ, est utilisé par Michels et al [77] pour analyser également par CE-SDS-NGS (détection LIF) un anticorps. L'analyse est réalisée avec un LIF Beckman et un laser avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et une longueur d'onde d'émission à  $600 \pm 15$  nm. L'échantillon est injecté à –10 kV pendant 10 s. Le FQ réagit avec les amines des lysines en présence d'un excès de cyanure pour former des dérivés stables protéine-FQ. Les auteurs optimisent la méthode de marquage en faisant varier le rapport molaire marqueur/protéine (D/P). La méthode CE-SDS-NGS est utilisée pour caractériser un rMAB marqué au FQ non réduit. La LC/ESI-MS est utilisée pour déterminer le nombre de site de marquage avec différents rapports FQ/protéine (D/P).

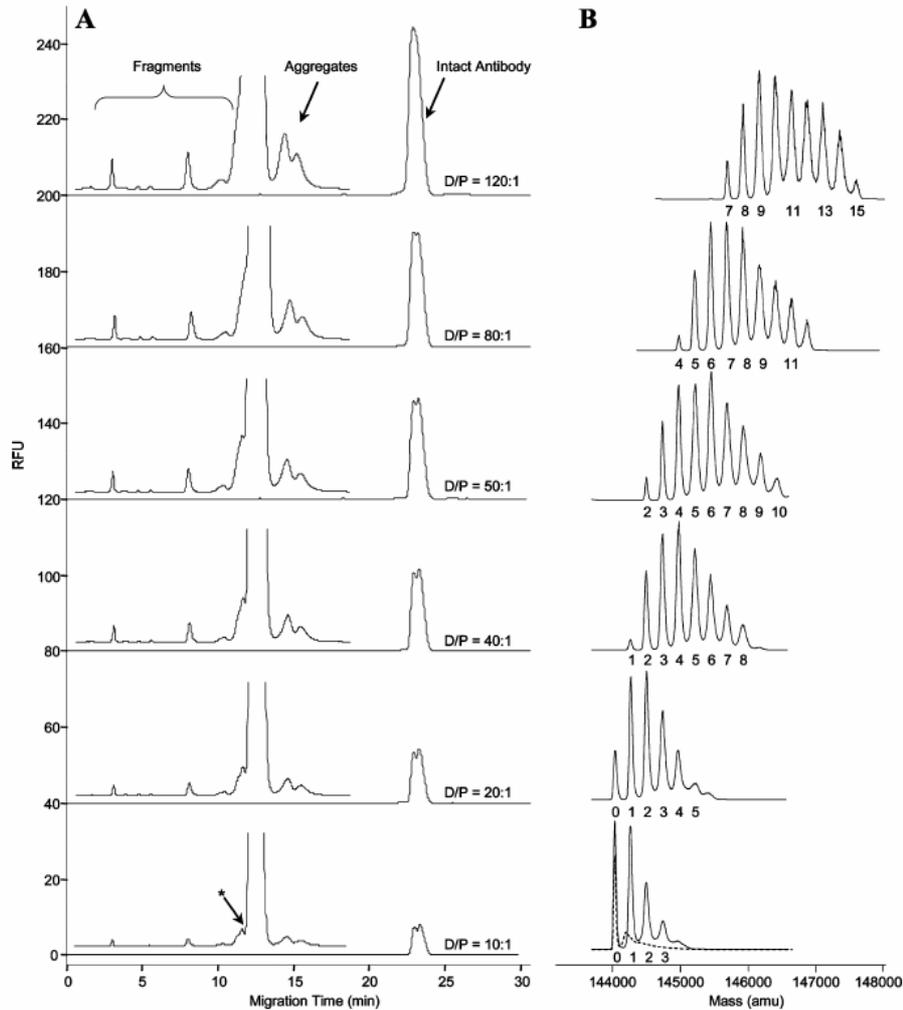


Figure 38 : (A) Séparation CE-SDS d'un échantillon rMAb marqué au FQ non réduit préparé avec différents rapports molaires D/P ; l'astérisque montre le pic utilisé pour étudier la résolution. (B) Spectre de masse d'un rMAb marqué au FQ et déglycosolé. Les pics montrent le nombre de FQ par molécule de rMAb [77]

La figure 38 représente l'analyse d'un rMAb marqué au FQ et préparé avec différents D/P allant de 10 :1 à 120 :1. Cette analyse montre des pics mineurs qui correspondent à des masses variables d'anticorps et à des agrégats. Lorsque l'échantillon est préparé avec un rapport molaire D/P de 10:1, le rMAb présente 1 à 3 sites de marquage. Lorsque le rapport D/P est de 20:1, le nombre de sites de marquage est de 1 à 5. Le passage d'un rapport 10:1 à 20:1 entraîne une augmentation de l'aire du pic principal d'un facteur 1,7. La fluorescence continue d'augmenter lorsque le rapport D/P augmente. Le degré de marquage influence également la résolution. Lorsque le nombre de sites de marquage augmente, la largeur du pic principal augmente entraînant une diminution de la résolution. Cette méthode offre donc une

bonne flexibilité : quand la sensibilité est recherchée, un rapport D/P élevé est utilisé ; au contraire, lorsque la résolution est recherchée, un rapport D/P plus faible doit être utilisé. Le rapport D/P 50 :1 est un bon compromis entre sensibilité et résolution. Sous ces conditions, la sensibilité atteinte est équivalente à celle obtenue avec le 5-TAMRA-SE soit 10 ng/mL.

D'autres procédures de marquage, moins répandues, sont décrites dans la littérature comme l'utilisation de la protéine G marquée à la fluoresceine isothiocyanate (FITC) ou l'utilisation de la doxorubicine :

La protéine G-FITC est utilisée pour marquer une immunoglobuline de sérum humain (h-IgG) par Relf et *al* [79]. La protéine G-FITC réagit avec les fragments Fc de l'h-IgG. La protéine G réagit seulement avec l'IgG humain (h-IgG) et ne se lie pas avec les autres immunoglobulines IgA ou IgM. L' h-IgG peut donc être directement quantifiée dans le sérum humain. La détection LIF est utilisée avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm et une longueur d'onde d'émission à 520 nm. La formation du complexe protéine G-FITC et h-IgG dépend de la concentration des deux protéines. En utilisant le complexe protéine G-FITC en excès, la limite de détection atteinte est de  $10^{-8}$  M. La région Fab de l'immunoglobuline est capable de se lier à un antigène spécifique. Donc l'h-IgG marquée avec le complexe protéine G-FITC peut être utilisée pour quantifier par fluorescence induite par laser des antigènes dans une matrice complexe.

La doxorubicine (médicament anti-cancéreux) est utilisée par Liu et *al* [80] pour analyser un anticorps BR96 par CE-SDS-NGS (détection UV et LIF). Le tampon utilisé est le gel Beckman. Les premières analyses sont réalisées avec une détection UV. L'analyse du BR96-DOX montre un pic avec un temps de migration de 21,1 min et une masse de 154 kDa. Le même échantillon dénaturé présente 6 pics. Si la réduction avait été totale, l'analyse aurait montré seulement deux pics : la chaîne légère et la chaîne lourde. Donc la dénaturation n'est pas totale ; les pics sont L (31 kDa), H (50 kDa), 1H et 1L (79 kDa), 2H (100 kDa), 2H et 1L (125 kDa), 2H et 2L (154 kDa). L'analyse est ensuite réalisée avec une détection LIF. Excitée à 490 nm, la DOX émet une fluorescence native à 550 nm. L'analyse est effectuée avec un laser 488 nm. L'analyse du BR96-DOX dénaturé montre seulement 5 pics. Le pic à 21 min a disparu car il correspond au BR-96 intact. Cette technique peut donc être utilisée pour contrôler le processus de conjugaison entre le BR96 et le DOX.

La méthode CE-LIF a été également utilisée pour déterminer le poids moléculaire d'anticorps à l'aide de marqueurs de taille. Mais cette technique présente des limites comme le montre Klyushnichenko et *al* [81]. Ils analysent par CGE-LIF différentes protéines d'un

surnagent de cultures cellulaires. Une courbe de calibration de taille est réalisée pour des protéines de 14 à 200 kDa :

$$\text{Masse moléculaire (kDa)} = f(t/t_0)$$

$t$  = temps de migration de la protéine

$t_0$  = temps de migration du marqueur : Orange G

La courbe de calibration est semi-linéaire et les auteurs indiquent que les protéines sont différentes en terme de charges, d'hydrophobicité, de structure et de composition (glycoprotéines). Elles interagissent donc différemment sur les molécules de SDS, les polymères, la surface du capillaire. Tous ces paramètres affectent leur temps de migration en solution polymère-SDS.

La méthode CE-LIF permet d'atteindre une meilleure sensibilité que la détection UV. Cette sensibilité est comparable à la méthode SDS-PAGE avec une détection coloration à l'argent. L'inconvénient de cette méthode est l'étape de marquage avant l'analyse, qui peut être contournée par l'utilisation du nano-orange.

La chromatographie liquide peut également être utilisée pour analyser des anticorps ; cette méthode est moins répandue que l'électrophorèse et fait l'objet du paragraphe suivant.

### **2.2.3.2. La chromatographie liquide**

L'HPLAC (chromatographie liquide d'affinité haute performance) a aussi été utilisée quelquefois pour la séparation des anticorps monoclonaux.

Par exemple, on peut citer les travaux de Ohlson et al [82]. Ils utilisent la protéine A pour l'analyse des immunoglobulines. La protéine A se lie de manière spécifique aux régions Fc des immunoglobulines. La protéine A est donc liée chimiquement aux microparticules de silice de la colonne. L'HPLAC avec la protéine A immobilisée permet la séparation des IgG. Une augmentation du pH et de la force ionique permet d'analyser l'IgG1. L'absorbance à 280 nm permet d'atteindre une limite de détection de 0,5 à 1 µg/mL. La protéine G peut également être utilisée [83-84] et permet de gagner en efficacité de séparation par rapport à la protéine A.

Moorhouse et al [85] ont mis au point une méthode de contrôle qualité d'un anticorps monoclonal recombinant (IDEC-C2B8) en utilisant la chromatographie haute performance échangeuse de cations. Le Mab est fragmenté en Fab et Fc par la papaïne. Une colonne PL-SCX est utilisée. Les points isoélectriques des fragments Fc et Fab sont respectivement 7,1 et 9,1. A pH 6, les deux fragments ont une charge positive et adhèrent aux charges négatives de

la matrice échangeuse de cations. Ils sont élués par un gradient de sels. A 280 nm, la limite de détection obtenue est de 0,2 µg et 0,1 µg pour les fragments Fc et Fab.

La spectrométrie de masse peut être aisément couplée à la LC afin de déterminer le poids moléculaire d'impuretés présentes lors de l'analyse d'une immunoglobuline. Tous et *al* [86] caractérisent par LC-MS un fragment de 92 kDa détecté lors de l'analyse d'une IgG1 réduite. L'IgG1 réduite est séparé par « size exclusion chromatography » (SEC) en utilisant une phase mobile contenant 6 mM de guanidine. Un premier pic est détecté à 12 min puis la chaîne lourde à 12,9 min et la chaîne légère à 15,4 min. Ce premier pic est analysé par LC-ESI-MS. Cette analyse permet de caractériser ce fragment de 92 kDa : il correspond à la liaison thioéther (non réductible par un agent réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol par exemple)) entre la Cys-223 de la chaîne lourde et la Cys-213 de la chaîne légère.

En conclusion, le succès croissant des anticorps monoclonaux pour le traitement de certains cancers et des maladies inflammatoires nécessite un contrôle qualité de produits pharmaceutiques rapide et sensible (identification, pureté, et stabilité du produit...). Nous venons de citer les différentes techniques analytiques permettant ce contrôle et particulièrement l'émergence de l'électrophorèse capillaire. La méthode SDS-PAGE était la principale méthode utilisée par les laboratoires pharmaceutiques. Cependant, cette technique est longue et non automatisée. Donc, la technique SDS-PAGE est transposée à l'électrophorèse capillaire avec une détection UV ou LIF. La détection UV présente l'avantage d'être une méthode directe. Cependant, la sensibilité de cette méthode est une limitation. La LOD atteinte est d'environ 500 ng/mL [54] soit une sensibilité équivalente au bleu de Coomassie et 50 fois inférieure à la coloration à l'argent. La détection LIF permet de gagner en sensibilité. Une limite de détection de 9,4 ng/mL est atteinte pour un rMAb marqué au TAMRA. [54]. L'inconvénient de cette technique est l'étape de marquage que nombre de compagnies pharmaceutiques se refusent d'utiliser.

L'objectif de mon travail est donc d'analyser des IgG par CE/LIF (Picometrics). Une méthode d'analyse sera développée à 488 nm et 532 nm pour l'analyse de rMAb marqués au TAMRA. La limite de détection sera déterminée. Afin d'éviter toute étape de marquage et afin de gagner en sensibilité par rapport à l'UV, une seconde méthode utilisant la fluorescence native sera développée à 266 nm.

**3.      *Développement d'un nouvel  
arrangement optique permettant d'intégrer  
la détection de fluorescence induite par  
laser à l'intérieur de l'électrophorèse  
capillaire***

En 1999, à partir d'un brevet de Léon Carlsson, un montage optique du détecteur de fluorescence a été développé pour l'électrophorèse capillaire [87]. Dans ce montage, une lampe deutérium via une fibre optique éclaire directement la fenêtre de détection. La fluorescence émise est récoltée par un demi-ellipsoïde en saphir fixé au niveau de la fenêtre de détection du capillaire par une goutte de glycérol. Les deux problèmes majeurs de ce montage sont l'alignement de la fibre optique avec le capillaire et l'évaporation du glycérol. L'utilisation de ce système est donc excessivement délicate.

Afin de remédier à ces problèmes, un nouveau montage optique a été développé : une bille a été utilisée afin de focaliser la fluorescence dans le capillaire et une interface capillaire/demi-ellipsoïde a été réalisée par un polymère réticulé in situ afin de collecter la fluorescence [11, 12, 13, 14]. L'optimisation et la validation de ce nouveau montage optique sont décrites ci-dessous.

### 3.1. Présentation du nouveau montage optique

La figure 39 représente notre nouveau montage optique. Le faisceau laser est focalisé à l'intérieur de la bille et permet d'illuminer le diamètre interne du capillaire. La fluorescence émise est réfléchiée à l'intérieur du capillaire. Le demi-ellipsoïde collecte la fluorescence et la focalise sur une fibre cœur liquide. La fluorescence passe à travers une série de filtres puis arrive au PMT.

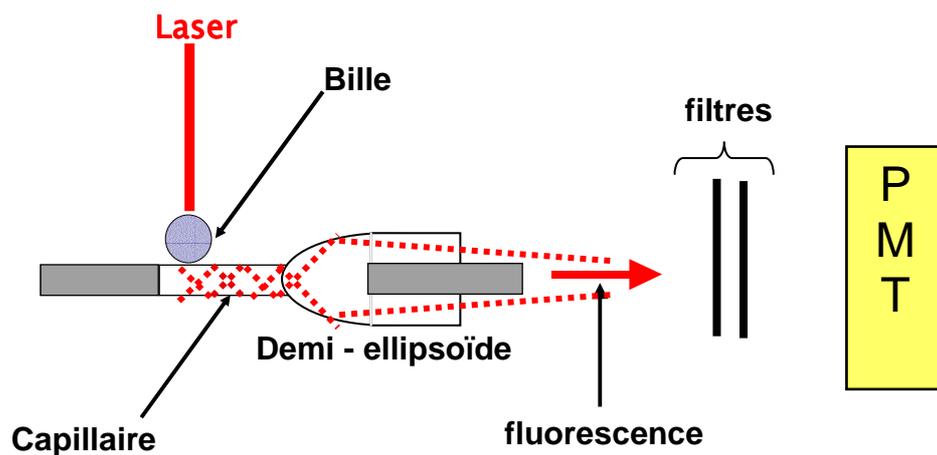


Figure 39 : Montage optique avec demi- ellipsoïde

### 3.2. Le demi ellipsoïde

L'image 40 ci-dessous montre le demi-ellipsoïde positionné sur un capillaire avec la fenêtre de détection.

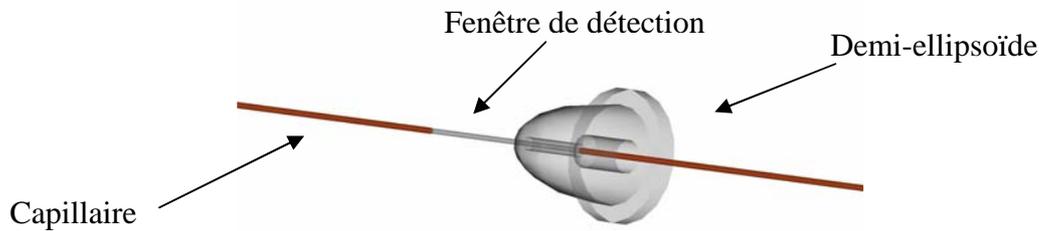


Figure 40 : Demi-ellipsoïde collé sur le capillaire

L'équation de l'ellipsoïde est la suivante :

$$(x/a)^2 + (y/b)^2 = 1 \text{ avec } a^2 = c^2 + b^2$$

avec, x = axe du capillaire, y et z axes orthogonaux à x

a = demi grand axe

b = demi axe moyen

c = demi distance entre les deux points focaux de l'ellipsoïde.

Un ellipsoïde a la propriété optique suivante : tout rayon lumineux issu d'un foyer d'un ellipsoïde et se réfléchissant sur le bord de cet ellipsoïde passe par l'autre foyer de l'ellipsoïde. Le demi-ellipsoïde, grâce à une continuité optique, est utilisé afin de collecter la fluorescence et de la focaliser vers la fibre cœur liquide (fibre de collection). Dans ce montage, b = 3 mm et c = 7 mm. Nous avons fixé arbitrairement ces distances afin d'avoir un demi-ellipsoïde assez « grand » pour pouvoir récolter au mieux la fluorescence et assez « petit » pour pouvoir intégrer la cellule de détection dans la cassette de l'appareil d'électrophorèse capillaire.

### 3.3. Les Lois de Descartes

Lorsqu'une onde électromagnétique arrive suivant le rayon SI à la surface de séparation de deux milieux d'indices différents  $n_1$  et  $n_2$  : *figure 41*

- une partie de l'énergie lumineuse se réfléchit suivant le rayon IR, dans le même milieu,
- le reste est transmis ou réfracté suivant le rayon IT dans le deuxième milieu d'indice  $n_2$ .

Ces deux phénomènes sont régis par un ensemble de lois : les lois de Descartes.

- **1<sup>ère</sup> loi** : Les rayons réfléchis et réfractés sont dans le plan défini par le rayon incident et la normale à la surface de séparation, appelé plan d'incidence.
- **2<sup>ème</sup> loi** : L'angle d'incidence  $i_1$  est égal à l'angle de réflexion  $i_1'$  :

$$i_1 = i_1' \quad (1)$$

- **3<sup>ème</sup> loi** : Entre les angles d'incidence et de réfraction, il existe la relation :

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2 \quad (2)$$

$n_1, n_2$  sont les indices de réfraction des milieux de propagation des rayons incidents et réfractés ;

$i_1$  est la direction de propagation du rayon incident ;

$i_1'$  est la direction de propagation du rayon réfléchi ;

$i_2$  est la direction de propagation du rayon réfracté.

(2) est appelé loi de Snell ou 3<sup>ème</sup> loi de Descartes.

### 3.3.1. $n_1 < n_2$

Lorsque la lumière passe d'un milieu [1] moins réfringent à un milieu [2] plus réfringent, c'est-à-dire si  $n_1 < n_2$ , d'après la 3<sup>ème</sup> loi des DESCARTES on a :

$$\sin i_2 = n_1/n_2 \sin i_1$$

$$\sin i_2 < \sin i_1$$

$$i_2 < i_1$$

Il existe toujours un rayon réfracté, la lumière peut dans tous les cas changer de milieu de propagation.

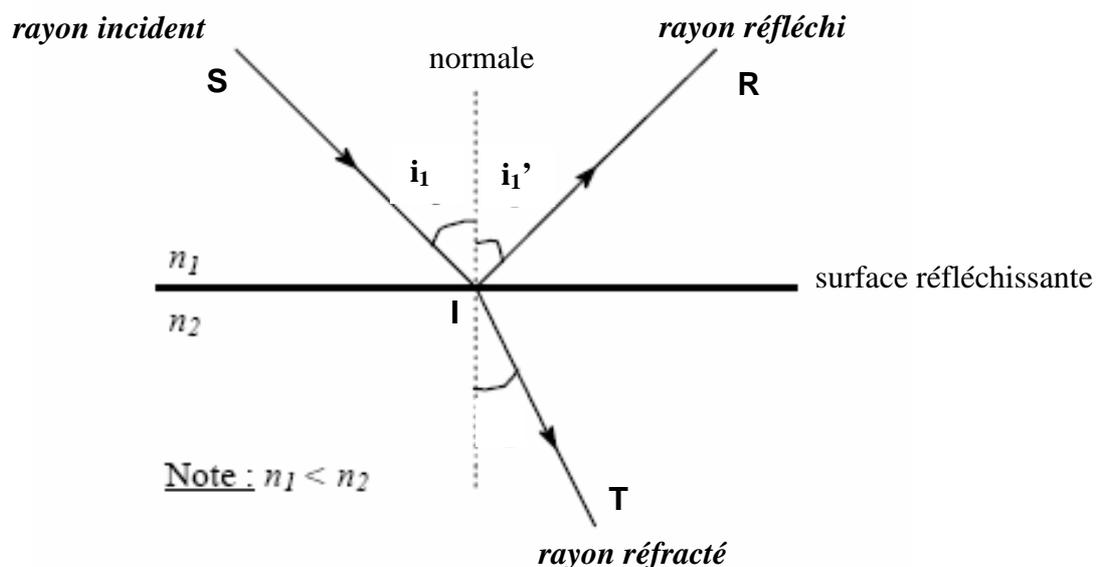


Figure 41 : réflexion et réfraction de la lumière [88]

### 3.3.2. $n_1 > n_2$

Lorsque la lumière passe d'un milieu plus réfringent [1] à un milieu moins réfringent [2] ( $n_1 > n_2$ ), il y a un angle maximal, appelé angle critique, pour lequel il peut y avoir un rayon réfracté *figure 42*. Si l'angle d'incidence est plus grand que l'angle critique, il n'y a pas de rayon réfracté. L'angle de réfraction  $i_2$  devient égal à  $90^\circ$  si l'angle d'incidence  $i_1$  prend la valeur de l'angle de réfraction critique  $i_c$  :

$$\begin{aligned} i_1 &= i_c & n_1 \sin i_c &= n_2 \sin 90^\circ = n_2 \\ i_2 &= 90^\circ & i_c &= \text{arc sin } (n_2/n_1) \end{aligned}$$

où  $i_1, i_2$  sont les angles des rayons incident et réfracté ici exprimés en degrés  
 $i_c$  est l'angle critique en degrés  
 $n_1, n_2$  sont les indices de réfraction des milieux de propagation des rayons incident et réfracté

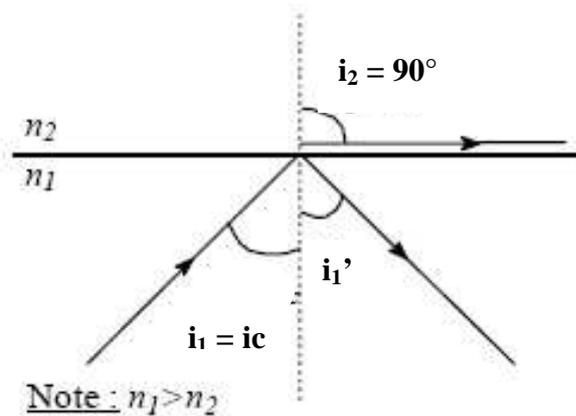


Figure 42 : angle critique  $i_c$  [88]

Les rayons qui arrivent sous un angle d'incidence supérieur à  $i_c$  ne peuvent être réfractés : ils subissent une réflexion totale et la surface de séparation des deux milieux se comporte alors comme un miroir parfait.

### 3.4. Application de la loi de Descartes au montage optique avec demi-ellipsoïde

D'après la 3<sup>ème</sup> loi de Descartes,  $n_1 \sin a_1 = n_2 \sin a_2$

Dans le montage optique avec demi-ellipsoïde,

$n_1$  correspond à l'indice de réfraction de la silice,  $n_1 = 1,33$

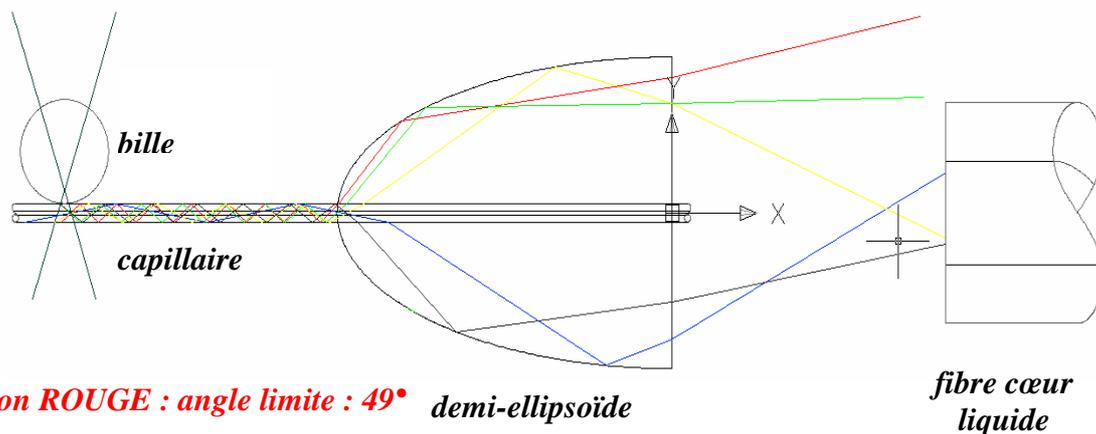
$n_2$  correspond à l'indice de réfraction de l'air,  $n_2 = 1$

donc,  $1,33 \sin a_1 = \sin a_2$

La fluorescence passe donc d'un milieu plus réfringent  $n_1$  à un milieu moins réfringent  $n_2$ .

D'après l'équation (2), l'angle critique est donc de  $49^\circ$ .

Tout rayon lumineux de fluorescence ayant un angle incident supérieur à  $49^\circ$  est réfléchi totalement à l'intérieur du capillaire. Tout rayon ayant un angle incident inférieur à  $49^\circ$  est réfracté et n'est pas collecté par la bille.



**rayon ROUGE : angle limite :  $49^\circ$  demi-ellipsoïde**

**rayon vert : angle d'incident  $52^\circ$**

**rayon gris : angle incident  $55^\circ$**

**rayon jaune : angle incident  $65^\circ$**

**rayon bleu : angle incident  $80^\circ$**

Figure 43 : Propagation de la fluorescence à l'intérieur du capillaire et du demi-ellipsoïde

Dans la figure 43, le rayon rouge correspond au rayon ayant un angle d'incidente égal à l'angle critique ( $49^\circ$ ). Ce rayon est donc réfléchi plusieurs fois à l'intérieur du capillaire. L'indice de réfraction de l'interface entre le capillaire et le demi-ellipsoïde étant supérieur à l'indice de réfraction du capillaire et inférieur à l'indice de réfraction du demi-ellipsoïde, le

rayon traverse la colle puis le demi-ellipsoïde. A la sortie du demi-ellipsoïde, le rayon étant divergent, il n'est pas récolté par la fibre cœur liquide.

Le rayon vert ayant un angle d'incidence de  $52^\circ$  est à la sortie du demi-ellipsoïde pratiquement parallèle à l'axe du capillaire. Alors que les rayons gris, jaune et bleu (angle d'incidence respectivement de  $55^\circ$ ,  $65^\circ$  et  $80^\circ$ ) sont collectés par la fibre cœur liquide.

Les distances bille – demi ellipsoïde et demi-ellipsoïde – fibre cœur liquide sont très importantes et seront optimisées dans le paragraphe 3.5.5.

### 3.5. Optimisation et validation du montage optique

#### 3.5.1. Présentation du montage avec deux PMT

Afin de valider et d'optimiser le montage optique avec le demi-ellipsoïde, ce dernier est comparé au montage colinéaire que nous avons décrit dans le paragraphe 2.1.6.1.2. Un détecteur prototype avec deux PMT a donc été fabriqué *figure 44*. Le faisceau laser est collecté par une fibre optique puis orienté vers un miroir dichroïque. Le faisceau laser est alors réfléchi vers un objectif de microscope puis focalisé à l'intérieur de la bille. La fluorescence émise par la solution à l'intérieur du capillaire est alors récoltée par deux PMT différents :

- le PMT1 récolte la fluorescence émise de manière colinéaire ;
- le PMT2 récolte la fluorescence qui est réfléchie à l'intérieur du capillaire puis récoltée par le demi-ellipsoïde.

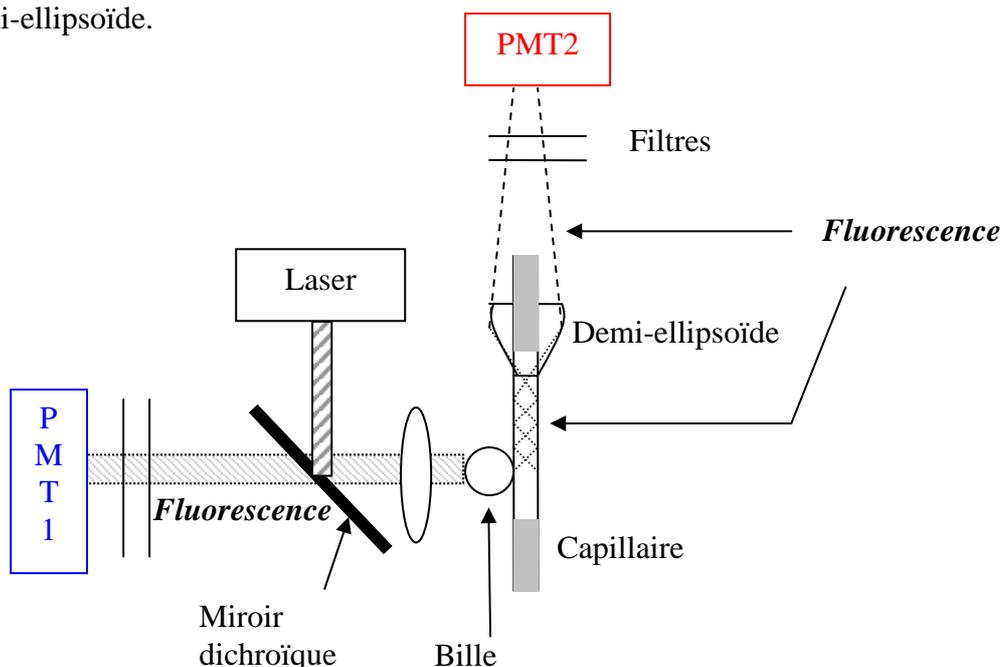


Figure 44 : Montage optique du détecteur avec double PMT

Ce montage optique permet de comparer de manière rigoureuse le montage avec demi-ellipsoïde et le montage colinéaire car l'excitation des molécules à l'intérieur du capillaire est la même dans les deux cas. L'échantillon est donc analysé en même temps par les deux montages. L'acquisition des deux signaux est réalisée simultanément. Ce montage avec double PMT est utilisé par la suite pour optimiser la détection avec le demi-ellipsoïde.

### **3.5.2. Choix de l'interface capillaire /demi-ellipsoïde**

Un polymère est utilisé afin de fixer le demi-ellipsoïde sur le capillaire. Ce dernier doit répondre à différentes contraintes :

- il doit transmettre la fluorescence de 266 nm à 780 nm.
- il doit assurer la continuité optique entre le capillaire et le demi-ellipsoïde. Pour cela, il doit avoir un indice de réfraction supérieur à celui de la silice et inférieur à celui du matériau de l'ellipsoïde.
- il doit être facile à positionner.

Différentes interfaces ont été testées. Nous ne les évoquons pas pour des raisons de confidentialité. La technologie du polymère vinylique polymérisant aux UV est choisie car ils transmettent les rayons UV.

Le polymère retenu a un indice de réfraction de l'ordre de 1.4. Cet indice de réfraction permet la continuité optique entre le capillaire et le demi-ellipsoïde. La viscosité est aux alentours de 8000 cps. Cette viscosité est un bon compromis ; en effet, le polymère n'est pas trop fluide et ne coule pas en dehors du demi-ellipsoïde ; de plus, cette viscosité permet d'introduire facilement le polymère dans le demi-ellipsoïde.

### **3.5.3. Choix du matériau du demi-ellipsoïde**

Le demi-ellipsoïde doit également répondre à différentes contraintes :

- laisser passer la fluorescence de 266 nm à 780 nm.
- sa géométrie doit respecter l'équation  $\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1$  et  $a^2 = c^2 + b^2$
- son indice de réfraction doit être supérieur à l'indice de réfraction de la colle soit 1.4

Différents matériaux polymères sont testés. Un premier matériau est choisi. Il présente un indice de réfraction de 1.5. Cependant il laisse peu passer la longueur d'onde 266 nm. La

figure 45 représente le spectre d'absorbance de ce matériau : ce matériau transmet très bien les longueurs d'onde au-delà de 400 nm.

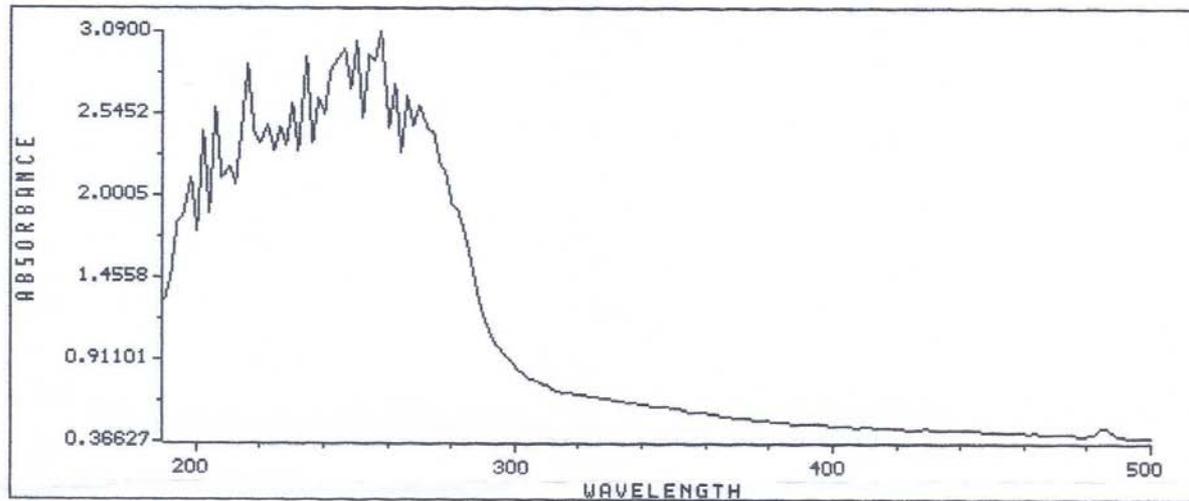


Figure 45: Spectre d'absorbance du matériau du demi-ellipsoïde utilisé dans le visible

### 3.5.4. Alignement du capillaire à l'intérieur du demi-ellipsoïde

Le bon positionnement du demi-ellipsoïde et du capillaire est primordial avant polymérisation afin d'avoir le meilleur rendement de collection.

Le demi-ellipsoïde et le capillaire doivent donc être coaxiaux.

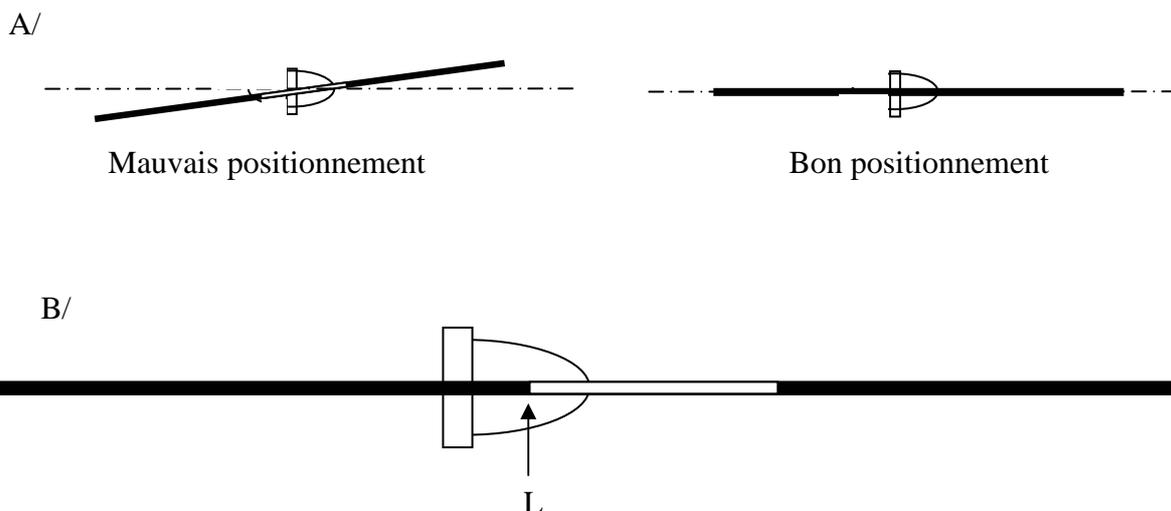


Figure 46 : Positionnement du demi-ellipsoïde sur le capillaire A/ Demi-ellipsoïde coaxial avec le capillaire ; B/ Positionnement du polyimide dans le demi-ellipsoïde

La limite L (limite entre le polyimide et la fenêtre de détection) doit se situer au centre du demi-ellipsoïde.

Un mauvais positionnement de cette limite peut entraîner une rupture du capillaire lors de sa flexion ou une mauvaise propagation de la fluorescence. Un appareillage permettant la polymérisation et un bon positionnement du capillaire a été développé par le service Recherche et Développement de Picometrics.

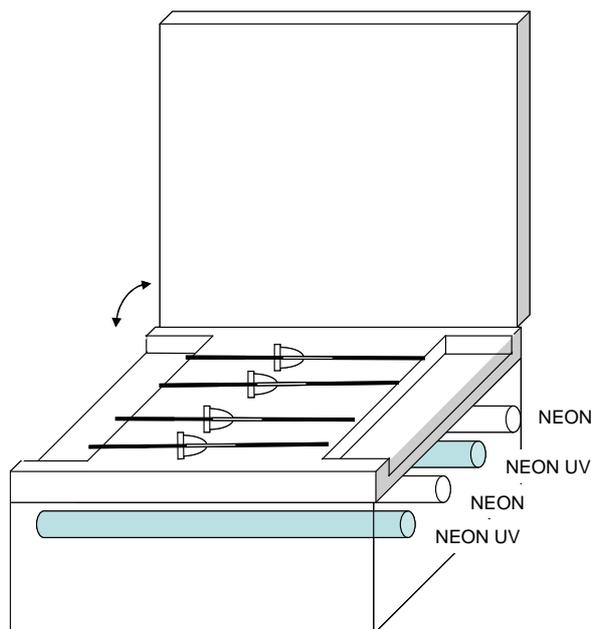


Figure 47 : Appareillage lumineux permettant le collage des demi-ellipsoïdes

Cet outil permet le collage de 7 demi-ellipsoïdes en même temps. Les néons normaux permettent de visualiser la limite L des demi-ellipsoïdes. Les néons UV permettent de polymériser l'interface capillaire/demi-ellipsoïde.

### 3.5.5. Détermination des distances

Afin de récolter un maximum de fluorescence, les distances bille-demi ellipsoïde et demi ellipsoïde-fibre de collection ont été optimisées par une approche progressive.

#### 3.5.5.1. Instrumentation

L'électrophorèse capillaire HPCE Agilent est utilisée avec le détecteur de fluorescence induite par laser avec double PMT décrit dans la partie 2.1. Les expériences sont réalisées avec un laser argon 488 nm (puissance = 25mW, Crystalaser, USA).

### 3.5.5.2. Conditions expérimentales

Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm. Une solution de FITC à  $10^{-10}$  M est préparée dans l'eau. Un tampon carbonate/bicarbonate a été utilisé. L'injection est hydrodynamique (50 mbar, 30 s). Le calcul du rapport S/N a été réalisé avec différentes distances bille-demi ellipsoïde et demi ellipsoïde-fibre de collection.

### 3.5.5.3. Détermination de la distance optimale bille-demi ellipsoïde

Afin de déterminer la distance optimale bille – demi ellipsoïde, un prototype de cellule de détection est utilisé ; il permet de modifier cette distance en faisant varier le positionnement du demi-ellipsoïde.

Une solution de FITC à  $10^{-10}$  M est injectée et la distance entre la bille et le demi-ellipsoïde est modifiée. Le rapport signal/bruit est mesuré.

Distance bille-demi ellipsoïde (mm)	S/N PMT1 (montage colinéaire)	S/N PMT2 (montage demi-ellipsoïde)
<b>7</b>	<b>43</b>	<b>45</b>
8	43	40
9	43	36
10	43	30
11	43	21

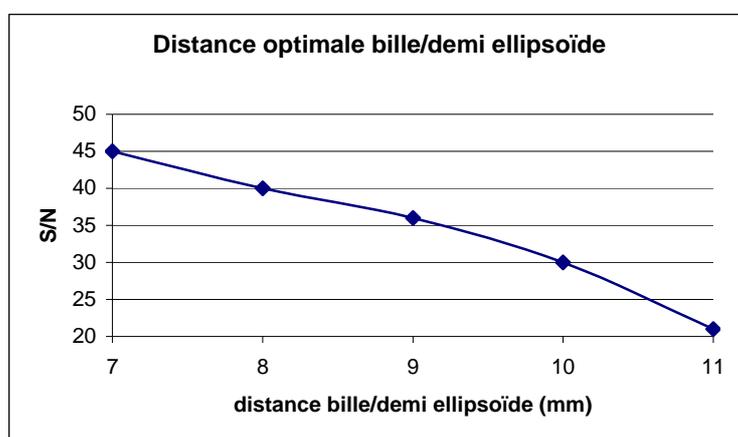


Figure 48 : Variation du rapport S/N en fonction de la distance bille / demi ellipsoïde

La distance optimale déterminée entre la bille et le demi-ellipsoïde est de 7 mm. Plus le demi-ellipsoïde est proche de la bille, plus la sensibilité est grande. Une distance inférieure à 7 mm est impossible à réaliser pour des raisons mécaniques.

### 3.5.5.4. Détermination de la distance optimale demi ellipsoïde-fibre cœur liquide

Afin d'optimiser la distance demi-ellipsoïde - fibre, le même prototype est utilisé ; il permet en outre de modifier cette distance.

Une solution de FITC à  $10^{-10}$  M est injectée et la distance entre le demi-ellipsoïde et la fibre cœur liquide est modifiée. Le rapport signal/bruit est mesuré.

Distance demi ellipsoïde-fibre cœur liquide (mm)	S/N PMT1 (montage colinéaire)	S/N PMT2 (montage demi-ellipsoïde)
<b>6,5</b>	<b>43</b>	<b>45</b>
7,3	43	40
8,3	43	35
9,3	43	32,5
10,3	43	27,5

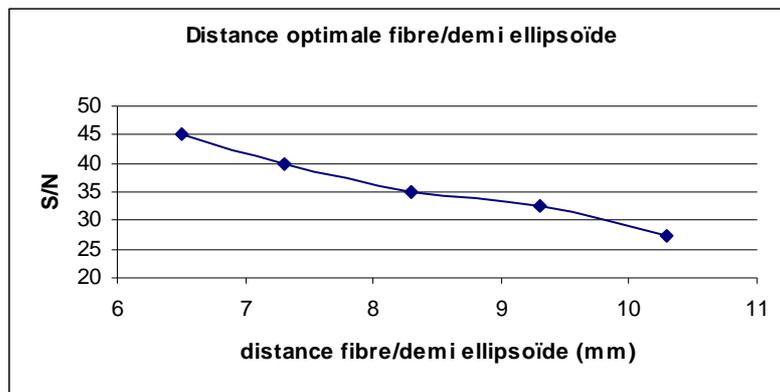


Figure 49 : Variation du rapport S/N en fonction de la distance demi-ellipsoïde / fibre cœur liquide

La distance optimale mesurée entre le demi-ellipsoïde et la fibre cœur liquide est de 6,5 mm. Plus la fibre cœur liquide est proche du demi-ellipsoïde, plus la sensibilité est grande. Une distance inférieure à 6,5 mm est impossible à réaliser pour des raisons là aussi d'encombrement mécanique.

### 3.5.6. Comparaison montage colinéaire/montage demi-ellipsoïde

Le montage décrit au paragraphe 3.5.1 est utilisé pour qualifier le détecteur. Lors de sa commercialisation, le détecteur avec demi-ellipsoïde pourra être proposé avec une gamme de laser allant de 266 nm à 633 nm. De ce fait, chaque longueur d'onde, avec le laser et un marqueur correspondants, doit être validée et comparée au montage colinéaire.

### 3.5.6.1. Tests effectués à 633 nm

Afin de valider la longueur d'onde 633 nm, un test sur le Cy5 est réalisé.

**Conditions d'analyses :** Une solution de Cy5 à  $10^{-9}$  M est injectée à 50 mbar pendant 30 secondes. Un tampon carbonate/bicarbonate 25 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $21 \pm 2$  pour le premier pic et de  $10 \pm 2$  pour le second pic *figure 50A*. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $19 \pm 2$  pour le premier pic et de  $9 \pm 2$  pour le second pic *figure 50B*.

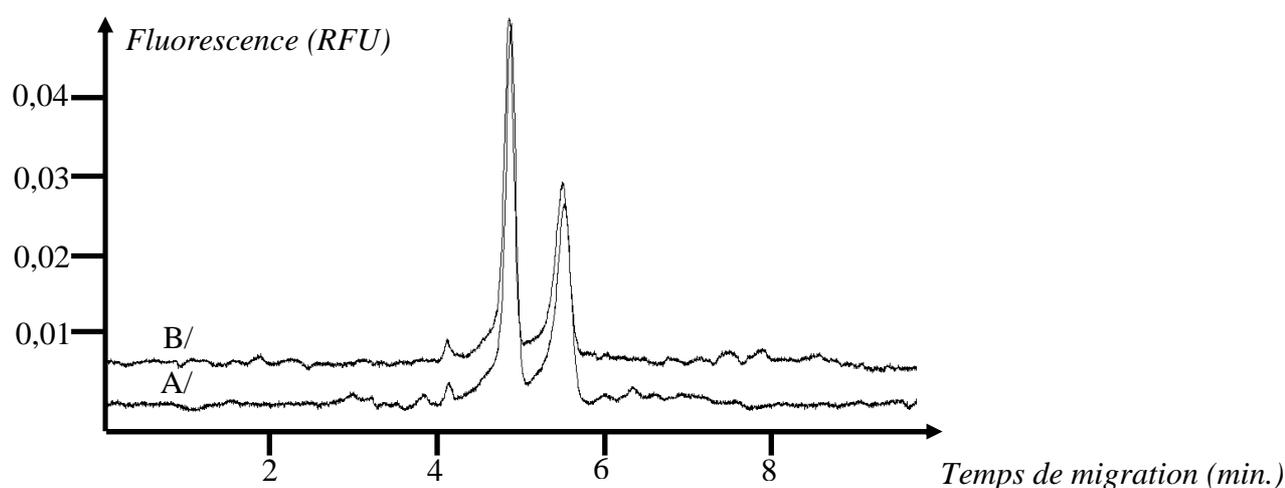


Figure 50 : Analyse du Cy5 à  $10^{-9}$ M A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.

### 3.5.6.2. Tests effectués à 488 nm

Afin de valider la longueur d'onde 488 nm, un test sur le FITC est réalisé.

**Conditions d'analyses :** Une solution de FITC à  $10^{-10}$  M est injectée à 50 mbar pendant 30 secondes. Un tampon carbonate/bicarbonate 25 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $290 \pm 5$  *figure 51A*. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $280 \pm 5$  *figure 51B*. Le montage avec le demi-ellipsoïde présente une ligne de base plus instable que le montage colinéaire.

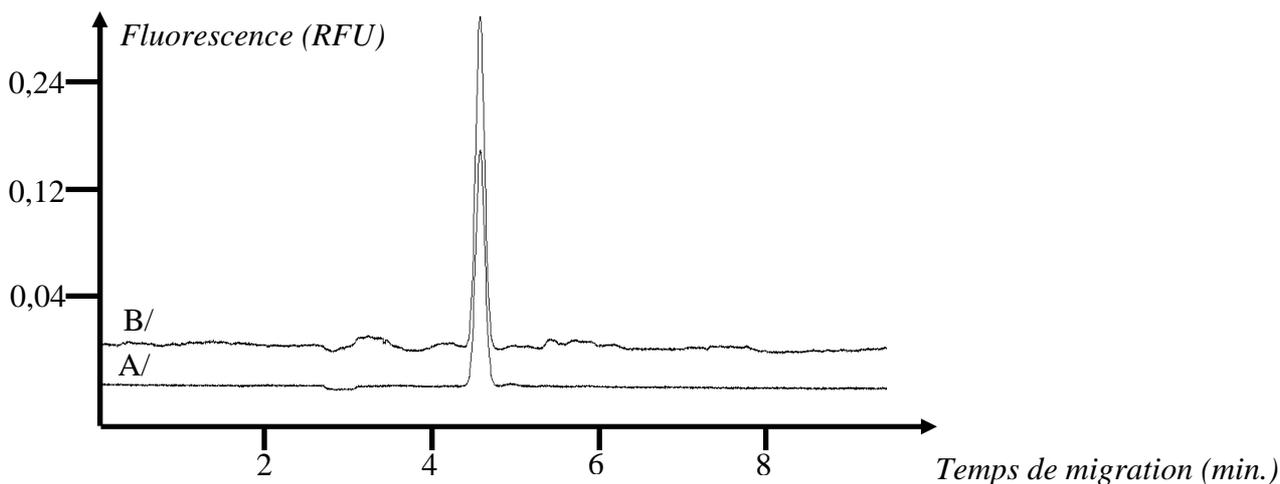


Figure 51 : Analyse du FITC à  $10^{-11}M$  A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.

### 3.5.6.3. Tests effectués à 410 nm

Afin de valider la longueur d'onde 410 nm, un test sur l'acide 7-hydroxycoumarin-3-carboxylique est réalisé.

**Conditions d'analyses :** Une solution d'acide 7-hydroxycoumarin-3-carboxylique à  $10^{-10} M$  est injectée à 50 mbar pendant 30 secondes. Un tampon carbonate/bicarbonate 25 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $30 \pm 2$  figure 52A. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $36 \pm 2$  figure 52B.

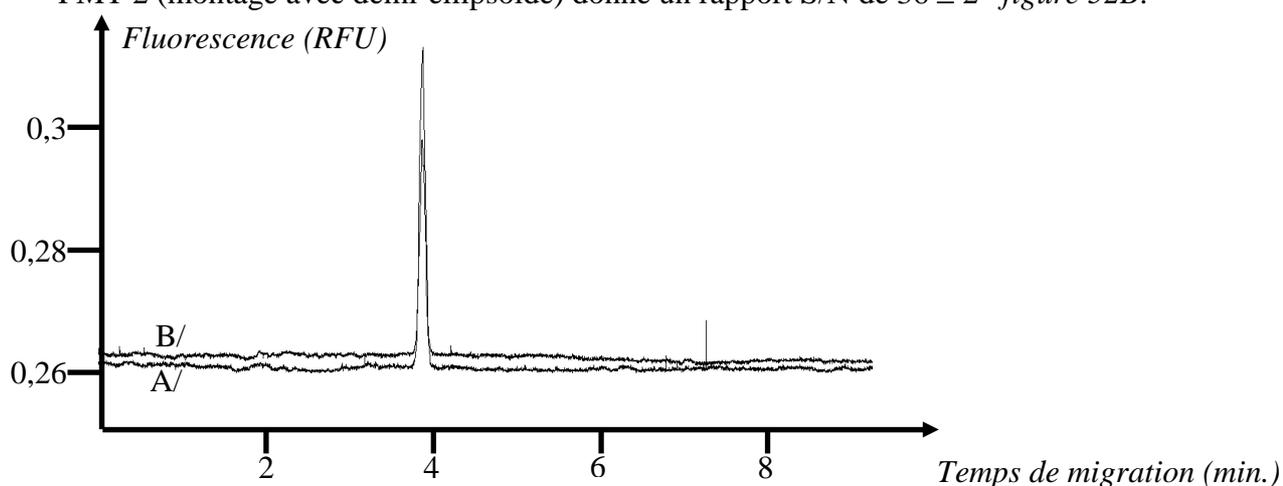


Figure 52 : Analyse de l'acide 7-hydroxycoumarin-3-carboxylique à  $10^{-10}M$  A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.

#### 3.5.6.4. Tests effectués à 325 nm

Afin de valider la longueur d'onde 325 nm, un test sur l'umbelliféron est réalisé.

**Conditions d'analyses :** Une solution d'umbelliféron à  $5 \times 10^{-10}$  M est injectée à 50 mbar pendant 30 secondes. Un tampon phosphate 50 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $19 \pm 2$  *figure 53A*. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $20 \pm 2$  *figure 53B*.

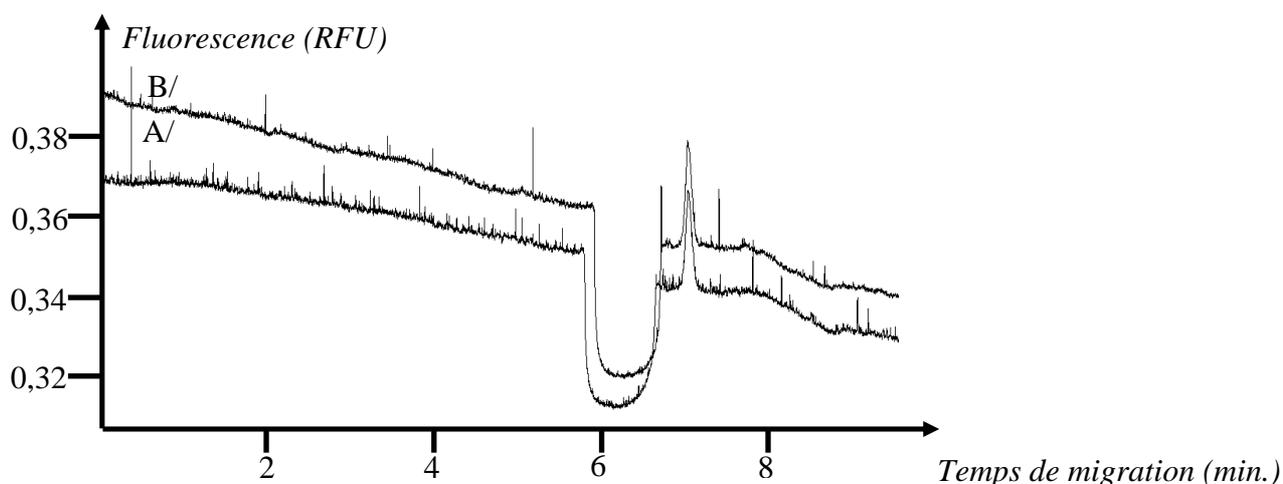


Figure 53 : Analyse de l'umbelliféron à  $10^{-10}$  M A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.

#### 3.5.6.5. Tests effectués à 266 nm

Afin de valider la longueur d'onde 266 nm, un test sur le tryptophane est réalisé.

**Conditions d'analyses :** Une solution de tryptophane à  $10^{-7}$  M est injectée à 50 mbar pendant 30 secondes. Un tampon phosphate 20 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 65 cm, et une longueur effective de 50 cm.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $130 \pm 3$  *figure 54A*. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $15 \pm 2$  *figure 54B*.

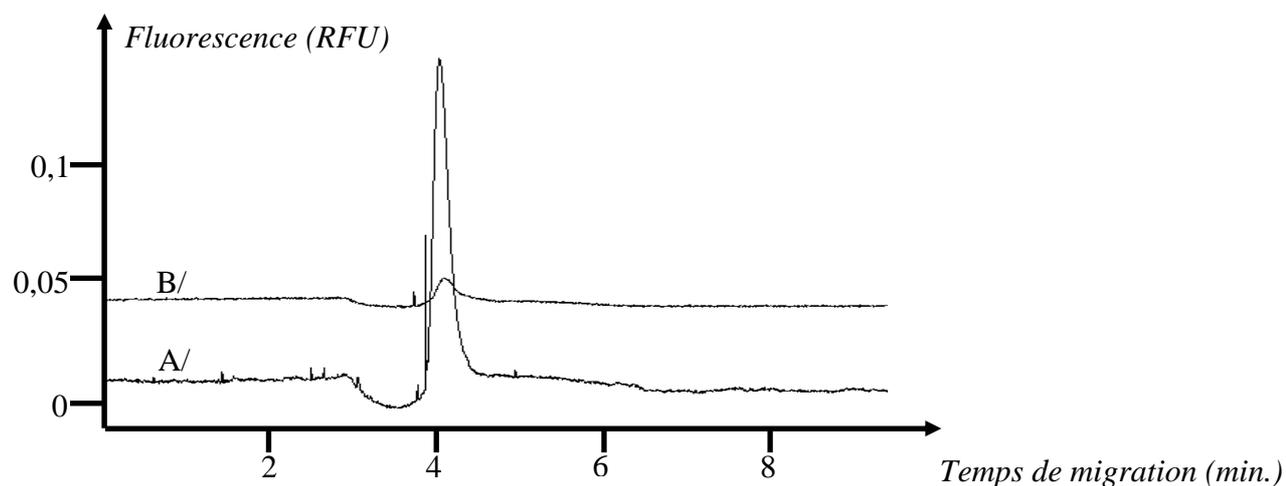


Figure 54 : Analyse du tryptophane à  $10^{-7} M$  A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.

### 3.5.6.6. Conclusion

Le tableau 8 résume l'ensemble des tests effectués avec les deux montages optiques.

Longueur d'onde / marqueur	LOD (pM, S/N=3) avec le montage colinéaire	LOD (pM, S/N=3) avec le montage avec demi-ellipsoïde
<b>266 nm</b> tryptophane	<b>2 300</b>	<b>20 000</b>
<b>325 nm</b> Umbelliferone	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>410 nm</b> 7-hydroxycoumarin-3- carboxylic acid	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>488 nm</b> FITC	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>633 nm</b> Cy5	<b>310</b>	<b>310</b>

Tableau 8: Limites de détection obtenues à différentes longueurs d'onde avec les deux montages optiques

Avec les deux montages optiques, les LOD sont très proches. Pour la longueur d'onde 266 nm, le montage avec demi-ellipsoïde est 9 fois moins sensible : cette différence est due à la difficulté de transmission des longueurs d'onde UV du demi-ellipsoïde et de la fibre cœur liquide. Hormis la longueur d'onde 266 nm, les sensibilités atteintes par les deux montages sont comparables.

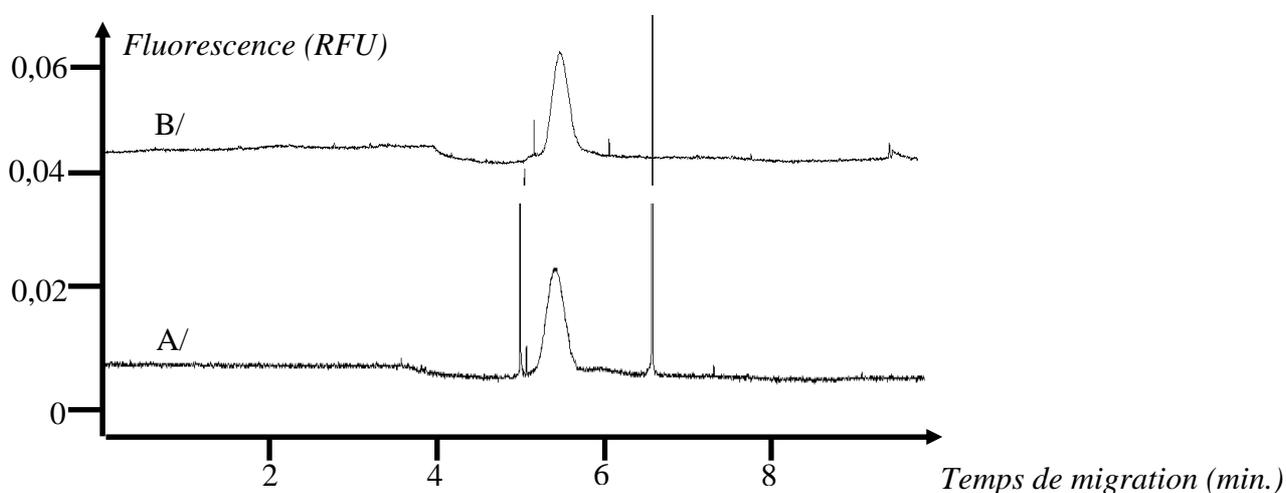
### 3.5.7. Amélioration de la longueur d'onde 266 nm

Les tests précédents ont montrés des résultats décevants à 266 nm. Nous pensons que le matériau du demi-ellipsoïde est en cause car il transmet peu les longueurs d'onde en dessous de 300 nm (voir paragraphe 2.3).

Plusieurs matériaux pour le demi-ellipsoïde sont donc testés. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une catégorie de verre minéral.

Le test décrit dans la paragraphe 3.5.6.5 sur du tryptophane  $10^{-8}$  M est réitéré.

**Résultats :** Le PMT 1 (montage colinéaire) donne un rapport S/N de  $18 \pm 2$  *figure 55A*. Le PMT 2 (montage avec demi-ellipsoïde) donne un rapport S/N de  $20 \pm 2$  *figure 55B*.



*Figure 55 : Analyse du tryptophane à  $10^{-8}$  M A/ à l'aide du PMT 1 (montage colinéaire) ; B/ à l'aide du PMT 2 (montage avec le demi-ellipsoïde). Conditions d'analyses décrites précédemment.*

Ces résultats étant concluants, un montage définitif ou « unité bêta » a été réalisé.

### 3.5.8. Tests du montage à l'intérieur de l'électrophorèse capillaire Agilent

Le montage optique définitif ou « unité bêta » est représenté par les photos suivantes :

Le capillaire, avec le demi-ellipsoïde collé, est inséré dans un support capillaire. Le support avec la bille est positionné au-dessus. La fibre d'excitation arrive au niveau du connecteur. Le faisceau, grâce à un miroir à l'intérieur du support bille, est focalisé au niveau de la bille. La fluorescence émise par les molécules à l'intérieur du capillaire, est récoltée par une fibre de collection. Les supports capillaire et bille sont intégrés dans la cassette Agilent de l'électrophorèse capillaire.

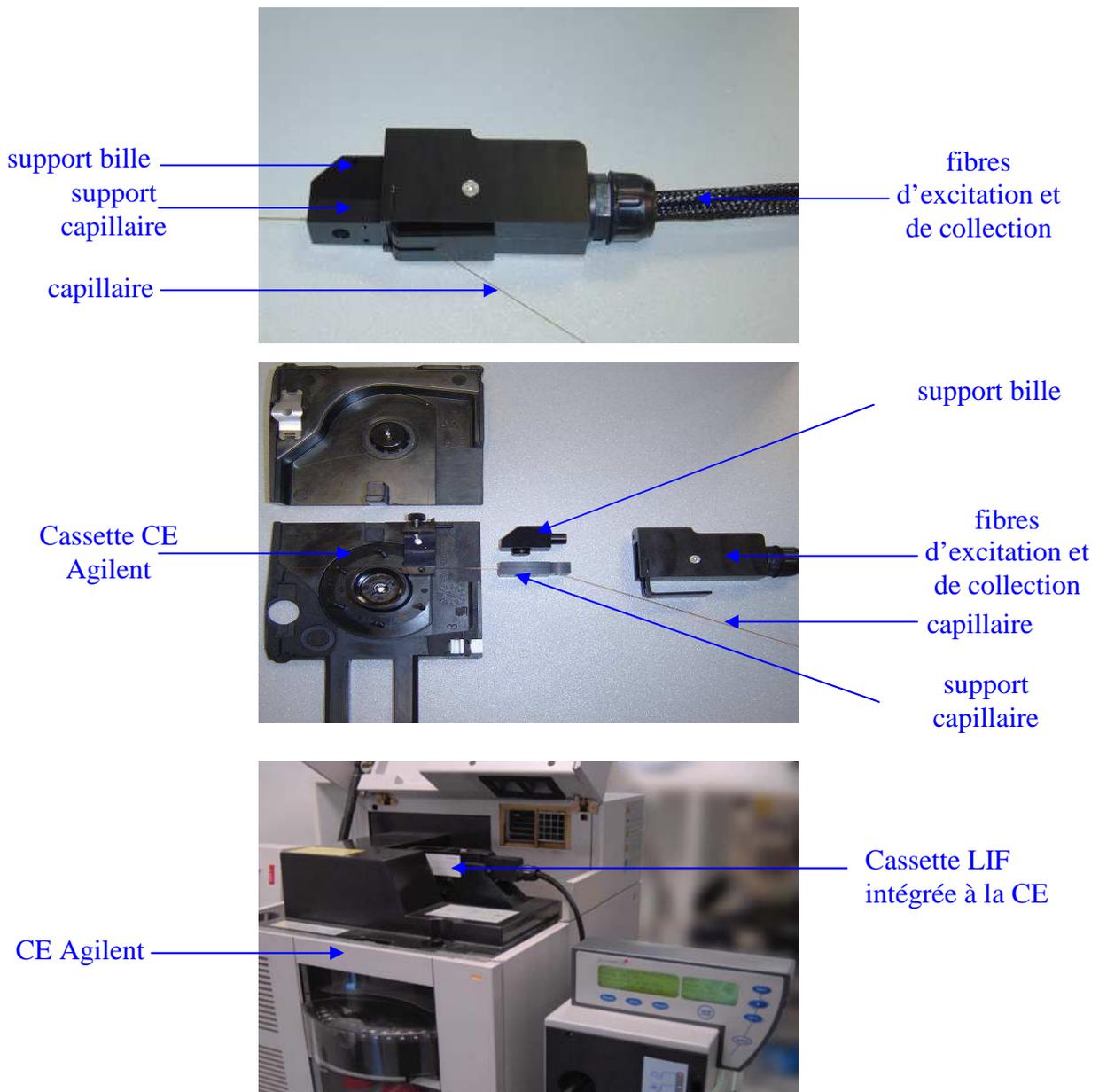


Figure 56 : Photographies du montage avec demi-ellipsoïde intégré dans la cassette de l'électrophorèse capillaire Agilent.

Les mêmes tests de sensibilité que ceux effectués au paragraphe précédent sont réalisés. Des résultats comparables sont obtenus.

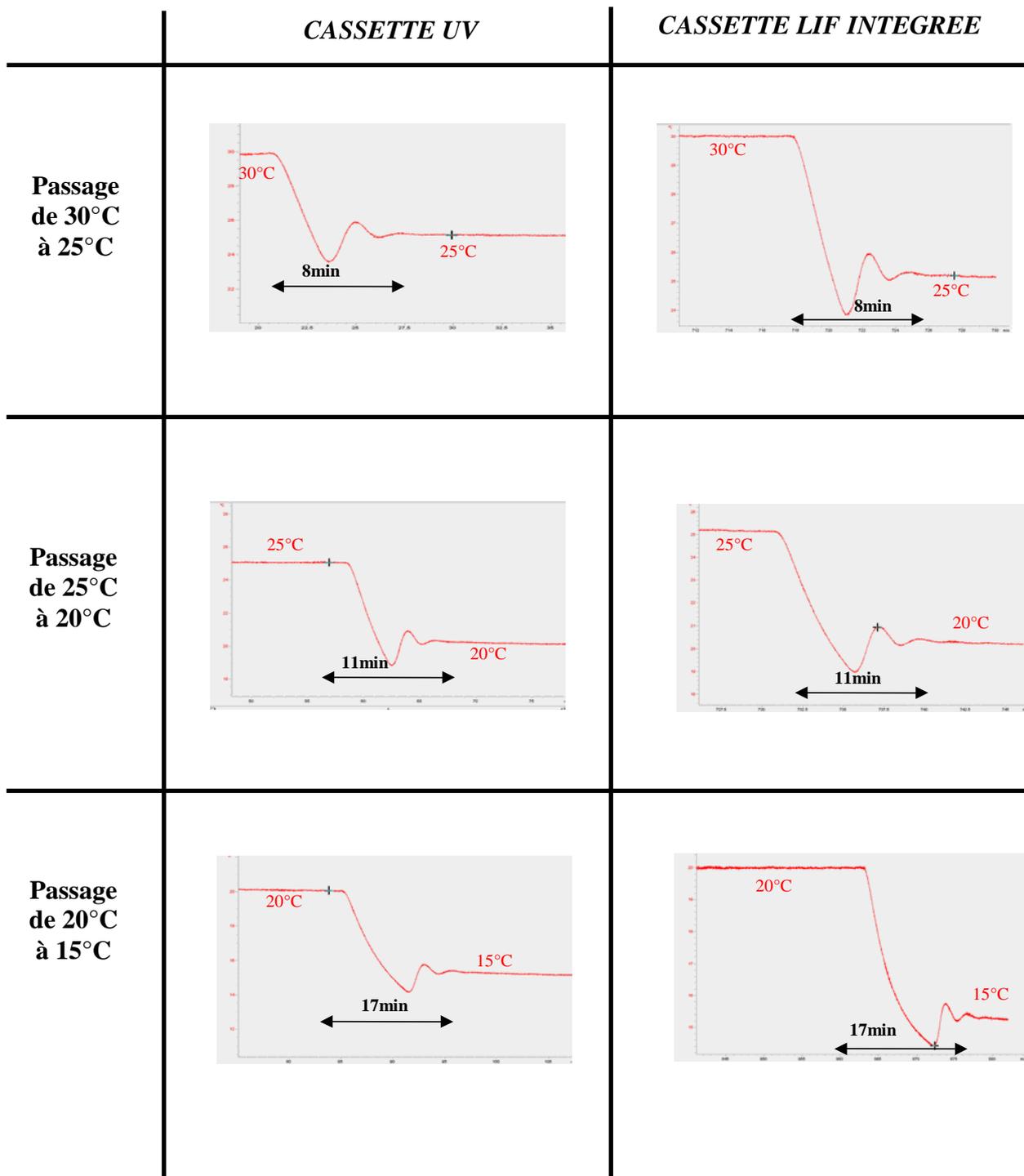
### **3.5.8.1. Tests de température**

Ce montage fonctionne au niveau de la performance optique mais il est important de vérifier que l'intégration de la cellule LIF ne perturbe pas la régulation de la cassette de l'électrophorèse capillaire. En effet, la température de la cassette Agilent est régulée par un module à effet Pelletier. Différents tests sont effectués afin de vérifier la non perturbation de la cellule LIF.

Pour cela, plusieurs températures à l'intérieur de la cassette ont été étudiées : *figure 57*

- le passage de 30°C à 25°C est effectué en 8 min pour la cassette UV et également en 8 min pour la cassette avec la cellule LIF intégrée ;
- le passage de 25°C à 20°C est effectué en 11 min pour la cassette UV et également en 11 min pour la cassette avec la cellule LIF intégrée ;
- le passage de 20°C à 15°C est effectué en 17 min pour la cassette UV et également en 17 min pour la cassette avec la cellule LIF intégrée.

Ces expériences montrent donc que la cellule LIF ne perturbe pas la régulation de température par l'effet Pelletier à l'intérieur de la cassette.



*Figure 57 : Tests de température sur la cassette de l'électrophorèse capillaire : détermination du temps nécessaire à une cassette UV et à une cassette avec la cellule LIF intégrée pour passer de 30°C à 25°C, de 25°C à 20°C, et de 20°C à 15°C.*

### 3.5.8.2. Tests de répétabilité et de linéarité

Afin de vérifier la répétabilité et la linéarité du système, de nombreuses analyses ont été effectuées à 488 nm. Une solution de FITC à  $10^{-11}$  M,  $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M et  $10^{-8}$  M est injectée à 50 mbar pendant 5 secondes. Un tampon carbonate/bicarbonate 25 mM est utilisé. Le capillaire a une longueur totale de 33 cm, et une longueur effective de 14 cm. Chaque échantillon est injecté six fois *figure 58*.

	FITC $10^{-11}$ M	FITC $10^{-10}$ M	FITC $10^{-9}$ M	FITC $10^{-8}$ M
1	0,032	0,36	3,6	34,3
2	0,032	0,35	3,7	34,5
3	0,033	0,36	3,7	35
4	0,032	0,36	3,6	34
5	0,034	0,34	3,5	35,2
6	0,032	0,36	3,6	35,5
% RSD	2,05	1,88	1,54	1,39

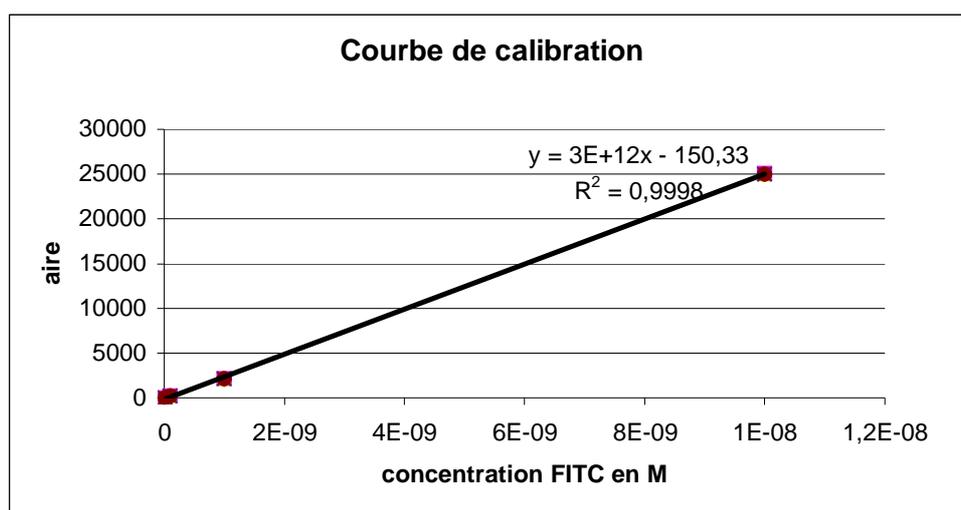


Figure 58 : Courbe de calibration du FITC en CE-LIF (montage avec demi-ellipsoïde) à 488 nm

Pour les quatre concentrations, le pourcentage RSD (relative standard deviation) sur l'aire est inférieur à 3%. Le coefficient de corrélation obtenue est de 0,9998.

### **3.6. Conclusion**

Nous venons de présenter l'optimisation et les différentes étapes de validation du nouveau détecteur de fluorescence intégrée à une électrophorèse capillaire comprenant une bille afin de focaliser le faisceau du laser à l'intérieur du capillaire. Ce détecteur utilise un demi-ellipsoïde placé au niveau de la fenêtre de détection du capillaire afin de récolter la fluorescence. Ce montage permet d'utiliser un capillaire court de 14 cm de longueur effective. Les performances de ce montage sont comparables à celles du montage colinéaire. Ce montage est commercialisé depuis mars 2007 (voir annexe 1). Ce montage avec demi-ellipsoïde est utilisé dans la partie suivante afin d'analyser des anticorps monoclonaux recombinants. Ce montage permet ainsi de réguler la température du capillaire et de diminuer les temps d'analyse grâce à une courte longueur de capillaire.

**4.      *Optimisation de séparations de  
molécules d'intérêt biologiques avec notre  
détecteur LIF***

## **4.1. Séparation d'anticorps marqués par CE-LIF à 488 nm et 532 nm**

Le but de ce travail est de développer une méthode d'analyse pour le contrôle qualité des anticorps monoclonaux recombinants par CE/LIF à 488 nm et 532 nm après marquage de ces molécules par le FITC ou le TAMRA. Afin de répondre aux exigences de l'industrie pharmaceutique, il serait important d'atteindre une limite de détection inférieure à celle obtenue par SDS PAGE avec une coloration à l'argent et un temps d'analyse inférieur à 30 minutes. Pour cela, le détecteur de fluorescence induite par laser avec ellipsoïde est utilisé avec une longueur totale de capillaire de 33 cm.

### **4.1.1. Instrumentation**

Une électrophorèse capillaire HP3DCE Agilent (Waldbronn, Allemagne) est utilisée avec une cassette CE UV. Le détecteur de fluorescence est le Zetalif Discovery Picometrics (Toulouse, France), mis au point dans le chapitre 3.5. La cellule de détection LIF est donc intégrée à l'intérieur de la cassette UV. Deux lasers sont utilisés : un laser argon 488 nm de 26 mW (Spectra Physics, Mountain View, Californie) et une diode laser 532 nm de 15 mW (CristaLaser, Messein, France). Un capillaire Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona) est utilisé de longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm, diamètre interne 50  $\mu\text{m}$ , diamètre externe 360  $\mu\text{m}$ .

### **4.1.2. Réactifs utilisés**

Les produits suivants ont été obtenus chez Sigma :

- IgG2a de souris marqué au FITC (ref : F6522),
- IgG de sérum humain marqué au FITC (ref : F9636),
- IgG de sérum de lapin marqué au FITC (ref : F2756),
- IgG1 de myélome de murin marqué au FITC (ref : F6397),
- IgG2 anti-souris marqué au TAMRA (ref : T2762).

Le 5 TAMRA-SE (SE= succinimide ester) provient de Molecular Probes.

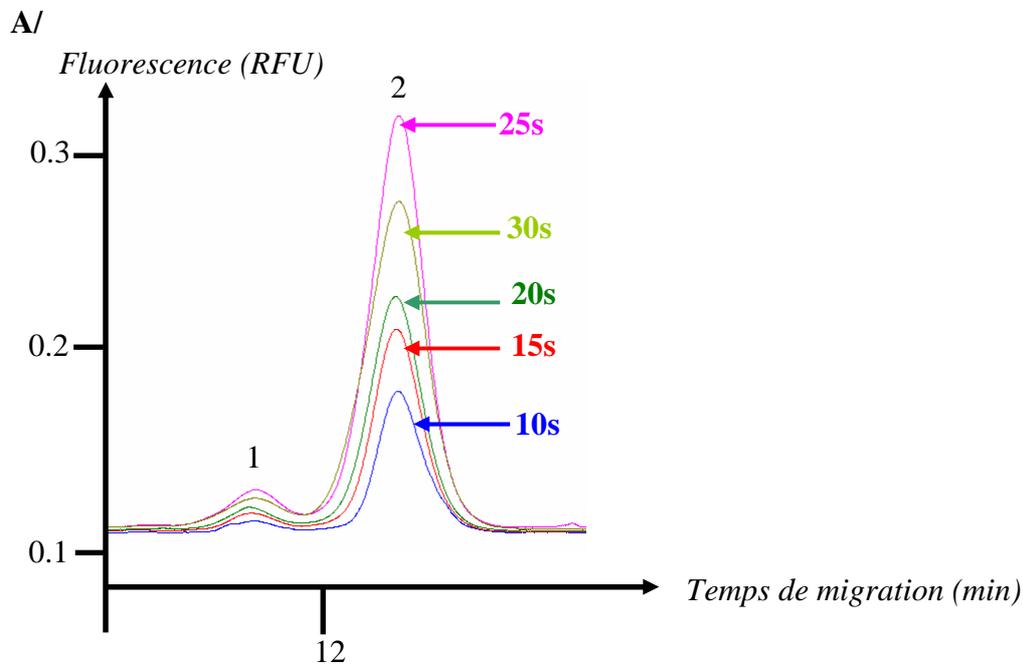
Le tampon SDS provient de Beckman Coulter.

### 4.1.3. Mise au point de la méthode d'analyse d'un IgG2a-FITC par CE/LIF (488nm)

La méthode de séparation est mise au point sur l'IgG2a de souris marqué au FITC. Les analyses sont effectuées par CE/LIF à 488 nm avec le tampon SDS Beckman Coulter.

#### 4.1.3.1. L'injection

L'IgG2a-FITC de souris à 100 ng/mL est injectée de manière électrocinétique à -15 kV. Le temps d'injection est optimisé (figure 59). L'IgG2a-FITC est analysée avec un temps d'injection de 10, 15, 20, 25 et 30 s.



Temps d'injection (secondes) à -15kV	Aire (pic 2)	Hauteur en RFU (pic 2)	N (pic 2)	Résolution
10s	0,92	0,071	21 680	1,59
15s	1,4	0,1	17 454	1,58
20s	1,7	0,12	14 945	1,52
25s	3,1	0,21	14 307	1,48
30s	2,7	0,16	10 052	1,19

B/

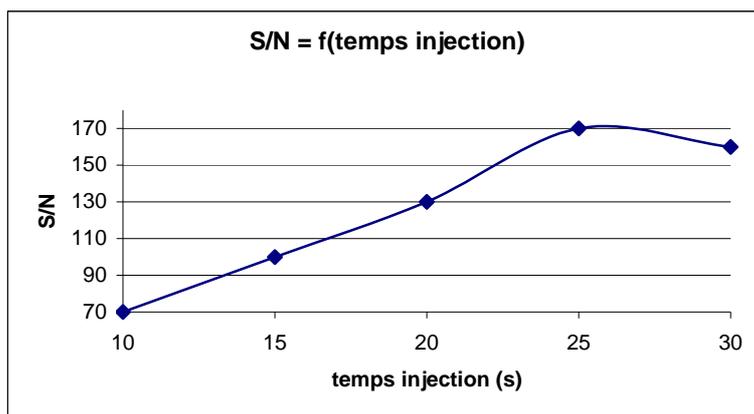


Figure 59 : Optimisation du temps d'injection en mode électrocinétique de l'IgG2a-FITC. A/ Analyse de l'IgG2a-FITC à 100 ng/mL : variation du temps d'injection à -15 kV de 10 à 30 s.

B/ Variation du temps d'injection en fonction du rapport S/N. Capillaire 50  $\mu\text{m}$ , longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

Jusqu'à 25 s, la sensibilité augmente avec le temps d'injection. Cependant, le nombre de plateaux théoriques et la résolution diminuent. Au-delà de 25 s, le pic d'IgG2a-FITC s'élargit et la sensibilité diminue. Une injection de -15 kV pendant 25 s permet d'obtenir la meilleure sensibilité ; la résolution entre les deux pics est suffisante pour les séparer.

#### 4.1.3.2. Pré-injection

Une pré-injection d'eau entraîne une zone de haut champ électrique dès le début de l'injection. Cela a pour effet de créer une frontière entre l'échantillon et l'électrolyte tampon où l'échantillon est concentré. La sensibilité est alors augmentée [89, 90, 91]. L'optimisation de cette pré-injection est réalisée *figure 60*. L'eau est injectée de manière hydrodynamique à 1000 mbar jusqu'à 1 min.

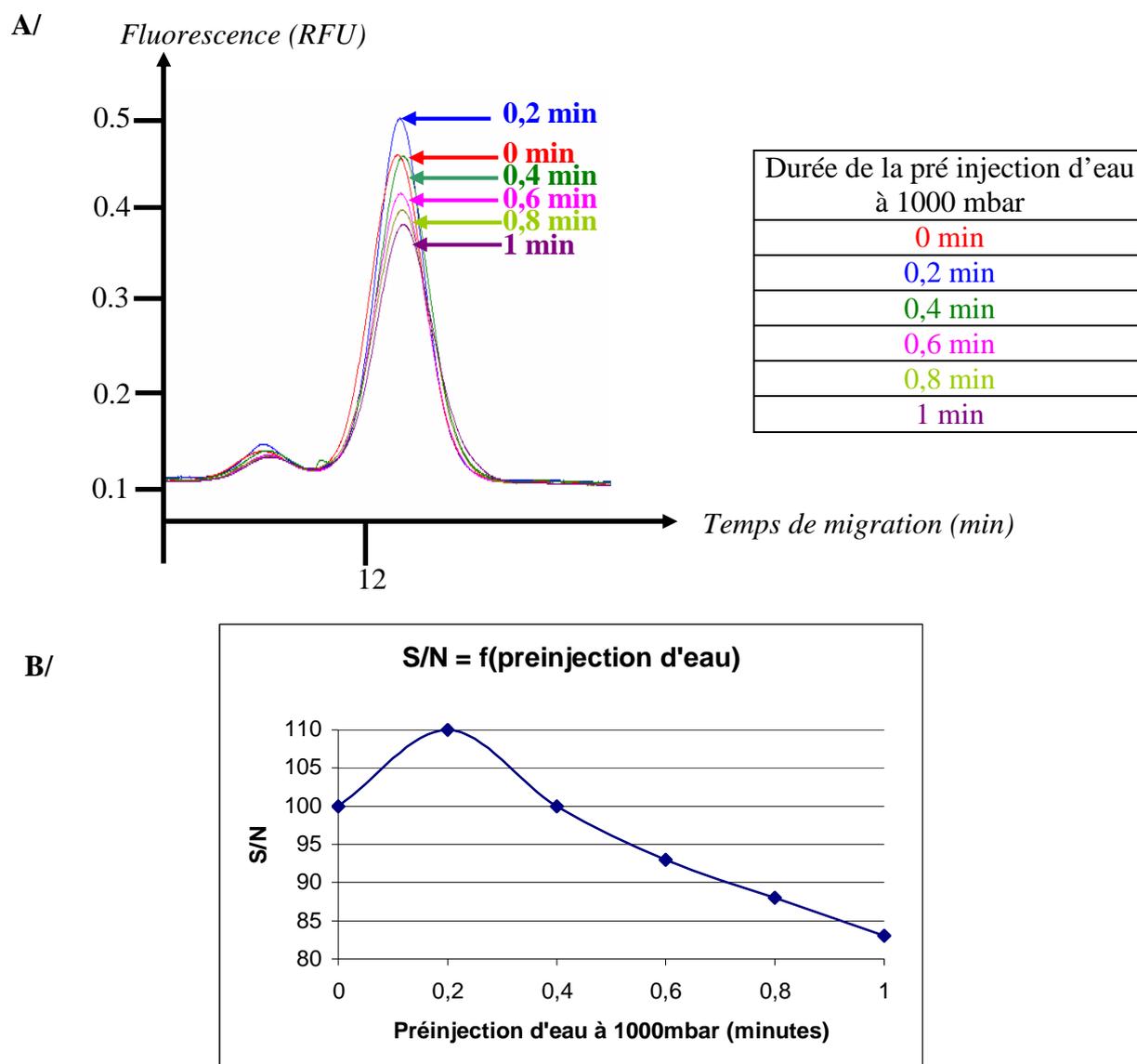


Figure 60 : Optimisation du temps de pré injection d'eau. A/ Analyse de l'IgG2a-FITC à 100 ng/mL : variation de la durée de pré-injection d'eau à 1000 mbar de 0 à 1 min. B/ Variation du temps de pré injection d'eau en fonction du rapport S/N. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14cm. Injection -15kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

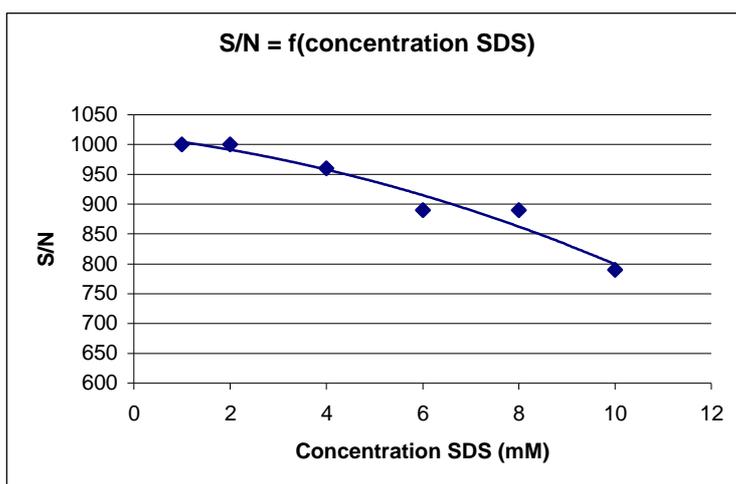
Une pré injection d'eau de 0,2 min à 1000 mbar permet d'augmenter la sensibilité. Au-delà de 0,2 min, la sensibilité diminue. Ainsi, la pré-injection d'eau optimale est de 0,2 min à 1000 mbar.

### 4.1.3.3. Dilution de l'échantillon

#### 4.1.3.3.1. Dilution de l'échantillon dans le SDS

L'IgG2a-FITC à 100 ng/mL est dilué dans du SDS à différentes concentrations 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM et 10 mM (figure 61). Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV.

A/



B/

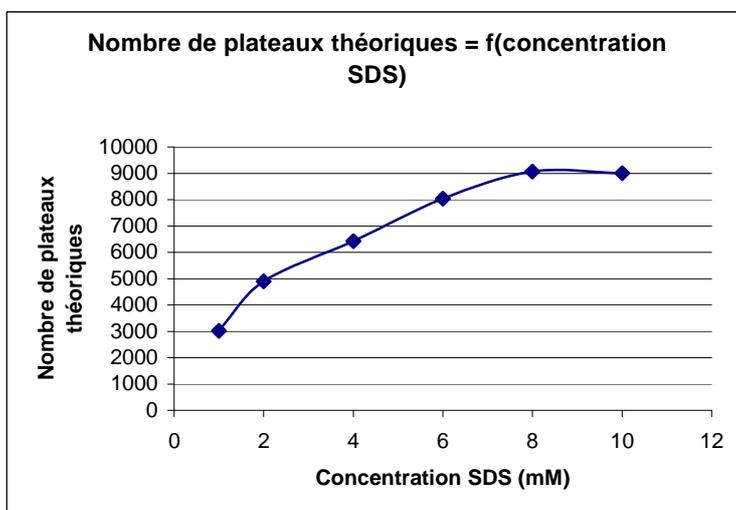


Figure 61 : Variation de la concentration de SDS (utilisé pour diluer l'échantillon de IgG2a – FITC) A/ en fonction du rapport signal / bruit et B/ en fonction du nombre de plateaux théoriques. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33cm ; longueur effective : 14cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

A 1 mM, le rapport S/N est le meilleur mais le pic d'IgG2a-FITC est large et déformé. De 1 mM à 6 mM, la sensibilité diminue mais le nombre de plateaux théoriques augmente. A

partir de 6 mM, le nombre de plateaux théoriques augmente peu et la sensibilité diminue. 6 mM est donc la concentration de SDS où l'on obtient le meilleur compromis entre sensibilité et nombre de plateaux théoriques.

#### 4.1.3.3.2. Dilution de l'échantillon dans le LiDS

L'IgG2a – FITC à 100 ng/mL est dilué dans du LiDS à différentes concentrations 2 mM, 4 mM, 6 mM, 8 mM, 10 mM (figure 62). Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV.

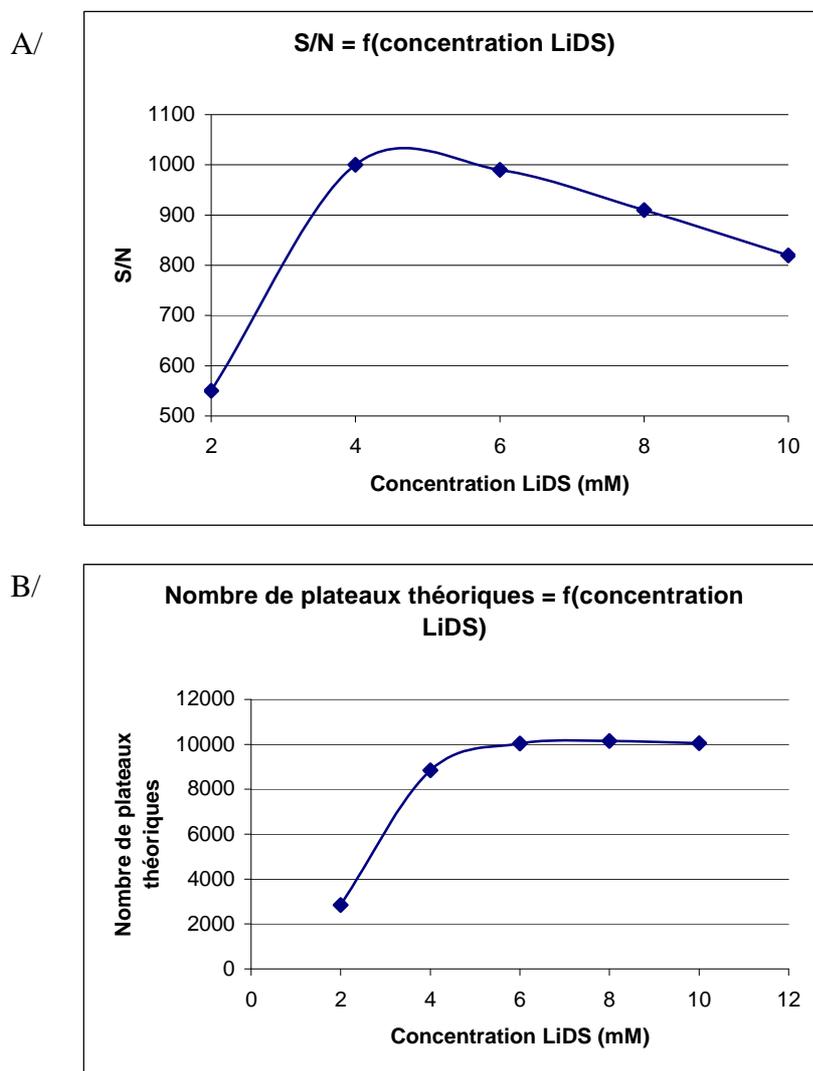


Figure 62 : Variation de la concentration de LiDS (utilisé pour diluer l'échantillon de IgG2a – FITC) A/ en fonction du rapport signal / bruit et B/ en fonction du nombre de plateaux théoriques. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

La meilleure sensibilité est obtenue pour une concentration en LiDS entre 4 mM et 6 mM. A 6mM, le pic a un nombre de plateaux théoriques plus grand ainsi nous trouvons 6 mM comme étant la concentration de LiDS optimale.

#### 4.1.3.3.3. Comparaison du milieu de dilution de l'IgG2a-FITC

La figure 63 compare la séparation de l'IgG2a – FITC dilué :

- en bleu : dilution dans l'eau
- en rose : dilution dans le tampon SDS pour échantillon Beckman
- en vert : dilution dans le SDS 6 mM
- en rouge : dilution dans le LiDS 6 mM

Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV.

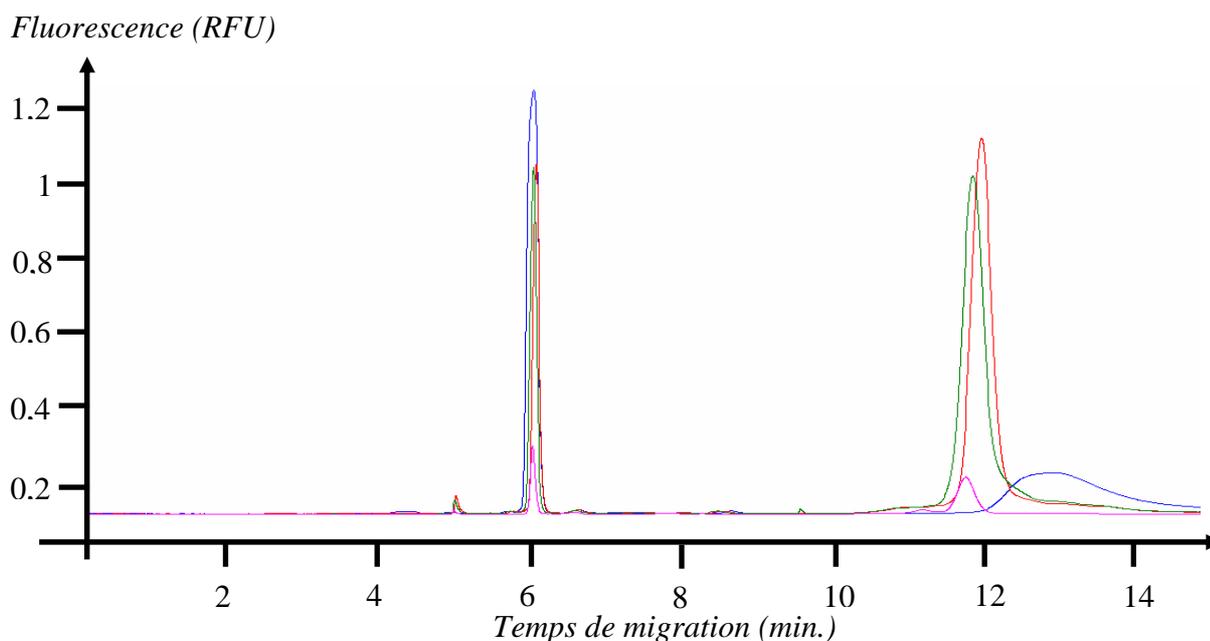


Figure 63 : Influence du milieu de dilution sur la sensibilité de l'IgG2a – FITC : bleu : dilution dans l'eau ; rose : dilution dans le gel SDS Beckman ; vert : dilution dans 6 mM de SDS ; rouge : dilution dans 6 mM de LiDS. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

	<i>Temps de migration (min)</i>	<i>Aire</i>	<i>Hauteur (RFU)</i>	<i>S/N (répétabilité sur 4 analyses)</i>
<i>Eau</i>	11,71	1,7 +/- 0,1	$9,90 \times 10^{-2} \pm 1 \times 10^{-2}$	99 +/- 10
<i>Tampon SDS Beckman</i>	12,87	10,6 +/- 0,1	$1,10 \times 10^{-1} \pm 1 \times 10^{-2}$	110 +/- 10
<i>SDS 6 mM</i>	11,81	19,1 +/- 0,1	$8,80 \times 10^{-1} \pm 2 \times 10^{-2}$	880 +/- 20
<i>LiDS 6 mM</i>	11,92	22,7 +/- 0,1	$1,00 \pm 0,02$	1000 +/- 20

*Tableau 9 : Influence du milieu de dilution sur la le temps de migration, l'aire, la hauteur et le S/N de l'IgG2a – FITC*

La meilleure sensibilité est obtenue lors de la dilution de l'IgG2a – FITC dans 6 mM de LiDS. La répétabilité des analyses (4 fois) montre que la différence de sensibilité est significative.

#### 4.1.3.4. Puissance du laser

Van den Beld [92] écrit l'équation suivante afin de calculer l'intensité de fluorescence F :

$$F = 2,3 \varepsilon \phi C^0 (d_c^2 / 2 r_L) [\pi v_Z r_L / 2 k_D] [1 - \exp(-\sigma)]$$

- Où  $C^0$  est la concentration du fluorophore injecté dans un capillaire conventionnel ;  
 $d_c$  est le diamètre interne du capillaire ;  
 $r_L$  est le rayon du faisceau laser ;  
 $\sigma$  est la puissance du laser réduite  $\sigma = 2 k_D P / \pi v_Z r_L$ , où P est la puissance du laser ;  
 $\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire du fluorophore ;  
 $\phi$  est le rendement quantique de fluorescence ;  
 $v_Z$  est la vitesse linéaire des molécules devant le faisceau laser ;  
 $k_D$  est la constante de photodégradation de la molécule fluorescente.

Cette expression montre donc que l'intensité de fluorescence d'un composé peut être augmentée en optimisant la puissance du laser et le diamètre du capillaire.

Bayle et al [93] étudient l'influence de la puissance d'un laser 488 nm sur l'analyse de la fluoresceine isothiocyanate (FITC). Pour cela, un capillaire 75  $\mu$ m ID est utilisé. La solution de FITC 0,01  $\mu$ M (diluée dans un tampon 40 mM acide borique pH=9,6) est injectée dans le

capillaire par dépression à 850 et 400 mbar. La puissance du laser est augmentée de 2 à 33 mW. Lorsque la puissance du laser augmente, le signal augmente ainsi que le bruit de fond (*figure 64*). Le rapport S/N optimum est observé à 10 mW lorsque la pression est de 850 mbar et 6 mW lorsque la pression est de 400 mbar. Ces expériences montrent bien que le rapport S/N est très sensible au temps de résidence devant le faisceau laser. Lorsque le temps de résidence est court, il y a peu de photodégradation des molécules et donc la puissance du laser peut être augmentée afin d'optimiser le rapport S/N.

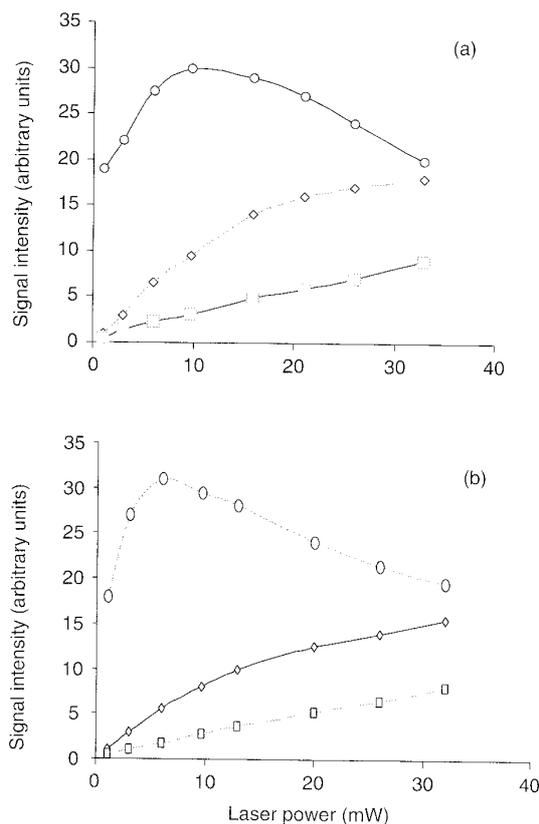


Figure 64 : Variation de la puissance du laser lors de l'injection du FITC à 0,01  $\mu\text{M}$ . a/ avec une dépression de 400 mbar. b/ avec une dépression de 850 mbar.  $\square$  représente le bruit quand le capillaire est rempli d'eau (multiplié par 10).  $\diamond$  représente le signal.  $\circ$  représente le rapport S/N [93]

Nous avons également étudié l'influence de la puissance du laser lors de l'utilisation d'un capillaire à bulle en CE-LIF. Le capillaire à bulle est fréquemment utilisé en CE afin d'augmenter le trajet optique et ainsi augmenter la sensibilité. La variation de la puissance de différents lasers est ainsi étudiée.

- **Variation de la puissance de la diode pulsée 266 nm**

Cinq composés (tryptophane, tyrosine, acide 5-hydroxyindole-3-acétique, acide homovanillique, acide hydroxyméthoxymandelique) sont analysés par CE-LIF à 266 nm avec un capillaire conventionnel 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et un capillaire à bulle 3x75  $\mu\text{m}$ . Ces deux capillaires ont une longueur totale de 60 cm et une longueur effective de 45 cm. L'injection est hydrodynamique : 10 s à 50 mbar. Le tampon utilisé est un tampon CAPS 10 mM et tétraborate de sodium 15 mM à pH 9,2. Le voltage est de 15 kV.

La *figure 65A* représente l'analyse avec un capillaire conventionnel. La puissance du laser a été optimisée (en additionnant des filtres à densité neutre à la sortie du laser) en analysant du tryptophane. Avec un capillaire conventionnel, le S/N augmente lorsque la puissance du laser augmente. A partir de 1,5 mW, le S/N stagne.

L'analyse avec le capillaire à bulle est représentée *figure 65B*. La puissance du laser a également été optimisée en utilisant du tryptophane. Le S/N augmente lorsque la puissance augmente jusqu'à 1,5 mW. Au-dessus de 1,5 mW, le S/N diminue fortement. L'optimum de puissance est donc différent entre les deux capillaires.

Après optimisation de la puissance du laser, le capillaire permet de gagner un facteur 3 par rapport à un capillaire conventionnel.

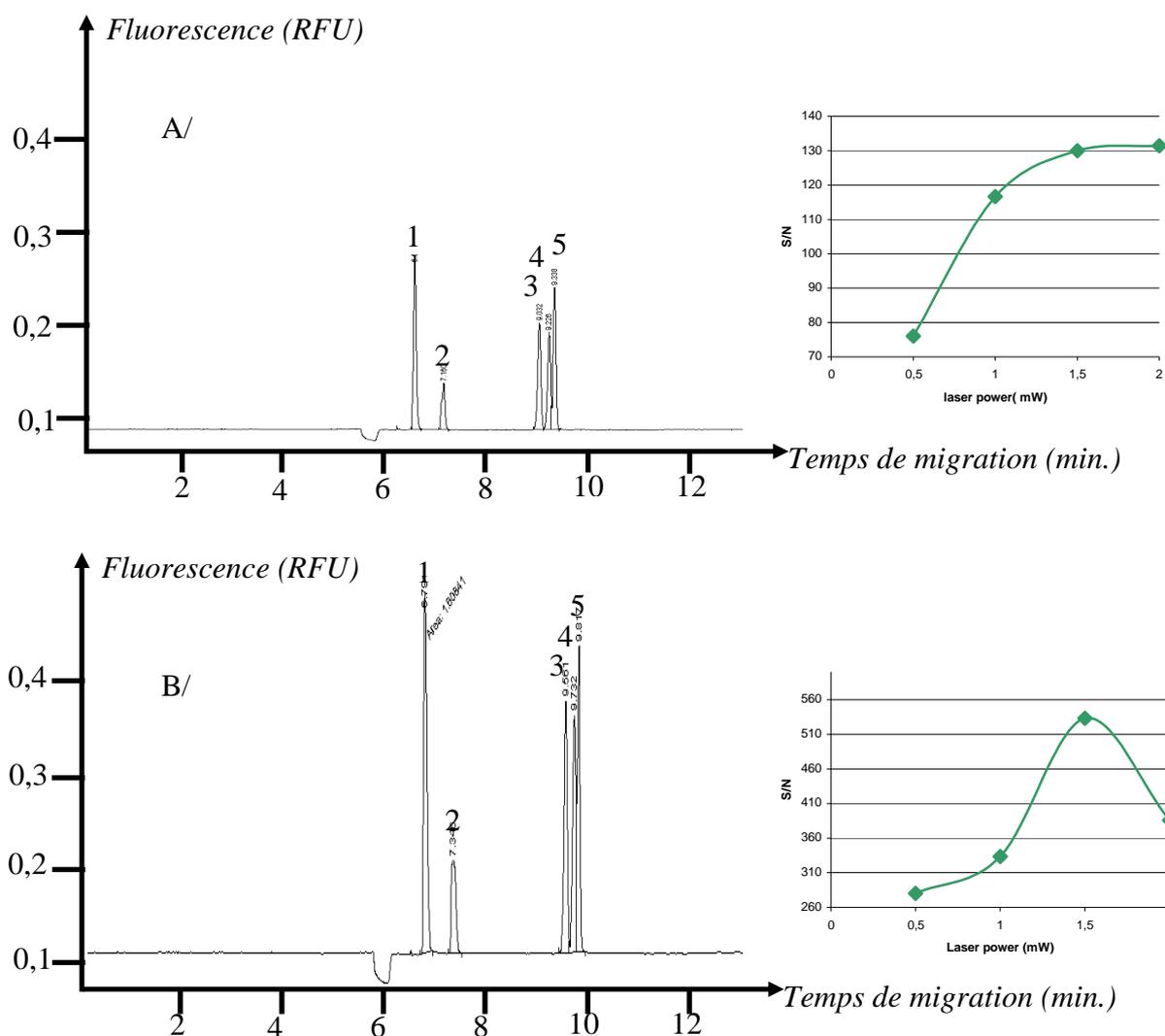


Figure 65 : Séparation tryptophane (1), tyrosine (2), acide 5-hydroxyindole-3-acétique (3), acide homovanillique (4), acide hydroxyméthoxymandelique (5) par CE LIF (266 nm) avec A/ un capillaire conventionnel 75 μm ; B/ un capillaire à bulle 3 x 75 μm. Les conditions de séparation sont décrites ci-dessus. Sur le côté, les graphes représentent la variation du rapport S/N du tryptophane en fonction de la puissance du laser pour les deux capillaires.

- **Variation de la puissance de la diode continue 410 nm**

La variation de la puissance de la diode 410 nm est également étudiée pour l'analyse d'acides aminés marqués au NDA et plus particulièrement le GABA. Le tampon utilisé est un tampon 7,5 mM tétraborate de lithium. La figure 66 représente la variation du rapport S/N du GABA marqué au NDA en fonction de la puissance du laser avec un capillaire conventionnel 50 μm de diamètre interne (figure 66A) et un capillaire à bulle 3 x 50 μm (figure 66B).

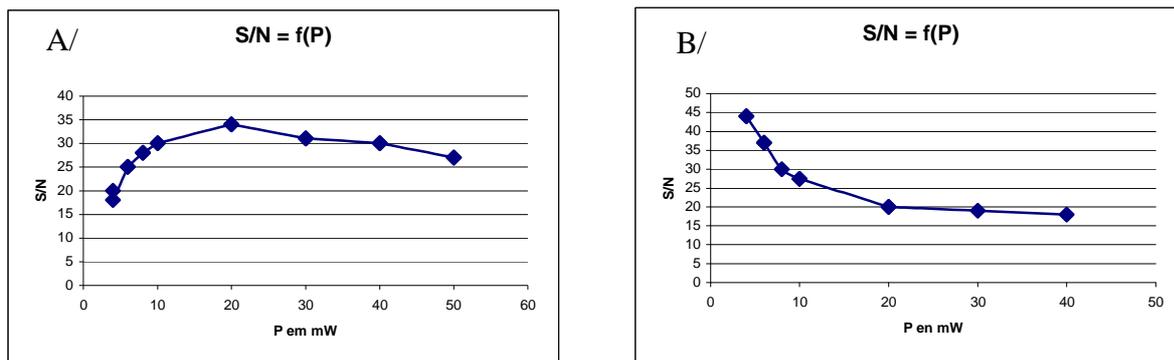


Figure 66 : Variation du rapport S/N du GABA marqué au NDA en fonction de la puissance du laser 410 nm A/ avec un capillaire conventionnel 50  $\mu\text{m}$  de diamètre interne, B/ avec un capillaire à bulle 3 x 50  $\mu\text{m}$ .

Avec le capillaire conventionnel, le rapport S/N du GABA augmente jusqu'à 20 mW. Au-dessus de 20 mW, le rapport S/N diminue progressivement.

Avec le capillaire à bulle, le rapport S/N diminue lorsque la puissance augmente. Il est impossible de diminuer la puissance de ce laser en dessous de 4 mW. 4 mW est donc la puissance où la sensibilité est la meilleure.

A 410 nm, lors de l'analyse d'acides aminés marqués au NDA, l'optimum de puissance est donc de 20 mW avec un capillaire conventionnel et de 4 mW avec un capillaire à bulle. Ces deux optimums sont très différents. Nous pouvons penser que la photodégradation par le faisceau laser des acides aminés est plus importante avec le capillaire à bulle. Il faut donc diminuer la puissance du laser.

L'ensemble de cette étude a permis de montrer que le capillaire à bulle augmente la sensibilité lors d'analyses par CE-LIF. Cependant, le gain de sensibilité dépend fortement de la nature des composés analysés ainsi que de la puissance du laser. En effet, à forte puissance, de nombreux composés sont photodégradés au niveau de la bulle de détection ; seule une diminution de la puissance permet de remédier à ce problème.

Afin d'optimiser la sensibilité, la puissance du laser lors de l'analyse de l'IgG2a-FITC est donc optimisée pour obtenir le meilleur rapport S/N. L'IgG2a – FITC à 100 ng/mL est diluée dans du LiDS 6 mM. Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV. L'analyse est effectuée en faisant varier la puissance du laser de 5 mW à 26 mW (figure 67).

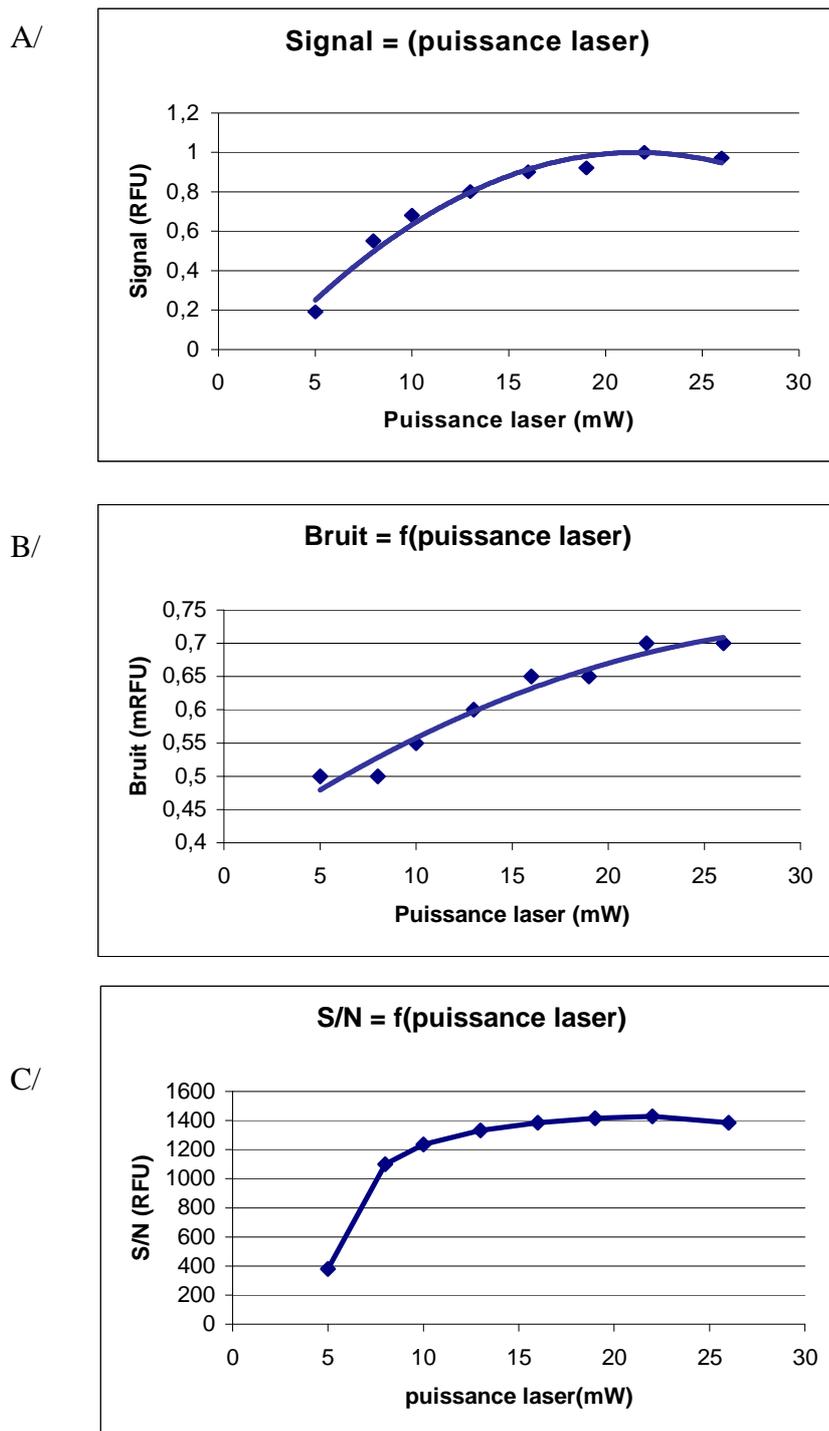


Figure 67 : Influence de la puissance du laser sur la sensibilité de l'IgG2a – FITC : A/ Influence de la puissance du laser sur le signal de l'IgG2a – FITC, B/ Influence de la puissance du laser sur le bruit, C/ Influence de la puissance du laser sur le rapport S/N. Capillaire 50  $\mu\text{m}$ , longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter.

La puissance du laser varie de 5 mW à 26 mW. Lorsque la puissance du laser augmente, le signal et le bruit augmentent. 22 mW est la puissance optimale afin d'obtenir la meilleure sensibilité.

#### 4.1.3.5. Répétabilité d'injection

L'IgG2a – FITC à 100 ng/mL est dilué dans du LiDS 6 mM. Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV. La puissance du laser est de 22 mW. L'analyse est effectuée six fois (*figure 68*).

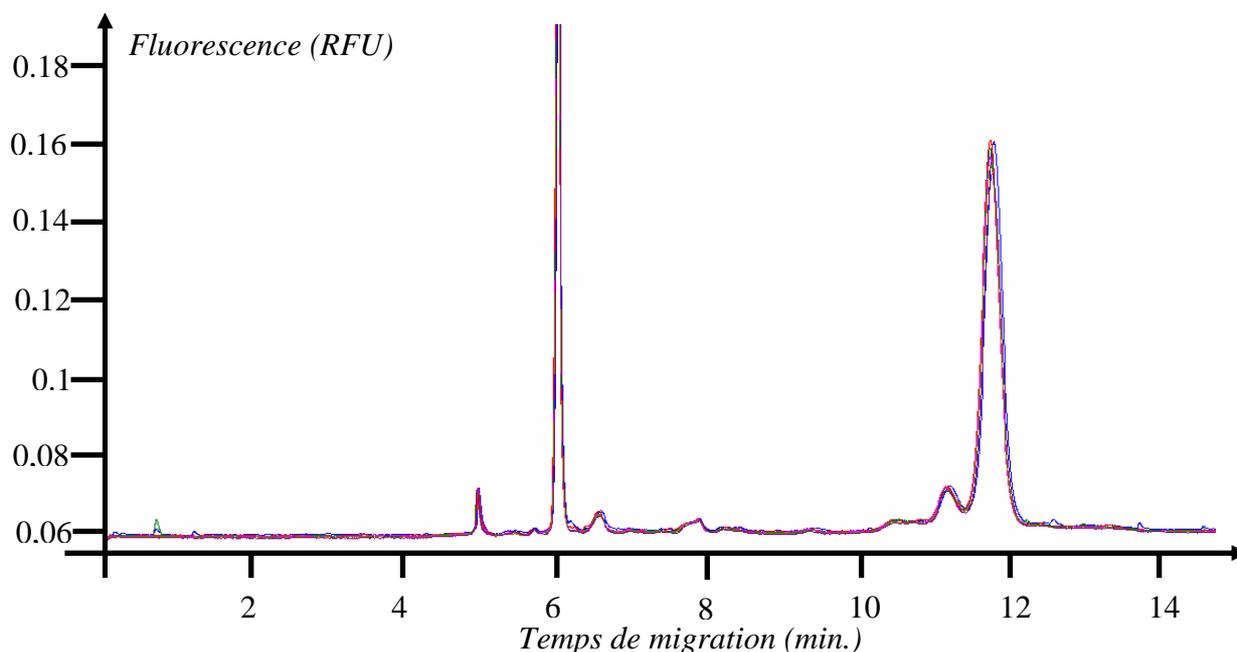


Figure 68 : Analyse de l'IgG2a – FITC répétée 6 fois. Pré-injection d'eau : 1000 mbar, 12 s. Injection -15 kV pendant 25 s. Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le tampon SDS Beckman Coulter. Puissance du laser : 22 mW

Injection	Temps de migration (min)	Aire
1	11,754	1,6
2	11,711	1,6
3	11,711	1,6
4	11,712	1,6
5	11,718	1,5
6	11,735	1,5
<b>RSD (temps migration) = 0,15%</b>		<b>RSD (aire) = 3,2%</b>

Tableau 10 : Calcul des RSD sur le temps de migration et sur l'aire

Le temps de migration est de 11,7 min. La déviation standard relative sur le temps de migration est de 0,15 % sur 6 analyses. La déviation standard relative sur l'aire est de 3,2 % (tableau 10).

#### 4.1.3.6. Courbe de calibration

La linéarité et la répétabilité sont testées *figure 69*. Cinq concentrations sont analysées et répétées 4 fois.

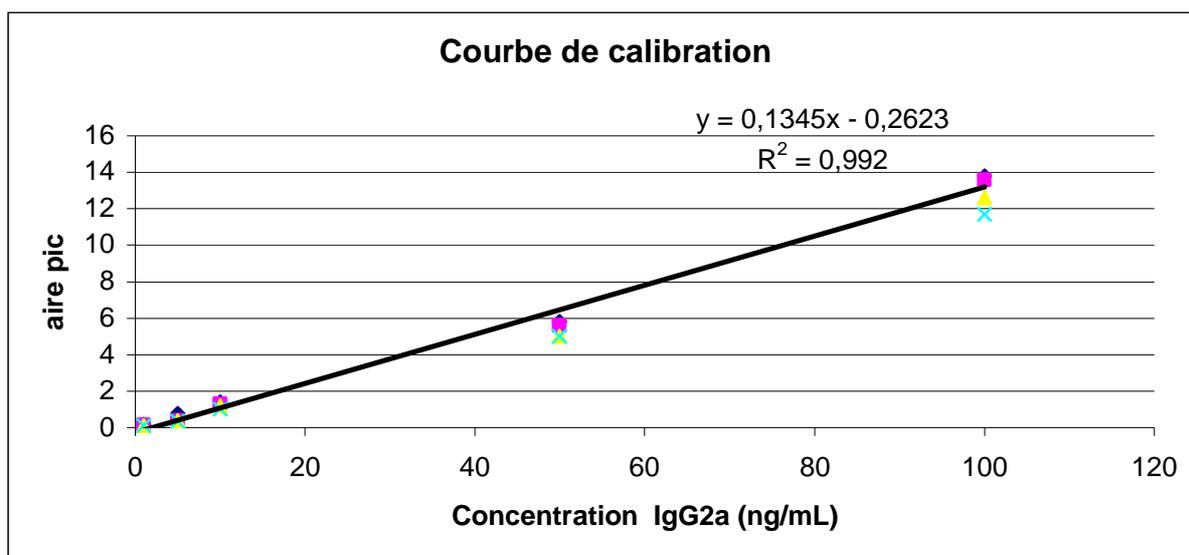


Figure 69: Courbe de calibration de l'IgG2a – FITC

L'aire à chaque concentration est représentée. Une fonction linéaire est obtenue avec un coefficient de corrélation de 0,992.

#### 4.1.3.7. Limite de détection de l'échantillon non réduit

La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) sont par définition la plus petite quantité d'analyte détectée et la plus petite quantité d'analyte pouvant être quantifiée, avec un niveau de confiance déterminé. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer ces quantités minimales dont la méthode du rapport signal/bruit. La LOD correspond à un rapport signal/bruit de l'analyte de 3 et la LOQ correspond à un rapport signal/bruit de l'analyte de 10 [94].

La LOQ et la LOD sur le pic principal de l'analyse de l'IgG2a-FITC sont déterminées. Ce pic principal correspond aux deux chaînes lourdes et aux deux chaînes légères de l'IgG2a-FITC.

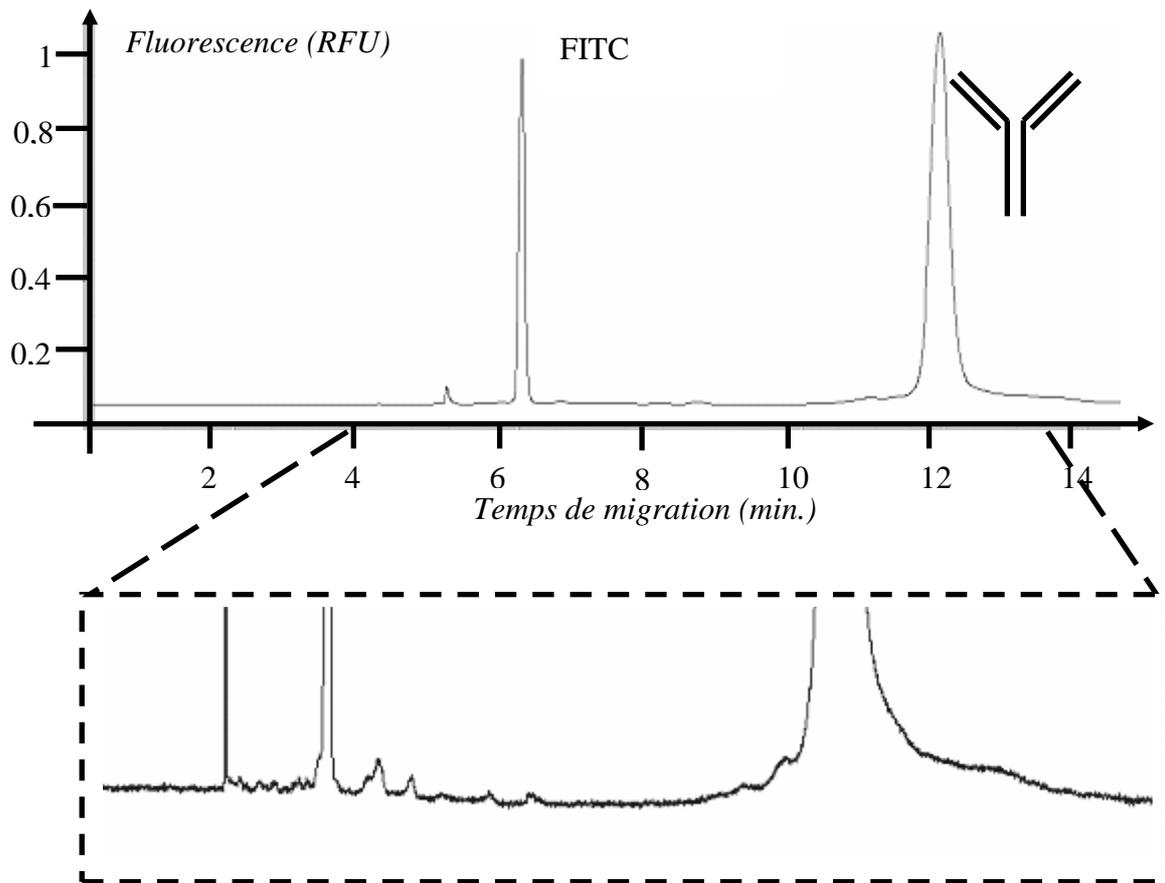


Figure 70 : Analyse de l'IgG2a-FITC à 100 ng/mL avec un agrandissement de 4 min à 14 min. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 7.

La figure 70 représente l'analyse de l'IgG2a-FITC à 100 ng/mL. Le rapport S/N du pic principal est de 1980. L'agrandissement de l'électrophérogramme dans la plage de temps de 4 min à 14 min montre la présence d'impuretés. Quelques unes seront attribuées dans le paragraphe 4.1.3.9 grâce à une cinétique de réduction.

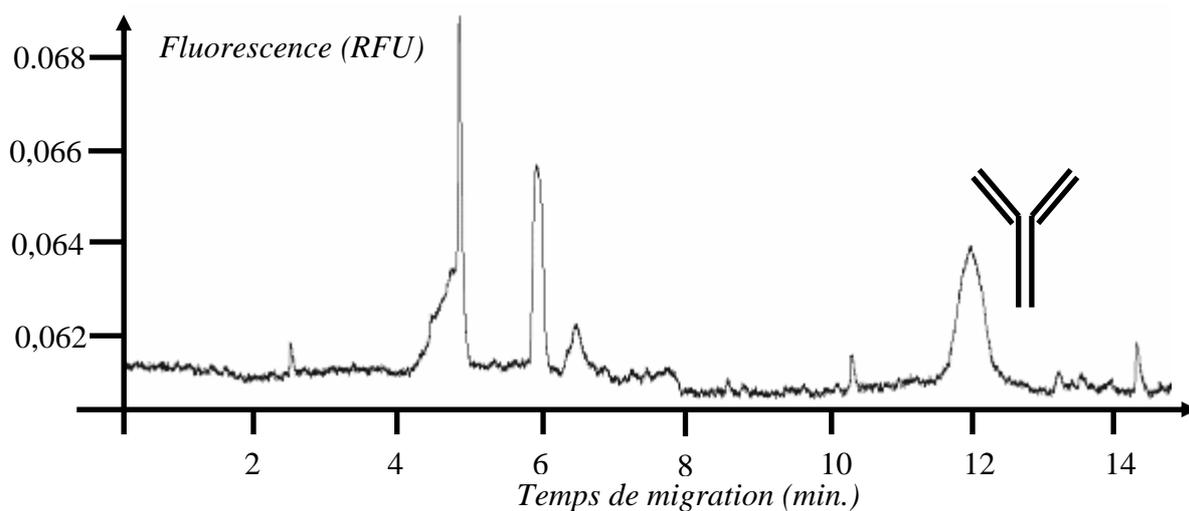


Figure 71 : Analyse de l'IgG2a-FITC à 0.5 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 7

La figure 71 représente l'analyse de l'IgG2a-FITC à 0,5 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 10. La LOQ est donc de 0,5 ng/mL. La LOD est de 0,15 ng/mL ( $S/N = 3$ ). Cette limite de détection est 66 fois plus sensible que la coloration à l'argent [54]. Cette sensibilité permet donc de visualiser des impuretés non détectées avec la coloration à l'argent.

#### 4.1.3.8. Limite de détection de l'échantillon réduit

La LOD et la LOQ des deux pics correspondant à la chaîne légère et la chaîne lourde de l'IgG2a-FITC sont déterminées. Pour cela, l'échantillon est réduit : à 100  $\mu\text{L}$  d'IgG2a-FITC à 10  $\mu\text{g/mL}$  (dilué dans du LiDS 6mM) sont ajoutés 3  $\mu\text{L}$  de mercapto-éthanol ; puis chauffé 15 min à 70°C.

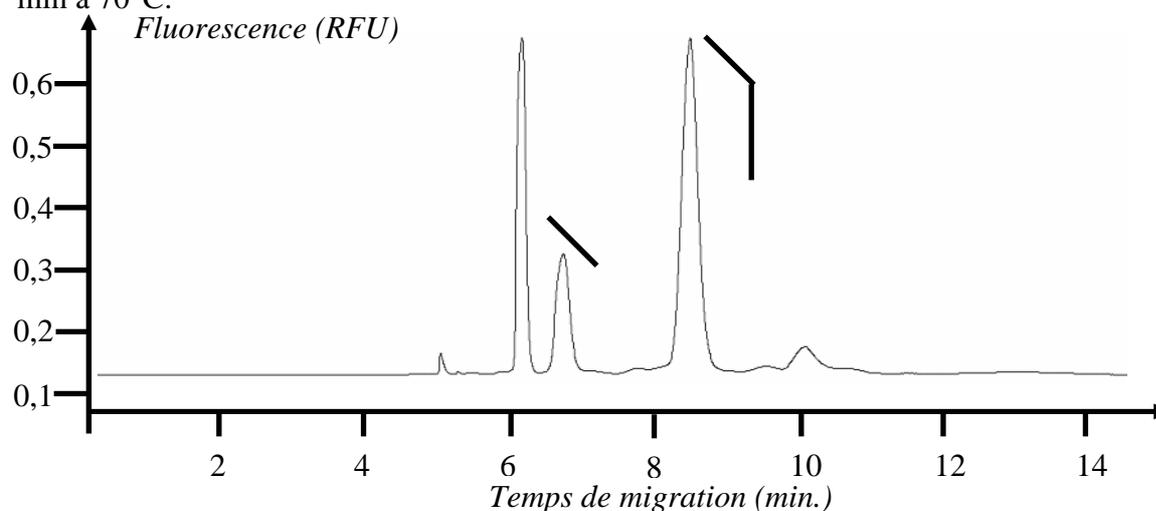
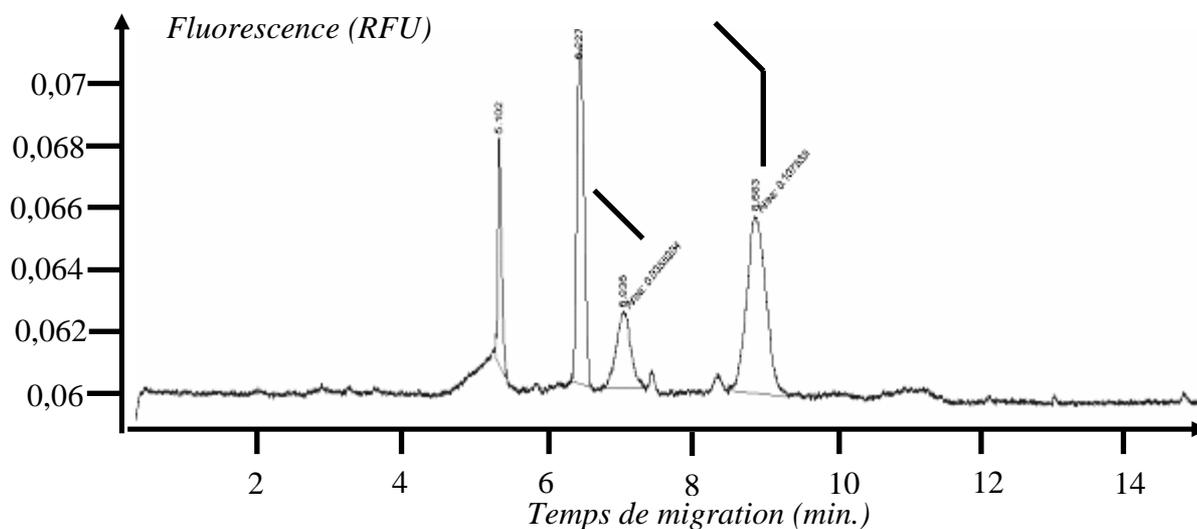


Figure 72 : Analyse de l'IgG2a-FITC réduit à 100 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 7

La *figure 72* représente l'analyse de l'IgG2a-FITC réduit à 100 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 730 pour la chaîne légère et de 2070 pour la chaîne lourde.



*Figure 73 : Analyse de l'IgG2a-FITC réduit à 1 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 7.*

La *figure 73* représente l'analyse de l'IgG2a-FITC réduit à 1 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 8 pour la chaîne légère et de 19 pour la chaîne lourde. La LOQ est donc de 1,25 ng/mL pour la chaîne légère et de 0,5 ng/mL pour la chaîne lourde. La LOD est donc de 0,4 ng/mL pour la chaîne légère et de 0,15 ng/mL pour la chaîne lourde.

		LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
<i>IgG2a-FITC non réduit</i>	<i>2 chaînes légères + 2 chaînes lourdes</i>	<b>0,5</b>	<b>0,15</b>
<i>IgG2a-FITC réduit</i>	<i>chaîne légère</i>	<b>1,25</b>	<b>0,4</b>
	<i>chaîne lourde</i>	<b>0,5</b>	<b>0,15</b>

*Tableau 11 : LOQ et LOD de l'IgG2a-FITC non réduit et réduit*

Cette méthode par CE-LIF (488 nm) permet ainsi d'atteindre une LOD 66 fois plus sensible que la coloration à l'argent d'après les données reportées dans la littérature [54]

#### 4.1.3.9. Cinétique de réduction de l'IgG2a-FITC

Afin d'identifier les différentes espèces présentes lors de l'analyse de l'IgG2a-FITC, une cinétique de réduction est effectuée. 3  $\mu$ L de mercaptoéthanol sont ajoutés à 100  $\mu$ L d'IgG en solution ; le mélange est chauffé à 70°C pendant 1 min, 5 min et 10 min. La *figure 74* représente cette cinétique de réduction. La *figure 74A* représente l'analyse de l'IgG2a-FITC non réduit. Le pic principal correspond aux complexes 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères. Plusieurs espèces ayant un temps de migration inférieur à celui du pic principal sont présentes en faible quantité. La cinétique de réduction va permettre d'identifier leur temps de migration.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 1 min (*figure 74B*) entraîne une diminution du complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères et l'augmentation du complexe 2 chaînes lourdes / 1 chaîne légère avec un temps de migration de 12 min.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 5 min (*figure 74C*) entraîne la diminution des complexes 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères et 2 chaînes lourdes / 1 chaîne légère. Les complexes 2 chaînes lourdes (temps de migration 11 min) et 1 chaîne lourde / 1 chaîne légère (temps de migration 10 min) augmentent en intensité.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 10 min (*figure 74D*) entraîne une réduction totale de l'échantillon. Les différents complexes ont été réduits. Seules la chaîne légère (temps de migration 7 min) et la chaîne lourde (temps de migration 9 min) restent présents.

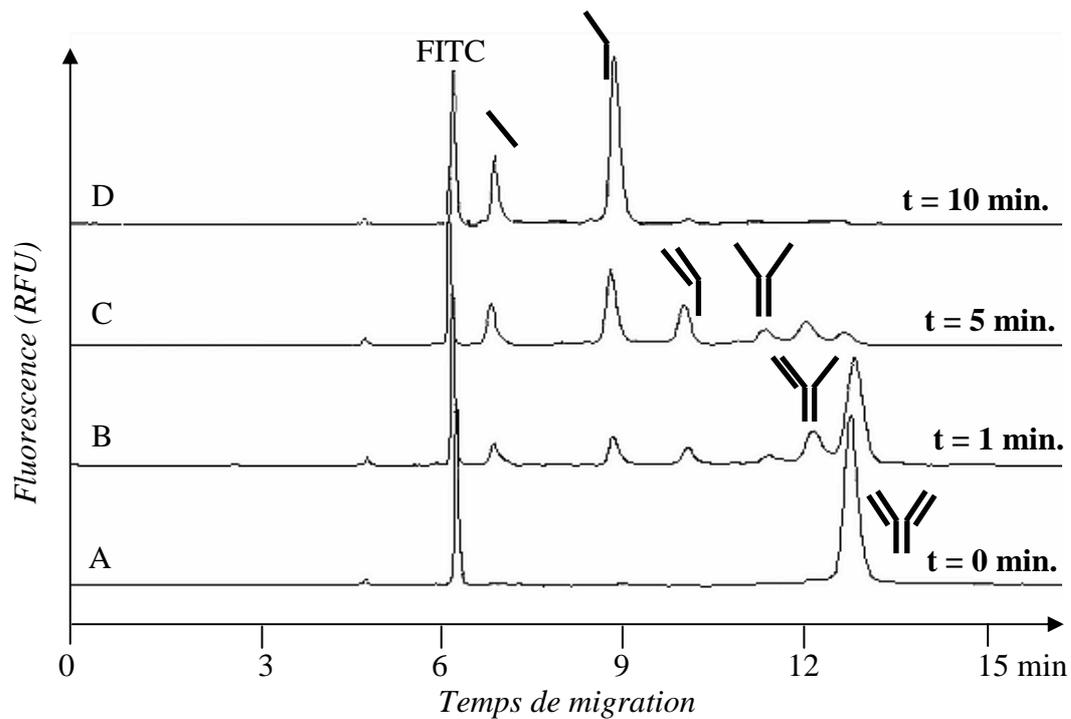


Figure 74 : Cinétique de réduction de l'IgG2a-FITC en CE-SDS-NGS : analyse de 100  $\mu$ L de l'IgG2a-FITC (à 200 ng/mL) mélangés à 3  $\mu$ L de mercapto-éthanol et chauffés à 70 °C et immédiatement injectés en électrophorèse capillaire après 0, 1, 5 et 10 min de temps de réduction. Capillaire 50  $\mu$ m ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à -15 kV pendant 10 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter, le voltage est de -20 kV.

#### 4.3.8 Comparaison de différents IgG marqués

Quatre IgG marqués au FITC à 200 ng/mL ont été analysés par CE-LIF. Cette manipulation a pour but de comparer les différents profils de quatre anticorps et de visualiser les différentes impuretés présentes dans l'échantillon. *Figure 75*

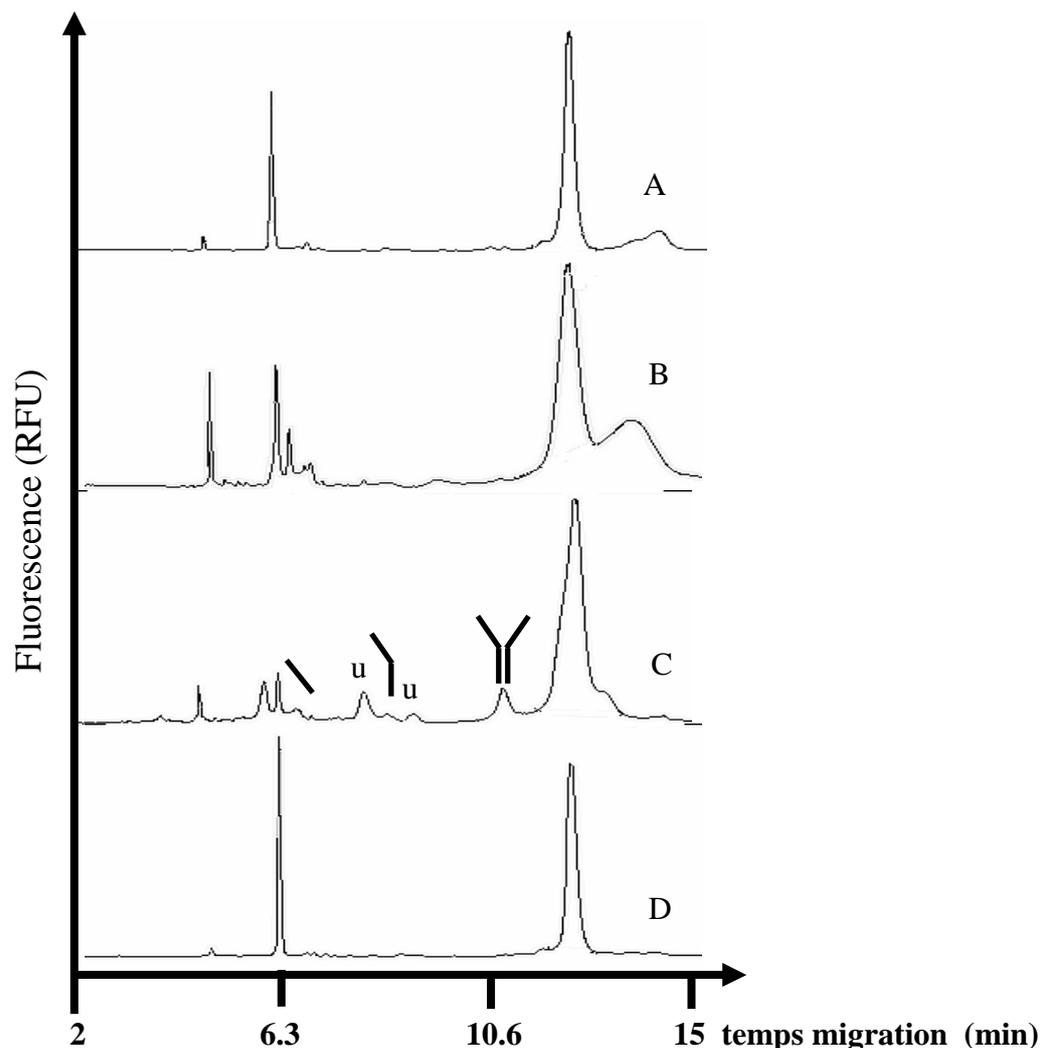
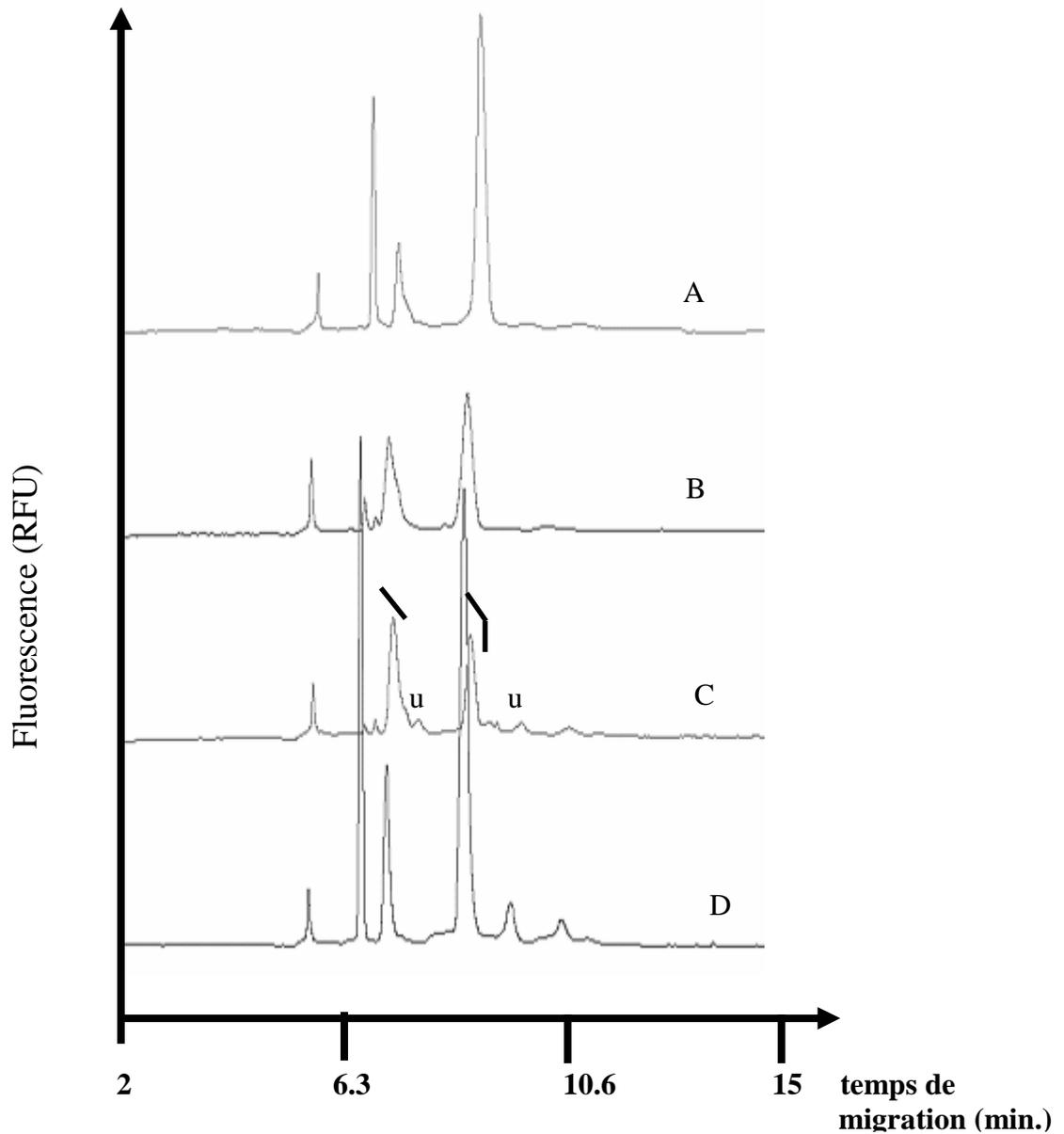


Figure 75 : Séparations de 4 IgG-FITC commerciaux non réduit à 200 ng/mL. Les conditions d'analyses sont identiques à celles de la figure 13. A/ IgG1-FITC contrôle isotype de myélome murin ; B/ IgG-FITC de sérum de lapin ; C/ IgG-FITC de sérum humain ; D/ IgG2a-FITC de souris. Les différents complexes sont attribués grâce à leurs temps de migration.

- l'IgG1-FITC non réduit contrôle isotype de myélome murin (figure 75A) présente des agrégats après le pic principal (complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères) ;
- l'IgG-FITC de sérum de lapin (figure 75B) non réduit migre différemment des autres. Un gros pic d'agrégats est présent ;
- l'IgG –FITC de sérum humain (figure 75C) non réduit présente de nombreuses impuretés. La chaîne légère, la chaîne lourde et le complexe 2 chaînes lourdes sont

identifiés grâce aux temps de migration et à la réduction de l'échantillon (*figure 76C*). Les composés (u) ne sont pas identifiés.

- l'IgG2a-FITC (*figure 75D*) non réduit ne présente pas d'impuretés et d'agrégats. La cinétique de réduction de cet IgG est représentée *figure 74*.



*Figure 76: Séparations de 4 IgG-FITC commerciaux réduits à 200 ng/mL. Les conditions d'analyses sont identiques à celles de la figure 13. A/ IgG1-FITC contrôle isotype de myélome murin ; B/ IgG-FITC de sérum de lapin ; C/ IgG-FITC de sérum humain ; D/ IgG2a-FITC de souris*

La *figure 76* représente l'analyse des quatre IgG-FITC (A/ IgG1-FITC contrôle isotype de myélome murin ; B/ IgG-FITC de sérum de lapin ; C/ IgG-FITC de sérum humain ; D/ IgG2a-FITC de souris) après réduction avec du mercapto-éthanol. Ces analyses montrent la disparition des agrégats (*figure 76A et 76B*). L'analyse de l'IgG-FITC de sérum humain réduit (*figure 76C*) permet d'identifier les différentes impuretés de l'IgG-FITC de sérum humain non réduit (*figure 76C*). Le pic à 6,3 min correspond à la chaîne légère ; le pic à 8 min correspond à la chaîne lourde. Le pic à 10,8 min disparaît lors de la réduction : il correspond vraisemblablement au complexe 2 chaînes lourdes. Les deux composés à 7,6 et 8,4 min sont toujours présents après réduction : ces deux composés n'ont pas été identifiés.

#### **4.1.4. Mise au point de la méthode d'analyse d'un IgG-TAMRA par CE/LIF (532nm)**

Dans le but d'augmenter la sensibilité, les analyses sont réalisées à 532 nm avec des anticorps marqués au tétraméthylrhodamine succinimide ester (TAMRA). Un anticorps anti-souris marqué au TAMRA est donc analysé par CE/LIF à 532 nm. Une diode 532 nm est utilisée. La méthode mise au point précédemment sur l'IgG2a-FITC est utilisée.

##### **4.1.4.1. Limite de détection de l'échantillon non réduit**

La LOQ et la LOD sur le pic principal de l'analyse de l'IgG-TAMRA anti-souris sont déterminées. Ce pic principal correspond aux deux chaînes lourdes et aux deux chaînes légères de l'IgG-TAMRA.

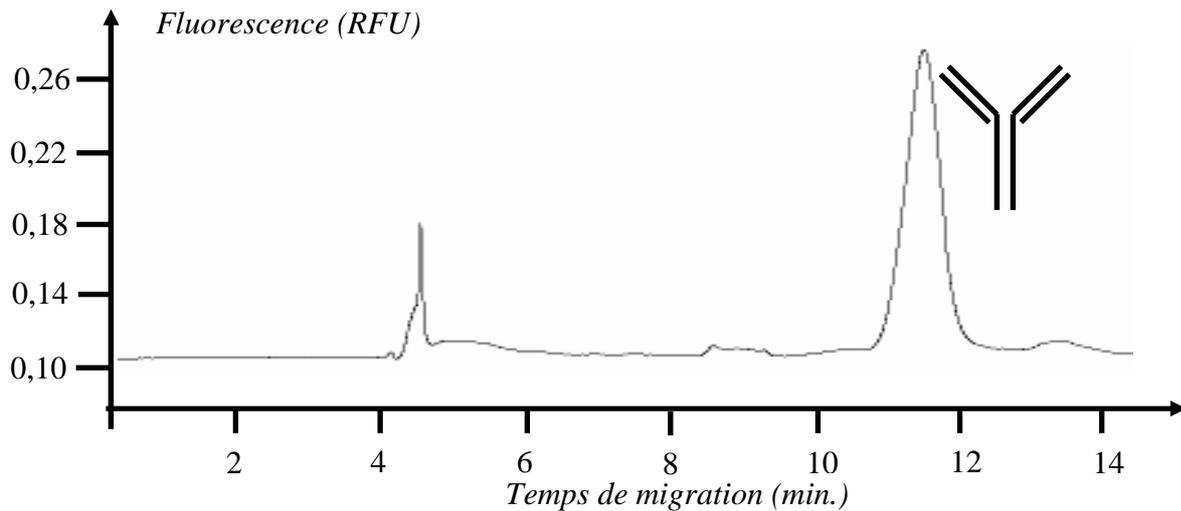


Figure 77 : Analyse de l'IgG-TAMRA à 20 ng/mL. Capillaire 50  $\mu\text{m}$  ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à  $-15$  kV pendant 25 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter, le voltage est de  $-20$  kV.

La figure 77 représente l'analyse de l'IgG-TAMRA anti-souris à 20 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 425.

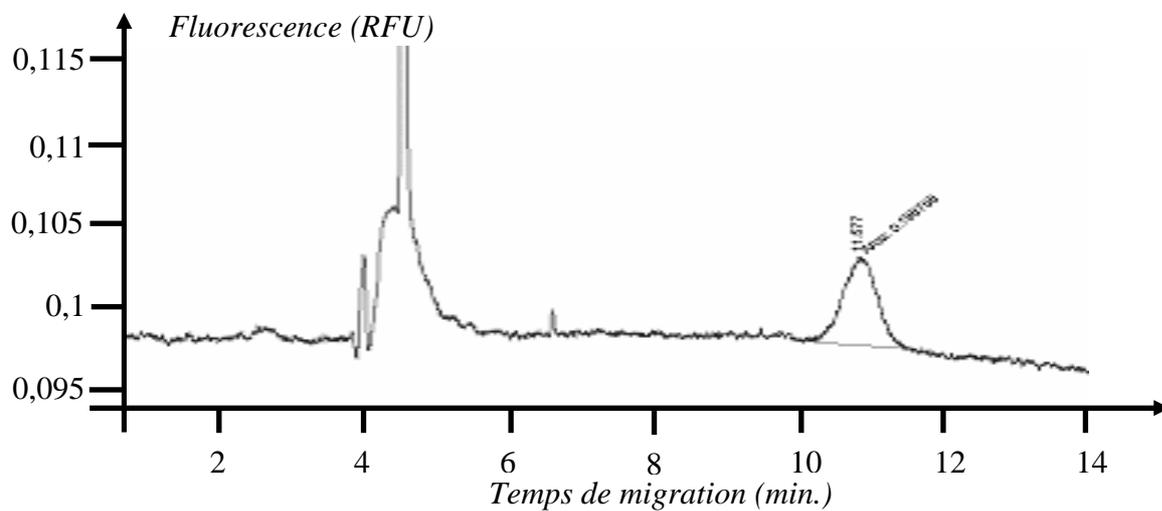


Figure 78 : Analyse de l'IgG-TAMRA non réduit à 200 pg/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 16.

La figure 78 représente l'analyse de l'IgG-TAMRA à 200 pg/mL. Le rapport S/N obtenu est de 12. La LOQ est donc de 167 pg/mL. La LOD est de 50 pg/mL ( $S/N = 3$ ). Cette

LOD obtenue est 200 fois plus sensible que la coloration à l'argent et 20 fois plus sensible que celle rapportée par Hunt et al [54].

#### 4.1.4.2. Répétabilité de l'injection

L'IgG-TAMRA à 200 ng/mL est dilué dans du LiDS 6 mM. Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV. L'analyse est effectuée six fois. (Figure 79)

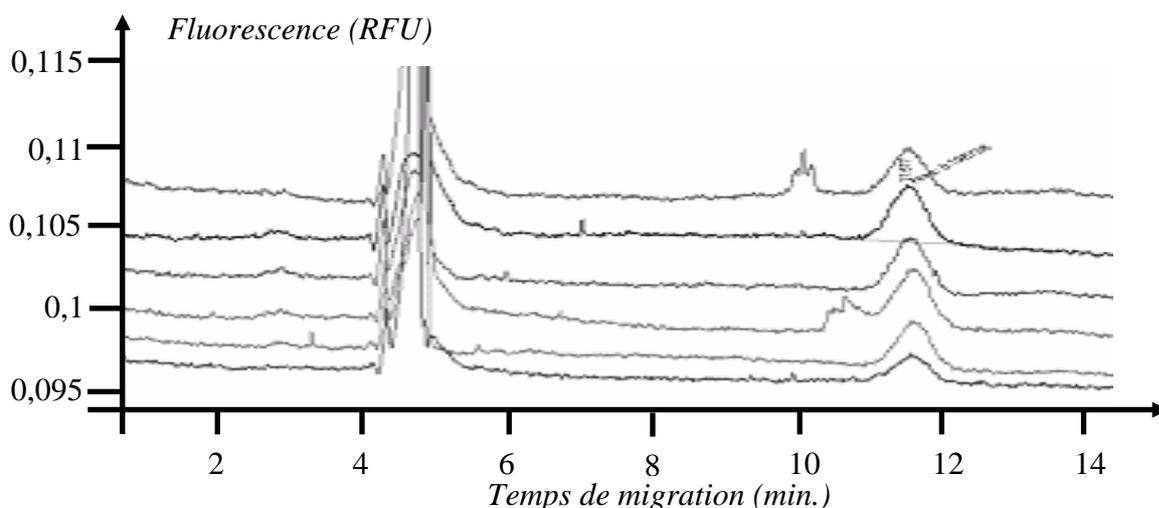


Figure 79 : Analyse de l'IgG-TAMRA non réduit à 200 pg/mL répétée 6 fois. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 16.

Injection	Temps de migration (min)	Aire
1	11,59	0,18
2	11,63	0,19
3	11,65	0,18
4	11,70	0,18
5	11,70	0,18
6	11,66	0,16
<b>RSD (temps migration) = 0,36%</b>		<b>RSD (aire) = 5,5%</b>

Tableau 3 : Calcul des RSD sur le temps de migration et sur l'aire

Le temps de migration est de 11,65 min. La déviation standard relative sur le temps de migration est de 0,36 % sur 6 analyses. La déviation standard relative sur l'aire est de 5,5 % (tableau 3).

#### 4.1.4.3. Limite de détection de l'échantillon réduit

La LOD et la LOQ des deux pics correspondant à la chaîne légère et la chaîne lourde de l'IgG-TAMRA sont déterminées. Pour cela, l'échantillon est réduit : à 100  $\mu$ L d'IgG2a-TAMRA à 40 ng/mL (dilué dans du LiDS 6 mM) sont ajoutés 3  $\mu$ L de mercapto-éthanol ; puis chauffé 15 min à 70°C.

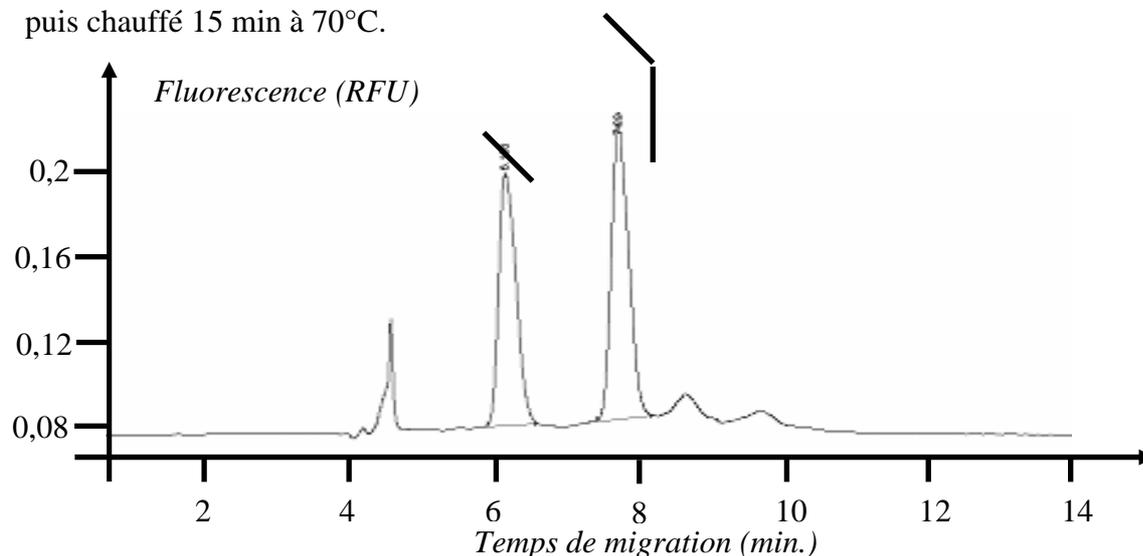


Figure 80 : Analyse de l'IgG-TAMRA réduit à 20 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 16.

La figure 80 représente l'analyse de l'IgG-TAMRA réduit à 20 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 300 pour la chaîne légère et de 350 pour la chaîne lourde.

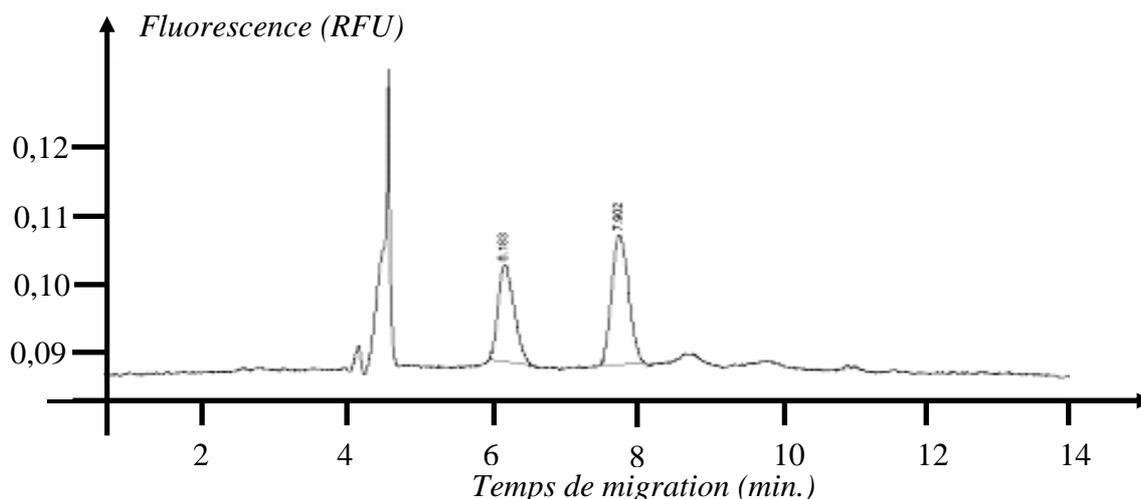


Figure 81 : Analyse de l'IgG-TAMRA réduit à 2 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 16.

La *figure 81* représente l'analyse de l'IgG-TAMRA réduit à 2 ng/mL. Le rapport S/N obtenu est de 35 pour la chaîne légère et de 48 pour la chaîne lourde. La LOQ est donc de 0,6 ng/mL pour la chaîne légère et de 0,4 ng/mL pour la chaîne lourde. La LOD est donc de 170 pg/mL pour la chaîne légère et de 125 pg/mL pour la chaîne lourde.

		LOQ (pg/mL)	LOD (pg/mL)
<i>IgG2a-FITC non réduit</i>	<i>2 chaînes légères + 2 chaînes lourdes</i>	<b>167</b>	<b>50</b>
<i>IgG2a-FITC réduit</i>	<i>chaîne légère</i>	<b>600</b>	<b>170</b>
	<i>chaîne lourde</i>	<b>400</b>	<b>125</b>

*Tableau 12 : LOQ et LOD de l'IgG-TAMRA non réduit et réduit*

La LOD atteinte sur l'immunoglobuline non réduite est 180 fois plus sensible par rapport à celle décrite dans la littérature lors de l'analyse d'une immunoglobuline marquée au TAMRA. [54]

#### **4.1.5. Conclusion**

Nous venons de développer une méthode d'analyse des IgG par CE/LIF. La détection LIF est intégrée à la CE grâce à un capillaire avec ellipsoïde. L'intégration de la détection LIF permet de réduire la longueur de capillaire (de 33 cm de longueur totale), d'automatiser les analyses et d'utiliser le tampon NGS. L'analyse est ainsi effectuée en 15 min. Différents IgG marqués au FITC ou au TAMRA ont été analysés respectivement à 488 nm et 532 nm. La limite de détection atteinte lors de l'analyse des IgG-TAMRA est 180 fois plus sensible que celle reportée dans la littérature [54]. Cette méthode d'analyse permet de séparer et de détecter les différentes impuretés présentes dans l'échantillon. Une cinétique de réduction permet d'identifier les différents fragments et agrégats.

#### **4.2. Séparation d'anticorps par CE-LIF à 266nm (fluorescence native)**

Le but de ce travail est de développer une méthode d'analyse pour le contrôle qualité des anticorps monoclonaux recombinants par CE/LIF à 266 nm (fluorescence native). Les IgG peuvent être analysés par CE/UV à 210 nm mais la limite de détection est seulement de 2 µg/mL [93]. Cette sensibilité est insuffisante pour détecter les impuretés en faible quantité (IgG partiellement réduit, IgG déglycosylé, agrégats...) par ailleurs les utilisateurs notent des

dérives de la ligne de base importantes qui peuvent gêner la détection de ces impuretés. L'analyse des IgG en CE/LIF à 266 nm permet d'éviter toute dérivatisation. La limite de détection doit être équivalente à une coloration à l'argent (méthode de révélation de protéines la plus sensible). Cette demande est imposée par l'industrie pharmaceutique pour son contrôle qualité. Le temps de migration doit être inférieur à 30 minutes. Pour cela, le détecteur de fluorescence induite par laser avec ellipsoïde est utilisé, toujours avec une longueur totale de capillaire de 33 cm. Par la suite, nous allons présenter une méthode d'analyse des IgG par CE/LIF en utilisant la fluorescence native. La LOD sera mesurée et différents IgG seront analysés.

#### **4.2.1. Instrumentation**

Une électrophorèse capillaire HP3DCE Agilent (Waldbronn, Allemagne) est utilisée avec une cassette CE UV. Le détecteur de fluorescence est le détecteur Zetalif Discovery Picometrics (Toulouse, France). La cellule de détection LIF est donc intégrée à l'intérieur de la cassette UV. Le laser 266 nm (diode pulsée, 3 mW) est utilisé (Team Photonics, Meylan, France). Un capillaire Polymicro technologies (Phoenix, Arizona) est utilisé de longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm, diamètre interne 50 µm, diamètre externe 360 µm.

#### **4.2.2. Réactifs utilisés**

Les produits suivants ont été obtenus chez Sigma :

- IgG de serum de bovin (ref : 19640) ;
- IgG de serum humain (ref : 12511);
- IgG de serum de lapin (ref : 18140) ;
- IgG de serum de rat (ref : 18015) ;
- Lithium dodecyl sulfate ;

Le tampon SDS provient de Beckman Coulter ainsi que l'IgG control standard (ref : 391734).

Le kit protéine 230 (marqueur de tailles) provient d'Agilent.

La PNGaseF provient de New England Biolabs (ref : P07045).

#### **4.2.3. Mise au point de la méthode d'analyse d'IgG par CE/LIF à 266 nm**

La méthode de séparation est mise au point sur « l'IgG control standard Beckman ». La méthode d'analyse est identique à celle utilisée pour l'analyse des IgG par CE/LIF 488 nm

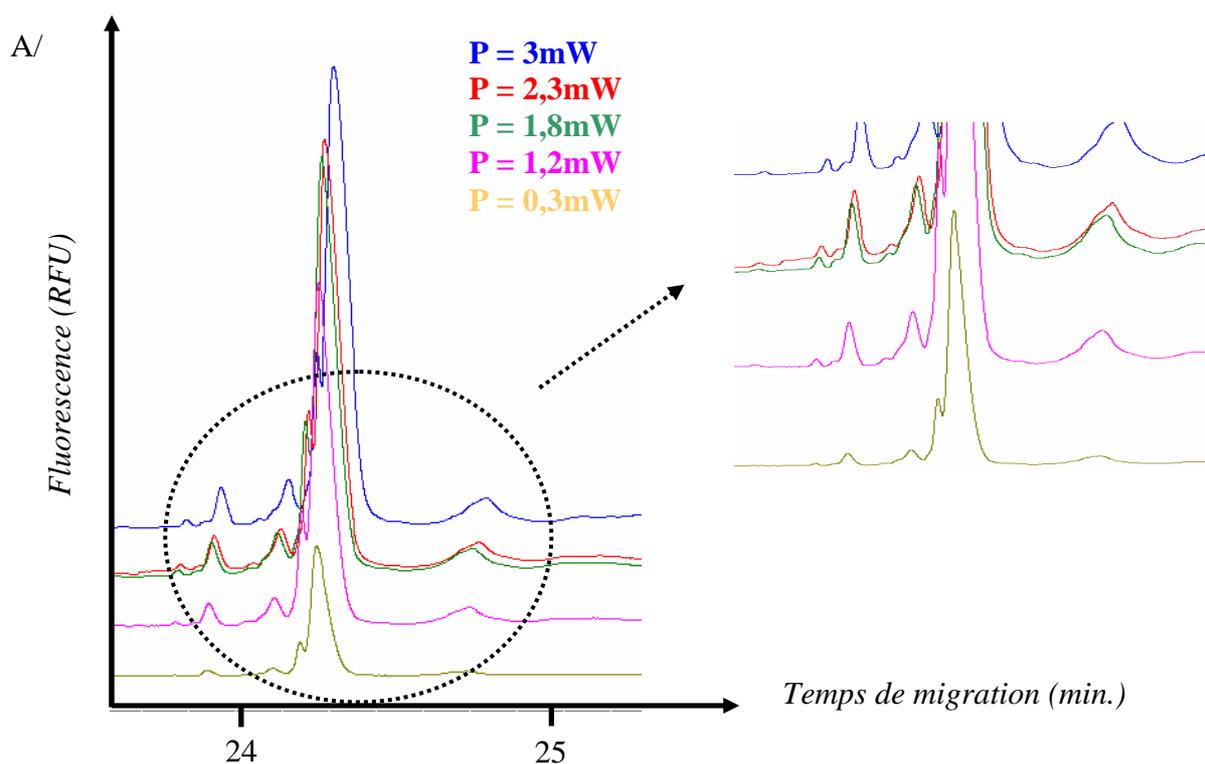
et 532 nm. Vu l'importance de la puissance du laser sur la sensibilité, que nous avons notée dans le paragraphe 4.1.3.4, une étude sur la variation de la puissance du laser 266 nm est effectuée.

Lors des premières analyses à 266 nm, un problème de rupture de courant a été mis en évidence alors que cette rupture de courant n'est pas observée avec un milieu non visqueux. Après trois analyses, le courant chute durant la manipulation. Après observation de la fenêtre de détection à la loupe binoculaire, nous pensons que cela est dû à un échauffement du capillaire au niveau de la bille lors de l'excitation par le laser dont le pulse est très puissant (1000 watts). Pour remédier à ce problème, la température à l'intérieur de la cassette Agilent a été fixée à 15°C. De plus un conditionnement du capillaire pendant une nuit, laser éteint, est indispensable.

#### 4.2.3.1. Optimisation de la puissance du laser

La puissance du laser est optimisée afin d'obtenir la meilleure sensibilité. Comme il a été décrit au paragraphe 1.3.4, l'optimisation de la puissance du laser est importante afin d'optimiser la photodégradation des molécules devant le faisceau laser.

L'IgG control standard Beckman est à 1 mg/mL. Après une pré-injection d'eau (1000 mbar, 12 s), l'échantillon est injecté pendant 25 s à -15 kV. L'analyse est effectuée en faisant varier la puissance du laser de 0,3 mW à 3 mW (figure 82).



B/

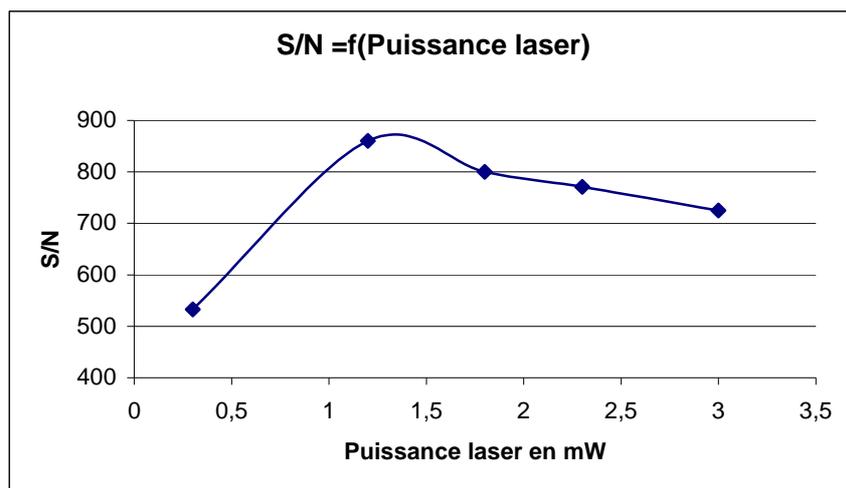


Figure 82 : Influence de la puissance du laser sur la sensibilité de l'IgG Beckman: A/ Analyse de l'IgG Beckman avec une puissance du laser qui varie de 0,3 mW à 3 mW : un agrandissement sur la ligne de base est réalisé ; B/ Influence de la puissance du laser sur le rapport S/N. Capillaire 50  $\mu$ m, longueur totale : 33 cm ; longueur effective : 14 cm. Pré injection d'eau 1000 mbar pendant 0,2 min ; Injection -15 kV pendant 25 s ; Séparation : -15 kV avec le gel SDS Beckman Coulter,  $T = 15^{\circ}\text{C}$

L'analyse de l'IgG Beckman montre une augmentation du signal en fonction de la puissance du laser 266 nm. Cette augmentation du signal s'accompagne également d'une augmentation du bruit et des instabilités de la ligne de base. Le meilleur rapport signal/bruit est obtenu avec une puissance du laser de 1,2 mW.

#### 4.2.3.2. Limite de détection de l'échantillon non réduit

La LOQ et la LOD sur le pic principal de l'analyse de l'IgG Beckman sont déterminées. Ce pic principal correspond aux deux chaînes lourdes et aux deux chaînes légères de l'IgG.

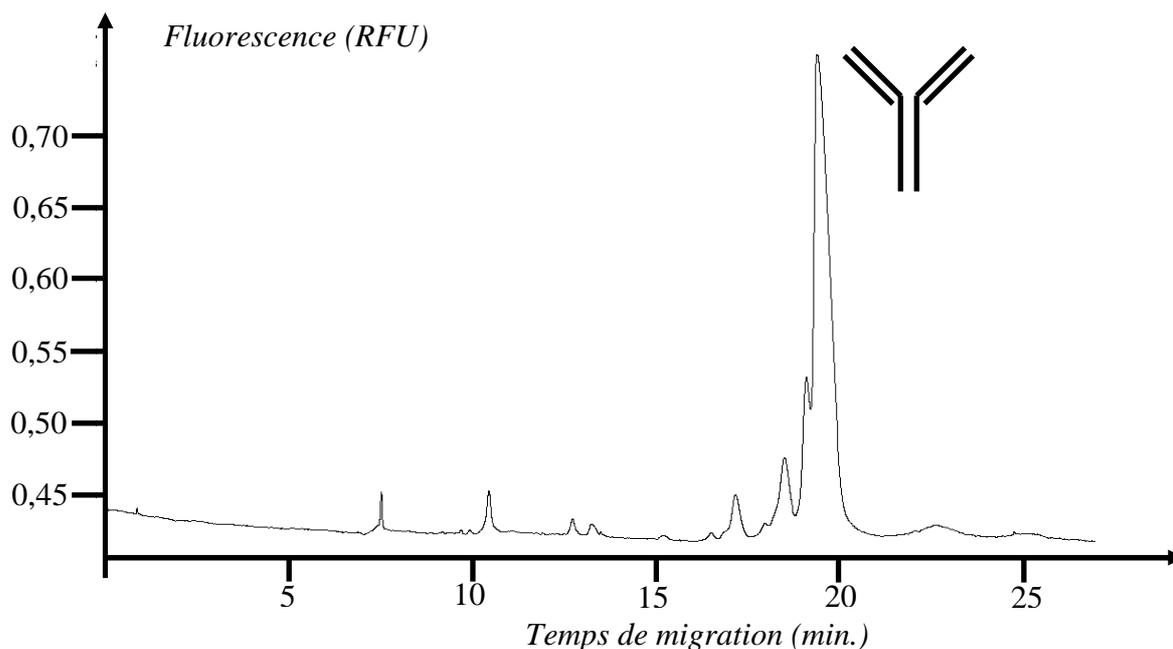


Figure 83 : Analyse de l'IgG control standard Beckman à 1 mg/mL. Capillaire 50  $\mu\text{m}$  ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à  $-15$  kV pendant 25 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter , le voltage est de  $-20$  kV ; température :  $15^\circ\text{C}$ .

La figure 83 représente l'analyse de l'IgG control standard beckman à 1 mg/mL. Le rapport S/N obtenu est de 1080. De nombreuses impuretés sont présentes dans l'échantillon, elles seront identifiées lors de la cinétique de réduction de l'échantillon (paragraphe 4.2.3.5)

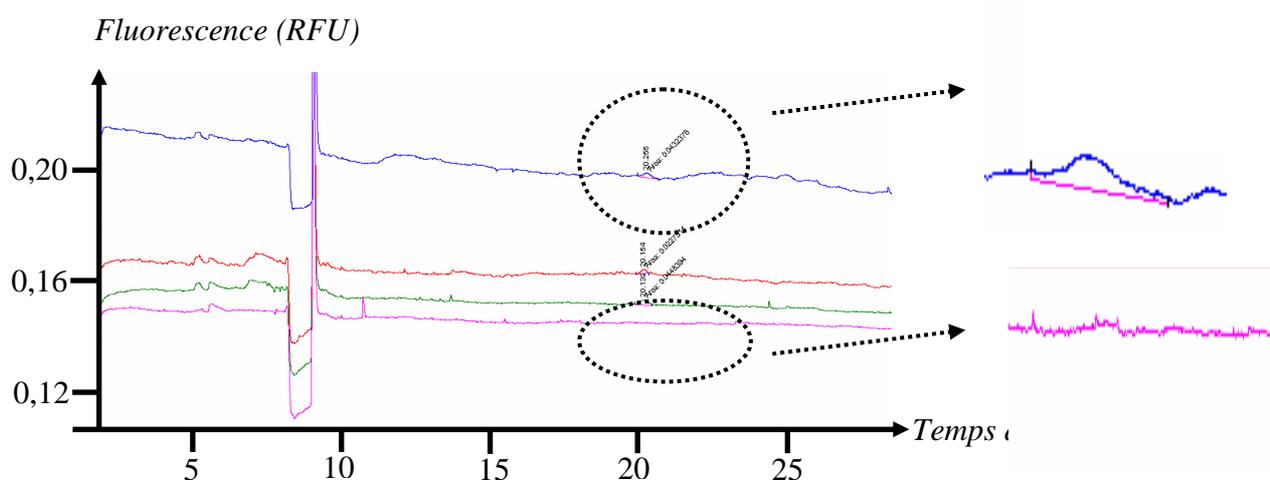
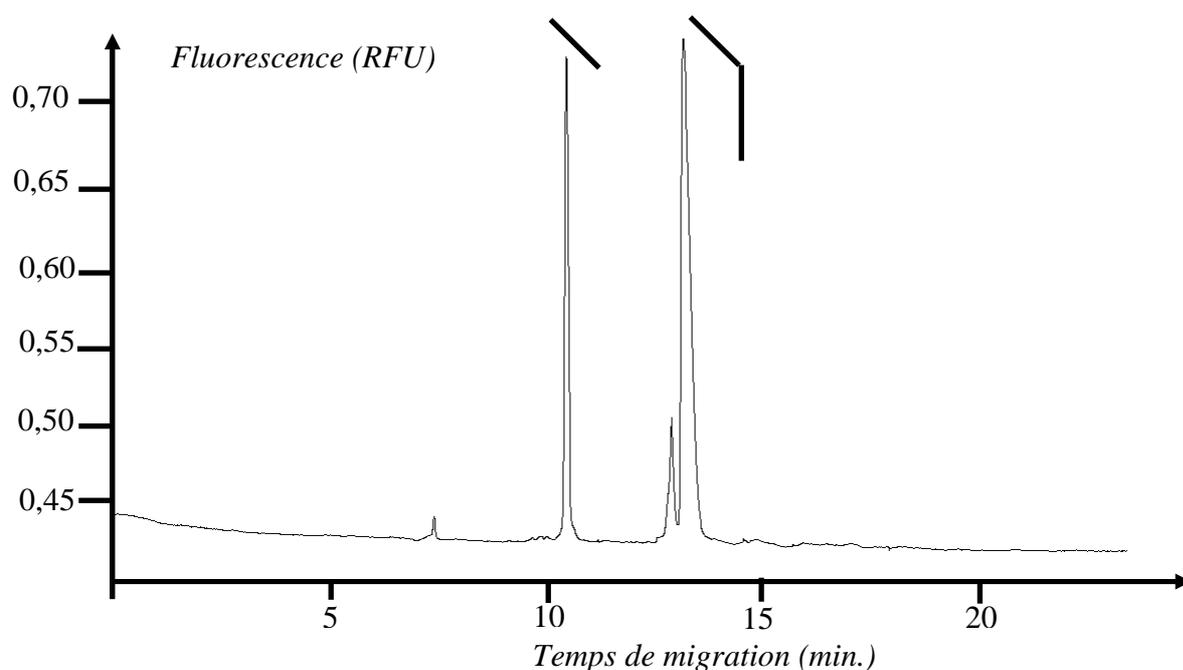


Figure 84 : Analyse de l'IgG control standard Beckman non réduit à 50 ng/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 22

La *figure 84* représente l'analyse de l'IgG control standard Beckman à 50 ng/mL (analyses réalisées 3 fois : électrophérogrammes bleu, rouge et vert). Un « blanc » est réalisé (électrophérogramme rose). Le rapport S/N obtenu est de 6. Le signal est défini comme étant la hauteur du pic en partant de la ligne de base. Le bruit est défini comme une valeur moyenne de la distance entre le pic maximum et le pic minimum sur deux périodes de une minute avant et après le pic. La LOQ est donc de 85 ng/mL (S/N = 10). La LOD est de 25 ng/mL (S/N = 3).

#### 4.2.3.3. Limite de détection de l'échantillon réduit

La LOD et la LOQ des deux pics correspondant à la chaîne légère et la chaîne lourde de l'IgG Beckman sont déterminées. Pour cela, l'échantillon est réduit : à 50  $\mu$ L d'IgG control standard Beckman à 1mg/mL est ajouté 3  $\mu$ L de mercapto-éthanol ; puis chauffer 15 min à 70°C.



*Figure 85 : Analyse de l'IgG control standard Beckman réduit à 1 mg/mL. Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 22*

La *figure 85* représente l'analyse de l'IgG control standard Beckman réduit à 1 mg/mL. Le rapport S/N obtenu est de 780 pour la chaîne légère et de 800 pour la chaîne lourde. La LOQ est de 270 ng/mL pour la chaîne légère et de 250 ng/mL pour la chaîne lourde. La LOD est de 80 ng/mL pour la chaîne légère et de 75 ng/mL pour la chaîne lourde (S/N = 3).

		LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
<i>IgG Beckman non réduit</i>	<i>2 chaînes légères + 2 chaînes lourdes</i>	<b>85</b>	<b>25</b>
<i>IgG Beckman réduit</i>	<i>chaîne légère</i>	<b>270</b>	<b>80</b>
	<i>chaîne lourde</i>	<b>250</b>	<b>75</b>

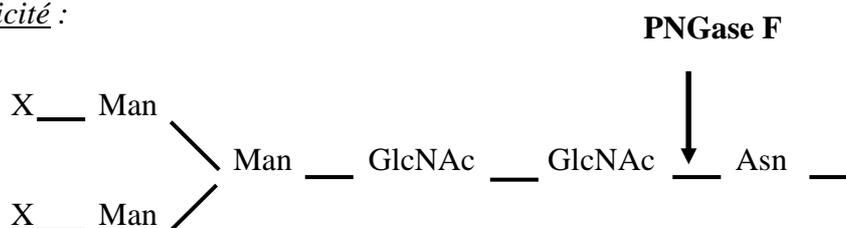
Tableau 13 : LOQ et LOD de l'IgG control standard Beckman non réduit et réduit

La LOD atteinte sur l'IgG non réduit est donc 20 fois plus sensible que la coloration avec le bleu de Coomassie et 2,5 fois moins sensible que la coloration à l'argent selon les LOD reportées dans la littérature. [7]

#### 4.2.3.4. Action de la PNGase F sur l'IgG control standard Beckman

Les anticorps possèdent une chaîne saccharidique. Afin de localiser dans l'électrophérogramme le pic qui correspondrait à la protéine dont la chaîne N-glycosylée a disparu, la N-Glycosidase F, aussi connue sous le nom de PNGase F, est utilisée. C'est une amidase qui clive la liaison entre la N-acetylglucosamine (GlcNAc) et l'asparagine (Asn) des glycoprotéines [95, 96].

##### Spécificité :



##### Conditions de réaction :

- 1/ 18µL d'IgG Beckman sont combinés avec 2µL de tampon dénaturant (5% SDS et 0.4M DTT) ;
- 2/ L'IgG dénaturée est chauffée à 100°C pendant 10 minutes ;
- 3/ 20µL de tampon 0.5M phosphate de sodium pH 7,5, 2 µL 10% NP40, 1µL de PNGase F et 11µL d'eau sont ajoutés.
- 4/ L'ensemble est incubé à 37°C pendant 1 heure (pour une réaction totale).

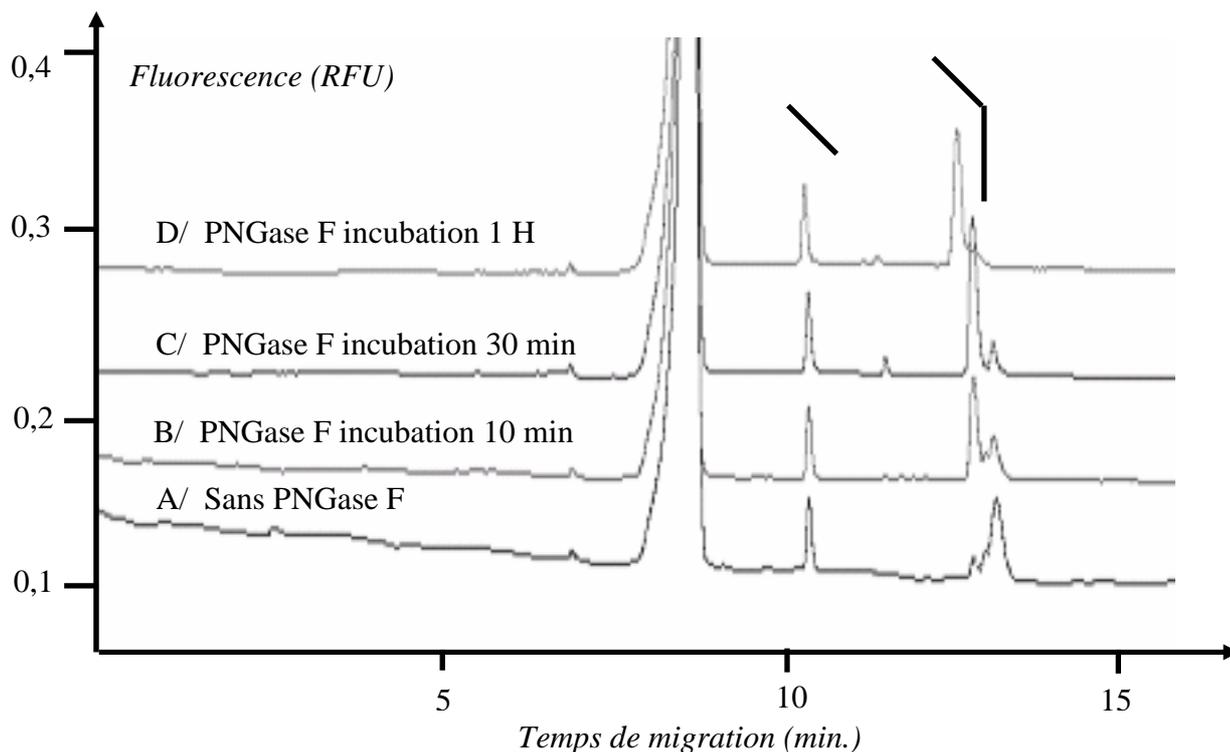


Figure 86 : Action de la PNGase F sur l'IgG control standard beckman à 1 mg/mL. Conditions de réaction voir le texte précédent. Conditions d'analyses identiques à la figure 22

L'action de la PNGase F sur l'IgG Beckman est étudiée (figure 86). La figure 86A montre l'IgG Beckman dénaturé sans PNGase F : on identifie la chaîne légère et la chaîne lourde. Les figure 86 B, C et D montrent la cinétique d'action de la PNGase F. La figure 86B correspond à 10 min d'incubation avec la PNGase F. La chaîne légère reste identique ; la PNGaseF n'a pas d'action sur cette chaîne car elle ne porte pas de chaîne saccharidique. Par contre, le pic de la chaîne lourde N-glycosilée diminue et deux pics de temps de migration inférieur apparaissent. La figure 86C correspond à un temps d'incubation de 30 min. Le pic de la chaîne lourde N-glycosilée continue à diminuer, alors que le pic de la chaîne lourde non N-glycosilée augmente. La réaction est totale au bout d'une heure (figure 86D). La chaîne lourde N-glycosilée a disparu ; il ne reste que la chaîne lourde non glycosilée.

Cette cinétique montre que 2 chaînes saccharidiques sont attachées à la chaîne lourde de l'IgG : en effet, la chaîne légère n'est pas affectée par la PNGase F. De plus, l'action de la PNGase F sur la chaîne lourde est bien démontrée : en effet, la coupure de la chaîne saccharidique entraîne une diminution du temps de migration de la chaîne lourde ; la chaîne saccharidique seule n'est pas visualisée car elle ne fluorescence pas à 266 nm.

#### 4.2.3.5. Cinétique de réduction de l'IgG control standard Beckman

Afin d'identifier les différentes impuretés présentes lors de l'analyse de l'IgG Beckman non réduit, une cinétique de réduction est réalisée.

La *figure 87* représente la cinétique de réduction de l'IgG control standard Beckman, 1  $\mu$ L de mercaptoéthanol est ajouté à 50  $\mu$ L d'IgG à 1 mg/mL ; le mélange est chauffé à 70°C pendant 1 min, 2 min et 10 min. La *figure 87A* représente l'analyse de l'IgG2a-FITC non réduit. Le pic principal correspond au complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères (temps de migration de 20 min). Le pic à 19.5 min correspond au complexe 2 chaînes lourdes déglycosilées / 2 chaînes légères. Plusieurs espèces ayant un temps de migration inférieur à celui du pic principal sont présentes en faible quantité. La cinétique de réduction va permettre de les identifier.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 1 min (*figure 87B*) entraîne la disparition du complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères ( $t_m = 20$  min) et du complexe 2 chaînes lourdes / 1 chaîne légère ( $t_m = 18,5$  min). Le complexe 2 chaînes lourdes ( $t_m = 17$  min) diminue en intensité. Par contre, le complexe 1 chaîne lourde / 1 chaîne légère ( $t_m = 16$  min), la chaîne lourde ( $t_m = 14$  min) et la chaîne légère ( $t_m = 11$  min) augmentent en intensité.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 2 min (*figure 87C*) entraîne une augmentation du complexe 1 chaîne lourde / 1 chaîne légère ( $t_m = 16$  min), de la chaîne lourde ( $t_m = 14$  min) et de la chaîne légère ( $t_m = 11$  min). Le complexe 2 chaînes lourdes ( $t_m = 17$  min) a totalement disparu.

La réduction de l'échantillon à 70°C pendant 10 min (*figure 87D*) entraîne une réduction totale de l'échantillon. Les différents complexes ont été réduits. Seules la chaîne légère ( $t_m = 11$  min) et la chaîne lourde ( $t_m = 14$  min) restent présents. La chaîne lourde déglycosilée (temps de migration de 13,5 min) est séparée de la chaîne lourde glycosilée ( $t_m = 14$  min).

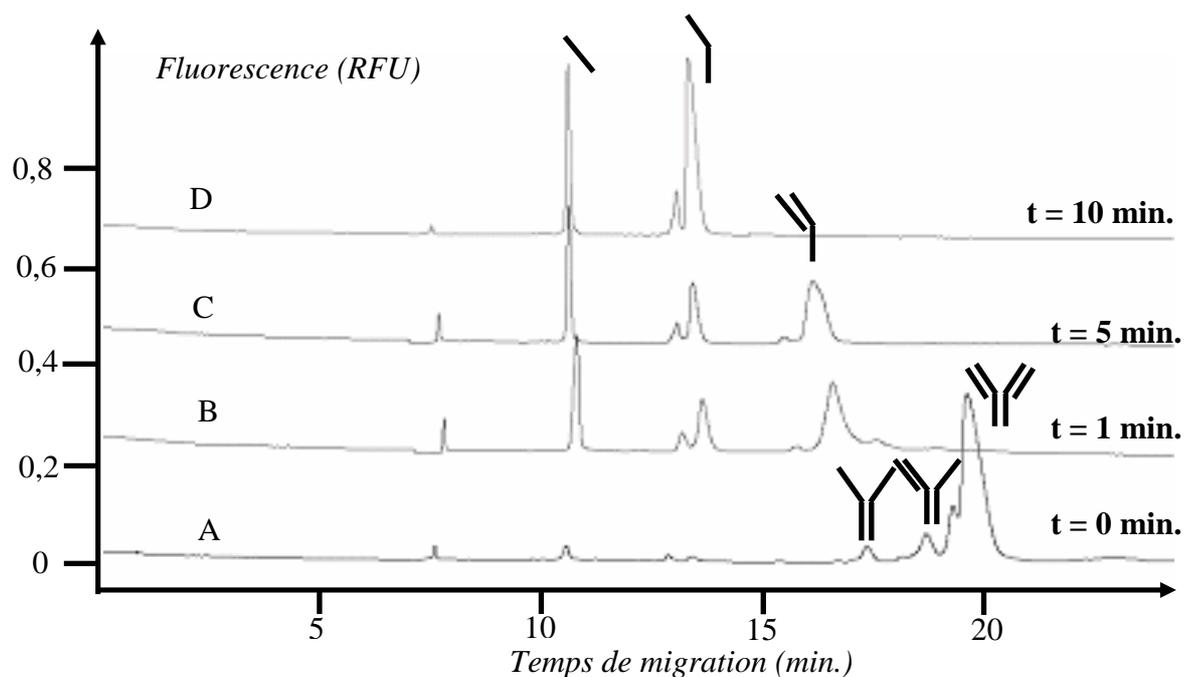


Figure 87 : Cinétique de réduction de l'IgG control standard Beckman: analyse de 50  $\mu\text{L}$  de l'IgG (à 1 mg/mL) mélangés à 2  $\mu\text{L}$  de mercapto-éthanol et chauffé à 70 °C et immédiatement injectés en électrophorèse capillaire après 0, 1, 2 et 10 min de temps de réduction. Capillaire 50  $\mu\text{m}$  ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à -15 kV pendant 10 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter , le voltage est de -20 kV.

#### 4.2.3.6. Comparaison détection UV et LIF (fluorescence native) sur l'analyse d'anticorps

Afin de comparer la sensibilité entre la détection par absorption UV (Agilent, lampe deutérium) et la détection LIF mise au point dans ce travail avec un laser 266 nm, un capillaire avec deux fenêtres est utilisé. La première fenêtre (longueur effective : 14 cm) correspond à la détection LIF ; la seconde fenêtre (longueur effective : 25 cm) correspond à la fenêtre UV. Ce capillaire permet donc d'effectuer les deux détections et aussi d'assurer une bonne comparaison. *Figure 88*

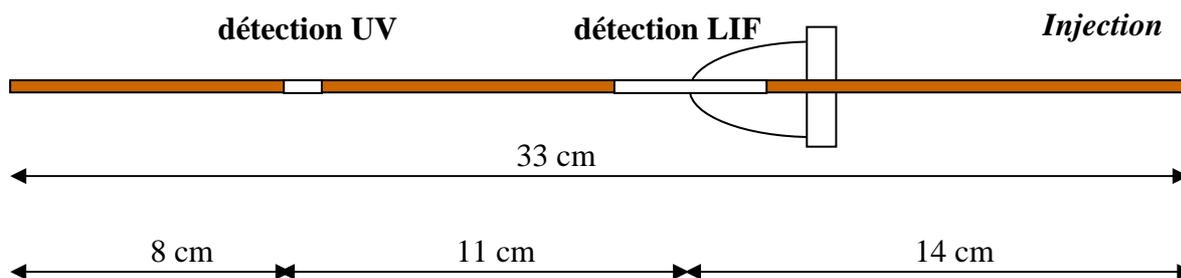


Figure 88 : Schéma du capillaire avec deux fenêtres de détection UV et LIF

La première étape consiste à déterminer la longueur d'onde optimale de la lampe UV afin d'obtenir un maximum de sensibilité. Pour cela, l'IgG Beckman (1 mg/mL) est analysé à trois longueurs d'onde UV : 210 nm, 214 nm et 220 nm. Figure 89

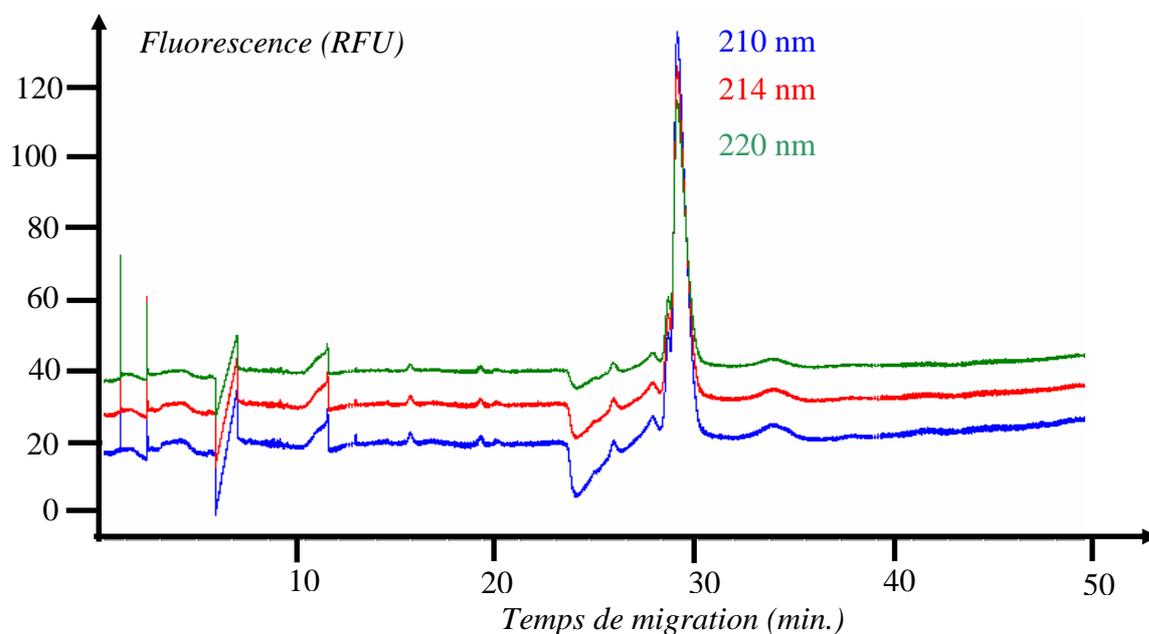


Figure 89 : Analyse de l'IgG control standard Beckman non réduit à 1 mg/mL avec une détection UV (210 nm, 214 nm et 220 nm). Capillaire 50  $\mu\text{m}$  ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 25 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à -15 kV pendant 10 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter, le voltage est de -20 kV.

Avec une détection à 210 nm, 214 nm et 220 nm, le rapport S/N du pic principal est respectivement de 114, 94 et 75. La comparaison est donc effectuée entre la détection UV (210 nm) et la détection LIF (266 nm).

La comparaison de la sensibilité entre la détection UV et LIF avec un capillaire doté de deux fenêtres est pertinente ; cependant il est important de s'assurer que le laser 266 nm n'influence pas la détection UV.

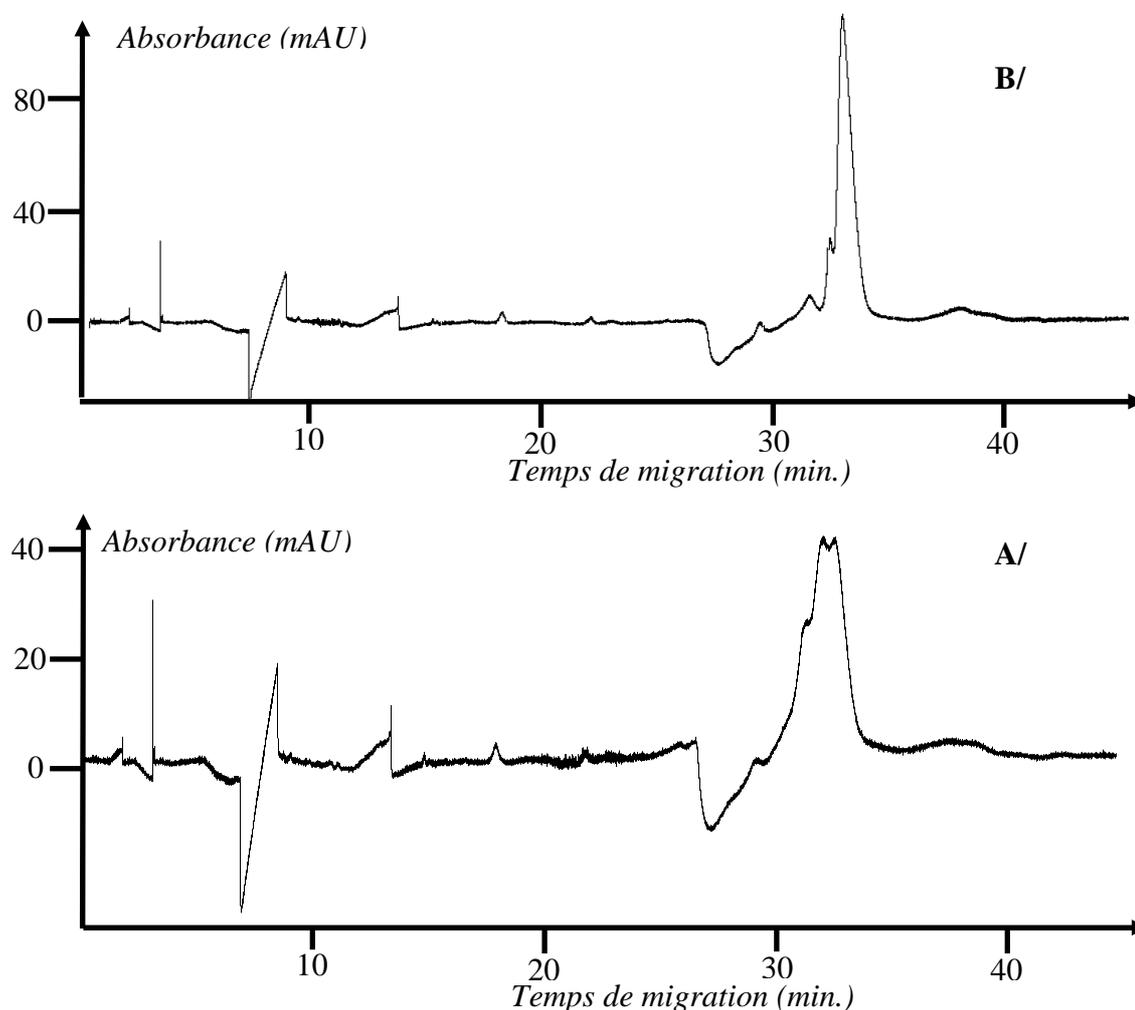
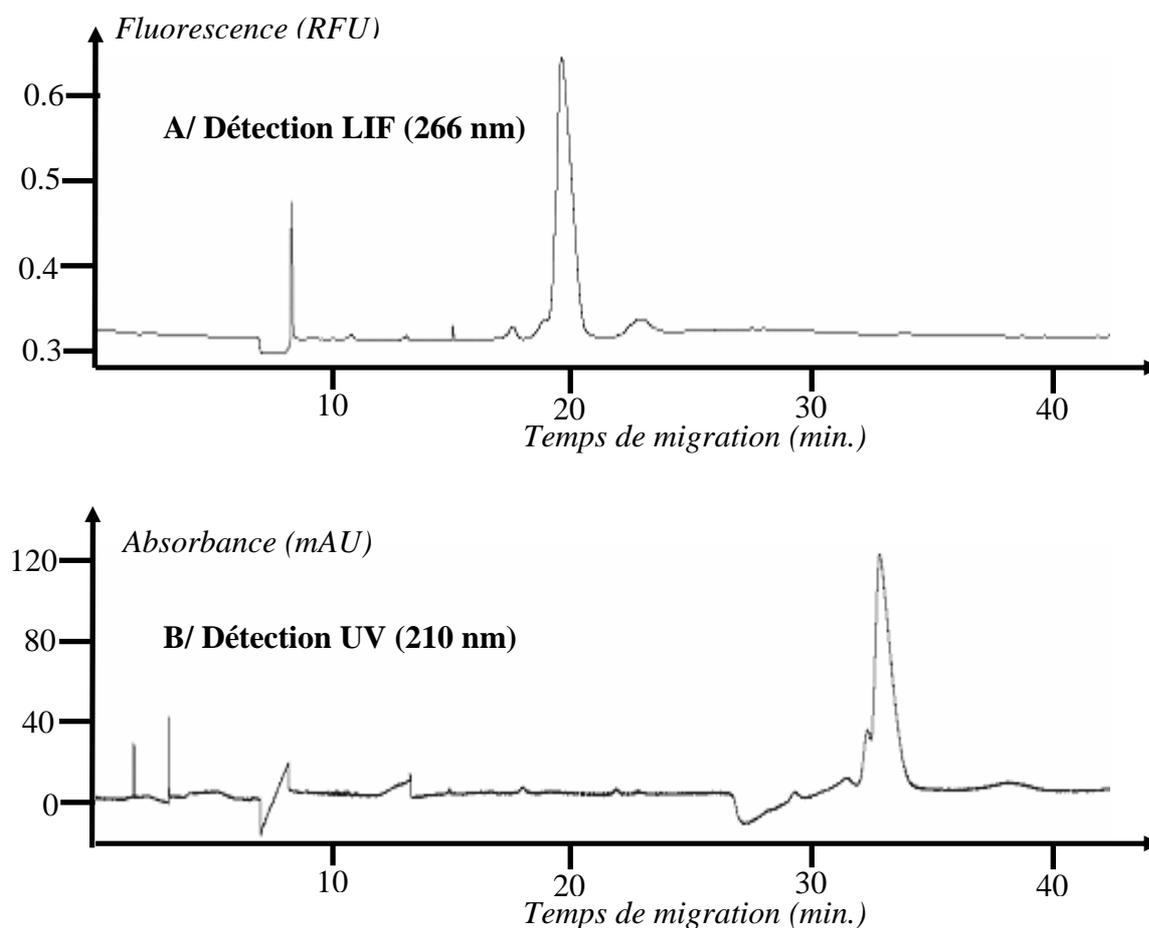


Figure 90 : Analyse de l'IgG control standard Beckman non réduit à 1 mg/mL avec une détection UV (210nm) A/ laser 266 nm éteint ; B/ laser 266 nm allumé; Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 28.

Pour cela, l'IgG Beckman non réduit à 1 mg/mL est analysé en LIF et en UV. La première analyse (figure 90A) est réalisée laser éteint ; seule la détection d'absorption UV est réalisée. La deuxième analyse (figure 90B) est réalisée laser allumé : nous pouvons observer une dégradation de l'IgG par le laser 266 nm. Donc, les deux détections ne peuvent pas être réalisées simultanément. Une première injection (laser 266 nm allumé) permet de déterminer la sensibilité en LIF. Une seconde analyse (laser 266 nm éteint) permet de déterminer la sensibilité en UV.

L'IgG Beckman non réduit à 1 mg/mL est donc analysé avec la détection LIF (266 nm) et la détection UV (210 nm). Le rapport S/N obtenu en détection LIF (*figure 91A*) est de 950 alors que le S/N obtenu en UV (*figure 91B*) est de 114. La limite de détection atteinte en LIF est de 25 ng/mL. Celle obtenue en UV est de 1 µg/mL. La détection LIF permet donc de gagner de facteur 40 en sensibilité par rapport à la détection UV.



*Figure 91 : Comparaison entre la détection LIF (266nm) et la détection UV (210 nm) : analyse de l'IgG control standard Beckman non réduit à 1 mg/mL; mêmes conditions d'analyses que précédemment.*

#### **4.2.3.7. Comparaison de différents IgG**

Cinq IgG non réduit à 1 mg/mL ont été analysés par CE-LIF (266 nm). Ils ont des profils très différents *figure 92*. Cette manipulation a pour but de comparer les différents profils de cinq anticorps et de visualiser les différentes impuretés présentes dans l'échantillon.

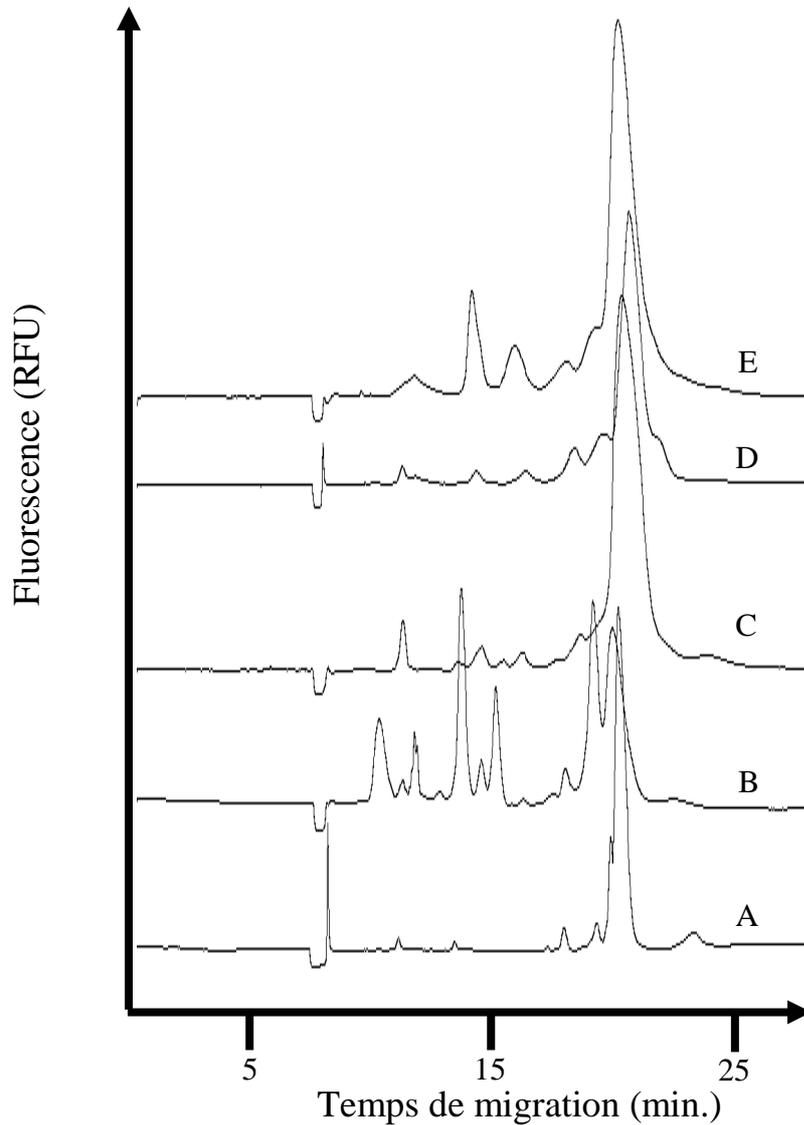


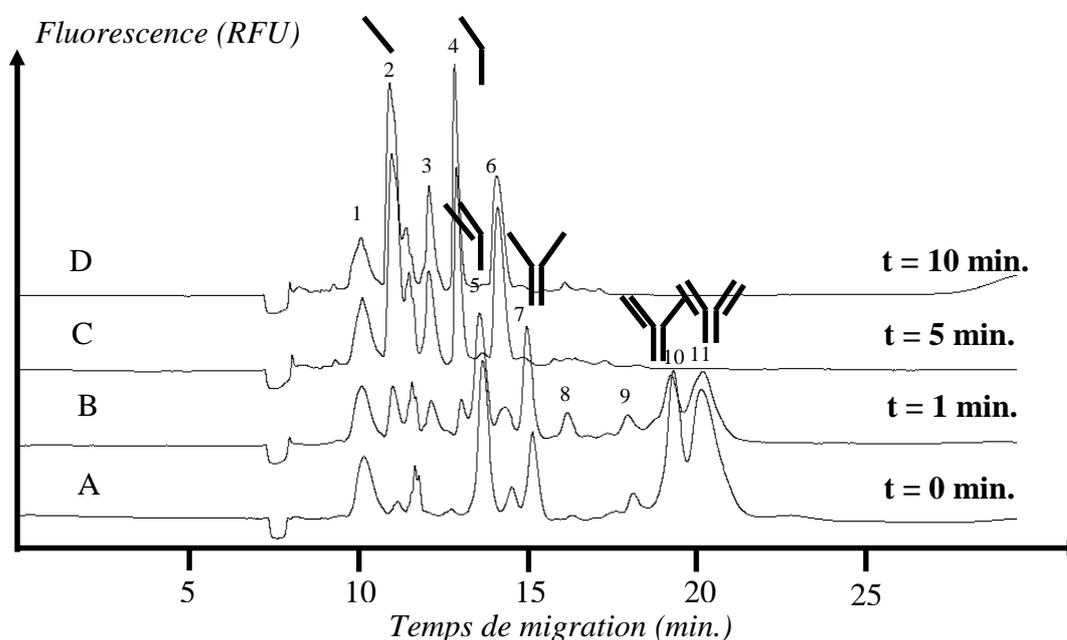
Figure 92: Séparations de 5 IgG non réduit à 1 mg/mL. Les conditions d'analyses sont identiques à celle de la figure 22. A/ IgG control standard Beckman ; B/ IgG de sérum de rat ; C/ IgG de sérum de bovin; D/ IgG de sérum humain ; E/ IgG de sérum de lapin.

- L'IgG control standard Beckman (*figure 92A*) a été étudié en détail précédemment. La cinétique de réduction a permis d'identifier l'ensemble des pics de l'échantillon (voir paragraphe 4.2.3.5) ;
- l'IgG de sérum de rat (*figure 92B*) est très complexe ; il présente de nombreux pics. Une cinétique de réduction est décrite dans le paragraphe suivant afin d'identifier certains pics.
- Les IgG de sérum de bovin (*figure 92C*), de sérum humain (*figure 92D*) et de sérum de lapin (*figure 92E*) ont très profils comparables. Seul l'IgG de lapin ne

présente pas d'agrégat. Les trois IgG présentent des impuretés avant le pic principal correspondant au complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères.

#### 4.2.3.8. Cinétique de réduction de l'IgG de sérum de rat

L'IgG de sérum de rat est très complexe, il présente de nombreux pics. Une cinétique de réduction est effectuée afin d'identifier certains composés. La *figure 93A* représente l'IgG de sérum de rat non réduit : onze composés sont présents dans cet échantillon. L'échantillon est ensuite réduit avec le mercaptoéthanol et immédiatement injecté après 1 min (*figure 93B*) ; 5 min (*figure 93C*) et 10 min (*figure 93D*) de réduction.



*Figure 93 : Cinétique de réduction de l'IgG de sérum de rat: analyse de 50  $\mu$ L de l'IgG (à 1 mg/mL) mélangés à 2  $\mu$ L de mercapto-éthanol et chauffé à 70 °C et immédiatement injectés en électrophorèse capillaire après 0, 1, 5 et 10 min de temps de réduction. Capillaire 50  $\mu$ m ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm. Après une pré-injection d'eau à 1000 mbar pendant 12 s, l'échantillon est injecté à -15 kV pendant 10 s ; le tampon est le tampon SDS Beckman Coulter, le voltage est de -20 kV.*

La *figure 93B* montre une diminution des pics 10 et 11 : on peut donc attribuer le pic 11 au complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères et le 10 au complexe 2 chaînes lourdes / 1

chaîne légère ou au complexe 2 chaînes lourdes / 2 chaînes légères déglycosilé. Les pics 8 et 9 ne sont pas identifiés.

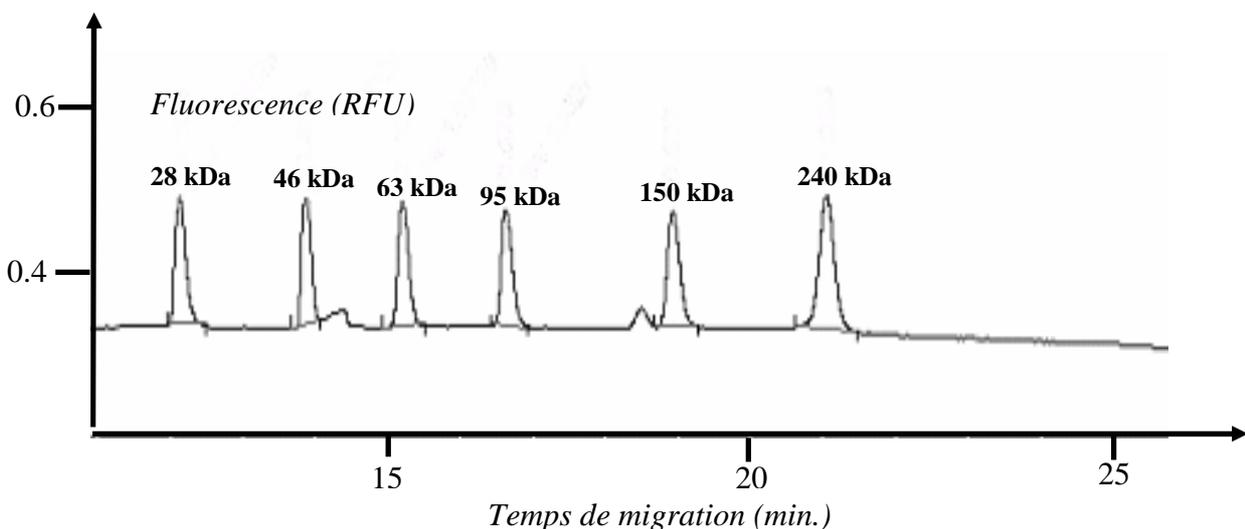
La *figure 93C* correspond à un temps de réduction de 5 min. Les pics 5 et 7 ont disparu ; on peut donc penser qu'ils correspondent respectivement au complexe 1 chaîne lourde / 1 chaîne légère et 2 chaînes lourdes. Les pics 3 et 6 ne sont pas identifiés.

Après 10 min de réduction (*figure 93D*), il reste 5 pics. Les pics 2 et 4 ont augmenté en intensité ; ils peuvent donc être attribués à la chaîne légère et la chaîne lourde respectivement. Les pics 1, 3 et 6 ne sont pas identifiés.

Pour cet échantillon, l'électrophorèse capillaire, comme en électrophorèse classique, ne permet pas d'identifier tous les composés présents. L'utilisation de marqueurs de taille pourrait aider à déterminer les tailles moléculaires de ces espèces pourvu qu'elles soient non glycosilées, sinon seule la spectrométrie de masse peut donner ces informations nécessaires.

#### 4.2.3.9. Mesure de la taille des immunoglobulines par électrophorèse capillaire

Afin de déterminer le poids moléculaire des anticorps, la méthode CE-LIF est utilisée. Pour cela, les marqueurs de taille du kit protéine 230 (28 kDa, 46 kDa, 63 kDa, 95 kDa, 150 kDa, 240 kDa) sont analysés (*figure 94*). Le logarithme du poids moléculaire des marqueurs de taille est donc tracé en fonction du temps de migration. *Figure 95*



*Figure 94 : Analyse des marqueurs de taille (Agilent protein 230 kit). Injection pré-injection d'eau pendant 12 s, injection -10 kV pendant 10 s. Capillaire 50  $\mu$ m ID, longueur totale 33 cm, longueur effective 14 cm, séparation -15 kV*

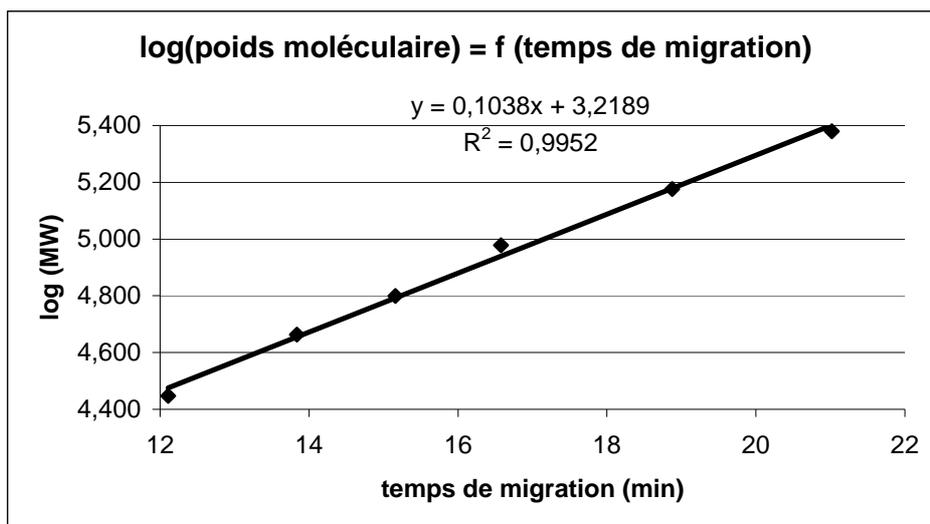


Figure 95 : Courbe de calibration : logarithme (poids moléculaire) = f (temps de migration)

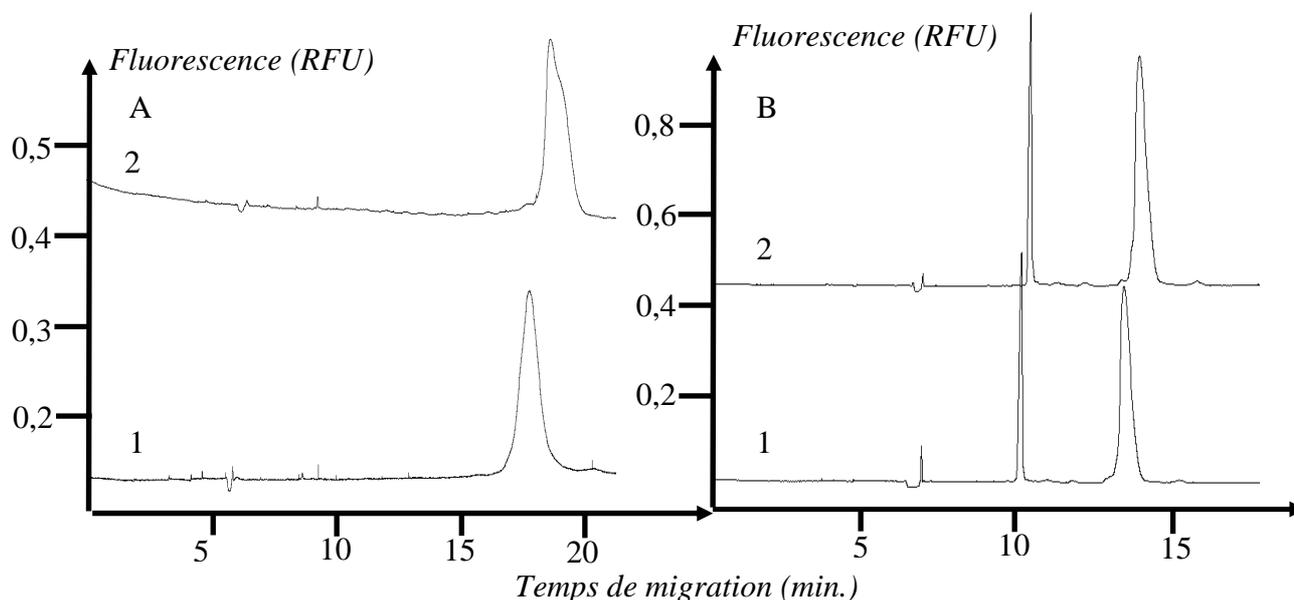
La figure 95 représente donc le temps de migration des différents marqueurs de taille analysés dans la figure 94 en fonction du logarithme de leurs poids moléculaire. Ce graphe permet de déterminer la taille de différents IgG.

La chaîne légère de l'IgG Beckman (figure 83) a un temps de migration de 10,5 min soit une taille de 20 kDa ; la chaîne lourde non glycosylée 12,9 min soit une taille de 36 kDa et la chaîne lourde 13,2 min soit une taille de 39 kDa. L'IgG Beckman non réduit (figure 85) a un temps de migration de 19,7 min soit une taille de 184 kDa et l'IgG non réduit déglycosylé a un temps de migration de 19,4 min soit une taille de 171 kDa. Dans la littérature, le poids moléculaire d'un IgG est de 150 kDa [75]. Cette différence avec les résultats obtenus peut être due à la chaîne glycosidique. En effet, la chaîne glycosidique entraîne une modification au niveau de la structure de l'immunoglobuline, ce qui modifie les temps de migration [97]. Ce problème est également rencontré avec le SDS-PAGE.

#### 4.2.3.10. Analyses d'anticorps pharmaceutiques

Deux lots d'un anticorps pharmaceutique (Cetuximab) sont analysés grâce à la méthode mise au point précédemment Figure 96. Le Cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique homme/souris. Il bloque le récepteur du facteur de croissance épidermique humaine (EGFR) situé à la surface des cellules tumorales. Il permet ainsi de bloquer la liaison des ligands de ce récepteur et donc empêche la transduction du signal et la cancérogenèse due au EGFR activé. Il est composé de la région Fv d'un anticorps murin anti-EGFR et des régions constantes

IgG1 humaines (chaînes lourdes et kappa). Il est produit par culture cellulaire d'un myélome murin. Il est utilisé en association avec la chimiothérapie pour traiter les cancers du côlon métastatiques et avec la radiothérapie pour le traitement des cancers de la tête et du cou.



*Figure 96 : Analyses de deux lots d'anticorps pharmaceutique : A-1 anticorps pharmaceutique non réduit lot 1 ; A-2 anticorps pharmaceutique non réduit lot 2 ; B-1 anticorps pharmaceutique réduit lot 1 ; B-2 anticorps pharmaceutique réduit lot 2.*

*Conditions d'analyses identiques à celles de la figure 22*

L'analyse des deux lots d'anticorps pharmaceutiques montre qu'ils ne présentent pas d'impuretés. Le pic de l'anticorps non réduit est large et dédoublé (2 minutes), il semble que plusieurs formes de l'anticorps soient présentes. L'échantillon est analysé à 1 mg/mL. La limite de détection du pic principal de l'échantillon non réduit est de 300 ng/mL soit 12 fois moins sensible que l'IgG Beckman, dans les mêmes conditions. La réduction de l'échantillon par le mercapto-éthanol montre deux pics : le premier correspond à la chaîne légère (pic très fin) et le second correspond à la chaîne lourde (pic plus large).

Le temps de migration de la chaîne légère de l'anticorps pharmaceutique réduit est de 10,6 min soit une taille de 21 kDa ; la chaîne lourde migre à 14,2 min soit une taille de 49 kDa. L'anticorps non réduit présente un temps de migration de 20,6 min soit une taille de 228 kDa.

Dans la littérature, il est mentionné que ce médicament présente un poids moléculaire approximatif de 150 kDa. La taille de la chaîne légère et de la chaîne lourde déterminée précédemment est en accord avec ce poids moléculaire ( $2 \times 21 \text{ kDa} + 2 \times 49 \text{ kDa} = 140 \text{ kDa}$ ).

Cependant, les analyses précédentes attribuent un poids moléculaire de 228 kDa à l'anticorps non réduit. Il est possible que ce pic soit un agrégat et que son temps de migration soit par conséquent modifié ou alors que les chaînes saccharidiques modifient complètement la migration et empêche d'utiliser le comparatif avec les marqueurs de taille. Des résultats similaires à ceux-ci ont été obtenus en SDS PAGE conventionnels.

#### **4.2.4. Conclusion**

Nous venons de développer une méthode d'analyse des anticorps monoclonaux recombinants. Deux approches sont possibles. La première correspond à l'analyse des anticorps marqués. L'avantage de cette technique est la sensibilité atteinte (50 pg/mL pour une IgG marquée au TAMRA). L'inconvénient est l'étape de marquage qui augmente le temps de préparation de l'échantillon, et nécessite avec un colorant non fluorogène, une étape de purification. Dans ce cas avec un colorant réagissant avec les fonctions amine, toutes les impuretés de type amine primaire et secondaire sont visualisées. La deuxième approche est l'analyse à 266 nm (fluorescence native). Dans ce cas, l'échantillon est analysé directement (pas d'étape de marquage), mais seuls les composés contenant des groupements tyrosine et tryptophane sont détectés. Cette technique permet de gagner un facteur 40 par rapport à la détection UV. Selon les laboratoires pharmaceutiques, l'une ou l'autre technique est mise en avant. Par exemple, le laboratoire Genentech favorise la sensibilité et utilise la méthode avec marquage [54, 75]. Au contraire, le laboratoire Amgen privilégie la détection UV ou LIF (266 nm) [98].

## **5. Conclusion générale**

L'objectif de ma thèse industrielle était de réaliser une nouvelle approche méthodologique en partenariat avec le service Recherche et Développement de Picometrics afin de développer un nouveau détecteur de fluorescence induite par laser qui puisse être intégré dans un appareil d'électrophorèse capillaire Agilent. Pour cela, une bille a été utilisée afin de focaliser le faisceau laser à l'intérieur du capillaire et un demi-ellipsoïde a été fixé au niveau de la fenêtre de détection afin de récolter la fluorescence.

Différentes phases ont été nécessaires avant la commercialisation de ce détecteur : après une première phase de développement (choix du matériau d'assemblage, choix du matériau de l'ellipsoïde, fixation du demi-ellipsoïde sur le capillaire, tests de température...), la phase d'optimisation a suivi (optimisation des distances bille – demi-ellipsoïde et demi-ellipsoïde - fibre cœur liquide, comparaison des performances avec le montage colinéaire). La dernière phase a été la phase de validation du détecteur à différentes longueurs d'onde (de 266 nm à 780 nm).

L'intégration de la détection LIF à l'intérieur de la CE Agilent permet ainsi de travailler avec un capillaire plus court (longueur totale minimale : 33 cm ; longueur effective minimale : 14 cm), de thermostatier l'ensemble du capillaire, et d'automatiser les analyses.

A partir de ce nouveau montage optique, une application a été développée sur le contrôle de la qualité d'anticorps monoclonaux recombinants par CE-LIF. En effet, les anticorps sont une nouvelle classe de médicaments en progression ces dernières années. Les industries pharmaceutiques ont l'obligation de contrôler la qualité de ces derniers (présence d'impuretés, d'agrégats). La méthode la plus utilisée est la méthode par SDS-PAGE. Les protéines sont alors séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Différentes méthodes de détection peuvent être utilisées dont la coloration à l'argent qui permet d'atteindre une limite de sensibilité de 10 ng/mL et le bleu de Coomassie qui permet d'atteindre une limite de sensibilité de 500 ng/mL. Mais cette méthode est longue, coûteuse et non automatisée. Ainsi, cette méthode est de plus en plus transposée à l'électrophorèse capillaire. La méthode cIEF sépare les protéines selon un gradient de pH à l'intérieur du capillaire. L'électrofocalisation utilise un mélange de solutions tampons contenant des zwitterions pour créer un gradient de pH dans le sens de la longueur du capillaire. Les molécules migrent alors jusqu'au point de gradient de pH, où elles n'ont aucune charge nette.

La méthode d'électrophorèse capillaire non gel est également utilisée. Dans ce cas, le gel est remplacé à chaque analyse. Deux méthodes de détection sont alors utilisées : la détection de fluorescence induite par laser ou l'absorption UV.

Nous avons donc développé avec notre nouveau système de détection deux méthodes d'analyses d'anticorps monoclonaux recombinants.

La première est une méthode par CE-LIF à 488 nm ou 532 nm. Dans ce cas, l'anticorps est marqué par un fluorophore puis analysé à 488 nm (FITC) et 532 nm (TAMRA). Cette méthode permet d'atteindre une limite de détection de 50 pg/mL, cependant une étape de marquage avant analyse est indispensable.

La deuxième méthode est une méthode par CE-LIF à 266 nm. Dans ce cas, aucune étape de marquage n'est nécessaire. La fluorescence native est détectée à cette longueur d'onde. Cette dernière méthode est 500 fois moins sensible que la précédente (limite de détection de 25 ng/mL) mais plus rapide, plus simple et plus sensible que la détection par absorption UV.

Suivant les laboratoires pharmaceutiques et leurs priorités, l'une ou l'autre des deux méthodes pourra être utilisée. Ce travail réalisé ouvre la porte à l'étape de validation de la méthode des médicaments « anticorps » des compagnies pharmaceutiques qui sera nécessaire pour la commercialisation de nouvelles molécules. En outre l'industrie pharmaceutique est soucieuse, dans ses processus de contrôle qualité, de ne pas dépendre d'un seul fabricant. Donc, à la solution CE-LIF Beckman s'ajoute la solution CE Agilent / LIF Picometrics.

## **6.     *Annexes***

Annexe 1 : Brochure commerciale du détecteur intégré à l'électrophorèse capillaire Agilent (1/2)

Laser  
Induced  
Fluorescence  
Detector

## LIF Detector ZetaLif™ Discovery

The Versatile detector

**A sensitive solution  
for CE, HPLC and fast-LC systems**



**On-line CE-LIF-MS**  
**On-line LC-LIF-MS**



- |                     |  |
|---------------------|--|
| <b>Sensitivity:</b> | 10 times to 100 times greater than conventional fluorescence and up to 100,000 times more sensitive than UV detection. |
| <b>Versatility:</b> | 14 different lasers are available to meet your specific application. The laser is readily interchangeable.             |
| <b>Selectivity:</b> | Only labeled molecules and compounds with native fluorescence will be detected. Low noise and interference.            |
| <b>Modularity:</b>  | Adaptable to CE and HPLC systems including Fast-LC, Capillary LC and nanoLC.   |

picometrics

# Annexe 1 : Brochure commerciale du détecteur intégré à l'électrophorèse capillaire Agilent (2/2)

## ZetaLif™ Discovery Detector Specifications:

Two models are available :

- DIS-JV-02 Designed for lasers emitting at wavelengths from 266 to 650 nm.
- DIS-VI-02 Designed for lasers emitting at wavelengths from 410 to 780 nm with optimization of sensitivity for wavelengths from 514 to 650 nm.

LIF Capillaries : OD: 365 µm ; ID: Refer to table 1

- UV-LIF capillaries optimized for excitation wavelength from 266 to 532nm.
- Visible-LIF optimized for excitation wavelength from 488 to 780nm.

Cell detection volume :

The cell is a small part of the capillary and depends on the capillary ID, see Table for details.

Signal outputs:

Analog (processed) 0-1V (DC), 0-10 V (DC)

LIF Capillary ID (µm)	Estimated* Cell Volume (nl)
20	0.06
25	0.1
50	0.4
75	0.9
100	1.6
150	3.5

\*Based on 200 µm length of cell and Table: Capillary ID and Volume cell

Distances:

Detector / Cell : 1m (maximum) ; Detector / Laser : 1m (maximum)

Data Acquisition Systems:

Zetalif is compatible with any data acquisition system featuring an analog input (0-1 V). If no analog input is available, an A/D converter is necessary.

Power requirements for the Detector:

100-240 VAC, 47/63 Hz, 1.6 A

Interface with HPLC system:

Zetalif Discovery is compatible with all LC systems but optimal sensitivity is achieved at flow rates < 0.5 mL/min. Lower sensitivity may be observed at higher flow rates.

Interface with CE system:

Agilent CE: Internal Detector Adapter kit, MS cassette, and A/D converter (HR 35900E) are needed. Minimum capillary length total 33 cm/effective 14 cm. The system works with the HP Chemstation software.

Beckman P/ACE MDQ: External Detector Adapter kit, MS cassette and an A/D converter (SS420-X) needed. Capillary length: total 53 cm/effective 35 cm. The system works with the 32 karat software.

Other systems: please contact Picometrics.



View of the Agilent CE cassette with the LIF cell holder.

Cell holder for MS coupling : The cell holder is an articulated arm which enables the cell to be as close as possible to the MS system (3 available models).

Dimensions and weight:

Detector : 340 (H) x 170 (W) x 34.0 (D) cm  
12,5 kg

Cell : See figure 1



Available Lasers:

Wavelength	Type	Power	Wavelength	Type	Power
266 nm	Pulsed DPSS (10kHz)	≥ 2 mW	514 nm	Argon ion	40 mW
325 nm	Helium / Cadmium	≥ 10 mW	532 nm	DPSS CW	15 mW
355 nm	Pulsed DPSS	≥ 2 mW	594 nm	Helium / Neon	≥ 2 mW
410 nm	Laser module	≥ 20 mW	633 nm	Helium / Neon	≥ 10 mW
442 nm	Helium / Cadmium	≥ 30 mW	635 nm	Laser Diode CW	20 mW
473 nm	Diode CW	≥ 30 mW	650 nm	Laser Diode CW	15 mW
488 nm	Argon ion	25 mW	780 nm	Laser Diode CW	40 mW

Filter block: The filters in filter block depend on the laser and contain the appropriate excitation and emission filters (a).

(a) Contact Picometrics for more information  
FR: Tél: 02 27 938 200/2050 ; US: Tél: 516 555 930 ; 1999/04/20

Laser  
Induced  
Fluorescence  
Detector

This document may not be reproduced or transmitted in any manner without the written permission of Picometrics S.A. France. Specifications subject to change without notice as part of our ongoing quality improvement program.

Picometrics S.A.  
99 Route d'Espagne,  
31100 Toulouse  
France  
+33(0)567 04 04 05

Info@picometrics.com

picometrics  
www.picometrics.com

V er ena Poinso<sup>1</sup>  
Audrey Rodat<sup>1,2</sup>  
Pierre Gavard<sup>1</sup>  
Bernard Feuer<sup>2</sup>  
François Couderc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paul Sabatier,  
IMRCP, France  
<sup>2</sup>Picoetrics,  
Toulouse, France

Received July 5, 2007  
Revised September 22, 2007  
Accepted September 22, 2007

## Review

### Recent advances in amino acid analysis by CE

This paper describes a number of articles that have been published on amino acid (AA) analysis using CE during the period from June 2005 to May 2007. This review article follows the format of the previous articles of Smith (*Electrophoresis* 1999, 20, 3078–3083), Prata *et al.* (*Electrophoresis* 2001, 22, 4129–4138), and Poinso *et al.* (*Electrophoresis* 2003, 24, 4047–4062 and *Electrophoresis* 2006, 27, 176–194). Several new developments in AA analysis with CE are reported describing the use of laser-emitting diodes for LIF, MS, and chips. In addition, we describe articles concerning clinical studies and neurochemical applications.

**Keywords:**  
Amino acids/ Capillary electrophoresis

DOI 10.1002/elps.200700482

## 1 Introduction

The analysis of amino acids (AAs) is a research area in which a large number of studies continue to be reported. A major reason for these studies is because AAs are frequently found in biological media and analysts are required to detect trace levels in exceedingly small samples. New analyses that are more sensitive, more selective, or simpler to perform continue to be required for clinical and neurochemical analyses. In addition, chirality of AAs is frequently used in the development of new analytical methods and instrumentation. In this new review, which follows the previous four reviews on this topic [1–4], we will summarize the variety of works on this topic that have been published from June 2005 to May 2007. Table 1 summarizes some experimental data.

## 2 New CE methods

### 2.1 CE-MS

The interfacing of CE with MS using ESI is a popular technique which requires the use of a sheath liquid because of the small flow rate of EOF. When a sheath liquid is

employed, it becomes difficult to obtain high-sensitivity assays of small molecules such as AAs due to the presence of ions in the sheath liquid. In addition, it should be noted that ESI requires the use of volatile buffers.

Nanomolar concentrations of AAs can be detected with transient ITP stacking with CE/ESI-MS. In a recent study, the AAs were diluted in ammonium acetate buffer and a formic acid solution was used as the BGE; the experimental data and computer simulations were examined as a multiplexed approach for studying the selective nutrient uptake behavior of *Escherichia coli* within a complex broth medium. The migration behavior of charged metabolites was modeled (role of absolute mobility and  $pK_a$ ) to support MS characterization. The computer simulations using “Simul 5.0” helps de novo identification of unknown nutrients (Table 1) [5].

A porous tip at the end of the capillary was formed by removing 25–40 mm of the polyimide coating of the capillary and etching this section by a 49% HF solution. The electrical connection to the capillary outlet was achieved by simply inserting the capillary outlet containing the porous tip into the existing ESI needle (metal sheath) and filling the needle with the BGE. To test the utility of this tip, the analysis of AAs was performed using an AA standard containing 17 different AAs. A formic acid/18-crown-6-tetracarboxylic acid (18-C-6-TCA) solution was used as a complexation reagent to enhance the sensitivity of AAs detection. It was noted that the complex increases the apparent masses of the AAs (Table 1). Figure 1 shows the base peak chromatogram of the 17-AA standard using the 120 cm long porous tip capillary. The results obtained using the porous tip were very similar to results using other conventional interface designs. The etching process reduces the wall thickness of the etched section and results in a stable electrospray at approximately 1.5 kV, thereby simplifying the CE to ESI-MS interface. The role of the etching process is to reduce outer diameter of the tip and to make the capillary porous. These two processes are done in a single step, and if the capillary is blocked or damaged, a small section of the tip can be readily etched off

**Correspondence:** Professor François Couderc, Université Paul Sabatier, Laboratoire des IMRCP, UMR5623, F-31062 Toulouse Cedex 9, France  
E-mail: couderc@chimie.ups-tlse.fr  
Fax: +33-05-61558155

**Abbreviations:** 5CFbCSE, 5-carboxyfluorescein-bis(5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl)ether- $\beta$ -alanine-carboxamide-succinimidyl ester; AA, amino acid;  $\beta$ -ME,  $\beta$ -mercaptoethanol; CIGD, contactless conductivity detection; FMOC, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride; FO, 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; LED, light-emitting diode; MH, methylhistidine; NBD-F, 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole; NDA, naphthalene-2,3-dialdehyde; OPA, o-phthalaldehyde; STDC, sodium taurodeoxycholate

## Annexe 2 : Publication 1 (2/17)

**Table 1.** Main separation conditions and performances for the CE separations of AAs

Sample	Separation electrolyte	Derivatization	Detection	LOD (nM)	Ref.
Broth medium	200 mM ammonium acetate (pH 7.01), 1 M formic acid (pH 1.8)	None	MS	1–25	[5]
Standards (17AA)	1 M formic acid, 30 mM 18-C-6-TCA	None	MS	?	[6]
Standard <i>N</i> <sup>6</sup> -hydroxy-L-arginine and oxidation products	50 mM formic acid (pH 2.5)	None	MS	?	[7]
In-line derivatization with 7.5 mM OPA/ $\beta$ -ME at rate of 1.2 mL/min. Glu Asp standards	25 mM SDS in 10 mM borate buffer, pH 10 (8 cm, 25 $\mu$ m id capillary), ( $E = 1.17$ kV/cm)	OPA/ $\beta$ -ME	LIF (LED 365 nm)	47	[10]
AAs and amines in beer	0.001% hexadimetrine bromide 50 mM sodium borate (pH 9.3) 20% 2-propanol	Fluorescence	LIF (LED 470 nm)	$70 \times 10^3$	[13]
Microdialysate of suprachiasmatic nucleus of hamster	Optimized conditions (factorial analysis) 155 mM borate, 20 mM SDS, and pH 9.5	Fluorescence	LIF (488 nm)	8 (GABA)	[15]
In-capillary derivatization: 4 s sample injection 2 s for NBD-F (molar ratio of NBD-F/sample > 215), standard AA	20 mM borate buffer (pH 8.8) temperature, 45 °C	NBD-F	LIF (488 nm)	100–600	[24]
In-capillary derivatization: gravity injections (20 cm) of 50 mM KCN solution (46 s) then AA solution (8 s), then 24 mM FQ in H <sub>2</sub> O/2-propanol (1:1) (46 s)	3 kV potential for 6 min at 45 °C for reagent mixing, then 12.5 kV at room temperature. BGE 70 mM borax-3.5 mM SDS pH 9.3	FQ	LIF (488 nm)	25–50	[25]
Plasma sample of a patient suffering from phenylketonuria					
Cerebrospinal fluid in-capillary derivatization, injection order was cyanide (0.1 mM), then AA, then NDA (0.1 mM)	BGE 10 mM tetraborate (pH 9.3) after injection the buffer is a 0.6% PEO BGE solution	NDA	LIF (LED 470 nm)	4	[27]
1 $\mu$ L of 10 mM standard AAs in 0.1 M bicarbonate buffer at pH 9.0, with 10 $\mu$ L of 5CFbCSE 2 mM in DMSO then diluted in 10 mM phosphate buffer. Gating beam (351–354 nm Ar ion laser) 20 ms	Running buffer: the derivatize sample is added to 10 mM phosphate buffer at pH 7.4.	5CFbCSE	LIF (488 nm)	1	[28]
FMOc-AAs are in 155 mM NaCl, 5.5 mM KCl, 2.3 mM CaCl <sub>2</sub> , and 107 mM borate at pH 9.4, are first injected, then the acidic plug 100 mM formic acid at pH 2.4	60 mM borate at pH 10.5	FMOc	UV	$10 \times 10^3$	[31]
Microdialysate samples of skeletal muscle tissue of adult male Sprague-Dawley rats. Human saliva					
NDA-labeled Ile and Trp in ACN/methanol/water (15:10:75% by volume) apparent pH 4.6 filling the entire capillary	Stacking 30 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> in a ACN/methanol/water (15:10:75% by volume), apparent pH 1.5, –20 kV Separation: as above with 100 mM SDS	NDA	LIF (blue LED)	1.1–1.4	[33]
Standard catechol amines and serum	Chip with 62 mm long separation channel, field strength +200 V/cm, 10 mM phosphate buffer (pH 7.4)	None	Amperometric 0.7 V	32–1130	[40]
D/L AAs	2% S- $\beta$ -CD 25 mM phosphate, pH 2.00 buffer, voltage of –30 kV (capillary id 25 $\mu$ m)	NDA	LIF	0.2–0.3	[47]
Microdialysate from the hippocampus of a brain of live arctic ground squirrels					
Tryptophan methyl ester and tyrosine methyl ester enantiomers	50 mM phosphate buffer, pH 2.27 with (methyl- $\beta$ -CD and dimethyl- $\beta$ -CD) and diaza-crown-ether derivative ( <i>N</i> -(2-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan-7-yl)propanoyl)glycine)	None	UV (218, 236, and 254 nm)	?	[48]
Standard D/L-AA	25 mM phosphate/borate (pH 9) with 8.8 mM $\delta$ -CD 50 mM SDS and 15% 2-propanol with 8.8 mM $\delta$ -CD	FMOc or dansyl	UV	?	[51]

## Annexe 2 : Publication 1 (3/17)

*Electrophoresis* 2008, 29, 207–223

CE and CEC 209

**Table 1.** Continued

Sample	Separation electrolyte	Derivatization	Detection	LOD (nM)	Ref.
Dansyl D/L-glufosinate; the whole capillary was filled with the sample diluted in water, and then stacking at $-30$ kV	17 mM $\gamma$ -CD, 2.0 mM phosphate (pH 6.5) and 5.0 mM NaCl +30 kV	Dansyl	Fluorescence (327 nm)	2	[52]
Model samples from river water 17 pairs of standard D/L-AA	150 mM borate and 18% v/v isopropanol at pH 8.0, with 30 mM $\beta$ -CD and 30 mM STDC	FMOG	UV (214 nm)	?	[54]
DHAIC reacts with AA at 70°C in ACN (5% v/v triethylamine) 60 min	50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 9.0), 18 mM SDS, and 25% v/v ACN	DHAIC	UV (202 nm)	32–600	[58]
Standard 5-fluoro-DL-tryptophan, 2-fluoro-DL-phenylalanine, 3-fluoro-DL-phenylalanine, 4-fluoro-DL-phenylalanine, 4-chloro-DL-phenylalanine	20 mM <i>N</i> -(2-hydroxyoctyl)-L-4-hydroxyproline, 10 mM $\text{CuSO}_4$ in 5M phosphoric acid solution, pH 4.5 (adjusted with ammonia)	None	UV (208 nm)	?	[61]
Application to synthesized AA Standard DL- <i>N</i> -acetyl-tryptophan, DL-5-bromo-tryptophan, DL-5-fluoro-tryptophan, DL-5-hydroxy-tryptophan, DL-kynurenine, DL-1-methyl-tryptophan, DL-5-methyl-tryptophan, DL-6-methyl-tryptophan, DL-methyl-tryptophan, DL-tryptophan, DL-tryptophan methyl ester	25 mM phosphate buffer, pH 7.5, 30 mM of CSA	None	UV (280 nm)	?	[62]
Gly, Glu, Asp, GABA, dopamine, and noradrenaline in microdialysate of rat striatum	22.5 mM lithium tetraborate, 20 mM lithium dodecylsulfate, pH 9.2, running voltage 10 kV (7 min) then 20 kV (8 min)	NDA	LIF (410 nm)	0.1 nM	[66]
On-column derivatization of microdialysate with 80 mM OPA, 230 mM HP- $\beta$ -CD in a MeOH/borate solution	20 mM HP- $\beta$ -CD, 100 mM borate buffer pH 10.5 (11.5 cm $\times$ 5 $\mu\text{m}$ capillary), 27 kV	OPA/ $\beta$ -ME	LIF (351 nm)	?	[67]
D/L-Ser, taurine, Glu, and GABA, from mouse cortical brain slices	160 mM borate, 34 mM HP- $\beta$ -CD, $-15$ kV	NBD-F	LIF (488 nm)	?	[68]
On-line derivatization of microdialysate of nucleus accumbens with OPA	10 mM borate, 0.88 mM HP- $\beta$ -CD in 9.5 cm $\times$ 10 $\mu\text{m}$ capillary, $-20$ kV	OPA/ $\beta$ -ME	LIF (351 nm diode pumped solid-state laser)	?	[69]
DL-Asp in the extract of CNS and buccal muscles of <i>A. californica</i>	20 mM $\beta$ -CD, 50 mM SDS, 50 mM borate (pH 9.4), 15% MeOH	NDA	LIF (457 nm)	1	[71]
On-line derivatization of o-phosphorylethanolamine, Glu, Asp, taurine, Ser, Gly with 10 mM OPA, 40 mM $\beta$ -ME, 36 mM borate, 0.81 mM HP- $\beta$ -CD, 10% MeOH, <i>in vivo</i> sampling of neurotransmitters by low-flow push-pull perfusion using a PDMS microfluidic chip	40 mM borate, 0.9 mM HP- $\beta$ -CD, pH 9.5 in a 9 cm, 10 $\mu\text{m}$ id capillary	OPA/ $\beta$ -ME	LIF (351 nm diode pumped solid-state laser)	60	[74]
Asp, Glu in human and rabbit serum and human cerebrospinal fluid	10 mM borate pH = 9.3	NDA	LIF (violet LED)	Around 20	[75]
$\text{NH}_4^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , diethanolamine, triethanolamine, ornithine, His, Lys, Arg, from sweat samples of finger and forearm of human	10 mM 4-methylbenzylamine, 6.5 mM $\alpha$ -hydroxyisobutyric acid, and 2 mM 18-crown-6 at pH 4.25	None	Indirect UV (214 nm)	$3-5 \times 10^3$	[76]
Pro, Ser, Gly, and Glu in saliva	20 mM borate buffer pH 9.5	FITC	LIF (488 nm)	0.1–2.4	[77]
AA in human serum (SCI or with BPH)	20 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid and 0.5 mM hexadecyltrimethylammonium hydroxide (pH 12.1), (104 cm $\times$ 75 $\mu\text{m}$ capillary); $-30$ kV	None	Indirect UV (DAD 350–200 nm)	?	[78]

Table 1. Continued

Sample	Separation electrolyte	Derivatization	Detection	LOD (nM)	Ref.
Met in retinal venous occlusive disease plasma endogenous and exogenous thiol (Hcy and Cys-Gly) derivatives. After reduction (Tris-2-carboxyethylphosphine) derivatization and centrifugation, the plasma samples were mixed with ACN 1:2 (v/v) and injected hydrodynamically as a long plug	125 mM Tris-phosphate buffer pH 2.3	None	UV (204 nm)	500	[79]
	200 mM Tris/HCl pH 2.1	2-Chloro-1-methyl-quinolinium tetra-fluoroborate	UV (355 nm)	1000	[81]
AAs and biogenic amines from Barrett's esophagus tissue homogenates	First capillary: 20 cm, 30 $\mu$ m id. BGE: 5% dextrane 513 kDa, 100 mM CHES, 100 mM Tris, 3.5 mM SDS, pH 8.7, +20 kV	FQ	LIF (488 nm)		[83]
ADMA, SDMA, and Arg after ACN/ammonia (90:10) protein precipitation from plasma. Injection 1 s water plug (0.5 psi), then sample 10 s (0.5 psi)	50 mM Tris-phosphate run buffer at pH 2.30 at 15°C	None	UV (200 nm)	30–60	[85]
3-MH, 1-MH, His from urine	500 mM acetic acid, 20 mM Tris, and 0.1% hydroxyethylcellulose pH 3.4 + 30	None	UV (214 nm)	$2-3 \times 10^3$	[86]
Ethanolamine, choline, Ala, 2-aminobutyric acid, GABA, creatinine, Orn, carnitine, citrulline, 4-hydroxyproline, 1-MH, and 3-MH from amiotic fluid	1.7 M acetic acid, and 0.1% hydroxyethyl cellulose (pH 2.15)	None	CICD	$1.5-6.7 \times 10^3$	[88]
Captopril in urine	20 mM phosphate buffer pH 12.0	5-Iodoaceta-mido fluorescein	LIF (488 nm)	2.5	[90]
As in single wheat embryonic protoplast	12.5 mM borax, 12.5 mM NaOH, 0.12 mM spermine pH 9.45, 25 $\mu$ m id capillary	FITC	LIF (488 nm)	?	[92]

without any loss of performance. It is noted that bubble formation due to redox reactions of water at the high-voltage electrode is outside of the separation capillary and does not affect separation or MS performances [6].

The use of CE/ESI-MS and CE/ESI-MS/MS for the analysis of AAs could determine the presence of electrochemical oxidation and nitrosation products from  $N^8$ -hydroxy-L-arginine. When the standard was used, three stable end products were identified: citrulline, cyano-ornithine, and  $N^8$ -nitroso arginine. In this application, the CE buffer was 50 mM formic acid (pH 2.5), and the samples were introduced hydrodynamically using a flow of 10  $\mu$ L/min of sheath liquid (Table 1) [7].

## 2.2 CE/fluorescence

The main advantage in using the fluorescence detectors for the analysis of AAs is to obtain better sensitivity than when conventional Vis-UV absorption is used. There were a few advances in the use of LIF and conventional fluorescence detection with CE for the analysis of AAs in the two past years. Since only two AAs (Trp and Tyr) possess strong fluorescence, most of these studies are done using labeling reactions involving the amine or thiol functions. Even if the derivatization involves an additional sample preparation step, it results in a better selectivity and sensitivity. The work

described below discusses new developments of fluorescence detectors, generally concerning the use of innovative light sources and optical components.

Xiao *et al.* presented a long review concerning the use of light-emitting diodes (LEDs) with CE. LEDs are extremely useful for CE because they are very stable and provide a high intensity at low cost. A variety of LEDs are available to supply a broad range of excitation wavelengths in both the UV and visible portion of the spectrum [8].

Kostal *et al.* described a miniaturized fluorimetric detection cell that is used at the end of the capillary; this cell is equipped with optical fibers and liquid core waveguides (LCWs). In this design, a fused-silica capillary that is coated with Teflon AF serves as a LCW. One optical fiber is used for coupling the excitation source with the detection domain in the LCW and the second fiber is used as the axial fluorescence collection from the LCW end. The latter fiber is connected with a compact CCD spectrometer for detecting the fluorescence signal. This new detection cell was used with off-line labeling (with FITC and fluorescein iodoacetamide) to monitor fluorescein-labeled AAs from the plasma. Levels measured on individuals in good health were compared to those of patients with inherited metabolic disorders [9]. In another study, a high power 365 nm UV LEDs was used to excite o-phthalaldehyde/ $\beta$ -mercaptoethanol (OPA/ $\beta$ -ME) derivatives, which were formed off-line, of Glu and Asp to

## Annexe 2 : Publication 1 (5/17)

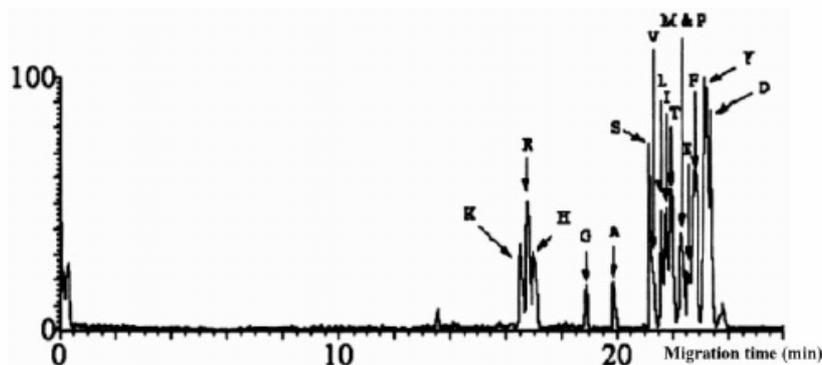


Figure 1. Base peak electropherogram of 17 standard AAs using a long porous tip capillary. The CE inlet electrode was maintained at  $-20$  kV. A solution of 15 mM 18-C-6-TCA in 1 M formic acid was used. The mass spectrometer was scanned in the mass/charge ( $m/z$ ) range of 515–700 for the AAs 18-C-6-TCA complex (6).

obtain detection limits of both 47 nM. The authors described an in-line labeling method which involved the introduction of both the sample and derivatization reagents (7.5 mM OPA/ $\beta$ -ME) into a mixing tee using a syringe pump at a rate of 1.2 mL/min. The outlet of the reaction tee was connected to a 100  $\mu$ m id capillary. The reaction time, which is dependent on the length, flow rate, and capillary id, was 70 s. The reaction capillary was interfaced to the separation capillary (25  $\mu$ m id, 8 cm effective length) via the flow-gating interface, where a crossflow (1 mL/min) of separation buffer was continuously applied across the gap to prevent analyte transfer between the two capillaries (Table 1). Sample was injected into the separation capillary via temporary disruption of the crossflow, while the separation capillary was maintained at a constant high voltage. The reported LOD was approximately 7 nM for these two AAs [10].

The detection of AAs, labeled off-line with naphthalene-2,3-dialdehyde (NDA) or FITC, was studied using a violet or blue LED as the excitation source and an optical fiber (40  $\mu$ m outer diameter (od)) to transmit the excitation light. The upper end of the fiber was inserted into the separation capillary and situated right at the detection window. The fluorescence emission was collected by a 40 $\times$  microscope objective, focused on a spatial filter, and passed through a cut-off filter before reaching the photomultiplier tube (PMT). AAs labeled with NDA or FITC could be monitored and LODs from 17 to 23 nM for NDA derivatives and from 8 to 12 nM for the FITC derivatives were reported. While we note that this optical arrangement is not new (for a review on LIF optical arrangements, see ref. [11]), its connection to an inexpensive diode laser is original [12]. It should be noted that this optical arrangement results in a significant degree of photo-degradation prior to detection and, therefore, limits the LOD.

An argon ion laser in a CE/LIF commercial instrument and an inexpensive blue LED in a "home-made" CE/LIF sys-

tem were used with a CCD to monitor amines that were labeled off-line with FITC. The CE separation was achieved in a coated capillary with a buffer containing hexadimethrine bromide and 20% 2-propanol and the level of AAs in beer was performed (Table 1). Although an LED is a low cost source, its light is not spatially coherent and the performance is not as good as when a laser is used (in contrast, the light from a laser is spatially coherent) [13]. The resolution achieved with the home-made instrument was much poorer than that with the commercial device since the light beam of the LED was about three times wider than the laser beam. In addition, the LODs of the FITC-labeled compounds were approximately 1.8 times poorer than those obtained with the conventional laser system when the LED was employed.

The use of a blue LED for LIF detection was compared with contactless conductivity detection (CICD) with both detectors sharing a common detection cell. In this study, off-line FITC-labeled AAs were separated and detected by the combined detector, the LODs were in the submicromolar level [14].

Because analytes, sample composition, and the sample matrix may vary between studies, it is necessary to optimize the separation to meet the precise requirements and conditions of an experiment. Ehlen *et al.* [15] have used factorial analysis, which is an efficient tool to relate the variables and optimize the analysis. Since MEKC allows the efficient separation of biogenic amines and AAs in biological samples, it has been optimized using factorial analysis involving multiple interacting factors. The standards labeled with 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (FQ) were separated with varying pH and concentrations of borate buffer,  $\beta$ -CD and SDS (Table 1). The optimized separation method had a correlation coefficient of 0.98 between the concentration of GABA measured with electrochemical detection and the fluorescent signal, and was linear in the desired concentration

range of 25 nM–10  $\mu$ M. Multiphotonic excitation fluorescence using a continuous diode laser was also described by Chen *et al.* [16]. The separation of off-line labeled AAs with FITC was shown using CZE and MEKC. While the LODs of AAs were not indicated by the authors, the one of Rhodamine B was reported to be 1.2  $\mu$ M, which is quite high. In another study, FITC-AAs were studied in femtoliter water droplets using CE/LIF [17].

### 2.3 Miscellaneous detection modes

The use of acetaldehyde as a derivatization reagent for AAs coupled with the electrogenerated chemiluminescence (ECL) of Tris-(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) has been reported for CE. The AA-acetaldehyde reaction results in secondary and tertiary amine derivatives, which are then oxidized by electrogenerated Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> to produce strong light emission. The precolumn derivatization of these AAs with acetaldehyde was performed in aqueous solution at room temperature for 1 h and the detection limits were about 100 nM with Arg, Pro, Val, and Leu [18].

ClCD and hydroxypropylated CD or 18-C-6-TCA were used as chiral selectors with an acidic buffer (lactic or citric acid) to detect AAs. The detection limits were in the range from 0.3 to 20  $\mu$ M for pseudoephedrine and AAs [19]. A study was performed to determine the performance of this technique at various pHs; the best results were found in most cases for low pH buffers. The linear dynamic range for this method was about two orders of magnitude for AAs and the concentration detection limits were found to be between 1.2 and 7.5  $\mu$ M for the AAs using a buffer at pH 2.1 [20].

### 2.4 In-capillary derivatization

Many new studies report the use of in-capillary derivatization (*i.e.*, on-line derivatization), to simplify the sample preparation work for CE users. In-capillary derivatization allows automation of the analysis and minimizes the sample preparation work, but its utility can be limited when the sample is complex (*e.g.*, body fluids).

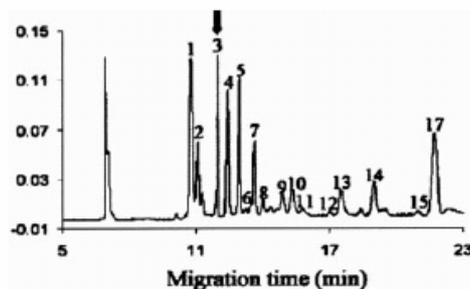
Ptolemy and Britz-McKibbin [21] described the use of on-line sample preconcentration with chemical derivatization and reported their on-line use for the derivatization of phospho-AAs with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC) with CE/UV detection. The analytes were focused using a dynamic pH junction and the FMOC labeling was influenced by buffer pH, ionic strength, sample injection length and dye concentration. LODs were around 0.1  $\mu$ M [22].

Koval *et al.* [23] used OPA/ $\beta$ -ME derivatives, separated in an alkaline BGE composed of sodium tetraborate and 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -CD as a chiral selector. The difficulty of the time-limited stability of OPA/ $\beta$ -ME derivatives has been overcome by employing in-capillary derivatization of the sample. The first step is consecutive hydrodynamic injection of the sample of AAs (negatively charged) followed by the

OPA/2-ME mixture (neutral). After the injections, the electric field is applied to introduce the zone mixing and the derivatization process; finally the derivatives are separated by their electrophoretic mobilities. UV-absorption detection at 230 nm provided a LOD of 3  $\mu$ M and baseline resolution of *D*- and *L*-serine derivatives was achieved in less than 10 min. A good agreement was achieved between the developed CE method and a previously established HPLC method. While OPA reacts quickly with primary amines, its utility is somewhat limited with secondary amines as a primary amino group is required for efficient labeling. In contrast, 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) reacts more slowly than OPA but can label primary and secondary amines and the labeled compounds fluoresce at 488 nm. An in-capillary derivatization was achieved in zone-passing mode by introducing successive plugs of sample and NBD-F into a fused-silica capillary previously equilibrated with an alkaline borate buffer. NBD-F was prepared daily in absolute ethanol to prevent its hydrolysis. A plug of absolute ethanol was introduced between the sample and NBD-F reagent plugs. Various parameters influencing the derivatization efficiency were investigated and the optimum conditions were found (Table 1). The intraday RSDs of the migration times and the peak heights were less than 1.3 and 4.6%, respectively. Efficient derivatization and separation of a mixture of Val, Ala, Glu, and Asp were reported and peptides were also separated [24].

The optimization of the in-capillary derivatization using FQ was reported by Veledo *et al.* [25]. These workers applied the optimized conditions to a sample that contained 16 AAs. The derivatization step was done using gravity injections of a plug of a KCN solution into the capillary followed by a plug of sample containing the amino acid solution, and then by a plug of a FQ in H<sub>2</sub>O/2-propanol solution. The authors indicate that after each injection of KCN, sample, or FQ, the inlet end of the capillary should be washed by immersion in a vial containing Milli-Q water. The analysis is performed using buffer vials with a 3 kV potential at 45 °C to allow mixing of reagents and formation of the derivatives. The separation is effected at 12.5 kV (Table 1). Four plasma samples from a healthy donor and patients suffering from phenylketonuria, propionic acidemia, and tyrosinemia were studied. Intraday repeatabilities were in the range of 0.3–1.2% for migration time and 3.7–8.2% for peak height, while interday reproducibility was between 0.7 and 1.4% for the migration time and 4.7 and 9.1% for the peak height. The clinical results showed a good agreement with those provided by the clinical biochemists using a standard methods of analysis [26] as shown in Fig 2.

Chang *et al.* developed in-column derivatization, stacking, and separation of AAs by CE in conjunction with LED-induced fluorescence (390–420 nm) using NDA labeling [27]. A tetraborate solution was used as BGE and the injection order was cyanide, followed by AAs and finally NDA. After the injection of the reagents and sample, the two ends of the capillary were immersed in a 0.6% poly(ethylene oxide) (PEO) BGE solution (Table 1). Once PEO migrates through the capillary under EOF, NDA derivatives, AAs, and



**Figure 2.** Separation of FQ-AA in a plasma sample of a patient suffering from tyrosinemia type II, with the use of a 3000 Da cut-off membrane for sample preparation. Running buffer 70 mM borax-3.5 mM SDS (pH 9.3), uncoated capillary ( $L = 60$  cm,  $l = 50$  cm,  $50 \mu\text{m}$  id), injection by gravity ( $h = 20$  cm) of a 50 mM KCN solution (46 s), the sample (8 s), followed by an injection of a solution of 24 mM FQ in water: 2-propanol (1:1), mixing time 6 min at 3 kV and 45°C, separation performed at 12.5 kV at room temperature. (1) Gln; (2) Asn; (3) Tyr indicated by an arrow; (4) Gly; (5) Ala; (6 and 8) Hcys; (7) Tau; (9) Trp; (10) Val; (11) Glu; (12) Asp; (13) Lys; (14) Phe; (15) Ile; (17) Leu [25].

$\text{CN}^-$  ions migrate against the EOF and enter the PEO zone. As a result of an increase in viscosity and possible interactions with PEO molecules, the migration of the reagents and analytes was reduced to the point where they become stacked at the boundary. The proposed method provides a lower degree of interference from NDA side products. Linearity of the response of GABA has been demonstrated over the range from 10 000 to 10 nM, with an LOD of 4 nM. The diagnostic potential of this approach has been demonstrated through the analysis of large volumes of cerebrospinal fluids without the need for sample pretreatment.

An interesting example of a new kind of in-capillary derivatization using a photolytic optically gated (POG) CE system for fast injections and separations was presented by Hapuarachchi *et al.* In this system, the sample and separation capillaries are constructed of one continuous capillary. The sample is labeled off-line with the fluorogenic dye 5-carboxyfluorescein-bis(5-carboxymethoxy-2-nitrobenzyl) ether- $\beta$ -alanine-carboxamide-succinimidyl ester (5CFbCSE). Upon UV-photoactivation, the electron-withdrawing caging groups are removed from the optically dormant fluorogenic dye restoring fluorescence and the labeled sample is then continuously introduced into the separation capillary via EOF. It is photoactivated in the capillary in a few milliseconds using a UV high-power laser beam (351–354 nm Ar ion laser), this leads to fluorescence in the illuminated volume of the sample which is then detected at a LIF detector positioned downstream. The injection of small analyte plugs is accomplished by opening the gating beam for a short time (20 ms), allowing fluorescent analyte to enter the separation path. The separation distance is defined by the distance between the UV-gating beam and LIF detection beam (488 nm),

allowing short separation distances and rapid separations (Table 1). POG-CZE utilizes on-column injections with narrow sample plugs that are injected with high reproducibility. The detection limits for on-line analysis of Arg, Glu, and Asp were less than 1 nM with separation times less than 5 s and separation efficiencies exceeding 1 000 000 plates/m [28].

In addition to in-capillary derivatization, dichlorotriazinylamino fluorescein (DTAF) was also used for the on-line coupling of sequential injection analysis (SIA) and CE/LIF (488 nm) via an in-line injection valve for automated derivatization of AAs and peptides. In this procedure, four steps are necessary: (i) the introduction of reagent and sample zones in a holding coil, (ii) the mixing of the sample and reagent in a reaction coil, (iii) the increased of the reaction time using a stop-flow step, and (iv) the delivery of derivatized sample into the loop of a microvalve interface. The analyte zone is introduced electrokinetically in the capillary via the valve interface. The influence of pH, borate, and SDS concentrations in BGE were studied, as well the derivatization conditions to obtain a high reaction yield. Thr, Ser, Gly, and enkephalins were detected and CVs below 5% were obtained [29].

## 2.5 Sample preconcentration

Since very small sample volumes are normally injected in CE, many AA analyses lack sensitivity. Sample preconcentration is often used as an answer to this analytical difficulty to increase, in the capillary, the concentration of injected sample.

A selective stacking of zwitterions in a full-capillary sample matrix using a cathodic-direction moving reaction boundary (MRB) CE under the control of EOF for sample preconcentration has been reported. Theoretical computations on the selective stacking of two test analytes (His and Trp) by the MRB created with 30 mM pH 3.0 formic acid-NaOH buffer and 2–80 mM sodium formate led to three predictions: (i) the MRB cannot stack His and Trp plugs if less than 12.5 mM sodium formate is used to form the MRB and to prepare the sample matrix, (ii) the MRB can stack His and/or Trp sample plugs completely if more than 50 mM sodium formate is chosen to form the MRB, and (iii) the MRB can only focus the His plug completely, but stack Trp plug partially if 20–50 mM sodium formate is used. These three predictions were experimentally verified and complete MRB-induced selective stacking of His rather than Trp was observed [30].

The use of a CE separation combined with the insertion of an extra plug of acid following a sample zone provides a selective acid barrage to block the backward migration of weak anionic analytes due to a sudden mobility reduction via an acid-base reaction but does not affect the ability of strong cations such as  $\text{Cl}^-$  to penetrate the barrage freely. This method, which is called acid barrage stacking (ABS) was used for on-line antisalt injection in CE of the separation of off-line FMOC derivatives of AAs detected by common UV absorption. The use of citric and tartaric acids as the barrage acid gives better results than phosphoric, acetic, or formic

acid. A stacking effect up to 1000 could be observed (Table 1). The concentration of Glu and Asp were determined in rat brain microdialysate, rat serum, and human saliva. The intraday RSDs were 0.33–4.9% for the migration time and 1.8–9.6% for the peak area. The recoveries measured by spiking technique were 82–115% for Glu and 86–116% for Asp. For example, Glu and Asp concentrations were found between 0.26–0.83 and 0.24–0.64  $\mu\text{M}$ , respectively, in rat brain microdialysate [31].

An etched column was used to increase the area of the capillary's inner surface and, consequently increases the electrostatic interaction between AAs at acidic pH and the inner surface of the capillary column. An injection at 10 psi for 1 min with a sample pH 4 results in the optimum quantity of adsorbed AAs. The performance of CE-DAD separations were enhanced by factors of 5200, 2800, and 3100 times for Asn, Tyr, and Phe, respectively, compared with a normal CE separation [32].

Full-capillary sample stacking (FCSS) and sweeping-micellar EKC were used for the analysis of NDA-labeled Trp and Ile. These weakly acidic compounds were dissolved in a low-conductivity buffer (ACN/methanol/water), and placed in an entire capillary, then each end was plunged in a vial of a high-conductivity buffer. When negative polarity is applied, the direction of the EOF is toward the inlet. Labeled AAs move in the reverse direction and are neutralized and stacked at the boundary of a dynamic pH-junction. When the sample concentration is completed, the two vials are replaced with the same buffer plus SDS (Table 1) for the sweeping step and MEKC [33] to provide a "dramatic improvement in sensitivity (400-fold)". The LODs were between 1.4 and 1.1 nM for the labeled AAs, with a very large number of theoretical plates (above 100 000), however, the migration times are relatively long (30 min).

## 2.6 Applications of chips

### 2.6.1 Improvements in detection

LIF detection is a commonly used technique for detection using microchips. An orthogonal optical arrangement was proposed by Fu *et al.* [34]. In this approach, a special crossed-channel configuration, with a 1.5 mm distance from the separation channel to the sidewall of the glass chip was designed in order to facilitate collection of the emitted fluorescence light through the sidewall. The significant difference in intensity distribution of scattered laser light on the chip plane observed in this study was fully exploited to optimize the S/N ratio using experimental measurements and ray-tracing simulation and a fluorescence collection angle of 45° to the chip plane gives the best result. Using this design, FITC-labeled AAs have been detected with LODs of 1.1 pM, comparable to that of optimized confocal LIF systems for chip-based CE. In addition, blue and green LEDs and an optical fiber were mounted in a PDMS-based microchip. The green LED resulted in LODs of 600 nM of sulforhodamine-

101, while the blue LED provides the detection of 120 nM of fluorescein. An integrated microfluidic device was used to determine NBD derivatives of Ser, Asp, and Val with LODs in the order of 10  $\mu\text{M}$  [35].

A contactless conductivity detector using poly(methyl methacrylate) chips was developed with the conductivity in the channel probed using a pair of external electrodes which are fixed on the chip holder [36]. Pulsed amperometric detection (PAD) can be used for the detection of electrochemically active molecules, but the detection current (nA) must be separated from the separation current ( $\mu\text{A}$ ) using an integrated decoupler which improves the sensitivity. The cathode for decoupling was a Pd microwire with the working electrode being a Au or Pt wire. This system is easy to make and can achieve detection limits as low as 5 nM for dopamine, 74 nM for glutathione, and 100 nM for glucose [37].

In another work, a single carbon fiber cylinder (CFC) working electrode replaced the more conventional carbon fiber disc (CFD). The fiber electrode is mounted at the end of a PDMS/glass hybrid microchannel. The electrochemical reduction reaction at the working electrode is also coupled to the separation high-voltage system and the coupling degree is related to the in-channel length of the CFC. This approach simplifies the fabrication procedure of the working electrode and also provides a convenient and sensitive means for the determination of nonelectroactive molecules as Arg, Thr, Glu, and the electroactive ones like Cys [38].

A response surface methodology (RSM) was used to optimize amperometric detection for Se-AAs. Under optimum conditions, the analytes could be separated and detected within 300 s using a separation voltage of 2 kV and a detection voltage of +0.9 V. The authors note that the negligible sample volumes used in the microchip procedure obviates surface fouling common to amperometric measurements of selenoamino acid compounds [39].

A microfluidic chip, based on CE coupled with a cellulose-ssDNA modified electrode, has been used by Johirul *et al.* [40] for the simultaneous analysis of dopamine, norepinephrine, 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), and ascorbic acid (AsA). The sensitivity of the modified electrode was about 12 times higher than that of a bare electrode as the S/N was enhanced. The most favorable potential for the amperometric detection was 0.7 V (vs. Ag/AgCl). Square-wave voltammetric analyses reflected the sensitivities of the modified electrode for DA, NE, L-DOPA, DOPAC, and AsA which were 1.78, 0.82, 0.69, 2.45, and 1.23 nC/ $\mu\text{M}$  with LODs of 0.032, 0.93, 1.13, 0.31, and 0.62  $\mu\text{M}$ , respectively. This microchip-based system was also used with serum samples (Table 1).

### 2.6.2 Multichannel applications

Multichannel microchips appear to be a promising technology for the analysis of biological samples, because these microchips could mimic slab gel multichannel separations. Two interesting applications were recently reported.

Shadpour *et al.* described the use of a 16-channel microfluidic chip equipped with an integrated contact conductivity sensor array. A polycarbonate (PC) chip with 16 hot-embossed separation channels (40  $\mu\text{m}$  deep, 60  $\mu\text{m}$  wide and 40 mm long) was employed with the gold sensor array lithographed onto a PC cover plate. The pairs of Au microelectrodes (60  $\mu\text{m}$  wide with 5  $\mu\text{m}$  spacing) were each incorporated into the 16 channels and used as independent contact conductivity detectors and a printed circuit board (PCB) collected the conductivity signals. Platinum wires fixed on another PCB distributed the high voltage to all the reservoirs of the fluidic chip. The conductivity detection was carried out using a bipolar pulse voltage waveform with a pulse amplitude of  $\pm 0.6$  V and a frequency of 6.0 kHz. Separations of AAs (among other molecules) were performed with an electric field of 90 V/cm in less than 4 min. The LOD of Ala was 7.1  $\mu\text{M}$  (and close values were obtained for Val, Asn, and Trp), with an average channel-to-channel migration time reproducibility of 2.8% and resolution near 1 [41].

Perhaps the most interesting multichannel chip involves the use of the Mars Organic Analyzer (MOA), which is a portable microfabricated CE instrument developed for planetary exploration reported by Skelley *et al.* [42]. This microfluidic device integrates all-glass CE separation channels with microfabricated PDMS membrane valves and pumps in a multilayer format. The separation channel lengths are 21.4 cm and contain 0.6 cm long cross-injection channels. The reservoirs of sample, waste, cathode, and anode are accessed by separate fluidic bus structures for delivering buffer and sample to the channel as well as for rinsing the separation channel between runs. The separation and fluidic layers are integrated into one multilayer device structure [43]. The LIF detector used a confocal arrangement with a 404 nm diode laser; the amines were labeled with fluorescamine, separated, and detected at concentrations of  $< 500$  nM on this multichannel chip. The prebiotic synthesis simulated by the products of an  $\text{NH}_4\text{CN}$  polymerization (1 M  $\text{NH}_4\text{CN}$  reacted at 100°C for 5 days in a sealed flask) could be successfully isolated. Ala and/or Ser were detected with no additional sample cleanup at a concentration of 4.1  $\mu\text{M}$ , which corresponds to a reaction yield of 0.0003%. Methyl and ethylamines were also identified at higher concentrations. The authors mentioned that the MOA is part of the Urey Instrument package that has been selected for the ESA ExoMars Opportunity.

### 3 Chirality

Enantiomeric separations are among the most common applications of CE, at least in terms of number of publications and pharmaceutical developments that have been reported. The separation of the 19 common AAs is a real challenge because most are in the D- and L-form. A large number of new applications describing improvements in chiral analysis have been reported over the last two years.

Many separations in which CDs, chiral surfactants or other chiral selectors are added to the migration buffer have been reported as examples of EKC. Another way to separate enantiomers is to derivatize the sample to obtain diastereoisomers which can be then separated via CZE.

#### 3.1 CDs

The behavior of 6-mono(alkylimidazolium)- $\beta$ -CDs, where an alkylimidazolium cation replaces a single primary hydroxyl group were studied using dansyl D/L-AAs. It was shown that the resolution depends on the concentration of chiral selectors (better in the range of 3–30 mM), the pH of the running buffer (optimum at pH 9.6), the counter anions of the CD, the side chain length of the *n*-alkyl-imidazolium cation, the temperature and the organic modifier [44]. This study involved the use of nine common and relatively rare AAs which were derivatized with dansyl chloride. The effect of the selector concentration as well as the alkyl chain length ( $R = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ ,  $n \leq 4$ ) were investigated using a BGE of 50 mM acetic acid adjusted to pH 5 or 6 with sodium hydroxide. It was determined that a shorter alkyl length enhances the resolution between the enantiomers ( $R = 1.02$ – $5.0$ ). In addition, a shorter alkyl length is also acceptable when the concentration of the modified CD is greater than 3 mM. The observed data were compared to the theoretical model of Wren and Rowe [45] and showed a good accordance of the best chiral resolution and the maximum apparent mobility difference [46].

Sulfated  $\beta$ -CD was used to obtain baseline resolution of 13 off-line NDA-labeled standard AAs. The pH is shown to be the most critical BGE parameter affecting resolution. Similarly, 2% S- $\beta$ -CD was used to obtain a baseline resolution of D/L-Ser. A dilute solution of the labeled AAs in water can be stacked 100-fold by hydrodynamic injection, while the LODs of D- and L-Ser and Glu are 0.20 and 0.30 nM, respectively, using LIF detection (Table 1). Unfortunately, the stacking process is not applicable when the ionic strength is high [47].

Different dual selector systems containing a CD derivative (methyl- $\beta$ -CD and dimethyl- $\beta$ -CD) and a new diazocrown-ether derivative (*N*-(2-(1,4,10,13-tetraoxa-7,16-diazacyclooctadecan-7-yl)propanoyl)glycine) were studied in the enantioselective separation of tryptophan methyl ester and tyrosine methyl ester enantiomers by Elek *et al.* [48] (Table 1).

The quantitation of Phe, *N*-acetylphenylalanine enantiomers, and prochiral *N*-acetylaminoacetic acid, by-products in D-Phe synthesis was performed using pH 2.5, 35 mM Tris buffer with 4% highly sulfated- $\beta$ -CD (in which sulfate substituted functions are present in a larger amount (an average of 12) on the oligosaccharide backbone than in common sulfated-CD (an average of 4) [49]), at  $-15$  kV and 25°C. D-Phe recoveries were in the range of 97.8–103.8%, and CVs are 2.3–5.0% [50].

$\delta$ -CD (nine  $\alpha$ -D-glucopyranoside ring molecule) has been employed to separate dansyl and FMOC derivatives of several AAs.  $\delta$ -CD provided better enantiomeric resolution than  $\alpha$ ,

$\beta$ -, and  $\gamma$ -CDs for Met, Phe, Leu, and Nle using a phosphate/borate with  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, or  $\delta$ -CD. When using the same buffer with SDS and 15% 2-propanol (Table 1), the enantiomeric separation is better for  $\delta$ -CD for Phe and Trp labeled with FMOc [51].  $\gamma$ -CD was used for the quantitation of dansyl labeled D- and L-glutofosinate (D,L-homoalanine-4-yl(methyl)-phosphonic acid), which was extracted using an extraction step on the anatase form of titania and large volume sample stacking (Table 1). An LOD of 2 nM was reported [52].

Eight amino-CDs containing amino, diamino, ethylene-diamino, and imidazo functions were used in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  to study the resolution between the enantiomers of aromatic AAs. BGEs for the chiral separation experiments were performed by dissolving each CD derivative (mM concentration) in 2.0 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (pH 6.8) in the presence of  $\text{CuSO}_4$ . The ligand exchange was used to separate the enantiomers D/L-Tyr, D/L-Phe, D/L-Trp. The authors concluded that CD derivatives with ionizable groups and ligand properties for metal ions are ideal chiral selectors [53].

A mixture of  $\beta$ -CD and sodium taurodeoxycholate (STDC) was also used to obtain better resolution than using either  $\beta$ -CD or STDC alone to separate 19 FMOc-labeled AAs (Table 1) [54]. Seventeen pairs of FMOc-AA enantiomers were resolved with resolution of 1.5 (only Arg (1.36) and Ala (1.18) have lower resolution). The addition of the second selector does not change the mobility difference between a pair of enantiomers or the number of theoretical plates; but it decreased the apparent mobility of a pair of enantiomers which could be the major reason for the improvement of the chiral resolution. The nonchiral effect of the selectors (change of the EOF) was an important factor in enhancing the enantioseparation resolution.

### 3.2 Chiral surfactants

NDA-derivatized Phe, Trp, Arg, 4-methylphenylalanine, and kynurenine enantiomers were separated using a synthesized surfactant (3-((3-dehydroabietamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate). These compounds were separated using borate buffer and 25 mM surfactant, with resolution for the various compounds in the range of 1.56–5.40 [55].

The separation of ephedrine, *N*-methyl ephedrine, pseudoephedrine, atenolol, metoprolol, and synephrine was obtained using an original chiral microemulsion containing ethyl acetate, a phosphate buffer (pH 7.0), dodecylcarbonylvaline with the cosurfactants (in mM concentration) 1-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, cyclopentanol, and cyclohexanol. It is reported that secondary alcohols improved enantiomeric selectivities while primary alcohols had the opposite effect (with the exception of the 1-butanol) [56].

### 3.3 Chiral derivatization agents

Dehydroabietylisothiocyanate (DHAIC), which is derived from dehydroabietic acid, was synthesized as a chiral deriva-

tization reagent [57]. When this reagent reacts with AAs at 70°C in ACN, stable derivatives can be detected using UV-absorption detection. The separation of the labeled D/L-Asn, D/L-Met, D/L-Leu, D/L-Phe, D/L-Trp, D/L-Ser, D/L-Val, D/L-Ala, D/L-Thr, and *R/S*-vigabatrin could be achieved using  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /SDS buffer with 25% v/v ACN, resulting in resolution between 0.95 and 8.9 (Table 1). In particular, vigabatrin enantiomers could be separated within 25 min, giving a calibration curve ranging from 0.3 to 6.0  $\mu\text{g/mL}$  with a detection limit of 0.15  $\mu\text{g/mL}$ . Quantitation of the compounds of interest was obtained in human plasma and no interferences were found from endogenous AAs [58].

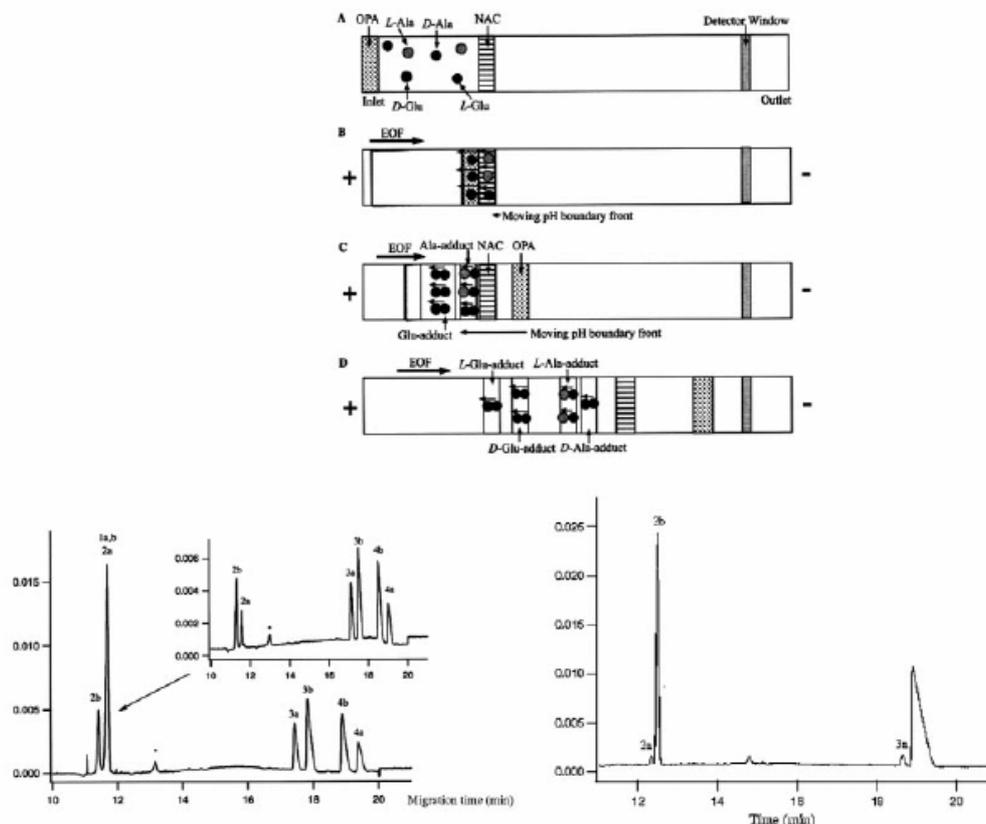
In-capillary chemical derivatization to obtain diastereoisomers was developed using OPA/*N*-acetyl L-cysteine (*t*-NAC) with on-line sample preconcentration with CE. This method, described in Fig. 3 [59] enables direct analysis of D-AAs in a 95% enantiomeric excess mixture with sub-micromolar detection limits using UV detection. It was applied to study the enantioselective AA flux in *E. coli* bacteria cultures which demonstrated a unique L-Ala efflux into the extracellular medium.

A PDMS microchip was used for precolumn in-line derivatization with OPA/2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\beta$ -D-glucopyranose and electrophoretic separation on this microchip system. The authors show that the reaction is maximized in less than 5 s for Arg, Leu, Trp while the overall analytical procedure (reaction and chiral separation) was obtained within 2.5 min. Resolution between enantiomers was in the range of 2.5–6.1 [60], however, the mixture of the five D/LAAs was separated with difficulty.

### 3.4 Miscellaneous

As indicated above, copper complexes are very commonly used as chiral selectors for ligand-exchange CE. The separation of halogenated AAs was studied with L-4-hydroxyproline, L-histidine, and *N*-alkyl derivatives of L-4-hydroxyproline as chiral selectors and ligands of  $\text{Cu}^{2+}$  to obtain chiral complexes which will then react with the halogenated AA enantiomers to form diastereoisomeric complexes (Table 1). The influence of various parameters on the resolution, such as selector concentration, pH, organic modifier, and field strength, was investigated. Optimum conditions were found using *N*-(2-hydroxyoctyl)-L-4-hydroxyproline as the chiral selector, with  $\text{CuSO}_4$  [61].

Proteins can also be used as chiral selectors, and the different stereoselective behavior of canine serum albumin (CSA) and BSA as electrolyte additives was investigated for the separation of tryptophan derivatives. The effects of pH, temperature, CSA concentration, electrolyte concentration, and organic modifiers on the enantiomeric separation of tryptophan derivatives (as 5-fluoro-tryptophan, 6-methyl-tryptophan, or kynurenine) were investigated (Table 1). Using UV absorption, detection is performed at 280 nm to minimize the noise due to the protein. The presence of an organic modifier was not found to be useful. When 11 deri-



**Figure 3.** Top: the general principle of SPCD-CE for single-step enantioselective analysis of submicromolar levels of AAs: (A) multiple hydrodynamic injection sequence; (B) on-line sample preconcentration; (C) in-capillary chemical labeling by zone passing of OPA/NAC; (D) chiral separation of diastereomeric AA adducts. Note that AA focusing occurs at different stages during electromigration both prior to and after in-capillary derivatization. Bottom right: electropherogram demonstrating the use of 1 mM  $\beta$ -CD as a chiral additive to enhance enantioselectivity by dynamic inclusion complexation of AA adducts by SPCD-CE. Inset electropherogram shows the same separation without *D*/*L*-Ser comigration with *D*-Ala. Bottom left: enantioselective resolution of micromolar levels of *D*-AAs from a 95% enantiomeric excess of their respective *L*-enantiomers without  $\beta$ -CD additive. Sample solutions contained 5 and 200  $\mu$ M *D*- and *L*-Ala/Glu, respectively. AA-isoindole adducts are: 1a, *D*-Ser; 1b, *L*-Ser; 2a, *D*-Ala; 2b, *L*-Ala; 3a, *D*-Glu; 3b, *L*-Glu; 4a, *D*-Asp; 4b, *L*-Asp [59].

vatives were separated using 15 kV as the separation voltage, only six derivatives could be baseline-separated with either CSA or BSA. It should be noted that after repeated runs, band-broadening drastically increased and the resolution decreased. To remove adsorbed protein, the capillary was washed with 1 M NaOH after each run [62].

Open-tubular CE chromatography was studied using liposomes to coat the capillaries. Liposomes prepared from 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(biotinyl), or 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(biotinyl)

with different amounts of phosphatidylserine were employed to separate *D,L*-Trp, *D,L*-phenylthioindantoin-Ser, and *D,L*-phenylthioindantoin-Thr. The resolution was estimated between 1.5 and 3.9 [63].

Three urea derivatives of terguride (TI) where the urea side chain is dimethyl (TI), diethyl (TII), and diisopropylurea (TIII) were used as chiral selectors for the enantiomeric separation of dansyl AAs using CE/UV and linear polyacrylamide-coated capillaries. A mixture of MeOH/THF in the BGE consisting of 100 mM  $\beta$ -alanine-acetate was used to increase the solubility of TI to 25 mM. The capillary was

filled with the TI (high-UV absorption), and the inlet and outlet vials contained only buffer solutions. The best separation of Dns-AAAs was achieved on TI [64].

New developments were reported regarding the use of open-tubular electrochromatography for AA analysis. As an example, a synthetic copper mesogenic polymer was prepared and then covalently bonded to the siloxane-based deactivated column. The EOF generated from the modified phase was surveyed with conventional aqueous buffers as well as hydroorganic mobile phases. The elution times for the aromatic AAs decreased slightly as the ratio of ACN/H<sub>2</sub>O run buffers increased from 50 to 90%. It is noted that ligand exchange should be involved in the separation, which could explain the migration order: Phe, Trp, Tyr [65].

#### 4 Analysis of AAs in animals

The level of AAs in neurotransmitter fluxes, animal (mouse, rat, mollusk) cerebral or neuronal fluids, have been investigated to provide a better understanding of neuronal functioning or for studying the effect of drugs or physiological parameters. Microdialysis (MD) coupled to CE is a well-known and established method for investigating changes in the concentration of AAs. The labeling of samples to optimize the sensitivity and obtain the maximum fluorescence is often a critical step of the analysis. NDA provides considerably more stable derivatives than OPA ones and can derivatize primary amines at concentrations as low as 100 pM. Siri *et al.* have performed a number of HPLC/fluorescence and MEKC/LIF experiments to compare separation and detection of six neuroactive compounds and 20 other AAs. The neuroactive molecules were Gly, Glu, Asp, GABA, and the catecholamines dopamine and noradrenaline [66]. The CE separation was optimized using lithium salts (Table 1). CE exhibits a greater resolution than HPLC and the observed LODs were in the range of 0.1 nM for CE/LIF (410 nm).

The level of a number of important neurochemicals, including D/L-Ser, taurine, Glu, and GABA, from mouse cortical brain slices has been studied by O'Brien *et al.* [67]. The AAs have been monitored using online MD-CE with analyte concentrations measured every 20–27 s. On-column derivatization was performed with OPA/β-ME. The separation was performed using a BGE containing HP-γ-CD, in a small capillary (11.5 cm × 5 μm id capillary, Table 1). Stimulation of a mouse with high-potassium concentrations increased the release of D-Ser and kainic acid (KA). Induced D-Ser release was not blocked by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, suggesting that α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid/KA receptors did not mediate D-Ser release. Application of L-Ser, the precursor of D-Ser, resulted in increasing extracellular D-Ser concentrations. This research group also studied the uptake of D-Ser in isolated larval tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) retinas using CE [68]. Excised retinas were incubated in Ringer's solution in the presence of 5 μM D-Ser. The supernatant was removed

after 30 min, mixed with NBD-F to label amines and then analyzed using CE (Table 1). A significant D-Ser uptake had been observed over a period of 1.5 h. This is the first observation of D-Ser uptake by an intact amphibian retinal tissue. This uptake in the retina was Na<sup>+</sup> dependent and blocked by L-Ala, L-Thr, and L-Cys.

The time course of AA neurotransmitter changes in the rat nucleus accumbens after the exposure to the predator odor was investigated by Venton *et al.* [69]. They used on-line MD coupled to CE with 14 s temporal resolution. AAs were derivatized using OPA/β-ME and detected with LIF with a 351 nm diode-pumped solid-state laser. The CE separation conditions used HP-β-CD as chiral selector and a short capillary (9.5 cm × 10 μm id Table 1). The authors indicate that rapid and transient increases in AA neurotransmitters correlate with behavioral reactivity to salient stimuli.

Intracerebral MD coupled with electrophysiological recordings has been used by Lena *et al.* [70] to determine relative changes in the concentrations of several neurotransmitters in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats during waking, slow-wave sleep, and rapid eye movement (REM) sleep. The concentrations of noradrenaline, dopamine, Glu, and Asp in 2 min dialysate samples were analyzed using CE/LIF.

Miao *et al.* intensively investigated the mollusk *Aplysia californica* and more particularly the role of D-Asp, which is found in the central nervous system (CNS) of animals and has a large variety of roles ascribed to it. In their first publication, the content, synthesis, and transport of D-Asp in the CNS of *A. californica* was investigated using CE/LIF (NDA derivatization was performed) and radionuclide detection. MM concentration of D-Asp was found in various regions of the CNS (Table 1). In pulse-chase experiments with radiolabeled D-Asp, followed by CE with radionuclide detection, the synthesis of D-Asp from L-Asp has been confirmed [71].

To determine the D-Asp content in cells and in sub-cellular domains, a homemade CE/LIF system was employed [72]. A glycerol treatment was described as stabilizing cell morphology during sample preparation and CD-mediated MEKC was then used for chiral separations with sufficient sensitivity and selectivity to measure the D-Asp content in specific subregions of a single neuron. The analytes are labeled with NDA and the separation conditions were the same as described above. It should be noted that when complex biological samples are analyzed, matching the migration time for an analyte and the corresponding standard may be insufficient to confirm the peak's identity. For this reason, these workers have developed a method which combines single-step immunoprecipitation and CE-LIF analysis for investigation of the chiral AAs in single cells and small tissue samples [73]. Anti-D-Asp serum, preincubated with L-Asp conjugate, is added to the sample to selectively bind the free D-Asp, creating an antibody-antigen complex with a migration time similar to that of antibody alone, but not that of D-Asp. The complete disappearance of the putative D-Asp peak confirms its identity.

## Annexe 2 : Publication 1 (13/17)

Electrophoresis 2008, 29, 207–223

CE and CEC 219

Microchip technology could be a key for efficiently labeling very low volumes of samples at a high rate, compatible with physiological processes. As an example, Cellar *et al.* [74] have used multilayer soft lithography to prepare a PDMS microfluidic chip that allows for *in vivo* sampling of neurotransmitters by low-flow push–pull perfusion. A peristaltic pump is used to deliver artificial cerebrospinal fluid to a push–pull perfusion probe, pull sample from the probe, perform on-line derivatization with OPA/ $\beta$ -ME and HP- $\beta$ -CD, and push the derivatized AAs into the flow-gated injector of a high-speed CE-LIF instrument (Table 1). Electropherograms with 100 000 theoretical plates were acquired at approximately 20 s intervals while sampling at 50 nL/min. Push–pull probes were implanted in the striatum of anesthetized rats. *o*-Phosphorylethanolamine, Glu, Asp, taurine, Ser, and Gly were all detected with stable peak heights observed for over 4 h with RSDs of 10% *in vivo*. The combined system allows temporal resolution for multi-analyte monitoring of approximately 45 s with spatial resolution 65-fold better than a conventional 4 mm long MD probe (Fig. 4).

### 5 Analysis of AAs in human fluids

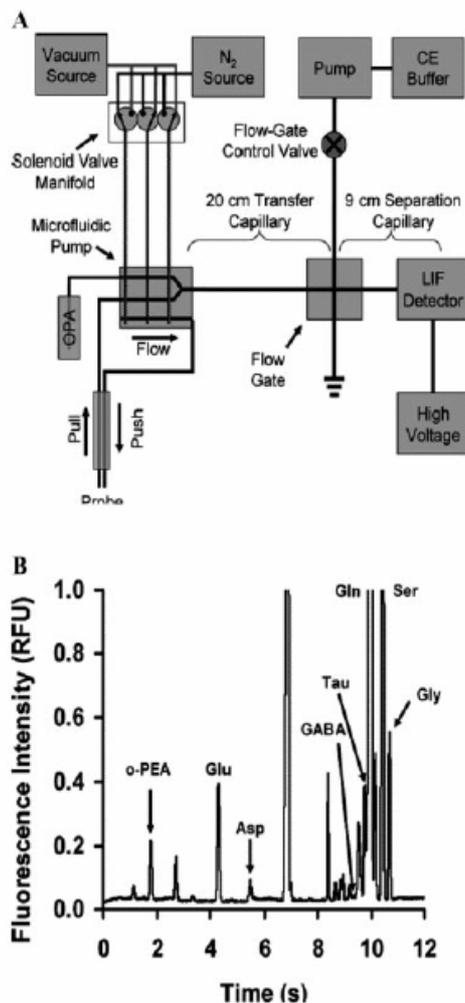
Clinical diagnostic techniques demand the use of the least invasive methods possible. A significant amount of work has been done on analyzing body fluids such as saliva, sweat, urine, blood plasma or serum, and amniotic fluid.

Wang *et al.* [75] analyzed the excitatory AAs (EAAs) tagged with NDA using a CE/LIF equipped with a LED. The separation was carried out in an uncoated fused-silica capillary with a borate buffer. The LODs for Glu and Asp were 21 and 23 nM, respectively (Table 1). The approach was successfully applied to the analysis of Glu and Asp in biological fluids including human serum, rabbit serum, and human cerebrospinal fluid.

Sweat has a complex composition and only minute sample volumes are normally available. For this reason, a new method proposed by Hirokawa *et al.* [76] has been used to allow for simultaneous analysis of metal cations, biogenic amines, and AAs using indirect UV detection. The separation of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , diethanolamine, and triethanolamine, ornithine, His, Lys, and Arg was performed in 13 min using 4-methylbenzylamine as chromophore (Table 1). The analytical results for particular analytes were found to vary, depending on the sampling spot and individual, but in general correspond well to clinical concentration ranges.

Pobozy *et al.* [77] reported the analysis of derivatized AAs in saliva using CE/LIF of FITC derivatives using a basic borate buffer. The main AAs occurring in saliva (Pro, Ser, Gly, and Glu) were separated in less than 7 min and the detection limits were in the range 0.1–2.4 nM (Table 1).

The level of Glu and Gly in serum has been determined by Nishijima *et al.* [78] in samples from healthy volunteers, patients with spinal cord injury (SCI) or with benign pro-



**Figure 4.** (A) Overview of the low-flow push–pull perfusion instrument. The microfluidic chip is placed in-line between the push–pull perfusion probe and the flow-gated injector of the CE instrument. Solenoid valves and a N<sub>2</sub> pressure vacuum manifold are employed to actuate control channels in the chip. Fluid pulled from the sample is derivatized with OPA on the chip and transferred through a capillary to a flow-gated CE-LIF instrument. The continuous flow of derivatized sample is serially analyzed by CE-LIF. (B) On-line electropherogram recorded for sample collected by push–pull perfusion at 50 nL/min from the striatum of an anesthetized rat. Borate concentration in the electrophoresis buffer was 40 mM. Peaks were identified by matching migration times with standards. *o*-Phosphorylethanolamine (*o*-PEA), taurine (Tau) [74].

static hyperplasia (BPH). The separation was performed using 2,6-pyridinedicarboxylic acid as chromophore with hexadecyltrimethylammonium hydroxide (pH 12.1) to reverse EOF. Detection was indirect UV (Table 1). In the healthy controls, Glu levels were higher and Gly levels were lower in men than in women. Serum Glu and Gly levels were not related to the spinal injury level or bladder activity. However, serum Gly levels changed in patients with SCI or BPH patients, so it may be possible to use it as an indicator of spinal glycinergic neuronal activity

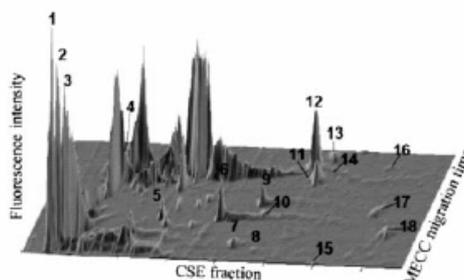
Met is an important AA involved in protein synthesis and transmethylation reactions. Since this AA is also the precursor of homocysteine (Hcy) and Cys, two important risk factors for cardiovascular diseases, the level of this AA should be measured in plasma. Zinellu *et al.* [79] presented a method in which analyte derivatization was avoided by sample concentration. Met was detected by CE/UV absorbance at 204 nm using an acidic Tris-phosphate buffer (Table 1). Assay performance was evaluated measuring Met concentrations in retinal venous occlusive disease.

Pinna *et al.* [80] have also determined the level of plasma Hcy and Cys levels in patients with retinal vein occlusion (RVO) and in healthy subjects using a new CE-LIF method which has been developed for this purpose. This study failed to demonstrate an association between increased plasma Hcy and RVO. The mean plasma Cys was significantly higher in patients with RVO, suggesting that hypercysteinemia may contribute to the pathogenesis of this disorder.

A routine analysis for total Hcy in human plasma has been developed and validated by Kubalczyk and Bald [81]. This method included reduction of homocysteine to thiol with Tris-2-carboxyethylphosphine, derivatization of the thiol with 2-chloro-1-methylquinolinium tetrafluoroborate, separation and detection of Hcy-2-S-quinolinium derivative from those of plasma endogenous and exogenous thiol derivatives by CE/UV with ACN stacking (Table 1). Recovery, calibration, precision, LOD, and LOQ are discussed in the reference.

Zhang *et al.* developed a method to investigate the relationship of plasma Hcy levels and the gene polymorphisms of N5,N10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) with Alzheimer's disease (AD) [82]. Plasma Hcy levels were measured using CE/UV without derivatization of Hcy. The plasma Hcy level in AD patients was significantly higher than that in the controls. The elevated plasma Hcy level in AD patients is probably involved in the pathogenesis of AD, which may be due to the environmental factor rather than genetic factors of the mutations of MTHFR and CBS.

Kraly *et al.* [83] have constructed a high speed, 2-D CE system with a compact and high-sensitivity fluorescence detector. Rapid and reproducible separations of Barrett's esophagus tissue homogenates could be performed after FQ labeling. The first capillary employed capillary sieving electrophoresis (CSE) using 5% dextrane as a replaceable sieving matrix and the second allowed a separation by MEKC (Table 1), the results are presented in Fig. 5.



**Figure 5.** Identified biogenic amines in 2D-CE separations of Barrett's esophagus tissue homogenates: 1, spermidine; 2, putrescine; 3, cadaverine; 4, Glu; 5, Lys; 6, Phe; 7, Ile; 8, Val; 9, Arg; 10, Met; 11, Gly; 12, Ala; 13, Ser; 14, Thr; 15, Trp; 16, Asn; 17, Gln; 18, His [83].

Methylated arginine analogs are involved in the nitric oxide synthase activity and may be associated with various diseases and their quantitative determination was reviewed by Schwedhelm [84]. Zinellu *et al.* set up a CE method to measure, in human plasma, asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA), and Arg after ACN/ammonia (90:10) protein precipitation, centrifugation, and filtration on microconcentrator. No pre-column derivatization was needed. The sample is simply concentrated by evaporation prior to CE/UV (200 nm), which was performed injecting a 1 s water plug (0.5 psi) followed by 10 s of the sample (0.5 psi). Separation was carried out in a Tris-phosphate buffer. Recoveries in plasma ADMA were between 101 and 104% [85].

A CE method has been developed by Tüma *et al.*, for the determination of urinary methylhistidine (MH). 3-MH, 1-MH, and His have been separated in both acidic and alkaline media, where these AAs form cations and anions, respectively [86]. The effective mobility of all ionic forms was measured over a broad range of pH (1.67–11.80). 3-MH and 1-MH were determined together with creatinine in untreated urine samples with the LOD of 2.4 and 3.0  $\mu$ M, respectively. Separation occurred in acetic acid/Tris/hydroxyethylcellulose electrolyte. This analysis has revealed differences between healthy individuals and patients pointing to a more extensive degradation of muscle proteins in the latter group.

Zinellu *et al.* [87] worked on the development of a simple free zone CE method for the simultaneous measurement of creatinine and creatine in human plasma. The effect of analytical parameters such as the concentration and the pH of Tris-phosphate running buffer and cartridge temperature on resolution, migration times, peak areas, and efficiency have been investigated. Good separation was achieved in less than 8 min. Plasma creatinine levels in 120 normal subjects has been studied.

A CE method with CIED has been used by Tüma *et al.* [88] for the determination of free AAs in amniotic fluid.

Twenty proteinogenic AAs and 12 other biogenic compounds have been identified including ethanolamine, choline, Ala, 2-aminobutyric acid, GABA, creatinine, Orn, carnitine, citrulline, 4-hydroxyproline, 1-MH, and 3-MH. Acetic acid and hydroxyethylcellulose were used as running electrolyte. Addition of ACN to the sample improved the separation of AAs. The LOD values were between 1.5  $\mu\text{M}$  (Arg) and 6.7  $\mu\text{M}$  (Asp). The CE/CICD method has then been applied to clinical analyses of the amniotic fluid collected from 20 pregnant women aged over 35 years and 24 pregnant women with whom abnormal fetus development was suspected. The latter group of women was found to exhibit systematically enhanced amniotic levels of most of the AAs studied.

Finally, a novel simultaneous determination method for free and total Pro and hydroxyproline (Hyp) in human urine was developed by Liang *et al.* [89]. The optimized analysis employed CE with electrochemiluminescence detection using Tris-(2,2'-bipyridyl) ruthenium(II). The separation provided a linear range of 0.01–2 mM, a detection limit of 4  $\mu\text{M}$  and sample recovery of 96.4–101.2% in human urine. The results show that the method has potential applications in monitoring the level of Pro and Hyp in body fluids from patients with bone disease, tumors, or chronic uremia.

## 6 Miscellaneous

Perez-Ruiz *et al.* have described the development of a CE method for the analysis of the antihypertensive drug captopril using LIF detection [90]. Derivatization of captopril was performed with the fluorescent label 5-iodoacetamidofluorescein. The calibration curve was linear in the concentration range of 3.5–6000 ng/mL with a detection limit of 0.5 ng/mL. The assay was successfully used for quantification of captopril in some marketed pharmaceutical preparations and urine samples.

Capillary ITP (cITP) in the cationic regime of separation with a conductometric detection has been used by Kubacak *et al.* [91] for the separation and determination of basic AAs (Arg, Lys, His) in pharmaceutical preparations (aminoplasmalm 5% E, Neonutrin 5%, Nutramin N 8%). The optimized ITP electrolyte system consisted of 10 mM potassium acetate adjusted to pH 4.0 with acetic acid as the leading electrolyte with the EOF suppressing additive, 0.2% w/v methylhydroxyethylcellulose (m-HEC), and 10 mM Ala as the terminating electrolyte. The RSDs from run-to-run and day-to-day were lower than 1.28% ( $n = 5$ ), and 1.86%, respectively.

AA analysis in a single wheat embryonic protoplast has been performed by Chen *et al.* using CE-LIF using a tissue culture technique [92]. FITC was introduced into living protoplasts by electroporation for intracellular derivatization. A special osmotic buffer (0.6 M mannitol, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) was used to keep the osmotic balance of embryonic protoplasts during the protoplasts derivatization. After completion of the derivatization reaction in the protoplasts, a single protoplast

was drawn into the capillary tip by EOF and a 0.1 M NaOH lysing solution was then injected by diffusion. The derivatized AAs were analyzed by CE/LIF (excitation 488 nm) after the protoplast was lysed. Nine AAs have been quantitatively and qualitatively determined and compared in lysate and single protoplast of wheat embryonic cells, respectively, with mean concentrations of AAs ranging from 26.8 to 181.8  $\mu\text{M}$  in single protoplast.

## 7 Conclusions

Hata *et al.* [93] presented the application of Hadamard transform technique, a multiplexing method, to CE for AA applications, using a particular experimental CE setup. This technique theoretically improves the S/N ratio by a factor of  $(n + 1)/2n^{1/2}$ , where  $n$  is the order of the Hadamard matrix, *i.e.*, the number of injections used for the Hadamard transformation [94]. The samples must be injected several times according to the Hadamard sequence code, for example for  $n = 511$ , the S/N ratio is theoretically improved by a factor of 11.3. This approach can be a solution for the limitation of sensitivity of the detection of AAs via a mathematical approach. In this review article, we observe that the use of CE for the analysis of AAs in body fluids continues to be an important tool for clinical applications. In the two last years, an increasing number of developments have been reported for on-capillary derivatization for CE-LIF experiments. In addition, we note that LED or solid lasers are gradually replacing the conventional gas lasers for CE/LIF which are expensive and large. LIF detection is still the most commonly used detection technique for AA analysis and NDA is an extremely popular dye [95] requiring LIF detection at 410 nm.

We thank Peter Froehlich for his careful review of this manuscript.

The authors have declared no conflict of interest.

## 8 References

- [1] Smith, J. T., *Electrophoresis* 1999, 20, 3078–3083.
- [2] Prata, C., Bonnafous, P., Frayssé, N., Treilhou, M. *et al.*, *Electrophoresis* 2001, 22, 4129–4138.
- [3] Poinot, V., Bayle, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2003, 24, 4047–4062.
- [4] Poinot, V., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G. *et al.*, *Electrophoresis* 2006, 27, 176–194.
- [5] Lee, R., Ptolemy, A. S., Niewczas, L., Britz-McKibbin, P., *Anal. Chem.* 2007, 79, 403–415.
- [6] Moini, M., *Anal. Chem.* 2007, 79, 4241–4246.
- [7] Meulemans, A., *J. Chromatogr. B* 2005, 824, 308–311.
- [8] Xiao, D., Zhao, S., Yuan, H., Yang, X., *Electrophoresis* 2007, 28, 233–242.

## Annexe 2 : Publication 1 (16/17)

222 V. Poinset et al.

*Electrophoresis* 2008, 29, 207–223

- [9] Kostal, V., Zeisbergerova, M., Hrotekova, Z., Šlais, K., Kahle, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 4658–4665.
- [10] Hapuarachchi, S., Janaway, G. A., Aspinwall, C. A., *Electrophoresis* 2006, 27, 4052–4059.
- [11] Nouadje, G., Siméon, N., Nertz, M., Couderc, F., *Analysis* 1996, 24, 360–370.
- [12] Zhao, S., Yuan, H., Xiao, D., *Electrophoresis* 2006, 27, 461–467.
- [13] Casado-Torres, S., Cortacero-Ramirez, S., Carrasco-Pan-corbo, A., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1835–1847.
- [14] Tan, F., Yang, B., Guan, Y., *Anal. Sci.* 2005, 21, 583–585.
- [15] Ehlen, J. C., Albers, H. E., Breyer, E. D., *J. Neurosci. Methods* 2005, 147, 36–47.
- [16] Chen, S., Liu, B. F., Fu, L., Xiong, T. et al., *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 160–166.
- [17] Edgar, J. S., Pabbati, C. P., Lorenz, R. M., He, M., Fiorini, G. S., Chiu, D. T., *Anal. Chem.* 2006, 78, 6948–6954.
- [18] Li, J., Yan, Q., Gao, Y., Ju, H., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2694–2699.
- [19] Gong, X. Y., Kubáň, P., Tanyanyiwa, J., Hauser, P. C., *J. Chromatogr. A* 2005, 1082, 230–234.
- [20] Abad-Villar, E. M., Kubáň, P., Hauser, P. C., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1031–1037.
- [21] Ptolemy, A. S., Britz-McKibbin, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1106, 7–18.
- [22] Ptolemy, A. S., Britz-McKibbin, P., *Analyst* 2005, 130, 1263–1270.
- [23] Koval, D., Jiraskova, J., Strisovsky, K., Konvalinka, J., Kašička, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 2558–2566.
- [24] Zhang, H., Le Potier, I., Smadja, C., Zhang, J., Taverna, M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1387–1394.
- [25] Veleido, M. T., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 2005, 1079, 335–343.
- [26] Veleido, M. T., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *Electrophoresis* 2006, 27, 3101–3107.
- [27] Chang, P. L., Chiu, T. C., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2006, 27, 1922–1931.
- [28] Hapuarachchi, S., Premeau, S. P., Aspinwall, C. A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3674–3680.
- [29] Zacharis, C. K., Tempels, F. W., Theodoridis, G. A., Voulgaropoulos, A. N., et al., *J. Chromatogr. A* 2006, 1132, 297–303.
- [30] Qin, W. H., Cao, C. X., Li, S., Zhang, W., Liu, W., *Electrophoresis* 2005, 26, 3113–3124.
- [31] Han, Y., Zuo, M., Qi, L., Liu, K. et al., *Electrophoresis* 2006, 27, 4240–4248.
- [32] Qu, Q., Liu, Y., Tang, X., Wang, C. et al., *Electrophoresis* 2006, 27, 4500–4507.
- [33] Shih, C. M., Lin, C. H., *Electrophoresis* 2005, 26, 3495–3499.
- [34] Fu, J. L., Fang, Q., Zhang, T., Jin, X. H., Fang, Z. L., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3827–3834.
- [35] Miyaki, K., Guo, Y., Shimosaka, T., Nakagama, T. et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 810–816.
- [36] Abad-Villar, E. M., Kubáň, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 3609–3614.
- [37] Vickers, J. A., Henry, C. S., *Electrophoresis* 2005, 26, 4641–4647.
- [38] Xu, J. J., Peng, Y., Bao, N., Xia, X. H., Chen, H. Y., *J. Chromatogr. A* 2005, 1095, 193–196.
- [39] Wang, J., Mannino, S., Camera, C., Chatrathi, M. P. et al., *J. Chromatogr. A* 2005, 1091, 177–182.
- [40] Johirul, M., Shiddiky, A., Kim, R. E., Shim, Y. B., *Electrophoresis* 2005, 26, 3043–3052.
- [41] Shadpour, H., Hupert, M. L., Patterson, D., Liu, C. et al., *Anal. Chem.* 2007, 79, 870–878.
- [42] Skelley, A. M., Cleaves, H. J., Jayarajah, C. N., Bada, J. L., Mathies, R. A., *Astrobiology* 2006, 6, 824–837.
- [43] Skelley, A. M., Scherer, J. R., Aubrey, A. D., Grover, W. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 1041–1046.
- [44] Ong, T. T., Tang, W., Muderawan, W., Ng, S. C., Chan, H. S., *Electrophoresis* 2005, 26, 3839–3848.
- [45] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235–241.
- [46] Tang, W., Ong, T. T., Muderawan, I. W., Ng, S. C., *Anal. Chim. Acta* 2007, 585, 227–233.
- [47] Kirschner, D. L., Jaramillo, M., Green, T. K., *Anal. Chem.* 2007, 79, 736–743.
- [48] Elek, J., Mangelings, D., Ivanyi, T., Lazar, I., Heyden, Y. V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 38, 601–608.
- [49] Verleysen, K., Sabah, S., Scriba, G., Chen, A., Sandra, P., *J. Chromatogr. A* 1998, 824, 91–97.
- [50] Zhao, Y., Yang, X. B., Jiang, R., Sun, X. L. et al., *Chirality* 2006, 18, 84–90.
- [51] Wistuba, D., Bogdanski, A., Larsen, K. L., Schurig, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 4359–4363.
- [52] Asami, T., Imura, H., *Anal. Sci.* 2006, 22, 1489–1493.
- [53] Cucinotta, V., Giuffrida, A., Maccarrone, G., Messina, M., Vecchio, G., *Electrophoresis* 2006, 27, 1471–1480.
- [54] Chen, F., Zhang, S., Qi, L., Chen, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2896–2904.
- [55] Zhao, S., Wang, H., Pan, Y., He, M., Zhao, Z., *J. Chromatogr. A* 2007, 1145, 246–249.
- [56] Kahle, K. A., Foley, J. P., *Electrophoresis* 2006, 27, 4321–4333.
- [57] Zhao, S., Wang, H., Zhang, R., Tang, L., Liu, Y. M., *Electrophoresis* 2006, 27, 3428–3433.
- [58] Zhao, S., Zhang, R., Wang, H., Tang, L., Pan, Y., *J. Chromatogr. B* 2006, 833, 186–190.
- [59] Ptolemy, A. S., Tran, L., Britz-McKibbin, P., *Anal. Biochem.* 2006, 354, 192–204.
- [60] Ro, K. W., Hahn, J. H., *Electrophoresis* 2005, 26, 4767–4773.
- [61] Koidl, J., Hodl, H., Schmid, M. G., Pantcheva, S., Pajpanova, T., Gubit, G., *Electrophoresis* 2005, 26, 3878–3883.
- [62] Hodl, H., Koidl, J., Schmid, M. G., Gubit, G., *Electrophoresis* 2006, 27, 4755–4762.
- [63] Han, N. Y., Hautala, J. T., Bo, T., Wiedmer, S. K., Riekkola, M. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 1502–1509.
- [64] Honzatko, A., Cvak, J., Vaingatova, S., Flieger, M., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 673–677.
- [65] Chen, J. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 729–735.
- [66] Siri, N., Lacroix, M., Garrigues, J. C., Poinset, V., Couderc, F., *Electrophoresis* 2006, 27, 4446–4455.
- [67] O'Brien, K. B., Bowser, M. T., *Electrophoresis* 2006, 27, 1949–1956.

## Annexe 2 : Publication 1 (17/17)

*Electrophoresis* 2008, 29, 207–223

CE and CEC 223

- [68] O'Brien, K. B., Miller, R. F., Bowser, M. T., *Neurosci. Lett.* 2006, 385, 58–63.
- [69] Venton, B. J., Robinson, T. E., Kennedy, R. T., *J. Neurochem.* 2006, 96, 236–246.
- [70] Lena, I., Parrot, S., Deschaux, O., Muffat-Joly, S. et al., *J. Neurosci. Res.* 2005, 81, 891–899.
- [71] Miao, H., Rubakhin, S. S., Scanlan, C. R., Wang, L., Sweedler, J. V., *J. Neurochem.* 2006, 97, 595–606.
- [72] Miao, H., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., *Anal. Chem.* 2005, 77, 7190–7194.
- [73] Miao, H., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., *J. Chromatogr. A* 2006, 1106, 56–60.
- [74] Cellar, N. A., Burns, S. T., Meiners, J. C., Chen, H., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 2005, 77, 7067–7073.
- [75] Wang, C., Zhao, S., Yuan, H., Xiao, D., *J. Chromatogr. B* 2006, 833, 129–134.
- [76] Hirokawa, T., Okamoto, H., Gosyo, Y., Tsuda, T., Timerbaev, A. R., *Anal. Chim. Acta* 2007, 581, 83–88.
- [77] Pobozy, E., Czarkowska, W., Trojanowicz, M., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2006, 67, 37–47.
- [78] Nishijima, S., Sugaya, K., Fukuda, T., Miyazato, M. et al., *Int. J. Urol.* 2006, 13, 1479–1483.
- [79] Zinellu, A., Sotgia, S., Usai, M. F., Zinellu, E. et al., *Anal. Biochem.* 2007, 363, 91–96.
- [80] Pinna, A., Carru, C., Zinellu, A., Dore, S. et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006, 47, 4067–4071.
- [81] Kubalczyk, P., Bald, E., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 1181–1185.
- [82] Zhang, Y. D., Ke, X. Y., Shen, W., Liu, Y., *Clin. Med. Sci. J.* 2005, 2054, 247–251.
- [83] Kraly, J. R., Jones, M. R., Gomez, D. G., Dickerson, J. A. et al., *Anal. Chem.* 2006, 78, 5977–5986.
- [84] Schwedhelm, E., *Vasc. Med.* 2005, 10, S89–S95.
- [85] Zinellu, A., Sotgia, S., Zinellu, E., Pinna, A. et al., *Electrophoresis* 2007, 28, 1942–1948.
- [86] Tüma, P., Samcová, E., Balinová, P., *J. Chromatogr. B* 2005, 821, 53–59.
- [87] Zinellu, A., Zinellu, E., Sotgia, S., Formato, M. et al., *Clin. Chem.* 2006, 52, 2054–2059.
- [88] Tuma, P., Samcová, E., Andelova, K., *J. Chromatogr. B* 2006, 839, 12–18.
- [89] Liang, H., Xue, J., Li, T., Wu, Y., *Luminescence* 2005, 20, 287–291.
- [90] Perez-Ruiz, T., Martinez-Lozano, C., Galera, R., *Electrophoresis* 2006, 27, 2310–2316.
- [91] Kubacak, P., Mikus, P., Valaskova, I., Havranek, E., *Arch. Pharm. (Weinheim)* 2006, 339, 96–99.
- [92] Chen, F. G., Wang, C., Zhi, D. Y., Xia, G. M., *Amino Acids* 2005, 29, 235–239.
- [93] Hata, K., Kaneta, T., Imasaka, T., *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 178–182.
- [94] Kaneta, T., *Anal. Chem.* 2001, 73, 540A–547A.
- [95] Rammouz, G., Lacroix, M., Garrigues, J. C., Poinot, V., Couderc, F., *Biomed. Chromatogr.* 2007, in press.

Audrey Rodat<sup>1, 2</sup>  
 Fabien Kalck<sup>2</sup>  
 V  r  na Poinso  t<sup>1</sup>  
 Bernard Feurer<sup>2</sup>  
 François Couderc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire des IMRCP,  
 Université de Toulouse,  
 Université Paul Sabatier,  
 Toulouse, France  
<sup>2</sup>PicoMetrics,  
 Toulouse, France

Received May 21, 2007  
 Revised July 16, 2007  
 Accepted August 10, 2007

## Research Article

# An ellipsoidal mirror for detection of laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis system: Applications for labelled antibody analysis

An LIF detector was integrated into a CE system which uses a ball lens to focus the laser beam on the CE capillary. The detector employs an ellipsoid that is glued on the capillary window, to permit the collection of the fluorescence in the capillary. This 'trapped' fluorescence stays in the capillary because the angle of the silica/air interface is greater than the critical angle. The performance of this new detector setup is found to be identical to the collinear setup using the same ball lens. An application to the analysis of FITC-labeled IgG was optimized using a 14 cm effective length capillary. The LOD of an FITC-labeled IgG2 at an excitation wavelength of 488 nm was 150 pg/mL, which was 10 times better than the LOD recorded with slab gel silver staining. Using a tetramethylrhodamine (TAMRA)-labeled IgG2 and a 532 nm excitation wavelength the LOD is 50 pg/mL. The electropherograms of four different commercial FITC conjugates of IgG were studied. The presence of aggregates was observed in two samples while close kinetics of reduction was observed between free aggregates and high aggregates concentration samples. The integrated LIF detector provides an extremely powerful and convenient tool for antibody analysis and should be useful for therapeutic MAb control in pharmaceutical facilities.

### Keywords:

Capillary electrophoresis / Ellipsoid / Immunoglobulin G / Laser-induced fluorescence / Quality control  
 DOI 10.1002/elps.200700369

## 1 Introduction

LIF detection is the most sensitive and selective detection technique for CE. Over the years, at least five different optical setups have been described in the literature (for a review, see ref. [1]) and two commercial LIF detectors are presently available for CE. The Beckman Coulter LIF detector is a dual wavelength detector and is used on the Beckman's MDQ instrument. It works with a 488 nm (Ar<sup>+</sup> laser) and a 635 nm laser (diode laser) and the detection of the fluorescence is orthogonal to the plane of excitation. This plane is defined by the two optical fibres which illuminate the capillary by the two laser wavelengths. At the back of the capillary a mirror reflects the fluorescence to the photomultiplier tube (PMT).

**Correspondence:** Professor François Couderc, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Laboratoire des IMRCP, UMR5623, F-31062 Toulouse, France  
 E-mail: couderc@chimie.ups-tlse.fr  
 Fax: +33-05-61-55-81-55

**Abbreviations:** PMT, photomultiplier tube; TAMRA, tetramethylrhodamine

The PicoMetrics ZETALIF detector is a single excitation LIF detector, which is modular and can be used with all CE or HPLC instruments as it is external to the instrument. This detector is based on a confocal microscope setup, where a ball lens concentrates the laser light into the capillary [2]. The fluorescence is collected by the same ball lens which has a very high numerical aperture. The emission is then passed through a series of filters and the fluorescence is then measured by a PMT. The use of a 'ball lens' is very useful because it allows the use of a very stable excitation beam and the collection is better than without a ball lens using a simple microscope [2]. In addition, this setup can be easily used with UV lasers [3, 4]. In a previous review article, a number of different 'homemade' LIF detectors were described in detail [5]. The most sensitive LIF detector was an end-column detector described by Dovichi *et al.* [6]. Because of the design of the detector, it is quite difficult to adapt it for use in a commercial CE instrument.

An attempt to construct an 'integrated' detector was briefly reported some years ago by Wan *et al.* [7]. The authors used a conventional fluorescence detector for a capillary developed by Flux Instrument connected to a UV laser and this optical setup was patented by Carlsson [8]. The Argos

detector employed a large sapphire ellipsoid and was integrated into an Agilent CE cassette. The laser beam illuminates the capillary *via* an optic fibre positioned in front of the detection window of the capillary, while an ellipsoid is positioned on this window. A drop of glycerol allows the fluorescence to be kept in the capillary and the ellipsoid. There are two major problems with this setup; the alignment of the optic fibre with respect to the capillary to maximize the laser power inside the capillary and the evaporation of the glycerol. The use of this detector involves a number of very tedious steps, which makes its use quite tricky.

In this paper, we describe an ellipsoid setup of the optics that use a ball lens to focus the laser beam inside the capillary and an ellipsoid glued on the capillary to collect the fluorescence kept in the capillary [9]. This detector can be readily integrated inside the CE cassette or used externally. An application to FITC-labeled antibodies analysis will be presented.

## 2 Experimental

### 2.1 Material and methods

All chemicals and the FITC-labeled IgG were obtained from Sigma: IgG2A mouse–FITC conjugate (ref: F6522), FITC human IgG serum (ref: F9636), IgG–FITC from rabbit serum (ref: F2756), IgG1–FITC isotype control from murine myeloma (ref: F6397) and goat antimouse IgG 2 (ref: T2762). Tetramethylrhodamine (TAMRA) was obtained from Molecular Probes. Cy5 is from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

An Agilent CE instrument HP3DCE system (Waldbronn, Germany), equipped with a CE UV cassette was employed. The detector is screwed inside the cassette. Experiments were performed using a 488 nm argon ion (25 mW laser) (Spectra Physics, Mountain View, CA) and a 532 nm diode laser (25 mW) (CrystaLaser, Reno, USA).

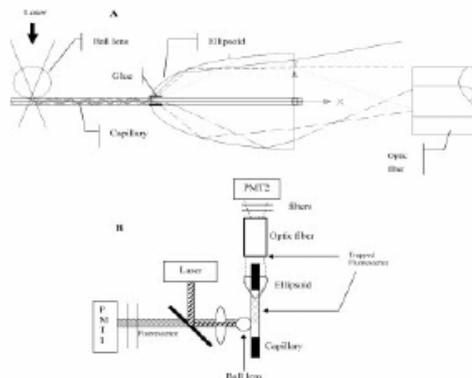
### 2.2 The ellipsoidal mirror

Figure 1A presents the reflections of the fluorescence in the capillary as a function of the critical angle  $\alpha_c$ . Using Snell's law (Eq. 1) a light ray will be reflected on an interface separating the two medium when  $\alpha_c = \arcsin(n_1/n_2)$  where  $n_1 < n_2$ .

$$n_1 \sin \alpha_1 = n_2 \sin \alpha_2 \quad (1)$$

In a fused-silica capillary, all the fluorescence rays having an incidence at the interface silica/air higher than are reflected and are 'trapped' in the capillary. An ellipsoid with an optical continuity between the silica and the ellipsoid is used to collect the fluorescence and to focus this fluorescence in a liquid light guide.

Figure 1B presents the setup of the various components in the newly integrated LIF detector.



**Figure 1.** Schematic of the ellipsoid 'in CE instrument' detector. (A) The fluorescence rays reflected at the interface silica/air. Plain line, critical angle  $49^\circ$ , dotted line  $52^\circ$ , large dotted line  $55^\circ$ , small dotted line  $65^\circ$ , alternate dotted and plain line  $80^\circ$ . The trapped fluorescence rays which can be collected by the ellipsoid are indicated. The glue is the optical continuity between the silica of the capillary and the PMMA of the ellipsoid. (B) Schematic of the detector showing the two PMTs; PMT1 detects the fluorescence emitted collinearly, while PMT2 detects the trapped fluorescence in this side of the capillary prior to the ball lens. The capillary is bent after the ellipsoid and then goes to the cathode vial.

The components of the detector include a fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with a 12 mm window, a silica ball lens (2 mm diameter), a liquid light guide (2 mm inner diameter (id)) and a laser beam (488 nm Ar<sup>+</sup> laser, or 532 nm diode laser). The trapped fluorescence in the capillary diffuses in the glue and then in the ellipsoidal mirror (customized).

The equation of the ellipsoidal mirror is shown below

$$(x/a)^2 + (y/b)^2 = 1 \text{ with } a^2 = c^2 + b^2 \quad (2)$$

where  $x$  is the axis of the capillary and  $y$  and  $z$  the axis orthogonal to  $x$ ,  $a$  the half length of the large axis (along  $x$ ),  $b$  the half medium axis and  $c$  the half distance between the two focal points of the ellipsoid.

In this design  $b = 3$  mm,  $c = 7$  mm and the inner diameter of the ellipsoidal mirror is 0.7 mm. The ellipsoidal mirror and its capillary were fixed in a customized support allowing us to align the ellipsoidal mirror and the liquid light guide. The position of the ellipsoidal mirror and the ball lens was optimized. The collinear setup is identical to the one presented elsewhere [2].

### 2.3 Comparative study of ball lens and ellipsoid setup

A 10 and 1 pM FITC solutions were prepared in water and separated by hydrodynamic injection for 30 s (50 mbar) with using a capillary length of 65 cm (effective length 50 cm) and

75  $\mu\text{m}$  id. The migration buffer was 25 mM sodium carbonate buffer. The LODs of the ellipsoid setup were determined using a 33 cm capillary (75  $\mu\text{m}$  id) with a 14 cm effective length and hydrodynamic injections at 50 mbar for 5 s.

#### 2.4 Separation of labeled IgG2

Fused-silica capillaries (50  $\mu\text{m}$  id) (Polymicro Technologies), with 33 cm total length and 14 cm effective length were used. The buffer was the CE-SDS buffer from Beckman. The capillary is washed with the CE-SDS buffer 15 min prior to the analysis, then we inject water for 0.2 min at 1000 mbars to get a homogenate stacking [10] and the sample is electrokinetically injected for 25 s at  $-15$  kV. The separation was run at  $-20$  kV. The sample is diluted in an LiDS solution. For reduced IgG–FITC complexes, 100  $\mu\text{L}$  of antibody dye at 200 ng/mL in LiDS was mixed with 3  $\mu\text{L}$  of 2-mercaptoethanol. Reduced samples were heated at  $70^\circ\text{C}$  in a sand bath for 10 min. The kinetic study was obtained using different heating times at  $70^\circ\text{C}$ .

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Detector optimization

Figure 1A shows the optical rays in the capillary and the ellipsoidal mirror. The red ray is drawn for the critical angle capillary/air ( $49^\circ$ ), the refractive index of silica ( $n_s$ ) is 1.33 (488 nm), while the refractive index of air ( $n_a$ ) is approximately 1. This ray is reflected several times in the capillary and because the refractive index of the glue and the ellipsoid ( $n_e = 1.50$ ) are both above the refractive index of silica, the ray crosses the silica/glue/ellipsoid interface and the ray at the output of the ellipsoidal mirror is diverging. The same drawing is done with two rays above the critical angle, which is reflected on the interface silica/air of the capillary  $52^\circ$

(dotted line) and  $55^\circ$  (large dotted line). We note that with a very small difference in the angle ( $3^\circ$ ), the green ray at the output of the ellipsoid is nearly parallel to the capillary axis and will not be collected by the optic fiber, while at  $55^\circ$  on incidence the ray can be collected by the optic fiber. Two other angles of incidence were drawn:  $60^\circ$  and  $80^\circ$ . All are converging in the same direction, leaving them to be collected by the liquid core light guide. This means that the distance between the ball lens and the ellipsoid and the one between the ellipsoid and the optic fibre will be a critical issue. There will be a competition between the fluorescence and the noise due to laser beam diffusion inside the capillary. The collection of the converging light will depend on the second distance, so we studied the influence of these distances on the S/N ratio. A  $10^{-12}$  M fluorescein solution was injected and we varied the distance between the ellipsoid and the ball lens and the distance between the ellipsoid and the optic fibre and measured the S/N. The results from these experiments are presented in Fig. 2. It can be seen that as the distance is made smaller, the S/N value will increase. The thickness of the holder of the ellipsoid prevented us to get smaller distances between the ellipsoid and the optic fibre.

#### 3.2 Comparing the collinear ball lens setup and the ball lens-ellipsoidal setup

We used the two setups in the detector with a capillary of 75  $\mu\text{m}$  id and a length of 65 cm (effective length 40 cm) and hydrodynamically injected (30 s, 50 mbar) different concentrations of FITC for the measurement of the differences in S/N between the two detectors. With the 10 pM FITC concentration, the collinear setup provides an S/N of 32 for FITC, while it is 30 for the ellipsoid setup. In the case of the collinear setup, the EOF results in a negative peak at 3.2 min while there is a much weaker signal for EOF in the ellipsoid

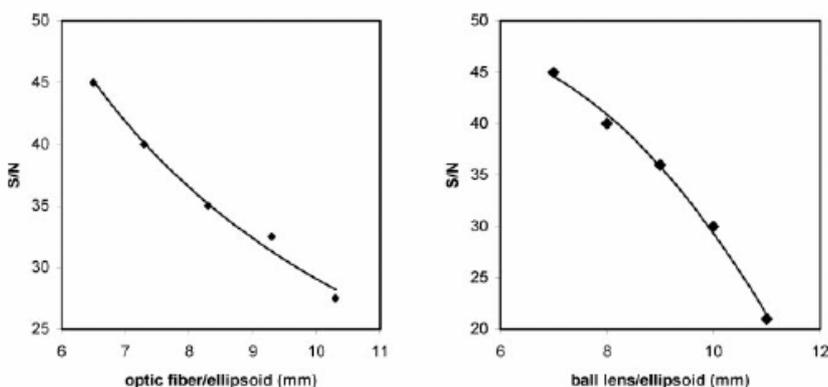
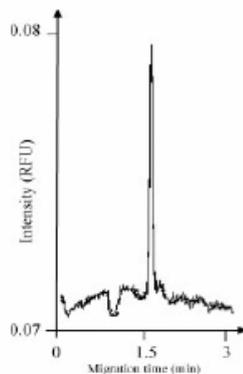


Figure 2. Variation of the S/N as a function of the distance of the ellipsoid to the ball lens used for excitation (right) or the distance between the ellipsoid and the optic fibre used for the collection of emission.

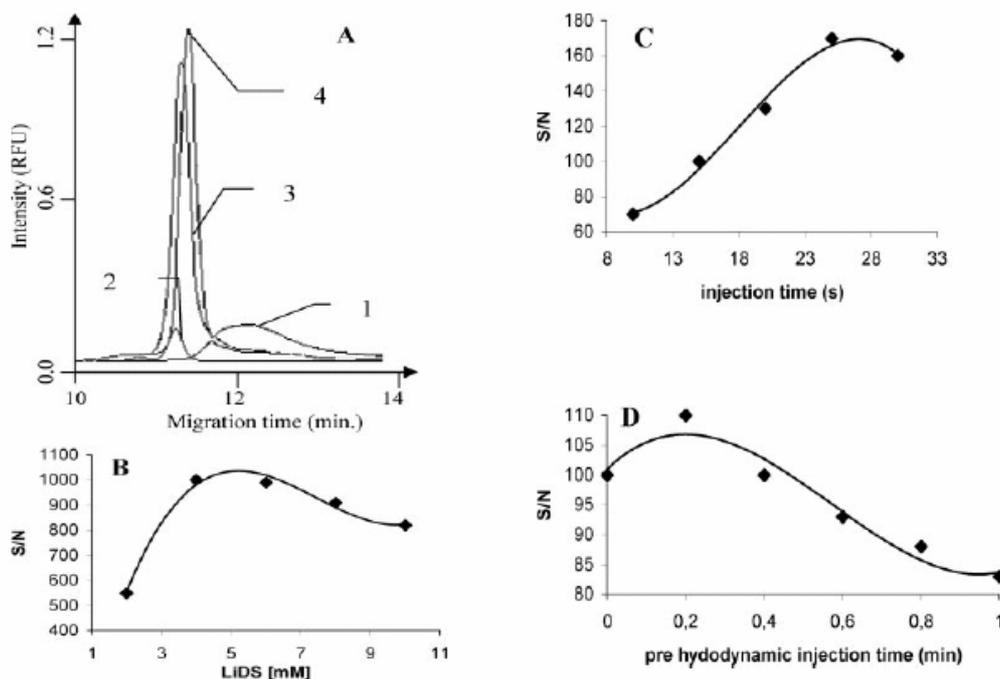
## Annexe 3 : Publication 2 (4/7)

detector. Both detectors indicate a FITC peak at 5.1 min and the LOD of the FITC was calculated to be 1 pM (for  $S/N = 3$ ).

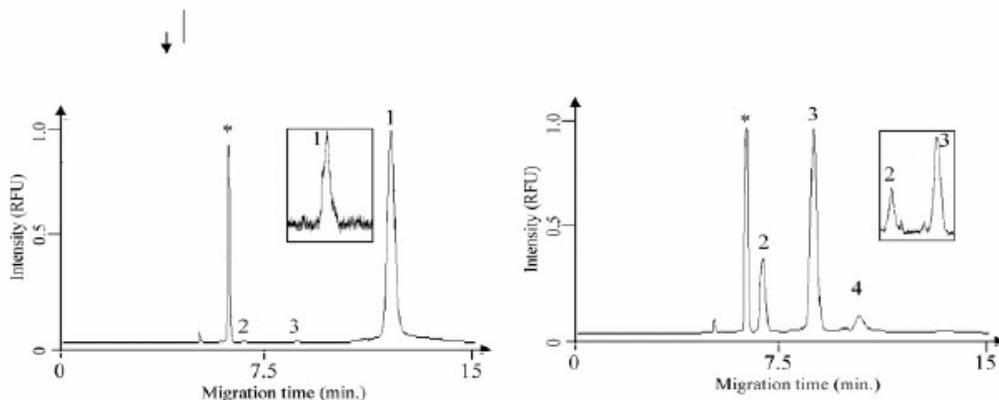
We also measured the LOD of different dyes at their appropriate different laser wavelengths. The LODs that are obtained are identical for both detection setups. When we used an HeCd laser at 325 nm, umbelliferone was detected at 100 pM ( $S/N = 3$ ), identical results were obtained for 7-hydroxycoumarin-3-carboxylic acid at 410 nm (diode laser), while FITC has the best LOD at 1 pM (488 nm Ar ion laser) and for Cy5 using an HeNe laser (LOD of 310 pM). This indicates both setups are identical with respect to the sensitivity. We then adjusted the ellipsoidal detector in the CE cassette so that a shorter effective length was employed (14 cm), with a total capillary length of 33 cm. Figure 3 presents an electropherogram of a 10 pM solution of FITC (injection time 5 s, 50 mbar); the migration times are 3.5 times smaller than with the collinear detector with the same electric field, the  $S/N$  ratio is 20. The calculated LOD ( $S/N = 3$ ) is 1.5 pM, lower than the previous one because the injected sample volume is bigger.



**Figure 3.** Analysis of 1 pM of FITC (in pure water) with a capillary of 33 cm total length and 14 cm effective length,  $S/N = 20$ . Carbonate/bicarbonate buffer 25 mM, +10 kV, injection 5 s, 50 mbar (66 nL).



**Figure 4.** Influence of different parameters on the sensitivity of FITC-IgG2, 100 ng/mL. (A) Sample dilution medium (1) diluted in water, (2) diluted in separation buffer (CE-SDS Beckman nongel sieving medium), (3) in 6 mM SDS, (4) in 6 mM LIDS. Injection: hydrodynamic 0.2 min water (1000 mbar) then electrokinetic –15 kV, 25 s. Capillary id 50  $\mu$ m, 33 cm total length, effective length 14 cm. Separation –20 kV, (B) different LIDS concentration of sample dilution (identical separation conditions), (C) the electrokinetic injection time using 6 mM LIDS diluted sample and a 0.2 min water plug water injection, same separation conditions as in (A), (D) the influence of injection time of water plug electrokinetic injection –15 kV, 15 s. Same separation conditions as in (A).



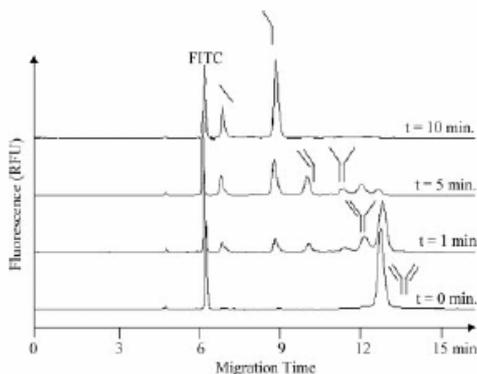
**Figure 5.** Separation using NGSCE/LIF of FITC-labelled IgG2, 12 s water prehydrodynamic injection,  $-25$  kV electrokinetic injection of mouse IgG2 100 ng/mL diluted in 6 mM LiDS, same separation conditions as in Fig. 4A (4). (A) Unreduced sample, (B) reduced sample, running buffer Beckman Coulter nongel sieving media, capillary  $50\ \mu\text{m}$  id, total length 33 cm, effective length 14 cm,  $-20$  kV. Inset shows a 0.25 and 1 ng/mL of unreduced and reduced IgG2 sample. \* Is the FITC, 1 is the antibody, 2 is the light chain, 3 is the heavy chain, 4 is the unreduced adduct of one heavy and one light chain. In (A) small amounts of 2 and 3 are detected.

### 3.3 Application to the separation of antibodies

The goal of this work was to develop a method with a short migration time using a short capillary to obtain an LOD below that obtained with slab gel silver staining, thereby making CE/LIF usable for the study of the purity of produced antibodies. Hunt and Nashabeh [10] explained that the quality control of recombinant antibody can be studied *via* CE/LIF provided that the sensitivity of detection leads to an LOD below 10 ng/mL which is comparable to the LOD of silver staining of conventional SDS-PAGE. For the migration media, we chose to use the SDS nongel sieving (SDS-NGS) media from Beckman Coulter. The first injection is a hydrodynamic injection (12 s, 1000 mbar) of water, which is followed by an electrokinetic injection of the diluted sample (25 s at  $-15$  kV). We first compared different injection sample media where the IgG2 is diluted (*i.e.* water, SDS-NGS buffer, 1–6 mM SDS, 1–6 mM LiDS). Figure 4A shows the peak heights of the obtained electropherograms of the unreduced IgG2; the data indicate that LiDS is a better dilution medium and results in the best sensitivity. In these injections the coefficients of variation are below 4.5%. We then optimized the concentration of LiDS (Fig. 4B), the injection time (Fig. 4C) and the water preinjection (Fig. 4D). It appears that the best set of conditions involve a 12 s plug of water injection, with an IgG2 sample diluted in 6 mM LiDS, at  $-25$  kV.

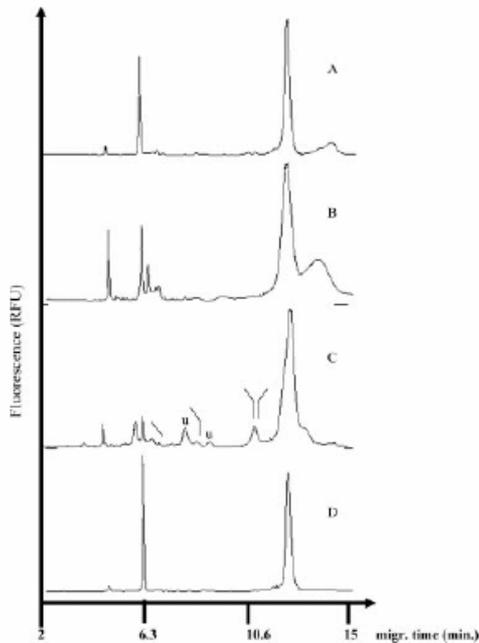
The LOD of the unreduced sample using the optimal conditions is calculated to be 0.15 ng/mL while the LOD of the reduced sample is 0.4 ng/mL ( $S/N = 3$ ). Figure 5 presents the analysis of an unreduced IgG2 (100 ng/mL), while the figure insets present the electropherograms for

the unreduced and reduced IgG2 at concentrations of 0.25 and 1.0 ng/mL, respectively. The CV for the migration time was 0.15% ( $n = 6$ ) and for the area was 1.6 % ( $n = 6$ ) using a temperature controlled sample tray sample ( $25^\circ\text{C}$ ). Using the same analysis conditions, a TAMRA-labeled IgG2 and a 532 nm excitation wavelength, the LOD of the unreduced form is 50 pg/mL, this difference could be due to the fact that the fluorescein does not optimally fluoresce at a pH below 9.6, while TAMRA is not pH sensitive at the pH where our experiments are run (pH 8.7).



**Figure 6.** Separation of  $100\ \mu\text{L}$  of IgG2A mouse FITC conjugate (200 ng/mL) added with  $3\ \mu\text{L}$  of mercaptoethanol heated at  $70^\circ\text{C}$  and immediately injected in CE/LIF after 0, 1, 5 and 10 min of reduction time. Separation conditions are identical to Fig. 4.

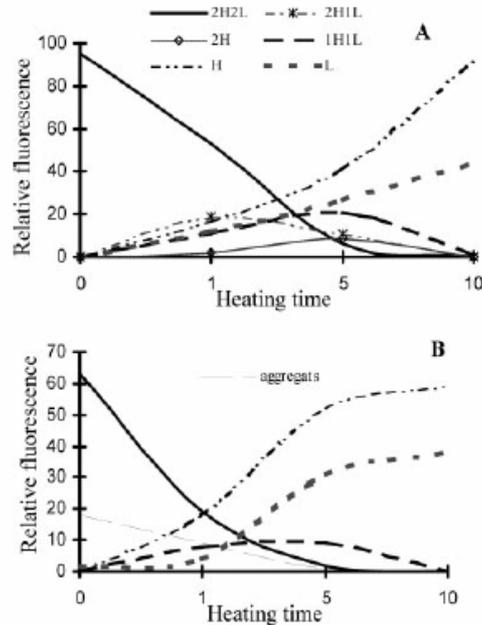
## Annexe 3 : Publication 2 (6/7)



**Figure 7.** Separation of different commercial FITC-labeled IgG (200 ng/mL) samples using the same separation conditions as in Fig. 5 with electrokinetic injection time 15 s. (A) IgG1-FITC isotype control from murine myeloma, (B) IgG-FITC from rabbit serum, (C) FITC human IgG serum, (D) IgG2A mouse FITC conjugate.

### 3.4 Comparison of labeled IgG2

By comparing the migration profile obtained by Hunt and Nashabeh and our work, we were able to identify the different complexes obtained after reduction of the IgG. In addition, we were able to confirm the species responsible for the various peaks that had a shorter migration time than unreduced IgG (2:slight/2:heavy chains), the slight chain, the heavy chain, the complex (1:slight/1:heavy chain), the complex (2:heavy chains) and the complex (2:heavy/1:slight chains) as shown in Fig. 6. The work was performed using an IgG2A mouse FITC conjugate to which we added 3  $\mu$ L of  $\beta$ -mercaptoethanol to a 100  $\mu$ L IgG solution, and heated the mixture at 70°C for 1, 5 and 10 min. In Fig. 7, we present the separation in the unreduced form of four commercially available FITC-IgG samples at 200 ng/mL. At migration times greater than that for the IgG migrated multimers and aggregates, they disappear when the molecule is reduced by  $\beta$ -mercaptoethanol (data not shown). These aggregates are important to detect in IgG control because they generally



**Figure 8.** Kinetic plots of reduction of two IgG at 200 ng/mL obtained as presented in Fig. 6 with electrokinetic injection time 15 s. (A) IgG2A mouse FITC conjugate, (B) IgG-FITC from rabbit serum.

have reduced activity and more importantly, greater immunogenicity potential because of the multiplicity of epitopes and/or conformational changes [11].

The migration profiles of the unreduced IgG are very different. We note that the IgG-FITC from rabbit serum migrates differently than the others, since a large amount of aggregates is present (at the same concentration as the others). The FITC-labeled human IgG serum (Fig. 7C) is not pure, as the electropherogram exhibits some of partially denaturated antibody ((L, H and 2H) were identified thanks to migration time) and other compounds (u) which could be identified. The IgG2A mouse-FITC conjugate sample is particularly well purified (Fig. 7D), while IgG1-FITC isotype control from murine myeloma has some aggregates and small peaks of unidentified amines or FITC impurities (Fig. 7A).

Although the kinetics of reduction is practically as rapid for the IgG2A mouse FITC conjugate (which has no aggregates) and the IgG-FITC from rabbit serum (which has a large quantity of aggregates), the kinetic plots are quite different. It seems that aggregates are rapidly denaturated in heavy and light chains; when the aggregates disappear, the concentration of H and L

## Annexe 3 : Publication 2 (7/7)

746 A. Rodat *et al.*

*Electrophoresis* 2008, 29, 740–746

increase slowly. We see that all the aggregates disappeared by following the kinetics of reduction of disulfide bridges (Fig. 8).

### 4 Concluding remarks

We developed an integrated LIF detector, using a ball lens to focus the light on the capillary where the fluorescence is collected thanks to a glued ellipsoid. The design allowed us to collect the fluorescence which is restricted to in the capillary because the angles at the interface silica/air of a capillary used for CE were higher than the critical angle. The performance of the new detector setup was identical to the more conventional collinear setup using a ball lens. The CE-LIF system was employed for the analysis of FITC-labeled IgG which demonstrated that the different reduction products could be readily separated, and were observed after IgG. One of the labeled IgG2 samples had a large amount of aggregates which were reduced as quickly as the IgG2 sample. Our experiments demonstrated that the LOD of the TAMRA-labelled IgG2 is 20 times better than the one previously reported in the literature [10].

*The authors have declared no conflict of interest.*

### 5 References

- [1] Bayle, C., Poinot, V., Fournier-Noel, C., Couderc, F., in: Pyell, U. (Ed.), *Electrokinetic Chromatography, Theory Instrumentation and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2006, 263–280.
- [2] Nouadje, G., Nertz, M., Verdeguer, Ph., Couderc, F., *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 335–341.
- [3] Benturquia, N., Couderc, F., Sauvinet, V., Orset, C. *et al.*, *Electrophoresis* 2005, 26, 1071–1079.
- [4] Bayle, C., Siri, N., Poinot, V., Treilhou, M. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 123–130.
- [5] Nouadje, G., Simeon, N., Nertz, M., Couderc, F., *Analisis* 1996, 24, 360–370.
- [6] Dovichi, N. J., Martin, J. C., Jett, J. H., Trkula, M., Keller, R. A., *Anal. Chem.* 1984, 56, 348–354.
- [7] Wan, H., Schmidt, S., Carlsson, L., Blomberg, L. G., *Electrophoresis* 1999, 20, 2705–2714.
- [8] Carlsson, L., *US patent 5895920*, patent device for detecting light fluorescence, 1997.
- [9] Nertz, M., Couderc, F., Dispositif d'analyse par fluorescence induite par laser et appareil de séparation avec un tel dispositif PCT/FR 02/02611, 2002.
- [10] Hunt, G., Nashabeh, W., *Anal. Chem.* 1999, 71, 2390–2397.
- [11] Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., Nema, S., *J. Pharm. Sci.* 2007, 96, 1–26.

# Improving detection in capillary electrophoresis with laser induced fluorescence via a bubble cell capillary and laser power adjustment

Audrey Rodat,<sup>a,b</sup> Pierre Gavard<sup>a</sup> and François Couderc<sup>a\*</sup>

**ABSTRACT:** Bubble cells have been frequently employed in capillary electrophoresis (CE) to increase the light path length with UV detection to provide an increase in the observed sensitivity of CE; however this approach has not been commonly used for laser-induced fluorescence detection (LIF) with CE. In this paper we study the influence of laser power on the sensitivity of detection in using conventional and enlarged fused silica capillaries for CE with LIF. When using the bubble cell capillary, the laser power must be decreased relative to use of the conventional capillary to reduce the effects of photodegradation of the species being illuminated by the laser. Even though the light intensity was decreased, an increase in sensitivity of detection was observed for most compounds when a bubble cell was used. This increase ranged from a factor of 8 for riboflavin (410 nm excitation) to 3.2 for most aromatic compounds (266 nm excitation), when using a 3× bubble cell compared with a conventional capillary. The bubble cell capillary was used for native detection of IgG by LIF at 266 nm. A limit of detection of 60 ng mL<sup>-1</sup> was obtained from a 20 pg injection, which was 40 times more sensitive than silver staining in conventional SDS/PAGE. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** capillary electrophoresis; laser-induced fluorescence; protein; antibody; beta blocker; bubble cell

## Introduction

When capillary electrophoresis (CE) is employed for the detection of compounds of biological or pharmaceutical interest, optimization of the sensitivity is frequently a critical issue. A variety of approaches have been used, including stacking (Malá *et al.*, 2007; Siri *et al.*, 2003) and sweeping (Pyell, 2001) to virtually increase the concentration of the sample. Laser-induced fluorescence (LIF) is a powerful tool which has been widely employed by a number of workers (Johnson and Landers, 2004; Lacroix *et al.*, 2005) to increase the sensitivity. Many modifications of the capillary (which acts as the detection cell) have been described to optimize the sensitivity. A typical approach is the use of a Z-shaped cell for UV detection to increase the path length of the detector (Mrestani and Neubert, 1998). Some years ago, Xue and Yeung (1994) described a bubble cell (BC) which was used to increase the sensitivity of detection in CE using UV absorbance detection. Masukawa (2006) used a bubble cell capillary for the analysis of hair care products analysis via CE/UV, and Law *et al.* (2005) proposed a similar BC for the CE/UV detection of proteins.

While LIF detection increases the sensitivity of the detection of compounds that possess native fluorescence (Siméon *et al.*, 1999) and labelled compounds (Bayle *et al.*, 2002), it is likely that a bubble cell will further increase the sensitivity. This increase should be especially useful when samples with a low concentration of the analyte are monitored or when a pulsed laser is used (Bayle *et al.*, 2003). In this regard, Cole *et al.* (1996) described the use of extended light path capillaries for CE and laser-induced fluorescence (LIF) detection and demonstrated that the bubble cell allowed for easier focusing of the laser beam in front of the

capillary and better collection of the fluorescence. These workers found that the sensitivity obtained for dansyl-phenylalanine detected using a 325 nm HeCd laser was increased by a factor of 6.7 with a 150 µm expansion region. The increase of sensitivity of detection is due to the larger cell region (×3) and to the differences in curvature of the outer and inner surfaces of the capillaries. The detection of fluorescein using a 488 nm Ar ion laser resulted in an increase of sensitivity by a factor of 4.2 using a BC. Frost *et al.* (1997) described the use of such extended path length cell for β-lysergic acid diethylamide (LSD) in blood; these workers used a 325 nm HeCd laser and observed an increase of 2–3-fold in sensitivity compared with a standard capillary when the path length was increased by a factor of 3. Recently, Hapuarachchi *et al.* (2006) used LIF detection with a BC capillary and a UV light emitting diode (365 nm) to detect polyaromatic hydrocarbons and amines labelled with *o*-phthalaldehyde and found similar sensitivity when using a LED and the BC capillary or a conventional capillary and a classical laser. Ibrahim *et al.* (2007) used a BC capillary with capillary LC and found an increase of sensitivity of a factor of 2 for vitamin B6 and a factor of 3.5 for quinine using the same analytical conditions. In this

\* Correspondence to: F. Couderc, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Laboratoire des IMRCP, UMR 5623, 31062 Toulouse Cedex, France. E-mail: couderc@chimie.ups-tlse.fr

<sup>a</sup> Laboratoire des IMRCP, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse, Cedex, France

<sup>b</sup> Picometrics, 99 Route d'Espagne, 31100 Toulouse, France

paper we will study the advantages of using a BC capillary with different fluorophores and describe the influence of the laser power on the sensitivity with a BC capillary. We will also demonstrate that the use of a bubble cell in CE-LIF can dramatically enhance sensitivity over a broad range of excitation wavelengths between 266 and 488 nm.

## Material and Methods

### Material and Reagents

All chemicals, including fluorescein–isothiocyanate (FITC),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), homovanillic acid, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, hydroxymethoxymandelic acid, IgG2 lambda from human plasma, lithium dodecylsulfate (LIDS), riboflavin, tryptophan, tyrosine, naphthalene-2,3-dialdehyde (NDA) and 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid, were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Capillaries were obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AR) while HP3DCE and bubble cell capillaries were purchased from Agilent Technologies (Waldbron, Germany). LIF detectors were from Picometrics (Toulouse, France).

Experiments were performed using a 266 nm pulsed diode laser (6 mW; Team Photonics, Meylan, France), a 410 nm continuous diode laser (20 mW; Oxxus, Lannion, France) and a 488 nm Argon ion laser (25 mW; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA).

### Comparative Sensitivity Study of the Conventional Capillary Vis-à-vis the Bubble Cell

Comparative sensitivity studies were performed using 50  $\mu\text{m}$  i.d. fused silica capillaries (Polymicro Technologies) and 150  $\mu\text{m}$  i.d. bubble cell/50  $\mu\text{m}$  i.d. fused silica capillaries (Agilent Technologies), both with a total length of 65 cm and an effective length of 50 cm.

A 1  $\mu\text{M}$  solution of tryptophan was injected into the CE system for 10 s at 50 mbar and was then eluted with a 20 mM sodium phosphate tribasic buffer at 15 kV. A 10 nM solution of GABA labelled with NDA was injected for 10 s at 50 mbar and then eluted with 7.5 mM  $\text{LiB}_3\text{O}_5$  buffer at a potential of 20 kV. A 10  $\mu\text{M}$  solution of FITC was hydrodynamically injected for 30 s at 50 mbar and then eluted with 10 mM carbonate/bicarbonate buffer at 20 kV. Different beta blockers (acetobutolol, atenolol, metoprolol,

nadolol and propranolol) were hydrodynamically injected for 12 s at 40 mbars and separated with 25 mM phosphate–Tris buffer (pH = 2.5) at 30 kV.

### Comparative Separation Study of Conventional Capillary and Bubble Cell

A 75  $\mu\text{m}$  i.d. fused silica capillary (Polymicro Technologies) and a 225  $\mu\text{m}$  i.d. bubble cell (Agilent Technologies) with 65 cm total length and 50 cm effective length were used for the separation of five aromatic compounds (tryptophan, tyrosine, 5-hydroxyindole-3-acetic acid, homovanillic acid and hydroxymethoxymandelic acid), which were injected for 10 s at 50 mbar using a 10 mM CAPS–15 mM sodium tetraborate buffer (pH 9.2). The separation was run at 15 kV.

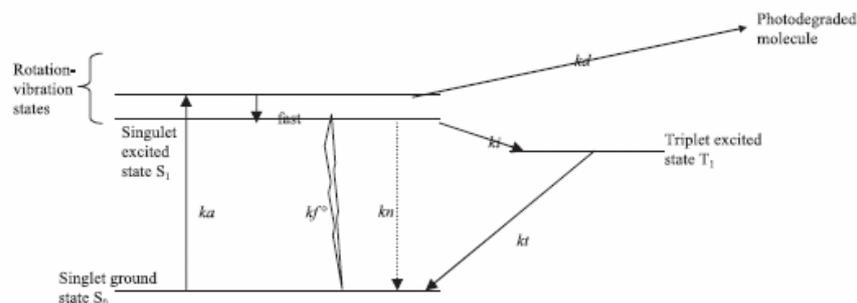
### Analysis of Antibody Native Fluorescence

A 50  $\mu\text{m}$  i.d. fused silica capillary (Polymicro Technologies) and a 150  $\mu\text{m}$  i.d. bubble cell 50  $\mu\text{m}$  i.d. fused silica capillary (Agilent Technologies) with 60 cm total length and 45 cm effective length were used. The sample was diluted in 6 mM of lithium dodecylsulfate solution (LIDS), injected for 60 s at  $-10$  kV and eluted with a CE-SDS buffer from Beckman at a potential of  $-30$  kV.

## Results and Discussion

### Theory

The overall kinetic scheme of electronic excitation and deactivation of the excited state, showing the different electronic states of a molecule and the different reactions that can occur after excitation (without photodegradation), is presented in Fig. 1. It is important to note that the high incident light intensity of the laser (photons  $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) may result in photochemical reactions of the fluorescing compounds; this photobleaching may convert them into a non-fluorescent compound which decreases the fluorescence intensity and the sensitivity. A number of publications have described the theoretical aspects of LIF detection; two especially useful ones are Mathies *et al.* (1990) and Van den Beld (1991). These workers demonstrated that the sensitivity of fluorescence detection depends on a number of factors including, (i) the rate of photodegradation of the molecule that absorbs at



**Figure 1.** Kinetic scheme showing the ground singlet state  $S_0$ , the first excited singlet state  $S_1$ , and the triplet state  $T_1$  of a molecule;  $k_a$  is the rate of absorption,  $k_f$  is the natural radiative rate,  $k_n$  is the radiationless decay rate,  $k_i$  is the intersystem crossing rate,  $k_t$  is the overall triplet decay rate and  $k_d$  is the rate of photodegradation rate. It is assumed that relaxation from the optically pumped vibronic levels to the emitting levels is very rapid compared with the pumping rate  $k_a$ .

the laser wavelength, (ii) the transit time of the molecule in the laser beam and (iii) the incident light intensity (photons  $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

Van de Beld (1991) indicates that the fluorescence intensity in CE can be calculated using equation (1):

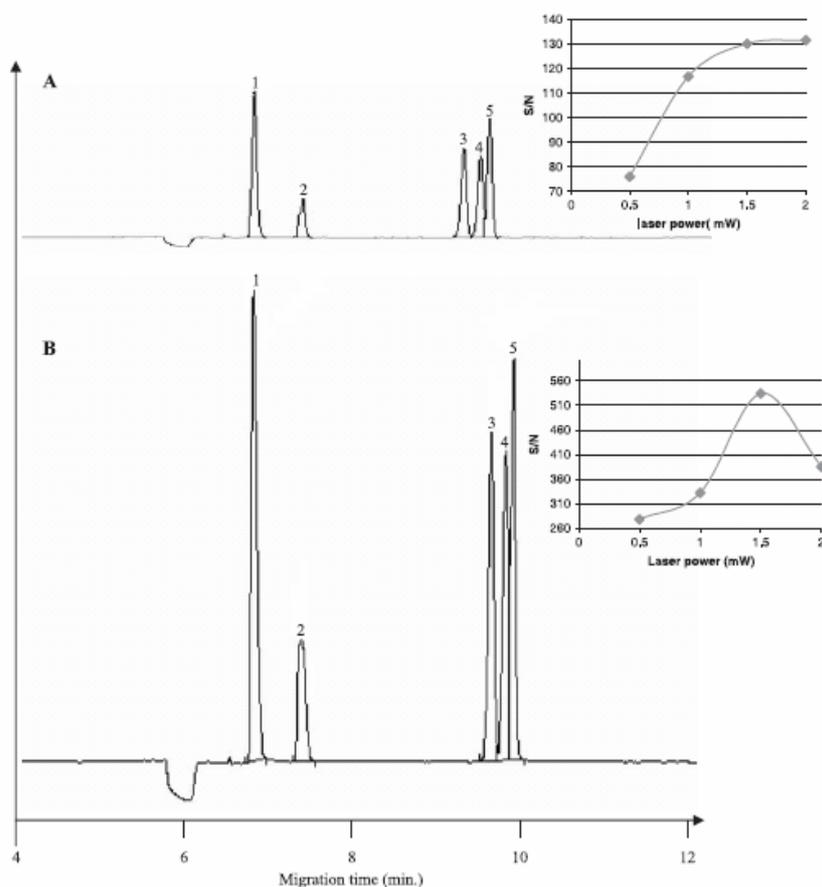
$$F = 2.3 \varepsilon \phi C' (d_c^2 / 2r_l) [\pi v_f r_l / 2k_d] [1 - \exp(-\sigma)] \quad (1)$$

where  $C'$  is the concentration of the fluorophore injected in the capillary in a conventional capillary where there is an electroosmotic flow;  $d_c$  is the internal diameter of the capillary;  $r_l$  is the radius of the laser at the beam waist ( $e^{-2}$  irradiance);  $\sigma$  is defined as the reduced laser power  $\sigma = 2k_d P / \pi v_f r_l$ , where  $P$  is the laser light power;  $\varepsilon$  is the coefficient of molar extinction of the fluorophore;  $\phi$  is the quantum yield of the fluorophore;  $r_l$  is the laser beam radius (lower than capillary radius); and  $k_d$  is the constant of photodegradation rate of the fluorescent molecule.

This expression can be used to describe the intensity of a fluorescent compound with respect to the power of the laser or the square of the diameter of a capillary. The noise is proportional to the laser power (Bayle *et al.*, 2006) and also depends on the migration velocity of the molecules.

#### Influence of the Laser Power on the Signal-to-noise Ratio

The signal-to-noise ratio of the fluorescence of several compounds injected into the CE system was determined using a variety of lasers. The fluorescence of tryptophan (Trp), GABA labelled by NDA and FITC was studied using a 266 nm pulsed diode laser, a 410 nm continuous diode laser and a 488 nm Ar ion laser, respectively. The optimum laser power was always lower using the bubble cell than with the conventional capillary. Figure 2 presents the results obtained at the 266 nm wavelength for a



**Figure 2.** Separation of Trp (1), Tyr (2), 5-hydroxyindole-3-acetic acid (3), homovanillic acid (4) and hydroxymethoxymandelic acid (5), using CE/UV-LIF (266 nm) with (A) a conventional capillary 75  $\mu\text{m}$ , (B) a bubble capillary  $\times 3$ , 75  $\mu\text{m}$  i.d. Agilent Technologies. Both capillaries have a total length of 60 cm, effective length 45 cm. Buffer: CAPS 10 mM, sodium tetraborate 15 mM, pH = 9.2, injection 10 s at 50 mbar, separation voltage 15 kV. Insets: variation of S/N of Trp (1  $\mu\text{M}$ ) following laser power.

normal capillary and a bubble cell. The insets present the variation for each capillary of the S/N following the laser power of the 266 nm laser (obtained when adding neutral density filters at the output of the laser). For the normal capillaries we obtained a curve where the S/N increased when the power increased and then stayed relatively constant or decreased slowly. For bubble capillaries, the decrease of the S/N after the optimum is much more significant. This optimum is different for the various wavelengths and molecules and in the following experiments we will use the laser power where S/N is optimum for each compound.

#### Influence of the Bubble Cell on the Sensitivity

The limits of detection for different compounds using the bubble cell compared with the conventional capillary are presented in Table 1. It is clear that the increment in intensity that is obtained from the use of the bubble cell is very dependent on the compound and the laser. We compared the obtained optimum fluorescence at the optimum laser wavelength; for example, a small increase (approximately  $\times 1.3$ ) was obtained for NDA labelled GABA (410 nm) while a significantly larger increase was obtained with riboflavin (a seven fold increase). If we used the bubble cell capillary with a power of 20 mW instead of 4 mW, the fluorescence of the NDA-GABA derivative decreased by a factor of 2, suggesting that the compound is quickly photodegraded in the bubble cell with the more powerful laser. Even with a 4 mW laser, 7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid was photodegraded and a decrease in sensitivity of a factor of 2 was observed.

When the 266 nm laser was used, a significant increment of a factor of 3.2 was observed for tryptophan and the fluorescence of various beta blockers (acetobutolol, atenolol, metoprolol, nadolol and propranolol) also increased. For propranolol, the sensitivity was increased by a factor of 3.7 and the sensitivity for atenolol, metoprolol and nadolol was increased by a factor of 5.

It should be noted that there is a broad range of detection limits for the compounds of interest (e.g. the LOD is 40 nM for metoprolol and 20  $\mu$ M for propranolol) and CE/UV-LIF may not be sensitive enough for pharmaceutical analysis.

A non-linear calibration curve at micromolar concentration was obtained for tryptophan at 266 nm excitation using the full power of the laser and the BC. This is probably because of photobleaching of the amino acid due to its exposure time in the

path of the laser, and if a linear calibration curve is required at such a concentration, the intensity of the laser should be reduced.

#### Influence of the Bubble on the Separation

Xue and Yeung (1990) showed that the separation in CE can be negatively affected using a bubble cell, because the irregular inner diameter of the capillary causes an irregular electroosmotic flow, which induces band broadening. These authors use a bubble cell made from a 33  $\mu$ m i.d. capillary with 15  $\times$  diameter expansion. With this bubble cell, the peak is about 3 times broader. We chose to analyse aromatic compounds with 266 nm UV-LIF detection, because with this pulsed laser wavelength the sensitivity is especially important. We used a bubble cell from Agilent which only has a magnified zone of 3. Table 2 and Fig. 2 present the variations of the number of theoretical plates (*N*), which reflects the band broadening variations between the two analyses; in addition, the resolution between the different neighbour peaks is also presented. In this figure we see that the resolution (*R*) between peak 3–4 and 4–5 is lower in the BC than in the conventional capillary (CC).  $RBC\ 3-4 = 1.2 \pm 0.1$ ;  $RBC\ 4-5 = 0.6 \pm 0.1$ ;  $RCC\ 3-4 = 1.6 \pm 0.1$ ;  $RCC\ 4-5 = 0.9 \pm 0.1$ .

In Table 2, we note that if *N* decreases as much as 47%, but remains above 70,000, the resolution is affected by less than 11.5% while the sensitivity is increased by a factor between 2.6 and 3.7 for the chosen compounds. The data also shows that a bubble cell can be helpful when studying peptides or proteins containing Tyr or Trp and where better sensitivity than conventional UV absorption at 214 nm is needed.

#### Monitoring the Native Fluorescence of Antibodies

CE/LIF is more and more used for the study of proteins (Lacroix *et al.*, 2005). Most analysis for antibody purity are performed by labelling the antibody and then monitoring the labelled antibody with CE using LIF (Hunt and Nashabeh, 1999; Rodat *et al.*, 2008; Michels *et al.*, 2007) in the visible region. These methods are ideal to determine impurities at low concentration, but necessitate the use of chemical derivatization and often require a separation of the unreacted dye prior to the separation. In addition, the dye-protein ratio affects the number of molecules

**Table 1.** Determination of the optimum laser power required to obtain the best sensitivity using a bubble cell capillary for different fluorescent compounds

Molecule	Laser wavelength (nm)	Optimum laser power (mW) (bubble cell)	Ratio S/N bubble capillary/normal capillary
FITC	488	24	$\times 2.0$
7-Hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid	410	Undetermined < 4 mW	$\times 2.0$
Riboflavin	410	4	$\times 7.0$
NDA-GABA	410	4	$\times 1.3$
Acetobutolol	266	1.5	$\times 4.0$
Atenolol	266	1.5	$\times 5.0$
Metoprolol	266	1.5	$\times 4.8$
Propranolol	266	1.5	$\times 4.9$
Nadolol	266	1.5	$\times 3.7$
Trp	266	1.5	$\times 3.2$

**Table 2.** Migration times, resolution, theoretical plate number and signal to noise ratio of a separation of Trp, Tyr, 5-hydroxyindole-3-acetic acid (HIAA), homovanillic acid (HVA) and hydroxymethoxymandelic acid (5), using a conventional capillary (75  $\mu\text{m}$  i.d.) and a bubble cell capillary (225  $\mu\text{m}$  i.d.). Separation conditions: CAPS, 10 mM; sodium tetraborate, 15 mM; pH = 9.2; injection, 10 s at 50 mbar; running voltage, 15 kV; total length, 60 cm; effective length, 45 cm  $\pm$  CV% ( $n = 4$ )

Sample	Capillary without bubble cell					Capillary with bubble cell			
	Increase in sensitivity	Migration time (min)	Resolution	$N$	S/N	Migration time (min)	Resolution	$N$	S/N
Trp	3.21 $\pm$ 0.02	6.56 $\pm$ 0.12	—	191,100 $\pm$ 600	56 $\pm$ 1	6.53 $\pm$ 0.12	—	142,550 $\pm$ 590	180 $\pm$ 2
Tyr	2.65 $\pm$ 0.08	7.12 $\pm$ 0.05	7.9 $\pm$ 0.2	137,900 $\pm$ 635	20 $\pm$ 1	7.05 $\pm$ 0.13	6 $\pm$ 0.1	73,700 $\pm$ 620	53 $\pm$ 1
HIAA	3.08 $\pm$ 0.08	8.97 $\pm$ 0.03	20.8 $\pm$ 0.3	123,750 $\pm$ 744	26 $\pm$ 1	8.95 $\pm$ 0.22	18.5 $\pm$ 0.1	139,700 $\pm$ 590	80 $\pm$ 1
HVA	3.58 $\pm$ 0.1	9.15 $\pm$ 0.02	1.6 $\pm$ 0.1	109,600 $\pm$ 660	26 $\pm$ 1	9.11 $\pm$ 0.22	1.2 $\pm$ 0.1	121,650 $\pm$ 650	93 $\pm$ 1
HMMA	3.37 $\pm$ 0.07	9.25 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.1	189,400 $\pm$ 640	38 $\pm$ 1	9.20 $\pm$ 0.22	0.6 $\pm$ 0.1	147,600 $\pm$ 630	128 $\pm$ 1

of dye which are covalently bonded and this ratio changes the intensity of fluorescence of the labelled molecules (Salas-Solano *et al.*, 2006). In order to eliminate the requirement for derivatization, native fluorescence can be used. Since the tyrosine and tryptophan in a protein can be excited, a 266 nm laser can be used. The limit of detection (LOD) using both conventional and bubble cell capillary was determined; the conventional cell provided an LOD of 200 ng mL<sup>-1</sup> while the bubble cell capillary provided an LOD of 60 ng mL<sup>-1</sup> (Fig. 3). When calculating the injected amount, the injected quantity  $n_2$  was calculated using equation (2) (Krivácsy *et al.*, 1999):

$$n_2 = (\mu_a + \mu_{\text{os}})^2 \pi U_{\text{inj}} t_{\text{inj}} C_a L^{-1} \quad (2)$$

where  $\mu_a$  is the electrophoretic mobility of the analyte;  $\mu_{\text{os}}$  is the mobility of the electroosmotic flow;  $r$  is the inner radius of the capillary;  $U_{\text{inj}}$  is the injection voltage;  $t_{\text{inj}}$  is the injection time;  $C_a$  is the molar concentration of the analyte; and  $L$  is the total length of the capillary.

The electroosmotic flow is negligible when a semi-viscous buffer (compared with the electrophoretic mobility of the anti-

body) is employed, as is the case when the antibody is analysed in the SDS/polyethylene oxide buffer provided by Beckman. When measuring the electrophoretic mobility ( $\mu_a$ ) of unredacted IgG in 6 mM LIDS, we found that a mean value of  $\mu_a = -4.58 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  resulted in an injected amount of IgG of 20 pg. The lowest detected amount at 266 nm was much lower than the detected amount in SDS/PAGE slab gel using silver staining, which we determined was 800 pg (unpublished results).

## Conclusion

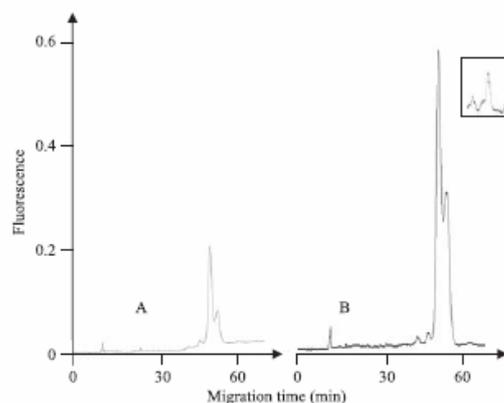
A bubble cell capillary provides better sensitivity than a conventional capillary for CE with laser-induced fluorescence detection. The increase of sensitivity is dependent on the molecule and the laser power and is related to the photodegradation rate of the fluorophore. To obtain the best sensitivity, the laser power usually must be decreased relative to the maximum useful power of the conventional capillary. When native fluorescence is employed, the sensitivity can increase by a factor of 3, thereby allowing for greater sensitivity for the detection of low levels of proteins such as antibodies (IgG), which have a relatively high amount of Tyr and Trp in their sequence. The lowest detected concentration of IgG was 60 ng mL<sup>-1</sup>, six times higher than that observed with SDS/PAGE and silver staining, while the injected amount is 40-fold more sensitive than silver staining (20 pg in CE/LIF at 266 nm compared with 800 pg via SDS/PAGE).

## Acknowledgement

We thank Dr Gerard Rozing and Dr Tobias Preckel from Agilent Technologies for their help in these studies.

## References

- Bayle C, Issac C, Salvayre R, Couderc F and Caussé E. Assay of total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. Pre-analytical and analytical conditions. *Journal of Chromatography A* 2002; **979**: 255–260.
- Bayle C, Siri N, Poinot V, Treilhou M, Caussé E and Couderc F. Analysis of tryptophan and tyrosine in cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis and 'ball lens' UV-pulsed laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2003; **1013**: 123–130.
- Bayle C, Poinot V, Fournier-Noel C and Couderc F. Laser-induced fluorescence detection. In *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications*, Pyell U (ed.). Wiley: Chichester, 2006; 263–280.
- Cole RO, Hiller DJ, Chwojda CA and Sepaniak MJ. Evaluation of extended



**Figure 3.** CE/Native UV LIF of unlabelled IgG2 from mouse (90  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) diluted in LIDS without (A) and with a bubble cell (150  $\mu\text{m}$  i.d.) (B), with a 50  $\mu\text{m}$  i.d., 45 cm effective length, 60 cm total length capillary. Electrokinetic injection 60 s, -10 kV. Running buffer Beckman sieving media (SDS, polyethylene oxide). Inset 200 ng mL<sup>-1</sup> injected using the bubble cell.

## Annexe 4 : Publication 3 (6/6)

- light path capillaries for use in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatogr A* 1996; **736**: 239–245.
- Frost M, Köhler H and Blaschke G. Determination of LSD in blood by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science Applications* 1997; **693**: 313–319.
- Hapuarachchi S, Janaway GA and Aspinwall CA. Capillary electrophoresis with a UV light-emitting diode source for chemical monitoring of native and derivatized fluorescent compounds. *Electrophoresis* 2006; **27**: 4052–4059.
- Hunt G and Nashabeh W. Capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving analysis of a therapeutic recombinant monoclonal antibody: a biotechnology perspective. *Analytical Chemistry* 1999; **71**: 2390–2397.
- Ibrahim H, Bouajila J, Siri N, Rozing G, Nepveu F and Couderc F. Very small injected samples to study chloroquine and quinine in human serum using capillary-LC and native fluorescence. *Journal of Chromatography B: Analytical Technology in Biomedicine and Life Sciences* 2007; **850**: 481–487.
- Johnson ME and Landers JP. Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems. *Electrophoresis* 2004; **25**: 3513–3527.
- Krivácsy Z, Gelencsér A, Hlavay J, Kiss G and Sárvári Z. Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds. *Journal of Chromatography A* 1999; **834**: 21–44.
- Lacroix M, Poinot V, Fournier C and Couderc F. Laser-induced fluorescence detection schemes for the analysis of proteins and peptides using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2005; **26**: 2608–2621.
- Law WS, Zhao JH and Li SFY. On-line sample enrichment for the determination of proteins by capillary zone electrophoresis with poly(vinyl alcohol)-coated bubble cell capillaries. *Electrophoresis* 2005; **26**: 3486–3494.
- Malá Z, Krivánková L, Gebauer P and Bocek P. Contemporary sample stacking in CE: a sophisticated tool based on simple principles. *Electrophoresis* 2007; **28**: 243–253.
- Masukawa Y. Separation and determination of basic dyes formulated in hair care products by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 2006; **1108**: 140–144.
- Mathies R, Peck K and Stryer L. Optimization of high-sensitivity fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 1990; **62**: 1786–1791.
- Michels DA, Brady LJ, Guo A and Balland A. Fluorescent derivatization method of proteins for characterization by capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 2007; **79**: 5963–5971.
- Mrestani Y and Neubert R. Separation of etoposide phosphate and methotrexate by capillary zone electrophoresis using UV detection with a high sensitivity cell. *Electrophoresis* 1998; **19**: 3022–3025.
- Pyell U. Micellar electrokinetic chromatography—from theoretical concepts to real samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2001; **371**: 691–703.
- Rodat A, Kalck F, Feurer B, Poinot V and Couderc F. An ellipsoidal mirror for detection of laser-induced fluorescence in capillary electrophoresis system: applications for labelled antibody analysis. *Electrophoresis* 2008; **29**: 740–746.
- Salas-Solano O, Tomlinson B, Du S, Parker M, Strahan A and Ma S. Optimization and validation of a quantitative capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate method for quality control and stability monitoring of monoclonal antibodies. *Analytical Chemistry* 2006; **78**: 6583–6594.
- Siméon N, Chatelut E, Canal P, Nertz M and Couderc F. Anthracycline analysis by capillary electrophoresis. Application to the analysis of daunorubicin in Kaposi sarcoma tumor. *Journal of Chromatography A* 1999; **853**: 449–454.
- Siri N, Riollot P, Bayle C and Couderc F. Automated large-volume sample stacking procedure to detect labelled peptides at picomolar concentration using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technology in Biomedical Life Science* 2003; **793**: 151–157.
- Van den Beld CMB. Laser induced fluorescence detection in HPLC and its application in bioanalysis. PhD thesis, Leiden, University, 1991.
- Xue Y and Yeung ES. Characterization of band broadening in capillary electrophoresis due to nonuniform capillary geometries. *Analytical Chemistry* 1994; **66**: 3575–3580.

## **7.      *Références bibliographiques***

- 1 Oldham PB., McCarroll ME., McGown LB., Warner IM, Anal Chem, 2000, 72, 197R-209R
- 2 Lakowicz JR., Principles of fluorescence spectroscopy, 1999, edition Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 63-72
- 3 Kasten FH., Introduction to fluorescent probes : properties, history and applications, 1993, Edition Mason WT., pp 12-33
- 4 Albani JR., Absorption et fluorescence, 2001, Edition Tec Doc Lavoisier
- 5 Richard P. Haugland, A guide to fluorescent probes and labelling technologies, 2005, Edition Molecular Probes
- 6 Cantor CR., Schimmel PR., Biophysical Chemistry, 1980, Editions W.H. Freeman and Company
- 7 Mathies RA., Peck K., Stryer L., Anal Chem, 1990, 62, 1786-1791
- 8 Wells S., Johnson I., Fluorescent labels for confocal microscopy, 1994, academic press, pp 101-129
- 9 Bayle C., Poinot V., Fournier-Noel C., Couderc F., « Laser induced fluorescence detection : a summary », Electrokinetic chromatography, theory instrumentation and applications, 2006, Pyell U. Ed. Wiley-VCH Weinheim Germany, pp 263-281
- 10 Nouadje Georges, Electrophorèse capillaire et détection colinéaire de fluorescence induite par laser, 1996, thèse université Paul Sabatier Toulouse
- 11 Couderc F., Nertz M., Nouadje G. Laser-induced fluorescence detector having a capillary detection cell and method for identifying trace compounds implemented by the same device, US n°08/982,256, 1er décembre 1997.
- 12 Couderc F., Nertz M., Nouadje G. Laser-induced fluorescence detector and method for the implementation of said device, PCT/FR 99/00800, 7 avril 1999.
- 13 Couderc F., Nertz M., Feurer B. Appareil de séparation par électrophorèse sur veine liquide et de détection par fluorescence induite par laser, PCT/FR 2002/002612, 22 juillet 2002.

- 14 Nertz M., Couderc F. Dispositif d'analyse par fluorescence induite par laser et appareil de séparation avec un tel dispositif , PCT/FR 02/02611, 22 juillet 2002.
- 15 Nouadje G., Simeon N., Nertz M., Couderc F., *Analisis*, 1996, 24, 360-370
- 16 Gassman E., Kuo JE., Zare RN., *Science*, 1985, 230, 813-814
- 17 Kurosu Y., Sasaki T., Saito M., *J High Resolut Chrom Chrom Comm*, 1991, 14, 186-190
- 18 Wu S., Dovichi NL., *J Chromatogr*, 1989, 480, 141-155
- 19 Taylor YF., Yeung ES., *Anal Chem*, 1992, 64, 1741-1744
- 20 Hernandez L., Marquina R., Escalona J., Guzman NA., *J. Chromatogr*, 1990, 502, 247-255
- 21 Haurum JS., *Drug Discov Today*, 2006,11 ,655-660
- 22 McCarron PA., Olwill SA., Marouf WM., Buick RJ., Walker B., Scott CJ., *Mol Interv*, 2005, 5, 368-80
- 23 Desgranges C., *Pathol Biol* 2004, 52,351-364
- 24 Sikora K., Smedley HM., anticorps monoclonaux, 1984, édition Oxford, pp 1-28
- 25 Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I., *Immunologie*, 2007, édition Elsevier, pp 65-97
- 26 Lane D., *Anticorps : un manuel de laboratoire*, 1991, édition Harlow
- 27 Wang W., Singh S., Zeng DL., King K., Nema S., *J Pharm Sci*, 2006, vol 96, no. 1
- 28 Male D., Fonteneau P., *Immunologie*, 2005, édition De Boeck université, pp 65-83
- 29 Berger M., Shankar V., Vafai A., *Am J Med Sci*, 2002, 324, pp 14-30
- 30 Weiner LM., *J Immunother*, 1997, 29, 1-9
- 31 Little M., Kipriyanov SM., Le Gall F., Moldenhauer G., *Immunol Today*, 200, 21, 364-370
- 32 Golsby R.A., Kindt TJ., Osborne BA., Kuby J., *Immunology*, 2002, édition W.H. Freeman and company, pp 76-137

- 33 Bugat F., les anticorps monoclonaux : d'une famille de protéines de système immunitaire a une nouvelle classe thérapeutique, 2007, thèse de pharmacie UPS
- 34 Maggon K, Curr Med Chem, 2007, 14, 1978-1987
- 35 Garnick RL., Solli NJ., Papa PA., Anal Chem, 1988, 60, 2546-2557
- 36 Flatman S., Alam I., Gerard J., Mussa N., J Chromatogr B, 2007, 848, 79-87
- 37 Shen Y., Smith RD., Electrophoresis, 2002, 23, 3106-3124
- 38 Little MJ., Paquette DM., Roos PK., Electrophoresis, 2006, 27, 2477-2485
- 39 Krull IS., Liu X., Dai J., Gendreau C., Li G., J Pharm Biomed Anal, 1997, 16, 377-393
- 40 Laemmli UK., Nature, 1970, 227, 680-685
- 41 Reynolds JA., Tanford C., Proc Natl Acad Sci, 1970, 66, 1002-1007
- 42 Ganzler K, Greve KS., Cohen AS., Karger BL., Guttman A., Cooke NC., Anal Chem, 1992, 2665-2671
- 43 Hames B.D., Gel electrophoresis of protein, A practical approach, 1998, édition Oxford university press, pp 13-33
- 44 Switzer RC., Merrill CR, Shifrin S., Anal Biochem, 1979, 98, 231-237
- 45 Oakley B.R., Kirsch DR., Morris NR., Anal Biochem, 1980, 105,361-363
- 46 Gonzalez L., Bustamante JJ., Barea-Rodriguez E., Martinez AO., Haro LS., Electrophoresis, 2006, 27, 2016-2023
- 47 Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., Anal Chem, 1996, 68, 850-858
- 48 Ansorge W., J Biochem Biophys Methods, 1985, 11, 13-20
- 49 Oakley B., Kirsch DR., Morris NR., Anal Biochem, 1980, 105, 361-363
- 50 Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W., Electrophoresis, 1988, 9, 255-262

- 51 Fernandez-Patron C., Castellanos-Serra L., Hardy E., Guerra M., *Electrophoresis*, 1998, 19, 2398-2406
- 52 Lee C., Levin A., ton D., *Anal Biochem*, 1987, 166, 308-312
- 53 Ohashi R., Otero J M., Chwistek A., Hamel JFP., *Electrophoresis*, 2002, 23, 3623-3629
- 54 Hunt G., Nashabeh W., *Anal Chem*, 1999, 71, 2390-2397
- 55 Strege M.A., Lagu A.L., capillary electrophoresis of proteins and peptides, 2004, édition Humana press, pp 1-15, pp 121-137
- 56 Tang S., Nesta DP., Maneri LR., Anumula KR., *J pharma biomed anal*, 1999, 19, 569-583
- 57 Hunt G., Hotaling T., Chen AB., *J Chromatogr A*, 1998, 800, 355-367
- 58 Liu Z., Pawliszyn J., *Anal Chem*, 2003, 75, 4887-4894
- 59 Liu Z., Pawliszyn J., *Anal. Biochem.*, 2005, 336, 94 –101
- 60 Zhou F., Johnston MV., *Anal Chem*, 2004, 76, 2734-2740
- 61 Jin LJ., Giordano BC., Landers JP., *Anal Chem*, 2001, 73, 4994-4999
- 62 Cohen AS, Karger BL, *J. Chromatogr*, 1987, 26, 397, 409-417
- 63 Lausch R., Scheper T., Reif OW., Schlösser J., Fleischer J., Freitag R., *J Chromatogr A*, 1993, 654, 190-195
- 64 Guttman A., Nolan JA., Cooke N., *J Chromatogr*, 1993, 632, 171-175
- 65 Guttman A., Nolan J., *Anal Chem*, 1994, 285-289
- 66 Sigma catalog, 2008, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
- 67 Benedek K., Thiede S., *Chromatographia*, 1994, 676, 209-217
- 68 Guttman A., Horvath J., Cooke N., *Anal Chem*, 1993, 65, 199-203
- 69 Vincentelli R., Bihoreau N., *J Chromatogr*, 1993, 641, 383-390

- 70 Han M., Phan D., Nightlinger N., Taylor L., Jankhah S., Woodruff B., Yates Z., Freeman S., Guo A., Balland A., Petit D., *Chromatographia*, 2006, 64, 335-342
- 71 Lee HG., Chang S., Fritsche E., *J Chromatogr A*, 2002, 947, 143-149
- 72 Bennett LE., Charman WN., Williams DB., Charman SA., *J Pharm Biomed Anal*, 1994, 12, 1103-1108
- 73 Lee HG., *J Immunol Meth*, 2000, 234, 71-81
- 74 Hunt G., Moorhouse KG., Chen AB., *J Chromatogr A*, 1996, 744, 295-301
- 75 Salas-Solano O., Tomlinson B., Du S., Parker M., Strahan A., Ma S., *Anal Chem*, 2006, 78, 6583-6594
- 76 Stoyanov AV., Ahnadzadeh H., Krylov SN., *J Chromatogr B*, 2002, 780, 283-287
- 77 Michels DA., Brady LJ., Guo A., Balland A., *Anal Chem*, 2007, 79, 5963-5971
- 78 Wise ET., Singh N., Hogan BL., *J Chromatogr A*, 1996, 746, 109-121
- 79 Relf OW., Lausch R., Scheper T., Freltag R., *Anal Chem*, 1994, 66, 4027-4033
- 80 Liu J., Abid S., Lee MS., *Anal Biochem*, 1995, 229, 221-228
- 81 Klyushnichenko V., Kula MR., *Electrophoresis*, 1997, 18, 2019-2023
- 82 Ohlson S., Wieslander J., *J Chromatogr*, 1987, 397, 207-212
- 83 Ohlson S., Nilsson R., Niss U., Kjellberg BM., Freiburghaus C., *J Immunol Methods*, 1988, 114, 175-180
- 84 Blank GS., Vetterlein D., *Anal biochem*, 1990, 190, 317-320
- 85 Moorhouse KG., Nashabeh W., Deveney J., Bjork NS., Mulkerrin MG., Ryskamp T., *J Pharm Biomed Anal*, 1997, 16, 593-603
- 86 Tous GI., Wei Z., Feng J., Bilbulian S., Bowen S., Smith J., Strouse R., McGeehan P., Casa-Finet J., Schenerman MA., *Anal Chem*, 2005, 77, 2675-2682

- 87 Carlsson L, A device for detecting light fluorescence, WO 96/15438, 23 mai 1996; EP 0 791 172 B1, 12 février 2003
- 88 Courrière P., Physique et biophysique pharmaceutiques, 1990, édition Masson, pp 113-145
- 89 Zheng X., Lu M., Zhang L., Chi Y., Zheng L., Chen G., Talanta, 2008, 76, 15-20
- 90 Wu SM., Ho YH., Wu HL., Chen SH., Ko HS., Electrophoresis, 22, 2717-2722
- 91 Malà Z., Krivankova L., Gebauer P., Bocek P., Electrophoresis, 2007, 28, 243-253
- 92 Van den Beld, Laser induced fluorescence detection in HPLC and this application in bioanalysis , 1991, thèse Leiden
- 93 Pyell U., Electrokinetic chromatography, theory, Instrumentation et application, 2006, édition John Wiley and sons, pp 263-280
- 94 Vial J., Jardy A., Anal Chem, 1999, 71, 2672-2677
- 95 Maley F., Trimble RB., Tarentino AL., Plummer THJR., 1989, Anal Biochem, 180, 195-204
- 96 Plummer THJR., Tarentino A.L., Glycobiology 1, 257-263
- 97 Klyushnichenko V., Kula M.R., Electrophoresis, 1997, 18, 2019-2023
- 98 Han M., Phan D., Nightlinger N., Taylor L., Jankhah S., Woodruff B., Yates Z., Freeman S., Guo A., Balland A., Petit D., Chromatographia, 2006, 64, 335-342

## *Abréviations*

AS : ankylosing spondylitis

Asp : aspartate

BSA : serum albumine bovine

c : concentration du fluorophore

C : région constante des immunoglobulines

CE : électrophorèse capillaire

CEM : chromatographie électrocinétique micellaire

CE-SDS-NGS : capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate nongel sieving

CD : crohn's disease

CDR : régions déterminant la complémentarité

CGE : capillary gel electrophoresis

CHES : 2-(N-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid

CIEF : capillary isoelectric focusing

CIEF-LCW-LIF-WCID : capillary isoelectric focusing-liquid core waveguide-laser induced fluorescence-whole column imaging detection

cmc : concentration micellaire critique

CW : laser continu

DOX : doxorubicine

D/P : rapport molaire marqueur/protéine

DPSS : laser solide pompé par diode

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire du fluorophore

E : champ électrique

EGFR : epidermal growth factor receptor

EOF : flux électro-osmotique

ESI : electrospray ionisation

FcR : récepteur du Fc

FDA : food drug administration

FQ : 3-(2-furoyl)quinoline-2-carboxaldehyde

FITC : fluorescein isothiocyanate

Gly : glycine

$\Phi_F$  : rendement quantique de fluorescence

H : heavy chain

HPLAC : chromatographie liquide d'affinité haute performance  
HPLC : chromatographie liquide haute performance  
HSA : serum albumine humaine  
 $I_F$  : intensité de fluorescence  
 $I_A$  : intensité absorbée  
ID : diamètre interne du capillaire  
Ig : immunoglobuline  
 $I_o$  : intensité de la lumière incidente  
l : épaisseur optique  
L : light chain  
LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation  
LiDS : lithium dodecyl sulfate  
LIF : fluorescence induite par laser  
LOD : limite de détection  
LOQ : limite de quantification  
 $\mu_{eo}$  : mobilité électro-osmotique  
MS : spectrométrie de masse  
NBD-F : 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan  
NBD-Cl : 4-chloro-7-nitrobenzofurazan  
NGS : non gel separation  
OD : diamètre externe du capillaire  
PAGE : électrophorèse en gel polyacrylamide  
PEO : polymère poly(éthylène oxide)  
PEG : polyéthylène glycol  
Phe : phénylalanine  
pI : potentiel d'ionisation  
PMT : tube photomultiplicateur  
PNGase : peptidyl N-glycosidase  
Pro : proline  
Ps : psoriasis  
PsA : psoriasis arthritis  
QPCR : quantitative polymérase chain reaction  
RA : rheumatoïd arthritis  
Ref : référence

rMAb : anticorps monoclonaux recombinants  
RPLC : chromatographie liquide phase reverse  
RSD : relative standard deviation  
RSV : respiratory syncytial virus  
SEC : size exclusion chromatography  
Ser : sérine  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
S/N : rapport signal/bruit  
5-TAMRA SE : 5-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester  
TNF $\alpha$  : tumor necrosis factor alpha  
Tyr : tyrosine  
Trp : tryptophane  
UC : ulcerative colitis  
UV : ultra violet  
V : région variable des immunoglobulines  
VEGF : vascular endothelial growth factor  
V<sub>eo</sub> : vitesse électro-osmotique  
 $\zeta$  : potentiel zêta de la surface du capillaire  
 $\eta$  : viscosité du milieu

**TITRE:** Development of a CE-LIF system integrated and application to the analysis of biomolecules

---

**SUMMARY:** Laser Induced Fluorescence (LIF) detection is the most sensitive and selective detection technique for Capillary Electrophoresis (CE). Thanks to a new optical arrangement, LIF detection was integrated into a commercial CE instrument : this system uses a ball lens to focus the laser beam on the capillary and a half ellipsoid placed on the capillary window to collect the fluorescence. The performance of this new arrangement was compared to the existing colinear arrangement commercialized by Picometrics. An application on immunoglobulins analysis was optimized in CE-LIF in order to meet the expectations of the pharmaceuticals products quality control. Two techniques were focused with the new detector : the first one is the analysis of FITC labelled immunoglobulin (488 nm) or of TAMRA labelled immunoglobulin (532 nm), the second one is the analysis of immunoglobulin at 266 nm (native fluorescence).

---

**KEY WORDS:** laser induced fluorescence, capillary electrophoresis, half ellipsoid, immunoglobulin G, quality control

**AUTEUR :** Audrey RODAT

**TITRE :** Mise au point d'un système CE-LIF intégré et application à l'analyse de biomolécules

**DIRECTEUR DE THESE :** M François COUDERC

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** Toulouse – 26 février 2009

---

**RESUME :** La détection par Fluorescence Induite par Laser (LIF) est la technique de détection la plus sensible et la plus sélective pour l'Electrophorèse Capillaire (CE). Grâce à un nouvel arrangement optique, la détection LIF a été intégrée à un appareil commercial de CE : ce système utilise une bille qui focalise le faisceau laser dans le capillaire et un demi-ellipsoïde placé sur la fenêtre du capillaire afin de collecter la fluorescence. Les performances de ce nouveau détecteur ont été comparées au montage colinéaire déjà existant et commercialisé par la société Picometrics. Afin de répondre aux attentes du contrôle qualité de produits pharmaceutiques, une application sur l'analyse d'immunoglobulines a été optimisée par CE-LIF. Deux techniques sont mises au point avec notre nouveau détecteur : la première est l'analyse des immunoglobulines marqués au FITC (488 nm) ou au Tamra (532 nm), la seconde est l'analyse des immunoglobulines à 266 nm (fluorescence native).

---

**MOTS CLES :** fluorescence induite par laser, électrophorèse capillaire, demi-ellipsoïde, immunoglobuline G, contrôle qualité

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Chimie, biologie, santé

---

**ADRESSE DU LABORATOIRE :** Laboratoire des I.M.R.C.P. – 118 route de Narbonne, Bâtiment 2R1, 31062 Toulouse