

Quelques applications cliniques de l'électrophorèse capillaire

C. Bayle¹, E. Caussé², M. Arellano³, N. Siméon¹ et F. Couderc⁴

¹ Zeta Technologie, 10 avenue de l'Europe, 31520 Ramonville, France

² Laboratoire de Biochimie/INSERM U466, CHU Rangueil, 1 avenue J. Poulhes, 31403 Toulouse Cedex 4, France

³ Laboratoire de Chimie Analytique, Université des Sciences Pharmaceutiques, Chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse, France

⁴ Université Paul Sabatier, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse, France

Several applications of capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence or indirect UV detection were realised in biological sciences: analysis of ribonucleic acid involved in atherosclerosis, amino acids and biogenic amines in sera or cerebrospinal fluids, anthracycline in tumors and the analysis of organic acids for bacterial taxonomy.

Introduction

Depuis 1981 l'électrophorèse capillaire (CE) s'est de plus en plus développée et de nombreuses applications sont publiées chaque mois dans les revues de chimie, de biochimie analytique ou de biologie structurale. Un essor particulier s'est produit depuis 1990, année à partir de laquelle tous les grands groupes d'instrumentation ont proposé des systèmes plus ou moins sophistiqués permettant de faciliter la compréhension de cette technique à l'expérimentateur et permettant de rendre de plus en plus générale l'utilisation de

cette technique de séparation. De très nombreux perfectionnements sur les modes de séparation ont été rapportés, et présentés plus particulièrement dans diverses revues [1–4]. Dans le domaine de la détection, la plupart des groupes d'instrumentation proposent des détecteurs UV-Visible soit mono longueur d'onde, soit à barrette de diode. Ces systèmes aujourd'hui permettent de satisfaire à 75 % des besoins publiés. Leur sensibilité reste limitée et seulement des concentrations minimales de l'ordre de 10^{-6} M peuvent être analysées. De plus en plus, les fabricants proposent les interfaces permettant de coupler la CE à la spectrométrie de masse. Si ce mode d'analyse, grâce aux sources d'ionisation nanospray, émerge de plus en plus, il reste relativement confidentiel à cause de la modeste sensibilité obtenue (10^{-6} , 10^{-7} M) et du coût important du spectromètre de masse. La fluorescence induite par laser est l'outil indispensable pour atteindre des concentrations plus basses (10^{-8} , 10^{-12} M) et pour avoir une plus grande sélectivité de détection.

Un des secteurs d'analyse dans lequel l'électrophorèse capillaire a du mal à s'implanter est le secteur de la biochimie clinique. Choc culturel, difficultés dues à une méthodologie analytique dont les protocoles d'analyses cliniques ne sont pas toujours validés, longueurs des processus de validation, tous ces motifs peuvent expliquer les lenteurs de la

diffusion d'une telle technique dans les laboratoires de biochimie des hôpitaux. Pourtant quelques uns de ces laboratoires mènent des recherches particulièrement performantes [5-7] mais ils restent encore trop peu nombreux.

Nous aborderons dans cet article, différentes méthodes de dosages utilisables en biochimie clinique. La plupart de ces dosages a été réalisée avec un détecteur de fluorescence induite par laser (LIF), c'est ainsi que nous avons pu étudier l'expression génique de cytokines dans la paroi vasculaire athéroscléreuse, la cinétique de disparition d'anthracyclines dans les tumeurs de syndrome de Kaposy, la concentration des acides aminés chez les enfants leucémiques traités au méthotrexate, la détermination d'acides aminés non usuels dans le plasma. D'autres dosages ont été réalisés avec un détecteur conventionnel d'absorption UV-Visible, comme le dosage des acides organiques dans les milieux de culture de bactéries anaérobies, à des fins de taxonomie bactérienne.

Applications de la CE-LIF

Étude quantitative de l'expression génique du bFGF

Le bFGF (basic fibroblast growth factor - FGF2) est un facteur de croissance impliqué dans l'athérosclérose [8]. La connaissance de sa concentration dans la paroi vasculaire peut aider à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de ce type de maladie. La quantité de cytokines dans les plaques d'athérome étant très faible, nous avons quantifié l'expression génique du bFGF (ARNm obtenus après reverse transcription ; RT) suivie d'amplification par PCR (polymerase-chain reaction) avec des amorces spécifiques fluorescentes. Le dosage des ADN obtenus par cette réaction de RT-PCR a été réalisé dans des capillaires greffés d'une phase apolaire (DB17, JW scientific, Altech, les Ulis, France) contenant un tampon semi-visqueux (1 % hydroxyéthylcellulose, 100 mM sodium tétraborate, 100 mM tris, pH = 8,7). La séparation est effectuée à -20 kV avec des injections électrocinétiques de 10 s à -20 kV [8]. Les courbes d'étalonnage sont réalisées dans les mêmes conditions, en utilisant un vecteur recombinant. La courbe obtenue du logarithme de l'intensité de la fluorescence en fonction du logarithme de la concentration est :

$$\log F = 0,714 \log C - 15,6 \quad (r = 0,9990)$$

pour des concentrations d'ADN variant entre 10^{-10} M à 10^{-14} M. Ainsi après extraction des ARNm de prélèvements tissulaires (artères mammaires internes) obtenus lors d'interventions chirurgicales, nous réalisons des réactions de RT-PCR avec les amorces fluorescentes. Les électrophérogrammes obtenus (Fig. 1) [8] permettent d'identifier aisément le produit de RT-PCR, qui doit seul être fluorescent ainsi que les amorces. Le rapport ARNm de bFGF sur ARN total extrait des prélèvements de patients est mesuré et

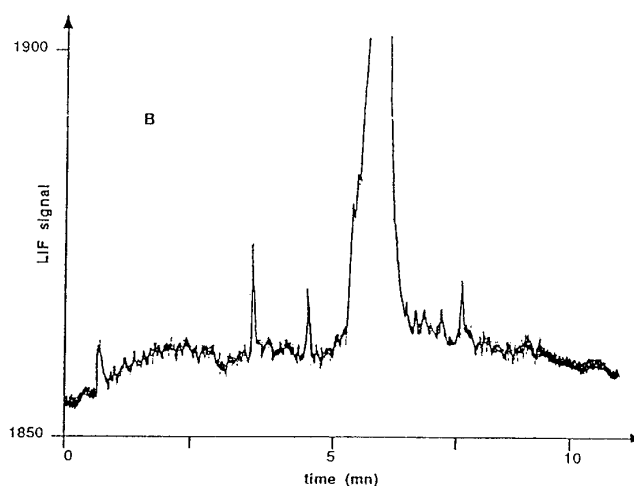
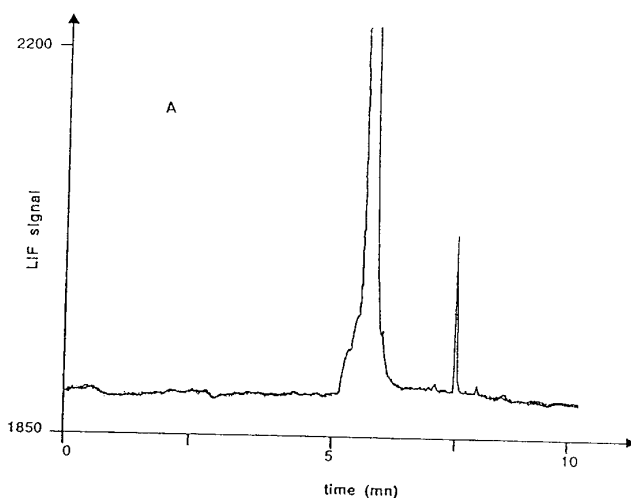


Figure 1. Électrophérogrammes de produits de RT-PCR obtenus de : A) culture de cellules d'aorte humaine ; B) fragment d'artère mammaire interne d'un patient [8]. • indique le pic du fragment de cDNA amplifié.

obtenu par CE-LIF ou par électrophorèse en gel de polyacrylamide avec détection par densitométrie. On observe un facteur 2 entre les résultats obtenus avec les deux méthodologies, l'analyse par CE-LIF donnant des résultats toujours supérieurs.

Analyse d'acides aminés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)

L'identification des acides aminés dans les liquides céphalo-rachidiens permet souvent d'identifier certaines pathologies chez les patients. Nous avons mis au point une analyse des acides aminés et de certaines amines biogènes dans le LCR [9]. Les échantillons sont dérivés avec la

fluorescéine isothiocyanate (FITC), puis afin d'obtenir les meilleures séparations, nous avons utilisé la chromatographie micellaire électrocinétique en ajoutant du SDS au tampon acide borique à pH = 9,5. Les résultats obtenus montrent une très bonne séparation de la plupart des acides aminés, sauf pour leucine-isoleucine et thréonine-valine qui sont mal séparés. Les nombres de plateaux théoriques sont très grands (supérieurs à 100 000). Ils sont répertoriés dans le tableau I et indiquent la performance de la séparation [10]. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une quantité importante d'ammoniaque dans les LCR, qui est liée à des céphalées aiguës chez le patient jeune traité par la doxorubicine, probablement due à une réaction hépatique.

Analyse des acides aminés soufrés

Ces acides aminés ont été analysés par deux méthodes : i) marquage au FITC, marquage de la fonction amine qui permet ainsi d'identifier la totalité des acides aminés et des amines [11], ii) marquage par la fluorescéine 6-iodoacétamide (IAF), spécifique de la fonction thiol et qui permet donc d'identifier sélectivement les acides aminés soufrés [12].

Le marquage des acides aminés par le FITC présente les avantages de marquer la totalité des acides aminés mais pose certains problèmes avec les acides aminés à groupement thiol [11]. En effet, ces derniers sont marqués aussi bien sur leur extrémité SH que NH₂, donnant ainsi deux dérivés différents séparés en électrophorèse capillaire. De plus, il semble que la fonction la plus réactive soit la fonction SH et par transfert interne le groupement thiocarbamyl migre du soufre vers le groupement NH₂. Ce transfert de groupement est assez lent et évolue donc dans le temps pour atteindre un équilibre après plusieurs heures, ce qui empêche de pouvoir analyser rapidement ces échantillons fraîchement dérivés. Par ailleurs la mobilité des dérivés *N* fluorescéine thiocarbamyl est grandement affectée par de faibles variations de pH de l'échantillon. En effet les points d'équivalence des fonctions thiol de la cystéine et de l'homocystéine sont de l'ordre du pH du tampon utilisé. Ainsi une faible variation du pH du tampon affecte la charge de l'acide aminé dérivé et donc sa mobilité. En réponse à ce problème, si l'on diminue le pH de l'analyse, cela affecte le rendement de fluorescence des dérivés (le noyau fluorescéine doit être chargé pour avoir la meilleure fluorescence) et donc diminue la sensibilité de la détection. Le fait d'augmenter le pH (pH = 10) du tampon augmente les temps d'analyse et le courant dans le capillaire. Afin d'améliorer le pouvoir tampon de notre électrolyte, nous y avons ajouter du CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique acide, concentration finale 20 mM), nous avons ainsi minimisé le déplacement des acides aminés à fonction thiol avec un temps d'analyse augmenté seulement de quelques minutes. Nous avons ainsi dosé l'homocystéine dans le plasma (Fig. 2) [11].

Afin de simplifier les électrophorégrammes, nous avons utilisé l'IAF qui permet de marquer sélectivement les fonctions thiols. Un électrophorégramme obtenu est présenté figure 3 [12].

Tableau I. Temps de migration et efficacités de la séparation d'acides aminés et d'amines biogènes dérivés avec la fluorescéine isothiocyanate [9].

Solutions standards	Temps de migration (min)	Nombre de plateaux théoriques $\times 10^3$
<i>Acides aminés</i>		
Arginine	8,77	652
Lysine	9,05	659
Thréonine	13,21	1405
Isoleucine-Leucine	13,67	392
Proline	13,92	567
Phénylalanine	14,11	341
Tryptophane	14,21	581
Asparagine	14,41	596
Tyrosine	14,68	1730
Sérine	14,99	1810
Alanine	15,22	1040
Cystéine	15,97	1960
Glycine	16,15	1180
Acide glutamique	21,99	2890
Acide aspartique	23,01	1070
<i>Amines biogènes ou acides aminés non usuels</i>		
Putrescine	7,08	672
Histamine	9,45	740
Ornithine	9,68	1710
Ethanolamine	9,99	803
Ethylamine	10,13	1870
Tyramine	10,18	834
β -phényléthylamine	10,54	894
Ammoniac	10,79	525
Spermidine	11,11	532
Taurine	15,97	2050

Études d'antracyclines

Doxorubicine et daunorubicine sont deux agents anti-tumoraux utilisés dans les traitements de tumeurs du Syndrome de Kaposy. La connaissance de la cinétique de la diffusion de ces agents dans la tumeur est intéressante puisqu'elle permet au clinicien de savoir si ces agents intercalants rentrent dans la tumeur et en quelle quantité. Ainsi, il est possible de pouvoir adapter les doses efficaces contre ces tumeurs. Ce type d'analyse avait été réalisé en CE-LIF par Reinhoud et al. [13] avec un laser argon ($\lambda = 488$ nm) de très haute puissance. Nous avons utilisés la CE-LIF avec le même type de laser, mais dont la puissance était de 12 mW, et nous avons suivi l'évolution de la daunorubicine dans ce type de tumeur [14]. La limite de détection est de $1.8 \cdot 10^{-11}$ M, comparable avec ce que trouvent Reinhoud et al. avec un laser de 100 mW. La sensibilité que nous avons observée nous a

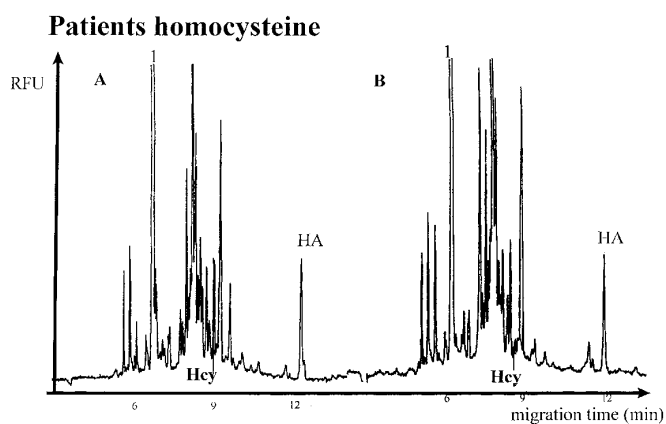


Figure 2. Électrophorégrammes de deux plasmas contenant une faible (A) ou une forte (B) concentration en homocystéine, avec acide homocystéique comme étalon interne. Les plasmas sont dilués 1000 fois dans l'eau ultra - pure avant l'analyse [11]. Conditions de migration : SDS 10 mM, acide borique 50 mM, pH 9,8, 25 kV (45 μ A).

donc permis de pouvoir étudier, après extraction, la quantité de daunorubicine contenue dans 10^8 cellules d'une tumeur après traitement du patient par une dose de 60 mg/m² de daunoxome. Pour l'analyse dans les tissus on prélève la tumeur, puis elle est broyée, on ajoute au broyat un standard interne (la rhodamine 123), puis on extrait l'agent tumoral et on réalise l'analyse par CE-LIF. La figure 4 présente l'électrophorégramme obtenu après extraction de la daunorubicine d'une tumeur traitée, 18 heures après l'injection du médicament au patient. Les cinétiques montrent une lente disparition de la daunorubicine de la tumeur et du plasma de façon comparable.

Application de la CE, avec détection par UV inverse, à la taxonomie des bactéries anaérobies

La taxonomie bactérienne, c'est-à-dire la classification des bactéries, peut être réalisée par une grande quantité de tests : observations au microscope, colorations, analyses biochimiques, analyse des acides gras bactériens, analyse des acides nucléiques. Une méthode ancienne pour compléter d'autres critères taxonomiques proposait pour les anaérobies d'analyser les acides organiques du milieu de culture des bactéries. Ces analyses reposaient sur l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse et de l'analyse des acides non dérivés, volatils, puis des acides dérivés pour les acides non volatils. Ces études relativement longues (deux analyses) engendraient plusieurs étapes d'extraction et de dérivation. Ainsi, en utilisant la CE avec détection UV indirecte, nous avons pu pallier l'inconvénient majeur de cette méthode de

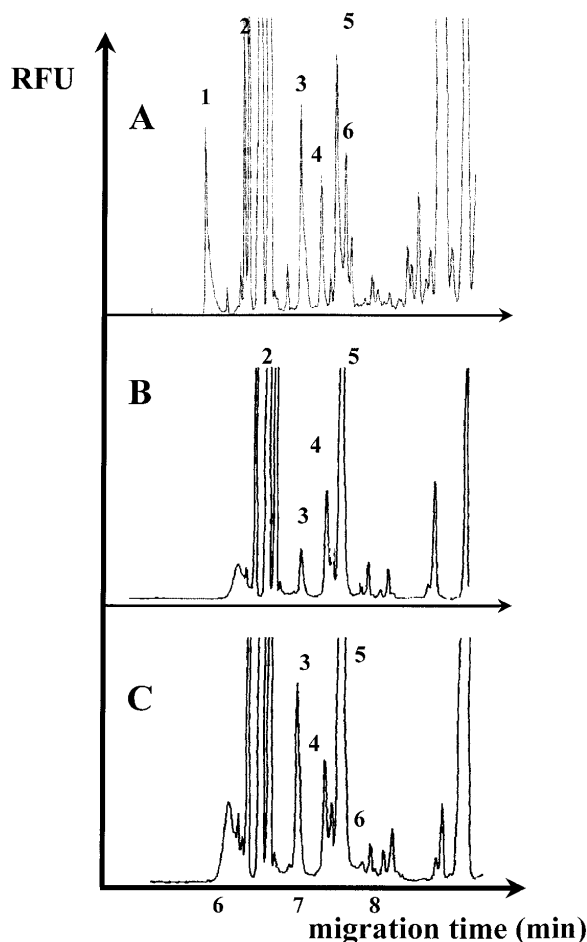


Figure 3. Électrophorégrammes des intensités de fluorescence (RFU) : (A) standard d'acides aminés thiols : (1) Cystéamine : 0,5 nM ; (2) 6-IAF ; (3) Homocystéine : 0,5 nM ; (4) D Penicillamine : 0,5 nM (standard interne) ; (5) Cystéine : 2,5 nM ; (6) glutathione : 2,5 nM. (B) plasma d'un patient contenant 14,3 μ mol/L d'homocystéine, (C) plasma d'un patient contenant 57,7 μ mol/L d'homocystéine. Les acides aminés à groupement thiol sont marqués avec la fluorescéine 6-iodoacétamide (6-IAF) à 1 mM et dilués 5000 fois. Conditions de migration : SDS 10 mM, acide borique 50 mM, CAPS 20mM à pH 9,5 ; 25 kV (26 μ A).

chromatographie et réaliser dans une même analyse, simultanément, la séparation des acides volatils et non volatils [15]. De plus, aucune étape d'extraction n'est utilisée, le milieu de culture étant seulement filtré puis dilué 10 fois. Le tableau II montre les divers temps de migration pour les différents acides qui caractérisent les bactéries anaérobies étudiées. La figure 5 montre une séparation de ces acides dans un tampon acide benzoïque (10 mM), histidine (10 mM) et Tétradécyl Triméthyl Ammonium Bromure (TTAB, 1 mM à pH = 6). La concentration des acides permet de classer les différentes bactéries étudiées selon leur espèce. Ceci permet d'apporter de nouveaux critères taxonomiques pour ces bactéries mal identifiées par des moyens plus classiques.

Tableau II. Concentrations en acides gras à courtes chaînes pour différentes souches bactériennes anaérobies [15].

Espèces	Succinique	Pyruvique	Acétique	Lactique	Propionique	2-hydroxy- butyrique	Butyrique	2-hydroxy- valérique	Isovalérique	Isocaproïque	3-phényl- propionique
<i>B. fragilis</i>	4,13 ± 0,18	0	13,34 ± 0,73	29,56 ± 1,87	3,65 ± 0,23	0	0	0	4,32 ± 0,33	0	0
<i>C. ochracea</i>	8,19 ± 0,43	9,79 ± 0,23	5,92 ± 3,30	3,21 ± 0,21	0	0	0	0	10,09 ± 0,78	0	0
<i>F. necrophorum</i>	1,90 ± 0,01	0	12,87 ± 1,44	31,96 ± 1,07	13,42 ± 0,72	1,96 ± 0,01	52,86 ± 1,54	5,33 ± 0,19	0	0	0
<i>F. nucleatum</i>	1,90 ± 0,00	0	14,70 ± 0,17	15,66 ± 0,04	3,09 ± 0,06	4,98 ± 0,14	69,02 ± 1,14	1,24 ± 0,03	0	0	0
<i>P. gingivalis</i>	0	0	16,20 ± 0,69	2,28 ± 0,02	3,02 ± 0,28	0	38,54 ± 1,70	0	11,22 ± 0,52	0	0
<i>P. melaninogenica</i>	10,04 ± 0,16	0	9,16 ± 0,77	19,22 ± 0,53	0	0	0	0	5,58 ± 0,02	0	0
<i>P. acnes</i>	2,28 ± 0,06	8,57 ± 0,04	4,59 ± 0,05	44,31 ± 3,40	7,18 ± 0,59	0	0	0	0	0	0
<i>P. anaerobius</i>	0	0	21,85 ± 0,47	5,84 ± 0,10	0	0	10,60 ± 0,35	0	6,08 ± 0,27	20,29 ± 1,11	7,19 ± 0,22
<i>P. perfringens</i>	1,85 ± 0,02	0	23,99 ± 0,52	6,54 ± 0,98	2,84 ± 0,12	2,13 ± 0,06	26,85 ± 0,05	10,39 ± 0,19	0	0	0
Milieu de contrôle	1,86 ± 0,02	0	3,90 ± 0,17	3,50 ± 0,07	0	0	7,73 ± 0,45	5,84 ± 0,64	0	14,49 ± 0,83	0

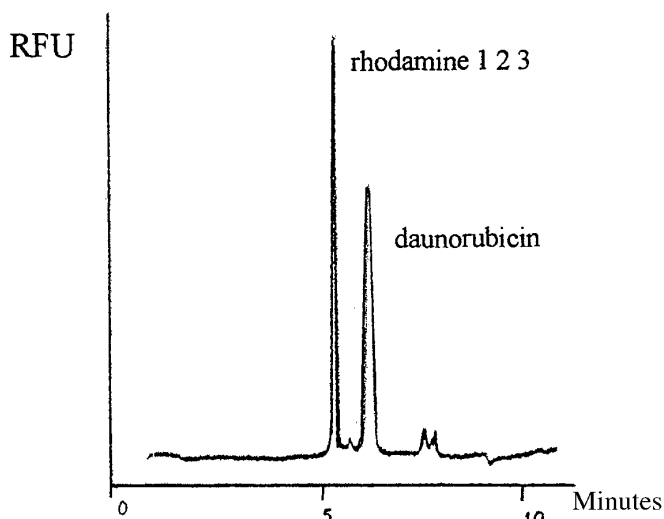


Figure 4. Analyse de la daunorubicine après extraction d'une tumeur de syndrome de Kaposy, 18 heures après traitement au daunoxome. Standard interne : rhodamine 123. Conditions de migration : acétonitrile, tampon dihydrogénophosphonate pH = 4 (v : v, 2:8).

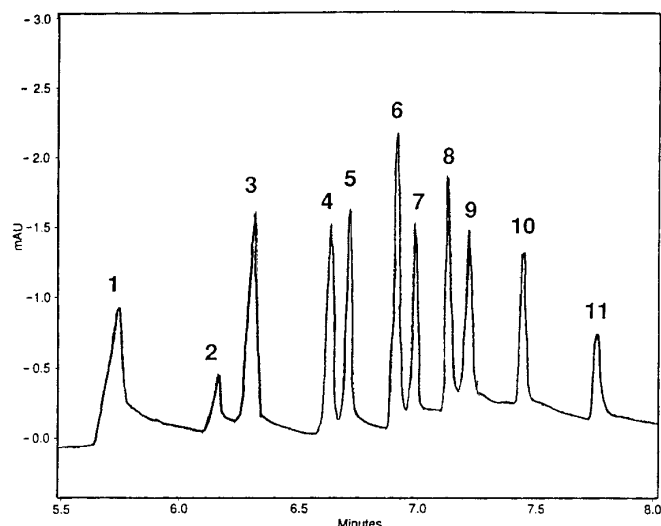


Figure 5. Électrophérogramme d'un mélange de 11 acides gras à chaîne courte : 1, acide succinique ; 2, acide pyruvique ; 3, acide acétique ; 4, acide lactique ; 5, acide propionique ; 6, acide 2-hydroxybutyrique ; 7, acide butyrique ; 8, acide hydroxyvalérique ; 9, acide isovalérique ; 10, acide isocaproïque ; 11, acide phénylpropionique. Tampon d'analyse : acide benzoïque (10 mM), histidine (10 mM) et Tétradécyl Triméthyl Ammonium Bromure (TTAB, 1 mM).

Conclusion

Au cours de cette revue, sur les diverses applications biologiques que nous avons faites au laboratoire, nous avons vu que l'électrophorèse capillaire pouvait être utilisée en routine dans les laboratoires de biologie, actuellement très équipés en électrophorèse classique et en chromatographie en phase liquide ou gazeuse. La CE permet de regrouper dans la même méthodologie d'analyse différentes applications, réalisées actuellement avec d'autres instrumentations, en minimisant les coûts et les temps d'analyses. Par ailleurs, l'ensemble de la littérature sur la CE montre tout son intérêt pour l'étude des macromolécules, largement exploitées en biochimie clinique.

Références

1. Beale, S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 279R.
2. St. Claire, R.L. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 569R.
3. Lunte, S.M.; Radzik D.M. Eds. *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis* 1 st ed.; Pergamon: Oxford, U.K., 1996.
4. Landers, J.P. Ed *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1997.
5. Hempel, G.; Blaschke, G. *J. Chromatogr. B* **1995**, *675*, 131.
6. Lu, W.; Han, D.S.; Yuan, J.; Andrieu, J.M. *Nature* **1994**, *368*, 269.
7. Naylor, S.; Ji, Q.; Johnson, K.L., Tomlinson, A.J.; Kieper, W.C.; Jameson, S.C. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2207.
8. Caussé, E.; Siméon, N.; Nertz, M.; Salvayre, R.; Bayard, F.; Valdigué, P.; Couderc, F. *J. Cap. Elec.* **1997**, *4(2)*, 77.
9. Nouadje, G.; Siméon, N.; Dedieu, F.; Nertz, M.; Puig, Ph.; Couderc, F. *J. Chromatogr. A* **1997**, *765*, 337.
10. Nouadje, G.; Rubie, H.; Chatelut, E.; Canal, P.; Nertz, M.; Puig, Ph.; Couderc, F. *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 293.
11. Caussé, E.; Terrier, R.; Champagne, S.; Nertz, M.; Valdigué, P.; Salvayre, R.; Couderc, F. *J. Chromatogr. A* **1998**, *817*, 181.
12. Caussé, E.; Siri, N.; Bellet, H.; Champagne, S.; Bayle, C.; Valdigué, P.; Salvayre, R.; Couderc, F. *Clin. Chem.* **1999** (sous presse).
13. Reinhoud, N. J.; Schroder, E.; Tjaden, U. R.; Irth, H.; Van der Greef, J. *J. Chromatogr.* **1992**, *574*, 327.
14. Siméon, N.; Canal, P.; Chatelut, E.; Nouadje, G.; Nertz, M.; Couderc, F. Daunorubicin and LIF detection comparative study using HPLC and CE separations, HPCE'97 Anaheim CA, p 615.
15. Arellano, M.; El Kaddouri, S.; Roques, C.; Couderc, F.; Puig, Ph. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 497.