



*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire – **LCOM** à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction de Mr Christian Rolando à qui j'adresse mes remerciements et ma reconnaissance de m'avoir bien reçue dans son laboratoire, et ceci dans le cadre du LIA, laboratoire international associé entre l'université des sciences et technologies de Lille et le laboratoire de recherche sur les macromolécules de l'université ABOUBAKR BRLKAID de Tlemcen sous la bienveillance de Mr Mustapha BENMOUNA que je remercie très vivement.*

*A ma raison de vivre, mes très chers enfants Islam et Rachad*

*A mes parents, surtout à ma mère qui m`a tout partagée et qui m`a soutenue avec sa disponibilité et ses encouragements à cet aboutissement.*

*En hommage reconnaissant à ma sœur pour son affection*

*A mes frères surtout Walid pour sa présence*

*A mon beau-frère et ma nièce Naziha*

*A tous ceux qui me sont chers*

*``Science sans conscience n`est que ruine de l`âme...``*

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>8</b>
1.1. Introduction	8
1.2. Elaboration, modification et hétérogénéités des gels	10
1.3. Cinétique de polymérisation	15
1.4. Cinétique de gonflement	17
1.5. SDS PAGE	22
<b>CHAPITRE 2 : CONSIDERATIONS EXPERIMENTALES : Produits utilisés, méthodes de préparation des échantillons et techniques expérimentales</b>	<b>27</b>
2.1. Produits utilisés	27
2.2. Méthodes de préparation des échantillons et techniques expérimentales	30
2.2.1. Spectroscopie UV-Visible	32
2.2.2. Cinétique de polymérisation : Variation de la température de polymérisation en fonction du temps.	34
2.2.3. Cinétique de gonflement	35
2.2.4. Electrophorèse (SDS-PAGE)	37
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS</b>	<b>45</b>
3.1. Spectroscopie UV-Visible	45
3.2. Profils de la température de polymérisation	47

3.3. Cinétique de gonflement	50
3.3.1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée	50
3.3.2. Gonflement dans la solution tampon (Tank Buffer)	52
3.4. SDS-PAGE	54
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS</b>	<b>63</b>
4.1. Spectroscopie UV-Visible (cinétique de gélification)	63
4.2. Profils de la température et effet Trommsdorf : cinétique de polymérisation	67
4.3. Cinétique de gonflement	69
4.3.1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée	69
4.3.2. Gonflement dans la solution tampon	71
4.4. SDS-PAGE	<b>73</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>77</b>

## **ABREVIATIONS**

PAAm : Polyacrylamide

AAm : Acrylamide

Bis : N,N'-méthylène-bisacrylamide

APS : Ammonium Persulfate

TEMED : N,N,N',N'-Tétraméthyléthylénediamine

PEG : Poly-Ethylène Glycol

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

PDS : Peroxyde- Di Sulfate

DMA : DiMéthylAcrylamide

SMS : Sodium MétabiSulfite

PDMA : PolyDiMéthylAcrylamide

SMA : Sodium MéthAcrylate

BMA : Butyl Méthacrylate

EMA : Ethyl MéthAcrylate

SA : Acrylate de Sodium

Dex-MA : Dextran - Maléique Anhydride

NAT : N-Acryloyl-Tris-(hydroxy-méthyle) amino-méthane

PEO : Poly(Ethylène-Oxyde)

PVP : Poly-Vinyle-Pyrrolidone

PAA : Poly (Acide Acrylique)

MAPTAC : [3-(MéthAcrylamido) Propyl] Triméthyl- Ammonium Chloride

EGDMA : Ethylène Glycol Di MéthAcrylate

pI : point isoélectrique

MSE : Mixed Solute Exclusion

PNIPA : poly (N-IsoPropyl Acrylamide)

HMW : High Molecular Weight

LMW : Low Molecular Weight

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

2D-GE : bidimensionnel-Electrophorèse en Gel

SM : Spectrométrie de Masse

ESI : Electro Spray Ionisation

MALDI-MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Mass Spectroscopy

CSGE : Conformation Sensitive Gel Electrophoresis

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les gels sont des réseaux de polymères réticulés susceptibles de gonfler lorsqu'ils sont immergés dans un liquide remplissant les conditions de bon solvant. Le système est un filtre sélectif qui permet la diffusion de molécules de soluté dans la solution dans un sens ou dans l'autre du réseau polymère et qui sert de filet - matrice favorisant la séparation et empêchant le liquide de couler. Dans le cas de l'eau et si le réseau de polymère est hydrophile on parle d'un hydrogel.

Les gels peuvent être utilisés comme absorbants dans les couches jetables, comme filtres pour la purification de l'eau ou comme systèmes de séparation en chromatographie et en électrophorèse. Ils présentent un intérêt particulier dans le largage contrôlé des médicaments. Les hydrogels de polyacrylamide (PAAm) en particulier trouvent une large utilisation dans les applications biologiques et médicales, en chromatographie et en électrophorèse [1-3]. Ils ont un grand intérêt dans les séparations biochimiques, en analyse et protection des protéines lorsque la taille des pores est appropriée pour un tamisage efficace des protéines en électrophorèse.

Une polymérisation radicalaire libre aqueuse entre le monomère d'acrylamide (AAm) et le réticulant N,N'-méthylène-bisacrylamide (Bis) initiée par le couple Ammonium Persulfate (APS) / N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) est la méthodologie la plus courante pour fabriquer un gel de polyacrylamide (PAAm). Une transparence optique, une neutralité électrique, de bonnes propriétés mécaniques et une facilité de synthèse à porosité contrôlée sont particulièrement souhaitées dans la séparation des protéines en électrophorèse. Les développements de la physico - chimie de ces gels a été favorisée par les besoins nouveaux en protéomie. Celle-ci a réellement ouvert le champ au développement de nouvelles technologies de pointe permettant la détection rapide d'un grand nombre de protéines à l'aide de gels de PAAm modifiés. Pour avoir une vue globale des protéines dans un tissu, il est nécessaire de les identifier, les quantifier, de déterminer leurs localisations, leurs modifications, leurs interactions et fonctions. Des tentatives de manipulations des réseaux de PAAm pour améliorer leurs propriétés ont été proposées en suivant des voies diverses. Des exemples de modifications possibles consistent à faire varier la concentration de monomère ou de réticulant [4,5], la température de polymérisation [6,7], à employer des additifs hydrophiles comme le polyéthylène glycol



(PEG) [8,9], l'agarose [10] ou encore à remplacer le réticulant Bis par d'autres [11-14]. La plupart de ces essais n'ont pas permis de reproduire un système susceptible d'être commercialisé. La formation de gels de PAAm dépend de nombreux paramètres comme la concentration d'AAM, le rapport (AAM / Bis) et la présence d'additifs ou solvants autres que l'eau [15]. Des études ont montré que les propriétés des gels dépendent fortement du taux initial de dilution. A mesure que la quantité d'eau augmente, la structure du réseau devient plus déformée. De ce fait, il est important de bien cerner l'influence des divers additifs sur les propriétés du matériau sachant que les gels sont des systèmes utilisés dans le largage des médicaments et par conséquent leur degré de toxicité doit être pris en compte.

Malgré de grands progrès, une compréhension fondamentale des propriétés des gels est encore insuffisante pour une conception rationnelle des gélifiants. Pour de telles conceptions, il est important de savoir comment les molécules de soluté interagissent avec le gel et comment elles se répartissent entre la phase gel et la phase liquide qui l'entoure. Parmi les tentatives faites pour modifier le réticulant, seuls quelques uns correspondent à une fonctionnalité potentielle supérieure à quatre. La fonctionnalité potentielle est le nombre de chaînes de polymères susceptibles d'être reliées à travers un monomère et correspond à deux fois le nombre de doubles liaisons. Les réticulants à fonctionnalité supérieure à quatre sont caractérisés par une faible solubilité dans l'eau et ils peuvent subir une dégradation de transfert de chaîne durant la polymérisation. La réactivité du réticulant joue un rôle important dans la formation structurale du réseau.

Quoique de nombreux travaux existent dans la littérature sur les propriétés physiques des gels de PAAm, leur mécanisme de formation reste peu connu. Les transitions de phases et le comportement des gels sont déterminés par quatre types fondamentaux d'interactions à l'échelle moléculaire : interactions de Van Der Waals, hydrophobiques, liaisons hydrogènes et interactions ioniques. Les hydrogels de PAAm absorbent une grande quantité d'eau due à la présence de groupements amides hydrophiles. Une forte absorption d'eau cause un manque de stabilité hydrolytique et une faible résistance mécanique ce qui limite l'usage des hydrogels dans de nombreuses applications. La performance mécanique du PAAm peut être améliorée par la formation de réseaux interpénétrés. Les gels ayant des interactions de type métal-ligand ont montré de meilleures propriétés thermomécaniques, un  $T_g$  élevé et une haute température de dégradation [16,17].

Ces gels aqueux tridimensionnels covalents sont insolubles dans l'eau et peuvent développer une résistance mécanique et établir un équilibre avec le liquide à la température de l'environnement. Une variation de concentration, de structure ou de fonctionnalité du monomère ou du réticulant peut modifier la structure et la porosité du gel. Le nombre de techniques utilisées pour explorer la porosité des hydrogels est limité parce qu'on doit parfois modifier la température ou le solvant ce qui pourrait entraîner une contraction ou un gonflement du gel. Il faudra donc bien maîtriser le phénomène de gonflement dans différentes conditions environnementales. Il n'y a pas une méthode unique permettant de corréler entre la formation du réseau tridimensionnel et les propriétés d'usage. Souvent on a recours à une multitude de techniques pour caractériser les gels synthétisés.

De nombreux exemples existent dans la littérature relatifs aux gels formés par copolymérisation de monomères mono- vinyliques et di- vinyliques et donnant des réseaux construits selon un mode statistique. D'autres travaux ont décrit la synthèse de quelques dérivés d'acryloyl réticulés à l'aide de monomères diamide avec une substitution de carbone  $\alpha$ -vinylique. Ces travaux ont introduit le concept de réactivité différentielle du vinyle. Une modification de la structure chimique vinylique peut conduire à une nette amélioration des propriétés du gel comme la porosité. Les gels idéaux ont une distribution homogène de réticulations tandis que les gels réels montrent des hétérogénéités spatiales dans le volume du gel qui sont d'une importance considérable pour la caractérisation de leurs propriétés d'usage. De point de vue pratique, les hétérogénéités spatiales sont nuisibles puisqu'elles réduisent la clarté optique et la tenue mécanique du gel et par conséquent affectent les performances dans les applications concrètes (exemples : lentilles de contact et super absorbants). La concentration initiale de monomère joue un rôle important et affecte la structure du réseau. Lorsque la concentration de polymère diminue, le gel est déformé et montre des défauts comme les boucles, les réticulations inefficaces ou des chaînes pendantes. L'augmentation de la quantité d'eau entraîne un gonflement des gels et aucun réseau ne se forme au-delà d'une quantité limite de solvant.

Le couple rédox standard APS / TEMED est capable d'oxyder les substances contenant des groupes amines produisant ainsi des N-oxydes. S'ils restent dans le gel, ces derniers peuvent oxyder les protéines spécialement à travers une transformation des résidus S – H en liaisons S – S. Le gonflement des gels dépend de la structure du réseau et est étroitement lié aux conditions de préparation. Ainsi, la compréhension du mécanisme de formation du réseau est d'un grand intérêt pour comprendre et contrôler ses propriétés physiques. Dans certains cas, des ions métalliques ont été introduits dans les gels comme

greffons de polymère. De tels réseaux sont sensibles aux ions métalliques et trouvent un usage important dans le domaine électronique et en technologie environnementale.

L'un des objectifs de cette thèse est de mettre au point un gel à base de PAAm modifié avec du dextran, ayant des propriétés similaires voire améliorées par rapport au gel commercial duracryl (Genomic Solution). Les gels synthétisés permettent de faire une analyse protéomique précise et peu coûteuse avec la possibilité de modifier simplement la constitution de base du gel de PAAm selon le besoin de l'application ciblée. Le duracryl est constitué d'une matrice d'AAM élastique mais résistante et utile dans un grand nombre d'applications en électrophorèse. La matrice reste stable comme solution réfrigérée pouvant tenir jusqu'à une année. L'incorporation de catalyseurs appropriés au duracryl forme une matrice renforcée et de qualité supérieure aux gels de PAAm en termes de force mécanique, d'élasticité et de propriétés de coloration des protéines. La sensibilité de détection des protéines par une coloration argentée, la linéarité des dépôts d'argents en fonction des charges de protéines sont équivalentes aux gels standards de PAAm. La possibilité de modifier la taille des pores selon des prescriptions et des procédures opératoires simples est une avancée majeure dans ce domaine. Pour atteindre ce but, différents gels de PAAm, modifiés par ajout de dextran, ont été fabriqués et analysés en changeant la concentration de monomère et de réticulant selon la taille des protéines à séparer et le rôle du gel, selon qu'il s'agisse d'un gel de séparation ou d'un gel de concentration. Un mode de synthèse adéquat a été mis au point ainsi que des études faisant appel à plusieurs méthodes expérimentales ont été effectuées. Des études d'électrophorèse SDS-PAGE, UV-Visible, cinétique de polymérisation, cinétique de gonflement ont été menées [18].

En plus de cette **introduction générale**, cette thèse est organisée en **4 chapitres** et une **conclusion générale**. Le **chapitre 1** permet d'avoir une idée sur l'état de l'art du problème. Il passe en revue certains travaux qui ont marqué des tournants majeurs dans la compréhension du comportement des gels dans différentes conditions. Sans être complet, il montre les contributions majeures et les tendances actuelles dans la recherche sur ce sujet. Le **chapitre 2** décrit la partie expérimentale concernant les produits utilisés et leur provenance, les méthodes de préparation des échantillons en vue des différentes analyses. Il décrit également les techniques expérimentales choisies dans cette investigation en montrant les appareillages utilisés. Le **chapitre 3** fait le bilan des résultats obtenus par les différentes techniques utilisées alors que le **chapitre 4** les discute et les analyse à la lumière des connaissances existantes et en essayant de justifier et d'interpréter les

phénomènes observés et les données expérimentales. La thèse est clôturée par une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus et les perspectives de poursuite de ce travail.

# CHAPITRE 1

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.6. Introduction

Dans ce chapitre nous faisons une sélection de travaux qui à notre avis ont suscité des avancées majeures dans la compréhension des gels depuis leur préparation jusqu'à leurs propriétés d'usage. Un gel est un réseau tridimensionnel formé d'une matrice de polymère gonflée par un liquide qui peut être un solvant organique ou une solution aqueuse. Le polymère a pour rôle de retenir le liquide et l'empêcher de couler comme dans une solution ordinaire. L'utilisation du gel dépend de sa transparence ou son opacité quand à ses propriétés optiques ou photo chimiques, elle dépend également de son élasticité en relation avec son comportement mécanique et visco-élastique. Toutes ces propriétés dépendent en particulier de la nature et de la concentration du monomère et du réticulant [19,20]. L'opacité d'un gel est due essentiellement aux hétérogénéités structurales qui produisent des fluctuations d'indice de réfraction à l'origine d'une forte dispersion de la lumière. Malgré les efforts déployés et les progrès réalisés dans la compréhension de leurs propriétés, les gels demeurent un sujet d'intérêt particulier dans la littérature et beaucoup reste à faire pour atteindre une conception rationnelle de leur utilisation. Par exemple, il faut bien comprendre comment les molécules de soluté interagissent avec le gel et se répartissent entre la phase gel et la phase liquide qui l'entoure. Cette répartition dépend de deux effets majeurs : l'exclusion de taille et l'attraction / répulsion moléculaire. Les gels établissent un équilibre avec le liquide à la température de leur environnement et montrent une certaine résistance mécanique [21]. Les variations de la nature du monomère et du réticulant, de leurs concentrations et de leurs fonctionnalités peuvent changer la structure du gel et sa porosité [22]. Il n'y a pas une méthode unique pour établir la corrélation entre la formation du réseau tridimensionnel et les propriétés du gel et souvent, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques pour caractériser ces propriétés.

Pour mettre au point un gel ayant des caractéristiques définies, il est important de pouvoir corréler la composition initiale, la méthode et les conditions de préparation avec la structure du réseau (en particulier, le nombre moyen d'unités monomères entre les points de réticulation) et les caractéristiques physiques comme le gonflement et les propriétés mécaniques du gel.

L'ossature du gel constituée par le réseau polymère peut être synthétisée par copolymérisation de monomères mono- vinyliques et di- vinyliques et des exemples de tels systèmes sont nombreux dans la littérature. Le di- vinyle réticulant a une structure similaire à celle du mono- vinyle, et le réseau est construit sur un mode statistique. La synthèse de tels réseaux peut conduire aux hétérogénéités qui ont une grande influence sur les propriétés physiques et sur le niveau de performance dans des applications [23-25]. En contrôlant la cinétique de polymérisation, il devient possible de modifier les caractéristiques physiques du gel. Il est donc utile de se donner la capacité de contrôler la séparation de phases, les réactions de réticulation et l'exotherme de polymérisation. Lorsque la polymérisation a lieu en milieu aqueux, les propriétés du gel dépendent du degré de dilution [26-28] et le réseau se déforme de plus en plus si la quantité d'eau augmente.

Sur le plan théorique des efforts ont été faits pour décrire les propriétés structurales des gels tenant compte des états pré- et post- gel [29]. Les théories classiques de gélification de Flory [30] et Stockmayer [31] décrivent la formation d'un réseau idéal et homogène en cours de polymérisation. Ces théories ont suscité de nombreux travaux dans la caractérisation des systèmes tridimensionnels et la compréhension des processus de polymérisation pour développer des méthodes de contrôle de la cinétique en modifiant la fonctionnalité, la réactivité et la composition de la solution initiale [32]. Le phénomène de gonflement dépend de la structure du réseau qui est étroitement liée aux conditions et au mécanisme de sa formation [33].

Etant donné le très grand nombre de travaux consacrés aux gels depuis des décennies, il est clair qu'une revue complète est pratiquement impossible et nous devons nous limiter à certains aspects particuliers. Pour cette raison, nous avons choisi de nous limiter essentiellement aux gels de PAAm et certaines de leurs modifications et nous intéresser presque exclusivement aux aspects traités dans cette thèse comme les méthodes de préparation et les hétérogénéités de structure, la cinétique de polymérisation, le gonflement et l'électrophorèse de type SDS-PAGE. Le choix de l'Acrylamide (AAm)

comme monomère de base est motivé par le fait que les gels à base d'AAM ont été l'objet d'une attention particulière pendant les dernières décennies.

### **1.7. Elaboration, modification et hétérogénéités des gels**

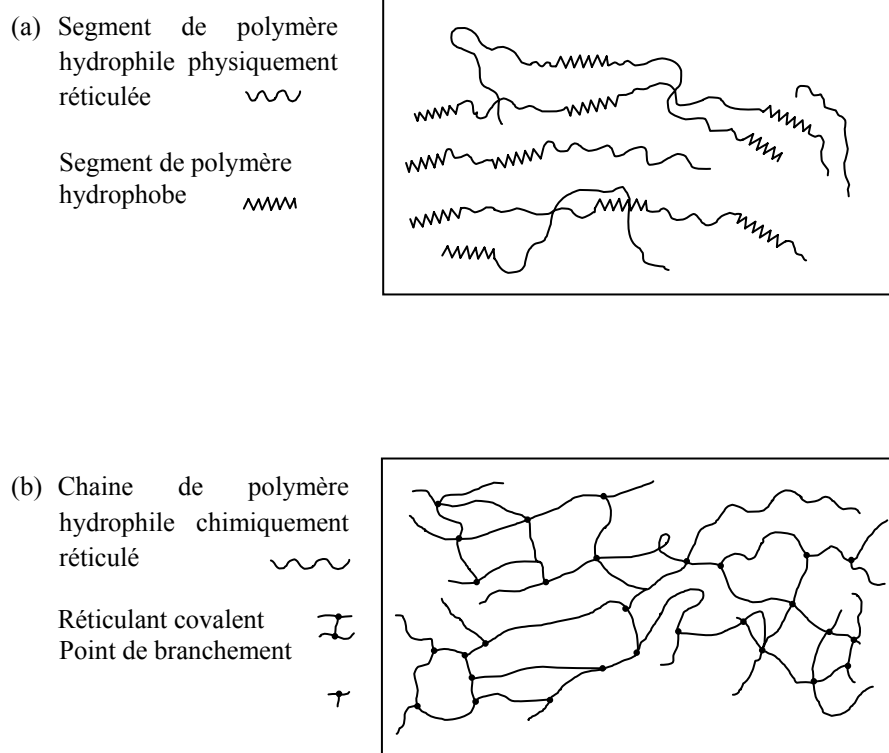
La synthèse des gels est relativement facile et les gels peuvent être modifiés et rendus biocompatibles pour être exploités dans de nombreuses applications de biocatalyseurs [34], bio-séparateurs [35], adsorption de protéines [36,37] ou encore de récupération d'ions uranyles [38-40]. Les gels à base d'AAM sont particulièrement intéressants pour ces raisons. Cependant, le couple rédox standard Peroxydisulfate (PDS) et Tétraméthylènediamine (TEMED) qui est souvent utilisé dans l'initiation de la polymérisation de l'AAM est capable d'oxyder les substances contenant des groupes amines, produisant ainsi des N-oxydes susceptibles d'oxyder les protéines et transformer les résidus S – H en liaisons S – S [41]. L'addition de polymères à la solution (AAM / Bis) avant gélification peut mener à des chaînes latéralement regroupées par liaisons hydrogène [42]. Selon la composition du mélange initiale, on peut être en mesure de contrôler la porosité et les propriétés mécaniques du gel [43,44].

L'effet de l'initiateur sur l'homogénéité du gel a été traité par Okay et al. [45] qui ont analysé le processus de gélification du mélange AAM / Diméthylacrylamide (DMA) par diffusion de lumière à temps réel. Ils ont utilisé le couple rédox pour initier la polymérisation en présence du Bis comme agent réticulant. Les radicaux libres du TEMED initient la polymérisation donnant un taux trois fois plus élevé qu'en son absence [46]. Un autre système initiateur est la paire rédox APS/sodium métabisulfite (SMS) dont le mécanisme n'est pas encore bien établi. La génération du radical libre se produit en utilisant des anions bisulfites [47,48] puisque l'ion bisulfite peut réagir avec l'oxygène pour former une paire rédox produisant des radicaux libres susceptibles d'initier la polymérisation [49]. La polymérisation radicalaire libre en présence de la paire APS/SMS et d'oxygène se fait en plusieurs étapes. Elle commence lentement avant de s'accélérer comme dans le cas du couple APS/TEMED. En remplaçant le TEMED par le SMS, le degré d'hétérogénéité change dans le PAAM et le PDMA et le système APS/SMS donne des gels relativement plus homogènes sur une large gamme de densité de réticulation. Gelfi et al. [7] ont suggéré que les hétérogénéités augmentent avec la concentration et la fonctionnalité du réticulant. Les polymères sensibles aux ions métalliques sont utiles dans les applications de préservation de la qualité de l'environnement et dans certaines

technologies de pointe notamment en électronique. C'est ainsi que des ions métalliques sélectifs ont été introduits dans les gels de PAAm en tant que greffons aux points de réticulation [50,51]. D'autre part, l'acide maléique, l'acide itaconique et l'acide éthylène-diamine tétra-acétique sont des agents actifs fréquemment introduits dans les gels de PAAm pour les rendre des chélateurs efficaces. Kantoglu et al. [52] ont modifié le PAAm en greffant l'acide éthylène-diamine tétra-acétique à l'aide d'un support pour l'absorption sélective des ions uranyles, en présence de cadmium et de plomb. Les gels de poly(acrylamide-co-acide-maléique) ont été utilisés en absorption cationique monovalente [53], absorption des ions  $\text{UO}_2^{2+}$  [54], et les réarrangements compétitifs du  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  [55]. D'autres applications des gels de PAAm en haute technologie peuvent voir le jour en modifiant le groupe amide par alkylation [56], ou par absorption d'ions métalliques [57]. L'hydrolyse habituellement partielle dans les conditions opératoires [58,59] aboutit à la génération de groupes carboxylates sur le polymère. Diverses tentatives ont été faites pour améliorer le comportement mécanique des gels en modifiant les méthodes de synthèse [60-63] avec différents réticulants, ou la copolymérisation avec un second monomère qui est plus hydrophobe que le PAAm ; tel que le méthacrylate de sodium (SMA), le méthacrylate de butyl (BMA), le méthacrylate d'éthyl (EMA), et l'acrylate de sodium (SA).

Notons que les gels peuvent également être préparés en utilisant des réticulations physiques formées en présence d'un monomère hydrophobe [64,65] dans la chaîne. La différence de la structure moléculaire des hydrogels préparés par réticulations chimiques ou physiques est illustrée sur la figure 1.1. Nous avons repris intégralement cette figure de la référence 48 pour illustrer les deux processus de réticulation les plus courants. Il s'agit d'une représentation classique qui n'a aucun aspect particulier ou innovant et c'est la raison pour laquelle nous n'avons pas essayé de l'adapter ou de la modifier.





**Figure 1.1 :** Processus de réticulation physique ou chimique d'un réseau d'après la référence [66].

Les polysaccharides comme la cellulose, l'amidon, la chitine ou le dextran sont des polymères naturels utiles dans les industries pharmaceutiques (vecteurs de médicaments et pansements) [67,68] et dans la promotion des produits biodégradables, en médecine et d'autres applications principalement pour leur biocompatibilité et biodégradabilité [69]. Ces polymères contiennent un pourcentage élevé de groupements hydroxyles et peuvent être transformés facilement en hydrogels. En particulier, le dextran est un polysaccharide amorphe soluble dans l'eau et les hydrogels à base de dextran fonctionnalisés avec des doubles liaisons de type méthacrylates [70-73] ont souvent été étudiés. Van Dijk-Wolthuis et al. ont synthétisé le méthacrylate de glycidyl-dextran en présence d'ammonium persulfate (APS) et de TEMED [74]. Le précurseur anhydride maléique-dextran (dex-MA) a aussi été synthétisé par Chu et al. et les hydrogels hybrides (dex-MA/poly(N-isopropylacrylamide)) ont été préparés par irradiation UV [75]. D'autres méthodes simples de préparation d'hydrogels de dextran ont été suggérées à l'aide d'un réticulant bifonctionnel comme l'isocyanate [76]. Le dextran dialdéhyde a été utilisé comme agent de réticulation de gélatines biocompatibles et biodégradables [77]. Les propriétés

rhéologiques [78,79] et les caractéristiques de libération [80] ont montré que l'action chimique de l'hydrogel (gélatine – dextran) dialdéhyde influence le mode de libération dans le temps.

D'autre part, le Duracryl™ est une matrice d'acrylamide mécaniquement forte et élastique, utile pour une large variété d'applications en électrophorèse. La matrice reste stable en solution réfrigérée jusqu'à une année. En ajoutant un catalyseur approprié, le Duracryl™ forme un gel renforcé supérieur aux gels de PAAm en termes de force mécanique, d'élasticité et de propriétés de coloration des protéines. La sensibilité de détection des protéines par la coloration argentée, ainsi que l'allure linéaire des dépôts d'argents en fonction des charges de protéines est équivalente aux gels standards d'AAM / Bis et ne modifie pas la migration des polypeptides relative à la matrice standard d'AAM / Bis. Jusqu'à présent, le Duracryl™ (Genomic Solutions) reste l'unique polymère renforcé de matrice à base de PAAm commercialisé et disponible pour les applications en électrophorèse [81,82]. Il a une matrice plus résistante aux déchirures et ruptures en cours de manipulation qu'un gel de PAAm classique en offrant de grandes possibilités d'applications en protéomique. Le Duracryl™ montre cependant deux inconvénients majeurs, il peut devenir trouble et contribuer ainsi au bruit de fond en fluorescence par suite de dispersion de la lumière, et ensuite, pendant la séparation en électrophorèse des protéines, une distorsion des bandes de haut poids moléculaire et un dédoublement des spots protéiques peuvent apparaître. Cette tendance à fausser les bandes protéiques est devenue un sujet de préoccupation ces dernières années. La solution d'AAM connue sous le nom de Rhinohide offre plus d'avantages de performance que le Duracryl™ avec une force mécanique élevée, une ouverture vers les technologies modernes de la protéomique et la possibilité d'éliminer le dédoublement parasite des spots et l'opacité de la matrice [83-86].

De nombreuses tentatives d'amélioration de la qualité des gels basées sur le choix d'un bon réticulant ont été proposées. La fonctionnalité potentielle joue un rôle important et relativement peu de tentatives ont utilisé une fonctionnalité supérieure à 4 puisqu'un tel réticulant est généralement insoluble dans l'eau [87,88] et peut subir une dégradation de transfert de chaîne durant la polymérisation [89]. Rappelons que la fonctionnalité potentielle représente le nombre moyen de chaînes reliées au point de réticulation et correspond normalement à 2 fois le nombre de doubles liaisons. Sachant que la réactivité du réticulant joue un rôle important dans la formation structurale du réseau [90], une procédure pouvant offrir 4 agents de réticulation hybride (1-4) a été développée à l'échelle

commerciale [91]. La conception de dérivés d'acryloyl réticulés avec des monomères diamides moyennant la substitution à un carbone  $\alpha$ -vinylique a été mise au point [13]. Le concept de la réactivité différentielle du vinyle a été introduit et les résultats préliminaires montrent que la modification de la structure chimique vinylique conduit à une amélioration des propriétés du gel comme la porosité. La structure poreuse peut être manipulée en modifiant la réactivité de la double liaison ou la fonctionnalité potentielle du réticulant [92-97]. La corrélation entre la concentration du monomère et l'homogénéité spatiale des gels de PAAm a montré [98] que l'intensité de dispersion augmente avec la concentration du monomère [99-104]. A titre d'exemple, le tris-acryl [N-acryloyl-tris-(hydroxy-méthyle) amino-méthane, NAT] a été préconisé pour produire des gels ayant des pores de grande taille pour l'électrophorèse [105]. Le monomère tris-acryl a été précédemment utilisé comme support chromatographique par Girot et Boschetti [106]. Ce monomère bien que fortement hydrophile montre une instabilité inhérente et se dégrade rapidement. Les polymères hydrophiles non-ioniques comme le poly(éthylène-oxyde) (PEO) [107-110], le poly-vinyle-pyrrolidone (PVP) [111,112], le dextran [113,114] et le polyacrylamide (PAAm) [115-117] ont aussi été utilisés pour analyser les effets de sel.

Les gels chargés ou polyélectrolytes sont formés à partir de polymères possédant des groupes ionisables. Ces gels peuvent subir des variations de volume importantes et contrôlables suite à de petites variations dans les conditions environnementales comme une variation de la température ou du pH comparables aux phénomènes ayant lieu dans les systèmes physiologiques, biologiques ou chimiques [118]. La présence de groupements acides carboxyliques donne au gonflement du gel, par exemple Poly (acide acrylique) (PAA), un caractère fortement dépendant du pH [119-123].

Un gel de PAAm peut avoir un caractère polyélectrolyte s'il est préparé en présence de [3-(méthacrylamido) propyl] triméthyl- ammonium chloride (MAPTAC) [124] qui est cationique. La distribution de taille des pores est fortement fonction de la charge et donc de la concentration du monomère cationique. L'influence du sel sur la porosité et le gonflement des gels chargés dépend de l'écrantage des interactions électrostatiques et l'effet Donnan [125-127] provenant des petits ions.

La gélification en cours de polymérisation génère des anomalies comme les chaînes pendantes, la cyclisation ou la réticulation multiple [128,129]. Ces anomalies donnent lieu à des défauts de réseau affectant ses propriétés physiques comme le gonflement, l'élasticité ou la perméabilité. Du point de vue pratique, les hétérogénéités spatiales ne sont pas

souhaitables puisqu'elles réduisent la clarté optique et la force mécanique qui sont à l'origine de nombreuses applications comme dans les lentilles de contact et les super absorbants. Ces hétérogénéités produisent des fluctuations locales de concentration qui peuvent être analysées par les méthodes de dispersion de la lumière, des rayons X ou des neutrons [130-133]. La formation d'agrégats du Bis pour un réticulant plus réactif que le monomère d'AAM [134,135] peut aussi induire des hétérogénéités [136-138].

Benguigui et al. [139] ont proposé un modèle théorique d'hétérogénéité dans le but d'expliquer certaines propriétés des gels [140]. Ils ont relié la formation d'hétérogénéités à la cinétique de croissance des chaînes et au processus de réticulation [141,142]. L'idée de fluctuations critiques figées donnant lieu à des domaines micro-phases dans la solution pré-gel a aussi été invoquée.

### **1.8. Cinétique de polymérisation**

Quoique de nombreux travaux aient été consacrés à l'étude des propriétés physiques des gels de PAAm, le mécanisme de formation reste encore à élucider dans de nombreux cas. Baselga et al. ont étudié la copolymérisation de l'AAM et du Bis en solution aqueuse et ont évalué le taux de réactivité des vinylyles au Bis à 1,14 [143-145]. Ce taux a été contesté par Tobita et al. [146] qui ont montré que la valeur de 1,14 ne pouvait pas expliquer les hétérogénéités observées et ont montré qu'une large fraction des groupements vinylyles était consommée par cyclisation et réactions multiples de réticulation responsables de la distribution hétérogène des points de réticulations dans le gel de PAAm [114]. La croissance de la masse de polymère peut conduire à une séparation de phase [147]. En présence d'un monomère di-fonctionnel comme l'éthylène glycol-di-méthacrylate (EGDMA), le N,N'-méthylènebisacrylamide (Bis) ou le 3-oxopentaméthylène-di-méthacrylate le système peut réticuler donnant un gel [148,149]. Un minimum de 2 doubles liaisons réactives est nécessaire pour assurer la réticulation et une structure micro gel apparait là où le réticulant se regroupe autour des chaînes de PAAm. Cette structure apparait pour de faibles taux de polymérisation, suite à des changements de température ou lorsque la fonctionnalité du réticulant augmente. Les réticulants à fonctionnalité élevée ont une réactivité élevée, ils favorisent la formation de micro-gels et donnent lieu à une forte diminution de l'effet Trommsdorf [150]. La température de polymérisation a aussi une influence sur la réactivité des espèces, sur le taux de dissociation de l'initiateur (APS) en radicaux libres, sur la propagation et la cinétique de la polymérisation. Une diminution

d'élasticité est obtenue lorsque la température augmente. L'opacité d'un gel est attribuée à la séparation de phase et à la formation de domaines dispersés dans le réseau. L'augmentation brusque de la température au point de gel porte le nom d'effet Trommsdorf. En ce point, la mobilité des chaînes est inhibée à cause de la croissance du nombre de points de réticulation qui se traduit par l'incapacité des radicaux de se terminer et la croissance continue jusqu'à consommation totale des monomères. La hausse de température durant la polymérisation est liée au taux de conversion tandis que l'effet Trommsdorff représente le point où la mobilité chute à un degré avancé du taux de réticulation. La capacité des radicaux à se terminer par une auto-réaction est freinée et les chaînes continuent de croître par diffusion de monomères.

Une étude de cinétique de polymérisation a été entreprise par Pekcan et al. [151] en utilisant différents réticulants à partir d'une transformation du Bis et le changement de la nature du radical. En partant de la formule du Bis, Pekcan et al. [152] ont fait l'étude avec plusieurs choix du radical R comme  $R=CH_3$  (mBis) etc. Ils ont observé que le réticulant méthacrylate a une réactivité élevée mais donne un taux de polymérisation plus faible et un effet Trommsdorf moins prononcé. Ce réticulant est introduit dans le mélange avant le monomère AAm et peut donc former des noyaux denses à partir desquels les chaînes de PAAm croissent. Une légère augmentation de viscosité au début de la polymérisation permettant aux chaînes de PAAm d'avoir suffisamment de flexibilité pour diffuser et se terminer. La température maximale et le taux de polymérisation diminuent systématiquement lorsque la fonctionnalité du réticulant augmente. Pour le méthacrylamide, il y a eu une grande diminution du maximum de température lorsque la fonctionnalité augmente. Ces auteurs ont également étudié l'effet de la température de polymérisation sur la cinétique [153].

L'effet Trommsdorff est interprété comme le moment où la mobilité des chaînes de polymère est inhibée à cause du nombre croissant de points de réticulation suivi d'une augmentation brusque de la température. La cinétique chimique a pour but d'élucider les chemins et mécanismes réactionnels et de déterminer les taux de réaction. Différentes méthodes peuvent être utilisées à cette fin comme les méthodes spectroscopiques (UV-VIS, IR, RAMAN), la polarimétrie à travers la mesure du pouvoir rotatoire ainsi que les méthodes couplées de chromatographie et de spectrométrie de masse. La chromatographie permet d'analyser l'échantillon et séparer ses constituants alors que la spectrométrie permet de séparer les différentes masses et d'identifier les espèces séparées. Il faut noter

que trois étapes sont nécessaires pour la rencontre de deux radicaux : diffusion de deux chaînes en croissance, réorientation des radicaux par diffusion segmentale et franchissement de la barrière énergétique pour rendre la réaction possible. L'élévation rapide de la viscosité du milieu diminue ce processus (diminution de la constante de réaction) et entraîne une augmentation de la concentration en radicaux, sans toutefois limiter la diffusion de monomères. On a alors une augmentation de la vitesse de polymérisation. A l'approche de la vitrification du réseau, les réactions de propagation sont contrôlées par la diffusion des monomères et la vitesse de polymérisation diminue. Il y a un processus d'auto-décélération. La gélification est le passage de l'état liquide à un état viscoélastique. C'est une transition irréversible à un certain taux de conversion. Les mesures rhéologiques sont souvent utilisées, mais il existe un grand nombre d'autres techniques. Müller et al. [154] ont montré que la façon la plus précise pour déterminer le point de gel, est de considérer le facteur de perte. Celui-ci devient indépendant de la fréquence de mesure au gel.

La relation entre le temps de gel  $\tau_{gel}$  et la température peut souvent être exprimée par une loi de type Arrhenius proposée par Yang et al. [155] :  $\ln(\tau_{gel}) = A + E_d/RT$  où le temps de gel et la température sont exprimés respectivement en minutes et degré Kelvin. En considérant que le paramètre (A) est une fonction linéaire de la concentration en inhibiteur et en accélérateur. L'énergie d'activation est la quantité d'énergie nécessaire pour initier la réaction chimique et vaincre la barrière énergétique. Cette barrière énergétique peut être réduite en utilisant un catalyseur.

## **1.9. Cinétique de gonflement**

Les gels hydrophiles doivent cette propriété à la présence de groupes fonctionnels hydrophiles tels que les acides carboxyliques, amines, amides et alcools entre autres. Dans certaines conditions ces gels peuvent subir une réorganisation importante en volume. En faisant varier certains paramètres comme la composition du solvant, la température, le champ électrique, les liaisons ioniques, le pH, le volume peut subir un changement discontinu, réversible et pouvant atteindre plusieurs ordres de grandeur. Ce phénomène a été observé sur des gels naturels et synthétiques. Ainsi, les gels peuvent être utilisés comme matériaux intelligents répondant d'une manière prédictible à des signaux extérieurs. Ce changement de volume provient en partie d'une transition « pelote (coil) –

globule` du polymère. Mais la transition `pelote –globule` est continue alors que dans un gel les chaînes sont toutes liées ensemble et le comportement collectif donne un changement de volume discontinu. Un gel gonfle dans un bon solvant et la majeure partie du gel gonflé est occupée par le solvant. Par conséquent, les propriétés du gel sont proches de celles d'une solution de polymère avec la différence majeure qu'un réseau de chaînes chimiquement liées n'est pas complètement soluble dans le solvant. Cette différence qui empêche le gel de couler comme un liquide fait de lui un matériau utile dans de nombreuses applications.

Le gel peut subir une transition de phase en volume et l'augmentation de température dans le liquide entraîne un rétrécissement du gel d'une manière réversible. D'autre part, le degré d'ionisation du gel joue un rôle important puisqu'un gel ionisé peut connaître un changement de volume d'un facteur  $10^3$ . Quand un gel et un liquide sont mélangés, ils diffusent l'un dans l'autre sous l'influence de la pression osmotique et les parties du gel en contact avec le liquide gonflent en premier. Cette différence temporaire dans le taux de gonflement donne des instabilités ce qui se manifestent par des motifs périodiques sur la surface du gel et en régime stationnaire, le gel reprend sa forme initiale.

Pour l'étude du gonflement des gels, il est important de connaître sa microstructure mais les méthodes usuelles comme la porosité de mercure ou l'adsorption d'azote ne sont pas utiles parce que les gels gonflent en milieu liquide. Pour cette raison, on utilise des méthodes indirectes pour mesurer les tailles des pores et leur distribution basées sur l'exclusion du soluté mélangé (Mixed Solute Exclusion) (MSE) [156,157]. Cette méthode consiste en 3 étapes:

- La solution est mise en contact avec le gel.
- Diffusion du soluté dans le gel jusqu'à l'équilibre.
- Séparation gel / solution et mesure de la concentration du soluté.

La décroissance de la concentration de soluté relative à la concentration initiale est utilisée pour calculer la distribution de la taille des pores du gel.

Pour isoler l'effet d'exclusion de taille de celui de l'attraction/répulsion moléculaire, les expériences ont été faites avec des solutés ne présentant pas d'interaction spécifique avec la matrice du polymère. Ainsi deux séries de solutés ont été utilisées: polyéthylène glycol / polyéthylène oxyde / éthylène oxyde et Dextran / oligosaccharide.

Le gonflement est directement lié aux propriétés viscoélastiques du gel. L'élasticité du gel et la friction entre le réseau et le solvant jouent un rôle important dans les cinétiques du gonflement du gel [158-160]. Il a été connu que le temps de relaxation du gonflement est proportionnel au carré de la taille linéaire du gel [127] ce qui a été confirmé expérimentalement [129]. L'une des plus importantes caractéristiques du processus de gonflement du gel est qu'il est isotrope, c'est-à-dire que quand la zone diminue de 10%, la longueur axiale diminue de 10% dans un long cylindre de gel. Les propriétés d'élasticité et de gonflement des réseaux permanents peuvent être conçues en considérant deux effets opposés, la pression osmotique et la force élastique de rappel [161,162]. Li et Tanaka [163] ont développé un modèle où le module de cisaillement joue un rôle important. Ce modèle montre que la géométrie du gel joue un rôle important et le gonflement n'est pas un processus de diffusion pur [164].

La gélatine est un matériau protéinique obtenu par dégradation hydrolytique du collagène naturel [165,166] présentant une structure triple hélicoïdale. La gélatine est soluble dans l'eau chaude ( $> 40^{\circ}\text{C}$ ) [167]. En refroidissant une solution aqueuse de gélatine, on obtient un gel montrant des changements caractéristiques attribués à la structure en triple-hélice du collagène [168]. La gélatine ayant un point de fusion relativement bas est instable à la température du corps humain. Elle se stabilise à l'aide de réticulation entre les chaînes de protéines selon diverses procédures de durcissement [169].

Le taux de gonflement est généralement pris comme le rapport de la masse du gel gonflé par la masse du même gel sec. Le degré de gonflement est égal à la masse de l'eau absorbée par le gel divisée par la masse du même gel sec.

Depuis les travaux de Wichterle et al. [170], les hydrogels ont été largement utilisés dans diverses applications pharmaceutiques et médicales. Le largage contrôlé des médicaments utilise le fait que le gonflement soit lent en solution aqueuse ce qui implique la possibilité de contrôler leur libération sur une longue durée. Dans d'autres conditions, un gonflement rapide est souhaitable pour le développement des dispositifs de rétentions gastriques [171,172] par exemple. Il est donc intéressant de bien comprendre le processus de transport d'eau dans les hydrogels pour améliorer leur performance [173].

Le phénomène de gonflement des gels peut être étudié à l'aide de la théorie d'élasticité de Flory- Rehner. Si le gel est chargé, cette théorie devrait être combinée avec une autre tenant compte des effets électrostatiques comme celle de l'équilibre de Donnan [174-176] qui tient compte de la pression du gel gonflé et de la pression osmotique des



ions libres mobiles dans le gel et dans la solution [177]. Le gonflement du gel modifie également l'intensité diffusée [178-181]. L'intensité de dispersion aux faibles vecteurs d'onde augmente avec le degré de gonflement [182,183]. Shibayama et al. ont signalé que le taux de gonflement des hydrogels du poly (N-isopropyl acrylamide) (PNIPA) est indépendant de la concentration initiale du monomère [184] et ont proposé une loi d'échelle entre la concentration du gel gonflé et celle du monomère dans la solution initiale. Bromberger et al. ont proposé un modèle statistique pour estimer la densité de réticulation du gel à partir des paramètres de la solution initiale [185] et ont pu expliquer le comportement du gonflement de gels ioniques et non-ioniques. Une représentation qualitative des différentes étapes de gonflement reprise de la littérature est montrée sur la figure 1.2.

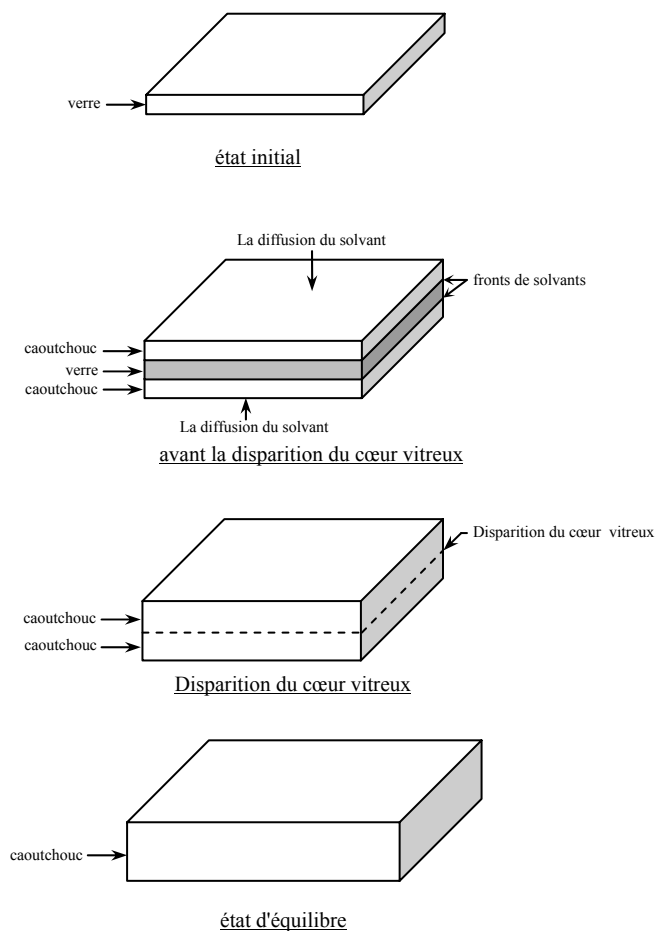


Figure 1.2 : Gonflement d'un gel dans un solvant [185]

L'eau diffuse dans le gel par la surface de contact produisant une pression qui s'exerce sur le volume du gel et donne lieu à une instabilité et à l'apparition de formes alvéolaires à sa surface. Selon un processus de diffusion, la profondeur de pénétration d'eau dans le gel devrait être proportionnelle à la racine carrée du temps. Les lignes de flexion où l'énergie élastique se concentre se manifestent à la surface du gel différemment à mesure que le temps passe.

Les gels de PAAm sont plus fragiles que ceux contenant le dextran, ils présentent des mailles (pores) plus grandes, des distributions plus larges et des formes plus irrégulières. Sur une surface hydrophile (où l'angle de contact  $\theta < 90^\circ$ ), l'eau mouille bien la surface et minimise la présence de bulles d'air. Si la surface est hydrophobe les bulles d'air viennent au contact de la surface et se développent.

Le gonflement près du point isoélectrique entraîne une mesure de la pression osmotique due aux contre-ions présents dans la solution pour assurer l'électro-neutralité. Un changement brusque du gonflement intervient près du point isoélectrique à un pH où la charge nette de la protéine est nulle. On a observé que la quantité d'eau absorbée diminuait légèrement avec la fonctionnalité et la taille du réticulant. Les résultats montrent que les gels obtenus avec le mBis sont plus souples que les autres. Le mBis étant moins rigide que les autres du type méthacrylate et de fonctionnalité plus grande, les gels réticulés en mBis absorbent une plus grande quantité d'eau.

Li et Tanaka ont développé un modèle dans lequel le module de cisaillement joue un rôle important pour garder le gel stable en présence des variations de volume et des dimensions dans les différentes directions. Ce modèle montre que le gonflement n'est pas un processus de diffusion simple et se fait en deux étapes, la première est un processus de diffusion classique du solvant à la surface alors que la deuxième étape est décrite par le modèle de Li-Tanaka au centre du gel.

### **1.10. SDS PAGE**

La technique d'électrophorèse a été introduite par Kolin [186] en 1950 et modifiée par Margolis et al. [187,188] en 1960 et beaucoup d'autres plus tard [189-199]. En électrophorèse sur gel, les macromolécules migrent à travers les pores interconnectés sous l'effet d'un champ électrique appliqué et sont ainsi tamisées. Pour cette application, les pores sont très souhaités. Les gels de PAAm qui peuvent donner des réseaux ayant une distribution spatiale uniforme des pores sont largement utilisés comme milieu de migration [200-203]. Les gels peuvent devenir turbides à cause des hétérogénéités de structure et d'indice de réfraction.

La résolution actuelles des gels 2D est insuffisante pour séparer toutes les protéines cellulaires [204] à cause de leur grande diversité surtout pour les protéines à point isoélectrique (pI) élevé et grande masse moléculaire (HMW) [205,206]. D'autres techniques plus puissantes s'imposent pour atteindre une interprétation suffisante de la formation de certaines perturbations et complexes protéiques typiques de certaines maladies [207-209]. Quelques protéines à haut poids moléculaires (HMW) comme la myosine (200 kDa), la dystrophine (400 kDa) et la thyroglobuline (330 kDa) sont responsables de maladies et sont de bonnes cibles thérapeutiques [210].

Le ``SDS-PAGE`` pour ``Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis``, est une technique qui permet de séparer des protéines selon leur masse molaire. La matrice est créée par la polymérisation d'AAM et du Bis, le couple APS / TEMED représente l'initiateur. La taille des pores diminue avec la concentration d'AAM et les molécules de petites masses sont mieux séparées. Un bref historique sur l'électrophorèse sur gel a été publié récemment [211], ainsi que plusieurs revues [212-216].

La migration des protéines à travers le gel de PAAm représente le prélude à une analyse protéomique détaillée permettant de déterminer la composition exacte d'une protéine. C'est une méthode dénaturante en raison de la présence du lauryl-sulfate de sodium. Le SDS est un détergent fort qui possède une queue hydrophobe et une tête chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa partie hydrocarbonée en liant les régions hydrophobes selon un rapport constant (1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS empêche ainsi le repliement de la protéine et lui confère une charge négative. Ceci permet sa migration dans le gel à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines en fonction du poids moléculaire. Cette migration est fonction de

modifications post-traductionnelles des protéines comme la glycosylation ou la phosphorylation par exemple. Les protéines sont d'abord condensées dans un gel de concentration ensuite séparées dans le gel de séparation, la visualisation des protéines séparées est effectuée à l'aide de colorants (Bleu de Coomassie, Rouge Ponceau ou nitrate d'argent) pour les protéines dont la concentration dépasse la limite de détection. Le gel coloré au bleu de Coomassie par exemple peut être décoloré par le mélange de solvants méthanol / acide acétique glacial / eau. Les gels de PAAm ont été introduits et développés en particulier à travers les travaux de Raymond, Weintraub [217], Davis [218], Ornstein [219], et Hjertén [220]. Ils ont immédiatement connu une grande popularité comme tiges supports en électrophorèse due à leurs propriétés fondamentales comme la transparence optique dans le visible et l'UV, la possibilité de synthèse avec un large intervalle de porosité [221]. Cependant, plusieurs défauts ont été observés comme son instabilité à pH alcalin sachant que la majorité des séparations de protéines et d'acides nucléiques ont lieu à pH alcalin.

Les travaux sur les protéines ont beaucoup focalisé sur le développement de méthodes permettant la détection du plus grand nombre de protéines possible en une seule analyse. Pour avoir une vue globale de la protéine dans une cellule ou un tissu, il est nécessaire d'identifier, quantifier, déterminer la localisation, les modifications, les interactions, les activités et les fonctions du plus grand nombre de protéines. Les protéines peuvent changer de forme et leurs fonctions biologiques sont intimement liées à leurs formes, une protéine modifiée est dite dénaturée et ne peut plus assurer sa fonction. Trois facteurs pouvant provoquer la dénaturation d'une protéine, l'agitation thermique par augmentation de la température susceptible de briser les faibles liaisons hydrogène reliant les radicaux de la chaîne, le pH puisque les protéines se dénaturent en milieu trop acide ou trop alcalin, la force ionique puisqu'une protéine placée dans un solvant organique peut se dénaturer, les parties hydrophobes se déploient vers l'extérieur et les parties hydrophiles se replient au centre de la molécule. On distingue les *protéines de structures* qui permettent à la cellule de maintenir son organisation dans l'espace, les *protéines de transport*, qui assurent le transfert des différentes molécules dans et en dehors des cellules, les *protéines régulatrices* qui modulent l'activité d'autres protéines, les *protéines de signalisation*, qui captent les signaux extérieurs, et assurent leur transmission dans la cellule ou l'organisme et les *protéines motrices* qui permettent aux cellules ou organismes de ce mouvoir. Les

fonctions biochimiques sont plus nombreuses, et essentiellement équivalentes à l'[activité enzymatique](#).

L'étude SDS-PAGE permet d'évaluer la mobilité relative ( $R_f$ ) et la résolution de marqueurs de protéines [222-225]. On définit  $R_f$  comme la distance de migration du marqueur protéique sur la distance de migration du bleu de bromophénol [226,227]. Afin d'optimiser les propriétés de séparation Schagger et Jagow [228] ont conçu un système pour une résolution optimale des protéines et peptides à bas poids moléculaires. Wiltfang et al. [229] ont été capables de séparer même de petites différences d'acides aminés des peptides  $\alpha,\beta$ -amyloïdogénique [230,231] dans la gamme de pH neutre à alcalin. Les systèmes SDS-PAGE acides sont plus difficiles à réaliser à cause de la présence d'ions amines [232]. Les systèmes PAGE à polarité positive faisant intervenir des détergents cationiques tels que le chlorure de benzyle-diméthyle -n-hexadécyl-ammonium (16-BAC) ou le CTAB présentent une solution possible [233,234] et montre leur utilité pour la détection des modifications du méthyle-ester et la séparation des protéines basiques comme les histones [235-242]. Les gels à faible pourcentage d'AAM sont typiquement utilisés pour séparer les grandes protéines [181] mais si cette concentration est inférieure à 5% les gels deviennent trop fragiles et très difficiles à manipuler, surtout dans les phases de coloration et de lavage. Une méthode à 2-DE a été développée [243] pour analyser les protéines (HMW) en utilisant l'agarose à la place d'AAM [244] mais cette méthode ne résout pas le problème de la faible pénétration des grandes protéines en SDS-PAGE [245-250]. Les méthodes de centrifugation, celles basées sur le séquençage des gènes et qui ont permis le calcul des masses à partir des séquences de dérivés d'acides aminés suggèrent que les mesures de SDS – PAGE sont trop grandes [251] et que cette technique surestime la masse du (HMW-GS) [252-254]. Il a été suggéré que l'anomalie de migration provient d'une structure secondaire stable du (HMW-GS), résistante à la dénaturation en SDS et pouvant exercer un frottement important et un glissement dans la matrice du gel [255].

Le SDS – PAGE repose sur deux hypothèses. La première dit que toutes les protéines ont le même rapport charge sur masse [256], la deuxième dit que le complexe SDS / protéine doit avoir la même conformation et la taille varie linéairement avec la masse molaire [257].

Les protéines qui montrent une migration anormale ne satisfont pas à l'une ou l'autre des hypothèses. En utilisant la méthode dite de Fergusson, il est possible d'obtenir une meilleure estimation de la masse en déterminant la migration relative des protéines en

fonction de la concentration du gel de PAAm [258]. Ferguson a observé que le logarithme de la mobilité d'une protéine varie linéairement avec la concentration du gel, la pente de cette variation donne accès au facteur de retardation ( $R_f$ ) qui est proportionnel à la masse de la protéine. La combinaison de ces observations avec le modèle d'Ogston [259] pour le tamisage dans un réseau de polymère fournit le cadre théorique de base pour l'électrophorèse sur gel [260-262]. Une représentation fréquente des courbes de Ferguson montrant le logarithme de la mobilité relative en fonction de la concentration du gel suggèrent que le coefficient de retardation est proportionnel au carré du rayon des protéines. Ainsi, des courbes standards peuvent être construites en portant le logarithme de la masse de protéines connues en fonction de la racine carré du coefficient de retardation. Une telle procédure est largement utilisée et des études ont révélé qu'une telle procédure en comparaison avec SDS-PAGE [263-265].

La mise au point de l'électrophorèse capillaire a mené à des séparations rapides avec détection qui exclue la nécessité d'une post-séparation avec coloration pour visualiser les protéines de l'ADN. L'électrophorèse en gel bidimensionnel (2D-GE) est devenue le premier outil analytique pour la séparation des mélanges protéiques complexes extraits des systèmes biologiques. Après la visualisation par l'intermédiaire de coloration, les spots de protéine peuvent être excisés, décolorés, être l'objet d'une digestion protéolytique en gel, et les peptides extraits sont analysés par spectrométrie de masse (SM) [266]. L'ionisation électro spray (ESI) et la spectrométrie de masse MALDI (Matrix- Assisted Laser Desorption / Ionization) peuvent être utilisées toutes les deux pour déterminer les masses des peptides protéolytiques ce qui va générer une carte des masses des peptides de la protéine. Les masses des peptides peuvent être utilisées pour performer la base des données recherchée pour l'identification des protéines. La 2D-GE est habituellement effectuée en gels de polyacrylamide, réticulés en structures spongieuses (comme une éponge) formés par réaction de l'acrylamide (AAm) avec un réticulant, souvent le bisacrylamide (Bis). Même sous des conditions soigneusement contrôlées, cette réaction est rarement complète et une petite quantité du monomère libre reste dans le gel. Par exemple, la concentration d'acrylamide qui n'a pas réagit dans un gel 5% en T et 4% en C (20cm x 20cm x 1mm) est de 30 – 60 mM [267] et le spot de protéine excisé (3 mm x 3mm x 1mm) contient 0,25 – 0,54 mmol d'acrylamide. Une partie de cet acrylamide peut réagir avec des groupes sulfhydryle dans les protéines durant la séparation électro phorétique pour former des adduits cystéine – acrylamide.

Ensuite en digestion du gel, l'acrylamide résiduel et d'autres composés auxiliaires tels que les détergents peuvent être extraits du gel avec les peptides. Une grande attention a été centrée sur les détergents tel que le Triton et dont la présence peut supprimer complètement les signaux des protéines et peptides sous les conditions nécessaires pour l'analyse par MALDI-MS [268]. Les effets d'autres paramètres tels que les agents de coloration et les procédures d'extraction sur la qualité du spectre de masse MALDI a également été interprété [269]. Cependant, l'effet du monomère d'acrylamide résiduel sur le spectre de masse MALDI des peptides n'a pas été examiné jusqu'à ce jour.

L'étape clef pour l'identification des maladies causant des mutations est la numérisation des gènes candidats pour la présence de variations de séquences d'ADN telles que les petites insertions, suppressions et SNPs. L'identification de tels changements subtils reste encore très difficile en termes de vitesse, précision et coût/efficacité. L'étalon-or pour toute stratégie de détection est le séquençage d'ADN.

La CSGE (Conformation Sensitive Gel Electrophoresis) a été développée pour l'analyse hétéro duplexes dans un système d'électrophorèse de gel de PAAM modifié [270]. L'idée était de différencier les homo- duplexes à partir des produits par migration électrophorétique différentielle. Des études précédentes avec des solvants tels que l'éthylène glycol et le formamide ont démontré qu'ils induisent des changements de conformation subtiles dans l'ADN en un processus continu qui commence bien au-dessous des concentrations nécessaires pour une dénaturation complète à température ambiante [271]. Il a été supposé qu'un système approprié de solvants légèrement dénaturants peut amplifier la tendance de décalage pour produire des changements de conformation telles que les coudes dans la double hélice et d'accroître ainsi la migration différentielle des hétéro-duplexes et homo-duplexes de l'ADN durant l'électrophorèse du gel.

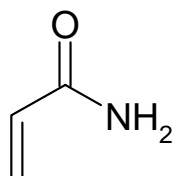
## CHAPITRE 2

### CONSIDERATIONS EXPERIMENTALES

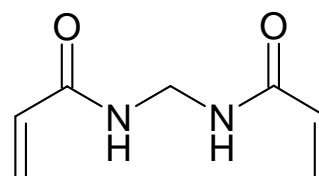
*Produits utilisés, méthodes de préparation des échantillons et techniques expérimentales*

#### 2.1. Produits utilisés

Le monomère acrylamide (AAm) et le réticulant (Bis) N,N'-méthylènebisacrylamide ont été acquis chez Polyscience (France), Dextran et les autres réactifs chez Aldrich, Fluka (Allemagne). Les marqueurs de protéines (HMW et LMW) ont été acquis chez Amersham Biosciences (Uppsala, Suède), Duracryl<sup>TM</sup> chez Genomic Solutions (Steinheim, Allemagne). Tous ces produits ont été utilisés sans modification ou purification préalable. Les formules chimiques des monomères (AAm et Bis) et du Dextran sont données dans la figure 2.1.

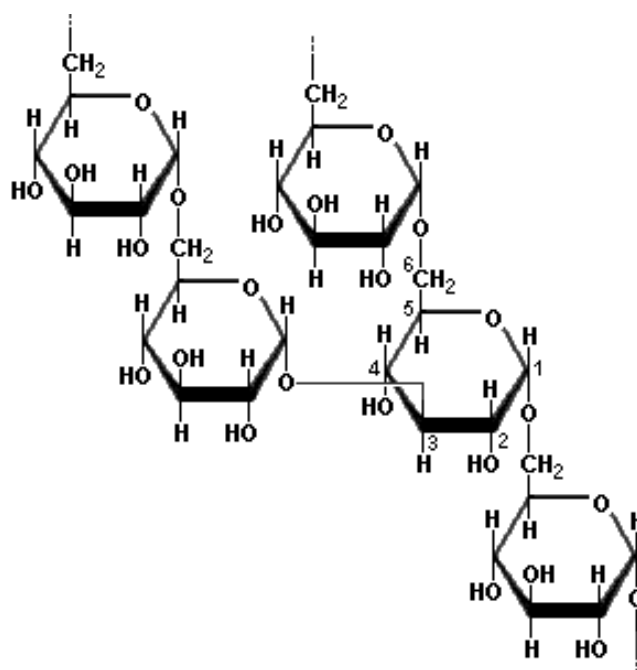


Acrylamide  
méthylènebisacrylamide



N,N'-





Dextran

**Figure 2.1** : Formules chimiques des monomères (AAM et Bis) et du Dextran.

Les échantillons de Dextran utilisés ont une masse moléculaire comprise entre  $6 \times 10^3$  et  $2 \times 10^6$  Da (g/ mol).

Les caractéristiques des protéines utilisées (marqueurs) peuvent être trouvées sur le tableau 2.1.

**Tableau 2.1** : Caractéristiques des protéines utilisées

	<b>Protéine</b>	<b>Masse Moléculaire (Da)</b>	<b>Source</b>	<b>Quantité (µg)</b>
<b>LMW</b>	Phosphorylase b	97 000	Rabbit muscle	67
	Albumin	66 000	Bovine serum	83
	Ovalbumin	45 000	Chicken egg white	147
	Carbonic anhydrase	30 000	Bovine erythrocyte	83
	Trypsin inhibitor	20 100	Soybean	80
	α-Lactalbumin	14 400	Bovine milk	116
<b>HMW</b>	Myosin	220 000	Rabbit muscle	25
	α-2-Macroglobulin	170 000	Bovine plasma	100
	β-Galactosidase	116 000	E. coli	16
	Transferin	76 000	Human	17
	Glutamate déshydrogénase	53 000	Bovine liver	18

Les mélanges protéiques sont dissouts dans le tampon de traitement Laemmli décrit sur le tableau 2.2.

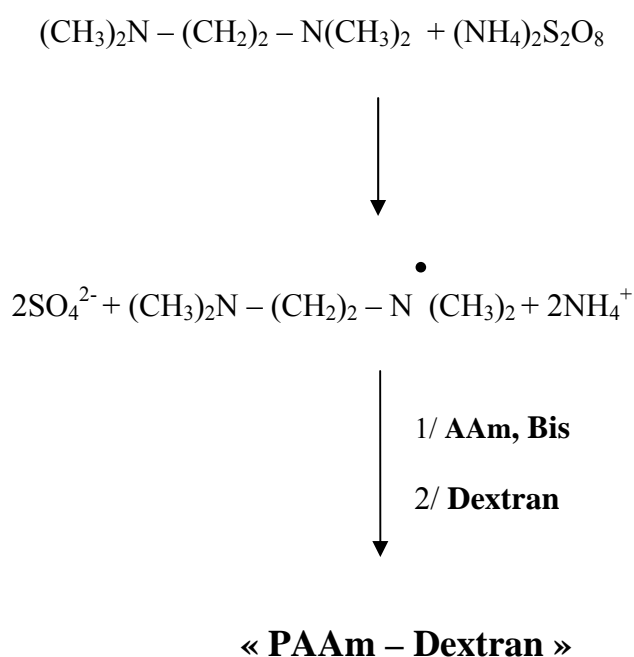
**Tableau 2.2** : Solutions tampons de traitement Laemmli

	Quantité	Rôle
Tampon de séparation pH 8,8	<b>2,5 mL</b>	Maintient le pH
Solution de SDS à 10 %	<b>4 mL</b>	Dénaturation des protéines et fixation de charges négatives
Dithiothréitol DTT	<b>0,31 g</b>	Destruction de ponts disulfures (S –S)
Glycérol	<b>4 mL</b>	Augmente la densité de l'échantillon pour faciliter les dépôts dans les puits
Bleu de Bromopénol à 10 %	<b>2mg</b>	Marque le front de migration en électrophorèse
Eau dé-ionisée	<b>10 mL</b>	Solvant

## 2.2. Méthodes de préparation des échantillons et techniques expérimentales

Le processus de formation du gel est initié par la formation d'un radical libre du N,N,N',N'-tétraméthyléthyléthyldiamine (TEMED) par réaction avec l'Ammonium Persulfate (APS). Ensuite la réaction entre le radical libre et le monomère d'AAM produit un monomère AAM activé qui réagit avec un autre monomère AAM. Cette séquence continue jusqu'à épuisement total du monomère et obtention du PAAM. Le réticulant Bis renforce le gel proportionnellement à sa concentration. D'une manière générale, la préparation d'un gel se fait à partir d'une solution d'AAM, Bis, tris base (pH 8,8), Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) et eau dé-ionisée. Cette solution est conservée à 4°C pendant 12h (la nuit), dégazée sous pression réduite pendant 40 mn et mise sous atmosphère inerte avant chaque utilisation. La polymérisation est initiée

par le couple rédox APS/TEMED. Le TEMED est une amine tertiaire qui fournit les électrons nécessaires à partir de son atome d'azote pour la décomposition de l'APS en radicaux sous forme d'ions sulfates. En même temps, les radicaux de TEMED sont formés et peuvent initier une nouvelle chaîne de polymérisation en s'attachant entre eux comme groupes de terminaison. Le TEMED peut également réagir comme agent de transfert par donation d'hydrogène au polymère radicalaire en stoppant la croissance de la chaîne et commençant une nouvelle chaîne. (voir figure 2.2.)



**Figure 2.2** : Schéma du processus de polymérisation.

Les quantités de monomère et de réticulant dépendent des propriétés des molécules à séparer, en particulier de leur taille.

### ***2.2.1. Spectroscopie UV-Visible***

La spectroscopie UV-Visible peut être utilisée pour étudier la cinétique de polymérisation à travers la variation d'absorbance en fonction du temps. La spectrométrie d'absorption moléculaire dans le domaine ultra-violet (UV, de 185 à 380 nm) et dans le visible (VIS, de 380 à 800 nm) est une technique courante de contrôle et d'analyse de composés chimiques [18,20]. Ainsi nous avons obtenu les spectres de nos échantillons (i.e.,  $Abs = f(t)$ ) à 300 nm pendant 900 secondes. Pour les molécules comme pour les atomes, l'absorption est due aux transitions électroniques entre différents niveaux d'énergie. Un électron à l'état fondamental absorbe des radiations d'une énergie suffisante pour l'élever à un niveau d'énergie supérieur d'un état excité, ce qui détermine la longueur d'onde  $\lambda$ . Le retour à l'état fondamental se produit par perte d'énergie (chaleur) ou par émission de radiation (fluorescence ou phosphorescence). Dans l'UV-VIS, les transitions électroniques sont accompagnées par des transitions de vibration entre les niveaux électroniques donnant la structure fine vibrationnelle. L'environnement chimique de l'échantillon comme la nature du solvant affecte la position et la forme de la bande d'absorption. L'analyse quantitative est réalisée sur la base des lois de Beer –Lambert [272].

Les éléments de base des spectromètres sont: une source, un porte-échantillon, un monochromateur, un détecteur et un appareil de lecture. En « UV-VIS », le porte-échantillon est placé à la sortie du monochromateur et les sources employées sont soit au deutérium qui émettent surtout dans l'UV soit les lampes au tungstène qui émettent surtout dans le VIS. Elles émettent un spectre continu et des raies atomiques permettant de faire un calibrage de longueur d'onde. Le monochromateur est composé d'une fente de sortie. Une lumière polychromatique est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur qui transmet sélectivement une bande étroite. Ce faisceau traverse l'échantillon avant d'atteindre le détecteur, photomultiplicateur ou photodiode. La mesure d'absorbance est faite à blanc (sans échantillon) et après avoir traversé l'échantillon.

La première étape de notre étude a permis d'optimiser la composition du gel en essayant plusieurs concentrations (0,5-1-1,5-2-5)% de Dextran. L'addition d'un

Dextran de masse moléculaire donnée (6, 40, 100, 500, 2000 kDa) à une concentration de 2% ( $\text{g cm}^{-3}$ ) dans le gel n'affecte ni son homogénéité, ni la migration des protéines. La variation de la densité optique en fonction du temps est étudiée à l'aide de la technique de Spectroscopie UV-Visible. Les gels considérés sont caractérisés par les concentrations %T=10 et %C=2,6. Nous rappelons les définitions [267] :

$$\%T = 100 \times [(\text{masse monomère} + \text{masse réticulant}) / \text{Volume total}],$$

$$\text{et } \%C = 100 \times [(\text{masse réticulant} / (\text{masse monomère} + \text{masse réticulant}))].$$

### ***Gels de PAAm / Dextran***

Des gels de PAAm avec et sans Dextran ont été préparés selon la composition suivante :

9.74 g AAm ; 0,26 g de Bis ; 1 mL de SDS (10%) ; 2,4 mL de Tris Base pH 8,8 (15mol/L) ; ajustement avec l'eau dé-ionisée jusqu'à 100 mL.

### ***Duracryl***

3,3 mL de Duracryl ; 2,4 mL de Tris Base pH 8,8 (15 mol/ L) ; 100  $\mu\text{L}$  de SDS (10%) ; 4,1 mL d'eau dé-ionisée.

Toutes ces solutions ont été dégazées sous pression réduite pendant 40 mn, après être refroidies à (0-4) $^{\circ}\text{C}$ , avant d'être analysées par UV en mesurant la variation d'absorbance en fonction du temps à 300 nm sur une durée de 900s. L'amorceur et l'initiateur (APS et TEMED) ont été utilisés selon les quantités 37,2  $\mu\text{L}$  et 4,2  $\mu\text{L}$ , respectivement et les mesures ont été faites sur un spectrophotomètre UV / VIS de type JASCOW, V – 530 montré sur la figure 2.3.



**Figure 2.3 :** Photo du spectrophotomètre UV / VIS de type JASCOW V – 530.

### *2.2.2. Cinétique de polymérisation : Variation de la température de polymérisation en fonction du temps.*

La formation d'un réseau de polymérisation radicalaire libre étant un processus exothermique cinétiquement contrôlé, la mesure de température permet de suivre cette cinétique [150]. Pour cela, les gels préparés ont été introduits dans de petites cuves ayant été soumises auparavant à un courant d'azote. Une sonde fine de température de type ORGANO SCIENTIFIC, Model SA880SSX (voir Fig. 2.4) a été placée dans ces cuves pour le suivi de la variation de température durant la polymérisation. La lecture de température est faite chaque minute pendant 2 heures. Les profils de température pour les gels de PAAm et Dextran (500 et 2000 kDa) jugés bons selon les analyses UV-VIS ont été pris ainsi que pour les gels de PAAm et Duracryl pris comme références. Le taux de conversion était toujours supérieur à 90%.



**Figure 2.4 :** Photo montrant la sonde de température ORGANO SCIENTIFIC, model SA880SSX.

### ***2.2.3. Cinétique de gonflement***

Les gels de séparation caractérisés par les concentrations (%T=10, %C=2,6) ont été découpés sous forme de carrés de 5 cm de côté et 1mm d'épaisseur en vue des mesures de gonflement.

Dès que l'initiateur est introduit dans la solution, la gélification a lieu en moins d'une minute alors que pour d'autres systèmes, on a généralement des temps de gélification de l'ordre d'une demi-heure [159,160]. Les gels sont séchés à l'étuve (60 °C) pendant 24h après leur préparation et avant d'être mis dans le solvant.

Les systèmes concernés par ces mesures sont donnés sur les tableaux 2.3 à 2.5.



**Tableau 2.3 :** Composition des gels concernés par la cinétique de gonflement

Constituant	AAm	Duracryl	Dextran 500kDa	Dextran 2000kDa
<i>Solution</i>	4.1 mL	4 mL	4 mL	4 mL
<i>Tampon de séparation</i> <i>pH 8.8</i>	3.1 mL	3 mL	3 mL	3 mL
<i>H<sub>2</sub>O distillée</i>	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
<i>APS (30%)</i>	60.6 µL	60.6 µL	60.6 µL	60.6 µL
<i>TEMED</i>	3.13 µL	3.13 µL	3.13 µL	3.13 µL

**Tableau 2.4 :** Composition des gels concernés par la cinétique de gonflement (suite)

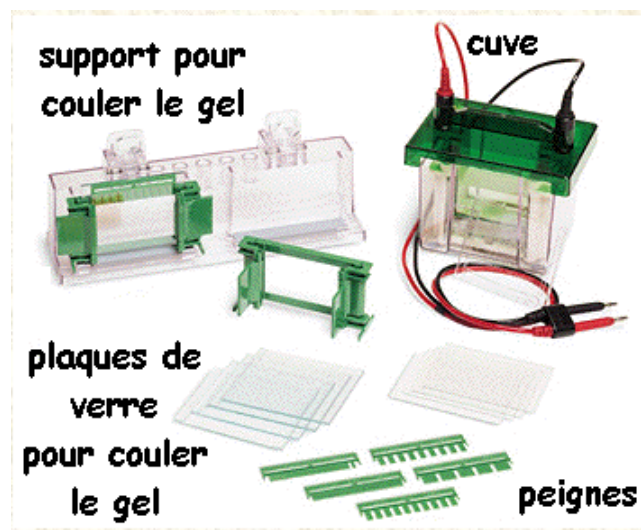
<i>Solution Dextran 500kDa</i>	<i>Quantité</i>	<i>Solution Dextran 2000kDa</i>	<i>Quantité</i>	<i>Solution d'AAm 1D</i>	<i>quantité</i>
<b>AAm</b>	3 g	<b>AAm</b>	3 g	<b>AAm</b>	2.92 g
<b>Bis</b>	0.08 g	<b>Bis</b>	0.08 g	<b>Bis</b>	0.078 g
<b>Dextran 500kDa</b>	0.2 g	<b>Dextran 2000kDa</b>	0.2 g	<b>Dextran 500kDa</b>	0.066 g
<b>H<sub>2</sub>O dé-ionisée</b>	10 mL	<b>H<sub>2</sub>O dé-ionisée</b>	10 mL	<b>H<sub>2</sub>O dé-ionisée</b>	10 mL

**Tableaux 2.5** : Solutions tampon utilisées dans l'étude du gonflement.

<i>Tampon de séparation</i>	<i>Quantité</i>	<i>Tampon (Tank Buffer)</i>	<i>Quantité</i>
<b>Tris (Fw121,1)</b>	3,02 g	<b>Tris (Fw121,1)</b>	3,02 g
<b>SDS</b>	1 g	<b>Glycine</b>	14,4 g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	200 mL	<b>SDS</b>	1 g
Ajuster le pH à 8.8 avec du HCl		<b>Eau distillée</b>	Jusqu'à 1 L

#### 2.2.4. Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les mesures d'électrophorèse ont été faites dans les conditions discontinues dites de Laemmli [211]. Le gel est mis entre 2 plaques de verre désinfectées et fixées sur un support. Un peigne est enchâssé entre les 2 plaques. Le gel de séparation est posé en premier et sa gélification dure environ 1heure, ensuite le gel de concentration est mis sur le premier après avoir placé un peigne désinfecté pour former les puits où les protéines seront déposées. Nous avons repris sur la figure 2.5 les équipements classiques nécessaires à l'électrophorèse SDS-PAGE pour illustration seulement. Cette figure est disponible sur le web et a été reprise intégralement [214]. L'étape de préparation des échantillons pour les mesures d'électrophorèse prend environ une demi-heure.



**Figure 2.5 :** Equipements classiques nécessaires à l'électrophorèse SDS-PAGE

La concentration %C est la même pour tous les gels (%C=2,6) mais %T est égal à 4,7 et 10 pour les gels de concentration et de séparation, respectivement dans le cas des protéines à bas poids moléculaire (LMW). Pour les protéines à haut poids moléculaire (HMW), on a utilisé un gel de séparation de %T=8 et %C=2,8 pour avoir des pores plus larges. Il est possible de faire varier la taille des pores en faisant varier la concentration d'AAM. Une concentration élevée est adaptée aux protéines de bas poids moléculaire alors qu'une faible concentration est plutôt adaptée aux protéines de haut poids moléculaire. Les formulations détaillées de ces gels sont données ci-dessous :

### ***Gel de Duracryl™***

#### *Gel de séparation*

4 mL Duracryl

3 mL Tampon de séparation

5 mL Eau dé-ionisée

60,6 µL APS (30%)

3,03 µL TEMED

#### *Gel de concentration*

1 mL Duracryl™

1,5 mL Tampon de concentration

3,75 mL Eau dé-ionisée

125 µL APS (30%)

6,25 µL TEMED

### ***Gel d'AAm***

#### *Gel de séparation*

4,1 mL AAm (1D)

3,1 mL Tampon de séparation

5,25 mL Eau dé- ionisée

60,6 µL APS (30%)

3,03 µL TEMED

#### *Gel de concentration*

1 mL AAm (1D)

1,5 mL Tampon de concentration

3,75 mL Eau dé- ionisée

125 µL APS (30%)

6,25 µL TEMED

### ***Gel d'AAm + Dextran***

Les solutions de Dextran (500 kDa et 2000 kDa, 2%) ont d'abord été préparées selon la formulation suivante :

3 g d'AAm (30%)

0,08 g de Bis (0,8%)

0,2 g de Dextran (500 kDa ou 2000 kDa, 2%)

#### *Gel de séparation*

4 mL de solution à 2% de Dextran (500 ou 2000 kDa)

3 mL de tampon de séparation

5 mL d'eau dé- ionisée

60,6 µL d'APS (30%)

3,03 µL de TEMED

### ***Gel de concentration***

1 mL de solution à 2% de Dextran (500 ou 2000 kDa)

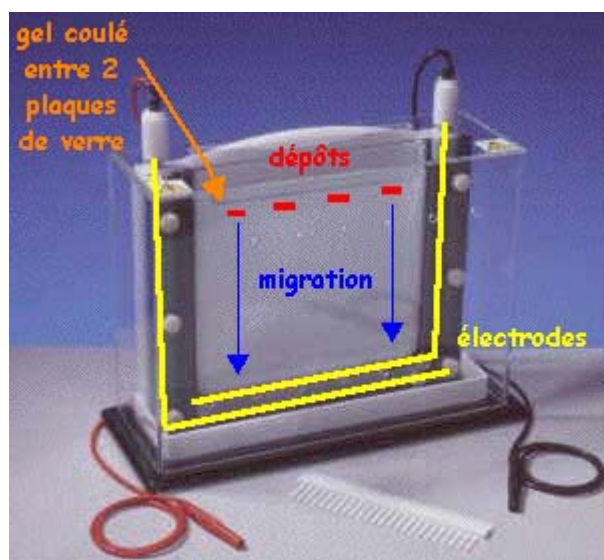
1,5 mL de tampon de concentration

3,75 mL d'eau dé-ionisée

125  $\mu$ L d'APS (30%)

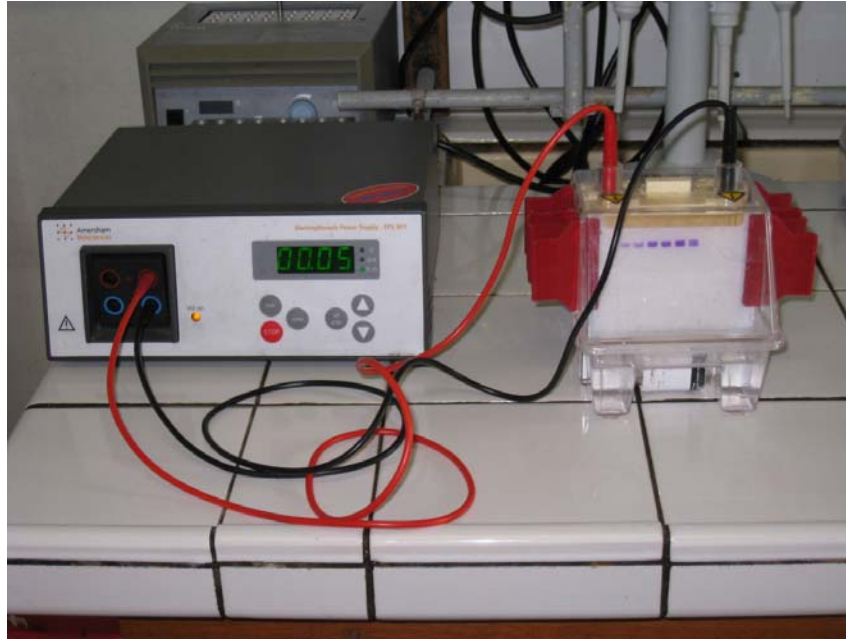
6,25  $\mu$ L de TEMED

Après polymérisation, le peigne est retiré formant ainsi des puits. Ensuite les plaques de verre contenant le gel sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Les flèches sur la figure 2.6 indiquent le sens de migration. Les différentes bandes sont visibles et la masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs représentés par des protéines standards de masses molaires connues [222,223].

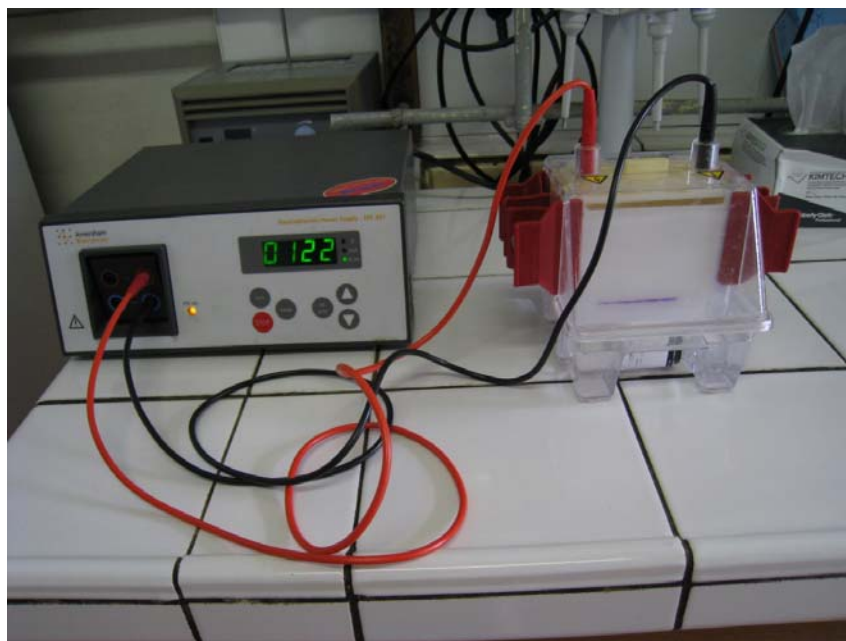


**Figure 2.6:** Dispositif classique d'électrophorèse SDS-PAGE. Ce schéma est disponible sur le web et a été repris intégralement. [214]

L'expérience d'électrophorèse est effectuée sous un champ correspondant à une tension de 300V en maintenant le courant à 80mA pendant 3 heures pour 4 échantillons simultanément en utilisant la solution tampon comme éluant. (voir schémas sur les figures 2.7 et 2.8)

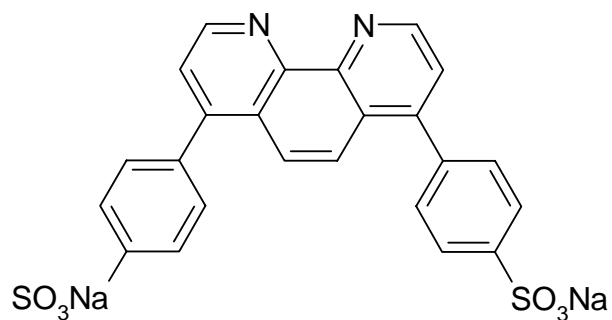


**Figure 2.7:** Photo représentant l'expérience d'électrophorèse SDS - PAGE  
(Début de migration des protéines)



**Figure 2.8:** SDS - PAGE : (Pendant la migration des protéines)

Les 3 étapes de fixation, coloration et lavage sont nécessaires. Pour les colorants fluorescents, la solution peut varier selon le type. Nous avons utilisé un colorant synthétisé par l'équipe de chimie organique du laboratoire, en l'occurrence le  $\text{Ru}(\text{BPs})_3$  dont la formule chimique est donnée sur la figure 2.9.



**Figure 2.9:** Formule chimique du colorant  $\text{Ru}(\text{BPs})_3$

La procédure de coloration est la suivante : Le gel est retiré des plaques et mis pendant 1 heure dans une solution de fixation qui consiste en un mélange ternaire de solvants, (éthanol – acide acétique – H<sub>2</sub>O) dans les proportions de (10, 7 et 83) %, respectivement. (voir figure 2.10). Ensuite, le gel est coloré durant une nuit dans le même mélange à des proportions différentes (i.e., 25:14:61) contenant du syro Ruby à un taux de 2 mg/ L.



**Figure 2.10 :** Agitation pendant la fixation, coloration et lavage du gel

Ensuite le gel est décoloré pendant une heure par une solution de lavage formée du même mélange de solvants aux proportions de 30, 10 et 60. Le gel est alors prêt pour être scanné à l'aide de l'appareil Thyphoon 9400 Variable Mode Imager comme le montre la figure 2.11.





**Figure 2.11:** Scanner de type Thymphon 9400 Variable Mode Imager.

## CHAPITRE 3

### RESULTATS

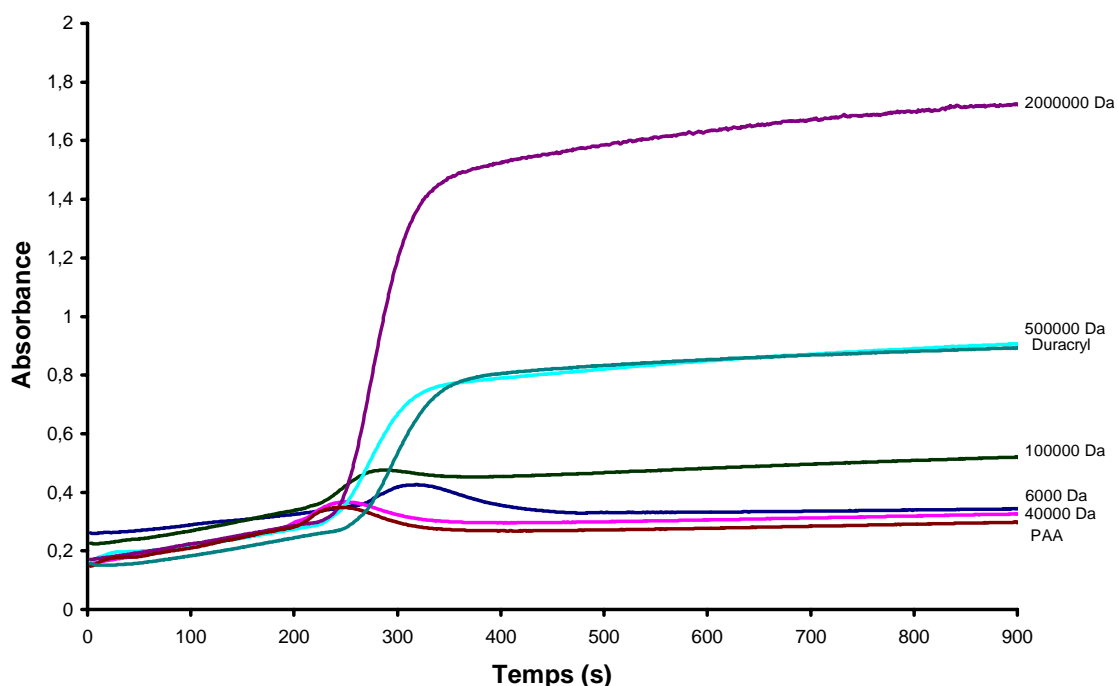
Dans ce chapitre nous nous contentons de donner les résultats obtenus sans développer les détails concernant les phénomènes en jeu et les interprétations possibles. Des discussions détaillées seront présentées au chapitre suivant.

#### 3.1. Spectroscopie UV-Visible

Les mesures d'absorbance par spectroscopie UV-Vis ont été faites en cours de polymérisation en fonction du temps. Les différents systèmes PAAm, PAAM / Dextran et Duracryl ont été considérés et les résultats sont regroupés dans les figures 3.1 et 3.2.

Sur la première figure, nous examinons l'impact de la masse moléculaire du Dextran incorporé à 2% dans le gel de PAAm sur les mesures d'absorbance en cours de polymérisation. Les mêmes mesures sont faites systématiquement sur les gels de PAAm pur et Duracryl pour comparer les résultats. Dans tous les cas, l'absorbance augmente d'abord très lentement ensuite brusquement à un moment donné durant la polymérisation et qui est plus ou moins le même pour tous les systèmes. Cette augmentation rapide de l'absorbance marque une transition du type sol / gel [153,154] qui est aussi observée dans la mesure de la température de polymérisation lors d'une expérience complémentaire réalisée dans ce travail. Le niveau d'absorbance maximum est atteint sur le système PAAM / Dextran de plus grande masse ( $2 \times 10^6$ ) suivi de celui qui a la masse de ( $5 \times 10^5$ ) avec le Duracryl, ensuite vient le système caractérisé par la masse de Dextran de  $10^5$  puis les 3 restants sont pratiquement rassemblés en bas de la figure. Ces mesures montrent que les gels de PAAm / Dextran

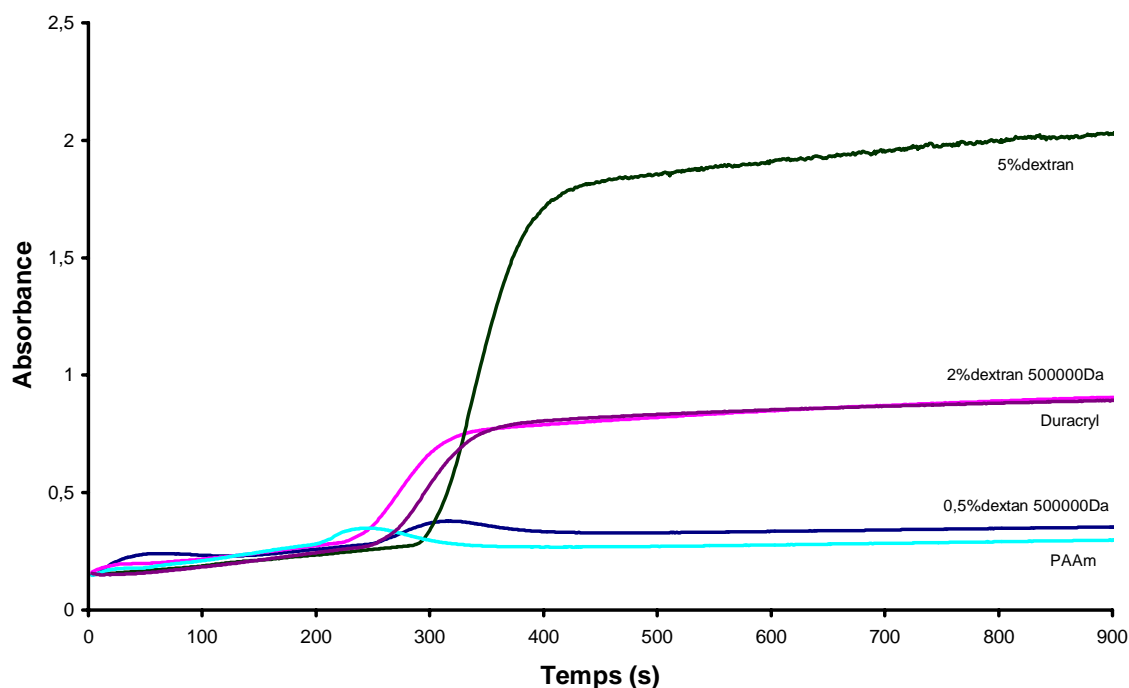
( $5 \times 10^5$ ) et Duracryl présentent la même performance du point de vue optique et mécanique.



**Figure 3.1 :** Absorbance à 300 nm en fonction du temps pour 2% des différents gels synthétisés.

Sur la figure 3.2 nous présentons des résultats similaires mais pour le mélange PAAm / Dextran, nous considérons uniquement le système caractérisé par une masse de Dextran égale à ( $5 \times 10^5$ ) à plusieurs concentrations. Cette figure permet de déterminer les effets de la concentration sur la cinétique à travers les mesures d'absorbance par spectroscopie UV-Vis. Nous remarquons que le mélange à plus forte concentration de Dextran donne le plus haut niveau d'absorbance et que ce niveau décroît à mesure que la quantité de Dextran diminue. Sur cette figure comme sur la figure précédente, le gel de PAAm pur donne le plus bas niveau d'absorbance ce qui était prévisible connaissant la clarté optique de ce gel. La même observation qualitative peut être faite sur toutes les mesures de l'absorbance en fonction du temps de polymérisation consistant en une augmentation très lente durant la phase initiale de

polymérisation suivie d'une augmentation brusque à un moment donné pour tous les systèmes presque simultanément.



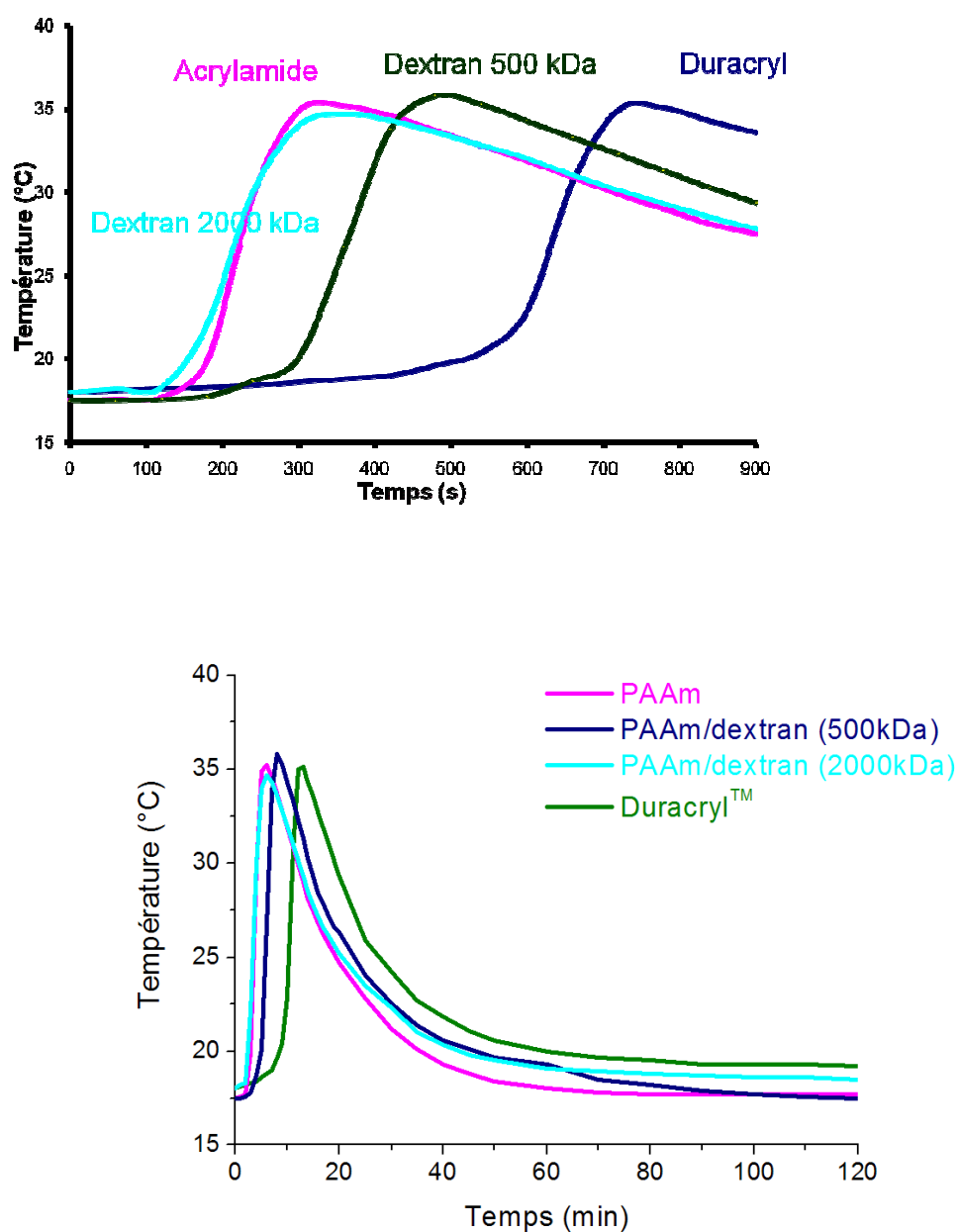
**Figure 3.2 :** Absorbance des gels à 300 nm en fonction du temps en présence de Dextran de 500 kDa à différentes concentrations.

### 3.2. Profils de la température de polymérisation

Comprendre le processus de réaction entre l'AAM et le réticulant est indispensable à l'élaboration d'un réseau tri- dimensionnel et peut être utile dans l'obtention de propriétés physiques spécifiques d'un gel comme la bonne taille des pores et une distribution adéquate. La polymérisation radicalaire libre est exothermique et peut être cinétiquement contrôlée [151,152]. Ainsi, la mesure de

température en fonction du temps de polymérisation permet de suivre ce processus exothermique et fournir une mesure du taux de conversion de monomère.

Une lecture de température a été faite toutes les minutes pendant deux heures, donnant lieu à un profil de température directement lié à la cinétique de polymérisation. Tous les systèmes montrent un effet Trommsdorf clair [150]. Cependant, les courbes qui correspondent au système contenant le dextran à 500 kDa et Duracryl sont les plus proches. Les profils de température de polymérisation des gels synthétisés sont donnés ci-dessous sur la figure 3.3.



**Figure 3.3 :** Profils de température en fonction du temps de polymérisation pour divers systèmes. Les deux figures présentent les mêmes résultats dans des domaines de temps différents.

### 3.3. Cinétique de gonflement

#### 3.3.1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée

Le taux de gonflement des gels synthétisés ainsi que la quantité d'eau absorbée ont été mesurés dans l'eau dé-ionisée à un pH = 5,86 et analysés en fonction du temps. Le taux ou degré de gonflement a été défini par le rapport de la masse d'eau absorbée sur celle du gel sec et les résultats sont représentés sur la figure 3.4.

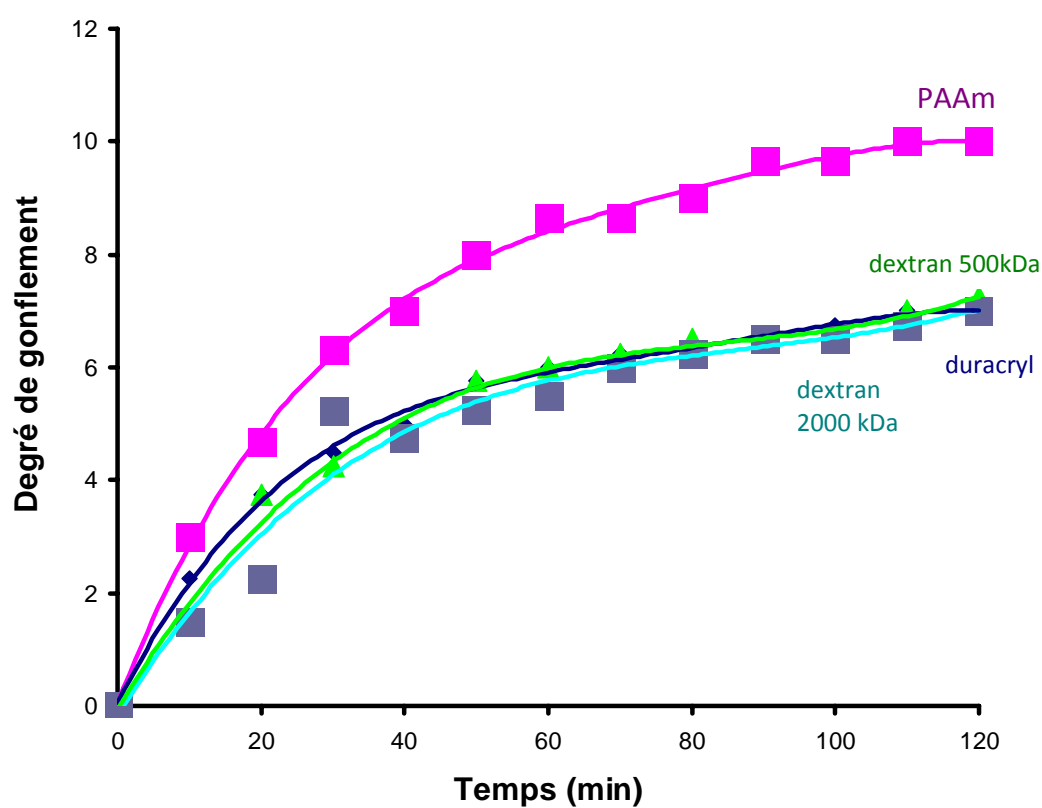


Figure 3.4: Degré de gonflement dans l'eau dé-ionisée en fonction du temps

Les dimensions des gels avant et après gonflement sont données sur les tableaux 3.1 et 3.2.

**Tableau 3.1** : Dimensions des gels avant et après gonflement dans l'eau dé-ionisée.

<b>Gel</b>	<b>Avant gonflement (cm x cm)</b>	<b>Gonflement à l'équilibre (cm x cm)</b>
Duracryl	5 X 5	5,7 x 5,5
PAAm	5 X 5	5,8 x 5,6
PAAm/Dextran 500	5 X 5	5,6 x 5,6
PAAm/Dextran 2000	5 X 5	5,5 x 5,5

Les gels contenant le Dextran ont un gonflement plus faible que les gels de PAAm pur.

**Tableau 3.2** : Taux de gonflement à l'équilibre dans l'eau dé-ionisée.

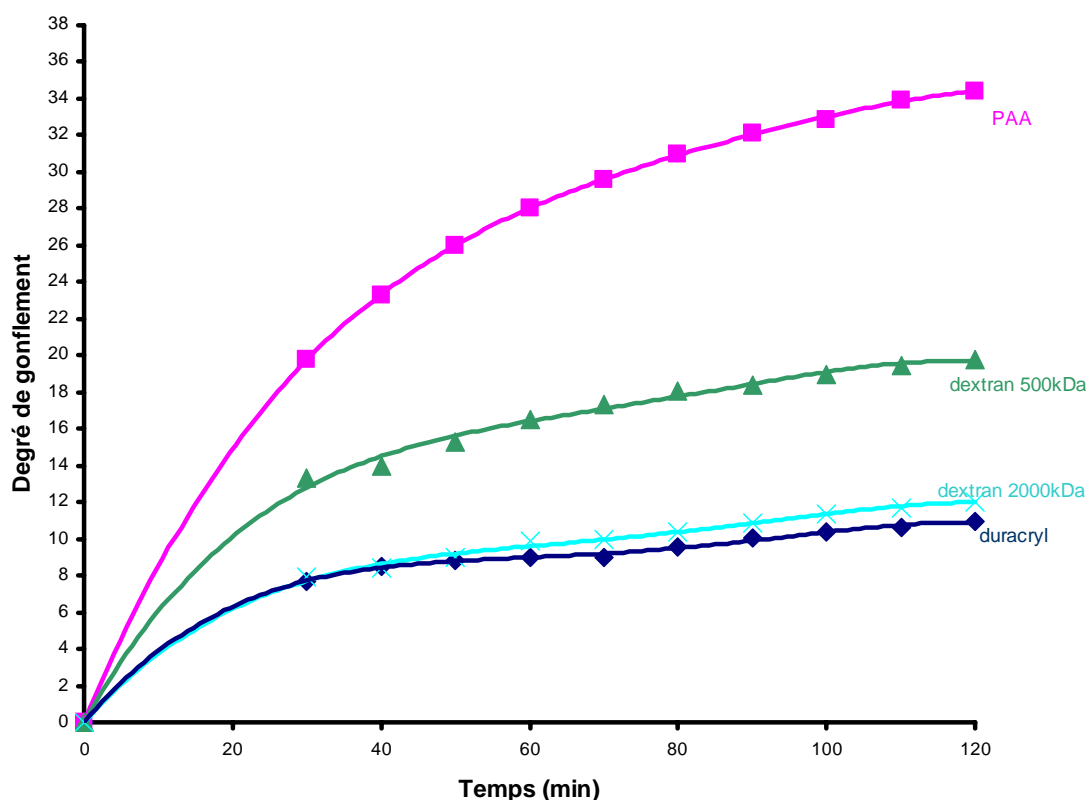
<b>Gel</b>	<b>Avant gonflement</b>	<b>Gonflement à l'équilibre</b>
Duracryl <sup>TM</sup>	0	(7±0,01)
PAAm	0	(10±0,01)
PAAm/Dextran 500	0	(7,25±0,01)
PAAm/Dextran 2000	0	(7±0,01)



Il est important de bien comprendre ce comportement parce que lors des expériences d'électrophorèse, les gels peuvent subir des cycles de gonflement et de coloration. On constate que le gel qui contient le Dextran 2000 kDa gonfle moins que les autres. Il est de ce fait plus favorable en électrophorèse puisqu'il présente une bonne stabilité mécanique et ne provoque pas de grossissement ou de déformation du réseau. Il permet une bonne migration des protéines en SDS-PAGE

### 3.3.2. Gonflement dans la solution tampon (Tank Buffer)

La solution tampon à pH = 8,54 représente le milieu d'élution des protéines en SDS-PAGE. Les résultats de gonflement dans cette solution sont donnés sur la figure 3.5.



**Figure 3.5:** Cinétique de gonflement des gels dans la solution tampon.

Le tableau 3.3 suivant résume les dimensions des gels avant et après gonflement :

**Tableau 3.3** : Dimensions des gels avant et après gonflement dans la solution tampon.

<b>Le gel</b>	<b>Avant gonflement (cm x cm)</b>	<b>Après gonflement (cm x cm)</b>
Gel de Duracryl™	5 X 5	5,7 x 5,6
Gel de polyacrylamide (PAAm)	5 X 5	5,8 x 5,6
Gel de dextran 500 kDa	5 X 5	5,6 x 5,8
Gel de dextran 2000 kDa	5 X 5	5,6 x 5,7

**Tableau 3.4** : Taux de gonflement à l'équilibre dans la solution tampon.

<b>Gel</b>	<b>Avant gonflement (cm x cm)</b>	<b>Gonflement à l'équilibre (cm x cm)</b>
Duracryl™	0	(10,96±0,01)
PAAm	0	(34,44±0,01)
PAAm/Dextran 500	0	(19,76±0,01)
PAAm/Dextran 2000	0	(12,04±0,01)

Comme dans le cas de l'eau dé-ionisée, le gel de PAAm / Dextran 2000 gonfle moins que les autres. D'une façon générale, les gels gonflent plus dans la solution tampon que dans l'eau dé-ionisée..

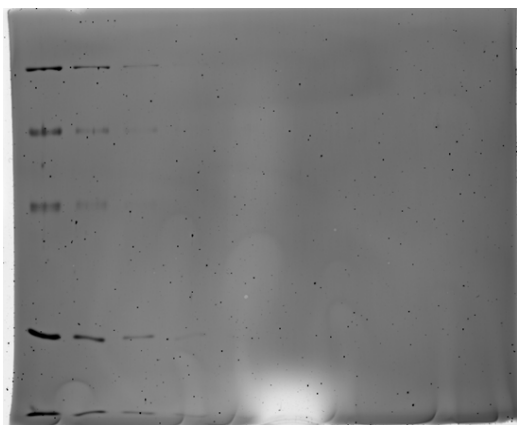
### 3.4. SDS-PAGE

Les protéines sont des macromolécules amphotères et peuvent être chargées positivement, négativement ou ne pas avoir de charge selon le pH [204-205]. Dans une expérience d'électrophorèse (SDS-PAGE), les distances de migration des spots de l'échantillon sont comparées à celles des marqueurs standards permettant d'avoir la taille des protéines. La méthode de Fergusson [223-224] permet de mesurer la migration des protéines selon leur mobilité en considérant le facteur de retardation  $R_f$  donné par le rapport de la distance de migration d'une fraction de protéine et la distance parcourue par l'éluant ou front de migration. L'intensité des bandes protéiques a été calculée en fonction des distances parcourues à l'aide d'un logiciel approprié ``ANALGEL`` (ce logiciel a été développé par Thomas Brumenfeld [225] Master Informatique). Ce logiciel génère un tableau de valeurs représentant la densité optique du gel en fonction de la distance de migration de la protéine. Il permet d'attribuer à chaque protéine une densité optique et un pic caractéristique de la séparation. Ce processus a permis de tracer les courbes de Fergusson sous la forme classique de  $\log M_w$  en fonction de  $R_f$ . (figure 3.6).

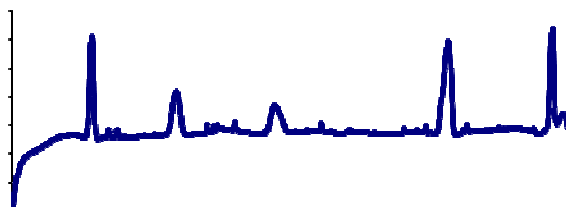
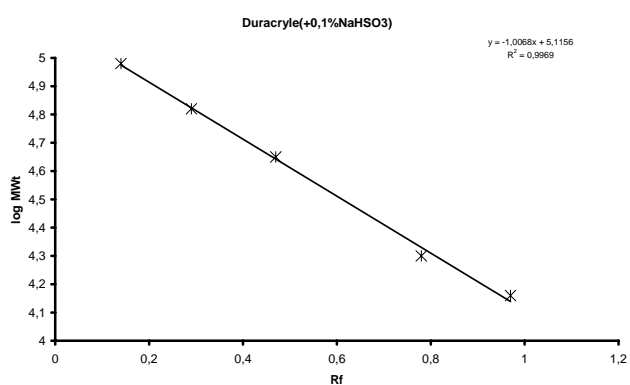
Les résultats sont analysés sur la base de 2 paramètres : Le coefficient de précision de la courbe de Fergusson communément noté  $R^2$  qui doit être compris entre 0.98 et 1 [225]. De plus le pic du spectre de densité optique doit être intense et fin. Pour chaque système, les résultats sont représentés par l'image de la migration des protéines, le spectre de densité optique et la courbe de Fergusson correspondante. Nous donnons les résultats ci-dessous sans commentaires pour les 2 classes de protéines (LMW et HMW). Les images sont elles mêmes parlantes, les spectres sont clairs et les courbes de Fergusson seront commentées en détail au chapitre discussions.

Protéines à bas poids moléculaires (LMW)

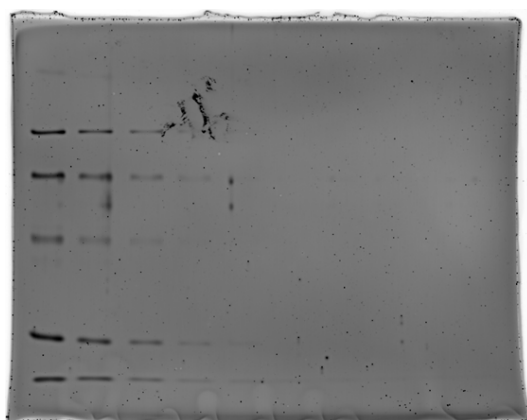
Duracryl



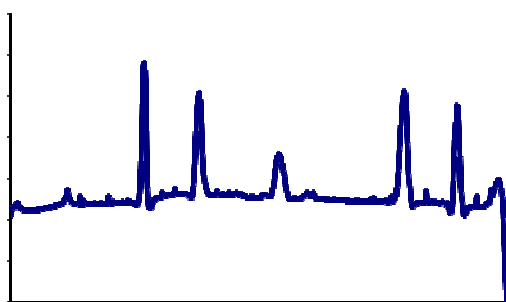
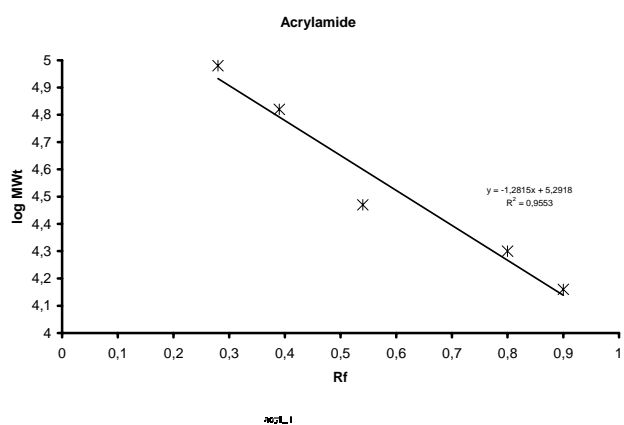
R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9969	1	7170,54794	15
	2	2919,26027	25
	3	1811,89041	28
	4	6459,67123	27
	5	7034,87671	15



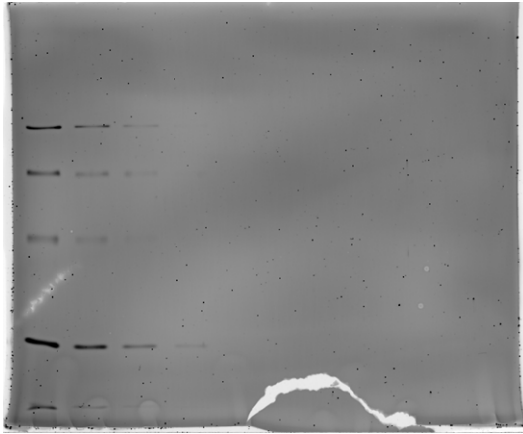
*PAAm*



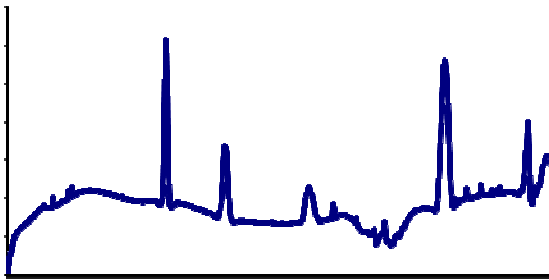
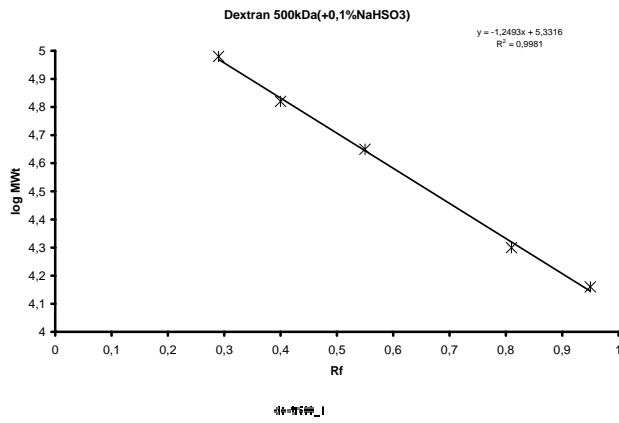
R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9553	1	7085,1358	18
	2	5045,38272	24
	3	2087,77777	28
	4	5644,54321	27
	5	5275,03766	19



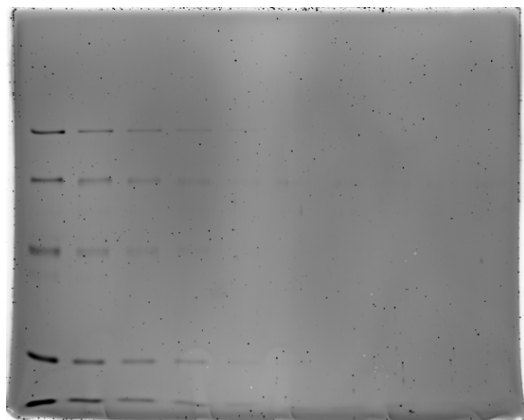
*PAAm + Dextran 500kDa*



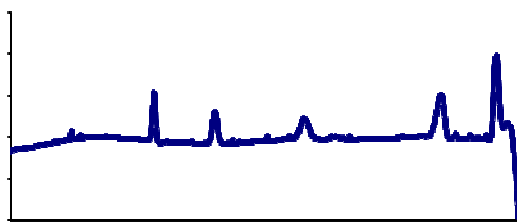
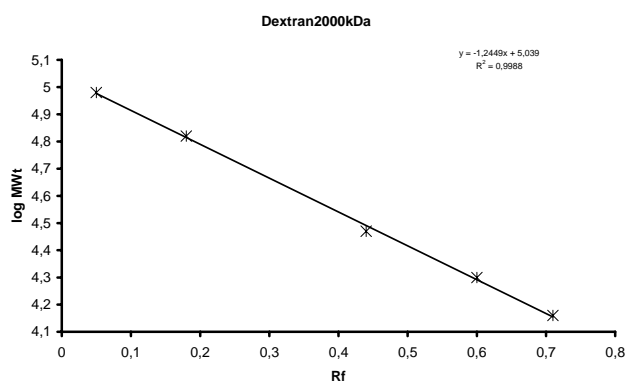
R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9981	1	8742,49231	16
	2	3926,98464	22
	3	1656,46154	8
	4	7735,13846	24
	5	4191,47692	15



*PAAm + Dextran 2000k kDa*

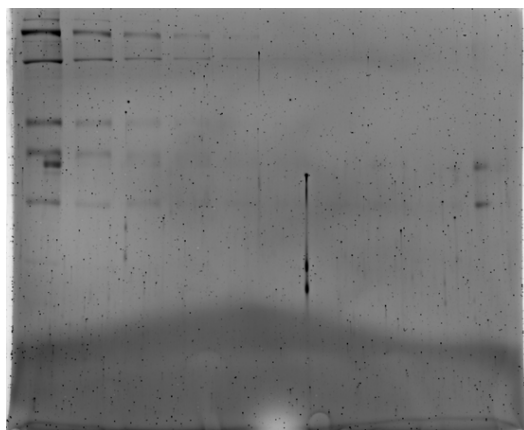


R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9988	1	6040,53521	16
	2	3722,95774	23
	3	2419,35211	33
	4	5164,59155	28
	5	10147,97193	20

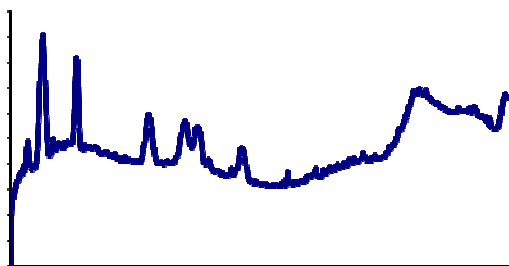
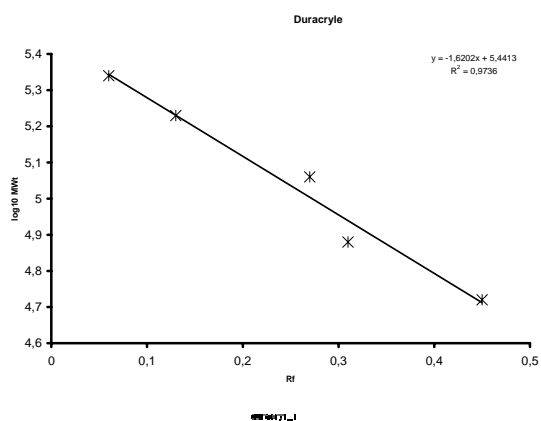


Protéines à haut poids moléculaire (HMW)

Duracryl™

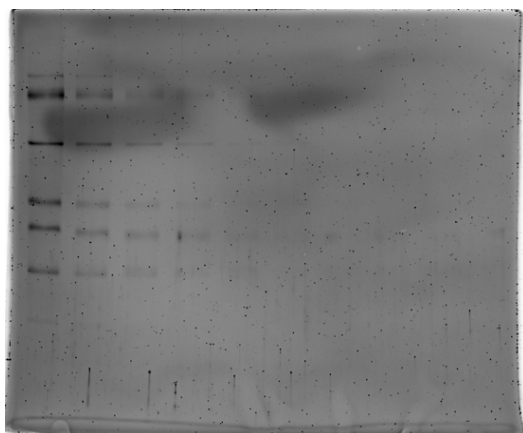


R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9736	1	9860,048	18
	2	6814,386	13
	3	3679,325	23
	4	3101,181	23
	5	2297,422	17

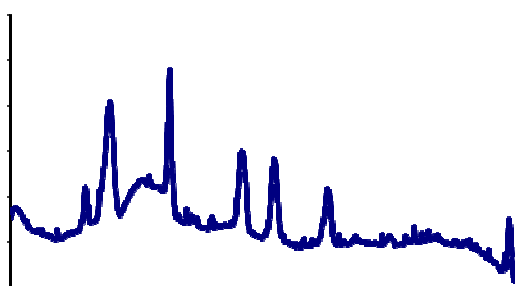
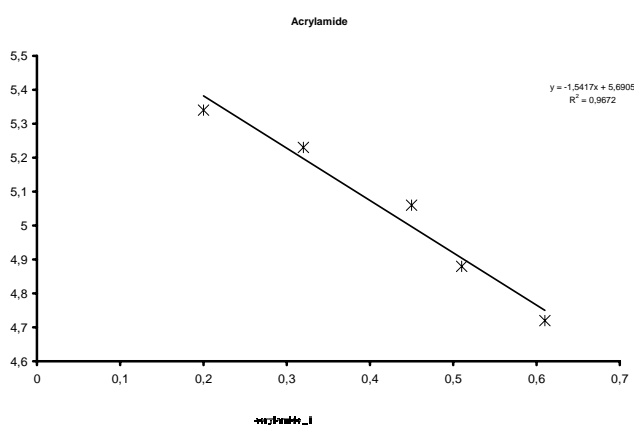




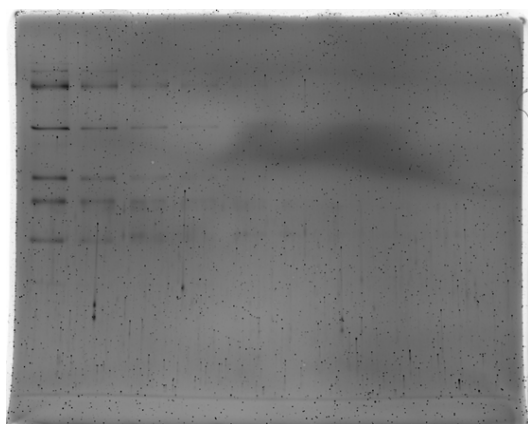
PAAm



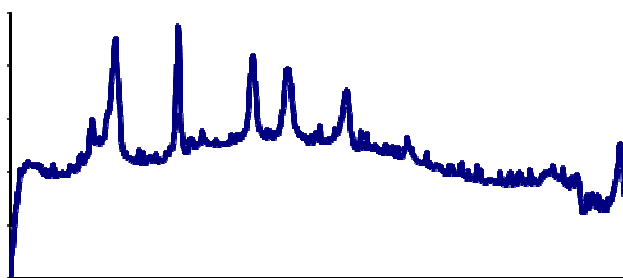
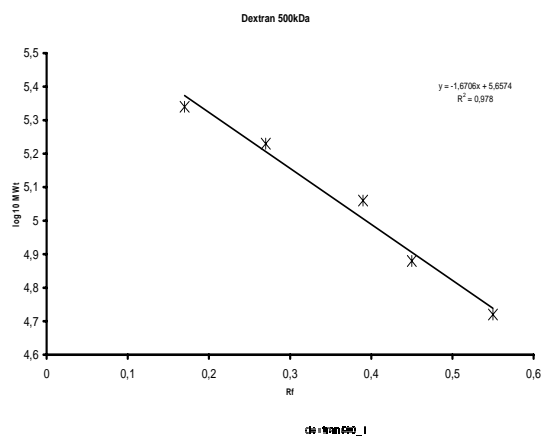
R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9672	1	4842,384	33
	2	6341,151	16
	3	3247,616	20
	4	3170,986	21
	5	2277,123	23



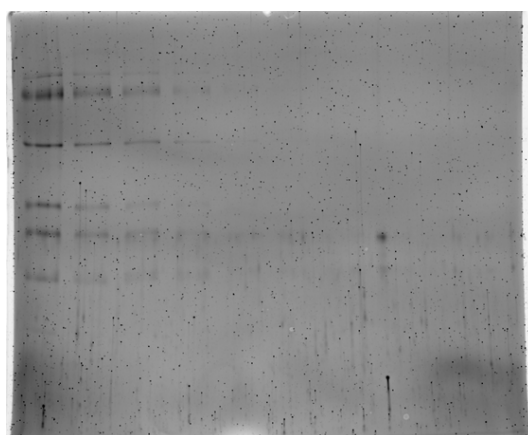
*PAAm + Dextran 500kDa*



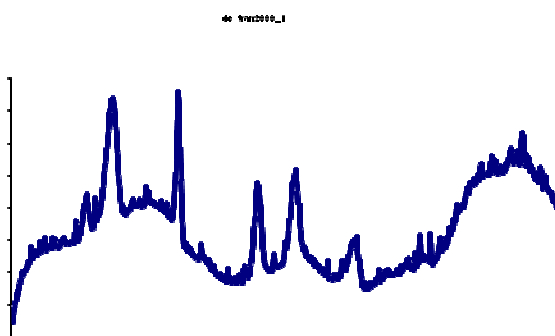
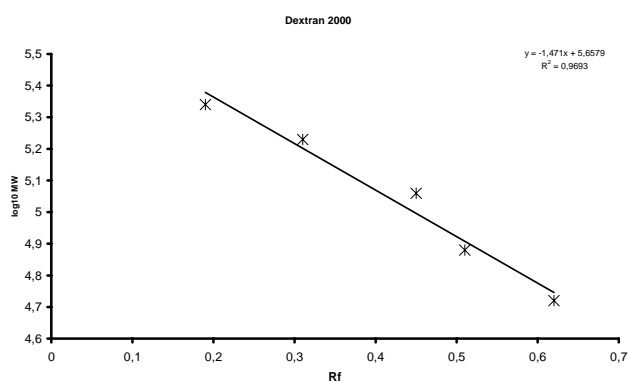
R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,978	1	10874,93	20
	2	11259,39	12
	3	6973,683	16
	4	5988,805	20
	5	5185,122	18



*PAAm + Dextran 2000kDa*



R <sup>2</sup>	pics	h	l
0,9693	1	3508,773	30
	2	4676,318	17
	3	2766,273	21
	4	2738,182	26
	5	1419,045	23



**Figure 3.6:** Images de migration des protéines en SDS-PAGE avec tableau de la résolution. Spectres de densité optique et courbes de Ferguson pour les différents gels.

## CHAPITRE 4

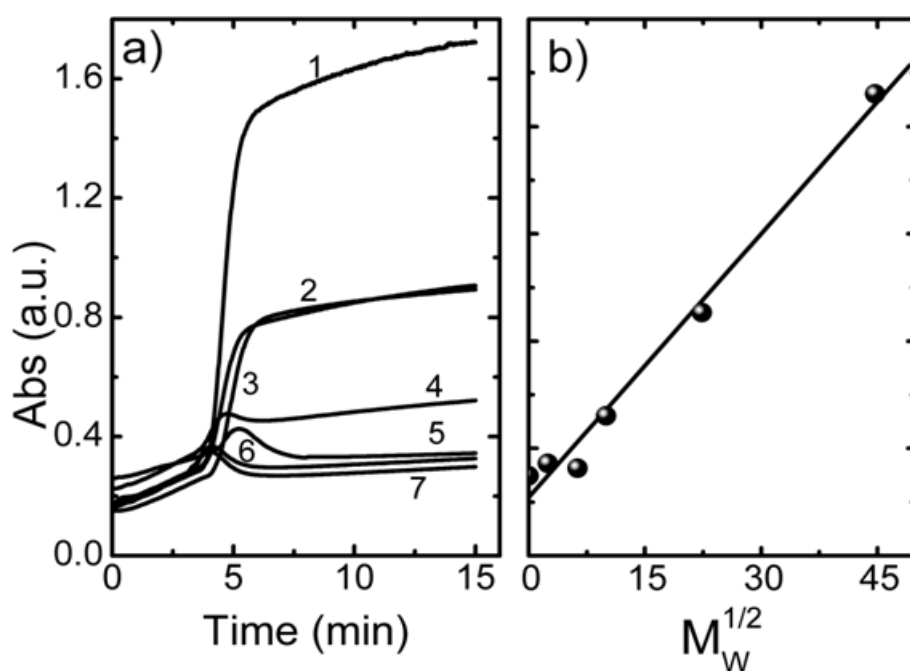
### DISCUSSION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Dans ce chapitre nous essayons d'analyser les résultats obtenus dans cette thèse et décrits au chapitre 3 précédent. Une tentative d'interprétation est faite en même temps qu'une comparaison avec les résultats de la littérature chaque fois que cette comparaison est possible. Pour plus de clarté nous garderons le même ordre de présentation. Ce chapitre est largement repris de l'article publié dans Polymer International [273]. Toutes les figures données ici sont intégralement reprises de cet article sans modification.

#### **4.1. Spectroscopie UV-Visible (cinétique de gélification)**

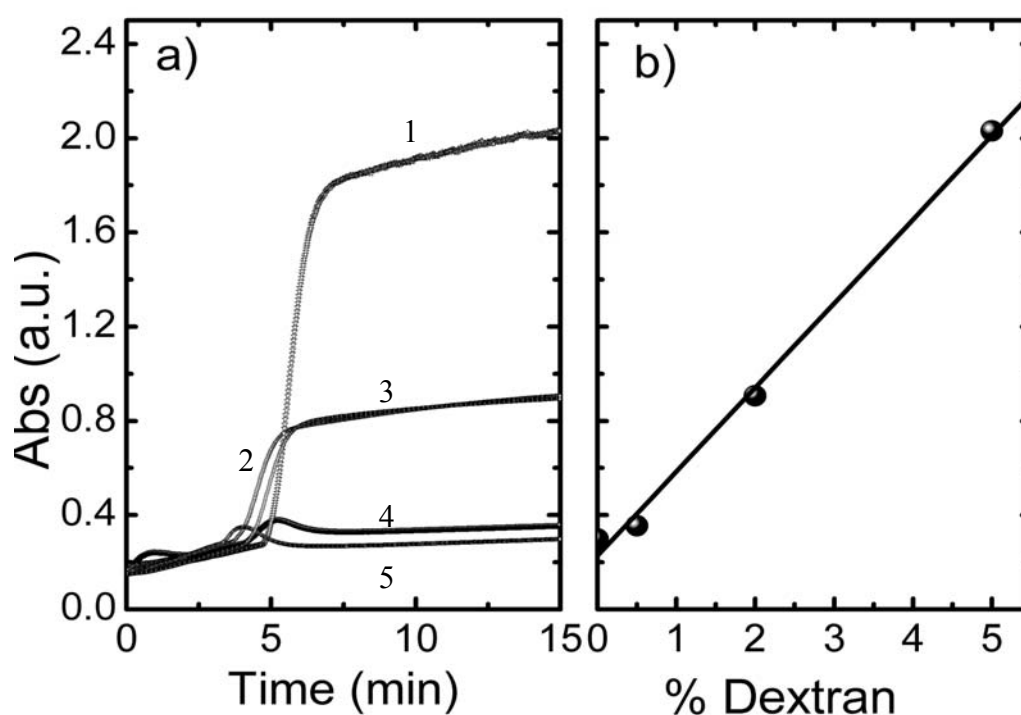
Les résultats des mesures d'absorbance par spectroscopie UV-Vis en fonction du temps pour les différents systèmes PAAm, PAAm / Dextran et Duracryl sont regroupés sur les figures 4.1 et 4.2. Les effets de la masse moléculaire et de la concentration du Dextran additif au gel de PAAm sur les mesures d'absorbance en cours de polymérisation sont clairement illustrés sur chacune de ces 2 figures. Les mêmes mesures ont été faites systématiquement sur les gels de PAAm pur et Duracryl<sup>TM</sup> pour raison de comparaison. D'une façon systématique, on remarque que l'absorbance augmente d'abord lentement puis brusquement presque instantanément durant la polymérisation pour tous les systèmes. Cette augmentation rapide de l'absorbance montre que le système devient turbide et diffuse la lumière de façon intense. Ce comportement peut être attribué à la présence de gros agrégats et constitue un signal de la transition sol / gel. Un maximum d'absorbance est obtenu dans le cas du gel de PAAm / Dextran correspondant à la plus grande masse ( $2 \times 10^6$ ) suivi de  $5 \times 10^5$ , du Duracryl<sup>TM</sup>, et du Dextran  $10^5$ . Les 3 systèmes restants donnent des résultats rassemblés en bas de la figure 4.1. Notons que les gels de PAAm / Dextran ( $5 \times 10^5$ ) et Duracryl<sup>TM</sup> ont des comportements proches l'un de l'autre.

Nous avons regroupé les résultats sur cette figure d'abord sous leur forme brute ensuite en fonction de  $M^{1/2}$  pour mettre en évidence la variation de l'absorbance selon une loi d'échelle particulière en fonction de la masse du Dextran. Ce comportement n'a pas été mis en évidence auparavant et son explication n'est pas encore claire. Pour mieux appréhender ce nouveau phénomène, d'autres mesures complémentaires devraient être faites sur des systèmes comparables utilisant différentes techniques d'analyse. Notre conclusion sur ce point est qu'il est nécessaire de conforter ces résultats par d'autres mesures qui ne pourront être validées d'une façon définitive à partir des seuls résultats présents. De plus une explication fondée sur des arguments clairs reste à trouver.



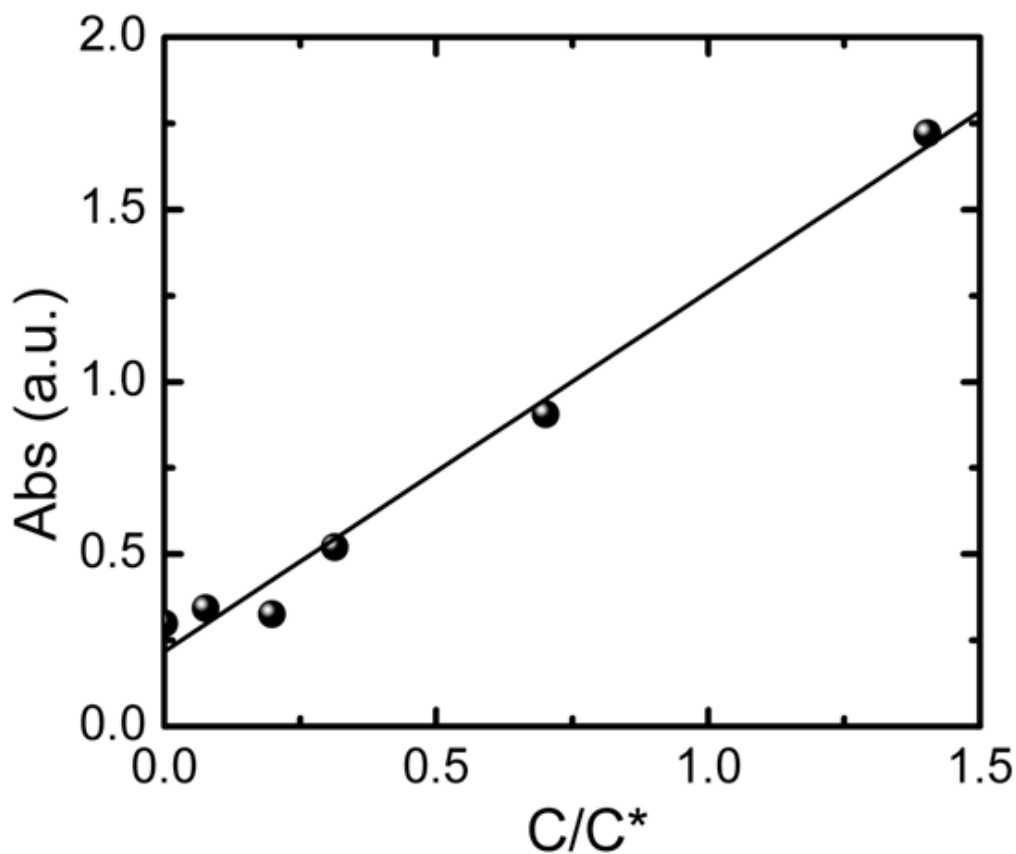
**Figure 4.1 :** Absorbance à 300 nm en fonction du temps pour les différents gels synthétisés **1.** PAAm/Dextran2000; **2.** PAAm/Dextran500; **3.** Duracryl<sup>TM</sup>; **4.** PAAm/Dextran100; **5.** PAAm/Dextran40; **6.** PAAm/Dextran5; **7.** PAAm pure. (b) Variation linéaire de l'absorbance en fonction de  $M_w^{1/2}$ .

La répétition des mesures d'absorbance en fonction de la concentration de l'additif Dextran pour une masse donnée montre que le système le plus concentré donne le plus haut niveau d'absorbance. Ce niveau décroît linéairement à mesure que la concentration de Dextran diminue. Le gel de PAAM pur donne le plus bas niveau d'absorbance ce qui est normal étant donnée sa clarté optique. La figure 4.2 montre cette croissance linéaire d'absorbance qui peut être interprétée en faisant remarquer qu'au premier ordre l'intensité diffusée est proportionnelle à la concentration de polymère en solution diluée et c'est probablement ce phénomène qui donne lieu au comportement décrit sur cette figure.



**Figure 4.2 :** Absorbance à 300 nm en fonction du temps pour les gels de PAAM en présence du Dextran de masse 500 KDa à différentes concentrations en plus de Duracryl™ et du gel de PAAM pure. (a) Absorbance en fonction du temps en présence de Dextran500 à concentrations différentes: **1.** 5wt%; **2.** 2wt%; **3.** Duracryl™; **4.** 0,5wt%; **5.** PAAM pure. (b) Variation linéaire de l'absorbance en fonction de la concentration de Dextran.

Il est intéressant de noter que tous ces résultats peuvent être rassemblés et représentés à l'aide d'un seul paramètre qui regroupe les effets de la masse molaire et de la concentration de Dextran. Une telle représentation est montrée par la courbe universelle de la figure 4.3.



**Figure 4.3 :** Variation de l'absorbance pour les différents gels étudiés en fonction de  $C/C^*$ , où  $C^*$  est la concentration de recouvrement selon De Gennes.

Tous les résultats de mesure de l'absorbance par UV-Vis sont regroupés sur cette figure pour mettre en évidence la nouvelle loi d'échelle et le comportement universel observé.

Dans cette analyse, nous avons considéré que le rayon hydrodynamique du Dextran ( $R_h$ ) peut être calculé en utilisant la loi empirique [274],  $R_h(A^\circ) = 0.27M_w^{0.47}$ . Ainsi les résultats des effets de la masse et de la concentration de Dextran ont été combinés pour tracer une courbe universelle en fonction de  $c/c^*$ , où  $c^*$  est la concentration de recouvrement définie par  $c^* = M_w / [4\pi R_g^3 / 3]$  selon De Gennes [275].

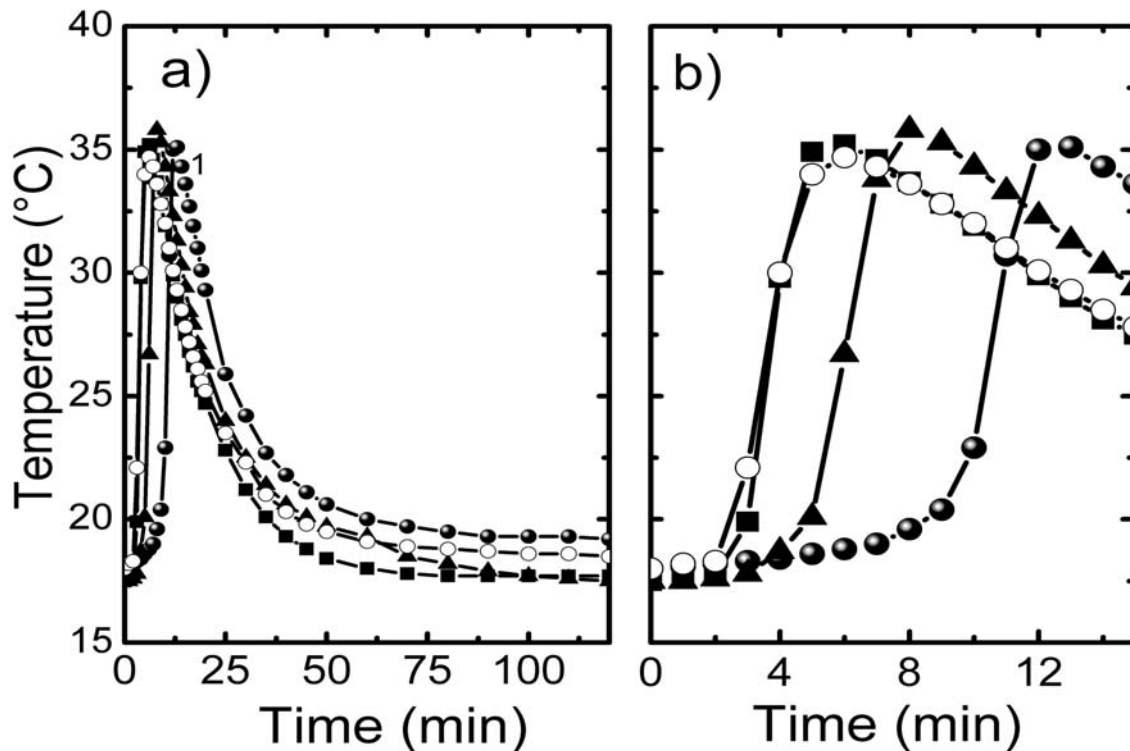
La déviation légère par rapport à un ajustement linéaire est probablement due à l'exposant critique dans la loi d'échelle de ( $R_g$ ) qui a été prise un peu inférieure à 1/2 puisque ( $c/c^*$ ) doit être proportionnel à ( $cM_w^{1/2}$ ). De plus, nous avons identifié le rayon de giration  $R_g$  au rayon hydrodynamique en utilisant la loi empirique citée. Ce comportement en loi d'échelle n'a pas été mis en évidence auparavant et son explication nécessite plus d'efforts à la fois sur le plan expérimental pour valider les résultats et sur le plan de la modélisation ou simulation sur ordinateur du phénomène en question.

#### **4.2. Profils de la température et effet Trommsdorf : cinétique de polymérisation**

La polymérisation radicalaire utilisée dans la synthèse des gels est exothermique [276] et par conséquent la cinétique de polymérisation peut être contrôlée en suivant la variation de la température en fonction du temps. La corrélation entre la température de polymérisation et le taux de conversion de monomère est un problème complexe qui nécessite l'utilisation d'un modèle cinétique approprié. En plus de la dépendance des paramètres cinétiques de la température qui est généralement de type Arrhenius, il faut résoudre l'équation de la chaleur en régime transitoire pour caractériser complètement une telle corrélation. Ce problème n'a pas fait l'objet d'une étude particulière dans cette thèse mais il est envisagé dans le cadre d'une extension future. Les profils de température obtenus expérimentalement sur les différents gels étudiés sont regroupés dans la figure 4.4.

Nous montrons ces profils sur toute la période de polymérisation dans la partie gauche de cette figure (a) à côté de leur amplification au début du processus de polymérisation dans la partie droite (b) de cette figure. Cette représentation permet de mettre en évidence les nuances des différents gels quant à l'effet Trommsdorf et déceler la différence dans les moments de l'augmentation rapide de la température.





**Fig 4.4:** (a) Profil de température en fonction du temps de polymérisation pour les systèmes étudiés. (b) Amplification des courbes au début des cinétiques. Carrés: PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Duracryl<sup>TM</sup>.

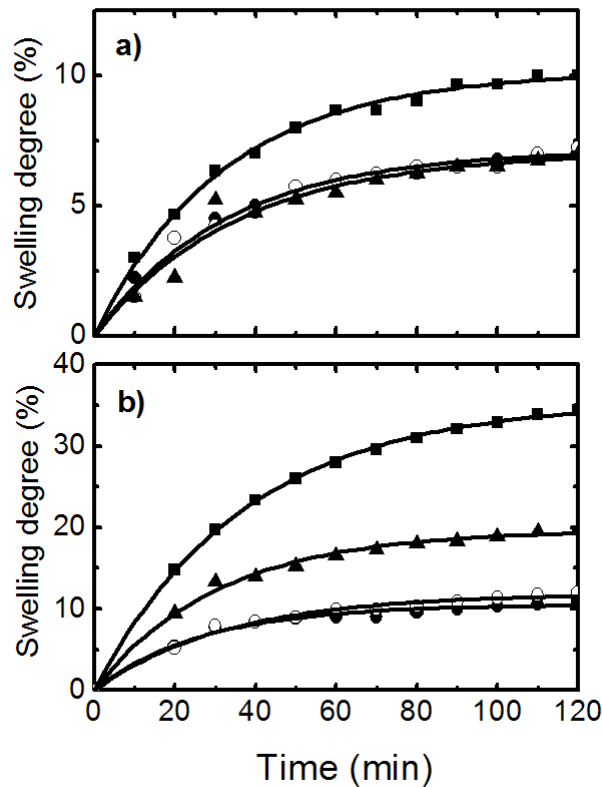
Après avoir atteint le maximum à des temps suffisamment distincts pour être observés, les courbes de température décroissent. Pour les gels de PAAm pure et celui contenant le Dextran2000, l'effet Trommsdorf a lieu moins de 4mn après le démarrage de la polymérisation. Pour le gel de Duracryl<sup>TM</sup>, le saut brusque de la température est quelque peu retardé puisqu'il n'a lieu que 10mn après le lancement du processus de polymérisation. Le gel contenant le mélange de PAAm/Dextran500 montre la même cinétique que Duracryl<sup>TM</sup>. Les effets retard dus à la présence du polysaccharide peuvent être analysés en argumentant que cet additif fait écran aux sites réactifs et provoque l'inhibition partielle de la chaîne de polymérisation et réticulation. Cette inhibition est vite compensée par l'augmentation brusque de la température discutée précédemment. Il y a un autre processus qui provoque l'accélération de la polymérisation due à la présence du polysaccharide. Cet additif provoque

à un certain moment une séparation de phase avec le PAAm par interaction provenant de l'incompatibilité thermodynamique décrite par le paramètre d'interaction  $\chi$  de Flory. Une telle séparation de phase favorise la rencontre des sites réactifs du PAAm et des radicaux de l'initiateur. Ces arguments justifient le résultat expérimental selon lequel la cinétique de polymérisation est plus rapide dans le cas des gels de PAAm synthétisés en présence du polysaccharide en comparaison avec celui du Duracryl<sup>TM</sup>. Il est clair que d'autres efforts sont nécessaires pour valider cette observation et les arguments invoqués pour analyser la cinétique de polymérisation des gels de PAAm modifiés d'une façon plus complète.

### **4.3. Cinétique de gonflement**

#### ***4.3.1. Gonflement dans l'eau dé-ionisée***

Le taux de gonflement des gels synthétisés ainsi que la quantité d'eau absorbée ont été mesurés dans l'eau dé-ionisée à un pH = 5,86 et analysés en fonction du temps. Le taux ou degré de gonflement est défini par le rapport de la masse d'eau absorbée sur celle du gel sec et les résultats sont représentés sur la figure 4.5.



**Figure 4.5:** Degré de gonflement en fonction du temps dans a) l'eau dé-ionisée b) la solution tampon (Tank Buffer) utilisée dans les expériences d'électrophorèse de type SDS-PAGE. Carrés: PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Duracryl™.

L'une des raisons pour lesquelles il est important de comprendre la cinétique de gonflement est que lors des expériences d'électrophorèse, les gels subissent des cycles de gonflement (lavages) et de coloration.

Le gel de PAAm pure montre le gonflement le plus élevé. Les autres gels en présence de Dextran ont un gonflement dans l'eau dé-ionisée proche de celui du Duracryl™ indiquant que du point de vue élasticité, ces gels sont caractérisés par des réponses mécaniques similaires. Il est connu que la quantité de solvant admise dans le gel dépend de la qualité de solvation et donc du paramètre d'interaction polymère – solvant. En ajoutant le polysaccharide au réseau de PAAm ne peut que renforcer sa résistance mécanique et à mesure que la masse molaire de l'additif augmente, la résistance du gel augmente et probablement aussi sa rigidité. Ces effets pourraient être mieux quantifiés par la mesure du paramètre

d'interaction pour la partie solvation et le module élastique pour la partie tenue mécanique et rigidité. De telles mesures n'ont pas été envisagées dans ce travail mais peuvent faire l'objet d'une étude ultérieure. Le gel qui contient le Dextran2000 gonfle moins que les autres. Il est de ce fait plus favorable en électrophorèse puisqu'il présente une bonne stabilité mécanique et ne provoque pas de grossissement ou de déformation du réseau. Il permet une bonne migration des protéines en SDS-PAGE. La ligne continue représente un ajustement théorique que nous discuterons sous peu.

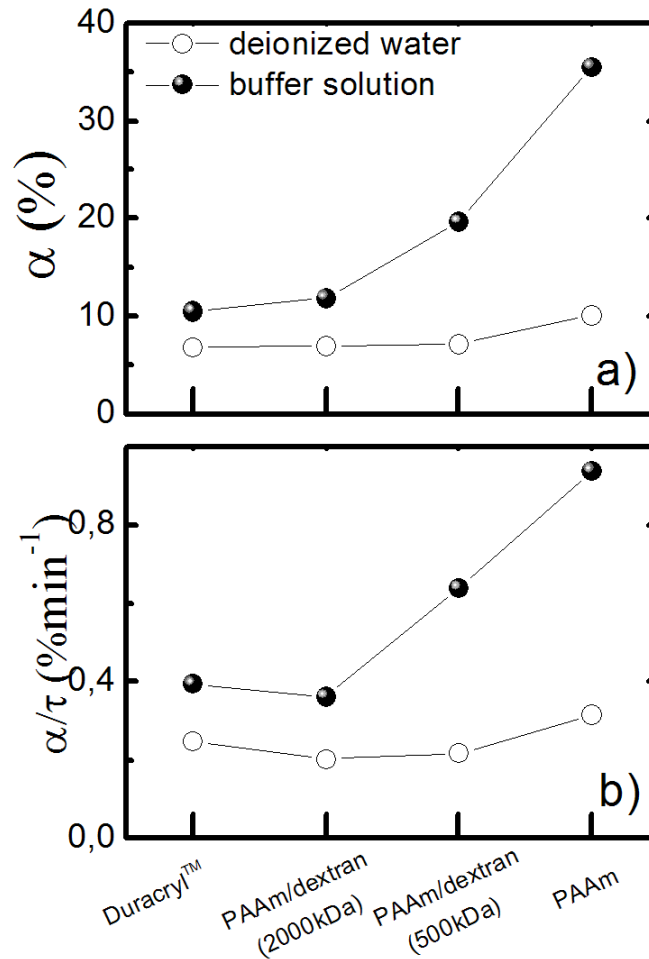
#### **4.3.2. Gonflement dans la solution tampon**

La solution tampon à pH = 8,54 représente le milieu d'élution des protéines en SDS-PAGE. Les résultats de gonflement dans cette solution sont donnés dans la partie inférieure de la figure précédente. Comme dans le cas de l'eau dé-ionisée, le gel de PAAm / Dextran2000 gonfle moins que les autres. D'une façon générale, les gels gonflent plus dans la solution tampon que dans l'eau dé-ionisée.

Le gonflement dans la solution tampon est donc assez différent de celui dans l'eau dé-ionisée. Dans la solution tampon, le gonflement est le résultat d'une compétition entre les forces élastiques du réseau qui s'opposent à son extension et la pression osmotique des petits ions très mobiles. Les courbes de la figure 4.5b montrent que le Duracryl<sup>TM</sup> et le système contenant le Dextran2000 subissent à peu près le même gonflement. D'une manière générale, le gonflement diminue lorsque la masse de l'additif polysaccharide augmente et dans tous les cas, comme on l'a déjà signalé ci-dessus, le gonflement dans la solution tampon est nettement supérieur à celui observé dans l'eau dé-ionisée. De plus, d'autres paramètres peuvent influencer le gonflement dans la solution tampon alors qu'ils ne présentent aucun effet dans l'eau dé-ionisée. Il s'agit du pH, du degré d'ionisation et de la force ionique. Ces effets de type polyélectrolyte ont un effet déterminant sur le gonflement du gel dans la solution tampon.

Les courbes en traits continus représentent un ajustement des mesures expérimentales selon l'expression  $\gamma = \alpha[1 - \exp(-t/\tau)]$  où  $\gamma$  (%) représente le taux de gonflement au temps  $t$  alors que  $\alpha$  est sa limite de saturation atteinte en un temps infiniment long par rapport au temps caractéristique  $\tau$ . Il est remarquable de noter que ce dernier paramètre est le seul paramètre d'ajustement dans cette comparaison. Les valeurs de  $\alpha$  sont données dans la figure 4.6a pour les 2 solvants alors que la vitesse initiale de gonflement représentée par le rapport  $\alpha/\tau$  est donnée dans la partie b de cette figure. Ces résultats montrent sans ambiguïté les capacités de

gonflement des différents gels étudiés dans l'eau dé-ionisée et dans la solution tampon. Le gonflement décroît de droite à gauche montrant que le gel de PAAm possède la plus grande capacité suivi par le PAAm/Dextran500 alors que Duracryl™ montre une plus faible capacité de gonflement.

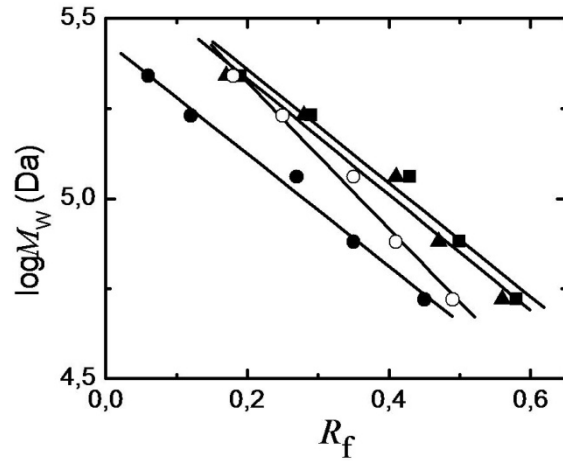


**Figure 4.6 :** a) Valeurs du taux de gonflement  $\alpha$ (%) utilisées dans l'ajustement des courbes théoriques des différents gels étudiés, b) Valeurs correspondantes du rapport  $\alpha/\tau$  (%mn<sup>-1</sup>).

#### 4.4. SDS-PAGE

Des efforts importants sont faits dans le domaine de la recherche pour améliorer la précision dans la détection des espèces moléculaires et diminuer les signaux parasites. Ainsi, ce travail s'inscrit dans ce contexte en SDS-PAGE utilisant de nouveaux gels de PAAm modifié et dont les performances sont améliorées par rapport au gel commercial Duracryl™. Les tests présentés ici utilisent des marqueurs qui consistent en des protéines standards de masse bien définie dans la gamme des petites (LMW) et des grandes masses (HMW).

La charge des protéines dépend du pH. Dans une expérience d'électrophorèse (SDS-PAGE), la méthode de Fergusson permet de mesurer la migration des protéines selon leur mobilité en considérant le facteur de retardation  $R_f$  donné par le rapport de la distance de migration d'une fraction de protéine et la distance parcourue par l'éluant ou front de migration. L'intensité des bandes protéiques a été calculée en fonction des distances parcourues à l'aide d'un logiciel qui génère un tableau de valeurs représentant la densité optique du gel en fonction de la distance de migration de la protéine et permet d'attribuer à chaque protéine une densité optique et un pic caractéristique de la séparation. Cette méthode permet de tracer les courbes de Fergusson sous la forme classique de  $\log M_w$  en fonction de  $R_f$  (figure 4.7). La mobilité des protéines en électrophorèse est reliée à la structure du réseau polymère qui a essentiellement un rôle de tamis pour des tailles de pores comparables aux dimensions des protéines sachant que les protéines de bas poids moléculaire sont plus mobiles. Cette étude préliminaire montre que les protéines de petites masses (comprises entre 10 et 100 kDa), le meilleur compromis en termes de résolution (c'est-à-dire une grande pente dans la représentation de Fergusson et faible largeur de bande dans le spectre) est atteint pour le système PAAm / Dextran500 en présence d'une faible quantité d'antioxydant (0,05%). Dans la gamme des protéines de grandes masses (50 à 2000 kDa), ce compromis est obtenu pour le système PAAm / Dextran2000 en présence d'une quantité d'antioxydant légèrement plus élevée (0,1%). Par conséquent, les courbes de Fergusson correspondant aux systèmes PAAm / Dextran500 et PAAm / Dextran2000 semblent indiquer que ces gels ont de meilleures performances que les autres et en particulier le gel commercial Duracryl™.



**Figure 4.7 :** Courbes de Fergusson donnant  $\log M_w$  en fonction du facteur de retardation  $R_f$  pour les différents systèmes analysés en SDS-PAGE. Carrés: PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Duracryl<sup>TM</sup>.

## **CONCLUSION GENERALE**

Les gels ont fait l'objet d'une attention particulière pendant de nombreuses décennies. Ils présentent des propriétés intéressantes du point de vue fondamental et appliqué. Des progrès significatifs ont été réalisés pour mieux comprendre les mécanismes physico chimiques qui régissent leur comportement et leurs propriétés d'usage dans différentes conditions. Cependant, les gels continuent de susciter la curiosité des chercheurs pour approfondir les connaissances acquises et explorer d'autres phénomènes non élucidés jusqu'à nos jours malgré les progrès réalisés.

Cette thèse s'inscrit dans cette problématique et constitue un effort tendant à la mise au point de nouveaux gels de PAAm renforcés par des macromolécules de Dextran. L'un des buts recherchés est de trouver un système optimal en masse et en concentration de l'additif polysaccharide permettant d'obtenir des performances de séparation en mode électrophorèse améliorées par rapport au gel commercial connu sous le nom de Duracryl™ fabriqué par l'entreprise Genomics Solution Inc. Ces gels ont été synthétisés à partir de produits chimiques parfaitement caractérisés contrairement aux produits contenus dans Duracryl™ qui ne sont pas connus d'une façon précise. Nous avons cherché les conditions permettant d'améliorer la résistance des gels pour atteindre une bonne résistance mécanique après des utilisations nombreuses et répétitives. Nous avons également exploré les conditions permettant de réaliser une meilleure transparence optique et des propriétés de fluorescence plus performantes en comparaison avec les gels commerciaux.

Sachant que les gels utilisés en séparation électrophorèse des macromolécules biologiques et notamment des protéines sont généralement immergés dans des solutions aqueuses ou des milieux liquides (solution tampon, liquide physiologique, électrolyte) les propriétés de gonflement ont été caractérisées avec une grande précision pour une bonne identification des masses et des charges des macromolécules à séparer ou à isoler. La chaleur dégagée par le processus de polymérisation a été étudiée en examinant la variation de la température en fonction du temps. La croissance brutale de température au début du processus connue sous le nom d'effet Trommsdorf a montré que la cinétique de



polymérisation des gels de PAAm en présence de Dextran est plus rapide par rapport au gel commercial Duracryl<sup>TM</sup>.

La spectroscopie UV-vis a été mise à contribution dans cette comparaison et a permis de corroborer les résultats précédents en mettant en évidence l'apparition au début de la polymérisation d'hétérogénéités structurales et d'une séparation de phase du type sol / gel.

La cinétique de gonflement des gels considérés dans cette thèse a été examinée dans l'eau dé-ionisée et dans la solution tampon de SDS-PAGE. L'ajustement des données expérimentales avec une expression mathématique simple a permis de mettre en évidence une vitesse d'augmentation du taux de gonflement plus rapide pour les gels de PAAm avec ou sans additif polysaccharide en comparaison avec Duracryl<sup>TM</sup>. Une étude de modélisation plus détaillée est en cours pour évaluer les effets des paramètres qui contrôlent à la fois la cinétique de polymérisation, la distribution de tailles des pores du gel ainsi que les paramètres qui contrôlent le gonflement.

Afin d'analyser de manière précise la coloration et la résolution de séparation, un logiciel développé au laboratoire a été utilisé permettant de déterminer le niveau de détection des bandes. Après découpage de chaque bande en SDS-PAGE correspondant à la séparation du mélange protéique à une concentration donnée sous Photoshop®, ce logiciel permet de générer un tableau de valeurs donnant la densité optique en fonction de la distance de migration. On peut ainsi attribuer à chaque protéine une valeur de la densité optique et un pic caractéristique.

Notons enfin que la polymérisation des gels de PAAm pure et modifiés est généralement faite en présence d'oxygène provoquant un retard au début des réactions en chaîne dû à l'annihilation des radicaux émis par le système initiateur. Deux types d'antioxydants ont fait l'objet d'une étude préliminaire et qui sera poursuivie dans un proche avenir.

## Références Bibliographiques

- [1] Hoffman, A.S., in :DeRossi, D., Kajiwara, K. Osada, Y., Yamauchi, A. (Eds.), Polymer Gels: Fundamentals und Biomedical Applications, Plenum Press, New York 1991, pp. 289-297.
- [2] Hames, B.D., Rickwood, D., (Eds), Gel Electrophoresis of Proteins; A Pratical Approach, second edition, Oxford University Press, Oxford 1994, pp 1-22.
- [3] Fawcett, J.S., Morris, C.J.O.R., Sep.Sci.1996, 1,9-26.
- [4] Rigueti,P.G., Brost,B.C.W., Snyder, R.S.,J.Biochem. Biophysics. Methods 1981, 4, 347-363.
- [5] Rodbard, D., Leviotov, C.,Chrambach, A., Sep. Sci. 1972,7, 705-723.
- [6] Gelfi, C., Rigueti, P.G., Electrophoresis 1981, 2, 220-228.
- [7] Önder, P., Kara, S., Polymer, 42 (2001) 7411-7417.
- [8] Rigueti, P. G., Gaglio, S., Saracchio, M., Quaraoni, S., Electrophoresis. 1992, 13, 587-595.
- [9] Charlionet, R., Levasseur, L., Malandain, J.J.,Electrophoresis 1996, 17, 58-66.
- [10] Chiari, M., D'Alesio, L., Consonni, R., Rigueti, P.G., Electrophoresis 1995, 16, 1337-1344.
- [11] Rigueti, P.G., Chiari, M., Electrophoresis 1995, 16, 1815-1829.
- [12] Chan, G.Y.N., Jingran, A.G., Kambouris, P.A., Looney,M.G., Solomon, D.H., Polymer 1998, 39, 5781-5787.
- [13] Chan, G.N.Y., Kambouris, P.A., Looney, M.G., Qiao, G.G., Solomon, D.H., Polymer 2000, 41, 27-34.
- [14] Hochstrasser, D.F., Merrill, C.R., Patchornik, A. US Patent # 5, 283, 196, 1994.
- [15] T. Tanaka, Sci. Am. 244, 124 (1981).
- [16] Bekturov E.A., Mamutbekov G.K. ; Makromol Chem1997, 81, 198.
- [17] Lindsay C., Sherrington D.C. ; Reactive Polymers 1988, 3, 327.
- [18] Tokita, M., Tanaka, T., Science, 253, 1121 (1991).
- [19] Bansil R., Gupta M.K.; Ferroelectrics 1980, 30, 63.
- [20] Richards E.G., Temple C.J.; Nature (Phys.Sci) 1971, 230, 92.

- [21] Tanaka, T., Sun, S.T., Hirokawa, Y., Katayama, S., Kucera, J., Hirose, Y., Amiya, T. *Nature* 1987, 325, 796-798.
- [22] Kremer, M., Pothmann, E., Rosser, T.Baker, J., Yee, A., Blanch, H., Prausnitz, J. M., *Macromolecules*. 1994, 27, 2965-2973.
- [23] Matsuo ES, Orkisz M, Sun S-T, Lia Y, Tanaka T., *Macromolecules*, 1994; 27: 6791.
- [24] Hu T-P, Ma Ds, Cohen C. *Polymer* 1983; 24: 1273.
- [25] Dusek K. *Collect Czech Chem Commun* 1993; 58: 2245.
- [26] Ilarvsky M., Prins W.; *Macromolecules*, 1970, 3, 425.
- [27] Dusek K.; in *Polymer Networks. Structure and Mechanical Properties.*, A.J.Cchompff and S. Newman, Eds., Plenum Press, NY 1971.
- [28] Baker J.P., Hong L-H., Blanch H.W., Prausnitz J.M.; *Macromolecules*, 1994, 27, 1446.
- [29] Panyukov S., Rabin Y., *Macromolecules* 1996, 29, 7690.
- [30] Flory, P.J.*J.Am.Chem.Soc.*1941, 63, 3083-3090, 3091-3096, 3096-3100.
- [31] Stockmayer, W.H.*J.Chem.Phys.* 1943, 11, 45-55.
- [32] Moad, G., Solomon, D.H., *The Chemistry of Free Radical Polymerisation*; Elsevier Science Ltd: Oxford, 1995; p8.
- [33] Dusek K.; in *Developpements in polymerisation 3*, R.N.Haward, Ed. *Applied Science*, London, 1982, p.143.
- [34] Vinod Kumar G.S., Mathew B.; *Eur Polymer Mater* 1998, 34, 1185.
- [35] Kasgöz H., Özgümü S., Orbay M.; *Polymer* 2001, 42, 7494.
- [36] Saraydin D., Karadag E., Güven O.; *Sep Sci Technol* 1995, 30, 3291.
- [37] Karadag E., Saraydin D., Öztöp N. Güven O.; *Polym Adv Technol* 1994, 5, 664.
- [38] Biçak N., Sherrington D.C., Senkal B.F.; *React Funct Polym* 1999, 41, 69.
- [39] Saraydin D., Karadag E., Güven O.; *Sep Sci Technol* 1995, 30, 3747.
- [40] Saraydin D., Isiksever Y., Sahiner N.; *Polym Bull* 2001, 47, 81.
- [41] Chiari M., Micheletti P.G., Righetti P.G., Poli G.; *J.Chromatogr.* 1992, 598, 287- 297.
- [42] Righetti P., Gelfi C.; *J.Chromatogr. B*1996, 699, 63-75.
- [43] Patton W., Lopez M., Barry P., Skea W.; *Biotechniques* 1992, 12, 580-585.
- [44] Mills N., Ilans J.; *Electrophoresis* 1985, 6, 531-534.

- [45] Orakdogan N., Okay O.; Journal of Applied Polymer Science, Vol 103, 3228-3237 (2007).
- [46] Feng X.D., Guo X.Q., Qiu K.Y.; Makromol Chem 1988, 189, 77.
- [47] Edbon J.R., Hunckerby T.N., Hunter T.C.; Polymer 1994, 35, 251.
- [48] Bokias G., Durand A., Hourdet D.; Makromol Chem Phys 1994, 199, 1387.
- [49] Mikherjee A.R., Ghosh P., Ghadha S.C., Palit S.R.; Makromol Chem 1966, 97, 202.
- [50] Chauhan G.S., Mahajan S.; J.Appl.Polym.Sci. 2002, 86, 667.
- [51] Chauhan G.S., Kumar S., Kuamri A., Sharma R. ; J.Appl.Polym.Sci. 2003, 90, 3856.
- [52] Inam R., Caykara T., Kantoglu O.; Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B2003, 208, 400.
- [53] Saraydin D., Karadag E., Güven O. ; J.Appl.Polym.Sci. 2000, 79, 1809.
- [54] Akkas P., Güven O. ; J.Appl.Polym.Sci. 2000, 78, 284.
- [55] Inam R., Gûmû Y., çaykara T. ; J.Appl.Polym.Sci. 2004, 94, 2401.
- [56] Mark H.F., Bikales N.M., Overberger C.G., Menges G. ; Eds., Wiley: New York, 1987, p789.
- [57] Lele A. ; Polymer Beyond AD 2000 ; Allied Publishers : New Delhi, 1999 ; p661.
- [58] Fu T.Y., Morawtez H. ; J.Biol.Chem. 1976, 251, 2087.
- [59] Higuchi M., Sengu R., Polymer.J. 1972, 3, 370.
- [60] Makhaeva E.E., Starodubtzev G.S.; Makromol.Chem.Rapid.Commun. 1993, 14, 105.
- [61] Srivinivasulu B., Raghunath P.R., Sundaram E.V., Srinivas M., Sirdeshmukh L.; Eur.Polym.J. 1991, 27, 979.
- [62] Srivinivasulu B., Raghunath P.R., Sundaram E.V.; J.Appl.Polym.Sci. 1991, 43, 1521.
- [63] Shan J., Liu Z.; Chem.J.Polym.J. 1998, 30, 585.
- [64] Yamamoto Y., Sefton M.V.; J.Appl.Polym.Sci 1996, 61, 351.
- [65] Ratner B.D.; In Comprehensive Polymer Science; Aggarwal S.L.; Ed.; Pergamon Press: New York, 1989, P 224, Vol 7.
- [66] Begam T., Nagpal A. K., Singhal R.; Journal of Applied Polymer Science 2003, 89: 779-786.

- [67] Cascone M.G., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G., Lazzeri L.; *J.Biomater.Sci.Polym.* Ed. 2001, 12, 267. Cascone M.G., Barbani N., Cristallini C., Giusti P., Ciardelli G., Lazzeri L.; *J.Biomater.Sci.Polym.* Ed. 2001, 12, 267.
- [68] Draye J.P.D., Delay B., Van De Voorde A., Van Den Bulcke A., De Reu B., Schacht E.; *Biomaterials* 1998, 19, 1677.
- [69] Chen J., Jo S., Park K. ; *Carbohydr.Polym* 1995, 28, 69.
- [70] Arranz K., Sanchez-Chaves M., Ramirez., J.C. ; *Polymer* 1993, 34, 1908.
- [71] Cadee J.A., De Kerf M., De Groot C.J., Den Otter W., Hennick W.E.; *Polym.Commun* 1999, 40, 6877.
- [72] Edman P., Ekman B., Sjöholm I. ; *J.Pharm.Sci.* 1980, 69, 838.
- [73] Ramirez J.C., Sanchez-Chaves M., Arranz F. ; *Polymer* 1994, 35, 2651.
- [74] Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Van Den Bosh J.J.K., Van Der Kerk-Van Hoof A., Hennink W.E. ; *Macromolecules* 1997, 30, 3411.
- [75] Zhang X., Wu D., Chu C. ; *Bioaterials* 2004, 25, 4719.
- [76] Brondsted H., Hovgaard L., Simonsen L. ; *Eur.J.Pharm.Biopharm.* 1996, 42, 85.
- [77] Draye J.P., Delaey B., Van de Voorde A., Van den Bulcke A., De Reu B., Schacht E. ; *In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films.* *Biomaterials* 1998, 19, 1677-1687.
- [78] Bogdanov B., Schacht E., Van Den Bulcke A.; *Thermal and rheological properties of gelatin-dextran hydrogels.* *J.Therm. Anal.* 1997, 49, 847-856.
- [79] Schacht E., Bogdanov B., Van Den Bulck A., De Rooze N.; *Hydrogels prepared by cross-linking of gelation with dextran dialdehyde.* *React. Funct. Polym.* 1997, 33, 109-116.
- [80] Draye J.P., Delay B., Van De Voorde A., Van Den Bulcke A., Bogdanov B., Schacht E.; *In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatine hydrogel films.;* *Biomaterials* 1998, 19, 99-107.
- [81] O'Dell S., Chen X., Day I., *Hum. Mutat.* 2000, 15, 565-576.
- [82] Chen X., O'Dell S., Day I.; *Biotechniques* 2002, 32, 1080-1086.
- [83] Patton W.; *J.Chromatogr. B2002*, 771, 3-31.
- [84] Schulenberg B., Beechem J., Patton W.; *Chromatogr. B2003*.

- [85] Schulenberg B., Patton W., Handbook of Proteomics, Humana Press, Totowa, NJ 2003.
- [86] Kolaz, B.N., Wojaczynska, M., Polymer. 1998, 39, 69-74.
- [87] Schmid, A.B., Flodin, P., Eur. Polym. J. 1993, 29, 469-474.
- [88] O'Connell, P.B.H., Brady, C.I., Anal, Biochem. 1976, 76, 63-73.
- [89] Patras, G., Qiao, G., Solomon, D.H., Macromolecules. 2001, 34, 6396-6401.
- [90] Chan G.Y.N., Looney M.G., Solomon D.H., Velmayitham S.; Aust. J. Chem., 1998; 51: 31-35.
- [91] Chan G.Y.N., Jhingran A.G., Kambouris P.A., Looney M.G., Solomon D.H.; Polymer. 1998; 39: 5781-5787.
- [92] Patras G., Solomon D.H., Qiao G., Electrophoresis 2000, 21, 3843-3850.
- [93] Patras G., Solomon D.H., Qiao G., Electrophoresis 2001, EL-4671.
- [94] Funke W, Okay O., Joos-Muller B.; Adv.Polym.Sci 1998, 136, 139.
- [95] Okay O.; Prog.Polym.Sci 2000, 25: 711.
- [96] Baker J.P., Hong L.H., Blanch H.W., Prausnitz J.M.; Macromolecules 1994, 27: 1449.
- [97] Kizilay M.Y., Okay O.; Macromolecules 2003, 36: 6856.
- [98] Debye P.J.; J.Chem.Phys. 1959, 31, 680.
- [99] Bueche F., J.Colloid Interface Sci. 1970, 33, 61.
- [100] Debye P., Bueche A.M.; J.Appl.Phys. 1949, 20, 518.
- [101] Soni V.K., Stein R.S., Macromolecules 1990, 23, 5257.
- [102] Horkay F., Hecht A.M., Geissler E.; Macromolecules 1994, 27, 1795.
- [103] Higgins J.S., Benoît H.C.; "Polymers and Neutron Scattering", Clarendon Press, Oxford 1994.
- [104] Kozulic B., Mosbach K., Pietrzak M.; Anal.Bio.Chem. 1988, 170, 478-484.
- [105] Girot P., Boschetti E.; J.Chromatogr. 1981, 213, 389-396.
- [106] Florin E., Kjellander R., Ericsson J.C.; J.Chem.Soc.Faraday.Trans. 1984, 80, 2889-2910.
- [107] Gravey M.J., Robb I.D.; J.Chem.Soc.Faraday. Trans. 1979, 1, 993-1000.
- [108] Kazanskii K.S., Arkhipovich G.N., Afnaséva M.V., Dubrovskii S.A., Kuznetsova V.I.; Polym.Sci. 1993, 35, 945-951.

- [109] Wachtel E., Maroudas A.; *Biochem.Biophys.Acta.* 1998, 37-38.
- [110] Takano M., Ogata K., Kawauchi S., Satoh M., Kmiyama J.; *Polym. Gels. Networks.* 1998, 6, 217-232.
- [111] Ataman M.; *Colloïd. Polym. Sci.* 1987, 265, 19-25.
- [112] Liveney Y.D., Ramon O., Kesselman E., Cogan U.n Mizhari S., Cohen Y.; *J.Polym.Sci. Part B: Polym.Phys.* 2001, 39, 2740-2750.
- [113] Wells J.D.; *Proc.R.Soc. London. Ser B.* 1973, 183, 399-419.
- [114] Boyde T.R.C.; *J.Chromatogr* 1976, 124, 219-230.
- [115] Eichler S., Ramon O., Cohen Y., Mizrahi S.; *Int.J.Food.Sci.Technol.* 2002, 37, 1-9.
- [116] Thiel J., Maurer G.; *Fluid.Phase.Equilibr.* 1999, 165, 225-260.
- [117] Ramaraj B.J., Radhakrishnan G.; *J.Appl.Polym.Sci.* 1994, 52, 837.
- [118] Tanaka T.; *Polymer* 1979, 20, 1404.
- [119] Baker J.P., Blanch H.W., Parausnitz J.M.; *J.Appl.Polym.Sci.* 1994, 52, 783.
- [120] Hariharan D., Peppas N.A.; *J Controlled Release* 1993, 23, 123.
- [121] Gudeman L., Peppas N.A.; *J.Appl.Polym.Sci.* 1995, 55, 919.
- [122] Chu Y., Varanasi P.P, McGlade M.J., Varanasi S.; *J.Appl.Polym.Sci.* 1995, 58, 2161.
- [123] Hooper H.H., Blanch J., Prausnitz H.W.; *J.M.Macromolecules.* 1990, 23, 1096.
- [124] Bloomfield V., Carpenter J.L.; In *Polyelectrolytes: Science and Technology*; Hara M.; Ed.; Marcel Dekker: New York, 1993, pp77-125.
- [125] Katchalsky A., Michaeli I.; *J.Polym.Sci.* 1955, 15, 69-86.
- [126] Ogawa I., Yamano H., Miyagawa K.; *J.Appl.Polym.Sci.* 1993, 50, 35-40.
- [127] Funke W., Okay O., Joos-Muller B.; *Adv.Polym.Sci.*, 1998, 136, 139.
- [128] Okay O., *Prog. Polym. Sci.*; 2000, 25, 711.
- [129] Mallam S., Horkay F., Hecht A.M., Geissler E.; *Macromolecules* 1989, 22, 3356.
- [130] Ikkai F., Shibayama M.; *Phys Rev. E* 1997, 56, R51.
- [131] Cohen Y., Ramon O., Kopelman I.J., Mizraki S.; *J.Polym.Sci.Polym.Phys.* Ed 1992, 30: 1055.
- [132] Schossler F., Skouri R., Munch J.P., Candau S.J.; *J.Phys II.* 1994, 4, 1221.

- [133] Baselga J., Llorente M.A., Nieto J.L., Hernandez-Fuentes I. Pierola I.F.; Eur.Polym.J. 1988, 24, 161.
- [134] Suzuki Y., Nozaki K., Yamamoto T., Itoh K., Nishio I.; J.Chem.Phys. 1992, 97, 3808.
- [135] Richards E.G., Temple C.; J.Nature 1971, 230, 92.
- [136] Hsu T.P., Ma D.S., Cohen C.; Polymer 1983, 24, 1273.
- [137] Hsu T.P., Cohen C.; Polymer 1984, 25, 1419.
- [138] Oshmyan V.G., Benguigui L. ; J.Phys II. France 1996, 6, 1585.
- [139] Hecht A.M. ; J.Phys. France 1978, 39, 631.; Benguigui L.; J.Phys II. France 1995, 5, 437.
- [140] Shibayama M.; Makromol Chem Phys 1998, 199, 1.
- [141] Bastide J., Candau S.J.; in: Physical Properties of Polymeric Gels., J.P.Cohen Addad, Ed., Wiley, Chichester 1996, p. 143.
- [142] Nieto J.L., Baselga J., Hernandez-Fuentes I., Llorente M.A., Pierola I.F.; Eur.Polym.J. 1987, 23, 551.
- [143] Baselga J., Llorente M.A., Nieto J.L., Hernandez-Fuentes I., Pierola I.F.; Eur.Polym.J. 1988, 24, 161.
- [144] Baselga J., Llorente M.A., Hernandez-Fuentes I., Pierola I.F.; Eur.Polym.J. 1989, 25, 471.
- [145] Tabita H., Hamielec A.E.; Polymer, 1990, 31, 1546.
- [146] Flory P.; J.Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press: Ithaca, NY 1953.
- [147] Krause S. ; J.Mocromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.C7, 1972, 251.
- [148] De Gennes P.G. ; Scaling Concepts in Polymer Physics (Cornell University, Ithaca, 1979).
- [149] Moad G., Solomon D.H.; The Chemistry of Free Radical Polymerization., Elsevier Science, Oxford, UK 1995, pp. 257-258.
- [150] Kara S, Pekcan Ô. ; Journal of Applied Polymer Science, 2001, Vol. 80, 1898–1906.
- [151] Pekcan Ô, Kara S. ; Polymer. 2000, 41, 8735–8739.
- [152] Pekcan Ô, Kara S. ; Polymer. 2001, 42, 10045–10053.
- [153] Muller.R, Gerard.E, Dugand.P, Rempp.P, Gnanou.V; Rheological characterization of the gel point: a new interpretation, macromolecules, 1991, 24, 1321-1326.



- [154] Yang.Y.S, Suspene.L, curing of unsaturated polyester resins : viscosity studies and simulations in pre-gel state, Polym. Eng. Sci., 1991, 31, 321-332
- [155] Kuga S.; J.Chromatogr. 1986, 206, 449-461.
- [156] Kuga S.; J.Chromatogr. Lib. 1988, 40, (Chapter 6).
- [157] Tanaka T., Filmore D. ; Chem Phys 1979, 70, 1214.
- [158] Peters A., Candau S.J.; Macromolecules 1986, 19, 1952.
- [159] Chiarelli P., De Rossi D.; Prog.Colloid.Polym.Sci. 1988, 78, 4.
- [160] Dusek K., Prins W. ; Adv.Polym.Sci. 1969, 6 : 1.
- [161] Candau S.J., Bstide J., Delsanti M. ; Adv.Polym.Sci. 1982, 7, 44.
- [162] Li Y., Tanaka T. ; Chem.Phys. 1990, 92 (2) : 1365.
- [163] Silbenger A. ; In : Kramer O., editor. Biological and synthetic networks, Amsterdam: Elsevier, 1988.
- [164] Wards A.G., Courts A.; The Science and Technology of Gelatin, Academic Press: New York, 1977.
- [165] Veis A., The Macromolecular Chemistry of Gelatin; Academic Press: 1964.
- [166] Djabourov M., Papon P.; Influence of thermal treatments on the structure and stability of gelation gels. Polymer 1983, 24, 537-538.
- [167] Clark A.H., Ross-Murphy S.B.; Structural and mechanical properties of biopolymer gels.Adv.Polym.Sci. 1987, 83, 57-192.
- [168] Burness D.M., Pouradier J.; The hardening of gelatine and emulsions; Mees C.E.K., James T.H.; Macmillan: New-York, 1996; Chapter 3.
- [169] Wichterle O., Lim D.; Nature 1960, 185: 117-118.
- [170] Chen J., Blevins W.E., Park K.; J.Controlled.Rel. 2000, 64: 39-51.
- [171] Hwang S.J., Park H., Park K.; Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Sys. 1998, 15: 243-284.
- [172] Khare A.R., Peppas N.A.; Absorbent Polymer Technology; Peppas L.B., Harland R.S.; Ed.; Elsevier: Armsterdam, 1990, p223.
- [173] Çaykara T., Bozkaya U., Kantoglu Ö. ; J.Polym.Sci. Part B : Polym Phys 2003, 41, 1656.
- [174] Çaykara T., Bozkaya U., Kantoglu Ö. ; J.Polym.Sci. Part B : Polym Phys 2003, 41, 1656.

- [175] Brannon-Peppas L., Peppas N.A.; Chem.Eng.Sci. 1991, 46, 715.
- [176] Flory P.J.; Principles of Polymer Chemistry. Ithaca (NY): Cornell University Press; 1953.
- [177] Bueche F.J.; Colloid Interf 1970, 33: 61.
- [178] Geissler E., Horkay F.; Hecht A.M.; J.Chem.Phys 1994, 100, 8418.
- [179] Mendes E., Linder P., Buzier M., Boue F., Bastide J.; Phys.Rev.Lett 1991, 66, 1595.
- [180] Bastide J., Mendes Jr.E.; Makromol.Chem.Makromol.Symp 1990, 40: 81.
- [181] Okay O., Kurz M., Lutz K., Funke W.; Macromolecules 1995, 28, 2728.
- [182] Funke W., Okay O., Joos-Muller B.; Adv.Polym.Sci. 1998, 136, 139.
- [183] Shibayama M., Shirotani Y., Hirose H., Nomura S.; Macromolecules 1997, 30, 7307.
- [184] Bromberg L., Grosberg A.Y., Matsuo E.S., Suzuki Y., Tanaka T.; J.Chem.Phys. 1997, 106, 2906.
- [185] Kolin A.; Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1955, 41, 101.
- [186] Margolis, J., Kenrick, K.G., Nature., 1967, 214, 1334-1336.
- [187] Margolis, J., Kenrick, K.G., Anal. Biochem. 1968, 25, 347-362.
- [188] Davis B.J.; Ann.N.Y.Acad.Sci. 1964, 121, 404-427.
- [189] Raymond S., Weintraub L.S.; Science 1959, 130, 711.
- [190] Davis B.J.; Ann.N.Y.Acad.Sci. 1964, 121, 404-427.
- [191] Raymond S., Weintraub L.S.; Science 1959, 130, 711.
- [192] Awdeh Z.L., Williamson A.R., Askonas B.A.; Nature 1968, 219, 66-69.
- [193] Dale G., Latner A.L.; Lancet i 1968, 847-848.
- [194] Leaback D.H., Rutter A.C.; Biochem.Biophys.Res.Comm. 1968, 32, 447-453.
- [195] Riguetti P.G., Caglio S., Saracchi M., Quaroni S.; Electrophoresis 1992, 13, 587.
- [196] Margolis J., Kenrick K.G.; Anal.Biochem. 1968, 25, 347-362.
- [197] Slater G.G.; Anal.Biochem. 1968, 24, 215-217.
- [198] Margolis J., Kenrick K.G.; Nature 1969, 221, 1056-1057.
- [199] Chrambach A., Rodbard D. ; Science 1971, 171, 440.

- [200] Fawcett J.S., Morris C.; *J.O.R.Sep.Sci.* 1966, 1, 9.
- [201] Weiss N., Van Vliet T., Silberberg A.; *J.Polym.Sci.: Polym.Phys.Ed.* 1981, 19, 1505.
- [202] Bansil R., Gupta M.K.; *Ferroelectrics* 1980, 30, 64.
- [203] Rabilloud T., *Proteomics* 2002, 2,3-10.
- [204] Wasinger V.C., Pollack J.D., Humphrey-Smith I.; *Eur.J.Biochem.* 2000, 267, 1571-1582.
- [205] Gôrg A., Weiss W., Dunn M.J.; *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
- [206] Hanash S.; *Nature* 2003, 422, 226-232.
- [207] Hanock W.S.; *J.Proteome.Res.* 2003, 2, 345.
- [208] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* 2001, 409, 860.
- [209] Oh-Ishi M., Maeda T.; *J.Chomatogr. B2002*, 771, 49-66.
- [210] Vesterberg O.; *Electrophoresis* 1993, 14, 1243-1249.
- [211] Zimm B.H., Levene S.D.; *Q.Rev.Biophys.* 25, 171-204.
- [212] Noolandi J.; *Adv.Electrophor.* 1992, 5, 1-57.
- [213] Norden B., Elvingson C., Jonsson M., Akerman B.; *Q.Rev. Biophys.* 1991, 24, 103-164.
- [214] Kozulic B.; In *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends* (Griffin A.M., Griffin H.G., Eds); pp 51-68, Horizon Scientific, Wymondham, UK.
- [215] Lai E., Birren B.W. (Eds) (1990) *Electrophoresis of large DNA Molecules: Theory and Applications*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [216] Raymond S., Weintraub L.; *Science* (Washington, D.C.), 1959, 30, 711-712.
- [217] Davis B.J.; *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1964, 121, 404-427.
- [218] Ornstein L.; *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1964, 121, 321-349.
- [219] Hjersten S.; *J.Chromatogr.* 1963, 11, 66-70.
- [220] Rihetti P.G.; *J.Biochem.Biophys.Methods.* 1989, 19, 1-20.
- [221] Hames B.D., Rickwood D.; *Gel electrophoresis of proteins; a pratical approach.* IRL Press, Oxford, pp1-86.
- [222] Acharya A., Mohan H., Sabharwal S.; Radiation induced polymerisation and crosslinking behaviour of N-Hydroxymethylacrylamide in aqueous solutions. *Radiat. Phys. Chem.* 65, 225-232.

- [223] Mengping Q., Ye Y., Baokang C., Zhili X.; Radiation induced polymerisation of acrylamide in ethanol and its application in medical X-ray film as a covering agent. *Radiat. Phys. Chem.* 1993, 42, 193-196.
- [224] Wojnarovits L., Takas E., Dajka K., Angelantonio M.D., Emmi S.S.; Pulse radiolysis of acrylamide derivatives in dilute aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.* 2001, 60, 337-343.
- [225] Davis B.J.; *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 1964, 121, 404-427.
- [226] Laemmli U.K.; *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [227] Schagger H., Von Jagow G.; *Anal. Biochem.* 1987, 166, 368-379.
- [228] Wiltfang J., Arold N., Neuhoff V.; *Electrophoresis* 1991, 12, 352-366.
- [229] Klafki H.W., Wiltfang J., Staufenbiel M.; *Anal. Biochem.* 1996, 237, 24-29.
- [230] Wiltfang J., Smirnov A., Schnierstein B., Kelemen G., Matthies U., et al.; *Electrophoresis* 1997, 18, 527-532.
- [231] Jovin T.M.; *Biochemistry* 1973, 12, 871-898.
- [232] MacFarlane D.E.; *Anal. Biochem.* 1983, 132, 231-235.
- [233] Mocz G., Balint M.; *Anal. Biochem.* 1984, 143, 283-292.
- [234] Feibush B., Li N.H.; (1991) U.S.Patent 5, 047, 438.
- [235] Ruchel R., Steere R.L., Erbe E.F.; (1978) *J.Chromatogr.* 166, 563-575.
- [236] Attwood T.K., Nelmes B.J., Sellen D.B.; (1988) *Biopolymers* 27, 201-212.
- [237] Whytock S., Finch J.; (1991) *Biopolymers* 31, 1025-1028.
- [238] Griess G.A., Guiseley K.B., Serwer P.; (1993) *Biophys.J.* 65, 138-148.
- [239] Laurent T., Killander J.; (1964) *J.Chromatogr.* 14, 317-330.
- [240] Rodbard D., Chrambach A.; Unified theory for gel electrophoresis and gel filtration. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA.* 1970, 65(4): 970-977.
- [241] Ogston A.G.; (1958) *Trans.Faraday.Soc.* 54, 1754-1757.
- [242] Hirabayashi T.; *Anal. Biochem.* 1981, 117, 443-451.
- [243] Oh-Ishi M., Satoh M., Maeda T.; *Electrophoresis* 2002, 21, 1653-1669.
- [244] Lawrence G.J., Shepherd K.W.; Variation in glutenin protein subunits of wheat. *Austral.J.Biol.Sci.* 33: 221-233.
- [245] Payne P.I., Holt L.M., Law C.N.; Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin., *Theor.Appl.Genet.*60: 229-236.

- [246] NG P.K.W., Bushuk W.; Concerning the nomenclature of high molecular weight glutenin subunits.; *J.Cereal.Sci.* 9: 53-60.
- [247] Bietz J.A., Wall J.S.; Wheat glutenin subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.; *Cereal. Chem.* 1972, 49: 416-430.
- [248] Khan K., Bushuk W.; Studies of glutenin IX. Subunits composition by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 7,3 and 8,9. *Cereal. Chem.* 54: 588-596.
- [249] Bunce N.A.C., White R.P., Shewry P.R.; Variation in estimates of molecular weight of cereal prolamins by SDS-PAGE.; *J.Cereal.Sci.* 1985, 3: 131-142.
- [250] Hamauzu Z., Kamazuk Y., Kanazawa H., Yonezawa D.; Molecular weight determination of component polypeptides of glutenin after fractionation by gel filtration. *Agric.Biol.Chem.* 1975, 39 (8): 1527-1531.
- [251] Sugiyama T., Rafalski A., Peterson D., Soll D.; Awheat HMW glutenin subunit gene reveals a highly repeated structure. *Nucl.Acids.Res.* 13(24): 8729-8731.
- [252] Thompson R.D., Bartels D., Harberd N.P.; Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW-glutenin subunit. *Nucl.Acids. Res.* 1985, 13(19): 6833-6835.
- [253] Halford N.G., Forde J., Anderson O.D., Greene F.G., Shwery P.R.; The nucleotide and deduced amino acid sequences of an HMW gluten subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and comparison with those genes from chromosomes 1A and 1D. *Theor. Appl. Genet.* 75: 117-126.
- [254] Shani N., Steffen-Campbell J.D., Anderson O.D., Greene F.C., Galili G.; Role of the amino-and carboxy-terminal regions in the folding and oligomerisation of wheat high molecular weight glutenin subunits. *Plant.Physiol.* 1992, 98: 433-441.
- [255] Reynolds J.A., Tanford C.; Binding of dodecyl sulphate to proteins at high binding ratios. Possible Implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc.Natl.cad.Sci.USA.* 1970, 66(3): 1002-1007.
- [256] Reynolds J.A., Tanford C.; The gross confirmation of protein-sodium dodecyl sulphate complexes.; *J.Biol.Chem.* 245(19): 5161-5165.

- [257] Ferguson K.A.; Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* 1964, 13(10): 985-1002.
- [258] Ogston A.G.; The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Trans-Faraday.Soc.* 1958, 54: 1754-1757.
- [259] Rodbard D., Chrambach A., Estimation of molecular radius, free mobility and valence using polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal.Biochem.* 1971, 40: 95-134.
- [260] Tietz D.; Evaluation of mobility data obtained from gel electrophoresis strategies in the computation of particle and gel properties on the basis of the extended Ogston model. P112-169 in: *Advances in Electrophoresis, Vol.2.A.* Chrambach M.; J.Dunn, and B.J.Radola, Eds. VCH: New York.
- [261] Hamauzu Z., Mabuchi Y., Matsutka K.; Determination of the molecular weight of gluten proteins from ferguson plots in sodium dedecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Agric.Biol.Chem.* 1982, 46(11): 2841-2842.
- [262] Hamauzu Z., Hayashi A.; Determination of the molecular weights of fractioned glutenin polypeptides from ferguson plots on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Agric.Biol.Chem.* 1984, 48(9): 2361-2362.
- [263] Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [264] Schevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.; *Anal .Chem.* 1996, 68: 850.
- [265] Righetti P.G., Ek K., Bjellqvist B.; *J.Chromatogr.* 1989, 475: 31.
- [266] Bordini E., Hamdan M., Righetti P.G.; *Rapid.Comm. Mass. Spectrum.* 1999, 13:1818.
- [267] Worrall T.A., Cotter R.J., Woods A.S.; *Anal.Chem.* 1998, 70: 750.
- [268] Galvani M., Bordini E., Piupelli C., Hamdan M.; *Rapid.Comm. Mass.Spectrum.* 2000, 14: 18.
- [269] Ganguly A., Rock M.J., Prockop D.J.; Conformation sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-standard PCR products and DNA heteroduplexes [published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 24, 91- 5217.
- [270] Lee C.H., Mizusawa H., Kakefuda T.; 1981. Unwinding of double-standard DNA helix by dehydration. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 2838-2842.

[271] Orosz J.M., Wetmur J.G.; 1977. DNA melting temperatures and renaturation rates in concentrated alkylammonium salt solutions. *Biopolymers* 16: 1183-1199.

[272] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. ; *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th Edition, Thomson Brooks/Cole, Belmont 2004, 710-740

[273] Ainseba-Chirani N., Dembahri Z., Tokarski C., Rolando C., Benmouna M.; *Polym Inter.* 2011, 60, 1024-1029.

[274] Grzn'arov'a G, Yu S, Stefuca V, Polakovi'c M. quantitative characterization of pore structure of cellulose gels with or without bound protein ligand. *Journal of Chromatography A*, 1092 : 107–113 (2005)

[275] De Gennes P G. 'Scaling concepts in polymer physics' Ithaca university. press Ithaca, NY (1979)

[276] Moad G., Solomon D.H.; *The Chemistry of Free Radical Polymerization.*, Elsevier Science Ltd., Oxford 1995, 257.

- é é

- ' .

.( / )

.(SDS-PAGE)

 $R_f$ 

.(SDS-PAGE)

- SDS PAGE -

**ABSTRACT**

Novel gels dedicated to the electrophoresis separation of proteins were synthesized from a mixture of acryl amide (AAm) and Dextran using a radical polymerization in the presence of the cross linker N,N-methylene-bis-acryl amide (Bis). The polymerization was initiated by the mixture of ammonium persulfate (APS) and N,N,N',N'-tetra methylene diamine (TEMED). The properties of the synthesized gels were studied by various techniques. UV-Vis spectroscopy was used to characterize the time dependence of absorbance during polymerization hence indirectly describing the kinetics. The same kinetics was also studied through the increase of temperature due to the heat produced by the exothermic polymerization process. A sudden rise of temperature was found at a certain time which was reminiscent of the Trommsdorf effect at the sol / gel transition. Swelling of the synthesized gels in de-ionized water and in the buffer solution was also characterized to identify the effects of the osmotic pressure due to small ions present in the buffer solution.

Application of the synthesized gels to the separation of proteins was presented using the SDS-PAGE technique and standards dye proteins. The results were interpreted via Fergusson plots showing the logarithm of the proteins molar mass versus retardation factor

$R_f$  expressed as the ratio of the migration distance of a fraction of proteins and the distance covered by the eluant fluid. We systematically compared the results of the novel gels with those obtained from the commercial gel known as Duracryl™ from Genomics. A detailed study was performed to highlight the effects of the molar mass and concentration of the additive polysaccharide relative to different properties considered in this thesis and to the separation performances of standards proteins using SDS PAGE.

**Keywords**

Gels, PAAm / Dextran, Duracryl™, SDS-PAGE, UV-Vis, Trommsdorf, Fergusson plot, kinetics, swelling, absorbance.

**RESUME**

De nouveaux gels destinés à la séparation des protéines par électrophorèse ont été synthétisés à partir d'un mélange d'Acrylamide (AAm) et de Dextran à l'aide d'une polymérisation radicalaire en présence de l'agent réticulant N,N'-méthylène-bis-acrylamide (Bis). La réaction a été initiée par le mélange d'ammonium persulfate (APS) et du N,N,N',N'-tétra-méthylène-diamine (TEMED). Les propriétés des gels synthétisés ont été étudiées par diverses techniques. La spectroscopie UV-Visible a permis de caractériser la variation de l'absorbance en fonction du temps et donc indirectement la cinétique de polymérisation. Cette cinétique a aussi été étudiée à travers le suivi de l'augmentation de la température de polymérisation en fonction du temps durant le processus/exothermique de la polymérisation. Une augmentation instantanée de la température a été observée à un moment donné décrivant le phénomène de type Trommsdorf attribué à la transition sol / gel. Le gonflement des gels synthétisés a également fait l'objet d'une étude dans l'eau dés-ionisée et dans la solution tampon. La cinétique de gonflement a été analysée dans les deux cas pour mettre en évidence l'effet de la pression osmotique due aux petits ions existant dans la solution tampon. L'application des gels synthétisés à la séparation de protéines connues jouant le rôle de marqueurs a été considérée en utilisant la technique de l'électrophorèse de type SDS-PAGE. Les résultats de cette technique ont été interprétés à l'aide du tracé dit de Fergusson montrant le logarithme de la masse moléculaire des protéines en fonction du facteur de retardatibn  $R_f$  donné par le rapport de la distance de migration d'une fraction de protéines et la distance parcourue par l'éluant ou front de migration. La démarche adoptée dans cette thèse consistait à comparer les performances de gels synthétisés à base de PAAm / Dextran à celles du gel commercial Duracryl™ de Genomics. Une étude détaillée a été effectuée mettant en relief les effets de la masse moléculaire et de la concentration de l'additif polysaccharide sur les différentes propriétés considérées et sur les performances de séparation de protéines standards par SDS PAGE.

**Mots clefs**

Gels, PAAm / Dextran, Duracryl , SDS-PAGE, UV-Vis, effet Trommsdorf, Fergusson plot, cinétique, gonflement, absorbance.



# Newly designed polyacrylamide/dextran gels for electrophoresis protein separation: synthesis and characterization

Naziha Ainseba-Chirani,<sup>a,b†</sup> Zahra Dembahri,<sup>a,b</sup> Caroline Tokarski,<sup>a</sup> Christian Rolando<sup>a</sup> and Mustapha Benmouna<sup>b\*</sup>

## Abstract

Newly designed gels for electrophoresis protein separation were synthesized from acrylamide, *N,N'*-methylenebis(acrylamide) and dextran mixtures. Radical polymerization was initiated by ammonium persulfate and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine. The time dependence of absorbance during polymerization was monitored using UV-visible spectroscopy. The exothermic polymerization process exhibited a sharp rise of temperature reminiscent of the Trommsdorff effect. The swelling kinetics of the synthesized gels was examined in deionized water and buffer solutions. One of the challenges was to find an alternative to commercial products, sold as mixtures with no detailed chemical contents, commonly used in sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for protein separation. For this reason, a systematic comparison was made of the properties of one of the most commonly used commercial gels, Duracryl™ from Genomics Solution Inc., and those of the synthesized polyacrylamide/dextran gels.

© 2011 Society of Chemical Industry

**Keywords:** polyacrylamide/dextran gels; Duracryl™; SDS-PAGE; swelling; absorbance

## INTRODUCTION

Because proteins are essential actors in cellular processes, it is important to develop methods for their separation, and also for their characterization from physical, chemical and biological points of view. Separation of proteins from biological systems and identification of their functions are parts of proteomics, a rapidly developing field at the edge of physics, chemistry and biological sciences.<sup>1,2</sup> Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)<sup>3,4</sup> has become a major tool for protein separation and identification. This technique is continually improving in terms of efficiency enhancement and miniaturization. Progress along these lines depends not only on technology developments but also on the type of gels considered and in particular on their nature, composition and structure.<sup>5–8</sup> Gels based on polyacrylamide (PAAm) have been the subject of much investigation for years often with modifications to meet the requirements of specific applications.<sup>9–11</sup> A typical example is the recent work of Bornemann *et al.*<sup>12</sup> who reported a gel with pore extension properties obtained by crosslinking hydrolysis after gel migration.

In the present paper, we report the synthesis and characterization of novel home-made gels combining PAAm (a flexible polymer) and dextran (a rigid polysaccharide) to obtain gels with better handling stability, mechanical strength and optical clarity and enhanced efficiency in protein separation. One of the challenges was to find alternatives to the commercial product Duracryl™ (from Genomics Solution) which has at least two major drawbacks. First, after polymerization Duracryl™ gels become turbid and produce large background fluorescence signals. Second, they can generate distortions in the molecular weight bands of electrophoresis separation experiments together with

morphological artefacts.<sup>13–15</sup> It is certainly more advantageous to rely on gels with known chemical formulations, presenting ease of synthesis, offering possibilities of efficiency improvements under practical application conditions and having a reasonable cost. The work presented is a contribution along these lines based on newly designed PAAm/dextran gels. The properties of dextran gels were examined recently by Imren *et al.* seeking highly swellable hydrogels.<sup>16</sup> However, in our case, the best gels must have the opposite property in order to preserve as much as possible their original size in various media used in proteomics for staining gels.

## EXPERIMENTAL

### Materials and sample preparation

The chemical structures of acrylamide (AAm), *N,N'*-methylenebis(acrylamide) (Bis) and dextran are well documented in the literature and there is no need to reproduce them here.

\* Correspondence to: Mustapha Benmouna, Macromolecular Research Laboratory, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaid of Tiemcen, BP 119, Algeria. E-mail: mbenmouna@email.com

† Present address: Department of Chemistry, University Djilali Liabès, Sidi-Belabbès, Algeria.

a Miniaturization for Synthesis, Analysis and Proteomics, USR CNRS 3290, Université de Lille 1, Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

b Macromolecular Research Laboratory, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaid of Tiemcen, BP 119, Algeria



**Table 1.** Composition and  $M_w$  of low-molecular-weight (LMW) and high-molecular-weight (HMW) protein markers used

	Protein	$M_w$ (kDa)	Origin	Quantity ( $\mu\text{g}$ )
LMW	Phosphorylase b	97	Rabbit muscle	67
	Albumin	66	Bovine serum	83
	Ovalbumin	45	Chicken egg white	147
	Carbonic anhydrase	30	Bovine erythrocyte	83
	Trypsin inhibitor	20	Soybean	80
	$\alpha$ -Lactalbumin	14.4	Bovine milk	116
HMW	Myosin	220	Rabbit muscle	25
	$\alpha$ -2-Macroglobulin	170	Bovine plasma	100
	$\beta$ -Galactosidase	116	<i>E. coli</i>	16
	Transferin	76	Human	17
	Glutamate dehydrogenase	53	Bovine liver	18

The compositions of the high-molecular-weight (HMW) and low-molecular-weight (LMW) protein mass markers used are listed in Table 1. AAm and Bis were supplied by Polysciences Europe (Eppelheim, Germany) while Duracryl™ was obtained from Genomics Solution Inc. (Steinheim, Germany). Protein calibration kits were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden).

Two series of gels were prepared depending on the total monomer concentration ( $\text{g L}^{-1}$ ) given by

$$\%T = \frac{\text{Weight of AAm} + \text{weight of Bis}}{\text{Total volume}}$$

and on the content of crosslinker (wt%) given by

$$\%C = \frac{\text{Weight of Bis}}{\text{Weight of AAm} + \text{weight of Bis}}$$

For the first series (separation gels), the concentrations %C and %T were fixed at 2.6 wt% and  $4.7 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ , respectively, and for the second series (stacking gels) we set  $\%T = 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ . The buffer solution for the stacking gels was made of 12.0 g of Tris base and 0.80 g of SDS dissolved in 200 mL of deionized water. The pH was adjusted to 6.8 with HCl. In the case of the gels used for protein separation, the buffer solution contained 60.0 g of Tris base and 1.33 g of SDS. The pH was adjusted to 8.8 with HCl. Laemmli buffer solutions were used to dissolve and stabilize the protein mass markers. Gels were obtained by redox polymerization with the initiators ammonium persulfate and *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine at 0.5 and 0.05 wt%, respectively. We chose to analyse gel absorbance in terms of dextran additives using five samples with various molecular weights ( $M_w$ ) spanning the range from 6 to 2000 kDa to validate the newly discovered power-law behaviour. In other cases, we limited ourselves to systems involving two dextran  $M_w$  (i.e. 500 and 2000 kDa) that exhibited properties useful for comparison with the commercial product Duracryl™. Oxygen was excluded using vacuum degassing just before polymerization. After preparation, the gels were kept overnight at 4 °C.

#### Time–temperature profiles during polymerization

Prior to the initiation of polymerization, sample holders were put under nitrogen circulation and connected to a thermocouple (model SA8805SX, Oregon Scientific, Portland, OR) for time–temperature profile recording during the exothermic polymerization process. Particular attention was paid to the sudden rise of temperature reminiscent of the so-called Trommsdorff effect.<sup>17</sup>

#### Gel absorbance and UV-visible spectroscopy

A UV-visible spectrophotometer (Jasco V530, Bouguenais, France) was used to obtain the time evolution of absorbance during polymerization. Data were obtained at a wavelength of 300 nm for various concentrations and molecular weights of dextran.

#### Electrophoresis separation of proteins: SDS-PAGE

Electrophoresis experiments were carried out at 20 °C using either an SE 250 Mini-Vertical Unit system or a Hoefer SE 600 Ruby™ system fitted with an EPS 301 power supply (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) under Laemmli discontinuous conditions<sup>18</sup> to separate proteins according to their mobility. Gels used for protein separation were poured on dedicated cassettes with glass and ceramic plates for 1 h before addition of stacking gels. Immediately after, a brush was applied to form grooves for protein accommodation. Electrophoresis was operated for a period of 2 h at 300 V, 80 mA with four samples simultaneously. Gels were immersed for 1 h in a solution of 10% ethanol, 7% acetic acid and deionized water. Prior to electrophoresis measurements, gels were immersed for 10 h in deionized water and a coloration solution containing 25% ethanol, 14% acetic acid and 2 mg L<sup>-1</sup> Ru(BPS)<sub>3</sub> fluorescent dye. The final step consisted of washing the gels with an aqueous solution made of 30% methanol and 10% acetic acid before scanning them with a Typhoon 9000 variable-mode imager (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) at a resolution of 200 dpi.

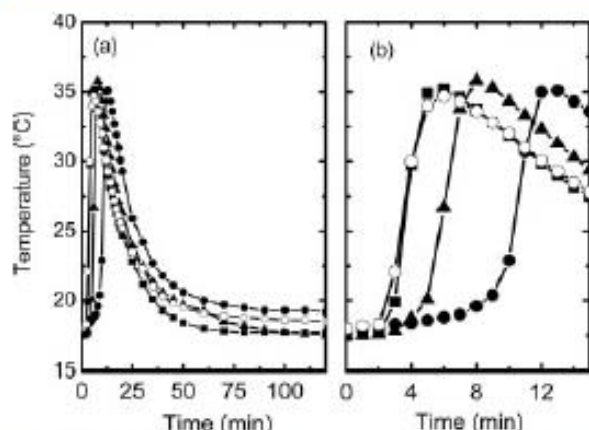
#### Swelling experiments

Gels were cut into square pieces of dimensions of 5 cm × 5 cm and dried at 60 °C for 24 h. Then they were weighed before immersion in 100 mL of MilliQ water at 18 °C. Swollen gels were weighed every 10 min after removal of excess water on their surface using an appropriate absorbing paper. This procedure lasted 2 h to cover major events in the kinetics of swelling and repeated using the buffer solution in place of deionized water. Similar procedures were used for Duracryl™ and the home-made PAAm/dextran gels.<sup>19,20</sup>

## RESULTS AND DISCUSSION

As pointed out earlier, a major goal of the present work was to design novel PAAm gels reinforced with dextran to yield efficient systems for electrophoresis separation of proteins. These home-made systems were formulated using chemically pure substances and exhibited good mechanical, separation and background fluorescence properties equivalent to those of gels made of





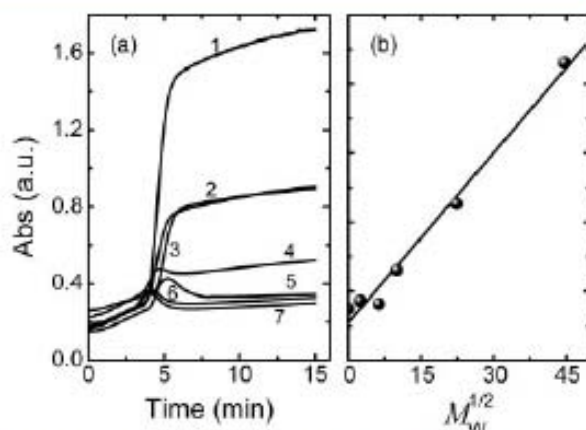
**Figure 1.** (a) Time-temperature profiles during polymerization for different systems. (b) Amplification of (a) in the early stages of kinetics. Solid lines are guides for the eye. Filled squares, PAAm; filled triangles, PAAm/dextran (500 kDa); open circles, PAAm/dextran (2000 kDa); filled circles, Duracryl™.

commercially available solutions containing unknown additives. Staining of gels and their use in further proteomics experiments involve immersion in baths of various compositions. In contrast to gels used, for example, in drug delivery, gels with a low swelling capability in various media including solutions of strong electrolytes such as SDS are essential for this purpose in order to get good inter-experiment reproducibility. For this reason, various properties were examined using standard techniques. The time-temperature profiles during exothermic polymerization processes were examined first.

**Time-temperature profiles**

Gel synthesis by radical polymerization is an exothermic process whose kinetics can be monitored via time-temperature profiles. The profiles depicted in Fig. 1(a) show a characteristic rise reminiscent of the so-called Trommsdorff effect. During the whole polymerization process that lasted 2 h, the kinetic curves exhibit the same trends with a sharp rise, reaching a maximum and declining. In the early stages, one finds some distinction between the various systems as shown in the amplification of Fig. 1(b). As the system cools, chain mobility is inhibited by crosslinking reactions and a sudden increase of viscosity. At this stage, chain growth proceeds by monomer diffusion and coalescence of agglomerates until the state of full monomer consumption is reached. For pure PAAm and the system containing dextran with the highest  $M_w$  (i.e. 2000 kDa), a sudden heating takes place less than 4 min following the initiation of polymerization. In the case of Duracryl™, the rise in temperature is delayed and the Trommsdorff effect occurs nearly 10 min after the start of polymerization. Data corresponding to dextran with  $M_w$  of 500 kDa are closer to those of Duracryl™. These features can be rationalized in terms of a polymerization retardation process due to the presence of dextran in the early stages, but this slowing down is quickly compensated by a sharp speed-up of kinetics. This acceleration originates from dextran-induced phase separation and a concomitant increase of the probability of encounters between reacting sites in the PAAm-rich domains. The kinetics of gel formation for PAAm and PAAm/dextran gels is faster compared to that for Duracryl™.

Clearly more effort is needed to strengthen our understanding of the kinetics of polymerization via time-temperature profiles.



**Figure 2.** (a) Variation with time of absorbance obtained using UV-visible spectroscopy at 300 nm: 1, PAAm/dextran (2000 kDa); 2, PAAm/dextran (500 kDa); 3, Duracryl™; 4, PAAm/dextran (100 kDa); 5, PAAm/dextran (40 kDa); 6, PAAm/dextran (5 kDa); 7, pure PAAm. (b) Linear dependence of absorbance on  $M_w^{1/2}$  for PAAm and dextran at  $0.02 \text{ g L}^{-1}$ .

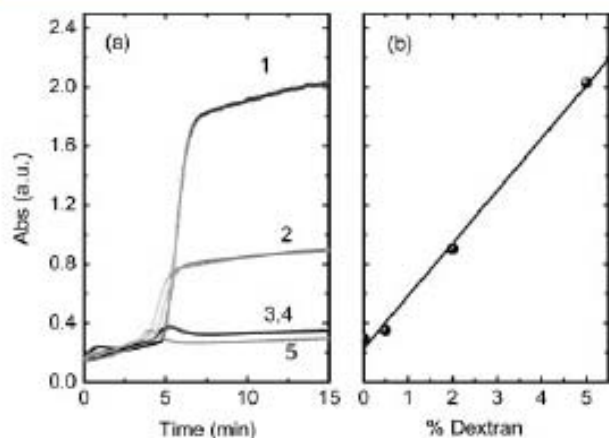
Here, only two systems with dextran additive were examined in addition to pure PAAm and Duracryl™. Clearly we would have gained more insights into the effects of dextran  $M_w$  by examining more closely the influence of other samples in the lower  $M_w$  range. Theoretical work is in progress to investigate the space and time dependence of temperature in the course of polymerization and resolution of this problem necessitates a model for the kinetics of polymerization. We hope to develop an adequate model that could lead to useful information on the kinetics giving more insight into the effects of dextran additive. In that case, the results for other samples in the lower range of dextran  $M_w$  would be highly useful.

**UV-visible spectroscopy and gel absorbance**

Figure 2(a) shows the time evolution of gel absorbance obtained using UV-visible spectroscopy. In the early stages of polymerization, the absorbance shows hardly any increase, but, after a few minutes, all samples show a more or less abrupt increase in absorbance before levelling off. Samples with dextran of various  $M_w$  were used to characterize in detail the influence of  $M_w$  on gel absorbance. Curves for the sample corresponding to the highest dextran  $M_w$  (2000 kDa) rise sharply while those corresponding to  $M_w = 500 \text{ kDa}$  and Duracryl™ show a more moderate rise and are practically superimposed. In the presence of dextran of high  $M_w$ , the system turns quickly turbid because of structural heterogeneities that emerge in the early stages of gel formation.<sup>21,22</sup> Fig. 2(b) reveals a power-law behaviour of absorbance that increases linearly with  $M_w^{1/2}$ . The fact that absorbance is enhanced for longer chains is not surprising but the scaling behaviour with an exponent of  $1/2$  remains to be elucidated. A possible explanation is that, since optical properties of gels are intimately related to the mean size of heterogeneities which in turn are proportional to the size of dextran chains, the power law could be rationalized directly by invoking the proportionality of dextran radius of gyration to  $M_w^{1/2}$ . Although several dextran samples were considered to assess this power law, more effort is still needed to deepen our understanding of these novel features.

Clearly, gel absorbance is also sensitive to dextran concentration, which is confirmed by the plots of Fig. 3. In Fig. 3(a), one



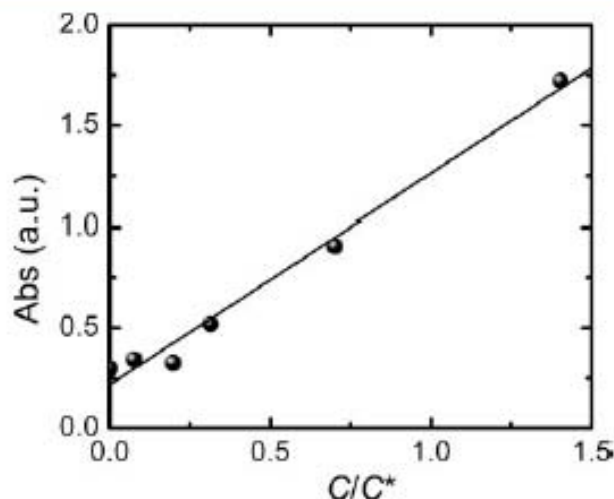


**Figure 3.** (a) Variation with time of the absorbance obtained using UV-visible spectroscopy at 300 nm, with dextran of  $M_w = 500$  kDa and various concentrations: 1, PAAm/dextran (5 wt%); 2, PAAm/dextran (2 wt%); 3, Duracryl™; 4, PAAm/dextran (0.5 wt%); 5, pure PAAm. (b) Linear variation of absorbance with dextran concentration.

observes the sharp rise due to structural heterogeneities in the early stages of gel formation, while Fig. 3(b) shows that the absorbance increases linearly with dextran concentration. Data of Figs 2 and 3 are combined to produce the universal plot in terms of the lumped coordinate  $c/c^*$  shown in Fig. 4. Here,  $c^*$  represents the overlap concentration according to de Gennes,<sup>23</sup> i.e.  $c^* = M_w/(4\pi R_g^3/3)$ , where  $R_g$  is the radius of gyration calculated according to the empirical formula<sup>24</sup>  $R_g = 0.27 \times M_w^{0.47}$  (where  $R_g$  is in Å). The weak scattering of data with respect to the linear fit may be attributed to the scaling behaviour of  $R_g$  which is slightly less than the expected mean field critical exponent of  $1/2$ . Note that the normalized dextran concentration  $c/c^*$  is equivalent to the product  $cM_w^{1/2}$  within a proportionality factor. It is surprising that the same power law remains valid below and above  $c/c^* = 1$ , since, normally, one would expect a change in scaling law when  $c/c^*$  exceeds the value of 1, as in the transition from dilute to semi-dilute solutions. However, we are dealing here with PAAm/dextran gels exhibiting somewhat different properties from those of ordinary semi-dilute solutions. Although Fig. 4 is obtained from a combination of data in Figs 2 and 3, such a representation showing a linear dependence of absorbance on the lumped coordinate  $c/c^*$  has not been reported previously in the literature. These effects of  $M_w$  of polysaccharide additives were assessed on the basis of five different systems to validate the linear dependence of absorption on  $M_w^{1/2}$ .

### Swelling

Solvent uptake of dry gels and solvent release from swollen ones are useful quantities for assessing gel quality and performance under practical application conditions.<sup>25,26</sup> Aktas *et al.*<sup>27</sup> investigated the swelling of PAAm gels in terms of the crosslinker (Bis) concentration and observed that fluorescence intensity decreased with swelling ratio. The results indicated that the swelling time constant and the cooperative diffusion coefficient decreased with crosslinking density. Francis *et al.*<sup>28</sup> reported a simple method for the preparation of super-porous PAAm gels using  $\gamma$ -radiation. Foaming and crosslinking processes were decoupled leading to fast swelling kinetics.



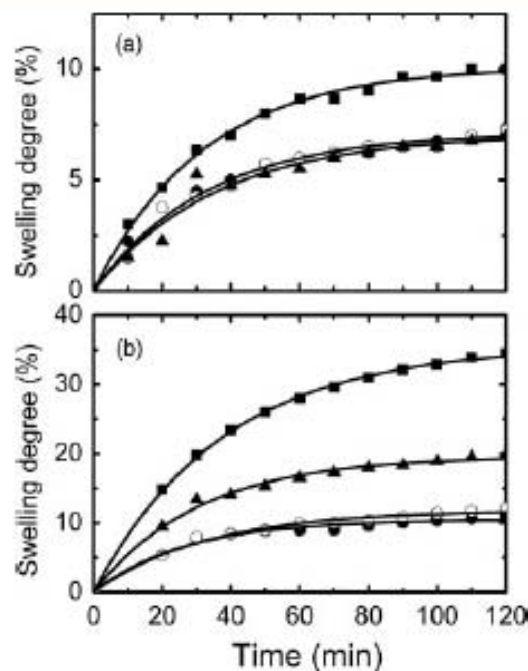
**Figure 4.** Variation of absorbance obtained from home-made gels with  $c/c^*$ , where  $c^*$  is the de Gennes overlap concentration. Data adapted from those of Fig. 2(b) expressing the linear dependence of absorbance with dextran concentration and square root of molecular weight.

In the present work, the kinetics was assessed from the time dependence of swelling ratio or weight fraction of swollen to dry gels. Results in deionized water (Fig. 5(a)) indicate that the PAAm gel is characterized by a much higher swelling capacity than any other gel considered in this study. Duracryl™ and gels with added dextran exhibit similar swelling behaviour, meaning that, under such conditions, the gel elasticity is comparable. Solvent uptake or expulsion depends on the polymer–solvent interaction parameter and on the network elasticity. Adding dextran to a gel enhances its stiffness and reduces its elasticity. As  $M_w$  of dextran increases, the swelling capacity of the gel decreases. These aspects could be quantified directly from measurements of the interaction parameter and the elastic modulus. Studies along these lines would be very useful but they are beyond the scope of the present work.

Swelling in buffer solution reveals some differences with respect to that in deionized water. Competition between the effects of stiffness opposing swelling and the high mobility of small ions promoting it is the reason behind this difference. Figure 5(b) indicates a weak swelling of Duracryl™ similar to that of the PAAm/dextran (2000 kDa) gel. As one would expect, gel swelling decreases with increasing  $M_w$  of added dextran and is systematically higher compared to swelling in deionized water because of the osmotic pressure of small ions present in the buffer electrolytic solution. Clearly polyelectrolyte effects have a strong impact on the swelling behaviour of ionized gels. Degree of ionization, pH and ionic strength determine to a large extent<sup>29</sup> the degree of swelling.

The solid lines in Figs 5(a) and (b) represent fits of the experimental data with the following expression:  $\gamma = \alpha[1 - \exp(-t/\tau)]$ , where  $\gamma$  is the time-dependent degree of swelling (in %) and  $\alpha$  its saturation value at times  $t$  much longer than the characteristic rise time of swelling  $\tau$ . The latter parameter is the only adjustable parameter in the fit. Figure 6(a) shows the results for various gels in both deionized water and buffer solution while Fig. 6(b) shows the rate of swelling (i.e.  $d\gamma/dt$  (at  $t = 0$ ) =  $\alpha/\tau$ , in %  $\text{min}^{-1}$ ) under similar conditions. These figures illustrate clearly the swelling capacity of various gels in terms of  $\alpha$  and rate  $\alpha/\tau$ . Swelling decreases from right to left indicating that PAAm has





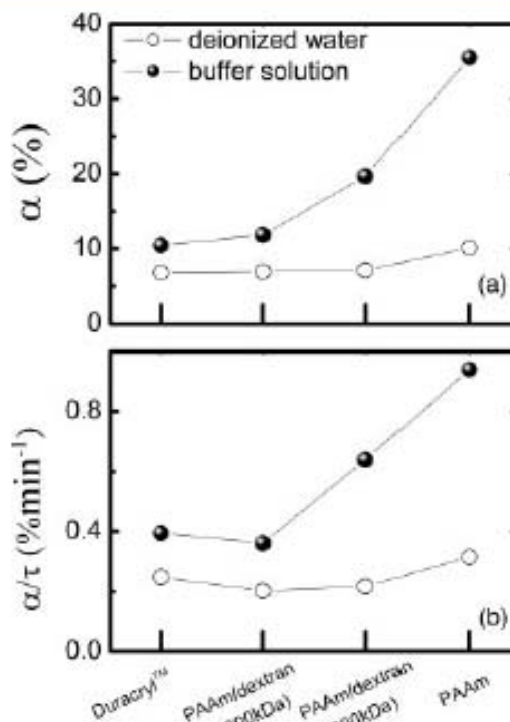
**Figure 5.** Swelling kinetics in (a) deionized water and (b) buffer solution for SDS-PAGE: filled squares, pure PAAm; filled triangles, PAAm/dextran (500 kDa); open circles, PAAm/dextran (2000 kDa); filled circles, Duracryl™. The solid lines represent fits with the expression  $\gamma = \alpha[1 - \exp(-t/\tau)]$ , where  $\gamma$  is the time-dependent degree of swelling (in %) and  $\alpha$  its saturation value at times  $t$  much longer than the characteristic rise time of swelling  $\tau$ .

the highest swelling capacity followed closely by PAAm/dextran (500 kDa), while Duracryl™ shows the lowest swelling ratio.

**SDS-PAGE**

SDS-PAGE is one the most useful separation techniques. Research efforts are being pursued to improve its precision and to develop efficient detection methods to reduce irregular changes in background signals. One of the challenges is to find relevant parameters having a significant impact on the quality of detection and identification of proteins and other analytes.<sup>30</sup> The work reported in the present paper focused more on the separation capability of the newly designed PAAm/dextran gels compared to the commercial product Duracryl™. For this reason, an electrophoresis study (i.e. SDS-PAGE) was performed using standard proteins with known molecular weights (Table 1). The protein separation performance can be rationalized by plotting the logarithm of molecular weight versus retardation factor  $R_f$  defined as the ratio of migration distances of proteins and solvent.<sup>14,31–33</sup> The results are depicted in Fig. 7, showing that the mobility of proteins is lowest in Duracryl™ especially for HMW protein markers.<sup>34</sup> All the lines are shifted to the right with respect to Duracryl™ especially in the range of HMW proteins. Interestingly, the slope of the line corresponding to  $M_w$  (dextran) = 2000 kDa is greater and tends to join with the data points of Duracryl™. Such findings mean that performances in terms of protein separation are best achieved for pure PAAm gel but the results remain quite close to those of the PAAm/dextran (500 kDa) gel. This system exhibits superior protein separation capabilities in the HMW and LMW ranges compared to Duracryl™.<sup>35,36</sup>

A more detailed SDS-PAGE analysis was undertaken comprising a study of fluorescence intensity, with rationalization of the results



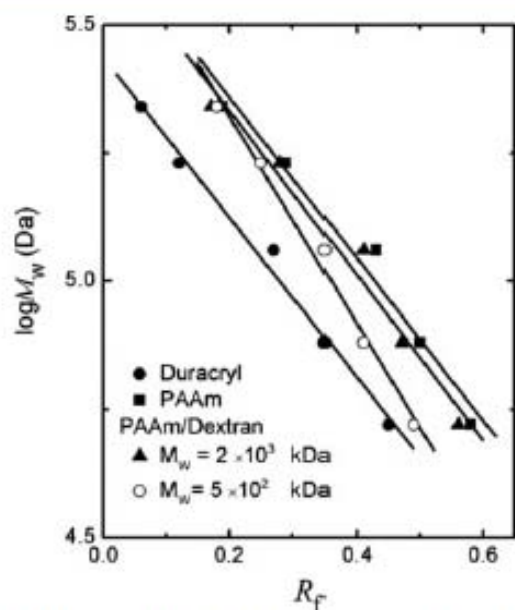
**Figure 6.** (a) Results for  $\alpha$  for various gels in both deionized water and buffer solution. (b) Rate of swelling or  $dy/dt$  at  $t = 0 = \alpha/\tau$ . These plots illustrate clearly the swelling capacity of the gels in terms of  $\alpha$  and rate  $\alpha/\tau$ .

in terms of an adapted Ferguson plot representing protein mass against distance of migration (or mobility) and resolution or spectral band width obtained for each gel under investigation. A preliminary analysis of data considering electrophoresis properties of gels for the separation of LMW proteins (10 to 100 kDa) shows that the best compromise in terms of resolution (large slope for the logarithm of  $M_w$  versus  $R_f$ , small band width) is achieved for the PAAm/dextran (500 kDa) gel in the presence of a small amount of antioxidant (0.05%). In the case of HMW proteins (50 to 200 kDa), the best compromise is obtained for the PAAm/dextran (2000 kDa) gel and a slightly higher concentration of antioxidant (0.1%). Investigations along these lines are being pursued and we hope to report the results in the near future. In any case, proteins migrate faster in the home-made PAAm gels than in Duracryl™.

**CONCLUSIONS**

New gels based on PAAm and dextran mixtures were synthesized and characterized using various techniques. Their properties were compared with those of Duracryl™, a commercial product, in an effort to find a substitute with improved performance in terms of electrophoresis protein separation. The exothermic polymerization process was examined considering the time–temperature profiles and the sharp rise of temperature characteristic of the Trommsdorff effect. This sudden heating took place earlier for the home-made gels suggesting faster kinetics of polymerization compared to Duracryl™. Likewise, UV-visible spectroscopy showed a sharp rise of absorbance at a certain time concomitant with the emergence of structural heterogeneities in early stages of gel formation. A more detailed study dealing with the





**Figure 7.** Logarithm of  $M_w$  of standard proteins versus electrophoretic shift measured for various gels: filled squares, pure PAAm; filled triangles, PAAm/dextran (500 kDa); open circles, PAAm/dextran (2000 kDa); filled circles, Duracryl™.

control of polymerization kinetics and pore size distribution of the modified PAAm gels is still in progress. We hope to correlate the results with the optimization of gel resolution in two-dimensional electrophoresis experiments in the near future. We are also investigating the effects of antioxidants on the polymerization process, examining the possibility of enhancing control of pore size distribution for specific applications. Polymerization of PAAm gels and their derivatives is usually implemented in the presence of oxygen which leads to a delay in the initial stages of chain reactions. This delay is due to oxygen annihilation of radicals emitted by the initiator. Two antioxidants are being tested, sodium bisulfite, which has been described in the patent literature for improving AAm electrophoresis gels,<sup>37</sup> and bromotetrahydroxymethylphosphate, which is used for making polymer gel dosimeters for use in X-ray therapy.<sup>38</sup>

Swelling kinetics was studied both in deionized water and in buffer solutions for electrophoresis protein separation. In water, stiffening induced by the presence of dextran inhibited gel swelling and water uptake. For pure PAAm, however, a large amount of solvent was quickly absorbed. In buffer solutions, the presence of small mobile ions induced greater swelling capacities compared to those in deionized water. Swelling was lowest for Duracryl™ and the PAAm gel containing dextran of highest  $M_w$  (2000 kDa). The effect of  $M_w$  of dextran could be clearly distinguished since swelling of the system with dextran of  $M_w = 500$  kDa was much higher than in the case of  $M_w = 2000$  kDa. Ferguson plots demonstrated that the new PAAm/dextran gels had better performances in terms of electrophoresis separation of proteins.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was performed within the framework of the International Associated Laboratory (LIA 136, MANSURA) between the universities of Tlemcen and Lille under the auspices of the

Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS, Algeria) and the National Centre of Scientific Research (CNRS, France). The proteomics facility used for this study is funded by the European Union (FEDER), the Région Nord-Pas de Calais (France), the IBISA (Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie) network, the CNRS and the Université de Lille 1, Sciences et Technologies.

### REFERENCES

- Hoffman AS, in *Polymer Gels: Fundamentals and Biomedical Applications*, ed. by De Rossi D, Kajiwaru K, Osada Y and Yamanchi A. Plenum Press, New York, p. 289 (1991).
- Hames BD and Rickwood D (eds), *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 2nd edition. Oxford University Press, Oxford, p. 1 (1994).
- Kolin A, *Proc Natl Acad Sci USA* **41**:101–105 (1955).
- Margolis J and Kennich KG, *Nature* **214**:1334–1336 (1967).
- Riguetti PG, Brost BCW and Snyder RS, *J Biochem Biophys Methods* **4**:347–363 (1981).
- Rodbard D, Leviotov C and Chrambach A, *Sep Sci* **7**:705–723 (1972).
- Gelfi C and Riguetti PG, *Electrophoresis* **2**:220–228 (1981).
- Önder P and Kara S, *Polymer* **42**:7411–7417 (2001).
- Riguetti PG, Gaglio S, Saracchio M and Quaraoni S, *Electrophoresis* **13**:587–595 (1992).
- Charlionet R, Lvasseur L and Malandain JJ, *Electrophoresis* **17**:58–66 (1996).
- Chiari M, D'Alesio L, Consonni R and Riguetti PG, *Electrophoresis* **16**:1337–1344 (1995).
- Bornemann S, Rietschel B, Baltruschat S, Karas M and Meyer B, *Electrophoresis* **31**:585–592 (2010).
- Kudela V, in *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, ed. by Kroschwitz JI. Wiley, New York, p. 458 (1990).
- Patras G, Qiao G and Solomon DH, *Electrophoresis* **21**:3843–3850 (2000).
- Fawcett JS and Morris CJ, *Sep Sci* **1**:9–26 (1996).
- Imren D, Gümüşdereliozlu M and Gunner A, *J Appl Polym Sci* **115**:740–747 (2010).
- Moad G and Solomon DH, *The Chemistry of Free Radical Polymerisation*. Pergamon Press, Oxford, pp. 7, 257 (1995).
- Laemmli UK, *Nature* **227**:680–685 (1970).
- Patras G, Qiao G and Solomon DH, *Electrophoresis* **22**:4303–4310 (2001).
- Patras G, Qiao G and Solomon DH, *Macromolecules* **34**:6396–6401 (2001).
- Malkoch M, Vestberg R, Gupta N, Mespuouille L, Dubois P, Mason AF, et al. *Chem Commun* 2774–2778 (2006).
- Webber RE, Creton C, Gong JP and Brown HR, *Macromolecules* **40**:2919–2924 (2007).
- De Gennes PG, *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Ithaca University Press, Ithaca, NY (1979).
- Grznarova G, Yu S, Stefuca V and Polakovik M, *J Chromatogr A* **1092**:107–113 (2005).
- Vervoort S, Patlazan S, Weytz J and Budtova T, *Polymer* **46**:121–127 (2005).
- Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A and Langer R, *Adv Mater* **18**:1345–1360 (2006).
- Aktas DK, Evinger GA and Pekcan O, *Adv Polym Technol* **28**:215–223 (2009).
- Francis S, Mitra D, Dhanawade BR, Varshney L and Sabharwal S, *Radiat Phys Chem* **78**:951–953 (2009).
- Li P, Kim NH, Ramaich S and Lee JH, *Composites B* **40**:275–283 (2009).
- Schröder S, Brandmüller A, Deng X, Ahmed A and Watzig H, *J Pharm Biomed Anal* **50**:320–327 (2009).
- Caulfield MJ, Purss HK and Solomon DH, *Electrophoresis* **22**:4297–4302 (2001).
- Chan GYN, Kambouris PA, Looney MG, Qiao GG and Solomon DH, *Polymer* **41**:27–34 (2000).
- Ferguson KA, *Metabolism* **13**:21–24 (1964).
- Smithies O, *Arch Biochem Biophys Suppl* **1**:125–131 (1962).
- Viovy JL and Lesec J, *Adv Polym Sci* **114**:1–41 (1994).
- Lerman LS and Frisch HL, *Biopolymers* **21**:995–997 (1982).
- Panattoni CM, US Patent US2005059761 (2005).
- Jirasek A, Hilt M, Shaw C and Baxter P, *Phys Med Biol* **51**:1891–1906 (2006).



Les gels sont des réseaux de polymères réticulés susceptibles de gonfler lorsqu'ils sont immergés dans un liquide remplissant les conditions de bon solvant. Le système est un filtre sélectif qui permet la diffusion de molécules de soluté dans la solution dans un sens ou dans l'autre du réseau polymère et qui sert de filet - matrice favorisant la séparation et empêchant le liquide de couler. Dans le cas de l'eau et si le réseau de polymère est hydrophile on parle d'un hydrogel.

Les gels peuvent être utilisés comme absorbants dans les couches jetables, comme filtres pour la purification de l'eau ou comme systèmes de séparation en chromatographie et en électrophorèse. Ils présentent un intérêt particulier dans le largage contrôlé des médicaments. Les hydrogels de polyacrylamide (PAAm) en particulier trouvent une large utilisation dans les applications biologiques et médicales, en chromatographie et en électrophorèse [1-3]. Ils ont un grand intérêt dans les séparations biochimiques, en analyse et protection des protéines lorsque la taille des pores est appropriée pour un tamisage efficace des protéines en électrophorèse.

Une polymérisation radicalaire libre aqueuse entre le monomère d'acrylamide (AAM) et le réticulant N,N'-méthylène-bisacrylamide (Bis) initiée par le couple Ammonium Persulfate (APS) / Tri- Ethyl- Méthylène- Diamide (TEMED) est la méthodologie la plus courante pour fabriquer un gel de polyacrylamide (PAAm). Un tel gel présente des caractéristiques particulièrement favorables en électrophorèse grâce à une transparence optique, une neutralité électrique, de bonnes propriétés mécaniques et une facilité de synthèse à porosité contrôlée. Ces caractéristiques sont particulièrement souhaitées dans la séparation des protéines en électrophorèse. Les développements de la physico - chimie de ces gels a été favorisée par les besoins nouveaux en protéomique. Celle-ci a réellement ouvert le champ au développement de nouvelles technologies de pointe permettant la détection rapide d'un grand nombre de



protéines à l'aide de gels de PAAm modifiés. Pour avoir une vue globale des protéines dans un tissu, il est nécessaire de les identifier, les quantifier, de déterminer leurs localisations, leurs modifications, leurs interactions et fonctions. Des tentatives de manipulations des réseaux de PAAm pour améliorer leurs propriétés ont été proposées en suivant des voies diverses. Des exemples de modifications possibles consistent à faire varier la concentration de monomère ou de réticulant [4,5], la température de polymérisation [6,7], à employer des additifs hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) [8,9], l'agarose [10] ou encore à remplacer le réticulant Bis par d'autres [11-14]. La plupart de ces essais n'ont pas permis de reproduire un système susceptible d'être commercialisé. La formation de gels de PAAm dépend de nombreux paramètres comme la concentration d'AAM, le rapport (AAM / Bis) et la présence d'additifs ou solvants autres que l'eau [15]. Des études ont montré que les propriétés des gels dépendent fortement du taux initial de dilution. A mesure que la quantité d'eau augmente, la structure du réseau devient plus déformée. De ce fait, il est important de bien cerner l'influence des divers additifs sur les propriétés du matériau sachant que les gels sont des systèmes utilisés dans le largage des médicaments et par conséquent leur degré de toxicité doit être pris en compte.

Malgré de grands progrès, une compréhension fondamentale des propriétés des gels est encore insuffisante pour une conception rationnelle des gélifiants. Pour de telles conceptions, il est important de savoir comment les molécules de soluté interagissent avec le gel et comment elles se répartissent entre la phase gel et la phase liquide qui l'entoure. Parmi les tentatives faites pour modifier le réticulant, seuls quelques uns correspondent à une fonctionnalité potentielle supérieure à quatre. La fonctionnalité potentielle est le nombre de chaînes de polymères susceptibles d'être reliées à travers un monomère et correspond à deux fois le nombre de doubles liaisons. Les réticulants à fonctionnalité supérieure à quatre sont caractérisés par une faible solubilité dans

l'eau et ils peuvent subir une dégradation de transfert de chaîne durant la polymérisation. La réactivité du réticulant joue un rôle important dans la formation structurale du réseau.

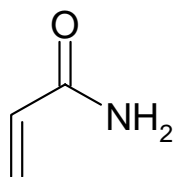
Quoique de nombreux travaux existent dans la littérature sur les propriétés physiques des gels de PAAm, leur mécanisme de formation reste peu connu. Les transitions de phases et le comportement des gels sont déterminés par quatre types fondamentaux d'interactions à l'échelle moléculaire : interactions de Van Der Waals, hydrophobiques, liaisons hydrogènes et interactions ioniques. Les hydrogels de PAAm absorbent une grande quantité d'eau due à la présence de groupements amides hydrophiles. Une forte absorption d'eau cause un manque de stabilité hydrolytique et une faible résistance mécanique ce qui limite l'usage des hydrogels dans de nombreuses applications. La performance mécanique du PAAm peut être améliorée par la formation de réseaux interpénétrés. Les gels ayant des interactions de type métal-ligand ont montré de meilleures propriétés thermomécaniques, un  $T_g$  élevé et une haute température de dégradation [16,17]. Ces gels aqueux tridimensionnels covalents sont insolubles dans l'eau et peuvent développer une résistance mécanique et établir un équilibre avec le liquide à la température de l'environnement. Une variation de concentration, de structure ou de fonctionnalité du monomère ou du réticulant peut modifier la structure et la porosité du gel. Le nombre de techniques utilisées pour explorer la porosité des hydrogels est limité parce qu'on doit parfois modifier la température ou le solvant ce qui pourrait entraîner une contraction ou un gonflement du gel. Il faudra donc bien maîtriser le phénomène de gonflement dans différentes conditions environnementales. Il n'y a pas une méthode unique permettant de corréler entre la formation du réseau tridimensionnel et les propriétés d'usage. Souvent on a recours à une multitude de techniques pour caractériser les gels synthétisés.

De nombreux exemples existent dans la littérature relatifs aux gels formés par copolymérisation de monomères mono- vinyliques et di- vinyliques et donnant des réseaux construits selon un mode statistique. D'autres travaux ont décrit la synthèse de quelques dérivés d'acryloyl réticulés à l'aide de monomères diamide avec une substitution de carbone  $\alpha$ -vinylique. Ces travaux ont introduit le concept de réactivité différentielle du vinyle. Une modification de la structure chimique vinylique peut conduire à une nette amélioration des propriétés du gel comme la porosité. Les gels idéaux ont une distribution homogène de réticulations tandis que les gels réels montrent des hétérogénéités spatiales dans le volume du gel qui sont d'une importance considérable pour la caractérisation de leurs propriétés d'usage. De point de vue pratique, les hétérogénéités spatiales sont nuisibles puisqu'elles réduisent la clarté optique et la tenue mécanique du gel et par conséquent affectent les performances dans les applications concrètes (exemples : lentilles de contact et super absorbants). La concentration initiale de monomère joue un rôle important et affecte la structure du réseau. Lorsque la concentration de polymère diminue, le gel est déformé et montre des défauts comme les boucles, les réticulations inefficaces ou des chaînes pendantes. L'augmentation de la quantité d'eau entraîne un gonflement des gels et aucun réseau ne se forme au-delà d'une quantité limite de solvant.

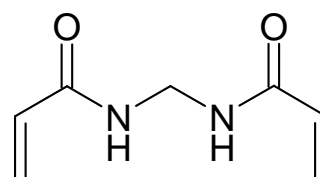
Le couple rédox standard APS / TEMED est capable d'oxyder les substances contenant des groupes amines produisant ainsi des N-oxydes. S'ils restent dans le gel, ces derniers peuvent oxyder les protéines spécialement à travers une transformation des résidus S – H en liaisons S – S. Le gonflement des gels dépend de la structure du réseau et est étroitement lié aux conditions de préparation. Ainsi, la compréhension du mécanisme de formation du réseau est d'un grand intérêt pour comprendre et contrôler ses propriétés physiques. Dans certains cas, des ions métalliques ont été introduits dans les gels comme greffons de polymère. De tels réseaux sont sensibles

aux ions métalliques et trouvent un usage important dans le domaine électronique et en technologie environnementale.

L'un des objectifs de cette thèse a été de mettre au point un gel à base de PAAm modifié avec du dextran, ayant des propriétés similaires voire améliorées par rapport au gel commercial duracryl (Genomic Solution).

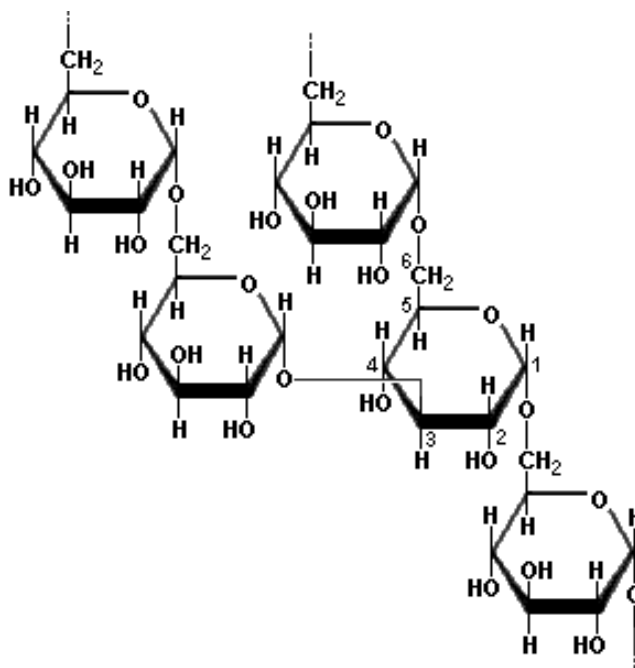


Acrylamide

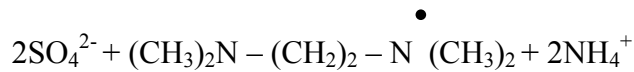
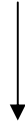


N,N'-

méthylènebisacrylamide



Dextran



1/ **AAm, Bis**

2/ **Dextran**

« **PAAm – Dextran** »

### Schéma du processus de polymérisation

Les gels synthétisés permettent de faire une analyse protéomique précise et peu coûteuse avec la possibilité de modifier simplement la constitution de base du gel de PAAm selon le besoin de l'application ciblée. Le duracryl est constitué d'une matrice d'AAM élastique mais résistante et utile dans un grand nombre d'applications en électrophorèse. La matrice reste stable comme solution réfrigérée pouvant tenir jusqu'à une année. L'incorporation de catalyseurs appropriés au duracryl forme une matrice renforcée et de qualité supérieure aux gels de PAAm en termes de force mécanique, d'élasticité et de propriétés de coloration des protéines. La sensibilité de détection des protéines par une coloration argentée, la linéarité des dépôts d'argents en fonction des charges de protéines sont équivalentes aux gels standards de PAAm. La possibilité de modifier la taille des pores selon des prescriptions et des procédures opératoires simples est une avancée majeure dans ce domaine. Pour atteindre ce but,

différents gels de PAAm, modifiés par ajout de dextran, ont été fabriqués et analysés en changeant la concentration de monomère et de réticulant selon la taille des protéines à séparer et le rôle du gel, selon qu'il s'agisse d'un gel de séparation ou d'un gel de concentration.

### Caractéristiques des protéines utilisées

	<b>Protéine</b>	<b>Masse Moléculaire</b>	<b>Source</b>	<b>Quantité (µg)</b>
<b>LMW</b>	Phosphorylase b	97 000	Rabbit muscle	67
	Albumin	66 000	Bovine serum	83
	Ovalbumin	45 000	Chicken egg white	147
	Carbonic anhydrase	30 000	Bovine erythrocyte	83
	Trypsin inhibitor	20 100	Soybean	80
	α-Lactalbumin	14 400	Bovine milk	116
<b>HMW</b>	Myosin	220 000	Rabbit muscle	25
	α-2-Macroglobulin	170 000	Bovine plasma	100
	β-Galactosidase	116 000	E. coli	16
	Transferin	76 000	Human	17
	Glutamate déshydrogénase	53 000	Bovine liver	18

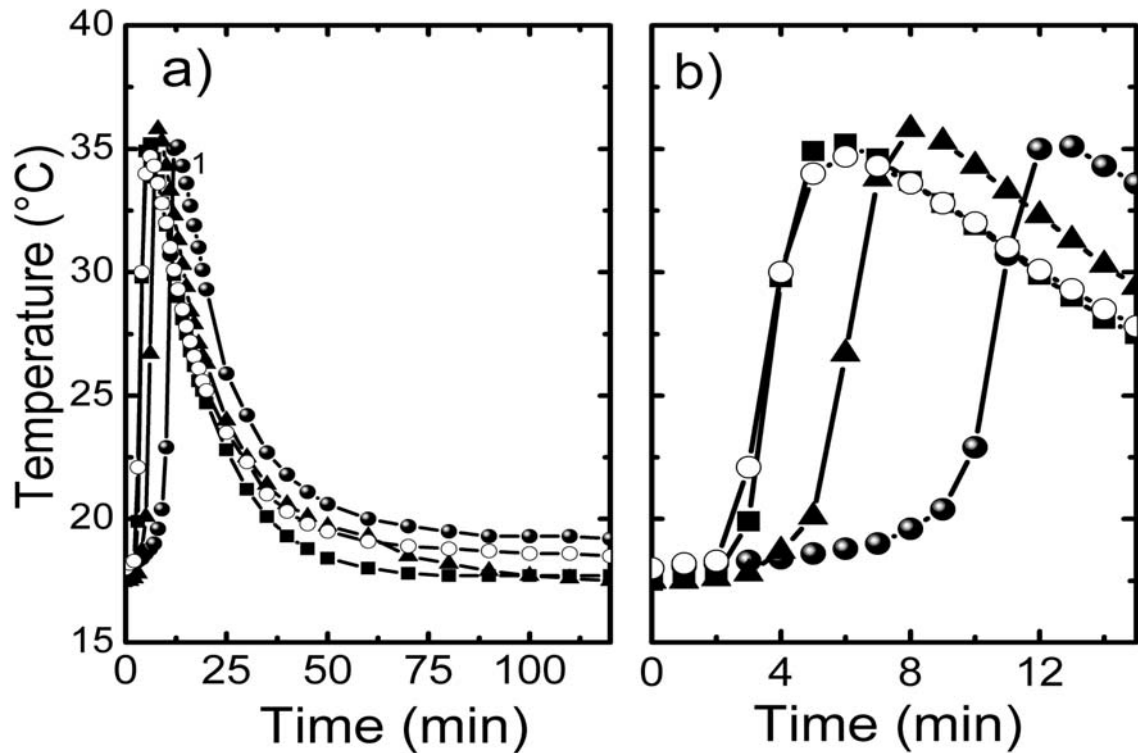
Un mode de synthèse adéquat a été mis au point ainsi que des études faisant appel à plusieurs méthodes expérimentales ont été effectuées. Des études d'électrophorèse SDS-PAGE, UV-Visible, cinétique de polymérisation, cinétique de gonflement ont été menées [18].

Ces gels ont été synthétisés à partir de produits chimiques parfaitement caractérisés contrairement aux produits contenus dans Duracryl<sup>TM</sup> qui ne sont pas connus d'une façon précise. Nous avons cherché les conditions permettant d'améliorer la résistance des gels pour atteindre une bonne résistance mécanique après des utilisations nombreuses et répétitives. Nous avons également exploré les conditions permettant de réaliser une meilleure transparence optique et des propriétés de fluorescence plus performantes en comparaison avec les gels commerciaux.

Sachant que les gels utilisés en séparation électrophorèse des macromolécules biologiques et notamment des protéines sont généralement immergés dans des solutions aqueuses ou des milieux liquides (solution tampon, liquide physiologique, électrolyte) les propriétés de gonflement ont été caractérisées avec une grande précision pour une bonne identification des masses et des charges des macromolécules à séparer ou à isoler. La chaleur dégagée par le processus de polymérisation a été étudiée en examinant la variation de la température en fonction du temps. La croissance brutale de température au début du processus connue sous le nom d'effet Trommsdorf a montré que la cinétique de polymérisation des gels de PAAm en présence de Dextran est plus rapide par rapport au gel commercial Duracryl<sup>TM</sup>.

**(a) Profil de température en fonction du temps de polymérisation pour les systèmes étudiés. (b) Amplification des courbes au début des cinétiques. Carrés:**

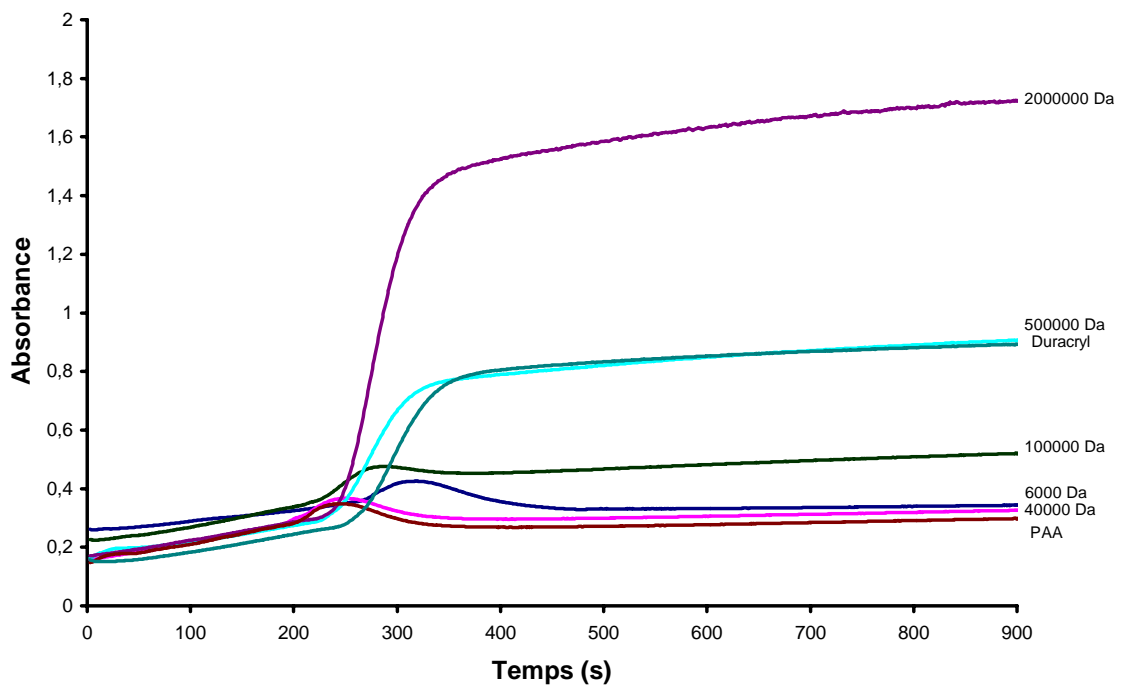
PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Duracryl™ :



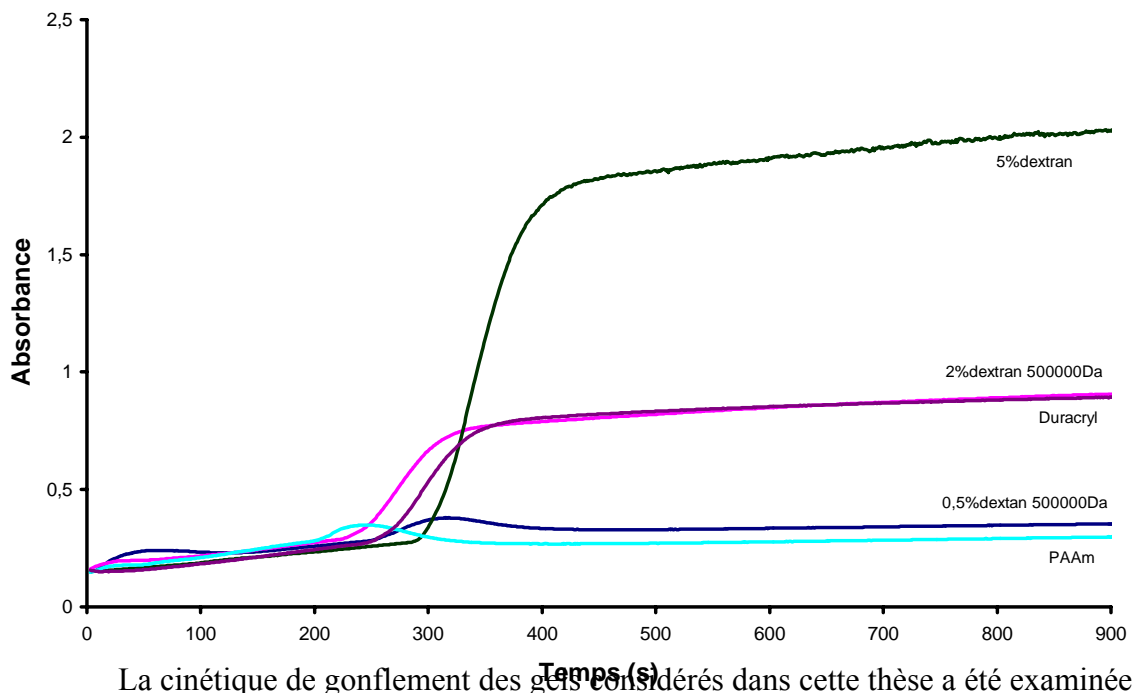
La spectroscopie UV-vis a été mise à contribution dans cette comparaison et a permis de corroborer les résultats précédents en mettant en évidence l'apparition au début de la polymérisation d'hétérogénéités structurales et d'une séparation de phase du type sol / gel.

**Absorbance à 300 nm en fonction du temps pour les différents gels synthétisés :**





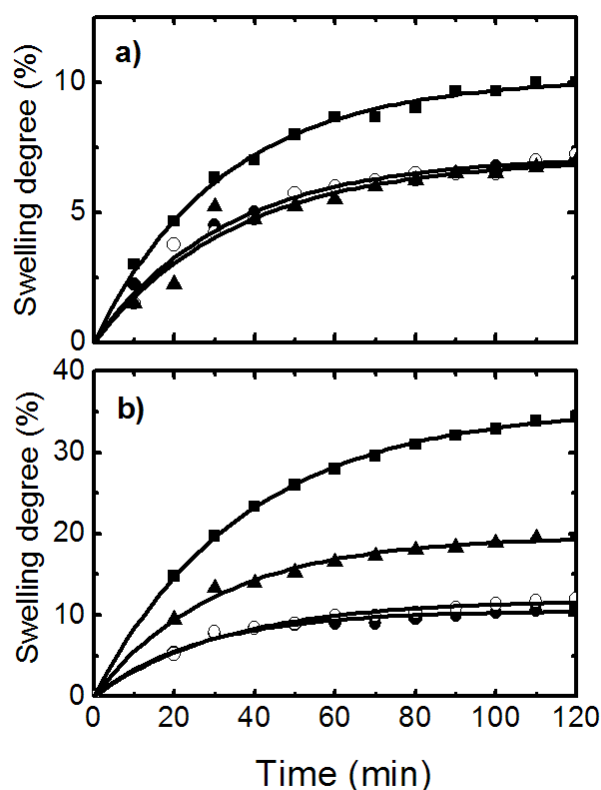
**Absorbance des gels à 300 nm en fonction du temps en présence de Dextran de 500 kDa à différentes concentrations :**



La cinétique de gonflement des gels considérés dans cette thèse a été examinée dans l'eau dé-ionisée et dans la solution tampon de SDS-PAGE. L'ajustement des

données expérimentales avec une expression mathématique simple a permis de mettre en évidence une vitesse d'augmentation du taux de gonflement plus rapide pour les gels de PAAm avec ou sans additif polysaccharide en comparaison avec Duracryl™. Une étude de modélisation plus détaillée est en cours pour évaluer les effets des paramètres qui contrôlent à la fois la cinétique de polymérisation, la distribution de tailles des pores du gel ainsi que les paramètres qui contrôlent le gonflement.

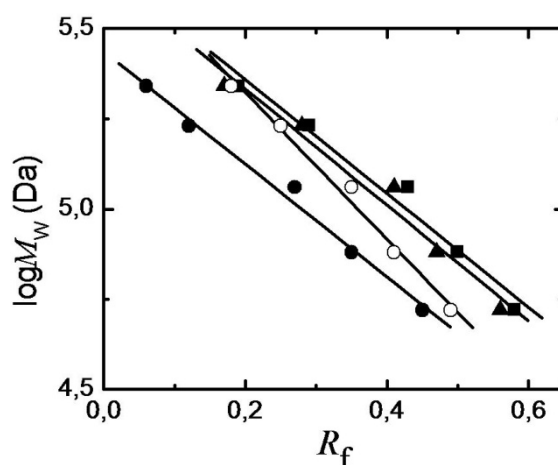
**Degré de gonflement en fonction du temps dans a) l'eau dé-ionisée b) la solution tampon (Tank Buffer) utilisée dans les expériences d'électrophorèse de type SDS-PAGE. Carrés: PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Duracryl™ :**



Afin d'analyser de manière précise la coloration et la résolution de séparation, un logiciel développé au laboratoire a été utilisé permettant de déterminer le niveau de détection des bandes. Après découpage de chaque bande en SDS-PAGE

correspondant à la séparation du mélange protéique à une concentration donnée sous Photoshop®, ce logiciel permet de générer un tableau de valeurs donnant la densité optique en fonction de la distance de migration. On peut ainsi attribuer à chaque protéine une valeur de la densité optique et un pic caractéristique.

**Courbes de Fergusson donnant  $\log M_w$  en fonction du facteur de retardation  $R_f$  pour les différents systèmes analysés en SDS-PAGE. Carrés: PAAm pure; Triangles: PAAm/Dextran500 ; Cercles blancs: PAAm/Dextran2000; Cercles noirs: Durac**



Notons enfin que la polymérisation des gels de PAAm pure et modifiés est généralement faite en présence d'oxygène provoquant un retard au début des réactions en chaîne dû à l'annihilation des radicaux émis par le système initiateur. Deux types d'antioxydants ont fait l'objet d'une étude préliminaire et qui sera poursuivie dans un proche avenir.

En plus de l'**introduction générale**, cette thèse est organisée en **4 chapitres** et une **conclusion générale**. Le **chapitre 1** permet d'avoir une idée sur l'état de l'art du

problème. Il passe en revue certains travaux qui ont marqué des tournants majeurs dans la compréhension du comportement des gels dans différentes conditions. Sans être complet, il montre les contributions majeures et les tendances actuelles dans la recherche sur ce sujet. Le **chapitre 2** décrit la partie expérimentale concernant les produits utilisés et leur provenance, les méthodes de préparation des échantillons en vue des différentes analyses. Il décrit également les techniques expérimentales choisies dans cette investigation en montrant les appareillages utilisés. Le **chapitre 3** fait le bilan des résultats obtenus par les différentes techniques utilisées alors que le **chapitre 4** les discute et les analyse à la lumière des connaissances existantes et en essayant de justifier et d'interpréter les phénomènes observés et les données expérimentales. La thèse est clôturée par une conclusion générale qui résume les principaux résultats obtenus et les perspectives de poursuite de ce travail.

## Références Bibliographiques

- [1] Hoffman, A.S., in :DeRossi, D., Kajiwara, K. Osada, Y., Yamauchi, A. (Eds.), *Polymer Gels: Fundamentals und Biomedical Applications*, Plenum Press, New York 1991, pp. 289-297.
- [2] Hames, B.D., Rickwood, D., (Eds), *Gel Electrophoresis of Proteins; A Pratical Approach*, second edition, Oxford University Press, Oxford 1994, pp 1-22.
- [3] Fawcett, J.S., Morris, C.J.O.R., *Sep.Sci.*1996, 1,9-26.
- [4] Rigueti,P.G., Brost,B.C.W., Snyder, R.S.,*J.Biochem. Biophysics. Methods* 1981, 4, 347-363.
- [5] Rodbard, D., Leviotov, C.,Chrambach, A., *Sep. Sci.* 1972,7, 705-723.
- [6] Gelfi, C., Rigueti, P.G., *Electrophoresis* 1981, 2, 220-228.
- [7] Ônder, P., Kara, S., *Polymer*, 42 (2001) 7411-7417.
- [8] Rigueti, P. G., Gaglio, S., Saracchio, M., Quaraoni, S., *Electrophoresis.* 1992, 13, 587-595.
- [9] Charlionet, R., Levasseur, L., Malandain, J.J.,*Electrophoresis* 1996, 17, 58-66.
- [10] Chiari, M., D'Alesio, L., Consonni, R., Rigueti, P.G., *Electrophoresis* 1995, 16, 1337-1344.
- [11] Rigueti, P.G., Chiari, M., *Electrophoresis* 1995, 16, 1815-1829.
- [12] Chan, G.Y.N., Jingran, A.G., Kambouris, P.A., Looney,M.G., Solomon, D.H., *Polymer* 1998, 39, 5781-5787.
- [13] Chan, G.N.Y., Kambouris, P.A., Looney, M.G., Qiao, G.G., Solomon, D.H., *Polymer* 2000, 41, 27-34.
- [14] Hochstrasser, D.F., Merril, C.R., Patchornik, A. US Patent # 5, 283, 196, 1994.
- [15] T. Tanaka, *Sci. Am.* 244, 124 (1981).
- [16] Bekturov E.A., Mamutbekov G.K. ; *Makromol Chem*1997, 81, 198.
- [17] Lindsay C., Sherrington D.C. ; *Reactive Polymers* 1988, 3, 327.
- [18] Tokita, M., Tanaka, T., *Science*, 253, 1121 (1991).