

MÉTHODES ÉLECTROPHORÉTIQUES

1. Définition :

C'est une méthode de séparation de particules chargées dans un champ électrique continu. Il s'agit du déplacement des macromolécules chargées dans un champ électrique.

2. Principe :

Dans un champ électrique généré par un courant continu, les espèces anioniques (chargées négativement) se déplacent vers l'anode (le pôle positif) tandis que les espèces cationiques (chargées positivement) vers la cathode (le pôle négatif).

Dans cette technique, la particule est soumise à deux forces :

Force électrique :

Dans le sens du déplacement vers le pôle de charge opposée. Elle est donnée par la formule suivante :

$$F_e = Q.E$$

Où :

Q : la charge

E : champ électrique (volt/cm)

Force de frottement :

Dans le sens opposé au déplacement. Elle est proportionnelle à la vitesse du déplacement :

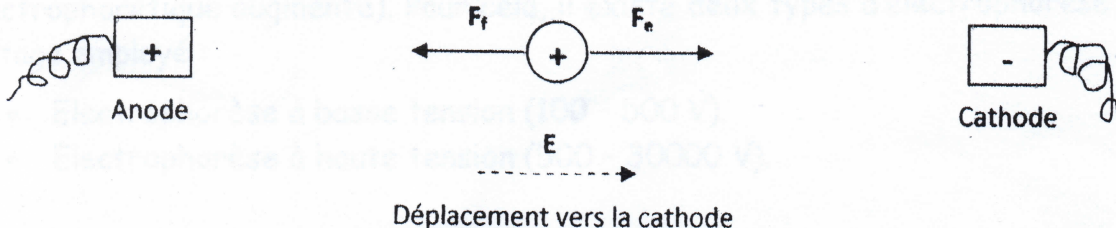
$$F_f = f.v$$

Où :

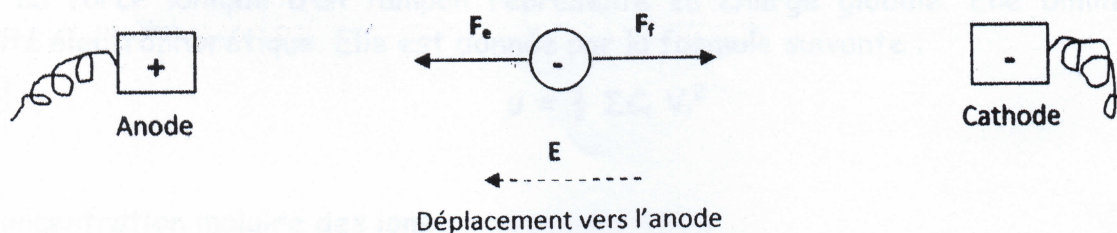
f : coefficient de frottement = $6\pi\eta r$

v : vitesse de déplacement

Si la particule est chargée positivement :



Si la particule est chargée négativement :



A l'établissement du champ électrique, la vitesse de la particule s'accroît et tend très rapidement vers une valeur limite (v_l) où la force électrique et la force de friction s'équilibrent ; donc :

$$F_e = F_f \text{ implique que } Q.E = f.v$$

$$v_l = Q.E/f$$

$$\text{donc : } v_l = Q.E/6\pi\eta r$$

$$\text{Alors : } Q/f = v_l/E = U \text{ (mobilité électrophorétique)}$$

D'où :

$$U = Q/6\pi\eta r$$

3. Facteurs influençant l'électrophorèse :

3.1. Temps de migration :

La particule soumise à un champ électrique se déplace à vitesse constante. Le déplacement est proportionnel au temps de migration.

3.2. Température :

Dans le bac de l'électrophorèse, la température augmente à cause de l'échauffement par effet Joule ; ce qui entraîne une évaporation du tampon aboutissant ainsi à l'augmentation de la concentration en ions du milieu (la mobilité électrophorétique augmente). Pour cela, il existe deux types d'électrophorèse selon le voltage employé :

- Electrophorèse à basse tension (100 - 500 V).
- Electrophorèse à haute tension (500 - 30000 V).

3.3. Force ionique du tampon :

La force ionique d'un tampon représente sa charge globale. Elle diminue la mobilité électrophorétique. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i V_i^2$$

Où :

C_i : concentration molaire des ions

V_i : la valence des ions

3.4. Le pH du tampon :

Le pH détermine l'ionisation des molécules donc définit leur charge électrique :

Si $pH < pHi$: molécule chargée positivement : donc sa migration vers la cathode.

Si $pH > pHi$: molécule chargée négativement : donc sa migration vers l'anode.

3.5. Courant électrique :

L'intensité du champ électrique est le rapport entre la différence de potentiel entre les électrodes et la distance entre les électrodes. L'augmentation de cette intensité entraîne l'augmentation de la mobilité électrophorétique.

3.6. Les forces de freinages :

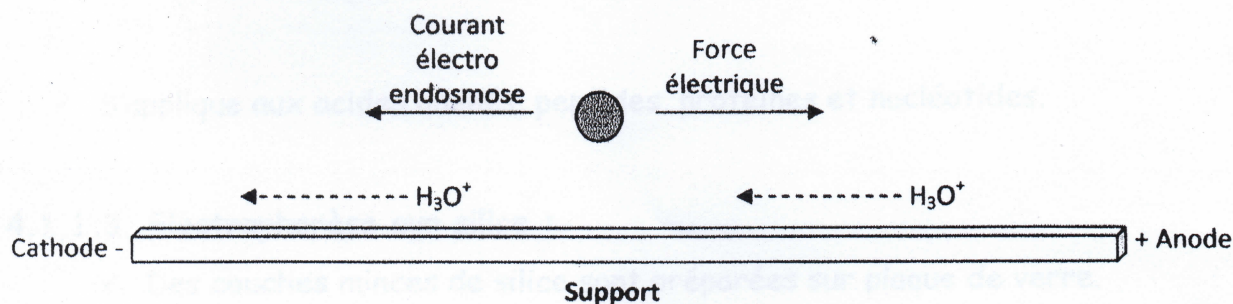
Ces forces sont générées par le support qui peut occasionner une adsorption, un phénomène d'électroendosmose et un tamisage moléculaire.

3.6.1. Adsorption :

C'est la rétention de l'échantillon par le support qui se manifeste par des traînées et donne des taches (après révélation) la forme de comète.

3.6.2. Electroendosmose (électro-osmose) :

C'est un flux du tampon dirigé vers la cathode (-) constitué de la partie cationique du tampon (entraînant de l'eau H_3O^+). Ce courant s'oppose à la migration des particules chargées négativement et accélère celle des particules chargées positivement.



3.6.3. Tamisage moléculaire :

Cet effet est rencontré dans le cas de support poreux (gel réticulé comme agarose, amidon et polyacrylamide). Cette porosité facilite la migration des petites molécules mais freine celle des molécules de grande taille.

4. Différents types d'électrophorèse :

4.1. Electrophorèse de zone (zonale)

4.1.1. Electrophorèse en couche mince :

- ✓ C'est la forme la plus simple d'électrophorèse.
- ✓ Elle est très utilisée pour des séparations analytiques et peut se prêter à des séparations préparatives.

4.1.1.1. Electrophorèse sur papier :

- ✓ Adsorbe l'échantillon (utilisation d'un tampon alcalin pour minimiser cet effet).
- ✓ Phénomène d'électroendosmose fréquent.
- ✓ Réalisation à basse tension.
- ✓ Révélation grâce à des colorants.
- ✓ Séparation des acides aminés, des peptides, des protéines et des nucléotides.

4.1.1.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose :

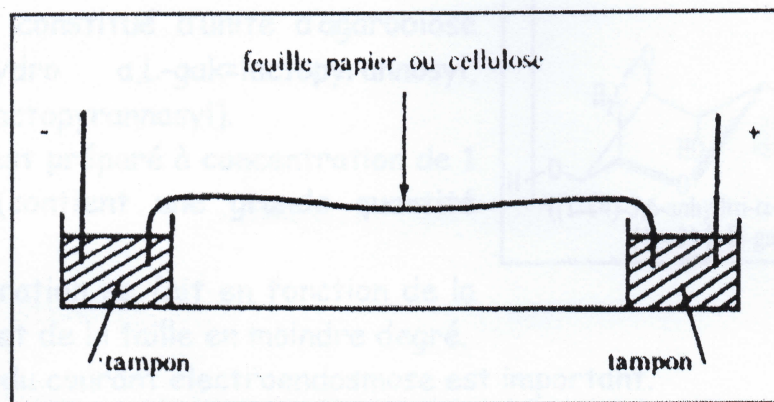
- ✓ Réalisée à des voltages élevés.
- ✓ Séparation rapide (en 30 à 120 min).
- ✓ Adsorption faible des échantillons.
- ✓ Utilisée pour des séparations analytiques seulement.

- ✓ S'applique aux acides aminés, peptides, protéines et nucléotides.

4.1.1.3. Electrophorèse sur silice :

- ✓ Des couches minces de silice sont préparées sur plaque de verre.
- ✓ Ce support donne une bonne résolution et une haute sensibilité.
- ✓ Utilisée pour la séparation des protéines.

4.1.1.4. Appareillage :

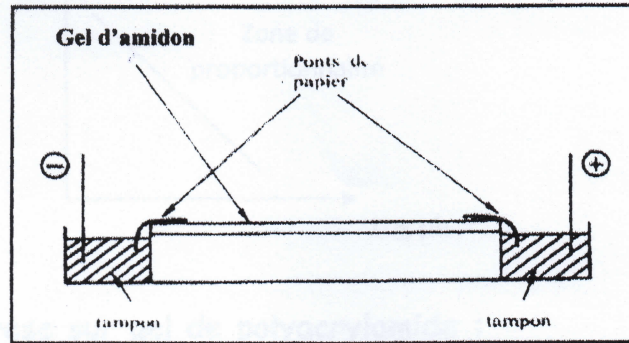


4.1.2. Electrophorèse sur gel :

Les gels sont utilisés pour la séparation de substances à haut poids moléculaire (protéines, acides nucléiques) parce qu'ils permettent une meilleure résolution car ils sont : hydrophiles, semi-colloïdes et insolubles dans l'eau.

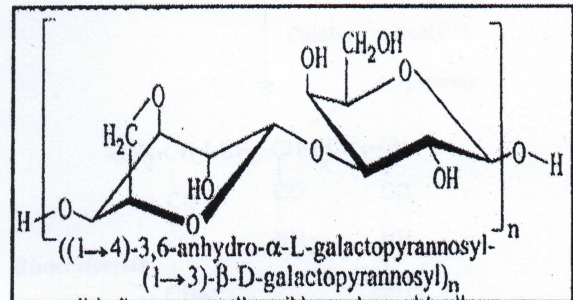
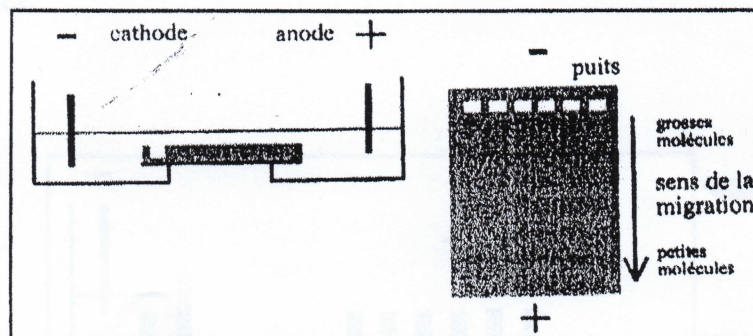
4.1.2.1. Electrophorèse sur gel d'amidon :

- ✓ Ce gel est préparé à base d'amylopectine (8 à 15%).
- ✓ Présente un effet tamis marqué.
- ✓ La séparation se fait en fonction de la charge et de la taille.
- ✓ Cette technique est appliquée à basse tension pendant quelques heures (3 à 4h).
- ✓ La révélation des macromolécules est réalisée par colorimétrie ou par réaction enzymatique.
- ✓ La limitation de cette technique est l'impossibilité de détecter des quantités inférieures à $10\mu\text{g}$.

Appareillage :

4.1.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose :

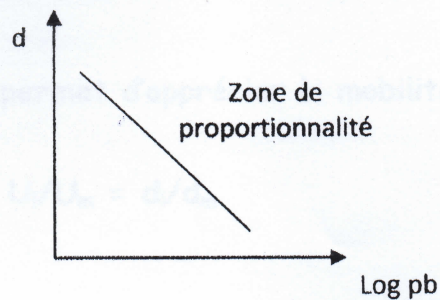
- ✓ L'agarose est un polyside neutre linéaire constitué d'unité d'agarobiose [3,6-anhydro α ,L-galactopyrannosyl, β ,D-galactopyrannosyl].
- ✓ Ce gel est préparé à concentration de 1 à 3% (contient une grande quantité d'eau).
- ✓ La séparation se fait en fonction de la charge et de la taille en moindre degré.
- ✓ L'effet du courant électroendosmose est important.
- ✓ Révélation par coloration.

Appareillage :Résultats :

Cette technique permet la détermination de la taille d'un fragment ADN selon la distance de migration (d) par report sur la droite d'étalonnage.

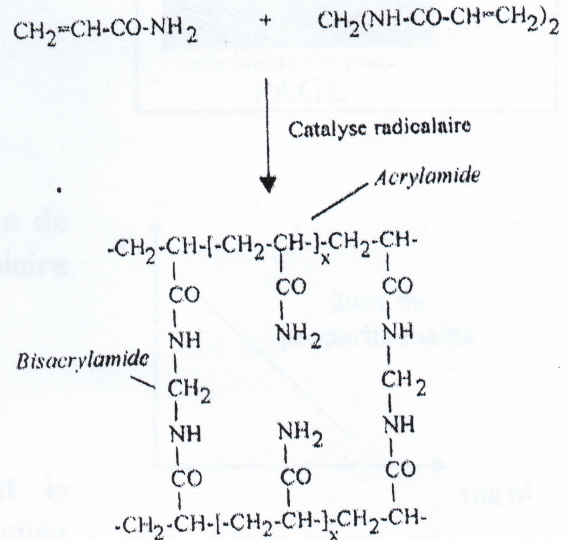
$$\text{On a : } d = \alpha \log(pb) + \beta$$

$$\text{Donc : } \log(pb) = \alpha' d + \beta'$$

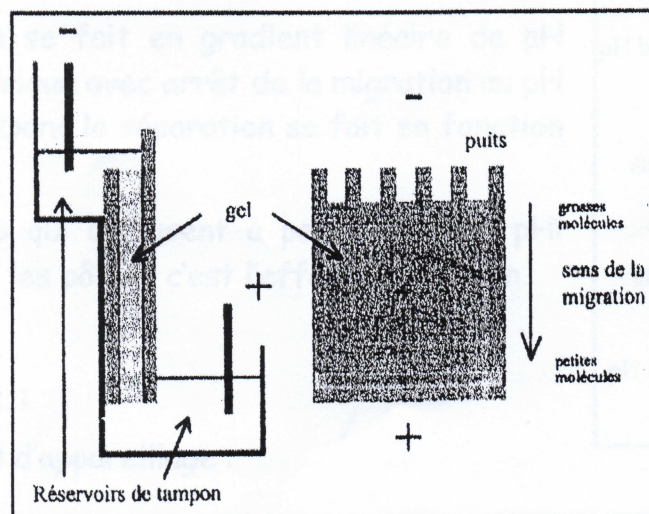


4.1.2.3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide :

- ✓ Le gel de polyacrylamide est obtenu par polymérisation de l'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) avec le bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$).
- ✓ Ce type de gel est caractérisé par un pourcentage d'acrylamide qui varie entre 3 et 30% ce qui permet d'effectuer une séparation de molécules ayant un poids moléculaire de 10^4 à 10^6 .
- ✓ Ce gel est peu adsorbant et ne produit pas de des phénomènes d'électroendosmose.
- ✓ La séparation se fait en fonction de la charge et du poids moléculaire.
- ✓ Les méthodes de détection peuvent être colorimétrique, enzymatique ou par fluorescence.



Appareillage :



Résultats :

Cette technique permet d'apprécier la mobilité relative en utilisant la formule suivante :

$$U_{ri} = U_i/U_m = d_i/d_m$$

Où :

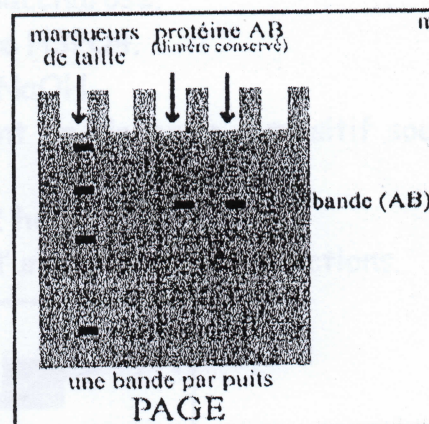
U_{ri} : mobilité relative

U_i : mobilité de l'échantillon

U_m : mobilité du marqueur

d_i : distance de migration de l'échantillon

d_m : distance de migration du marqueur

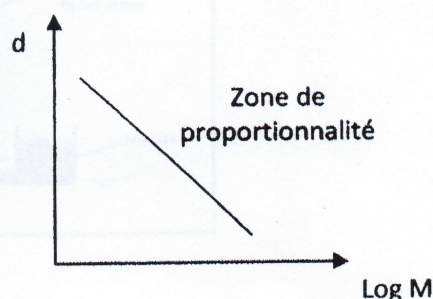


Il existe une relation linéaire entre la distance de migration et le poids moléculaire (masse molaire moléculaire).

$$\text{On a : } d = a \log M + \beta$$

$$\text{D'où : } \log M = \alpha' d + \beta'$$

Donc M peut être déterminé en reportant la distance de migration de la molécule étudiée (protéine) à la droite d'étalonnage.

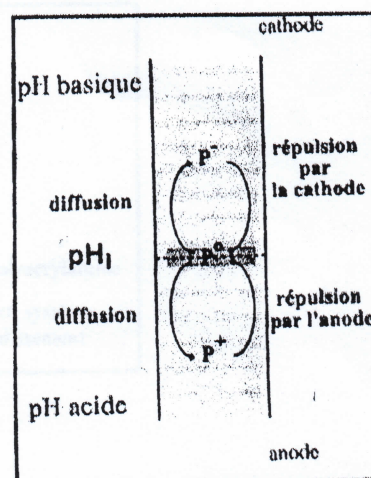


4.2. Focalisation isoélectrique (électrofocalisation)

4.2.1. Principe :

La séparation se fait en gradient linéaire de pH dans un champ électrique avec arrêt de la migration au pH isoélectrique (pHi). Donc la séparation se fait en fonction du pH.

Les molécules qui diffusent à partir de leur pHi sont repoussées par les pôles ; c'est l'effet focalisation.

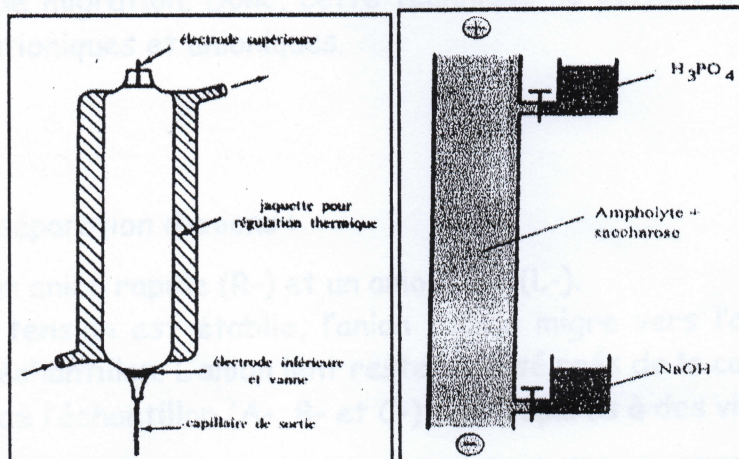


4.2.2. Appareillage :

Il existe deux types d'appareillage :

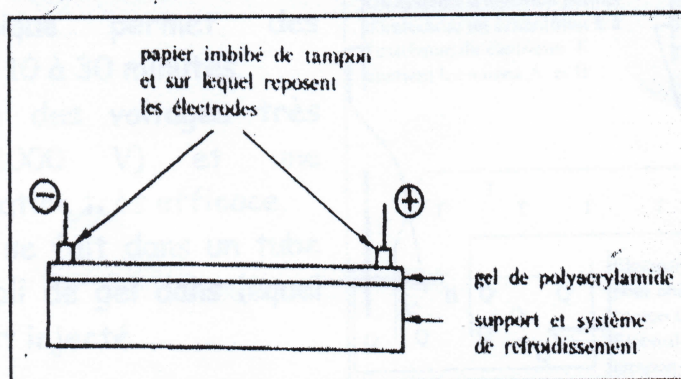
4.2.2.1. Migration verticale (E. sur colonne en veine liquide) :

- ✓ Dans ce cas, la technique consiste en une colonne thermostatée remplie de substance ampholyte placée dans un gradient de saccharose.
- ✓ L'anode est connectée à un réservoir de phosphate H_3PO_4 .
- ✓ La cathode est connectée à un réservoir de soude $NaOH$.
- ✓ Le gradient de pH est d'abord mis en place, avant de placer le dispositif sous tension.
- ✓ La séparation complète s'effectue entre 24 et 72 heures.
- ✓ Il y a possibilité de fractionner le milieu à l'aide d'un collecteur de fractions.



4.2.2.2. Migration horizontale :

- ✓ Le support peut être de gel de polyacrylamide ou d'agarose.
- ✓ Cette technique est réalisée à haute tension jusqu'à 2000V.
- ✓ La chaleur dégagée doit être évacuée par un système de refroidissement efficace.
- ✓ Une séparation complète s'effectue en quelques heures (3-4h).



4.2.3. Application :

Détermination du pH_i à 0,01 à 0,02 unité de pH .

4.3. Isotachophorèse

4.3.1. Définition :

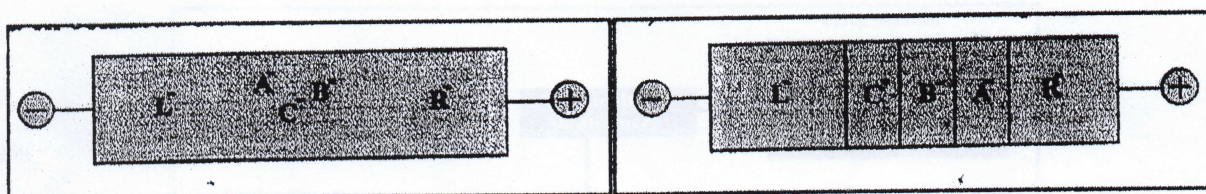
Isotachophorèse est un mot grec (phoresis : séparation ; iso : même, tacho : vitesse)

C'est la séparation des ions ayant la même charge dans un champ électrique avec la même vitesse de migration. Donc, cette technique ne permet pas de séparer à la fois les formes cationiques et anioniques.

4.3.2. Principe :

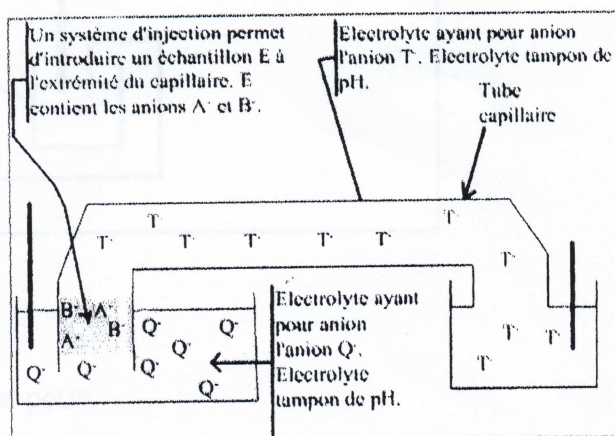
Dans le cas d'une séparation d'anions :

- ✓ On utilise un anion rapide (R-) et un anion lent (L-).
- ✓ Lorsque la tension est établie, l'anion rapide migre vers l'anode suivi par les anions de l'échantillon. L'anion lent reste localisé près de la cathode.
- ✓ Les anions de l'échantillon (A-, B- et C-) sont séparés à des vitesses similaires.



4.3.3. Appareillage :

- ✓ Cette technique permet des séparations en 10 à 30 minutes.
- ✓ Elle nécessite des voltages très importants (3000 V) et une thermostabilisation très efficace.
- ✓ La séparation se fait dans un tube capillaire rempli de gel dans lequel l'échantillon est injecté.



4.3.4. Applications :

Cette technique s'applique aux acides organiques, inorganiques, nucléiques et aux protéines.

Les applications touchent les domaines biochimique, pharmaceutique, agroalimentaire et de l'environnement.

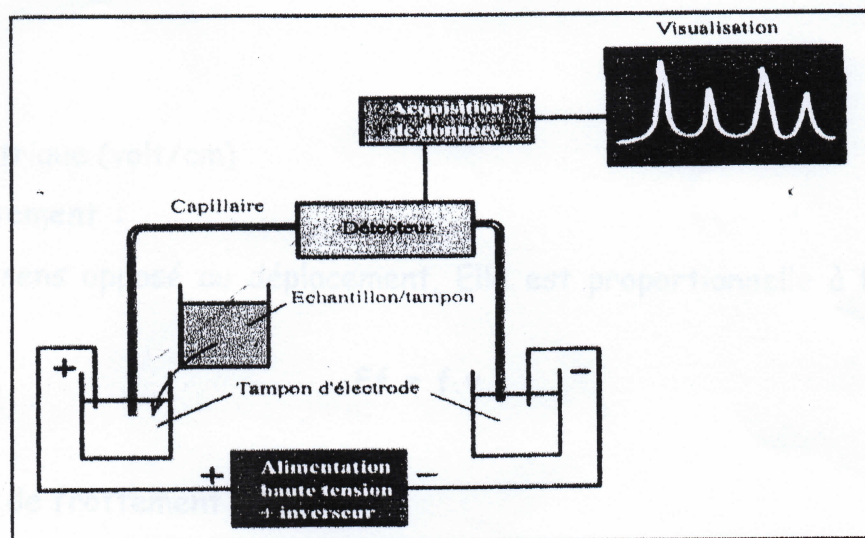
4.4. Electrophorèse capillaire

4.4.1. Principe :

Cette technique consiste à la séparation de composés chargés par un champ électrique appliqué aux extrémités d'une colonne capillaire, plus, l'utilisation ou non d'un courant électroendosmose. Les ions vont, en général, migrer vers la cathode.

4.4.2. Appareillage :

- ✓ La séparation électrophorétique est effectuée dans un tube capillaire de silice (25 - 100 μm).
- ✓ Utilisation des hautes tensions donc analyse rapide.
- ✓ Cette technique donne un haut pouvoir de résolution.
- ✓ Avantage de cette technique : ne nécessite que quelques (nl) de l'échantillon.



4.4.3. Applications :

- ✓ L'électrophorèse capillaire est utilisée pour :
- ✓ Des séparations en biologie moléculaire.
- ✓ La séparation des peptides et des protéines.
- ✓ La mise en évidence et le dosage de petites molécules telles que : drogue, métabolite, nucléoside, nucléotide, acides aminés, ions dans les liquides biologiques (urine, sérum).