



Chapitre VI

L'électrophorèse



VI-1-Introduction.

VI-2-Principe.

VI-3-Électrophorèse capillaire.

VI-4-Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique.

VI-5-Instrumentation.

VI-6-Techniques électrophorétiques.

V-1-Introduction:

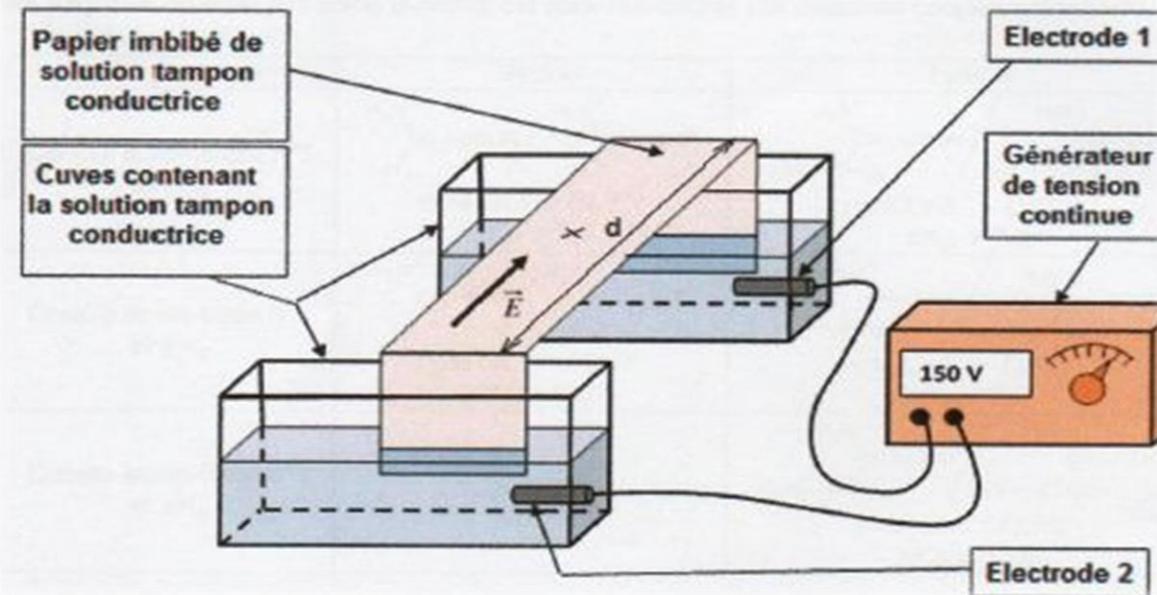
- ❖ L'**électrophorèse** repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale. Cette méthode encore appelée **électrophorèse capillaire haute performance (EHP)** permet de séparer aussi bien les biomolécules que les composés de faible masse moléculaire.



VI-2-Principe:

- ❖ On utilise une bandelette de matière plastique recouverte d'une substance poreuse imprégnée d'un électrolyte. Ses extrémités plongent dans deux réservoirs indépendants contenant également cet électrolyte et reliés aux électrodes d'un générateur de tension continue.

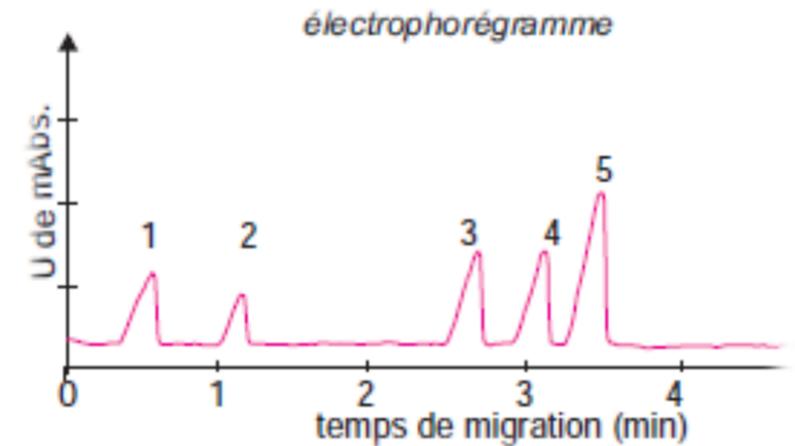
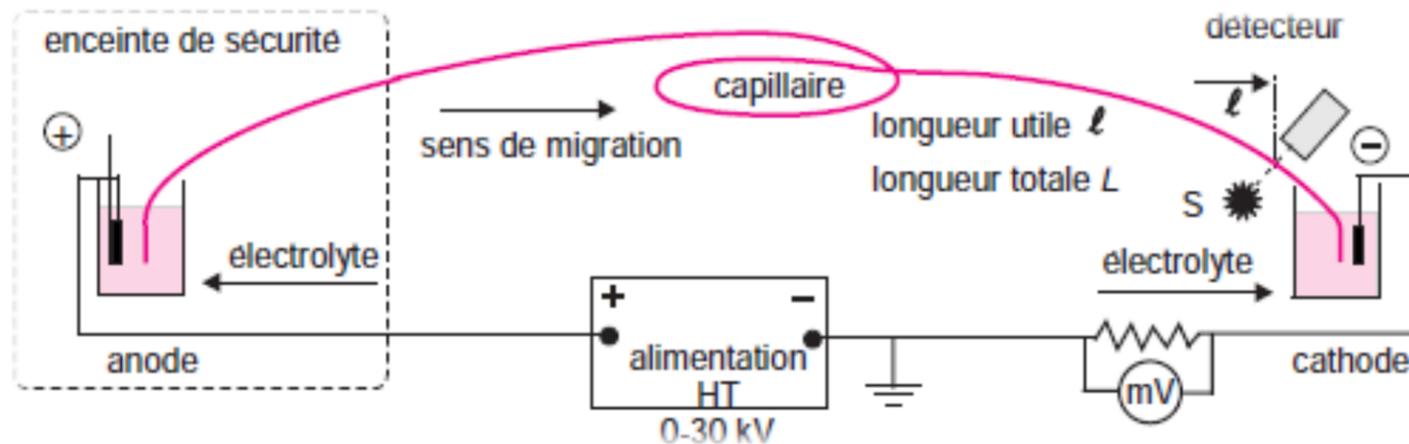
Le dispositif utilisé pour réaliser l'électrophorèse du mélange M est représenté ci-après.



- ❖ L'échantillon est déposé sous forme d'un petit trait transversal sur la bandelette. Les espèces hydratées présentes migrent en un temps très variable, vers l'une ou l'autre des extrémités de la bandelette. Chaque composé se différencie par sa mobilité.

VI-3-Électrophorèse capillaire:

- ❖ En électrophorèse capillaire, le support plan de la technique classique est remplacé par un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice de très faible diamètre (15 à 150 μm). Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 20 et 80 cm, est rempli d'un électrolyte tampon.



- ❖ Pour limiter l'échauffement du capillaire il est préférable de le placer dans une enceinte thermostatée
- ❖ Un détecteur est placé à la distance de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'**électrophorégramme** qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon.

VI-4-Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique:

- ❖ En électrophorèse, les constituants d'un mélange se séparent dans le temps par effet de deux facteurs principaux appelés mobilité électrophorétique et flux ou écoulement électroosmotique

VI-4-1-Mobilité électrophorétique:

- ❖ Tout composé porteur d'une charge électrique se déplace dans l'électrolyte à une vitesse v_{EP} qui dépend des conditions de l'expérience et de sa mobilité électrophorétique propre μ_{EP} . Ce paramètre est défini à partir de la vitesse de migration électrophorétique du composé et du champ électrique E :

$$\mu_{EP} = \frac{v_{EP}}{E} = v_{EP} \times \frac{L}{V}$$

- ❖ L désigne la longueur totale du capillaire et V la ddp appliquée à ses extrémités. On affecte à la mobilité électrophorétique un signe (+ ou -) selon la nature cationique ou anionique de l'espèce ; μ_{EP} ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est nulle pour une espèce globalement neutre, v_{EP} du composé dans un champ E
- ❖ Le nombre de plateaux théoriques N dans une colonne d'électrophorèse capillaire est donné par la relation :

$$N = \frac{\mu_{EP} \times V}{2D} \text{ avec } D \text{ est le coefficient de diffusion du soluté (cm}^2/\text{s)}$$

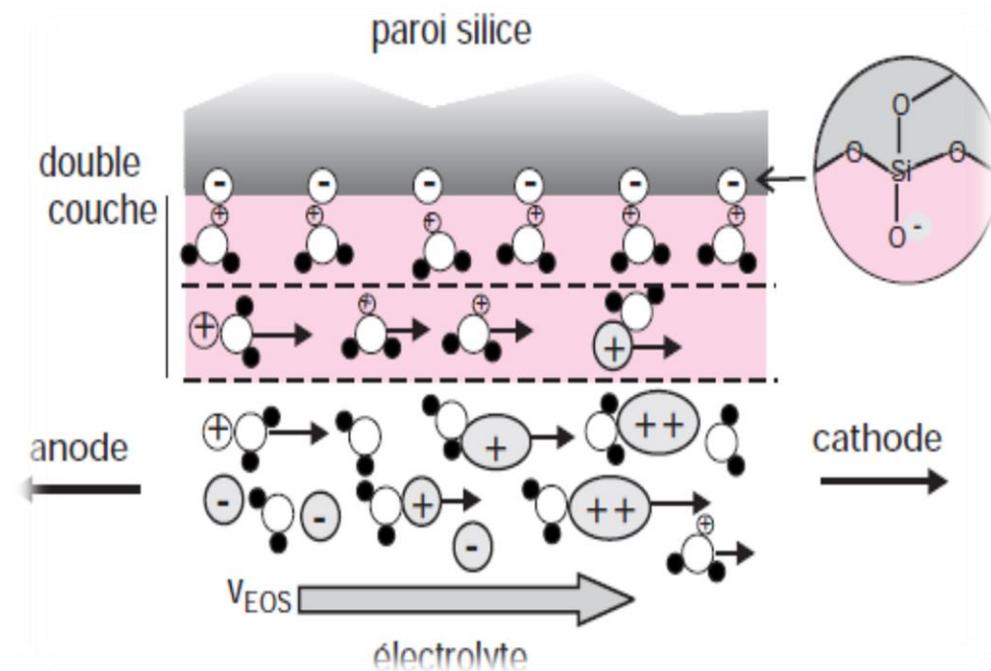
VI-4-Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique:

VI-4-2-Flux électro-osmotique:

- ❖ Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte appelé *flux électro-osmotique* caractérisé par sa *mobilité électro-osmotique*, μ_{EOS} . On définit μ_{EOS} par la relation suivante:

$$\mu_{EOS} = \frac{v_{EOS}}{E} = v_{EOS} \times \frac{L}{V}$$

- ❖ Un capillaire de verre de silice comporte en surface de nombreux groupements silanols (Si-OH) qui sont ionisés en silanoates (Si-O⁻) si le pH de l'électrolyte est supérieur à 3. Ces sites anioniques fixes attirent des cations présents dans la solution et les ordonnent en deux couches dont l'une est collée à la paroi et l'autre peu mobile. Entre ces deux couches naît une différence de potentiel, dont la valeur dépend de la concentration de l'électrolyte et du pH. le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Ces ions étant solvatés par des molécules d'eau, il apparaît un flux d'électrolyte qui se dirige dans le même sens



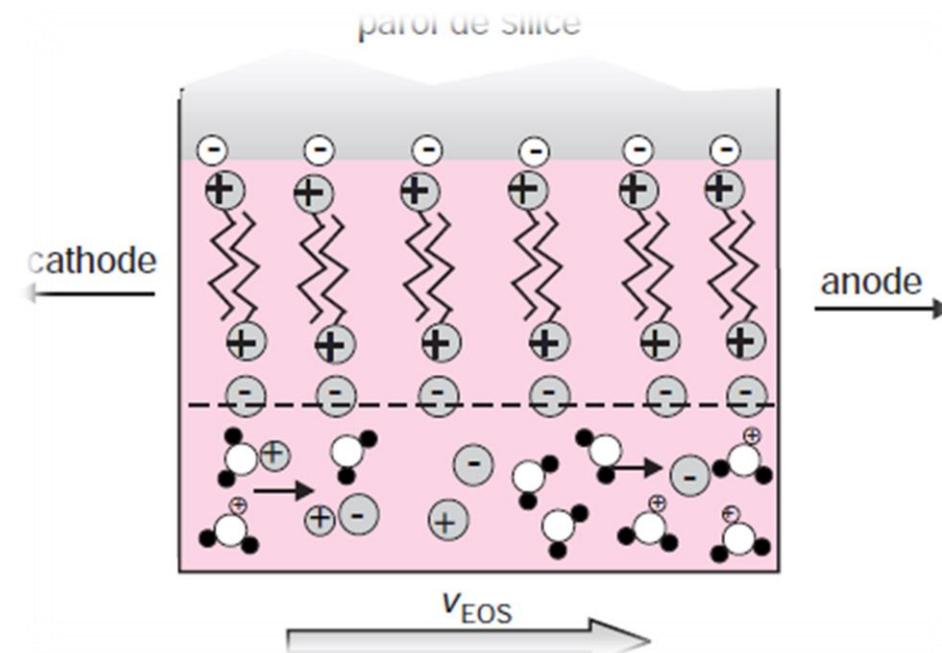
VI-4-Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique:

VI-4-2-Flux électro-osmotique:

❖ Pour calculer μ_{EOS} on doit déterminer v_{EOS} . Celle-ci correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge globale. On y accède à partir du temps de migration t_{mn} que met un *marqueur neutre* à usage de traceur pour parcourir la distance effective du capillaire, $v_{EOS} = \frac{\ell}{t_{mn}}$. On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (ex. acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique).

➤ Remarque:

❖ En règle générale, une surface négative provoque un flux électro-osmotique dirigé vers la cathode. En revanche si on ajoute un surfactant, tel un tétra alkyl ammonium, pour inverser la polarité de la paroi, le flux électro-osmotique se dirige vers l'anode



VI-4-Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique:

❖ En fonction de ce qui précède, chaque ion a donc une vitesse apparente de migration v_{app} qui dépend de la vitesse électrophorétique et de la vitesse du flux électro-osmotique :

$$v_{app} = v_{EP} + v_{EOS}$$

❖ v_{app} est aisément calculable à partir de l'électrophorégramme à partir de ℓ , longueur utile du capillaire entre les points d'injection et de détection et de t_m , son temps de migration. v_{app} est donnée par la relation :

$$v_{app} = \frac{\ell}{t_m}$$

❖ La mobilité électrophorétique apparente μ_{app} , définie par la relation suivante : $\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = v_{app} \times \frac{L}{V}$

par conséquent on a: $\mu_{app} = \frac{\ell}{t_m} \times \frac{L}{V}$

❖ En combinant le flux électro-osmotique de l'électrolyte μ_{EOS} et la mobilité apparente μ_{app} il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique μ_{EP} selon la relation suivante:

$$\mu_{EP} = \mu_{app} - \mu_{EOS} \quad \text{soit} \quad \mu_{EP} = \frac{L \times \ell}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{mn}} \right)$$

VI-5-Instrumentation:

❖ Pour introduire un micro volume d'échantillon, qui ne doit pas dépasser 1 % de la longueur utile du capillaire ℓ , deux procédés sont utilisés :

a. L'injection hydrostatique:

❖ Elle consiste à plonger l'extrémité du capillaire dans l'échantillon en solution (également un électrolyte) et à provoquer une aspiration à l'autre extrémité

b. L'injection par électromigration:

❖ Elle consiste à immerger pendant un certain temps l'extrémité du capillaire dans l'échantillon porté à un potentiel (50 mV/cm) dont on choisit la polarité par rapport à l'autre extrémité.

c. Modes de détection:

❖ Afin de déterminer les différents solutés plusieurs modes de détection existes:

- ✓ Détection **UV/VIS**.
- ✓ Détection par **fluorescence**.
- ✓ Détection **électrochimique**.
- ✓ Détection par **spectrométrie de masse**.

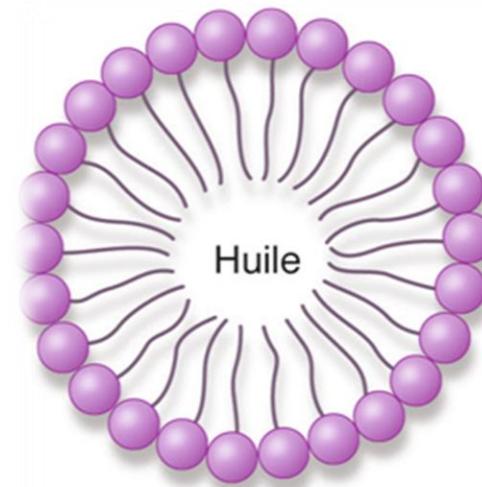
VI-6-Techniques électrophorétiques:

VI-6-1-Électrophorèse capillaire de zone:

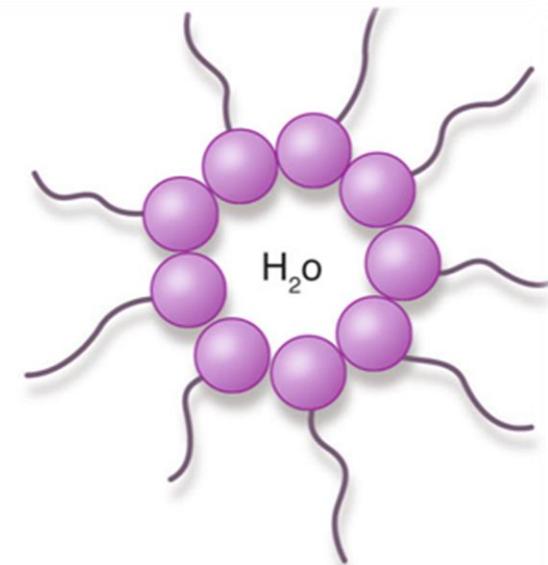
❖ C'est le procédé d'électrophorèse le plus courant. Le capillaire est parcouru par l'électrolyte constitué soit par un milieu tampon qui, selon l'application, est acide (phosphate ou citrate) ou basique (borate), soit par un ampholyte (molécule possédant une fonction acide et une fonction basique).

VI-6-2-Électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire:

❖ Dans cette variante au procédé de base décrit précédemment, on ajoute dans la phase mobile un composé cationique ou anionique, tel le dodécylsulfate de sodium, pour former **des micelles** dont le caractère ionique les rend porteuses de charges. Ces microgouttelettes, qui ne sont pas miscibles à la solution, emprisonnent les composés neutres, plus ou moins efficacement, par affinité du type **hydrophile/hydrophobe**



Micelle
10-50 nm



Micelle inversée

VI-6-Techniques électrophorétiques:

VI-6-3-Électrophorèse capillaire sur gel:

- ❖ C'est la transposition de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou d'agarose. Le capillaire est rempli avec un électrolyte contenant un gel. Celui-ci produit un effet de filtration qui ralentit les grosses molécules et qui minimise les phénomènes de convection ou de diffusion. Les oligonucléotides, peu fragiles, peuvent être ainsi séparés

VI-6-4-Électrophorèse à focalisation isoélectrique:

- ❖ Cette technique également connue en électrophorèse sur support, consiste à créer un gradient de pH linéaire dans un capillaire à paroi traitée contenant un ampholyte. Le capillaire plonge dans H_3PO_4 à l'anode et dans NaOH à la cathode. Chaque composé migre et se focalise au pH qui a même valeur que son potentiel isoélectrique (pI). Ensuite, sous l'effet d'une pression hydrostatique et en maintenant le champ électrique, on déplace les espèces séparées vers le détecteur. Les résolutions élevées obtenues avec ce procédé, permettent notamment de séparer des peptides dont les pI ne diffèrent que de 0,02 unité pH.

Références

