

L'ELECTROPHORESE
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

PAR : S. DOULBEAU

Antenne ORSTOM auprès du CEA
CEN de Cadarache

Travail réalisé dans le cadre
de la préparation du diplôme
du Conservatoire National des
Arts et Métiers

CENTRE REGIONAL ASSOCIE AU
CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
D'AIX EN PROVENCE

PREPARATION A L'ORAL PROBATOIRE

SPECIALITE ELECTROCHIMIE

L' E L E C T R O P H O R E S E

Présenté par Sylvie DOULBEAU le 31 mars 1984

Professeur : M. Jean GALEA

I - INTRODUCTION	1
II - DEFINITION	2
III - CONCEPT DE MOBILITE	3
1 - Généralités	3
2 - Théorie	3
a) modèle choisi pour représenter la particule migrante	3
b) rappels généraux sur l'électricité	4
c) bilan des forces agissant sur la particule chargée	7
d) fonction de distribution du potentiel	8
e) notion de double couche	10
e) définition des mobilités effectives	13
3 - Paramètres influant sur la mobilité	15
a) paramètres extérieurs	15
b) paramètres relatifs au solvant	15
c) paramètres relatifs au soluté	16
IV - QUELQUES RAPPELS SUR :	
1 - Les protéines	17
a) généralités	17
b) propriétés acido-basiques	18
c) les protéines - les peptides	21
2 - Les colloïdes	22
a) généralités	22
b) caractères électriques	24
3 - L'électroosmose	25
a) mise en évidence expérimentale	25
b) interprétation	25
4 - Dialyse	27
a) la dialyse	
b) l'électrodialyse	
V - APPLICATION DU PHENOMENE D'ELECTROPHORESE : DIFFERENTES METHODES EXPERIMENTALES ET ANALYTIQUES.	
1 - Classification des différentes méthodes	28
a) électrophorèse de zone	
- électrophorèse libre	
- électrophorèse sur support	
b) électrofocalisation	
2 - Objectifs de l'analyse électrophorétique	30
a) méthode préparative	
b) méthode analytique	
3 - Généralités sur les expérimentations d'électrophorèse	31

A) ELECTROPHORESE DE ZONE

1 - Electrophorèse libre

a) Electrophorèse à frontière mobile	35
a - 1 : Généralités	
a - 2 : Description de l'appareillage et mise en œuvre	
a - 3 : Principe	38
a - 4 : Applications	41
a - 5 : En conclusion	45
b) Isotachophorèse	47
b - 1 : Principe	
b - 2 : Dispositif expérimental	49
b - 3 : Applications, conclusions	

2 - Electrophorèse dans des milieux anti-convection

52

Généralités	
Principe	
Avantages et inconvénients	54
Appareillages	60
Séparation à deux dimensions	61
Choix du support	63

Premier groupe de support

a) Electrophorèse sur papier	63
a - 1 : Appareillages, mode opératoire	
a - 2 : Avantages et inconvénients	70
a - 3 : Conclusions	
b) Electrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose	71
b - 1 : Appareillage	
b - 2 : Avantages et inconvénients	72
b - 3 : Conclusion	73

Deuxième groupe de support

a) Analyse immuno-électrophorétique	74
a - 1 : Généralités	
a - 2 : Principe	
a - 3 : Exemple	75
a - 4 : Conclusion	
b) Electrophorèse sur gel d'amidon	76
b - 1 : Mise en œuvre	
b - 2 : Conclusion	77
c) Electrophorèse sur gel de polyacrilamide	77
c - 1 : Généralités	
c - 2 : Mise en œuvre	
c - 3 : Avantages	79
c - 4 : Conclusion	80

B) ELECTROFOCALISATION

1 - Généralités	81
2 - Principe	
3 - Réalisation pratique	83
4 - Conclusion	84

VI - ELECTROPHORESE PREPARATIVE		
1 - Généralités	84
2 - Electrophorèse de zone	85
a) régime continu		
b) régime discontinu		
c) conclusions		
3 - Electrofocalisation	88
a) régime continu		
b) régime discontinu		
4 - Electrodécantation : principe	89
5 - Electroconvection : principe	90
VII - CONCLUSION	93
VIII - BIBLIOGRAPHIE	95

i - INTRODUCTION

Des particules chargées, placées dans un champ électrique, vont migrer sous l'influence de ce dernier. Ce phénomène de migration, en solution, est connu depuis le milieu du XIX^{ème} siècle. FIELD et TEAGUE, en 1907 ont isolé la toxine et l'antitoxine diphtériques en mettant à profit la différence de leur vitesse de migration sous l'influence d'un champ électrique. L'utilisation de ce phénomène de transport électrocinétique, à des fins analytiques, date de 1935. TISELUS en précise les conditions opératoires en séparant les constituants du sérum en quatre fractions par la méthode des déplacements de frontières détectées par des méthodes de réfraction.

D'une mise en œuvre très délicate à ces débuts, la technique d'électrophorèse est maintenant très utilisée, en particulier pour l'analyse de mélanges biologiques. Elle est appliquée à des électrolytes très divers (colloïdes, anions et cations minéraux ou organiques) et les techniques de séparation par électrophorèse sont devenues très nombreuses.

Le développement de cette technique a permis d'obtenir, pour l'étude des composés macromoléculaires, des avantages comparables à ceux obtenus, pour les particules de faible poids moléculaire, par les méthodes de chromatographie.

L'intérêt de l'électrophorèse, hormis son étude théorique, réside dans le fait qu'elle a permis la découverte et l'identification de nombreux tissus animaux et végétaux. L'application analytique principale est l'étude des sérums pathologiques.

II - DEFINITION

A l'origine le terme "électrophorèse" désignait uniquement la migration des particules colloïdales chargées sous l'influence d'un champ électrique continu (MICHAELIS 1909) ; l'anophorèse étant la migration des colloïdes négatifs et la cataphorèse celle des colloïdes positifs. Dans les ouvrages les plus anciens, une distinction est faite quant à la nature de la particule qui se déplace, et, pour tout autre élément qu'un colloïde, on parle "d'ionophorèse".

Actuellement, que les particules chargées soient :

- des macromolécules (pour lesquelles la frontière avec les colloïdes est parfois difficile à définir)

- des petits ions : que certains appareils d'électrophorèse permettent maintenant d'analyser (petits ions minéraux, ions provenant de l'ionisation d'acides aminés etc...)

- des gouttelettes ou des bulles en suspension.

on désigne, de façon générale, la migration de toute espèce ionisée dans un solvant par le terme d'électrophorèse.

Il faut cependant prendre garde au fait qu'à ce terme d'électrophorèse il est toujours associée l'idée de séparation qui doit s'effectuer au sein du solvant indépendamment des réactions électrochimiques ayant lieu aux électrodes. Ainsi, l'électrodéposition faisant intervenir les réactions d'électrodes n'est pas à proprement parlé une méthode électrophorétique.

L'électrophorèse consiste en fait en une migration d'ions et conduit à la détermination d'une grandeur en tous points semblable à la mobilité ionique que l'on détermine pour des solutions vraies.

III - CONCEPT DE MOBILITE

1 - Généralités :

Le concept de mobilité joue un rôle très important dans les diverses techniques électrophorétiques puisque c'est la différence des mobilités effectives des espèces ioniques présentes qui va leur permettre d'être séparées au sein de la solution.

De nombreuses théories mathématiques de l'électrophorèse sont proposées par différents auteurs. Nous ne les envisagerons pas ici et nous nous contenterons d'établir, aussi simplement que possible, les équations nécessaires à la compréhension du phénomène.

Après quelques rappels généraux sur le champ électrique et les lois de l'électrocinétique, nous ferons l'inventaire des forces qui agissent sur l'ion puis, nous dégagerons les paramètres qui influent sur sa mobilité.

2 - Théorie :

a) modèle choisi pour représenté la particule chargée

Nous ferons l'hypothèse qu'il s'agit d'une sphère

- de rayon r
- de charge électrique Q répartie uniformément
- $\Psi(x)$ sera le potentiel en un point situé à une

distance x à l'extérieur de la sphère.

Cette sphère étant plongée dans un liquide

- incompressible
- de constante diélectrique ϵ (Farad . cm⁻¹)
- de viscosité η (Poise)
- la densité de charges dans le liquide au contact

de la sphère étant ρ .

b) rappels généraux sur l'électricité

Le phénomène d'électrisation libère à la surface des particules des charges électriques ; ce n'est qu'une répartition nouvelle des charges préexistantes et il y a obligatoirement conservation de l'électricité. Les seules charges mobiles sont les électrons ainsi : un défaut d'électrons sera interprété comme une charge positive et un excès, comme une charge négative. L'unité de mesure de charges étant le Coulomb.

Loi de Coulomb : Deux masses électriques ponctuelles placées dans le vide exercent l'une sur l'autre une force proportionnelle aux deux charges et inversement proportionnelle au carré de la distance qui les sépare.

$$f = k_0 \frac{q q'}{r^2}$$

avec : q et q' exprimés en Coulomb

f en: Newton

r en mètres

k₀ dans le vide vaut $\frac{1}{4 \pi \epsilon_0}$ avec $\epsilon_0 = \frac{1}{36 \pi 10^9}$ K₀ = 9 10⁹

Champ électrique : Etat d'un espace tel qu'en chacun de ces points toute charge électrique soit soumise à une force.

$$E = k_0 \frac{q}{r^2}$$

Champ E créé par une charge q à une distance r. La loi de Coulomb peut aussi s'écrire :

$$f = E q'$$

Potentiel électrique:

$V = k_0 \frac{q}{r}$ est la fonction potentiel, ou potentiel à la distance r.

Lois essentielles de l'électrocinétique :

L'électrophorèse se déroulant dans un conducteur, ces lois rendront compte des contraintes dues au courant électrique.

Si l'on réunit deux corps A et B de potentiels différents par un conducteur, leurs potentiels vont devenir égaux par suite du passage de charges électriques d'un corps à l'autre. Par convention, il s'agit du passage de charges positives du corps de potentiel le plus élevé vers le potentiel le plus faible.

L'intensité sera par définition : $i = \frac{dq}{dt}$

Un générateur sera un appareil dont la fonction sera de maintenir la différence de potentiel initiale, il y aura ainsi circulation de courant permanente dans le système.

La loi d'ohm relie l'intensité et le potentiel

$$i = y (V_A - V_B) \quad \text{ou} \quad V_A - V_B = R i$$

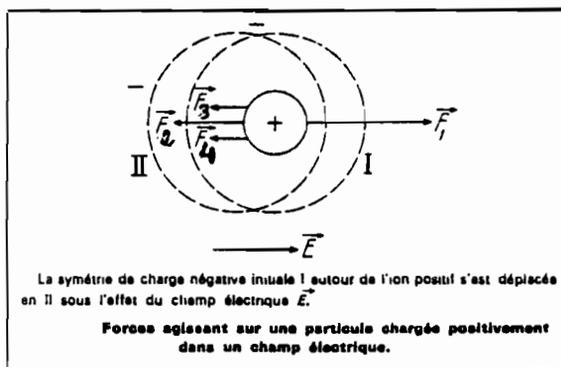
y est la conductivité du conducteur AB. R sa résistance.

Si une quantité d'électricité Q passe d'un point de potentiel V_A à un point de potentiel V_B , l'énergie électrique $W = Q (V_A - V_B)$ est dissipée dans le conducteur.

D'après la loi de Joule, cette énergie se transforme intégralement en chaleur. La loi de Joule s'écrit :

$$q = R i^2 t$$

Dans un conducteur constitué par exemple par un gel, il faudra vérifier l'intensité du courant pour éviter tout échauffement du gel.



(SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

Figure 1

c) bilan des forces agissant sur la particule chargée

Si l'on applique un champ électrique \vec{E} à une solution d'électrolyte, les particules chargées vont se déplacer et atteindre une vitesse limite \vec{v} dans la direction du champ, constante dans le temps. A ce stade, quatre forces différentes agissent sur la particule :

- Une force F1 exercée par le champ électrique E sur la charge de la sphère

$$\vec{F1} = Q \vec{E}$$

- Une force F2, de friction, due au frottement rencontré lors du déplacement dans le liquide ; elle nous est donnée par la loi de Stokes qui, pour un ion sphérique s'écrit :

$$\vec{F2} = -6\pi\eta r \vec{v} = -f_c \vec{v} \quad (f_c, \text{facteur de friction})^*$$

- Les forces F3 et F4 sont dues à la présence d'une atmosphère ionique autour de l'ion, formée de particules de charge opposée, à celle de l'ion.

La force F3 : de retard électrophorétique, est due au fait que les ions de l'atmosphère ionique se déplacent dans une direction opposée à celle de la particule centrale dans le champ électrique.

Ces ions adsorbés vont être entraînés avec eux des molécules de solvant qui vont freiner la progression de l'ion central en créant un contre-courant. Cet effet de freinage est fonction de la concentration de l'électrolyte et tend à s'annuler lorsque la dilution devient infinie.

La force F4 : de relaxation, est due au fait que l'atmosphère ionique, distribuée symétriquement autour de l'ion lorsqu'il est au repos et de ce fait n'exerçant aucune force sur lui, lorsque la particule est en mouvement, se déplace en sens inverse. De ce fait, il n'y a plus symétrie et le centre des charges de l'atmosphère ne coïncide plus avec celui de la particule centrale et exerce ainsi une force coulombienne sur cette dernière qui va venir s'ajouter à la force F3.

A l'état stationnaire, la somme de ces quatre forces est nulle, et l'on a la relation :

$$q\vec{E} - f_c\vec{v} + \vec{F3} + \vec{F4} = 0$$

* Lorsque les particules ne sont pas sphériques, f_c est proportionnel à η mais un facteur de correction doit être introduit pour tenir compte de la forme, la taille et l'orientation de la particule.

La vitesse électrophorétique \vec{v} se met sous la forme :

$$\vec{v} = \frac{Q\vec{E} + \vec{F}_3 + \vec{F}_4}{6\pi\eta r}$$

Cette relation nous permet de comprendre l'influence de la force de retard électrophorétique, de la relaxation, la forme, la taille, l'orientation de la particule (si le modèle choisi n'est pas sphérique), et l'influence du solvant sur la vitesse de migration électrophorétique.

Pour calculer \vec{v} , il nous faudra donc connaître : Q , F_3 et F_4 .

Dans des théories simplifiées, on rencontre souvent la relation suivante :

$$\vec{v} = \frac{Q\vec{E}}{6\pi\eta r}$$

qui négligent \vec{F}_3 et \vec{F}_4 .

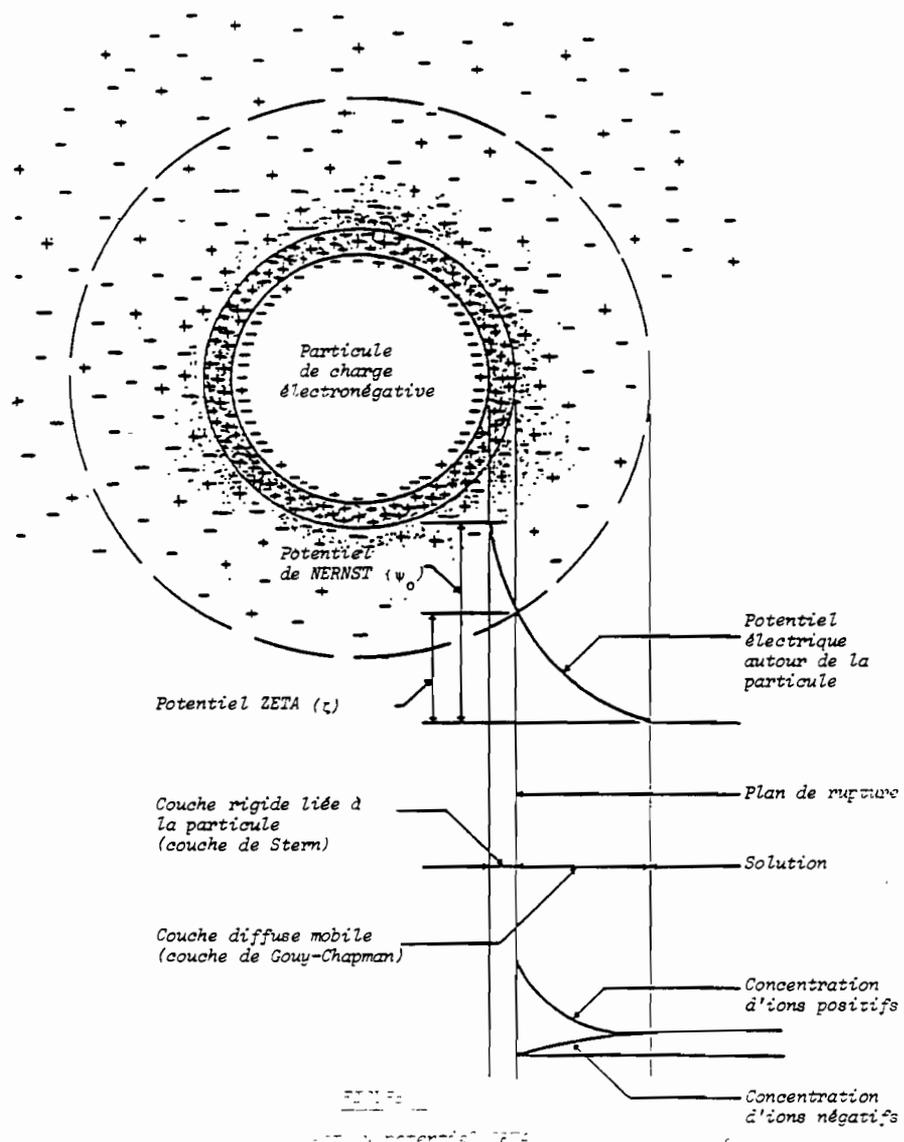
La théorie de DEBYE et HUCKEL, lorsqu'elle est étendue des solutions vraies aux solutions colloïdales, néglige la force de relaxation. Les forces de retard électrophorétique, sont déterminées en faisant appel à des notions de distribution spatiale des ions adsorbées autour de la particule centrale et à des notions de distribution de potentiel.

d) fonction de distribution des ions autour d'une particule : notion de double couche.

Si une particule non chargée est introduite dans une solution d'électrolyte, elle est susceptible d'acquérir une certaine charge superficielle. Cette charge peut avoir pour origine différents phénomènes :

- adsorption à la surface de la particule d'une partie des ions contenus dans l'électrolyte.
- dissolution d'ions de la particule solide.
- ionisation de molécules à la surface de la particule.

Les ions de l'électrolyte dont la charge est opposée à celle acquise par la particule vont être attirés tandis que ceux portant une charge de même signe seront repoussés.



(LUSETTI G., 1983)

Figure 2

Il y a ainsi formation d'une double couche dans la phase liquide qui entoure immédiatement l'ion.

La couche interne est localisée en surface (couche de STERN)

La couche externe, partie diffuse de la double couche, forme une charge spatiale qui peut atteindre quelques angströms du fait du mouvement brownien.

Puisque la particule est liée à des ions adsorbés, l'entité mobile susceptible de ce déplacer aura une dimension supérieure à celle de l'ion, nous appellerons R son rayon (supérieur au rayon r de la particule initiale).

La concentration en ions autour de la particule est représentée au bas de la figure 2 en fonction de la distance à la particule.

Ce modèle de représentation d'un ion est dû à STERN, et si on lui adjoint la fonction de distribution du potentiel, c'est celui qui donne les résultats les plus proches de ceux obtenus de façon expérimentale.

e) fonction de distribution du potentiel (GOUY et CHAPMAN).

La figure 2 représente les variations du potentiel en fonction de l'éloignement de la particule en accord avec la théorie de la double couche.

Le potentiel à la surface de la particule migrante ne sera plus $\psi(r)$ mais $\psi(R)$ et, comme il est facile de le constater sur le graphique, lui inférieur. Le potentiel $\psi(R)$ correspond à la tension électrocinétique ou potentiel Zéta il est noté ζ . Il est possible de faire une analogie entre cette tension ζ et la tension superficielle ou interfaciale existant dans un liquide. On appellera plan de glissement, la plan situé à la distance R du centre de la particule. Certaines méthodes expérimentales permettent la détermination de ce potentiel (LUSSETTI). Il revêt une grande importance lorsque l'on souhaite étudier la stabilité de suspensions colloïdales puisqu'il gère toutes les interactions électrostatiques entre les particules.

Le potentiel électrique de surface $\Psi(r)$ dans un milieu isolant de constante diélectrique ϵ d'une particule au repos de rayon r est lié à la charge de la particule par la relation :

$$\Psi(r) = \frac{Q(r)}{\epsilon \cdot r} \quad (e_1)$$

Si l'on porte cette relation dans la formule simplifiée nous donnant la vitesse de migration d'une particule (en négligeant F3 et F4) et si le rayon de la particule est pris égal à R , nous obtenons la relation :

$$\vec{v} = \frac{\Psi(R) \epsilon \vec{E}}{6 \pi \eta} = \frac{\zeta \epsilon \vec{E}}{6 \pi \eta} \quad (e_2)$$

Cette relation permet de calculer ζ à partir de la vitesse de migration de petites particules sphériques dans un champ électrique.

Dans le cas de particules de dimensions supérieures et/ou de forme non sphérique ; le calcul devient plus complexe : il faut faire intervenir un facteur de correction.

La fonction de distribution du potentiel peut se mettre sous la forme (GOUY et CHAPMAN)

$$\Psi(x) = \Psi(r) \exp(-Kx) \quad (e_3)$$

$\Psi(r)$: potentiel à la surface de la sphère

K : paramètre de DEBYE-HUCKEL

avec :

f_i : force ionique de la solution

$$f_i = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{i=n} C_i z_i^2 \quad (C_i : \text{concentration des ions})$$

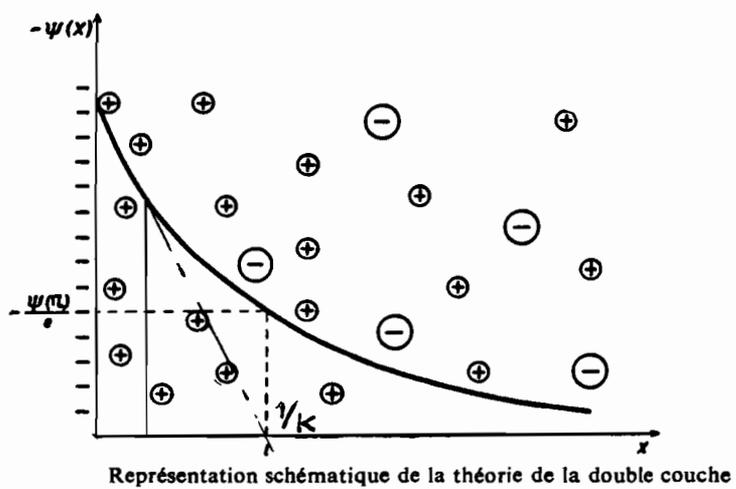
e : charge élémentaire d'électricité (en Coulomb)

ϵ : constante diélectrique du milieu ($\text{Farad} \cdot \text{cm}^{-1}$)

k : constante de Boltzmann ($8,32 \text{ J} \cdot \text{mole}^{-1}$)

T : température en $^{\circ}\text{K}$

$$K = \left(\frac{8 \pi e^2 \cdot f_i}{\epsilon k T} \right)^{1/2}$$



(MILAZZO G., 1969)

Figure 3

Dans la réalité, la particule se trouve dans un milieu non isolant (électrolyte). $Q(R)$: qui est la charge électrocinétique, et $\Psi(R)$ peuvent être reliés par la relation :

$$Q(R) = \varepsilon \Psi(R) R (1 + KR) \quad (e_4)$$

La relation (e₂) peut donc se mettre sous la forme :

$$\vec{v} = \frac{Q(R)}{(1 + KR) 6 \pi \eta R} \vec{E} \quad (e_5)$$

$1/K$: étant l'épaisseur de la couche diffuse. Elle est définie comme étant "la distance l de la surface de la particule de potentiel $\Psi(R)$ à une surface parallèle(x), dont le potentiel $\Psi(x)$ est $\Psi(R)/e$; e étant la base des logarithmes népériens ; $e = 2,7$."

Les relations (e₂) et (e₅) deviennent égales lorsque le produit KR devient voisin de zéro.

Nous avons tout au long de ce raisonnement conservée l'hypothèse d'une particule sphérique. Bien d'autres modèles existent, plus complexes, pour relier la charge à la vitesse de migration, mais ils rendent compte du même phénomène.

f) mobilité effective :

Par définition, la mobilité est la vitesse moyenne atteinte par un ion, lorsqu'il est soumis à un champ électrique de 1V par cm. On la désigne par μ^+ lorsqu'il s'agit d'un cation et par μ^- si la particule migrante est un anion.

La mobilité ionique absolue est elle aussi la vitesse limite atteinte par une particule chargée soumise à un champ électrique de 1V par cm mais à dilution infinie. C'est une constante caractéristique de chaque espèce ionique, pour un solvant donné. Elle est proportionnelle à la conductance équivalente limite et vaut :

$$\Lambda_0 = \lambda_0^+ + \lambda_0^- = (\mu_0^+ + \mu_0^-) F$$

La mobilité effective dépend de nombreux facteurs.

En pratique, il est très rare de travailler à dilution infinie et l'influence des autres espèces présentes ne peut être négligée. Des corrections doivent être effectuées pour tenir compte de phénomènes tels que le retard électrophorétique et l'effet de relaxation, d'autres auteurs proposent de tenir compte des interactions ion-ion ainsi que de l'effet d'une dissociation partielle. TISELIUS considérait que la mobilité effective était la somme de tous les produits des degrés de dissociation et des mobilités ioniques :

$$\mu_{eff} = \sum_i d_i \mu_i$$

où : μ_{eff} est la mobilité effective
 d_i est le degré de dissociation
 μ_i est la mobilité ionique.

En résumé, il est possible de constater que la mobilité effective d'une espèce ionique donnée dépend de nombreux facteurs tels que : la taille de l'ion, la solvation, la constante diélectrique et la viscosité du solvant, la forme, la charge de l'ion, le pH, le degré de dissociation et la température. Il est très difficile de trouver une expression mathématique rendant compte de tous ces phénomènes. Lorsque nous parlerons de mobilité effective, nous utiliserons l'expression :

$$\mu_{eff} = \sum_i d_i \gamma_i \mu_i$$

où : γ_i est un facteur de correction rendant compte de la relaxation et du retard électrophorétique.

La mobilité effective et la vitesse de migration sont liées par la relation :

$$\vec{v}_i = \mu_{i,eff} \vec{E}$$

qui rend compte du déplacement de l'espèce ionique "i" sous l'influence du champ électrique \vec{E} .

Les mobilités électrophorétiques sont du même ordre de grandeur que les mobilités ioniques. Elles sont comprises entre $2 \cdot 10^{-4}$ et $20 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s.V}$.

3 - Paramètres influant sur la mobilité

a) Paramètres extérieurs

- Le champ électrique : c'est le paramètre essentiel, il sera créé par une différence de potentiel appliquée aux bornes de la cellule d'électrophorèse.
- L'intensité du courant électrique continu : le déplacement d'une particule chargée croît avec l'intensité du courant. L'utilisation de cet effet est limitée par des considérations d'ordre pratique en particulier l'effet Joule doit être combattu par un refroidissement très efficace de la cellule d'électrophorèse si l'intensité du courant à utiliser est élevée.
- La température : la conductivité du solvant croît avec la température, il faudra donc la maintenir constante tout au long de l'expérimentation. Elle joue également un rôle sur la viscosité du solvant. Cet effet est dû principalement au passage du courant et si cela est possible, il faudra travailler à des intensités faibles (quelques milliampères). Il peut également y avoir évaporation du solvant, ce qui augmente encore la conductivité.
- Le temps : à l'état stationnaire, lors d'une manipulation d'électrophorèse, la particule se déplace à vitesse constante. Plus le temps de manipulation sera grand, et plus le déplacement sera grand. Cette durée est cependant limitée par des facteurs tels que la diffusion des substances étudiées sur le support, la dégradation des produits ...

b) paramètres relatifs au solvant

- La constante diélectrique du milieu : elle influe sur la valeur des forces électrostatiques. La mobilité croît avec ϵ .
- La viscosité : elle a une influence moins importante. Plus sa valeur est faible et plus la vitesse de migration est importante, en contre partie, apparaissent des courants de convection.
- La force ionique : elle fixe la densité de charge autour de l'ion. Le déplacement d'une particule augmente lorsque la force ionique diminue. En fait, elle est inversement proportionnelle à la conductivité du solvant utilisé, et donc proportionnelle à sa résistance. Les forces ioniques des tampons que l'on a l'habitude d'utiliser en électrophorèse, varient entre 0,05 et 0,10.

- Le pH : il joue un rôle très important spécialement lorsque les substances que l'on désire séparer sont amphotères. Pour les protéines par exemple qui, comme nous le verrons au chapitre suivant, ont, suivant le pH du milieu une résultante de charges positives ou négatives. De plus, pour un certain pH, elles deviennent neutres et de ce fait, ne migrent plus sous l'influence d'un champ électrique (cette propriété est mise à profit dans une des techniques d'électrophorèse).

- La nature des ions composant le solvant : elle joue un rôle important pour les protéines et les colloïdes car elle peut modifier la charge globale de ces particules et dans certaines conditions, entraîner une floculation.

c) paramètres relatifs au soluté :

- La charge Q : très liée comme nous venons de le voir au milieu dans lequel se trouve la particule.

- La forme et la taille des ions : ont un rôle important principalement si l'on couple l'électrophorèse à d'autres méthodes analytiques ; filtration sur un support à gradient de porosité par exemple. Dans certaines techniques électrophorétiques, ce sont ces paramètres qui guideront le choix du support de migration.

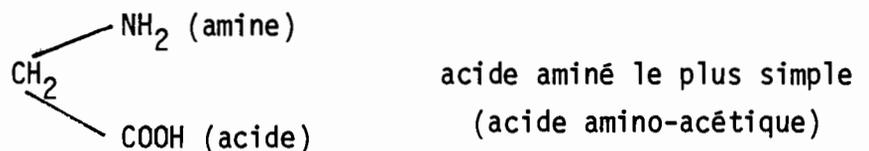
IV - QUELQUES RAPPELS SUR

1 - LES PROTEINES

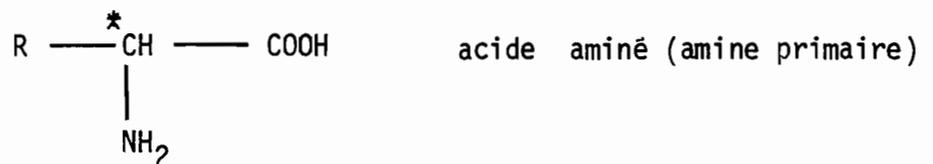
a) Généralités

Les protéines sont indispensables au maintien des activités de la vie et beaucoup de fonctions biologiques dépendent d'elles. Toutes les enzymes qui régissent les réactions du métabolisme et la plupart des hormones qui régularisent des processus métaboliques sont des protéines. Dans l'organisation moléculaire et structurale de la cellule, les protéines seront donc les substances les plus importantes.

Elles résultent de la condensation d'un grand nombre d'acides aminés. Un acide aminé est un composé dont la molécule comporte une fonction amine et une fonction acide carboxylique.



Les acides aminés jouant un rôle fondamental dans la constitution des tissus vivants dérivent de celui-ci par substitution d'un radical R à l'un des H du groupement CH_2 . (Le radical R peut représenter des fonctions chimiques très variées : alcool, acide, amine, phénol, ...)



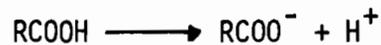
Remarques: Si la structure comprend deux fonctions amine et une fonction acide, l'acide aminé sera dit "basique", si par contre, elle comprend une fonction amine et deux fonctions acide, l'acide aminé sera dit "acide".

Les acides aminés possèdent un certain nombre de propriétés communes ; la nature du radical R leur donnera un assez grand nombre de propriétés secondaires associées.

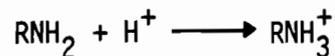
b) Propriétés acido-basiques :

La présence dans la structure de leur molécule d'une fonction acide et d'une fonction basique détermine la propriété la plus importante des acides aminés, leur caractère amphotère.

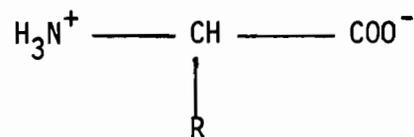
En milieu aqueux, la fonction acide est dissociée



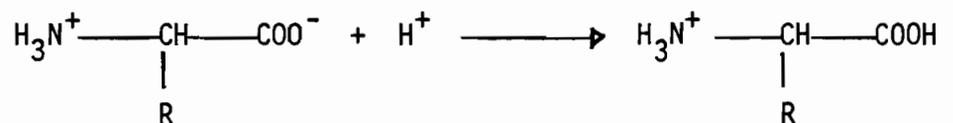
Les ions H^+ sont libérés par le groupe carboxyle puis, captés par le groupe aminé



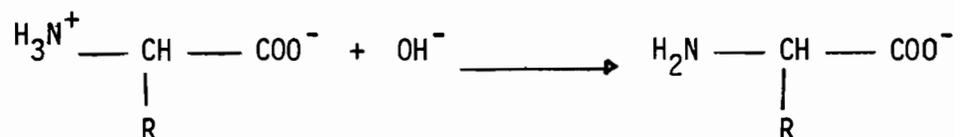
L'acide aminé se trouvera sous la forme d'un ion dipolaire, résultant du transfert de H^+ entre les deux fonctions, soit une sorte de "neutralisation interne". Cet ion dipolaire est appelé "zwitter-ion" ou "sel interne".



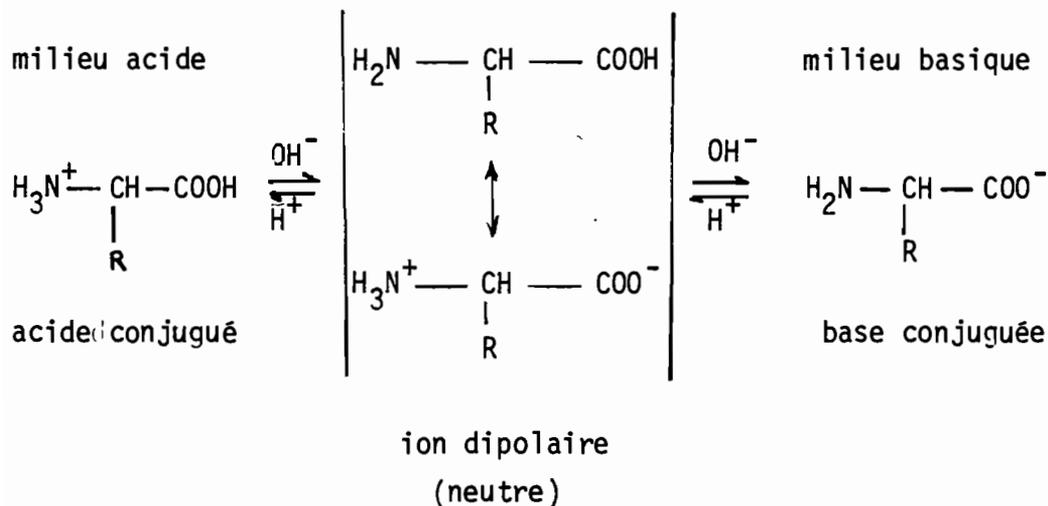
En milieu acide, dans lequel les ions H^+ prédominent, le groupement négatif est saturé



En milieu basique, où les ions OH^- prédominent, les protons fixés sur le groupe aminé sont captés pour former de l'eau.



Les différents équilibres auxquels peuvent donner lieu un acide aminé en solution peuvent se résumer ainsi :



L'équilibre entre la molécule et l'ion dipolaire est indépendant du pH puisque cette transformation, purement interne, ne fait pas appel aux ions H^+ du milieu. Par contre, les équilibres de l'acide aminé avec son acide ou sa base conjugués dépendent du pH de la solution. Selon la valeur du pH, l'un ou l'autre est favorisé.

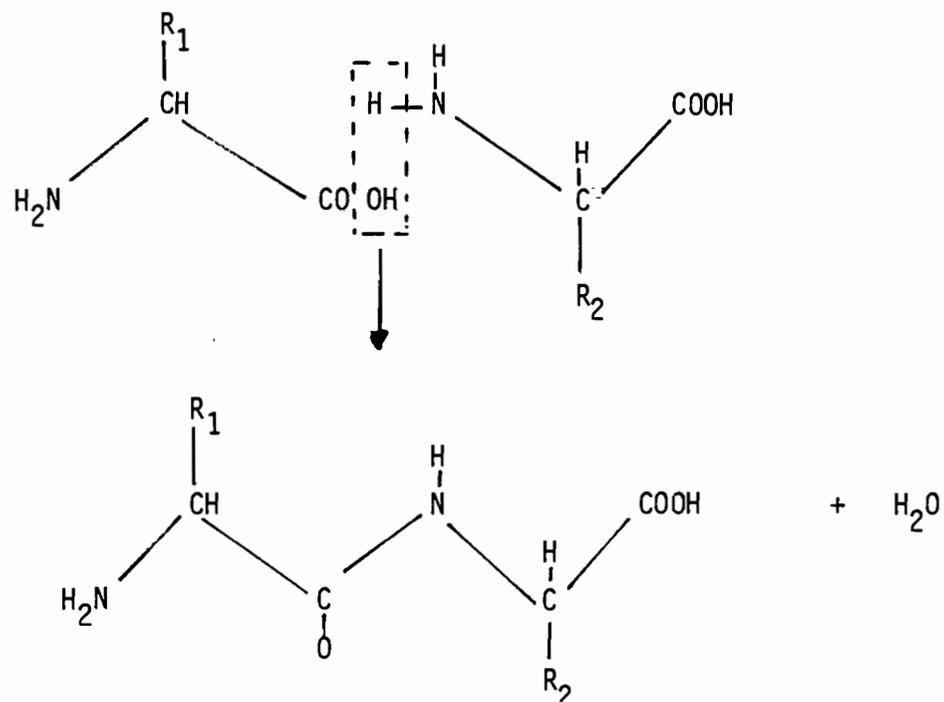
Pour une certaine valeur de pH, la concentration en anions et cations est la même. Cette valeur est définie comme étant le point isoélectrique de l'acide aminé, ainsi nommé en raison du comportement de l'acide aminé lors d'une électrolyse à ce pH. En effet, si le milieu est basique, la forme prépondérante est $\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COO}^-$ et l'on observe une migration vers l'anode ; si le milieu est acide, la forme prépondérante est $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COOH}$ et la migration a lieu vers la cathode. Au point isoélectrique, où les concentrations de ces deux ions sont égales, et, à condition que leurs mobilités soient égales, aucune migration préférentielle n'est observée vers l'une des électrode.

Ces remarques sont mises en application dans la séparation analytique des acides aminés par électrophorèse.

La valeur de pH correspondant au point isoélectrique dépendra des forces respectives des fonctions acides et basiques de la molécule, elle sera variable selon la nature de la molécule. Pour les acides aminés "neutres" elle sera généralement comprise entre 5,02 et 6,3. Les amino-acides "acides" auront un pHi nettement acide voisin de 3,00 ; les amino-acides "basiques" auront, eux, un pHi faiblement basique 7,6 à fortement basique 10,8.

c) Les protéïnes, les peptides :

Nous avons vu que les protéïnes étaient formées d'un grand nombre d'acides aminés. Leur condensation en chaînes polypeptidiques se fait par condensation du groupement acide de l'une des molécules et du groupement basique de la molécule voisine, et élimination d'une molécule d'eau.



Peuvent ainsi être condensées un grand nombre de molécules conduisant à des chaînes plus ou moins longues, linéaires ou cycliques. Dans notre exemple, la substance formée est un dipeptide. La liaison $-\overset{\overset{O}{||}}{C}-NH$, porte le nom

de liaison peptidique.

Seules les chaines latérales des protéines, porteuses de groupements COOH et NH_2 libres, donneront aux molécules leur caractère acide ou basique.

2 - LES COLLOIDESa) Généralités :

Thomas GRAHAM, en 1861, subdivisa les substances chimiques en deux parties :

- substances se dissolvant facilement dans l'eau et traversant les membranes semi-perméables (sels, sucres) ou cristalloïdes, la majorité d'entre elles possédant la propriété de cristalliser.
- substances formant des suspensions et ne traversant pas les membranes semi-perméables (protéïnes, gommes, gélatine) ou colloïdes, susceptibles de fournir, par concentration, des gelées solidifiées.

Remarques : - Colloïde vient du grec : colla (colle).

- Une même substance peut, selon les conditions du milieu où elle se trouve, se présenter à l'état cristalloïde ou bien à l'état colloïdal.

En fait, une solution colloïdale différera essentiellement d'une solution cristalloïde, par la taille des particules en suspension dans le solvant.

DIAMÈTRE DES DIVERSES PARTICULES QUI DÉTERMINENT LES SOLUTIONS VRAIES, LES SOLUTIONS COLLOÏDALES ET LES SUSPENSIONS.

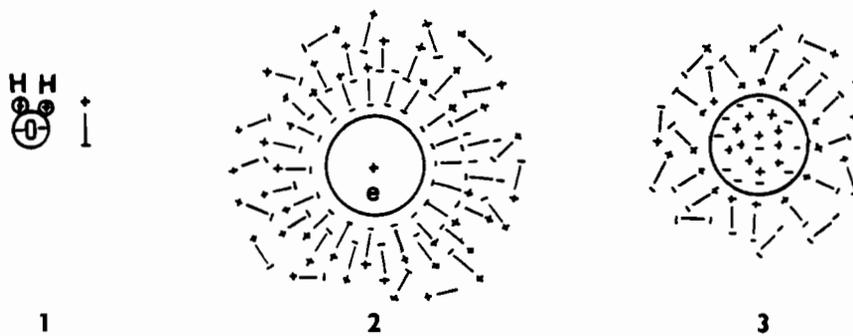
0,003 μ représente la limite de visibilité à l'ultramicroscope et 0,2 μ celle de la visibilité au microscope photonique.

	<i>Solutions ordinaires</i>	<i>Solutions colloïdales (micelles)</i>	<i>Suspensions</i>
Diamètre des particules	< 0,003 μ	de 0,003 μ à 0,2 μ	0,2 μ et > 0,2 μ

Tableau I (NOUGADERE A., 1969)

Dans une solution ordinaire, les molécules du corps dissout, ont une dimension très voisine de celle du solvant.; par contre, dans une solution colloïdale, le diamètre des molécules du corps dispersé sera beaucoup plus grand que celui du milieu de dispersion.

Les principaux caractères qui vont nous permettre de différencier les colloïdes des solutions ordinaires, seront : d'être dialysables (ultra filtration à travers différents types de membranes), de posséder une très faible vitesse de diffusion, de cristalliser diffici-



émulsoïde : colloïde hydrophile.

1) dipôle constitué par une molécule d'eau et représentation schématique de ce dipôle avec un pôle + et un pôle -. Les dipôles s'attirent mutuellement par leurs charges opposées et construisent des « associations ».

2) organisation des dipôles en une assise liquide aux molécules orientées tout autour d'une particule de charge positive, les dipôles s'appuient par leur pôle négatif contre la particule chargée positivement. Au-delà de cette assise d'hydratation très délimitée, les molécules d'eau se répartissent au hasard.

3) particule au point isoélectrique, charge minimale et enveloppe liquide bordante plus diffuse et moins large (d'après PALLMANN, 1931).

(A. NOUGADERE, 1969)

Figure 4

lement, de présenter fréquemment une hétérogénéité optique (certaines substances colloïdales soumises à un éclairage violent diffractent la lumière dans toutes les directions et sont ainsi rendues visibles au microscope : c'est l'effet TYNDALL. L'eau pure et les solutions ordinaires ne présentent pas cette propriété, d'adsorber à leur surface des molécules ou bien des ions libres présents dans le milieu.

b) Caractères électriques :

Si l'on prend en considération : la gravité qui devrait, normalement, faire précipiter les colloïdes ou bien leur énergie superficielle très élevée qui devrait avoir tendance à diminuer par la formation d'agrégats; la stabilité des colloïdes peut nous sembler surprenante.

La stabilité est assurée par les charges électriques de même nature que portent les particules au sein d'une solution donnée. Les charges identiques de ces particules vont donc se repousser, empêchant ainsi la formation d'agrégats.

De telles particules placées dans un champ électrique vont avoir tendance à se déplacer vers le pôle positif, si elles sont porteuses de charges négatives et vers le pôle négatif si l'ensemble des particules colloïdales sont chargées positivement.

Plusieurs théories sont proposées par les différents auteurs pour expliquer l'origine de la charge électrique des colloïdes, elles dépendent de la nature du colloïde envisagé. Pour la majorité d'entre eux, la charge est liée à des phénomènes d'adsorption de particules présentes dans le milieu. "La particule colloïdale acquiert, ainsi, une certaine charge et les autres espèces ioniques restant en solution dans le milieu de dispersion lui confèrent une charge de signe opposé". (Théorie de la double couche mise au point par Helmholtz et extrapolée aux particules colloïdales). Pauli, quant à lui, propose d'extrapoler les propriétés des solutions d'électrolytes "vrais" aux solutions de particules colloïdales. Seule varie la taille de l'une (ou des deux) particule qui augmente. Si maintenant, l'on considère des colloïdes biologiques, (solutions de protéines par exemple), la charge dépend uniquement de la nature de la particule; ionisation des groupements COOH ou NH₂ libres

3 - L'ELECTROOSMOSE

C'est le déplacement d'un liquide le long d'une paroi solide sous l'action d'un champ électrique parallèle à celle-ci.

Mise en évidence expérimentale :

Si l'on place un diaphragme dans un tube de verre rempli d'eau et que l'on applique une tension de part et d'autre, l'eau s'élèvera dans le tube capillaire situé au dessus du tube expérimental, jusqu'à ce qu'une certaine pression d'équilibre soit atteinte.

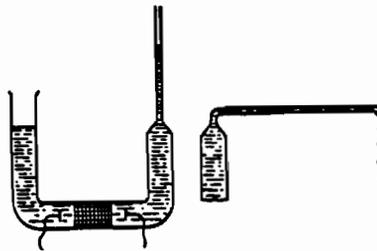


Figure 5

Électroosmose

(MILAZZO G., 1969)

Si, maintenant, l'on remplace le diaphragme par un (ou plusieurs)*capillaire en verre, le même phénomène pourra être observé. La différence de potentiel "oblige" donc l'eau à traverser le capillaire. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le rapport entre la surface de contact de la paroi fixe, au volume du liquide, est plus important.

Interprétation : (Figure 6)

Helmotz suppose l'existence d'une double couche due aux ions compensateurs qui s'aligneraient parallèlement à la paroi solide à une distance très faible, mais définie, de celle-ci.

Gouy propose un modèle selon lequel les contre-ions se distribueraient en une couche diffuse de faible épaisseur.

Stern, quant à lui, propose un modèle qui est la synthèse des deux précédents.

* on assimile alors ce réseau de capillaires à un diaphragme

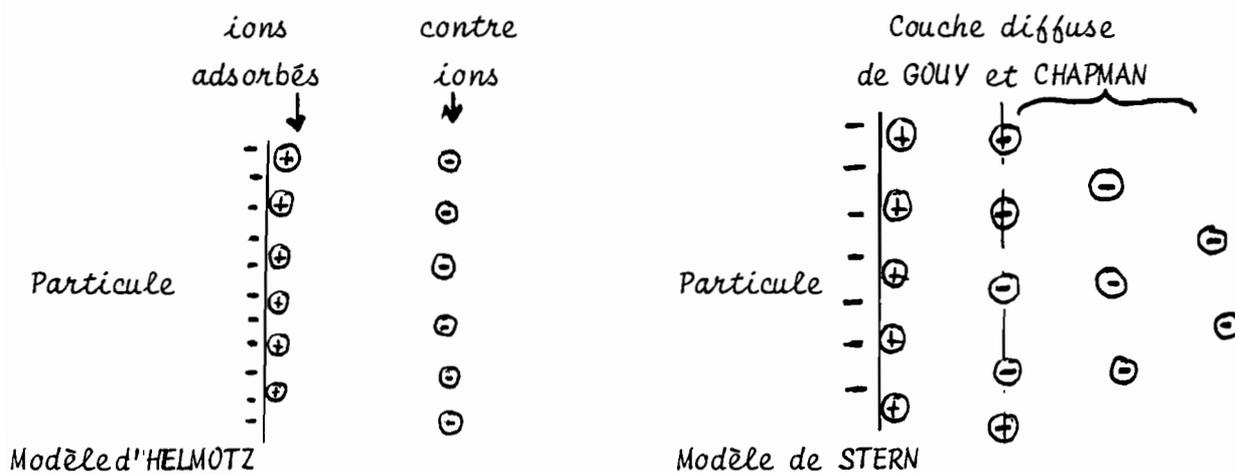


Figure 6 : Schéma des trois modèles cités précédemment

Pauli, en s'appuyant sur la théorie de dissociation ionique qu'il a déjà utilisée pour les particules colloïdales, nous propose une explication de la naissance de ces charges. A la surface des parois fixes, **existeraient** des complexes susceptibles de **se dissocier** (dissociation favorisée par le contact avec le liquide), communiquant ainsi une charge à la paroi et libérant dans la solution (au voisinage immédiat de la paroi), une charge de signe opposé appelée contre-ion, ou ion compensateur. A titre d'exemple, il est possible de citer la silice qui, au contact de l'eau, se charge négativement en perdant un ion H^+ et le verre qui, lui, perdra un ion Na^+ , les ions libérés restant au voisinage immédiat de la paroi.

Ces phénomènes sont mis en évidence lorsque l'on impose un champ électrique parallèle à la surface du solide et que l'on observe le déplacement du liquide. Le champ électrique agit sur les contre-ions en les forçant à migrer et entraînant avec eux, du fait de leur hydratation et de la viscosité du liquide, une partie de ce dernier ; provoquant ainsi, la phénomène d'électrosmose.

Ce phénomène sera gênant lors d'analyses par électrophorèse puisqu'il s'opposera à la migration anodique des particules étudiées.

4 - DIALYSE

a) La dialyse

C'est un procédé de purification des solutions colloïdales.

C'est une méthode de purification par ultrafiltration à travers des membranes à dialyse qui sont perméables aux cristalloïdes mais, imperméables aux colloïdes. La maille de ces membranes est inférieure au $m\mu m$; d'où le terme d'ultrafiltration qui est utilisé. Cette filtration a lieu à la pression atmosphérique.

Si l'on place un colloïde dans un sac de collodion (type de membrane ci-dessus décrite), le tout plongé dans de l'eau pure que l'on renouvelle constamment, les ions passent dans l'eau. Les colloïdes restent, eux, prisonniers du sac de collodion. On obtient ainsi une solution colloïdale pratiquement pure.

Si l'on réalise cette ultrafiltration sous pression, le collodion est placé sur un disque poreux qui évite sa rupture.

b) l'électrodialyse :

C'est une dialyse accélérée par un champ électrique que l'on appliquera entre deux électrodes séparées de la solution de colloïdes par une membrane. Les ions de l'électrolyte migrent au travers de la membrane et la purification est ainsi accélérée. Elle est plus rapide que la précédente mais, elle peut provoquer la coagulation des colloïdes dont la stabilité est souvent liée à la présence d'électrolytes même en faibles quantités.

V - APPLICATION DU PHENOMENE D'ELECTROPHORESE : DIFFERENTES METHODES EXPERIMENTALES ET ANALYTIQUES.

1 - Classification des différentes méthodes :

a) Comme nous l'avons vu précédemment, une différence dans la mobilité effective des espèces ioniques contenues dans une solution, entraîne, lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique \vec{E} , une différence dans leur vitesse de migration. Chaque espèce se déplacera avec une vitesse propre et il sera possible de les séparer. Les types d'électrophorèse basés sur ce principe sont appelés "électrophorèse de zone". Cette dénomination provient du fait qu'à la fin de l'analyse, il sera possible de distinguer (après révélation si nécessaire), des compartiments contenant chacun un type d'espèce migrante.

L'électrophorèse de zone est divisée en :

- électrophorèse libre ;
 - électrophorèse à frontière mobile (la séparation a lieu dans un tube en U d'environ 1 cm² de section).
 - isotachophorèse (la séparation a lieu dans un tube capillaire).
- électrophorèse dans des milieux anti-convection ; électrophorèse sur support
 - 1^{er} groupe : le tampon est fixé sur un support solide (électrophorèse sur papier par exemple).
 - 2^{ème} groupe : le tampon est mêlé à une substance à l'état de gel (électrophorèse sur gel d'amidon) on ne distingue alors qu'une phase.

b) L'électrofocalisation présente un principe différent : c'est une méthode de séparation qui est fonction des points isoélectriques des protéines, peptides et acides aminés ; en fait des substance amphotères en général. Ces substances acquièrent une charge positive lorsqu'elles se trouvent dans un milieu dont le pH est acide (en fait inférieur au pHi) et une charge négative dans le cas inverse : pH basique (supérieur au pHi).

Placées dans un milieu où il existe un gradient de pH et soumises à un champ électrique \vec{E} , elles vont se déplacer jusqu'à une zone de pH appelée "point isoélectrique". En effet comme nous l'avons vu dans le chapitre de rappel sur les protéines, en ce point, la particule est globalement neutre.

La séparation est donc fonction du point isoélectrique pHi et non de la vitesse de migration.

Cette méthode peut être considérée comme une technique électrophorétique car, pour atteindre cette zone de pH où leur état est stationnaire, les particules migrent électrophorétiquement.

Dans les deux cas envisagés (a) et (b), on essaye de séparer un mélange en ses différents constituants. Il faudra se donner les moyens, pour qu'il y ait méthode analytique, d'identifier et éventuellement quantifier, les différentes fractions obtenues.

Le dispositif expérimental sera fonction du type d'électrophorèse et revetira, dans chacune des catégories, des formes très diverses, spécifiques du problème envisagé.

De manière générale l'analyse sera effectuée :

- en phase liquide ou solide
- en régime continu ou discontinu

Le tableau suivant résume toutes les données de ce paragraphe :

Tableau II

<i>Séparations par électrophorèse.</i>				
Type de séparation	Électrophorèse	Utilisation	Milieu de séparation	Régime
<i>suivant la mobilité</i>	Électrophorèse de zone proprement dite	analytique	support solide ou gel	discontinu
		préparative	support solide, gel ou phase liquide	continu ou discontinu
	Électrophorèse à frontière mobile	analytique	phase liquide	(¹)
	Isotachophorèse	analytique	phase liquide	discontinu
préparative		phase liquide	(¹)	
<i>suivant le point isoélectrique</i>	Électrofocalisation	analytique	support solide, gel ou phase liquide	discontinu
		préparative	support solide, gel ou phase liquide	continu ou discontinu

(¹) méthode peu utilisée.

(SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

2 - Objectifs de l'analyse électrophorétique.

Deux objectifs pourront être poursuivis lors d'une analyse par électrophorèse :

- séparer ou purifier les constituants d'un mélange en vue d'une utilisation ultérieure.: méthode préparative.
- identifier et/ou quantifier les différents constituants: méthode analytique.

a) méthode préparative :

- échantillons inférieurs au gramme : électrophorèse en régime discontinu.
- échantillons en quantité plus importante : électrophorèse en régime continu.

b) méthode analytique :

- séparation de groupes de substances.

On utilise dans ce cas l'électrophorèse de zone sur acétate de cellulose qui est la technique la mieux adaptée (elle est automatisée actuellement pour le sérum sanguin).

- séparation du plus grand nombre possible de produits contenus dans une solution.

Il faut faire appel à l'électrophorèse de zone sur gel ou l'isofocalisation en veine liquide ou sur gel.

Ces méthodes sont beaucoup plus fines que la précédente mais, d'une mise en œuvre plus délicate. Elles seront examinées en détail dans le chapitre qui leur est consacré.

Il faudra prendre beaucoup de précautions lors de la préparation des échantillons. La qualité du résultat obtenu dépendant pour moitié de la méthode utilisée et pour moitié de la qualité de la manipulation.

3 - Généralités sur les expérimentations d'électrophorèse.

Quelque soit la méthode d'électrophorèse utilisée, donc quelque soit l'appareillage envisagé ;

- le principe d'une analyse électrophorétique peut se résumer selon :

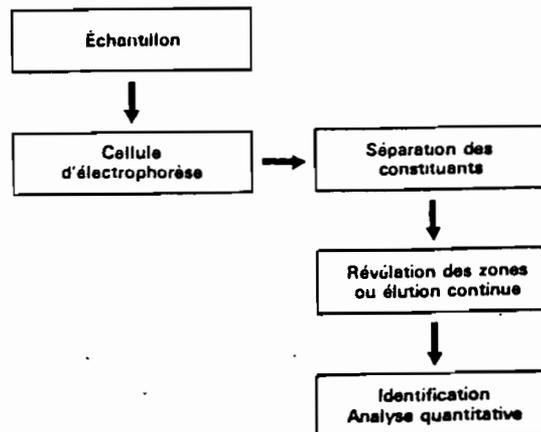


Figure 7 : Principe d'une analyse par électrophorèse.

(SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

- tous les instruments consistent en cinq parties principales :

- les compartiments anodiques et cathodiques
- la cellule ou chambre d'électrophorèse
- le système d'injection
- le détecteur

et tout une gamme de produits : colorants, tampon, etc...

- des précautions sont à prendre pour obtenir les résultats les plus exploitables et les plus reproductibles possibles. Chaque méthode a ses exigences propres décrites dans des articles et ouvrages spécialisés mais, il est possible de distinguer des généralités.

1°) quantité d'échantillon ;

quelques micro-grammes (sauf en électrophorèse préparative).

2°) intensité du champ électrique ;

doit être adapté à la nature de l'espèce ionique que l'on souhaite séparer :

- un champ électrique de quelques volts par centimètre sera suffisant pour les macro-molécules.

- un champ plus important, 100 volts par centimètre, sera nécessaire pour séparer les petites molécules.

3°) intensité du courant ;

doit être un compromis entre deux exigences :

- une séparation rapide des éléments pour éviter la dégradation des produits et/ou leur diffusion. Pour satisfaire à cette exigence, il faut une intensité suffisante.
- une limitation des phénomènes suivants induits par une forte intensité.
 - o apparition de courants de convection qui peuvent limiter ou annuler les séparations.
 - o augmentation des phénomènes de diffusion qui nuisent à une bonne séparation.
 - o risque de dégradation des produits sensibles à la chaleur

Les phénomènes de convection peuvent être limités de différentes manières :

- o en électrophorèse libre :
la chaleur sera dispersée radialement par conduction depuis l'axe de la colonne jusqu'au milieu extérieur à travers les parois de la cellule.
- o en électrophorèse sur support :
grâce à des supports appropriés (gel d'amidon par exemple). Ces milieux par contre, influent de manière non négligeable, sur la migration électrophorétique. Par exemple, le chemin parcouru réellement par une particule est bien supérieur à la distance de migration observée. La véritable distance sur laquelle s'effectue la chute de potentiel est donc supérieure à la distance mesurable.

4°) limiter l'électroosmose ;

cette migration du solvant, en sens inverse du déplacement des ions ou dans le même sens selon leur charge nette, est sensible surtout en isotachophorèse et en électrophorèse sur support. En effet, la surface de contact liquide/solide, est importante par rapport au volume de liquide. Il faudra corriger les mobilités en fonction de ce phénomène.

5°) identification des constituants par ;

- comparaison avec un électrophorégramme étalon.
- mise en œuvre de tests spécifiques (en analyse biochimique en particulier pour les protéines)
- coloration avec des colorants spécifiques d'une substance donnée. Cette coloration pouvant intervenir avant le début de l'expérience ou bien lorsque la séparation a eu lieu. (Noir de soudan pour les glucides, Réactif de Schiff pour les fractions glucidiques des protéines) .
- marquage de certaines substances par des éléments radioactifs (^{59}Fe dans du sérum sanguin permettant de voir dans quelle partie il va se fixer puis comptage ou autoradiographie).

6°) composition stable du tampon tout au long de l'analyse ;

Ceci peut être obtenu par divers dispositifs :

- membranes destinées à freiner le passage des gros ions du fait de l'électrolyse, par exemple.

7°) normalisation des protocoles de mesure ;

Dans la mesure du possible, il faudra s'y attacher afin de pouvoir effectuer des comparaisons entre les analyses, dans de bonnes conditions.

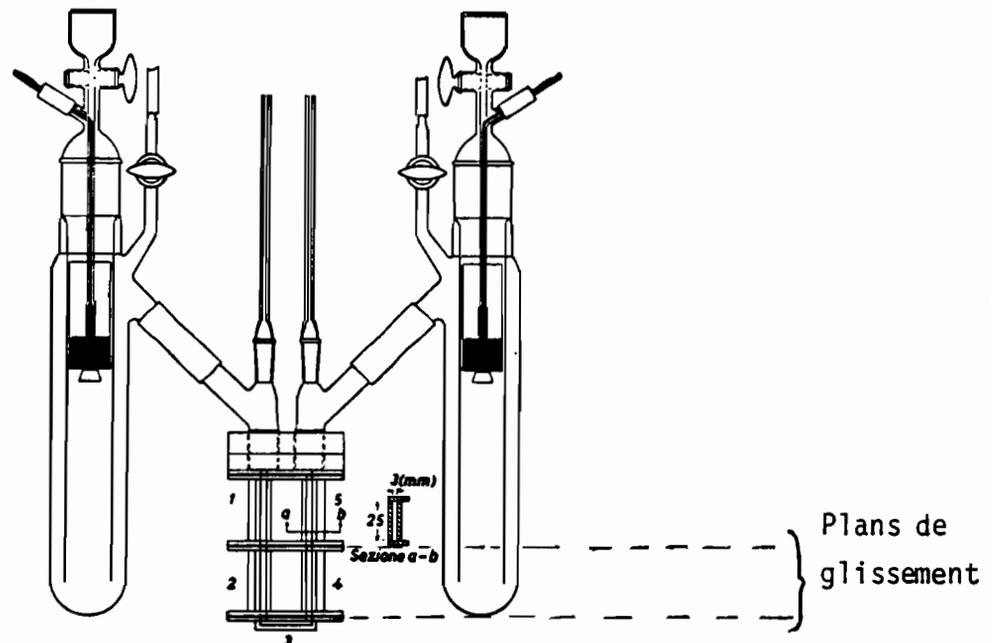


Figure 8 : Cellule de Tiselius et ses vases d'électrodes

(MILAZZO G., 1969)

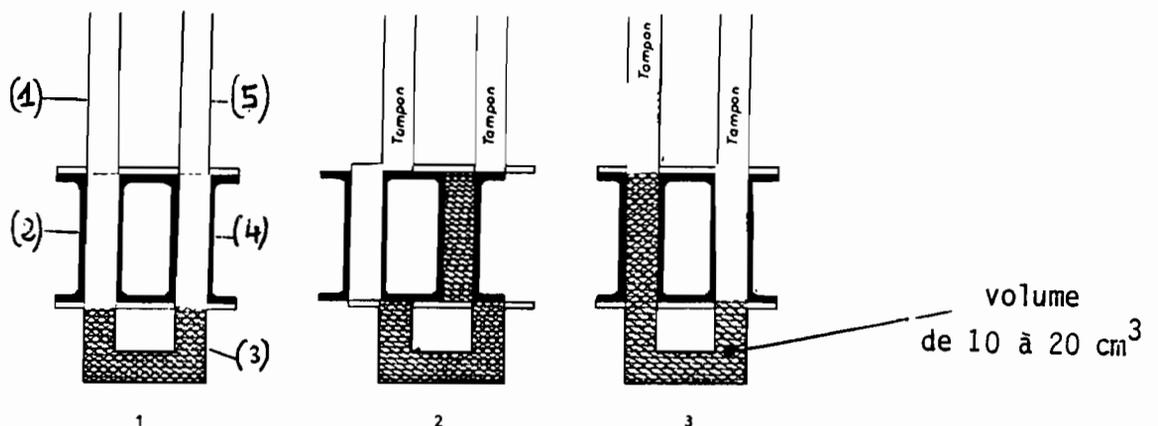


Figure 9 : Schéma du dispositif permettant d'obtenir une surface de séparation nette entre le tampon et la solution de protéine qui sera soumise au champ électrique. La partie médiane de la cuve en U peut se déplacer latéralement.

1, La partie inférieure et la partie médiane sont remplies avec la solution de protéine. 2, La partie moyenne a été déplacée de manière à pouvoir remplir la partie supérieure avec le tampon. 3, La disposition initiale a été rétablie

(BOULANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

A) ELECTROPHORESE DE ZONE

1 - Electrophorèse libre

a) électrophorèse à frontière mobile

a - 1 : Généralités :

C'est une des méthodes les plus importantes d'électrophorèse libre et c'est également la plus ancienne. Thèse de Doctorat d'Etat de TISELIUS en 1930 ; ces travaux, dans ce domaine lui ont permis d'obtenir le prix Nobel en 1948. Pour la première fois, il a été possible de séparer, en plusieurs fractions les constituants du sérum sanguin.

Si les particules étudiées sont des colloïdes, elle est désignée sous le nom de "méthode de TISELIUS".

a - 2 : Description de l'appareillage et mise en oeuvre : (Figures 8 et 9)

L'appareillage consiste en :

- une cellule en "U" où sont mis le tampon et la solution à étudier. Son volume est de 10 à 20 cm³.

Dans l'appareil de TISELIUS, le tube d'analyse comprend cinq tronçons. Les tronçons médians (2;4) solidaires l'un de l'autre, pouvant glisser, à la façon d'un tiroir; par rapport au fond du tube (3) et aux parties supérieures (1) et (5), et, ceci de façon parfaitement étanche. La partie (3) peut glisser indépendamment le long du tiroir médian.

Pour effectuer le remplissage, on procède de la manière suivante :

- le fond du tube (3) est rempli de solution de particule dialysée en présence d'un tampon T. La solution macromoléculaire consistera, dans notre exemple, en un mélange de trois particules A, B, C chargées négativement.
- l'on remplit l'un des tronçons médians (4) de la même solution dialysée qu'en (3), le second tronçon étant rempli de tampon T.
- les deux branches supérieures (1) et (5), ainsi que les vases d'électrodes contenant le tampon T.

On fait ensuite glisser les éléments de l'ensemble l'un par rapport à l'autre afin de reconstituer la cellule d'analyse.

On amènera, en déplaçant le liquide, les frontières au niveau du détecteur optique situé, en général, au niveau du tronçon médian.

La section de la cellule est rectangulaire (représentée en coupe sur le schéma présentant le cellule de TISELIUS).

- un détecteur optique :

Le plus utilisé est basé sur une application de l'effet FOUCAULT+TÖPLER.

Son principe est le suivant : (Figure 10)

Un rayon lumineux, lorsqu'il traverse un milieu où existe un gradient d'indice de réfraction, voit sa trajectoire déviée.

A chacune des frontières apparue lors de l'analyse, se produira, avec la variation de concentration, une variation d'indice de réfraction.

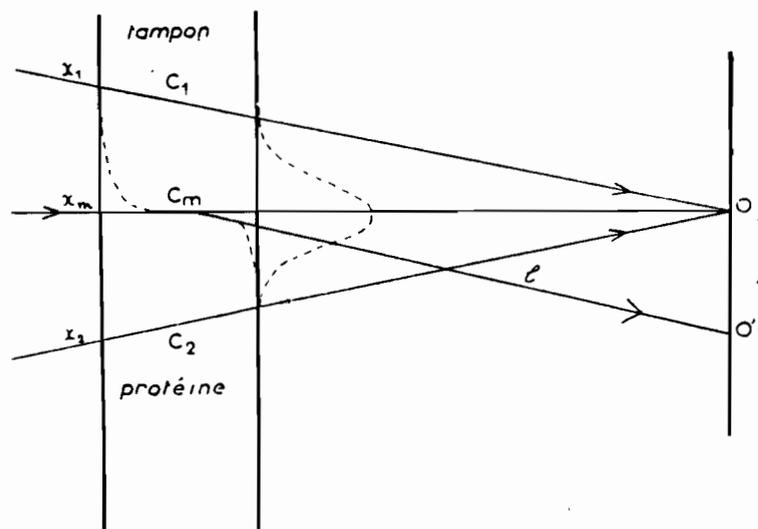


Figure 10 : Déviation d'un rayon traversant la cuve à électrophorèse au niveau d'une frontière.

La courbe pointillée à l'intérieur de la cuve représente les concentrations c (en abscisses) en fonction de la hauteur x . La courbe pointillée en cloche représente le gradient de concentration (en abscisses) en fonction de x . Les rayons x_1O et x_2O ne sont pas déviés. Le rayon x_mO est celui qui subit la plus grande déviation. Les rayons frappant la cuve entre x_m et x_1 et x_m et x_2 subissent des déviations de plus en plus faibles. Des dispositifs optiques utilisent ces déviations pour donner une image agrandie de la courbe en cloche

(BOULLANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

Il sera possible par différents procédés (appareil de photographie astigmatique par exemple qui permet de mesurer des variations d'indice de réfraction) de suivre le plan où le gradient d'indice dn/dx est maximal et d'obtenir un diagramme tel que : (Figure 11)

- en ordonnée y : on ait une grandeur proportionnelle au gradient d'indice dn/dx .
- en abscisse x : la hauteur de la cuve à électrophorèse.

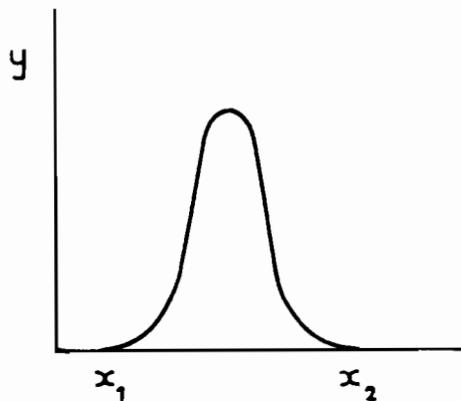


Figure 11 : Portion d'un diagramme électrophorétique correspondant à une frontière.

En abscisses, x , hauteur dans la cuve. En ordonnées, y , grandeur proportionnelle au gradient d'indice de réfraction.

(BOULLANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

Le déplacement du sommet de ces courbes nous donnera la vitesse de déplacement de chaque frontière $\Delta x / \Delta t$ qui servira à calculer la mobilité .

Note : pour des analyses en micro-électrophorèse, études sur quelques mg de protéines, on utilise un interféromètre utilisant la différence dans le trajet de deux faisceaux lumineux pour produire des franges d'interférence dont la densité, par millimètre, sera proportionnelle au gradient de concentration.

- bain de refroidissement :

maintenu à une température telle que la densité du tampon soit maximale (en règle générale voisine de 1°C). Grâce à la géométrie de la cellule, le refroidissement s'effectue dans de bonnes conditions.

Ce bain, introduit par TISELIUS, a permis d'obtenir des résultats très précis.

Dans le paragraphe consacré aux précautions générales à prendre lors d'une analyse par électrophorèse, nous avons vu que le passage du courant électrique provoquait une élévation de température. Cette hausse de température au centre du tube provoque une différence de densité horizontale. Un courant ascendant au milieu du tube et un courant descendant le long des parois ont lieu en l'absence de refroidissement.

- un tampon :

permettant d'obtenir la séparation maximum.

Si le mélange n'est pas, comme dans notre exemple, un composé de trois particules "idéales" mais, un mélange de protéines, il pourra être judicieux de choisir le pH du tampon de telle sorte qu'il ait une valeur intermédiaire entre le pHi de l'espèce que l'on souhaite séparer et celui des autres protéines, les molécules de l'espèce à séparer migreront alors en sens inverse des autres.

a - 3 : Principe :

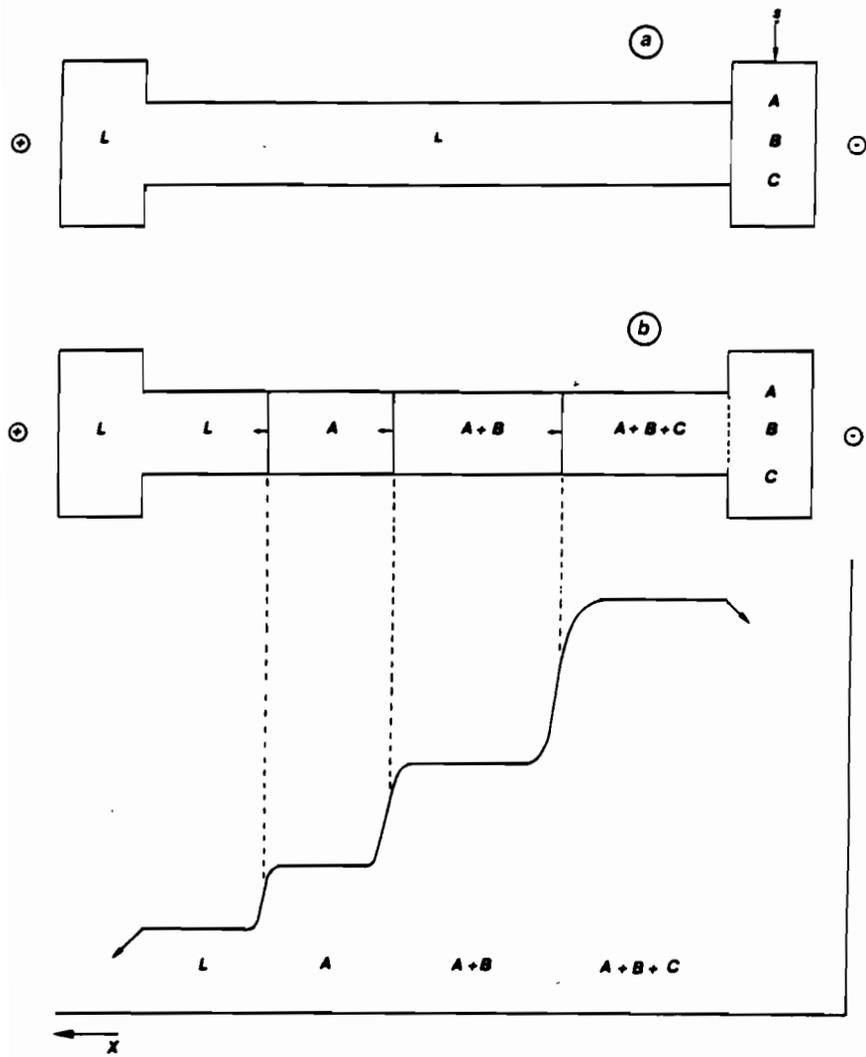
Si l'on applique, par l'intermédiaire des électrodes, un champ électrique, aux bornes de la cellule de mesure. Au bout d'un certain temps (1 heure par exemple), une séparation des constituants du mélange apparaît.

Si A, B, C sont des anions et si $\mu A > \mu B > \mu C$; on obtiendra la répartition suivante.



1 - état initial

2 - état final ; après passage du courant.



(EVEAREST M., 1976)

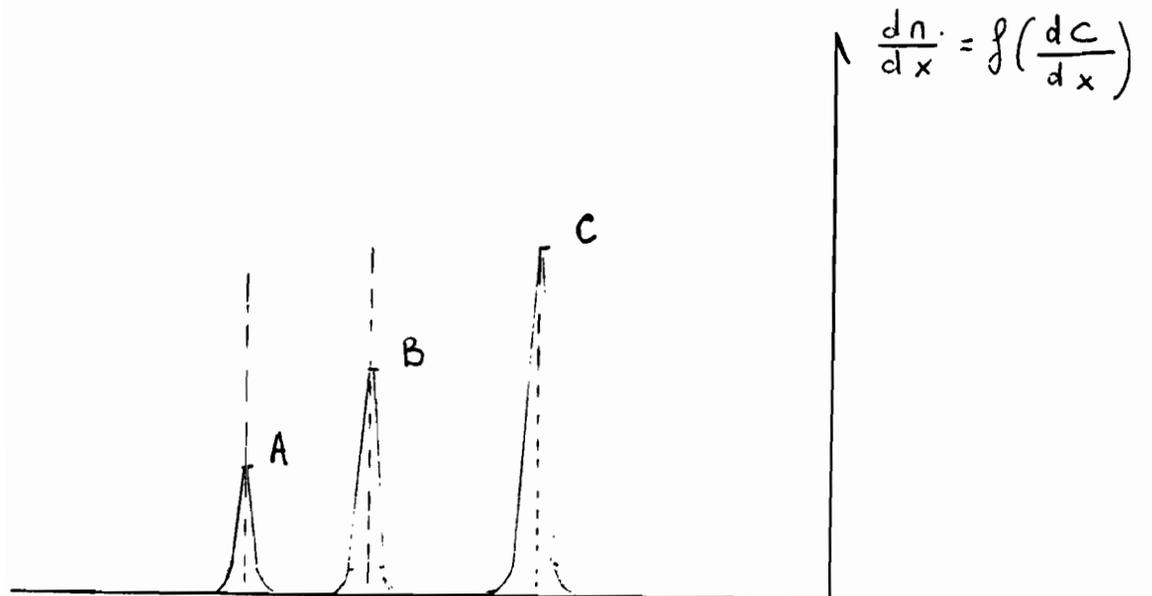


Figure 13

Sur ce schéma, il apparaît que seules la substance la plus mobile et la moins mobile sont séparées. Des zones intermédiaires apparaissent où sont présents des mélanges (B+C), (A+B) et entre ces deux zones subsiste le mélange initial (A,B,C + T)

Selon le signe de leur charge, les molécules migreront vers le haut dans l'une des branches (branche ascendante - branche de gauche) et vers le bas dans la seconde (branche descendante). La frontière ascendante (A^- / T) se meut dans le tampon pur. Dans l'autre branche, les molécules quittent le tampon qui leur servait de solvant et forment la frontière descendante.

L'observation des frontières peut se faire directement si la particule est colorée (hémoglobine par exemple) ; en règle générale, il faut avoir recours à un procédé optique. On obtient ainsi un électrophorégramme nous donnant dn/dx (proportionnel à dC/dx : variation de la concentration) en fonction de la situation de la frontière à l'intérieur du tube.

Une représentation schématique du cas étudié dans notre exemple est présenté (Figure 13) , et un exemple obtenu lors d'une expérimentation est donné ci-dessous.(Figure 14).

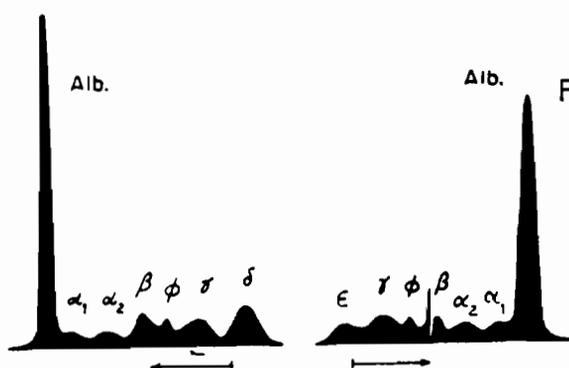


Figure 14 : Diagramme électrophorétique ascendant (à gauche) et descendant (à droite) d'un plasma normal humain dans un tampon de diéthylbarbiturate de sodium, de force ionique 0,1 à pH 8,6.

La frontière φ correspond au fibrinogène (d'après ALBERTY (192)).

(BOULLANGER P. et POLONOVSKI J. 1959)

Dans cette méthode, certaines anomalies apparaissent :

- la concentration des substances, calculée d'après le diagramme ci-contre, ne correspond pas aux concentrations réelles.
- le déplacement de la frontière ascendante n'a pas la même valeur que celui de la frontière descendante.

Il sera nécessaire de tenir compte de ces deux anomalies lors d'analyse de haute précision.

Théoriquement, les frontières ascendante et descendante devraient être l'image l'une de l'autre. Ceci n'est jamais réalisé lors des expérimentations.

Ci dessous, un exemple est donné, représentant les différences de vitesse de migration des frontières ascendantes et descendantes. Cette électrophorèse a été réalisée par L. G. LONGSWORTH en milieu tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 3,93 et à diverses concentrations A d'une protéine.

Tableau III - : Valeurs expérimentales du rapport des vitesses de migration des frontières ascendante et descendante

A % de protéine	$\frac{v^{bc}}{v^{ab}}$
0,64	1,09
1,36	1,18
2,74	1,33

(BOULANGER P. et PLONOVSKI J., 1959)

a - 4 : Applications :

L'analyse des électrophorégrammes comprend :

- d'une part ; la détermination des mobilités des éléments.
- d'autre part ; la mesure de leur concentration relative.

- détermination de la mobilité d'une protéine pure.

Si tel est l'objectif que l'on s'est assigné, le calcul s'effectuera d'après la vitesse $\Delta x / \Delta t$ de la frontière descendante. Les molécules se déplacent alors dans un milieu dont on connaît la conductance spécifique λ ; c'est celle de la solution dialysée.

On atteint la valeur du champ électrique \vec{E} par la mesure de l'intensité i du courant électrique circulant dans la cellule de mesure. \vec{E} et i sont reliés par :

$$E = \frac{i}{a \lambda} \quad (\text{volts.cm}^{-1})$$

où : a représente la section de la cuve en cm^2
 λ la conductance en $\text{ohm}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

La mobilité est donnée par la relation :

$$\mu = \frac{\Delta x}{E \cdot \Delta t} \quad (\text{cm}^2 \cdot \text{volts}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1})$$

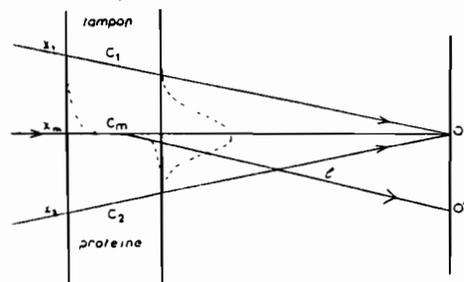
si la vitesse $(\Delta x / \Delta t)$ est exprimée en $\text{cm} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Pour les protéines, l'ordre de grandeur des mobilités, dans un champ de 1 volt par centimètre est 10^{-5} centimètre par seconde.

Tous les dispositifs nous permettant de suivre le déplacement des frontières, permettent, outre la détermination de la mobilité, celle de la concentration de la protéine qui disparaît dans la frontière ; c'est à dire celle qui en est responsable.

- détermination de la concentration.:

Si l'on reprend le schéma suivant :



La déviation y est proportionnelle au gradient d'indice dn/dx , à l'épaisseur e de la cuve et au trajet optique l . La relation liant tous ces paramètres est :

$$y = e l \frac{dn}{dx}$$

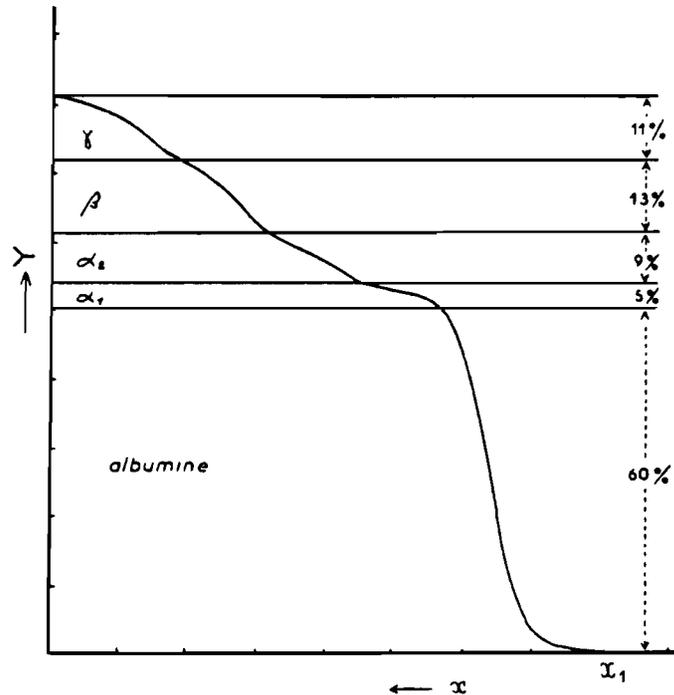
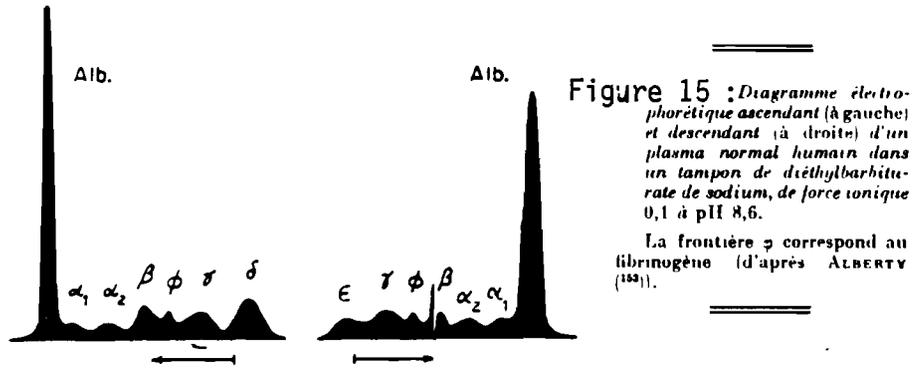


Figure 16 : Diagramme représentant la concentration de protéine dans un sérum en fonction de la hauteur x dans la cuve d'électrophorèse.

En x_1 (tampon) la concentration est nulle. Y est proportionnel à la concentration. Les lignes horizontales séparent les domaines respectifs de chaque constituant.

(BOULLANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

	Concentration en g p. 100 cm ³	Mobilité en cm ² volt ⁻¹ sec ⁻¹ × 10 ⁶
Albumine	4,0 — 4,5	— 5,9
Globuline α_1	0,2 — 0,3	— 5,1
Globuline α_2	0,4 — 0,5	— 4,1
Globuline β	0,6 — 0,8	— 2,8
Fibrinogène	0,3 —	— 2,1
Globuline γ	0,7 — 1,2	— 1,0

(BOULLANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

Tableau IV : Concentrations et mobilités des divers constituants du plasma humain

Entre les deux points x_1 et x_2 , la différence d'indice a pour valeur :

$$n_2 - n_1 = \frac{1}{e.l} \int_{x_1}^{x_2} y.dx$$

Si x_1 est situé en un point où la concentration de la protéine est nulle et si x_2 est dans une zone où cette concentration ne varie plus ($n_2 - n_1$) est proportionnel à la concentration C de la protéine. D'où

$$C = \frac{1}{A.e.l} \int_{x_1}^{x_2} y.dx = \frac{1}{A.e.l} . Y$$

où : A est une constante

Y est l'intégrale de la surface comprise entre l'axe des abscisses de la courbe en cloche représentant dn/dx en fonction du niveau des frontières dans la cuve.

En prenant comme exemple l'électrophorégramme du plasma sanguin, si l'on suppose que l'incrément d'indice de réfraction ($n_{\text{solution}} - n_{\text{solvant}}$) / concentration est le même pour toutes les protéines, le pourcentage d'un constituant s'obtient en divisant la surface du pic par la surface totale de l'électrophorégramme. (Figure 15)

Si l'on porte sur un graphique les intégrales cumulées des surfaces à partir du point x_1 en fonction des abscisses comptées elles aussi à partir de x_1 on obtient le diagramme ci-contre. Le hauteurs de palier sont proportionnelles aux concentrations respectives des constituants. (Figure 16)

On trouvera dans le tableau IV , les concentrations et les mobilités des divers constituants du plasma humain (tampon diéthylbarbiturate de sodium à pH=8,6).

Le diagramme suivant représente les variations de mobilités des différentes fractions du sérum humain séparées par électrophorèse en fonction du pH du tampon utilisé. Les expériences ont été réalisées avec un tampon acétate ou phosphate de force ionique 0,1 .

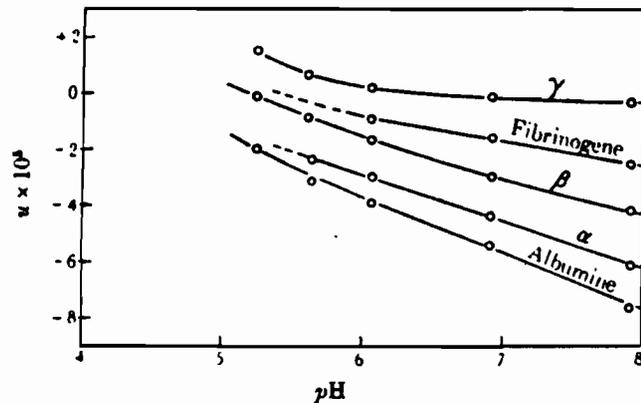


Fig. 17. Mobilité des constituants d'un plasma humain en fonction du pH (d'après STENHAGEN⁽¹⁷⁾).
(BOULANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

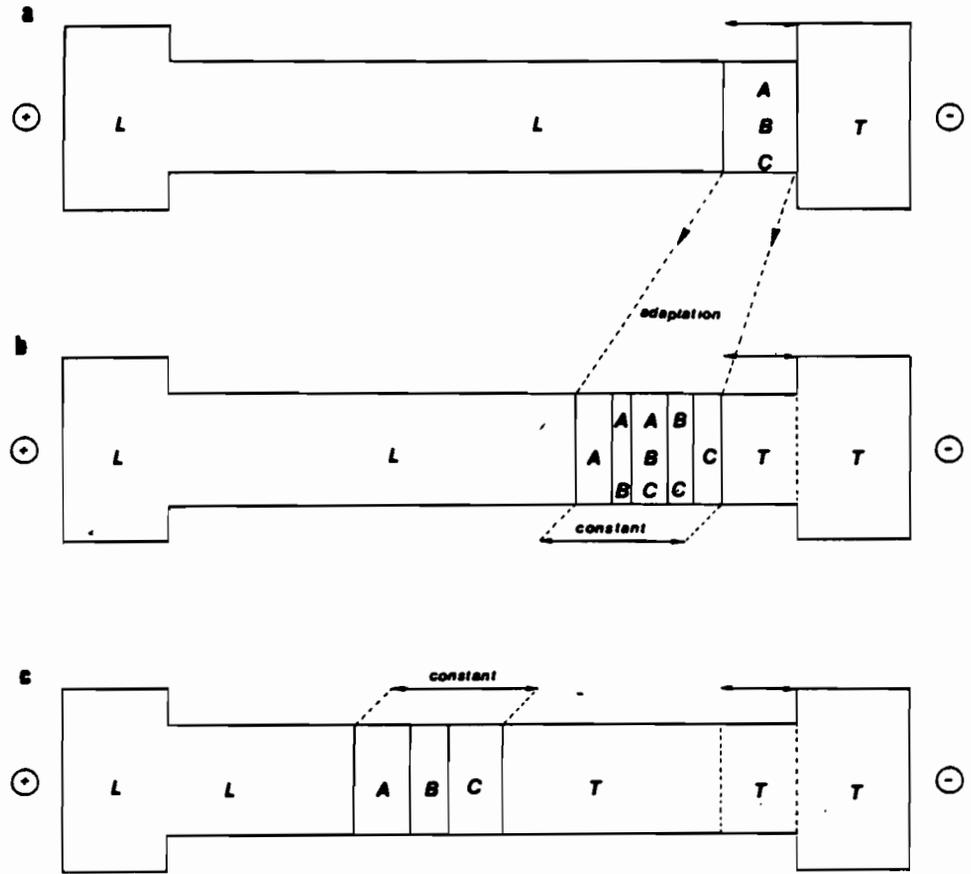
a - 5 : En conclusion :

Seuls les constituants les plus et les moins mobiles d'un mélange peuvent être séparés par ce type d'électrophorèse. Il serait de toute façon très délicat de les prélever sans créer de migration d'autres substances. Cette méthode ne sera pas utilisée à des fins préparatives.

Elle permet la détermination de la valeur absolue des mobilités électrophorétiques des différents composants. Elle sera de ce fait utilisée principalement lors de recherches fondamentales concernant la charge des particules ; elle pourra permettre de prévoir la stabilité de suspensions colloïdales, et, en corollaire, l'identification de particules à l'aide de leur mobilité dans un tampon de pH donné.

La détermination des points isoélectriques est également possible par ce procédé.

Le temps d'exécution assez long, la mise en œuvre délicate et l'appareillage important qu'elle nécessite font de l'électrophorèse à frontière mobile une technique de moins en moins employée.



(EVEAREST M., 1976)

- a : état initial ; il est décrit dans le 1°) de la page 47
- b : état intermédiaire ; il est décrit dans le 2°) de la page 47
- c : état final ; il est décrit dans le 3°) de la page 48

Figure 18

b) Isotachophorèse

b - 1 : Principe :

Nous étudierons la séparation d'espèces anioniques A^- , B^- , C^- dans un tube capillaire situé entre un compartiment anodique et un compartiment cathodique. Pour la séparation d'espèces anioniques ; le tube capillaire et le compartiment anodique seront remplis avec "un électrolyte meneur" L ; dont l'anion devra avoir une mobilité supérieure à celles de toutes les espèces à séparer. Les cations de l'électrolyte meneur devront avoir un pouvoir tampon suffisant au pH où l'analyse est à effectuer. Le compartiment cathodique devra être rempli avec un électrolyte terminal T dont l'anion aura une mobilité μ_T inférieure à celle de toutes les espèces présentes.

1°) l'échantillon sera introduit avec précaution entre les électrolytes L et T en évitant tout mélange par exemple avec une microseringue. (figure 18 - a).

Nous aurons un gradient de mobilité tel que :

$$\mu_L > \mu A^- > \mu B^- > \mu C^- > \mu T^-$$

2°) Si nous imposons un courant électrique dans le système, un champ électrique apparaît à travers celui-ci et chacun des ions migrera avec une vitesse qui est fonction de sa mobilité. Derrière l'anion meneur on trouvera l'anion le plus rapide, tandis que le plus lent sera devant l'électrolyte terminal. En début de séparation, on se retrouvera dans une situation analogue à celle obtenue en électrophorèse libre (figure 18 - b). Dans les zones intermédiaires, les espèces ioniques sont arrangées dans l'ordre de leurs mobilités effectives décroissantes.

Les espèces anioniques de L ne pourront jamais être dépassées, et celles de T seront les dernières.

La zone d'échantillons sera toujours comprise entre ces deux zones.

3°) Lorsque la séparation est complète, après un certain temps, des zones apparaissent ne contenant chacune qu'une seule espèce anionique dans l'ordre des mobilités décroissantes (figure 18 - c).

Après cette étape, un état stationnaire est atteint et tous les anions se déplacent à la même vitesse. Pour assurer la continuité électrique les espèces restent très près l'une de l'autre.

Ce déplacement à vitesse constante de tous les ions implique que :

$$\vec{v}_L = \vec{v}_{A^-} = \vec{v}_{B^-} = \vec{v}_{C^-} = \vec{v}_T$$

$$\mu_L \cdot \vec{E}_L = \mu_{A^-} \cdot \vec{E}_{A^-} = \mu_{B^-} \cdot \vec{E}_{B^-} = \mu_{C^-} \cdot \vec{E}_{C^-} = \mu_T \cdot \vec{E}_T$$

C'est l'équation caractéristique d'une séparation par isotachophorèse.

Entre chaque zone, il y aura un gradient de champ électrique qui sera fonction de la différence de mobilité effective des ions voisins.

Si l'on travaille avec une densité de courant constante, le produit $\vec{E} \cdot \vec{I}$ (qui peut mesurer la variation de chaleur) variera d'une zone à l'autre. Les champs électriques et les températures en fonction des zones sont représentées sur la figure ci-contre ainsi que les variations du potentiel.

Cette différence de gradient de potentiel induit deux caractéristiques importantes de l'isotachophorèse :

- "auto-correction" de frontière :

Au contraire des autres méthodes où la netteté des frontières est atteinte par la diffusion ou l'adsorption ; dans cette méthode le gradient de champ électrique empêche ces phénomènes.

Si un ion passe dans une zone où règne un champ électrique plus important, il va acquérir une plus grande vitesse et ainsi réintégrer sa zone. Si il diffuse dans la zone précédant la sienne, où le champ électrique est plus faible, sa vitesse diminuera et il rattrapera sa propre zone.

- le gradient de température :

Par un détecteur thermique les différentes zones pourront ainsi être détectées.

b - 2 : Dispositif expérimental.

- tube capillaire en verre ou en téflon, thermorégulé
 - o de diamètre compris entre 0,4 et 0,6 mm.
 - o de longueur comprise entre 20 et 100 cm selon les différences de mobilité des constituants.

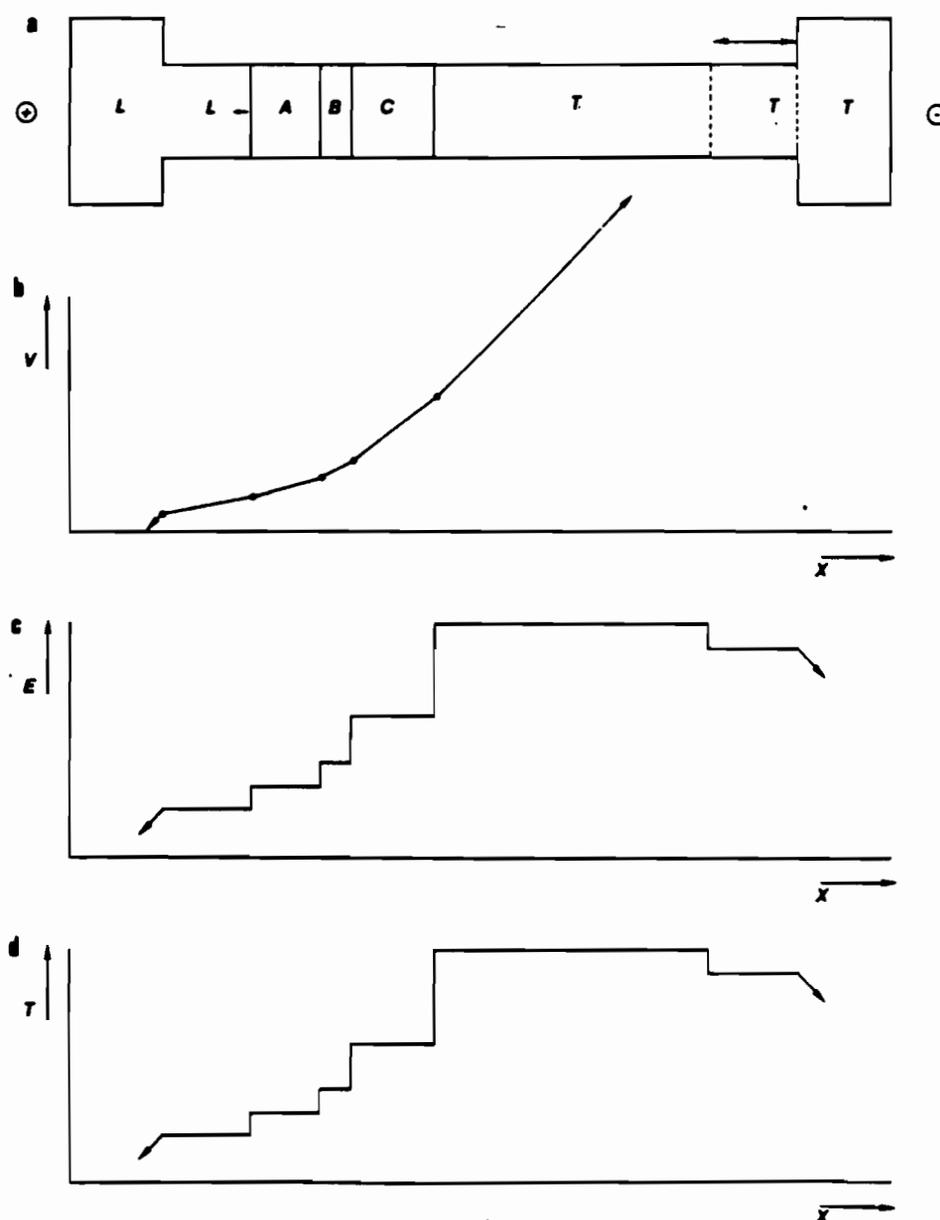


Figure 19 : a - état final obtenu après une analyse par isotachophèse.
 Représentations graphiques : (X représente la position de l'élément)
 b - du potentiel V
 c - du champ électrique E au stade terminal de l'analyse
 d - de la température T

(EVEAREST M., 1976)

- les deux compartiments à électrodes sont séparés du tube capillaire par deux membranes semi-perméables.
- intensité constante $\approx 70 \mu\text{A}$
- potentiel : il varie entre 20 et 20 KV
- détecteurs :
 - o thermométrique ; universel mais de précision moyenne
 - o dont le principe se fonde sur la mesure de conductivité, du potentiel ou de l'absorption UV ; de mise en œuvre délicate et souvent spécifique d'une expérience donnée.
- prise d'essais : de 1 à 5 μl .

b - 3 : Conclusions.

L'analyse peut être qualitative ou quantitative. Dans ce dernier cas, il existe une relation linéaire entre la longueur de la zone et la quantité de l'espèce ionique isolée. Il faudra de toute façon procéder à un étalonnage avec toutes les espèces présentes dans l'échantillon.

Les applications de l'isotachophorèse sont nombreuses aussi bien pour les ions minéraux, que pour les ions organiques. Pour les protéines il conviendra d'inclure des substances ampholytes qui, en augmentant la conductivité de l'électrolyte, diminueront l'échauffement.

La figure 10 de la page 51 représente un exemple d'isotachophorégramme.

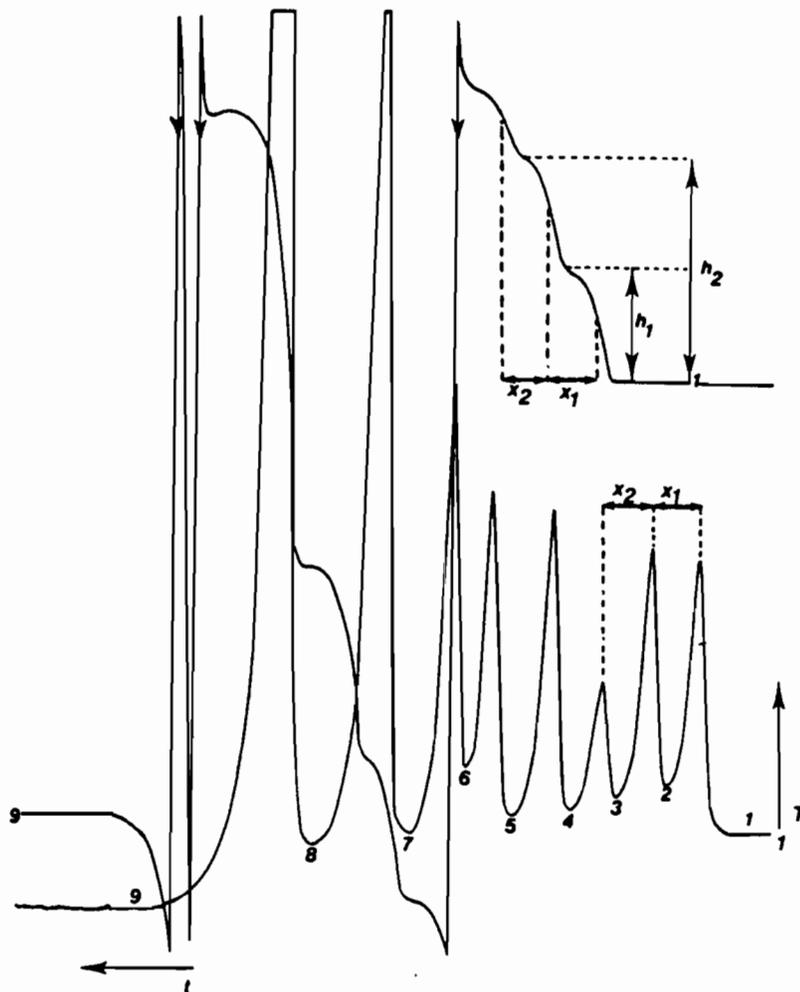


Figure 20 : Isotachophoregramme obtenu après la séparation de quelques cations, le solvant était du méthanol, et l'on a utilisé un détecteur thermique.
 1 = H^+ (ion meneur) ; 2 = $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$; 3 = NH_4^+ ; 4 = K^+ ; 5 = Na^+ ;
 6 = Li^+ ; 7 = Mn^{2+} ; 8 = Cu^{2+} ; 9 = Cd^{2+} (ion terminal).

h1 = information qualitative : ion tétraméthyl-ammonium

h2 = " " : ion ammonium

h1 et h2 sont rapportées à la "température" de l'ion meneur

x1 et x2 sont une mesure des quantités des ions concernés

T = température

t = temps.

2 - Electrophorèse dans des milieux anti-convection

Généralités :

Ce sont les méthodes d'électrophorèse les plus utilisées. Elles sont applicables aussi bien à la séparation des macro-molécules chargées, qu'à la séparation de petits ions organiques et minéraux. En électrophorèse préparative, certaines d'entre elles permettront la préparation de constituants purs.

Principe :

Pour la description du principe, nous considérerons, que la chambre de séparation est un tube de diamètre étroit, connecté à une anode et à une cathode. Le signe distinctif, de l'électrophorèse de zone en général d'ailleurs, sera que les compartiments anodiques, cathodiques et la chambre de séparation, sont remplis avec un électrolyte appelé électrolyte de fond ou électrolyte support. C'est lui qui transportera le courant électrique et, généralement, il aura un pouvoir tampon assez important.

L'échantillon, mélange d'espèces positives et négatives, est introduit dans le système dans l'électrolyte support. En règle générale, la concentration de l'électrolyte de fond est grande par rapport à celle de la prise d'essai à analyser. Cette concentration importante permet le maintien d'un champ électrique constant, et son pouvoir tampon, un pH constant dans le système.

Ces conditions feront que l'espèce à étudier, migrera avec une vitesse constante. Les variations de pH et de gradient de potentiel qu'elle induit étant négligeable.

Si les vitesses de migration des différentes espèces sont suffisamment différentes on obtiendra une bonne séparation, chaque zone étant séparée par une bande contenant la solution tampon.

A titre d'exemple, nous étudierons la migration de trois espèces anioniques A, B, C et d'une espèce cationique D. L'électrolyte de fond comprendra une espèce anionique Q et une espèce cationique P.

Un champ électrique est ensuite appliqué et, au bout d'un temps t suffisant, (il sera fonction de la différence qu'il existe entre les vitesses de migration des différentes particules), on observe la séparation des différentes espèces.

La figures 21 a et b représentent, schématiquement, une telle expérience.

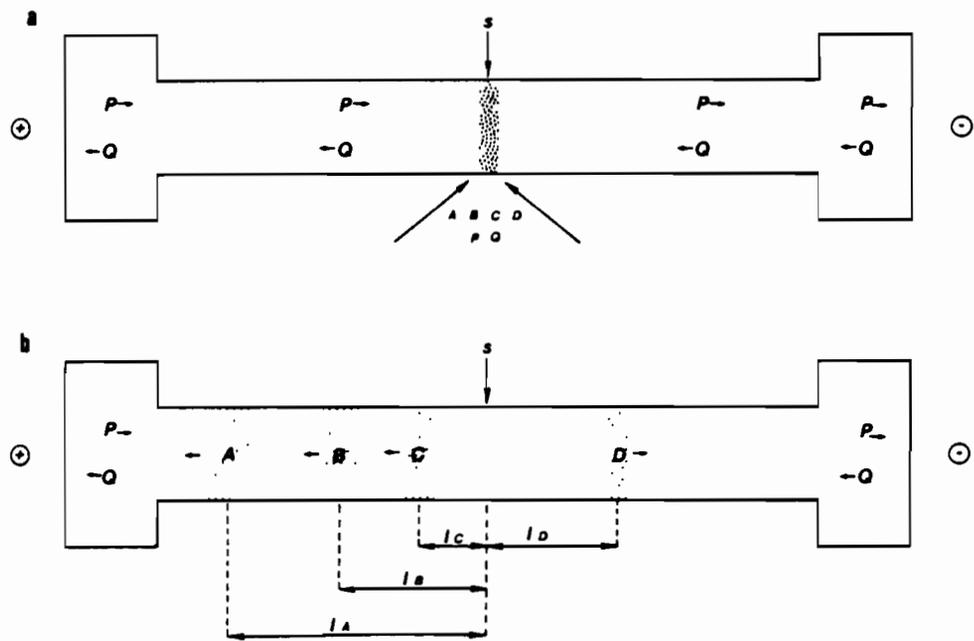


Figure 21 : Séparation électrophorétique d'espèces anioniques A, B et C et d'une espèce cationique D par électrophorèse de zone. Tous les compartiments sont remplis avec l'électrolyte P^+Q^- .

a - injection de l'échantillon

b - toutes les espèces ioniques sont séparées : les distances l_A , l_B , l_C et l_D pourront être utilisées pour la détermination des espèces ioniques A, B, C et D.

(EVEAREST M., 1976)

Pour corriger l'influence de différents facteurs (que nous aborderons un peu plus en détail dans le chapitre suivant), on rapporte la longueur de migration des espèces étudiées à celle d'une espèce ionique standard, nous permettant ainsi d'identifier ces éléments. On détermine ainsi une grandeur R_F .

$$R_F = \frac{l(\text{espèce ionique})}{l(\text{espèce standard})}$$

Dans notre exemple, les valeurs seront prises relatives à l'espèce anionique C.

$$R_F(A) = \frac{l_A}{l_C} \quad \text{et} \quad R_F(B) = \frac{l_B}{l_C}$$

Très souvent la détection est effectuée par une méthode spécifique, colorant propre à révéler chaque groupe d'espèces. Par exemple ; rouge ponceau ou amidoschwartz pour les protéines, rouge de ciba pour les lipoprotéines. Une information quantitative sera obtenue par mesure de l'intensité de la couleur due à la réaction produite, tandis qu'une information qualitative (identification) sera obtenue à partir des distances de migration.

Avantages et inconvénients :

1°) Avantages

Certains avantages présentés par ces méthodes, par rapport à l'électrophorèse libre, sont à noter (TISELIUS et FLODIN) :

- la séparation des différentes espèces est complète, dans chacune des zones se trouve une espèce de vitesse de migration donnée. On n'a plus affaire, comme en électrophorèse libre, à une simple séparation de frontière. Il pourra être possible, par découpage des différentes zones, d'isoler les différentes fractions. Elles pourront soit être mise en solution, soit conservées sur leur support, séchées, en vue d'analyse ou comparaison ultérieures
- les anomalies de frontière n'interfèrent pas.
- l'appareillage nécessaire est en règle générale de mise en œuvre simple et peu coûteux. (spécialement lorsque le tampon est fixé sur un support solide).
- la quantité d'échantillon peut être très faible. Dans le cas du sérum sanguin, quelques gouttes suffisent.

Les avantages que nous venons d'énumérer sont cependant obtenus le plus souvent aux dépens de la précision des résultats obtenus par l'électrophorèse libre, en particulier si l'on veut employer ces méthodes pour déterminer des mobilités absolues ou des points isoélectriques. Nous allons examiner les paramètres induits par le milieu anti-convection.

2°) Inconvénients

- adsorption sur le support : elle freine la migration de certaines particules.
- ultrafiltration : elle joue un rôle important pour les macro-molécules en particulier lors de l'électrophorèse sur gels. S'il s'agit par exemple de gel d'amidon, les dimensions des pores sont de l'ordre de grandeur de celles des protéines. Du fait de l'agitation thermique, les chaînes de polysaccharides présentent une variation continue dans la dimension de leurs pores. Les molécules de grandes dimensions trouvent, mais rarement, des pores qu'elles peuvent traverser. Leur migration dans le gel est ainsi nettement ralentie.
- évaporation de l'électrolyte : particulièrement sensible en électrophorèse sur papier.
- courant électroosmotique : faible dans le cas d'électrolytes forts (KCl 1M) relativement important s'il s'agit d'électrolytes faibles. Un flux électroosmotique important est constaté en particulier lors d'électrophorèses sur papier ou sur gel d'agar-agar. Son origine réside dans les charges négatives contractées par le support au contact de la solution. Son effet pourra être évalué de la manière suivante : à côté de la particule chargée $+$, on placera une particule de même poids mais, non chargée, et l'on retranchera son déplacement à celui de la particule chargée. Le Dextran est employé pour les protéines, la dextrine pour l'albumine ; ils servent de substance indicatrice.

Si d est la distance observée de déplacement de la particule chargée :

$$d = d_e + d_0$$

où : d_0 est le déplacement dû à l'électroosmose (positif si la particule est chargée négativement).

d_e est le déplacement dû à la migration électrophorétique.

- facteur de tortuosité : il est imputable au trajet souvent tortueux que les particules chargées sont obligées de parcourir au travers du support.

KUNKEL et TISELIUS (1951) ont proposé un schéma permettant de tenir compte de ce phénomène. Les équations sont établies pour des systèmes où l'évaporation est nulle et l'adsorption négligeable.

En électrophorèse libre nous avons les relations :

$$\begin{aligned} v &= \mu E \\ \frac{d}{t} &= \mu \frac{V}{l} \\ \mu &= \frac{d l}{V t} \quad (1) \end{aligned}$$

où : μ : mobilité
 d : distance parcourue par la particule
 l : longueur sur laquelle la différence de potentiel est appliquée
 t : temps
 V : tension appliquée

Une autre expression peut être donnée en introduisant comme paramètres l'intensité du courant i et la conductance spécifique du tampon κ .

$$V = R i = \frac{1}{\rho} \frac{S}{l} i = \kappa \frac{S}{l} i$$

et l'équation (1) devient :

$$\mu = \frac{d S}{t} \cdot \frac{\kappa}{i} \quad (2)$$

où : S : est la surface de la veine liquide

Cette équation n'est pas applicable au trajet à travers un support poreux et il faudra apporter une correction.

La figure 22 représente le mécanisme de la migration ionique à travers un support poreux : papier filtre d'après KUNKEL et TISELIUS.

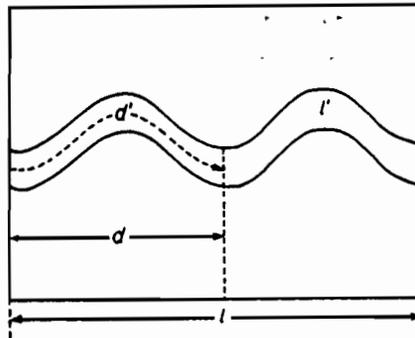


Figure 22 : Mécanisme de la migration ionique.

(RIBEIRO L.P., 1961)

Les relations suivantes vont nous amener à la détermination du facteur de correction dû à la tortuosité.

On a évidemment :

$$l' = l \left(\frac{l'}{l} \right)$$

d'où :

$$d' = d \left(\frac{l'}{l} \right)$$

La distance parcourue en électrophorèse libre peut être tirée de l'équation (2) :

$$d = \frac{\mu t}{S} \frac{i}{\chi}$$

En électrophorèse sur papier nous avons donc :

$$d' = \frac{\mu t}{S_p} \frac{i}{\chi}$$

où : S_p : est la section principale du papier.

$$d \left(\frac{l'}{l} \right) = \frac{\mu t}{S_p} \frac{i}{\chi}$$

$$d = \frac{\mu t}{S_p} \cdot \frac{i}{\chi} \left(\frac{l}{l'} \right)$$

Si l'on procède de même avec l'équation (1) on obtient :

$$d = \frac{\mu t v}{l} \left(\frac{l}{l'} \right)^2$$

où : $\left(\frac{l}{l'} \right)$: est le facteur de tortuosité.

Ce facteur correctif peut être atteint expérimentalement par la mesure de la résistance du papier en appliquant la relation :

$$l' = \sqrt{R \ V_p \ \chi}$$

où : V_p : est le volume occupé par le tampon selon le trajet .

Nous avons en effet :

$$R = \frac{1}{\chi} \cdot \frac{l'}{S_p} \quad (5)$$

$$V_p = l' \cdot S_p \quad \rightarrow \quad S_p = \frac{V_p}{l'}$$

Substituée dans la relation (5) :

$$R = \frac{1}{\chi} \frac{l'^2}{V_p} \quad \rightarrow \quad l' = \sqrt{R \ V_p \ \chi}$$

Ce coefficient a été calculé pour différentes sortes de papier lors de l'étude de la sérulalbumine humaine. Tampon véronal pH = 8,8, force ionique = 0,1.

Calcul du facteur de correction l/l' pour différentes sortes de papier.

Papier	μ_o	$\left(\frac{l}{l'}\right)$	$\mu_{corr.}$
Munktell n° 20/150	$4,01 \pm 0,09$	$0,77 \pm 0,03$	6,78
Ford, papier filtre	$3,21 \pm 0,12$	$0,70 \pm 0,04$	6,53
Schleicher et Schüll n° 413	$2,34 \pm 0,21$	$0,58 \pm 0,06$	6,85

Tableau V (WUNDERLY Ch., 1956)

où : μ_o est la mobilité observée ($\mu m/sec/volt/cm$)
 μ_{corr} est la mobilité corrigée ($\mu m/sec/volt/cm$)

En observant ce tableau, il apparaît que quelque soit le papier employé, les mobilités sont égales. (après correction avec le facteur $\frac{l}{l'}$.)

Dans le tableau ci-dessous, plusieurs répétitions ont été effectuées (papier MUNKTELL N°20 150) et comparées à des résultats obtenus en veine liquide (DOLE 1964).

Expérience N°	Albumine	Globulines			
		α_1	α_2	β	γ
1	6,18	1,86	3,96	3,15	1,45
2	6,53	5,04	1,09	3,06	1,24
3	6,62	5,32	3,77	2,84	1,12
4	6,60	5,38	4,01	3,05	1,25
Moyenne μ_{corr}	6,48	5,15	3,97	3,02	1,27
Moyenne d'après DOLE (67)	5,94	5,07	4,08	2,83	1,02

Tableau VI (WUNDERLY Ch., 1956)

Il existe une très bonne corrélation entre les deux familles de valeurs.

- diffusion : un des inconvénients majeur des méthodes de détection liées à ce type d'électrophorèse est que la détection intervient après que la séparation ait eu lieu. Il s'en suit, (du fait des interventions nécessaires : colorations par exemple qui requièrent un certain temps) des phénomènes de diffusion. Cette diffusion a lieu également au cours de l'analyse en fonction du temps et au faire et à mesure que la migration a lieu diminuant ainsi la concentration relative des constituants.

Appareillages :

Dès 1950 différents supports ont été proposés pour effectuer de l'électrophorèse sur un support stabilisant l'électrolyte. Il peut être du papier filtre (DURRUM, GREMER et TISELIUS, GRASSMAN et HANNING en 1950), de l'acétate de cellulose (KOHN 1957), du gel d'agar-agar (GRABAR et WILLIAM 1953, WIENNE 1959).

D'un emploi très simple ces supports sont couramment utilisés.

Quel que soit la nature du support utilisé, la cuve à électrophorèse comprend essentiellement au moins deux bacs contenant le tampon et une électrode. L'anode et la cathode sont reliées à un générateur de courant continu. Les extrémités du support poreux trempent dans la solution d'électrolyte ou lui sont reliées par du papier filtre. L'ensemble peut être recouvert d'un couvercle. Il faut également prévoir un circuit de refroidissement du support poreux.

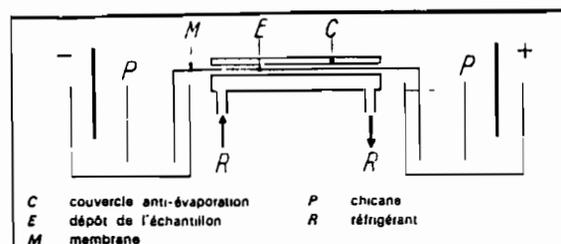


Figure 23 Électrophorèse sur membrane en acétate de cellulose : dispositif expérimental.

(MANENC J., SANCHEZ V., 1980)

Séparation à deux dimensions :

A côté de la séparation unidimensionnelle des substances chargées, il faut aussi noter la séparation à deux dimensions.

Par commodité, nous inclurons dans ce groupe les systèmes dans lesquels l'électrophorèse est associée à la chromatographie sur papier (Certains auteurs, cependant, pensent que l'on ne peut pas dire que cette méthode soit réellement à deux dimensions) ; elle est parfois appelée "électrochromatographie".

C'est DURRUM en 1950 qui a décrit cette méthode.

Les séparations étaient basées sur le fait que certaines substances, tels les amino acides, migraient avec des mobilités effectives différentes selon la valeur du pH. Ainsi, la séparation a lieu dans une direction à un pH donné, puis, à une autre valeur de pH (avec une relation de mobilité différente) dans une direction perpendiculaire à la première.

Sur la figure ci-contre est représenté un tel électrophorégramme. DURRUM a eu la confirmation expérimentale que, pour de tels composés, la séparation était meilleure à basse température.

MEAD en 1954 propose, après électrophorèse selon une direction, de changer le pH du tampon en l'exposant à des vapeurs d'ammoniaque. Cette méthode a été très utilisée pour la séparation des principaux acides aminés ; acides glutamique et aspartique, de la cystine, glycine, alanine etc... Il n'est cependant pas possible de séparer la leucine de l'isoleucine.

SMITHIES et POULIK en 1958 ont décrit une intéressante méthode à deux dimensions. Electrophorèse sur papier suivie, à angle droit par une séparation sur gel d'amidon. En utilisant cette méthode, environ 20 composants peuvent être séparés dans le sérum humain. PEETERS et al. (1959) ont étudié la distribution des ions sur le papier durant une séparation à deux dimensions. Ils en ont conclu qu'il y avait une distribution caractéristique des ions en fonction de la conductivité.

L'association de l'électrophorèse avec la chromatographie sur papier est également utilisée fréquemment spécialement pour la séparation des acides et des bases aminées. Ces procédés donnent de bons résultats.

Les différences fondamentales entre ces méthodes viennent du fait que certaines sont discontinues et d'autres ne le sont pas.

Choix du support :

Papier filtre : actuellement principalement pour la séparation des petits ions qui nécessite un champ électrique élevé

Acétate de cellulose : très utilisé en analyse de routine.

Gels : permettent une grande résolution.

1^{er} groupe de support :

a) Electrophorèse sur papier

a - 1 : Appareillages et mode opératoire :

Le papier filtre (bande ou feuille d'environ 30 cm de longueur) est plongé dans la solution tampon, puis, laissé au repos quelques minutes pour éliminer le surplus entre deux feuilles de papier absorbant.

La solution à analyser est déposée, à l'aide d'une micropipette, au centre de la feuille. (10 à 400 mm³ selon la nature de la solution et sa concentration).

Ainsi préparée la feuille est déposée dans l'appareil à électrophorèse et l'on établit le courant.

basse tension : 100 à 200 volts pour les protéines.
Durée d'électrophorèse environ 12 à 20 heures.

La mise en évidence a lieu ensuite : il faut d'abord dénaturer la protéine afin qu'elle reste fixée sur le support puis la mettre en évidence par un colorant si cela n'a pas été fait avant l'analyse. Elle pourra être isolée puis dissoute dans un solvant approprié et enfin soumise à une analyse photométrique. Il est également possible, après trempage de la bande dans une solution convenable, de procéder directement sur celle-ci à une lecture photométrique directe.

haute tension : 1000 à 3000 volts : elle est utilisée pour de petites molécules (acides aminés, peptides, ions minéraux ...)

Exemple d'une électrophorèse à une dimension sur papier du
sérum humain

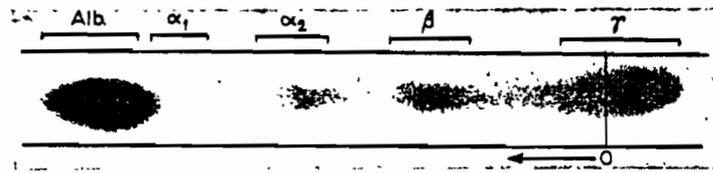


Figure 24 : Electrophorégramme d'un sérum humain : la séparation est faite dans un tampon barbital de pH = 8,6 et de force ionique = 0,06. Les protéines sont colorées au bleu de bromophénoï. (RIBEIRO L.P., 1961)

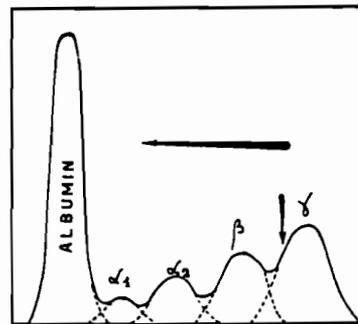


Figure 25 : Diagramme obtenu à partir d'un électrophorégramme de sérum humain normal, montrant les différentes surfaces correspondant aux différentes fractions. (RIBEIRO L.P., 1961)

Fraction	Area	%
Albumin	57.8	62.9
α_1 -Globulin	1.4	4.9
α_2 -Globulin	3.5	8.2
β -Globulin	8.1	13.8
γ -Globulin	11.5	19.9

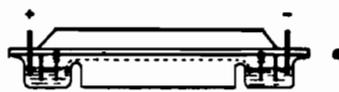
Tableau où sont regroupées les valeurs obtenues à partir du diagramme de la figure 25.

Tableau VII (RIBEIRO L.P., 1961)

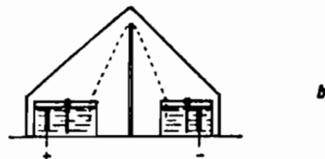
Dans ce cas le refroidissement doit être très efficace. La révélation est, là encore, fonction de la substance. Par exemple : révélation par la ninhydrine qui donne une coloration pourpre avec le plupart des acides aminés et jaune avec la proline et l'hydroxypropiline.

Pour les ions minéraux, il faudra quelque fois, lorsque leur mobilités ioniques ne sont pas suffisamment différentes, avoir recours à la complexation de l'un d'entre eux pour accroître l'écart.

Quelques exemples schématiques d'appareils utilisés en électrophorèse sur papier à une dimension :



a) le papier est disposé horizontalement



b) le papier est relevé en son milieu. Ce dispositif a permis à MACHEBOEUF et al. en 1953 de découvrir que, dans un tel système, l'évaporation était minimale au niveau de l'arête. Combinée avec l'étude de l'électroosmose, à l'aide de glucose, il a été déterminé une ligne de flux nul vers le compartiment cathodique. Quel que soit leur point de départ, les particules de glucose se regroupent sur cette ligne au bout de 7 heures.



c) Le papier est disposé entre deux plaques de verre pour éviter l'évaporation.



d) Le papier est disposé dans un liquide réfrigérant : chlorobenzène ou tétrachlorure de carbone.

Figure 26 : Dispositifs divers pour électrophorèse sur papier.

(MILAZZO G., 1969)

Pour ces deux derniers systèmes il est possible d'employer des courants pouvant atteindre 500 mA. Utilisation possible d'électrolytes forts 10 M sous 200 volts (dispositifs à basse tension) ou bien des électrolytes faibles sous de hautes tensions.

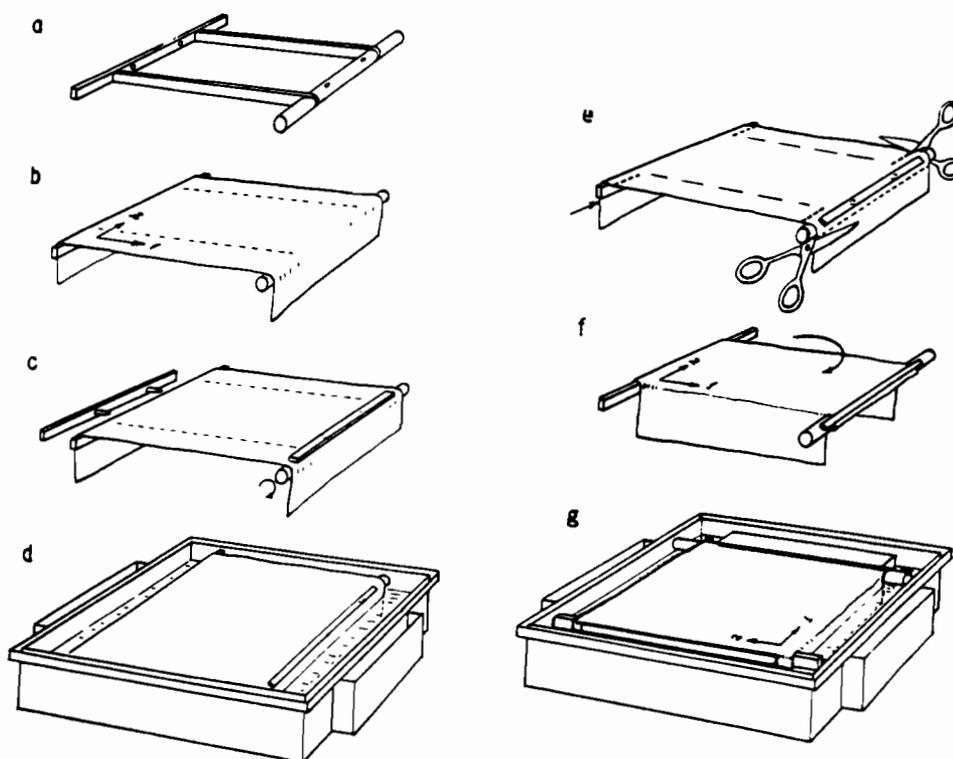
Sur les trois pages suivantes sont présentés des schémas d'appareils pour analyse à deux dimensions.

Pour ces analyses, on retrouve les mêmes types d'appareils que pour les études à une dimension. (Figures 27)

figure (a) : le papier est disposé horizontalement

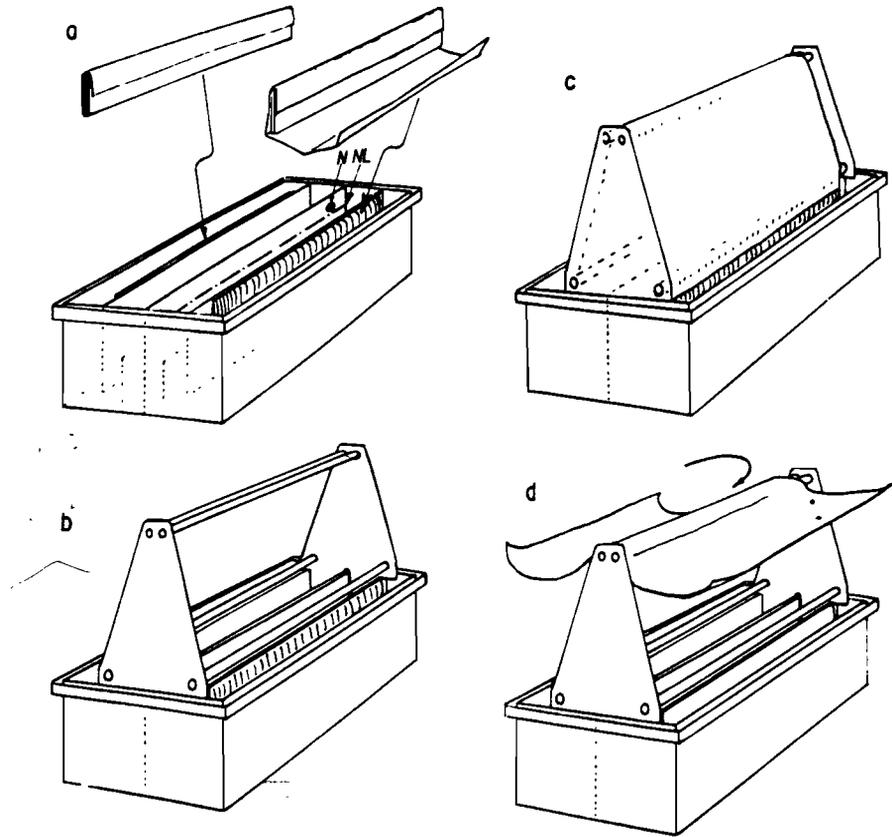
figure (b) : le papier est relevé

figure (c) : le papier est supporté par un plateau.



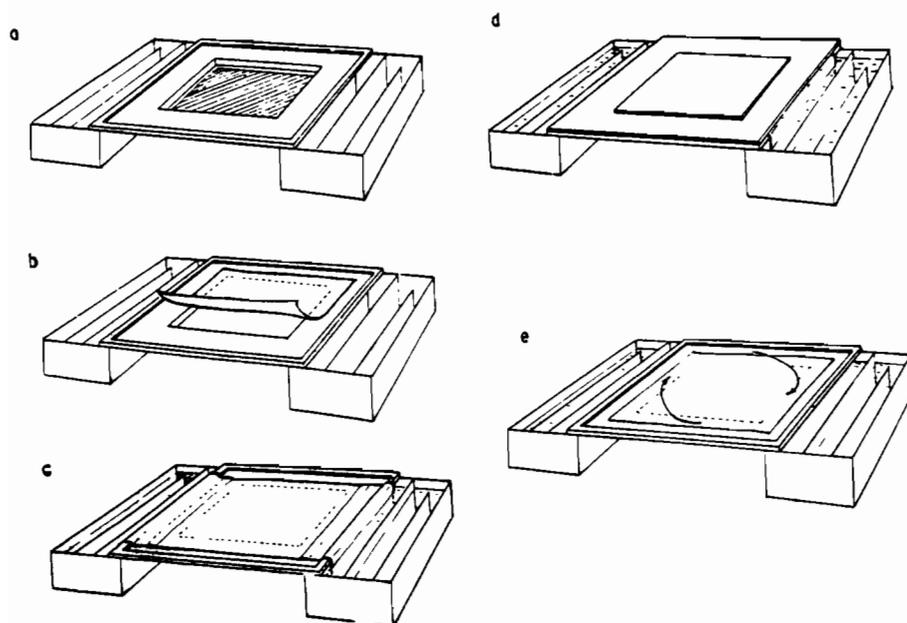
(RIBEIRO L. P., 1961)

Figure 27 - a : Différentes étapes de la mise en place de l'appareillage en vue d'une électrophorèse à deux dimensions avec un appareil où le papier est disposé horizontalement.



(RIBEIRO L. P., 1961)

Figure 27 - b : Différentes étapes de la mise en œuvre de l'appareillage en vue d'une électrophorèse sur papier à deux dimensions. Le papier est ici relevé en son milieu.



(RIBEIRO L. P., 1961)

Figure 27 - c : Différentes étapes de la mise en place d'un dispositif d'électrophorèse à deux dimension. Le papier est ici disposé sur un plateau.

a - 2 : Avantages et inconvénients :

Avantages ; ce type de support permet

- l'utilisation de champs électriques élevés.
- la stabilisation des constituants
- une grande simplicité dans la mise en oeuvre et une rapidité d'exécution de l'analyse

Inconvénients ;

- l'importance du phénomène électroosmotique dû à la charge électrique du papier
- l'adsorption spécifique de certains composés protéiques par exemple.

a - 3 : Conclusion :

Ce milieu anticonvection a été largement utilisé pour l'analyse des protéines dans un but clinique. Il reste utilisé pour des analyses de routine en sciences du sol.

b) Electrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose

b - 1 : Appareillages et mise en oeuvre :

Les montages expérimentaux sont très simples. Ils sont identiques à ceux utilisés en électrophorèse horizontale.

Un exemple est présenté ci-dessous :

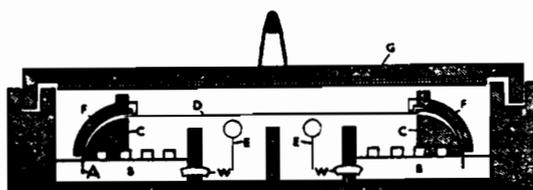


Figure 28 : Schéma de l'appareil d'électrophorèse sur membrane de SHANDON.

- A - Bande de papier
- B - Tampon
- C - Supports de la membrane
- D - Membrane
- E - Electrodes
- F - Supports de la membrane
- G - "Eponge".

(RIBEIRO L.P., 1961 d'après KOHN J.)

- La prise d'essais dépendra du type d'appareillage et sera comprise entre 0,1 et 5 μg .

Le dépôt peut avoir lieu : au centre, ou à proximité d'une des extrémités de la membrane.

- durée : de quelques minutes à plusieurs heures.

- révélation des espèces par coloration spécifique

- analyse quantitative par densimétrie ; après que la membrane ait été rendue transparente (méthanol-acide acétique-diacétone-alcool).

L'exemple ci-dessous représente un électrophorégramme obtenu sur membrane en acétate de cellulose.

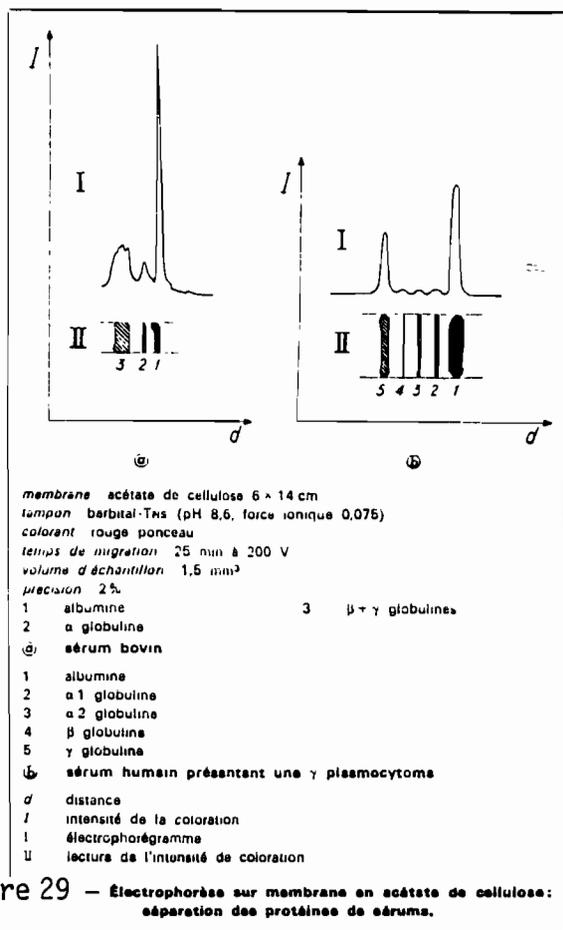


Figure 29 – Électrophorèse sur membrane en acétate de cellulose : séparation des protéines de sérums.

(MANENC J., SANCHEZ V., 1980)

b - 2 : Avantages et inconvénients :

Avantages : (par rapport au papier)

- le support est chimiquement pur ; il y a peu de contaminants pour les protéines.
- absence, presque totale, de phénomènes d'absorption.
- pouvoir de résolution meilleur : les bandes sont très nettes et le temps d'analyse est plus court. Ceci est dû à une porosité plus uniforme.
- meilleure reproductibilité des résultats.
- dissolution totale dans les solvants si analyse par élution.
- transparence totale lors d'analyse par densitométrie directe.

Inconvénients :

- faible résolution par rapport à d'autres techniques (électrophorèse sur gel par exemple). Dans le sérum humain, on dénombre
 - * 5 zones sur acétate de cellulose
 - * 15 zones sur gel
- phénomène de diffusion important.

b - 3 : Conclusions :

Cette technique est simple et facilement utilisable en analyse de routine ; elle peut être automatisée.

Pour remédier à son manque de résolution, il est possible de l'associer à une séparation à deux dimensions :

- électrochromatographie
- électrophorèse bi-dimensionnelle.

Les applications de l'électrophorèse sur acétate de cellulose sont nombreuses en biochimie.

2^{ème} groupe de support :

Les gels actuellement utilisés sont au nombre de trois. Ils ont préparés extemporanément et coulés sur un support.

- gel d'agar-agar (gélose) : utilisé principalement lors d'analyse immuno-électrophorétique.
- gel d'amidon et gel de polyacrylamide : utilisé pour la séparation des substances biochimiques si une résolution très importante est souhaitée.

Avec chacun, il sera possible d'effectuer :

- une électrophorèse sur couche mince (gel déposé sur une plaque) de mise en oeuvre délicate mais permettant l'analyse de très petites quantités d'échantillon.

- une électrophorèse en tube : plus facilement utilisable au niveau d'un laboratoire d'analyse

a) Analyse immuno-électrophorétique :

a - 1 : Généralités :

GRABAR et WILLIAMS (1953) ont proposé une méthode combinant

- l'électrophorèse (en milieu gélosé : gel d'agar-agar à 1 %, coulé à chaud sur plaque de verre et qui présente l'avantage de ne pas provoquer d'inter-action avec les protéïnes), dans une direction.

- l'analyse immuno-chimique par diffusion.

C'est un perfectionnement apporté par rapport aux autres méthodes car, elle va permettre :

- l'identification de constituants différents ayant la même mobilité.

- la mise en évidence de constituants très peu abondants.

a - 2 : Principe:

L'immuno-sérum (anti-sérum humain normal) est obtenu en infectant à un animal la fraction protéïque à étudier. Il réagit en fabriquant des anti-corps. A chaque élément du mélange de protéïnes correspond son anti-corps qui réagit avec lui de façon spécifique.

On effectue tout d'abord une électrophorèse du mélange de protéïnes ; on obtient ainsi, au bout d'un certain temps, une séparation des constituants selon un axe Ox.

Dans une gouttière latérale creusée parallèlement à la direction de migration, est déposé l'antisérum (mélange d'anti-corps).

Après double diffusion durant quelques heures à quelques jours, on obtient, au niveau des points de rencontres, une série

de fines lignes de précipités dues à la formation de complexes antigènes-anticorps. Ces lignes ont le plus souvent la forme d'un arc d'ellipse. "A chaque protéine du mélange correspond une ligne et une seule".

La figure ci-dessous représente schématiquement un tel phénomène.

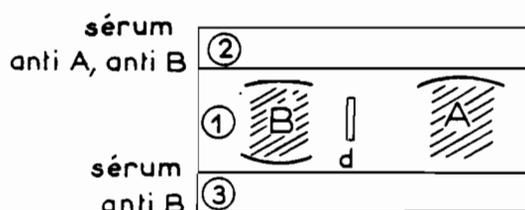


Figure 30 - Principe de l'analyse immunoélectrophorétique de GRABAR et WILLIAMS

En 1 : électrophorèse en milieu gélatiné d'un mélange de deux protéines A et B. Les hachures figurent l'emplacement des protéines à la fin de l'expérience. d = gouttière de départ.

En 2 : Lorsque l'électrophorèse est terminée, on place en 2 un immunosérum d'animal antiprotéine A et antiprotéine B.

En 3 : on place en 3 un immunosérum d'animal antiprotéine B.

Après une diffusion de quelques jours, la précipitation antigène-anticorps se traduit par l'apparition de traits blancs à l'intérieur du milieu gélatiné.

(BOULANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

Il est possible, lorsque la diffusion a eu lieu, d'ajouter des colorants qui vont faciliter la caractérisation des différentes protéines.

a - 3 : Exemple :

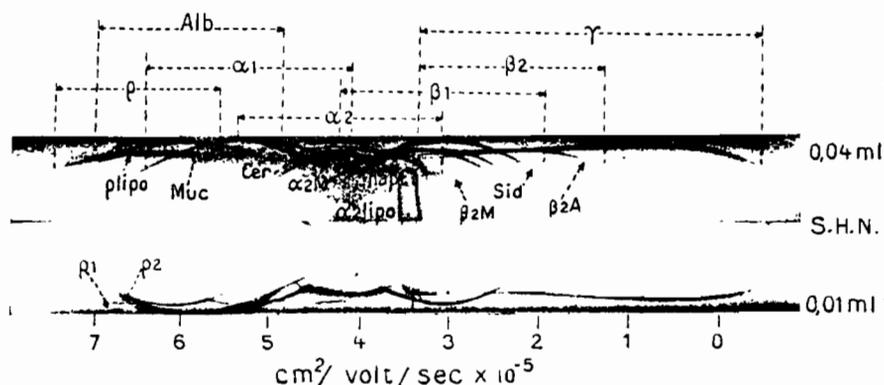


Figure 31 - Analyse immuno-électrophorétique d'un sérum humain normal.

En haut : 0,04 ml de sérum humain; en bas : 0,01 ml du même sérum. Le développement a été fait avec un sérum de cheval (n° 282) anti-sérum humain normal. Electrophorèse en gel de gélose à 1,5 p.100, tampon véronal pH 8,2; $I/2 = 0,03$; environ 4 V/cm; 4 heures. Coloration, après séchage, par l'azo-carmin.

(Cliché dû à l'obligeance du Pr P. GRABAR).

(BOULANGER P. et POLONOVSKI J., 1959)

16 à 18 composants peuvent être identifiés dans l'ordre de leur mobilité décroissante

a - 4 : Conclusion :

Cette méthode utilise :

- la grande spécificité des réactions immunochimiques
- le pouvoir de résolution important de l'électrophorèse.

C'est donc une méthode d'analyse qualitative extrêmement fine ; permettant de révéler des éléments à l'état de trace. Elle a permis la caractérisation de nombreuses protéines plasmatiques.

Elle ne permet pas d'analyse quantitative.

b) Electrophorèse sur gel d'amidon

b - 1 : Mise en oeuvre :

Technique décrite par SMITHIES (1955).

On chauffe de l'amidon partiellement hydrolysé dans un tampon approprié jusqu'à obtention d'une solution visqueuse, que l'on coule dans un support (plaque de verre ou membrane) sur une épaisseur de 1 mm. Par refroidissement, on obtient la consistance d'un gel.

L'appareillage est très voisin de celui utilisé avec les membranes en acétate de cellulose.

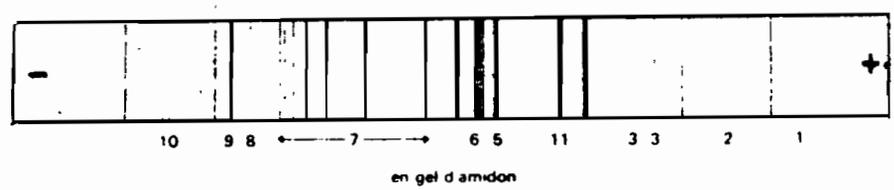
Conditions opératoires :

- volume de l'échantillon : 0,1 à 3 cm³ , inséré dans une fente pratiquée dans le gel.
- champ électrique : 5 à 6 V/cm
- durée de la séparation : quelques heures
- force ionique du tampon : $0,01 < \mu < 0,03$
- le tampon qui sature le gel peut être le même que celui au contact des électrodes ou bien être différent.
- diamètre des pores : diamètre des protéines si l'on ne souhaite pas faire de "tri" en fonction de leurs tailles.

Lorsque la séparation est terminée, on coupe le gel en bandes dans le sens de la longueur

Pour chacune des bandes obtenues : les zones sont révélées puis, on procède au dosage (élution ou densitométrie).

Un exemple d'électrophorégramme est présenté ci-dessous :



- | | |
|-----------------|---------------------------------------|
| 1 préalbumine | 6 transferrine |
| 2 albumine | 7 haptoglobines 2 2 |
| 3 postalbumines | 8 bêta-lipoprotéine |
| 4 Gc component | 9 alpha 2 macroglobuline |
| 5 hémoglobine | 10 haptoglobine 1 1 et ceruloplasmine |

Figure 32 - *Electrophorèse d'un serum humain* (SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

La séparation des constituants du sérum permet d'obtenir 20 bandes

b - 2 : Conclusion :

Technique peut utilisée en raison des difficultés rencontrées lors de l'élaboration du gel d'amidon.

c) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

c - 1 : Généralités :

Cette technique a été décrite par RAYMOND et WEINTRAUB dès 1959. Une étude théorique en a été faite par ORNSTEIN en 1964.

C'est actuellement la technique la plus employée et la plus fine en électrophorèse sur support.

c - 2 : Mise en oeuvre :

Etant la technique la plus utilisée, elle sera décrite un peu plus en détail.

- le gel : c'est un mélange d'acrylamide monomère et d'un monomère divalent : la N N' méthylène bisacrylamide. La polymérisation est induite par photochimie ou par adjonction de peroxydes.

Le gel sera préparé :

- soit directement dans la solution tampon
- soit dans de l'eau ; la solution tampon pénétrant ensuite le gel par diffusion.

Deux paramètres influent sur la préparation :

- la concentration T du gel

$$T = \frac{a + b}{m} \times 100$$

où : a masse d'acrylamide

b masse de N N' méthylène bisacrylamide

m masse totale

et : 3 % < T < 30 %

↓
gel mou

↓
gel dur

La concentration aura une influence sur les propriétés mécaniques et sur la porosité

- le degré de réticulation R :

$$R = \frac{b}{a + b} \times 100$$

Influe sur la taille des pores ; donc sur l'effet de tamis du gel.

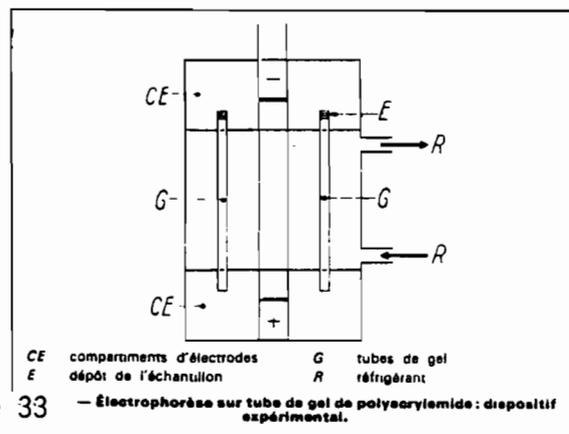
Si R passe de 0 à 5 % ; la taille des pores diminue d'environ 25 %. En général elle sera de 50 μm .

Techniques :

- Electrophorèse sur couche mince

Le protocole est le même que pour le gel d'amidon.

- Electrophorèse en tube :



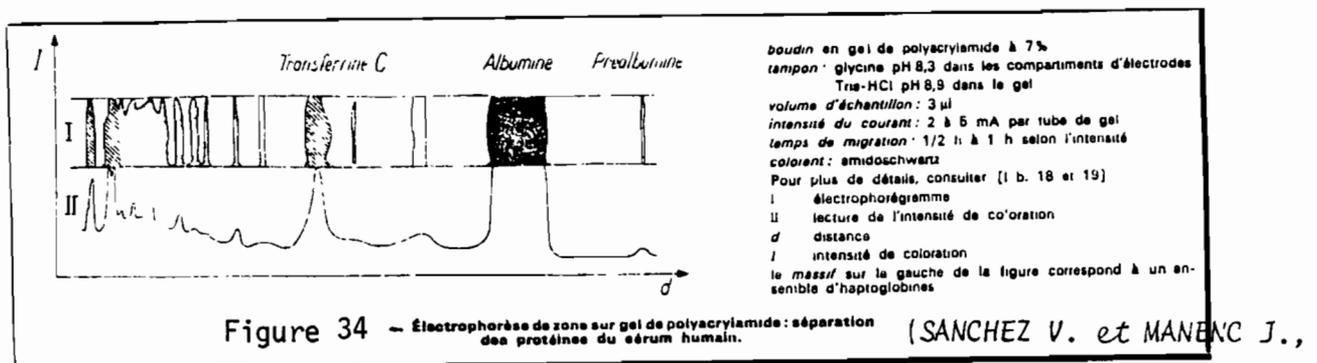
Conditions opératoires :

- le gel, saturé de solution tampon remplit les tubes verticaux G
- les compartiments CE contiennent une solution de même pH.
- l'échantillon E est déposé à une extrémité des petits tubes G.
- le contact électrique est assuré par G
- intensité : 4 mA par colonne
- durée de la séparation : 1 heure.

Lorsque l'on applique le champ électrique, les constituants se séparent sous forme de disques parallèles superposés (d'où le nom de "disc electrophoresis" donné par les anglais à cette méthode).

A la fin de l'opération (que l'on peut visualiser à l'aide d'un produit coloré ajouté comme traceur) ; le gel est sorti du tube, révélé par des colorants appropriés dont on éliminera éventuellement l'excès. En règle générale, cependant, la polyacrylamide ne donne aucune réaction avec les colorants ; le gel reste ainsi transparent. La lecture par densitométrie est aisée.

Ci-dessous ; un exemple d'électrophorégramme de sérum humain obtenu par cette technique.



c - 3 : Avantages :

- bonne résistance mécanique
- porosité reproductible
- pas de phénomène d'absorption ou d'électroosmose
- peu de diffusion
- stabilisation hydrodynamique excellente

- très large éventail de solutions tampons utilisables
- prise d'essai très faible (0,1 μ g)
- transparence naturelle.

c - 4 : Conclusions :

C'est une technique rapide, précise, sensible, reproductible. Elle peut être employée en recherche fondamentale.

Le choix de la porosité :

- porosité constante et définie
- gradient de porosité

en fonction du type d'analyse permet une séparation associant :

- la charges des macro-molécules (vitesse de migration)
- la taille des macro-molécules (filtration).

Il est également à noter que si l'électrophorèse sur gel est réalisée en présence d'urée ou de dodécylsulfate de sodium, la migration des protéines sera proportionnelle à leur poids moléculaire.

B) ELECTROFOCALISATION

1 - Généralités

C'est SVENSSON en 1961 qui a introduit cette technique. Elle a été ensuite développée par VERSTERBERG en 1969.

Elle est principalement utilisée pour la séparation des macromolécules amphotères.

2 - Principe

Cette méthode permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique ; elle utilise un gradient de pH souvent combiné à un gradient de densité.

Le principe de base de l'isofocalisation (autre dénomination de l'électrofocalisation) est que dans la chambre de séparation, le pH varie d'une extrémité à l'autre. Le pH le plus bas vers l'anode et le plus élevé vers la cathode. Quand un mélange d'ampholytes est introduit dans un tel milieu ; chacune des substances va acquérir une charge nette, en fonction de son pH_i propre, positive ou négative selon le pH de la zone d'introduction. Par exemple, si l'on introduit une protéine à un pH supérieur à son pH_i , elle acquerra une charge négative. Si un champ électrique est appliqué, elle migrera vers l'anode jusqu'à la zone de son pH_i . Sa charge est alors nulle et sa vitesse tend vers zéro.

La figure de la page suivante représente la séparation de trois substances dont les pH_i sont 4, 6 et 8 respectivement pour A, B et C. Elles sont introduites à $pH = 6$:

A possède une charge < 0 ; $pH_{int.} > pH_{iA}$; la substance A migrera vers l'anode jusqu'à ce qu'elle atteigne la zone de $pH = 4$.

B possède une charge nette = 0 ; il n'y aura pas de migration.

C possède une charge nette > 0 ; $pH_{int.} < pH_{iB}$; la substance C migrera vers la cathode, jusqu'à ce qu'elle atteigne la zone de $pH = 8$.

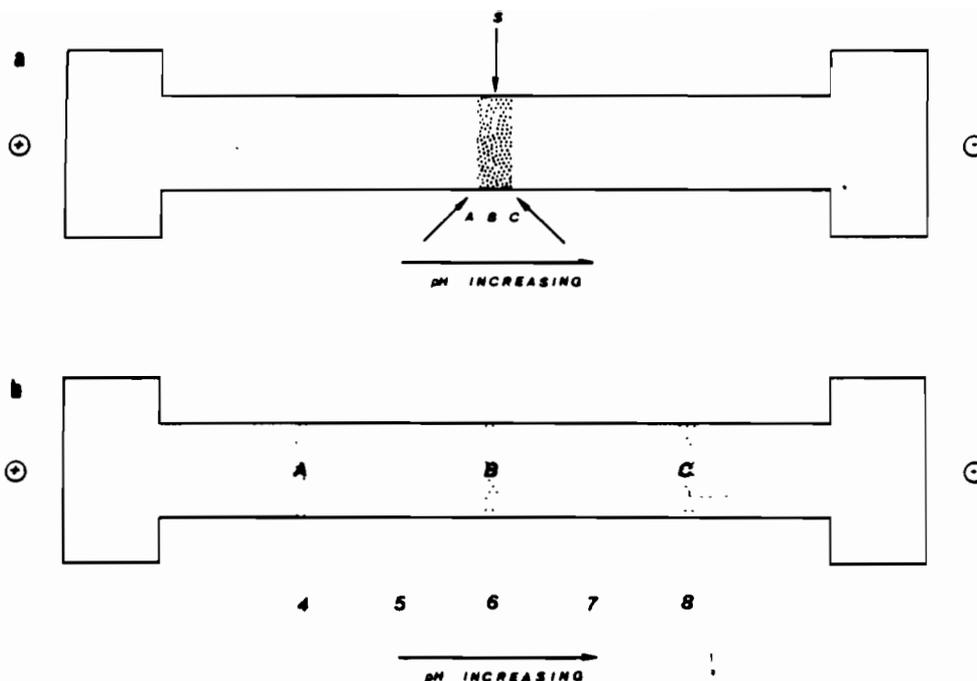


Figure 35 - Séparation de substances amphiprotiques A, B et C avec des valeurs de pI respectivement égales à : 4, 6 et 8 par isofocalisation.

a - introduction du tampon (s = position d'introduction).

b - séparation des espèces A, B et C. (EVEAREST M., 1961)

Par isofocalisation, les constituants du mélange se trouveront séparés, sous réserve qu'ils aient des points isoélectriques différents. Chaque espèce se concentrera dans une zone étroite ; des différences de 0,02 unité pH permettent la séparation !

3 - Réalisation pratique

L'analyse peut s'effectuer sur support en couche mince ou en colonne en phase liquide.

a) sur support :

La mise en œuvre est la même qu'en électrophorèse de zone sur gel de polyacrylamide. On ajoute à ce support une solution d'électrolyte permettant un gradient de pH.

A la fin de l'expérimentation, les protéines sont révélées par coloration et le pH relevé. Le temps de l'expérience sera plus court qu'avec une colonne.

b) sur colonne :

Conditions opératoires :

- la colonne est entourée d'une "jaquette" permettant le réglage de la température pendant l'expérience. La colonne est remplie de l'élec-

trolyte dans lequel est établi un gradient de pH et de densité.

- L'échantillon peut être déposé à un endroit quelconque de la colonne. La position finale sera indépendante de la position de départ.

- L'utilisation de saccharose glycérol etc... permet la création d'un gradient de densité

- La durée de l'expérimentation nécessite 24 à 72 heures.

- La tension est de 200 à 1200 volts sous 10 mA.

Lorsque l'expérimentation est terminée, la colonne est vidée par le tube capillaire et l'on mesure le pH et la concentration des différentes espèces recueillies par colorimétrie.

c) conditions diverses.

- ampholyte-support.

Pour créer un gradient de pH dans l'électrolyte, on mélange un nombre important de substances amphotères ayant des pHi très voisins. Dans un champ électrique continu, entre un compartiment anodique acide et un compartiment cathodique basique, il en résultera la formation d'un gradient de pH.

Les ampholytes supports utilisés sont un mélange d'acides polycarboxyliques et de polyamides, la répartition des groupes aminés, dans la molécule, et des groupes carboxyliques définit le pHi.

Deux groupes existent :

- o à large gamme : 7 unités de pH par exemple
- o à gamme étroite : 2 unités de pH (6 - 8 par exemple)

- précipitation des protéines au pHi.

Elle est évitée :

- en n'introduisant qu'un faible volume d'échantillon : de 0,1 à 10 μ l.
- en augmentant la solubilité des protéines
 - o soit par une concentration plus élevée des ampholytes supports
 - o soit en ajoutant de l'urée.

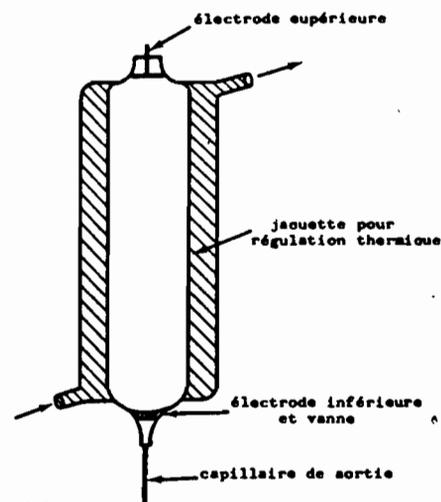
d) Schéma d'une colonne

Figure 36 -
- Représentation simplifiée
d'une colonne pour électrofocalisation
(SANCHEZ V. et MANENC J.,
1980)

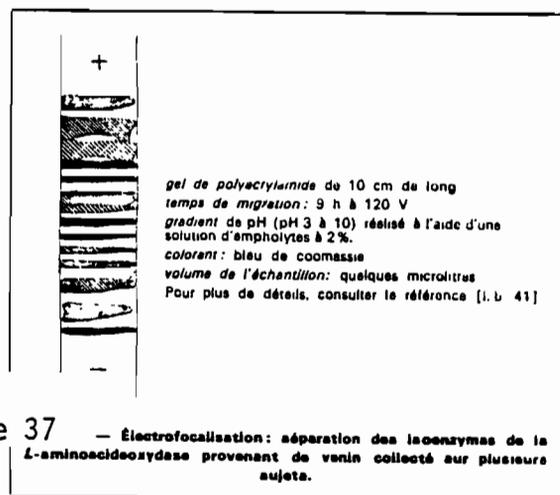
e) Exemple de séparation obtenue

Figure 37 - Électrofocalisation : séparation des isoenzymes de la L-aminoacidoxydase provenant de venin collecté sur plusieurs sujets.

4 - Conclusion

C'est une méthode très fine pour la séparation de constituants ayant des pHi très proches.

Après élimination des ampholytes supports (par dialyse par exemple) elle permet d'obtenir des produits purs.

(SANCHEZ V. et MANENC J.)

VI - ELECTROPHORESE PREPARATIVE1 - Généralités

Seules : l'électrophorèse de zone sur support et l'électrofocalisation, parmi les méthodes déjà décrites, permettent la préparation de constituants purs.

- En régime continu : il suffira d'augmenter les dimensions des appareils utilisés dans des proportions convenables.

- En régime discontinu : pour récupérer quelques grammes de produit pur ; on fera s'écouler le liquide sous forme d'un filet sur un support poreux ou en phase liquide.

De l'électrodécantation et de l'électroconvection qui sont davantage des procédés industriels, nous ne verrons que brièvement le principe.

2 - Electrophorèse de zone.

a) Régime continu

C'est GRASSMANN et HANNIE qui ont proposé cette technique (1950), basée sur des travaux de SUENSSON (1949). Elle est depuis, largement utilisée.

On impose une tension électrique à une feuille de papier (ou autre milieu poreux) perpendiculairement au sens d'écoulement de l'électrolyte.

Le mélange à étudier est introduit en un filet continu et l'on récupère les échantillons au bas du support dans des collecteurs de fractions.

Dans l'exemple ci-dessous, un dispositif expérimental, est représenté schématiquement.

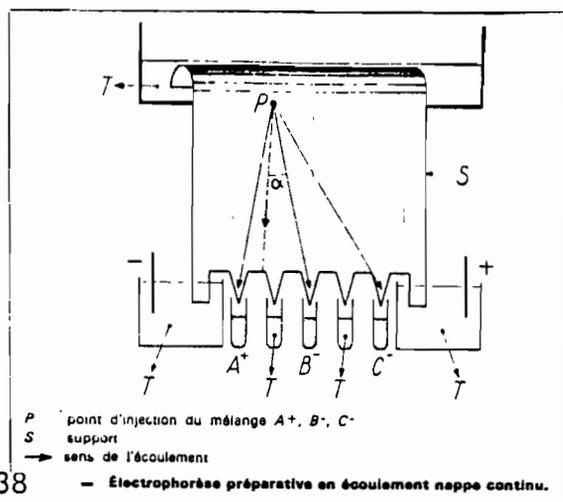


Figure 38

T : solution tampon

E : champ électrique appliqué perpendiculairement à la direction d'écoulement du liquide.

(SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

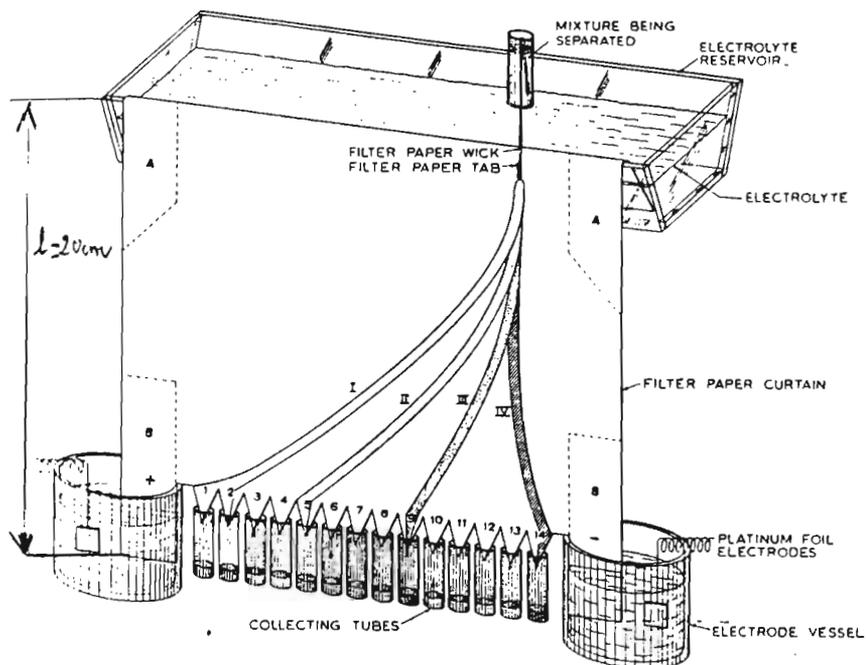


Figure 39 -

E. L. DURRUM, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 4875.)

Appareil de DURRUM : il est décrit à la page 87

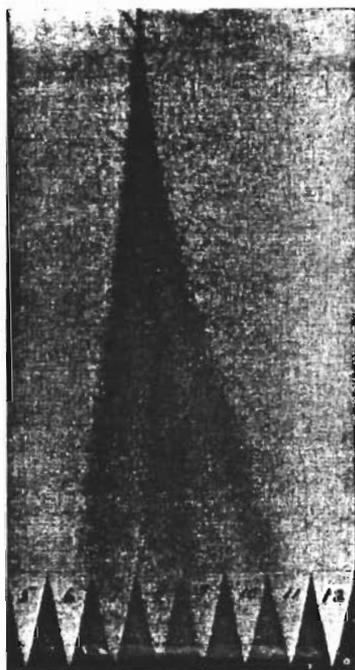


Figure 40 -

E. L. DURRUM, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 4875.)

Un exemple d'utilisation de ce dispositif : séparation du sérum.

Les substances se déplacent suivant des directions qui sont fonction :

- de la vitesse de migration électrophorétique \vec{V} (donc de μ_i et \vec{E}).

- de la vitesse d'écoulement du liquide \vec{v}_h

La tangente de l'angle de déviation a pour valeur

$$\text{Tg } \alpha = \frac{v}{vh}$$

Les séparations obtenues sont analogues à celles obtenues par spectrométrie de masse.

Chaque constituant suit sa propre trajectoire.

Ci-contre, la figure du haut représente l'appareil de DURRUM.

Conditions opératoires :

- la différence de potentiel appliquée peut être comprise entre 500 et 1500 V.
- l'intensité restant entre 100 et 300 mA.
- le débit du tampon est de $300 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.
- le débit de l'échantillon est de 1 à $5 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$.
- la séparation dure de 5 minutes à 2 heures. (des substances fragiles pourront ainsi être étudiées).

La figure du bas représente une séparation du sérum.

b) Régime discontinu.

La séparation peut être réalisée soit sur colonnes soit sur support horizontal (couches ou plaques) et tubes.

o Sur support :

Constitué par l'un des éléments suivants : poudre de cellulose, poudre de verre, verre fritté, gels granuleux (dextran, biogel, sephadex) ou gel d'amidon ou de polyacrylamide.

Ils peuvent être disposés en couche mince (0,3 cm) ou épaisse (1,5 cm).

Les manipulations sont les mêmes qu'en méthodes analytiques.

o En_tube :

Si l'on utilise des tubes ; c'est le gel de polyacrylamide qui est le plus utilisé. Les fractions sont récupérées en continu par élution.

Le gel, déposé sur une membrane semi-perméable, est disposé dans une chambre où circule perpendiculairement à l'axe du tube une solution tampon (débit fiable : $1 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Les constituants se trouvent dilués mais le gel est réutilisable.

70 à 90 % des protéines présentes initialement sont récupérées. On traite ainsi une centaine de milligrammes par tube.

o Milieu_liquide :

Comme dans le domaine analytique, le liquide est stabilisé par un gradient de densités et les fractions récupérées par élution. Le refroidissement est là encore très important.

c) Conclusion

Quelques inconvénients :

- En régime continu, il faut se limiter dans le nombre de constituants à séparer.
- Il est difficile d'obtenir une granulométrie uniforme sur une grande surface et cela nuit à l'écoulement.
- Les échantillons recueillis sont très dilués.

3 - Electrofocalisation

a) Régime continu

Le tampon de l'appareil de DURRUM est remplacé par des composés ampholytes qui vont ainsi créer un gradient de pH qui sera perpendiculaire à la direction d'écoulement.

De la même manière qu'en méthodes analytiques, les constituants migreront jusqu'à leur pH_i et la position du dépôt initial est sans importance. L'alimentation ne doit pas forcément être ponctuelle.

b) Régime discontinu

Seules les dimensions des appareils d'isofocalisation vont très sensiblement changer : colonnes de $150 \text{ à } 500 \text{ cm}^3$, et les supports seront d'épais gels granuleux.

Par cette méthode, il est possible de traiter jusqu'à 7 g. d'échantillon.

4 - Electrodécantation. Principe

C'est une méthode qui peut se rapprocher de l'électrodialyse.

Pour la décrire nous nous servirons du schéma ci-dessous :

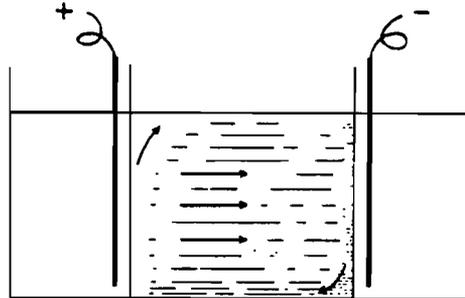


Figure 41

(MILAZZO G., 1969)

Lors d'une électrodialyse les ions, les colloïdes, ou de grosses particules chargées : protéines, acides aminés ... que nous supposons chargés positivement, migrent sous l'action du champ électrique appliqué. Les colloïdes vont venir s'accumuler le long de la membrane puisqu'ils leur est impossible de la traverser.

Le long de cette paroi la densité va augmenter (zone en pointillé sur le schéma) et il y aura un flux descendant de solution chargée de colloïdes vers le fond du récipient d'analyse.

De l'autre côté par contre, la densité de la solution sera beaucoup plus faible puisque les particules sont attirées vers la membrane opposée. Le film de liquide, dont la densité devient inférieure à celle de la solution, aura tendance à s'élever.

Si le poids spécifique des particules est inférieur à celui de l'eau le phénomène est inversé : les particules à isoler (latex par exemple) se retrouvent en surface.

Au bout d'un certain temps, deux "couches" se forment dans la solution :

- l'une contenant le colloïde concentré
- l'autre les impuretés.

Si l'on effectue plusieurs cycles d'électrodécantation en remplaçant à chaque fois, dans le cas général, la partie de la solution qui se trouve en surface par un solvant pur, on obtient une solution colloïdale pratiquement exempte d'impuretés.

Par cette méthode, il est possible d'obtenir des solutions de concentrations élevées ce qu'il est difficile de faire avec d'autres méthodes.

5 - Electroconvection

A des fins préparatives, c'est un des moyens qui a été imaginé pour séparer des fractions importantes d'un mélange de protéines par électrophorèse.

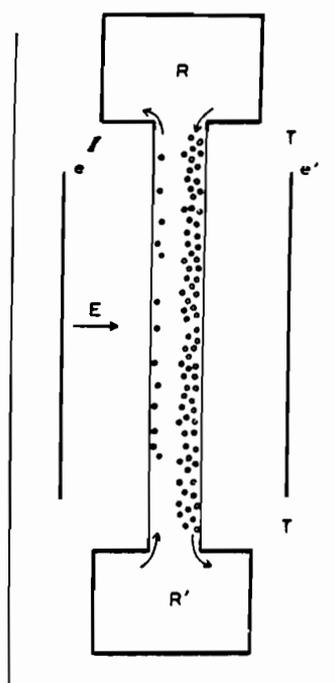
On cloisonne la colonne de liquide au travers de laquelle passe le courant ; les séparations (membranes ou robinets) permettront d'effectuer les prélèvements sans mélanges intempestifs !

On ajuste le tampon T au pH de la protéine que l'on souhaite isoler, elle sera ainsi immobile dans le champ électrique et les autres protéines pourront être éliminées.

La méthode combine :

- l'électrophorèse
- le transport par convection

Un schéma de l'appareil est présenté ci-dessous :



— Schema de l'appareil à électroconvection de Kirkwood.

Figure 42
(MILAZZO G., 1969)

L'appareil comprend deux réservoir R et R' remplis de solution protéique et reliés par une cellule plate en cellophane : qui constitue une membrane semi-perméable. L'ensemble est plongé dans la solution tampon T. Un champ électrique E est établi par l'intermédiaire des électrodes e et e'.

Le long de la paroi vers laquelle les protéines se déplacent, il y a accroissement de la densité, il en résulte un courant descendant et le réservoir inférieur R' s'enrichit des protéines les plus mobiles. La solution se trouve déplacée et remonte. Elle est soumise au champ électrique et le même processus se renouvelle. Au bout d'un certain temps, la protéine qui dans ce milieu est au point isoélectrique, va s'accumuler dans le compartiment supérieur R.

Cette méthode présente beaucoup d'analogies avec l'électro-décantation.

<i>Possibilités analytiques de l'électrophorèse.</i>				
Caractéristiques de l'analyse	Électrophorèse de zone proprement dite		Électrofocalisation	Isotachophorèse liquide
	Acétate de cellulose	Gel	Veine liquide ou gel	
Nature des éléments dosables	macromolécules ayant des mobilités électrophorétiques différentes	macromolécules ayant des mobilités électrophorétiques différentes	macromolécules ayant des pl différents	tous les ions
Concentration minimale des solutions analysées	de l'ordre de 1 g/litre	de l'ordre de 0,1 g/litre	de l'ordre de 0,1 g/litre	environ 0,1 g/litre (10 ⁻³ moles/litre)
Durée totale de l'analyse	environ 2 h	quelques heures	quelques heures à 1 jour	quelques heures à 1 jour
Utilisation de la méthode	analyse de routine	recherche en laboratoire	recherche en laboratoire	recherche en laboratoire
Coût de l'appareillage	environ 5 000 F + coût du spectrophotomètre	environ 5 000 F + coût du spectrophotomètre	supérieur à 10 000 F + coût du spectrophotomètre	supérieur à 10 000 F

Tableau VIII (SANCHEZ V. et MANENC J., 1980)

Documentation

CONSTRUCTEURS

Fournisseurs de matériel d'électrophorèse

France

Beckman Instrumenta France.
 Delhomme et Cie (Éts R.).
 Gelman S. à r. l.
 Gilson Médical Electronics France.
 Labo Moderne.
 L K B Instruments.

Millipore S A.
 ORTEC.
 Roucaire (Éts).
 Sartorius France.
 Sebina (Sté)
 Tebu France S. à r. l.
 Technam
 Touzart et Maignon.

VII - CONCLUSION

Nous avons principalement décrit les méthodes électrophorétiques propres à l'analyse dont les possibilités sont regroupées dans la tableau ci-contre. Certaines d'entre elles, nous l'avons vu, sont extrapolables à l'analyse préparative et même à la séparation "industrielle" des protéines dans les mélanges. Cependant ; elles sont beaucoup moins résolutive qu'à l'échelle analytique.

L'électrophorèse est une méthode très fine d'analyse des macro-molécules ionisées.

L'analyse s'effectue en plusieurs étapes (contrairement à la chromatographie, par exemple, où toutes les étapes se déroulent dans le même appareil).

- séparation des constituants du mélange
- révélation
- identification et/ou
- quantification

Le temps d'analyse varie de quelques heures à quelques jours.

Le choix de la solution tampon dans laquelle s'effectue la séparation est essentiel.

Selon que le mélange à analyser est formé de substances "connues" ou "inconnues" ; la méthode à employer sera différente :

- l'analyse du sérum humain est par exemple automatisée et s'effectue en électrophorèse de zone sur acétate de cellulose.

- pour les mélanges dont les constituants sont inconnus, on pourra avoir recours à l'électrophorèse sur gel ou à l'isofocalisation qui ; avec son grand pouvoir de résolution, permet d'obtenir les constituants dans des zones très étroites et sous forme concentrée

A côté des méthodes envisagées, d'autres existent ; par exemple :

- les microméthodes : électrophorèse sur fil de cellulose, électrophorèse en veine liquide : qui permettent d'analyser des constituants en quantités de l'ordre de 100 à 1000 picogrammes.

- l'électrophorèse en croix : en régime continu ou discontinu, qui permet de tester les réactions éventuelles entre deux produits.

VIII - BIBLIOGRAPHIEOuvrages généraux

M. BIER *

Electrophoresis, Methods, Theory and Applications
(Academic Press - 1967) 2 volumes.

P. BOULANGER et J. POLONOVSKI

Traité de Biochimie Générale - tome I
(Masson - Paris - 1959) 2 volumes.

G. LUSETTI

Méthodes expérimentales de détermination du potentiel Zéta (40 p.) 3-7 et 18
Oral probatoire CNAM Aix en Provence - 1983

G. MILAZZO

Electrochimie tome I (426 p.)
(Dunod - Paris - 1969) 2 volumes.

A. NOUGADERE

Biologie Végétale - Cytologie - tome I
(Masson - Paris - 1969) 2 volumes.

V. SANCHEZ et J. MANENC

Séparation électrochimiques : Electrophorèse (17 p.)
(Techniques de l'Ingénieur (P - 1815) - 1980)

* ouvrage de base non consulté mais auquel de nombreux auteurs se réfèrent.

Electrophorèse sur papier

M. LEDERER

An introduction to paper electrophoresis, and related methods (206 p.)
(Elsevier - New York - 1955)

Ch. WUNDERLY

Electrophorèse sur papier (180 p.)
(Vigot frères - Paris - 1956)

L. P. RIBEIRO

Paper electrophoresis (423 p.) 7-26, 126-127
(Elsevier - New York - 1961)

Isotachophorèse

M. EVEAREST

Isotachophoresis (Theory, instrumentation and applications)
Journal of Chromatography : volume 6 (418 p.) 7-40
(Elsevier - Scientific Publishing Company - New-York - 1976)