M2 Biotechnologie microbienne

TECHNIQUES DE CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES

Chargé de cours : Dr. CASASNI

Année universitaire : 2024/2025

ÉLECTROPHORÈSE

ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse est une méthode d'**analyse** et de **séparation** de particules **chargées électriquement** par migration différentielle sous l'action d'un **champ électrique.**

L'origine de cette méthodes à été imaginée par **S.E. Linder et H. Picton 1892.**

- ✓ Le préfixe **« électro » : électricité**
- ✓ La racine **« phorèse »** du grec *phoros* **: porter d'un côté à l'autre**

ÉLECTROPHORÈSE

Principe :

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le **déplacement d'ions** (molécules chargées positivement ou négativement) sous l'effet d'un **champ électrique**. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse ces ions auront des **vitesses de migration différentes**, ils vont donc se séparer les uns des autres.

Cation : chargé +. **Attiré** lors de l'électrolyse par la **CATHODE** (ou électrode négative)

Anion : chargé -. **Attiré** lors de l'électrolyse par **l'ANODE** (ou électrode positive)

ÉLECTROPHORÈSE

Paramètres qui influencent l'électrophorèse :

- ✓ Nature des molécules (charge, taille, forme)
- ✓ Champ électrique
- ✓ Tampon
- ✓ Support

ÉLECTROPHORÈSE

Types d'électrophorèse :

Le **choix du support** est dicté par la **nature des molécules à séparer** et selon le support on distingue trois types d'électrophorèse :

- Electrophorèse **en veine liquide** (un support liquide).
- Electrophorèse **de zone** (sur support poreux) :

✓ Sur papier et sur acétate de cellulose (support solide),

✓ Sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide(support semi-solide)

✓ Electrophorèse isoélectrique (Electrofocalisation),

- Electrophorèse **capillaire.**

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Principe :

La séparation des composés en EC résulte de deux mécanismes de transport : l'**électromigration** et l'**électro-osmose**.

Electromigration

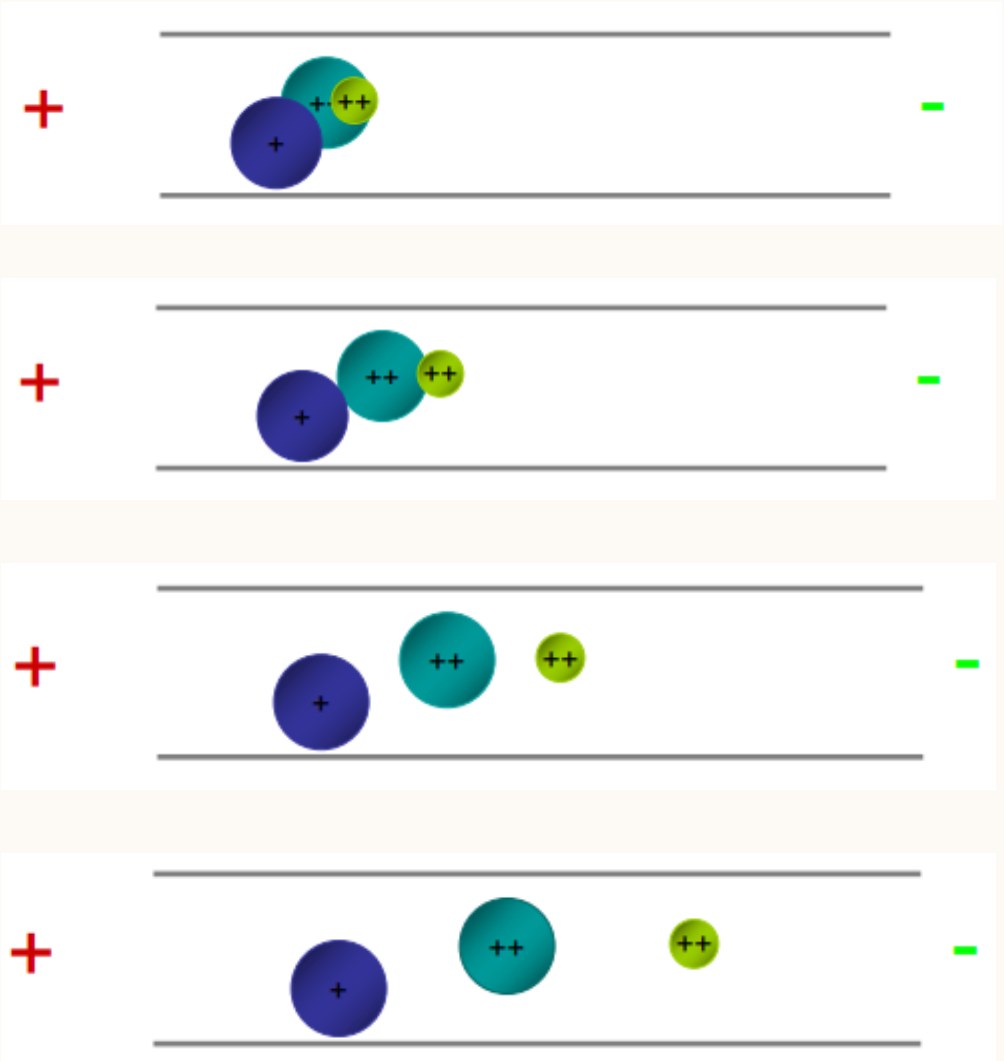
L'électromigration résulte du **déplacement** d'une **espèce chargée** lorsqu'elle est soumise à un **champ électrique**.

La **vitesse électrophorétique** acquise est alors proportionnelle au champ électrique et à la mobilité électrophorétique de l'ion.

L'électromigration s'effectue dans le sens du champ électrique (mobilité électrophorétique positive) pour les cations et dans le sens opposé pour les anions (mobilité électrophorétique négative).

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Les molécules **neutres** ne sont pas concernées par ce phénomène. En revanche, les ions, lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique, se déplacent à une vitesse caractéristique constante qui est fonction de leur taille et de leur charge : **un ion sera d'autant plus mobile que sa charge est élevée et que sa taille (ou son rayon ionique) sera faible.**



ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

L'électrophorèse peut séparer :

- Des molécules portant des **charges différentes.**
- Des molécules portant des **charges identiques** mais de **tailles différentes.**

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Principe :

La séparation des composés en EC résulte de deux mécanismes de transport : l'**électromigration** et l'**électro-osmose**.

Electro-osmose

Le flux électro-osmotique est quant à lui un phénomène **particulier au capillaire de silice**, correspondant à **l'écoulement d'un liquide remplissant un capillaire** (dont la paroi interne possède une charge de surface) lorsque celui-ci est soumis à un champ électrique tangentiel.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Electro-osmose

Dans le cas d'un capillaire de silice, les groupements silanols sont très acides et donnent facilement des groupements Si-O- dès que le pH est supérieur à 2, ce qui **confère au capillaire une charge interne négative.** Lorsque le capillaire est rempli d'**un tampon électrophorétique**, les cations du tampon viennent **s'adsorber à la paroi interne.** Lorsqu'on impose une **tension** dans le capillaire, **la solution sera entraînée vers la cathode** par la **création d'un flux**, entraînant dans le même mouvement toutes les espèces portées par le **fluide**, qu'elles soient chargées ou non.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

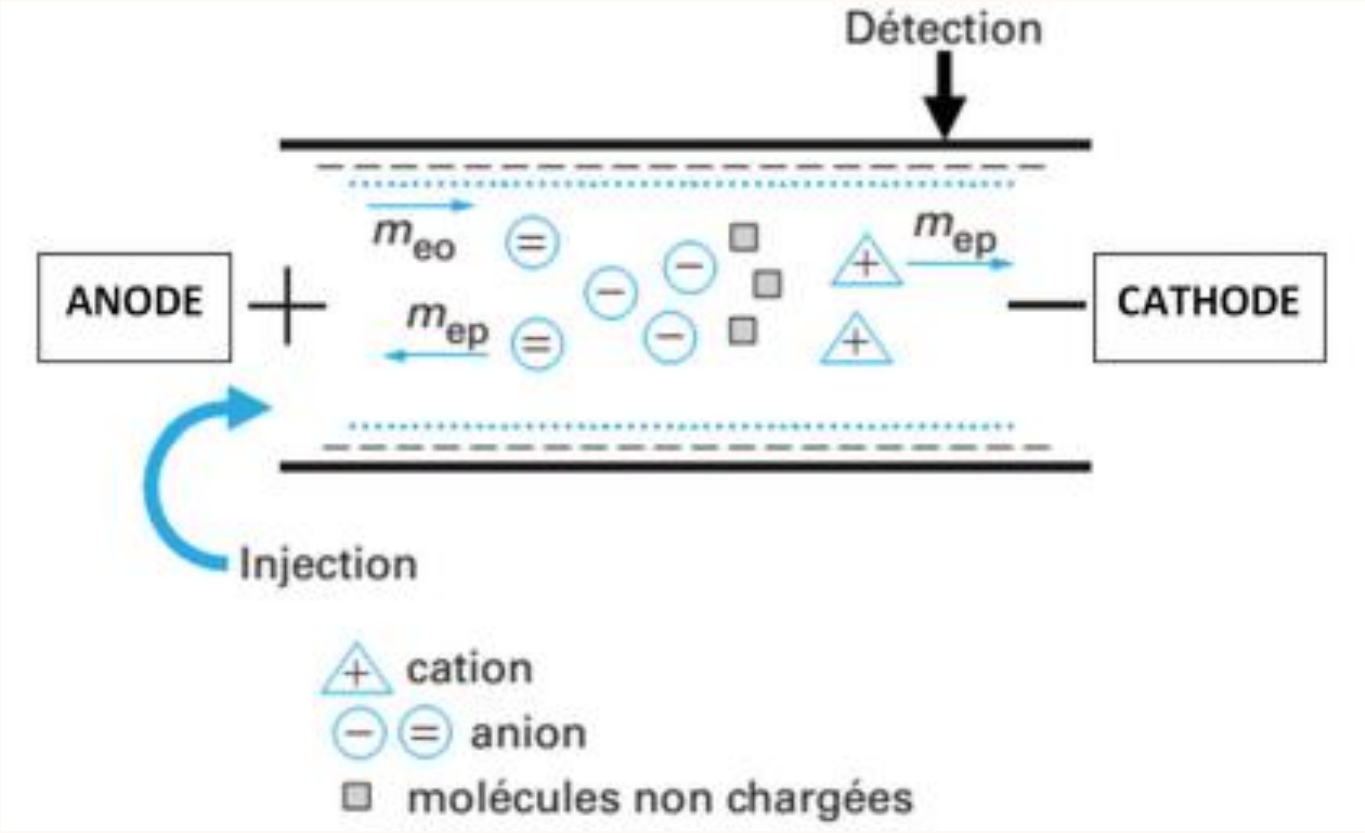
vitesse de migration = vitesse électrophorétique + vitesse électroosmotique

Dans la configuration usuelle, la migration se fait dans un capillaire constitué de silice d'un diamètre interne allant de 50 à 100 µm. **Il est rempli d'une solution tampon ; l'injection se fait communément à l'anode** (+) **et on détecte à la cathode** (-)**.** On applique une tension aux bornes du capillaire et le **déplacement des espèces** est régi par les deux phénomènes que sont **l'électromigration et l'électro-osmose.**

Lorsqu'on applique une tension positive au sein du capillaire lorsqu'il s'agit d'un cation, les mobilités électrophorétique et électro-osmotique sont de même signe et provoquent un mouvement de migration rapide du cation vers le détecteur.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Pour un **anion**, la mobilité électrophorétique est de signe **opposé** à celle du flux électro-osmotique ; ainsi, un anion ne migre vers la cathode que si sa mobilité électrophorétique est inférieure en valeur absolue à la mobilité électro-osmotique. Sinon, il est possible d'analyser cet anion en inversant le signe de la tension de séparation (**tension négative**). Les molécules **non chargées** migrent toutes à la vitesse du flux électro-osmotique et ne sont pas séparées entre elles.



ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Paramètres importants

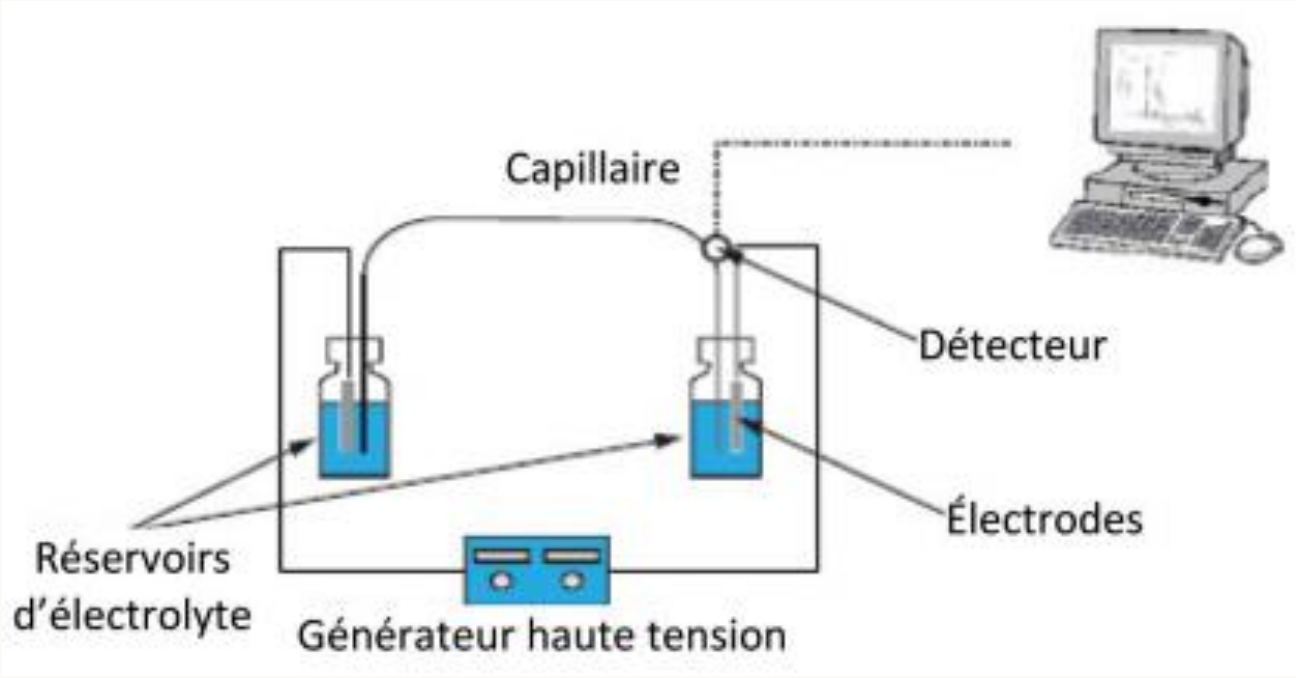
- Le **pH du tampon** est le paramètre le plus important puisqu'il détermine l'état d'ionisation des espèces analysées ainsi que l'amplitude du flux électro-osmotique.
- La **force ionique** influe aussi de façon importante sur le flux électro-osmotique ainsi que sur la mobilité électrophorétique des ions analysés. Si des tampons de force ionique faible permettent de réaliser des séparations rapides, des tampons de force ionique élevée sont aussi intéressants car ils offrent l'avantage d'améliorer la résolution de la séparation.
- La **tension appliquée** et la **température** représentent des paramètres secondaires dans l'optimisation d'une séparation.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Appareillage

L'EC est constituée d'un capillaire de séparation dont les extrémités sont immergées dans des réservoirs contenant un **électrolyte** (**tampon**), de deux **électrodes de platine** plongeant dans ces réservoirs et alimentées par un **générateur de tension**, d'un **système d'injection** des échantillons et d'un **système de détection.**

Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se **déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.**



ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Capillaire

Le capillaire, d'environ 50 cm (30 à 100 cm) de longueur et 50 µm de diamètre interne, est constitué de **silice fondue** et revêtue d'une **couche de polyimide** afin d'en assurer la flexibilité.

La surface interne de silice est constituée de **silanols** dont l'**ionisation** permet de générer un **flux électro-osmotique** dirigé **vers la cathode.**

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Générateur de tension

Le générateur de haute tension permet d'imposer une **différence de potentiel** entre les deux **électrodes de platine**, situées à chaque extrémité du capillaire. Cette différence de potentiel est essentielle, non seulement lors de la **séparation**, mais aussi lors de **certains types d'injection**. Les champs électriques appliqués sont généralement très élevés (~ **500 à 1 000 V/cm**) afin d'obtenir des séparations rapides. Il en résulte un pouvoir résolutif élevé, dû notamment à de grandes efficacités de séparation.

Thermorégulation

L'EC possède un système de **thermorégulation**. En effet, les courants générés lors de l'application d'un voltage conduisent à un **échauffement** (effet Joule) du **capillaire** et de l'**électrolyte**. Il est donc nécessaire de **dissiper cette chaleur**. Un système de convection forcée à l'air est donc en place sur l'EC.

Modes d'injection

- **Hydrodynamique :** Ce mode d'injection est particulièrement utilisé en EC car il est indépendant de la nature des composés. L'injection hydrodynamique consiste à imposer une différence de pression entre les deux extrémités du capillaire, plongées préalablement dans l'échantillon (du côté de la cathode) et dans le tampon (du côté de l'anode), créant une surpression à l'entrée et une dépression à la sortie. On injecte pendant quelques secondes (3 à 10 s) sous 50 mbar de pression, ce qui conduit à l'injection de volumes de l'ordre de 1 à 50 nL.
- **Électrocinétique :** L'injection électrocinétique consiste à appliquer une tension qui va permettre l'introduction des solutés par migration, après avoir plongé ici encore une des extrémités du capillaire dans l'échantillon. Les solutés migrant à des vitesses différentes, les quantités injectées sont différentes. De plus, elles dépendent également de la matrice de l'échantillon. On ne peut plus dans ce cas parler de volume d'injection de l'échantillon, mais de quantités injectées, et ce pour chacun des solutés.

Détecteur

La **détection UV** est fournie commercialement sur tous les appareillages d'électrophorèse capillaire. Elle est réalisée directement à travers le capillaire au niveau d'une fenêtre établie en éliminant la couche de revêtement externe.

D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance UV dépend de la **longueur du chemin optique,** relié au **diamètre du capillaire**. Pour pallier le **manque de sensibilité** lié à ce faible chemin optique, des **cellules en Z** ou bien des **capillaires à bulle** peuvent être utilisés.

Détecteur

La plupart des anions et cations inorganiques n'absorbent pas ou peu dans la zone UV-visible. Ils ne peuvent donc pas être directement détectés. Pour pallier cette absence d'absorbance, de nombreuses méthodes impliquant une détection en **UV indirecte** ont été mises en œuvre avec l'utilisation d'**agents visualisant** ou **chromophores**.

Le chromophore doit être anionique pour l'analyse des anions, et cationique pour celle des cations. Lorsque les analytes passent devant le détecteur, une chute d'absorbance est détectée liée au défaut de concentration du chromophore et qui se traduit par un pic négatif. **La valeur de la mobilité électrophorétique du chromophore est un paramètre très important** : elle doit se situer dans la même gamme que celles des anions d'intérêt sous peine d'obtenir des pics fortement dissymétriques.

Détecteur

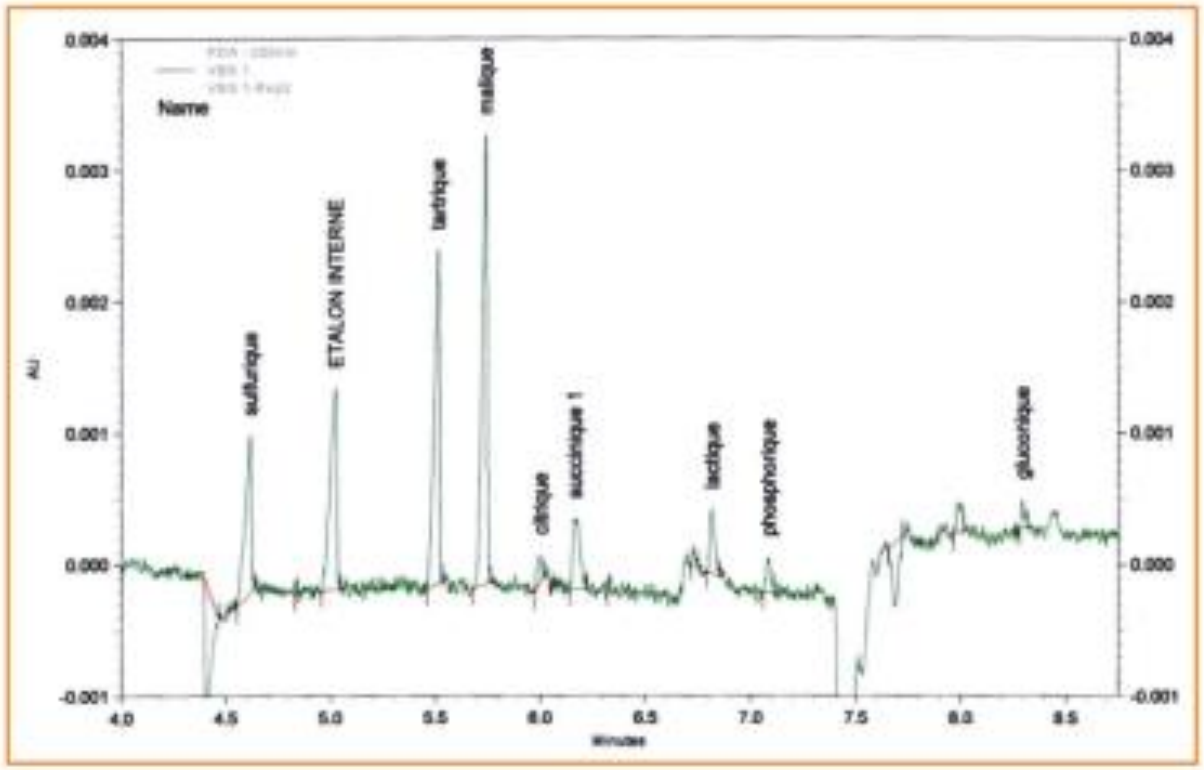
D'autres types de détection sont possibles pour les **espèces inorganiques**, telles que la **conductimétrie** qui est une alternative intéressante. Cette technique de détection a pour avantage d'être universelle pour l'analyse d'espèces ioniques. Elle implique une mesure de conductance entre deux électrodes, qui peut être réalisée soit par contact entre l'électrolyte de séparation et les électrodes de mesure, ou bien en mode sans contact dans lequel les électrodes se situent de part et d'autre du capillaire.

Pour les **molécules organiques**, des modes de détection tels que l'**ampérométrie**, la **fluorimétrie** ou bien la **spectrométrie de masse** ont été rapportés. Enfin, **les couplages EC/SM** (spectrométrie de masse) se sont énormément développés depuis la fin des années 1980, bien que présentant encore quelques difficultés de mise en œuvre.

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Electrophérogramme

Un **électrophérogramme**, ou **électrophorégramme**, peut également être appelé EPG ou e-gramme. Il s'agit d'un enregistrement ou d'un graphique produit par **électrophorèse** dans une technique analytique.



ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Applications :

Quelques applications en **chimie**, mais principalement utilisée en **biochimie** ou **biologie moléculaire** pour la séparation des **protéines** ou les a**cides nucléiques** (ADN, ARN…).

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Avantages

- Instrumentation : pas de pompe, pas de vanne d'injection : MINIATURISATION
- Faibles volumes d'échantillon, d'électrolyte (tampon de séparation) : COÛT
- EFFICACITE de séparation élevée
- Compatibilité avec de nombreux détecteurs (conductimétrique, fluorométrique, UV, spectrométrie de masse…)

Inconvénients

- Faible SENSIBILITE DE DETECTION

ÉLECTROPHORÈSE

Types d'électrophorèse :

Le **choix du support** est dicté par la **nature des molécules à séparer** et selon le support on distingue trois types d'électrophorèse :

- Electrophorèse **en veine liquide** (un support liquide).
- Electrophorèse **de zone** (sur support poreux) :

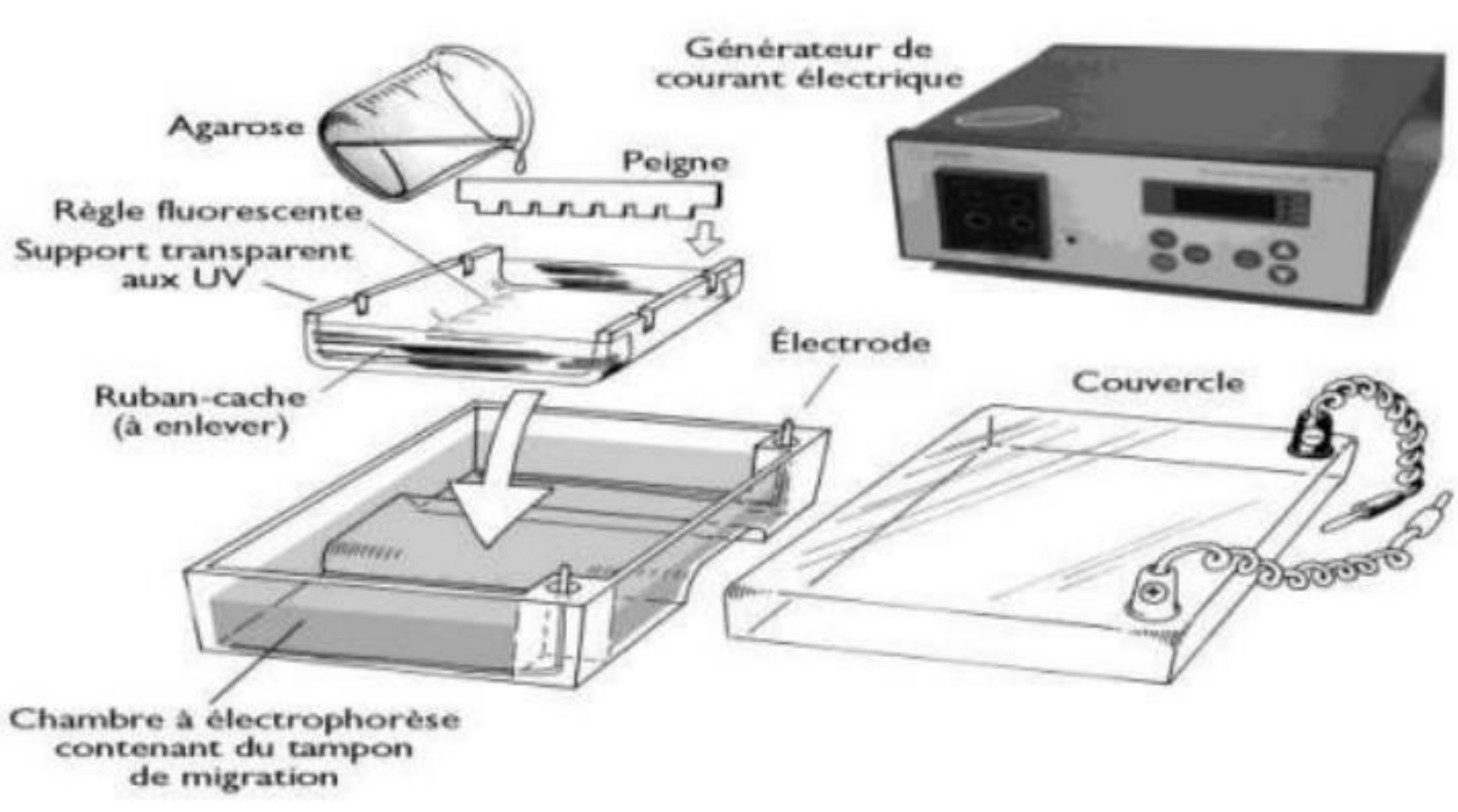
✓ Sur papier et sur acétate de cellulose (support solide),

✓ Sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide(support semi-solide)

✓ Electrophorèse isoélectrique (Electrofocalisation),

- Electrophorèse **capillaire.**

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

- Utilisée principalement pour la séparation des acides nucléiques (ADN et ARN)
- Fragments à séparer de taille entre 0,2 et 50 kb.
- Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse.

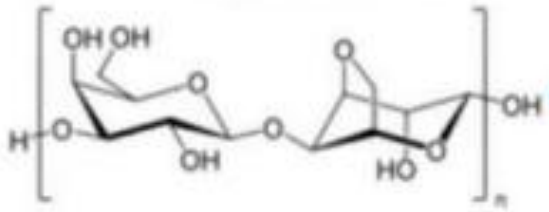
Agarose :

- Une chaine carbohydratée polymèrique linéaire
- L'unité de base est le disaccharide agarobiose
- Extraite d'algues rouges tels que Gelidium et Gracilaria
- L'agarose fond à environ 100°C et se solidifie à environ 45°
- Après refroidissement, le polymère s'agrège en une structure de fibre en double hélice.

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

1

Peser l'agarose en poudre



polysaccharide

Dissoudre l'agarose dans le tampon de migration

2

Quel pourcentage d'agarose choisir ?

% d'agarose	Éventail de tailles d'ADN (bp)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

TBE = Tris Borate EDTA
TAE = Tris Acétate EDTA

Activer Windows
Accédez aux paramètres pour activer Windows.

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

3

Porter la solution à ébullition pour bien dissoudre l'agarose

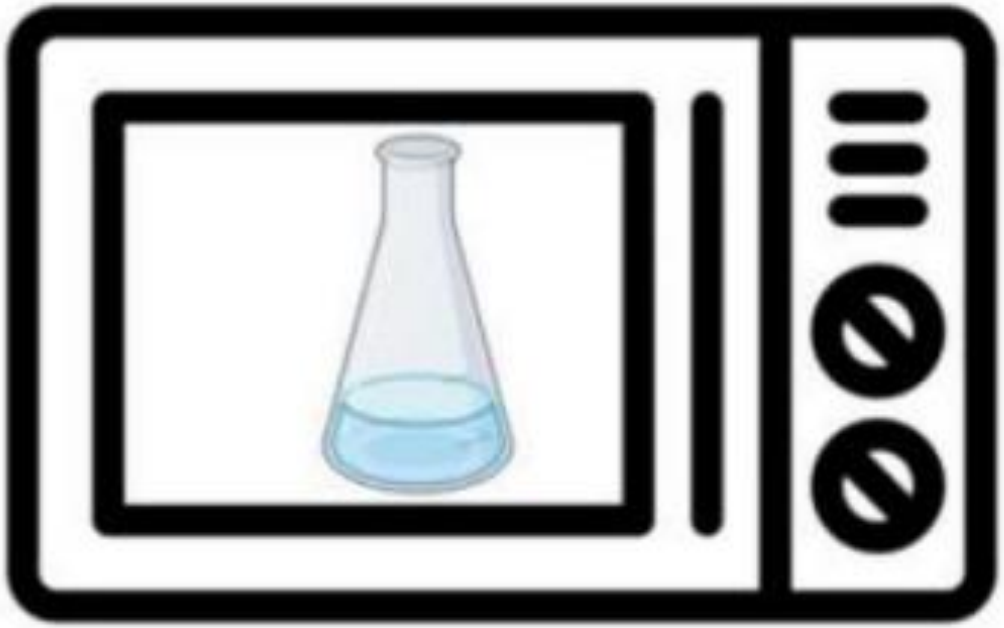
Refroidir

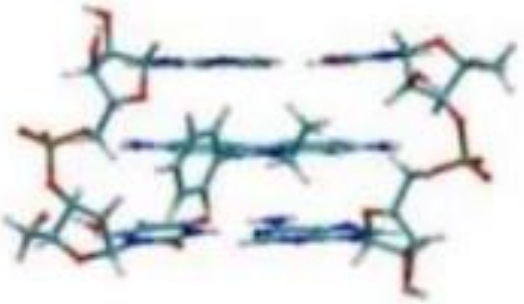
à 60°c

4

Rajouter quelques microlitres d'agent intercalant

Bromure d'éthidium (BET)
SYBR Green
Midori Green

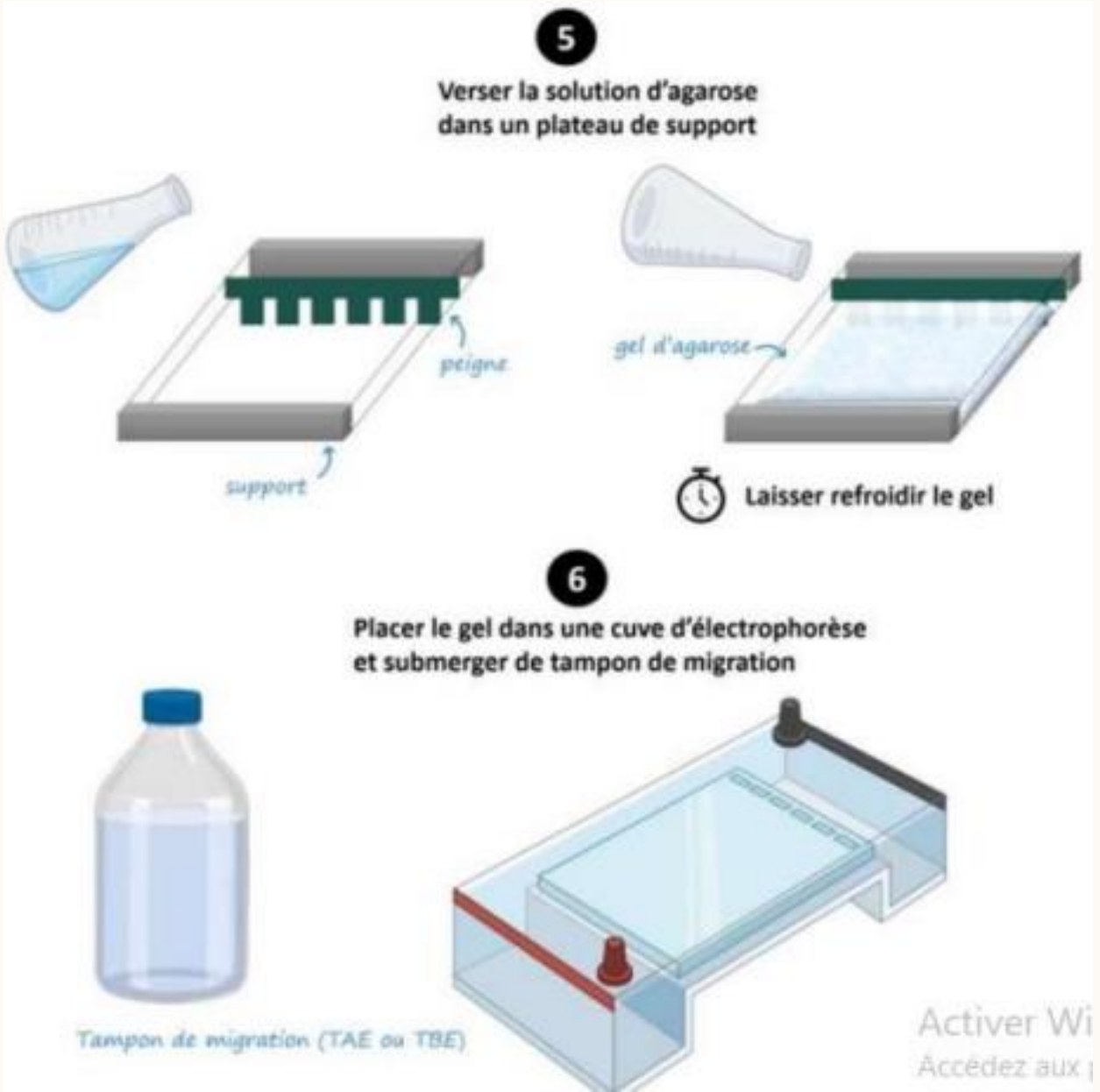




Agent intercalant se lie à l'ADN et le rend fluorescent sous UV

Activer Windows

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL



Activer Wi
Accédez aux

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

échantillons d'ADN à analyser

1

✓ **Ajout du tampon de charge contenant :**

Bleu de bromophénol *Xylène cyanol*

Suivi de l'avancée des échantillons dans le gel

Glycérol

Augmentation de la viscosité

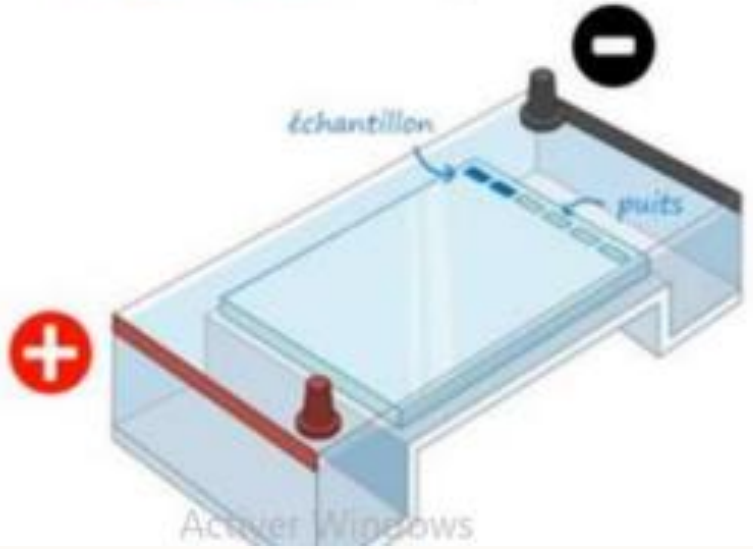
2

Prélèvement de l'échantillon

3

Dépôt de l'échantillon dans les puits

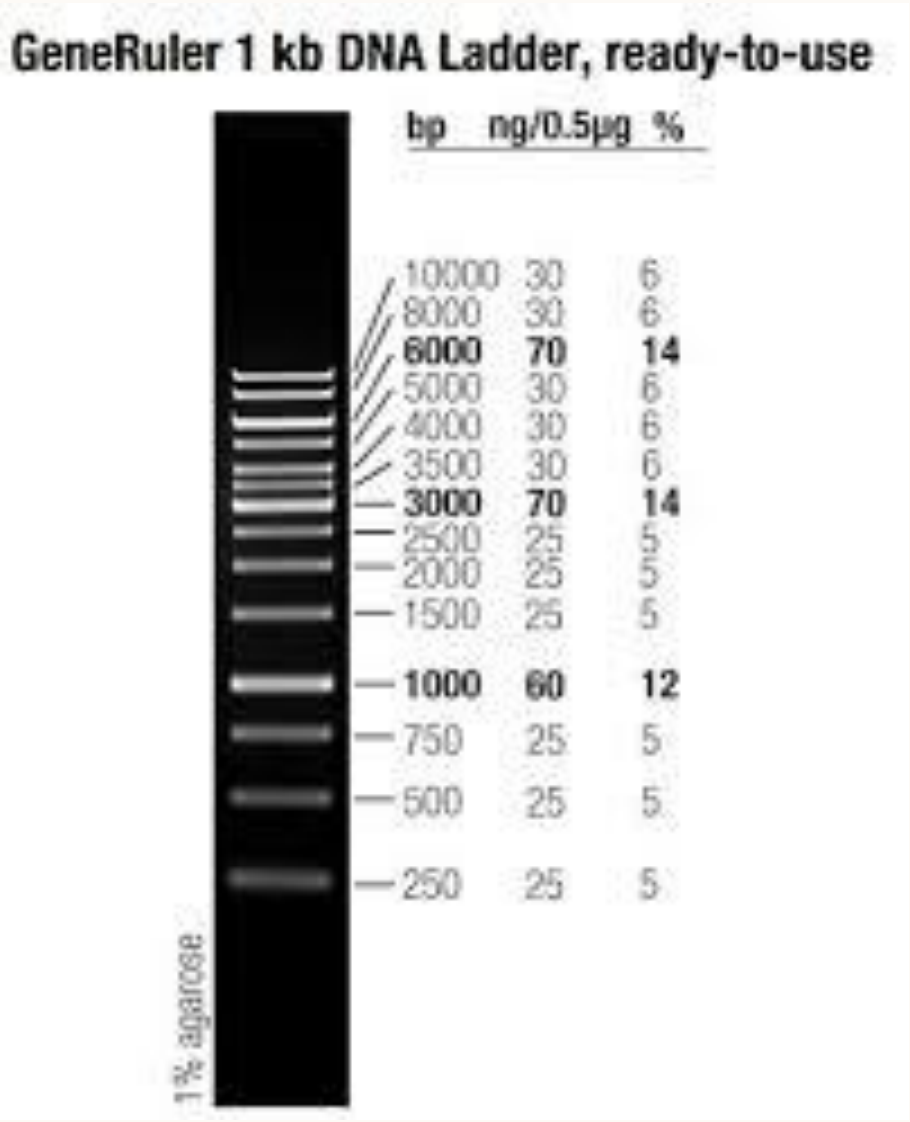
+ le marqueur de taille dans le premier puits



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

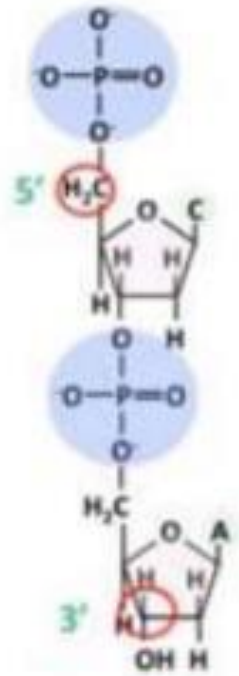
Un marqueur de taille ADN

- C'est un mélange de molécules d'ADN linéaires, de tailles connues et variées qui sont bien séparables sur un gel d'agarose par électrophorèse.
- Il sert de référence pour estimer la taille (inconnue) des molécules d'intérêt.



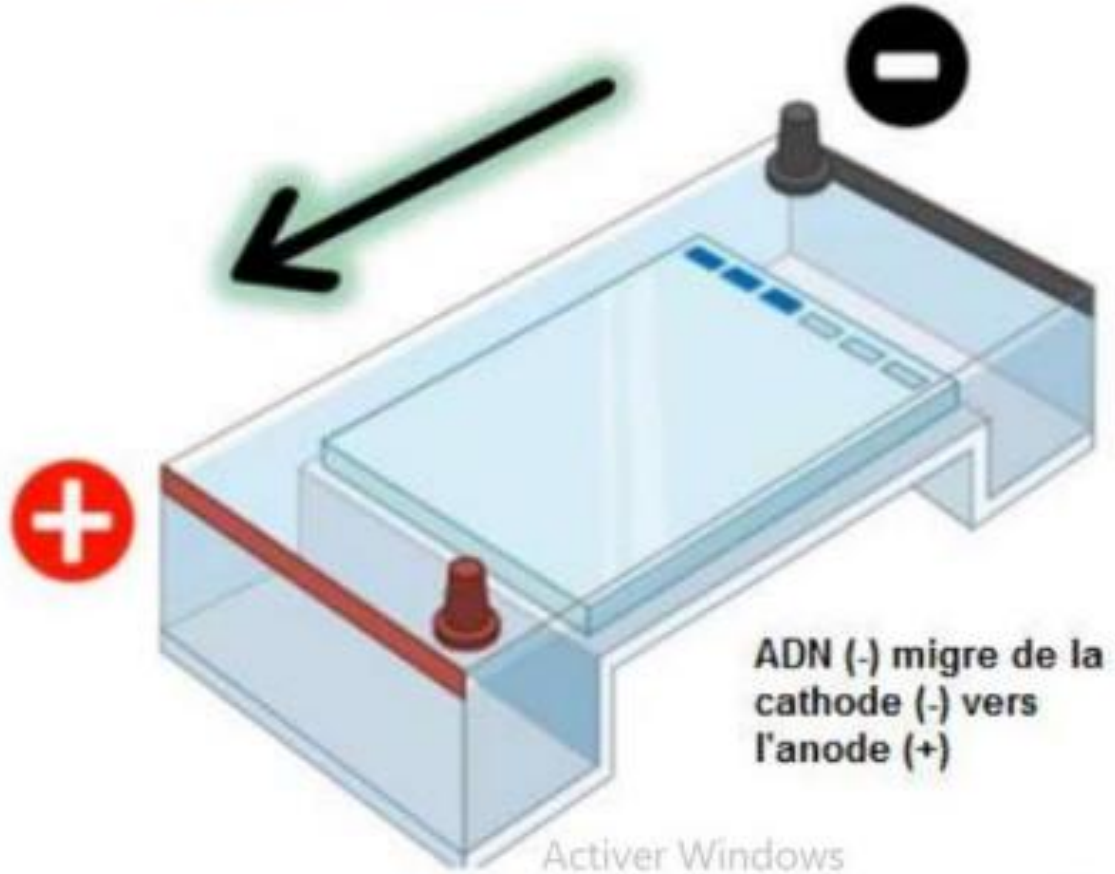
ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

Les acides nucléiques sont chargés négativement.
Ces charges négatives sont portées par les groupements phosphates.



On applique 5 à 10 V par cm de gel

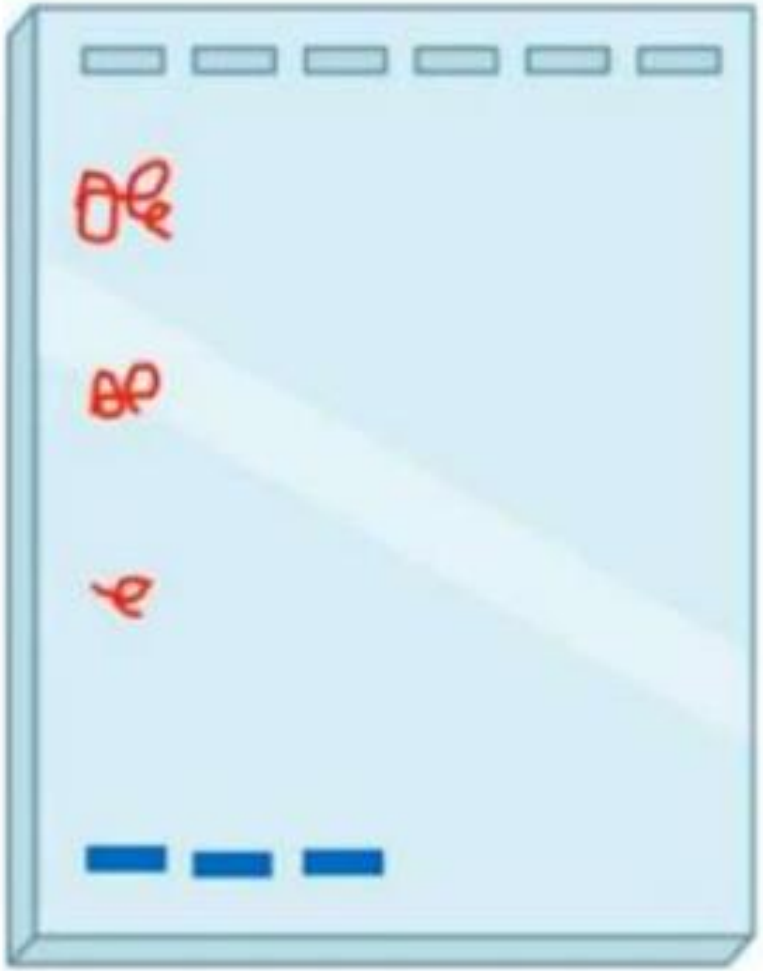
Typiquement 100 V

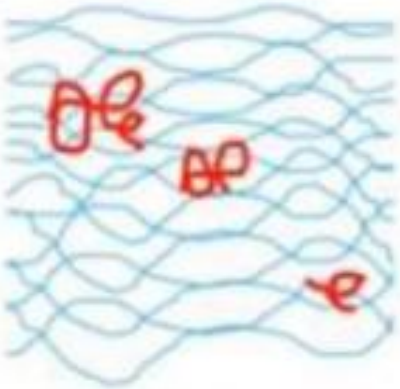


Activer Windows

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

Séparation des molécules D'ADN se fait donc selon leur taille





les petites molécules migrent plus vites que les grosses

La résolution du gel dépend du pourcentage en agarose.

Séparation des molécules de grande taille
→ Faible pourcentage en agarose

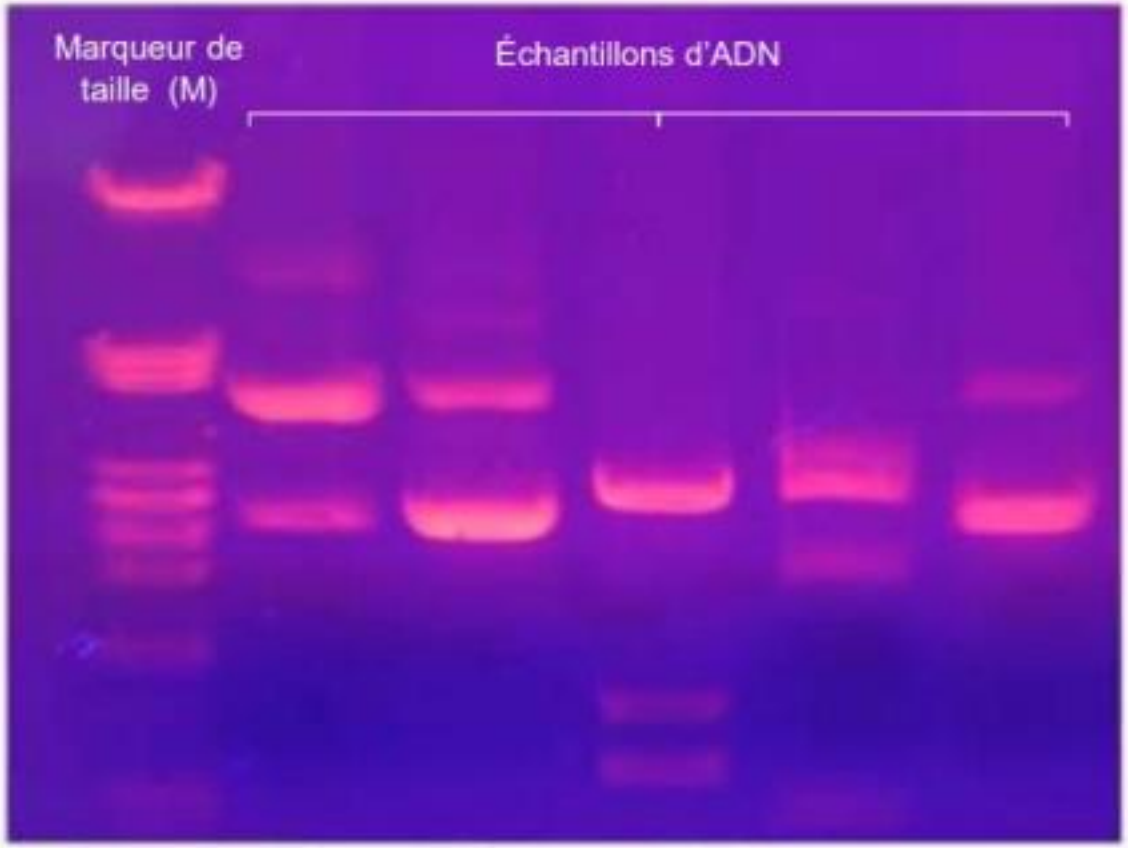
Séparation des molécules de petite taille
→ Augmentation du pourcentage en agarose

Activer Windows

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL

La visualisation des bandes correspondant aux fragments d'ADN se fait soit sous lumière UV soit par émission de fluorescence (selon l'agent intercalant utilisé)

L'intensité des bandes est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans l'échantillon.



Par Mnolf — Photo taken in Innsbruck, Austria, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1131449