

CHAPITRE II Méthodes chromatographiques

Définition

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation.

Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire.

Types de chromatographie

Les méthodes chromatographiques peuvent être classées selon le support de la phase stationnaire en:

- Chromatographie sur colonne (HPLC, CPG, et les colonnes de silice).
- Chromatographie sur surface (chromatographie sur couches minces ou CCM, chromatographie sur papier).

Elles peuvent être classées aussi selon la nature de la phase mobile en:

- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).
- Chromatographie en phase liquide (CPL):
 - Chromatographie sur couche mince (CCM)
 - Chromatographie liquide haute pression (ou performance) (HPLC).

Suivant le type de chromatographie, elle peut servir à identifier (CCM, HPLC, CPG), à séparer ou à purifier les composés d'une réaction (chromatographie sur colonne, HPLC). Cette technique peut également, grâce à un témoin, permettre de quantifier un produit (CPG, HPLC).

Le choix de l'une ou l'autre de ces techniques dépend de la nature des composés à séparer et en fonction de celle-ci, le choix de l'adsorbant utilisé.

Chromatographie sur colonne

C'est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases:

- La phase stationnaire: support solide.
- La phase mobile: le solvant.

La vitesse de déplacement des composés dans la colonne dépend de:

- L'affinité à la phase stationnaire: plus que l'affinité à la phase stationnaire est grande, plus que le déplacement des composés dans la colonne est très lent.
- La solubilité dans la phase mobile (plus que le composé est très soluble dans la phase mobile, plus que son déplacement dans la colonne est très vite).

Le choix du type de chromatographie et du support dépend de la nature des composés

A) Eléments chromatographiques

Les éléments de la chromatographie sont: L'échantillon, la phase stationnaire, la phase mobile, la colonne, la pompe, le détecteur, le collecteur de fractions et l'enregistreur.

□□L'échantillon: C'est la solution qui contient les composés à analyser.

□□La phase stationnaire: C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne (Tab). Les granules peuvent: être poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.

Type de chromatographie	Type de granules
Chromatographie d'exclusion stérique	Poreuses (réticulées)
Chromatographie échangeuse d'ion	Portent une charge ionique positive ou négative
Chromatographie d'affinité	Portent un site d'affinité

□□**La phase mobile:** C'est un liquide qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant avec lui les composés de l'échantillon. Elle doit être soluble et interagir avec les composés de l'échantillon et non pas avec la phase stationnaire.

□□**La colonne:** C'est le support de la phase stationnaire (gel ou résine). A travers lequel, la phase mobile passe. Elle peut être en verre, en plastique ou en inox et de différentes dimensions (Fig. 1).



Figure 1. La colonne chromatographique.

□□**La pompe:** Elle permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne (Fig. 2).



Figure 2. La pompe.

□□**Le détecteur:** Il évalue la quantité de chacun des composés séparés et envoie un signal

électronique vers l'enregistreur (Fig. 3). Par exemple, les protéines sont détectées grâce à un détecteur UV-visible



Figure 3. Le détecteur.

□ □ L'enregistreur: Il dessine les pics en fonction de leur intensité (Fig. 4).



Figure 4. L'enregistreur.

□ □ Le collecteur de fractions: permet de collecter les fractions de l'échantillon (Fig. 5).



Figure 5. Le collecteur de fraction.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne.
- Injecter l'échantillon.
- Effectuer l'élution.

- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

1. 1. Chromatographie d'exclusion stérique (filtration sur gel ou tamisage moléculaire)

C'est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur poids moléculaire et de leur forme. La phase stationnaire est un solide poreux dont la dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer. Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc éluées en premier. Les petites molécules et les molécules de taille moyenne sont éluées plus tardivement, elles pénètrent dans les pores du gel, leur migration est donc retardée.

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards..

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

Le diamètre des pores (la porosité): Il est fixé par le degré de réticulation du gel qui correspond à la proportion de substrat dans l'ensemble de la phase stationnaire. Il détermine le pouvoir de séparation (séparation microporeuse ou macroporeuse).

L'inertie chimique: Le gel ne doit pas réagir avec la phase dispersante. Il se dégrade si le pH est inférieur à 2 et supérieur à 8. Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile.

La stabilité physico-chimique: Le gel doit être résistant à la température et à la pression de l'expérience.

La taille et la forme des particules (la granulométrie): Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 µm en chromatographie classique et de 20 à 80 µm en haute performance.

La forme: La forme sphérique assure un écoulement uniforme de la phase mobile.

La nature: Les gels peuvent être en dextran, en polyacrylamide ou en agarose

Les différentes étapes de la chromatographie d'exclusion stérique regroupent:

Le choix du gel: Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer (**Tab. 3**).

Type de gel	Capacité de rétention (Da)
Dextran	
Sephadex G-10	700
Sephadex G-25	1000-5000
Sephadex G-75	3000-70000
Sephadex G-200	5000-800000
Polyacrylamide	
Bio-gel P2	200-2000
Bio-gel P6	1000-6000
Bio-gel P-150	15000-150000
Bio-gel P-300	60000-400000
Agarose	
Sepharose 2B	2 000000-25000000
Sepharose 4B	300000-3000000
Bio-gel A-0,5M	30000-500000
Bio-gel A-15M	30000-15000000
Bio-gel A-150M	5000000-150000000

Le choix de la phase mobile: Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire.

La préparation du gel: Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.

Le remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.

L'équilibration de la colonne: C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).

L'injection de l'échantillon.

L'éluion: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon.

La collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.

La régénération du gel: Pour éliminer les contaminants, le gel est lavé par une solution saline. Le gel est conservé à 2-4°C après addition d'un agent antimicrobien et de conservation (azide de sodium).

Applications de la chromatographie d'exclusion stérique

Le domaine d'application de ce type de chromatographie est celui de la séparation des macromolécules de masses molaires élevées.

Séparation de petites molécules et de macromolécules: Comme l'élimination des ions d'une solution de macromolécules (exemple le facteur VIII antihémophilique) et la purification d'une protéine après marquage à l'iode 131.

Analyse d'un mélange de macromolécules: C'est la purification de fractions plasmatiques (immunoglobulines M) pour la préparation de médicaments ou de réactifs de diagnostic.

Fractionnement de petites molécules: Il regroupe l'analyse de peptides (en analyse alimentaire dans les fromages), l'analyse d'enzymes et l'analyse de colorants dans les produits alimentaires.

Séparation de cellules: La chromatographie sur gel de dextran permet d'isoler les lymphocytes des monocytes.

Détermination des poids moléculaires: La meilleure méthode est l'étalonnage direct des colonnes de chromatographie d'exclusion stérique avec des étalons de poids moléculaires connus tels que le cytochrome C (12600), la myoglobine (17500), l'albumine (68000), l'ovalbumine (45000) et la γ -globuline (160000).

1. 2. Chromatographie échangeuse d'ions

Elle permet la séparation de molécules chargées (La séparation est en fonction de la charge électrique). La phase stationnaire est un solide ayant des propriétés particulières que l'on appelle un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions électrostatiques (ioniques) avec des composés (protéines) ionisées. Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables ayant la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution. C'est une séparation des composés basée sur des interactions ioniques réversibles entre une phase stationnaire appelée échangeur d'ion, des contre ions échangeables ou mobiles et un soluté ou protéine chargé.

Groupement négatif lié par covalence au support

A) Les échangeurs d'ions

Ce sont des solides plus au moins poreux, gélifiables le plus souvent, se présentant sous forme granulée. Ils constituent un réseau de macromolécules insolubles. Il existe deux grands groupes de résines utilisées dans ce type de chromatographie :

1. Les résines échangeuses de cations dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature anionique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

Résines cationiques fortes: Résines sulfoniques (très fortement ionisées quel que soit le pH).

Résines cationiques intermédiaires: Résines phosphoriques.

- Résines cationiques faibles: Résines carboxyliques (non ionisées en milieu acide fort).
- Résines cationiques très faibles: Résines phénoliques (ionisées en milieu basique uniquement).

2. Les résines échangeuses d'anions dont la phase stationnaire possède des groupements fonctionnels de nature cationique se classent en fonction de leur aptitude à l'ionisation en:

- Résines anioniques fortes (résines à amine quaternaire).
- Résines anioniques faibles (résine à amine secondaire).

A) Echangeurs anionique

Résine chargée positivement

Protéine chargée négativement

Contre ion chargé négativement

B) Echangeur cationique

Résine chargée négativement

Protéine chargée positivement

Contre ion chargé positivement

Les échangeurs cationiques sont:

- Le CM-polyoside (carboxyméthyle): c'est un échangeur faible.
- Le SP-polyoside (sulfopropyle): C'est un échangeur fort.

Les échangeurs anioniques sont:

- Le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle): C'est un échangeur faible.
- Le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle): C'est un échangeur fort.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir le gel.
- Choisir la phase mobile.
- Remplir la colonne.
- Equilibrer la colonne (fixation des contre ions).
- Injecter l'échantillon (l'étape de fixation ou adsorption des protéines).
- Effectuer l'élution (étape de désorption par la Fi ou pH).
- Récupérer les fractions.
- Analyser le chromatogramme.
- Régénérer le gel.

Donc, la colonne est remplie, sans irrégularité, puis équilibrée (l'effluent doit avoir la même composition que l'éluant). Lorsque le dépôt de l'échantillon est fait, on procède à une élution soit en modifiant le pH, soit en modifiant la force ionique de l'éluant. On peut opérer avec un gradient continu ou un gradient discontinu. Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère):

Si le pH du milieu est supérieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée négativement: Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.

Si le pH du milieu est inférieur au point isoélectrique de la protéine, cette dernière devient chargée positivement: Pour l'éluer, il faut augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (Déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de Concentration plus élevée (exp. Cl⁻, HO⁻, Na⁺, H⁺...)).

C) Applications

La chromatographie échangeuse d'ions est utilisée au laboratoire, depuis la préparation de l'eau déminéralisée jusqu'à l'analyse de traces ioniques dans un échantillon. Elle s'applique à l'analyse et à la séparation de sels minéraux, d'acides aminés, de peptides, de protéines, de nucléotides, d'acides nucléiques, de lipides et de glucides ionisés.

1. 3. Chromatographie d'affinité

Elle est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (ligands), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase fixe et son partenaire d'affinité en solution (substance à analyser ou affinant).

Le ligand est fixé sur une matrice (résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur).

Dans le complexe de nature biologique, dont la formation est à la base de la chromatographie d'affinité, l'un des partenaires au moins est une protéine ; cette protéine peut constituer le ligand fixe ou le partenaire d'affinité en solution.

Tableau : Exemples de ligand et d'affinant.

Ligand	Affinant
Une enzyme	Le substrat ou l'inhibiteur
Un antigène	L'anticorps
Une hormone	Le récepteur

La phase stationnaire (le gel):

Est constituée d'un effecteur (ligand), fixé par covalence à un support poreux (matrice ou résine) par l'intermédiaire d'une chaîne latérale: le bras fixateur. Le support peut-être en dexran, en agarose ou en polyacrylamide. Ce sont des particules uniformes. Il doit être insoluble dans l'eau, stable chimiquement et mécaniquement et doit porter des groupements fonctionnels réactifs permettant la fixation des bras fixateurs

Le bras fixateur: C'est une chaîne polycarbonnée (C6-C8) intercalée entre la matrice et le ligand.

Le ligand: Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

Les effecteurs utilisés sont:

- Pour la purification des enzymes:

Des substrats et analogue de substrat.

Des inhibiteurs réversibles.

Des effecteurs allostériques.

Des coenzymes.

- En immunologie:

Des haptènes.

Des antigènes.

Des anticorps.

- Pour l'étude des protéines réceptrices:

Des hormones.

A) Mode opératoire

Il consiste à:

- Choisir la phase mobile.

- Remplir la colonne.

- Equilibrer la colonne.

- Injecter l'échantillon.

- Laver la colonne pour éliminer les substances non adsorbées.

- Eluer les substances adsorbée ou fixée.

- Récupérer les fractions.

- Analyser le chromatogramme.

- Régénérer le gel.

La première opération consiste à préparer le gel d'affinité, en fixant le ligand sur le support. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité. On y fait passer la solution aqueuse contenant la substance à purifier. Celle-ci est retenue, alors que les contaminants en solution passent librement. Des lavages successifs permettent d'éliminer toute trace de produits indésirables. Enfin, on élue la substance retenue en décomposant le complexe.

B) Elution

Pour éluer les substances adsorbées, il est nécessaire de modifier certains paramètres:

Le pH: Le substrat voit alors ses charges électriques se modifier et son affinité pour le ligand changer voire disparaître (élution non spécifique).

La force ionique en augmentant la concentration en sels (élution non spécifique).

La composition en ajoutant un composé (un tampon d'élution qui contient un compétiteur ou un ligand non fixé) dont l'affinité avec le ligand est plus forte (élution spécifique).

C) Applications

La chromatographie d'affinité est adaptée, soit à l'analyse, soit à la préparation de substances biologiques. Elle a été utilisée en:

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait enzymatiques.

- Immunologie, pour la purification d'anticorps.

- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.

- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.)

Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

Elle a été utilisée depuis 1975 et elle a réduit en moyenne de dix fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimiques. Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.

C'est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés. Pour certains, HP signifie «haute pression». Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en biochimie, ainsi qu'en chimie analytique. Le «P» du sigle, à l'origine signifiait Pression mais lorsque la méthode a été améliorée (réduction des particules et régulation de la phase stationnaire) le «P» a donc été attribué à Performance afin de marquer cette innovation. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés). La combinaison de la rapidité et de la résolution élevées conduit à l'appellation haute performance.

Le champ d'application de ce type de chromatographie recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute l'analyse:

Des composés thermosensibles.

Des composés très polaires.

Ainsi que des composés de masses molaires élevées.

Un appareil d'HPLC comprend différents modules: un réservoir à solvant contenant la phase mobile, un système de pompage permettant d'effectuer des éluions graduées, un injecteur, une colonne, un détecteur et un système d'acquisition de données (**Fig**).

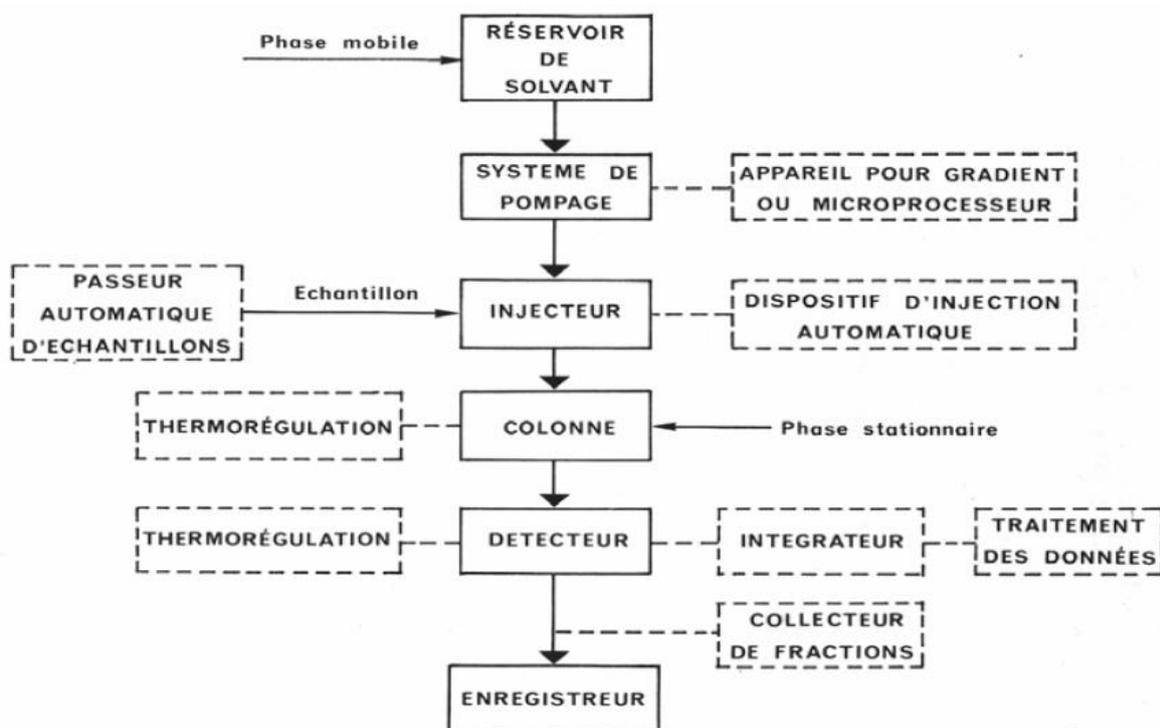


Figure. Appareillage de l'HPLC.

CHAPITRE III Méthodes électrophorétiques

. Définition

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-).

. Principe

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

Plusieurs facteurs peuvent influencer la mobilité électrophorétique.

1. Nature de la molécule

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. De même, la charge des molécules influence directement leur mobilité. La charge est fonction du pH pour les molécules ionisables, de la force ionique et de la formation éventuelle de complexes. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse.

. 2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse

La présence d'ions étant nécessaire au passage du courant, un compromis est obtenu avec une force ionique comprise entre 0.05 et 1 mol/l. Le pH influe sur l'ionisation des acides faibles et bases faibles, pour lesquels il s'avère nécessaire de travailler dans un milieu tamponné.

A pH et force ionique identiques, deux tampons de nature différente ne produisent pas toujours des mobilités électrophorétiques identiques. Certaines substances ajoutées au tampon de migration modifient aussi les comportements électrophorétiques. Ainsi:

□□ La présence d'EDTA ou d'acide citrique favorise par complexation la séparation de certains ions minéraux.

□□ Les ions boratés forment avec les sucres des complexes chargés rendant ainsi possible leur séparation.

□□ L'addition d'urée modifie le comportement électrophorétique des macromolécules par rupture de liaisons hydrogène.

3. Support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration entraînant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme. Ces propriétés adsorbantes sont liées à la présence de certains groupements fonctionnels comme les hydroxyles.

. 4. Champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide: on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide: on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte. Les particules à séparer peuvent être de nature et de tailles très différentes: des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines..

Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle.

. 2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.

- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative . Les protéines transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

A- Appareillage d'électrophorèse

L'appareillage usuel est constitué de (Fig.)

- Un générateur du courant continu stabilisé relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.
- Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments. Chaque compartiment est rempli du tampon de migration.
- Des accessoires comme le support d'électrophorèse, les plaques de verre pour couler le gel et les peignes pour creuser des puits dans le gel, dans lesquels les composés à analyser seront déposés.

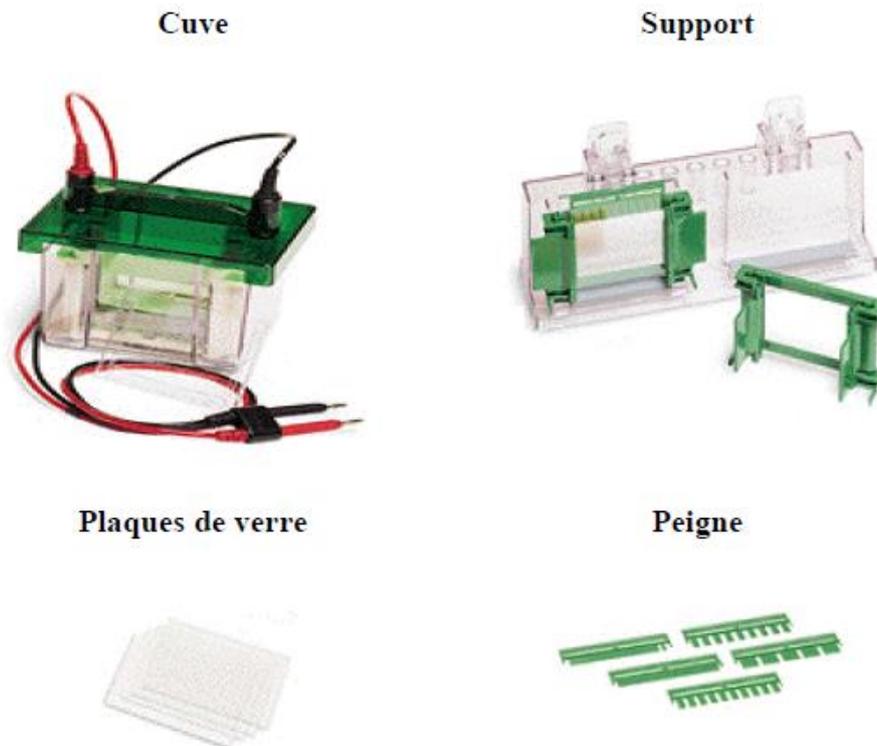


Figure 3. Appareillage d'électrophorèse.

B) Mode opératoire

Il consiste à:

- Préparer le gel de concentration et le gel de séparation.
- Couler le gel de séparation entre des plaques de verre fixées sur un support suivi par le gel de concentration.
- Déposer un peigne entre ces plaques.
- Retirer le peigne après polymérisation du gel (formation des puits).
- Déposer l'échantillon et les marqueurs de masse moléculaire dans les puits.
- Placer les plaques de verre contenant le gel polymérisé dans une cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve avec le tampon de migration.
- Mettre en marche le générateur de courant.
- Enlever le gel à partir des plaques à la fin de la migration.
- Colorer puis décolorer le gel.
- Analyser le gel.

□□Préparation du gel

Elle consiste à préparer deux gels: un gel de séparation dont les pores sont serrés et un gel de concentration dont les pores sont lâches.

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule réticulée utilisée comme support d'électrophorèse. C'est un copolymère d'acrylamide qui forme des chaînes et de NN'-méthylène bis-acrylamide qui assure le pontage entre les chaînes de polyacrylamide (**Fig. 4**). La polymérisation de l'acrylamide nécessite la présence de deux catalyseurs: Le TEMED (N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine: TMEDA) et le persulfate d'ammonium [(NH₄)₂S₂O₈] qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière. La porosité du gel varie en fonction du taux de l'acrylamide, de bis-acrylamide, du TEMED (**Fig. 5**) et du persulfate d'ammonium. Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer (**Tab. 1**). Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.

Le gel de séparation permet la séparation de la solution à analyser. La densité typique de ce gel peut être 6, 8, 10, 12, ou 15%. Plus le gel est dense meilleure sera la séparation des composés. Le gel de concentration est coulé en haut du gel de séparation et sa densité est de l'ordre de 5%. Il permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation.

□□**Préparation de l'échantillon:** L'échantillon est soumis à l'action de plusieurs composés:
□□Le β mercaptoéthanol: Composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociées.

□□Le SDS: Composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative.

□□Le sucrose ou le glycérol: Qui donnent une densité à l'échantillon permettant ainsi à ce dernier d'être déposé facilement au fond des puits.

□□Le bleu de bromophénol: Est également utilisé comme marqueur coloré afin de vérifier le bon déroulement d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou en gel d'agarose.

En conséquence, les protéines sont dénaturées (elles ont perdu leur structure tridimensionnelle) et n'ont plus de ponts disulfures (elles sont sous une forme monomérique).

□□**Les marqueurs de masse moléculaire:** La détermination de la masse moléculaire des protéines inconnues nécessite l'utilisation des protéines standards de masse moléculaire connue.

□□**Le tampon de migration:** Il contient des électrolytes qui sont responsables du transport du courant électrique. Si la concentration de ces électrolytes est faible, la totalité du courant est transportée par le soluté et une faible proportion est transportée par les électrolytes, ce qui entraîne la migration des protéines et donc leur séparation. Le tampon d'électrophorèse est constitué de glycine qui joue le rôle de conducteur de courant.

□□**La coloration:** Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est démoulé, séché puis plongé dans un colorant. Les protéines sont révélées par une coloration spécifique (par exemple avec le bleu de Coomassie).

□□**La décoloration:** Une succession de bains dans la solution de décoloration permet d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique.

C) Applications

L'électrophorèse est utilisée pour vérifier la pureté d'une fraction chromatographique et pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue à l'aide des protéines standards.

□□**Détermination de la masse moléculaire**

Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique (R_f) au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue.

Dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement (R_f) et l'extrapolation de ce R_f sur la droite: $\text{Log } M = f(R_f)$, permettent la détermination de sa masse moléculaire (**Fig. 6**).

A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) (**Tab. 2**) on trace la droite d'étalonnage $\text{Log } M = f(R_f)$.

Le rapport frontal (R_f) représente le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration (F_m).

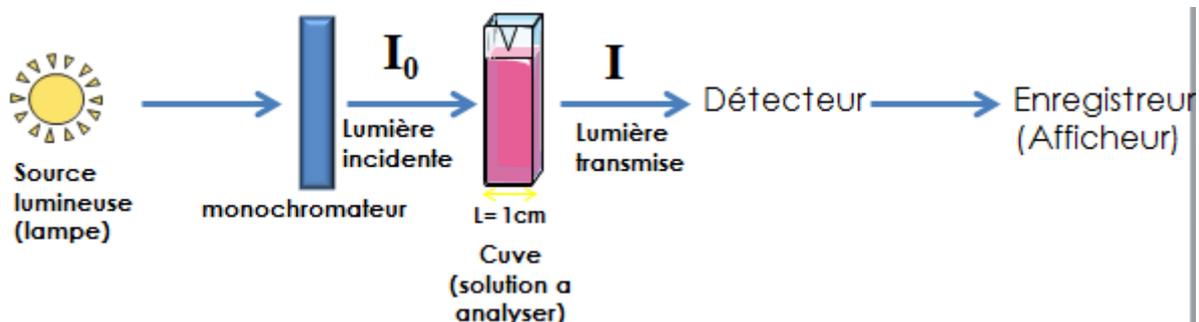
CHAPITRE III Méthodes spectrales

1) Spectrophotomètre UV-VIS (spectroscopie d'absorption moléculaire)

Lorsqu'un faisceau lumineux monochromatique (une longueur d'onde fixe) de longueur l et intensité I_0 traverse une solution (exp bleu de méthylène + eau) les molécules dissoutes vont absorber une quantité de la lumière incidente

L'intensité de la lumière transmise I sera inférieure à celle de la lumière incidente I_0

- La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution,
- Plus cette substance est concentrée plus elle absorbe la lumière (relation entre la concentration et l'absorbance).



- C'est la loi de Beer Lambert $A_1 = \epsilon_1 \cdot L \cdot C$.donc on peut déterminer la concentration a partir de l'absorbance.

. Pour l'établissement de la loi de Beer-Lambert on suppose donc que l'on dispose d'un rayonnement monochromatique (ou du moins de largeur plus fine que le profil d'absorption)

d'intensité constante $I_{0\lambda}$ à la longueur d'onde λ correspondant en général au maximum du profil d'absorption.

$$\text{absorbance} = \text{ABS} = \log \frac{I_{0\lambda}}{I_{\lambda}} = \epsilon_{\lambda} l c$$

$$\% \text{absorption} = \%A = 100 \frac{I_{0\lambda} - I_{\lambda}}{I_{0\lambda}}$$

$$\% \text{transmission} = \%T = 100 \frac{I_{\lambda}}{I_{0\lambda}} = 100 - \%A$$

$$\text{ABS} = \log_{10} \frac{100}{\%T} = \log_{10} \frac{100}{100 - \%A}$$

L'absorbance à une longueur d'onde donnée est proportionnelle à la concentration des espèces absorbantes, ce qui est à la base de l'analyse quantitative. Pour faire une l'analyse quantitative par spectrophotométrie d'absorption il faut suivre les étapes suivantes :

- Mesurer d'abord le profil ou la bande d'absorption pour déterminer le ou les maxima de ϵ_{λ} (avec une solution de concentration donnée permettant une absorption suffisante).
- Choisir la longueur d'onde λ pour laquelle ϵ_{λ} est maximum. Comme ϵ_{λ} varie avec λ , on aura intérêt, pour une concentration donnée, à choisir la longueur d'onde pour laquelle ϵ_{λ} est maximum, afin d'avoir l'absorbance la plus élevée possible.
- Etablir une courbe d'étalonnage donnant l'absorbance en fonction de la concentration connue des solutions étalon. On doit obtenir une droite $\text{ABS} = \epsilon_{\lambda} l c$ passant par l'origine et dont la pente est $\epsilon_{\lambda} l$.

- Permet de déterminer la concentration d'une substance en solution dans un milieu simple ou complexe.
- Suivie de la cinétique d'une réaction chimique
- Dosage des protéines exp hémoglobine dans le sang à 540nm.
- Suivie en continue de l'élution des protéine au cours d'une chromatographie
- *Remarque: l'opacimétrie ou la turbidimétrie est une méthode qui utilise le spectrophotomètre à 625 nm pour quantifier le nombre de particules dans une suspension (exp: suspension bactérienne ou de globules rouges)*

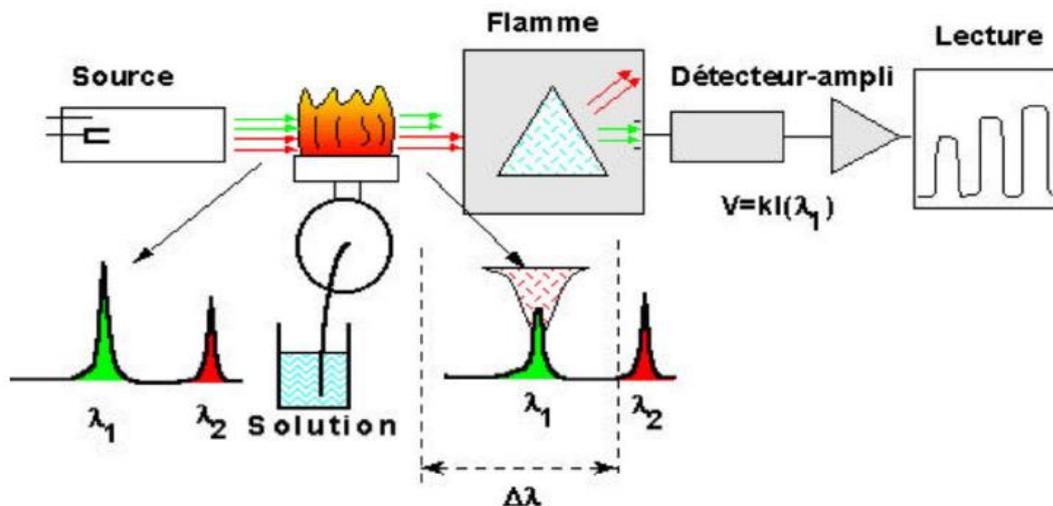
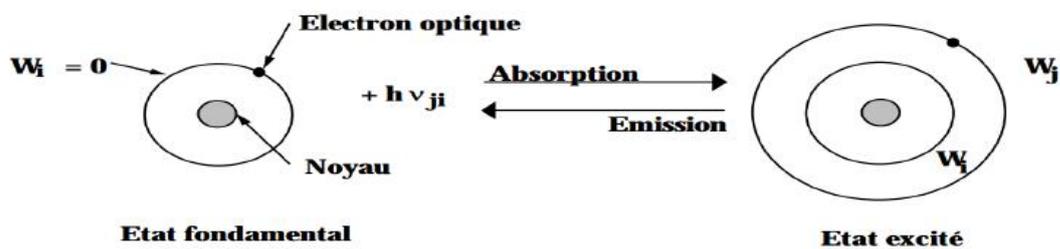
2. photométrie d'Absorption/Emission atomique

L'émission atomique permet d'effectuer des analyses qualitatives, ce qui n'est pas le cas en absorption. En effet, c'est l'échantillon lui-même qui est la source de lumière dans une spectroscopie d'émission. Dans le cas particulier de l'absorption ou émission atomique, on travaille sur des atomes libres à l'état fondamental ($W_i = 0$), ces atomes peuvent absorber des photons et passer ainsi à leurs différents états excités. Pour un atome, on peut donc faire de l'absorption sur les raies qui correspondent au passage état fondamental - états excités, mais avec une sensibilité différente pour chaque niveau excité. Ces raies sont appelées raies de résonance. Les photons absorbés ou émis étant caractéristiques des éléments absorbants ou

émis et leur quantité étant proportionnelle au nombre d'atomes d'élément, l'absorption ou l'émission permet de mesurer les concentrations des éléments que l'on a décidé de doser.

Dans le cas de l'absorption, un faisceau d'intensité connue est envoyé sur les atomes à doser, de longueur d'onde bien choisie et on mesurait l'intensité transmise, pour en déduire le nombre d'atomes absorbants présents dans la flamme. Les atomes dosés étant en large majorité à l'état fondamental car les températures habituelles de flamme sont de l'ordre de 2000 à 3000 K ce qui ne suffit pas à exciter une grande proportion d'atomes.

En émission, on excite thermiquement les atomes, dans la flamme ou le plasma afin qu'ils réémettent leur spectre de raies. En étudiant les spectres détectés, on peut donc voir quels éléments constituent l'échantillon (à condition d'avoir une température suffisamment élevée pour exciter tous les atomes), et évaluer leur quantité grâce à l'intensité des raies.



Applications de la photométrie d'absorption/émission atomique

- Dosages des sels et des métaux dans les liquides biologiques (sang, plasma, urine, homogénat de tissus.....)
- Qualité de l'eau; analyse du contenu en sels et métaux
- Toxicologie dosage des métaux lourds dans les aliments, l'eau et même dans les tissus
- Archéologie; le dosage du Ca, Sr, Zn dans les os
- Géologie l'analyse des éléments pour identification des pierres