EXERCICE II – SÉPARATION D'ACIDES α-AMINÉS PAR ÉLECTROPHORÈSE (6 points)


Arne Tiselius

Les progrès de la chimie et de la biologie moléculaire sont étroitement liés à l'évolution des techniques de séparation des constituants d'un mélange. Le XX^{e} siècle a été une période très féconde dans le domaine du développement de ces techniques, avec notamment l'invention de méthodes de séparation basées sur la migration des constituants d'un mélange sur un support, à des vitesses différentes.

Ainsi l'électrophorèse a été développée à partir de 1931 par le chimiste suédois Arne Tiselius (Prix Nobel de chimie en 1948), dans le but de séparer les protéines du sérum sanguin.

Dans cet exercice, on s'intéresse au principe de séparation des protéines par électrophorèse.

À propos de la technique d'électrophorèse

La technique d'électrophorèse consiste à séparer les constituants d'un mélange de protéines déposé sur un support horizontal (papier à acétate de cellulose, gel d'amidon ou d'agarose, etc.) en le soumettant à un champ électrique $\vec{E}$ supposé uniforme. La séparation repose essentiellement sur les différences de charge électrique et de taille des constituants du mélange.

Les constituants sont supposés immobiles avant que la tension ne soit appliquée.

Quelques fractions de seconde après le début de l'application du champ électrique, pour chaque constituant du mélange, la force de frottement $\vec{f}$, modélisée par $\vec{f} = -k.R.\vec{v}$, compense la force électrique avec :

- k : constante positive caractéristique du constituant et du milieu où s'effectue la migration ;
- R : rayon de Stockes du constituant. Ce rayon est d'autant plus grand que le constituant est volumineux ;
- $\vec{v}$: vecteur vitesse du constituant.

1. Migration des constituants lors de l'électrophorèse

1.1. Justifier que le mouvement de la migration des constituants du mélange est rectiligne uniforme.

1.2. Montrer que la vitesse de migration d'un constituant de charge q est donnée par : $v = \dfrac{|q|.E}{k.R}$.

1.3. Tous les constituants se déplacent-ils à la même vitesse ? Justifier.

On choisit une durée de 40 min pour réaliser l'électrophorèse. Pour un constituant tel que $k.R = 2{,}2\times10^{-12}$ N.s.m^{-1} et portant une charge élémentaire $q = 1{,}6\times10^{-19}$ C placée dans un champ électrique de valeur $E = 7{,}5\times10^{2}$ V.m^{-1}.

1.4. Calculer la durée nécessaire pour obtenir une migration de 10 cm. Conclure sur la durée choisie initialement.

2. Séparation d'un mélange d'acides α-aminés

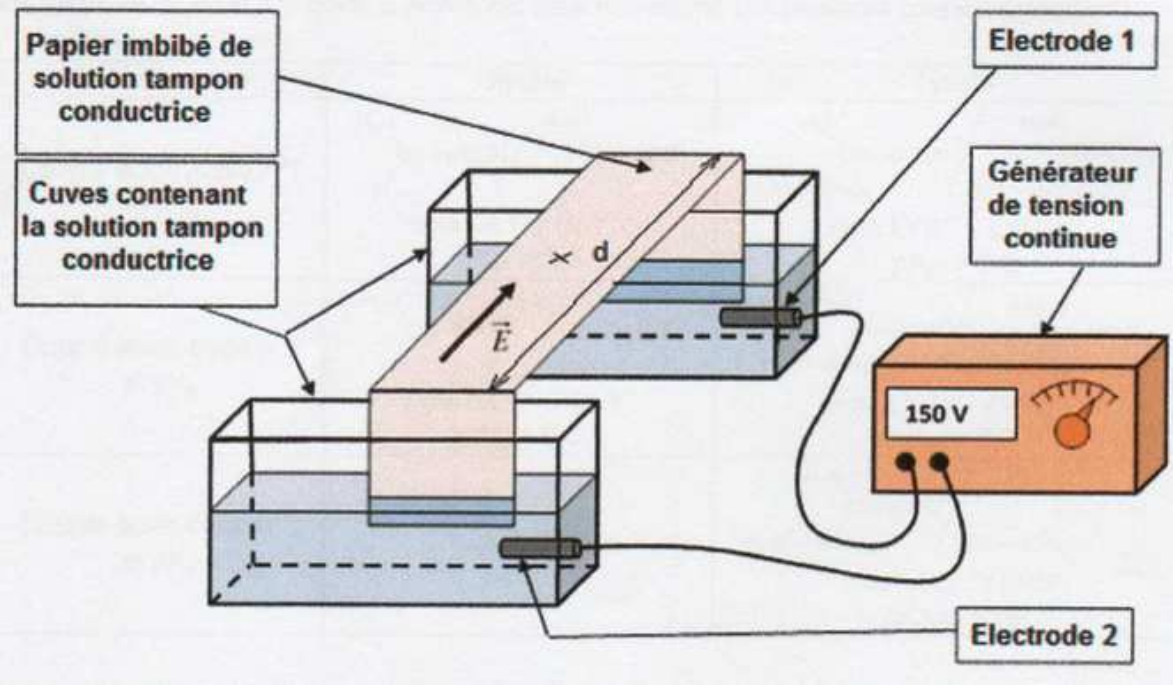
On modélise un mélange, noté M, de protéines par une solution aqueuse de quatre acides α-aminés : la lysine, la glycine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

À partir des documents ci-après, représenter les domaines de prédominance des quatre acides α-aminés évoqués ci-dessus. À partir des réponses aux questions précédentes et des connaissances acquises, associer à chaque tache obtenue lors de l'électrophorèse du mélange M, l'acide α-aminé qui lui correspond.

Le candidat est invité à prendre des initiatives et à présenter la démarche suivie même si elle n'a pas abouti. La démarche suivie est évaluée et nécessite d'être correctement présentée.

Protocole et résultats de l'électrophorèse du mélange M d'acides α-aminés

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



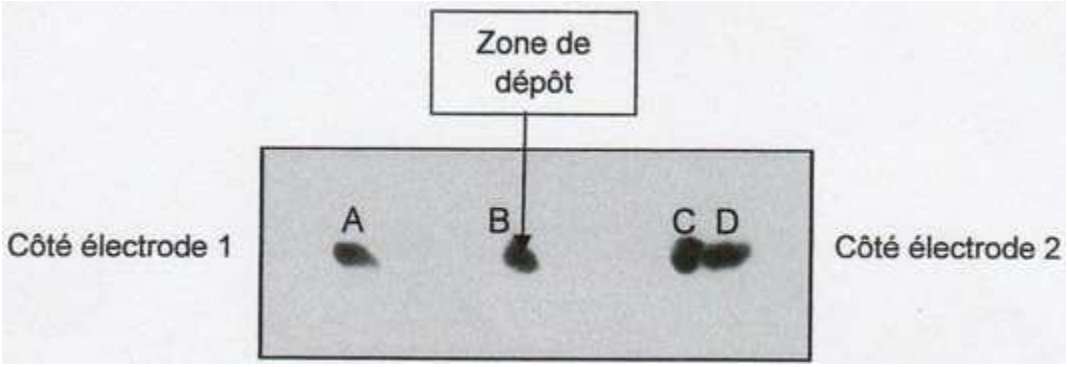
- Le support de migration est une feuille de papier de type acétate de cellulose. Celui-ci est imprégné d'une solution tampon de pH = 6,0.

- Quelques gouttes du mélange M sont déposées au centre de la feuille de papier, marqué d'une croix (voir figure ci-dessus).

- Le générateur de tension, réglé sur la tension U = 150 V est mis en fonctionnement pendant plusieurs heures. Il permet de produire le champ électrique $\vec{E}$, supposé uniforme, dont la direction et le sens sont représentés sur la figure ci-dessus.

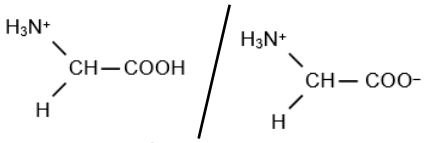
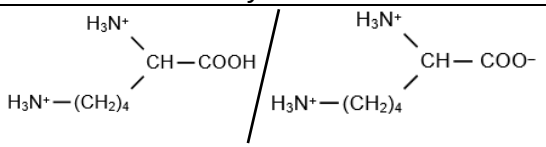
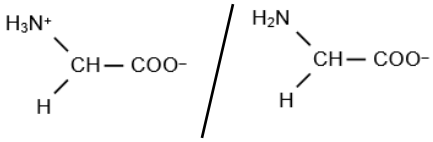
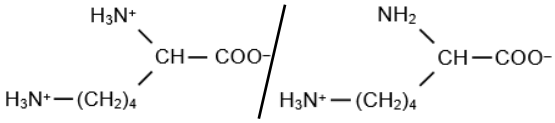
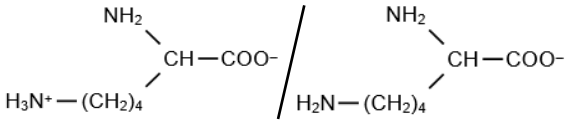
- Le générateur est éteint puis on vaporise sur la feuille de papier, sous hotte, du réactif à la ninhydrine lequel colore les acides α-aminés afin de rendre visible leur position sur le papier après migration.

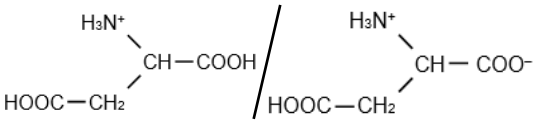
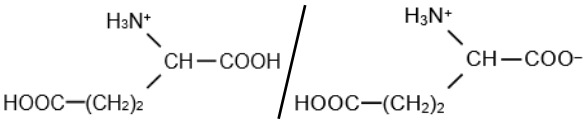
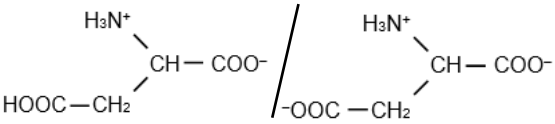
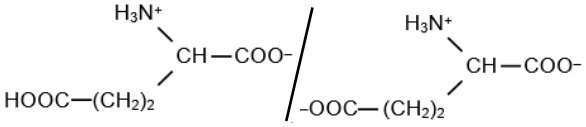
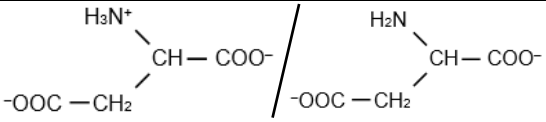
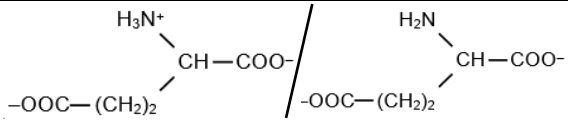
- La feuille de papier fait apparaître alors quatre taches, notées A, B, C et D. Les taches C et D sont seulement légèrement séparées. Chaque tache correspond à un des acides α-aminés du mélange. La feuille de papier est représentée ci-dessous :



Quelques données physico-chimiques concernat les acides α-aminés

De par les propriétés acido-basiques de ses groupes fonctionnels, un acide α-aminé peut se trouver sous plusieurs formes acides ou basiques en solution aqueuse, chaque forme pouvant porter une charge totale positive, négative ou nulle. Un acide α-aminé est ainsi représenté par plusieurs couples acide/base.

Acide α-aminé	Glycine	Lysine
Couple acide/base n°1 et pk_a	 noté GLY^+/GLY^{+-} $pK_{a1} = 2,3$	 noté LYS^{++}/LYS^{+-} $pK_{a1} = 2,2$
Couple acide/base n°2 et pk_a	 noté GLY^{+-}/GLY^- $pK_{a2} = 9,6$	 noté LYS^{++-}/LYS^{+-} $pK_{a2} = 9,0$
Couple acide/base n°3 et pk_a	Aucun	 noté LYS^{+-}/LYS^- $pK_{a3} = 10,5$

Acide α-aminé	Acide aspartique	Acide glutamique
Couple acide/base n°1 et pk_a	 Noté ASP^+/ASP^{+-} $pK_{a1} = 2,2$	 Noté GLU^+/GLU^{+-} $pK_{a1} = 2,2$
Couple acide/base n°2 et pk_a	 Noté ASP^{+-}/ASP^{+--} $pK_{a2} = 3,9$	 Noté GLU^{+-}/GLU^{+--} $pK_{a2} = 4,3$
Couple acide/base n°3 et pk_a	 Noté ASP^{+--}/ASP^{--} $pK_{a3} = 9,8$	 Noté GLU^{+--}/GLU^{--} $pK_{a3} = 10,5$