

II. Méthodes Electrophorétiques

1. Introduction :

L'électrophorèse : Electro : énergie électrique. Phorèse : phoros (Grec) porter, avoir en soi.

L'électrophorèse est avec la chromatographie, la principale des techniques utilisées en **biologie** pour la **séparation** et la **caractérisation** des molécules. Elle a quelques applications en **chimie**, mais est principalement utilisée en **biochimie ou biologie moléculaire** pour la séparation des **protéines** ou des **acides nucléiques**.

Historique :

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du serum sanguin en appliquant un champ électrique.

La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube. Il a pu ainsi obtenir sur le **pôle +** des protéines de charge très **négative** comme l'**albumine** et sur le **pôle -** des protéines de charge plus **positive** comme les **globulines**.

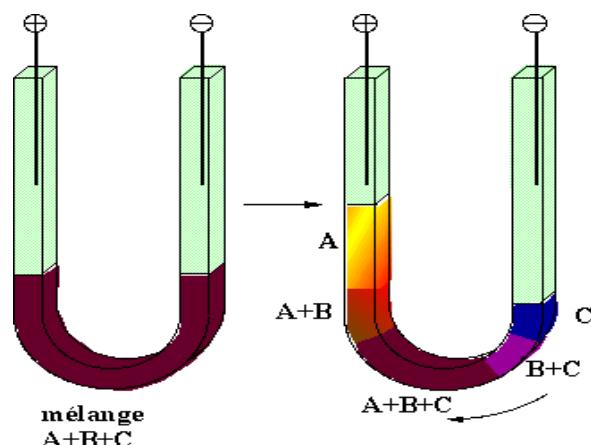


Figure 1 : Electrophorèse libre ou Electrophorèse en veine liquide

2.Définition :

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

Elle est utilisée pour **séparer et caractériser** des **molécules** telles que des **protéines** ou des **acides nucléiques** (ADN, ARN, etc.) basée sur le fait que dans un milieu donné soumis à un **champ électrique**, la **migration** et la **séparation** des molécules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, en fonction de leur **taille** et de leur **forme**.

3.Principe :

L'électrophorèse est une technique permettant de **déplacer des ions** (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un **champ électrique**.

Les anions (chargés négativement) migrent vers l'**anode** (potentiel positif) et les **cations** (chargés positivement) migrent vers la **cathode** (potentiel négatif).

En ce qui concerne les molécules **non chargées**, il n'existe pas de migration.

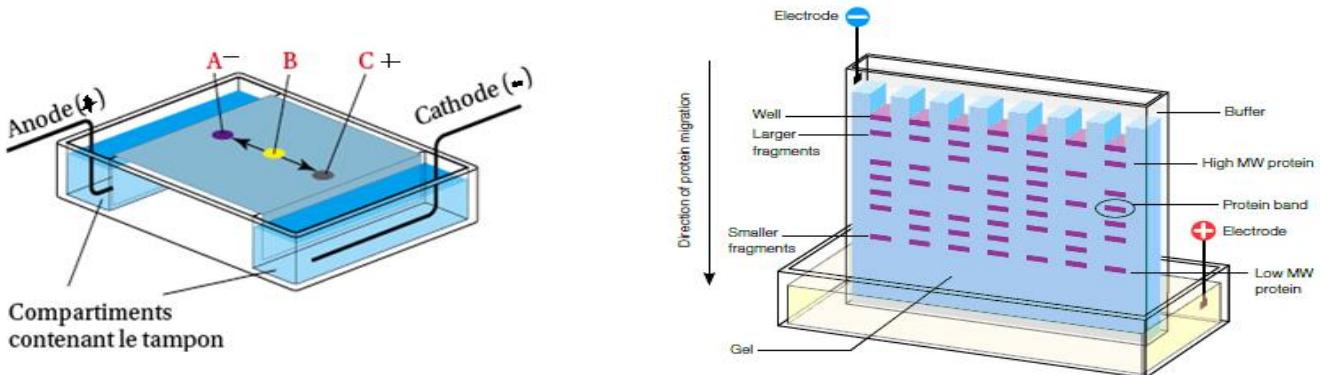


Figure 2 : Principe de l'électrophorèse

4. Paramètres et conditions de réalisation.

4.1. Electrophorèse native ou L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Dans l'électrophorèse en conditions **non dénaturantes ou native**, les molécules sont séparées dans leur **état natif**. Il faut donc éviter les conditions dénaturantes :

- Les pH élevé ou au contraire très bas.
- Des traitements à des températures élevées.
- Les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel).
- Les agents chimiques dénaturants.

Cette technique présente certains **avantages** comme celui de permettre la séparation de molécules entières.

Et certains **inconvénients** comme l'interprétation difficile, il est fréquent que les molécules présentes dans l'échantillon soumis à électrophorèse se collent entre elles, formant de très gros ensembles impossibles à séparer.

4.2. Electrophorèse en milieu dissociant ou L'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Comme son nom l'indique, les molécules sont soumises à un traitement **dénaturant** avant leur séparation électrophorétique. Il existe différentes méthodes pour dénaturer les molécules. Les plus classiques sont :

- Les pH élevé ou au contraire très bas.
- Des traitements thermiques (des températures élevées).
- Les hautes forces ioniques (fortes concentrations en sel).
- Et bien sur l'utilisation d'agents dénaturant comme **l'urée** ou le **SDS** (sodium dodécyl sulfate).

5. Les supports électrophorèses

On peut déterminer 2 types d'électrophorèses selon leurs supports:

A.Support liquide => « Electrophorèse en veine liquide » dite « libre ».

Pour les **TRES grosses** particules (cellules et organites); La migration s'effectue au sein d'un **liquide** soumis à un **champ électrique** de courant continu.

Presque plus utilisée car l'appareillage est couteux et la mise en œuvre est longue et délicate.

B.Support poreux => « Electrophorèse de zone ».

Pour séparer les **très grosses molécules** (Protéines ou petits fragments d'Acides Nucléiques); Ce type d'électrophorèse utilise un support **poreux** pour stabiliser la **phase liquide**.

- ✓ Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :
 - électrophorèse sur **papier filtre**
 - électrophorèse sur **acétate de cellulose**
 - électrophorèse sur **gel** (amidon, agar, agarose, polyacrylamide, etc.).
- ✓ 2 types de montage peuvent être mis en place dans l'électrophorèse de zone :

- Montage horizontal:

Utilisé pour les supports **en acétate de cellulose** ou **en papier**. Le support se présente sous forme de longues et étroites bandelettes.

Les extrémités du support plongent dans un liquide tampon d'électrode.

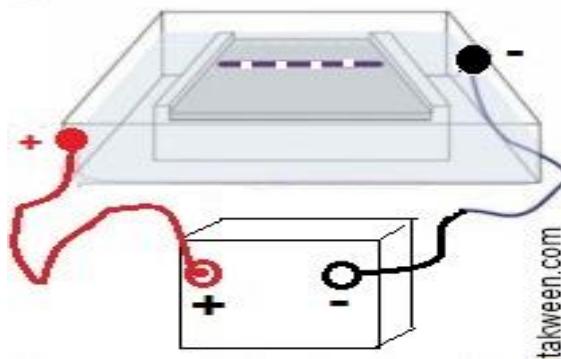


Figure 3 : Electrophorèse horizontale

- Montage vertical:

Utilisé pour les supports en **gel polyacrylamide** ou, plus rarement en **gel d'agarose**.

Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre.

Durant la gélification on aura pris soin de faire des puits où on déposera les échantillons.

L'extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.

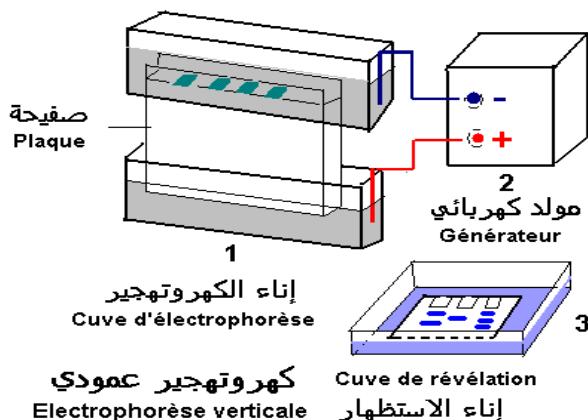


Figure 4 : Electrophorèse horizontale

6. Différents types d'électrophorèse et leurs applications.

6.1. Electrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose.

Migration des molécules principalement en fonction de la **charge globale**, et en conditions **non dénaturantes**.

Principe :

- imprégnation d'une bande par un **électrolyte** (substance conductrice).
 - dépôt d'1 goutte de solution contenant l'espèce ionique à étudier sur la bande de papier ou l'acétate de cellulose.
 - établissement d'une tension électrique entre les 2 extrémités de la bande de papier
- L'espèce ionique se déplacera sous l'action du champ électrique avec une vitesse propre à elle.

Remarque :

Un **électrolyte** est une **substance conductrice**, car elle contient des **ions mobiles**.

Par exemple : le sel de table (chlorure de sodium, NaCl) ou le sucre (comme le glucose)

6.1.1. Electrophorèse sur papier.

Sépare les **petites molécules** (acides aminés ou petits peptides)

Permet de déterminer le **point isoélectrique d'un acide aminé** en mesurant sa mobilité à différents pH.
Peu utilisée de nos jours.

Remarque :

-Le **point isoélectrique** (pI ou pKi) ou **potentiel hydrogène isoélectrique** (pHi) est le pH auquel une molécule est sous forme **d'ion mixte** ou sous un **potentiel électrique neutre**.

6.1.2. Electrophorèse sur acétate de cellulose.

Séparation de molécules de **milieux complexes** (ex plasma)

Séparation de **petites molécules** migrant à vitesse proportionnelle à leur charge

✓ Cas de l'Electrophorèse des hémoglobines A et S sur bande d'acétate de cellulose

Permet l'identification des phénotypes moléculaires et des génotypes par électrophorèse de l'hémoglobine (**voir diapositifs**).

De + en + remplacée par les électrophorèses sur gel.

6.2. Electrophorèse sur gel.

Il existe différents types **d'électrophorèse sur gel** les plus utilisés sont :

- électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)
- électrophorèse sur gel d'agarose
- électrophorèse bi-dimensionnelle
- Isoélectrofocalisation.
- Immunoélectrophorèses.

Remarque :

Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en **conditions dénaturantes** (Détergents type SDS ou urée)

6.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis):

Cette technique est très utilisée en **immunologie** et dans l'étude des **protéines** car elle permet, après la **séparation** des différentes protéines, leur **transfert** sur une membrane afin d'être identifier par le biais d'**anticorps spécifiques**.

Elle est également utilisée pour le **séquençage de l'ADN**.

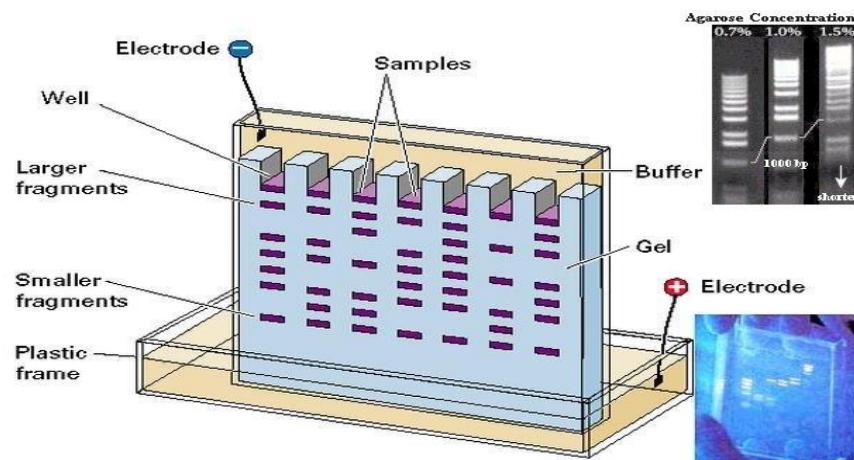


Figure 5: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (montage vertical)

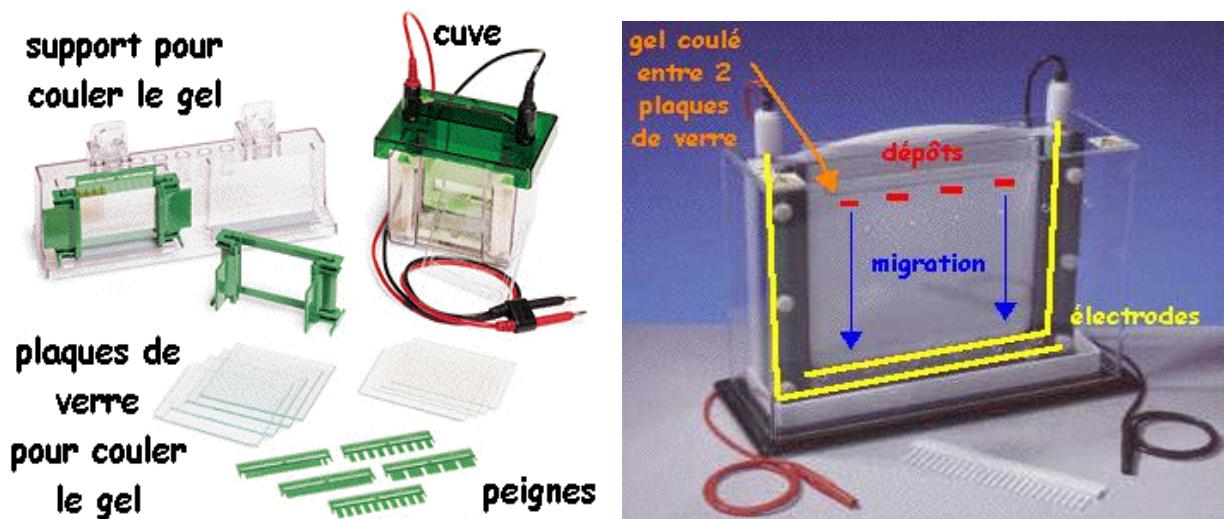


Figure 6 : Le matériel d'électrophorèse

Le matériel d'électrophorèse se compose:

des plaques

des pinces

le joint d'étanchéité

Le peigne

les espaces

Principe :

- Deux sorte des gels d'acrylamide ont utilisés, **un gel de séparation** (resolving gel) qui peut être à 6%; 8%; 10%; 12% ou 15%. Plus le gel est dense meilleure sera la séparation et **un gel de concentration** (stacking gel) à 5%.
- La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs: le **TEMED** (tetra-méthyl-èthylènediamine) et l'**ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.
- La migration se fait grâce à une solution tampon (tampon de migration) de Tris 25mM, glycine, d'eau distillée
- Les plaque sont réunies grâce aux pinces entres lesquelles on met des espaces, on rajoute les joint d'étanchéité
- Le gel de séparation (resolving gel) est aussitôt coulé entre les 2 plaques à l'aide d'une pipette et ensuite recouverts d'eau distillée afin d'obtenir une surface parfaitement horizontale.
- Retirer l'eau distillée au dessus du gel de séparation puis remplir le montage jusqu'au niveau supérieur des plaques de verre, de gel de concentration (stacking gel) et polymérisés grâce au **TEMED** et à l'**ammonium persulfate**. Le peigne est alors mis en place pour former des puits dans le gel de concentration.
- Le peigne est retiré puis les plaques et les cuves de migration sont placées sur le support. Les cuves sont remplies avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure. Dépot de 50 microlitres d'échantillon protéique dénaturé dans chaque puit à l'aide d'une seringue et selon la technique sous-marine.
- Les électrodes de la cuve sont reliées au générateur. La migration se fait à 30 mA jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur des plaques.

Révélation:

Le gel est retiré des plaques puis placé sur un agitateur et coloré pendant 30 minutes dans une solution de coloration de **bleu de coomassie**, puis décoloré 3 fois à 30 minutes avec une solution décolorante composée d'isopropanol, d'acide acétique et d'eau.

Remarque :

-Une **solution tampon** est une solution qui maintient approximativement le même **pH** malgré l'addition de petites quantités d'un **acide** ou d'une **base**, ou malgré une dilution.

En condition dénaturante :

Électrophorèse sur gel polyacrylamide-SDS (SDS-page).

Sépare les **protéines** réalisée **en condition dénaturante**, en **présence** de **SDS** Sodium Dodécyl Sulfate (C₁₂H₂₅SO₄-) détergent anionique.

Les conditions d'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) permettent la suppression des facteurs **forme** et **charge** lors de la migration et Sépare les protéines uniquement en fonction du facteur **taille**.

6.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.

L'electrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en **biochimie** et en **biologie moléculaire** pour **séparer** les fragments de l'**ADN** et l'**ARN** ou **des protéines** en fonction de leur **poids et tailles** moléculaire. La technique de l'electrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des **acides nucléiques** chargés **négativement** sous l'effet d'un **champ électrique**. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Même principe que l'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide sauf que pour l'Electrophorèses sur gel d'agarose, la révélation des bandes d'ADN se fait par coloration : Bromure d'Etidium (BET) et l'éclairage sous ultraviolet (voir diapositifs).

Remarque : cette technique est peu utilisée dans le cas des protéines, car dans ce domaine les gels de polycrylamide donnent toute satisfaction.

6.2.3.Isoélectrofocalisation : (IEF de l'anglais isoelectric focusing ou electrofocusing) est une technique de séparation des **molécules**, tel que les **protéines**, par des différences dans leur **point isoélectrique**.

Ici, la séparation des molécules de l'échantillon se fait dans un gradient de pH (Force motrice des protons). Les molécules se déplacent sous l'effet d'un champ électrique jusqu'à l'endroit où le pH égal à leur **pI** (point isoélectrique).

Cette méthode présente l'avantage de lutter contre la diffusion de l'échantillon hors de sa zone de **pI**.

On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration.

Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication. Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle.

Remarque :

-**Le point isoélectrique** (**pI** ou **pKi**) ou **potentiel hydrogène isoélectrique** (**pHi**) est le pH auquel une molécule est sous forme d'ion mixte ou sous un potentiel électrique neutre.

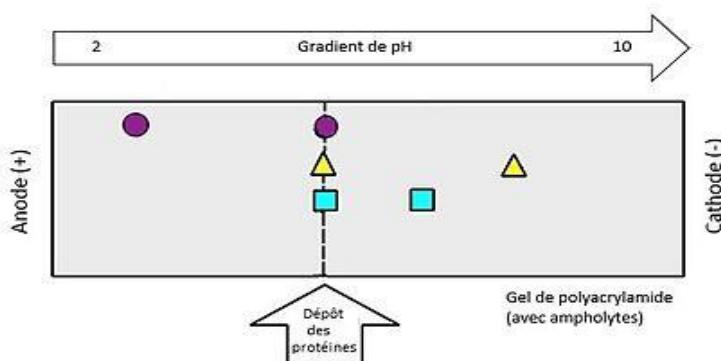


Figure 7 : Isoélectrofocalisation

6.2.4. Electrophorèse bidimensionnelle

C'est un type d'électrophorèse utilisé pour analyser des **bandes protéiques** très proches formant un **chevauchement**. Pour séparer ces bandes, la combinaison **de 2 modes de séparation dans 2 dimensions** devient nécessaire.

L'électrophorèse bi-dimensionnelle permet **la résolution >1 000 protéines** différentes alors que le SDS-PAGE (unidimensionnelle) permet uniquement **la résolution <50 protéines**.

Dimension 1

Séparation des protéines en fonction de la **charge** par **Focalisation Isoélectrique (FIE)**

On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi. On soumet alors à un fort courant électrique.

Dimension 2

Séparation en fonction de la **taille ou la masse** des protéines par **SDS-PAGE**

Le gel étroit de protéines séparées par **FIE** est soumis à une **SDS-PAGE** dans une direction **perpendiculaire**.

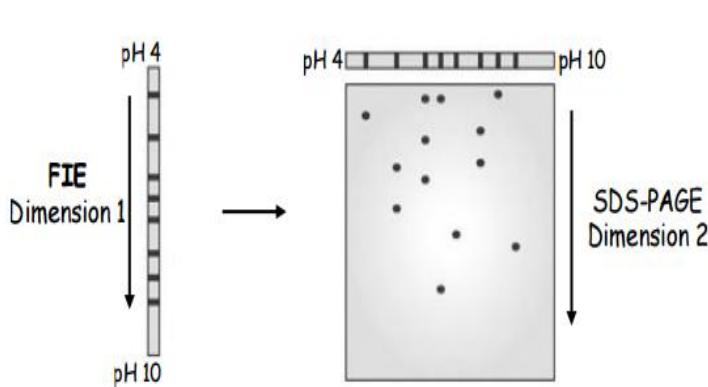


Figure 8 : Electrophorèse bidimensionnelle

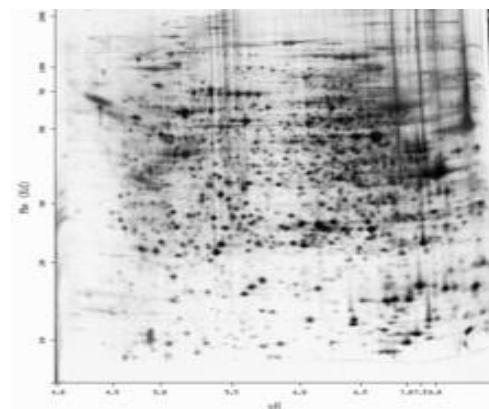


Figure 9: Electrophorèse bidimensionnelle en photo

6.2.5. L'immuno-électrophorèse :

La révélation est basée sur une réaction « antigène-anticorps ». L'immunoélectrophorèse est une méthode de fractionnement des **protéines** présentes dans le **sérum de sang** ou l'**urine**, après contact avec des anticorps marqués.

Ces anticorps permettent de repérer ensuite la protéine recherchée.

Principe

Dans un premier temps, les protéines sériques sont séparées par électrophorèse. Ensuite les fractions obtenues sont étudiées avec des anticorps spécifiques des protéines sériques par la méthode de la double diffusion

- **Electrophorèse**

-Dépôt des sérums de chèvre ou de mouton dans les puits marqués.

-Tension de 100V appliquée pendant 45 mn

-Les protéines qui ont une charge globale négative sont séparées essentiellement en fonction de cette charge.

Résultats

Les fractions albumine, α_1 , α_2 , β et γ globulines sont séparées comme dans une électrophorèse de zone classique mais ici on ne les visualise pas par coloration.



Figure 10 : L'immuno-électrophorèse

• Immunodiffusion

Les immuns sérums utilisés ont été préparés à partir de sérums de chèvre ou de mouton et les antisérum contre sérum total humain.

-Dépôt des antisérum IgG humaines, les IgA humaines et les IgM humaines dans chaque rigole parallèle à l'axe de migration.

- Double diffusion

Les protéines sériques (Ag) et les anticorps diffusent librement dans le support. Des complexes immuns se forment dans la zone d'équivalence (réseau) où il y a précipitation.

-Lavage et coloration

Elimination par lavage-absorption (NaCl 0,85%) des protéines restées libres puis séchage des plaques et coloration à l'aide d'un colorant bleu pour protéines.

Décoloration puis séchage.

Seuls les arcs de précipitation apparaissent colorés.

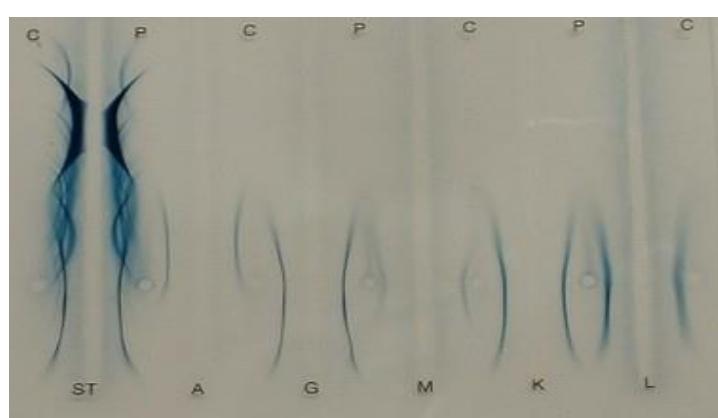


Figure 11 : les arcs de précipitation colorés

Immunoélectrophorégramme