

Les techniques électrophorétiques

1.1. Histoire de l'électrophorèse:

L'origine de cette technique a été imaginée par **S.E. Linder et H. Picton en 1892**. Ils se sont inspirés des études de Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

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 sérum 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. Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique **d'électrophorèse sur papier**.

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec **C.A. Williams**, une méthode connue sous le nom **d'analyse immuno-électrophorétique**, qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines. La méthode est rapidement utilisée dans de nombreux laboratoires médicaux pour des besoins de diagnostics.

En 1955, O. Smithies met au point la technique **d'électrophorèse en gel d'amidon**.

En 1957, Joachim Kohn sépare les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique **d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose**.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant **SDS** (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

1.2. Définition

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse est donc une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

1.3. Principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations.

1.4. Les différents types d'électrophorèses

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

1.4. 1. L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tiselius (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée (ceci afin de pouvoir réaliser des mesures optiques au travers du tube, comme avec une cuve de spectrophotomètre) : la séparation n'est pas totale, mais les frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV, indice de réfraction, fluorescence...). Cette méthode est utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines.

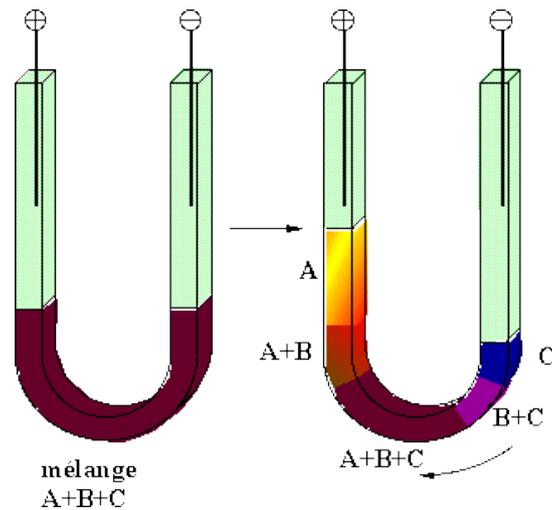


Fig 1 : appareillage pour l'électrophorèse libre, en veine liquide

1.4. 2. L'électrophorèse sur supports poreux (électrophorèse de zone)

Ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Différents types de support peuvent être utilisés.

Différents supports d'électrophorèse de zones :

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- papier
- acétate de cellulose
- semi-solide (gels)

- Différents types d'électrophorèse sur gel:

- électrophorèse sur gel d'agarose
- électrophorèse en champ pulsé
- électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)
- électrophorèse bi-dimensionnelle
- Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée).

a- Électrophorèse sur papier

Assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les

deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine.

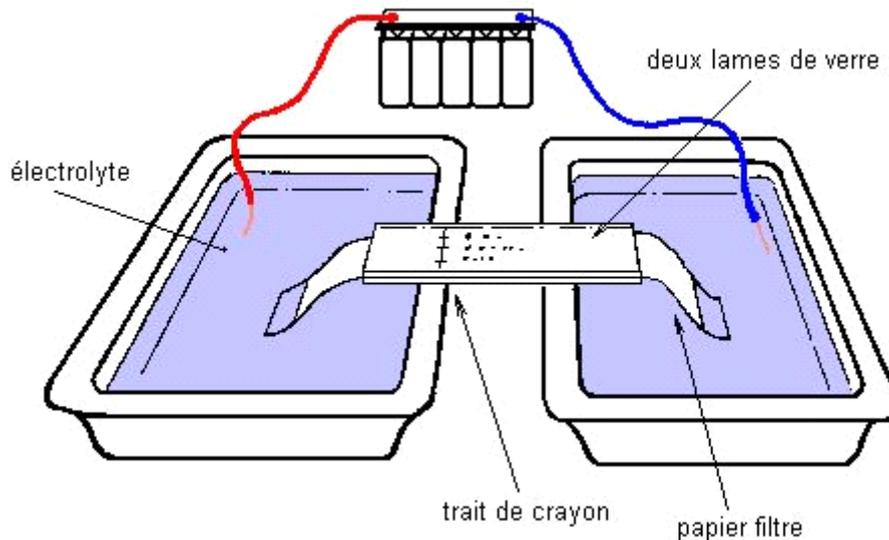


Fig 2 : appareillage pour l'électrophorèse sur papier.

b-Électrophorèse sur acétate de cellulose :

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.

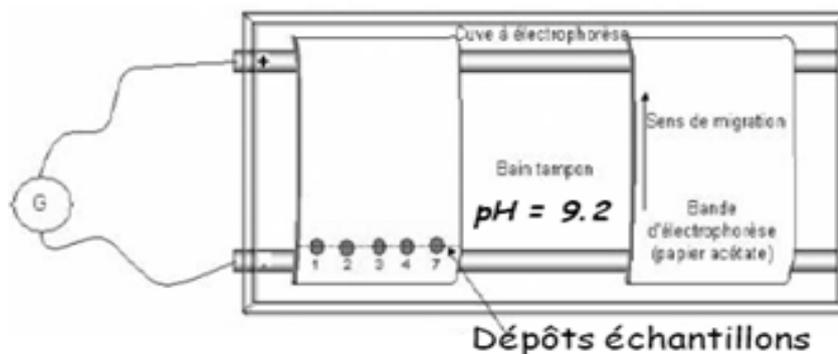


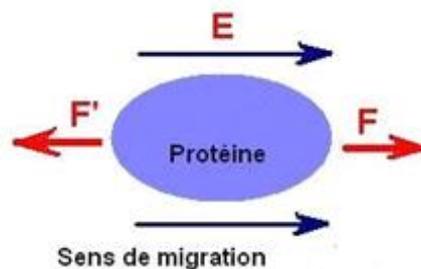
Fig 3 : appareillage pour l'électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose.

c-Électrophorèse sur gel d'amidon :

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétiques des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes.

d-Électrophorèse sur gel

Sous l'action d'un champ électrique, E, une protéine se déplace avec une vitesse(v) proportionnelle aux champs:



$V = \mu E$, avec μ appelée « **mobilité électro phorétique** »

$$\mu = v/E$$

μ en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$, v en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ et E en $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

Le champ électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force, F, sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q;

$$F = Q \cdot E$$

Les forces de frottement, F', dues à la viscosité (η) vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner;

$$f = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante; on peut alors écrire :

$$Q \cdot E = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \text{soit} \quad v = Q \cdot E / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

On définit pour chaque particule sa **mobilité μ** , de manière indépendante du champ électrique, par la relation suivante:

$$\mu = v/E \text{ (= vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm)}$$

$$\text{soit encore: } \mu = Q / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs : q, (η) et r.

Elle est proportionnelle à sa charge (q), inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η) et son rayon (r). La mobilité est une caractéristique de chaque particule, il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

d.1. Électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire :

- Soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité,
- Soit à des fins préparatoires, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside.

L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (surfusion) Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne fond pas tant que la température reste inférieure à 100 °C.

D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

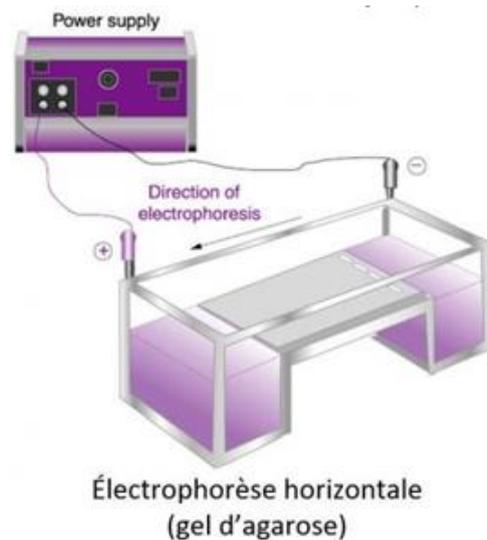


Fig 4 : appareillage pour utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose.

d.2. Sur gel de polyacrylamide

d.2.1. L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Cette technique aussi appelé PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est très utilisée en immunologie, dans l'étude des protéines et également utilisée pour le séquençage de l'ADN.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'**acrylamide** (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de **bisacrylamide** qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

La polymérisation est réalisée grâce à l'ajout de 2 réactifs: le **TEMED** (N,N,N',N' tétraméthyl-éthylènediamine) et **l'ammonium persulfate** qui deviennent des anions hyperactifs en présence de lumière.

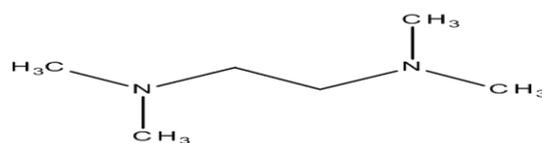
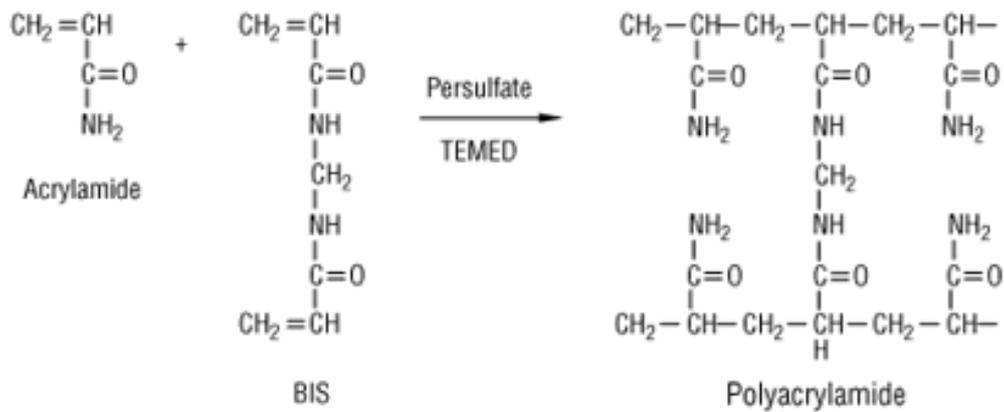


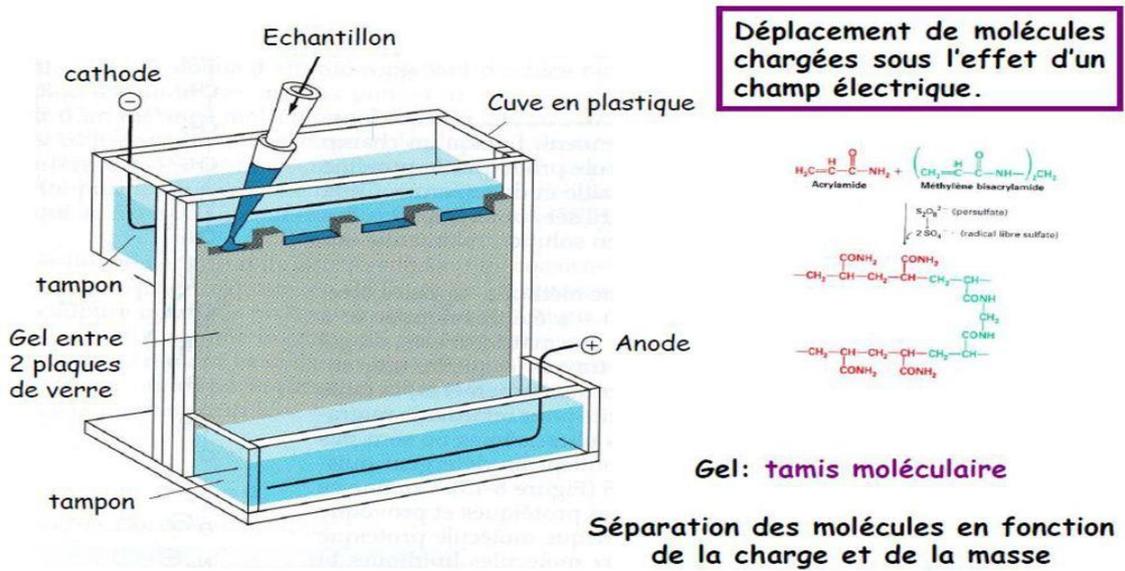
Fig 5: Structure chimique du TEMED.

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. Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.



- Avant que le mélange réactionnel n'ait durci, il est coulé dans un récipient formé par deux plaques de verres et polymérise en une couche mince de gel de quelques Millimètres.
- Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel.
- Le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH ~9 pour que toutes les protéines aient une charge négative).
- Un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration
- après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées

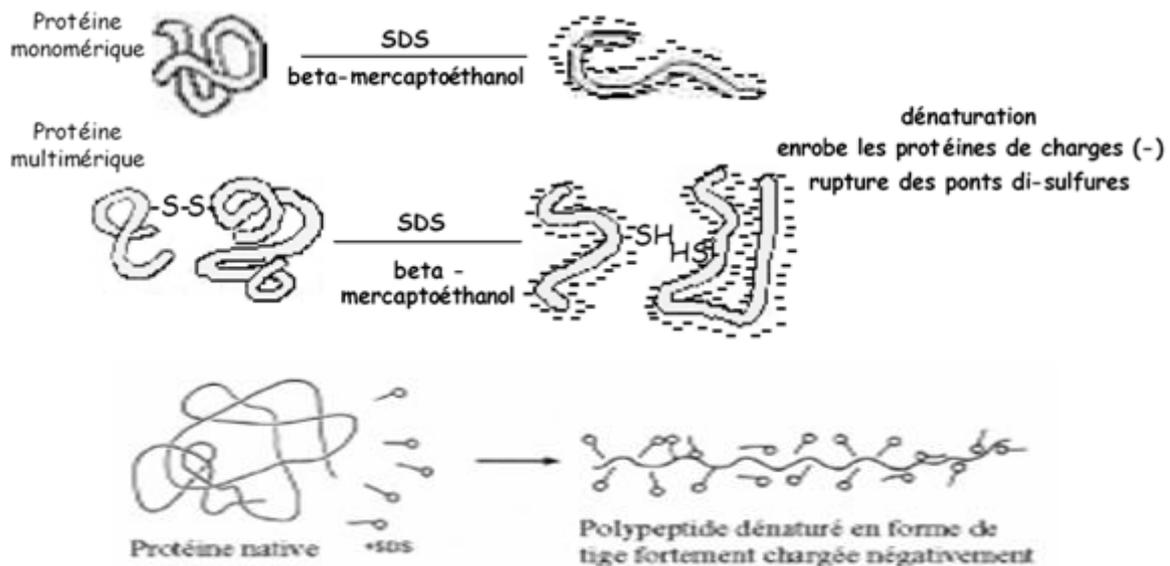
Les protéines migreront vers l'anode (+) selon leur ratio charge/masse



d.2.2. L'électrophorèse en conditions dénaturantes

Une variante de cette technique consiste à utiliser du **SDS (Sodium Dodécylsulfate)** qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de **leur masse moléculaire**. Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.

Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le **β -mercaptoéthanol** qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique. **La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines**

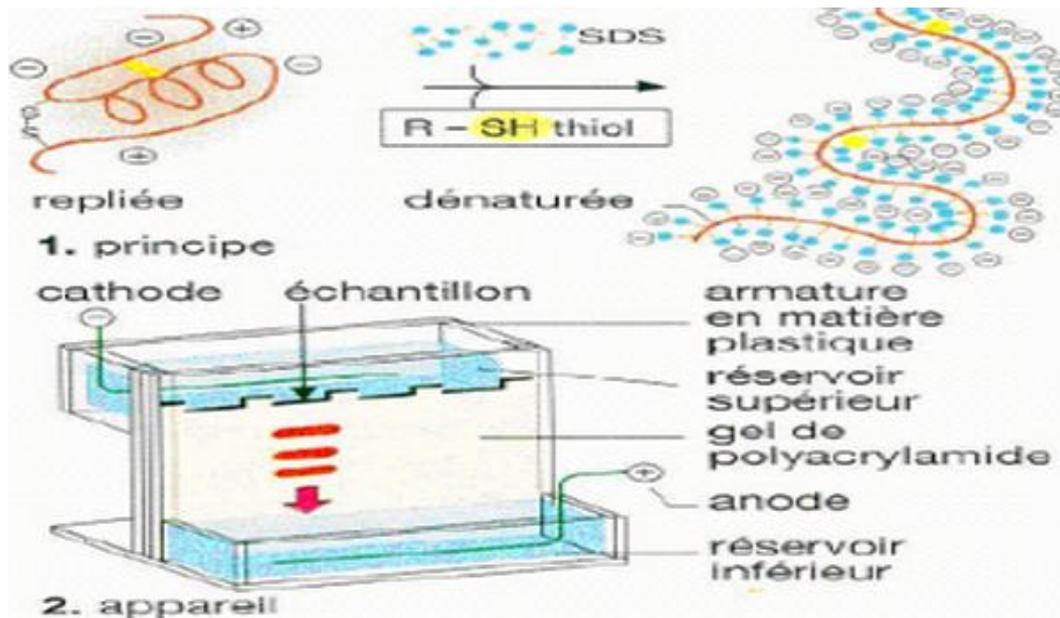


Par conséquent le rapport charge/masse sera le même pour toutes les protéines de même masse et la séparation électrophorétique du gel avec du SDS dépendra uniquement du phénomène de gel-filtration par les pores du gel.

Cette méthode donne la meilleure résolution et les bandes sont les plus résolues de toutes les méthodes d'analyse- en utilisant des marqueurs de poids moléculaires connus.

- cette méthode possède deux grands avantages par rapport à l'électrophorèse ordinaire :

- l'utilisation de SDS dissout les agrégats et les particules insolubles qui peuvent causer des problèmes en bloquant les pores du gel
- la mobilité électrophorétique possède une relation directe avec le poids moléculaire



d.3. Visualisation des protéines dans les gels

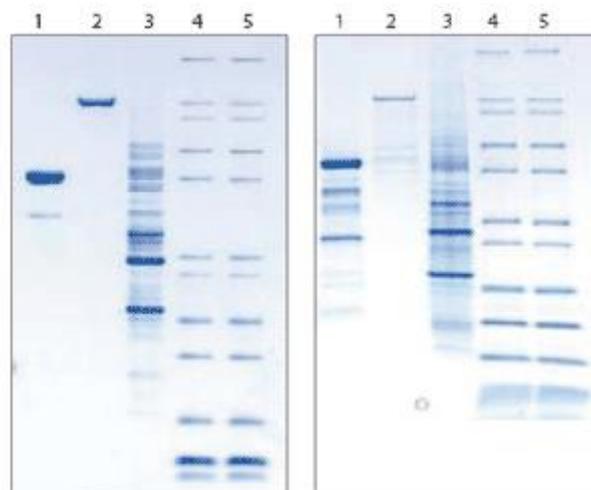
Une fois que la migration des protéines dans le gel est terminée, il faut visualiser les bandes obtenues par les protéines

- les différentes approches sont:

- la coloration avec le **bleu de Coomassie brillant**
- la coloration au **nitrate d'argent**.
- Le **bleu noir naphthol**.

- une approche plus spécifique consiste à détecter la protéine d'intérêt avec un

Exemple de gel après coloration au bleu de Coomassie :



e.1.Électrophorèse bidimensionnelle

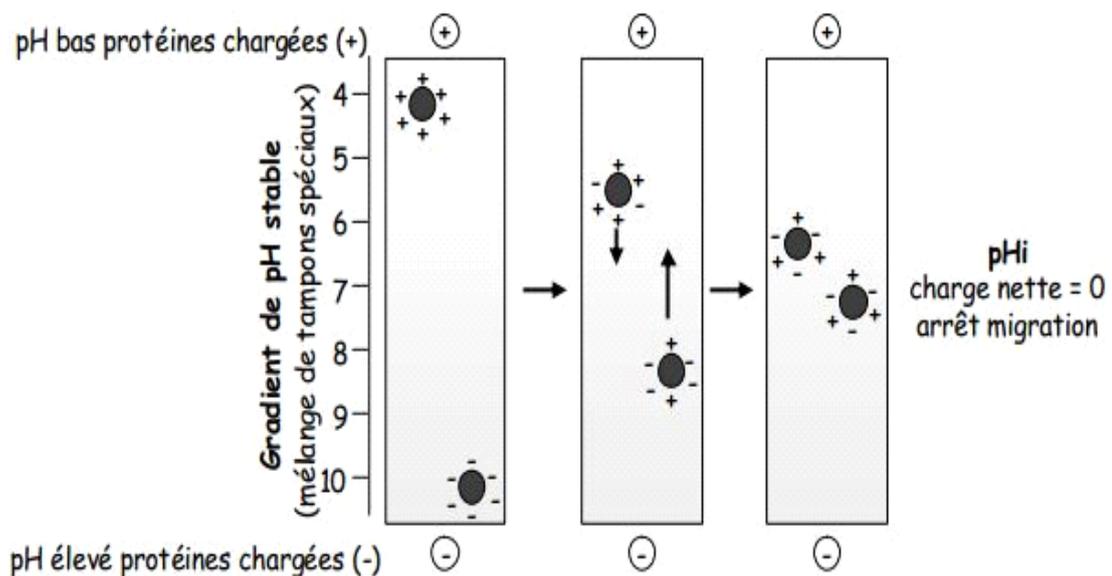
Lorsqu'il est existé des bandes protéiques très proches, on a un chevauchement. Par les méthodes unidimensionnelles la résolution est bon pour moins de 50 protéines. Grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle, on combine deux modes de séparation différents. La résolution peut être appliquée pour plus de 1000 protéines différentes.

- **DIMENSION 1**

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

La migration est effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. 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 : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large ex :3-9, ou plus ou moins étroite ex : 4-5 ou 5-6.5)

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



Les protéines migrent vers la position du gradient = pHi et s'y immobilisent.

- **DIMENSION 2**

Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction perpendiculaire.

