

Chapitre 4. L'électrophorèse des protéines et des acides aminés : l'essentiel

Introduction et généralités :

1. Principe :
2. Electrophorèse sur papier
3. Electrophorèse sur gel SDS -PAGE.
4. L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel (2DPAGE)

Introduction et généralités

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique.

Les molécules se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge nette z , à une vitesse v proportionnelle à cette charge.

Cette technique permet, entre autre, de :

- déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective
- d'évaluer le degré de purification d'une protéine
- de séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps)
- de séparer des protéines sur des gels bi-dimensionnels (technique de départ en protéomique), selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation) puis masse molaire.

Applications principales : biochimie et biologie moléculaire. Séparation des protéines et des acides nucléiques

1.Principe :

Le principe repose sur la migration de molécules chargées (perte de neutralité électrique) dissoutes ou en suspension dans un solvant, sous l'effet d'un champ électrique

- Champ électrique : générateur de courant continu
- Support du champ : tampon conduisant le courant d'un pôle à l'autre

En fonction des caractéristiques propres des molécules et des conditions d'électrophorèse la vitesse de migration est différente pour les molécules chargées et permet leur séparation les unes des autres.

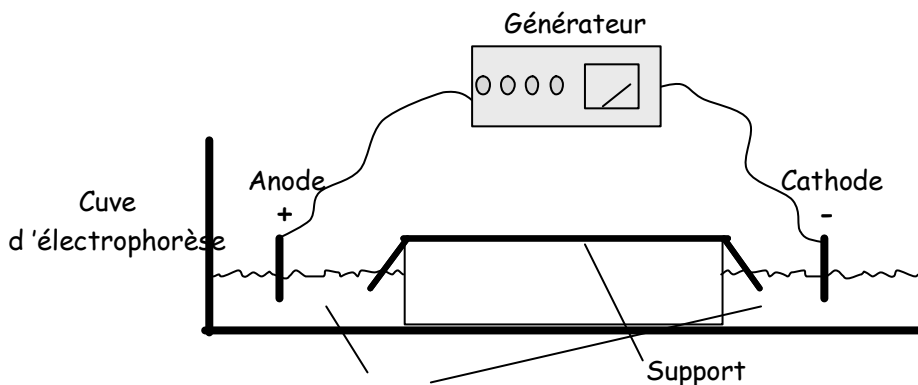
Cation : chargé +. Attiré lors de l'électrolyse par la cathode (ou électrode négative)

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

3. Electrophorèse sur papier

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.



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.

La migration des molécules principalement en fonction de la charge globale, et en conditions non dénaturantes. Cette technique permet de :

- Séparation des petites molécules (acides aminés ou petits peptides)
- coloration des protéines (rouge Ponceau)

- analyse densité optique des bandes
- Intensité coloration proportionnelle concentration protéines ou acides aminés.

3. Electrophorèse sur gel : SDS-PAGE.

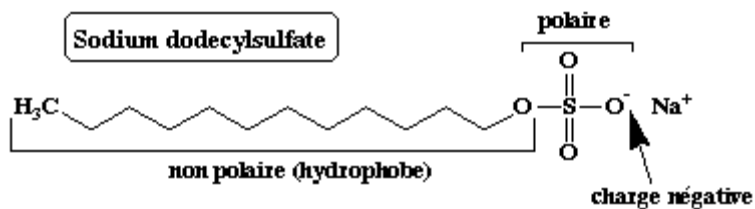
Les électrophorèses sont réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée) SDS-PAGE.

("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE)

Principe :

On fait bouillir un mélange de protéines en présence :

- d'un agent réducteur : le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.
- d'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques.



E. Jaspard (2006)

En conséquence :

- les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native
- les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme monomérique (structure primaire)

Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

C'est un gel, obtenu par polymérisation :

- d'acrylamide qui forme des chaînes

- et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide

Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. En conséquence : plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer.

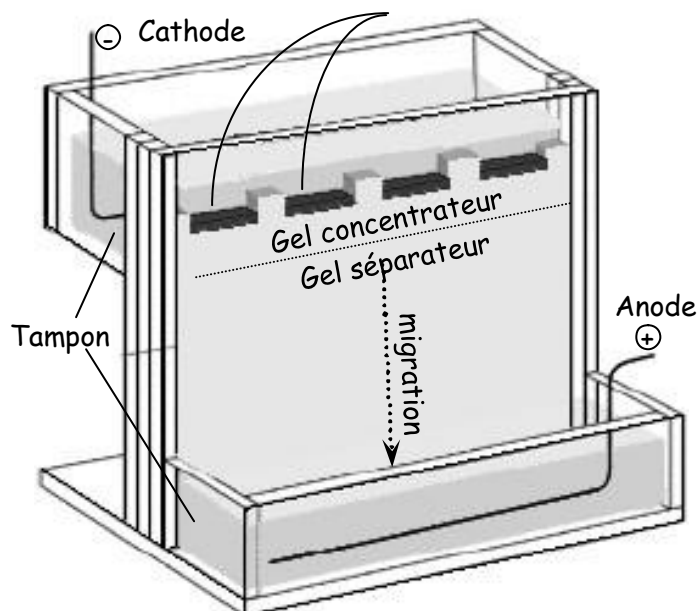
Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques.

Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits. La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes allant de 20 μL à 200 μL d'échantillon de protéines à séparer.

Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse.

Du tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique.

Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits.



La séparation des molécules s'effectue selon leur ratio charge / masse moléculaire.

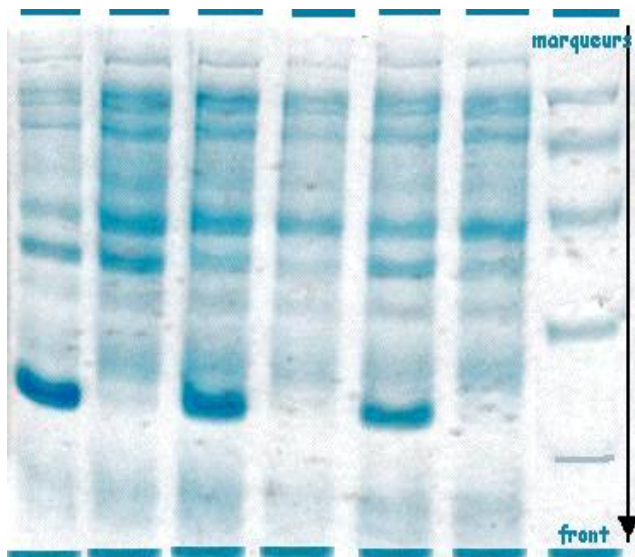
Elle est fonction également de la taille des pores et de la concentration du gel.

Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique.

Les protéines sont révélées par une coloration avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (plus sensible).

On obtient différentes bandes pour chaque piste de la figure ci-contre (la flèche indique le sens de migration).

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).



Exemple de marqueurs : myosine (205 kDa) - β galactosidase (116 kDa) - albumine (66 kDa). - ovalbumine (45kDa)

4. L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel (-2DPAGE)

a. Principe

La stratégie la plus courante est de séparer dans un premier temps les protéines par électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide (ou 2D - PAGE - "two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis").

En effet, du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur masse molaire et leur charge nette à un pH donné. Cette valeur est caractérisée par le point isoélectrique ou pI.

Les protéines ont :

- des pI qui s'échelonnent de 2 (glucose-1-phospho-D-mannosylglycoprotéine phosphodiesterase) à 12 (cathepsine G)
- des masses molaires de 5 kDa à 590 kDa (calossine - 5322 acides aminés !)

L'une des difficultés majeures de la séparation est de trouver des conditions d'électrophorèse qui couvrent de telles gammes de propriétés physico-chimiques. La séparation se fait en deux temps.

1ère dimension : une isoélectrofocalisation (IEF) où les polypeptides migrent jusqu'à un pH égal à leur pI.

La séparation selon la charge utilisait auparavant des ampholytes pour obtenir un gradient de pH.

On utilise aussi des gradients de pH immobilisés (IPG), formés avec des immobilines.

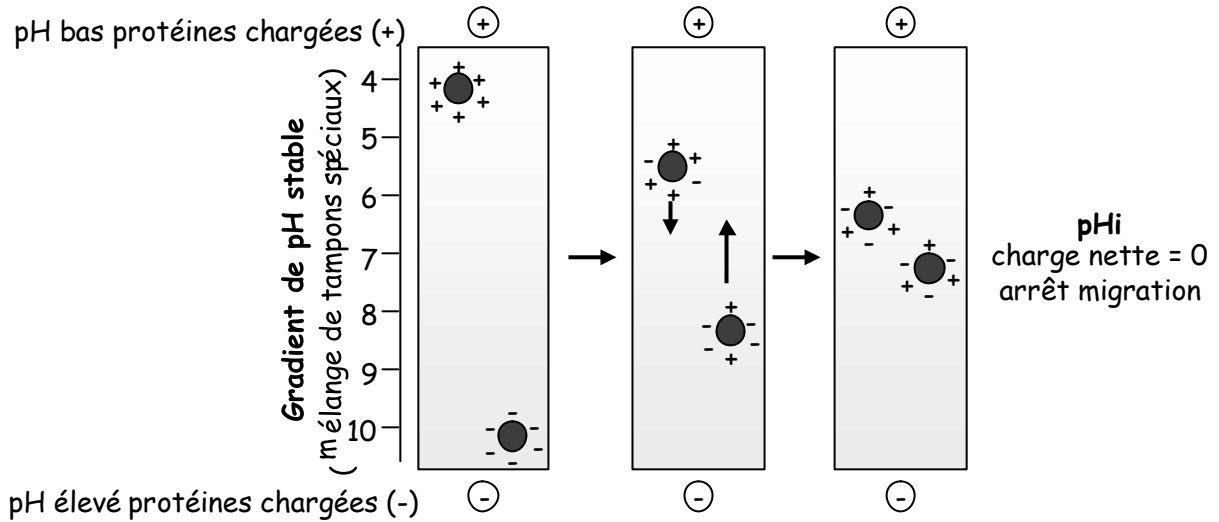
2ème dimension : une séparation selon la masse molaire est un gel d'électrophorèse de polyacrylamide en conditions dénaturantes (sodium dodécyl sulfate ou SDS et réduction des ponts disulfure).

Ces deux électrophorèses sont effectuées de manière perpendiculaire l'une par rapport à l'autre.

b. Les méthodes de révélation des protéines :

Coloration des gels pour la révélation des protéines au Bleu de coomassie ou nitrate d'argent :

Première dimension :

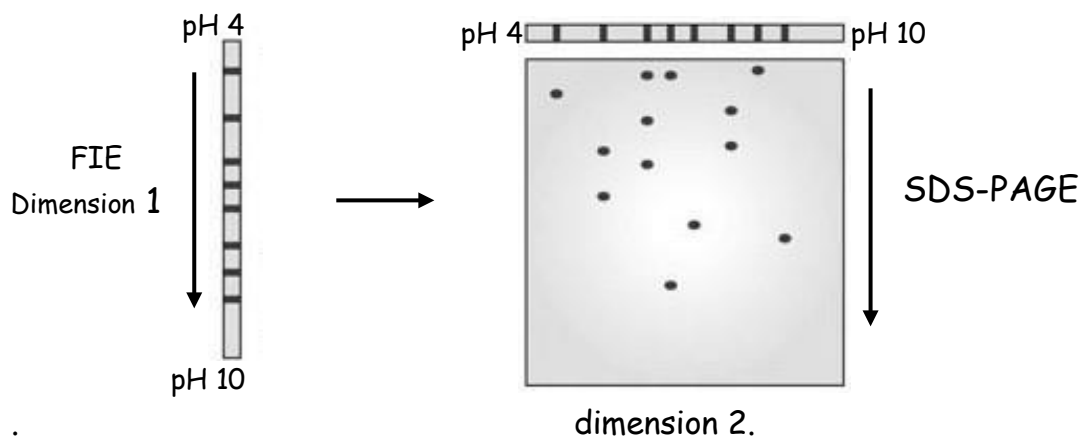


Les protéines migrent vers la position du gradient = pH_i et s'y immobilisent

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.



Applications :

"Blotting ou effet buvard.

Définition : Réalisation d'une réplique exacte de gels sur des membranes, suivie d'une détection spécifique

Analyse d'ADN (**Southern Blot**), d'ARN (**Northern Blot**) et de protéines (**Western Blot**)

- **Séparation** ADN, ARN ou protéines par **électrophorèse**
- **Transfert** : réplique du gel sur une membrane
- **Révélation** des molécules d'intérêt
- **Quantification** des molécules d'intérêt

- membranes de transfert : **Nitrocellulose** : la plus utilisée

WESTERN BLOT : Détection spécifique d'espèces protéiques rares

Le *western blot* (également appelé transfert de protéines ou buvardage de western ou encore technique des immuno-empreintes), est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique (sérum ou autre extrait ou homogénat tissulaire) à l'aide d'anticorps dirigés contre ces protéines que l'on souhaite détecter. Le western blot permet ainsi de visualiser des protéines particulières dans un mélange complexe. C'est l'une des techniques analytiques de transfert sur membrane utilisées en biochimie et en biologie moléculaire.

Elle est parfois utilisée comme un outil de diagnostic complémentaire pour mettre en évidence une protéine particulière (protéine virale, par exemple) dans le sérum d'un patient.