

Techniques électrophorétiques

Introduction

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

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 celle des acides nucléiques.

1- Description

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement et la migration des particules chargées ou d'ions sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse, ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres.

Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (-).

Sur les acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements phosphates du squelette.

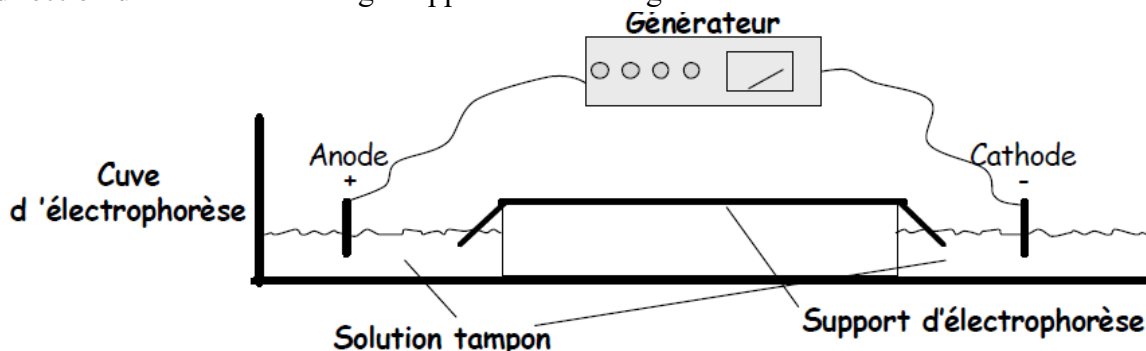
Sur les protéines, la situation est plus complexe et il existe différents types de groupements ionisables :

- Ceux pouvant acquérir une charge négative :
 - Les fonctions acide carboxylique (-COOH) de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'extrémité C terminal de la chaîne polypeptidique ;
 - La fonction thiol (-SH) de la cystéine;
 - Les fonctions alcool (-OH) de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine.
- Ceux pouvant acquérir une charge positive :
 - La fonction guanido d'arginine ;
 - La fonction imidazole de l'histidine ;
 - La fonction amine (-NH₂) de la lysine et de l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique ;

La charge nette d'une protéine dépend donc en général de sa composition en acides aminés et du pH.

2- Principes de fonctionnement

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.



3- Principes de la migration électrophorétique

La migration dépend de plusieurs facteurs :

• a- : de la **mobilité électrophorétique U**, qui est fonction de la **charge** et de la **géométrie** de la particule. Une particule de **charge électrique Q**, placée dans un champ électrique **E**, est soumise à une force **F** qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé :

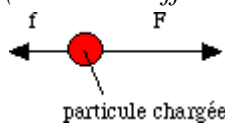
Des forces de **frottement f**, dues à la viscosité du milieu η , s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant

$$\mathbf{F} = \mathbf{Q} \cdot \mathbf{E}$$

plus que la particule est grosse (r = rayon) et que la vitesse de migration (v) est grande :

$$\mathbf{f} = 6 \Pi \cdot \eta \cdot \mathbf{r} \cdot \mathbf{v}$$

(N.B. Le coefficient de viscosité η dépend de la température)



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

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

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

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

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

La mobilité est une caractéristique de chaque particule; il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété. La charge **Q** est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant : on appelle **pH isoélectrique** d'une particule (ϕ) le **pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champ électrique**.

La différence **pH - phi** détermine le **signe de la charge Q** d'une particule et son **intensité** : plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante:

si pH > phi	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si pH < phi	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si pH = phi	charge nette nulle	pas de migration

• b : du **champ électrique E** : $\mathbf{E} = \mathbf{v} / \mu$

• c : des **courants liquidiens** :

- le **courant d'électroendosmose** : Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode.

- les courants d'**évaporation** : le passage du courant s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau de la phase liquide; on utilise alors des cuves réfrigérées.

• **d** : de la **durée de migration**, qui influe sur la distance de migration : $d = v \cdot t$
(**d** = distance, **v** = vitesse, **t** = temps de passage du courant)

Cette formule n'est pas applicable dans le cas de l'électrophorèse sur support, car les molécules effectuent un trajet non linéaire dans les microcanaux du support poreux.

• **e** : de **facteurs liés à la nature du support** : adsorption, texture...

4-Type de support

Support liquide => électrophorèse en veine liquide

Support poreux => électrophorèse de zone : il y a différents supports d'électrophorèse de zone:

- Papier
- Acétate de cellulose
- Semi-solide (les gels): gel de polyacrylamide, gel d'agarose, gel d'amidon, gel de silice ...

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.

4-2- L'électrophorèse sur support ou électrophorèse de zones

L'équipement nécessaire pour l'électrophorèse est une unité d'électrophorèse et un générateur de courant électrique. L'électrophorèse peut se faire sur un système vertical ou horizontal.

5- APPLICATIONS

5-1-électrophorèse sur papier et acétate de cellulose

5-2-électrophorèse sur gel de polyacrylamide

- PAGE
- SDS-PAGE
- Focalisation isoélectrique (FIE)
- électrophorèse bidimensionnelle

5-3-électrophorèse sur gel d'agarose

- électrophorèse sur gel d'agarose
- électrophorèse en champ pulsé

5-4-électrophorèse capillaire

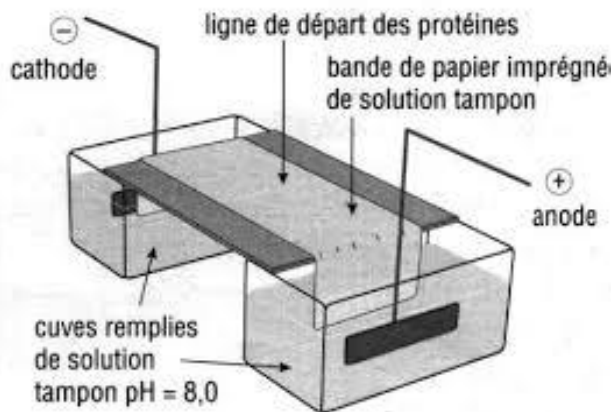
5-1-Électrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose

Papier: Habituellement employé dans un montage horizontal, plus rarement vertical, il servait surtout à séparer des acides aminés ou d'autres petites molécules chargées. Le dépôt et la migration des échantillons se font en surface. La présence de charges sur la cellulose qui constitue le papier interfère un peu avec la migration. Il est de moins en moins utilisé sauf, quelques fois, pour la séparation des acides aminés sous très haut voltage.

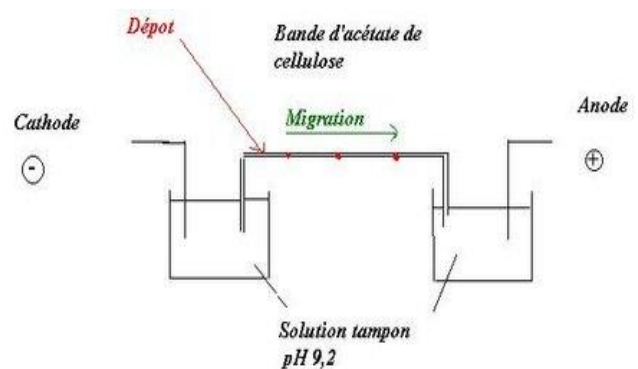
Acétate de cellulose: Il s'agit d'un dérivé acétate d'une forme purifiée de cellulose. Elle se présente sous la forme d'une mince et fragile feuille. Le dépôt et la migration se font en surface sur un montage horizontal. On s'en sert beaucoup pour séparer grossièrement des protéines. La faible résolution ne permet que la séparation de grands groupes de protéines. Son faible coût et sa grande facilité d'emploi la rendent utile pour la séparation des protéines sériques, particulièrement en biochimie clinique pour le diagnostic de maladies. Mais même dans ce secteur, on le remplace par des méthodes où la matrice est de l'agarose.

La révélation des fractions peut être **globale** (rouge Ponceau, Amido-schwartz, vert de lissamine, bleu de Coomassie) ou **spécifique** (révélation des lipoprotéines avec un colorant des lipides, révélation d'une activité enzymatique...).

La **lecture** peut se faire **à l'oeil nu** (analyse qualitative) ou par **densitométrie** (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, l'**intégration** des pics permet une analyse quantitative des fractions; ou encore le dosage peut être effectué après **élution** des fractions.



Électrophorèse sur papier



Électrophorèse sur acétate de cellulose

5-2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

5-2-1- Électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

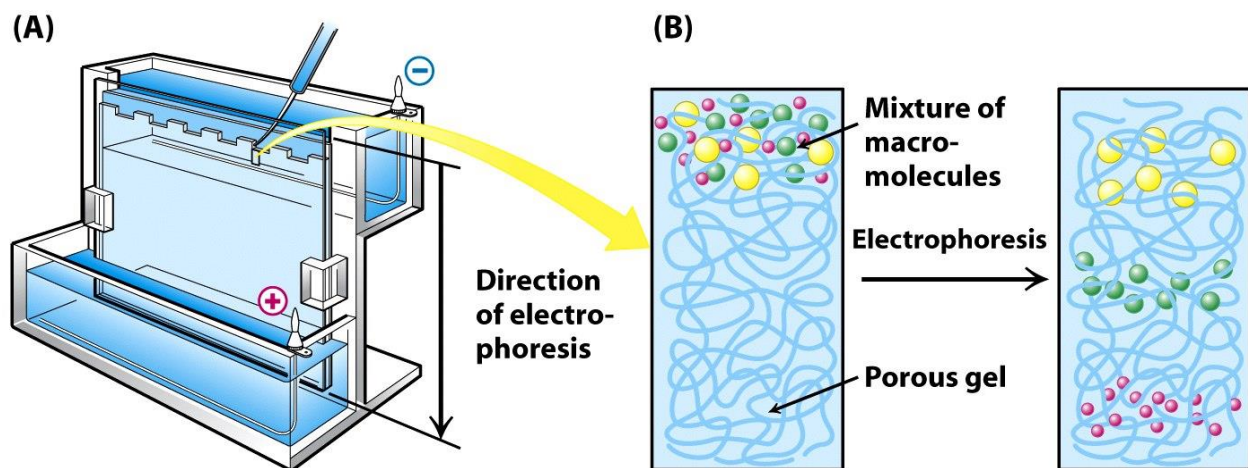
L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines ou pour les acides nucléiques de petite taille (le séquençage de l'ADN).

La méthode PAGE est actuellement la méthode la plus utilisée en immunologie et en analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire. Celles-ci peuvent alors être transférées sur membrane de nitrocellulose pour être mises en contact avec des anticorps spécifiques. Cette technique s'appelle le Western blot.

Les techniques traditionnelles de séquençage de l'ADN utilisent les gels de polyacrylamide pour séparer des fragments d'ADN (ceux-ci possèdent un pouvoir résolutif de 1 paire de bases).

Le **polyacrylamide** est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'**acrylamide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du **bisacrylamide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) qui forme des ponts entre les chaînes; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bisacrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un **tamis moléculaire** (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).

Typiquement, les gels de séparation sont faits à 6 %, 8 %, 10 %, 12 % ou 15 %. Un gel de concentration définie est coulé en haut du gel. Des pistes individuelles sont réalisées par l'utilisation d'un "peigne" qui sépare le gel en portions égales destinées à la migration de chaque échantillon. Le pourcentage choisi dépend de la taille de la protéine que l'on veut identifier. Plus le poids connu est petit, plus le pourcentage devra être élevé.



Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

5-2-2- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

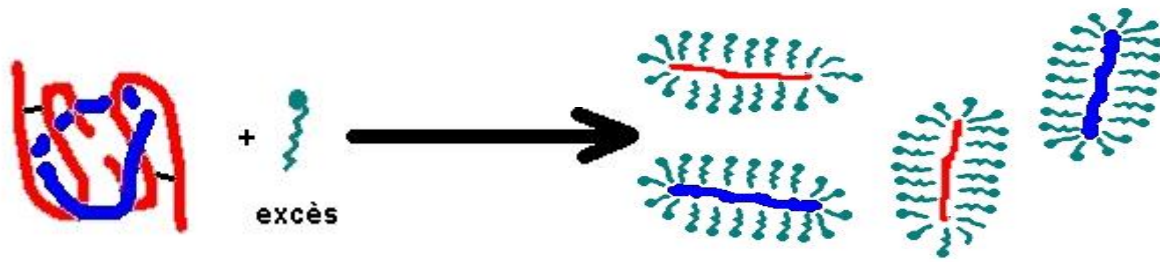
SDS- PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis




Cette méthode de séparation, par rapport à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide classique, est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de laurylsulfate de sodium (ou SDS)

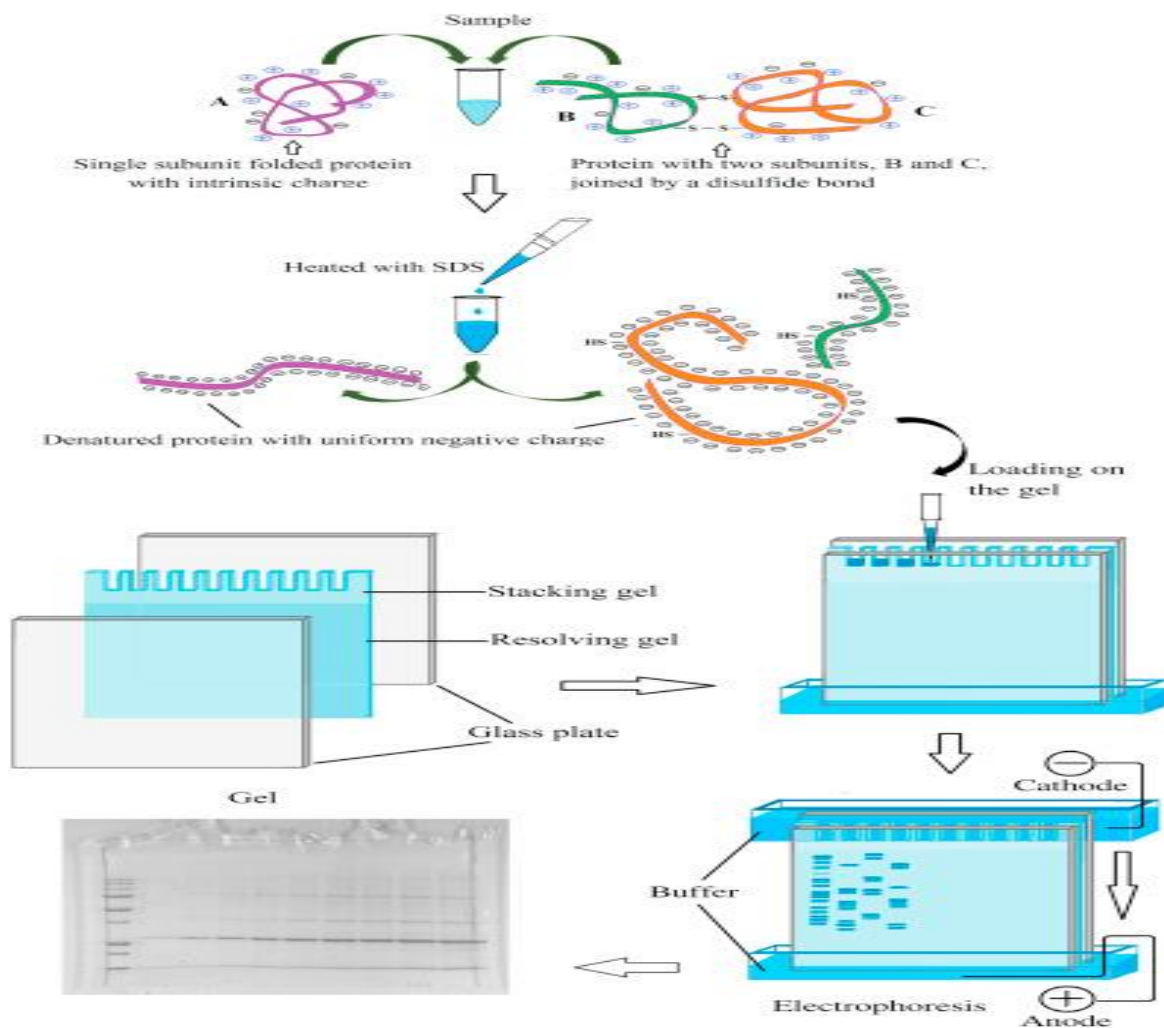
Dans ce gel dénaturant, on retrouve ce SDS qui se lie aux protéines selon un ratio approximativement constant (~1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS est un détergent fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. **La structure native de la protéine est donc dénaturée, et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine.** Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaires (les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migreront plus rapidement).

Lorsque les protéines ont été séparées, leur visualisation peut être effectuée en les colorants directement : bleu de Coomassie, méthodes aux sels de cuivre, au nitrate d'argent ...Après transfert (technique dite **western blot**) sur une membrane, on révèle sélectivement certains polypeptides en utilisant des anticorps marqués

grâce à la SDS-PAGE, il est possible de déterminer assez finement la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique. Une protéine sera caractérisée par une masse moléculaire donnée.



Soit, par exemple, une protéine formée par l'assemblage de 4 sous unités polypeptiques, 2 unités symbolisées par  et 2 unités symbolisées par . La "chaîne rouge" possède des ponts disulfures (-S-S-) symbolisés par des traits noirs. Soit  symbolisant le SDS. Chaque unité polypeptidique est isolée, dénaturée, réduite, sous forme de micelle SDS-unité. Toutes les micelles ont la même densité de charge



5-2-3- Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)

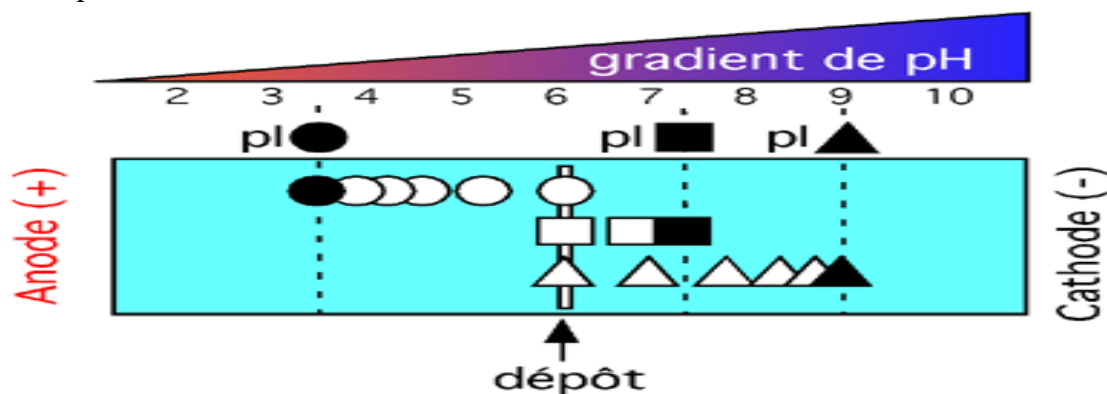
La focalisation isoélectrique est une méthode permettant de séparer des protéines qui ne diffèrent que par une seule charge.

Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur p_i , elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur p_i .

On peut créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines, carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de p_i . Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur p_i . Une série d'ampholytes ayant donc chacun un p_i couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur p_i .

La durée de la focalisation est beaucoup moins critique que celle d'une électrophorèse ordinaire. En effet dans une FIE les protéines ne risquent pas de sortir du gel puisqu'elles s'immobiliseront au point où elles auront atteint leur p_i . Il faut seulement que la migration dure suffisamment longtemps pour que les ampholytes aient le temps de migrer correctement et que protéines aient le temps d'atteindre leur p_i . À 2 mA, on estime le temps requis à environ 1 heure.

Les procédures de coloration sont similaires à celle d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Il faut cependant éliminer les ampholytes du gel, car elles peuvent se colorer. On fait donc précéder la coloration par trempage dans un bain d'acide trichloracétique 5 ou 10% pour les faire diffuser hors du gel tout en fixant les protéines sur place.

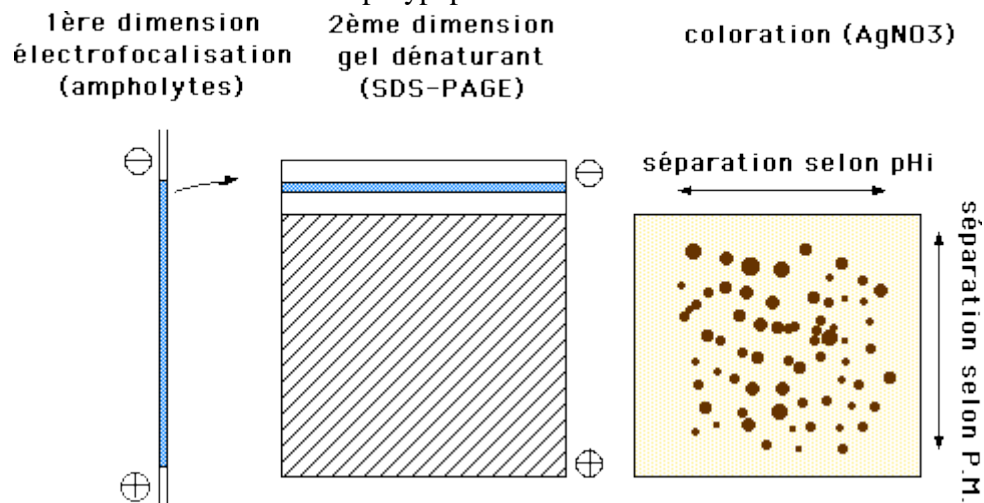


5-2-4- Électrophorèse bidimensionnelle

On sépare selon le p_i dans une dimension (IEF) et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS); on sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum.

La méthode la plus puissante d'analyse d'un mélange complexe de protéines est sans contredit l'électrophorèse bidimensionnelle (E2D), développée initialement par O'Farrel (1979). Il s'agit de la combinaison d'une FIE, qui sépare selon le p_i , suivi d'une électrophorèse dénaturante SDS, séparant selon le poids moléculaire. Dans un premier temps, on sépare donc le mélange selon le p_i dans un gel cylindrique ou plat. On découpe ensuite la bande verticale du gel plat ou on récupère le cylindre de gel. On laisse incubé dans un tampon contenant les éléments du tampon de gel de tassement d'un système dénaturant au SDS. On dépose ensuite cette bande horizontalement sur un gel de tassement et on la soumet à l'électrophorèse,

permettant une séparation selon le poids moléculaire. Cette approche permet donc de séparer un mélange selon deux paramètres complètement indépendants, lui donnant une capacité de résolution inégalée. Ainsi, une FIE ou une SDS-PAGE peut séparer environ 60 à 100 composantes. Combinant ces deux méthodes dans une E2D, on peut résoudre au-delà de 1000 polypeptides.



3-2-5- Électrophorèse sur gel d'agarose

Elle est peu utilisée dans le cas des protéines, car dans ce domaine les gels de polyacrylamide donnent toute satisfaction. Cependant, des gels d'agarose sont destinés à des applications spécifiques pour révéler un type donné de constituant (ex. lipoprotéines) ou certaines enzymes, ainsi que pour les techniques de révélation par anticorps. **L'électrophorèse sur gel d'agarose est surtout utilisée pour la séparation des acides nucléiques.** Elle est utilisée.

– soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité

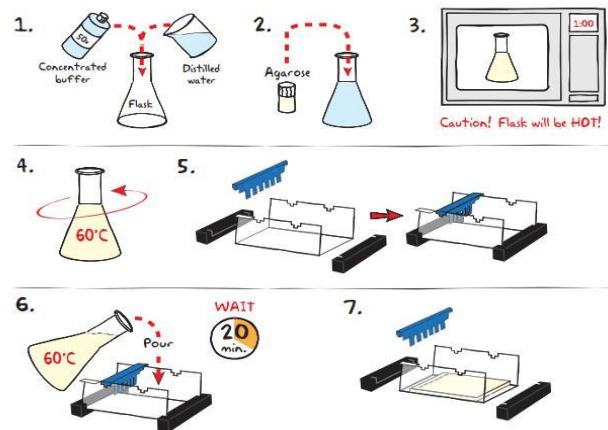
-soit à des fins préparatifs, pour purifier un fragment d'AND de taille connue.

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 au bromure d'éthidium (BET). 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.

Le gel d'agarose,

L'agarose est un colloïde naturel extrait d'une algue, c'est un polysaccharide linéaire. L'agarose est très fragile et se détruit facilement sous l'effet de manipulations. Les gels d'agarose ont de grands « pores » et sont utilisés essentiellement pour séparer les grandes molécules d'une masse moléculaire supérieure à 200 kDa.

Les gels d'agarose sont obtenus en mettant la poudre d'agarose déshydraté en suspension dans un tampon aqueux, puis en faisant bouillir le mélange jusqu'à ce que l'agarose se transforme en une solution claire. Celle-ci est ensuite versée sur un moule et mise à refroidir à température ambiante jusqu'à formation d'un gel rigide. En durcissant, l'agarose forme une matrice dont la densité est déterminée par sa concentration.



Dépôt d'échantillon et migration

Les échantillons d'ADN à charger sur le gel d'agarose sont tout d'abord mélangés à un tampon de chargement exemple, du xylène cyanol, du bleu de bromophénol, du vert de bromocrésol, etc. qui permet de suivre le front de migration. Les puits situés à gauche et à droite du gel devraient, dès lors, être remplis avec un ADN marqueur d'une taille connue. Un marqueur contient généralement un nombre défini de fragments d'ADN connus, ce qui permet de déterminer plus facilement la taille des ADN inconnus.

Le dépôt se fait du côté cathode et le système est soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts

Les acides nucléiques chargés négativement sont déposés du côté de la cathode et migrent vers l'anode dans le champ électrique. La migration des fragments d'ADN dépend de leurs tailles ; plus le fragment à une taille élevée, moins la migration électrophorétique par rapport au puits d'inclusion est importante. À l'inverse les fragments de petite taille ont une distance de migration plus élevée.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille. Ce contrôle permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc.

5-2-6- Électrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue. Il devient alors possible de séparer les molécules en fonction de leur **longueur**. Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génome des procaryotes et des eucaryotes.

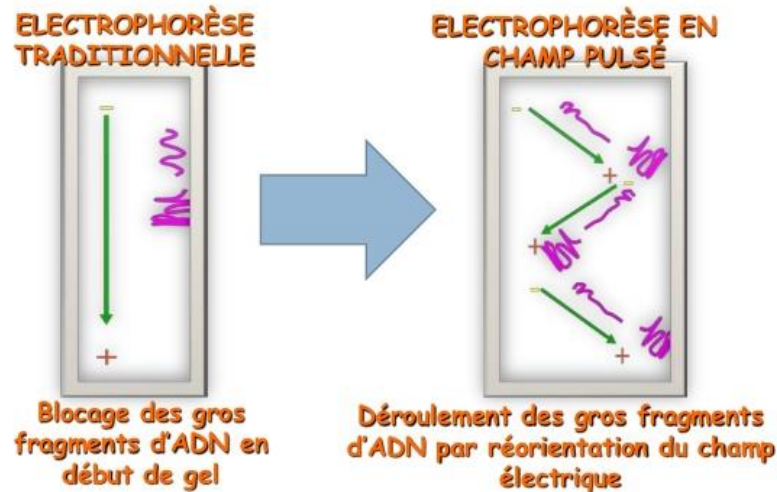
Ce type d'électrophorèse a été développé par Schwartz et Cantor en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0.4% les gels sont impossibles à manipuler).

La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel.

Pour ce type d'électrophorèse, il n'est pas possible d'utiliser des ADN purifiés par les techniques classiques, car ces techniques les cassent en fragments d'une taille inférieure à 100 kb. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN, les cellules sont incluses dans des blocs d'agarose.

La cartographie de restriction à grande échelle nécessite des enzymes qui coupent rarement l'ADN et le fractionnement des grands fragments de restriction par électrophorèse sur gel en champ pulsé



5-3- électrophorèse capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la **rapidité**, de la très grande **résolution** et, partant, de la très grande **sensibilité** de la détection.

En électrophorèse traditionnelle, les éléments chargés électriquement se déplacent dans le liquide conducteur sous l'influence d'un champ électrique. Introduite dans les années 1960, la CE a été conçue pour séparer des espèces chimiques selon leur rapport charge / taille à l'intérieur d'un petit tube capillaire rempli d'un électrolyte

L'électrophorèse capillaire représente une famille de techniques qui utilisent des capillaires étroits (diamètre interne de 10 à 200 μ m) pour réaliser avec une très grande efficacité la séparation électrophorétique de molécules de tailles très variables. Le domaine d'application de cette technologie est très vaste et elle permet d'analyser des macromolécules complexes telles que les protéines et les acides nucléiques ou des solutés de petite taille comme les médicaments organiques, les anions et cations inorganiques. Des voltages très importants (plusieurs dizaines de kV) sont utilisés pour séparer les molécules sur la base de leur différence de rapport charge/taille. L'instrumentation est relativement simple et comporte les éléments principaux suivants : un générateur de haut voltage, deux réservoirs de tampon et un capillaire que traverse un système optique de détection relié à un module d'acquisition des données (*figure 1*). L'ensemble de l'instrument est contrôlé par un ordinateur.

