

Centre universitaire Abdelhafid Boussouf, Mila
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

Instrumentation et Maintenance en Biotechnologie

1^{ère} Année Master Biotechnologies Et Amélioration des Plantes

2021-2022

Dr. Bouchekrit M.



Les techniques électrophorétiques

électrophorétiques
Les techniques



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 "phorèse" vient du grec phoresis qui signifie " porter d'un côté à l'autre.

Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse (identification et dosage) qualitative et quantitative, et de séparation basée sur la migration différentielle de particules, chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique.

Paramètres qui influencent sur l'électrophorèse



Nature des molécules

Les molécules à séparer jouent un rôle très important dans leur séparation par électrophorèse et ceci par trois propriétés :



La charge

Plus la charge est grande, plus la vitesse de migration est élevée



La taille

la vitesse de migration est inversement proportionnelle au poids moléculaire



La forme

Les molécules ayant les mêmes charges et les mêmes PM mais avec des formes différentes migrent avec des vitesses différentes.

Nature des molécules



La taille

Les molécules ayant un faible PM migrent plus rapidement.

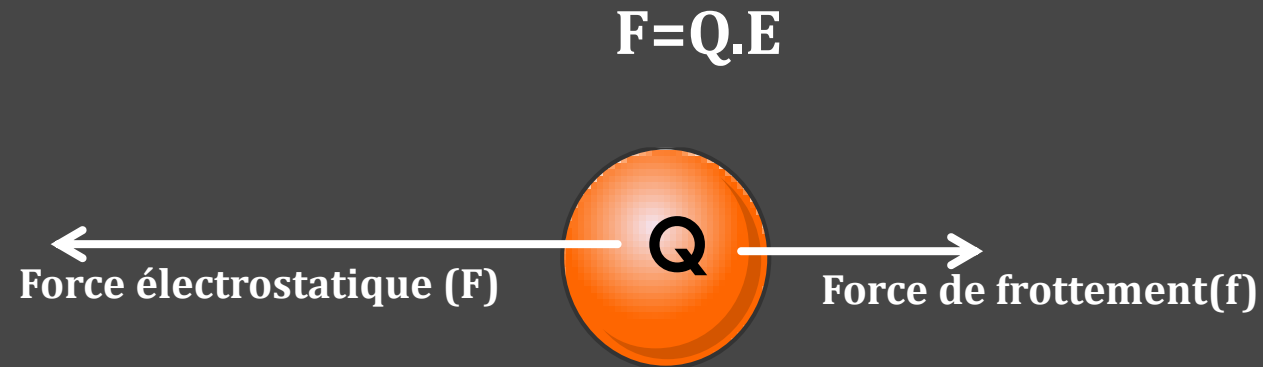


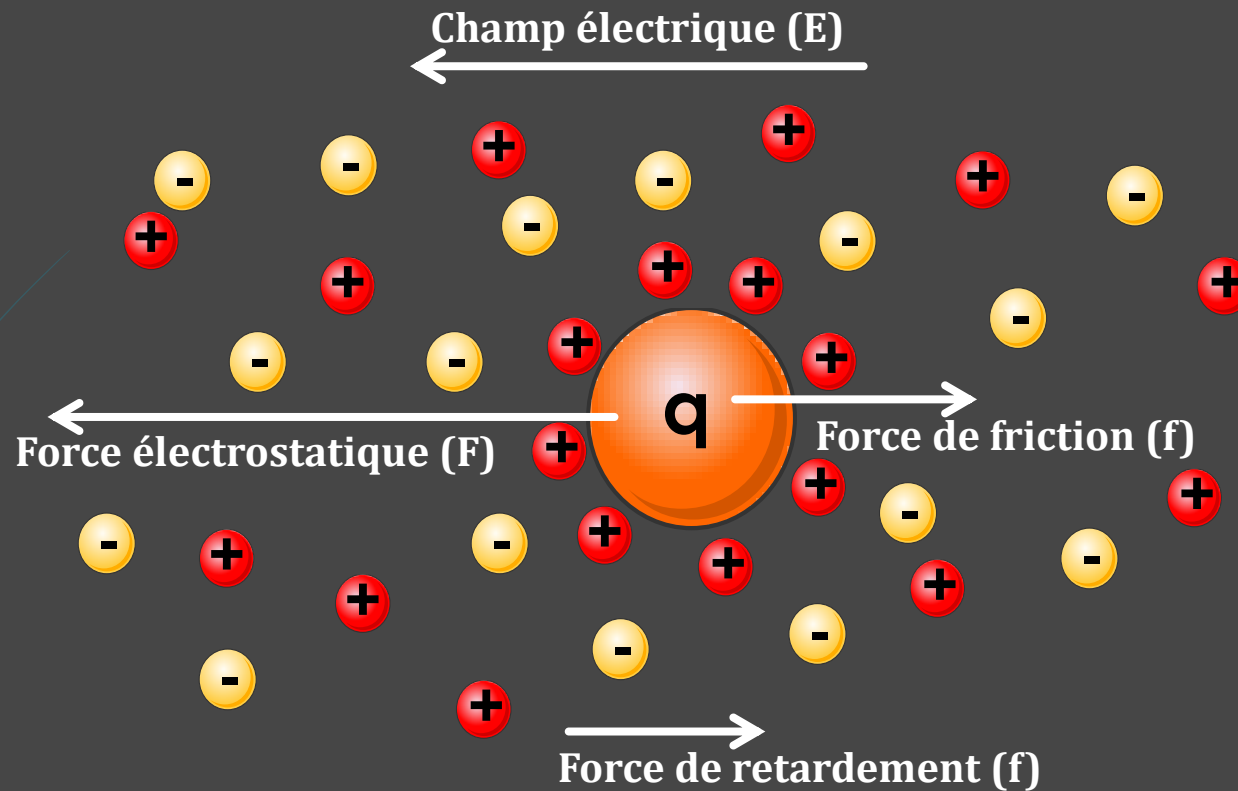
La forme

A masse moléculaire égale, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse.

Champ électrique

La mobilité électrophorétique est en fonction de la charge de la particule. Une particule de charge Q , placée dans un champ électrique E , est soumise à une force électrostatique F qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé et une force de frottement (f),





Des forces de frottement f , dues à la viscosité du milieu η (le coefficient de viscosité dépend de la température) s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant plus que la particule est grosse ($r = \text{rayon}$) et que la vitesse de migration (v) est grande :

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

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

$$Q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \longrightarrow \quad v = Q \cdot E / 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r$$

La mobilité électrophorétique

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

$$\begin{aligned} \mu &= V/E \\ Q.E / 6.\pi. \eta .r &= V \end{aligned} \longrightarrow \mu = Q / 6.\pi. \eta .r$$

Champ électrique



Voltage

la vitesse de migration est proportionnelle au voltage selon la relation : $F=V.Q/d$

V= voltage,

F= force exercée par le champ électrique,

Q= charge de la molécule et

d= distance entre les deux pôles.



Ampérage

Le courant électrique est porté par les ions du tampon et les molécules à séparer.

La vitesse de migration et la distance parcourue sont proportionnelles à l'intensité du courant.



Résistance

Sous un champ électrique la vitesse de migration des molécules est inversement proportionnelle à la résistance (dépendante de la longueur du support, la concentration des ions du tampon).

Tampon

le tampon détermine la force ionique et le pH du milieu.



Force ionique



pH

La force ionique

La FI est très importante du fait que le courant électrique est transporté par les ions du tampon et de l'échantillon:



Si la FI est très élevée

tout le courant est porté par les ions du tampon ce qui laisse une très faible quantité transportée par les ions de l'échantillon

la vitesse de ces ions sera très faible

une augmentation considérable de la température.

La séparation sera mauvaise puisque la distance parcourue sera insuffisante



Si la FI est très faible

tout le courant sera porté par les ions de l'échantillon qui vont tous migrer très rapidement

la séparation sera aussi mauvaise.

Support

Malgré que le support doit être totalement inerte, on trouve, en pratique, trois phénomènes dans les différents supports utilisés.



Adsorption



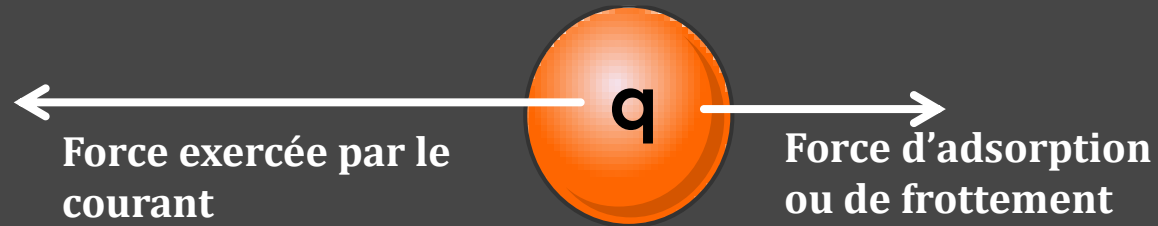
Electroendosmose



Tamisage

L'adsorption

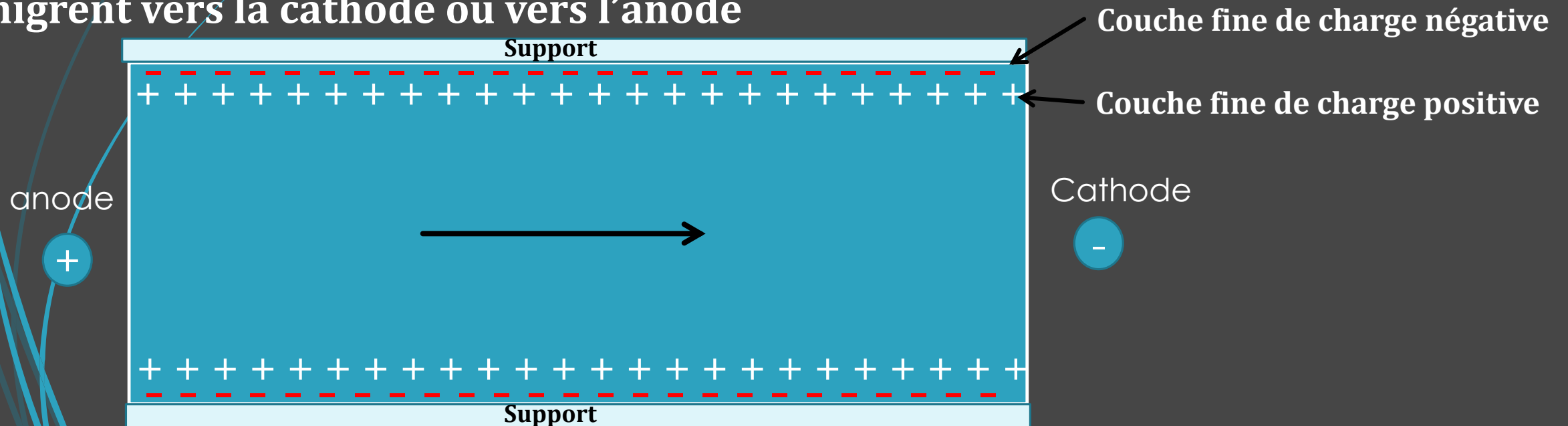
Certains supports peuvent s'adsorber aux composés de l'échantillon de façon non spécifique mais différente d'une molécule à une autre. Cette adsorption va ralentir ces molécules et empêcher leur migration



Electroendosmose (electro-osmose)

le support se charge négativement; une couche mobile de charge positives se forme dans le solvant, au contact du support et entraîne la phase liquide (essentiellement le H_3O^+) vers la cathode.

Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode



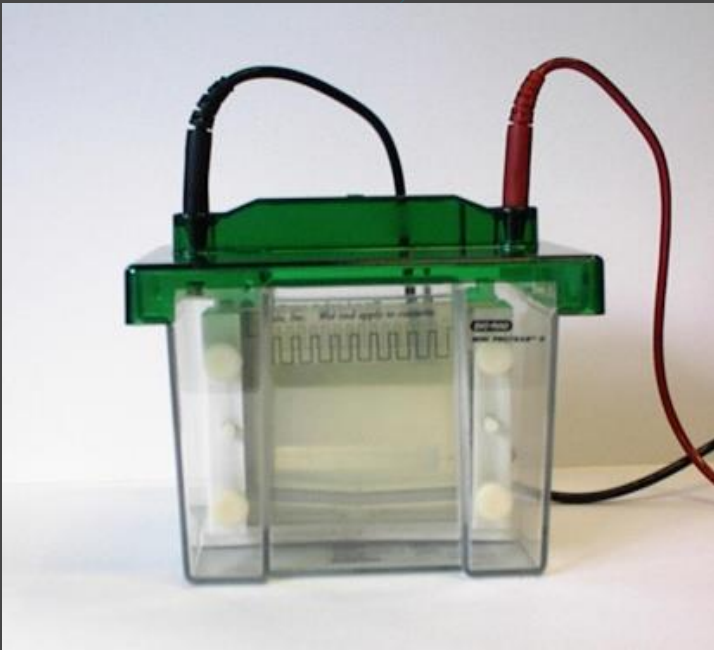
Tamisage

Le gel d'acrylamide (et d'amidon) ressemble à un tamis. A un pourcentage donné du gel certaines molécules sont retenues, d'autres passent difficilement et d'autre facilement.

Si la concentration augmente, le phénomène de tamisage accroît aussi de façon proportionnelle.

Matériels

Le montage vertical



utilisé pour les gels de polyacrylamide.

Les échantillons se déplacent généralement à l'intérieur de la matrice.

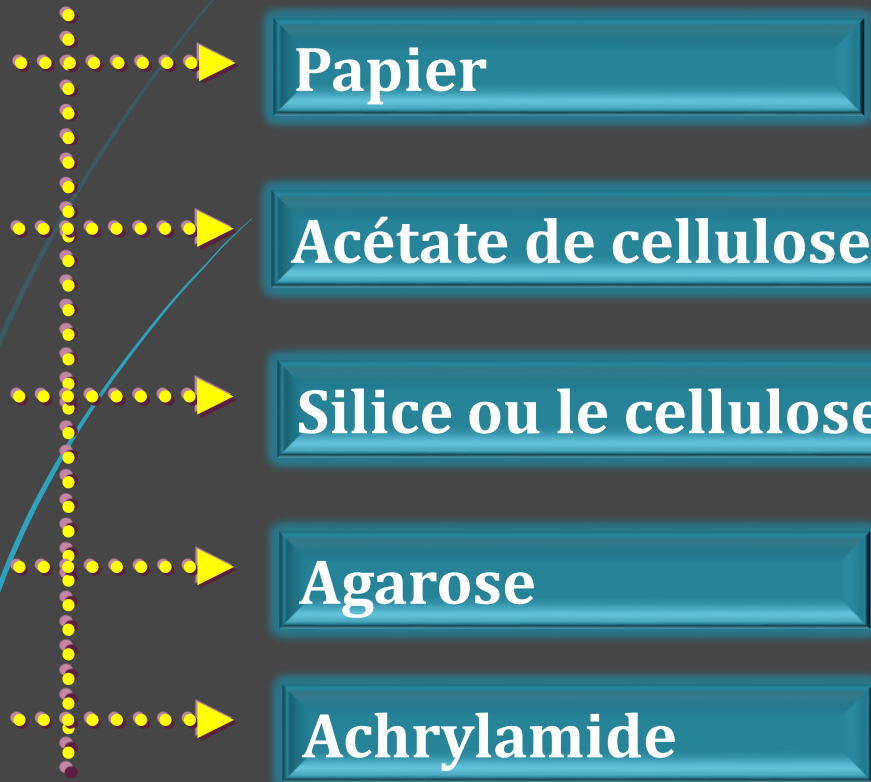
Le montage horizontal



utilisé pour les matrices comme l'acétate de cellulose ou le papier où les échantillons se déplacent à sa surface. Les deux bouts de la matrice plongent dans une solution d'électrolytes

On utilise aussi des montages horizontaux pour des matrices d'agarose lors de l'électrophorèse d'acides nucléiques ou d'immuno-électrophorèse

Principales matrices d'électrophorèse



Papier

habituellement employé dans un montage horizontal, plus rarement vertical.

Il servait surtout à séparer des acides aminés ou d'autres petites molécules chargées.



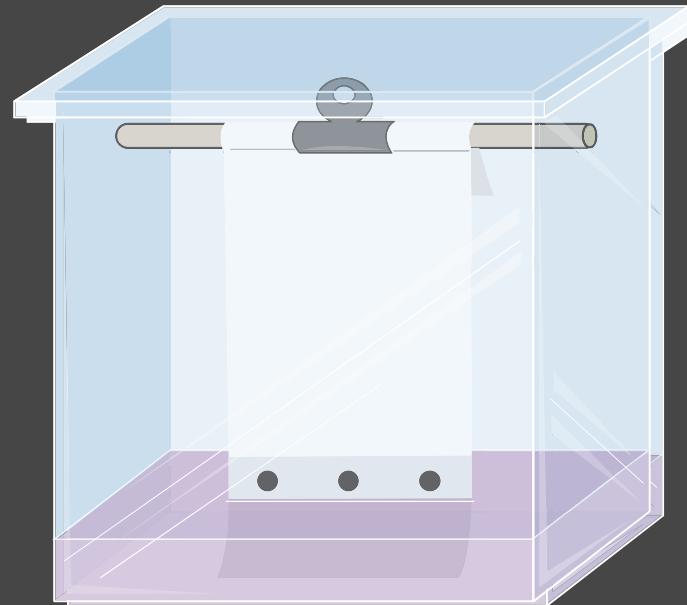
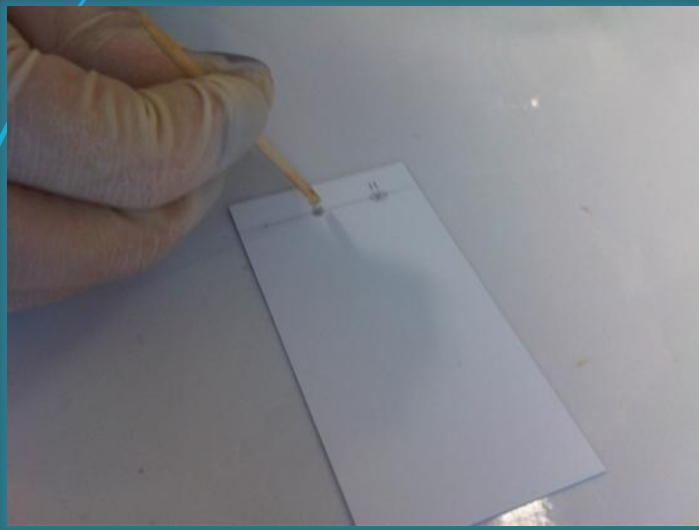
Acétate de cellulose

il s'agit de feuilles fines très poreuse et fragiles. Le dépôt et la migration se font en surface sur un montage horizontal.

La faible résolution ne permet que la séparation de grands groupes de protéines.

Silice ou cellulose

La silice ou la cellulose (en poudre) est étalée sur une plaque de verre ou une feuille semi-rigide horizontale puis humidifiée par un tampon convenable.



Agarose

L'agarose ne polymérise pas par création de liens covalents, il se gélifie à basse température ($<38^{\circ}\text{C}$). Cette gélification est due à la formation d'une multitude de liens hydrogène entre les longues molécules linéaires de dextran qui composent l'agarose.

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. Sa faible adhésion au verre oblige généralement à étaler ce gel sur une plaque de verre horizontale

Agarose

C'est la matrice souvent utilisée pour l'électrophorèse des acides nucléiques. Les immuno-électrophorèses sont aussi faites sur gel d'agarose (facilite la diffusion des anticorps).

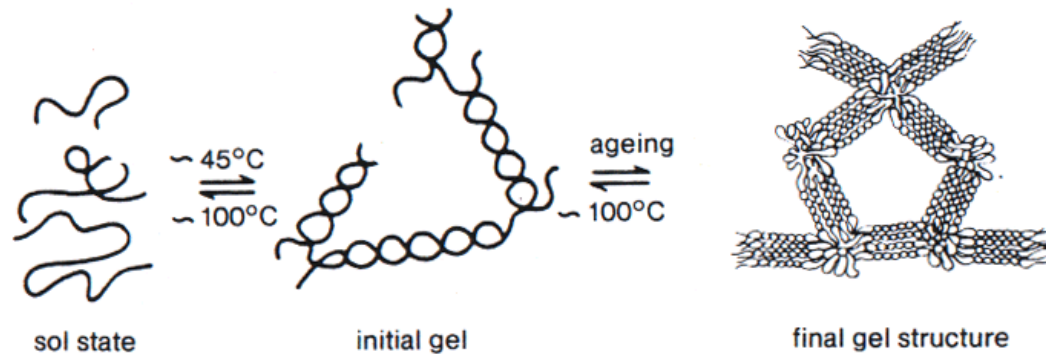
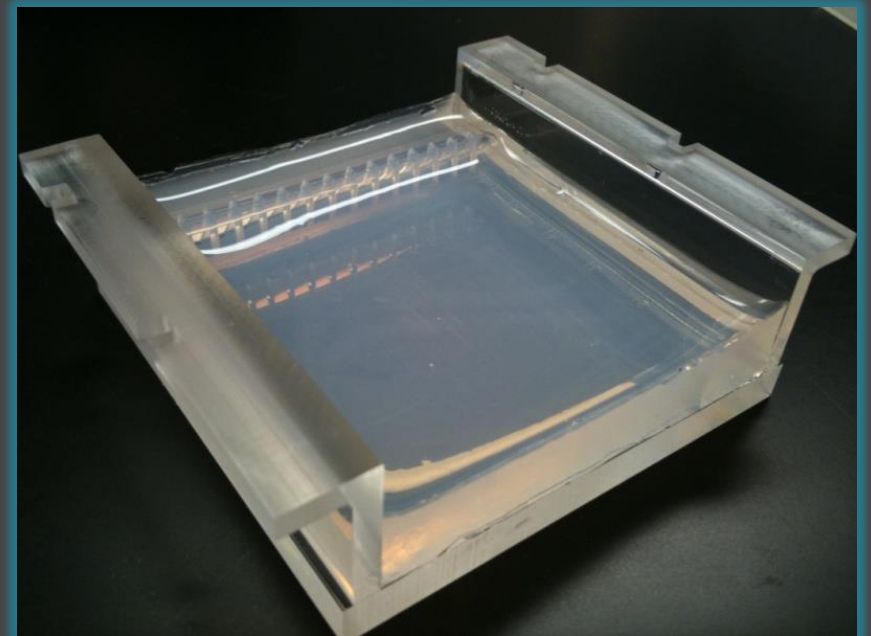
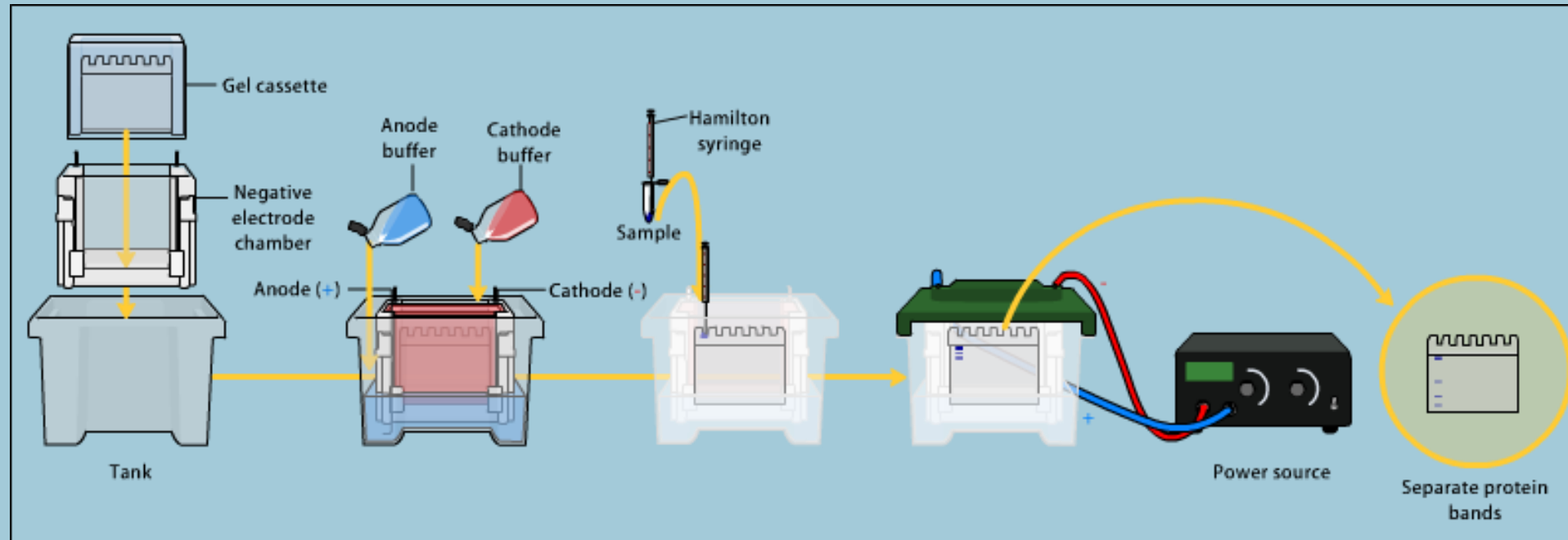


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)



Polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est polymérisé entre deux plaques de verre ou à l'intérieur de tubes cylindriques de verre, où il formera un gel poreux. On dépose l'échantillon sur le sommet de ce gel vertical. Les molécules pourront alors migrer à l'intérieur de ce gel



Tampon



Système dénaturants

Le sodium dodécyl sulfate (SDS)

Le mercaptoéthanol et le dithiothréitol (DTT)

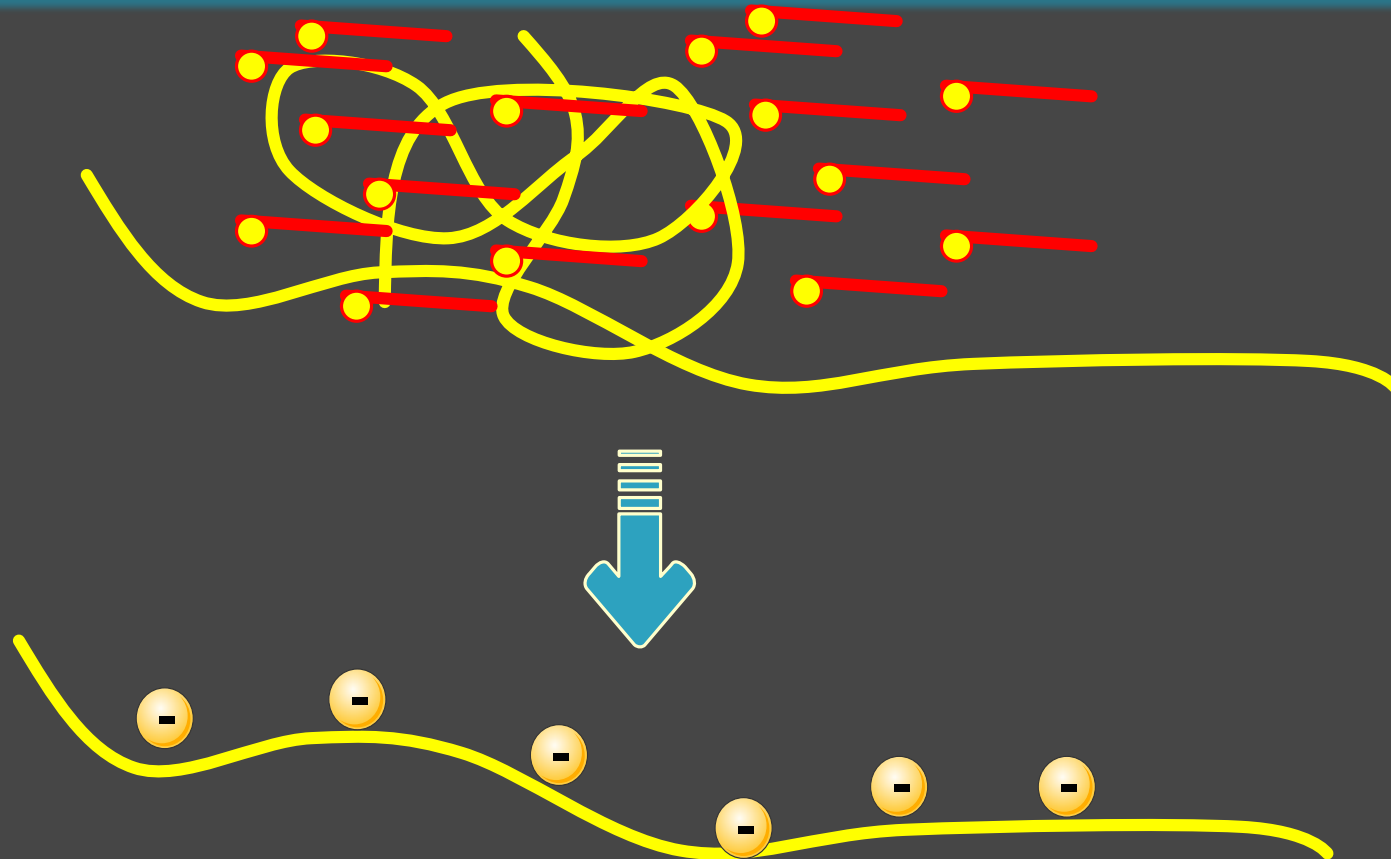
L'urée



Système non-dénaturants

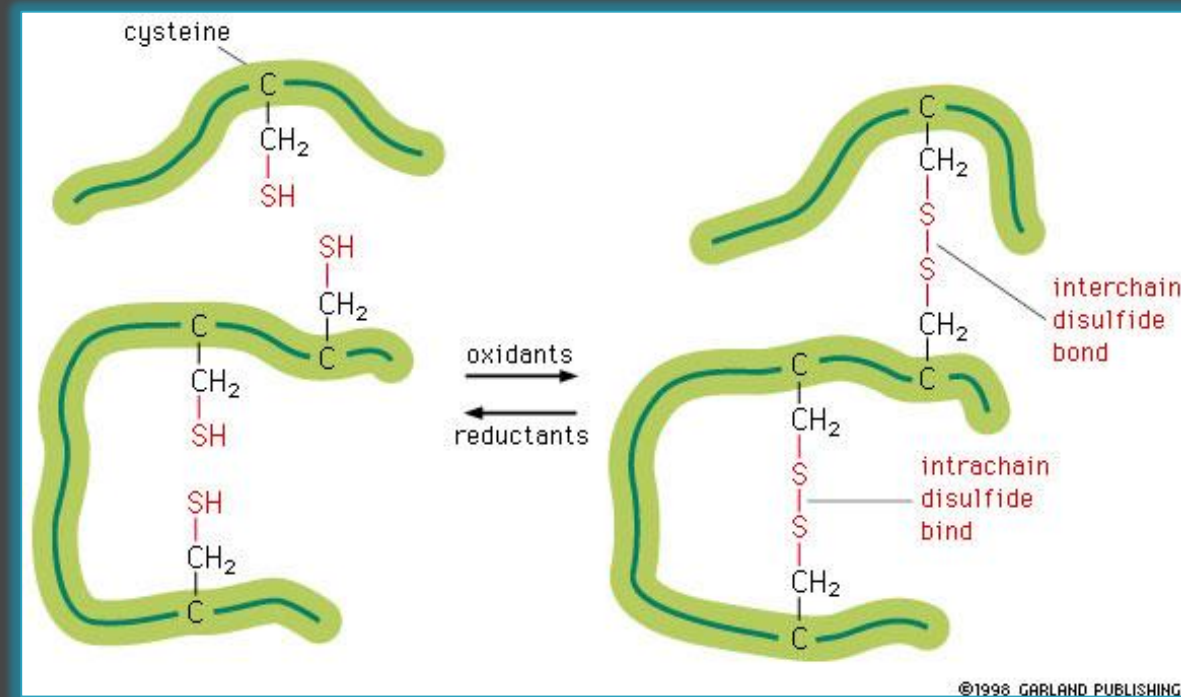
SDS

est un détergent anionique qui dénature des structures secondaires et tertiaires (mais pas de liaisons disulfures), et applique une Charge négative pour chaque protéine en fonction de sa masse. En conséquence, les protéines **se séparent** selon **la masse** seulement



Mercaptoéthanol ou DTT

Ces deux agents sont utilisés pour réduire les ponts disulfure (S-S) inter-chaînes en groupements sulfhydryle (-SH).



L'Urée

rompre les liaisons hydrogène mais garde les charges nettes telles qu'elles sont.



Tampon



Systeme continu



Systeme discontinu

Systeme continu

Dans les systèmes tampons continus, l'identité et la concentration des composants du tampon sont les mêmes dans le gel et la cuve.

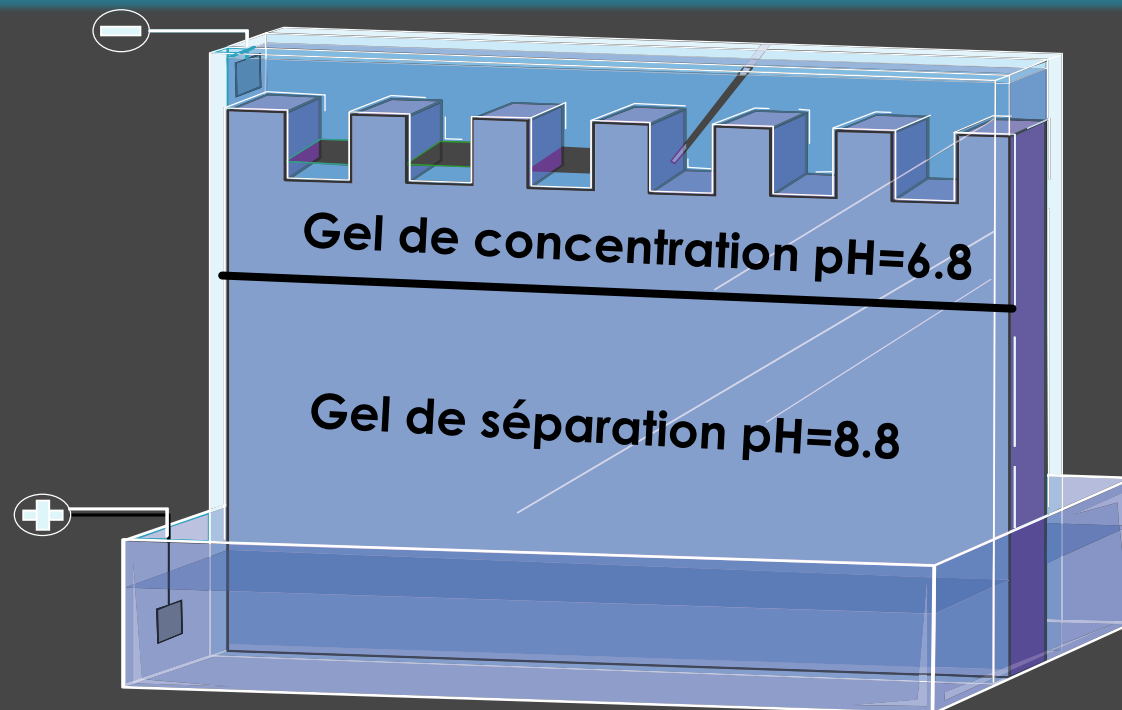
Les bandes sont plus larges et par conséquent une résolution plus pauvre.

Utilisé dans l'électrophorèse de gel d'agarose d'ADN.

Systeme dis continu

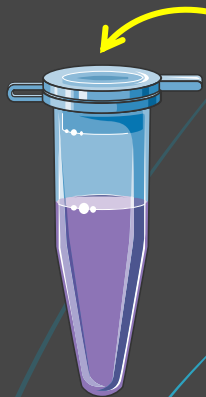
Les systemes discontinus utilisent souvent deux differents tampons dans le gel.

Le gel est divise en gel de concentration (pH 6.8) en haut du pourcentage faible de l'acrylamide et le gel de separation (pH 8.8) en bas avec un pourcentage d'acrylamide plus eleve.



La solution échantillon

1. Soluté
2. b-mercaptoéthanol
3. SDS, DTT, urée
4. Glycérol ou saccharose
5. Bleu de bromophénol, xylène, cyanol



les protéines sont dénaturées

bouillir le mélange

Le courant appliqué

Un générateur de courant continu relié aux électrodes de la cuve (cordons électriques :un noir, un rouge). Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.

Plus le courant est élevée, plus les échantillons migrent vite.



Tampon de migration

Le tampon de migration contient des électrolytes qui sont responsable du transport du courant électrique (conducteur).

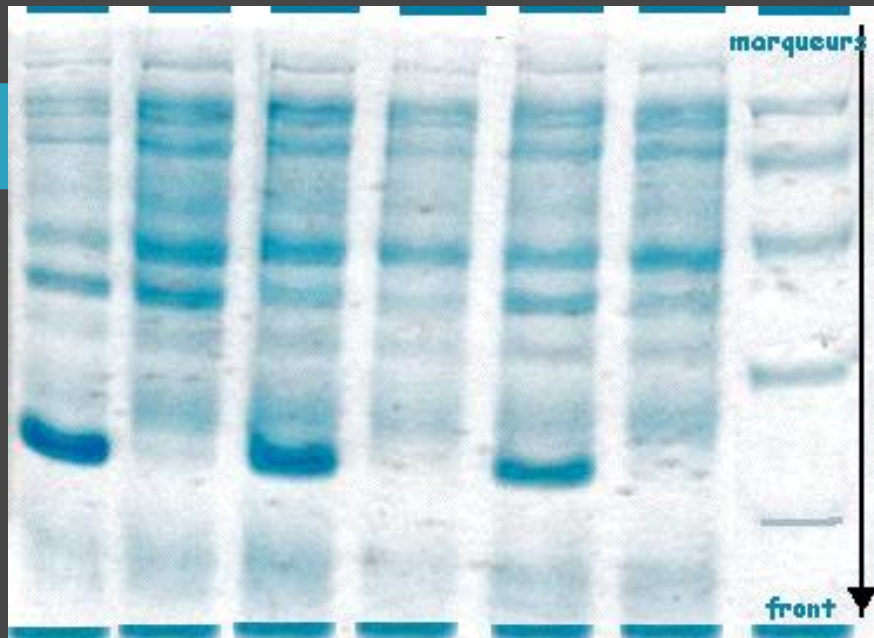
Si la concentration de ces électrolyte est faible, donc la totalité du courant est transporté par le soluté et une faible proportion est transporté par les électrolytes, ce qui entraine la migration des protéines et donc la séparation.

Le tampon d'électrophorèse est constitué de glycine qui joue le rôle de conducteur du courant.

Visualisation ou coloration

Avant la coloration, il faut fixer les protéines, en mettant le gel dans un acide dilué comme l'acide acétique ou l'acide trichloroacétique .

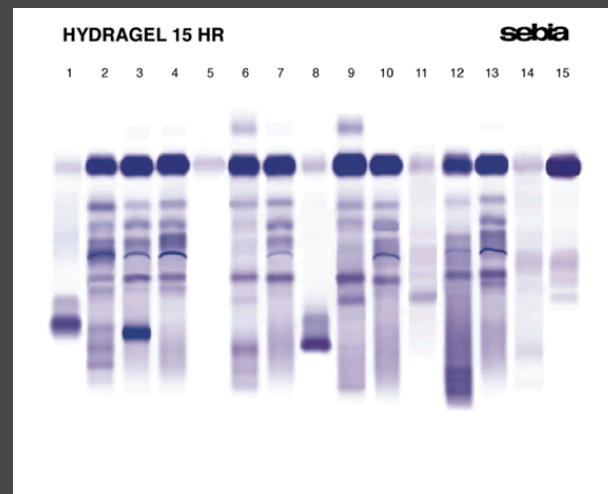
Le colorant le plus couramment utilisé est le bleu de Coomassie, Il ya aussi rouge Ponceau, Amido-schwartz (noir) et vert de lissamine.



Un gel coloré par le bleu de coomassie



Un gel coloré par le rouge ponceau



Un gel coloré par l'Amido-schwartz

L'agent d'intercalation le plus couramment utilisé pour rendre visible les bandes d'ADN à la lumière ultraviolette est **le bromure d'ethidium**. Le colorant peut être inclus à la fois dans le tampon et le gel, le gel seul, ou les gels peuvent être colorés après la séparation de l'ADN.

