

## 1. Définition

Le terme électrophorèse est formé de deux parties, le préfixe "Electro" vient du grec *Elektron* qui signifie l'ambre jaune ou électricité et la racine "Phorèse" qui signifie "porter d'un côté à l'autre", du grec *Phoresis*. C'est une méthode d'analyse qualitative et quantitative (identification et dosage) et de fractionnement, elle représente le mouvement d'une molécule chargée au sein d'un électrolyte immobile (tampon) sous l'effet d'un champ électrique.

## 2. Principe

L'électrophorèse est basée sur la migration différentielle des molécules chargées électriquement sous l'effet d'un champ électrique. La vitesse de déplacement varie en fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, ...), ce qui permet la séparation des molécules. Les cations migrent vers la cathode, les anions migrent vers l'anode alors que les molécules non chargées restent immobiles.

## 3. Mobilité électrophorétique

Plusieurs molécules biologiques telles que les nucléotides, les acides nucléiques, les protéines, ... portent des groupements ionisables et existent en solution en tant qu'espèces chargées soit positivement (cations) ou négativement (anions). Les molécules dispersées ont une charge extérieure électrique, sur laquelle un champ électrique externe exerce une force électrostatique.

En effet, une espèce de charge  $Q$ , placée dans un champ électrique  $E$  (Volt  $\text{cm}^{-1}$ ) est soumise à une force électrique  $F_e$  qui lui porte vers le pôle de signe opposé (Fig. 01). Le déplacement des molécules est produit dans un milieu liquide et donc visqueux, ce qui fait apparaître une force de friction ou de frottement  $F_f$  opposée de leur sens de migration et les freine.

La force électrique exercée sur la molécule est donnée par cette formule:

$$F_e = Q * E \dots\dots\dots (01)$$

Considérant une molécule assimilée à une sphère de rayon  $r$  et mise dans un milieu de viscosité  $\eta$ , la force de frottement de cette molécule est donnée par la loi de Stokes:

$$F_f = 6\pi r \eta v \dots\dots\dots (02)$$

Dont :  $r$  : le rayon de la sphère ;

$v$  : vitesse de déplacement de la molécule ;

$\eta$ : coefficient de viscosité du milieu dépend de la température.

Elle peut se calculer aussi par la formule :

$$F_f = f * v \dots\dots\dots (03)$$

Dont :  $f$  est le coefficient de friction et égale à  $6\pi r\eta$  selon la loi de Stokes.

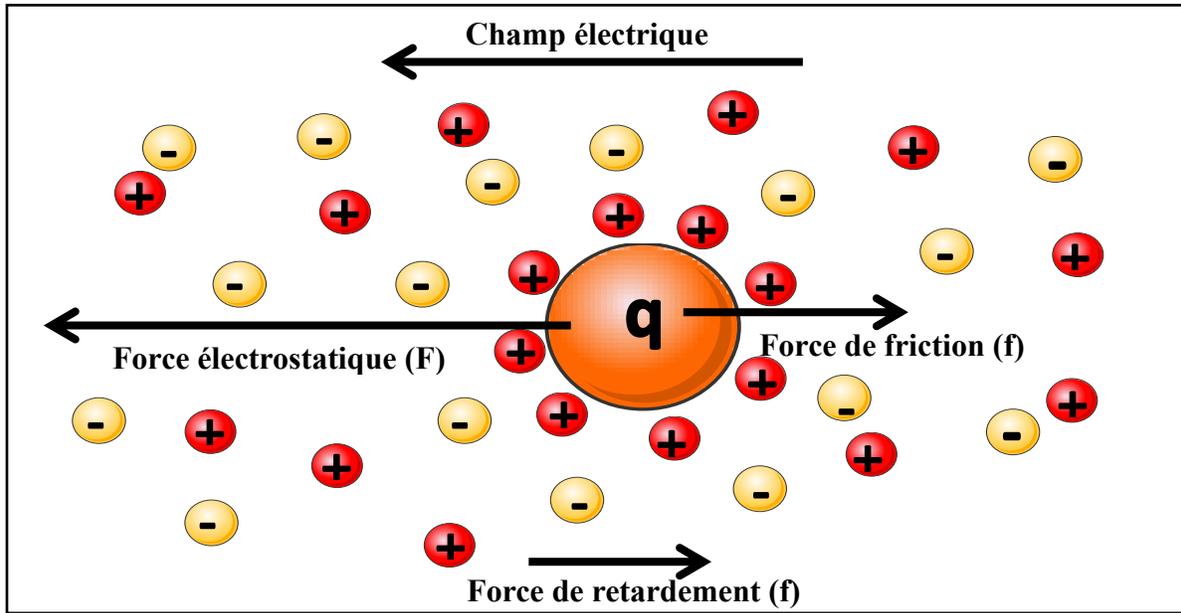


Figure 01: Illustration de l'électrophorèse

Sous l'influence d'un champ électrique, la vitesse de la molécule est augmentée et tend vers une valeur limite  $V_l$  ou la force électrique et celle de frottement s'égalisent ( $F_e = F_f$ ), la molécule est alors animée d'un mouvement uniforme et donc le résultat est nulle. De 01 et 02, on obtient :

$$QE = 6\pi r\eta v \dots\dots\dots (04)$$

Et donc :

$$v = \frac{QE}{6\pi r\eta} \dots\dots\dots (05)$$

Si on maintient le champ électrique longtemps pour négliger le temps petit de l'électrophorèse, le déplacement  $d$  de la molécule dans un temps  $t$  est donné par cette formule :

$$d = v * t \dots\dots\dots (06)$$

Ou :

$$d = \frac{qEt}{6\pi r\eta} \dots\dots\dots (07)$$

La mobilité électrique  $\mu$  est définit comme étant la distance parcourue  $d$  dans une unité de temps  $t$  sous l'influence d'un champ électrique  $E$ , et donc :

$$\mu = \frac{d}{tE} \dots\dots\dots (08)$$

D'après ce qui précède, la mobilité électrique peut être donnée par :

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{f} = \frac{Q}{6\pi r\eta} \dots\dots\dots (09)$$

D'après (09), la mobilité d'une molécule dépend de trois facteurs :

- Elle est proportionnelle à sa charge et donc l'état d'ionisation doit être maintenue constant en utilisant un milieu tamponné. Toute modification de pH provoque un changement de charge ;
- Elle est inversement proportionnelle à son diamètre ;
- Elle est inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu.

**4. Facteurs influençant la migration**

La migration dépend de plusieurs facteurs :

**4.1. Mobilité électrophorétique**

Dépend de la charge de la molécule, sa géométrie (forme et sa taille) et la viscosité du milieu (tampon). La charge d'une molécule est dépendante du pH du milieu et le pHi. La taille est importante notamment dans le cas où les molécules passent à travers une matrice poreuse. La forme des molécules varie selon leurs structures, linéaires, bi ou tridimensionnelles (globulaire ou fibrillaire). La viscosité du milieu dépend de sa concentration et sa température (le passage du courant est accompagné toujours avec une libération de chaleur).

**4.2. Champ électrique**

Supposant deux électrodes de distance  $l$  (m) et de différence de potentiel (ddp)  $V$  (Voltage) (Volt) :

$$E = \frac{V}{l} \text{ (Volt m}^{-1}\text{) ..... (10)}$$

Selon (10), plus que la distance est petite, plus que le champ est élevé.

L'intensité de la force électrique  $F_e$  exercée sur un ion de charge  $Q$  est alors :

$$F_e = \frac{VQ}{l} \text{ ..... (11)}$$

La migration est proportionnelle à  $VQ/l$

Le courant électrique  $I$  généré après l'apparition d'un champ électrique entre les deux électrodes est exprimé en Coulomb  $s^{-1}$  ou Ampère et transporté par les espèces chargées d'échantillon et les ions du tampon. L'intensité de  $I$  (A) est déterminée par la résistance du milieu  $R_\omega$  et le Voltage  $V$  (Volt) selon la loi d'Ohm :

$$V = R_\omega * I \text{ ..... (12)}$$

*La résistance* augmente avec la longueur du trajet entre les deux électrodes (support).

Selon (10) et (12), on conçoit que plus la ddp  $V$  est élevée, plus le  $E$  est grand et plus la particule migre rapidement. Cependant, l'augmentation du courant  $I$  augmente aussi la différence du potentiel  $V$  provoquant ainsi l'augmentation de la température  $T$  par dissipation de l'énergie sous forme de chaleur dans le milieu.

### 4.3. Tampon

Par sa composition, il doit être inerte vis-à-vis l'échantillon et le support. Il détermine le pH et la force ionique du milieu :

- **pH** : la charge nette des protéines dépend du pH du milieu et leur pHi (on doit travailler dans un milieu tamponné), cependant celle des nucléotides, les polynucléotides ou les acides nucléiques (charge nette est toujours négative).

- 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

- **Force ionique (FI)**: le courant électrique est transporté par les ions du tampon et de l'échantillon. Au fait, un accroissement de la FI du milieu entraîne une augmentation du courant vecteur, ce qui provoque une diminution du courant transportant l'échantillon et donc une mauvaise séparation (l'augmentation du courant favorise l'augmentation de la **T**). A faible FI, le déplacement de l'échantillon ionisé est favorisé avec une diminution de production de la chaleur, mais une perte de résolution est obtenue. Le choix de la FI est donc un compromis et elle doit être comprise dans une gamme allant de 0.05 à 1 mol l<sup>-1</sup>.

### 4.4. Support

Bien que les supports utilisés doivent être totalement inertes, ils peuvent occasionner, en pratique, trois phénomènes dont chacun d'eux peut influencer la vitesse de migration :

- **Adsorption** : certains supports ont des propriétés adsorbantes qui fixent les molécules d'échantillon (et solvant), ce qui favorise leur ralentissement en entraînant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme.

- **Electroosmose** : une différence de charge entre les molécules d'eau, de tampon et du support favorise l'apparition de ce phénomène (Fig. 02). Au fait, supposant, en pratique, un support chargé négativement, les ions de charge positive s'adsorbent sur le support et forment dans le solvant une couche de signe positif. Ce phénomène entraîne la phase liquide vers la cathode, il favorise le déplacement des cations et même les molécules neutres vers la cathode et ralentit celui des anions.

- **Tamisage moléculaire** : il est rencontré dans des supports préparés de gels (agarose, amidon ou polyacrylamide) qui possèdent, après réticulation et à une certaine concentration, une réticulation donnée.

Cette dernière facilite la migration de petites molécules et freine d'autres de grande taille. Le phénomène de tamisage accroît proportionnellement en fonction de la concentration du gel.

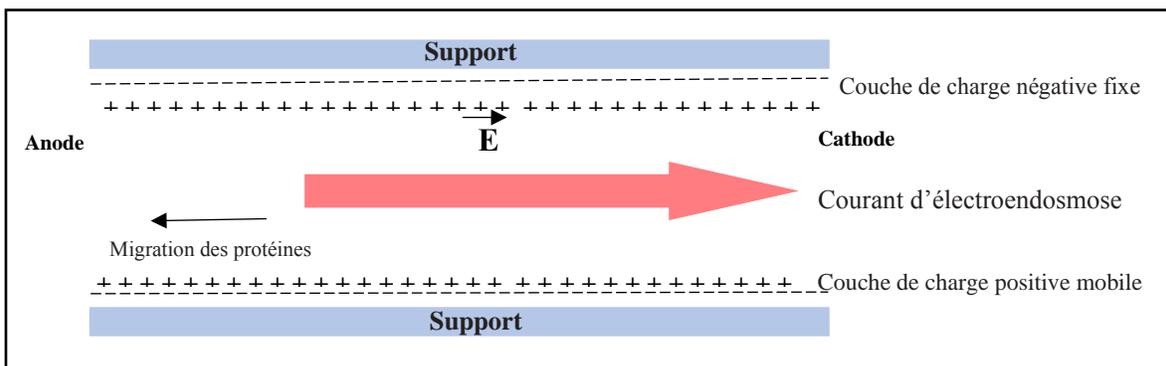


Figure 02: Phénomène d'Electroendosmose.

#### 4.5. Duré de migration

Influe la distance de la migration  $d$  et la mobilité  $\mu$  en électrophorèse en veine liquide (06 et 08). Cependant, en électrophorèse sur support, ces équations ne sont pas applicables du fait de la sinuosité du chemin parcouru par les molécules à travers les pores du support.

#### 4.6. Courants liquidiens

Ils sont particuliers à l'électrophorèse sur support, il en existe trois sortes :

##### 4.6.1. Courant d'évaporation (Rhéophorèse)

La présence d'un champ électrique  $E$  s'accompagne d'une augmentation de la température du support sous l'effet Joule, ce qui aboutit à l'évaporation de l'eau de la phase liquide (Fig. 03). Comme les deux extrémités du support sont plongées dans le tampon et l'évaporation est maximal au milieu de la bande, il s'établit un courant liquidien de chaque extrémité pour compenser la perte de l'eau évaporée. Pour limiter ce phénomène, la cuve d'électrophorèse doit être fermée par un couvercle, ou on utilise des montages réfrigérés.

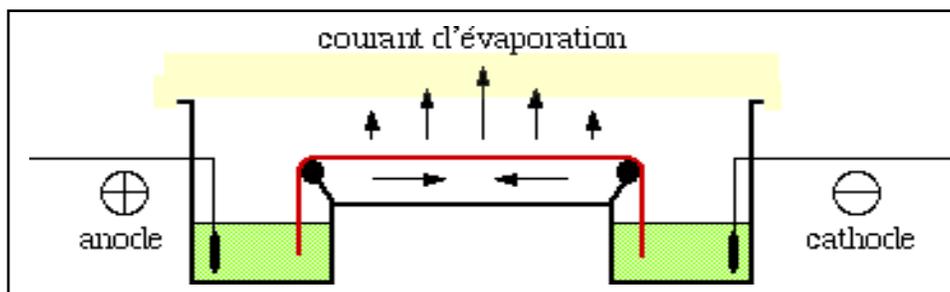


Figure 03: Phénomène de Rhéophorèse.

### 4.6.2. Courant électroendosmose

Dans des conditions expérimentales, la couche mobile de signe positif migre dans le sens du champ électrique, ce qui entraîne généralement la phase mobile vers la cathode, c'est le phénomène d'électroendosmose (Fig. 02). Ce dernier s'oppose au sens de déplacement des protéines chargées négativement et donc les ralentit.

### 4.6.3. Courant électrolyse

Suite à la décharge des ions au niveau des électrodes (électrolyse), il s'établit une modification de la composition du tampon dans les deux compartiments, ce qui entraîne une variation du pH et donc une perturbation de la séparation et une diminution de la résolution.

## 5. Matériel électrophorétique

### 5.1. Montage horizontal

Ce type de montage s'utilise pour des matrices préparées de l'acétate de cellulose ou de papier dont les espèces à séparer migrent en surface (Fig. 04). Les deux extrémités de la matrice, une bande généralement longue et étroite, plongent dans un tampon d'électrode (solution d'électrolyte). La matrice est humidifiée avec le tampon, ce qui permet aux ions d'électrolyte de se déplacer à la surface en créant le courant qui entrainera les espèces chargées de l'échantillon et donc les séparer. Également, le montage horizontal est utilisé avec les matrices d'agarose lors l'électrophorèse d'acides nucléiques ou d'immuno-électrophorèse.

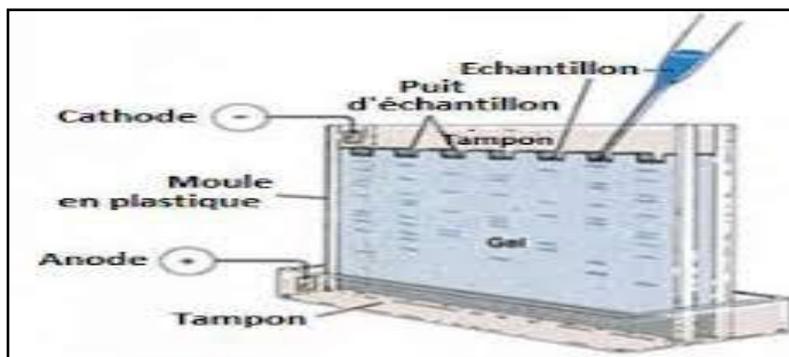


**Figure 04:** Montage horizontal d'électrophorèse

### 5.2. Montage vertical

Ce type de montage s'utilise pour préparer des matrices en gel de polyacrylamide, rarement d'agarose, où les molécules migrent généralement à l'intérieur du gel (Fig. 05). La matrice, gel, est préparée soit entre deux plaques de verre "sandwich" (plaque de verre/gel/plaque de verre) ou dans un tube cylindrique en verre "carotte". Durant la gélification, on réalise des puits au sommet du gel ou les

échantillons seront déposés. Lors l'électrophorèse, les deux extrémités du gel sont déposées dans une solution tampon riche en électrolytes qui, sous l'effet du courant électrique, permettent le passage du courant dans le gel en entraînant avec eux les espèces à séparer.



**Figure 05:** Montage vertical d'électrophorèse

Généralement, le gel d'acrylamide est le plus utilisé dans ce genre de montage car cette substance peut s'attacher sur le verre et ne glissera pas hors du "sandwich". En revanche, l'agarose a une faible affinité pour le verre et donc moins utile pour ce genre de montage.

### 5.3. Principales matrices d'électrophorèse

Il existe différents types de matrices qui se diffèrent en fonction de leur constitution, le montage d'utilisation et leurs caractéristiques physico-chimiques.

#### 5.3.1. Papier

Le papier, ou cellulose, a été introduit aux séparations électrophorétiques au début des années 1950 comme technique de séparation des protéines. Il est employé habituellement dans les montages horizontaux et rarement verticaux, et les molécules se déplacent en surface de la cellulose. Il sert à séparer les acides aminés, les nucléotides et d'autres molécules de petite taille. Ce type de support est de moins en moins utilisé, car il possède des propriétés adsorbantes qui entraînent un phénomène d'électroendosmose élevé.

#### 5.3.2. Acétate de cellulose

L'acétate de cellulose a été introduite comme support en 1957 comme alternative de la cellulose (papier). Elle est préparée sous forme d'une bande mince et fragile, et est utilisée avec les montages horizontaux dont le dépôt et la migration des molécules se font en surface. Elle possède plusieurs avantages par rapport au support papier:

- Minimise les phénomènes d'adsorption (porosité plus uniforme) et d'électroendosmose et donc une bonne résolution ;
- Les séparations sont plus rapides, avec une résolution améliorée;
- Elle est transparente après un traitement avec une huile appropriée, ce qui facilite la détection optique des zones ;
- Elle se dissout facilement dans une variété de solvants, facilitant ainsi l'élution et l'isolement des composants séparés.

L'acétate de cellulose est utilisé pour séparer les mêmes substances que celles définies pour le papier, mais des applications particulières sont faites dans la séparation des protéines du sang (biochimie médicale). Cependant, sa faible résolution et fragilité la rend moins préférée par rapport aux gels.

### **5.3.3. Silice**

La poudre de silice est préparée sous forme de couche mince étalée sur une plaque de verre horizontal. Ce type de support a une bonne sensibilité et donne une bonne résolution.

### **5.3.4. Gels**

Les supports utilisés en électrophorèse sur couche mince sont remplacés par les gels *pour séparer les molécules à haut poids moléculaires* telles que les protéines et les acides nucléiques. Les propriétés physiques, hydrophiliques, semi-colloïdes des gels plus que leur insolubilité dans l'eau leurs permettent de donner une meilleure résolution par rapport aux autres supports.

#### **5.3.4.1. Gel d'amidon**

L'amidon a été le premier milieu de gel utilisé pour une séparation électrophorétique (1958). C'est un gel semi-solide préparé à partir d'un amidon partiellement hydrolysé.

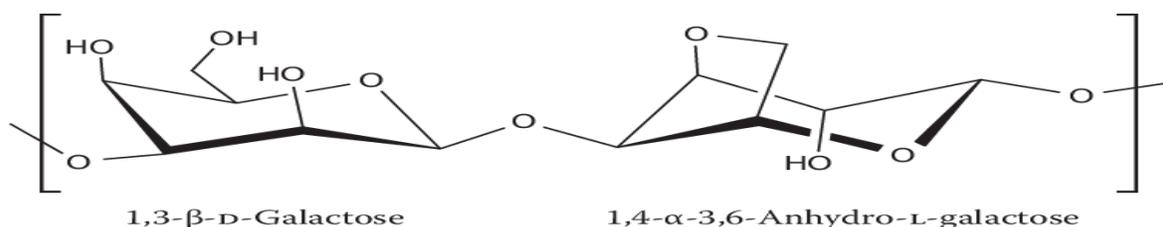
Le gel a un effet de tamisage et pour le réduire, la porosité du gel doit être contrôlée. Des solutions d'amidon de concentration allant de 8 à 15% sont utilisées pour préparer des gels de porosité variable (forte => faible), des concentrations d'amidon trop élevées ou trop faibles donnent des gels excessivement rigides ou mous. Aussi, il présente le phénomène d'adsorption (sa charge négative interagit avec les protéines et les freine) et électroendosmose qui peut être quantifié à l'aide du bleu de dextran, un oligosaccharide non chargé qui possède une mobilité électrophorétique nulle (soustraction des distances). L'amidon est remplacé par des gels de polyacrylamide et d'agarose.

### 5.3.4.2. Gel d'agar

Ce gel présente des phénomènes d'électroendosmose, et il est réservé actuellement à l'électrophorèse des lipoprotéines.

### 5.3.4.3. Gel d'agarose

L'agarose a été utilisé pour la première fois comme milieu d'électrophorèse au début des années 1970. C'est un polymère linéaire constitué d'unité d'agarobiose contenant un D-galactose lié à un 3,6 anhydro-galactose préparé dans l'eau bouillante (Fig. 06). La structure du gel est maintenue par des liaisons hydrogène. La concentration de l'agarose dans le gel détermine sa porosité, dont la taille des pores est beaucoup plus grande que celle du gel de polyacrylamide. Aussi, sa faible adhésion au verre oblige le manipulateur, généralement, à étaler ce gel sur une plaque de verre horizontale.



**Figure 06:** Structure de base du gel d'agarose.

Les gels d'agarose peuvent être utilisés en modes vertical (concentration à partir de 0,8%) et horizontal (concentration à partir de 0,2%). Ce type de gel présente un phénomène important d'électroendosmose (formation de groupements sulfates lors la préparation). Il permet la détection des protéines antigéniques grâce à l'immunoélectrophorèse. L'effet faible du tamisage moléculaire a permis l'analyse d'ADN et les produits de restriction (fragment d'ADN).

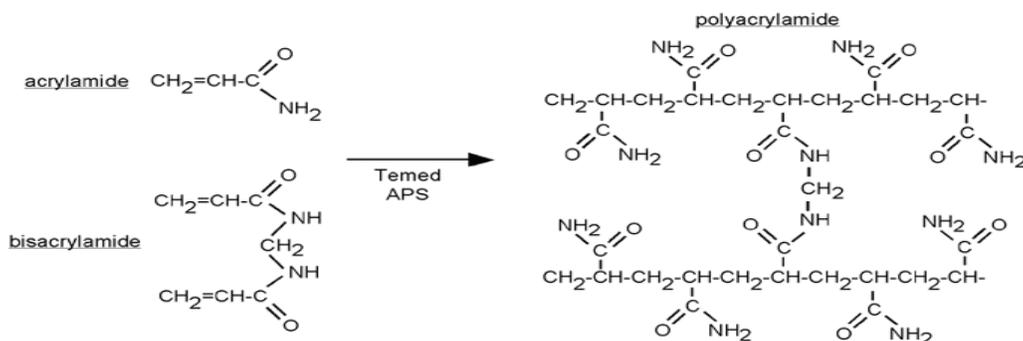
### 5.3.4.4. Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide a remplacé le gel d'amidon dans la séparation des protéines, de petits fragments d'ARN et de très petits fragments d'ADN. C'est actuellement le support le plus utilisé en raison :

- De sa grande résistance mécanique ;
- De l'absence du phénomène d'adsorption et d'électroendosmose ;
- De la reproductibilité de sa porosité.

Le gel de polyacrylamide (PAGE: PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est obtenu après une copolymérisation du monomère d'acrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ ) (formation des chaînes d'acrylamide)

avec un agent de réticulation, N,N'-méthylène bisacrylamide ( $(\text{CH}_2(\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2)_2)$ ) qui assure le pontage des chaînes (Fig. 07).



**Figure 07:** Copolymérisation d'acrylamide qui donne le gel d'acrylamide.

Les gels de polyacrylamide sont préparés entre deux plaques de verre ou à l'intérieur de tubes cylindriques de verre, avec une concentration allant de 3% (une pâte) à 30% d'acrylamide (opaque, cassant et rigide) mais pratiquement une gamme de 4 à 20% est utilisée. La porosité d'un gel de polyacrylamide contrôle la mobilité et la résolution des composants. En outre, la taille des pores (mailles), la densité, l'élasticité, la viscosité et la résistance du gel peuvent être contrôlées en faisant varier la concentration totale de monomère et du réticulant (bisacrylamide). L'échantillon est déposé au-dessus du gel vertical et donc migre à l'intérieur. Il se prête bien en analyse quantitative et à la révélation par fluorescence puisque l'acrylamide n'absorbe pas les rayons UV.

Le rapport frontal  $R_f$  est un paramètre qui doit se calculer pour déterminer la masse molaire (MM) d'une protéine. Il définit comme étant le rapport entre la distance parcourue par l'espèce à séparer et le front de migration, ce qui permet de tracer la droite :  $\text{Log}(\text{MM}) = f(R_f)$ .

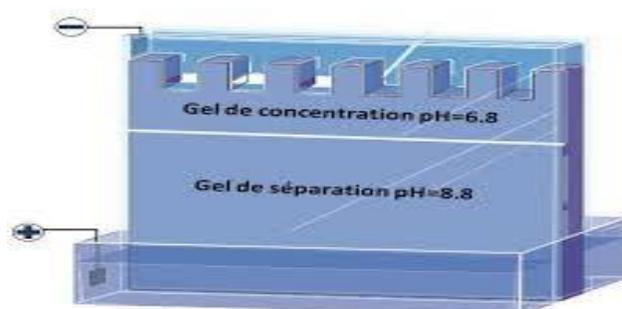
### 5.3.5. Tampon

Pour une bonne séparation électrophorétique, le pH de l'opération doit être maintenu en une valeur constante en utilisant des solutions tampons. D'ailleurs, la mobilité des solutés est affectée par la composition et la force ionique du tampon d'électrophorèse. En outre, il existe deux catégories de système de tampon: un système dénaturant ou non-dénaturant et un système continu ou discontinu.

#### 5.3.5.1. Système continu et discontinu

- *Système continu* : la même composition ionique dans le gel, les deux réservoirs anodique et cathodique et dans la solution d'échantillon. L'échantillon est mis directement au-dessus du gel à travers lequel la migration a lieu. Le gel de ce système doit posséder une porosité suffisamment petite (taille des pores) pour que les composants d'échantillon puissent se séparer par tamisage moléculaire.

- *Système discontinu ou polyphasiques*: le tampon du gel et des réservoirs de deux électrodes ne sont pas les mêmes, la discontinuité est à la fois en concentration et en pH. L'échantillon est alors mis sur un gel de porosité large (gel de concentration ou *Stacking gel*, pH = 6.8) qui se polymérise sur le gel de séparation proprement dit, pH = 8.8 (Fig. 08). Parmi les avantages de ce système, l'utilisation de volume relativement élevé des protéines diluées en gardant une résolution élevée.

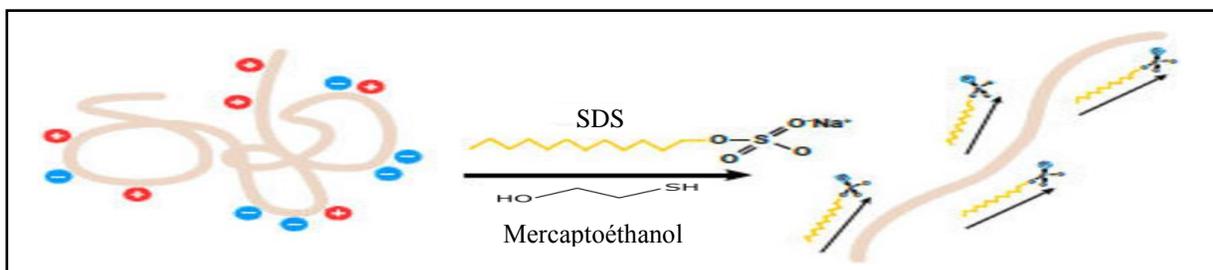


**Figure 08:** Structure d'un gel de séparation discontinu

### 5.3.5.2. Système dénaturant et non dénaturant

Un système dit naturel, non dissociant, lorsque l'intégrité de la molécule et sa charge nette sont maintenues lors l'électrophorèse. Toutefois, le système dénaturant dissocie les molécules en chaîne unitaires ou change leurs charges totales.

L'électrophorèse des acides nucléiques (charge négative) à simples brins est compliquée par leur structure secondaire (hélicoïdale), et donc leur séparation à base du poids moléculaire exige l'introduction des agents dénaturants qui déroulent leurs brins. la perturbation des liaisons d'hydrogène structure. De ce fait, le système tampon dénaturant d'ADN le plus utilisé contient **l'urée** et le **formamide**.



**Figure**

**09:** Dénaturation des protéines sous SDS et Mercaptoéthanol

L'analyse électrophorétique des protéines est basée sur leur charge, forme et masse molaire, donc pour les séparer en fonction de leur masse molaire seulement elles doivent être dénaturées. La dénaturation est réalisée en utilisant un système tampon dénaturant incluant **le sulfate dodécyle de**

**sodium (SDS)** qui est un détergent anionique, dénature les structures secondaires et tertiaires des protéines (mais pas les liaisons disulfures), et les rend chargées négativement. Le **mercaptoéthanol** et le **dithiothréitol (DTT)** sont utilisés pour réduire les ponts disulfure (S-S) inter-chaînes en groupements sulfhydryle (-SH) (Fig. 09).

### 5.3.6. Solution échantillon

Cette solution doit contenir le glycérol ou le saccharose pour rendre l'échantillon plus dense et donc rester au fond du puits de chargement. Aussi, elle contient des colorants de petite taille permettant le suivi de la migration d'échantillon le long du gel tels que : le bleu de bromophénol, ou le xylène de cyanol. Des agents de dénaturation comme SDS, DTT, Urée... sont aussi y présents.

### 5.3.7. Courant appliqué

La vitesse de migration des molécules d'échantillon est en fonction de l'intensité du courant électrique appliqué, plus qu'elle est élevée, plus les molécules migrent vite. Toutefois, une haute tension augmente énormément la température ce qui peut fusionner le gel, et donc diminuer sa résolution. Une tension très faible est aussi déconseillée.

### 5.3.8. Visualisation ou Révélation

Après l'électrophorétique, la seule bande visible est celle du colorant de suivi, cependant la détection des taches invisibles des protéines et d'acides nucléiques nécessite une visualisation par coloration. Une solution de l'acide trichloracétique à 10% est utilisée pour fixer les protéines dans le gel de séparation en les précipitant et donc empêcher l'élargissement des bandes et la perte d'analytes dans les solutions de coloration. Après la fixation, le gel est déposé dans une solution de coloration convenable, protéine ou acide nucléique, suivi par un rinçage par une solution de rinçage qui élimine le colorant dans tout le gel que les taches dont les molécules sont interagies avec le colorant (coloration non sélective).

Le colorant le plus utilisé pour **les protéines** est celui de bleu de **Coomassie brillon** plus que rouge Ponceau, Amido-schwartz (noir) et vert de lissamine. L'agent d'intercalation utilisé pour rendre les bandes d'**ADN** plus visibles sous UV est celui du **bromure d'éthidium**.