

6.3. Isoélectrophocalisation (IEF)

C'est une méthode de séparation des protéines basée sur la différence des points isoélectrique (pHi). La réalisation du gradient de pH ainsi que sa stabilisation sont assurées avec un mélange de molécules amphotères de différents pHi, de poids moléculaires faible (300-700 Da : analogue à celui des peptides) et qui couvre une certaine gamme de pH. Les ampholytes sont des molécules synthétisées à base d'acides aliphatiques polyamino-polycarboxyliques, disponibles commercialement pour toutes les gammes de pH disponible (2,5 - 4, 4 - 6, 5 - 7, 7 - 9, 3,5-10,...). Sous l'influence d'un champ électrique, les ampholytes (plus le saccharose pour limiter la diffusion) inclus dans le gel avant sa polymérisation et se rangent en couches successives, entre la cathode et l'anode, selon leur pHi et forme un gradient de pH.

Le dépôt d'échantillon peut avoir lieu à la cathode, à l'anode ou aussi au milieu du gel. Les molécules migrent selon leur charge qui varie en fonction du pH du milieu (Fig. 15).

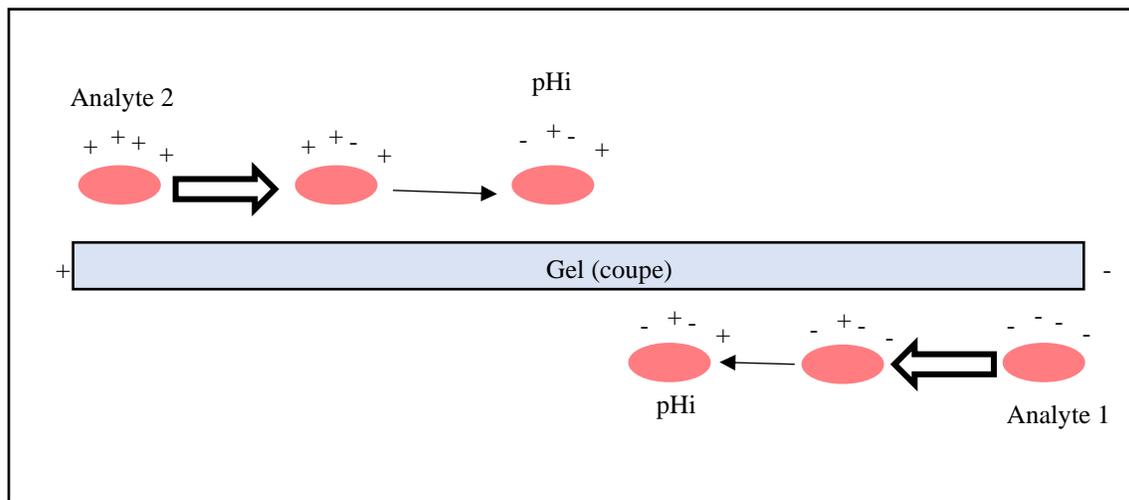


Figure 15: Un gel d'Isoélectrophocalisation.

Lorsque le pH est inférieur au pHi de la protéine, elle prend une charge positive et migre vers la cathode (-) et vis vers ça. En revanche, la protéine, lors son déplacement, rencontre un point de pH à lequel elle est à l'état de zwitterion et donc s'immobilise en formant une bande stationnaire, focalisation des protéines.

6.4. Analyse combinée ou 2D

Parmi les électrophorèses citées ci-dessus, il est possible de combiner certaines d'elles qui ont des principes de séparation différents, cette combinaison s'appelle électrophorèse bidimensionnelle ou 2D (1^{ère} dimension et 2^{ème} dimension) (Fig. 16). La combinaison a pour but d'augmenter la résolution électrophorétique. Le système 2D le plus utilisé est celui IEF/SDS-PAGE qui s'appelle la méthode d'O'Farrell.

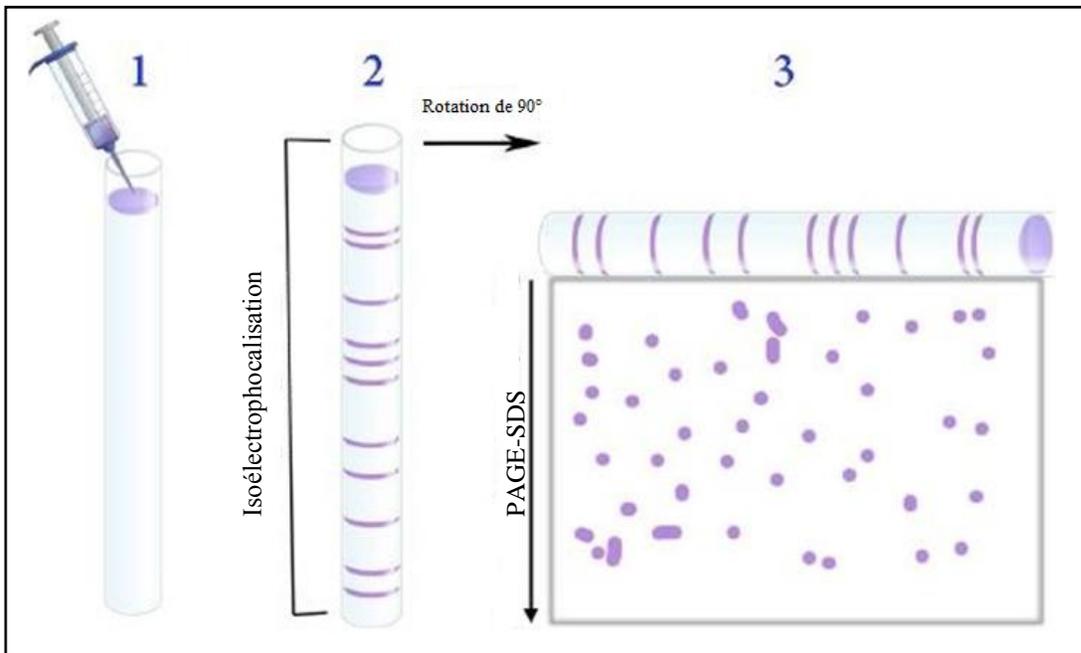


Figure 16: Electrophorèse en double dimension.

Selon la figure ci-dessus, la première dimension représente la séparation des protéines par isoélectrophocalisation (IEF) en fonction de leur charge seulement le long du gel de polyacrylamide de forme cylindrique. Après la séparation des protéines selon leur pHi, le gel cylindrique est mis horizontalement au sommet du gel SDS-PAGE sur le gel de concentration et donc remplace l'étape du dépôt d'échantillon, c'est la migration en deuxième dimension. Le déplacement des protéines est fait à 90° par rapport à celle d'IEF, et les analytes (protéine-SDS) migrent selon leur taille seulement.

6.5. Electrophorèse en champ pulsé

Ce type d'électrophorèse s'utilise pour séparer les molécules d'ADN de grand poids moléculaire (plus de 50000 Kb) dans un support solide (gel d'agarose ou polyacrylamide). La séparation de ces molécules ne peut pas être réalisée par la méthode classique (tamisage moléculaire des gels) puisque leurs tailles sont supérieures au diamètre le plus élevé des pores du gel, ceci peut être augmenté mais le gel devient plus fragile.

Pour résoudre ce problème, au lieu d'utiliser un champ électrique continu et unidirectionnel, deux champs électriques de deux orientations différentes sont appliqués de façon perpendiculaire (90°) et alternative, c'est l'électrophorèse pulsée (Fig. 17). Au fait, les électrodes sont placées en deux positions perpendiculaires dont la durée d'application de chacune d'elles (temps de pulse) est choisie judicieusement selon la taille des fragments à séparer.

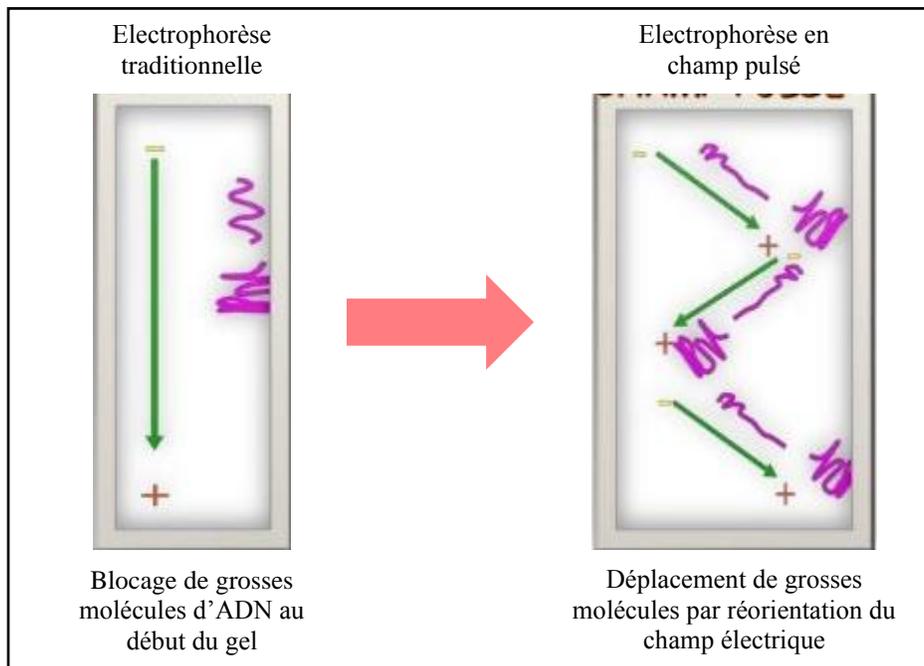


Figure 17: Principe de migration en électrophorèse en champ pulsé.

Entre chaque deux applications successives du champ, les fragments d'ADN se réorientent à la même direction du champ électrique appliqué dont leur vitesse de réorientation est étroitement liée à leur taille. En outre, le temps de pulse (la durée d'application du champ dans un sens donné) contient deux périodes: le temps de la réorientation des fragments (fragment immobiles) et le temps de la migration. Ainsi, les molécules de tailles voisines ont une faible différence de temps de

réorientation, mais peuvent entraîner une différence élevée dans le temps de migration total ce qui améliore la séparation et donc augmente la résolution de l'électrophorèse en champ pulsé.

6.6. Immunoélectrophorèse (IE)

Cette méthode exploite les différents caractères de mobilité des protéines (antigènes) ainsi que leurs propriétés immunologiques, elle provoque l'apparition d'un arc de précipitation Ag-Ac après une réaction Antigène-Anticorps. La détection immunochimique mise en place peut-être une précipitation antigène-anticorps (méthode de Grabar et Williams, 1953) ou immuno-électro-précipitation (Rockets).

6.6.1. Immunoélectrophorèse qualitative

Cette méthode, appelée aussi méthode de Grabar et Williams, utilise dans son principe la séparation des protéines par effet de tamisage et la spécificité des anticorps (Ac). Le support d'électrophorèse est celui du gel d'agarose à 1% (1mm d'épaisseur), tamponné à pH varie entre 8.2 et 8.6, avec une porosité élevée pour permettre le déplacement des protéines en fonction de leur charge seulement. Après coulage, deux types de puits seront pratiqués, des puits ronds pour déposer l'échantillon protéique à analyser (Antigène) et des puits allongés sous forme de rigole (Gouttière d'antisérum) pour déposer les anticorps (Fig. 18).

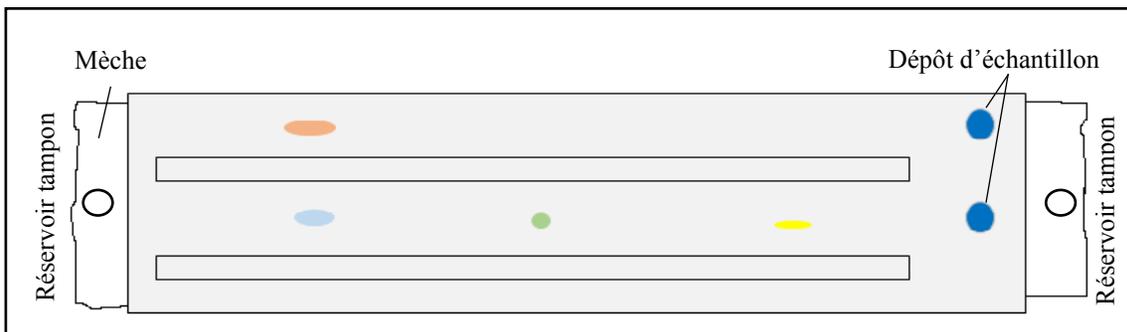


Figure 18: Méthode de Grabar et Williams, étape d'électrophorèse.

La méthode de Grabar et Williams passe par deux étapes, l'étape de l'électrophorèse et celle d'immunodiffusion. Dans la première étape, les Ag migrent sous l'effet du champ électrique en fonction de leur charge. Le gel d'agarose en montage horizontal est mis en contact avec les deux

électrodes au moyen d'un tissu inerte imbibé avec la solution tampon (Fig. 18), l'électrophorèse dure d'une heure jusqu'à deux heures.

Dans la deuxième étape, une solution d'Ac, spécifique d'une protéine donnée ou mélange d'Ac, se place dans les rigoles après la coupure du champ électrique, le gel est ensuite incubé dans une enceinte humide pendant une nuit ou les Ag et les Ac diffusent de façon radiale et se rencontrent. La rencontre entre l'Ag et son Ac spécifique forme le complexe Ag-Ac qui précipite sous forme d'un arc, plusieurs arcs de précipitation indiquent plusieurs complexe Ac-Ag (Fig. 19).

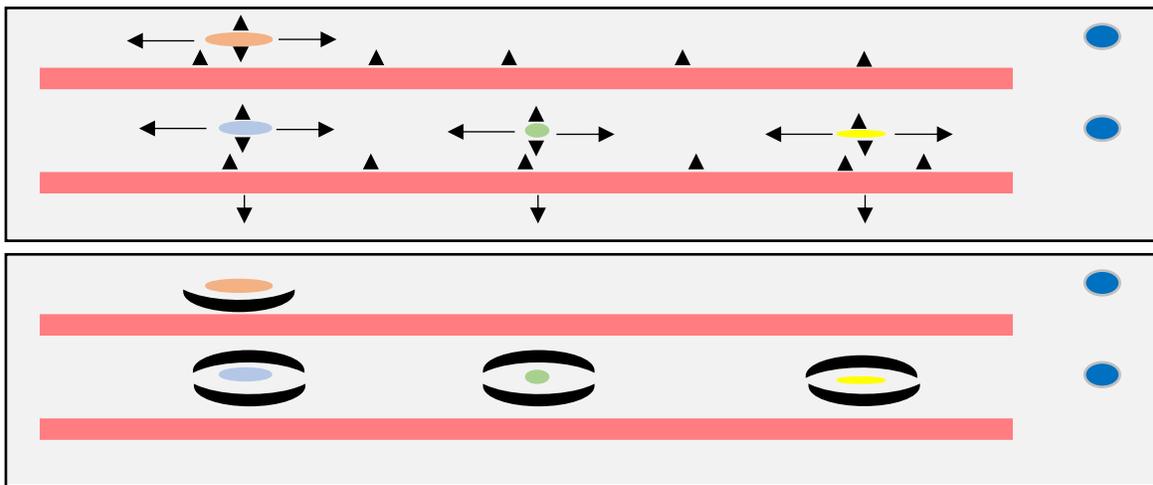


Figure 19: Méthode de Grabar et Williams, étape d'immunodiffusion.

A la fin, le gel est lavé pour éliminer les analytes libres, les arcs sont colorés avec un colorant approprié (bleu de Coomassie) pour la révélation et les Ag sont identifiées par le biais d'un sérum control traité dans les mêmes conditions. Malgré la grande porosité du gel d'agarose, il ne permet pas la diffusion du complexe Ag-Ac.

6.6.2. Immunoélectrophorèse quantitative

Cette méthode, appelée aussi méthode des Rockets de Laurell ou "Fusilles", est basée sur le déplacement électrophorétique des Ag dans un environnement contenant des Ac. Au fait, lors la préparation du gel d'agarose (1 à 2%), des anticorps à 1% doivent être mélangés avec le gel. Une série de puits est formée dans le gel avant l'électrophorèse, généralement du côté cathodique, dans lesquels des échantillons de concentrations différentes d'antigènes sont placées. La mise du système sous tension provoque la migration des Ag vers l'anode sauf l'IgG qui migre vers la cathode.

Pendant l'électrophorèse, des concentrations d'antigène plus élevées conduisent à des distances de migration plus grandes (déplacement suffisant) avant la formation de la ligne de précipitation (pointe de la fusée) (Fig. 20). L'équivalence Ag-Ac 1:1 n'est atteinte que lors la présence d'une concentration élevée en Ag, les complexes se précipitent et des lignes de précipitation (sommelle de rockets) se forment. Les lignes formées sont en forme de fusée et la hauteur de la fusée, de l'extrémité cathodique du puits à la pointe de la fusée, est directement proportionnelle à la concentration en antigène.

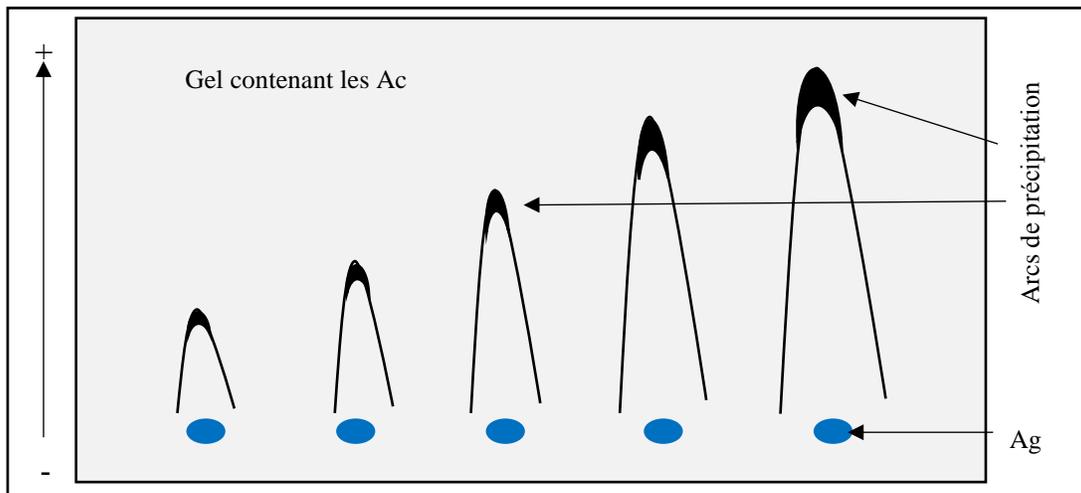


Figure 20: Immunoelectrophorèse, méthode des Rockets de Laurell.

L'électrophorèse des Rockets de Laurell peut être utilisée pour déterminer des quantités de nanogrammes de protéines. La révélation des protéines est effectuée par le bleu de Coomassie ou l'argent peut être utilisé pour faciliter la détection visuelle des lignes de précipitation, à condition qu'un rinçage préalable soit utilisé pour éliminer les anticorps non liés du gel.