

L'électrophorèse

1. Introduction

L'électrophorèse est une technique de séparation qui utilise un champ électrique pour déplacer des particules chargées électriquement. Les particules se déplacent vers l'électrode de charge opposée, leur vitesse de migration étant déterminée par leur taille, leur charge et la force du champ électrique.

2. Définition

Electro=électricité, phorèse=photos (en grec), porter d'un côté à l'autre.

Electrophorèse= migration des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

C'est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur:

- Taille;
- Charge électrique;
- Autres propriétés physiques....

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

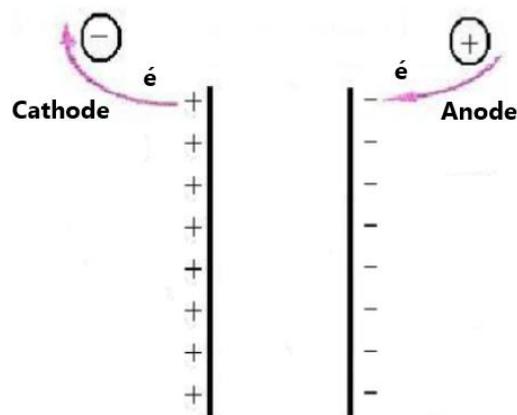


Figure 1: Principe de fonctionnement de l'électrode

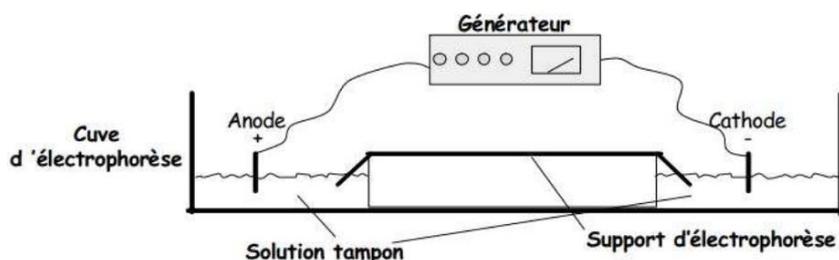


Figure 2: Schéma simplifié du principe de l'électrophorèse

- Les molécules à séparer sont déposées sur un support d'électrophorèse 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.

3. Types d'électrophorèse

La séparation se fait en zones distinctes (bandes) des molécules chargées après migration. Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support poreux:

- Electrophorèse sur couche mince (papier ou sur acétate de cellulose);
- Electrophorèse sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide...).

a- Electrophorèse sur couche mince (papier ou sur acétate de cellulose)

C'est une technique de séparation qui utilise un support solide et poreux pour séparer les composés en fonction de leur mobilité électrophorétique. Le support est généralement une plaque de verre ou de plastique recouverte d'une fine couche de matériau absorbant, tel que la cellulose, l'alumine ou la silice.

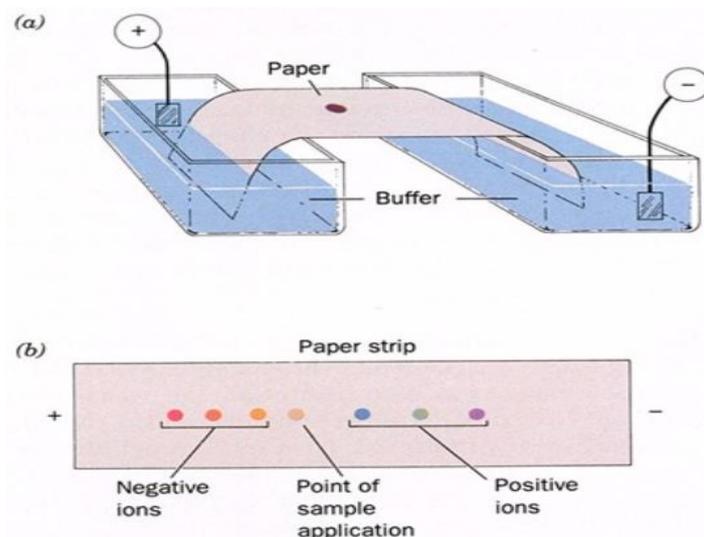


Figure 3: Schéma simplifié de l'électrophorèse sur couche mince

b- Electrophorèse sur gel

C'est la technique la plus couramment utilisée pour la séparation des protéines et des acides nucléiques. Les gels d'usage commun, l'agarose et le polyacrylamide, possèdent des pores de la taille des molécules à séparer.

b.1- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide:

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylSulfate de sodium (SDS-PAGE), est une technique utilisée pour la séparation de mélanges de protéines. Elle se déroule en conditions dénaturantes.

b.1.1- Préparer le gel de polyacrylamide:

Le gel est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. Plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel.

Tableau 1: % polyacrylamide dans gel dépend de la taille des macromolécules à séparer

Pourcentage d'acrylamide (%)	Gamme de séparation en kDa
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2.5-100

b.1.2- Préparer le mélange protéique:

On fait bouillir un mélange de protéines, pendant quelques minutes en présence:

- **D'un détergent anionique fort (agent dénaturant):** le dodécylsulfate de sodium (SDS):

Comme il y a une charge négative par molécule de SDS, sa liaison masque toutes les charges de la protéine, et lui confère une charge globale négative élevée. La structure native de la protéine est donc dénaturée.

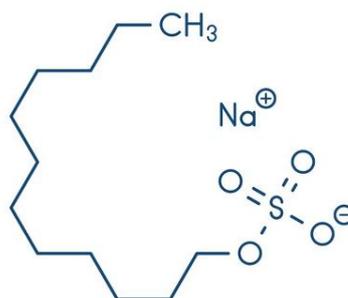


Figure 4: Structure chimique du SDS

- **D'un agent réducteur:** le β -mercaptoéthanol: permet une dénaturation complète des protéines par réduction des ponts disulfures.

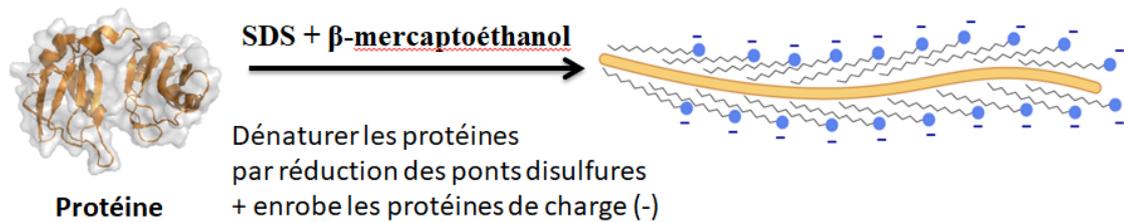


Figure 5: Les étapes de préparation du mélange protéique

b.1.3- Couler le gel et préparer l'électrophorèse

Couler le gel entre deux plaques de verres fixées sur un support.

La partie inférieure du gel, appelé gel de migration (running gel) (pH est vers 8,7 et sa concentration en acrylamide (entre 7 et 15%, en général)).

La partie supérieure du gel, appelé gel de concentration (stacking gel) (pH est vers 6,5 et sa concentration en acrylamide est de l'ordre de 2 à 4% seulement).

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

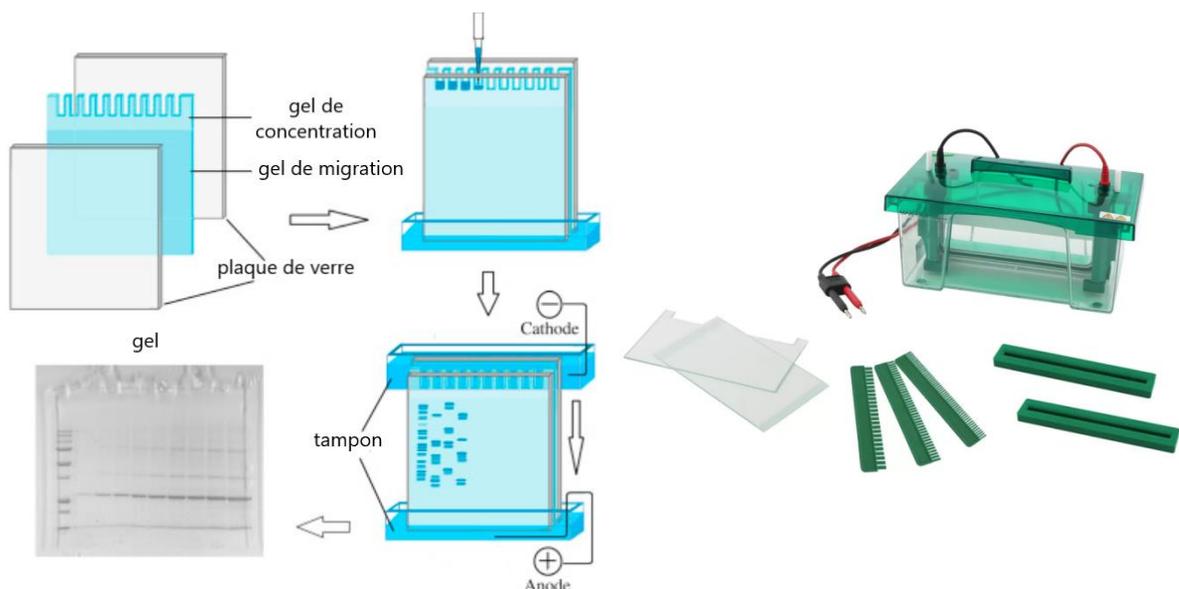


Figure 6: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

b.1.4- Migration et démoulage du gel

Les protéines migreront toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaires des protéines sera le facteur de leur séparation.

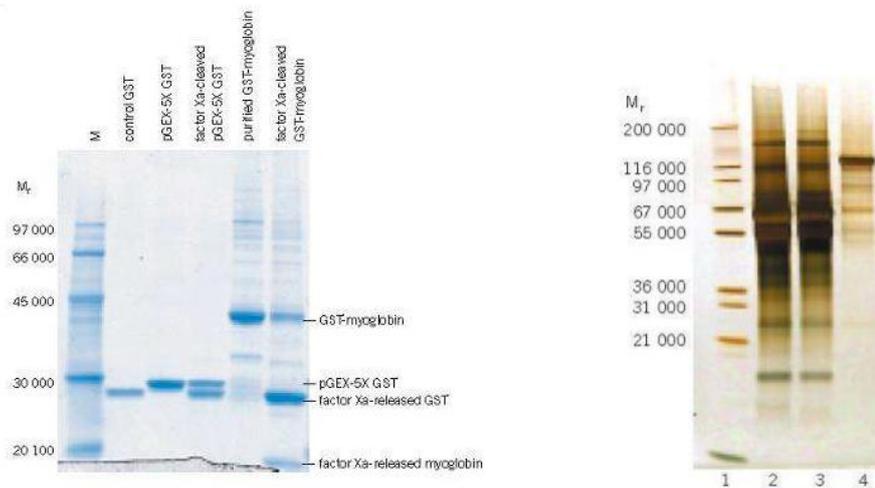
L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant approche de l'extrémité inférieure du gel de migration.

Après migrations, le gel est démoulé.

Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel.

b.1.5- Révélation

Les protéines sont révélées par une coloration: par exemple avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent.



Coloration au Bleu de Coomassie brillant

Coloration au nitrate d'argent

Figure 7: Exemple de gel de migration SDS-PAGE des protéines après révélation

b.1.6- Détermination de la masse molaire

La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masse molaires connues.

Exemple de marqueurs:

- β galactosidase (116 kDa).
- Albumine (66 kDa).
- Ovalbumine (45 kDa).

$$\text{La mobilité relative} = \frac{\text{distance de migration d'une bande}}{\text{distance de migration du front de migration}}$$

La droite $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$ permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

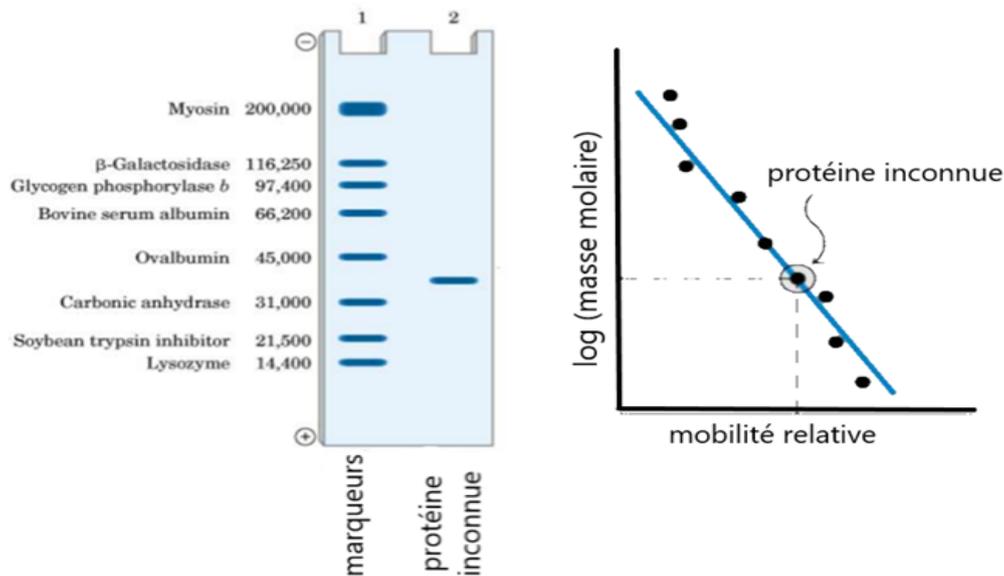


Figure 8: Détermination de la masse molaire des protéines par une droite

b.2- Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée pour séparer l'ADN et l'ARN en fonction de leur masse moléculaire.

La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose: les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Cette technique se fait horizontale dû à la faible adhésion du gel agarose au verre.

b.2.1- Préparer le gel d'agarose:

Pour préparer le gel d'agarose, il suffit de mélanger de la poudre d'agarose avec du tampon d'électrophorèse. La concentration d'agarose dans le gel détermine la taille des pores du gel. Une concentration plus élevée d'agarose correspond à des pores plus petits, ce qui permet de séparer les biomolécules plus petites.

Tableau 2: % d'agarose dans gel dépend de la taille de l'ADN à séparer

% d'agarose	Eventail de tailles d'ADN (bp)
0,75	10000-15000
1,0	500-10000
1,25	300-5000
1,5	200-4000
2,0	100-2500
2,5	50-1000

b.2.2- Préparation des échantillons:

- Bleu de bromophénol dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 300 pb (tout petit fragment: migration très rapide).
- Xylène cyanol dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 4000 pb (très gros fragment: migration la plus lente).

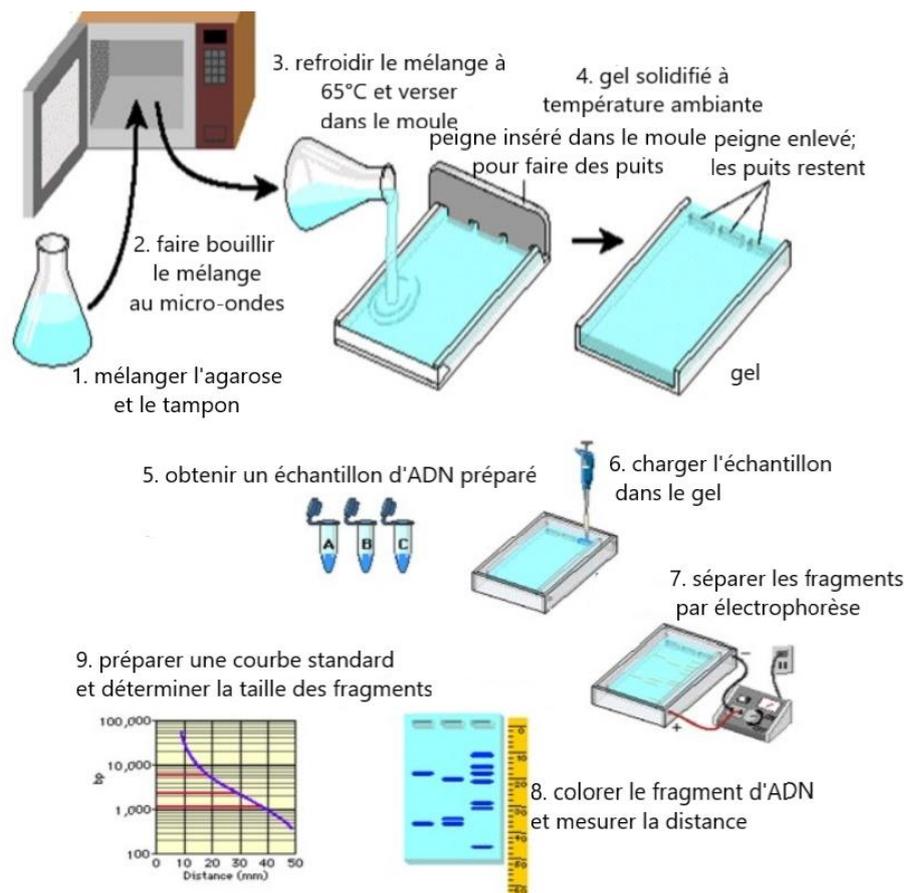


Figure 9: Les différentes étapes d'électrophorèse sur gel d'agarose

b.2.3- La révélation

La révélation de l'ADN peut se faire à l'aide de bromure d'éthidium (BET), qui est un agent d'interaction fluorescent couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques en laboratoire de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements UV, il prend une coloration rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

En fonction des conditions d'électrophorèse, on distingue parmi les différents genres l'électrophorèse bidimensionnelle.

4. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est une combinaison d'une focalisation isoélectrique qui sépare les protéines en fonction de leur pH_i (première dimension), suivi d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (deuxième dimension) qui les sépare en fonction de leur poids moléculaires.

4.1- Focalisation isoélectrique ou isofocalisation

Les protéines sont soumises à une migration sur un gradient de pH établi à l'intérieur du gel de polyacrylamide coulé dans un tube cyclique étroit. Ce gradient est établi par pré électrophorèse d'une série de molécules faibles masses moléculaires contenant des groupes aminos et carboxyles appelés ampholytes.

Une protéine analysée sur ce type de gel va migrer jusqu'au pH correspondant à son point isoélectrique et s'y arrêter.

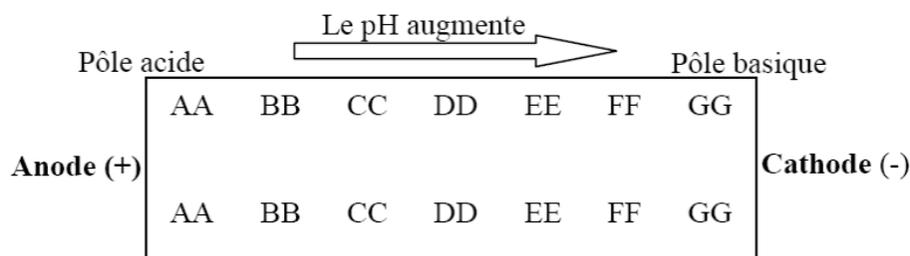


Figure 10: Gradient de pH en isoélectrofocalisation

A, B, C, D, E, F et G sont des ampholytes de pH_i croissant de pH_i^A à pH_i^G . Les ampholytes à pH acide migrent vers l'anode, les ampholytes à pH_i basique migrent vers la cathode.

4.2- Electrophorèse en conditions dénaturantes

Après focalisation électrique, le tube de gel est enlevé et placé au-dessus d'un gel de concentration et soumis à une SDS-PAGE classique dans une direction de 90° par rapport à l'expérience d'électrofocalisation initiale. Chaque bande du gel d'électrofocalisation peut contenir plusieurs protéines de poids moléculaire différent.

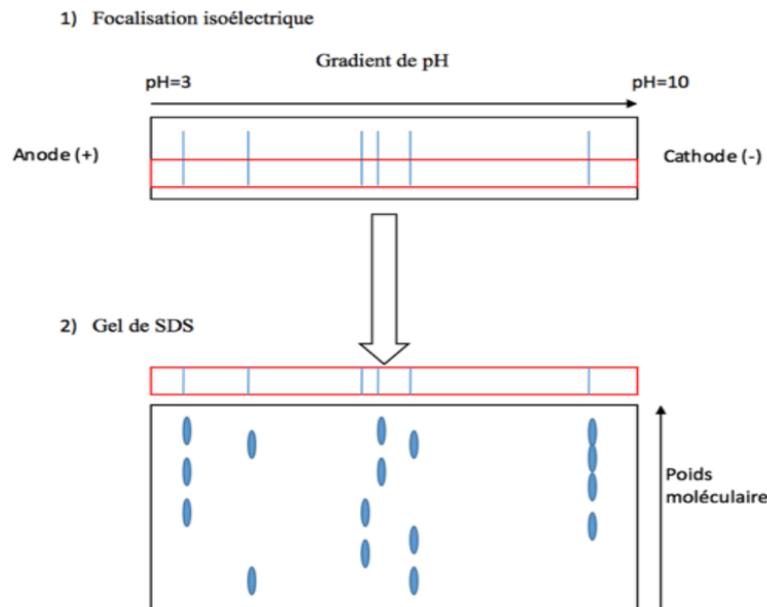


Figure 11: Electrophorèse 2D

À la fin des deux étapes, les protéines sont séparées en deux dimensions, formant un motif unique de points appelé "gel 2D". Les protéines peuvent être identifiées à l'aide de colorants ou de sondes fluorescentes.

5. Domaines d'applications

L'électrophorèse est une technique polyvalente qui est utilisée dans de nombreux domaines, notamment :

- ❖ **La recherche biologique:** l'électrophorèse est utilisée pour identifier et caractériser les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides. Par exemple, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur taille et de leur charge. L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée pour séparer les acides nucléiques en fonction de leur taille.
- ❖ **Le diagnostic clinique:** l'électrophorèse est utilisée pour diagnostiquer des maladies, telles que les maladies cardiaques, les maladies infectieuses et les cancers. Par exemple, l'électrophorèse de l'hémoglobine est utilisée pour diagnostiquer l'anémie falciforme. L'électrophorèse de l'urine est utilisée pour diagnostiquer les infections urinaires.
- ❖ **L'industrie alimentaire:** l'électrophorèse est utilisée pour contrôler la qualité des aliments, tels que la viande, les produits laitiers et les céréales. Par exemple, l'électrophorèse des protéines est utilisée pour identifier les protéines de lait et de viande. L'électrophorèse des polysaccharides est utilisée pour identifier les polysaccharides dans les céréales.

