

1. Définition

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 la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ». 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 une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations.

3. Types d'électrophorèse

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

3.1. L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tiselius (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée (Fig. 01) (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.

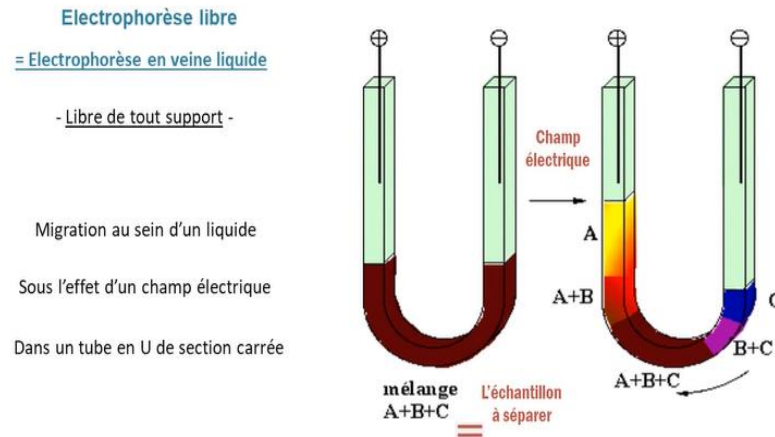


Figure 01. Appareillage pour l'électrophorèse libre, en veine liquide.

3.2.L'électrophorèse sur supports poreux (électrophorèse de zone)

Ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Différents types de support peuvent être utilisés.

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- ✓ Papier
- ✓ Acétate de cellulose
- ✓ semi-solide (Gels) :

Différents types d'électrophorèse sur gel :

- Electrophorèse sur gel d'agarose
- Electrophorèse en champ pulsé
- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)
- Electrophorèse bi-dimensionnelle (2D)

Les électrophorèses peuvent aussi être réalisées en conditions dénaturantes (détergents type SDS ou urée).

a. Electrophorèse sur 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.

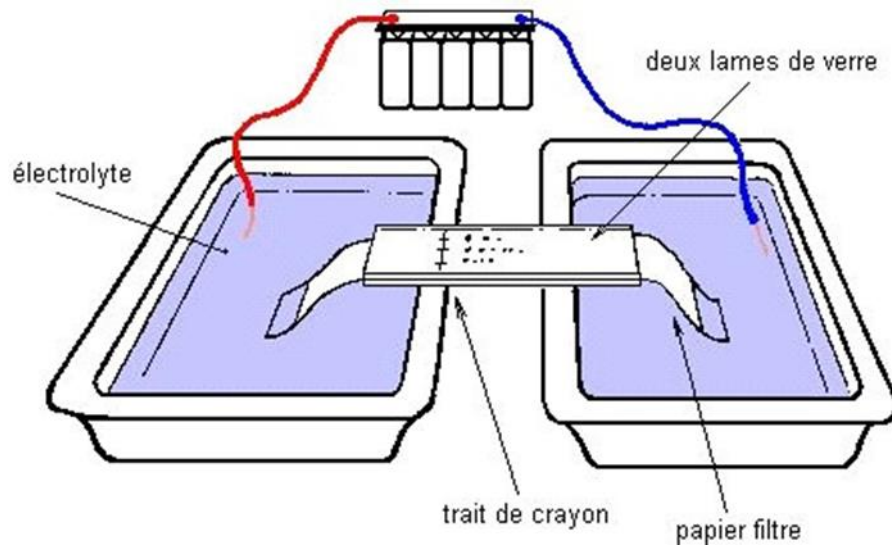


Figure 2. Appareillage pour l'électrophorèse sur papier.

b. Electrophorèse sur Acétate de cellulose

L'acétate de cellulose a été introduit 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.

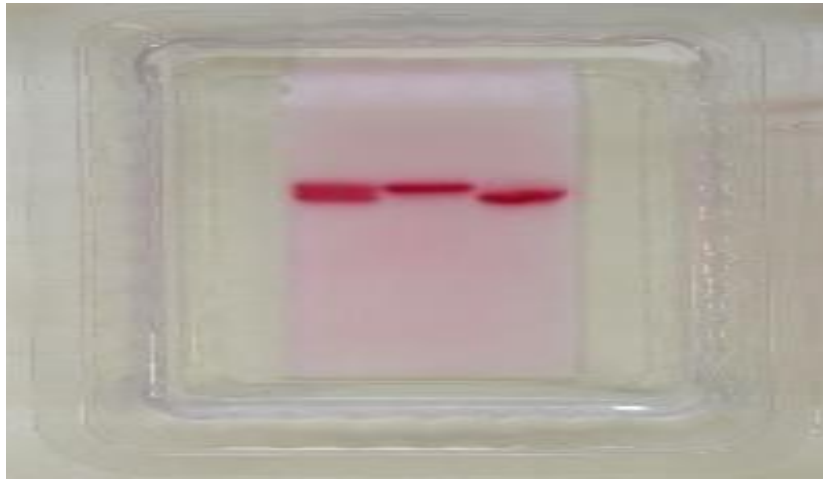


Figure 3. Appareillage pour l'électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose.

c. 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.

d. 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.

➤ Gel d'amidon

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétiques des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes.

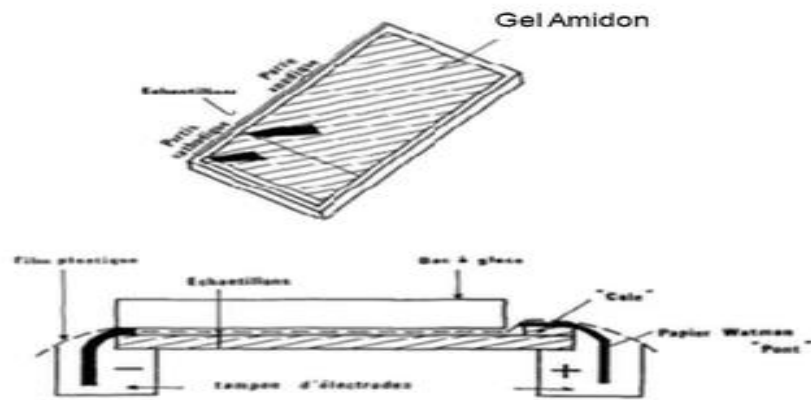


Figure 04. Appareillage pour l'électrophorèse sur gel d'amidon.

➤ Gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire :

- 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 préparatoires, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb. L'agarose est un polysaccharide hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside. D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.



Figure 05. Appareillage pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.

➤ **Gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide a remplacé le gel d'amidon dans la séparation des protéines, de petits fragments d'ARN et 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** : **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis) 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. 06).

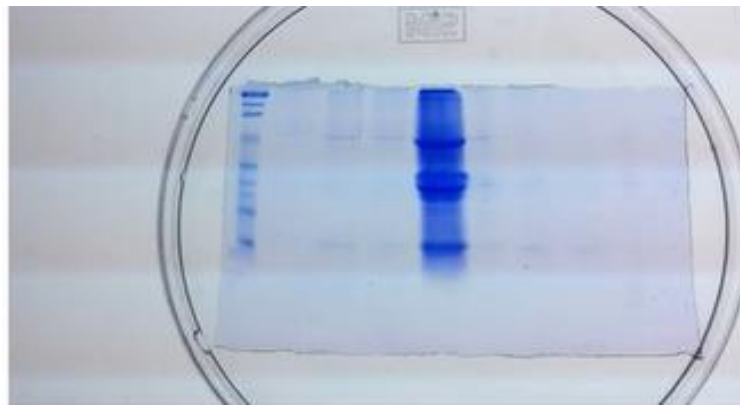


Figure 06. Appareillage pour l'électrophorèse sur gel de Polyacrylamide.

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 : $\text{Log}(\text{MM}) = f(R_f)$.

4. 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.**

4.1. 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 ait 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** : 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 running gel, pH = 8.8** (Fig. 07). Parmi les avantages de ce système, l'utilisation de volume relativement élevé des protéines diluées en gardant une résolution élevée.

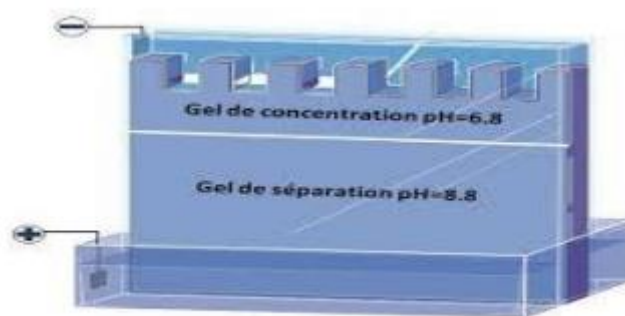


Figure 07. Exemple d'un gel en système discontinu.

4.2. Système dénaturant et non dénaturant

○ Electrophorèse en des conditions non dénaturantes (non dissociant)

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule, de sa taille et de sa structure tridimensionnelle.

- **Electrophorèse en des conditions dénaturantes (Dissociantes)**

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons :

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative. Les protéines transformées en **manopolyanions**, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de **leur masse moléculaire**. Le β -mercaptoéthanol et le dithiothréitol (DTT) sont utilisés pour réduire les ponts disulfure (S-S) inter-chaînes en groupements sulfhydryle (-SH).

5. Matériel électrophorétique

- **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. 08). 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-électrophorès.

- **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. 08). 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 sommeil du gel où 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 entrainant avec eux les espèces à séparer.

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.

Electrophorèse zonale

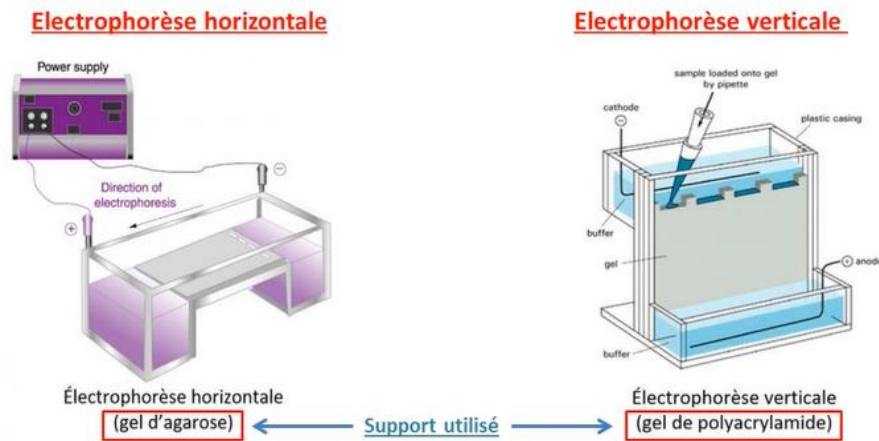


Figure 08. Montages horizontale et verticale d'électrophorèse.

- **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 (Papier ; acétate de cellulose et gel).

- **Tampon**
- **Solution d'échantillon**

L'échantillon doit contenir le glycérol ou le saccharose pour le rendre plus dense et donc rester au fond du puits. 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.

- **Courant appliqué**

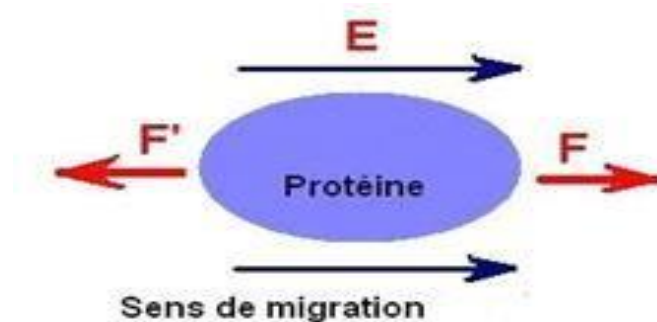
La vitesse de migration des molécules d'échantillon est en fonction de l'intensité du courant électrique appliqué, plus qu'elle est élevée, plus les molécules migrent vite. Toutefois, une haute tension augmente énormément la température ce qui peut fusionner le gel, et donc diminuer sa résolution. Une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

- **Visualisation ou Révélation**

Après l'électrophorèse, 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 ou le rouge ponceau. L'agent d'intercalation utilisé pour rendre les bandes d'ADN plus visibles sous UV est celui du bromure d'éthidium (BET).

6. Mobilité électrophorétique

Sous l'action d'un champ électrique, E , une protéine se déplace avec une vitesse (v) proportionnelle aux champs :



Avec : F : force d'entraînement, F' : force de frottement.

$V = \mu E$, avec μ appelée « **mobilité électrophorétique** » :

$$\mu = v/E$$

μ en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$, v en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ et E en $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

Le champ électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force d'entraînement, F , sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q ;

$$F = Q \cdot E$$

Les forces de frottement, F' , dues à la viscosité (η) vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner ;

$$f = 6 \Pi . \eta . r . v$$

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

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

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

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

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

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs : **q, (η) et r**. Elle est proportionnelle à sa charge (q), inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η) et son rayon (r). La mobilité est une caractéristique de chaque particule, il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.