

## Chapitre 8 : Electrophorèse

### 1. Définition

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. L'électrophorèse est – avec la chromatographie – la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais est principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou celle des acides nucléiques.

### 2. Principe

Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. 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.

Cation : chargé +. Attiré lors de l'électrolyse par la CATHODE (ou électrode négative).

Anion : chargé -. Attiré lors de l'électrolyse par l'ANODE (ou électrode positive).

Les molécules à séparer sont déposées sur un support 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.

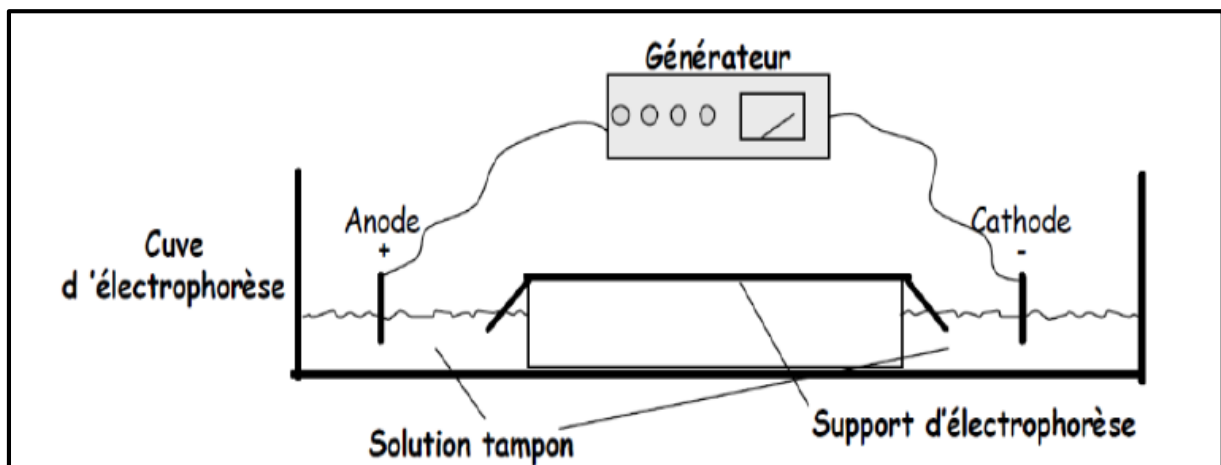


Figure 1 : Principe d'électrophorèse.

### 3. Types d'électrophorèses :

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

3-1 Electrophorèse en veine liquide (un support liquide) :

3-2 Electrophorèse de zone (sur support poreux) :

- Sur papier et sur acétate de cellulose (support solide),
- Sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide (support semi-solide),
- Electrophorèse isoélectrique (Electrofocalisation),

### 3-3 Electrophorèse capillaire,

#### 3.1. Electrophorèse en veine liquide (un support liquide) :

La migration dans ce type d'électrophorèse s'effectue au sein d'un liquide de composition déterminée soumis à un champ électrique de courant continu est réalisée dans un tube en U de section carrée (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...).

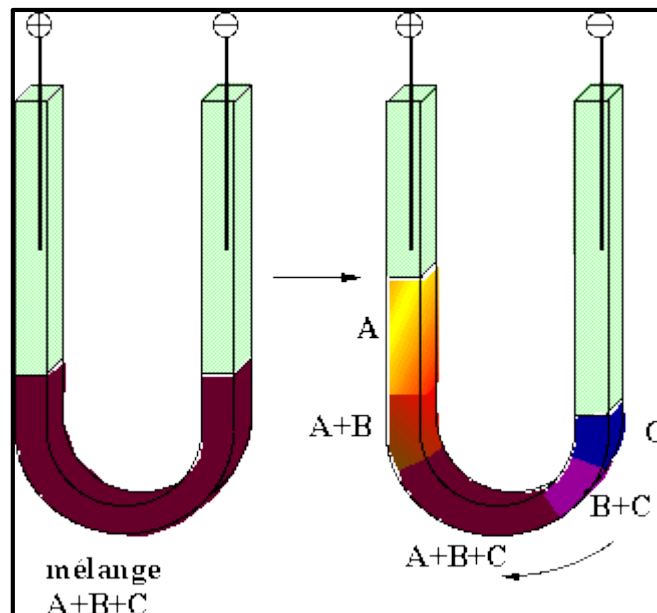


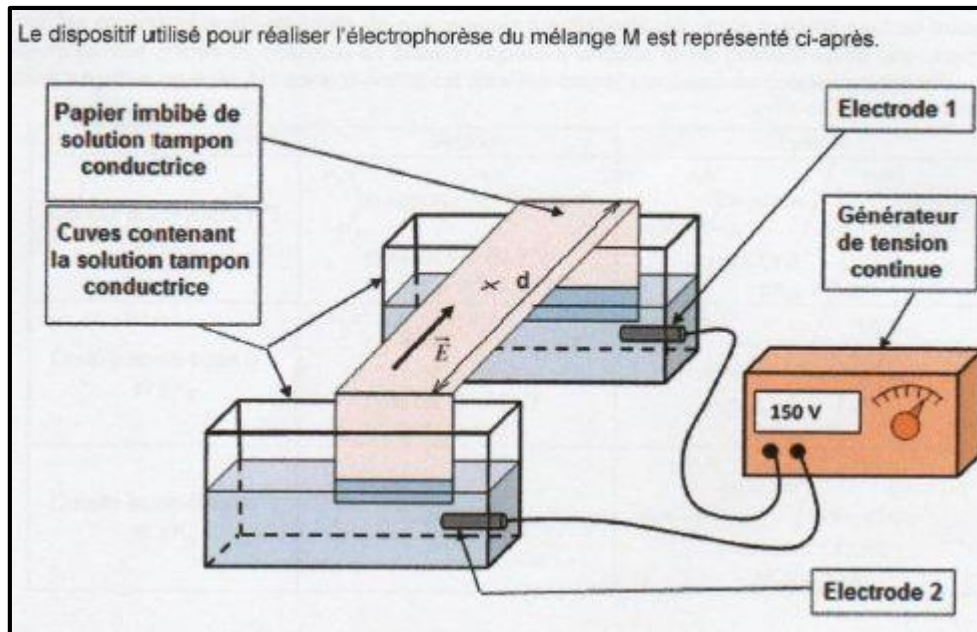
Figure 2 : Electrophorèse en veine liquide.

#### 3.2. Electrophorèse de zone (sur support poreux)

- **Electrophorèse sur papier et acétate de cellulose**

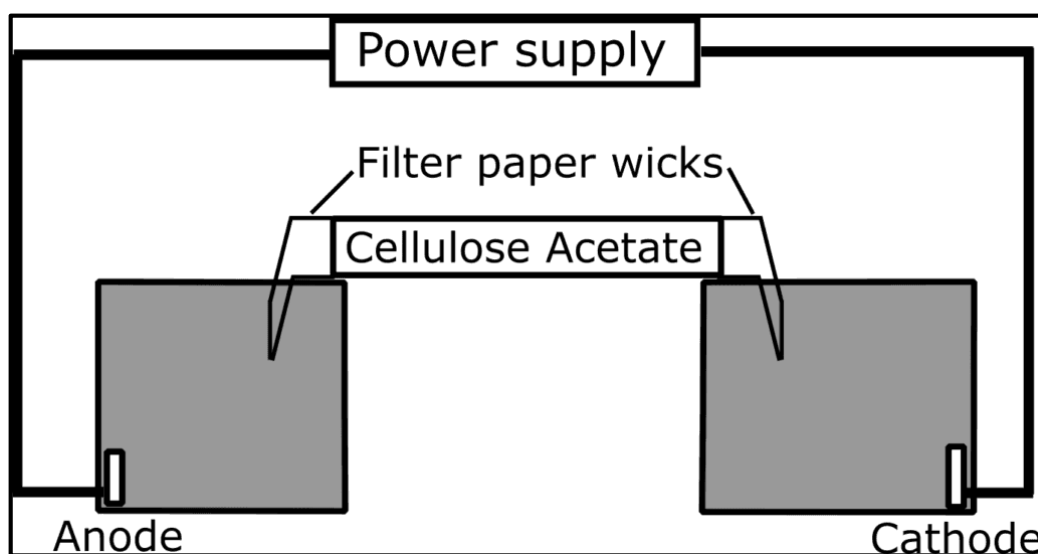
Migration des molécules principalement en fonction de la charge globale et en conditions non dénaturantes, Séparation des petites molécules (acides aminés ou petites peptides)

\*L'électrophorèse sur papier est assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable.



**Figure 3 :** Electrophorèse sur papier.

\***Electrophorèse sur acétate de cellulose**, se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.

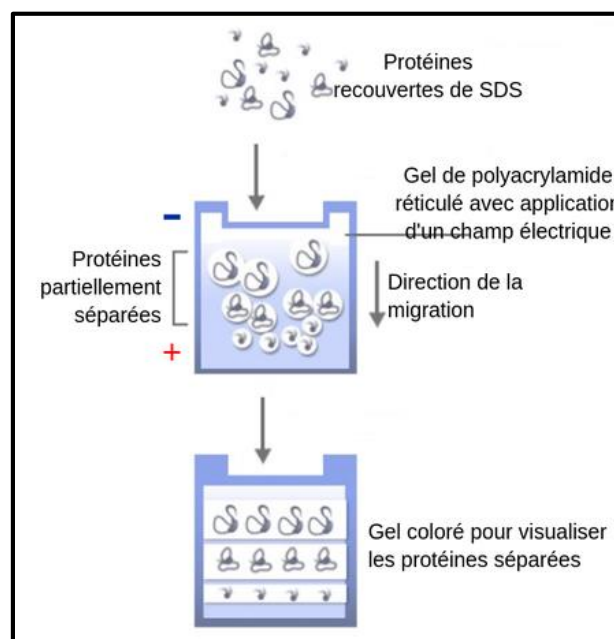


**Figure 4 :** Electrophorèse sur acétate de cellulose.

➤ **Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines ou pour les acides nucléiques de petite taille (le séquençage de l'ADN). La méthode PAGE est actuellement la méthode la plus utilisée en immunologie et en analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire. Celles-ci peuvent alors être transférées sur membrane de nitrocellulose pour être mises en contact avec des anticorps spécifiques. Cette technique s'appelle le Western blot.

Le polyacrylamide est un gel finement réticulé, que l'on fabrique au moment de l'emploi en mélangeant de l'acrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ), qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du bisacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) qui forme des ponts entre les chaînes; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bisacrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).



**Figure 5 :** Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

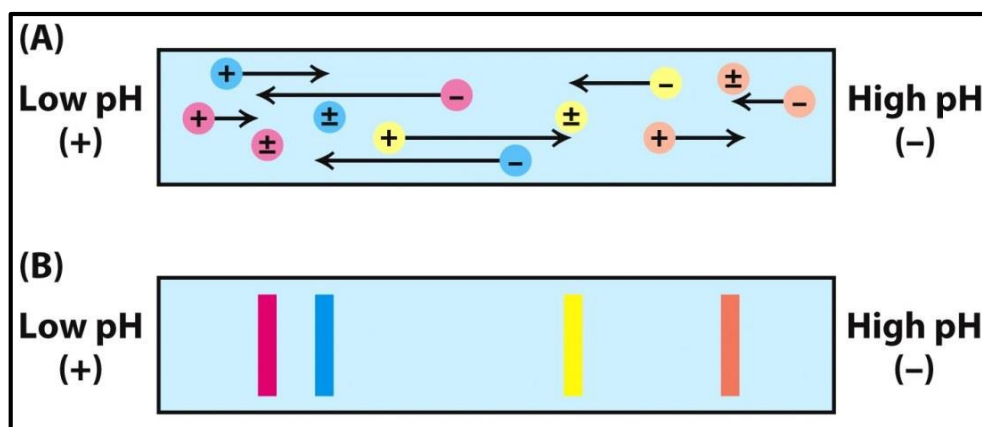
➤ **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS SDS- PAGE = sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis**

Cette méthode de séparation, par rapport à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide classique, est une méthode dénaturante en raison de l'ajout de laurylsulfate de sodium (ou SDS) Dans ce

gel dénaturant, on retrouve ce SDS qui se lie aux protéines selon un ratio approximativement constant (~1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Le SDS est un détergent fort possédant une longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et lui confère une charge nette négative. La structure native de la protéine est donc dénaturée, et une charge apparente négative est alors conférée à la protéine. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Ceci permet sa migration dans la matrice à l'aide d'un courant électrique et la séparation des protéines s'effectue uniquement en fonction de leurs poids moléculaires (les protéines ayant un poids moléculaire plus faible migreront plus rapidement). Lorsque les protéines ont été séparées, leur visualisation peut être effectuée en les colorants directement : bleu de Coomassie, méthodes aux sels de cuivre, au nitrate d'argent ...Après transfert (technique dite western blot) sur une membrane, on révèle sélectivement certains polypeptides en utilisant des anticorps marqués grâce à la SDS-PAGE, il est possible de déterminer assez finement la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique. Une protéine sera caractérisée par une masse moléculaire donnée.

➤ **Electrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)**

La focalisation isoélectrique est une méthode permettant de séparer des protéines qui ne diffèrent que par une seule charge. Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique.



**Figure 6 :** Electrofocalisation.

➤ **Electrophorèse bidimensionnelle**

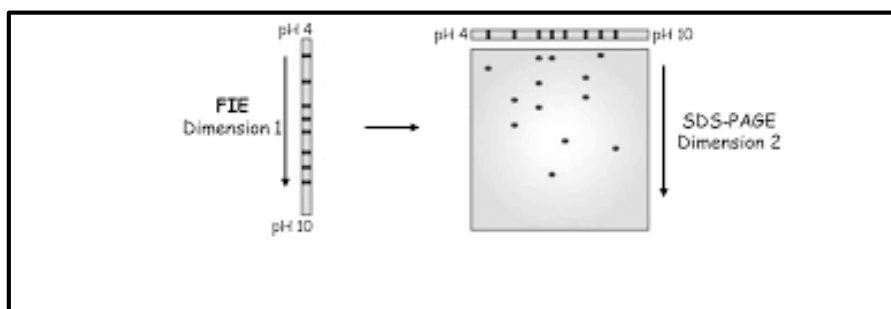
Lorsqu'il est existé des bandes protéiques très proches, on a un chevauchement. Par les méthodes unidimensionnelles la résolution est bon pour moins de 50 protéines. Grâce à

l'électrophorèse bidimensionnelle, on combine deux modes de séparation différents. La résolution peut être appliquée pour plus de 1000 protéines différentes.

**\*Dimension 1** : Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation Isoélectrique (FIE). La migration est effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large ex : 3-9, ou plus ou moins étroite ex : 4-5 ou 5-6.5) On réalise une électrophorèse dans un tube étroit de gel polyacrylamide où un gradient de pH est établi. On soumet alors à un fort courant électrique.

**\*Dimension 2**

Séparation en fonction de la taille des protéines : SDS-PAGE Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction perpendiculaire



**Figure 6** : Electrophorèse bidimensionnelle.

➤ **Electrophorèse en gel d'agarose**

Comme l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, l'électrophorèse en gel d'agarose est une technique où sont couplés une électrophorèse et un tamisage moléculaire.

Elle peut être utilisée pour séparer des protéines ou des acides nucléiques, mais compte tenu de la grande taille des mailles du réseau, cette technique est essentiellement réservée à la séparation des acides nucléiques, elle permet le fractionnement d'ADN de 100pb (paire de bases) à plusieurs millions de pb (arrive à 50000Kd).