

Techniques de séparation

« Électrophorèses »

Plan du cours

1. Introduction
2. Principe d'électrophorèse
3. Les supports d'électrophorèse
4. Différents types d'électrophorèse sur gel

1. Introduction

L'électrophorèse : méthode de séparation des molécules chargées électriquement.

séparation → caractérisation
ou → purification de molécules d'intérêts

Le préfixe « *électro* » → électricité
la racine « *phorèse* » du grec *phoros* → porter d'un côté à l'autre

Applications principales : en biochimie et biologie moléculaire
séparation des protéines et des acides nucléiques

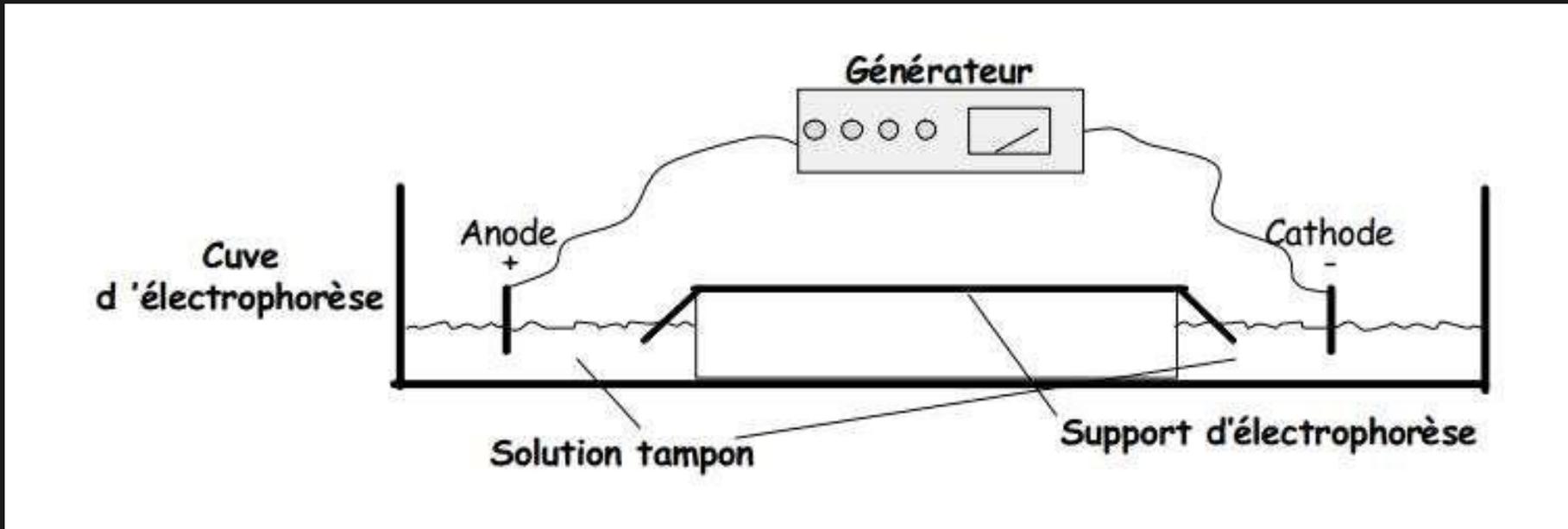
Principe d'électrophorèse

électrophorèse = migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

Les molécules anioniques (-) → migrent vers l'anode (+)

Les molécules cationiques (+) → se déplacent vers la cathode (-)

Principe d'électrophorèse



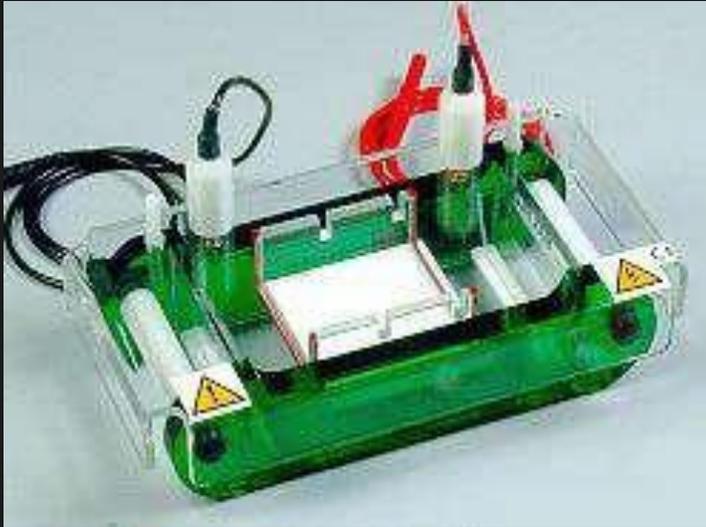
- Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.
- Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.

Paramètres qui influencent sur l'électrophorèse

- **Nature des molécules** (charge, taille, forme)
- **Champ électrique**
- **Tampon**
- **Support**

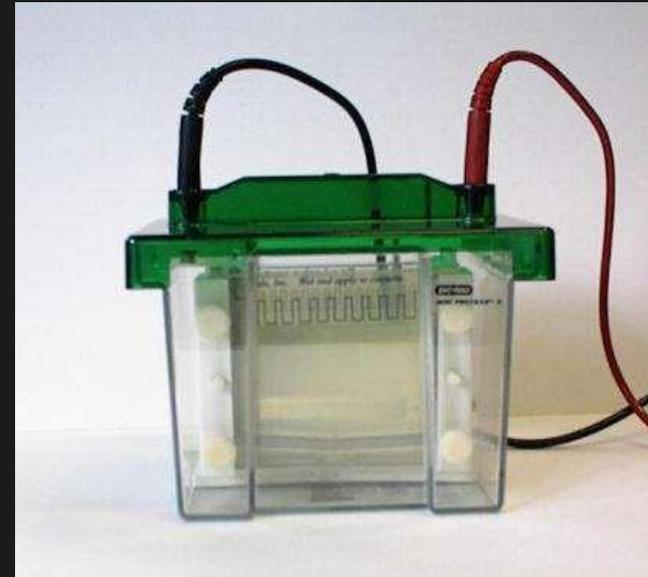
Matériels

Montage horizontal



- utilisé pour les gels de polyacrylamide

Montage vertical



- support de migration (papier, acétate de cellulose, gel d'agarose)

Les supports électrophorèses

Liquide : Electrophorèse en veine liquide

→ la séparation n'est pas totale (elle n'est plus utilisée)

Support poreux : Electrophorèse de zone

→ séparation en zones distinctes (bandes) des molécules chargées

→ Différents supports d'électrophorèse de zones

- papier

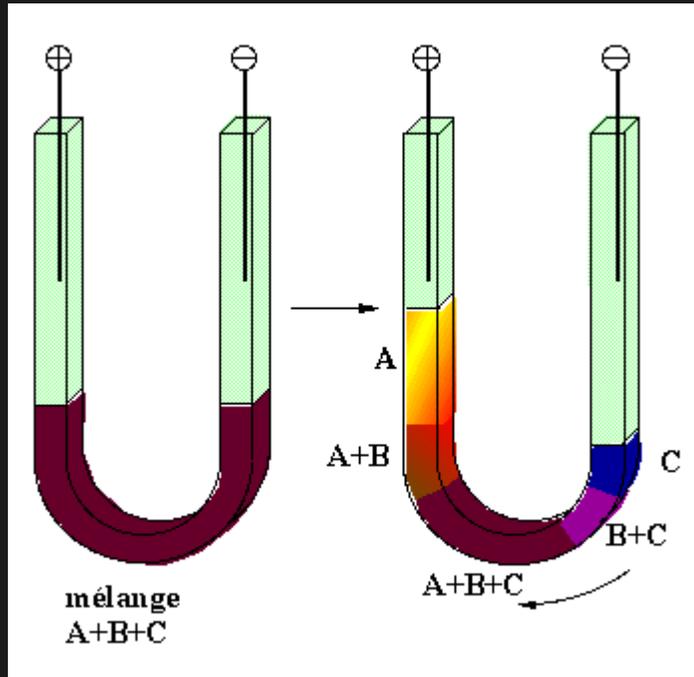
- acétate de cellulose

- **semi-solide (gels)** → meilleur séparation

Electrophorèse en veine liquide...*première électrophorèse*



- Mise au point par *Arne Wilhelm Kaurin Tiselius* en **1937**



**Electrophorèse sur supports liquide
(*électrophorèse en veine liquide*)**

- il a séparé les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique.
- La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube.

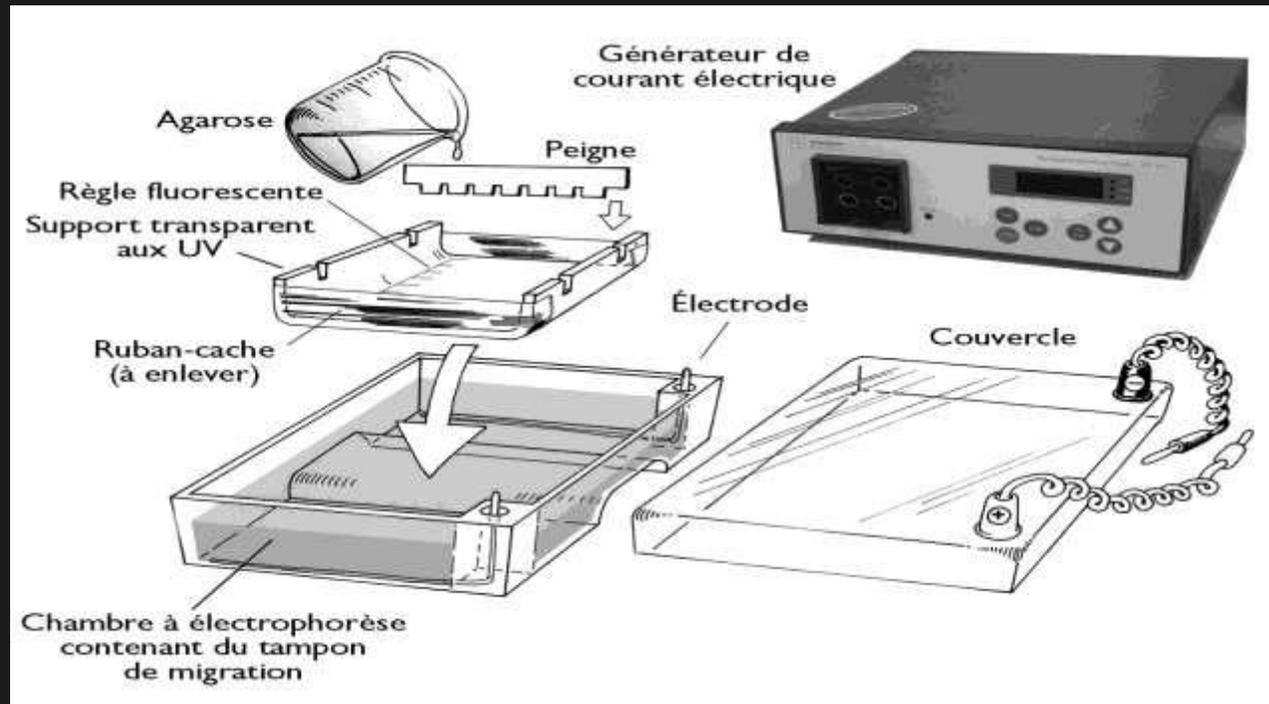
Différents types d'électrophorèse sur gel

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

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

Électrophorèse sur gel d'agarose

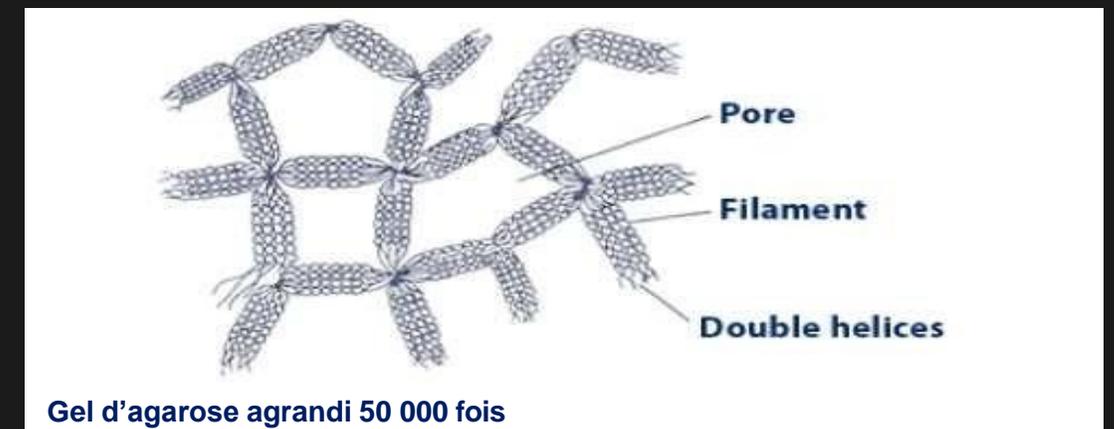
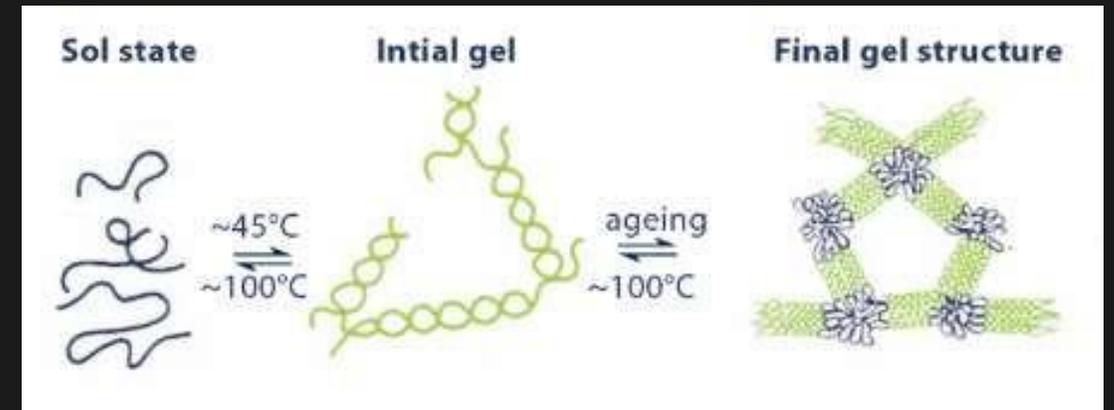
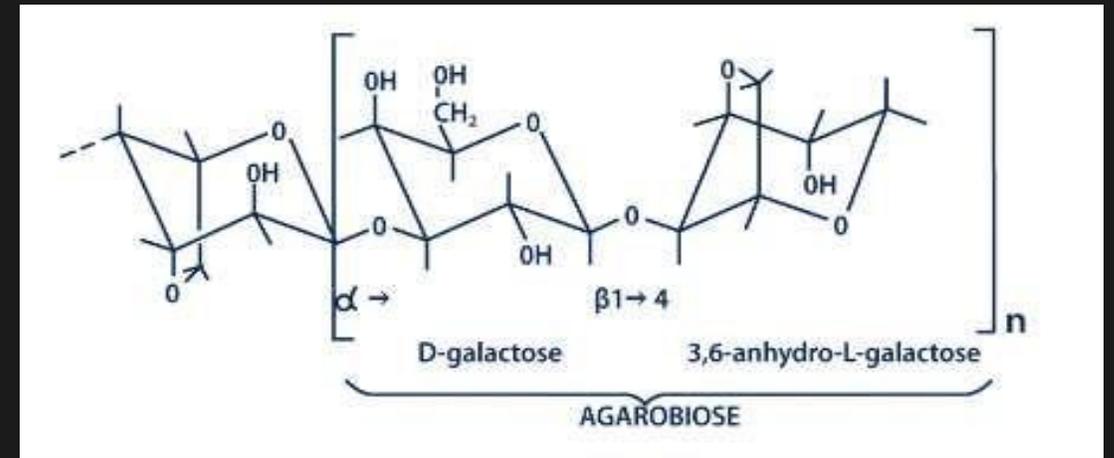
- Utilisée principalement pour la séparation des acides nucléiques (ADN et ARN)
- Fragments à séparés de taille entre 0,2 et 50 kb.
- Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse



Conjugué mobilité électrophorétique
+
effet filtration du gel
(taille des pores limite vitesse de migration)

L'agarose

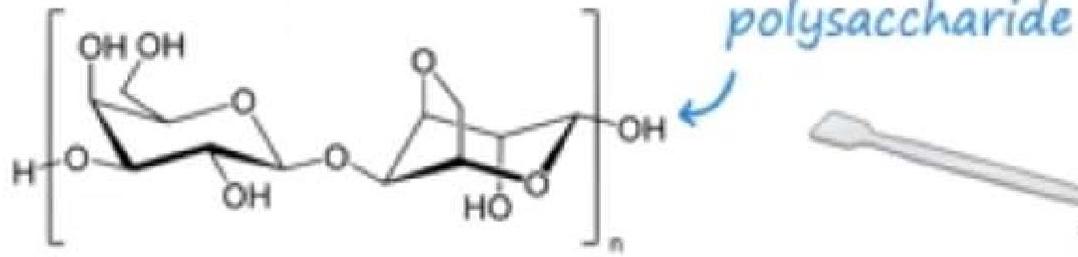
- une chaîne carbohydratée polymérique linéaire
- l'unité de base est le disaccharide agarobiose
- extraite des algues rouges tels que *Gelidium* et *Gracilaria*
- L'agarose fond à environ 100°C et solidifie à environ 45°C
- Après refroidissement, le polymère s'agrège en une structure de fibre en double hélice.



Préparation de gel d'agarose

1

Peser l'agarose en poudre



Dissoudre l'agarose dans le **tampon de migration**

2

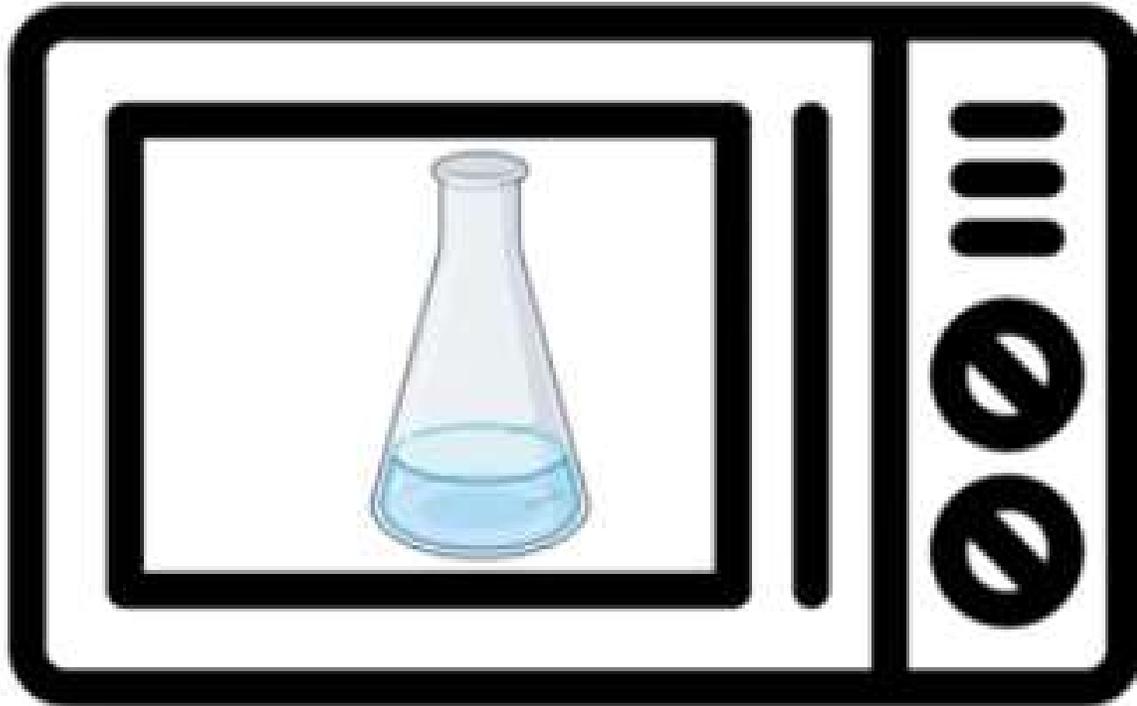
Quel pourcentage d'agarose choisir ?

% d'agarose	Éventail de tailles d'ADN (bp)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

TBE = Tris Borate EDTA
TAE = Tris Acétate EDTA

3

Porter la solution à ébullition
pour bien dissoudre l'agarose



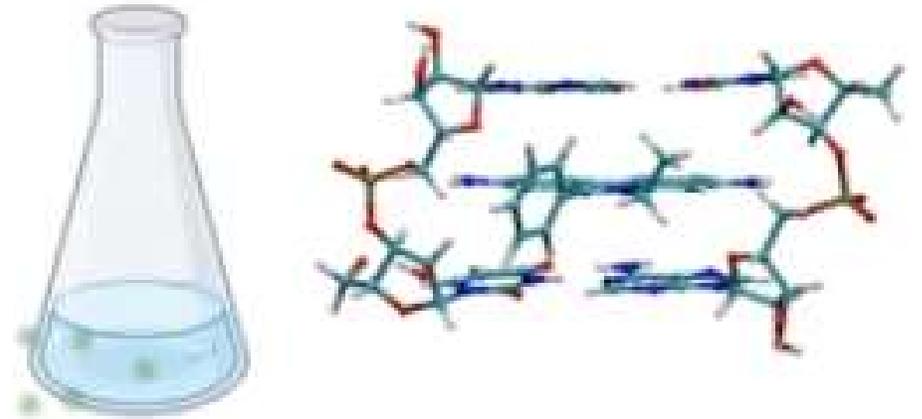
Refroidir
à 60°C



4

Rajouter quelques microlitres
d'**agent intercalant**

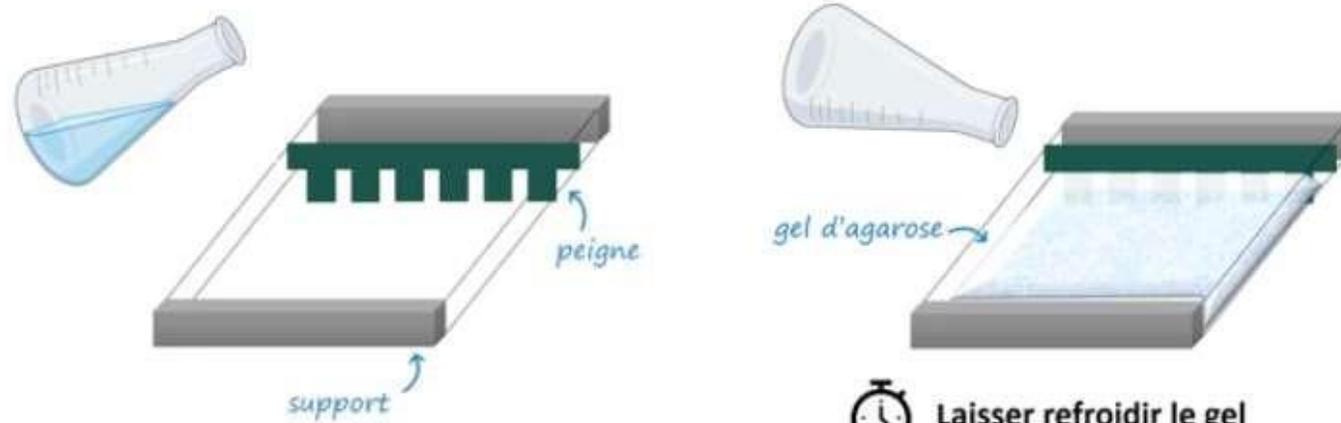
Bromure d'éthidium (BET)
SYBR Green
Midori Green



Agent intercalant se lie à l'ADN et
le rend fluorescent sous UV

5

Verser la solution d'agarose dans un plateau de support



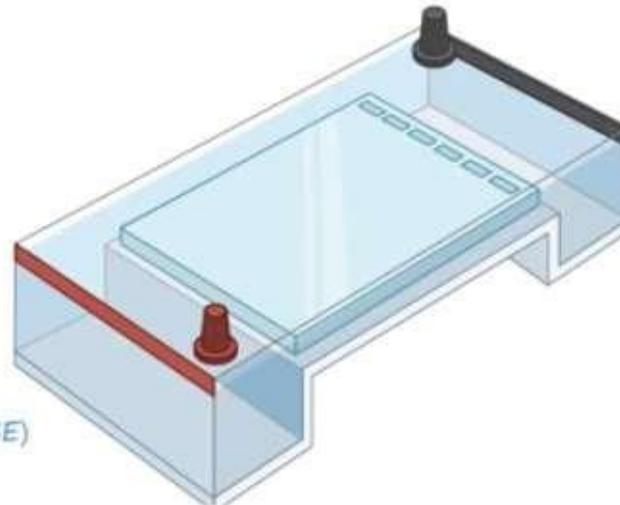
Laisser refroidir le gel

6

Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse et submerger de tampon de migration



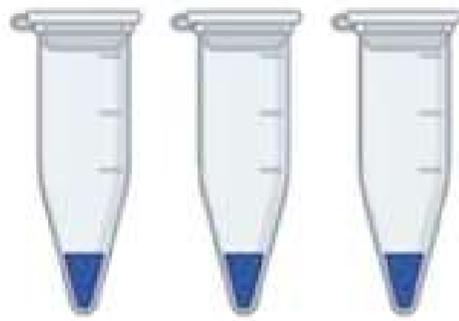
Tampon de migration (TAE ou TBE)



Préparation des échantillons

1

Échantillons d'ADN à analyser



✓ Ajout du tampon de charge contenant :

Bleu de bromophénol

Xylène cyanol



Suivi de l'avancée des échantillons dans le gel

Glycérol

Augmentation de la viscosité



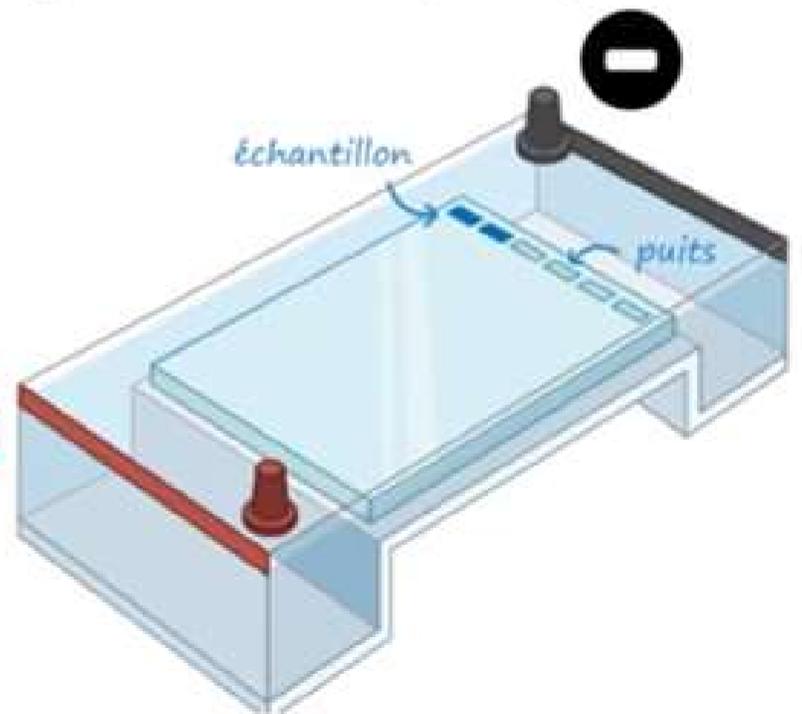
2

Prélèvement de l'échantillon

3

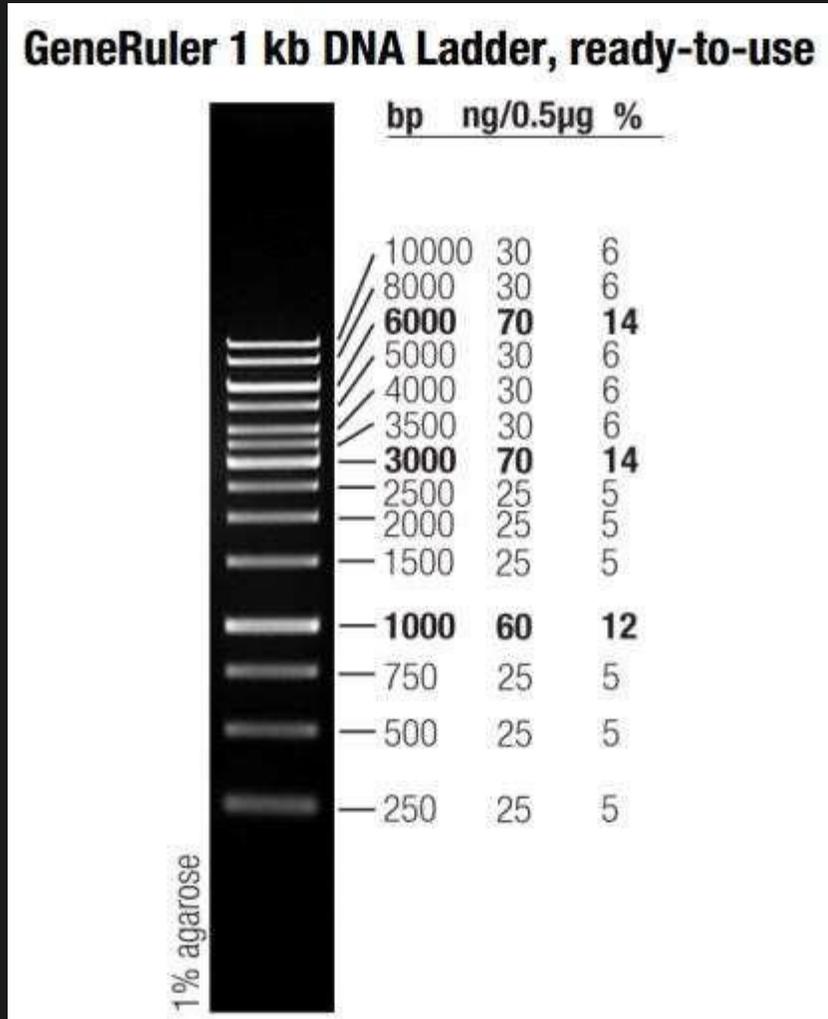
Dépôt de l'échantillon dans les puits

+ le *marqueur de taille* dans le premier puits.



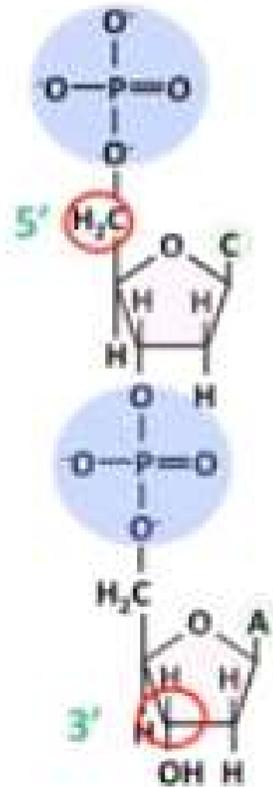
Un marqueur de taille ADN

- C'est un mélange de molécules d'ADN linéaires, de tailles connues et variées qui sont bien séparables sur un gel d'agarose par électrophorèse.
- Il sert de référence pour estimer la taille (inconnue) des molécules d'intérêt.

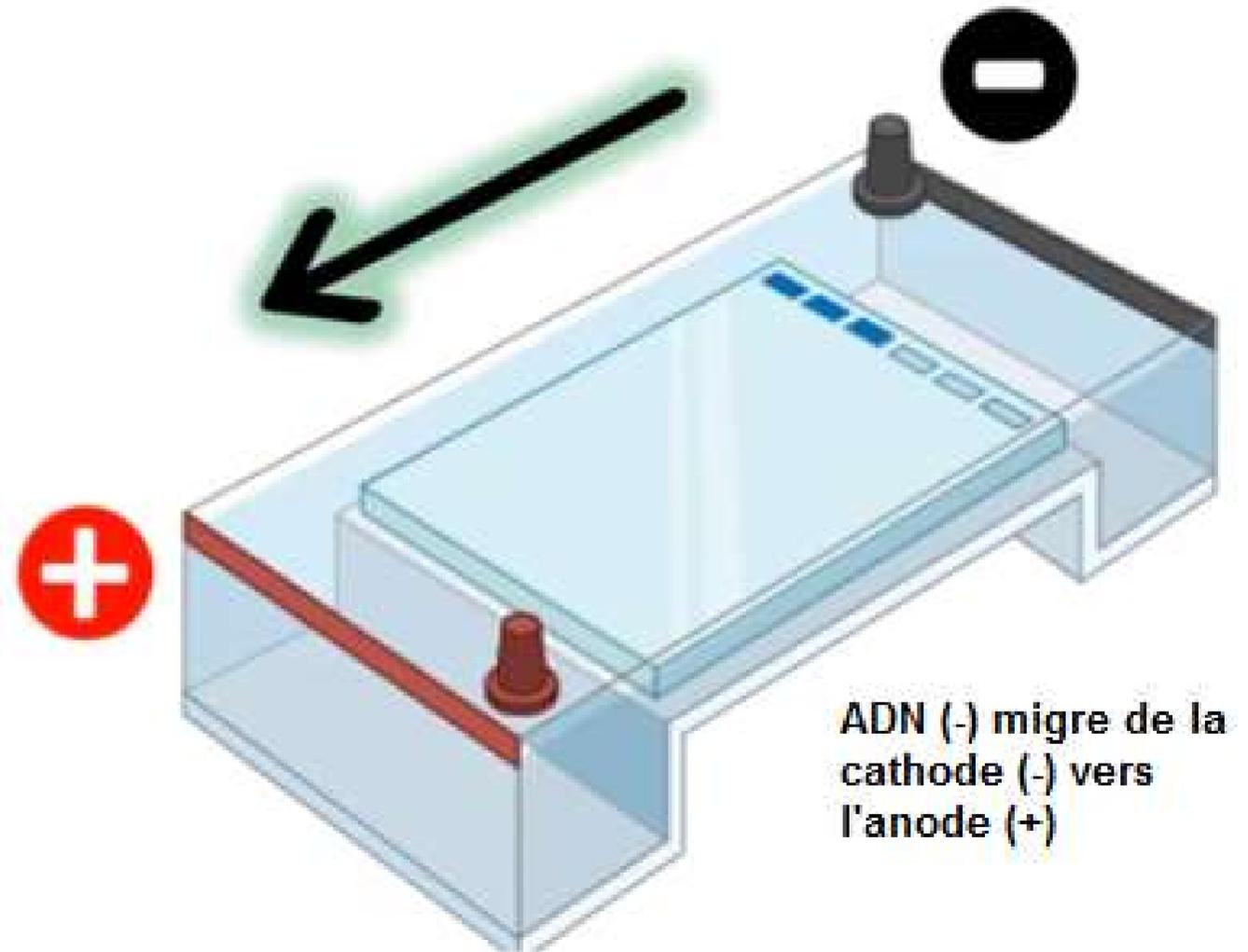


Migration électrophorétique

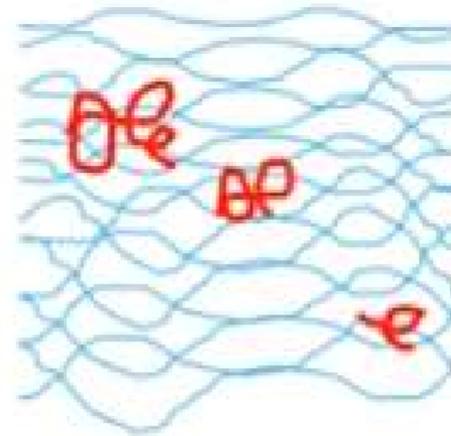
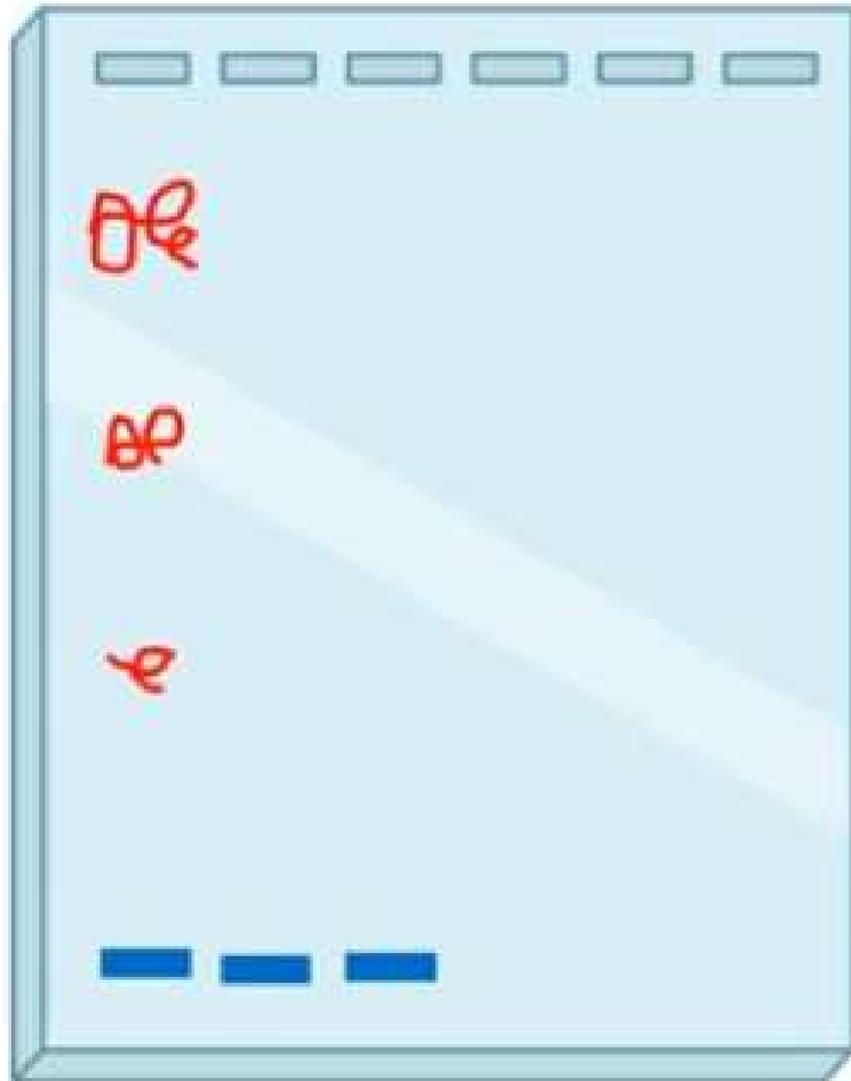
Les acides nucléiques sont chargés négativement.
Ces charges négatives sont portées par les groupements **phosphates**.



On applique 5 à 10 V par cm de gel
Typiquement 100 V



Séparation des molécules D'ADN se fait donc selon leur taille



les **petites** molécules
migrent plus vites que
les **grosses**

La **résolution** du gel dépend
du pourcentage en agarose.

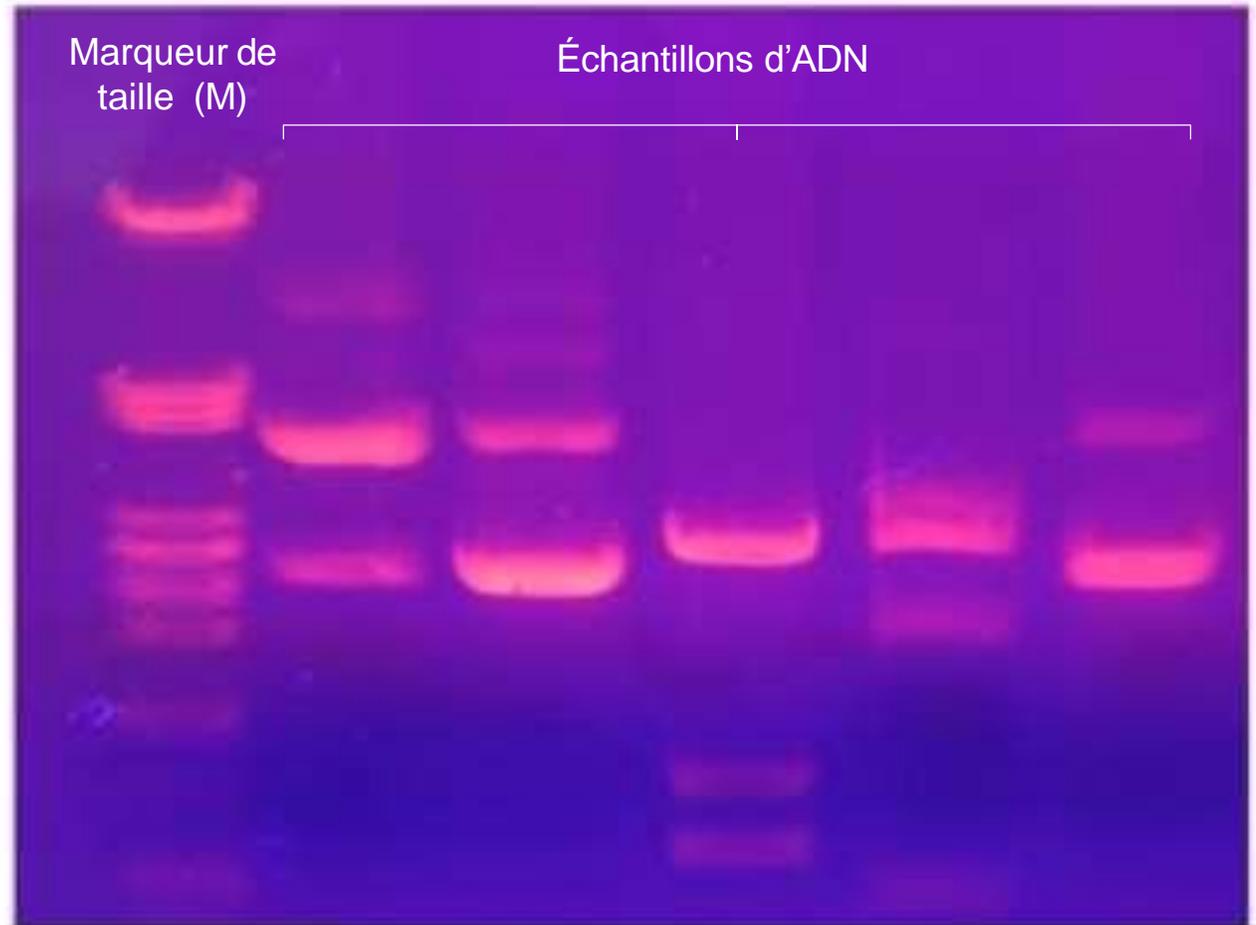
Séparation des molécules de grande taille
→ Faible pourcentage en agarose

Séparation des molécules de petite taille
→ Augmentation du pourcentage en agarose

Visualisation et analyse

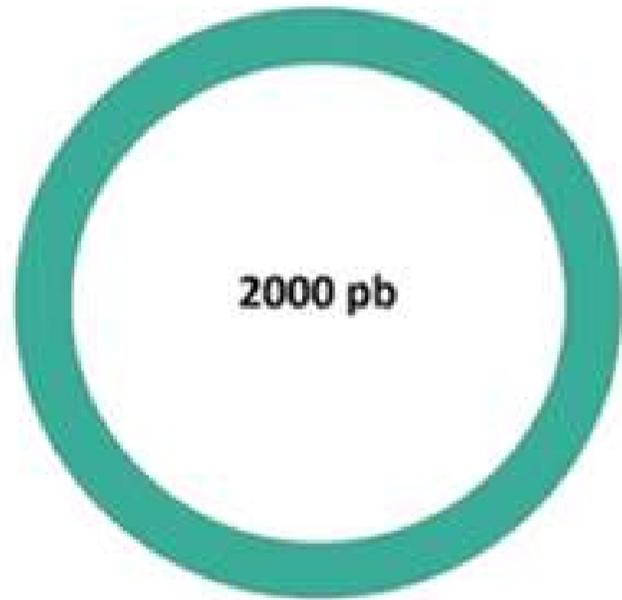
La visualisation des bandes correspondant aux fragments d'ADN se fait soit sous **lumière UV** soit par **émission de fluorescence** (selon l'agent intercalant utilisé)

L'intensité des bandes est proportionnelle à la **quantité d'ADN** présent dans l'échantillon.

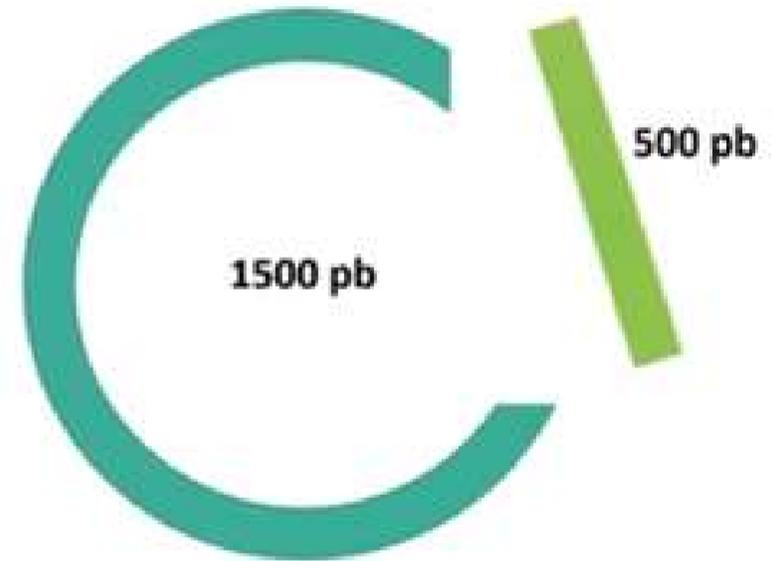
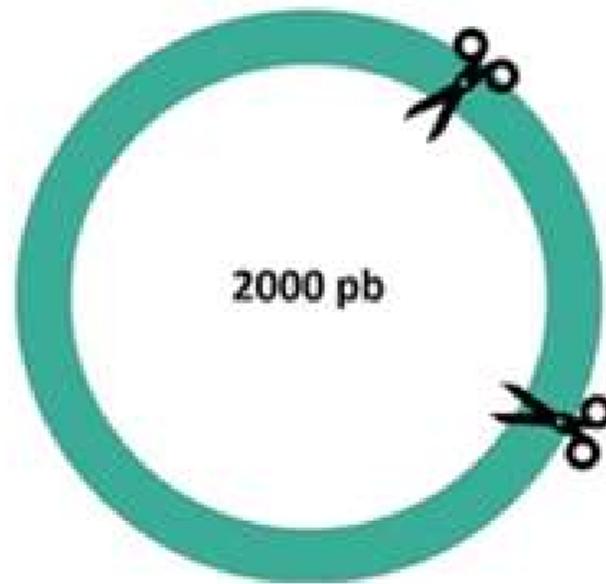


Par Mnolf — Photo taken in Innsbruck, Austria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1131449>

Comment interpréter les résultats d'un gel d'agarose ?

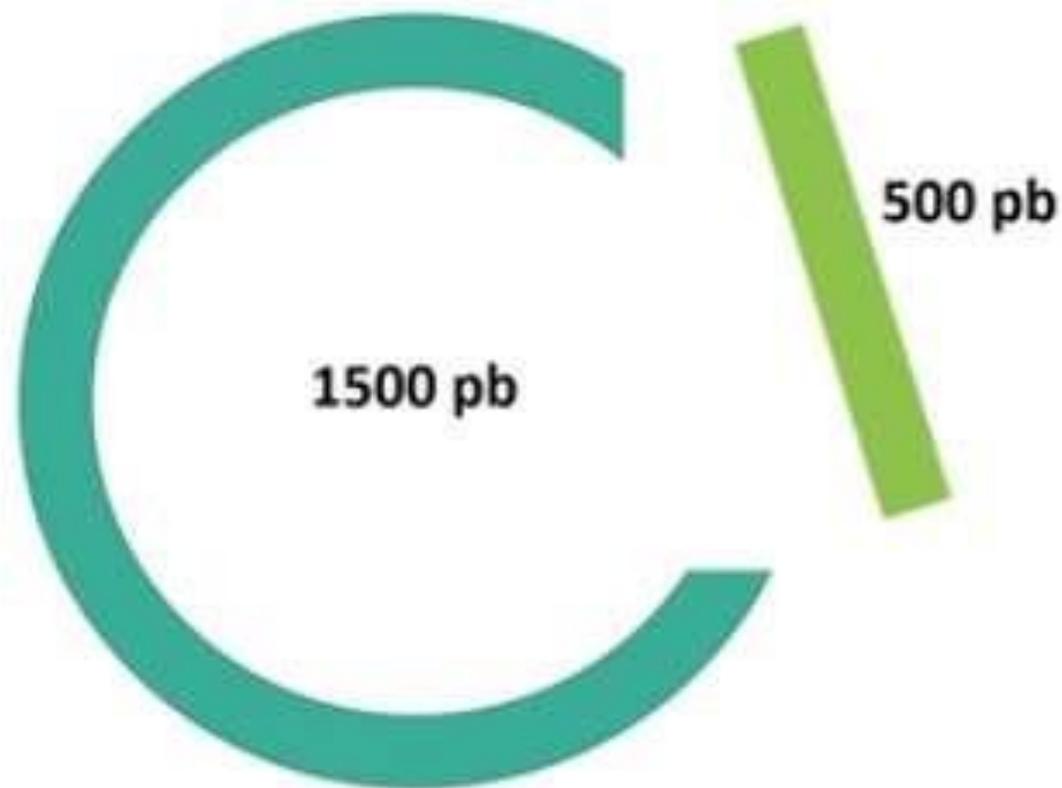


ADN circulaire plasmidique



Digestion par des enzymes de restriction

Comment interpréter les résultats d'un gel d'agarose ?



- 1** : ADN circulaire non digéré
- 2** : ADN digéré – on s'attend à avoir deux fragments

