

II.1. Généralité

II.1.1. Définition

Les macromolécules soumises à un champ électrique, migrent dans le sens du champ (ou dans le sens opposé) si elles sont chargées positivement (ou négativement).

L'électrophorèse est une méthode d'analyse (identification et dosage) et de fractionnement de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique.

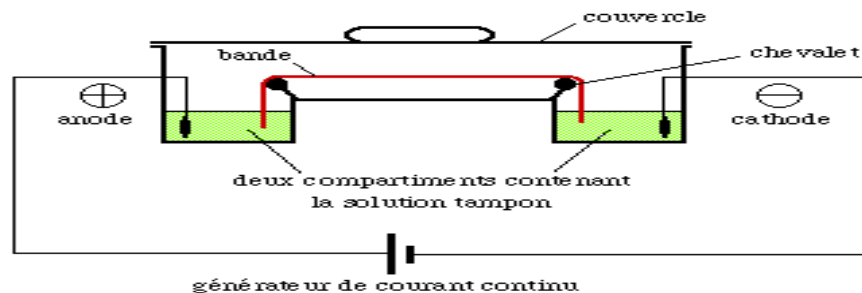
Il y a une électrophorèse libre et une électrophorèse de zone

- a) **L'électrophorèse libre** (technique d'analyse) : **En veine liquide** selon **Tiselius** (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée : 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 pour la séparation des très grosses particules (cellules, organites) ; presque plus utilisée.
- b) **L'électrophorèse sur support** (papier, gel) : Elle permet de stabiliser la phase liquide grâce à l'utilisation d'un support poreux imprégné d'un solvant tamponné. technique dans laquelle l'échantillon est contraint à se déplacer dans une phase solide, comme le papier filtre, la cellulose, ou d'un gel.

Par cette technique :

- 1) on élimine largement l'agitation provoquée par la convection.
- 2) en plus, cette technique requiert une quantité faible de matériel.

II.1.2. Appareillage : Le support doit être homogène, poreux et inerte.



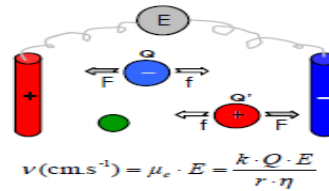
- On peut utiliser du **papier**, de l'acétate de cellulose, du **gel de polyacrylamide**, du **gel d'agarose**, du **gel d'amidon**, du **gel de silice**, ...
- On peut procéder sur bande (**papier, acétate de cellulose**), sur lame ou en tube (gels).

- 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).

II.1.3. Principes de la migration électrophorétique en milieu liquide



La migration dépend de plusieurs facteurs :

1. De la mobilité électrophorétique μ égale à la vitesse par unité de champ, qui est fonction de la **charge** et de la **géométrie** de la particule. Une particule de **charge électrique Q** , placée dans un champ électrique **E** , est soumise à une force **F (électrique)** qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé :

$$u = \frac{\vec{v}}{E} = \frac{q}{f} \quad \boxed{F = Q \cdot E}$$

v en ms^{-1} , E en $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$

μ est positif pour un cation, négatif dans le cas contraire s'exprime en $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.

2. Des forces de frottement f , dues à la viscosité du milieu, s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant plus que la particule est grosse (r = rayon de la sphère) et que la vitesse de migration (v) est grande :

$$\boxed{f = 6 \Pi \cdot \eta \cdot r \cdot v}$$

Loi de Stokes

η : coefficient de viscosité du milieu

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent ($F=f$), et la particule se déplace alors à **vitesse constante** ; on peut alors écrire :

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

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

$$\boxed{\mu = v/E \text{ (= vitesse de migration pour un champ électrique de 1 Volt/cm)}} \\ \text{soit encore: } \mu = Q / 6 \Pi \cdot \eta \cdot r$$

La vitesse de migration de la particule chargée : $\vec{v} = \frac{q}{f} \cdot \vec{E}$ dépend de la valeur de la charge Q donc du pH de la solution aqueuse.

La mobilité d'une particule migrant en milieu liquide sous l'influence d'un champ électrique uniforme dépend de trois facteurs :

- Elle est proportionnelle à **sa charge**, ce qui implique qu'une électrophorèse doit être pratiquée à pH constant, puisque pour les ampholytes, la charge dépend du pH ;
- elle est inversement proportionnelle à son rayon, quand on peut l'assimiler à une sphère, sinon on dit qu'elle dépend de sa taille et de sa forme ;
- elle est **inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du tampon**, lequel augmente avec la concentration et diminue quand la température augmente.

La mobilité est une caractéristique de chaque particule ; il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

La charge **Q** est fonction du **pH** isoélectrique de la particule et du pH du solvant.

La différence **pH - pHi** détermine le signe de la charge **Q** d'une particule :

- si **pH > pHi** charge négativement (-) (anion) migration vers l'anode (c'est le cas des protéines dans l'organisme ;
- si **pH < pHi** charge positivement (+) (cation) → migre vers la cathode ;
- si **pH = pHi** charge nette nulle (des ampholytes électriquement neutres) pas de migration.

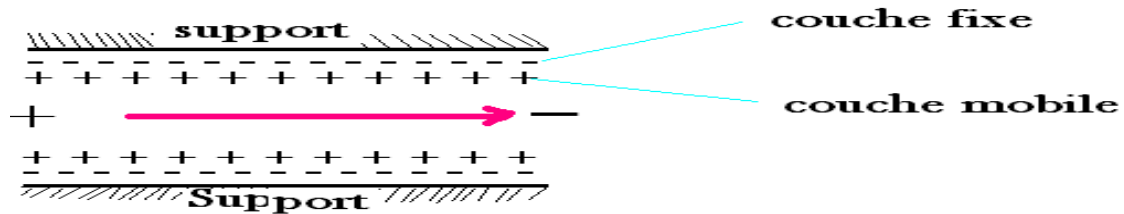
La différence pH - pHi détermine l'intensité de la charge Q d'une particule : plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante.

$$\text{La mobilité électrophorétique} = \frac{\text{pH} - \text{pHi}}{\text{PM}}$$

3. du champ électrique E : $E = v / \mu$

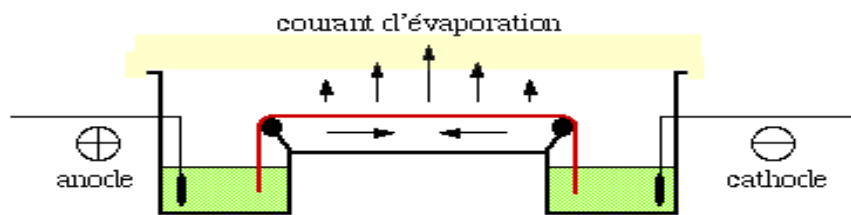
4. des courants liquidiens :

a) **Le courant d'électro-endosmose** : résulte de la présence de charges négatives portées par la matrice du support. Ces charges attirent des petits ions de signe contraire, en solution dans la phase liquide dispersante qui l'environne. La couche mobile de charges positives migre dans la direction du champ entraînant globalement la phase liquide vers la cathode.



Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode. Il peut dans certains cas être plus puissant que les forces électriques, ce qui fait que des protéines chargées négativement peuvent globalement migrer vers la cathode.

b) Le courant d'évaporation (ou de rhéophorèse) : le passage du courant s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau au niveau de la surface d'une bande ou d'une lame d'électrophorèse de la phase liquide ; cet effet est maximal au milieu de la bande. Comme les extrémités plongent dans le tampon il s'établit depuis chacune d'elles un courant de liquide qui tend à compenser cette évaporation. Les effets du courant d'évaporation sont évités en plaçant un couvercle sur la cuve, on utilise aussi des cuves réfrigérées.



c) de la durée de migration, influant sur la distance de migration.

$$d = v \cdot t$$

(d = distance, v = vitesse, t = temps de passage du courant).

d) de facteurs liés à la nature du support : adsorption, texture et la réticulation du support ...

II.1.4. Applications

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés, acides nucléiques et nucléotides.

II.2. Électrophorèse des protéines sériques sur bandes d'acétate de cellulose

II.2.1. Principe

Le but de l'analyse est de séparer les protéines du sérum, d'identifier les fractions protéiques et de déterminer le pourcentage relatif chacune d'elles.

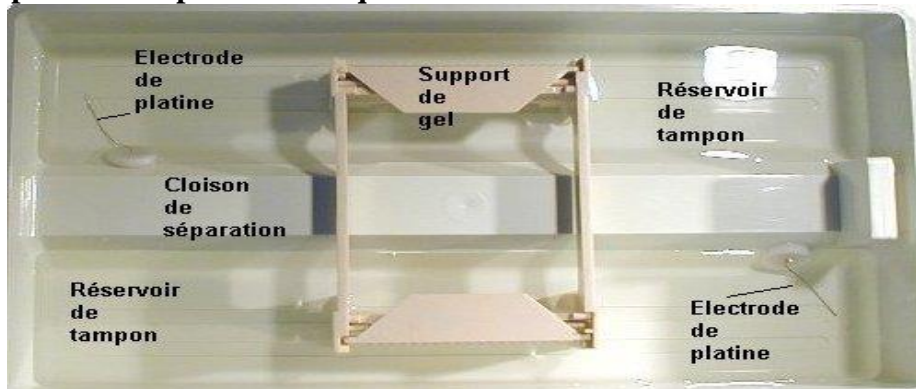
La migration se fait au sein d'une phase liquide imprégnant un solide poreux ou un gel. Elle aboutit à la séparation, plus ou moins parfaite des fractions protéiques sous forme de zones distinctes.

Le support doit être homogène, poreux, physiquement et chimiquement inactif. Le plus utilisé est l'acétate de cellulose. Sous l'influence d'un champ électrique, les différentes fractions protéiques de l'échantillon migrent à des vitesses différentes.

- La **révélation** des fractions peut être **globale** (rouge Ponceau, Amido-schwartz, vert de lissamine, bleu de Coomassie) ou **spécifique** (révélation des lipoprotéines avec un colorant des lipides, révélation d'une activité enzymatique...).
- La **lecture** peut se faire **à l'œil nu** (analyse qualitative) ou par **densitométrie** (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas, l'**intégration** des pics permet une analyse quantitative des fractions ; ou encore le dosage peut être effectué après **élution** des fractions.

II.2.2. Protocole

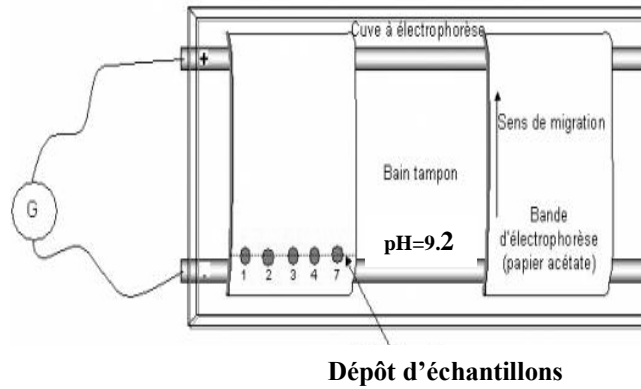
➤ Cuve pour électrophorèse clinique



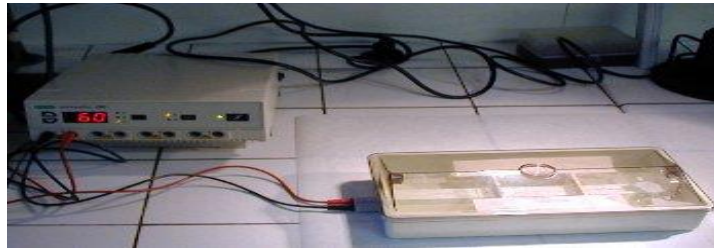
II.2.2.1. Préparation du gel et dépôt des échantillons

- **Gel d'agarose prêt à l'emploi** : Les gels supportés prêts à l'emploi sont constitués d'une mince couche d'agarose coulée sur un support plastique de 100mm x 75mm permettant leur manipulation aisée.
- **Essorage de la zone de dépôt** : Une fois le gel sorti de son emballage, la zone de dépôt est essorée avec une bande de papier filtre pour faciliter la diffusion des échantillons lors du dépôt.
- **Mise en place du masque de dépôt** : La bande est ensuite retirée et jetée et on dispose à la même place un masque de dépôt formé d'une bande de plastique comportant 10 fentes.
- **Dépôt des échantillons** : Un volume de 5µL des échantillons à analyser est déposé sur les fentes et abandonné pendant 5 minutes pour assurer leur diffusion au niveau de la zone de dépôt.
- **Essorage du liquide en excès** : Le liquide non absorbé par le gel est ensuite essoré avec une autre bande de papier filtre et le masque de dépôt est jeté.

- **Gel en place dans la cuve** : Le gel est alors mis en place dans la cuve et le contact électrique entre le tampon placé dans les deux réservoirs et le gel est assuré par des bandes de papier filtre trempées dans le tampon.



- **Ensemble du dispositif d'électrophorèse** Après fermeture du couvercle et mise en marche de l'alimentation, la migration des protéines démarre. La tension appliquée au gel et le temps de migration dépendent de la nature des échantillons à analyser.



- **Fixation et coloration** : Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel est plongé pendant dix minutes dans le fixateur, séché puis plongé pendant 10 minutes dans le colorant.

- **Décoloration du fond** : Une succession de bains dans la solution de décoloration permet ensuite d'éliminer la coloration du fond de façon à faire apparaître les bandes correspondant aux diverses protéines séparées.

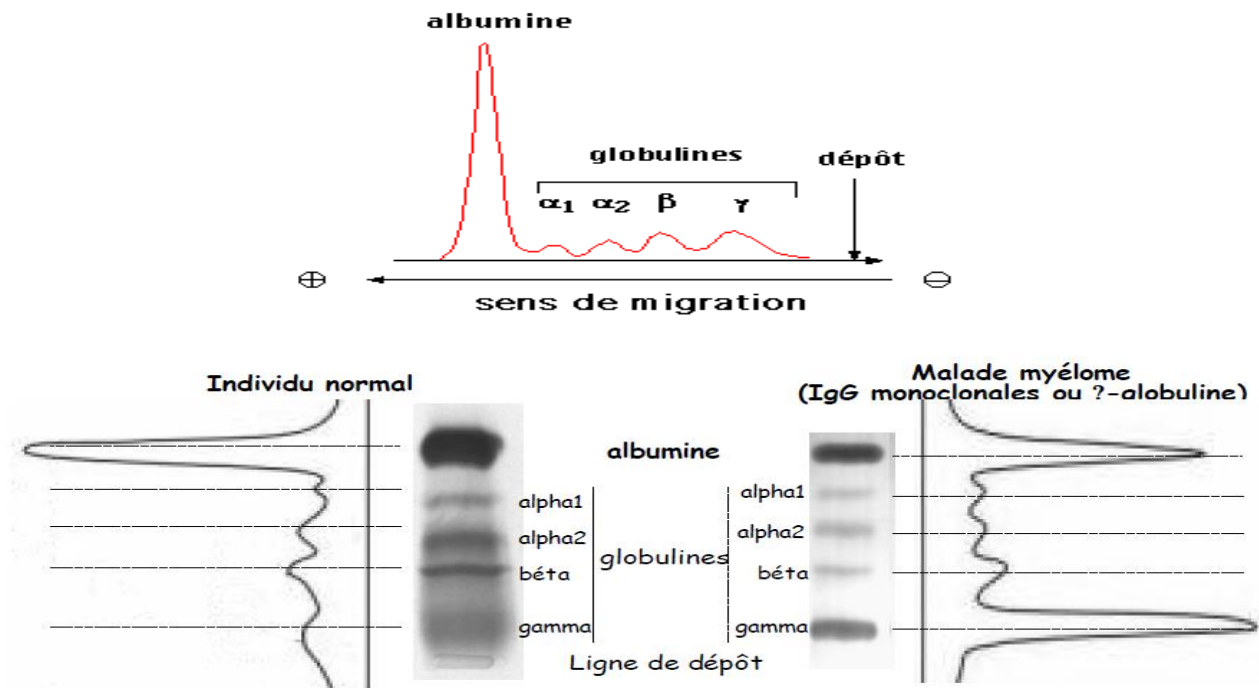
- **Séchage final du gel** : Le gel est ensuite séché ce qui permet de le conserver dans de bonnes conditions.



II.2.3. Electrophorèse native

Electrophorèse des protéines du sérum. Cinq échantillons de sérum ont été analysés par électrophorèse. Le gel a été coloré puis scanné en densitométrie. On peut distinguer au plus 5 bandes, alors que le sérum contient plusieurs centaines de protéines différentes.

❖ Tracé densitométrique du protéinogramme d'un sérum humain normal



II.3. L'immunoélectrophorèse

II.3.1. L'immunoélectrophorèse unidimensionnelle

C'est une méthode qui associe l'électrophorèse de protéines (antigènes) à une immundiffusion contre des anticorps spécifiques. Elle aboutit à une réaction antigène-anticorps en donnant un arc de précipitation par couple Ag-Ac.

L'arc se forme à l'endroit où l'antigène et les anticorps se rencontrent dans les conditions où le rapport de leurs concentrations est optimal.

II.3.1.1. Principe

Dans un premier temps, les protéines sériques sont séparées par électrophorèse. Ensuite, les fractions obtenues sont étudiées avec des anticorps spécifiques des protéines sériques par la méthode de la double diffusion.

II.3.1.2. Principales étapes du protocole

L'immunoélectrophorèse se réalise en deux temps :

A) Le premier temps : Le temps d'électrophorèse (Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams)

- **Dépôt des sérums** : 2µl de sérum de contrôle dans les puits marqués C et 2µl de sérum du patient dans les puits marqués P.

- **Migration** : Plaque d'agarose placée dans la cuve (préchargée en tampon à pH 8,5), puits du côté cathode. Tension de 100V appliquée pendant 45 mn.

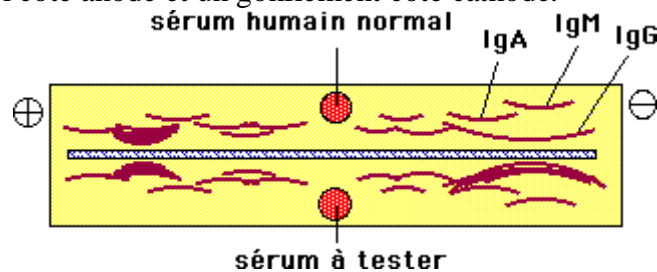
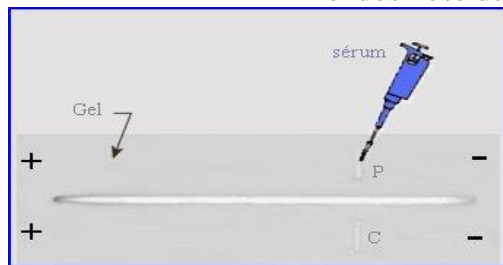
Les protéines qui ont une charge globale négative sont séparées essentiellement en fonction de cette charge, leur taille et le courant d'électro-endosmose intervenant également.

- **Résultats** : Les fractions protéiques particulièrement mobiles du sérum (sérum-albumine, α_1 , α_2 , β , et γ globulines) migrent vers l'anode.

Les fractions les moins mobiles comme les IgG sont entraînées vers la cathode par le courant d'électro-endosmose. Elles migrent donc en apparence vers la cathode (-), bien que chargées négativement.

Remarque :

Ce fort courant d'électro-endosmose du gel coté anode et un gonflement coté cathode.



B) Deuxième temps Immunodiffusion

Dépôt des antisérums
20µl de l'antisérum approprié poly ou monospécifique dans chaque rigole parallèle à la direction de migration.

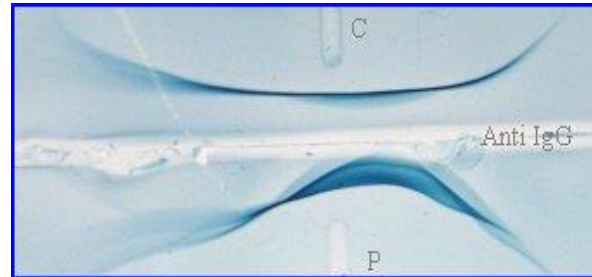
- Double diffusion

- Gel placé dans une chambre humide et incubé à 20°C pendant 18h. Les protéines sériques (Ag) et les anticorps diffusent librement dans le support. Des complexes immuns se forment dans la zone d'équivalence (réseau) où il y a précipitation.



- Lavage et coloration : Elimination par lavage-absorption (NaCl 0,85%) des protéines restées libres puis séchage des plaques et coloration à l'aide d'un colorant bleu pour protéines.

- Décoloration puis séchage.
Seuls les arcs de précipitation apparaissent colorés.



II.3.2. Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

Electrophorèse bidimensionnelle, dans laquelle la diffusion est remplacée par une deuxième électrophorèse perpendiculaire à la première, au sein d'un gel d'agar tamponné dans lequel ont été mis en solution un ou plusieurs anticorps spécifiques.

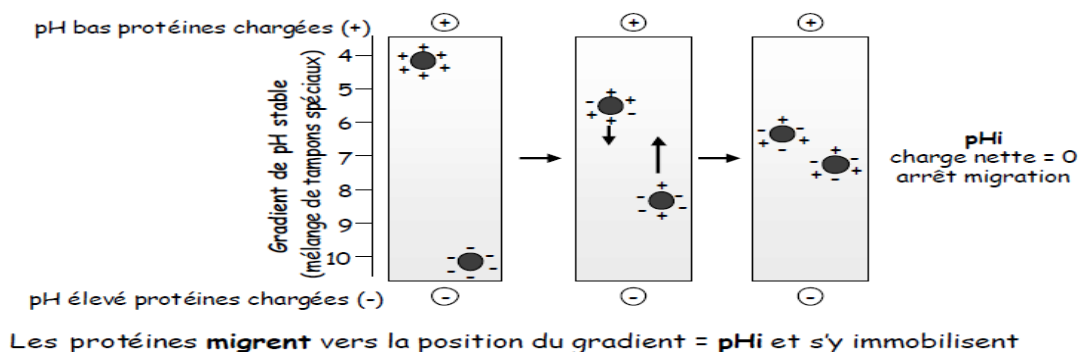
Les arcs de précipitations sont remplacés par des V (ou obus) de précipitation qui traduisent la rencontre des antigènes et des anticorps dans ces conditions.

Cette technique représente un gain de temps considérable par rapport à l'immunoélectrophorèse à une dimension ; la durée du 2^{ème} temps y est de une heure environ, alors que dans la techniques mono est de 24heures.

On sépare selon le **pHi** dans une dimension (IEF= Immunoélectrofocalisation) et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS); on sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum.

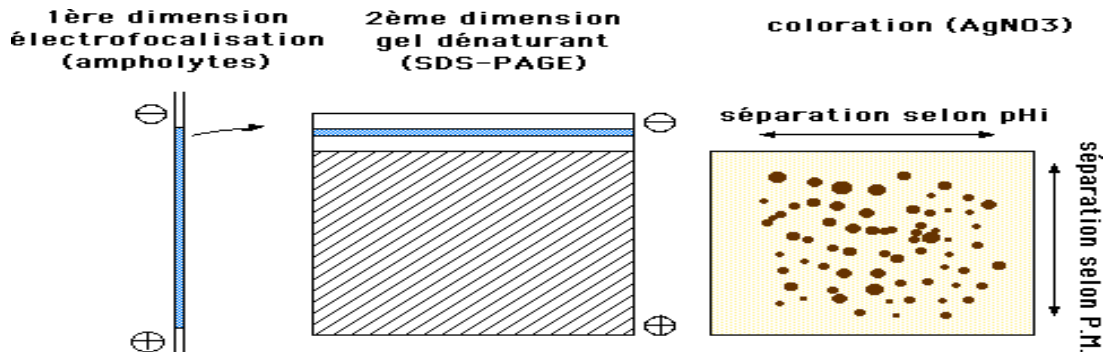
➤ Dimension 1

- La **charge nette** d'une protéine varie avec le **pH**. A **pHi** : charge nette nulle.
- Valeur de pHi spécifique d'une protéine, qui ne migre plus dans un champ électrique
- 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**.



II.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE= Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)

II.4.1.Principe

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule réticulée utilisée comme support d'électrophorèse. Ce gel est préparé extemporanément et coulé en tube ou sur lame. C'est un copolymère d'acrylamide

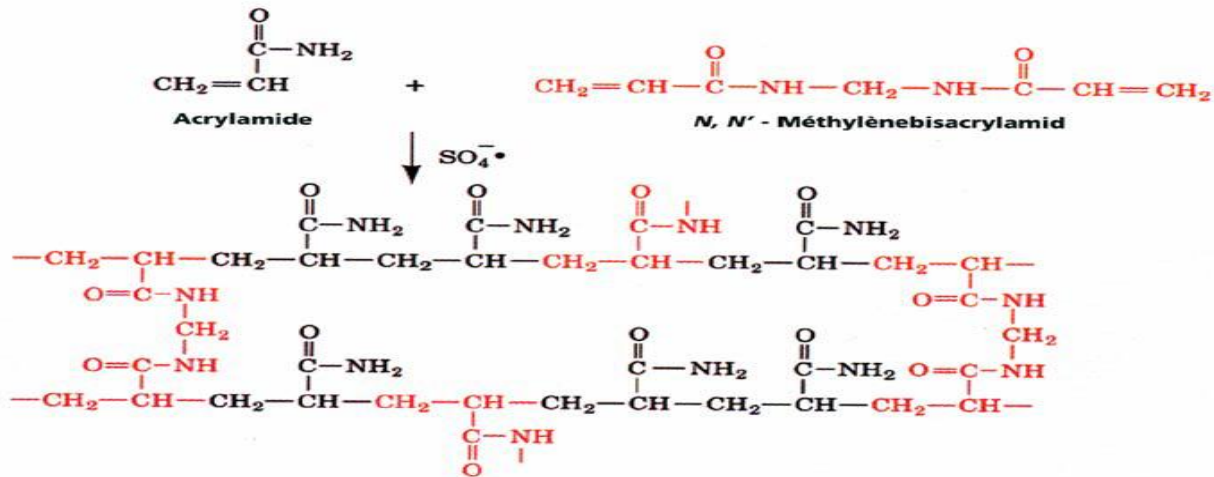
- **l'acrylamide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), qui polymérise en donnant des chaînes linéaires, et du
- **bis-acrylamide** ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), qui forme des ponts entre les chaînes ; on obtient ainsi un réseau, dont les mailles sont de taille variable en fonction des proportions d'acrylamide et de bis-acrylamide utilisées ; le gel obtenu se comporte donc comme un tamis moléculaire.

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide est une technique couplant une séparation électrophorétique à un tamisage moléculaire.

La polymérisation de l'acrylamide se fait après ouverture des doubles liaisons.

Le réseau de polyacrylamide est formé par polymérisation de monomère d'acrylamide (Acryl) en présence du bis acrylamide (NN'méthylène-bis-acrylamide).

Le bis-acrylamide est l'équivalent de 2 monomères d'acrylamide liés par un groupement méthyl. Il est utilisé comme agent pontant. Après réaction de polymérisation on obtient un gel de polyacrylamide avec un degré de réticulation bien précis (dépendant du pourcentage du bis-acrylamide).



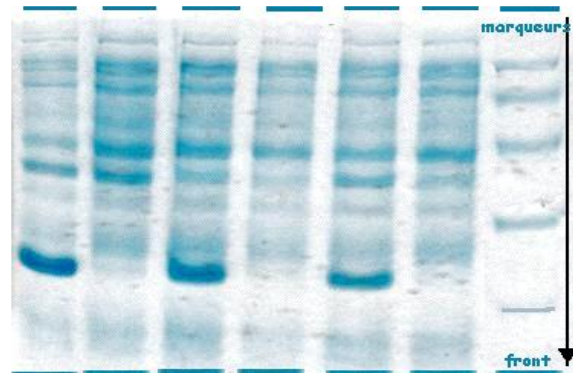
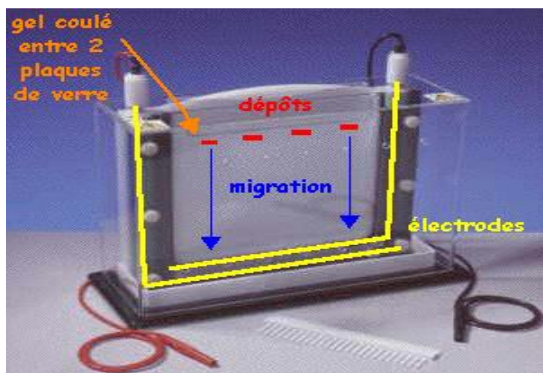
II.4.2. Technique

II.4.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en tube

Le gel est préparé extemporanément dans des tubes de verre, dont l'intérieur a été enduit d'un lubrifiant de démouler aisément le « boudin » de gel de polyacrylamide.

Le tube, placé verticalement dans une cuve électrophorétique, est connecté par l'intermédiaire de deux compartiments remplis de tampon à l'alimentation électrique. La partie supérieure du tube est branchée à la cathode, la partie inférieure à l'anode. Le tampon imbibe le gel.

La macromolécule chargée négativement migre de haut en bas, le dépôt est fait à la partie supérieure du tube. Dans ce type de gel, plus le gel est long, meilleure est la finesse des bandes et la résolution.



II.4.2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en lame

Dans cette technique, le gel de polyacrylamide est coulé en lame. L'électrophorèse peut se pratiquer alors que la lame est en position verticale ou horizontale. Une lame, il est possible de séparer en une seule fois de nombreux échantillons (jusqu'à 25 par lame) dont on pourra comparer directement la migration.

La chaleur dégagée par effet joule est plus facilement dissipée sur lame qu'en tube.

Après migration, la révélation peut être effectuée : **directement sur gel** pour les protéines, on révèle au bleu de Coomassie ou à l'Amidoschwartz. Pour les acides nucléiques, on révèle au bromure d'éthidium (BET), les protéines on réalise un **Western-blot** : on fait agir, dans un premier temps, un anticorps monoclonal sur la protéine, puis un deuxième anticorps monoclonal conjugué à une enzyme, sur le premier.

Pour les acides nucléiques, la révélation est faite à l'aide de sondes nucléiques, contre les ARN on réalise un **Northern-blot**, contre les ADN un **Southern-blot**.

II.4.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) (SDS-PAGE)

Méthode de Séparation de **protéines** réalisée **en condition dénaturante**, en **présence de SDS**.

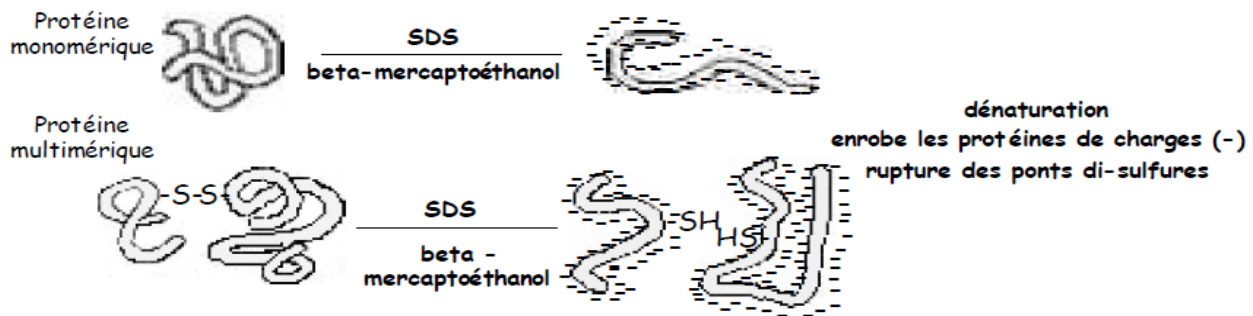
Les protéines sont dénaturées par :

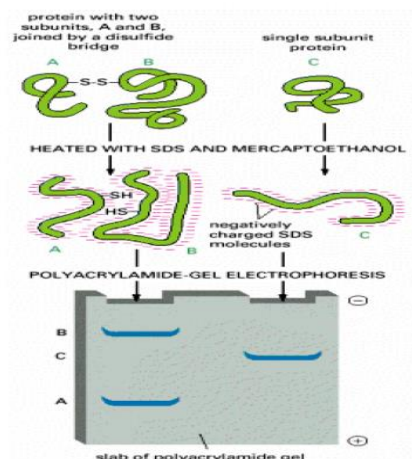
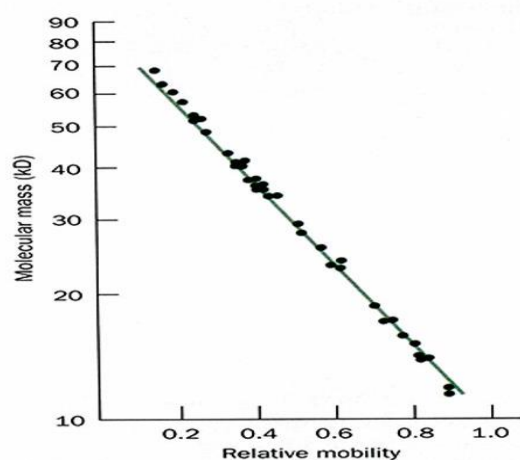
- chauffage, qui casse les liaisons hydrogène ;
- SDS, un détergent anionique, qui casse les liaisons ioniques ;
- un agent réducteur mercaptoéthanol qui casse les ponts disulfures.

Les protéines migreront alors grâce à leur forte charge négative apportée par le détergent et de façon proportionnelle à leur masse. La résolution est fortement améliorée (SDS : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^-$, Na^+), cette électrophorèse est appelée **électrophorèse dénaturante**

$$\text{Log PM} = F(d)$$

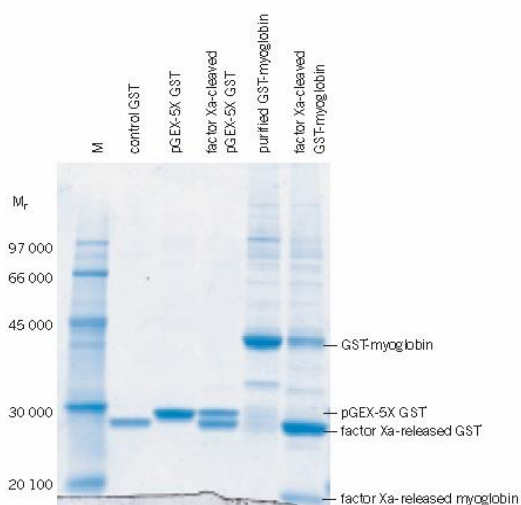
PM est le poids moléculaire et **d** la distance de migration



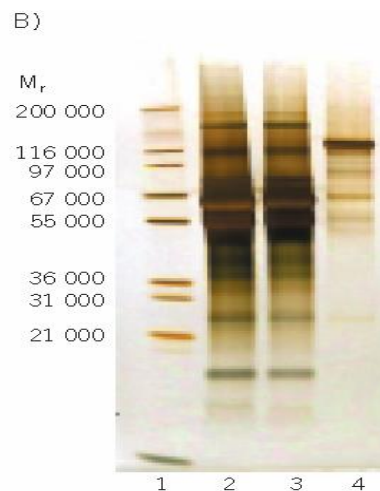


Relation entre les masses moléculaires des protéines et leur mobilité électrophorétique

Coloration de gels de protéines



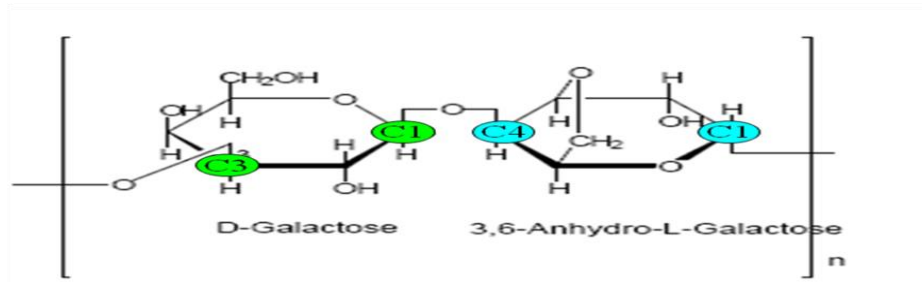
Coloration au Bleu de Coomassie brillant



Coloration au nitrate d'argent

II.5. Electrophorèse en gel d'agarose

L'agarose et l'un des deux polymères constituant l'agar-agar, l'autre étant l'agaropectine. La chaîne principale de l'agarose est formée de la polycondensation de diholosines de formule suivante :



Les différentes variétés d'agarose se distinguent par la nature des substituant de la chaîne principale. On prépare le gel d'agarose par solidification d'une solution d'agarose portée à ébullition.

Dans ce gel, les chaînes polysidiques établissent entre elles des liaisons de type hydrogène. Les espaces délimités entre les chaînes constituent les mailles d'un réseau.

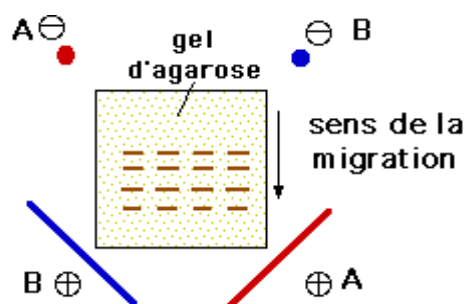
Comme électrophorèse en gel de polyacrylamide, l'électrophorèse en gel d'agarose est une technique où sont couplés une électrophorèse et un tamisage moléculaire. Elle peut être utilisée pour séparer des protéines ou des acides nucléiques, mais compte tenu de la grande taille des mailles du réseau. Cette technique est essentiellement réservée à la séparation des acides nucléiques. Elle permet le fractionnement d'ADN de 100pb à plusieurs millions de pb. La détection se fait par révélation directe par le bromure d'éthidium (BET).

Lorsque la technique d'électrophorèse en gel d'agarose ne parvient pas à séparer les fragments d'ADN de grande taille, on utilise la technique électrophorétique **en champ pulsé**.

II.6. Electrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille. Les fragments d'ADN à séparer sont soumis à l'action alternative de deux champs électrophorétiques perpendiculaires agissant à une certaine fréquence et à une certaine valeur des champs, judicieusement choisies en fonction de la taille des fragments à séparer. L'un des champs étire le fragment d'ADN et lui permet de sortir du piège dans lequel il était bloqué, l'autre assure l'avancement du fragment au sein du gel. Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue.

L'avantage de l'électrophorèse en champ pulsé est que cette technique possède un bon pouvoir de résolution à la fois pour les fragments de petites taille et de grande taille.



Electrophorèse en champ pulsé :
on utilise en alternance les couples d'électrodes A ou B

II.7. Electrofocalisation

II.1. Electrofocalisation analytique

Développée surtout après 1968, cette technique a constitué un progrès majeur dans le domaine des méthodes de séparation fine des protéines. Sa réalisation implique des équipements semblable à ceux de l'électrophorèse classique : gel de polyacrylamide, migration en plaques horizontales ou en tubes verticaux, mais son principe est totalement différent. Contrairement à l'électrophorèse où la séparation a lieu à pH constant, l'électrofocalisation est réalisée dans un *gradient de pH* formé par migration (préalable ou simultanée) de substances amphotères, disponibles dans le commerce pour toutes les gammes de pH possibles (2.5-4, 4-6, 5-7, 7-9, 3.5-10,...) et connue sous : des noms commerciaux tels qu'« Ampholines », « Pharmalytes », « Servalytes »,...

Lorsqu'une protéine est introduite dans un tel gradient de pH, par exemple à un pH inférieur à son pHi, elle acquiert, par définition, une charge nette positive. Elle va donc migrer vers la cathode, *c'est-à-dire vers un environnement de pH de plus en plus élevés lesquels, en retour, influencent (font régresser) son ionisation*. Ainsi, au cours de son déplacement, la protéine va voir sa charge nette diminuer, jusqu'à ce qu'elle atteigne son pHi, point auquel elle présente une charge nette nulle. Elle s'arrête donc en ce point.

L'électrofocalisation est donc une technique qui permet la séparation des protéines en fonction de leur pHi. En conséquence, le diagramme obtenu est en principe indépendant du point auquel l'échantillon a été déposé. La protéine doit en effet atteindre son pHi, qu'elle ait été déposée du côté de l'anode ou du côté de la cathode, pourvu que le temps de l'expérience ait été suffisant. Également, lorsque toutes les protéines ont atteint leur pHi, le diagramme ne doit plus en principe évoluer, de sorte que le résultat final est indépendant du temps de l'expérience.

Il faut bien insister sur le fait que si la protéine qui a atteint son pHi migre (en raison des phénomènes de diffusion), par exemple vers la cathode, elle acquiert aussitôt une charge négative qui va entraîner sa migration, son rappel, dans le sens positif et donc son retour vers le pHi. De même, en cas de diffusion vers l'anode. *L'effet de focalisation agit ainsi contre l'effet de diffusion*, de sorte que les fractions séparées se concentrent en des zones très fines avec une résolution qui ne peut normalement pas être atteinte en électrophorèse conventionnelle.

Une variante consistant à déposer l'échantillon du côté acide du gradient de pH et à arrêter l'expérience avant que les protéines atteignent réellement leur zone de pHi a été utilisée, notamment pour les séparations de 1^o dimension dans les électrophorèses bidimensionnelles. Cette variante est connue sous le nom de NEPHGE (nonequilibrium pH gradient electrophoresis).

7.2. Techniques préparatives

Les différentes techniques d'électrophorèse analytique décrites ci-dessus peuvent être appliquées à l'échelle préparative, c'est-à-dire non plus seulement en vue déterminer la composition d'un mélange de constituants, mais en vue d'isoler, de purifier certains d'entre eux en quantité non négligeable (quelques mg, voire quelques dizaines ou centaines de mg). En électrophorèse analytique, on dépose des quantités d'échantillon généralement de l'ordre de 0.1 mg. En électrophorèse préparative, le dépôt est de l'ordre de quelques dizaines de mg, voire du gramme, de protéines.

Le principe de la technique n'est pas modifié, mais les appareillages sont adaptés à de plus grosses quantités : colonnes de 2 ou 3 centimètres de diamètre, couches de gels de 0.5 à 1 cm d'épaisseur.

Deux principaux types de support sont utilisés : les gels de polyacrylamide, qui offrent un pouvoir de résolution élevé mais à partir desquels la récupération des protéines n'est pas toujours facile et les gels granulaires (de structure semblable à des supports de chromatographie du type Sephadex G75) qui permettent facilement d'éluer les fractions.

Comme il s'agit ici de préparer des fractions protéiques purifiées ayant gardé si possible leur structure native, on ne peut généralement pas procéder à leur identification par coloration directe (qui les dénaturerait). On a donc recours à une élution à partir du support, après repérage des fractions par spectrophotométrie UV ou par prise d'empreinte du diagramme, empreinte qui est colorée afin de repérer la position des bandes sur le support.

La mise en œuvre de ces techniques préparatives est généralement plus délicate que celle de leurs homologues analytiques et les résolutions obtenues sont toujours inférieures.

Parmi les systèmes actuellement utilisés, nous prendrons les deux exemples suivants :

a) L'électrophorèse / isotachophorèse préparative en gel de polyacrylamide.

Ce système se pratique au moyen d'une colonne verticale de 2.5 x 30 cm réfrigérée, dont les extrémités sont connectées à des réservoirs de tampon circulant et qui est soumise à une tension de l'ordre 1000 volts.

Les protéines, déposées au sommet de la colonne se séparent au cours de la traversée du gel et peuvent être récupérées au fur et à mesure qu'elles parviennent à l'extrémité inférieure, grâce à un autre système de tampon circulant et sont envoyées dans un collecteur de fractions comme en chromatographie.

b) électrofocalisation préparative en couche de gel granulaire de Sephadex.

Ce système utilise un moule parallélépipédique dans lequel on coule une couche (2 à 10 mm d'épaisseur) de gel de Sephadex G75 contenant des ampholytes. La solution protéique peut être incorporée au gel ou déposée ensuite.

Après focalisation (exemple : 1 nuit sous une tension de 600 volts), une empreinte de la couche est prise au moyen d'un papier filtre que l'on colore.

Cela permet de localiser les bandes et de récupérer simplement la couche de Sephadex au moyen d'une spatule là où se trouvent les protéines recherchées et d'éluer ensuite facilement ces dernières dans une micro colonne munie d'un filtre. Cette résolution est à comparer avec celle obtenue avec les mêmes protéines, en version analytique.

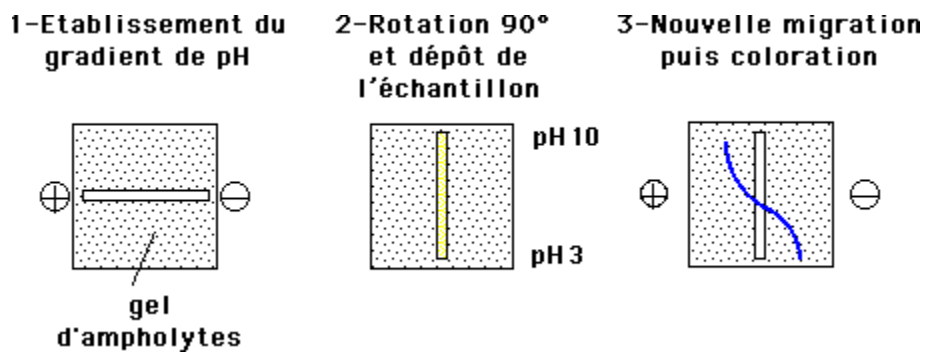
II.7.3. Électrofocalisation (IEF — IsoElectric Focussing)

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs **points isoélectriques**. La migration est effectuée dans un gradient de pH ; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi.

L'électrophorèse est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles on a préétabli un gradient de pH. Les protéines déposées migrent vers l'anode (+) ou la cathode (-) selon leur charge mais, au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge : elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle, c'est-à-dire qu'elles focalisent à l'endroit où le pH est égale à leur propre pH.

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 : Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle et l'établissement d'un gradient linéaire de pH dans le gel. Une protéine analysée sur ce type de gel va migrer jusqu'au pH correspondant à son point isoélectrique et s'y arrêter.

L'électrofocalisation bidimensionnelle est une méthode qui permet d'obtenir une courbe de titrage d'une protéine donnée. On prépare un gel dans lequel on établit le gradient de pH, puis on dépose dans une rigole centrale la solution de protéine, après quoi on tourne la plaque de 90 ° et on fait à nouveau passer un courant électrique.

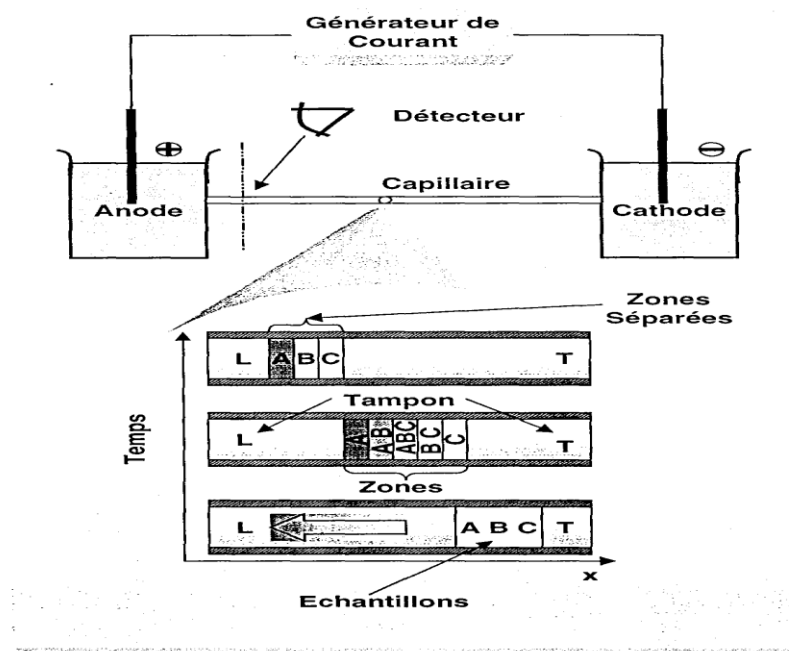


II.8. Isotachophorèse

Le terme « isotachophorèse » dérive du fait que, dans cette technique, toutes les bandes protéiques migrent (à partir d'un certain moment) toutes à la même vitesse. L'échantillon est introduit entre deux solutions d'électrolytes, un meneur et un terminal. Dans une expérience donnée, on peut séparer soit des cations, soit des anions, mais pas les deux à la fois. S'il s'agit par exemple de séparer un mélange de cations, l'électrolyte meneur (placé côté cathode) doit renfermer un cation de mobilité plus élevée (par exemple H^+) que celle des ions de l'échantillon à étudier, tandis que l'électrolyte terminal (placé côté anode) doit renfermer un ion de mobilité plus faible que celles des ions de l'échantillon. Lorsque le champ électrique est appliqué, les gradients de potentiel vont évoluer d'une manière qui va assurer une migration de tous les ions à la même vitesse. Ainsi, dans les régions où des cations de faible mobilité sont présents, le champ électrique est plus fort, faisant migrer ces ions à la même vitesse que les plus rapides.

Cette modification automatique des gradients de potentiel est un résultat inhérent à la nature même du système. Si tel n'était pas le cas, cela signifierait que l'électrolyte meneur pourrait se détacher vers l'avant, se séparer des cations de l'échantillon, laissant alors une région dépourvue d'ions, ce qui est impossible car le courant électrique ne pourrait plus traverser le système. Une caractéristique de ce système est l'apparition d'un équilibre dynamique dans lequel chaque composant cationique individuel migre sous la forme d'une bande pure. Chaque bande pure est en effet « prise en sandwich » entre les composants de mobilité immédiatement supérieure et de mobilité immédiatement inférieure.

Les composants migrent donc, à la même vitesse, et dans l'ordre des mobilités électrophorétiques, du plus mobile au moins mobile.



Quand un courant électrique est appliqué au système, la différence de potentiel va générer un champ électrique uniforme sur la zone de l'échantillon. Ainsi, chaque espèce anionique de l'échantillon aura sa propre vitesse de migration, selon l'équation $v=UE$.

Les espèces anioniques de l'échantillon ayant la mobilité la plus élevée se déplaceront en premier suivies des espèces de faible mobilité qui restent par derrière. Ainsi, deux zones sont obtenues comme dans tous les cas d'électrophorèse en *solution libre*. Dans la série de zones mixtes, les espèces sont rangées dans l'ordre décroissant de leur mobilité effective.

Pendant le déplacement, les ions de l'électrolyte support conducteur L ne peuvent jamais être dépassés par les anions de l'échantillon, puisque leur mobilité effective est choisie comme la plus élevée. Parallèlement, les ions de la phase terminale ne peuvent jamais dépasser les espèces anioniques de l'échantillon. Dans ce cas, les zones de l'échantillon sont intercalées entre le support électrolyte conducteur et terminal. Dans les zones mixtes de l'échantillon, la séparation se poursuit et, après un certain temps, quand la séparation est complète, une série de zones est obtenue dans laquelle chaque zone ne contient qu'une espèce ionique de l'échantillon. Pendant la séparation, cette série de zones est encore intercalée entre les supports conducteur et terminal L et T.

La première zone de l'échantillon contient les espèces anioniques avec la mobilité effective la plus élevée; par ailleurs, la dernière zone contient les anions avec la mobilité effective la plus basse. Dans ce cas, on peut dire qu'un système de séparation par isotachophorèse est établi. Cependant, une ou plusieurs espèces anioniques peuvent se présenter dans une zone mixte, c'est-à-dire, contenant des espèces de mobilité effective identique. Ainsi, toutes les zones doivent se déplacer de manière liée, contrairement à la méthode de l'électrophorèse de zone, où toutes les zones sont libres. Ici les zones ne peuvent pas être libérées puisque il n'existe pas de solution électrolytique entre elles.

Dans cet état stable, toutes les zones ont des vitesses identiques de migration, déterminées par la vitesse de migration des espèces de la solution du support d'électrolyte conducteur. Considérons les zones L, A, B, C et T:

$$V_L = V_A = V_B = V_C = V_T$$

ou

$$U_LE_L = U_AE_A = U_BE_B = U_CE_C = U_TE_T$$

L'équation $V_L = V_A = V_B = V_C = V_T$ est la caractéristique fondamentale pour la séparation par cette méthode et sera appelée la *condition isotachophorétique*.

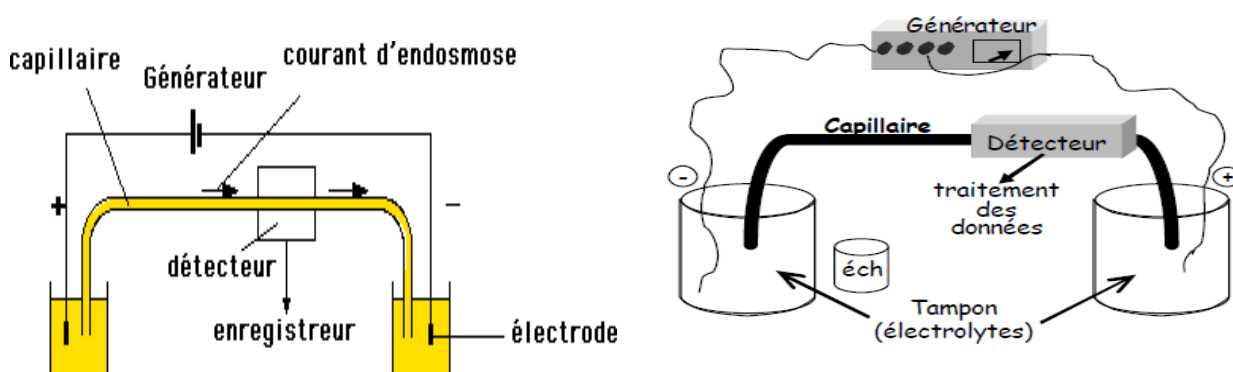
Comme les espèces sont arrangées dans l'ordre décroissant de leur mobilité effective, c'est-à-dire, $U_L > U_A > U_B > U_C > U_T$, les forces générées par le champ électrique augmentent sur le côté arrière de chaque zone. Si on travaille à une densité de courant constante, la résistance augmente ainsi sur le côté arrière et donc les températures augmentent dans les zones précédentes.

L'accroissement du gradient de potentiel entre deux zones voisines induit deux caractéristiques importantes aux systèmes isotachophorétiques. La première caractéristique est l'auto-correction des limites de zone. Quand une zone a atteint l'état stable, ses limites sont bien délimitées contrairement à l'électrophorèse de zone, où les pics sont larges en raison de l'adsorption et des phénomènes de diffusion. Cet effet peut aisément être compris. Si un ion situé à l'arrière d'une zone subit une force plus élevée, alors il acquerra une vitesse de migration plus élevée en accord avec l'équation ($v=UE$), jusqu'à ce qu'il se positionne dans sa propre zone. S'il passe dans une zone amont, où la force due au champ électrique est plus basse que celle qui correspond à sa vitesse, sa vitesse diminuera et il se repositionnera dans sa zone. La deuxième caractéristique est l'accroissement de la température dans les zones successives. Cette propriété permet de détecter les différentes zones à l'aide d'un capteur de température.

II.9. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse en veine liquide, selon Tislius, est une technique désuète, maintenant abandonnée ; en revanche l'électrophorèse capillaire qui, comme son nom l'indique est une électrophorèse en veine liquide, pratiquée dans un tube capillaire, est une technique moderne (elle a explosé dans le commerce scientifique et technologique à partir des années 1985-1986) qui est en passe de devenir la première méthode de séparation.

C'est une technique séparative récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de grand pouvoir de séparation de la très grande résolution, de la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules, et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse capillaire prend le nom d'ionophorèse lorsqu'il s'agit de l'analyse des ions inorganiques. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice (un tube capillaire ouvert) de diamètre d'environ 50µm et de longueur 1m (rempli de tampon ou de gel). Les extrémités plongent dans deux réservoirs d'électrolyte, auxquels on applique une différence de potentiel pouvant atteindre 30 kV pendant le temps nécessaire (voltages élevés). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans le capillaire et ceux-ci sont détectés par absorption UV, fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (on injecte seulement quelques nanolitres de l'échantillon).



Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides,... le nombre de plateaux est de l'ordre de 500000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable. La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.

II.9.1. Mobilité électrophorétique et flux électrostatique

En électrophorèse capillaire, les constituants d'un mélange se séparent dans le temps par effet de deux facteurs principaux : mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique, qui sont définissables pour les ions, les molécules, les particules ou les micelles.

II.9.1.1. Mobilité électrophorétique

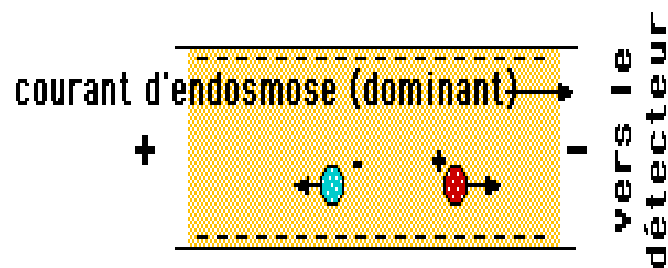
La mobilité (ou migration) électrophorétique U_e correspond au déplacement des molécules chargées, dans un électrolyte supposé immobile, vers les électrodes de signe opposé. U_e correspond au quotient de la vitesse de migration de l'ion, v_e , par la valeur du champ électrique, E . $U_e = v_e/E = v_e.L/V$, où L représente la longueur du capillaire et V la différence de potentiel appliquée à ses extrémités, U (cm².V⁻¹.s⁻¹). On affecte à la mobilité U_e le signe (+) ou (-) selon la nature de la charge portée ; elle est nulle pour une espèce sans charge nette.

II.9.1.2. Flux électro-osmotique

Le second paramètre qui contrôle le mouvement des solutés est le flux électroosmotique **Uos**. Il est dû à l'écoulement de l'électrolyte par effet de la paroi interne du capillaire, qui est tapissée de groupements silanols qui se déprotonnent si le pH est supérieur à 2 pour former une couche polyanionique fixe. Les cations du milieu tampon, qui viennent recouvrir la paroi, se mettent en mouvement dès qu'un champ électrique est appliqué au capillaire.

On définit U_{os} par la relation : $U_{os} = v_{os}/E = v_{os}.L/V$, **v_{os}** représentant la vitesse électro-osmotique des molécules neutres de la phase mobile.

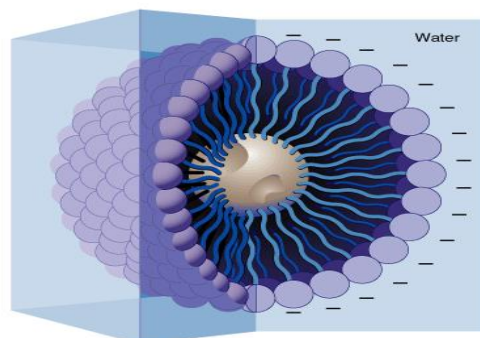
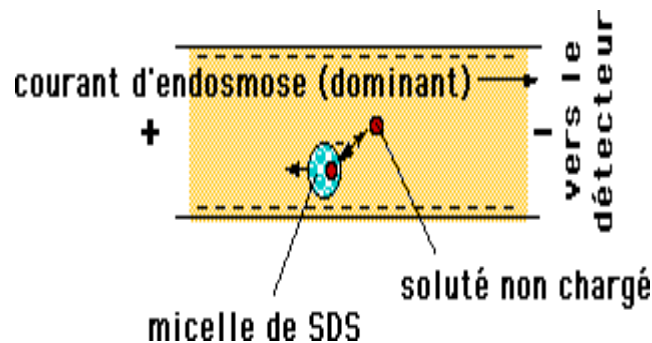
II.9.2. Electrophorèse capillaire en solution libre (FSCE)



Dans l'électrophorèse capillaire, le courant d'endosmose est la force dominante (il entraîne tous les solutés quelle que soit leur charge) et il dépend des charges présentes sur la paroi du capillaire (qui est fonction du pH); ce courant diminue à pH acide.

II.9.3. Electrophorèse capillaire micellaire (MCE)

Les micelles de détergent (SDS) forment une phase pseudo-stationnaire et le soluté se partage entre celle-ci et la phase mobile. Les substances les plus apolaires sont davantage "retenues".



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.