

L'ELECTROPHORESE

Historique

Cette technique a été initiée par **S.E. Linder et H. Picton en 1892**, qui se sont inspirés des études d'Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de **déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge**.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer en appliquant un champ électrique les **protéines du sérum sanguin**.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique **d'électrophorèse sur papier**

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec **C.A. Williams**, une méthode connue sous le nom **d'analyse immuno-électrophorétique** qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes.

En 1955, O. Smithies met au point la technique **d'électrophorèse en gel d'amidon**.

En 1957, Joachim Kohn sépare les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique **d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose**.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant **SDS** (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

I. Principe:

L'électrophorèse est une technique importante dans la **purification** de très nombreuses **molécules chargées électriquement**. Elle est devenue un outil principalement analytique, indispensable à la détermination des propriétés de molécules telle que leur point isoélectrique, leur mobilité électrophorétique et leur taille. L'évolution de son champ d'application est apparue ainsi: les petits ions, les peptides, les protéines, puis les acides nucléiques.

Elle permet la séparation et l'analyse de particules (ayant perdu leur neutralité électrique) chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique. Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-).

Cette technique permet, entre autre, de :

- déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective
- d'évaluer le degré de purification d'une protéine
- de séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps)
- de séparer des protéines sur des gels bi-dimensionnels, selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation) puis masse molaire
- de séquencer l'ADN
- de déterminer la taille de fragments d'ADN

II. Migration électrophorétique

II.1. Migration et conditions physico-chimiques :

Les molécules se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge nette z , à une vitesse v proportionnelle à cette charge : $v = E \cdot z / f$ où E est la force du champ électrique et f la force de friction.

Plus le courant est intense plus la migration se fera vite et loin. L'intensité du champ électrique (tension ou voltage), généralement mesurée en V, affecte l'intensité du courant. Dans un système où la résistance (r) est constante, il y a un lien direct entre la tension ("voltage", V) et le courant (I) :

$$V = r * I.$$

La résistance n'est cependant pas stable au cours d'une électrophorèse, elle a généralement tendance à diminuer avec le temps. Donc en modifiant le courant on modifie aussi la tension et inversement. à diminuer avec le temps.

La résistance électrique du système résulte directement de la concentration des électrolytes dans le tampon d'électrophorèse. À courant et à voltage donnés, plus la concentration d'électrolytes sera forte, plus le courant sera dû à ces électrolytes et non pas aux molécules de l'échantillon qu'on veut séparer. Donc, plus la résistance du système, due aux ions présents dans le tampon et la matrice, est forte, plus la migration des molécules de l'échantillon sera lente. Il faut quand même qu'il y ait des électrolytes dans le système pour soutenir le passage du courant. Ils servent aussi à maintenir des conditions de pH et de force ionique pour que la séparation se fasse et que les molécules à séparer restent stables et solubles.

II.2. Migration et caractéristiques des molécules :

La **charge des molécules** est évidemment la caractéristique fondamentale de la migration électrophorétique. Elle détermine la direction d'après sa polarité, vers l'anode ou la cathode, et la vitesse, donc la distance, de migration proportionnellement à la densité de la charge.

Normalement la charge d'une molécule est dépendante du pH du milieu, c'est le cas de la plupart des molécules biologiques. Pour une molécule ayant plusieurs groupements ionisables, il faut évidemment tenir compte de sa **charge nette**. La charge nette dépend du pI (pour une protéine) et du pH du milieu ambiant.

La **taille des molécules** a une certaine influence, particulièrement dans le cas où les molécules passent à travers une **matrice poreuse**. Plus la taille des molécules est **petite**, relativement à celles des pores, plus les molécules se **déplaceront facilement**, ce qui implique évidemment qu'elles migreront rapidement. La taille peut donc avoir une importance majeure dans une électrophorèse.

L'affinité des molécules pour la matrice affecte la migration. Plus l'affinité est grande moins la molécule migre vite et loin, parce qu'elle est retardée. Ce phénomène étant généralement nuisible à la qualité de la séparation et la vitesse de la migration, on essaie de minimiser ce problème en choisissant des matrices les **plus inertes possibles** (acrylamide) par rapport aux molécules qu'on veut séparer.

III. Techniques électrophorétiques

III.1 Types d'électrophorèse

- L'électrophorèse dite "**libre**" **en veine liquide**
- L'électrophorèse de **zone sur support**.

L'électrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre) :

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon de pH et de concentration convenable dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage coûteux, mise en oeuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

L'électrophorèse de zone sur support:

Les mobilités obtenues en ce type d'électrophorèse sont plus faibles que celles de l'électrophorèse en veine liquide. Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.).

III.2. Types de montage :

Montage horizontal:

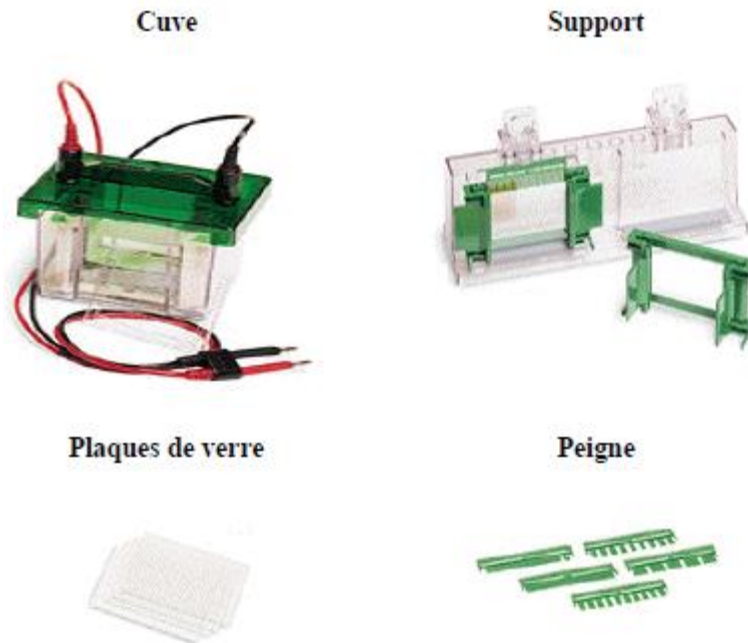
Utilisé pour les supports en acétate de cellulose ou en en papier. Le support se présente sous forme de longue et étroite bande. Les extrémités du support plongent dans un tampon d'électrode, créant une mince couche d'eau à sa surface.

Montage vertical:

Utilisé pour les supports en gel polyacrylamide ou, plus rarement d'agarose. Le gel est souvent préparé peu avant usage en le coulant entre 2 plaques de verre. Chaque extrémité du gel est mise en contact avec un tampon contenant des électrolytes qui permettra la propagation d'un courant dans le gel.

Le gel de polyacrylamide est constitué d'**acrylamide** (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de **bisacrylamide** qui est l'agent portant. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

La densité typique d'un **gel de séparation** peut être à 6%; 8%; 10%; 12% ou 15%. Plus le gel est dense meilleure sera la séparation



SDS-PAGE:

Une variante de cette technique consiste à utiliser du **SDS (Sodium Dodécylsulfate)** qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur **masse moléculaire**. Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.

III.3. Exemple de Techniques électrophorétiques

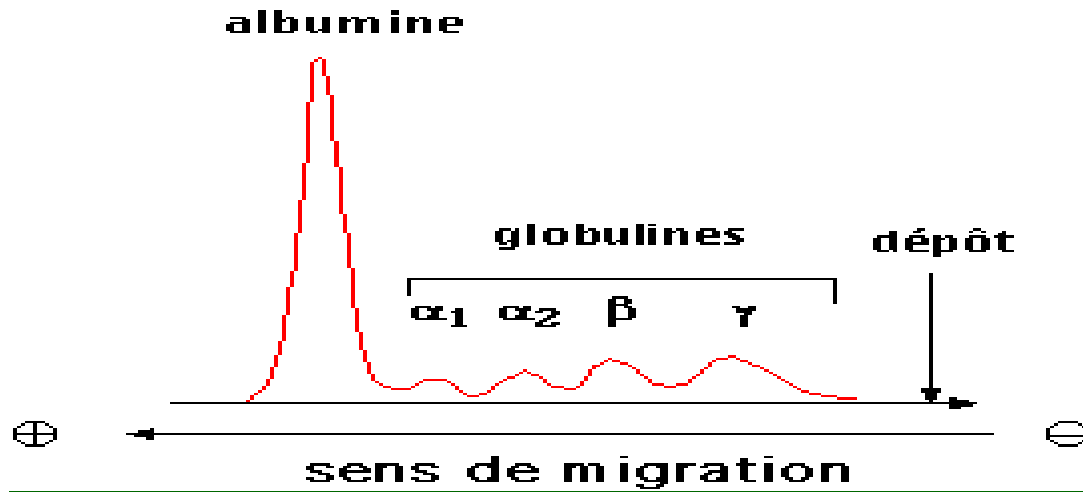
III.3.1. Electrophorèse sur acétate de cellulose

Cas de la séparation des protéines sériques sur acétate de cellulose

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'**oeil 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.

Tracé densitométrique du protéinogramme d'un sérum humain normal



III.3.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE)

La 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 bis-acrylamide utilisées; le gel obtenu se comporte donc comme un **tamis moléculaire** (les macromolécules migrent d'autant moins vite qu'elles sont plus grosses).

En présence de Sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique qui défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules sont chargées de la même façon, et la séparation est alors uniquement fonction de la **masse molaire** :

(**SDS** : $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{10} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{SO}_3^-, \text{Na}^+$),

Pour dénaturer les protéines, on utilise à la fois un détergent comme le SDS et un agent réducteur qui coupera les ponts disulfure, comme le β - mercaptoéthanol.