

Université MSB Jijel

Cours de Biochimie Instrumentale II

Chapitre III

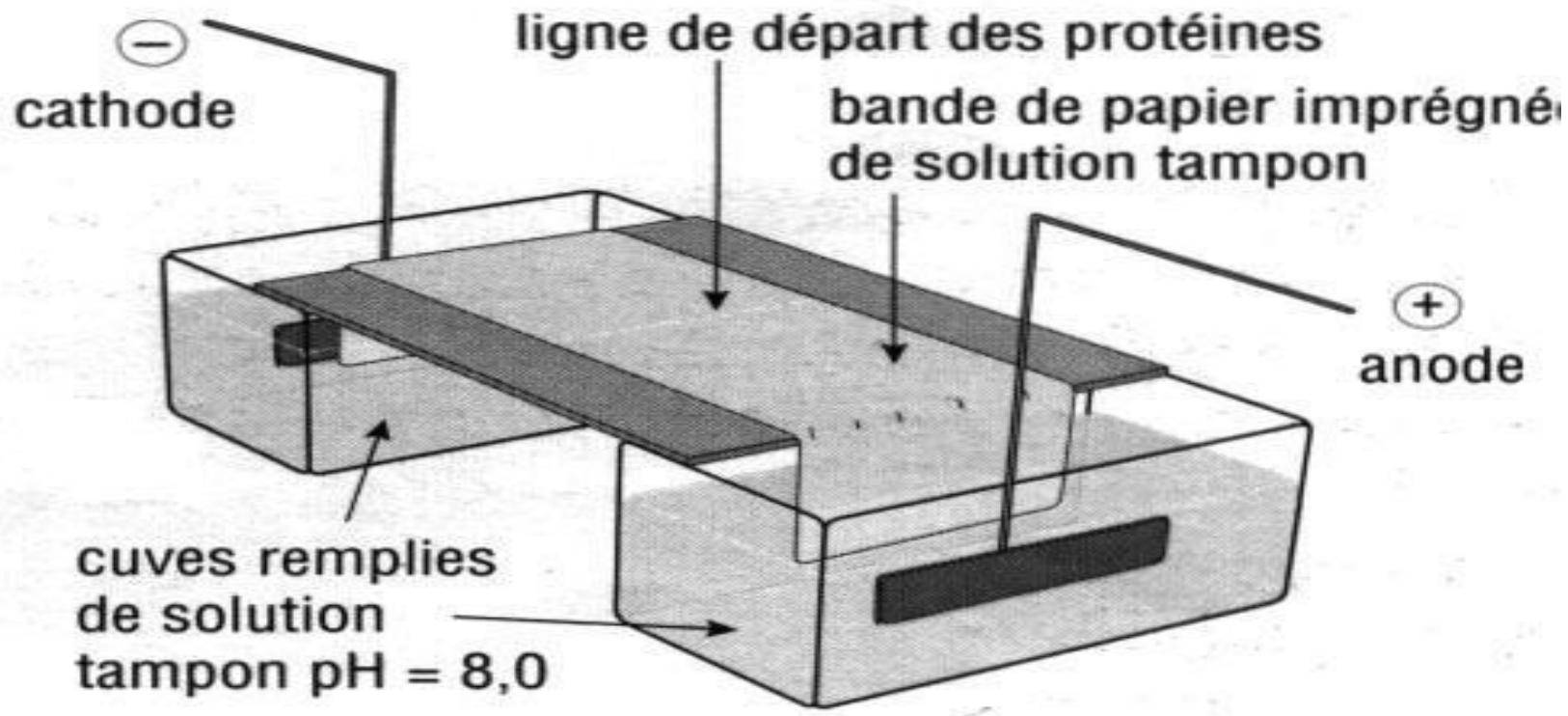
Techniques Electrophorétiques

Dr. KEBSA

Licence Pharmacologie expérimentale

1. Définition et principe :

- L'électrophorèse est une méthode **de séparation et de fractionnement**, elle est basée sur la migration différentielle des particules chargées dans un champ électrique à courant continu.
- La vitesse de migration ou de déplacement d'une molécule est proportionnelle au **degré de polarité** de celle-ci.
- **NB:** **le poids moléculaire** joue un rôle important dans la migration, électrophorèse sur gel de polyacrylamide.



- Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

2. Facteurs influençant la migration :

- a. Le PH du tampon
- b. La force ionique du tampon
- c. La température
- d. Le champ électrique
- e. Force de freinage
- f. La durée
- g. La taille de molécules
- h. L'affinité des molécules pour la matrice

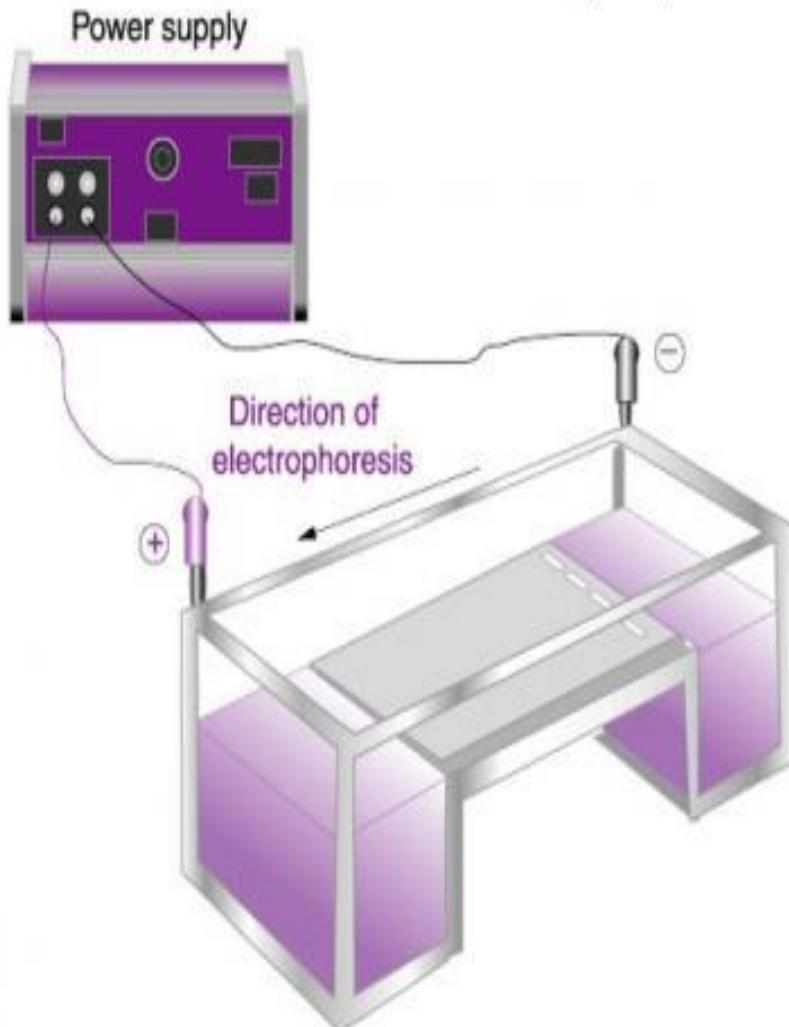
3. Les matrices (le support) :

Migration sur la surface
(papier, acétate de cellulose ;...)

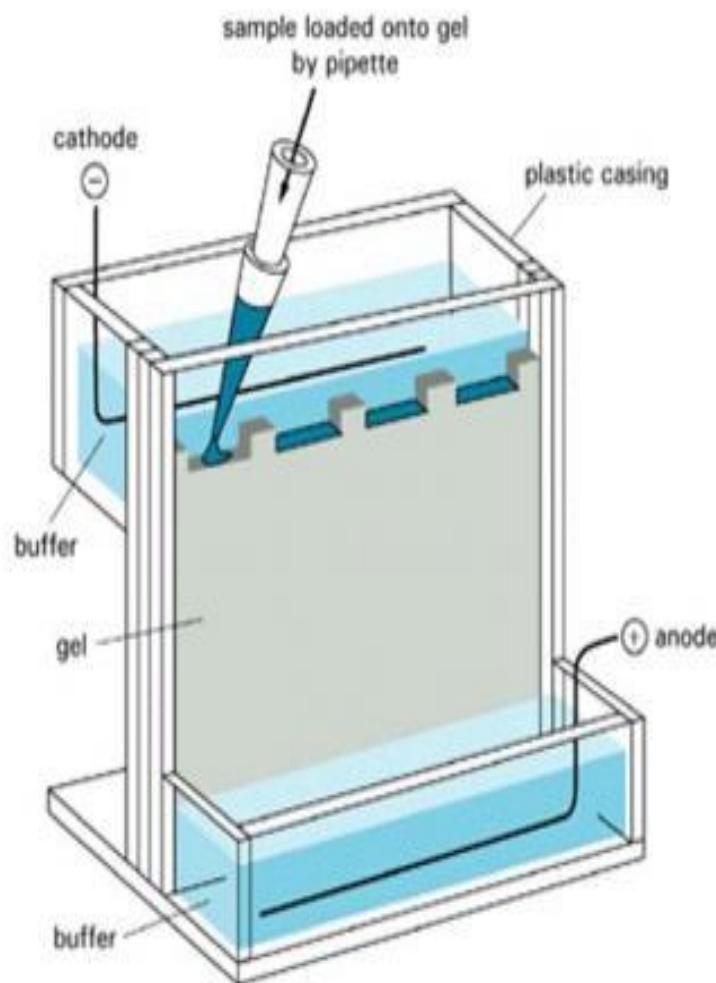
Migration à l'intérieur de la matrice c à d
dans l'épaisseur des gels.
(Agarose, polyacrylamide,...).

- a. **Le papier** : pour séparer les acides aminées et les petites molécules chargées.
 - b. **Acétate de cellulose** : séparation des protéines sériques en Biochimie clinique.
 - c. **Les gels**: En fonction de la taille des pores, on peut séparer des molécules situées dans une fourchette approximative de masses moléculaires. Par adaptation de la réticulation du gel à l'échantillon lors de sa préparation ☐ avoir une idée sur la nature des molécules que l'on souhaite séparer.
- **L'agarose** : (grande porosité) - séparation des molécules de très grandes tailles (séparation des molécules d'ADN ou d'ARN).
- **Gel de polyacrylamide** forme des réseaux beaucoup plus réticulés ☐ indiqués pour des molécules de PM moins élevé; protéines.

3. L'électrophorèse se fait en 2 montages :



Électrophorèse horizontale
(gel d'agarose)



Électrophorèse verticale
(gel de polyacrylamide)

4. Aspect théorique de la mobilité électrophorétique :

- → Soit une macro-molécule qui se déplace avec une vitesse \vec{V} sous l'influence d'un champ électrique \vec{E} . La vitesse est

donnée par :

$$\vec{V} = \mu \vec{E} \Rightarrow \mu = \frac{|\vec{V}|}{|\vec{E}|}$$

$|\vec{V}|$ en (cm /s),

$|\vec{E}|$ en (volt/cm) et

μ mobilité électro phorétique en ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \text{ volt}^{-1}$)

- Si la particule de charge « q » est placée dans un champ électrique \vec{E} elle subit une force calculée selon la **formule de Colombe** :

$$\vec{F} = q \vec{E}$$

- **la force de frottement f :** $f = f \cdot V$
- Si on a des molécules simples de forme sphérique telles les protéines globulaires du sérum, **le coefficient de friction f** aura pour valeur :

$$f = 6 \pi \eta r$$

$$\vec{f} = 6 \pi \eta r V$$

- à l'état stationnaire. $\vec{f} = \vec{F} \Rightarrow 6\pi\eta r V = q \vec{E}$

$$\Rightarrow \vec{V} = \frac{\overrightarrow{qE}}{6\pi\eta r}$$

$$\bullet \quad \mu = \frac{|\vec{V}|}{|\vec{E}|} \Rightarrow \mu = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

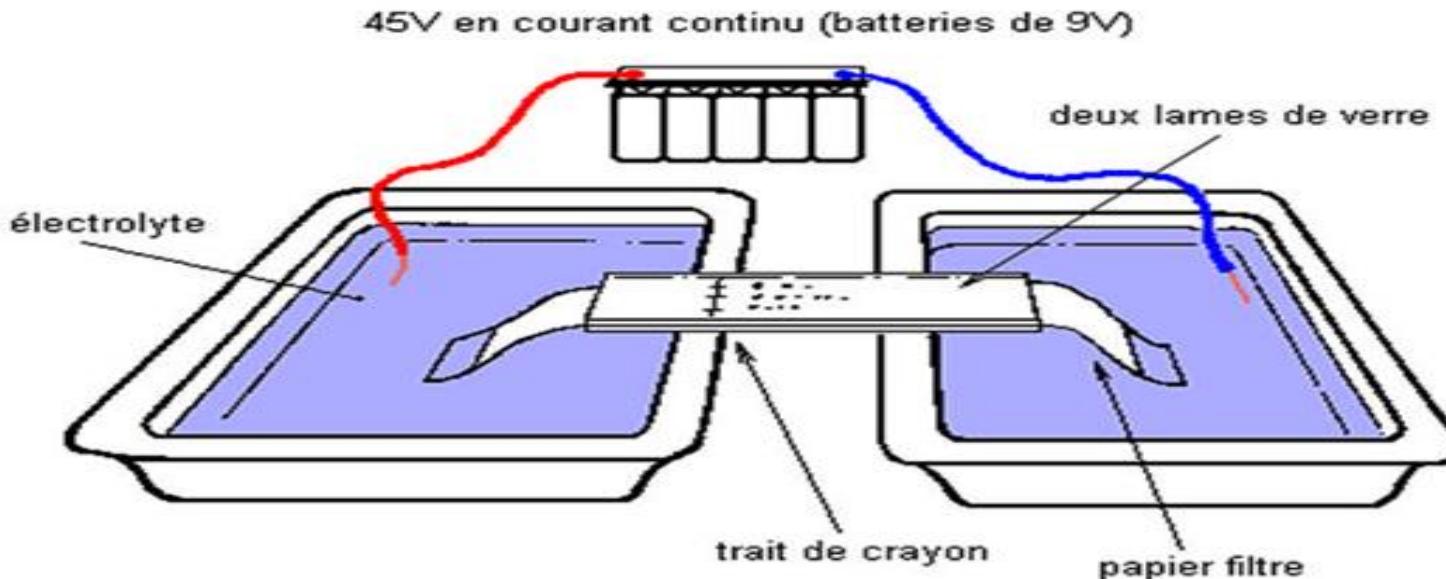
η : coefficient de viscosité
(g.cm-1.s-1 ou poise)

μ : la mobilité electro-phorétique

De cette relation on peut en déduire que la mobilité électrophorétique dépend de 3 facteurs :

1. La mobilité est proportionnelle à la charge « q » des molécules.
2. Inversement proportionnelle à son rayon « r ».
3. Dépend de la viscosité du milieu, plus elle est faible la molécule bouge librement.

A. Electrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose



Séparation des **petites molécules** (acides aminés ou petits peptides)

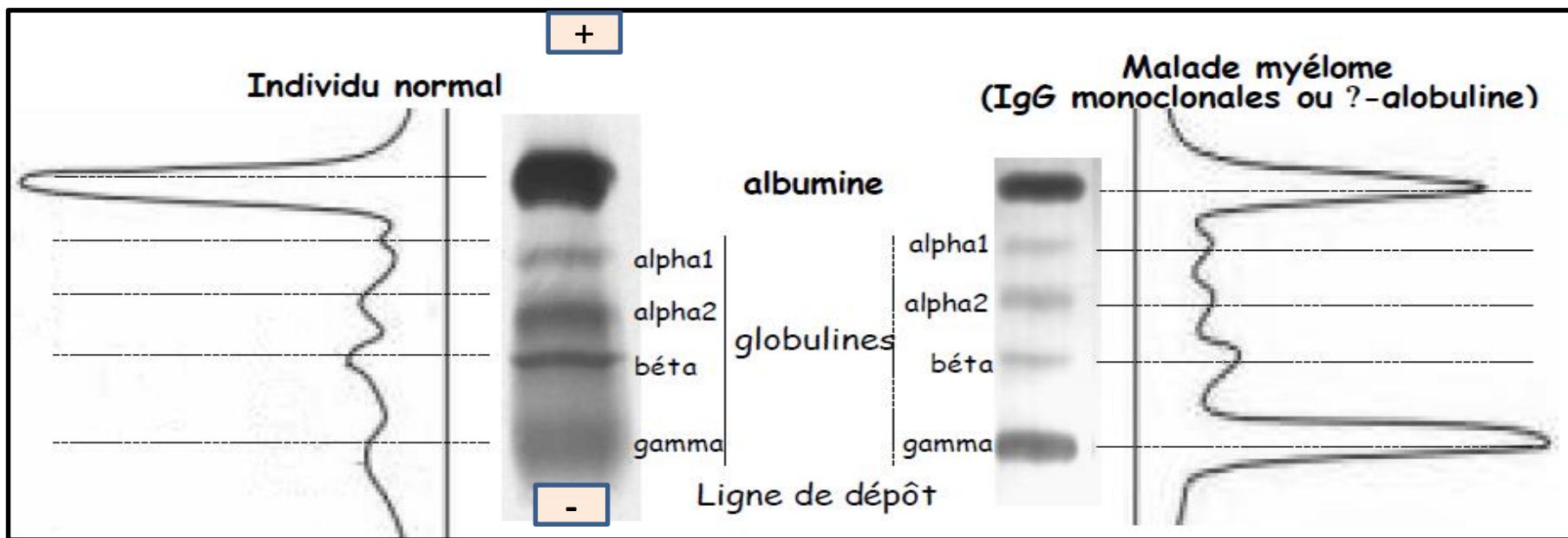
- Une bande de papier filtre, imprégnée d'une solution tampon, trempe par chacune de ses extrémités dans un récipient rempli de ce tampon.
- Entre ces deux récipients, on établit une différence de potentiel continue de quelques centaines de volts qui crée un champ électrique E le long du papier.
- La goutte de solution à analyser est déposée au milieu de la bande et la migration se fait sur le papier, dans un sens ou l'autre selon la charge des particules.

Migration des molécules principalement en fonction de la **charge globale**, et en conditions non dénaturantes

Vitesse de migration dépend : magnitude de la charge + taille molécules

- coloration des protéines (rouge Ponceau)
- analyse densité optique des bandes

Intensité coloration proportionnelle concentration protéines



- 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.

B. Electrophorese sur gel de polyacrylamide (PAGE)

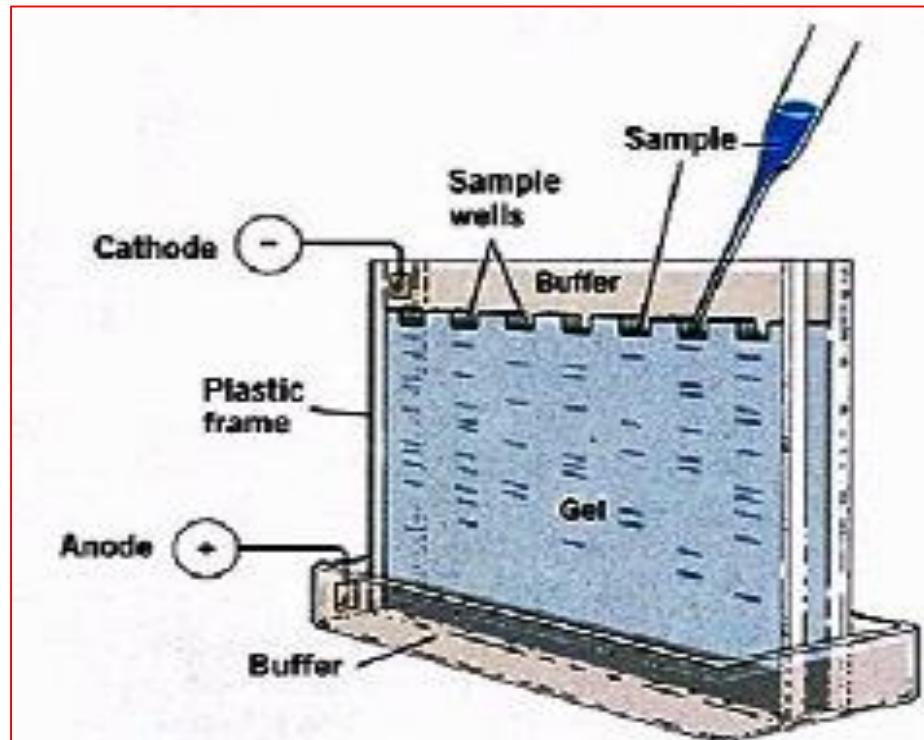
Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

Séparation/purification de - protéines

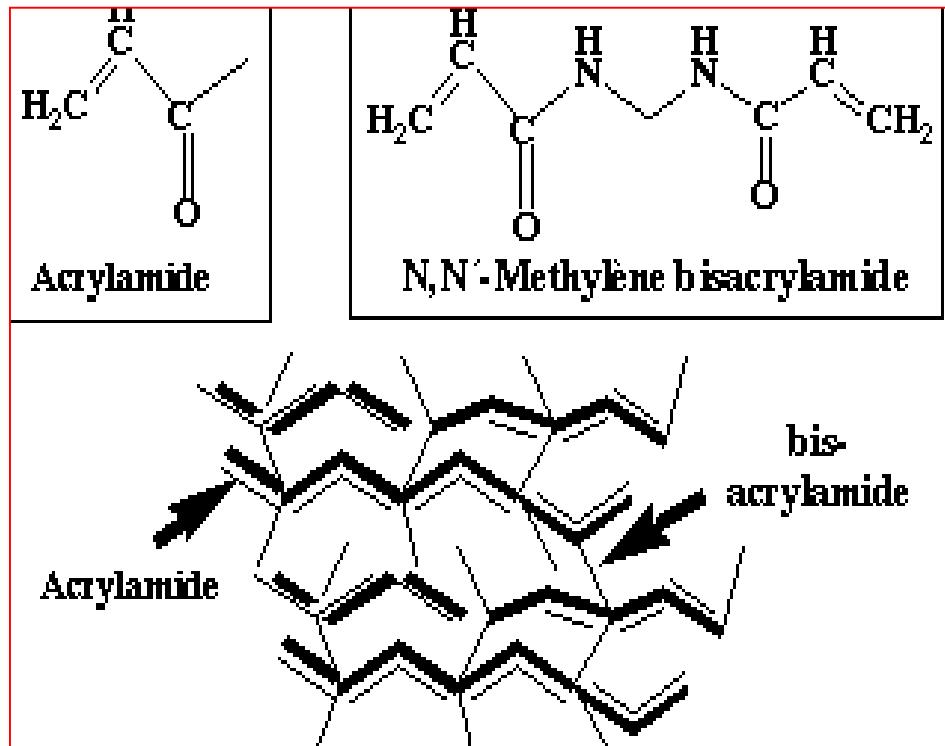
- petits fragments d'Acides Nucléiques (taille <1000 pb)
(purification oligonucléotides de synthèse (élimination nucléotides libres), détermination de séquences d'ADN)

La vitesse de migration dépend de:

- La charge nette
- La forme
- La taille



- Le gel de polyacrylamide est **un gel réticulé**, obtenu par polymérisation :
 - Acrylamide* ↗ qui forme des chaînes
 - bis-acrylamide* ↗ qui ponte les chaînes d'acrylamide
- Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé
- ↗ plus les mailles ou pores du réseau du gel sont serrées ou réticulées

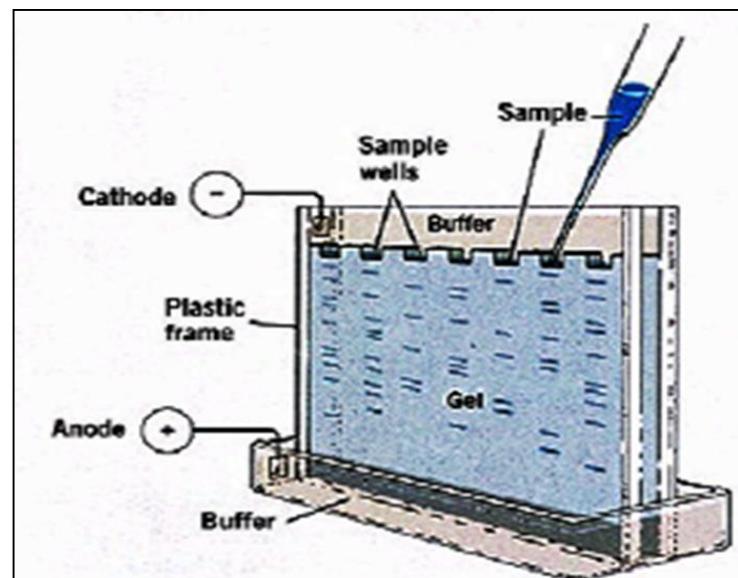


modification % polyacrylamide (3-30%)
 ↳ ≠ tailles des pores (tamis moléculaire)

% polyacrylamide dans gel dépend de la taille des macromolécules à séparer
 (Tableau donné à titre d'exemple)

	polyacrylamide	Gamme séparation
	7.5 %	40-400 kDa
	10 %	20-300 kDa
	12 %	15-200 kDa
	15 %	6-90 kDa

1. Le gel est coulé entre des **plaques de verre (moule)** fixées sur un support et un **peigne** est enchâssé entre ces plaques.
2. Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits.
3. Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse,
4. Du tampon d'électrophorèse conducteur est mis dans la cuve pH 8.3-8.8,
5. Les échantillons de protéines sont déposés dans les puits.
6. la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique :100 V - 150 V.
7. On surveille la migration grâce à un indicateur coloré chargé placé initialement dans la solution. Lorsque indicateur atteint l'extrémité inférieure de la plaque on arrête l'électrophorèse.
8. Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont révélées par une coloration (bleu de Coomassie)



C. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS- PAGE)

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE

Séparation de protéines réalisée en condition dénaturante, en présence de SDS

Sodium Dodécyl Sulfate ($C_{12}H_{25}SO_4^-$) détergent anionique

CH₃

CH₂

-O-

|

O

|

O

-

O

Na⁺

Les extraits protéiques mis à bouillir en présence d'un détergent et d'un agent réducteur

Protéine monomérique



SDS
beta-mercptoéthanol



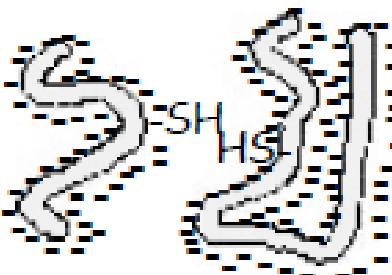
dénaturation

enrobe les protéines de charges (-)

Protéine multimérique



SDS
beta - mercptoéthanol



rupture des ponts di-sulfures

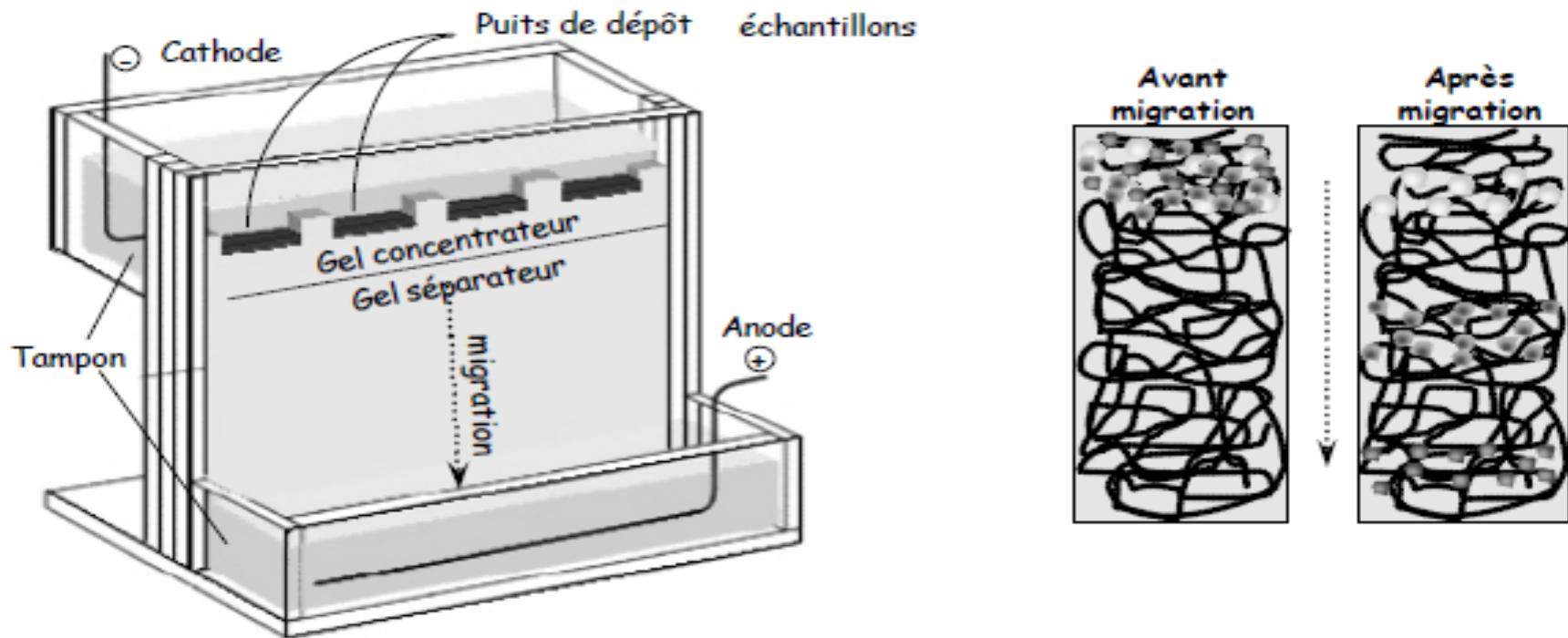
perte de la charge nette et de la structure III ou IV

Préparation d'un gel de séparation (résolution, 6-15% polyacrylamide) contenant du SDS

Un gel concentrateur (stacking gel, 3 à 5%) est coulé en haut du gel de séparation

=> entrée homogène de l'échantillon dans gel de séparation

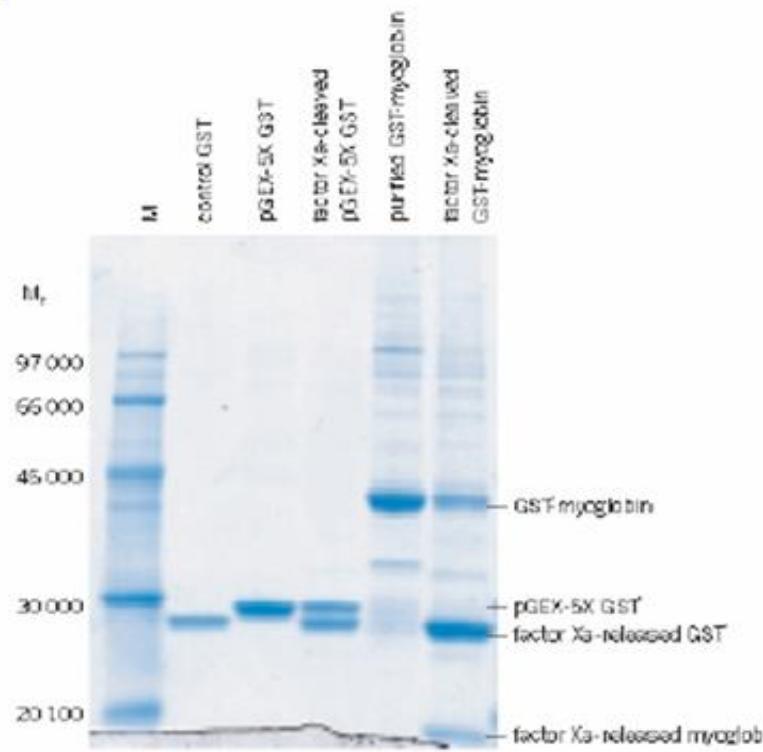
=> affine les bandes avant leur entrée dans le gel de résolution



Évaluation des masses moléculaires des protéines séparées, on utilise des standards =
mélange de protéines de masses moléculaires connues

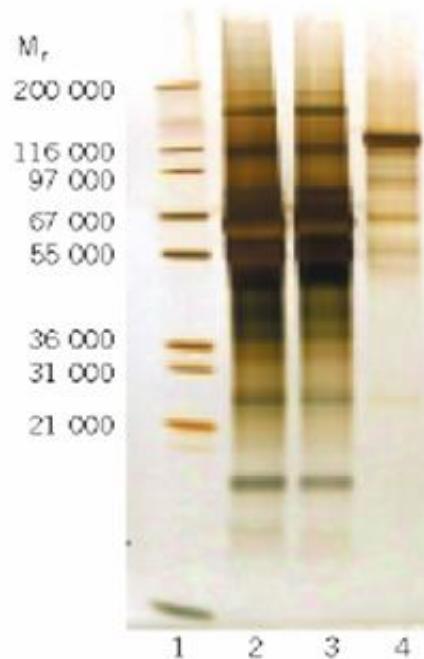
Révélation des protéines séparées dans le gel : **coloration** au bleu de Coomassie, nitrate d'argent (+ sensible), ou nouveaux colorants fluorescents

A



Coloration au Bleu de Coomassie brillant

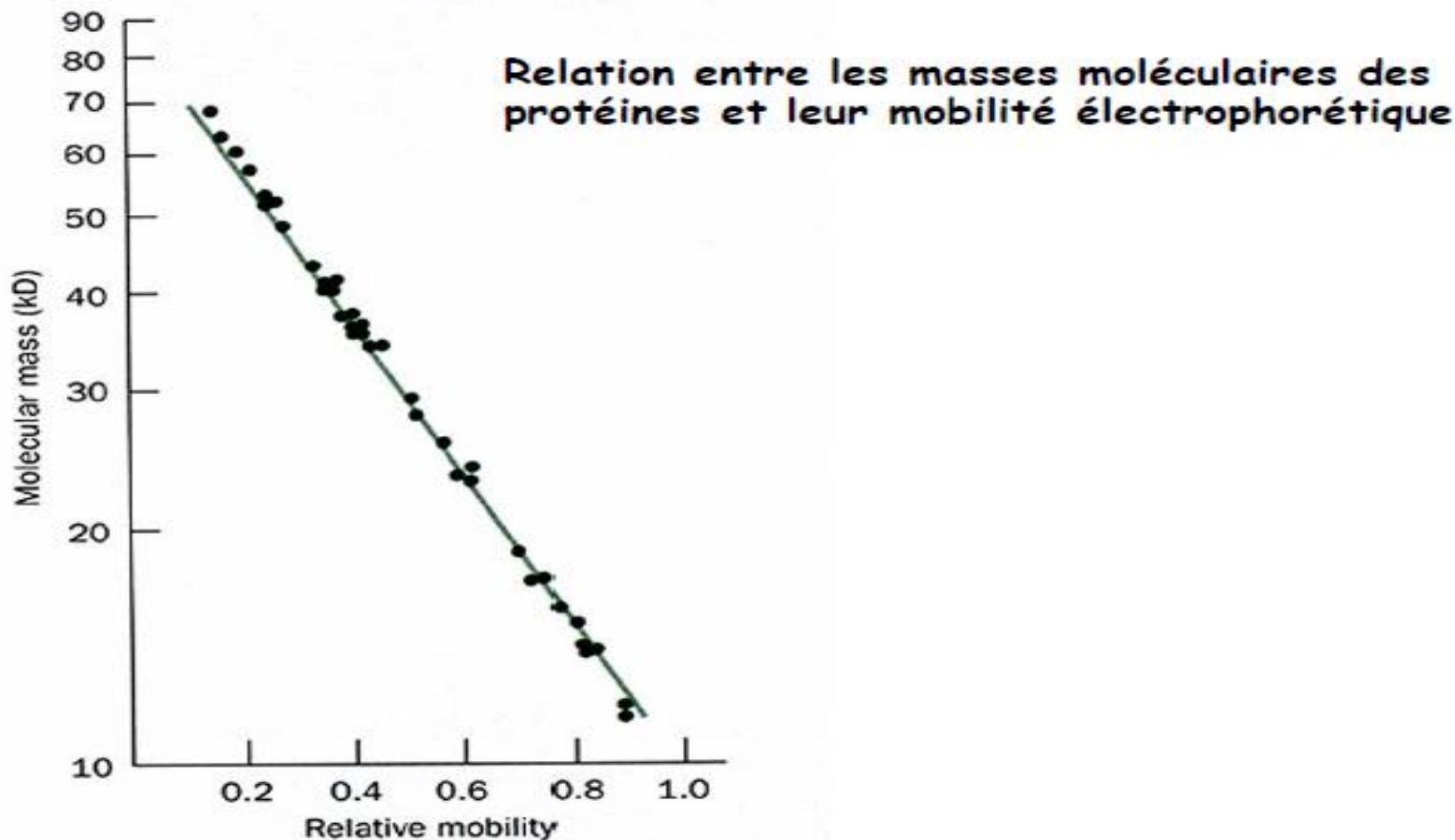
B



Coloration au nitrate d'argent

=> Visualisation de l'ensemble des protéines dans le gel.

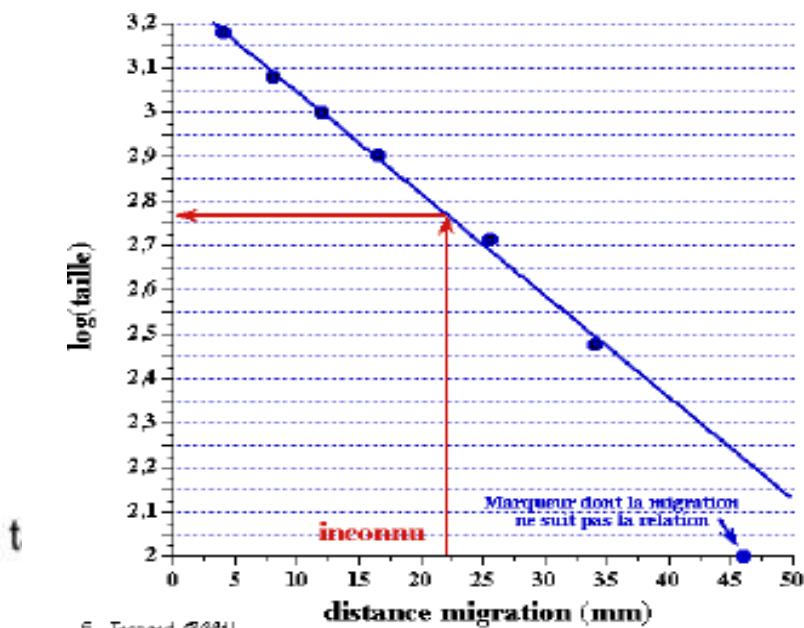
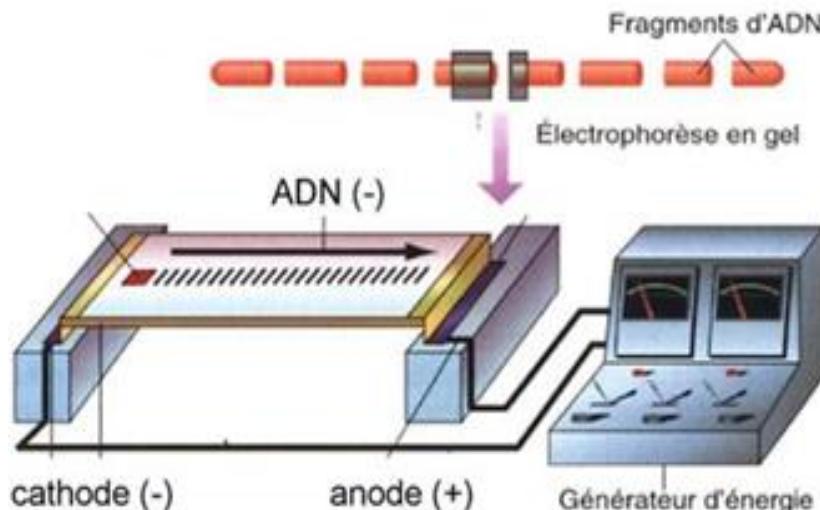
- il a été démontré qu'on peut obtenir une **relation linéaire entre la mobilité électrophorétique et le logarithme du poids moléculaire**



D. Electrophorèse sur gel d'agarose

Principe

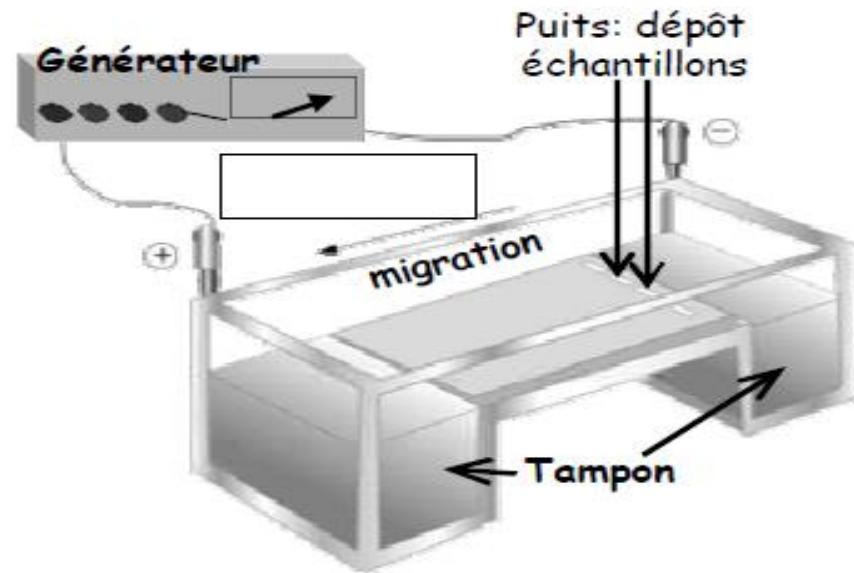
- La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique.
- Séparation s'effectuant à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.



Exemple d'application: séparation des acides nucléiques

Echantillons mélangés à 2 colorants (tampon de charge) avant dépôt dans le gel :

- Bleu de bromophénol dont migration est comparable à un fragment d'ADN de 300pb (tout petit fragment: migration très rapide)
- Xylène cyanol dont la migration est comparable à un fragment d'ADN de 4000pb (très gros fragment: migration la plus lente)



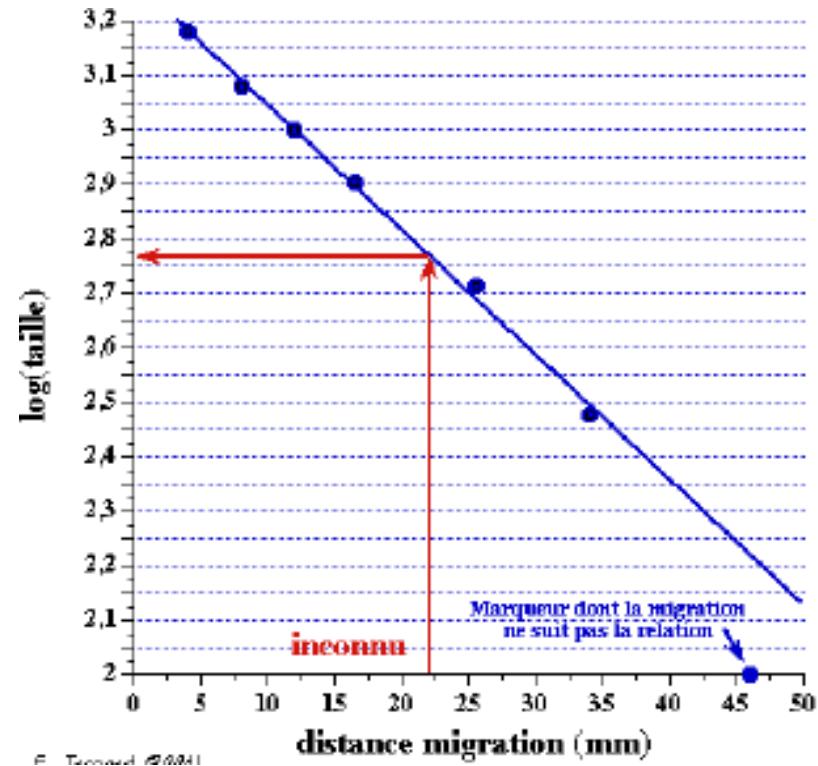
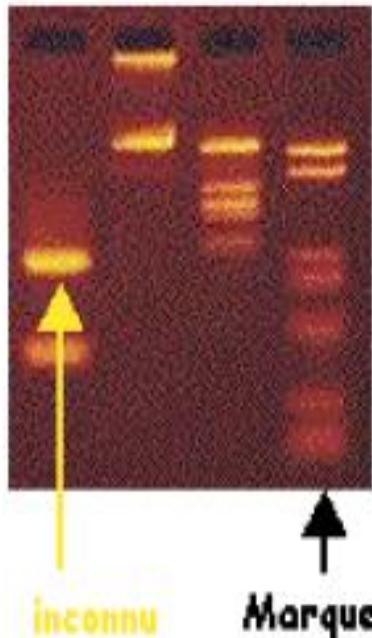
Révélation des bandes d'ADN par coloration : Bromure d'Ethidium (BET) / UV

Le BET s'intercale entre les plateaux de paires de bases. Eclairé par UV courts (UV 200-300nm) => fluorescence orangée. Visualisation : transilluminateur UV.

Seuil de détection : quelques nanogramme

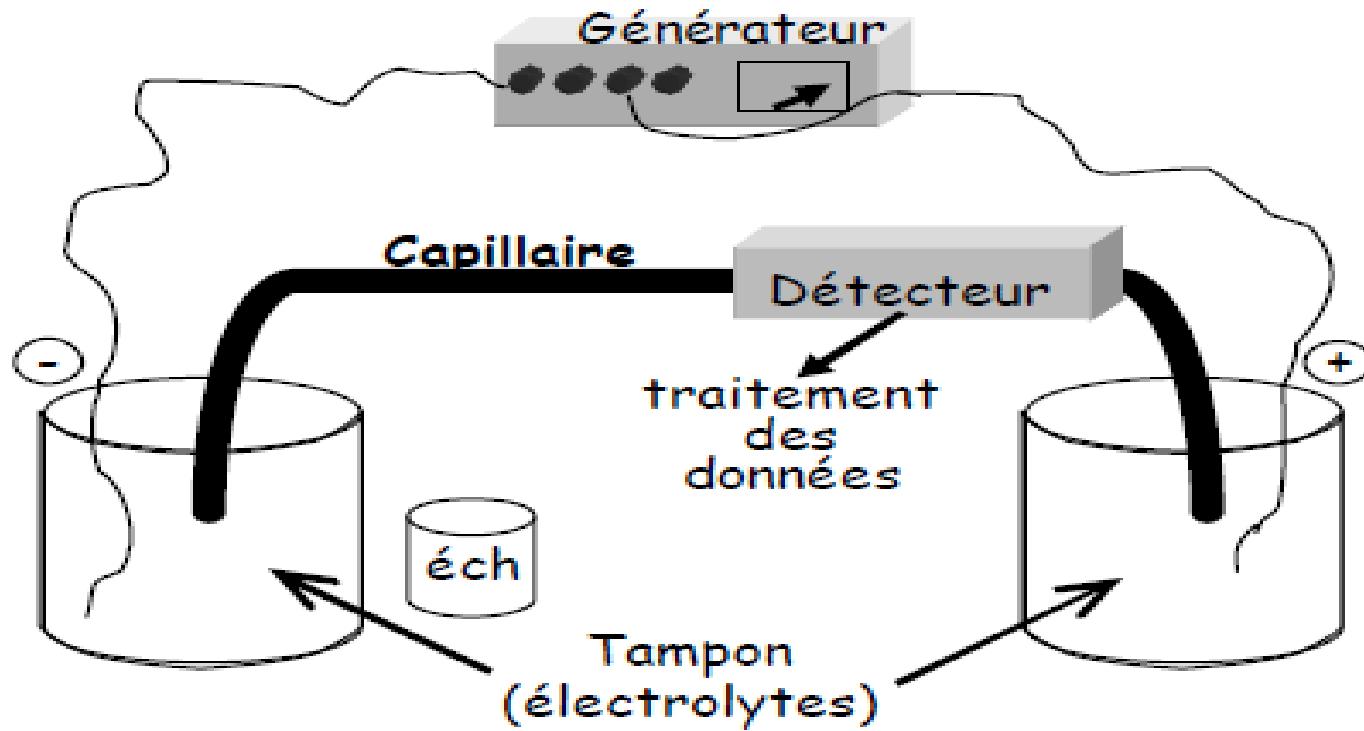
Évaluation des masses moléculaires des protéines séparées, on utilise des standards =
=> estimation de la quantité d'acide nucléique

- La droite $\log(\text{taille}) = f(\text{distance de migration})$ permet de déterminer la taille en paires de base d'un fragment d'ADN inconnu (figure de droite).



E/ Electrophorèse capillaire (CE)

Electrophorèse capillaire (CE): séparation d'espèces ioniques dans un tube capillaire rempli d'un électrolyte,



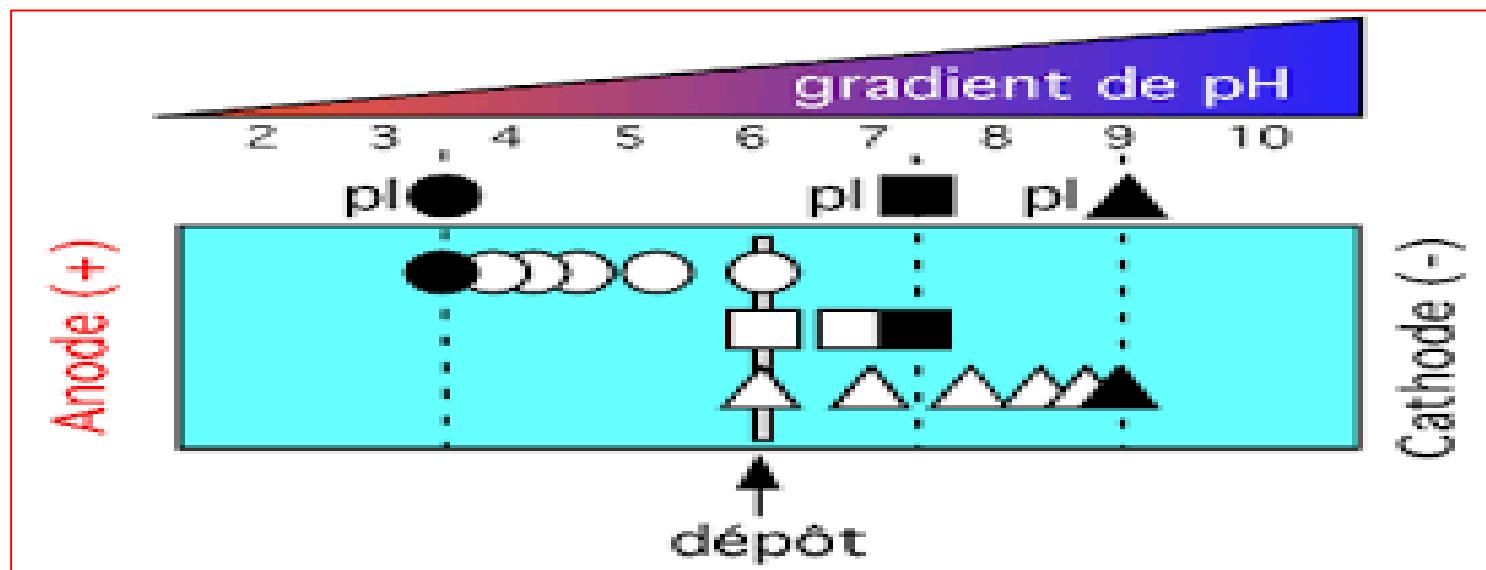
Séparation des composants dépend de la migration différentielle des analytes dans un champ électrique appliqué,

- Séparation par CE repose sur la présence d'un flux de solution électriquement induit dans le capillaire, **flux électroosmotique (EOF)**, pour pomper les solutés vers le détecteur ,
- Ions sont attirés à travers le capillaire, dans le même sens, par EOF ,
- Les analytes sont séparés pendant leur migration = mobilité électrophorétique différente;
- Capillaire inséré dans le détecteur , signal envoyé à une plateforme de traitement des données permet la détection en temps réel des pics séparés,

- Technique : rapide, haute résolution, très sensible et automatisable

E/ Electrofocalisation

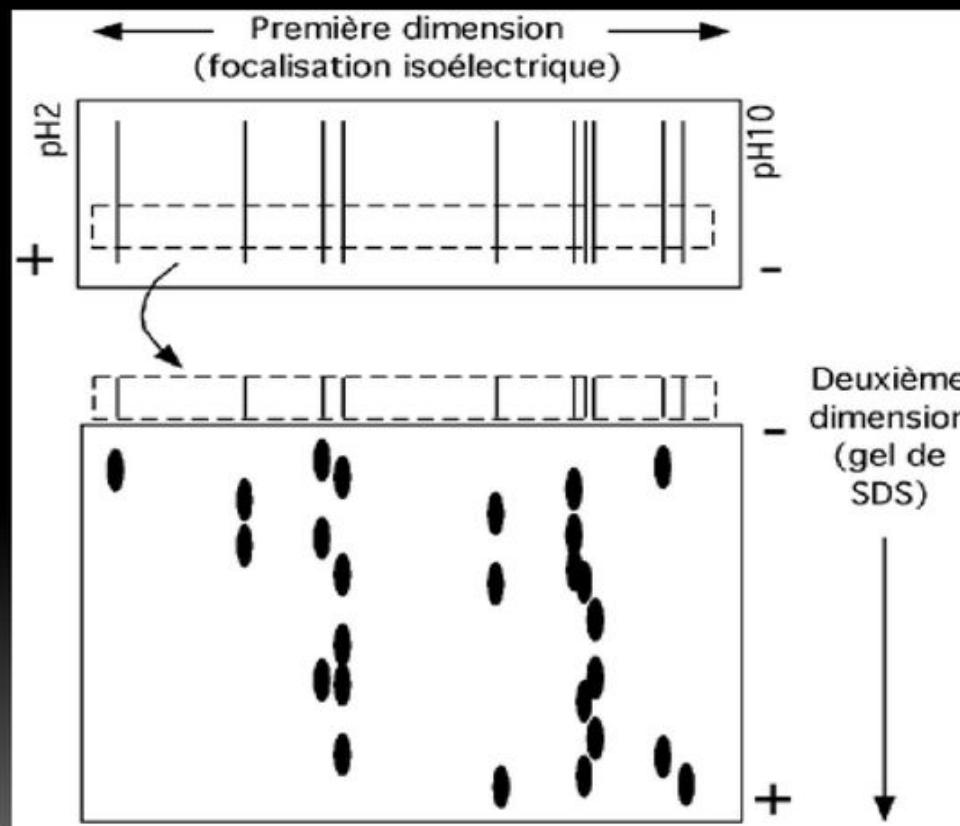
- La migration est effectuée dans un gradient de pH; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pH_i.
- On utilise un gel de forte porosité (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration.
- Le gradient de pH est généré par des ampholytes, introduites dans le gel au moment de sa fabrication, elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel.



ELECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

- On sépare:
 - ✓ selon le pH dans une dimension (IEF).
 - ✓ et selon la masse molaire dans l'autre dimension (PAGE-SDS);
 - ✓ on sépare ainsi environ 1000 protéines dans le sérum !
- On peut établir de cette manière la "carte d'identité protéique" des principaux tissus et organes humains.
- La lecture nécessite alors un système informatisé d'analyse d'images.

ELECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE

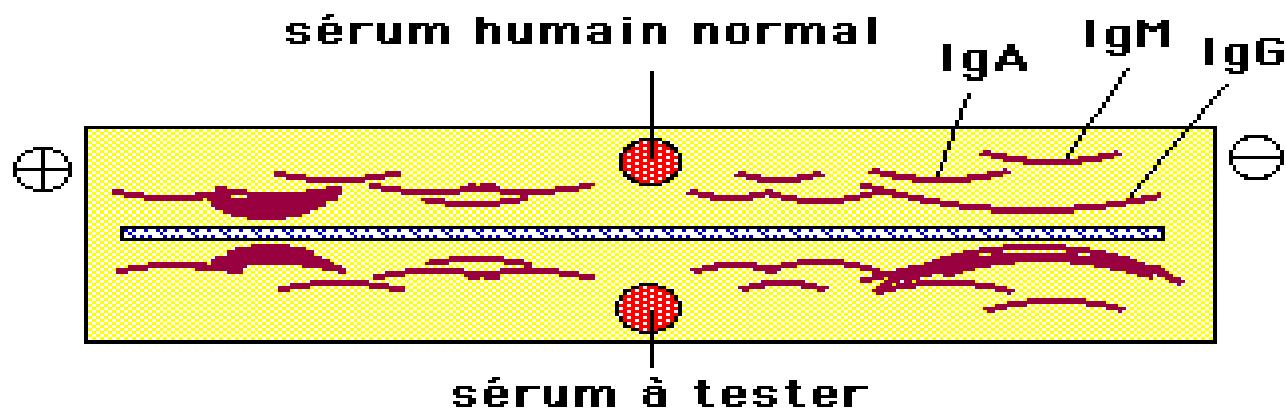


F-Immunoélectrophorèse

- La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps,
- il se forme des agrégats (= réaction d'immunoprécipitation.
- Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

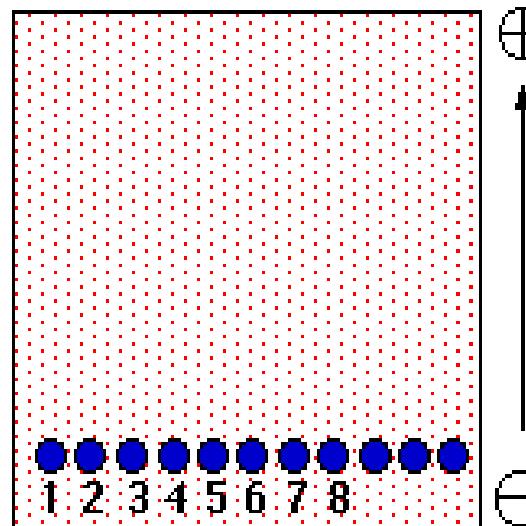
Les protéines migrent dans un gel d'agarose, puis on les révèle par une technique de double diffusion des antigènes et des anticorps, donnant des arcs de précipitation. Avec un antisérum total, on peut par exemple distinguer 30-40 protéines dans le sérum humain. On peut bien sûr l'utiliser également avec un antisérum spécifique.



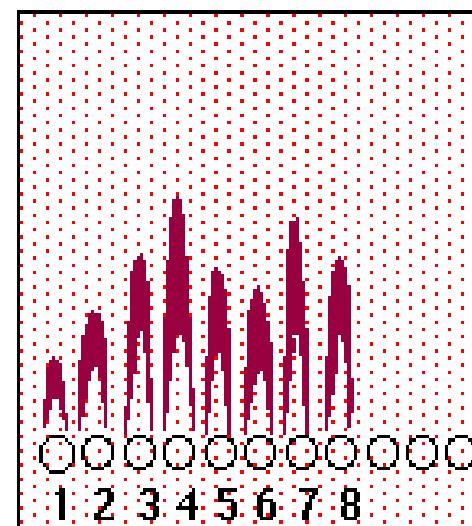
Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell

Les protéines sont déposées sur des gels contenant l'antisérum. Les protéines se déplacent et rencontrent les anticorps qui forment alors des précipités en forme de fusée appelés "rockets" dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en protéine. On utilise une partie des puits pour faire un étalonnage.

15 ml de gel d'agarose
contenant l'antisérum



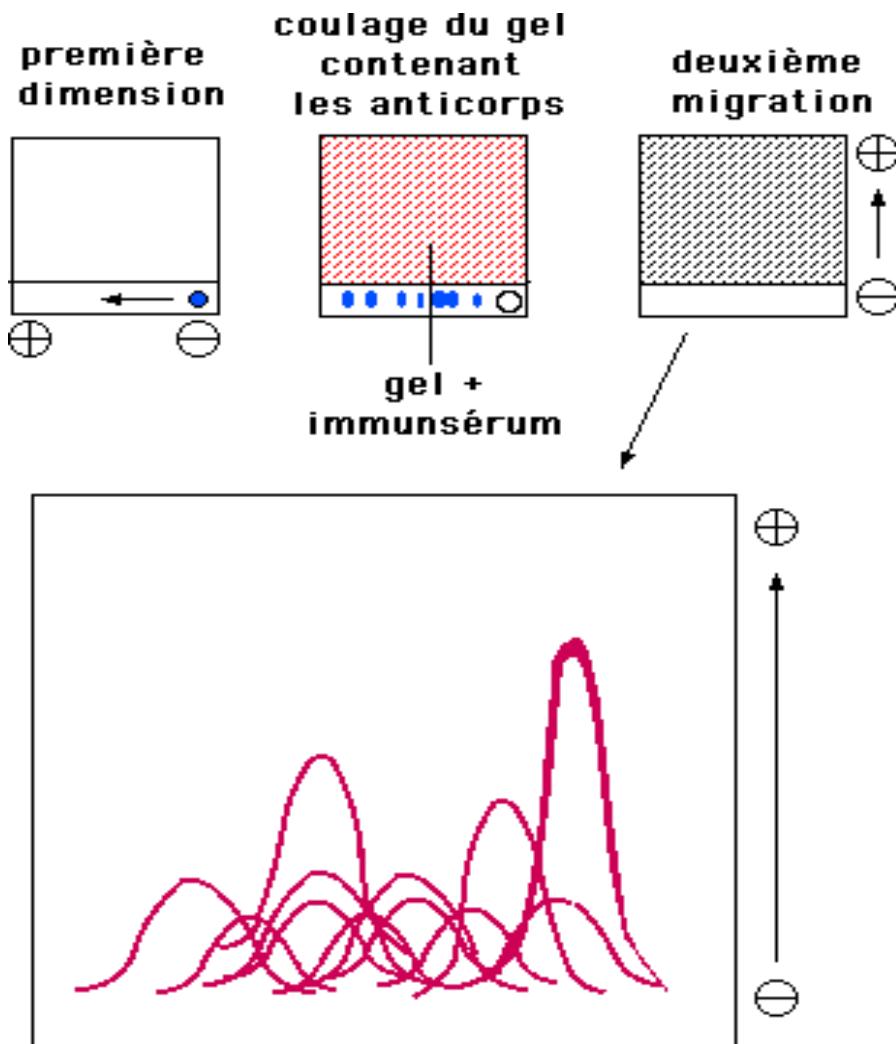
gamme
d'étalonnage



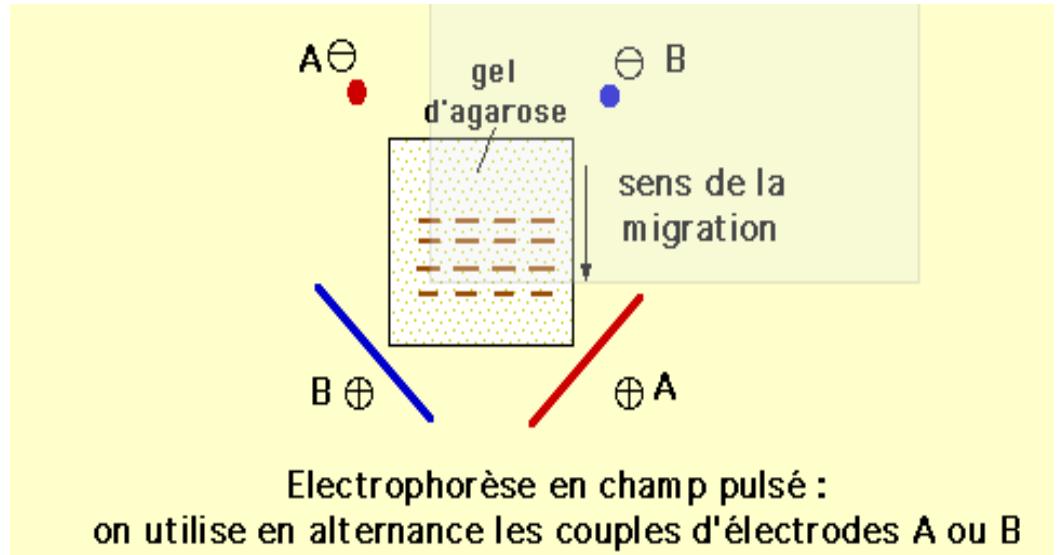
Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell)

On sépare les protéines dans une première dimension en gel d'agarose.

On coule ensuite un gel contenant l'immunsérum polyspécifique, puis on réalise la seconde dimension.



G/ Electrophorèse en champs pulsés



Cette technique est utilisée pour

l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb).

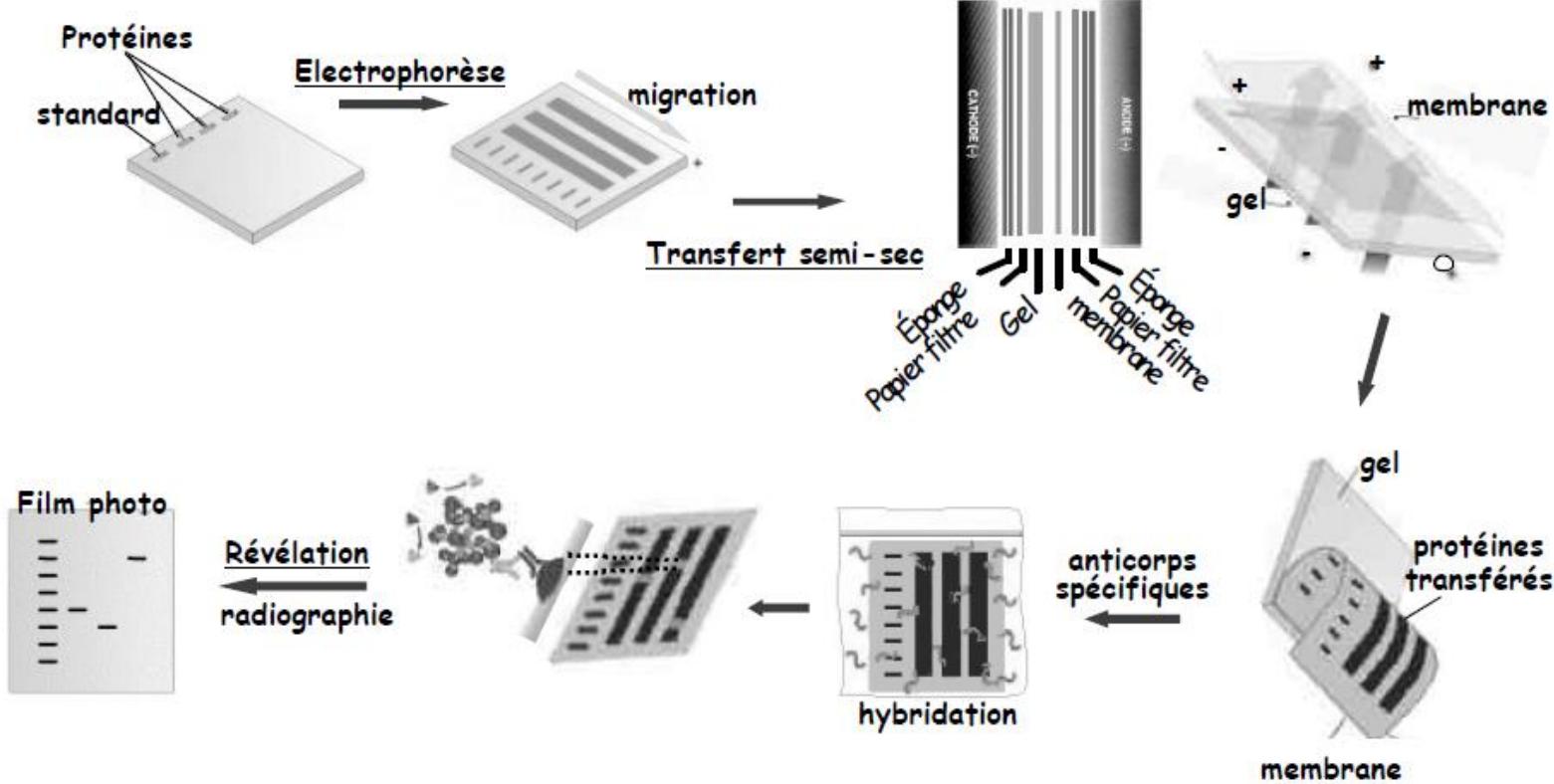
Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille,

Il devient alors possible de séparer les molécules en fonction de **leur longueur**. Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génome des procaryotes et des eucaryotes.

L'emploi de deux champs orthogonaux utilisés en alternance fait que les molécules d'ADN, qui mettent un certain temps à s'orienter dans le sens du champ électrique, ne migrent que lorsque celle-ci est réalisée. **Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue.**

Applications

WESTERN BLOT



Détection **espèces rares** ou de **variations d'expression protéique de faible intensité** :

besoin d'une méthode **TRES sensible** => Western Blot

Possible analyse semi-quantitative des espèces protéiques détectées

SOUTHERN & NORTHERN BLOTS

