

Electrophorèse

1.Principe

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Elle n'est donc pas adaptée à la séparation des lipides. 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. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations. Sans prétendre à l'exhaustivité, cet article présente les principales sortes d'électrophorèse, leurs intérêt et limite.

2.Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

Plusieurs facteurs peuvent influencer la mobilité électrophorétique.

2.1 Nature de la molécule

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. De même, la charge des molécules influence directement leur mobilité. La charge est fonction du pH pour les molécules ionisables, de la force ionique et de la formation éventuelle de complexes. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse.

2.2 Composition ionique du tampon d'électrophorèse

La présence d'ions étant nécessaire au passage du courant, un compromis est obtenu avec une force ionique comprise entre 0.05 et 1 mol/l. Le pH influe sur l'ionisation des acides faibles et bases faibles, pour lesquels il s'avère nécessaire de travailler dans un milieu tamponné.

A pH et force ionique identiques, deux tampons de nature différente ne produisent pas toujours des mobilités électrophorétiques identiques. Certaines substances ajoutées au tampon de migration modifient aussi les comportements électrophorétiques. Ainsi:

- La présence d'EDTA ou d'acide citrique favorise par complexation la séparation de certains ions minéraux.

- Les ions boratés forment avec les sucres des complexes chargés rendant ainsi possible leur séparation.
- L'addition d'urée modifie le comportement électrophorétique des macromolécules par rupture de liaisons hydrogène.

2.3 Support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration entraînant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme. Ces propriétés adsorbantes sont liées à la présence de certains groupements fonctionnels comme les hydroxyles.

2.4 Champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide: on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide: on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte. Les particules à séparer peuvent être de nature et de taille très différente: des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines.

3. Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Électrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle.

Électrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des

protéines. Le SDS (**Figure. 1**) est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative (**Fig. 2**). Les protéines transformées en monopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire

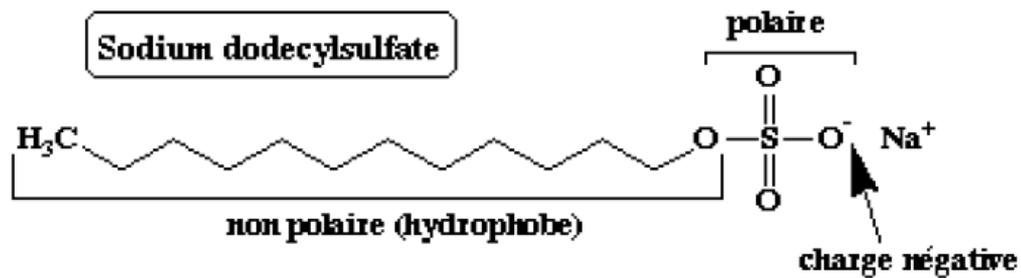


Figure 1. Structure chimique du SDS.

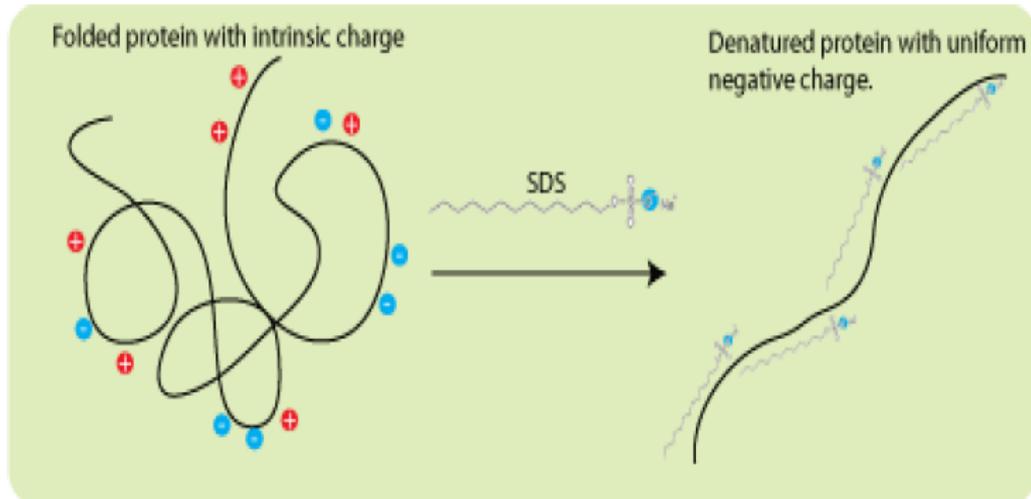


Figure 2. Action du SDS sur les protéines.

Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse:.

Electrophorèse 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 couteux, mise en oeuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

Electrophorèse 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 (PAGE), etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.).

Electrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide).

Les fractions séparées par électrophorèse de zone migrent comme des zones individuelles. La taille des pores pour le support en gel peut influencer la vitesse de migration (ralentissement du déplacement des grosses molécules).

Autres types d'électrophorèse

Il existe d'autres types d'électrophorèse: Electrophorèse bidimensionnelle, isoélectrofocalisation, électrophorèse en champ pulsé et immunoélectrophorèse.

Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pHi) et leur masse moléculaire. La séparation se fait en deux dimensions: La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pHi par isoélectrofocalisation (IEF) et la deuxième dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS.

Isoélectrofocalisation

La focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (valeur de pH à laquelle la molécule ne présente aucune charge nette). L'IEF est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles un gradient de pH est préétabli. Le gradient de pH est réalisé en imprégnant le gel avec un mélange de substances amphotères de points isoélectriques différents. Lorsque la différence de potentiel est appliquée,

les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leur point isoélectrique et réalisent un gradient de pH entre les deux électrodes. 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 (elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre point isoélectrique (**Figure.3**).

Les ampholytes sont des mélanges d'un certain nombre de molécules de faible masse moléculaire, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine.

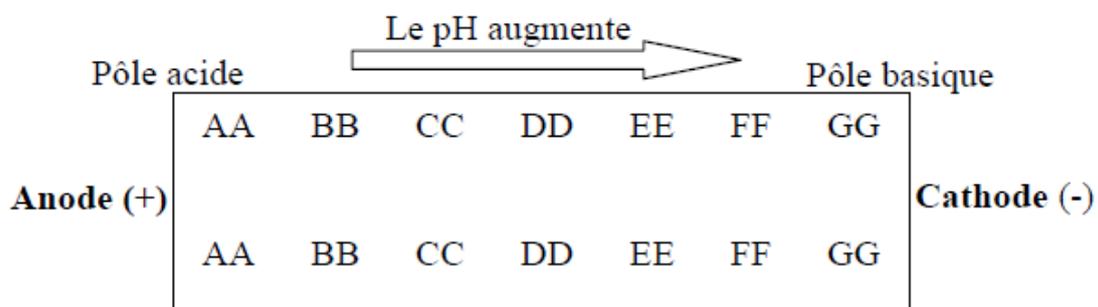


Figure 3. Gradient de pH en isoélectrofocalisation.

A, B, C, D, E, F et G sont des ampholytes de pH_i croissant de pH_i^A à pH_i^G . Les ampholytes à pH acide migrent vers l'anode, les ampholytes à pH basique migrent vers la cathode.

L'échantillon protéique est déposé dans un large puits au centre du gel. Les protéines migrent dans une direction ou dans l'autre jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur point isoélectrique, point où elles cessent de migrer.

Dans l'IEF, le gel de polyacrylamide doit être de forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration.

L'IEF est utilisée pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine inconnue par l'utilisation des marqueurs de point isoélectrique (standards), en traçant la droite d'étalonnage: $pH_i \text{ standards} = f(Rf)$. Il ya une relation linéaire entre le point isoélectrique des protéines et leur rapport frontal (**Figure.4**).

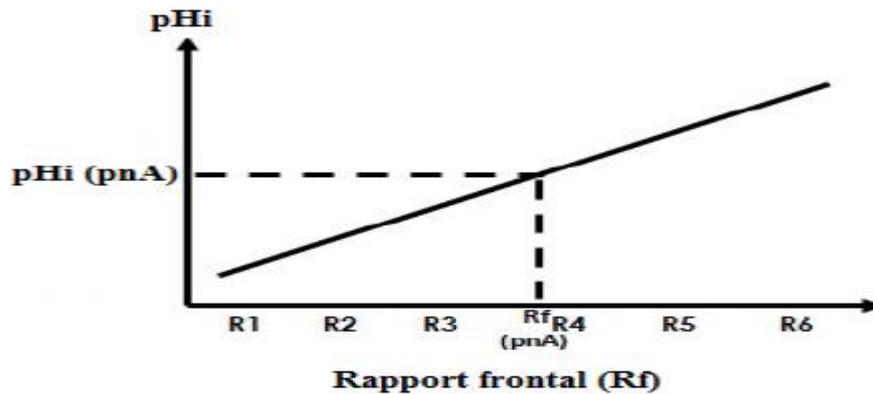


Figure 4. Mobilité des protéines en fonction de leur point isoélectrique. (pnA: protéine A de pHi inconnu).

Electrophorèse en champ pulsé

En 1984, Schwartz et Cantor, proposent une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose dont le pouvoir de séparation peut aller au moins jusqu'à 9 000 kb. Cette technique est utilisée lorsque l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide ne permet pas de séparer des molécules d'ADN dont la taille excède 50000 paires de bases (50 kb).

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.

Grâce à cette technique, il est pratiquement possible, pour tous les organismes à petit génome, procaryotes et eucaryotes inférieurs, de localiser très rapidement un gène quelconque.

Immunoélectrophorèse

Cette technique permet de séparer les composés par électrophorèse et de les détecter par réaction immunologique par formation d'arc de précipitation entre antigène et anticorps. Les précipités peuvent être facilement visualisés sur un gel. Donc, c'est une méthode qui associe l'électrophorèse de protéines (Ag) à une immuno-diffusion contre des Ac spécifiques.

Les antigènes sont séparés en électrophorèse de zones sur une lame de gel d'agar tamponné à pH variable de 8.2 à 8.6 est percée de deux puits au centre. Les fractions protéiques particulièrement mobiles du sérum (sérum-albumine, α_1 lipoprotéine, α_1 antitrypsine, haptoglobine, transferrine, β lipoprotéine, etc.) migrent vers l'anode à pH

8.2-8.6, comme sur l'acétate de cellulose (sens 1) (**Figure. 5**). Par contre, 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 (sens 2) (**Figure. 5**).

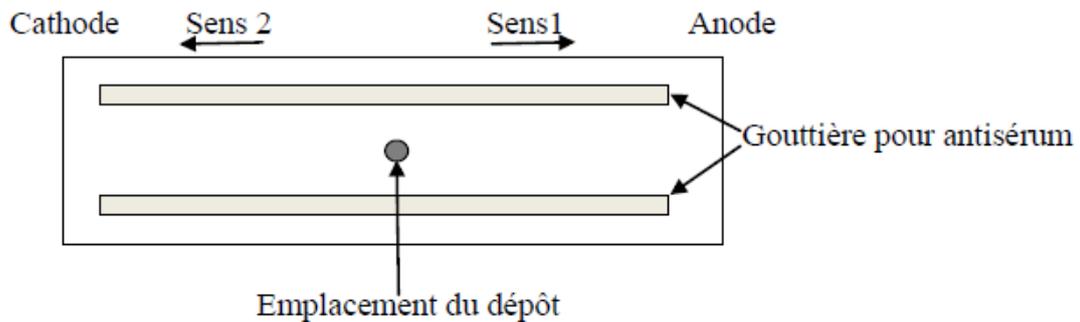


Figure 5. Lame d'immunoélectrophorèse

L'antisérum spécifique est déposé dans une rigole découpée parallèlement à la direction de la migration électrophorétique (**Figure.7**). La plaque est placée en chambre humide pendant 24 à 48 heures. Après cette période, les arcs de précipitation apparaissent.

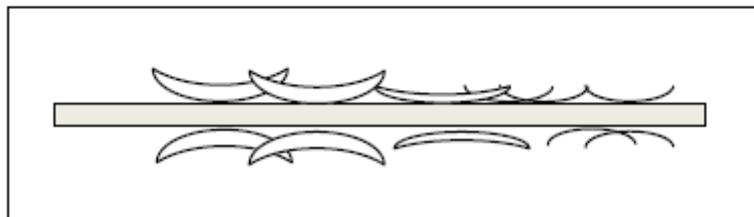


Figure 7. Immunoélectrophorèse d'un sérum.