

CHAPITRE VI LES TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

1. Historique

Dès le début du XVIII^e siècle, les travaux de Charles de COULOMB (1736-1806), Alessandro VOLTA (1745-1827) et André-Marie AMPERE (1775-1836) avaient permis l'émergence des premières lois de l'électrostatistique et de l'électricité.

Un siècle plus tard, en 1859, L'Allemand Georg Hermann QUINCKE découvre qu'il était possible de déplacer des particules colloïdales (sous forme de colle gélatineuse) sous l'action d'un champ électrique : ce phénomène est appelé cataphorèse.

Par la suite, Hermann Von HELMHOLTZ développe l'électro-osmose : sous un champ électrique, il observe que des particules chargées se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1892, LINDER S.E et PICTON.H exploitent cette observation pour la séparation de particules chargées.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse: l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer 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. Il a pu ainsi obtenir sur le pôle + des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle - des protéines de charge plus positive comme les globulines. Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

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.

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.

2. Définition

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse est une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

3. Principe

L'électrophorèse consiste à faire migrer et à fractionner grâce à un champ électrique, et dans un tampon de pH déterminé, les constituants séparés en fonction de leur charge électrique. Ce principe d'électrophorèse s'applique aux protéines et pour qu'ils puissent migrer, elles doivent être ionisées. C'est ce qui se produit lorsque le milieu est au pH alcalin supérieur au pH isoélectrique (pHi) de différentes protéines.

4. Appareillage d'électrophorèse

L'appareillage usuel est constitué de :

- Un générateur du courant continu stabilisé relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.
- Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments. Chaque compartiment est rempli du tampon de migration.
- Des accessoires comme le support d'électrophorèse, les plaques de verre pour couler le gel et les peignes pour creuser des puits dans le gel, dans lesquels les composés à analyser seront déposés.



Support



Cuve



Plaques de verre



Peigne

Figure 1 : Appareillage d'électrophorèse

5. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

Les facteurs influençant la mobilité électrophorétique sont en relation avec :

- **Les caractéristiques des molécules chargées :**

La mobilité électrophorétique dépend de la charge nette et de la taille, ce qui inclut la forme de la molécule et la masse moléculaire.

- **Les caractéristiques du système électrophorétique :**

Il existe un certain nombre de paramètres du système électrophorétique-lui-même qui peut influencer les séparations. Les plus importants sont :

- le pH du tampon, la composition ionique du tampon, le voltage appliqué, la température, le type de support.

6. Les différents types d'électrophorèses

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

6. 1. L'électrophorèse libre ou en veine liquide

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 œuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules).

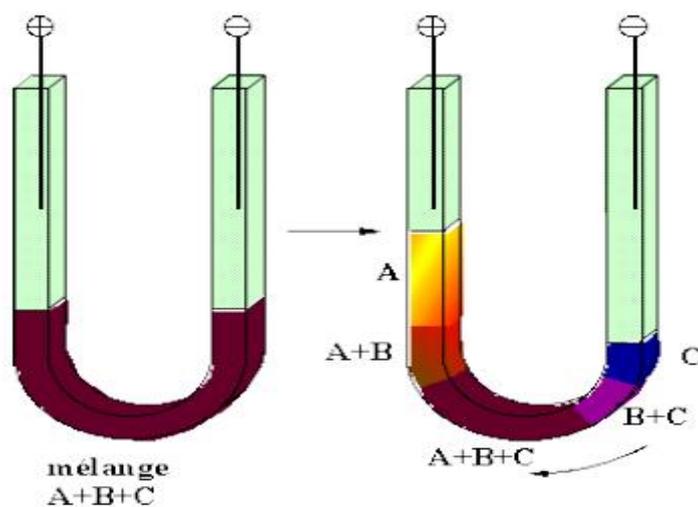


Figure 2. Appareillage pour l'électrophorèse en veine liquide

6. 2. L'électrophorèse sur supports poreux (électrophorèse de zone)

Ce type d'électrophorèse utilise un support poreux pour stabiliser la phase liquide. Le support doit être homogène, poreux et inerte. Différents types de support peuvent être utilisés.

• Différents supports d'électrophorèse de zones :

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

- papier
- acétate de cellulose

- semi-solide (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).

6. 2. 1. Électrophorèse sur papier

Cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine.

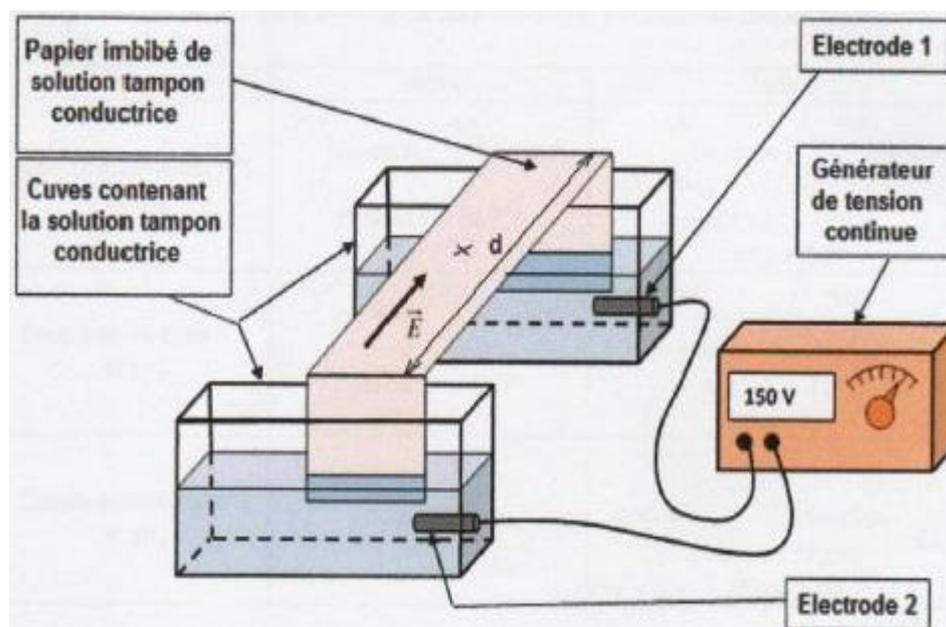


Figure 3. Appareillage pour l'électrophorèse sur papier.

6. 2. 2. Électrophorèse sur acétate de cellulose

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques.

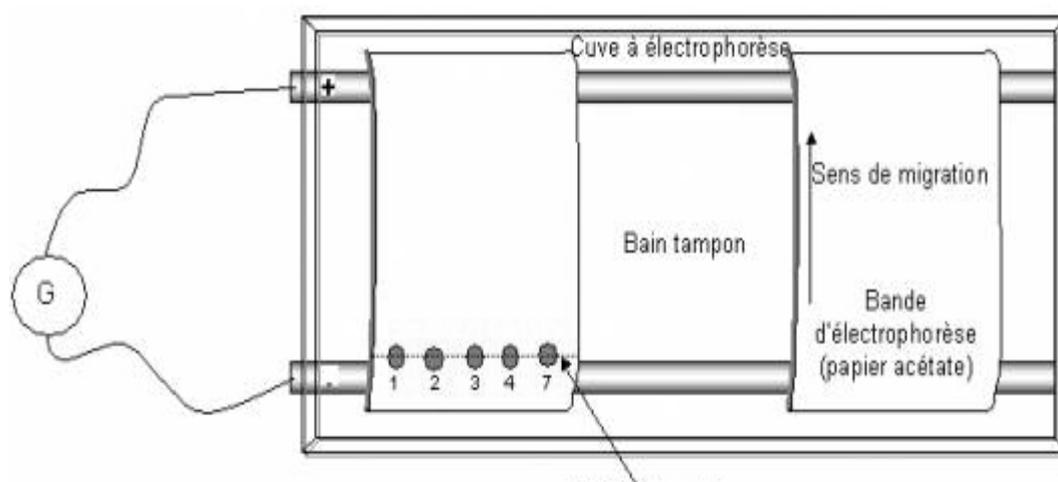


Figure 4. Appareillage pour l'électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose.

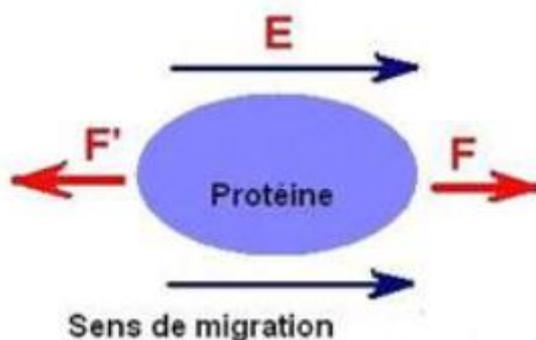
6. 2. 3. Électrophorèse sur gel

La technique de l'électrophorèse sur gel est utilisée pour séparer les acides nucléiques et les protéines. La séparation de macromolécules dépend de deux variables : la charge et la masse. Lorsqu'un échantillon biologique tel qu'un ADN est mélangé à une solution tampon et appliqué sur un gel, il se produit une interaction des deux variables. Les molécules repoussées d'un côté par le courant électrique produit par une électrode sont attirées simultanément par le courant produit par l'autre électrode. La force de friction du matériau composant le gel joue le rôle de « tamis moléculaire » et sépare les molécules en fonction de leur taille. Durant l'électrophorèse, les macromolécules sont poussées à travers les pores. Leur vitesse de migration à travers le champ électrique dépend des facteurs suivants :

- la résistance du champ
- la taille et la forme des molécules
- l'hydrophobicité relative des échantillons

- la force ionique et la température du tampon dans lequel les molécules se déplacent.

Sous l'action d'un champ électrique, E, une protéine se déplace avec une vitesse (v) proportionnelle aux champs:



$V = \mu E$, avec μ appelée « **mobilité électro phorétique** »

$$\mu = \frac{V}{E}$$

μ en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$, v en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ et E en $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

Le champ électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force, F, sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q.

$$F = q \cdot E$$

Les forces de frottement, F', dues à la viscosité (η) vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner.

$$F' = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot V$$

Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent, et la particule se déplace alors à vitesse constante; on peut alors écrire :

$$F = F'$$

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot V \quad \text{soit} \quad V = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

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

$$\mu = \frac{V}{E} \quad (\text{vitesse de migration pour un champ électrique de } 1 \text{ Volt/cm})$$

$$\text{Soit encore } \mu = \frac{q}{6.\pi.\eta .r}$$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs : q , (η) et r .

Elle est proportionnelle à sa charge (q), inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η) et son rayon (r). La mobilité est une caractéristique de chaque particule, il est donc possible d'effectuer une séparation en se basant sur cette propriété.

6. 2. 4. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire :

- Soit à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité.
- Soit à des fins préparatoires, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside.

L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (surfusion) Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne fond pas tant que la température reste inférieure à 100 °C.

D'une manière générale, l'agarose forme des gels dont la réticulation est assez faible, permettant la séparation de molécules de très hautes masses moléculaires. Ils sont principalement utilisés pour séparer des molécules d'ADN ou d'ARN. Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

Plus que le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus que la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées. Par conséquent, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, moins les molécules volumineuses peuvent migrer. Donc, plus que la masse moléculaire du composé est élevée, plus que la migration est lente.

- Avant que le mélange réactionnel n'ait durci, il est coulé dans un récipient formé par deux plaques de verres et polymérisera en une couche mince de gel de quelques Millimètres.
- Les échantillons sont déposés dans des puits préformés au sommet du gel.
- Le tampon est le même dans les réservoirs du haut et du bas (pH ~9 pour que toutes les protéines aient une charge négative).
- Un courant continu de 100 à 200 volts parcourt le gel pendant la durée de migration
- après migration, le gel est retiré et les bandes de protéine sont visualisées

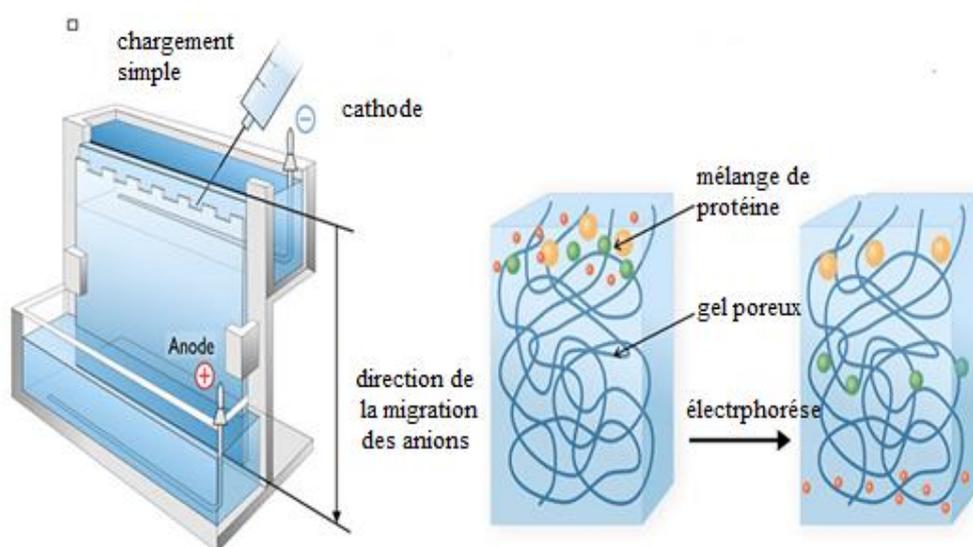


Figure 6. Appareillage pour l'électrophorèse en gel Polyacrylamide

6. 3. Visualisation des protéines dans les gels

Une fois que la migration des protéines dans le gel est terminée, il faut visualiser les bandes obtenues par les protéines

- les différentes approches sont:

- la coloration avec le bleu de Coomassie brillant
- la coloration au nitrate d'argent.
- Le bleu noir naphthol.

6. 4. 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.

6. 5. 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 7) 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 (Figure 8). Les protéines transformées en manopolyanions, 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.

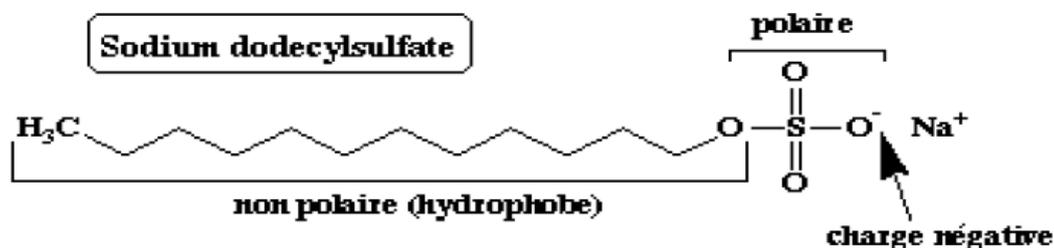


Figure 7. Structure chimique du SDS.

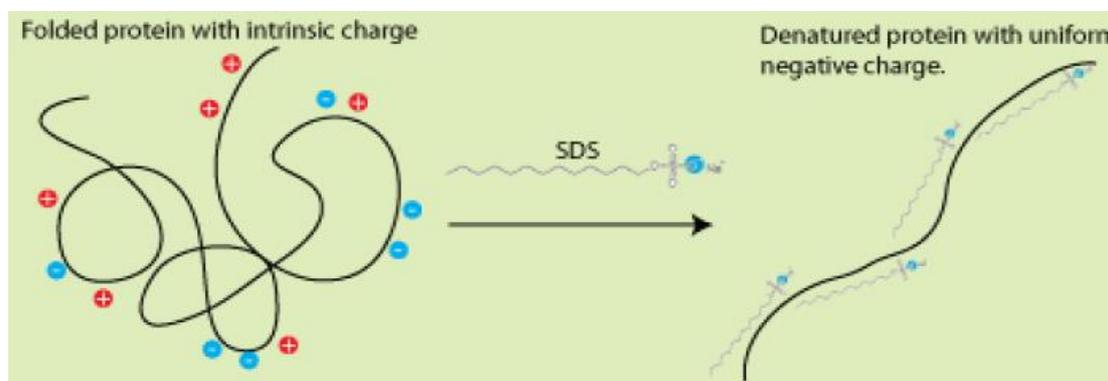


Figure 8. Action du SDS sur les protéines.

On peut aussi déterminer l'oligométrie d'une protéine en mettant en corrélation le poids moléculaire trouvé par gel filtration (conditions natives) avec ceux des sous-unités trouvés par SDS-PAGE (conditions dénaturantes).

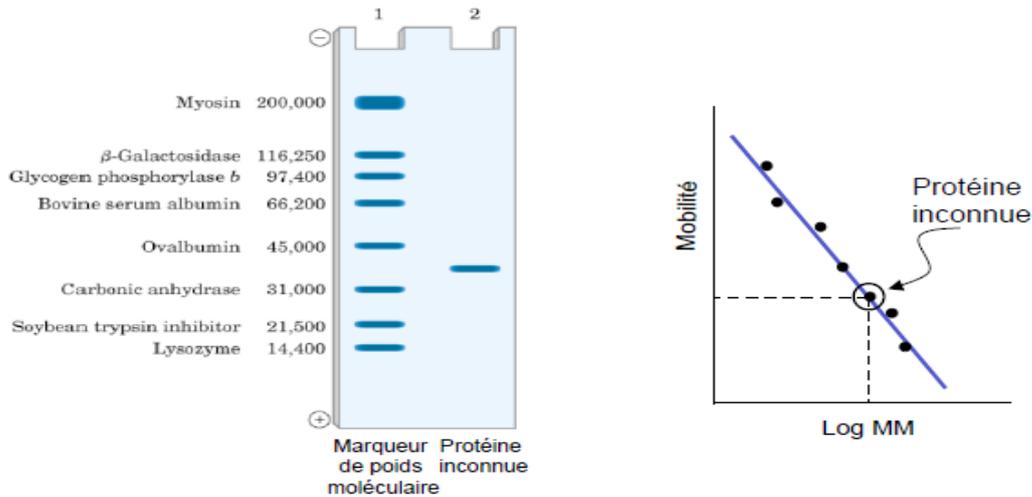


Figure 9. Mobilité des protéines en fonction du logarithme de leur masse moléculaire.

6.6. Électrophorèse à focalisation isoélectrique (CIEF)

Cette technique également connue en électrophorèse sur support, consiste à créer un gradient de pH linéaire dans un capillaire à paroi traitée contenant un ampholyte. Le capillaire plonge dans H_3PO_4 à l'anode et dans NaOH à la cathode. Chaque composé migre et se focalise au pH qui a même valeur que son potentiel isoélectrique (au pI, sa charge nette est nulle). Ensuite, sous l'effet d'une pression hydrostatatique et en maintenant le champ électrique, on déplace les espèces séparées vers le détecteur. Les résolutions élevées obtenues avec ce procédé, permettent notamment de séparer des peptides dont les pI ne diffèrent que de 0,02 unité pH.

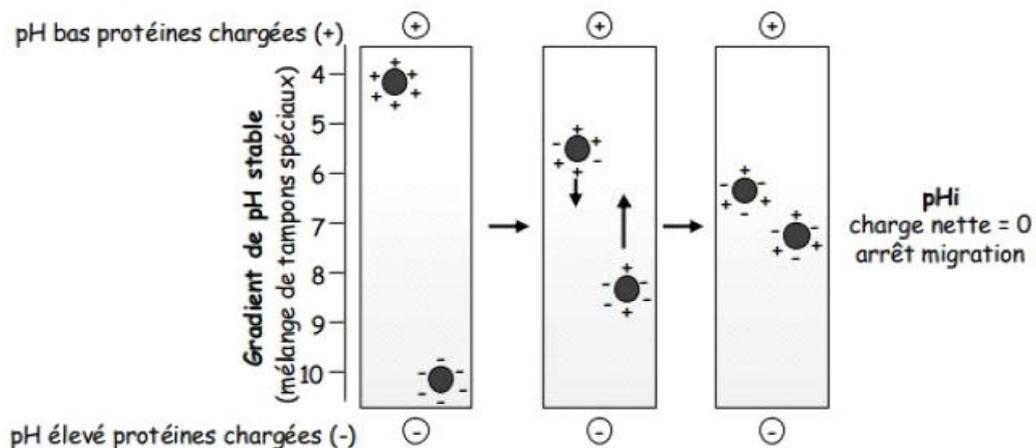


Figure 10. Gradient de pH en isoélectrofocalisation

6.7. Électrophorèse bidimensionnelle

Lorsqu'il est existé des bandes protéiques très proches, on a un chevauchement. Par les méthodes unidimensionnelles la résolution est bon pour moins de 50 protéines. Grâce à l'électrophorèse bidimensionnelle, on combine deux modes de séparation différents. La résolution peut être appliquée pour plus de 1000 protéines différentes.

•Dimension 1

Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation Isoélectrique (FIE). La migration est effectuée dans un gradient de pH, chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. 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 : on utilise un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large ex :3-9, ou plus ou moins étroite ex : 4-5 ou 5-6.5)

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.

Les protéines migrent vers la position du gradient = pHi et s'y immobilisent.

•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.

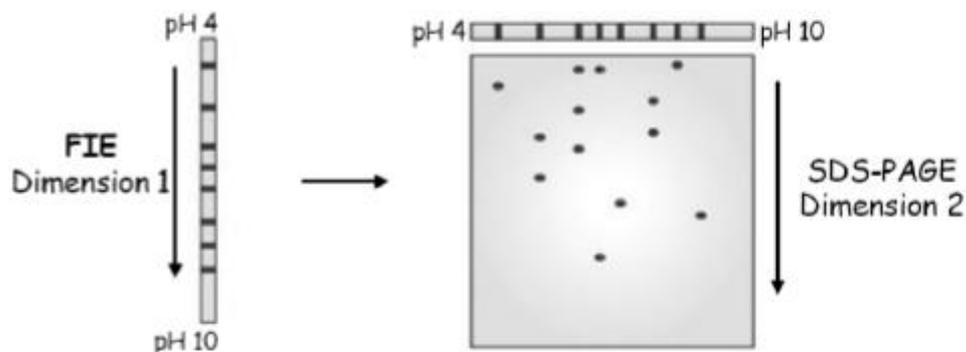


Figure 11. Électrophorèse bidimensionnelle

6.8. Électrophorèse capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50 µm et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 à 30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption U.V., 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 500 000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable (on peut séparer des peptides différant d'un acide aminé, des mélanges complexes d'oligonucléotides, des fragments tryptiques de peptides ; la méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse...). La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.

6.9. Électrophorèse 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 50 000 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.

6.10. Immunoélectrophorèse

La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps". On mettra de côté l'immunoblot, qui consiste à visualiser des protéines sur un gel (la fixation d'Ac étant révélée par un second anticorps marqué). Les techniques ci dessous utilisent le fait qu'à des concentrations adéquates, du fait de la présence de familles d'anticorps (polyclonaux) et de la bivalence de ces anticorps, il se forme des agrégats (réaction d'immunoprécipitation). Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

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.

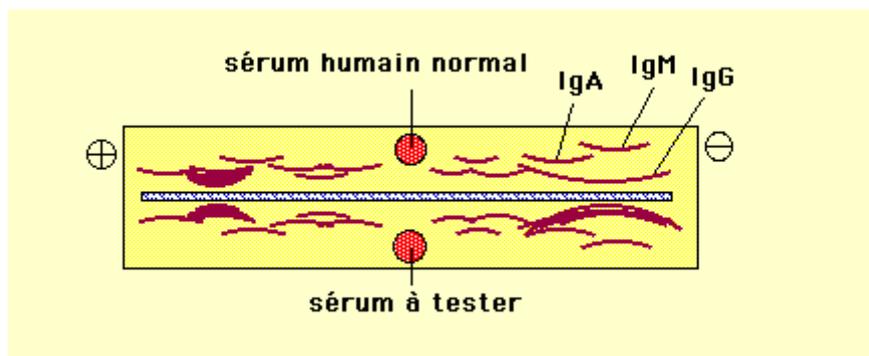


Figure 12. Immunoélectrophorèse d'un sérum.