

Les méthodes électrophorétiques

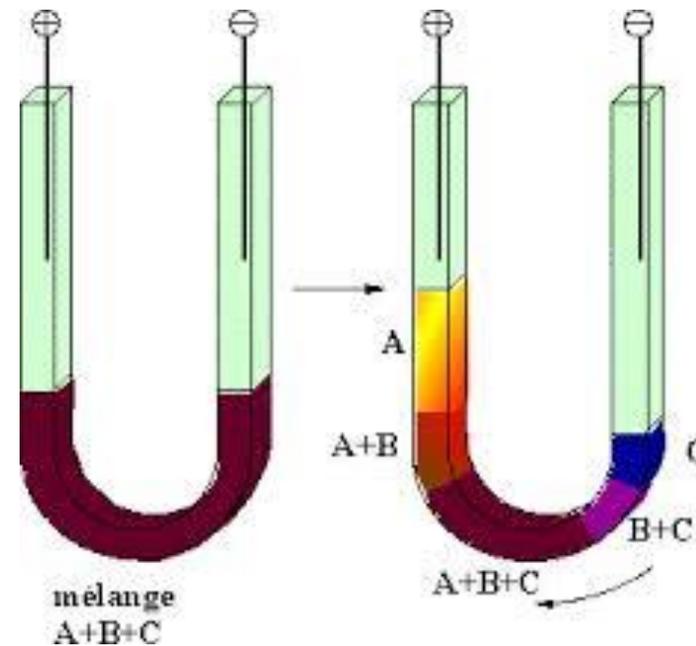
Principe : électrophorèse = méthode de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique.
Les molécules anionique (-) migrent vers l'anodes (électrode positive) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (électrode négative).

Cette méthode 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 bidimensionnels (technique de départ en protéomique), selon 2 paramètres : masse molaire et point isoélectrique (focalisation isoélectrique).
- de séquencer l'ADN.
- de déterminer la taille de fragments d'ADN.
- de séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique du northern-blot (ARN) ou du Southern-blot (ADN).
- d'établir le profil de restriction (hydrolyse par des enzymes de restriction) de fragments d'ADN.
- *etc.*

1. Électrophorèse en veine liquide

L'électrophorèse libre, en veine liquide selon TISÉLIUS (1937, prix Nobel 1949), est réalisée dans un tube en U de section carrée avec une électrode à chaque extrémité.



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, *etc.*).

La migration d'une particule chargée au sein d'un champ électrique, dans le cas d'une électrophorèse en veine liquide, dépend de plusieurs facteurs :

✓ LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE ABSOLUE μ DE LA PARTICULE :

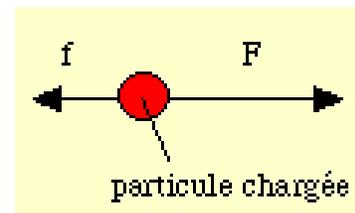
La mobilité électrophorétique absolue μ d'une particule dépend de sa charge q et de sa géométrie.

Une particule de charge électrique q , placée dans un champ électrique E , est soumise à une force F qui l'entraîne vers l'électrode de signe opposé :

$$F = q \cdot E$$

Des forces de frottements f , dues à la viscosité du milieu η (qui dépend de la température) s'opposent à la migration de la particule, et ce d'autant plus que la taille de la particule ($r =$ rayon de Stokes) est grande et que la vitesse de migration v est grande :

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



Il arrive un moment où ces deux forces s'équilibrent \Rightarrow la particule se déplace alors à une vitesse v constante.
On peut alors écrire :

$$F = f ; \text{ donc } q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v$$

$$\text{d'où : } v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

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

$$\mu = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

Donc :

$$v = \mu \cdot E$$

Donc la vitesse de déplacement d'une particule globulaire chargée au sein d'un champ électrique E , dans le cas d'une électrophorèse en veine liquide est :

- inversement proportionnelle à la viscosité du milieu η ,
- inversement proportionnelle à sa taille r ,
- proportionnelle à sa charge q .

Le rapport $\frac{q}{r}$ est appelé **densité de charge**.

✓ LA CHARGE q DE LA PARTICULE :

La charge q d'une particule est fonction de son **pH isoélectrique** et du **pH du tampon de migration**.

pH isoélectrique, ou point isoélectrique $pI = pH$ pour lequel la particule ne migre plus dans un champ électrique car sa charge électrique nette est nulle.

Pour les molécules de petite taille, on peut prévoir la valeur du pH_i , à partir des pK_a des différents groupements ionisables de la molécule.

Mais cela n'est pas possible pour les macromolécules, car leur environnement ionique modifie notablement leur charge réelle.

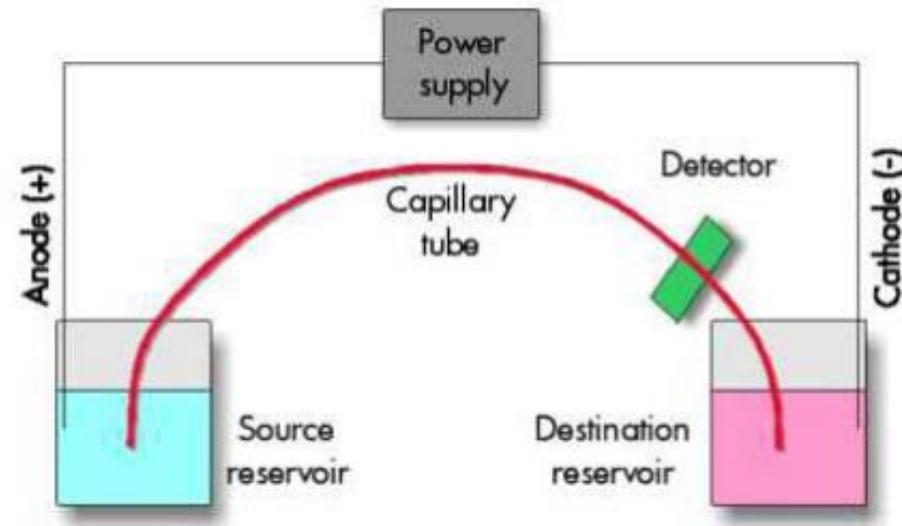
La comparaison entre le pH_i de la particule et le pH du tampon de migration détermine le signe de la charge q de la particule :

- si $pH_{\text{tampon de migration}} < pH_i$ \Rightarrow charge électrique nette positive (forme cationique) de la particule.
 \Rightarrow migration de la particule vers la cathode (électrode négative)
- si $pH_{\text{tampon de migration}} > pH_i$ \Rightarrow charge électrique nette négative (forme anionique) de la particule.
 \Rightarrow migration de la particule vers l'anode (électrode positive)
- si $pH_{\text{tampon de migration}} = pH_i$ \Rightarrow charge électrique nette nulle de la particule
 \Rightarrow pas de migration de la particule

✓ LE CHAMP ÉLECTRIQUE E :

Le champ électrique E peut être calculé par la relation suivante : $E = \frac{V}{\mu}$

Le principe de l'électrophorèse en veine liquide est utilisée en recherche pour mesurer la mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines. On parle aujourd'hui d'électrophorèse capillaire.



Cette technique 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 50 kV)

⇒ courant d'électroosmose important :

⇒ les particules chargées migrent rapidement majoritairement vers la cathode : les particules cationiques plus rapidement que les particules anioniques..

La **détection des composés séparés se fait directement sur l'extrémité du capillaire** (absorption UV, fluorimétrie, conductimétrie, etc.)

Avantages : - vitesses de migration très élevées,
- grande résolution,
- rapidité,
- faible consommation d'échantillon et de tampon de migration.

Applications : - séparation d'oligonucléotides,
- test de pureté de peptides et protéines,
- mise en évidence de petites molécules dans les liquides biologiques.

2. Électrophorèse de zone, ou électrophorèse sur support

Électrophorèse de zone = migration sur ou dans un support inerte et poreux imbibé d'un tampon de migration.

2.1. Mobilité d'une molécule en électrophorèse de zone

Le support influence la mobilité d'une molécule de façon importante.

On observe alors une mobilité électrophorétique dite apparente qui dépend :

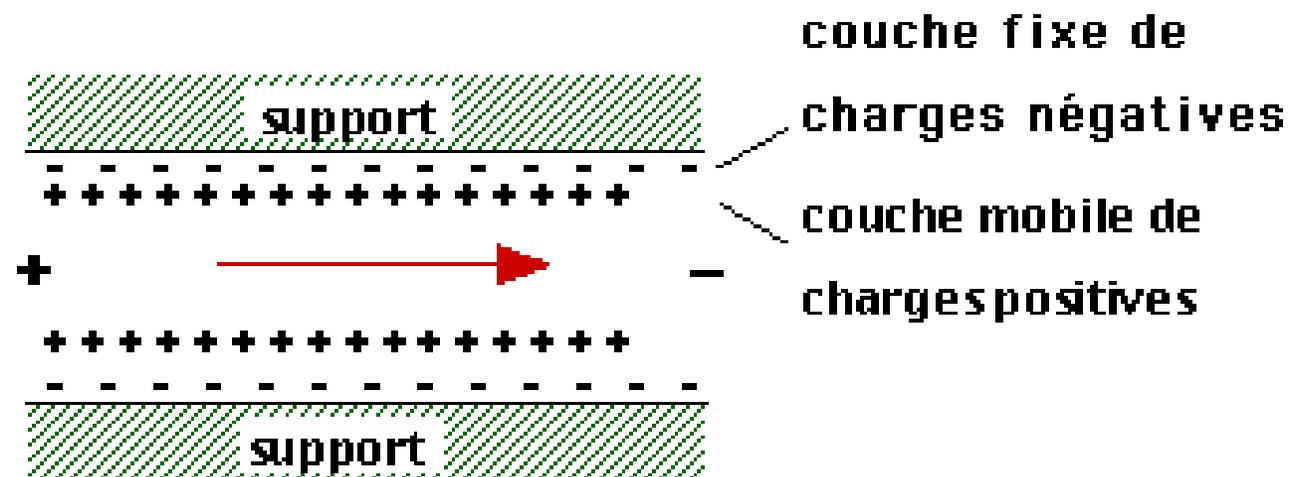
- de la mobilité électrophorétique absolue μ ,
- des caractéristiques du support : degré de réticulation d'un gel-support, propriété adsorbante du support,
- des courants liquidiens liés à la présence du support.

On distingue trois types de courants liquidiens qui influencent la mobilité électrophorétique d'une molécule :

✓ **LE COURANT D'ÉLECTROENDOSMOSE** :

Dans les conditions expérimentales, le support se charge négativement.

Une couche mobile de charges positives se forme dans le solvant, au contact du support et entraîne globalement la phase liquide vers la cathode.



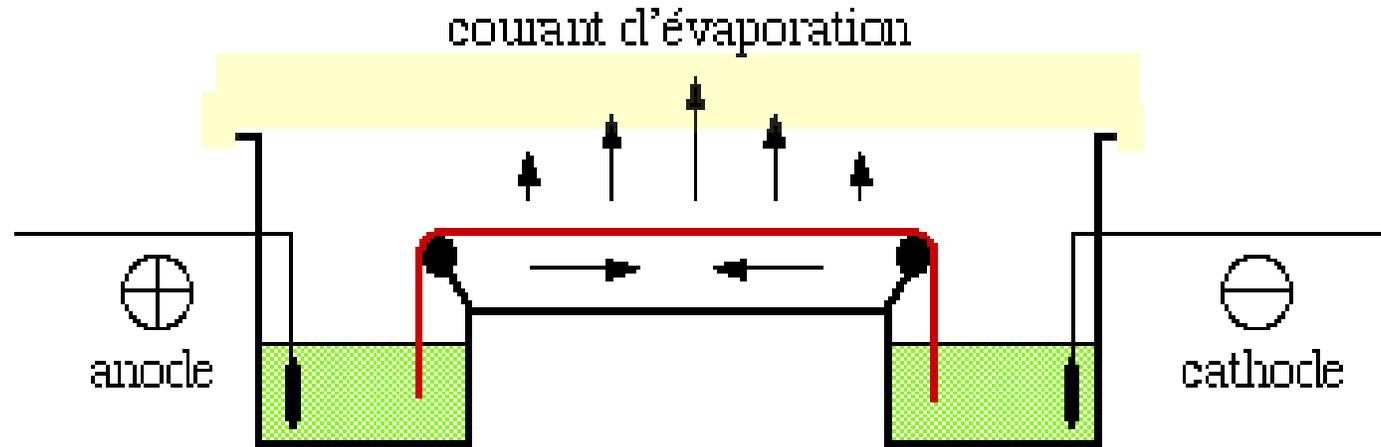
Ce courant accélère ou ralentit la migration des molécules, suivant qu'elles migrent vers la cathode ou vers l'anode.

Il peut, dans certains cas, être plus puissant que les forces électriques, ce qui fait que des molécules chargées négativement peuvent globalement migrer vers la cathode : c'est particulièrement vrai avec les gels d'agarose et aussi dans le cas de l'électrophorèse capillaire.

✓ LE COURANT D'ÉVAPORATION, OU RHÉOPHORÈSE :

Le passage du courant s'accompagne d'un **échauffement du support** (par effet Joule), ce qui entraîne l'**évaporation de l'eau** du tampon de migration. Cet effet est maximal au milieu du support.

Il s'établit ainsi un **courant liquidien depuis chaque extrémité vers le centre du support**..



Pour limiter ce phénomène, la **cuve est fermée par un couvercle**. On peut aussi utiliser des **cuves réfrigérées**

✓ LE COURANT D'ÉLECTROLYSE :

Courant liquidien lié à des mouvements d'ions issus de réactions d'oxydoréduction au niveau des électrodes.

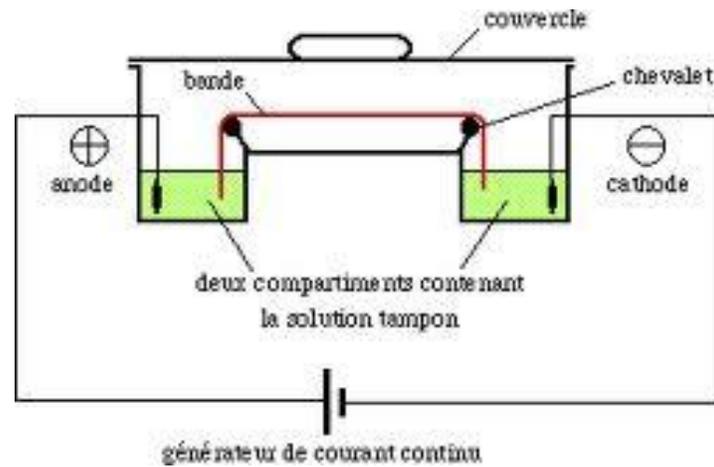
2.2. Supports et appareillages utilisés en électrophorèse de zone

Il existe différents supports : papier (séparation de petites molécules), acétate de cellulose (protéines sériques), gel d'agarose et gel de polyacrylamide (séparation fine de protéines et acides nucléiques)

La présence du support permet de limiter les phénomènes de diffusion et donc une meilleure résolution qu'en veine liquide.

2.2.1. Électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose

L'électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose est utilisée pour des peptides (obtenus par digestion protéasique de protéines), des protéines (notamment la séparation des protéines sériques).

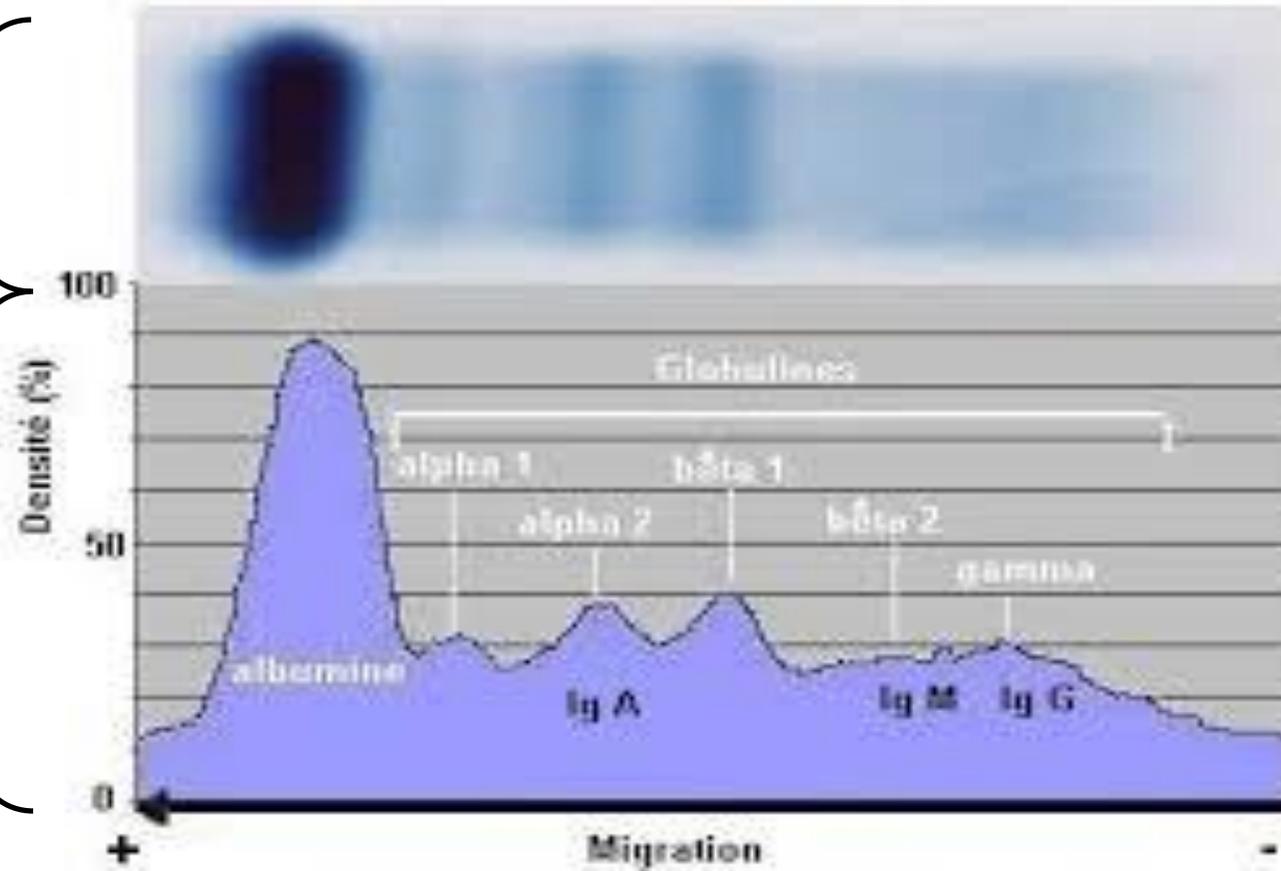


Après révélation des bandes, la **lecture de l'électrophorégramme peut se faire à l'œil nu** (analyse qualitative) ou **par densitométrie** (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration).

Dans ce cas, l'intégration des pics permet une analyse quantitative des fractions obtenues après migration.

bande d'acétate de cellulose
obtenu après électrophorèse
des protéines sériques

densitogramme

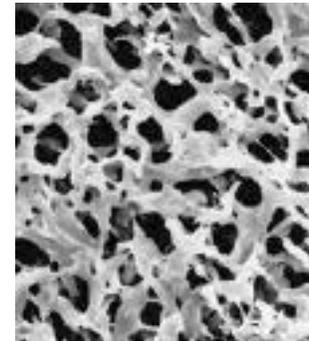
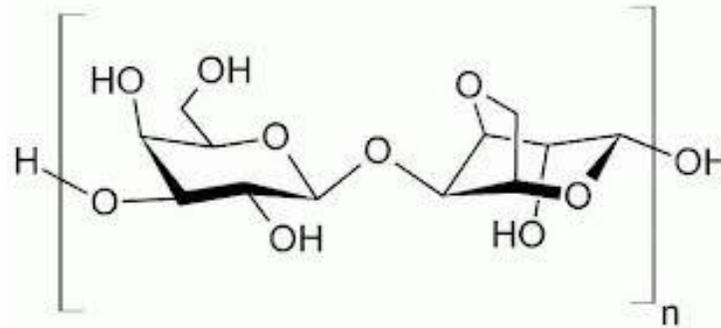


2.2.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

On utilise principalement le gel d'agarose comme support pour les électrophorèses d'ADN et d'ARN. Mais on peut également l'utiliser pour l'électrophorèse des peptides et protéines.

L'agarose est une forme purifiée de l'agar, une substance extraite de certaines algues et utilisée en microbiologie.

L'agarose est un polymère linéaire et non chargé où alternent des résidus de galactose et d'anhydrogalactose.



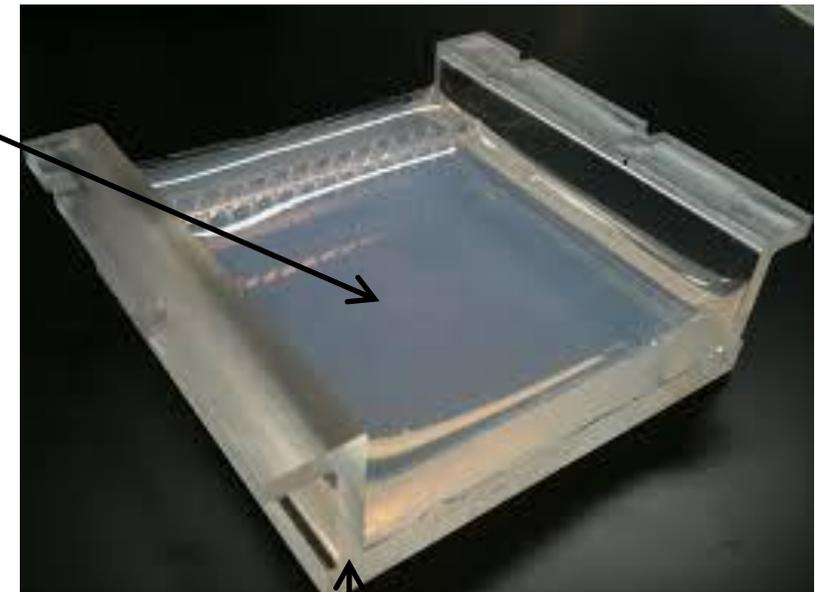
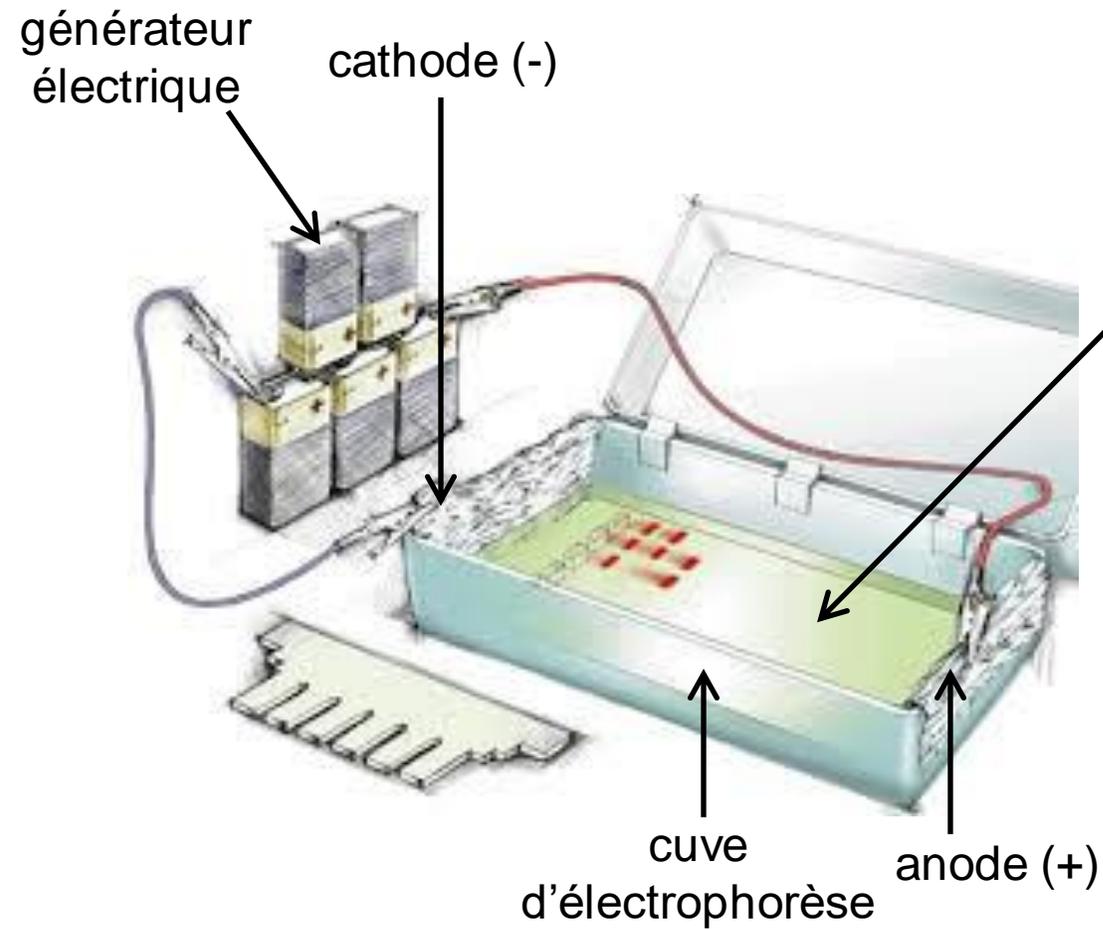
La purification enlève une bonne partie des composantes ioniques de l'agar qui perturberaient la diffusion ou la migration électrophorétique en créant des courants d'électroendosmose.

La gélification de l'agarose se fait par formation de ponts hydrogène entre les chaînes de polymères.

Comme tous les gels, l'agarose solidifiée a une porosité correspondant à sa concentration.

Entre 0,5 et 2 %, elle est suffisamment grande pour que les complexes protéiques et les acides nucléiques puissent diffuser.

La concentration habituellement employée dans les techniques immunochimiques est de l'ordre de 1 %.



2.2.3. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ou PAGE

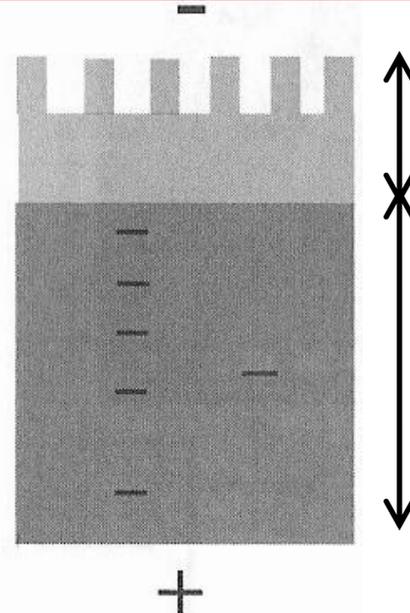
L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ou **PAGE** (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), est une méthode électrophorétique permettant principalement la séparation des peptides et protéines (mais peut également être utilisée pour les acides nucléiques).

On peut utiliser cette méthode dans deux conditions :

- conditions non dénaturantes, ou conditions natives.
- conditions dénaturantes (présence de SDS et éventuellement d'un agent réducteur des ponts disulfures).

Les gels de polyacrylamide peuvent présenter deux types de structures :

- un gel de concentration (stacking gel) : en général à 5 %, il permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation,
- un gel de séparation, ou gel de résolution (resolving gel).



Gel de concentration : pH neutre, grande porosité
⇒ concentration de l'échantillon à analyser à l'interface

Gel de résolution : pH basique, faible porosité
⇒ séparation des analytes de l'échantillon à analyser

Entre ces deux extrêmes, les protéines peuvent être séparées différemment selon la concentration en polyacrylamide du gel de séparation :

% en polyacrylamide	Masses molaires (kDa)
15 – 20	10 – 40
10 – 15	40 – 100
5 – 10	100 – 300
5	300 – 500
2 – 5	> 500

Avant dépôt dans les puits, les échantillons sont mélangés à un tampon de charge (ou tampon d'échantillon) contenant :

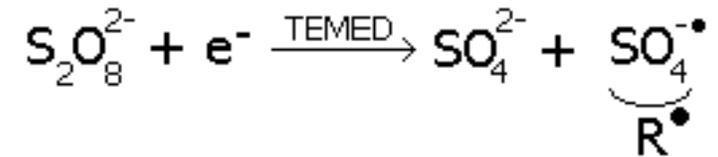
- un composé permettant d'augmenter la densité de l'échantillon : **glycérol, saccharose**.
- un témoin de migration permettant de suivre la progression de l'électrophorèse : **bleu de bromophénol**.

Le gel de polyacrylamide est un copolymère de deux monomères :

- l'acrylamide : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ($M = 71,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- le bisacrylamide, qui est un agent réticulant : $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ($M = 154,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)

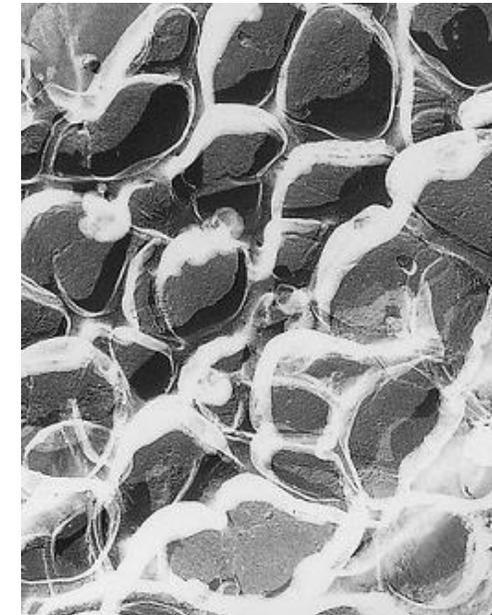
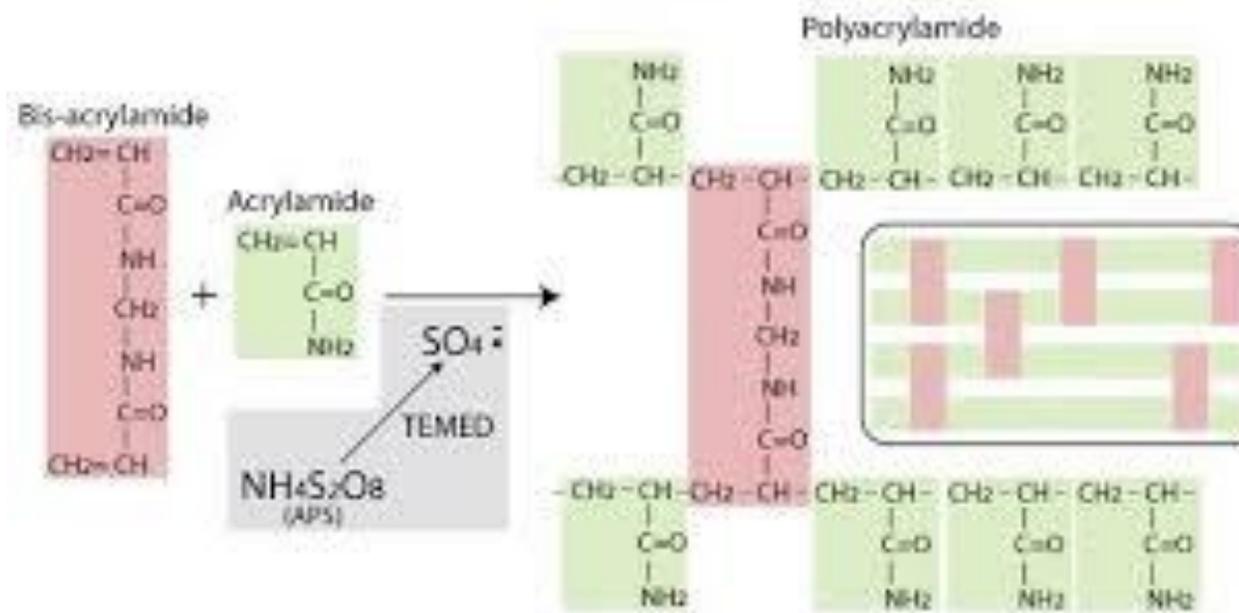
La polymérisation s'effectue en présence de radicaux libres, donc en l'absence d'oxygène (il faut dégazer les solutions et réaliser la polymérisation à l'abri de l'air).

Ces radicaux sont obtenus par décomposition du persulfate d'ammonium (NH₄)₂S₂O₈ (ou APS):



L'initiation de la polymérisation s'effectue en présence de TEMED (tétra-méthyl-éthylène-diamine) qui est un catalyseur (accélère la réaction).

On obtient un gel réticulé dont la structure est schématisée ci-après :



Un gel PAGE est caractérisé par deux chiffres :

- **1^{er} chiffre : concentration totale en monomères, notée T** : $T = \frac{P1 + P2}{V} \times 100$

Avec : P1 = masse d'acrylamide, en g.

P2 = masse de bisacrylamide, en g.

V = volume de la solution, en mL.

- **2nd chiffre : degré de réticulation, noté C** : $C = \frac{P2}{P1 + P2} \times 100$

Exemple : Donner la signification de l'inscription PAGE 15 : 0,3

Total acrylamide et bisacrylamide = 15 % (m/V), dont bisacrylamide 0,3 % (m/V)

soit acrylamide 14,7 % = 14,7 g/100 mL et bisacrylamide 0,3 % = 0,3 g/100 mL

D'une manière générale, en ce qui concerne le pourcentage total, on utilise pour les protéines des gels de 7 à 15 % et de 2 à 20 % pour les acides nucléiques.

Une gel pou PAGE est réalisée avec un montage vertical, pour limiter l'oxygénation.



2.3. Révélation des gels d'électrophorèse

Après migration, il faut révéler les gels électrophorèse.

Il existe deux type de systèmes de révélation :

✓ Révélation non-spécifique :

Exemples : Toutes les protéines révélées par le rouge ponceau, ou par le bleu de Coomassie.

Acides nucléiques révélés par fluorescence grâce au bromure d'éthidium (BET), ou le GelRed, ou le SybrGreen.

✓ Révélation spécifique :

Dans ce cas on utilise les propriétés particulières des molécules d'intérêt à révéler.

Exemples : Révélation d'une enzyme par ajout d'un substrat chromogène.

Utilisation d'un anticorps spécifique marqué (immunodétection).

Utilisation d'une sonde oligonucléotidique marquée (radioactivité, fluorescence) pour révéler une séquence particulière d'ADN ou d'ARN complémentaire.

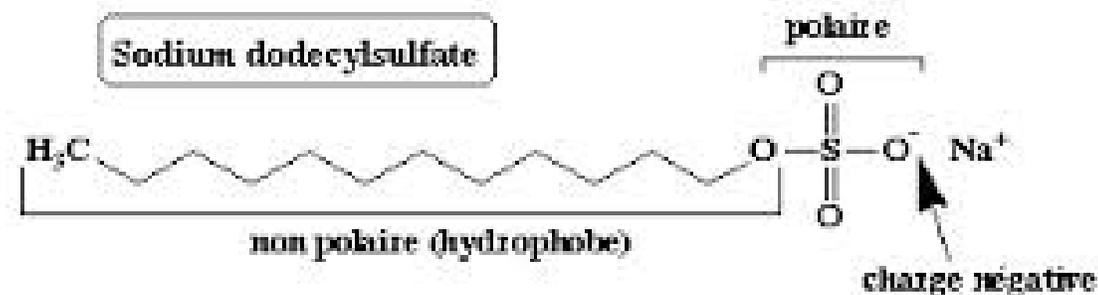
3. Quelques applications des méthodes électrophorétiques

3.1. SDS-PAGE

La technique de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, ou *SDS-PAGE*) s'applique aux protéines.

La dénaturation des protéines est obtenue par effet combiné de la chaleur et du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) : chauffage à environ 95°C en présence de SDS.

Le SDS est un détergent anionique dénaturant les protéines et leur conférant une charge électrique globale négative en se complexant à elles.

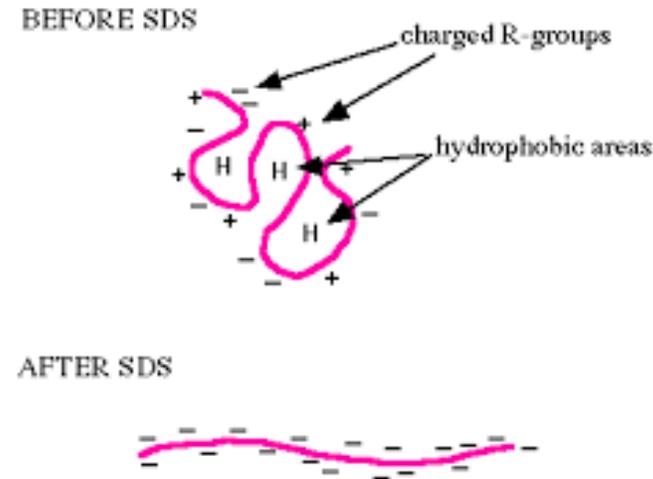


E. Jaspard (2006)



Le SDS se fixe sur les protéines dans des proportions toujours similaires :

1,41 g de SDS / g de protéine soit environ 1 molécule de SDS tous les 2 résidus d'acides aminés



En conséquence :

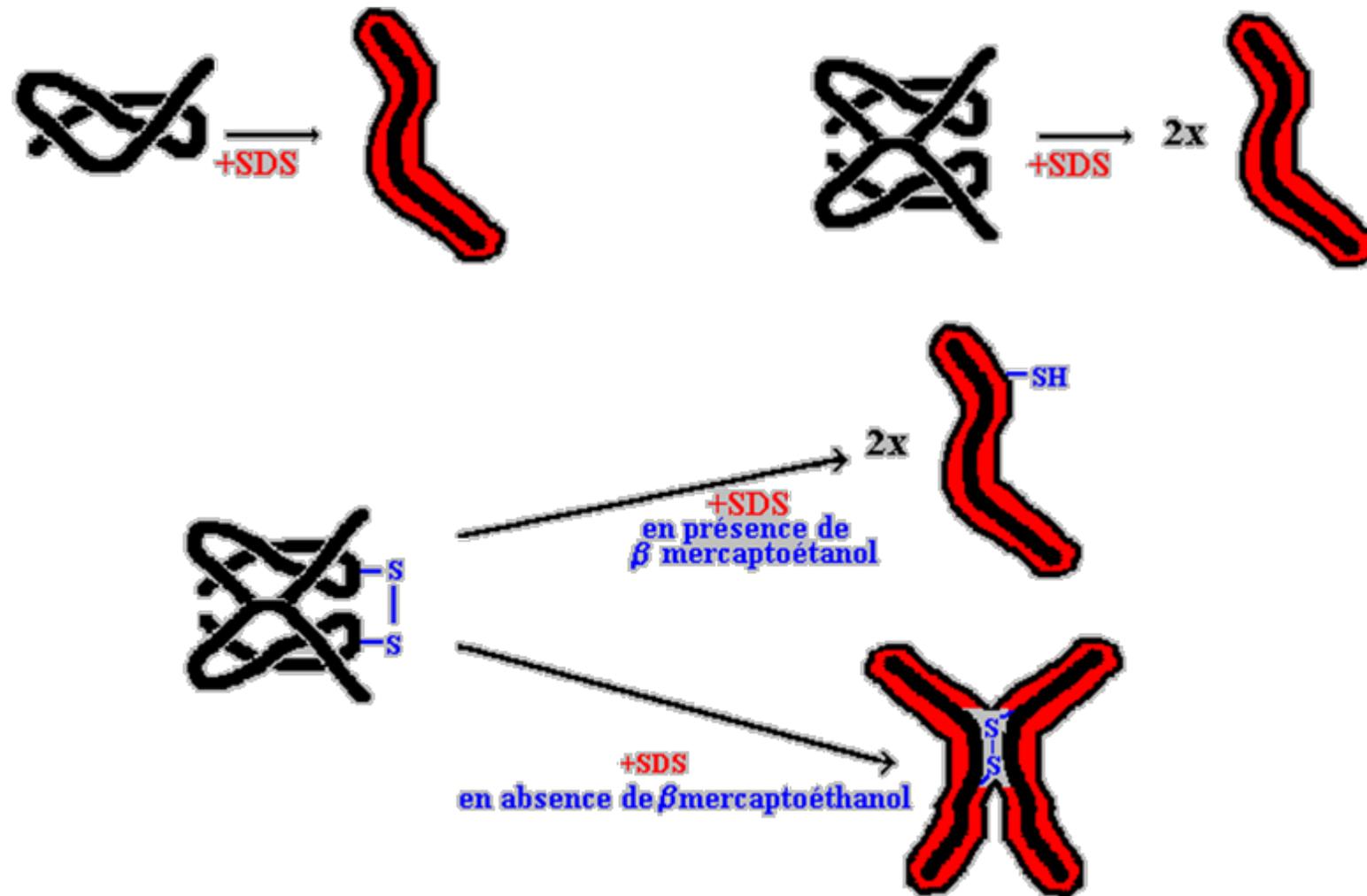
- les protéines sont **dénaturées** : elles perdent leur structure tridimensionnelle native.
- La charge intrinsèque des protéines est masquée par la **charge négative** liée aux très nombreuses molécules de SDS : **les protéines migrent vers l'anode**.
- toutes les protéines lient le SDS dans les mêmes proportions, elles ont alors toutes une **même densité de charge q/r** , donc une **même mobilité électrophorétique absolue μ** . (rappel : $\mu = q / (6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r)$)

La **séparation des molécules se fera donc uniquement par l'effet de tamisage (filtration) lié au gel**.

Les molécules **les plus grosses** (plus encombrantes) progressent moins rapidement et migreront donc **le moins loin** du fait de leur plus grande difficulté à passer à travers les mailles du gel.

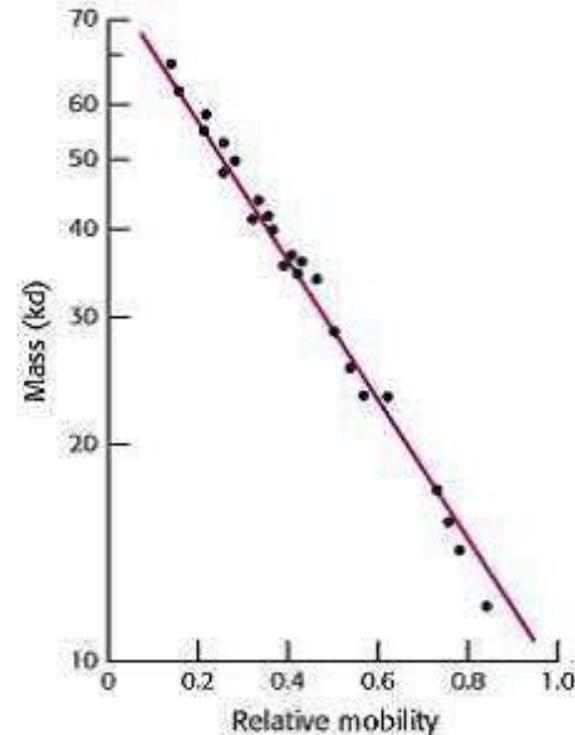
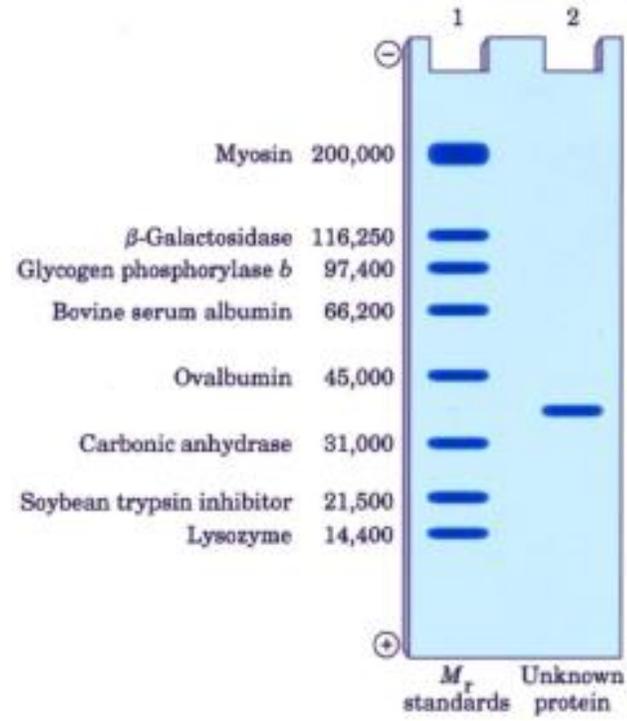
Il existe une **proportionnalité entre la distance de migration et le log décimal de la masse molaire**.

On ajoute assez souvent un agent réducteur tel le β -mercaptoéthanol (ou 2-mercaptoéthanol, β ME) ou le dithiothréitol (DDT), ce qui permet de réduire les ponts disulfures éventuellement présents dans la protéine.



La SDS-PAGE permet donc de déterminer la masse molaire d'une protéine :

- 1) On fait migrer parallèlement un mélange de protéines marqueurs de masse moléculaire connue et la protéine de masse molaire inconnue,
- 2) On révèle les protéines par coloration au bleu de Coomassie ou nitrate d'argent par exemple,
- 3) Après avoir mesuré la distance de migration d des différents marqueurs, on trace une droite d'étalonnage $d = f(\log_{10}(M))$, ou l'inverse,

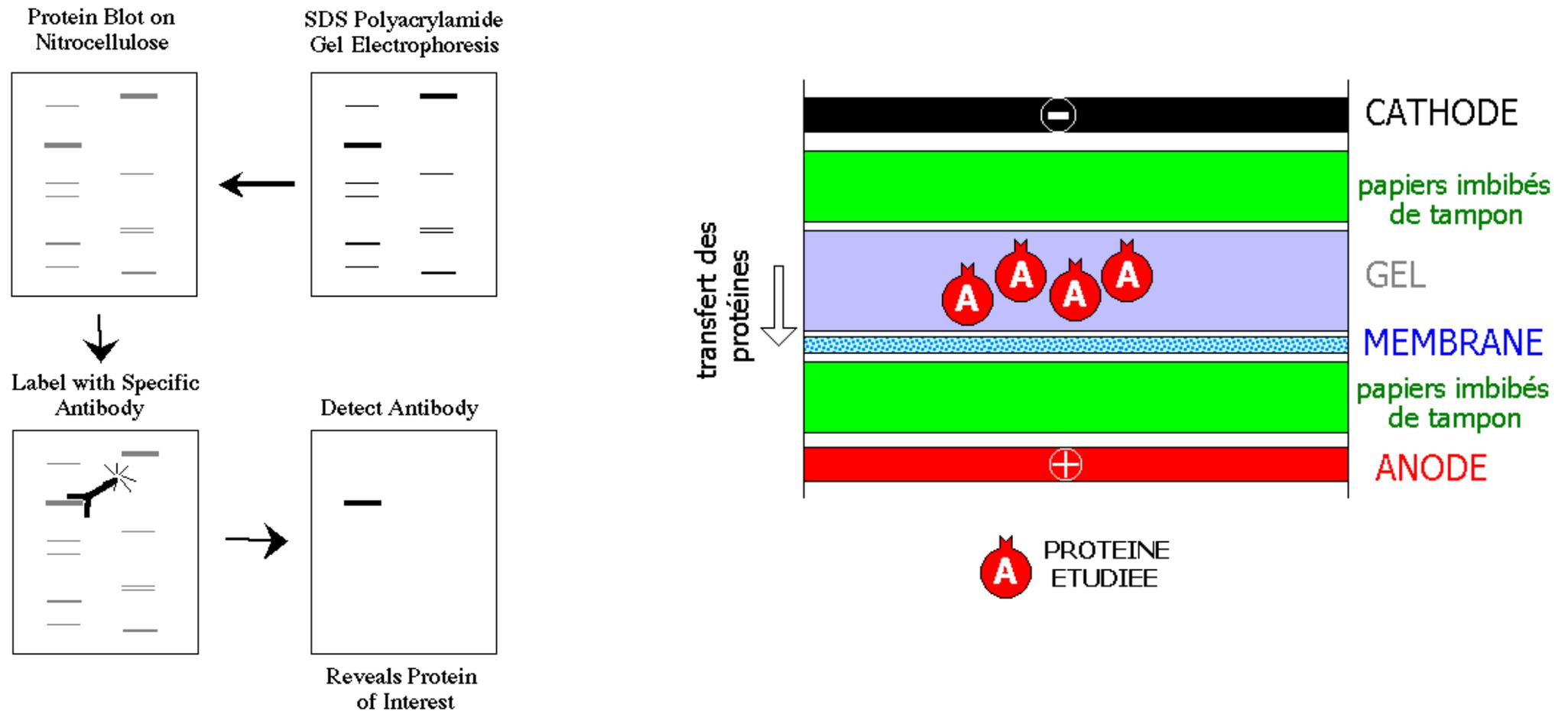


- 4) La distance de migration de la protéine de masse molaire inconnue peut alors être reportée à la droite d'étalonnage et sa masse molaire déterminée.

3.2. Western blot, Southern blot, northern blot

Principales étapes expérimentales du western blot :

- 1- SDS-PAGE des protéines des échantillons biologiques à analyser.
- 2- Migration par électrotransfert sur membrane (nitrocellulose, nylon)
- 3- Révélation spécifique de la protéine d'intérêt (ici par immunodétection).



La révélation de la protéine d'intérêt se fait le plus souvent :

- avec des anticorps marqués de façon radioactive, puis par autoradiographie,
- avec des conjugués = anticorps marqués de façon enzymatique (phosphatase alcaline, peroxydase ...) ou autre (biotine, protéine A, fluorochrome, *etc.*).
- avec des systèmes « sandwich », comme dans les immunodosages.

La même technique est adaptée et appliquée :

- pour la détection de séquence d'ADN spécifique à l'aide d'une sonde oligonucléotidique radioactive de séquence complémentaire à celle recherchée.
On parle alors de Southern blot.
- pour la détection de séquence d'ARN spécifique à l'aide d'une sonde oligonucléotidique radioactive de séquence complémentaire à celle recherchée.
On parle alors de northern blot.

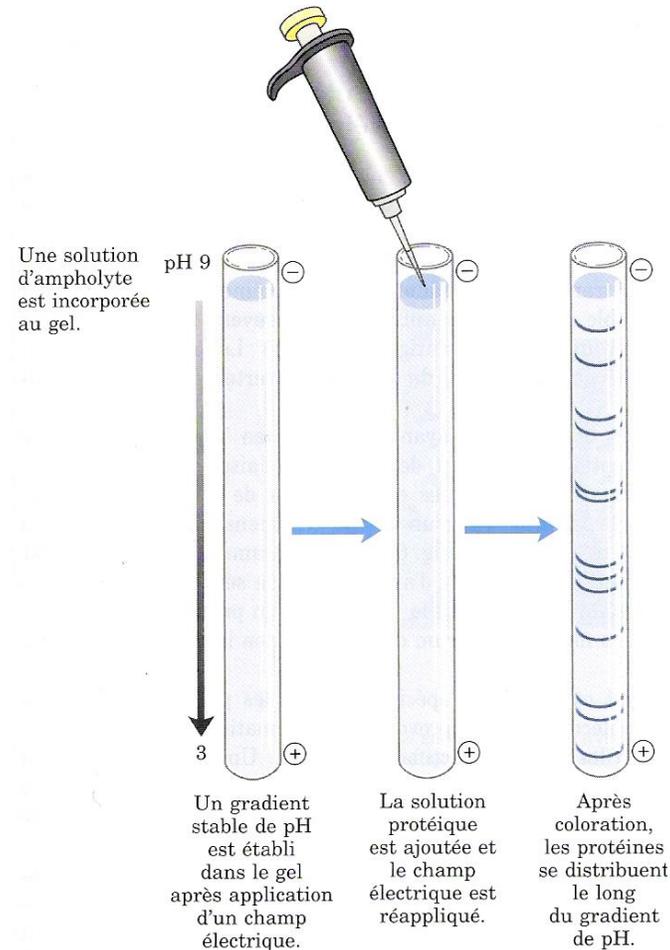
3.3. Focalisation isoélectrique (IEF pour *isoélectric focusing*)

La migration est effectuée dans un gradient continu de pH (pH acide à l'anode et basique à la cathode).

Chaque protéine migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pH_i \Rightarrow migration isoélectrique.

Si il y a diffusion à partir du pH_i , on a une répulsion grâce aux pôles \Rightarrow effet de focalisation.

On peut déterminer le pH_i des protéines à **0,01 unité de pH**.



On utilise un gel de grande porosité (exemple : 6 % acrylamide), pour que la taille n'influence pas la migration.

Le gradient de pH est généré par un mélange d'ampholytes de faible masse molaire (molécules pouvant avoir à la fois un rôle acide et basique ; exemple : H_2O).

Elles sont introduites dans le gel au moment de sa fabrication.

Le tampon à l'anode = un acide fort. À la cathode = une base forte.

Lorsqu'on applique une tension entre les deux électrodes, chaque ampholyte se déplace rapidement jusqu'à son point isoélectrique et s'y immobilise. On a alors généré un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel.

Comme les protéines sont plus grosses que les ampholytes, elles migrent beaucoup plus lentement. Le gradient de pH se crée donc avant que la migration des protéines ne soit importante.

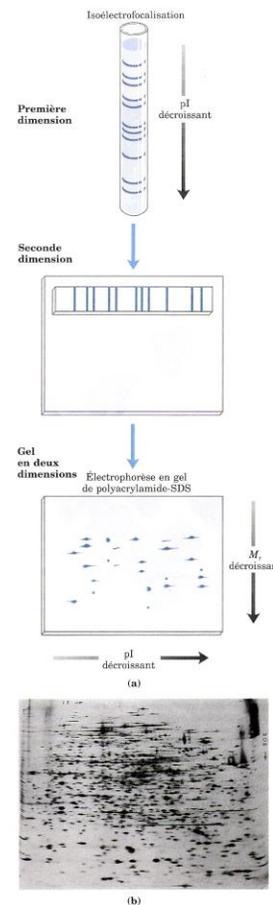
On peut combiner l'IEF à une SDS-PAGE classique : on parle alors d'électrophorèse bidimensionnelle.

3.4. Électrophorèse bidimensionnelle

Les **protéines** sont d'abord séparées par focalisation isoélectrique.

Le gel est ensuite placé horizontalement sur un second gel, et les protéines sont séparées par SDS-PAGE.

On obtient un **gel en deux dimensions** dans lequel la séparation horizontale reflète les différences de pH_i , et la séparation verticale reflète les différences de masses molaires.



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.

3.5. Électrophorèse en champ pulsé, ou PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*)

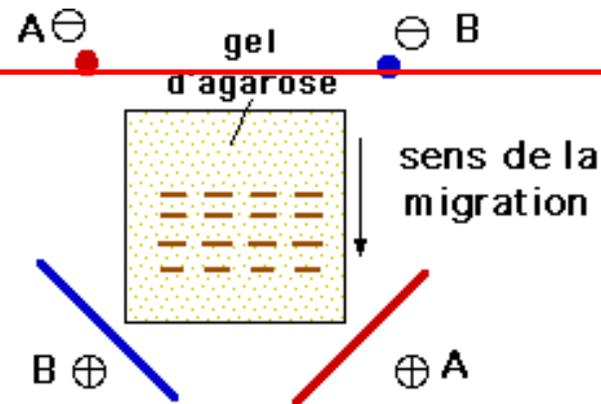
Ce type d'électrophorèse a été développé par SCHWARTZ et CANTOR en 1984 afin de séparer les grandes molécules d'ADN (> 50 kpb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre, même en diminuant au maximum la concentration d'agarose (en dessous de 0,4 % les gels sont impossibles à manipuler).

La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au μm alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kpb complètement étirée est d'environ $18 \mu\text{m}$.

La vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kpb n'est plus affectée par l'effet de filtration, elle est constante quelle que soit la taille de la molécule.

Le principe de l'électrophorèse en champ pulsé consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel.

Cette probabilité dépend de la taille de la molécule et la vitesse de migration d'un fragment d'ADN dans le gel varie dans le sens inverse de sa taille.



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

L'électrophorèse en champ pulsé permet ainsi de séparer des fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 1 kpb à une dizaine de mégabases.

Le marqueur de tailles utilisé le plus fréquemment, servant de référence pour la taille des fragments, est l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génome des procaryotes et des eucaryotes.