

LES MÉTHODES D'ÉLECTROPHORESE : L'ESSENTIEL

Premier Cycle d'Etudes Médicales

Faculté de Médecine Jacques Lisfranc
Université Jean Monnet

Aude Barani

PRINCIPES

DIFFERENTS TYPES D'ELECTROPHORESES

I. ELECTROPHORESE sur PAPIER et ACETATE de CELLULOSE

II. ELECTROPHORESE sur GEL

- SÉPARATION SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (PAGE)

PAGE et SDS-PAGE

Focalisation Isoélectrique (FIE) + électrophorèse BI-DIMENSIONNELLE

- SÉPARATION SUR GEL D'AGAROSE

Électrophorèse sur gel d'agarose

Électrophorèse en champ pulsé

III. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

IV. "BLOTTING" et APPLICATIONS

- Western blot

- Southern et Northern blot

PRINCIPES

Electrophorèse : Méthode de séparation de particules chargées électriquement
(séparation, caractérisation ou purification de molécules d'intérêt)

Electro : énergie électrique

Phoresis : *phoros* (Grec) **porter, avoir en soi**

Applications principales : biochimie et biologie moléculaire

Séparation des protéines et des acides nucléiques

Principe : migration de molécules chargées (perte de neutralité électrique) dissoutes ou en suspension dans un solvant, sous l'effet d'un **champ électrique**

Champ électrique : générateur de courant continu

Support du champ : tampon conduisant le courant d'un pôle à l'autre

En fonction des caractéristiques propres des molécules **et** des conditions d'électrophorèse

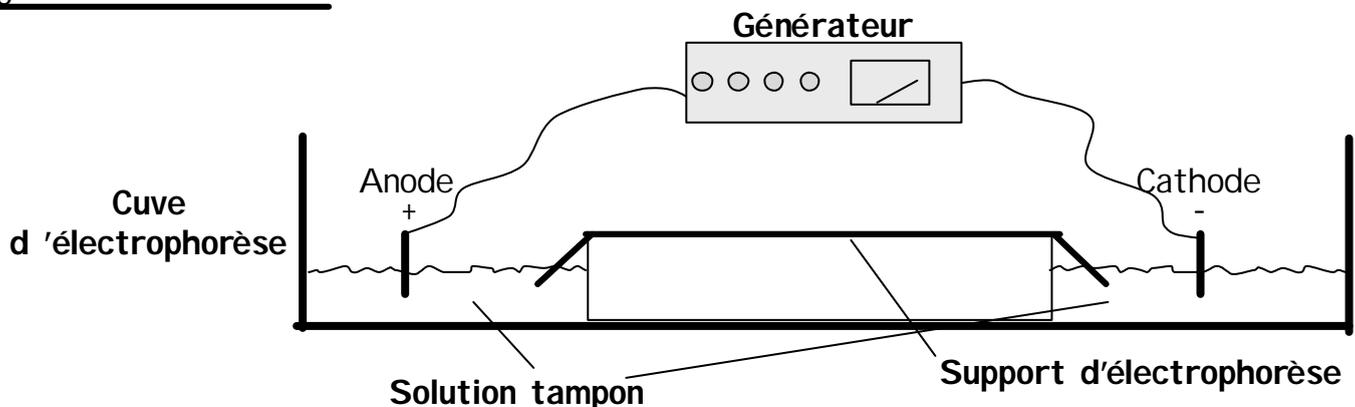
=> **La vitesse de migration est différente pour les différentes molécules chargées et permet leur séparation les unes des autres**

Cation : chargé +. Attiré **lors de l'électrolyse** par la **CATHODE** (ou électrode négative)

Anion : chargé -. Attiré **lors de l'électrolyse** par l'**ANODE** (ou électrode positive)

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.



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.

LES SUPPORTS ÉLECTROPHORÈSES

Liquide => "électrophorèse en veine liquide"

Pour les TRES grosses particules (cellules, organites); presque plus utilisée

Support poreux => "électrophorèse de zone"

Obtention après migration d'une séparation en zones distinctes (bandes) des molécules chargées

- **Différents supports d'électrophorèse de zones**

- 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)

ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER ET ACÉTATE DE CELLULOSE

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

L'ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER (peu utilisée de nos jours)

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

Détermination du **point isoélectrique d'un acide aminé** par des mesures de mobilité
=> détermination de **mobilité** d'un acide aminé à **différents pH**

$$\text{mobilité} = k \cdot (\text{pH} - \text{pHI}) / \text{masse molaire}$$

L'ÉLECTROPHORÈSE SUR ACÉTATE DE CELLULOSE

Séparation de molécules de **milieux complexes (plasma)**

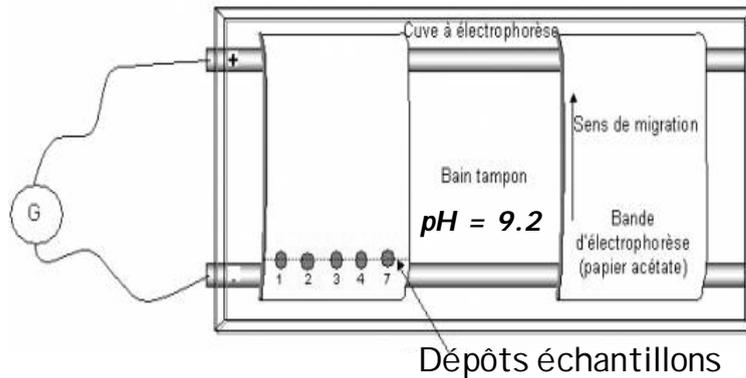
Séparation de **petites molécules migrant à vitesse proportionnelle à leur charge de + en +** remplacée par les électrophorèses sur gel

- imprégnation d'une bande par un **électrolyte** convenable
- dépôt d'1 goutte de solution contenant l'espèce ionique à étudier sur la bande
- établissement d'1 **ddp** entre les 2 extrémités de la bande de papier



espèces ioniques se **déplacent** sous l'action du **champs électrique** avec 1 **vitesse propre**

ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER ET ACÉTATE DE CELLULOSE



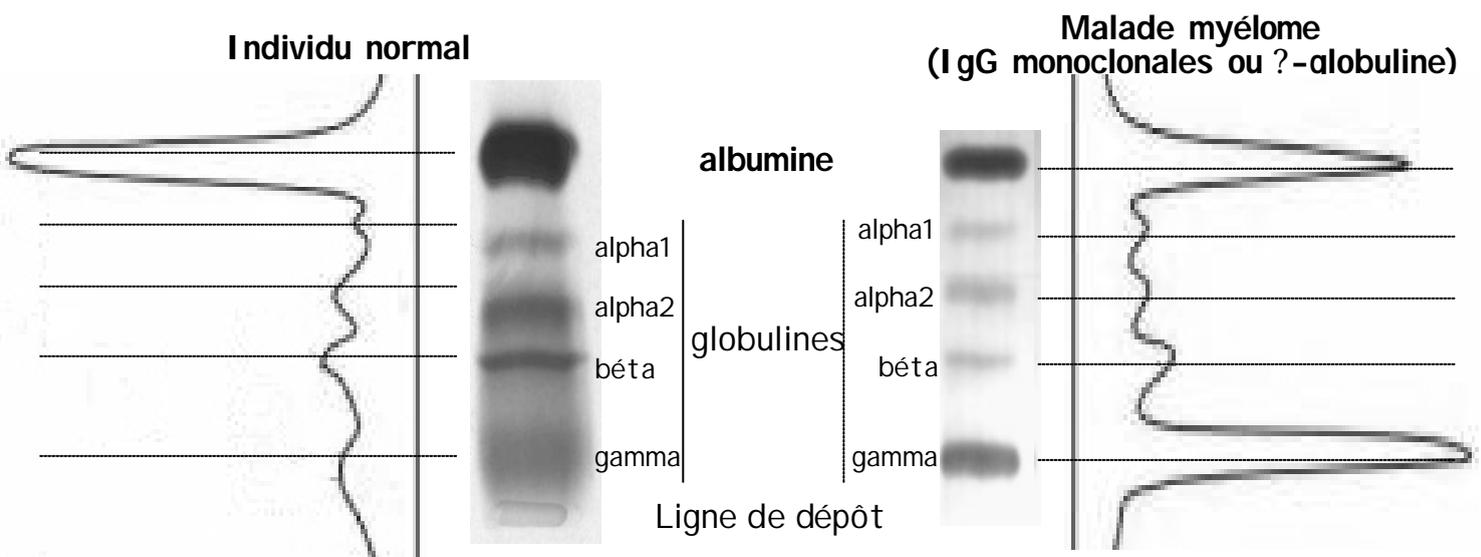
Milieu basique: protéines chargées (-)

- extrémités des bandes plongées dans tampon d'électrophorèse conducteur (pH = 9.2)
- application champ électrique - dissolution échantillon dans solution conductrice
- migration le long de la bande

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



ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL (SUPPORTS SEMI-SOLIDES)

Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse

Conjugent **mobilité électrophorétique** + **effet filtration** du gel

(taille des pores limite vitesse de migration)

Les molécules chargées atteignent rapidement une vitesse

$$V = qE/f$$

q: charge particule

E: champ électrique

f: coef. frottement particule/solvant

Théorie de l'électrophorèse Mobilité **u** dans un champ électrique au sein d'un gel

$$\text{Log } u = \text{Log } u_0 - KrC$$

Log u_0 = mobilité en milieu liquide

Kr = coef. de retardement dû au gel (fonction masse moléculaire)

C = concentration du gel

Ainsi, la **vitesse de migration** dépend aussi de **masse moléculaire**

2 types de matériaux

Agarose colloïde naturel extrait d'algue rouge (*Gracilaria*)

Grande taille de pores => séparation **très grosses** molécules :

Protéines >500kDa, Ac. Nucléiques >1500pb

Polyacrylamide De l'acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ est mis à polymériser avec du

NN' méthylène-**bis**-acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$,

donnant des chaînes latérales linéaires

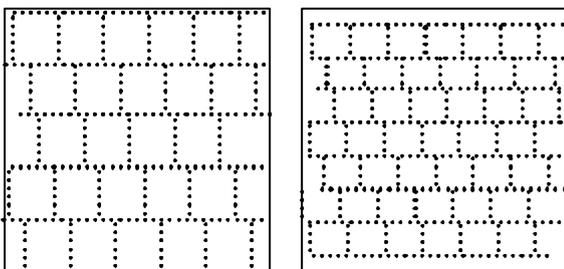
ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)

PolyAcrylamide 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)



modification % polyacrylamide (3-30%)

↳ \neq 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

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)

Séparation / purification d'un mélange de **PROTEINES**

Possible détermination de la **taille** et la **composition en sous unité** d'une protéine

Protéines : **charge nette positive** ou **négative**, reflet du mélange d'acides aminés dont elles sont formées

Si on applique un champ électrique à une solution contenant des protéines, la **Vitesse de migration** dépend de :
- la **charge nette**
- la **forme**
- la **taille**

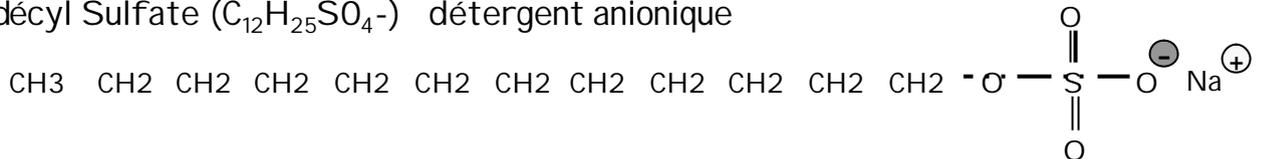
C'est l'électrophorèse PAGE qui a tendance à remplacer celles sur acétate de cellulose

Pour séparer des protéines, on utilise le + souvent une électrophorèse particulière réalisée **en conditions dénaturante** (SDS-PAGE)

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

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

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



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

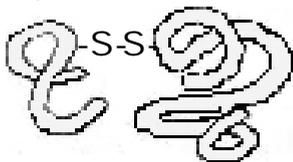
Protéine monomérique



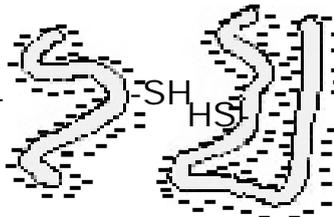
SDS
beta-mercaptoéthanol



Protéine multimérique



SDS
beta-mercaptoéthanol



dénaturation
enrobe les protéines de charges (-)
rupture des ponts di-sulfures

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

Conditions SDS-PAGE => suppression facteurs **FORME** et **CHARGE** lors migration

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE

avec une électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS

ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

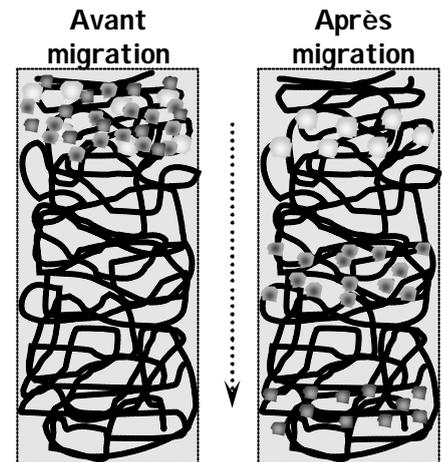
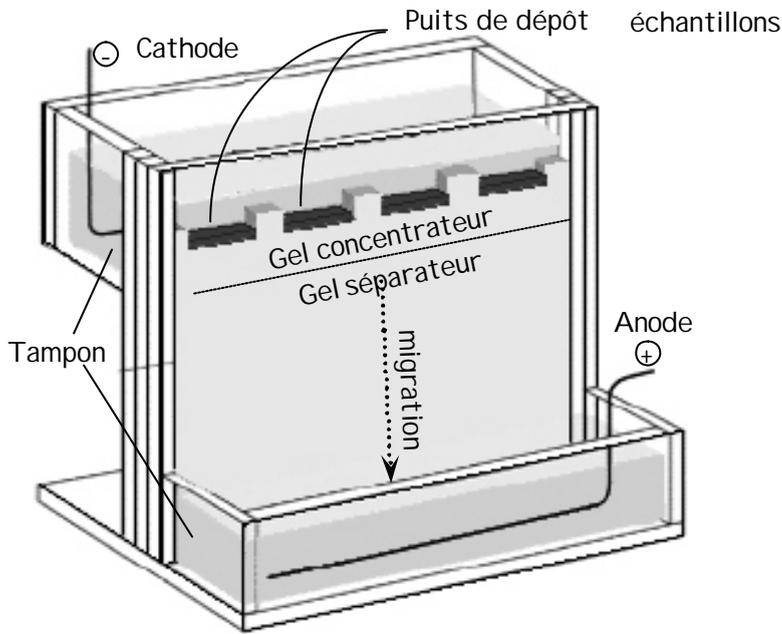
Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE

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

Rappel : - **Masse moléculaire (m)** : exprimée en Dalton (Da)

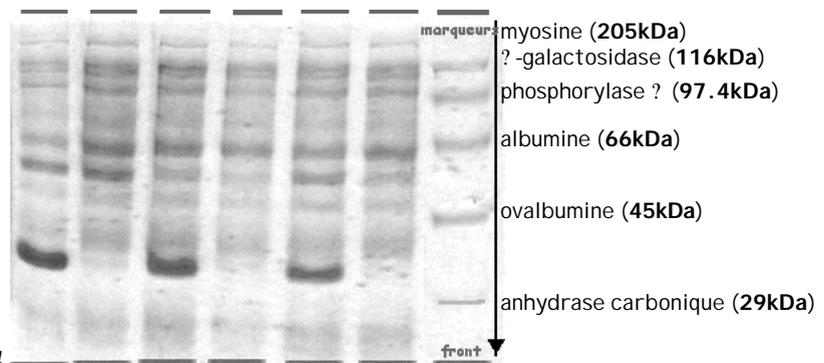
1 Dalton = 1/12 de la masse du **carbone 12**

Majorité des macromolécules suffisamment grosse pour expression en kiloDalton (kDa)

- **Poids moléculaire (Mr)** : masse moléculaire **relative** (pas d'unité)

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

Ex: Gel coloré au bleu de Coomassie
Standard : dernier puit



Source : E. Jaspard 2004

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

Pour la détection **spécifiques** => utilisation d'**anticorps** marqués (western blot)

ÉLECTROPHORÈSE BI-DIMENSIONNELLE (2D)

Lorsqu'il existe des bandes protéiques très proches => chevauchement

Séparation par électrophorèse SDS-PAGE (unidimensionnelle): **résolution <50 protéines**

Pour séparer plus de bandes => combinaison de 2 modes de séparation dans 2 dimensions

Électrophorèse bi-dimensionnelle Résolution >1 000 protéines différentes

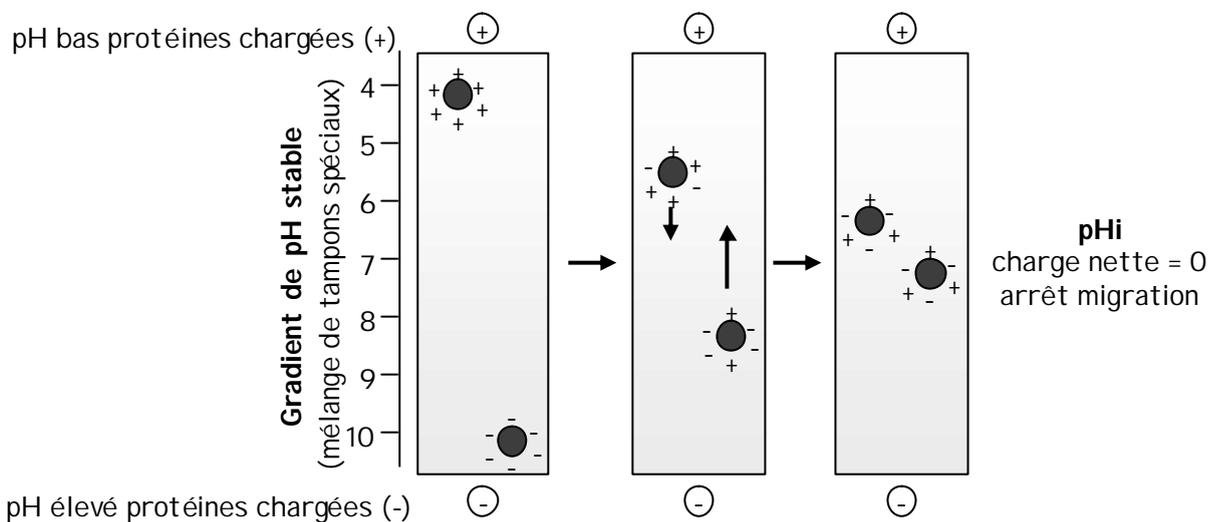
DIMENSION 1

Séparation des protéines en fonction de la **charge** par **Focalisation Isoélectrique (FIE)**

La **charge nette** d'une protéine varie avec le **pH**. A **pHi** : charge nette nulle.

Valeur de pHi spécifique d'une protéine, qui ne migre plus dans un champ électrique

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

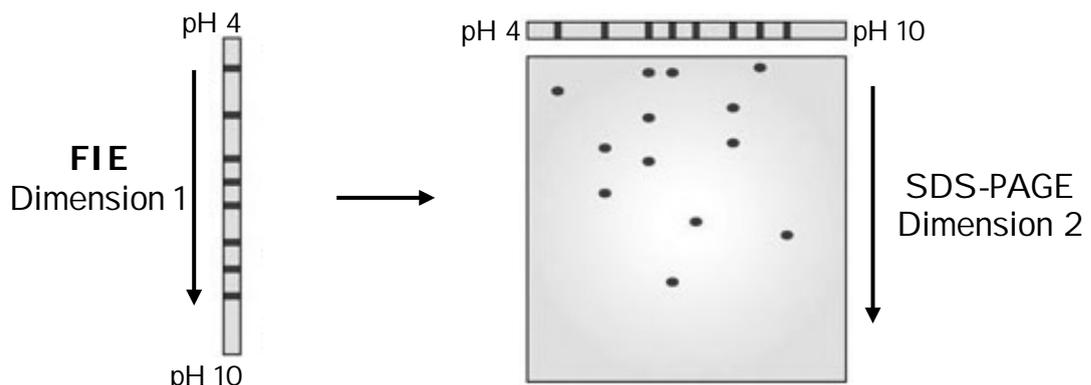


Les protéines **migrent** vers la position du gradient = **pHi** et s'y immobilisent

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**.

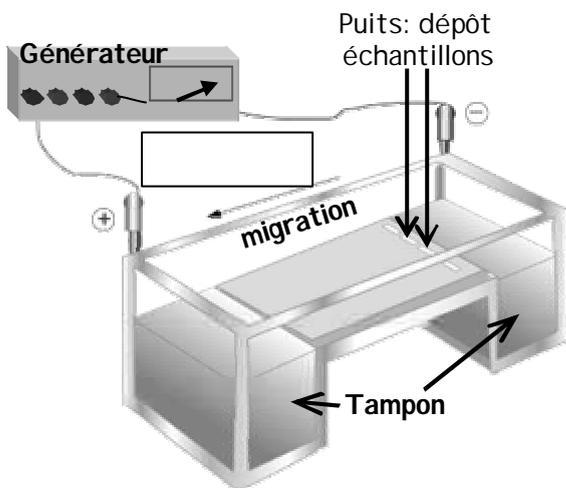


ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE

Exemple d'application: séparation des acides nucléiques

Acides nucléiques = macromolécules **polyanioniques** uniformément **chargées** => charge relative constante => La charge n'est plus un critère de **discrimination**; la taille et structure le restent. C'est l'effet "tamis moléculaire" du gel : + les molécules sont de petite taille, + vite elles passent au travers des pores du gel ; un ADN de structure serrée (ex: plasmide superenroulé) migrera + vite qu'une structure lâche (plasmide circulaire ou linéarisé). Plus un gel est concentré en agarose, + les pores seront de petite taille => discrimination de molécules + petites.

Évaluation de l'**avancement de la séparation** : pour ne pas laisser migrer trop longtemps : (sinon, risque de perte des échantillons)



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)

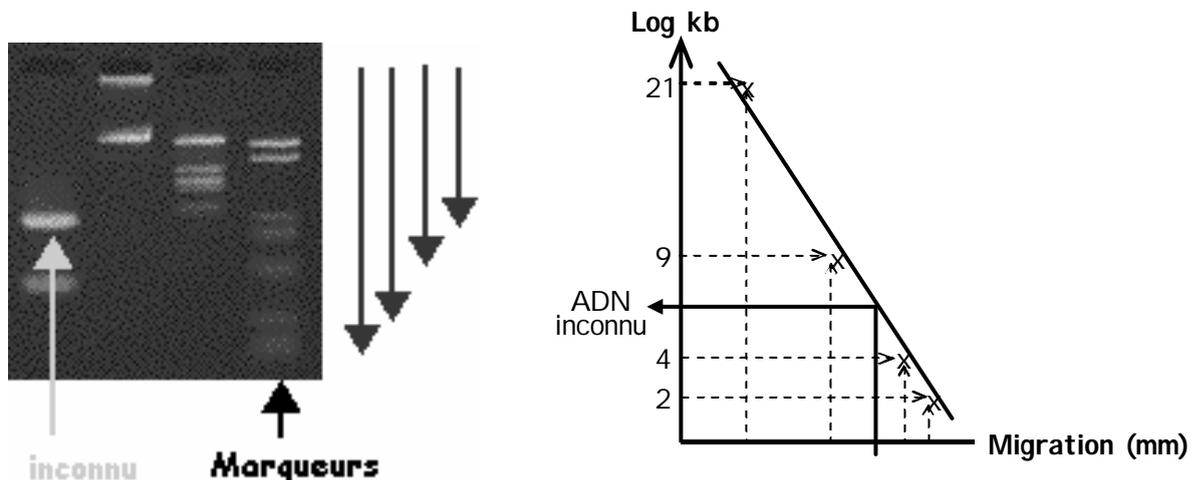
Révélation des bandes d'ADN par coloration : **Bromure d'Ethidium (BET)** / UV

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

Intensité de fluorescence échantillon comparée avec quantité connue (standard) mélange d'acides nucléiques de masses moléculaires connues



ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

Résolution de très gros ADN (50 kb - 10^{aine} Mb)

Dans les concentrations classiques d'agarose => porosité < 1µm

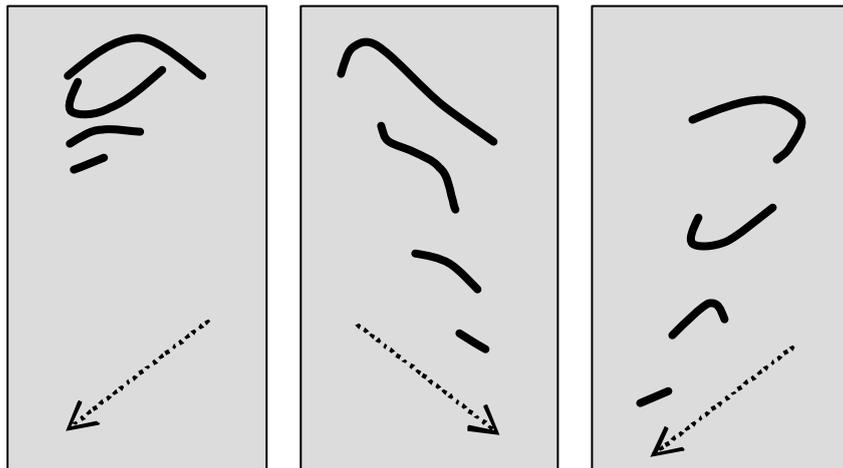
ADN 50 kb étiré ~ 18µm ➡ Ne peut se déplacer dans le gel que par **reptation**

Champ électrique ➡ **allongement ADN dans sens du champ**

=> **Reptation** à partir d'1 extrémité => **Vitesse de migration = constante**
quelle que soit la taille de la molécule

↳ ADN > 50 kb => **Absence de pouvoir séparateur du gel** (plus d'effet tamis moléculaire)

=> **Champ pulsé** : **changement orientation** et/ou **polarité** du champ, alternativement au cours du temps



Réalisation d'1 électrophorèse en champ pulsé

Séparation : gel d'agarose (1%)

Application d'1 courant électrique

Modification orientation du champ au cours du temps

Réorientation champ électrique => **réorientation** ADN

Réorientation ADN // nouveau champ => retarde la migration

Temps de réorientation proportionnel à **longueur** de l'ADN

ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Electrophorèse = migration d'espèces électriques chargées, dissoutes ou suspendues dans un électrolyte, à travers lequel passe un courant électrique

Electrophorèse capillaire (capillary electrophoresis, CE) = **séparation** d'espèces ioniques dans un **tube capillaire** rempli d'un **électrolyte**

Séparation des composants par CE dépend de la **migration différentielle** des analytes dans un champ électrique appliqué :

Vmigration électrophorétique (u_p) d'un analyte vers l'électrode de charge inverse =

$$u_p = \mu_p E$$

μ_p : mobilité électrophorétique

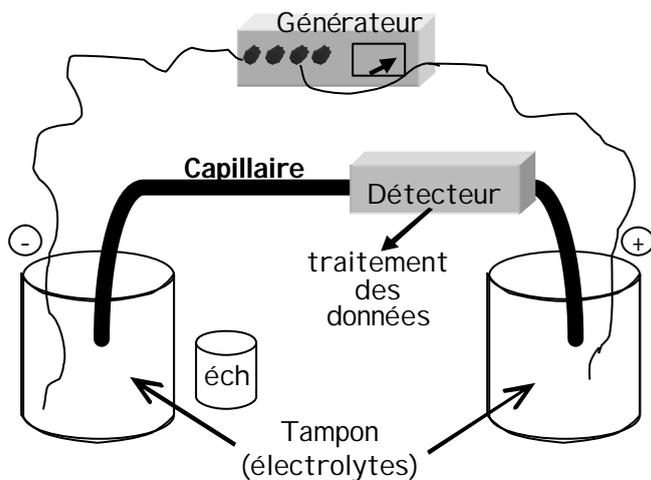
E : force champ électrique

Mobilité électrophorétique : **proportionnelle** à **charge ionique** de l'échantillons

inversement proportionnelle à toute **force de friction**

Forces de friction présentes dans le tampon : viscosité du milieu, taille et forme de l'ion

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



Réalisation d'une CE

Capillaire (10-100 μ m diamètre) rempli d'une solution d'électrolyte conduisant le courant à l'intérieur du capillaire

Voltage élevé (15-30 kV) $V_{migration}$ très rapide

Injection échantillon (capillarité, pression, siphonage ou électroinjection). Quelques **nanolitres** d'échantillon

Capillaire passe au travers du **détecteur** (absorption UV, fluorimétrie, conductimétrie)

Ions, positifs et négatifs, **attirés à travers le capillaire, dans le même sens**, par EOF

Analytes **séparés** pendant leur migration = **mobilité électrophorétique différente**

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

utilisation d'un **équipement d'analyse automatisé**

temps d'analyses très courts (*utilisation hauts voltages*)

détection en temps réel des pics séparés Capillaire inséré dans le détecteur

signal envoyé à une plateforme de **traitement des données**

plateformes de traitement du signal utilisable pour séquencer

APPLICATIONS

“BLOTTING” ou EFFET BUVARD

DEFINITION : Réalisation d'une **réplique exacte** de **gels** sur des **membranes**, suivie d'une **détection spécifique**

Analyse d'ADN (**Southern Blot**), d'ARN (**Northern Blot**) et de protéines (**Western Blot**)

- **Séparation** ADN, ARN ou protéines par **électrophorèse**
- **Transfert** : réplique du gel sur une membrane
- **Localisation** (hybridation à l'aide d'1 sonde ou d'1 anticorps)
- **Révélation** des molécules d'intérêt
- **Quantification** des molécules d'intérêt

Les différents types de membranes de transfert

Nitrocellulose : la plus utilisée

PVDF : support hydrophobe (polyvinylidène difluoride)

Acides nucléiques, +++ **protéines** (car limite passage à travers membrane)

Nylon : support chargé +. +++ **Ac. nucléiques**

WESTERN BLOT

Détection **spécifique** d'espèces protéiques **rare**s

Les constituants protéiques abondants (actine, tubuline...) sont facilement détectés

Protéines de signalisation, facteurs de transcription.. Molécules très importantes

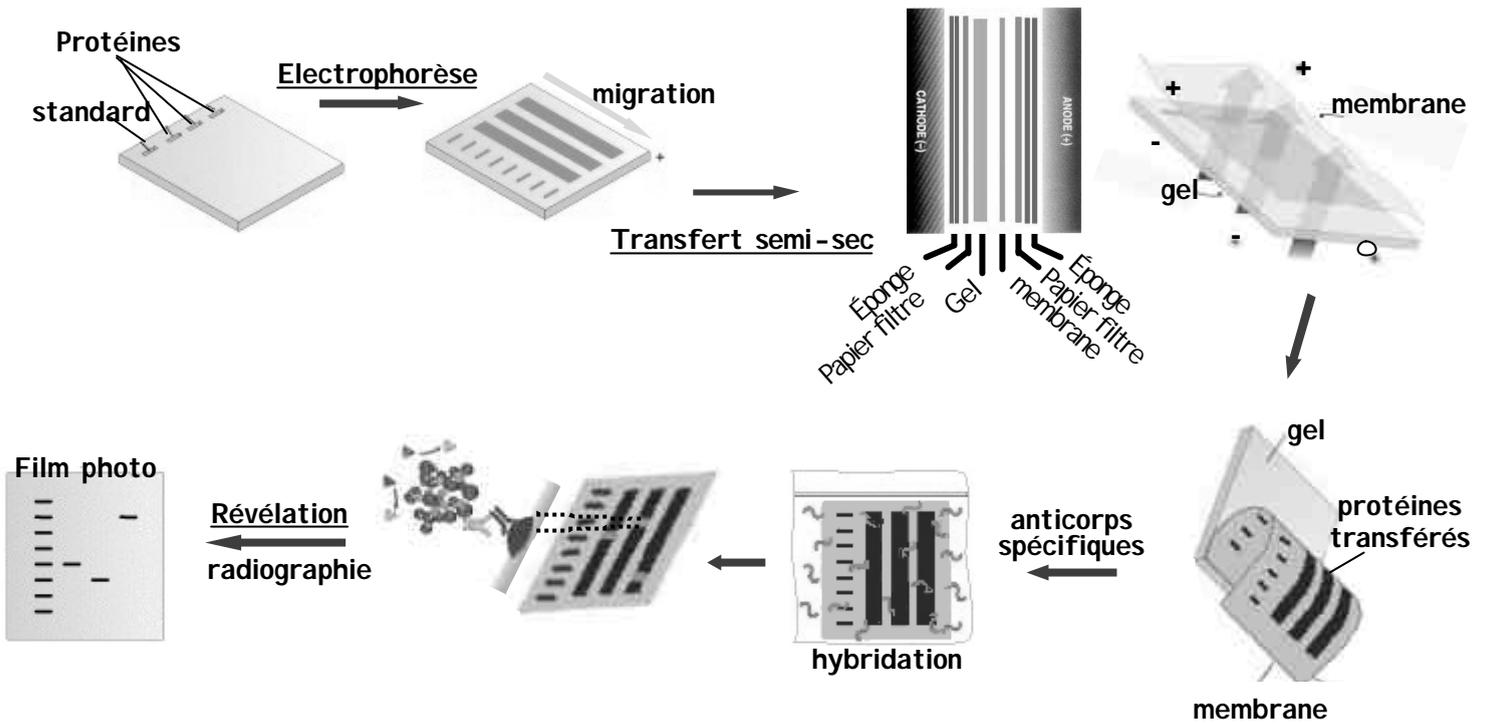
MAIS très peu représentées (< 0.1% des protéines cellulaires totales)

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

WESTERN BLOT



SOUTHERN & NORTHERN BLOTS

