

1. Définition

L'électrophorèse est une méthode d'analyse (identification et dosage) et de séparation basée sur la migration différentielle de particules, chargées électriquement sous l'influence d'un champ électrique.

Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

2. Principe de la migration électrophorétique

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 facteurs, la vitesse de migration va être variable ; ce qui permet la séparation des différentes molécules.

Facteurs influençant la mobilité électrophorétique

✓ La charge Q

La charge dépend du pH isoélectrique de la particule et du pH du tampon.

La différence **pH - pHi** détermine le **signe de la charge Q** d'une particule :

si $\text{pH} > \text{pHi}$	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si $\text{pH} < \text{pHi}$	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si $\text{pH} = \text{pHi}$	charge nette nulle	pas de migration

La différence **pH - pHi** détermine l'**intensité de la charge Q** d'une particule : plus cette différence est grande en valeur absolue, plus la charge est importante.

✓ La taille

La taille des molécules a une certaine influence, particulièrement dans le cas où les molécules passent à travers une matrice poreuse. Plus la taille des molécules est petite, relativement à celles des pores, plus les molécules se déplaceront facilement, ce qui implique évidemment qu'elles migreront rapidement.

✓ 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.

✓ Support

Certains supports possèdent des propriétés adsorbants 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.

✓ Champ électrique

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le 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.

3. Les différents types d'électrophorèses

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

3. 1. L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tisélius (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée: 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...).

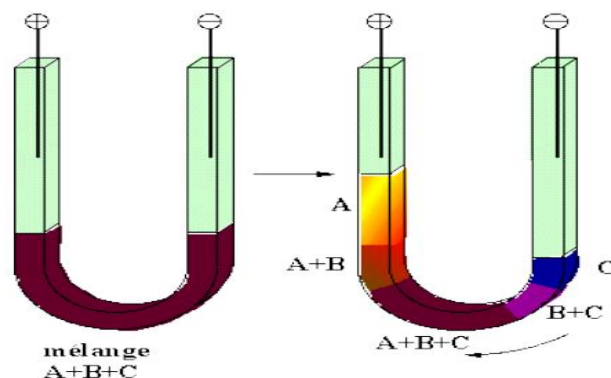


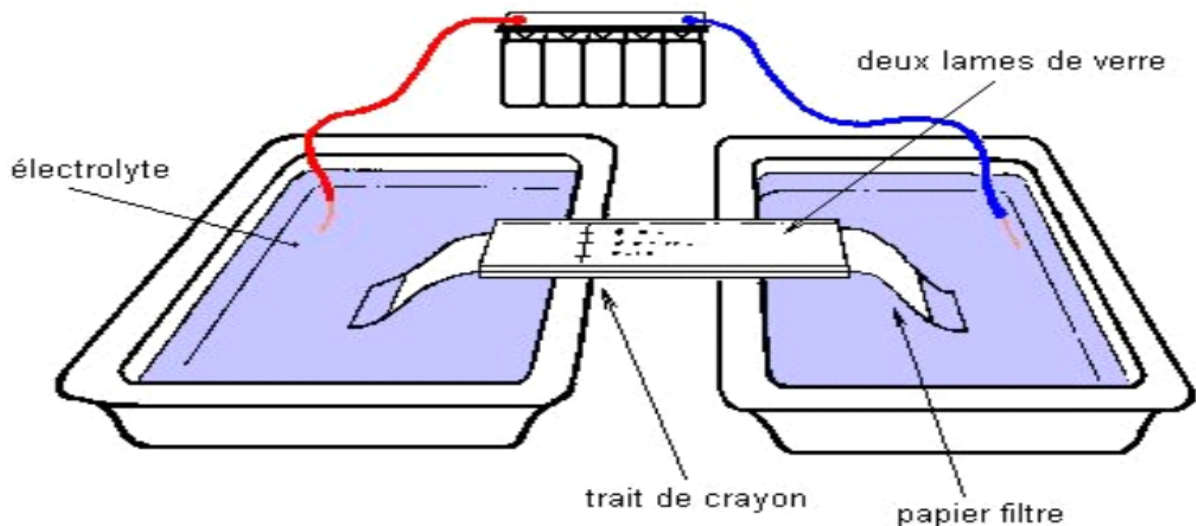
Fig 1 : appareillage pour l'électrophorèse libre, en veine liquide**3.2. L'électrophorèse sur supports (électrophorèse de zone)**

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

De nos jours, on n'utilise que des matrices solides pour supporter l'échantillon à analyser, c'est ce qu'on appelle une électrophorèse de zone. En effet les fractions séparées migrent comme des "zones" individuelles.

3.2.1. Électrophorèse sur papier

Assez peu résolutive, 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.

**Fig 2** : appareillage pour l'électrophorèse sur papier.**3.2.2. 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.

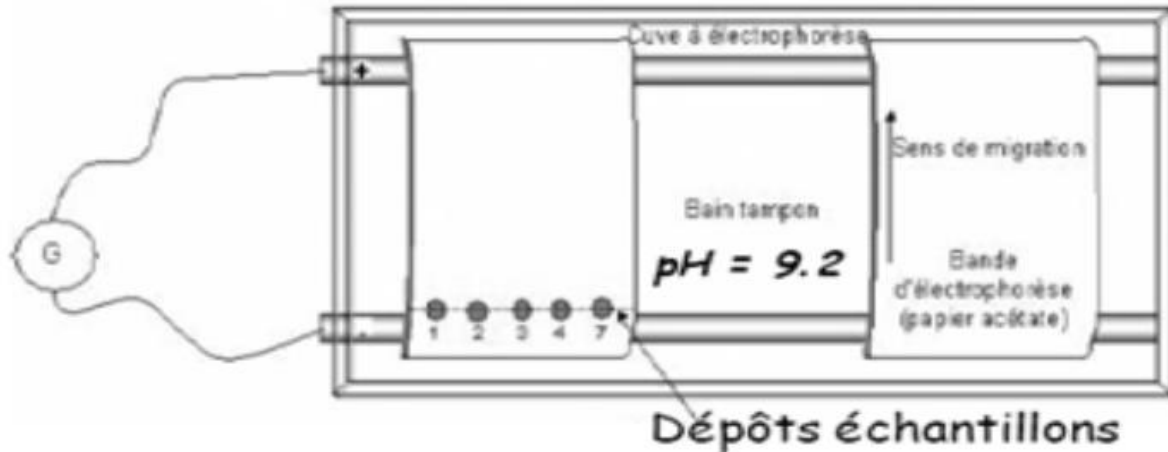


Fig 3 : appareillage pour l'électrophorèse sur les bandes d'acétate de cellulose.

3.2.3. Électrophorèse sur gel d'amidon :

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré.

3.2.4. 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.

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

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.

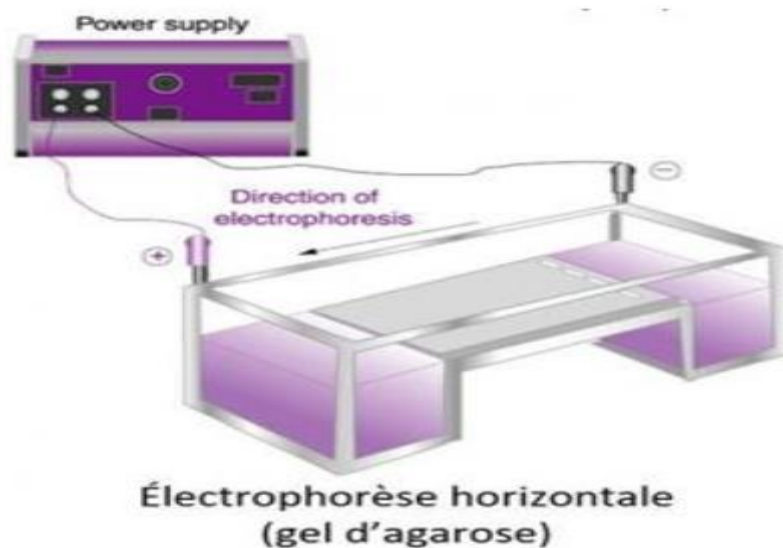


Fig 4 : appareillage pour utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose.

3.2.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

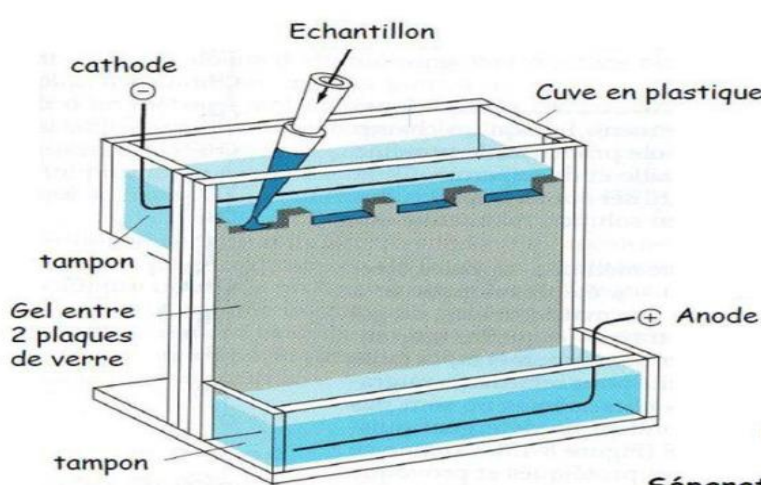
✓ L'électrophorèse en conditions non dénaturantes

Cette technique aussi appelé PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est très utilisée en immunologie, dans l'étude des protéines et également utilisée pour le séquençage de l'ADN.

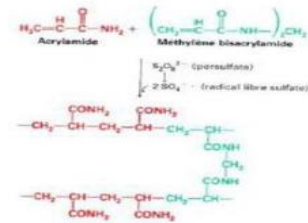
Le gel de polyacrylamide est constitué d'acrylamide (extrêmement neurotoxique par ingestion ou contact avec la peau) qui est l'unité de base et de bisacrylamide qui est l'agent porteur. En faisant varier les taux de ces 2 substances on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel.

On peut polymériser l'acrylamide entre deux plaques de verre ou à l'intérieur de tubes cylindriques de verre, où il formera un gel poreux. On dépose l'échantillon sur le sommet du gel de polyacrylamide, maintenu vertical. Les molécules pourront alors migrer à l'intérieur de ce gel.

Cette matrice électriquement inerte n'entrave pas la migration, permettant donc des séparations de haute résolution.



Déplacement de molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique.



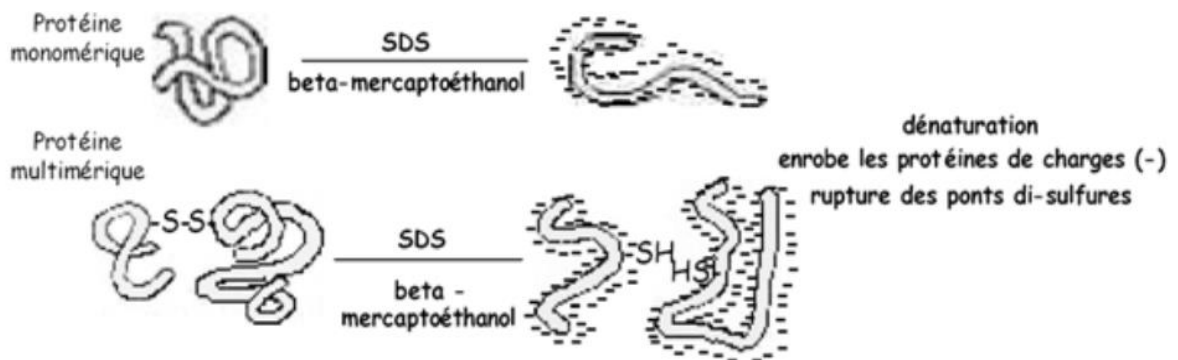
Gel: tamis moléculaire

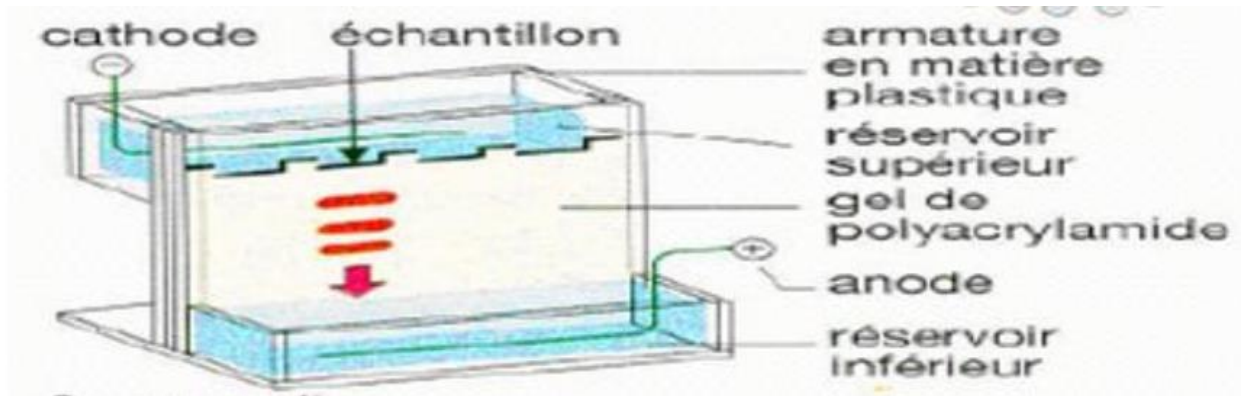
Séparation des molécules en fonction de la charge et de la masse

✓ L'électrophorèse en conditions dénaturantes

Une variante de cette technique consiste à utiliser du SDS (Sodium Dodécylsulfate) qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

Les protéines sont dites dénaturées: elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native. Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le β-mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines les rendant ainsi sous forme monomérique. La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines





Cette méthode donne la meilleure résolution et les bandes sont les plus résolues de toutes les méthodes d'analyse- en utilisant des marqueurs de poids moléculaires connus.

- cette méthode possède deux grands avantages par rapport à l'électrophorèse ordinaire :

- l'utilisation de SDS dissout les agrégats et les particules insolubles qui peuvent causer des problèmes en bloquant les pores du gel
- la mobilité électrophorétique possède une relation directe avec le poids moléculaire

3.2.6. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est l'une des méthodes les plus puissantes et les plus communes pour la séparation de centaines à milliers de protéines extraites à partir des tissus, des cellules, etc.

Le principe de la séparation des protéines dans l'électrophorèse bidimensionnelle est effectué en deux étapes principales : 1^{ère} dimension et 2^{ème} dimension. Dans la 1^{ère} dimension, les protéines sont résolues en fonction de leur point isoélectrique et séparées en bande étroite dans un gradient de pH dont on utilise la focalisation isoélectrique. Dans la 2^{ème} dimension, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire par SDS- PAGE. Les deux séparations sont effectuées en gel de polyacrylamide.

