



# Electrophorèse

Dr,  
Amrani Amel

# I- Introduction

L'**électrophorèse** est — avec la chromatographie — la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais est principalement utilisée en **biochimie** ou **biologie moléculaire** pour la séparation des **protéines** ou des **acides nucléiques**.

la séparation des particules se fait en fonction de leur **charge électrique** et pour des charges identiques, **en fonction de leur taille**.

# 1- Application d'electrophorèse

- 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 séquencer l'ADN et de déterminer la taille de fragments d'ADN ;
- de séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique du **Northen blot** (ARN) ou du **Southern blot** (ADN).

## 2- Principe d'électrophorèse

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un **gel (un polymère)** sous l'effet d'un **champ électrique**.

Les molécules se déplacent vers le pôle de charge **opposée** à **leur charge nette** ,


Les molécules **anioniques** (-) migrent vers **l'anode** (+) et les molécules **cationiques** (+) se déplacent vers la **cathode** (-).

Sur les acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements **phosphate** du squelette.

Sur les protéines, la situation est plus complexe et il existe différents types de groupements ionisables :

- Ceux pouvant acquérir une charge négative :
  - Les fonctions acide carboxylique (**-COOH**) de l'acide glutamique, de l'acide aspartique et de l'**extrémité C-terminale** de la chaîne polypeptidique ;
  - La fonction **thiol (-SH)** de la cystéine ;
  - Les fonctions **alcool (-OH)** de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine.
- Ceux pouvant acquérir une charge positive :
  - La fonction **guanido** de arginine ;
  - La fonction **imidazole** de l'histidine ;
  - La fonction amine (**-NH<sub>2</sub>**) de la lysine et de l'**extrémité N-terminale** de la chaîne polypeptidique.

La charge nette d'une protéine dépend donc en général de sa composition en **acides aminés** et du **pH**.



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

## 3- Les supports électrophorèses

**Liquide** => "électrophorèse en veine liquide"

**Support poreux** => "électrophorèse de zone" Obtention après migration d'une séparation en zones distinctes (bandes) des molécules chargées,

### 3-1/ Différents supports d'électrophorèse de zones

a- papier

b- acétate de cellulose

c - semi-solide (gels)

### 3-2/ Différents types d'électrophorèse sur gel

- électrophorèse sur gel d'agarose

- focalisation isoélectrique

- électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

- électrophorèse bi-dimensionnelle

- électrophorèses en conditions dénaturantes (détergents SDS ou urée)

## 4- Facteurs influençant la migration

- **La mobilité électrophorétique dépend de plusieurs**

**facteurs:**

- Charge électrique nette, celle-ci dépend de la différence entre le pH du milieu et le pI de chacune des particules
- Taille et géométrie de la molécule
- Viscosité du tampon
- Intensité du champ électrique
- Température





- la migration dépend:

de la charge de la protéine

de sa taille

du support (gel plus ou moins réticulé, papier)

-dans la focalisation isoélectrique (électrophorèse dans gradient de pH) la migration dépend uniquement du pI

-dans l'électrophorèse "SDS-PAGE"\*, la vitesse de migration dépend

- de la taille de sous-unité (protéine dénaturée)

- du degré de réticulation du gel

\* Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

## II- 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)

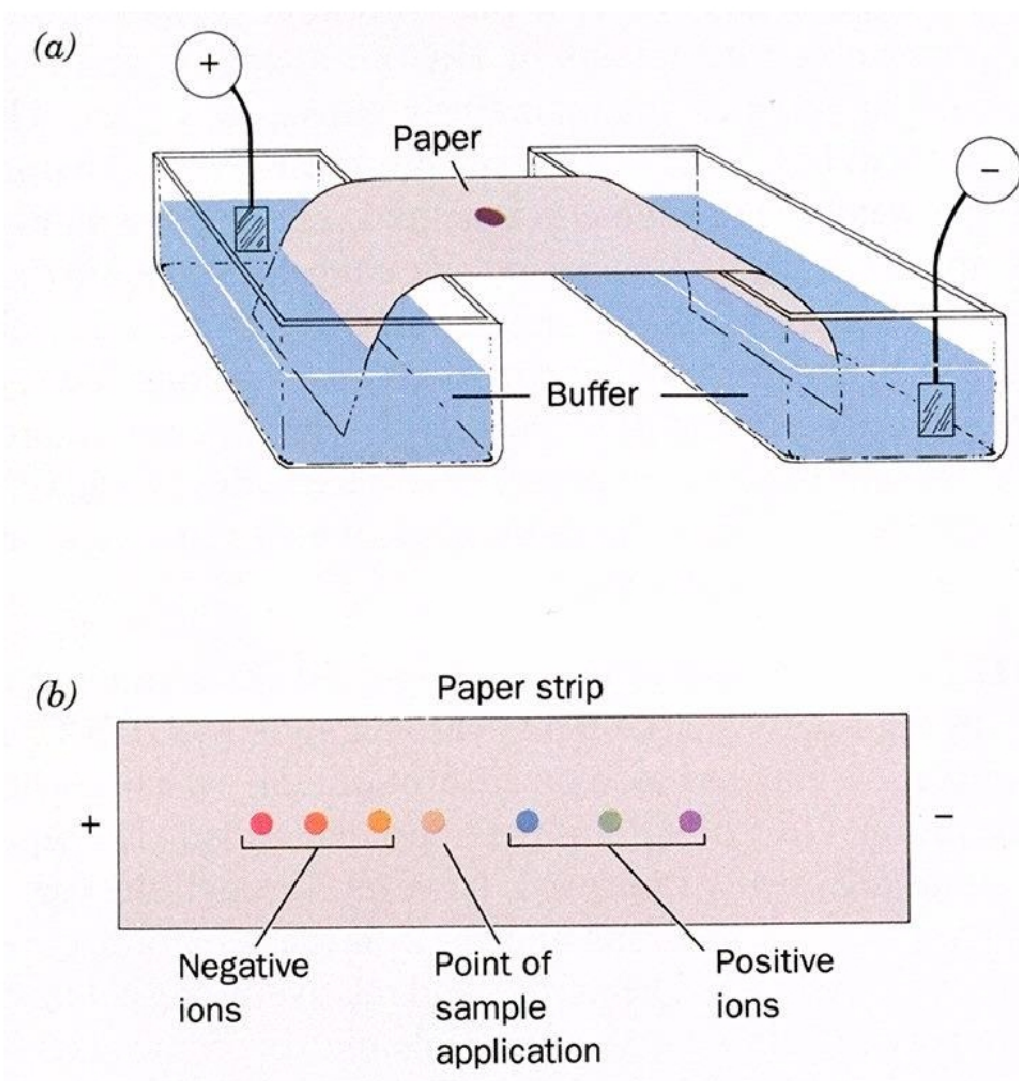
- Séparation des petites molécules (acides aminés ou petits peptides),
- Détermination du point isoélectrique d'un acide aminé

### L'électrophorèse sur acétate de cellulose

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

# figure: Électrophorèse sur papier

- Papier filtre ou acétate de cellulose
- Champ électrique: env. 20 V/cm
- cathode (-): attire les cations (+)
- anode (+): attire les anions (-)



# III- Électrophorèse en gel:

Gels avec pores de dimensions moléculaires de taille variable

1. **Polyacrylamide:** petite taille des pores

2. **Agarose:** grande taille des pores

La taille des pores varie aussi avec la concentration des gels

Plus la concentration  plus la taille

La séparation des molécules repose sur:

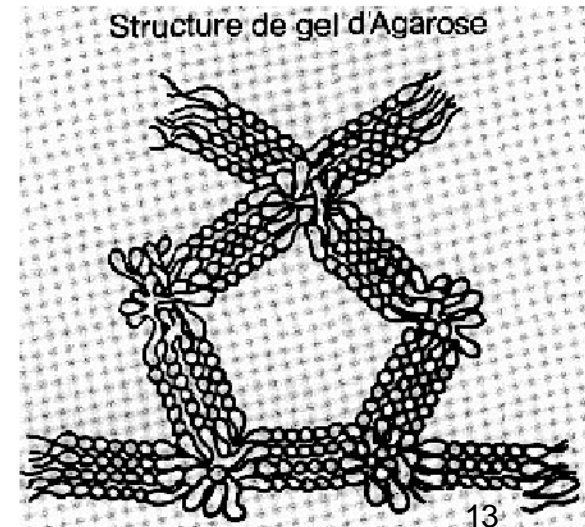
Gel-filtration (grosses molécules ralenties par rapport aux petites)

# 1- Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide ou **PAGE** est une application de l'électrophorèse de zone, elle est très utilisée pour l'étude des protéines ou pour le séquençage de l'ADN.

# 2- Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer l'ADN, l'ARN ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire : **les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.**



### 3- Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

La technique du gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis" ou SDS-PAGE) a été décrite par **Ulrich Laemmli** en 1970. **SDS-PAGE** utilisé pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine ou de ses sous-unités,

**A/ Dénaturation des protéines**

**B/ Séparation par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

## A/ Dénaturation des protéines

On fait bouillir un mélange de protéines en présence :

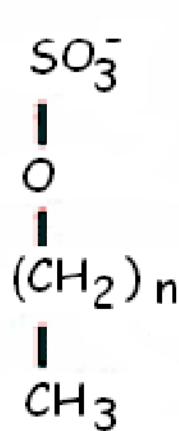
- d'un agent réducteur : le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.
- d'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges **négatives**.

En conséquence :

- les protéines sont **dénaturées** : elles ont perdu leur **structure tridimensionnelle native**
- les protéines n'ont plus **de pont disulfure** : elles sont sous une forme **monomérique**

En présence de Sodium dodécylsulfate (SDS), détergent anionique qui défait la structure spatiale et se fixe sur les protéines, toutes les molécules sont chargées de la même façon, et la séparation est alors uniquement fonction de la **masse molaire** <sup>15</sup>

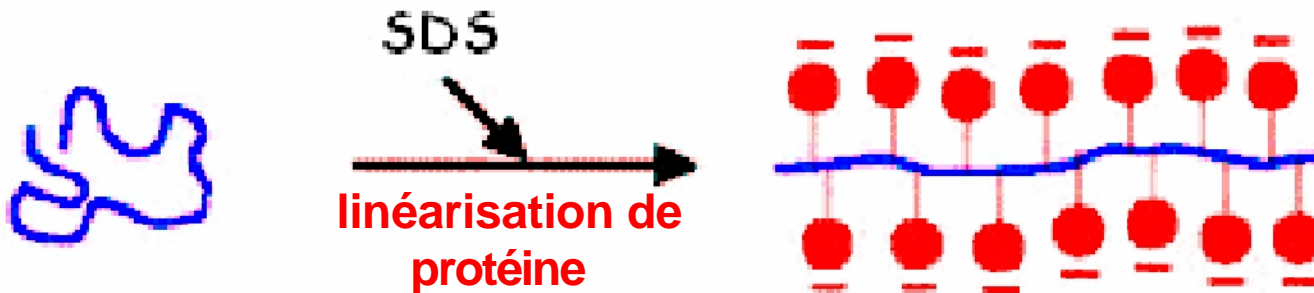
# Principe de formation du complexe SDS-protéines dénaturées



tête chargée négativement

Le SDS se lie très fortement aux protéines en leur conférant une forme de bâtonnet. Les protéines lient environ une molécule de SDS pour deux résidus d'acides aminés

## Combinaison d'une protéine avec SDS



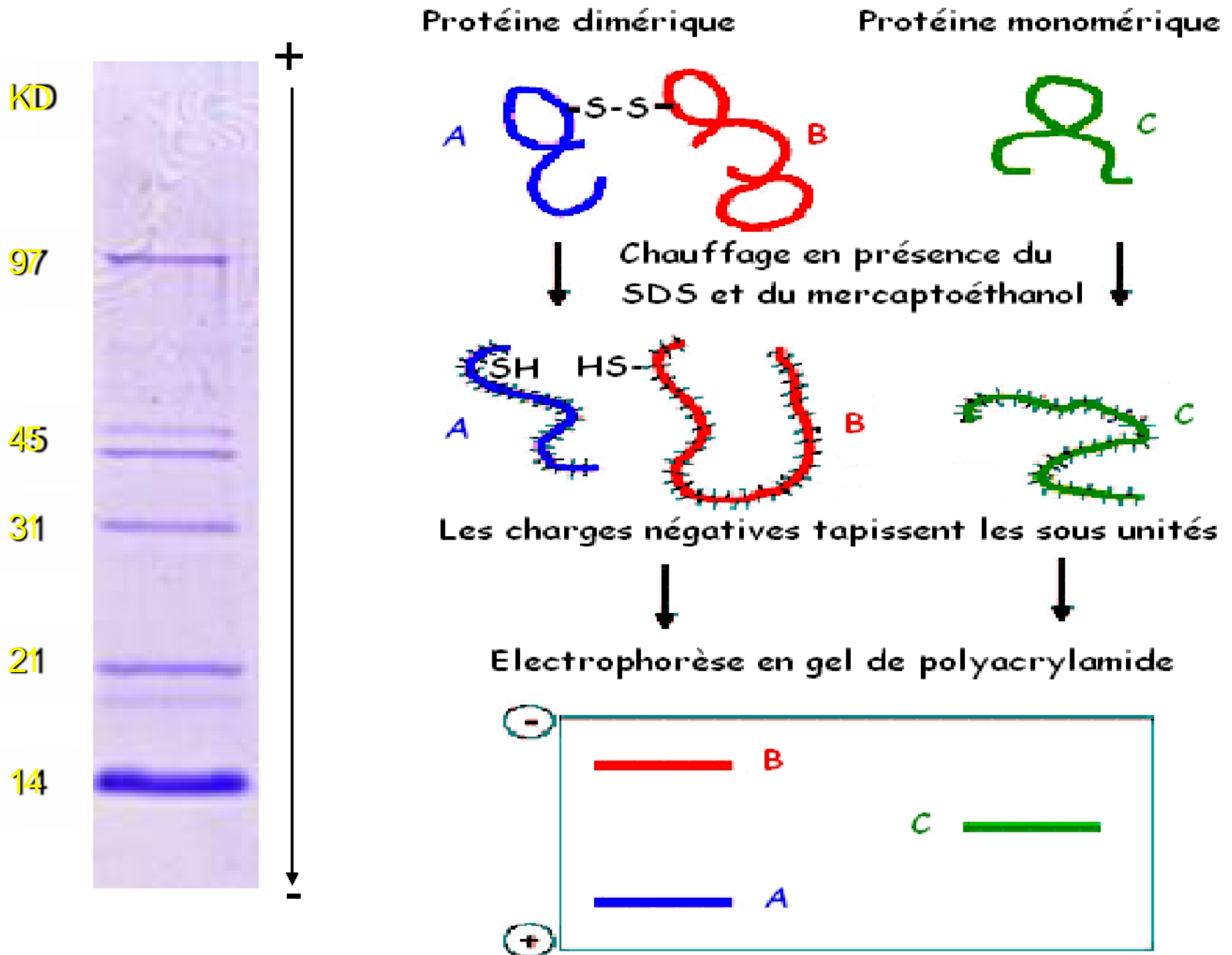
La forte charge négative apportée par le SDS masque la charge intrinsèque de la protéine

Les protéines sont chargées négativement.

Elles migrent vers l'anode en fonction de leur PM



# Électrophorèse en SDS-page: détermination de la MM



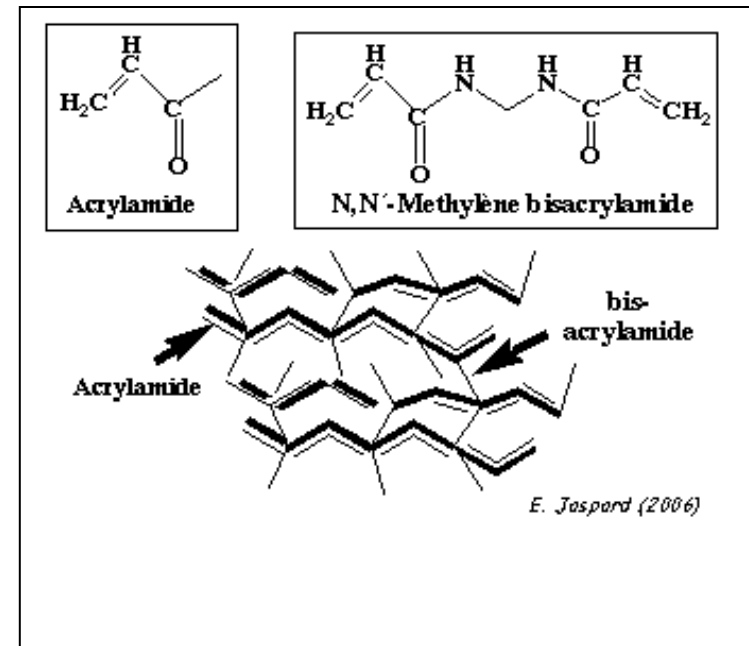
## B/ Séparation par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide

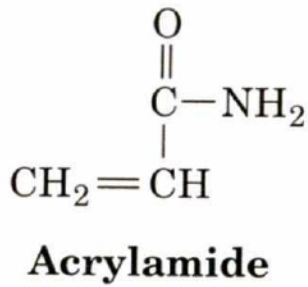
Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel **de polyacrylamide** en présence de SDS.

Le gel **de polyacrylamide** C'est un **gel réticulé**, obtenu par polymérisation:

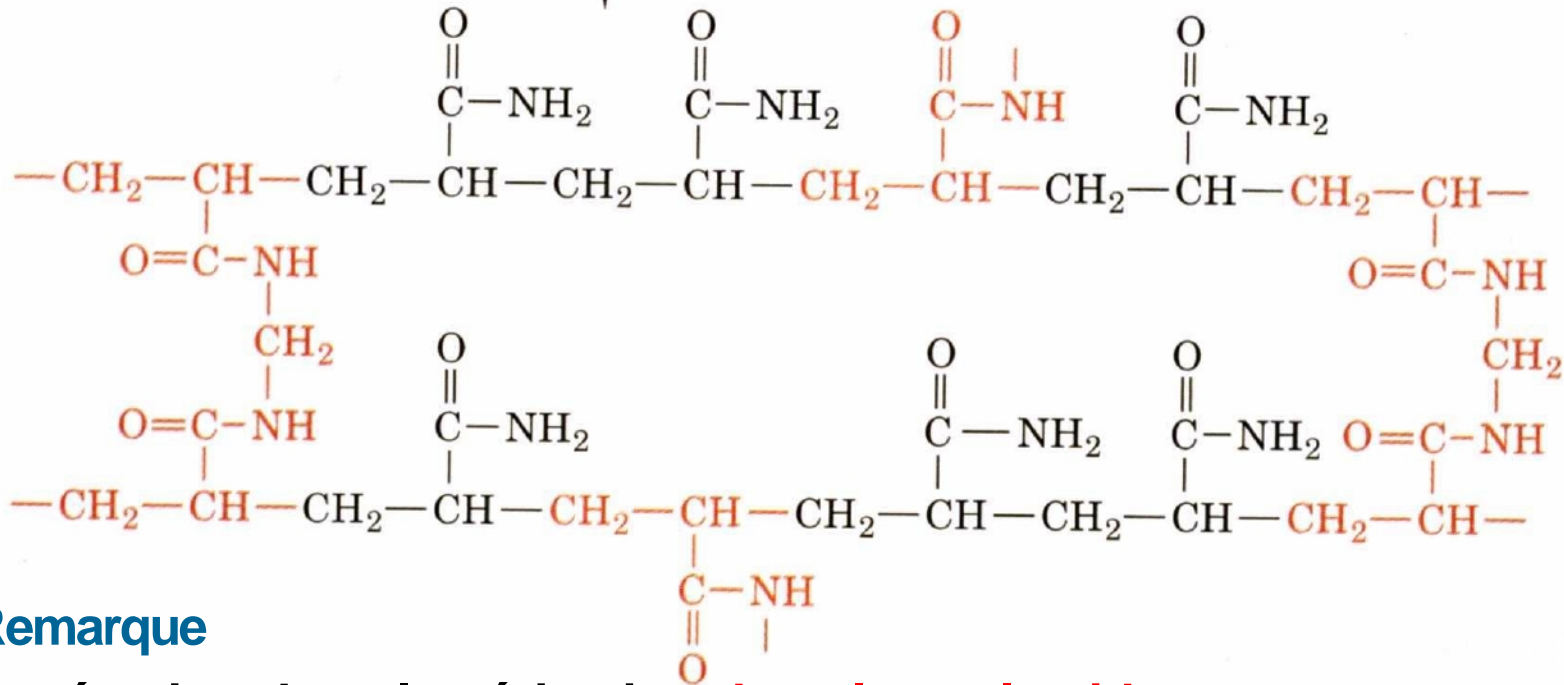
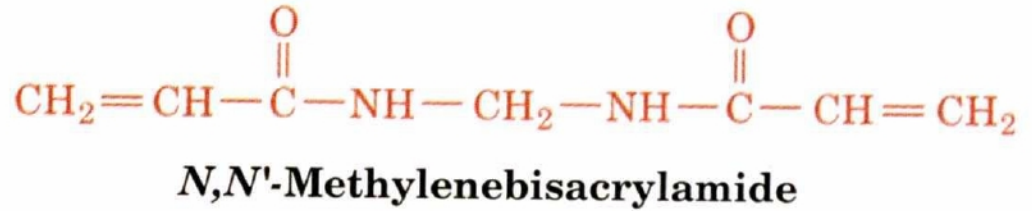
- **d'acrylamide** qui forme des chaînes
- et de **bis-acrylamide** qui pontent les chaînes d'acrylamide

Plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées.






+



### Remarque

La réaction de polymérisation **de polyacrylamide** est :

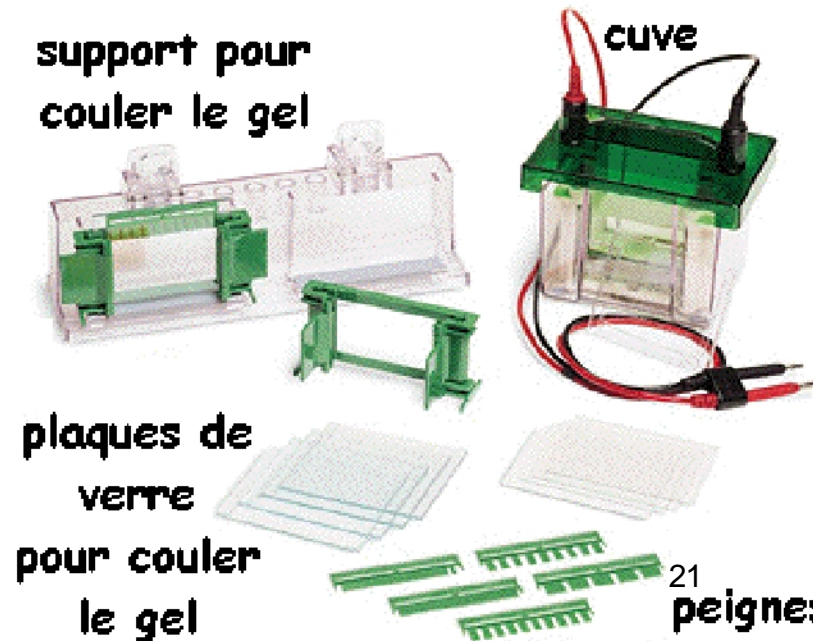
- Initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS)
- Catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-1-2-diaminométhane)



<b>Pourcentage d'acrylamide</b>	<b>Gamme de séparation en kDa</b>
<b>7,5</b>	<b>45 - 400</b>
<b>10</b>	<b>22 - 300</b>
<b>12</b>	<b>13 - 200 15</b>
<b>15</b>	<b>2,5 - 100</b>

- Le gel est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques.
- Après polymérisation du gel, le peigne est retiré formant ainsi des puits. La taille et le nombre des dents des peignes sont variables ce qui permet de déposer des volumes allant de 20  $\mu\text{L}$  à 200 $\mu\text{L}$  d'échantillon de protéines à séparer.
- Les plaques de verre contenant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse.
- Du tampon d'électrophorèse conducteur (électrolytes) est mis dans la cuve et la migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique :

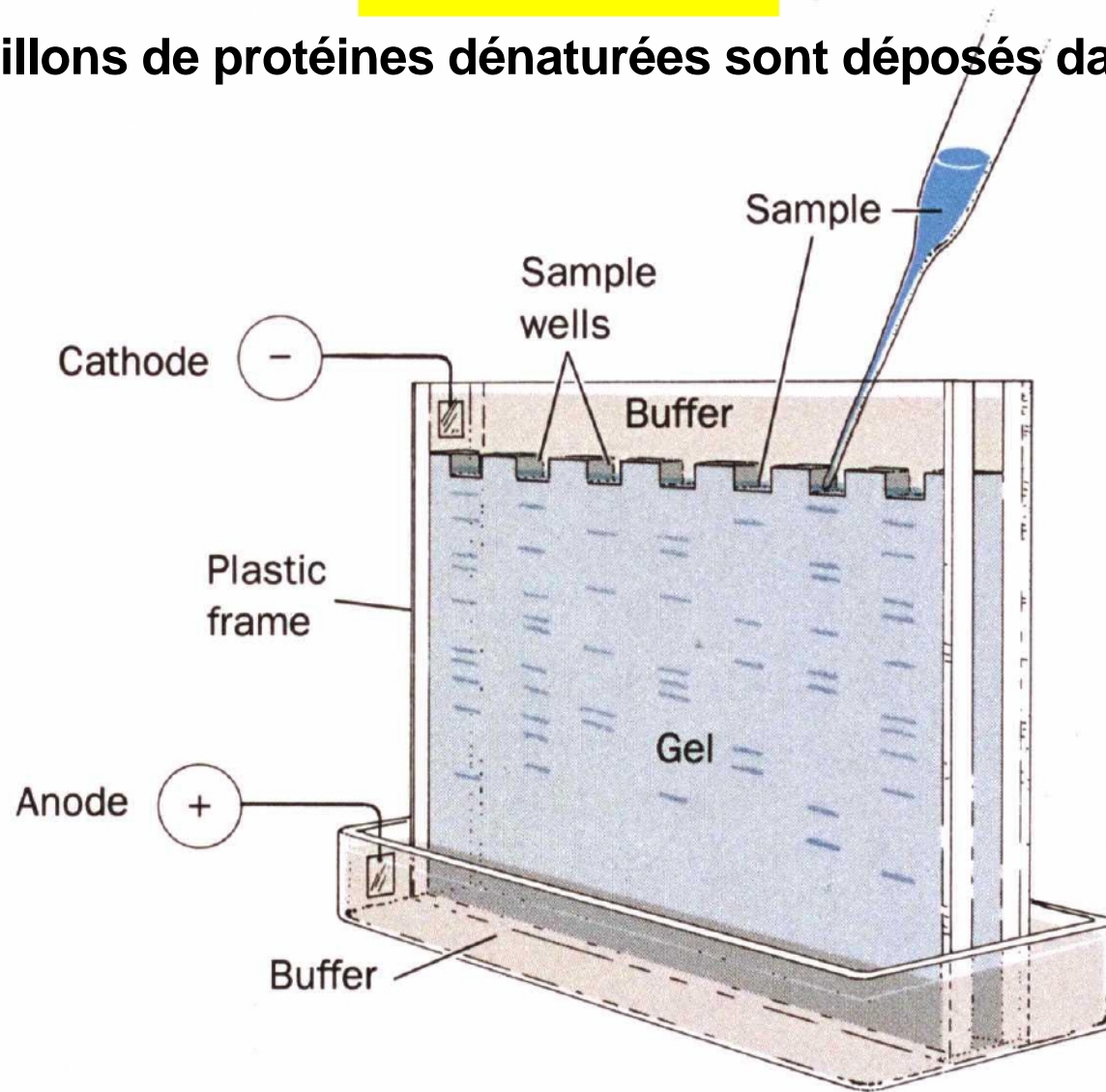
**tampon d'électrophorèse** : Tris 50 mM -

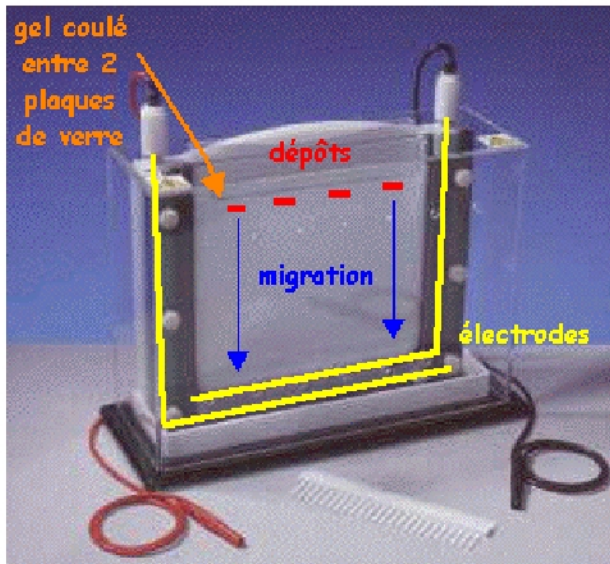


**Glycine 0,2 M - SDS 0,1% - pH 8,3 - 8,8**

# SDS-PAGE

- Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits.





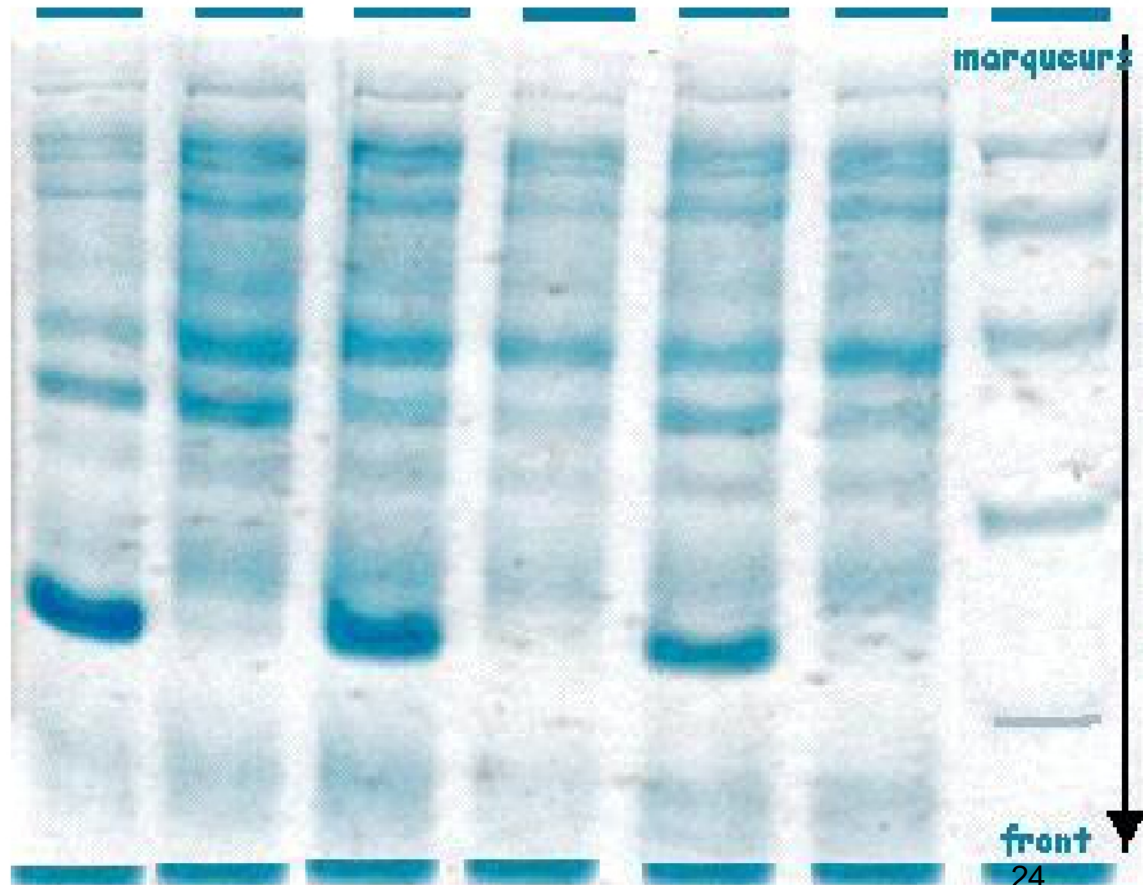
- Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique.
- Les protéines sont **révélées** par une coloration : par exemple avec le **bleu de Coomassie** ou le **nitrate d'argent** .



- On obtient différentes **bandes** pour chaque piste (la flèche indique le sens de migration).
- La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues (piste de droite).

### Exemple de marqueurs :

- myosine (205 kDa)
- $\beta$  galactosidase (116 kDa)
- phosphorylase  $\beta$  (97,4 kDa)
- albumine (66 kDa)
- ovalbumine (45 kDa)
- anhydrase carbonic (29 kDa)

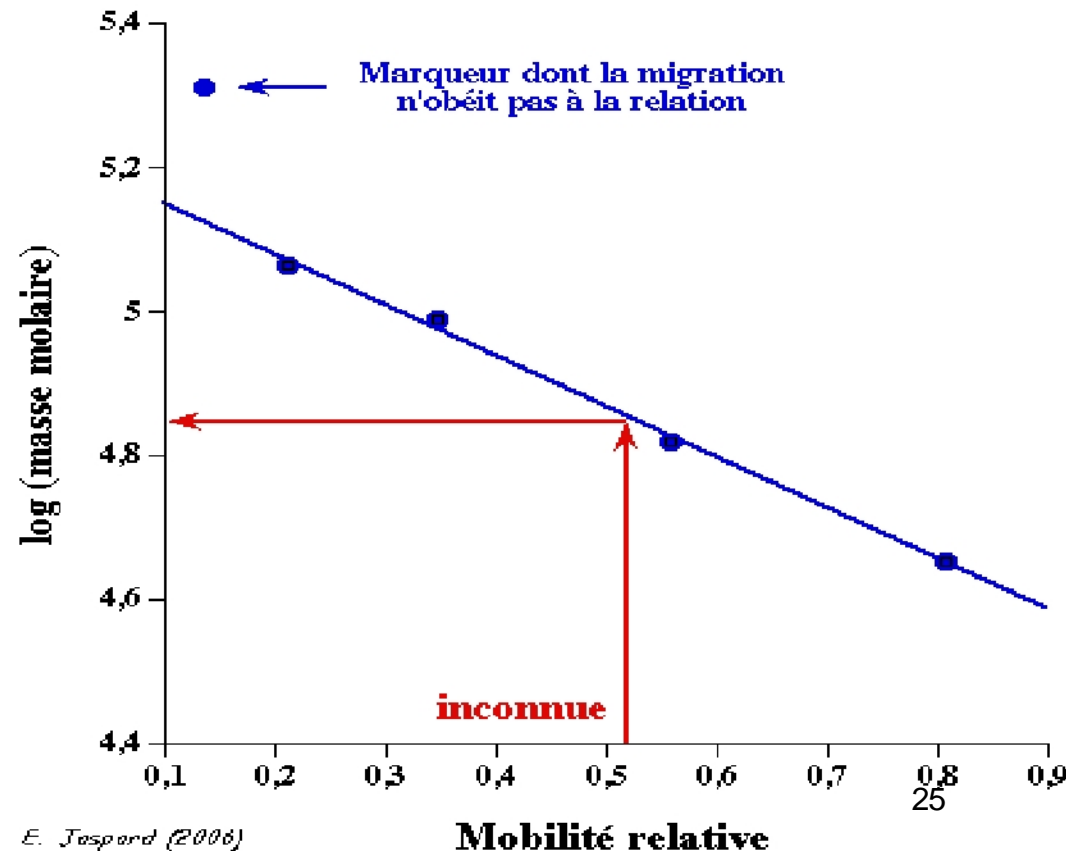


## Détermination de la masse molaire d'une protéine

distance de migration d'une bande

La **mobilité relative** est le rapport :  $\frac{\text{distance de migration d'une bande}}{\text{distance de migration du front de migration}}$

La droite :  **$\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$**   
permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.



## 4- Electrofocalisation

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).

# Focalisation isoélectrique

Un ampholyte est une espèce chimique pouvant se comporter à la fois comme un acide et une base

**Repose sur les différences de PHi entre protéines.**

1- Une première électrophorèse est effectuée avec une solution de molécules amphotères à travers un gel.


La migration de ces molécules dans un champ électrique crée un gradient de pH au niveau du gel.

Les molécules amphotères vont se répartir en fonction de leurs PH:

les plus acides se rassemblent vers l'anode

les plus basiques se positionnent vers la cathode

**Ainsi, le pH  de l'anode vers la cathode.**



2- La solution de protéines est ensuite déposée sur le gel pour effectuer une seconde électrophorèse.

Les protéines se déplacent dans le **gradient de pH** du gel, jusqu'à ce qu'elles arrivent à une zone correspondant à leur P<sub>Hi</sub> respectif.

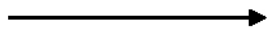
**À ce P<sub>Hi</sub>, les protéines n'auront plus de charge nette, elles vont donc arrêter de migrer.**

**Chaque protéine se trouve donc concentrée sous forme d'une bande étroite autour de son point isoélectrique à  $\pm 0.01$  unités de pH.**

# figure. les étapes de la focalisation isoélectrique

- 1- Création d'un gradient de pH (solution d'ampholytes)
- 2- Séparation des protéines natives en fonction du pHi

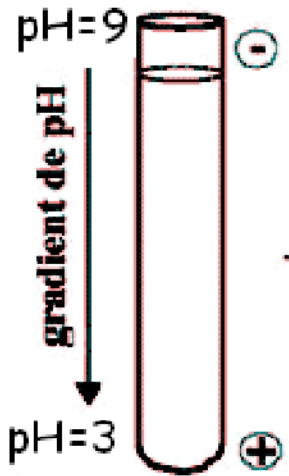
Ampholytes  
basiques



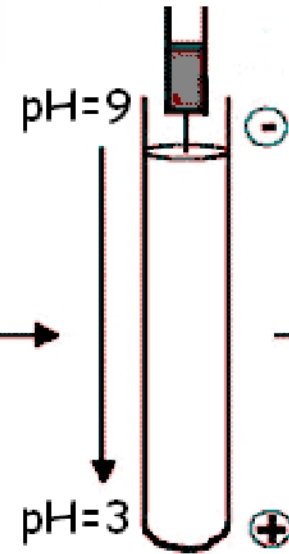
Ampholytes  
acides



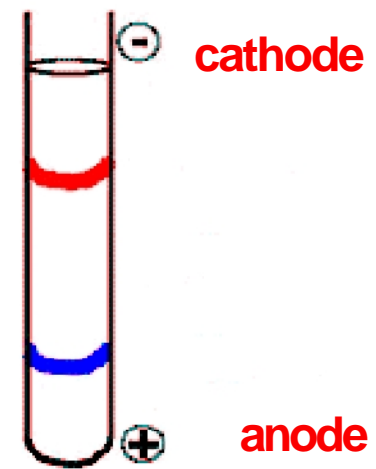
Incorporation  
de Solution  
d'ampholytes  
au gel



Ajout de  
protéines



Protéines natives  
migrent jusqu'au pH  
correspondant à leur  
pHi



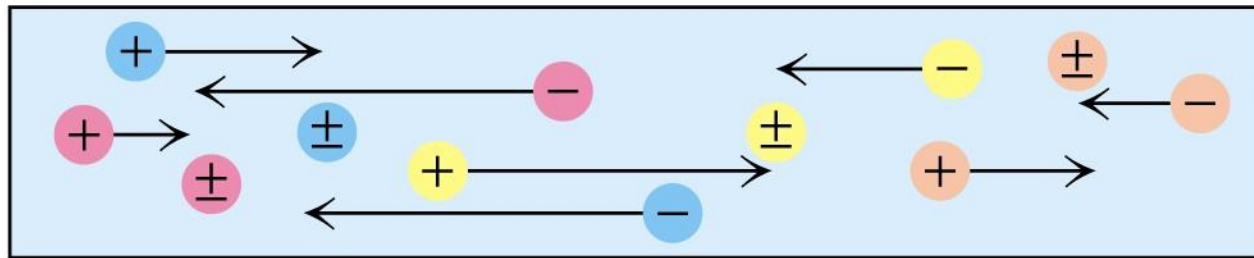
Etablissement d'un  
gradient de pH après  
application d'un  
champ électrique

# figure. Focalisation isoélectrique

Matrice (gel) ayant un gradient de pH: le pH augmente lentement de l'anode vers la cathode, chaque protéine va migrer jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son point isoélectrique:

(A)

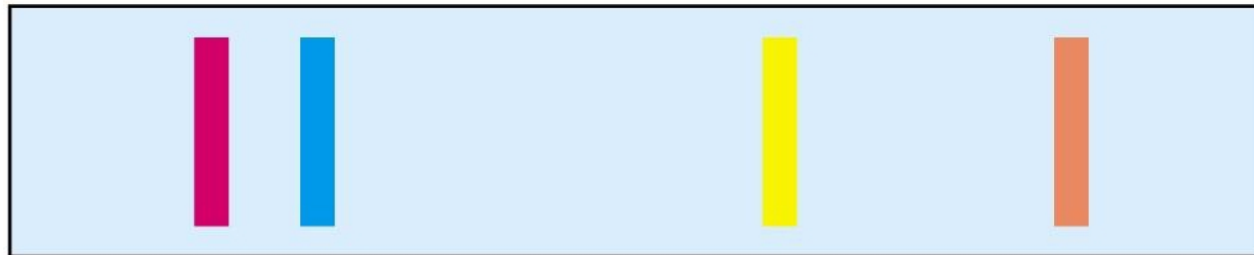
Low pH  
Anode (+)



High pH  
Cathode (-)

(B)

Low pH  
Anode (+)

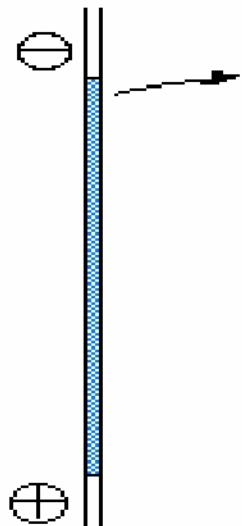


High pH  
Cathode (-)

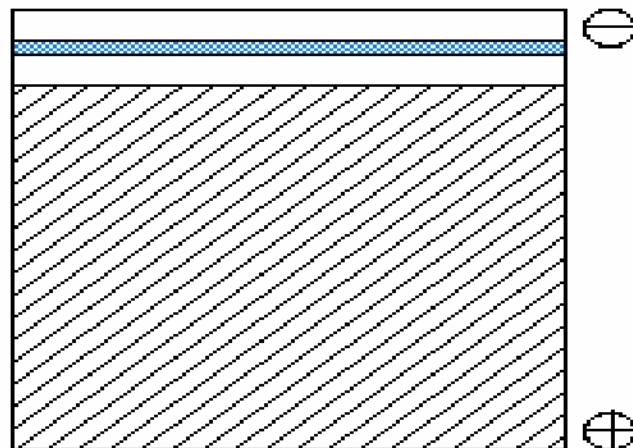
## 5- Electrophorèse bidimensionnelle

On sépare selon le **pHi** dans une dimension et selon la **masse molaire** dans l'autre dimension (PAGE-SDS); on sépare ainsi environ 1000 protéines

1ère dimension  
électrofocalisation  
(ampholytes)

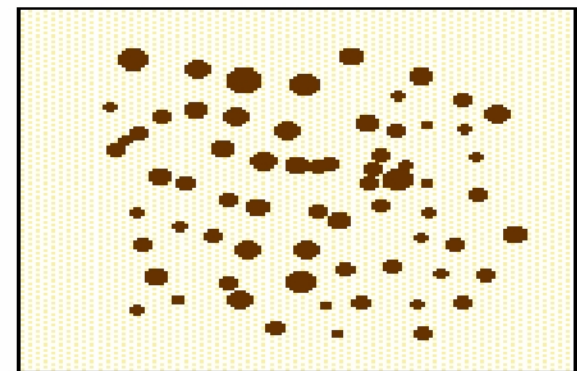


2ème dimension  
gel dénaturant  
(SDS-PAGE)



coloration (AgNO3)

séparation selon pHi



séparation selon P.M.



## 6- Gel d'électrophorèse d'ADN

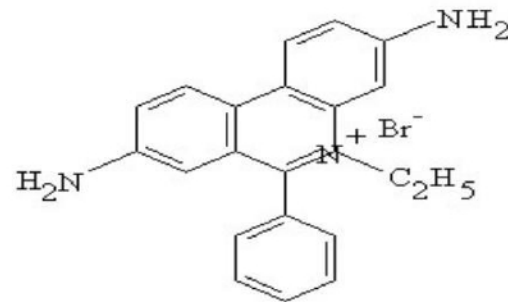
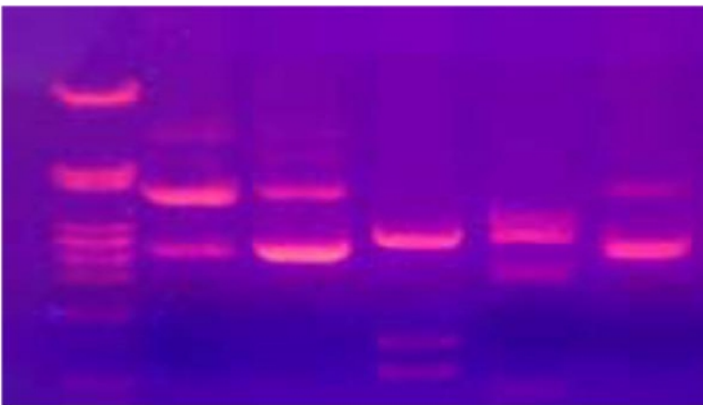
On utilise en général un gel de 1 à 2 % M/V (1 à 2 g d'agarose pour 100 ml de volume final). L'augmentation de la concentration en agarose dans le gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragments d'ADN de plus petite taille.

### Applications et avantages

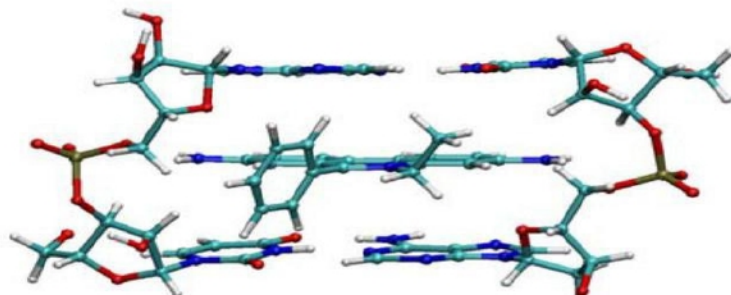
- Estimation de la taille d'un fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction.
- Analyse d'ADN ou d'ARN après amplification PCR
- Séparation de fragments ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas du Northern Blot
- Préparation aisée et rapide des gels d'agarose
- Pas de dénaturation des échantillons
- Agarose plus ferme que le gel de polyacrylamide
- Les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires<sub>32</sub>.

# Révélation de l'ADN

La méthode la plus utilisée est la révélation au **bromure d'éthidium (BET)**, qui est un agent d'intercalation fluorescent couramment utilisé comme marqueur d'acides nucléiques en laboratoire de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des **rayonnements UV**, il prend une **coloration rouge-orangée**, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.



Ethidium Bromide



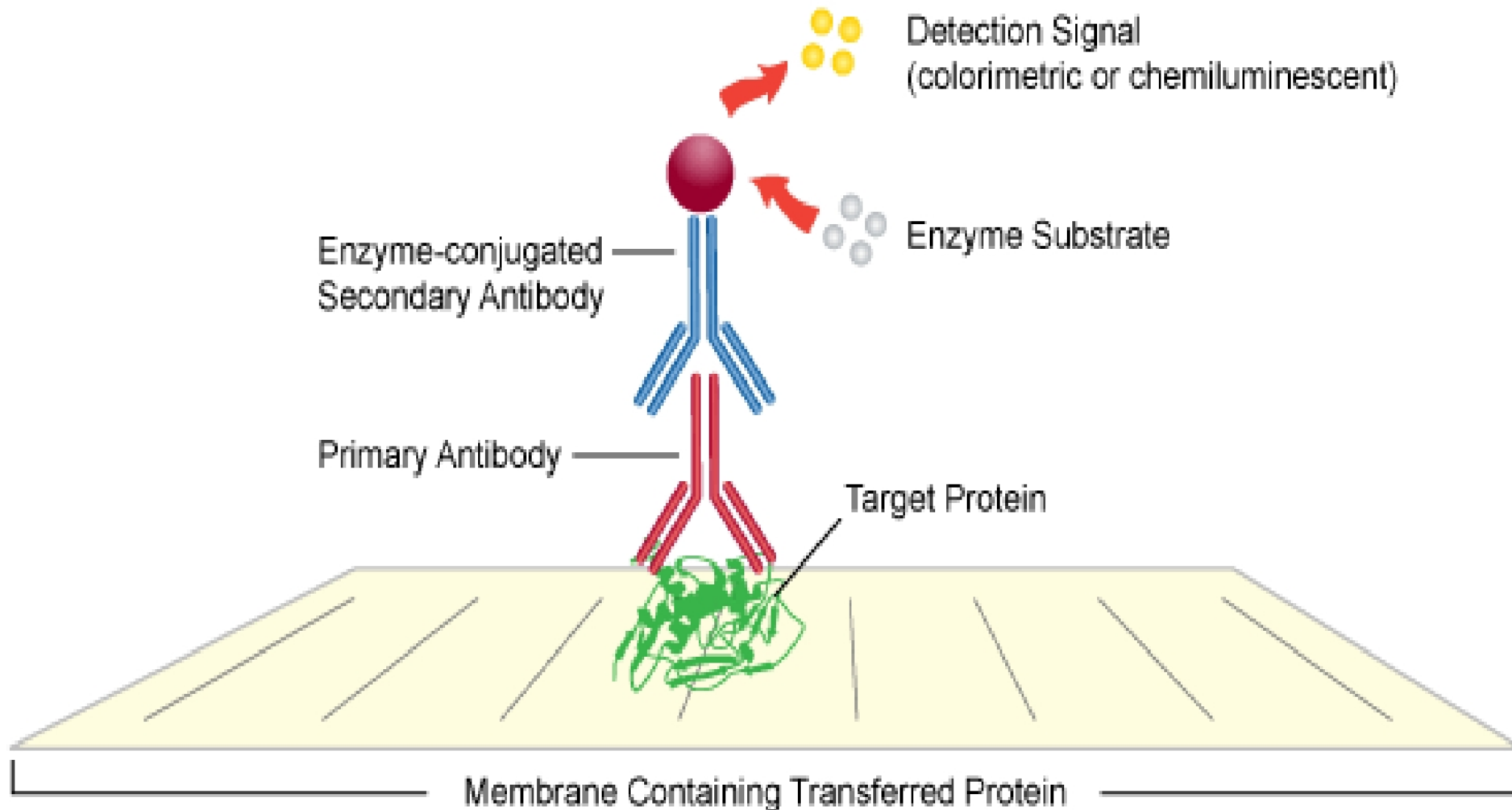
## **Western blot** : Révélation d'une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique

Après une électrophorèse standard sur plaque, le gel est recouvert d'une **membrane de nitrocellulose**.

Le sandwich de gel et de membrane est remplacé dans une chambre d'électrophorèse, de sorte que les **protéines migrent du gel vers la nitrocellulose**, où elles se lient irréversiblement.

La membrane peut alors être ôtée et trempée dans une solution contenant un anticorps de la protéine d'intérêt.

Ce complexe protéine-anticorps, formé sur la membrane peut alors être détecté par ajout d'un anticorps marqué et qui se lie sur le premier anticorps utilisé.



**Diagram 2:** Illustration of detection in Western Blots.

# "Western blot" = "immunoempreinte"

Révélation d'une protéine à l'aide d'un anticorps spécifique

- 1 Perform gel electrophoresis on a sample containing the protein of interest
- 2 Blot the proteins from the gel onto nitrocellulose
- 3 Block the unoccupied binding sites on the nitrocellulose with casein
- 4 Incubate with rabbit antibody to the protein of interest
- 5 Wash and incubate with an enzyme-linked goat anti-rabbit antibody
- 6 Assay the linked enzyme with a colorimetric reaction

