

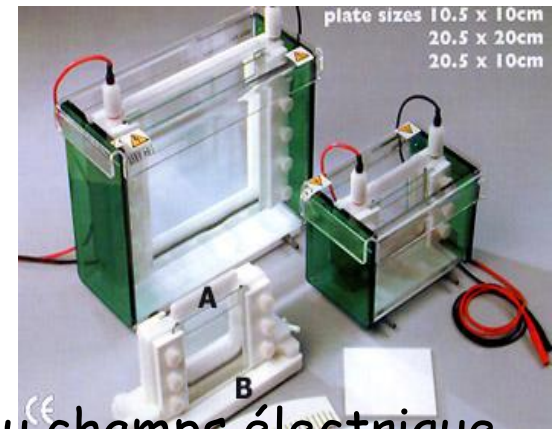
# L'électrophorèse

SAIT-DIB 5

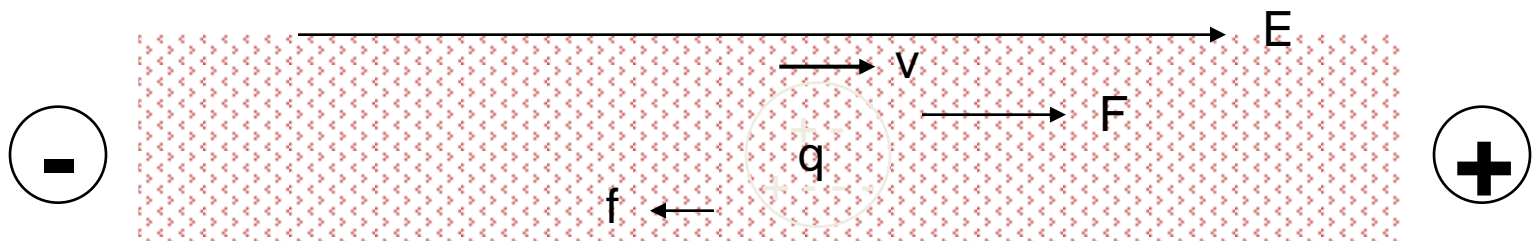
## L'ÉLECTROPHORÈSE

- Séparation de particules sous l'action d'un champ électrique.
- Technique principalement analytique mais qui peut être également utilisée comme technique préparative.

# L'électrophorèse



1. Les molécules sont séparées sous l'effet du champs électrique,
2.  $F = qE$  :  $q$  charge nette,  $E$  intensité du champs électrique,
3.  $qE = fv$  :  $f$  force de friction,  $v$  vitesse,
4. Mobilité =  $v/q = q/f = q/6\pi\eta r$  : où  $\eta$  est la viscosité du milieu,  $r$  est le rayon de la molécule sphérique.



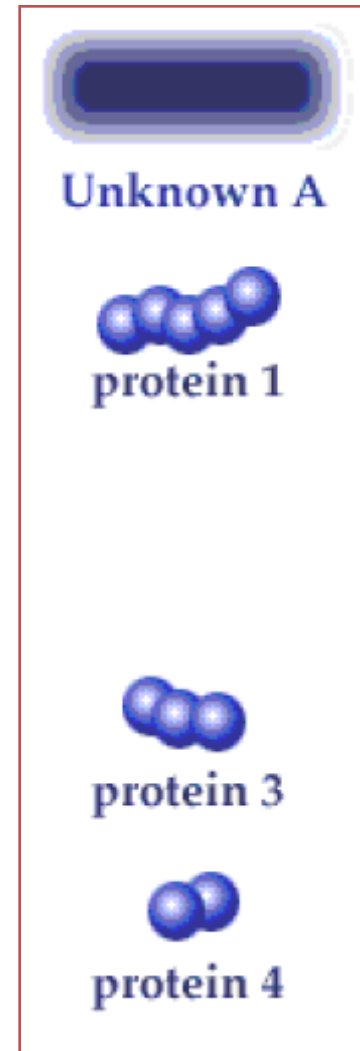
## Facteurs affectant la mobilité des molécules:

### 1. Facteurs moléculaires

- Charge,
- Taille,
- Forme.

### 2. Facteurs environnementaux

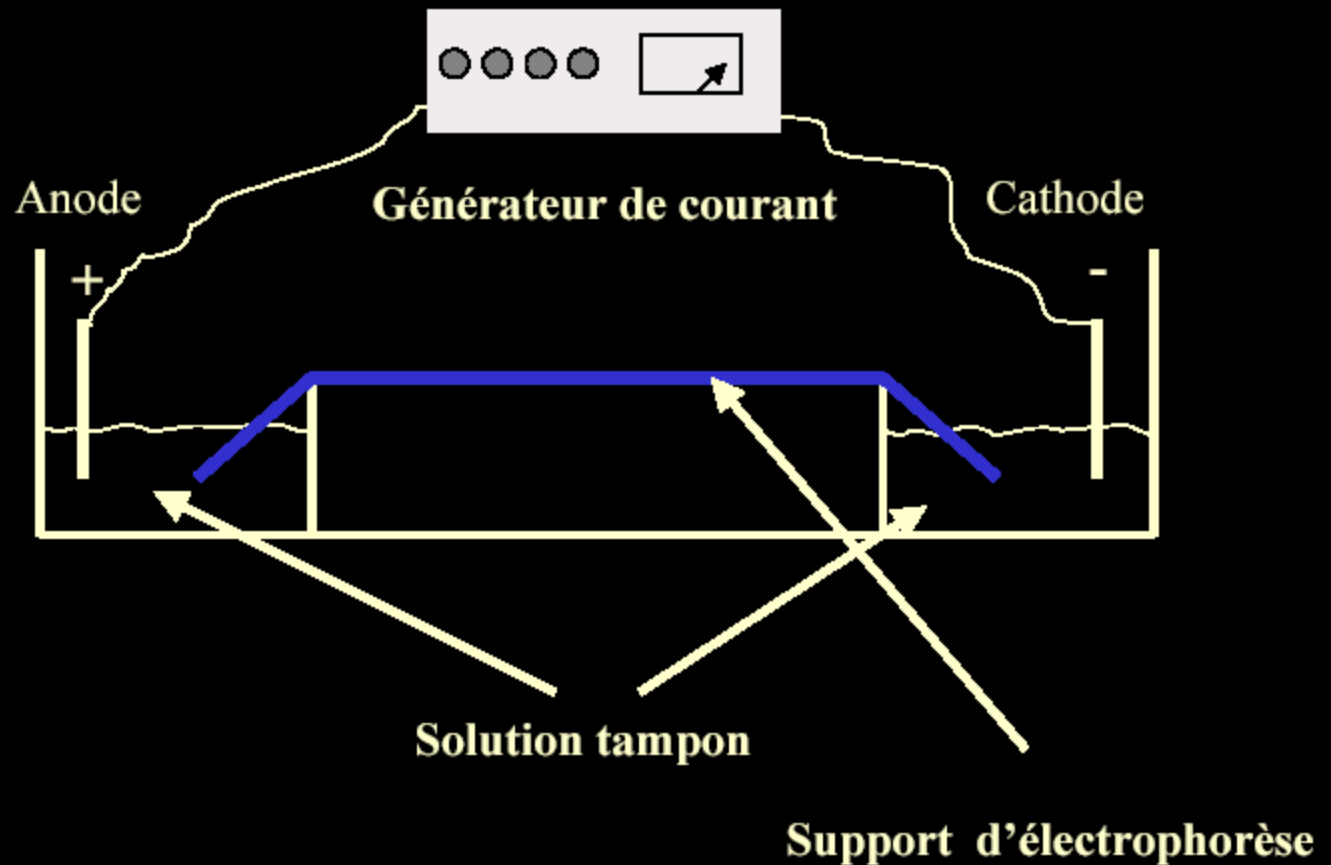
- L'intensité du champs électrique,
- Le support,
- Tampon d'électrophorèse.



# Types de supports

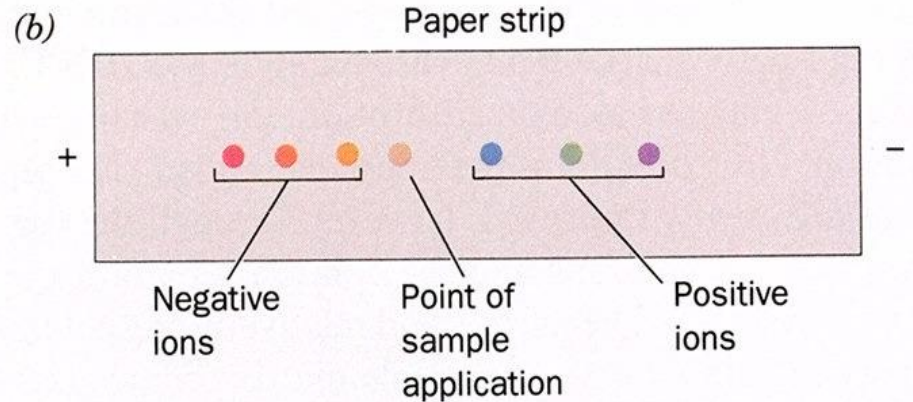
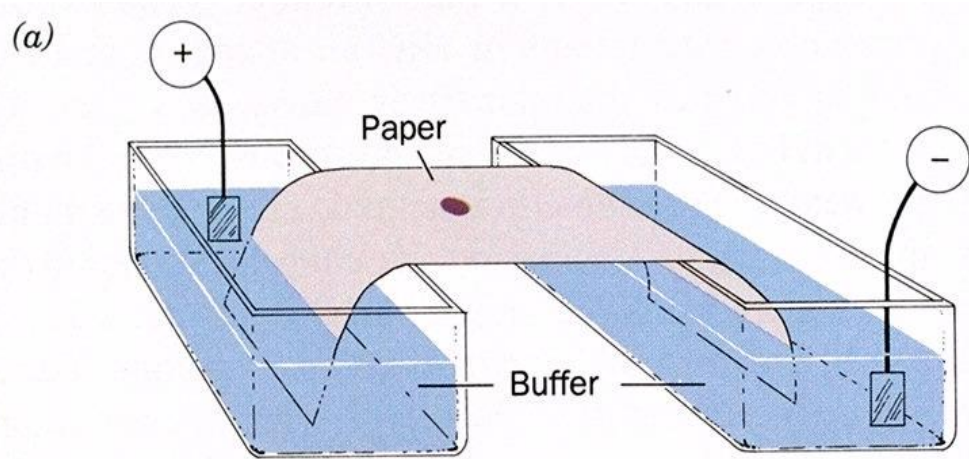
- Papier,
- Gel d'agarose (*Agarose gel electrophoresis*),
- Gel de polyacrylamide (*PAGE*),
- Acétate de cellulose.

## SCHÉMA D'UN MONTAGE D'ÉLECTROPHORÈSE



# Électrophorèse sur papier

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



# Électrophorèse sur papier

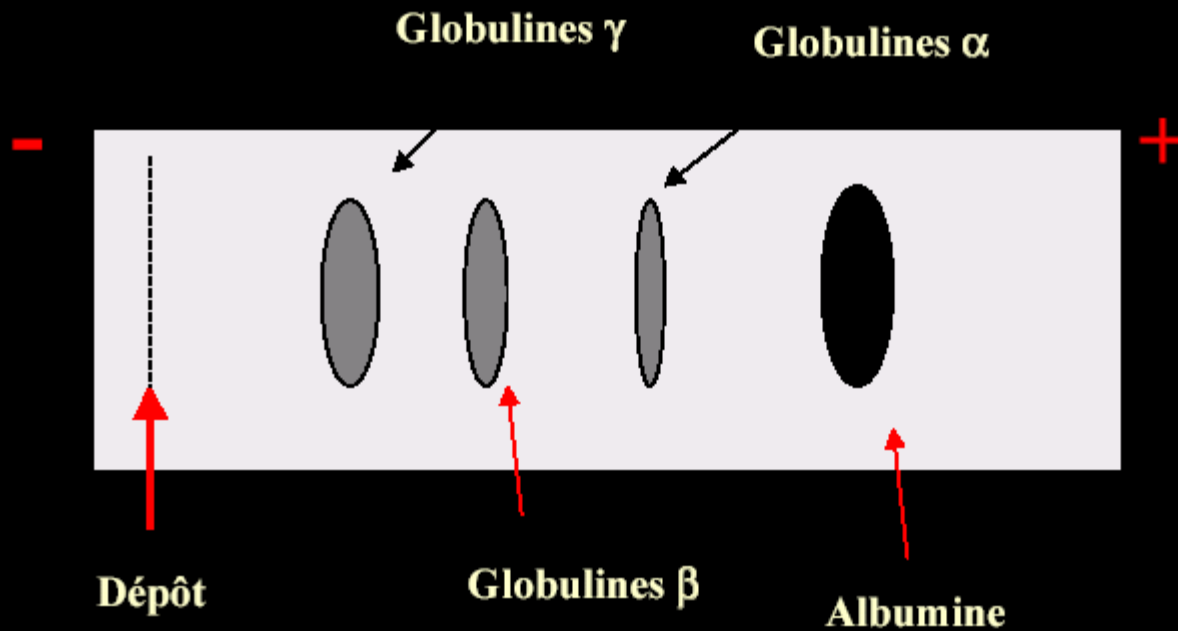
## Important:

- ➡ Dans l'électrophorèse sur papier:  
Les ions sont séparés en fonction de leurs charges
- ➡ Dans la chromatographie sur papier:  
Les molécules se séparent en fonction de leur caractère polaire



## SÉPARATION DES PROTÉINES DU SÉRUM SUR ACÉTATE DE CELLULOSE

Tampon pH 9,2 ; migration 40 minutes sous 180 V  
révélation par coloration des protéines au noir amido.



# Électrophorèse sur gel:

- ☞ Gels avec pores de dimensions moléculaires de taille variable
  - ☞ Polyacrylamide: petite taille des pores
  - ☞ Agarose: grande taille des pores (pour comp. > 200kDa)
- ☞ La taille des pores varie aussi avec la concentration des gels
  - ☞ Plus la concentration  $\uparrow$ , plus la taille  $\downarrow$
- ☞ La séparation des molécules repose sur:
  - ☞ Gel-filtration (grosses molécules ralenties par rapport aux petites)
  - ☞ mobilités électrophorétiques des molécules

# Électrophorèse sur gel:

## ✦ Électrophorèse sur gel:

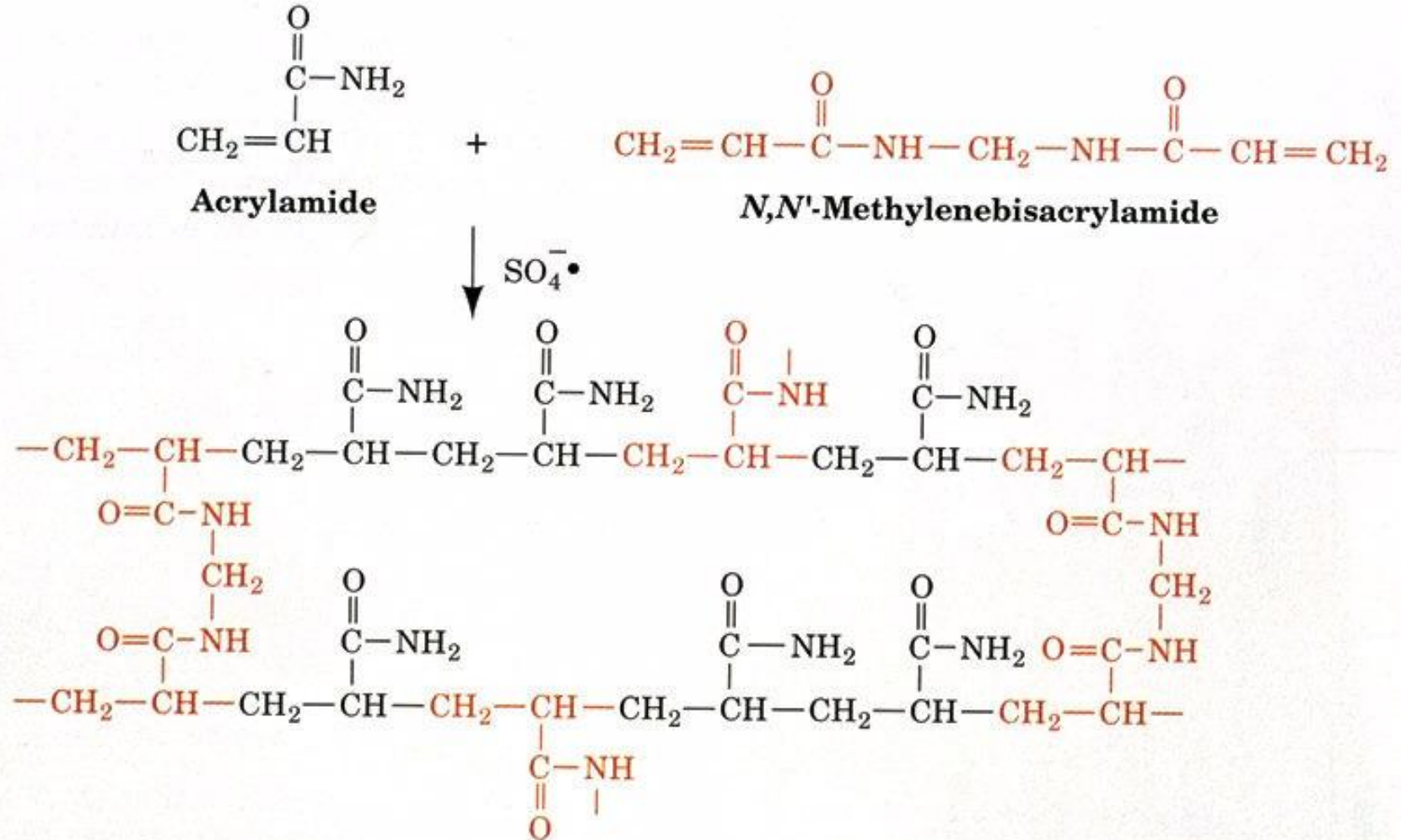
- Les grosses molécules sont ralenties par rapport aux petites
- Migration des molécules dans un champ électrique

## ✦ Chromatographie par filtration sur gel:

- Les petites molécules sont ralenties par rapport aux grosses
- Migration des molécules par gravité

# Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE):

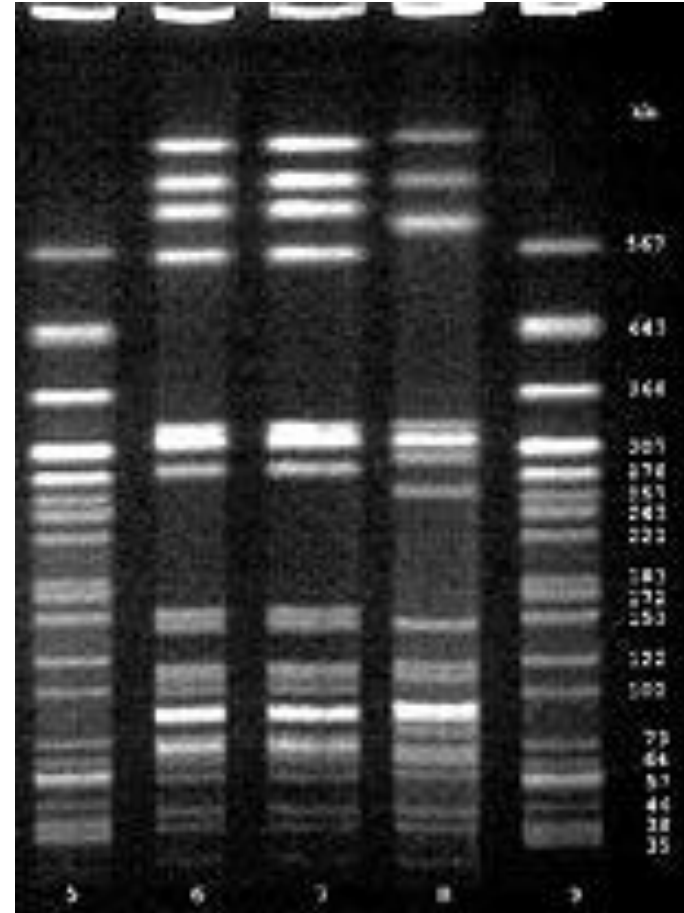
Polymérisation, induite par radicaux libres, d'acrylamide et de *N,N'*-méthylènebisacrylamides



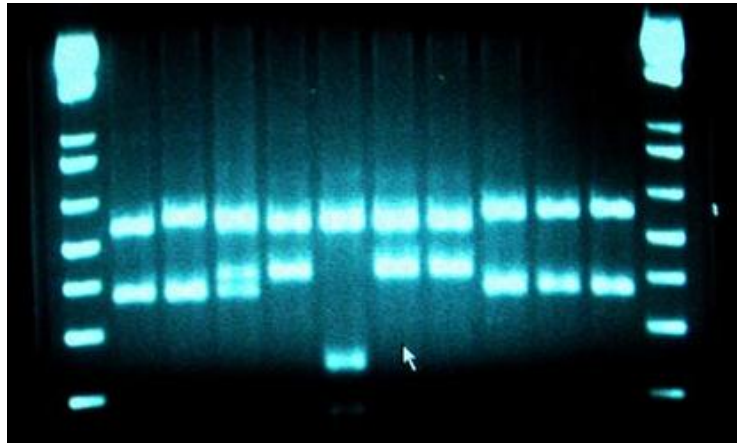
**TEMED**, stabilisateur de radicaux libres, ajouté au gel

## Gel d'agarose

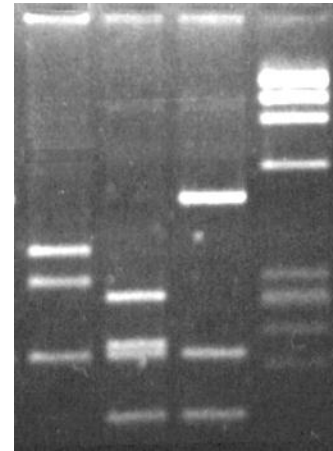
- polysaccharide de MM élevée extrait à partir d'agar,
- Gel très ouvert ( pores larges),
- Utilisé fréquemment pour de grosses molécules d'ADN.



# Coloration d'un gel d'agarose

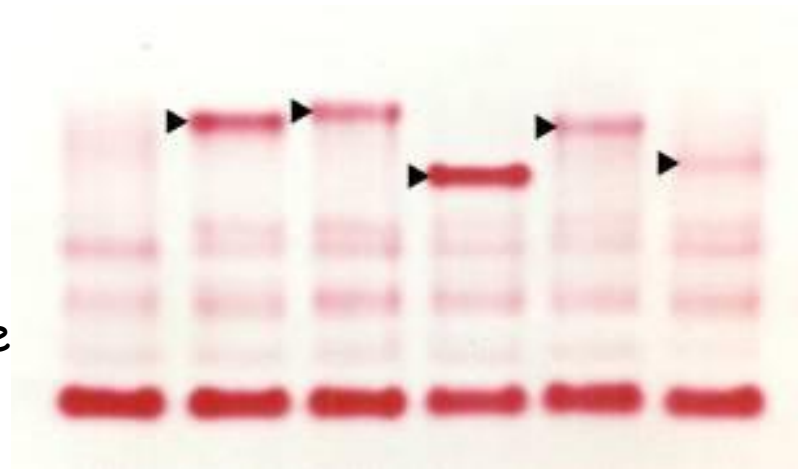


Fluorescence



Bromure d'éthidium

Coloration au rouge  
Penceau



## ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

**Concerne exclusivement la séparation des protéines.**

**Migration des molécules en fonction de leur charge globale, de leur taille et de leur forme.**

**Electrophorèses sont possibles en conditions dénaturantes ou non dénaturantes.**

**Elles sont essentiellement utilisées en conditions dénaturantes.**

**On parle alors d'électrophorèses SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).**

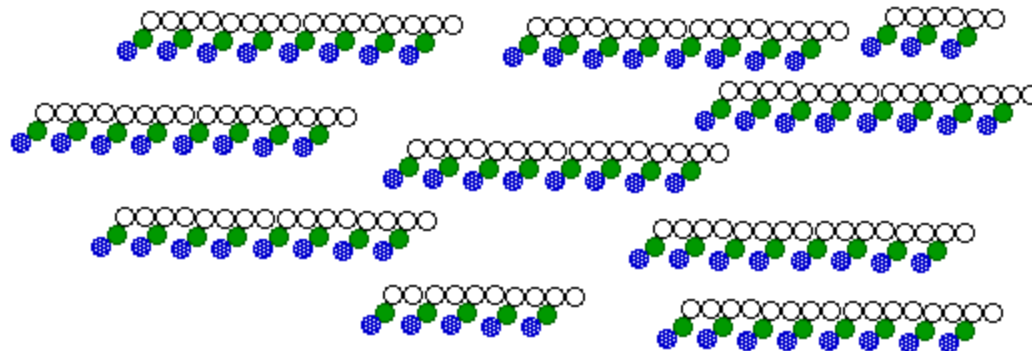
## Concentration en acrylamide du gel de séparation.

Masse moléculaire (MM)	% acrylamide
10 000-40 000	15-20
40 000-100 000	10-15
100 000-300 000	5-10
300 000-500 000	5
500 000	2-5

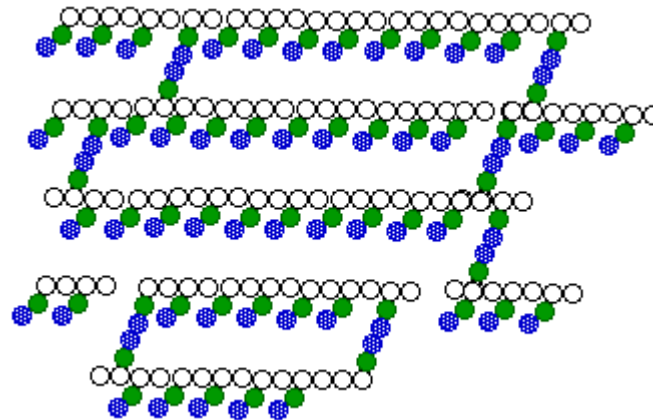
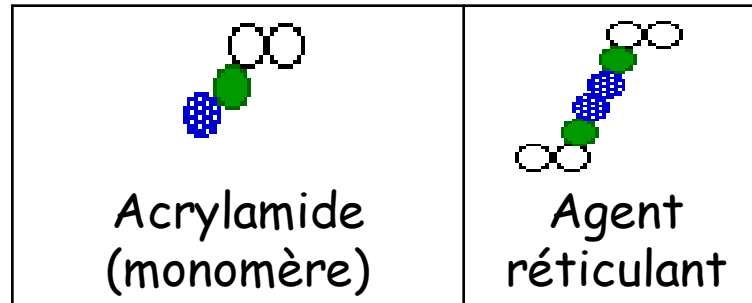


# Réticulation

Une solution de polyacrylamide polymérisé seulement avec de l'acrylamide est cependant liquide, quoique très visqueuse, donc impossible à manipuler. En effet, l'acrylamide ne possède qu'un seul site de formation de radical par molécule et ne peut donc donner que des chaînes linéaires plus ou moins longues sans lien entre elles.



Gel d'acrylamide polymérisé sans agent réticulant.  
Il y a formation de longues chaînes linéaires sans liens entre elles



Gel d'acrylamide polymérisé avec agent réticulant. Il y a formation de longues chaînes linéaires liées entre elles par l'agent réticulant

# Catalyseurs de la polymérisation

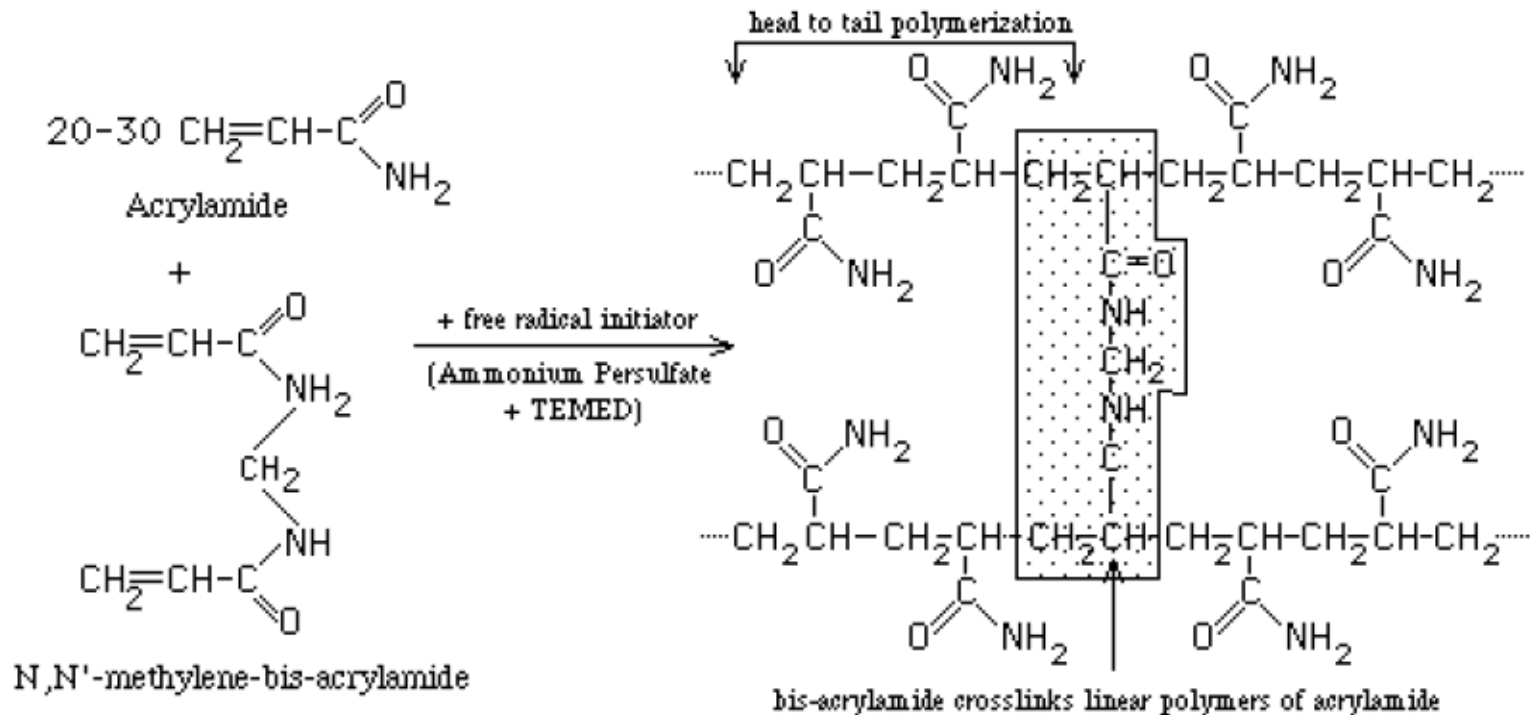
La polymérisation est donc initiée par la formation de quelques radicaux libres sur des doubles liens C-C de l'acrylamide ou de l'agent réticulant. Ces radicaux libres ne se forment pas spontanément sur l'acrylamide. Il faut mettre dans la solution des catalyseurs (ou initiateurs de la formation de radicaux libres).

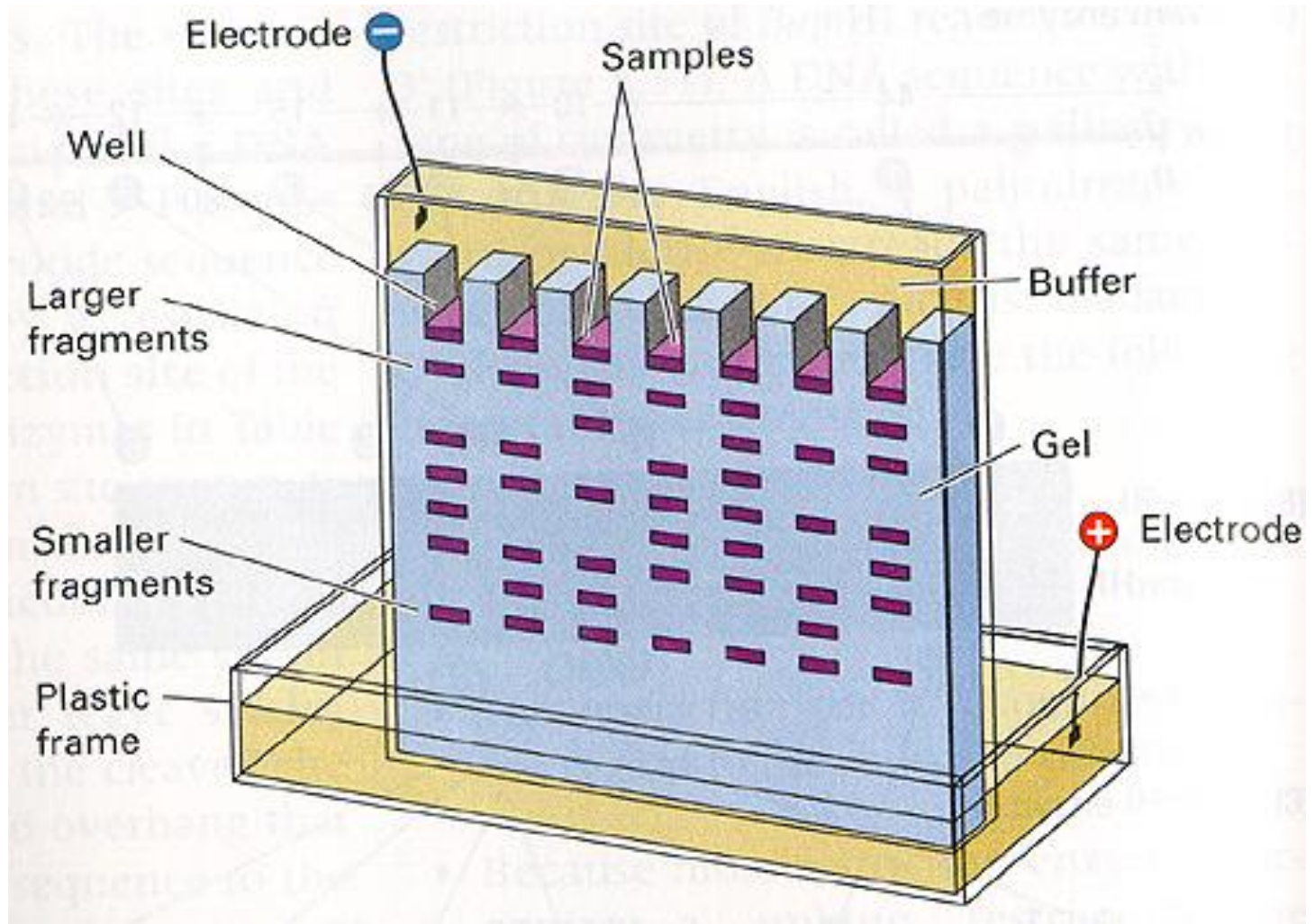
Il faut donc ajouter à la solution un (ou des) catalyseurs capables:

- ☞ 1) d'initier la formation de radicaux libres qui pourront alors démarrer la réaction en chaîne de la polymérisation, ce sont des initiateurs,
  - ☞ 2) de stimuler la réaction de propagation des radicaux libres pour l'accélérer et l'empêcher de "s'étouffer", ce sont des accélérateurs
- ☞ Le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine) est presque toujours utilisé comme accélérateur. Le TEMED doit être sous forme basique pour avoir son action. Plus rarement on se sert du DMNAPN (3-diméthylaminopropionitrile).
- ☞ Le persulfate d'ammonium (PSA) est souvent utilisé comme initiateur.

# Gels de Polyacrylamide

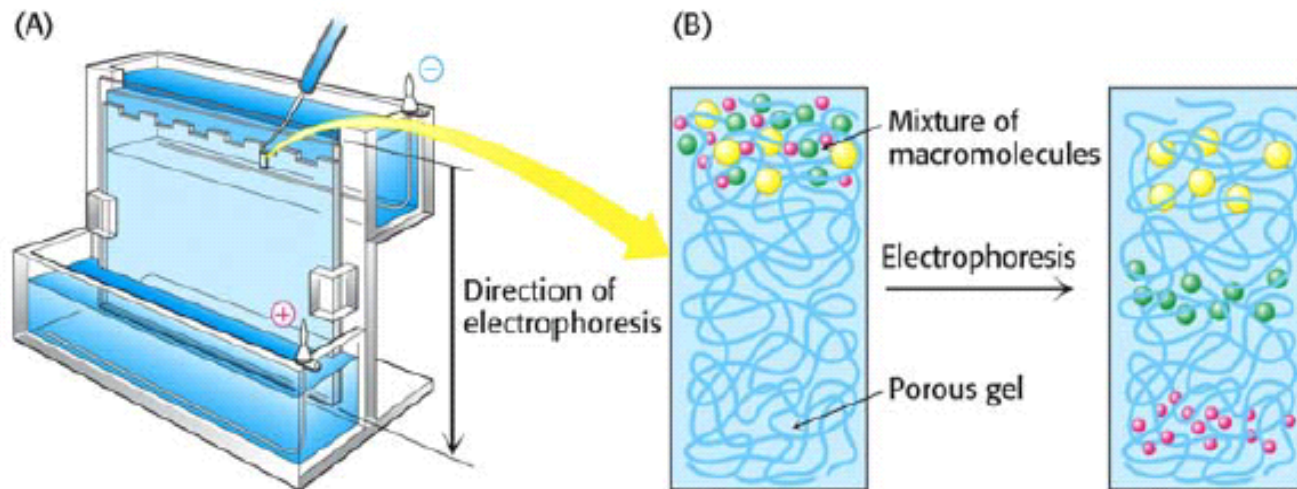
- Polymère d'Acrylamide ; gel très stable,
- Peut être préparé à différentes concentrations,
- Gradient de concentrations: grande variété de tailles de pores.





**Figure 1:** cuve électrophorétique verticale

L'électrophorèse sur gel est la méthode la plus importante pour déterminer la composition d'un échantillon de protéines



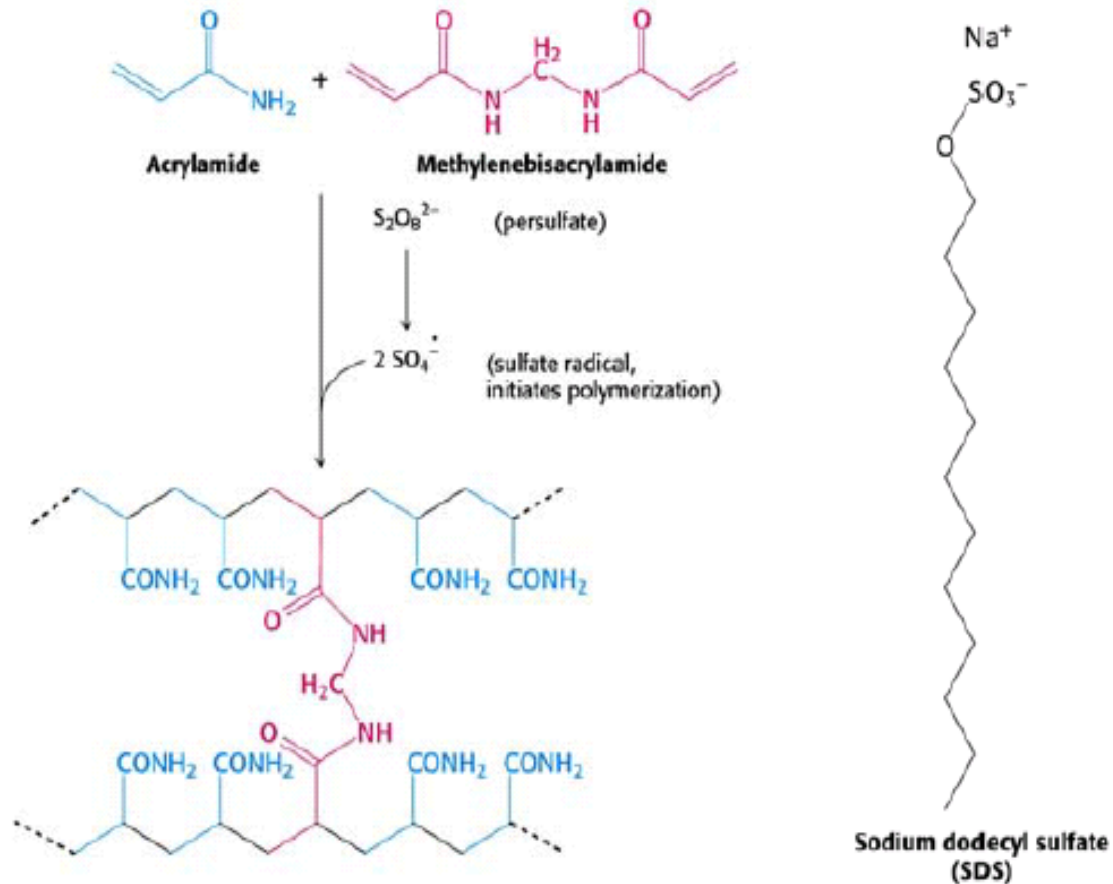
$$v = Ez/f$$

v: vitesse de migration

E: force électrique; z: charge net de la protéine

f: coefficient de friction

# SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis



En général, une molécule de SDS est liée par deux résidus d'une protéine



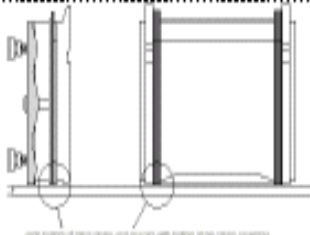
1



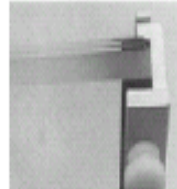
2



3



4



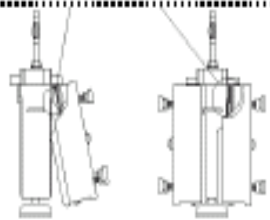
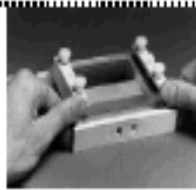
6



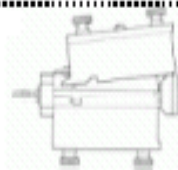
7



1



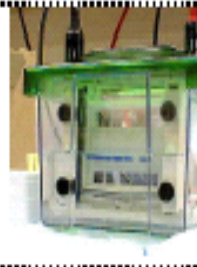
2



3

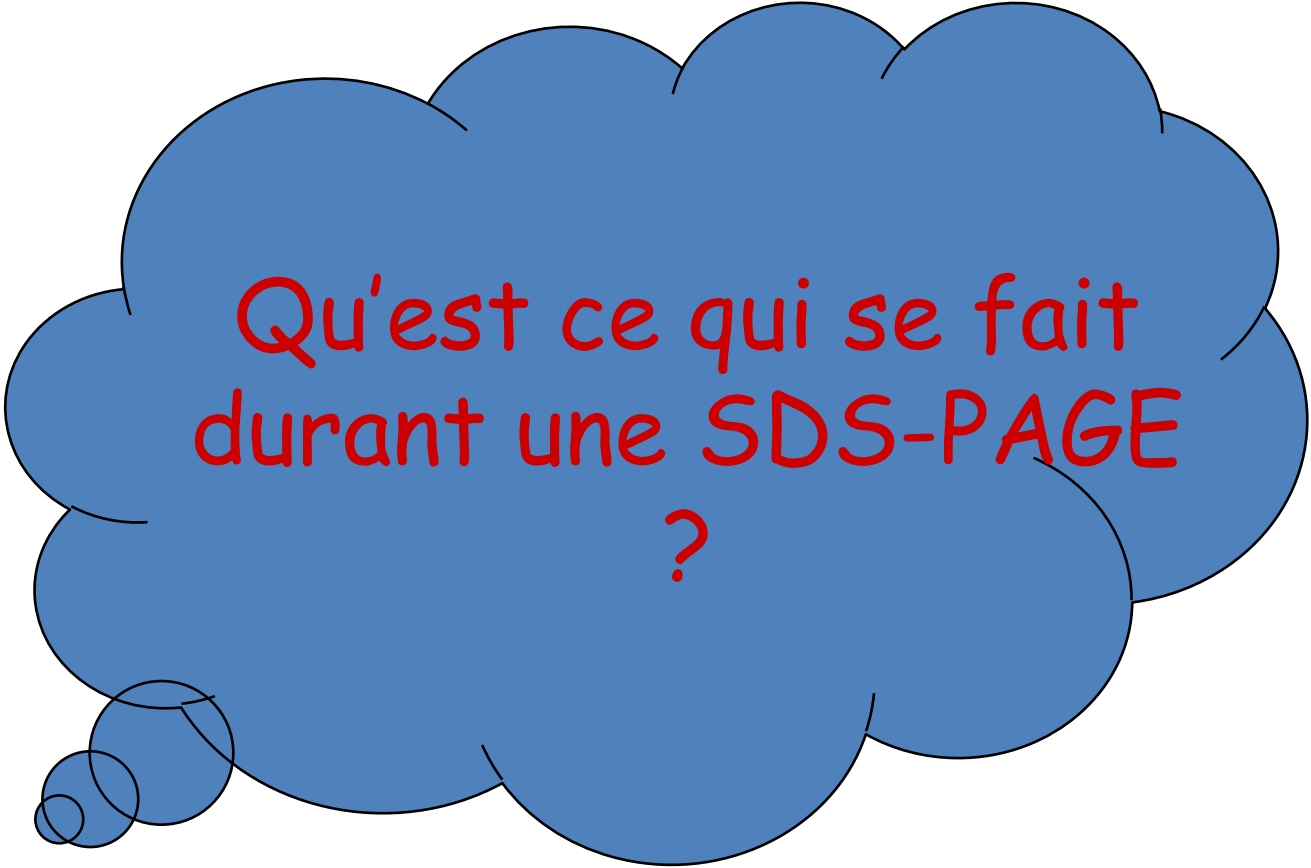


4



5



A large, blue, cloud-like thought bubble with a black outline. Inside the bubble, the text "Qu'est ce qui se fait durant une SDS-PAGE ?" is written in red. The bubble has three smaller circles of decreasing size leading to it from the bottom left.

Qu'est ce qui se fait  
durant une SDS-PAGE  
?

## Dénaturation de l'échantillon lors de la SDS-PAGE

Dans des microtubes (1,5ml) Eppendorf dont le bouchon a été percé à l'aide d'une aiguille, mettre successivement :

- ➡ 20  $\mu$ l de solution protéique des fractions ( 0,5 mg/ml),
- ➡ 20  $\mu$ l de tampon de dénaturation (2x) dont la composition est:

Tris-HCl, 0,125 M pH 6,8

Glycérol 20%

SDS 4%

Bleu de bromophénol 0,2%

b-mercaptoéthanol 10%

- ➡ Préparer les échantillons de standards de poids moléculaires,
- ➡ Porter tous les échantillons à ébullition pendant 4 minutes.

# Dépôt des échantillons et migration :

- ☞ Déposer 10 à 50  $\mu\text{l}$  d'échantillon protéique dénaturé par puits à l'aide d'une micropipette P 20.
- ☞ Connecter les électrodes au générateur, (le + en bas du gel).
- ☞ Faire migrer à 30mA pendant 3 à 4 heures, jusqu'à ce que le front de Bleu de Bromophénol atteigne le bord du gel.

# Coloration

Démouler le gel

☞ incuber 30 min à 1 h dans la solution de coloration sous agitation

**Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R250 0,25%  
acide acétique 20%  
Isopropanol 20%  
H<sub>2</sub>O 60%

# Décoloration

☞ incuber 3 fois 30 minutes dans la solution de décoloration sous agitation

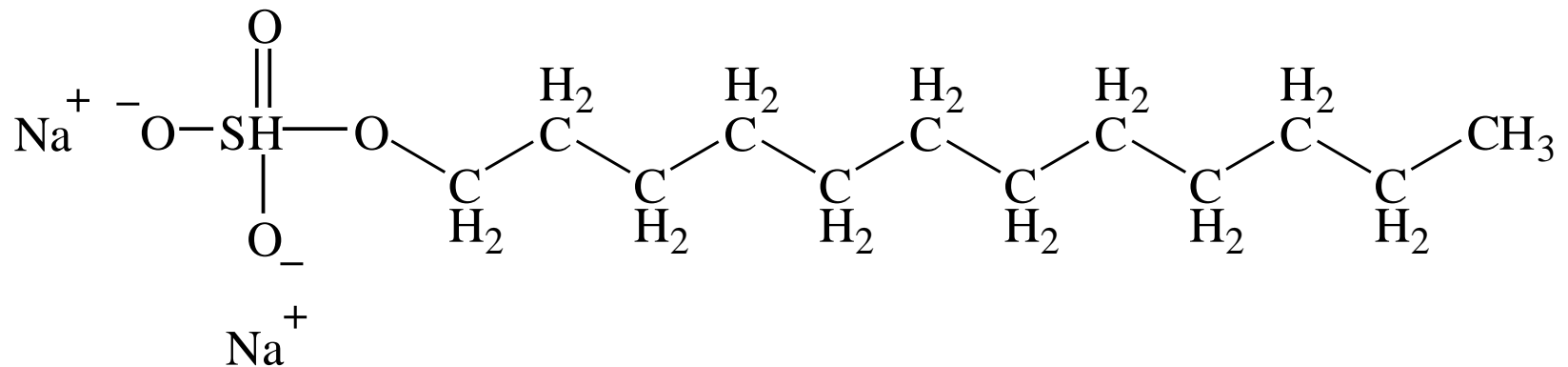
**Solution de décoloration**

acide acétique 10%  
Isopropanol 45%  
H<sub>2</sub>O 45%

☞ Le gel peut être conservé dans une solution aqueuse d'acide acétique à 5% .

# SDS-Page:

- ✦ Le SDS possède une longue queue hydrophobe qui interagit fortement avec les chaînes polypeptidiques.
- ✦ Le nombre de molécules de SDS liées à un polypeptide est proportionnel à la longueur de la chaîne.
- ✦ Chacune des molécules de SDS apporte deux charges (-), qui sont exposées à la surface du complexe protéine-SDS, et qui favorisent la migration du complexe vers l'électrode (+).



- ✦ La forte charge négative globale apportée par le SDS masque la charge intrinsèque des protéines.
  - rapports charge/masse identiques et de formes semblables.
- ✦ Le SDS est aussi un détergent qui brise les interactions et détruit les structures tertiaires et quaternaires,
- ✦ La mobilité électrophorétique ( $\mu$ ) des protéines en SDS-PAGE est inversement proportionnelle au logarithme de sa masse moléculaire,
- ✦ SDS-PAGE utilisé pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine ou de ses sous-unités, en utilisant des protéines « marqueurs » de masses moléculaires connues.

## L'ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE

**Traitement des échantillons par :**

- du **Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)** qui est un détergent anionique. Ce composé dénature les protéines et les enrobe de charges négatives.

– du  $\beta$  mercaptoéthanol qui est un agent réducteur. Ce composé entraîne la rupture des ponts disulfures.

**Suppression des facteurs forme et charge.**



**Séparation des protéines uniquement en fonction de leur taille.**

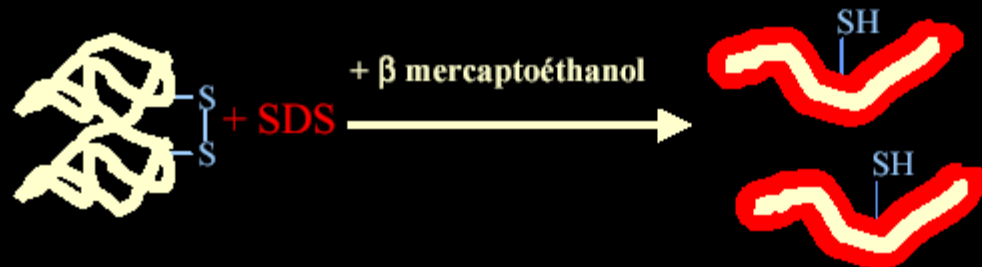


## ACTIONS DU SDS SUR LES PROTÉINES EN PRÉSENCE DE $\beta$ MERCAPTOÉTHANOL

Sur une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique

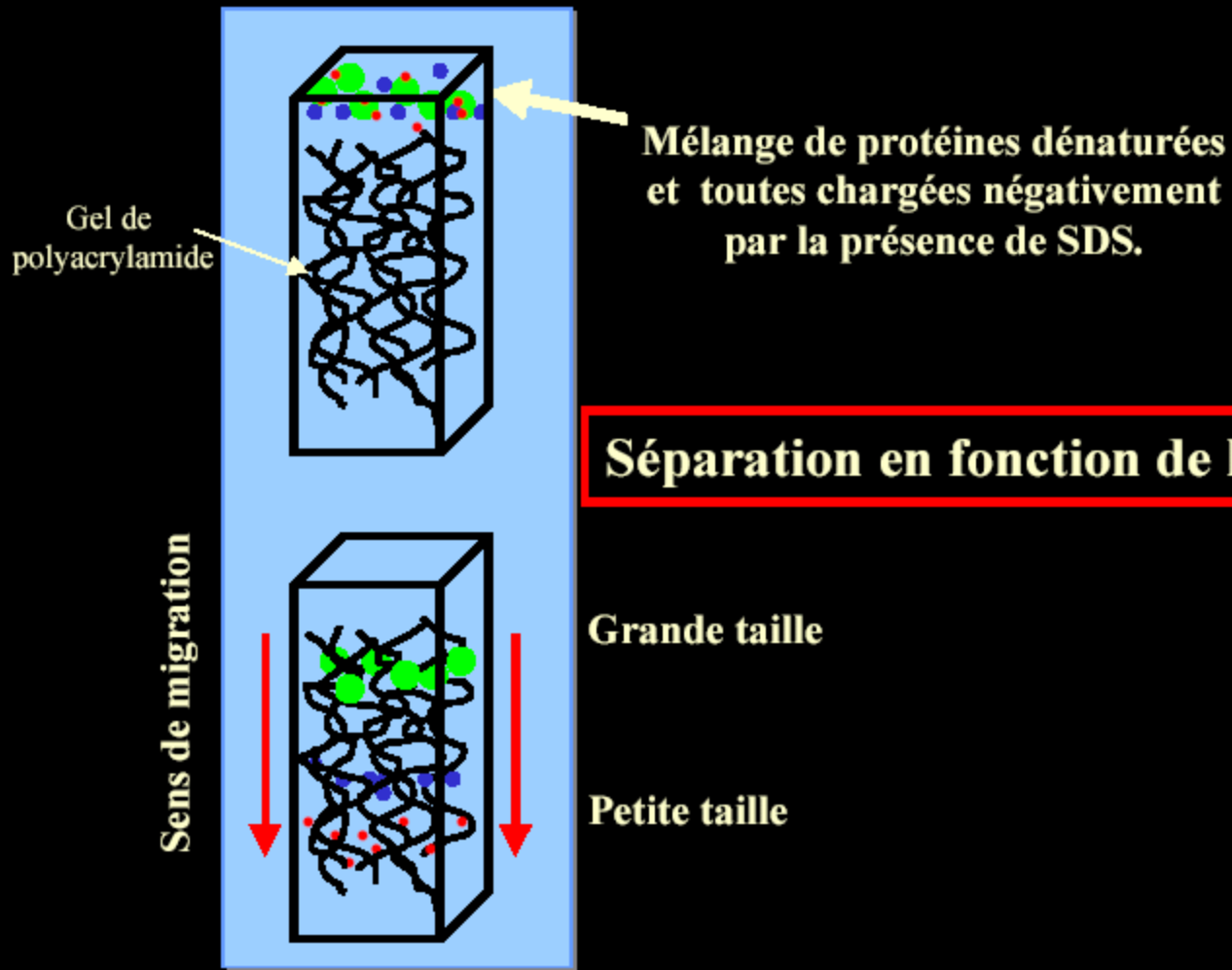


Sur une protéine constituée de deux chaînes polypeptidiques



Chaînes polypeptidiques  
dénaturées et entourées  
de SDS chargé  
négativement

## MIGRATION LORS D'UNE ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE



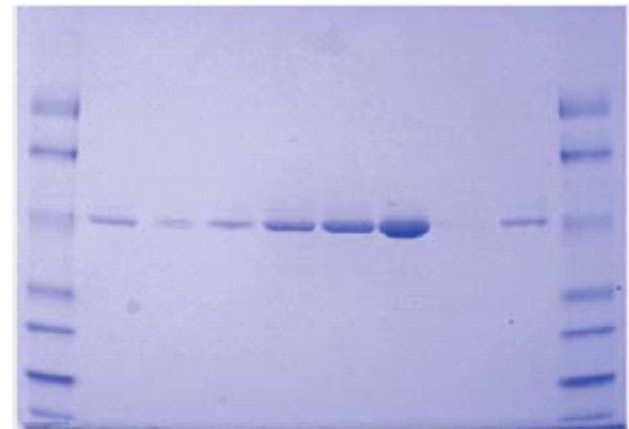
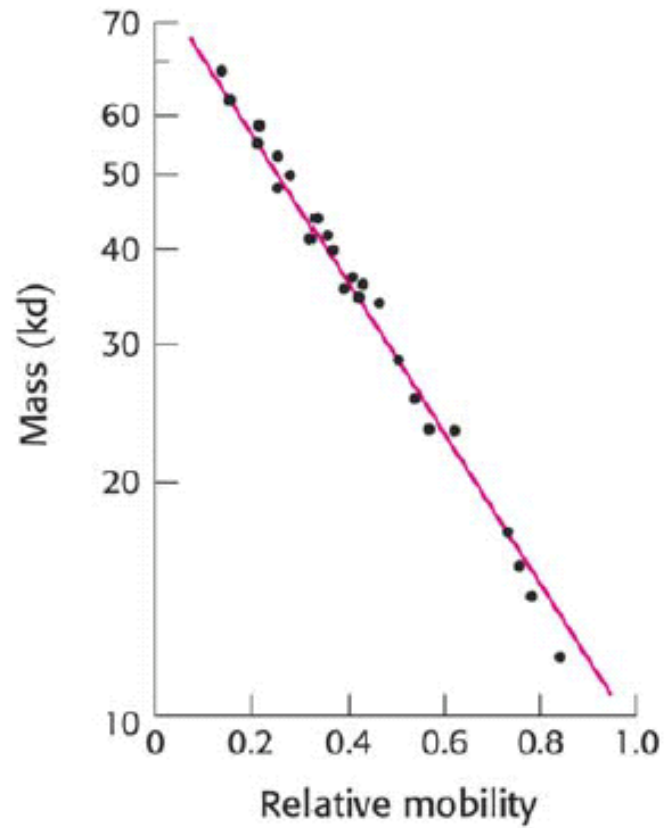
## RÉVÉLATION DES PROTÉINES PRÉSENTES SUR LE GEL

**La visualisation de l'ensemble des protéines présentes dans le gel se fait par coloration.**

**La coloration est effectuée dans la majorité des cas avec du bleu de Coomassie. Il est également possible de colorer les protéines présentes avec de l'argent.**

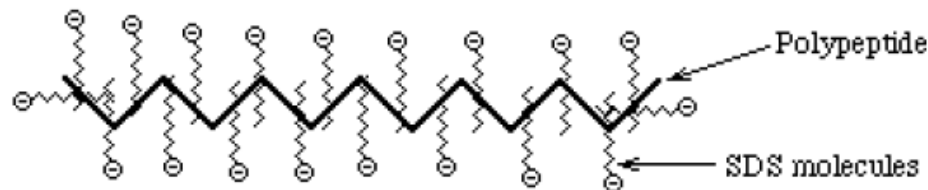
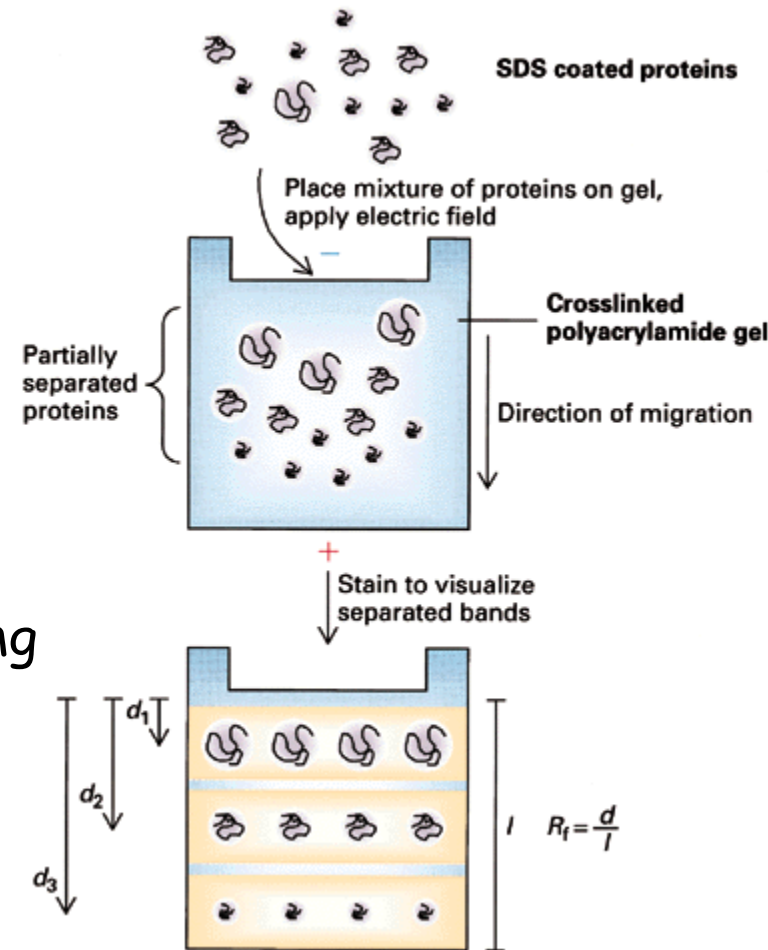
**Afin de visualiser uniquement la présence de certaines protéines, il est possible d'utiliser des anticorps marqués qui reconnaissent de manière spécifique ces protéines. Pour ce faire il est nécessaire de transférer les protéines sur une membrane de nitrocellulose (Western blot). Ce support, plus solide que les gels, permet une manipulation plus aisée.**

La mobilité dans le SDS-PAGE est proportionnelle au logarithme de leur masse



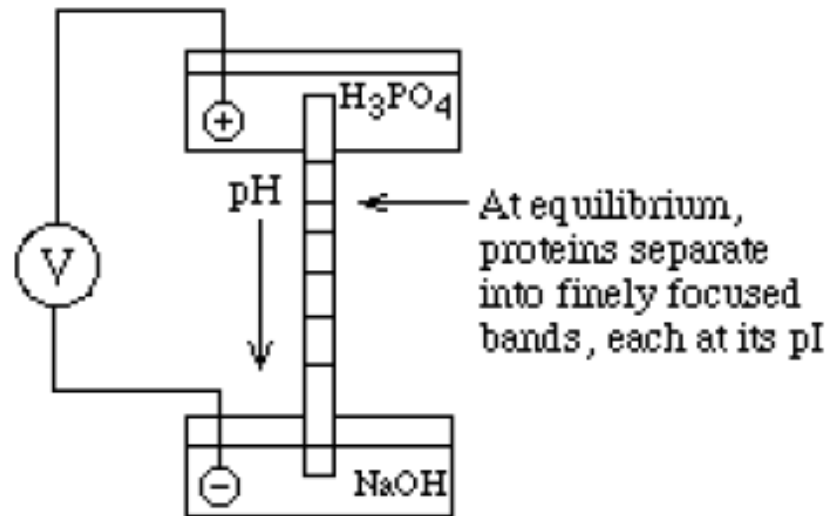
# SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

- Sodium Dodecyl Sulfate = Sodium Lauryl Sulfate:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^- \text{Na}^+$
- Molécule amphiphilique
- Détergent puissant pour la dénaturation des protéines
- Taux de liaisons (Binding ratio): 1.4 mg SDS/mg protéine
- Normalisation de la charge et de la taille

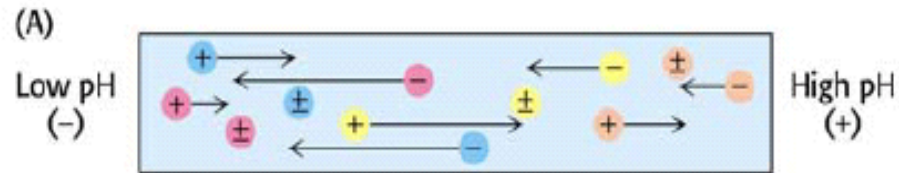


# Isoelectric Focusing Electrophoresis (IFE)

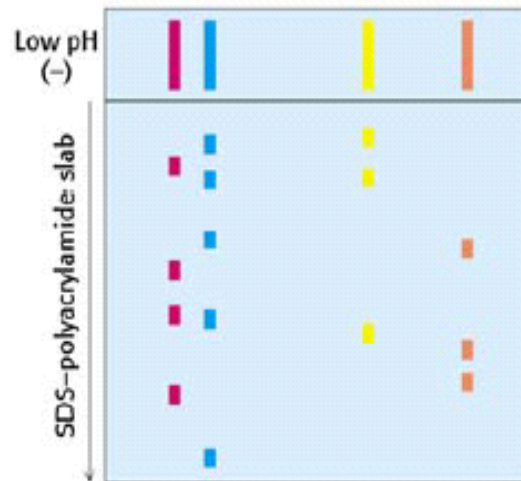
- Sépare les molécules selon leur point isoélectrique (pI)
- Au point isoélectrique (pI), la molécule a une charge globale nulle ( $q=0$ ), hence molecule ceases
- Gradient de pH



## Focalisation isoélectrique/ isoelectric focuission:



Combinaison du focalisation isoélectrique et du SDS-PAGE permet la électrophorèse en deux dimensions



# Électrophorèse bidimensionnelle

- La première dimension est faite en IFE (separation par pI),
- La deuxième dimension est faite en SDS-PAGE (séparation par taille)
- Cette technique est ainsi appelée **2D-PAGE**
- Haute resolution,
- Très utilisée en "Protéomique".

