

Electrophorèses

1. Electrophorèse dénaturante SDS-PAGE

1.1 Principe et considérations générales

L'électrophorèse dénaturante « SDS-PAGE » est la méthode la plus utilisée pour :

- L'analyse qualitative d'un mélange de protéines
- La séparation des protéines selon le poids moléculaire
- La détermination du poids moléculaire.
- L'estimation du nombre de sous unité protéiques

Le gel de polyacrylamide fréquemment utilisé se forme par la polymérisation des monomères d'acrylamides en présence de N,N'-methylene-bis-acrylamide ("bis-acrylamide") (Fig. 1). Notez que le bis-acrylamide est composé de 2 acrylamides liés par un groupement méthylène il est nommé agent de réticulation.

(Fig. 1). La polymerization de l'acrylamide est une catalyse à radical libre initiée par l'addition du persulfate d'ammonium et une base le N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED). TEMED catalyse la décomposition de l'ion persulfate en donnant un radical libre :

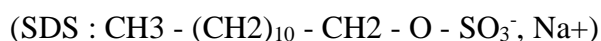


si le radical libre est représenté par $R\cdot$ et M comme monomère d'acrylamide , la polymérisation serait représenté comme suit:



On aura de longue chaîne de polyacrylamide et le bis-acrylamide assurera la liaison entre ces chaînes sous formes de ponts de réticulation.

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** :



1.2. Méthodologie : (SDS-PAGE et Zymogramme « technique qui détecte l'activité des enzymes dans un gel d'électrophorèse »)

Exemple de l'électrophorèse d'une protéine nommée xylanase enzyme qui catalyse l'hydrolyse du xylane qui est un hémicellulose qui se trouve dans la paroi des cellules végétales.

1.2.1 Préparation des gels d'électrophorèse

On ajoute du xylane de bouleau à 0,1% (m/v) à un gel de séparation de 15% (annexe), ce mélange est versé entre deux plaques mini protean II (BIO-RAD) mise dans un dispositif qui maintient les deux plaques (voir Figure ci dessous), le gel occupe le tiers de la plaque, après polymérisation, le gel de concentration à 4% (annexe) est coulé au dessus du gel de séparation, le peigne de 7,5 mm est inséré immédiatement jusqu'à complète polymérisation du gel de concentration.

1.2.2 Préparation des échantillons

75µl du surnageant concentré est mélangé avec 25 µl du tampon d'échantillon (contenant du). Les marqueurs protéique BIO-RAD prêt à l'emploi sont chauffés à 100°C pendant 2mn alors que l'échantillon est chauffé à 100°C pendant 5 mn.

1.2.3 Réalisation de l'électrophorèse

Tout d'abord le peigne est retiré du gel et les plaques sont mises dans la cuve d'électrophorèse (voir la Figure ci dessous), le compartiment intérieur et extérieur sont remplis avec du tampon de migration (annexe), Le kit de marqueurs Biorad utilisé contient 10 marqueurs ayant les poids moléculaires suivants : 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 et 250 KDa. L'échantillon et les marqueurs sont déposés à raison de 20µl dans les puits, La migration se fait à 150V pendant 1h et 15mn.

1.2.4 Coloration au bleu de Coomassie et réalisation du zymogramme

La migration est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est à 1cm du bord inférieur de la plaque, une fois la migration est terminée, la visualisation du profil de migration se fait après le traitement du gel comme suite :

- ✚ le gel est rincé à l'eau distillée et coupé en deux portions, le premier gel sert pour la réalisation de la coloration au bleu de Coomassie R250 et le deuxième gel pour la réalisation du zymogramme, pour la coloration au bleu de Coomassie le gel subit les traitements suivants :
- ✚ Immersion pendant une heure dans une solution d'acide trichloroacétique (TCA) (annexe) ;
- ✚ Rinçage à l'eau distillée puis coloration dans la solution de bleu de Coomassie R250 (annexe) sous faible agitation pendant 1h 30mn ;
- ✚ Lavage à l'eau distillée puis trempage dans la solution de décoloration (annexe) avec un changement de bain (2 à 3 fois).

2.4.1 Détermination de la masse moléculaire de la xylanase

La masse moléculaire est déterminée en utilisant la courbe d'étalonnage

« $R_f = f(\log PM)$ »

Le rapport frontal est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

Le deuxième gel destiné pour la réalisation du zymogramme, subit les traitements suivants :

- ✚ Immersion dans une solution de Triton X-100 à 2.5% (m/v) pendant 30mn ;
- ✚ le gel est débarrassé du Triton X-100 par rinçage à l'eau distillée puis une incubation dans du tampon phosphate 50mM à pH 7 à 50°C pendant 20mn ;
- ✚ Coloration au rouge de congo (0,1%) pendant 15 mn ;
- ✚ Lavage avec une solution de NaCl à 1M ;
- ✚ immersion dans de l'acide acétique à 0,5% (m/v) pour stopper la réaction et augmenter le contraste

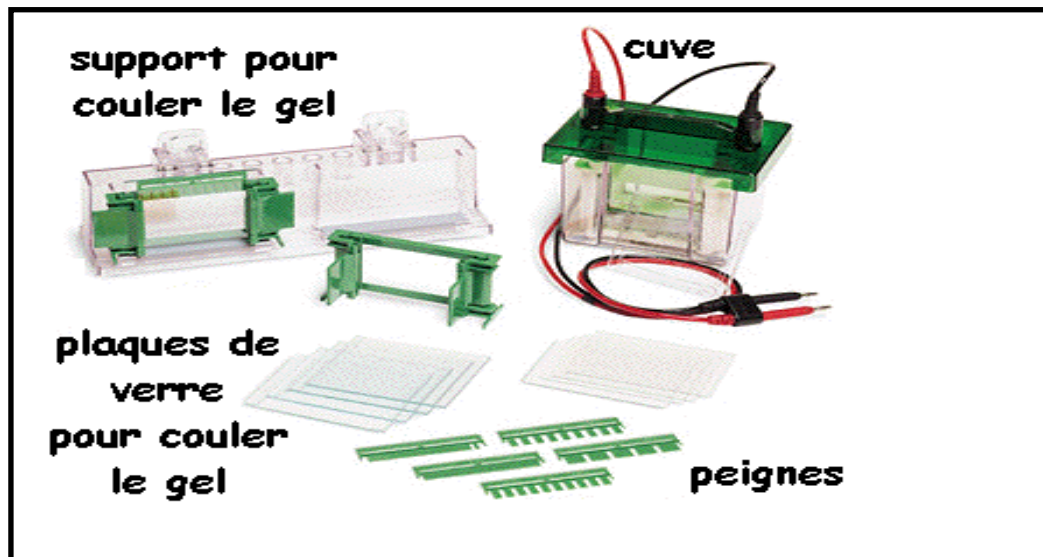


Figure 1 : Cuve et accessoires du dispositif d'électrophorèse (Mini Protean II, Bio Rad).

2. Electrophorèse native et mise en évidence des xylanases par zymogramme

L'électrophorèse est réalisée en conditions non dénaturante, le protocole de Laemmli a été repris (cité ci-dessus) en préparant un gel et un tampon de migration sans SDS et β -mercaptoéthanol. L'échantillon n'est pas dénaturé par la température, la coloration des protéines est réalisée avec du nitrate d'argent ou au bleu de Coomassie R250.

Dans ce type d'électrophorèse on utilise des gels homogènes ou en gradient.

2.1 Gels homogènes et en gradient

Habituellement on fait des gels où la concentration d'acrylamide est homogène, c'est-à-dire constante dans toute la plaque de gel. Les gels homogènes permettent une séparation fine sur une plage réduite de masses moléculaires. Si on désire séparer deux protéines l'une de l'autre, il est donc plus efficace d'utiliser un gel homogène, il est cependant possible de faire des gels où la concentration d'acrylamide sera variable. Dans ce cas la concentration à la base du gel sera plus grande que celle au sommet. Ainsi dans un gradient 3 à 25%, les protéines rentrent d'abord dans le gel où la concentration est de 3%, plus les protéines avancent dans le gel plus elles sont mises graduellement en présence de grandes concentrations d'acrylamide jusqu'à 25%.

Ce système permet une meilleure séparation générale des protéines sur une vaste gamme de masses moléculaires. En effet la taille des mailles du gel sera de plus en plus petite à mesure que les protéines avanceront dans le gel. Donc, au fur et à mesure de leur progrès dans le gel, les protéines finiront par être exposées à la concentration d'acrylamide optimale pour leur séparation.

La principale difficulté des gels en gradients est qu'il faut éviter que la polymérisation ne se produise durant le coulage du gel qui est un processus un peu lent. Pour cela, on utilise soit un initiateur de polymérisation activable à volonté, comme la riboflavine, ou de très faibles concentrations d'un initiateur spontané comme le Persulfate d'ammonium.

3.Électrophorèse de zone sur support

3.1Principe

A partir de 1950, on a proposé différents supports qui permettent d'effectuer une électrophorèse de zone sur un support « stabilisateur » qui peut être le papier-filtre, l'acétate de cellulose, ou encore le gel d'agar .

Ces supports ont connu un immense succès, car leur emploi est simple, rapide, peu onéreux. En outre, il ne nécessite que de très petites quantités de substances. Ainsi, dans le cas d'un sérum sanguin, quelques microlitres suffisent.

Quel que soit le support, on utilise une « cuve à électrophorèse » essentiellement constituée de deux bacs contenant le tampon et une électrode. Anode et cathode sont reliées à un générateur de courant continu. Les extrémités du support solide trempent dans le tampon ou lui sont reliées par des ponts en papier filtre.

3.2 Électrophorèse sur papier et sur acétate de cellulose

On dépose quelques microlitres de la solution à étudier (mélanges d'enzymes, de protéines sériques ou d'autres substances chargées) sous forme d'une ligne mince sur le support imbibé de tampon. On le soumet ensuite à une électrophorèse ; l'intensité du courant est voisine de 2 mA par centimètre de largeur du support.

Au bout de quelques heures, la feuille est séchée. Les différentes fractions sont révélées par des colorants spécifiques, qui permettent de caractériser, par exemple, les protéines, les

glycoprotéines, les lipoprotéines. Quant aux enzymes, on peut les révéler en utilisant leur activité spécifique sur des substrats convenablement choisis.

2.1 Exemple d'électrophorèse des hémoglobines A et S sur bande d'acétate de cellulose

Les échantillons utilisés pour mener l'électrophorèse sont des solutions réalisées artificiellement avec des hémoglobines A et S du commerce dissoutes à raison de 2,5 mg/mL dans du tampon d'électrophorèse préalablement oxygéné par une agitation vigoureuse. Pour chaque "membre de la famille", on place dans un tube Eppendorf étiqueté 100 μ L de solution. Les échantillons correspondant aux individus homozygotes pour HbA sont constitués de 100 μ L de la solution d'hémoglobine A, les échantillons correspondant aux individus homozygotes pour HbS sont constitués de 100 μ L de la solution d'hémoglobine S et les échantillons correspondant aux individus hétérozygotes sont constitués d'un mélange de 50 μ L de la solution d'hémoglobine A et de 50 μ L de la solution d'hémoglobine S. Un tel volume permet de réaliser une vingtaine de pistes d'électrophorèse.

✚ Protocole expérimentale

1. Mettre à tremper les bandes d'acétate de cellulose dans le tampon d'électrophorèse (tampon tris-véronal) pendant 10 à 20 minutes.



Trempage

2. Essorer l'excès de tampon en plaçant les bandes entre deux feuilles de papier absorbant (essuie-tout).



Essorage

3. Placer la bande sur le portoir en veillant à disposer la face absorbante vers le haut.
La bande doit être tendue et ses extrémités doivent dépasser suffisamment pour tremper dans le tampon une fois le support placé dans la cuve.

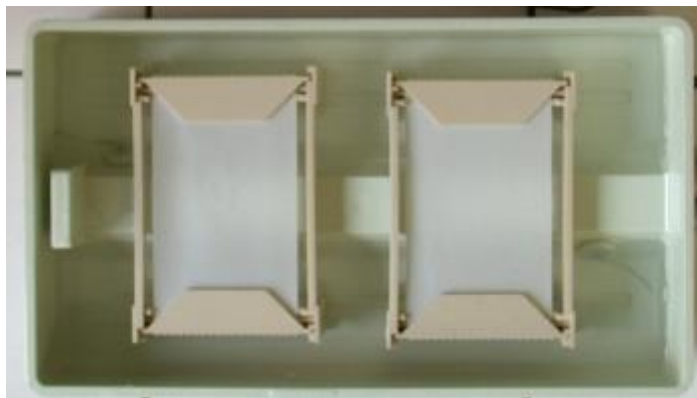


Mise en place de la bande sur le support

4. Remplir les deux compartiments de la cuve avec un même volume de tampon d'électrophorèse.

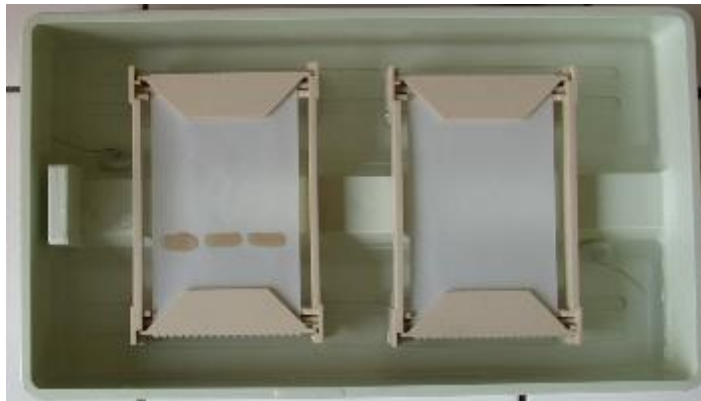
5. Mettre en place le(s) support(s) dans la cuve.

6. Prélever un échantillon et le déposer sur la bande, sur son support, au tiers de l'extrémité, côté cathode (borne noire) en prenant garde que la bande soit bien horizontale et que l'échantillon ne coule pas.



Bandes en place dans la cuve

On peut prélever et déposer les échantillons soit avec une micropipette, soit avec un capillaire, soit avec un applicateur comme celui présenté ci-dessous réalisé avec un bouchon et deux trombones pour permettre un dépôt linéaire.



Dépôts effectués sur une bande

7. Recommencer pour chaque échantillon en laissant un espace suffisant pour ne pas risquer la fusion des échantillons qui diffusent légèrement lors du dépôt. 8. Fermer la cuve et mettre sous tension (environ 1 h de migration à 150 V).



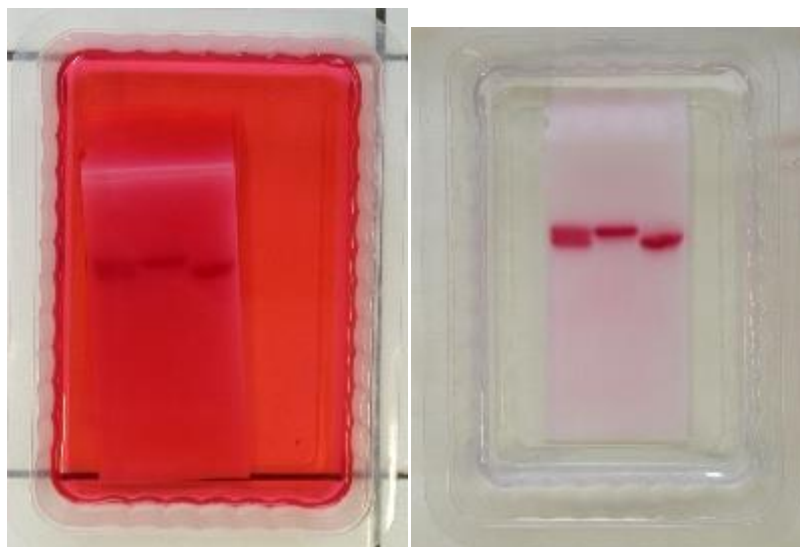
Cuve et générateur pendant la migration

9. Après migration, placer les bandes dans la solution de rouge ponceau pendant 10 minutes.



Coloration

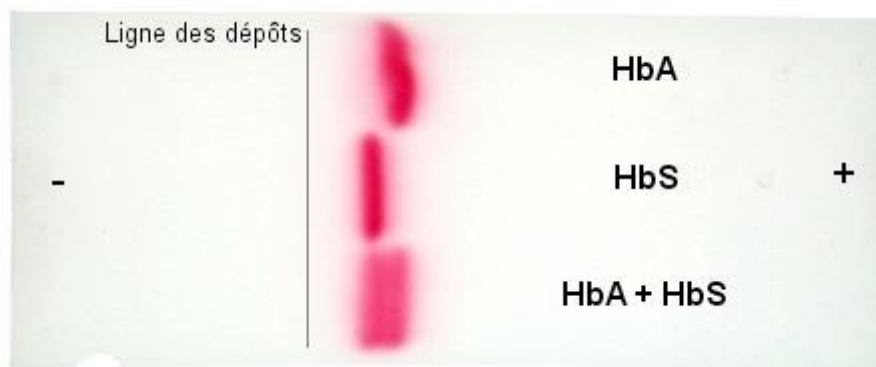
10. Décolorer le fond dans des bains successifs d'acide acétique à 5 %. Agiter le cas échéant pour accélérer la décoloration.



Bains de décoloration

- **Résultats**

L'hémoglobine S moins chargée que l'hémoglobine A en raison de la substitution d'un acide glutamique par une valine en position 6 de la chaîne de la bêta globine migre moins loin et peut ainsi être distinguée sur la bande d'acétate de cellulose.



Electrophorèse des hémoglobines A et S

3.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

Principe

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 masse moléculaire. La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose : les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

□

Facteurs affectant la migration

Le facteur le plus important est la longueur de la molécule d'ADN : la séparation se fait en fonction de la masse moléculaire et donc de la taille de l'ADN. Toutefois la conformation de l'ADN est aussi un facteur important. Ainsi pour éviter les problèmes liés à cette conformation, n'est séparé sur gel d'agarose uniquement que de l'ADN linéaire (fragment d'ADN issu d'une digestion, ADN amplifié par PCR ou encore de l'ADNc).

L'augmentation de la concentration d'agarose dans un gel réduit la vitesse de migration et permet la séparation de fragment d'ADN de plus petite taille. Plus le voltage est important, plus la vitesse de migration augmente. Toutefois le voltage est limité en intensité, effectivement un fort voltage induit une augmentation de température ce qui peut faire fondre le gel.

La conformation d'ADN plasmidique, non digéré par une enzyme de restriction, migre à différentes vitesses (du plus lent au plus rapide) : ADN circulaire, ADN linéaire et ADN superenroulé.

Gel d'agarose

On utilise généralement un gel 1 % m/V (1 g d'agarose pour 100 ml de volume final) en électrophorèse. Plus on veut un gel discriminant, plus on augmentera le pourcentage d'agarose.

L'agarose est un polymère à base d'agar purifié. Différentes puretés d'agarose sont disponibles auprès des fournisseurs. En général, de l'agarose de grande pureté à la solidification lente est utilisé lorsque l'ADN doit être extrait du gel après migration.

Tampons

Il existe un nombre très varié de tampons. Les plus souvent utilisés sont le Tris/Acétate/EDTA (TAE), le Tris/Borate/EDTA (TBE) et le sodium borate (SB). Le TAE possède le plus faible pouvoir tampon mais produit une meilleure séparation pour les fragments d'ADN de grande taille. Le SB est relativement nouveau et inefficace pour la séparation de fragments d'ADN d'une taille supérieure à 5000 paires de bases (5 kb). Cependant sa faible conductivité permet l'utilisation d'un plus fort voltage (jusqu'à 35V/cm), ceci réduisant considérablement le temps de migration. Des fragments d'ADN avec seulement quelques paires de bases de différences sont séparés en utilisant un gel d'agarose à 3 % et avec un tampon SB de très faible conductivité (1 mM lithium borate).

Préparation

Exemple pour un mini-gel de 50 ml destiné à séparer des fragments de 2 à 6 kb

- Préparer le moule et le peigne appropriés au nombre et au volume des échantillons à séparer.
- Préparer suffisamment de tampon (TAE, TBE) pour remplir la cuve (par exemple 200 ml) et préparer le gel (50 ml).
- Dans une fiole Erlenmeyer, peser la quantité d'agarose déterminée d'après le tableau suivant et en fonction de la taille des fragments à séparer:

Pouvoir de séparation d'ADN linéaire, double brin, selon la concentration d'agarose du gel

Concentration d'agarose (% en <u>m/V</u>)	Gamme de tailles idéales (en <u>kb</u>)
0.3	5 – 60
0.6	1 – 20
0.7	0.8 – 10
0.9	0.5 – 7
1.2	0.4 – 6
1.5	0.2 – 3
2.0	0.1 – 2

- Pour l'exemple, il faudra donc fondre 600 mg d'agarose dans 50 ml de tampon: concentration finale de 1,2 %, idéale pour séparer des fragments de 0.6 à 6 kb.
- Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon, en plaçant l'Erlenmeyer soit au four à micro-ondes, soit encore dans un bain-marie d'eau bouillante, et en agitant de temps en temps. L'agarose est totalement dissout lorsque les grains, initialement visibles sous forme de petites lentilles, ont complètement disparu.
- Mettre sous agitation et laisser refroidir, ou placer dans un bain-marie à environ 50 °C (température supportable au toucher). Éventuellement, refroidir plus rapidement en laissant couler un filet d'eau froide le long de l'Erlenmeyer, en agitant constamment. Il est particulièrement important de refroidir l'agarose en dessous de 60 °C lors de l'utilisation de moules en PMMA, qui risquent sinon de fondre.
- Si désiré, du bromure d'éthidium peut maintenant être ajouté, à une concentration finale de 0,5 µg/ml. Il est cependant déconseillé d'ajouter à la place du bromure d'éthidium certains autres révélateurs (par exemple du SYBR Gold, un fluorophore semblable au (SYBR Green I) directement dans le gel, car ceux-ci peuvent affecter la mobilité des acides nucléiques lors de l'électrophorèse.
- Couler l'agarose dans le moule avec le peigne et laisser refroidir. Un gel froid et figé prêt à l'emploi se reconnaît par son apparence opalescente lorsqu'il est observé par la tranche, par rapport à un gel encore liquide qui est parfaitement translucide. Emballé dans du film plastique ou dans du tampon (TAE, TBE ou SB), le gel peut alors être conservé à 4 °C au réfrigérateur pendant plusieurs jours, avant qu'il ne perde trop d'eau par évaporation. La conservation de gels contenant du bromure d'éthidium dans du

tampon n'en contenant pas peut conduire à la diffusion du révélateur hors du gel. Ceci peut faire que la distribution du bromure d'éthidium dans le gel soit inhomogène, ce qui finalement peut affecter l'apparence des bandes (les acides nucléiques, de charge négative, migreront plus vite là où la concentration du révélateur, de charge positive, sera plus faible).

- Juste avant d'effectuer l'électrophorèse, placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon. Retirer ensuite le peigne, charger les échantillons et les standards, et faire migrer en appliquant une tension ou un courant adaptés. La vitesse de migration des acides nucléiques dépendant du champ électrique, on fixe généralement la tension entre 1 et 5 V/cm (distance entre les électrodes) et on laisse varier le courant (parce que la conductivité du gel varie au cours du temps).

✚ Révélation de l'ADN

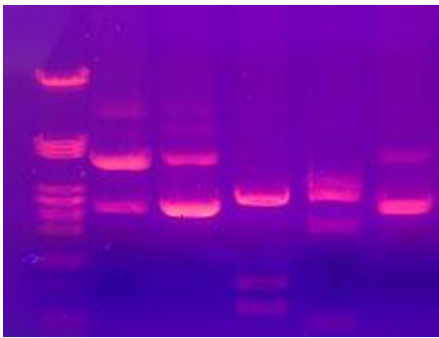


Figure 2 : Gel d'électrophorèse sous UV.

Afin de visualiser la migration de l'électrophorèse, il faut préalablement ajouter un colorant dans le gel à une concentration prescrite par le fabricant de l'agent intercalant ou encore procéder à une révélation post-migration. La méthode de révélation la plus utilisée est la révélation au bromure d'éthidium ou BET. Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Cet effet serait dû à l'augmentation de l'hydrophobie de l'environnement, plutôt qu'à une rigidification du cycle benzénique, celui-ci n'étant pas situé entre les paires de bases. Cependant, le bromure d'éthidium est toxique et hautement mutagène et doit être manipulé avec grande précaution. D'autres agents intercalants plus sécuritaires comme le GelRed, le SYBR Safe, le violet de gentiane et le bleu de méthylène peuvent être utilisés.

GelRed

Le GelRed est un colorant fluorescent utilisé pour la révélation sur gels d'agarose ou de polyacrylamide d'ADNdb, d'ADNsb ou d'ARN. Il possède pour caractéristiques d'être hautement spécifique, très stable et de respecter l'environnement. De plus, sa sensibilité est supérieure au bromure d'éthidium et il ne requiert pas d'étapes de décoloration⁴.

1. Ajouter le GelRed à l'agarose fondu pour une concentration finale de 1X.
2. Couler le gel et procéder à la migration.
3. Visualiser la migration avec un appareil UV.

SYBR Safe

Le SYBR Safe est un colorant à gel d'agarose ou de polyacrylamide possédant une haute sensibilité. Il agit comme agent intercalant pour l'ADN ainsi que l'ARN. Le fabricant vend le produit à une concentration déjà prête pour l'usage. La visualisation de la migration peut être faite en excitant l'agent avec des rayons UV ou encore avec de la lumière bleue.

Violet de gentiane

Il est possible d'utiliser le violet de gentiane comme agent de visualisation pour un électrophorèse sur gel d'agarose. Il est nécessaire d'avoir une grande concentration d'ADN (100 ng et plus) à faire migrer étant donné la faible sensibilité de cette méthode. Comparativement au bromure d'éthidium, ce colorant doit être ajouté à une concentration de 10 ug/ml dans le gel ainsi que dans le tampon de migration pour obtenir des résultats adéquats. Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, il est d'abord possible de décolorer le gel dans l'eau une fois la migration terminée. Ensuite, il est recommandé d'effectuer une seconde coloration dans un grand volume de tampon TAE 0,1X contenant 10ug/ml de violet de gentiane à la fin de la migration.

Bleu de méthylène

Le Bleu de méthylène peut être utilisé comme révélateur à la fin de la migration sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Cette méthode nécessite un temps de coloration pouvant aller jusqu'à 15 heures étant donné sa faible sensibilité. Son avantage est simplement qu'il permet de ne pas utiliser le bromure d'éthidium et que sa décoloration nécessite seulement de

l'eau distillé. Toutefois, l'utilisation de ce colorant induit une coloration de fond difficile à éliminer et cela rend la visualisation des bandes plus difficile.

Alternativement, le gel peut être incubé dans un bain contenant du SYBR Green I (pour les acides nucléiques doubles brins) ou du SYBR Green II (pour détecter aussi les acides nucléiques simples brins). Le SYBR Green présente l'avantage d'une moindre toxicité et d'une sensibilité plus élevée permettant de détecter des quantités plus faibles d'acides nucléiques.

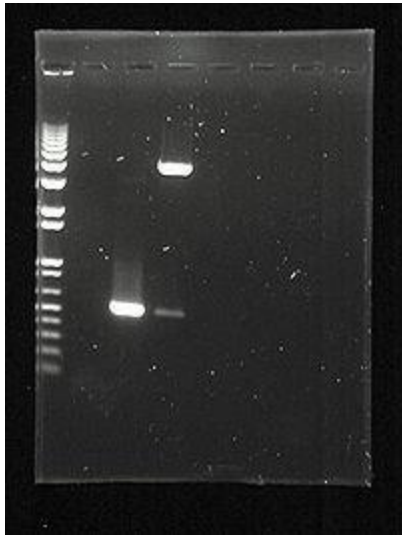
Limites de résolution

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet théoriquement la séparation de fragments d'ADN d'une taille allant de 50 paires de bases à plusieurs millions. Cependant, elle est généralement utilisée pour la séparation de fragment d'une taille allant de 100 pb à 20 kpb. La durée moyenne de migration est d'une heure.

Les petits fragments d'acides nucléiques sont mieux séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les fragments de tailles importantes sont plus difficiles à séparer. En général, l'utilisation de gel d'agarose à forte concentration (3 à 4 %) est alors nécessaire pour des fragments inférieurs à 150 pb, car elle permet une meilleure séparation et résolution des différentes bandes en fonction de leur différence de taille. Le principal désavantage est le temps de migration, qui peut aller jusqu'à plusieurs jours. Pour pallier ces problèmes, il est avantageux d'effectuer une électrophorèse en champ pulsé ou bien une électrophorèse en champ inversé.

Analyse du gel

Après la migration d'électrophorèse, le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescente. Les bandes peuvent être alors découpées et séparées du gel, puis dissoutes afin de récupérer l'ADN purifié. L'estimation de la taille des fragments est faite grâce à la comparaison avec l'échelle de marqueur de taille moléculaire utilisée simultanément dans un autre puits lors de la migration.



1 2 3 4

Figure 3 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose

1. Échelle de marqueur de poids moléculaire (1kbplus),
2. vide
3. Un produit de PCR d'une taille légèrement supérieure à 500 paires de bases, Puits
4. Fragment d'environ 4.5kb d'un Plasmide digéré par une enzyme de restriction

Applications

- Estimation de la masse moléculaire de fragment d'ADN après une digestion par des enzymes de restriction
- Analyse d'ADN après une amplification par PCR
- Séparation de fragments ADN digérés avant Southern blot ou d'ARN dans le cas de Northern Blot.

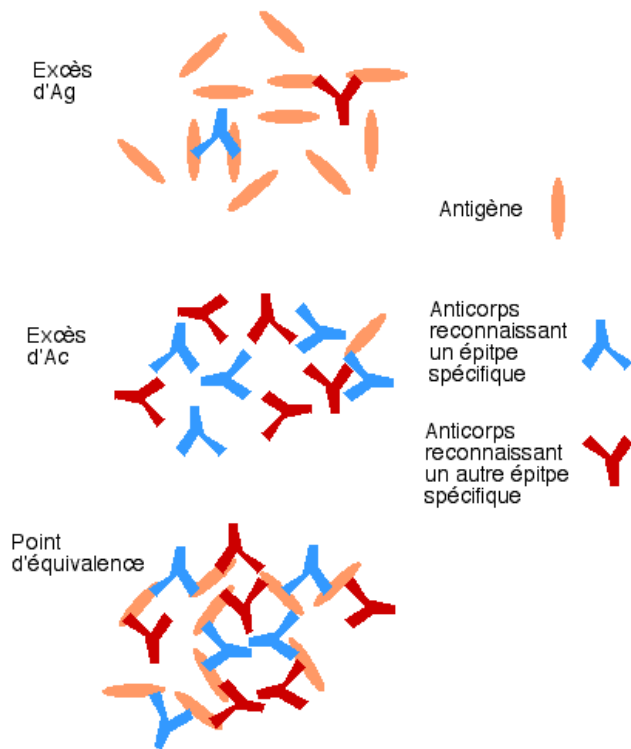
Les avantages de l'électrophorèse sur gel d'agarose sont les suivants :

- Préparation aisée, rapide, et peu coûteuse des gels d'agarose ;
- Pas de dénaturation des échantillons ;
- L'agarose plus ferme et moins toxique que le gel de polyacrylamide ;
- Les échantillons peuvent être récupérés en vue d'analyses supplémentaires.

3. Immunoélectrophorèse

3.1 Principe

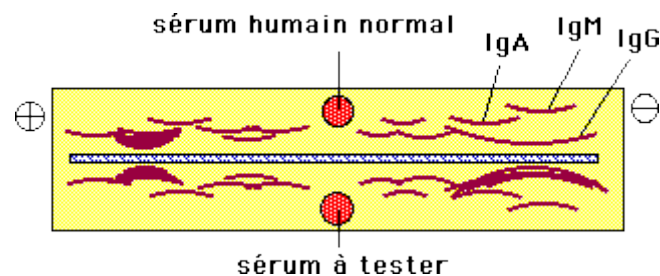
On peut disposer des protéines (antigènes ou anticorps) dans un gel d'agarose de diverses façons: par dépôt direct, par migration électrophorétique, etc. Les antigènes ou les anticorps contenus sous forme ponctuelle dans le gel pourront alors diffuser de façon radiale, autour de leur point d'application. En effet les pores d'un gel d'agarose sont suffisamment grands. Au cours de cette migration, des antigènes et des anticorps finiront par entrer en contact les uns avec les autres et formeront des complexes antigènes-anticorps stables. Ces complexes, s'ils ne sont pas trop gros, continueront à diffuser. Ils continueront aussi de grossir en entrant en contact avec d'autres antigènes ou d'autres anticorps. Au point d'équivalence, des complexes massifs (contenant des milliers d'antigènes et d'anticorps reliés ensemble) se formeront et seront emprisonnés dans le gel à cause de leur taille et ne pourront plus diffuser. Après avoir éliminé toutes les protéines n'ayant pas réagi, par trempage dans un solvant aqueux (e.g. salin), on pourra colorer les complexes antigènes-anticorps. **Le point d'équivalence est le rapport optimal du nombre d'antigènes et d'anticorps polyclonaux où se forment de très longues chaînes d'antigènes liés à des anticorps.** Lorsqu'il y a beaucoup trop d'antigènes par rapport aux anticorps, il ne se forme que des complexes antigène:anticorps 2:1 (s'il s'agit d'une IgG) avec un résidu d'excès d'antigènes non liés. Inversement s'il y a beaucoup trop d'anticorps par rapport aux antigènes, il se formera des complexes antigènes:anticorps ou un antigène sera attaché à quelques anticorps avec un excédent d'anticorps libres. Les complexes antigènes:anticorps 1:1 ou 2:1 sont relativement petits et peuvent diffuser dans les pores d'un gel d'agarose, tout comme les anticorps et les antigènes libres. Au fur et à mesure que les anticorps et les antigènes migrent un vers l'autre, le rapport antigène:anticorps devient optimal, des complexes de plus en plus gros se forment jusqu'à contenir des milliers de molécules associées en de gigantesques complexes insolubles et immobilisés dans le gel. Ces complexes sont appelés précipitines.



Il existe en fait tout un ensemble de techniques qui utilisent des anticorps associés à des séparations électrophorétiques. On peut distinguer les techniques suivantes :

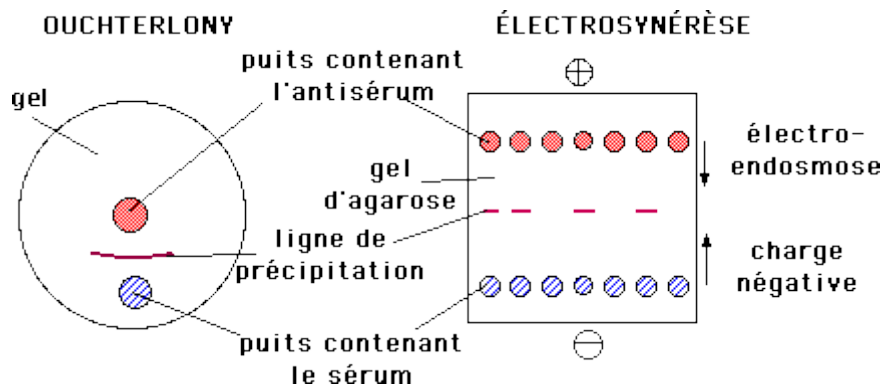
3.2 Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

Les protéines migrent dans un gel d'agarose, puis on les révèle par une technique de double diffusion des antigènes et des anticorps, donnant des arcs de précipitation. Avec un antiserum total, on peut par exemple distinguer 30-40 protéines dans le sérum humain. On peut bien sûr l'utiliser également avec un antiserum spécifique.



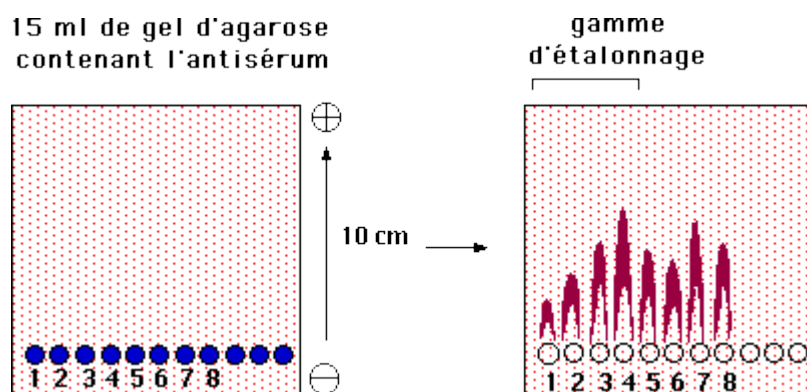
3.3 Electro-immunodiffusion double (= électrosynérèse)

Cette méthode dérive en fait de la technique d'immunodiffusion double d'Ouchterlony. Elle consiste à accélérer la diffusion par un champ électrique. Les conditions électrophorétiques sont choisies de façon à ce que les antigènes et les anticorps migrent en sens inverse (ceci est possible car le pHi des Immunoglobulines est supérieur à celui de beaucoup de protéines).



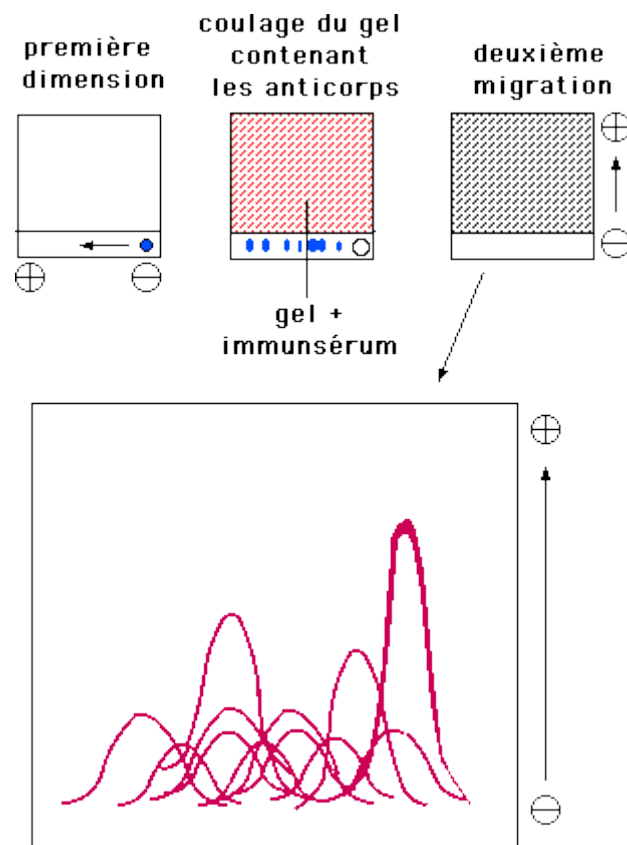
3.4 Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell)

Les protéines sont déposées sur des gels contenant l'antisérum. On se place à pH où les Ig migrent peu. Les protéines se déplacent et rencontrent les anticorps qui forment alors des précipités en forme de fusée appelés "rockets" dont la hauteur est proportionnelle à la concentration en protéine. On utilise une partie des puits pour faire un étalonnage.



3.5 Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell)

On sépare les protéines dans une première dimension en gel d'agarose. On coule ensuite un gel contenant l'immunsérum polyspécifique, puis on réalise la seconde dimension.



4. Isoélectrofocalisation

4.1 Principe

On sait que les protéines ont une charge qui leur permet de migrer dans un champ électrique. La vitesse de cette migration est proportionnelle à la charge qui elle-même est proportionnelle à la différence entre le pH du milieu et le pI de la protéine. Au pI, la protéine ne possède aucune charge nette, le nombre de charges positives étant égal à celui de charges négatives. Donc à un pH égal au pI, les protéines ne peuvent pas se déplacer dans le champ électrique. Le principe de base de la focalisation isoélectrique (FIE) est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les protéines soumises à un champ électrique. Les protéines migreront dans ce champ électrique. Arrivées au pH correspondant à leur pI, elles s'immobiliseront puisque leur charge nette sera nulle. De cette façon, il est possible de séparer les protéines d'une préparation selon leur pI.

On peut créer un tel gradient de pH avec des polyélectrolytes portant un certain nombre de groupes ionisables positivement ou négativement (amines, carboxyles ou sulfates) et possédant un certain pouvoir tampon. Ces molécules sont appelées ampholytes. Si on soumet ces ampholytes à un champ électrique borné par une solution d'un acide fort à l'anode et par une solution d'une base forte à la cathode, ils migreront et se distribueront par ordre de pI. Leur capacité tampon aidera à maintenir autour d'elles une petite zone de pH égal à leur pI. Une série d'ampholytes ayant donc chacun un pI couvrant une certaine gamme de pH créera donc un gradient continu de pH. Si on fait migrer une petite quantité de protéines dans ce système, après ou durant sa formation, elles migreront aussi et s'immobiliseront à leur pI.

4.2 Méthodologie

Dans un montage de FIE, il faut donc créer un gradient de pH dans lequel pourront ensuite se déplacer les protéines de l'échantillon. Comme matrice inerte, on peut utiliser de l'agarose, de l'acrylamide ou, plus rarement du dextran, dans lequel se formera ce gradient de pH. De nos jours un gel de polyacrylamide est de plus en plus utilisé. Puisque seul le pI doit influencer la migration, il faut utiliser des concentrations d'acrylamide dont la porosité ne ralentira pas les grosses protéines par rapport aux petites mais qui est suffisamment solide pour être aisément manipulable. Un gel de 5-6% fait généralement l'affaire. Pour les protéines particulièrement volumineuses, on peut avoir à utiliser des concentrations inférieures à 4%, mais ce gel est très difficile à manipuler et très fragile. Pour le renforcer, on ajoute quelque fois de l'agarose pour lui conférer un peu plus de rigidité sans affecter la mobilité des grosses protéines.

Le tampon de l'anode est un acide fort, généralement de l'acide phosphorique. À la cathode, on place une base forte, souvent de la triéthanoamine. On met les ampholytes dans le mélange du gel avant la polymérisation du gel. Pour créer le gradient de pH, on utilise un mélange de polyélectrolytes de petite masse molaire, les ampholytes. Ces molécules, des polyélectrolytes, se déplacent dans le champ électrique et se disposent un à la suite de l'autre dans l'ordre de leur propre pI. Beaucoup de compagnies fabriquent un grand nombre de mélanges d'ampholytes couvrant des gammes très étroites ou très larges de pH: Ampholine, Pharmalite de la compagnie Pharmacia, BioLites de Bio-Rad, Immobiline, etc. Lorsqu'on applique une tension entre les deux électrodes, chaque ampholyte se déplacera jusqu'à son point isoélectrique et s'y immobilisera. On pourra créer des gradients de diverses amplitudes de pH en combinant divers ampholytes. Par exemple, on peut obtenir des gradients de très faibles intervalles (e.g. 0.1 unité de pH) sur de petites gammes de pH (e.g. entre pH 5 à 7 ou 6 à 8), permettant une séparation très fine pour mesurer précisément le pI. Inversement, on peut aussi créer un gradient à plus grands intervalles (e.g. 0.4 unité de pH) sur une plus vaste gamme de pH (e.g. entre pH 2 à 10), si on veut analyser un grand nombre de protéines. Les protéines peuvent être ajoutées après la polymérisation du gradient ou directement dans le mélange avant la polymérisation. Elles aussi migreront dans le champ électrique. Comme elles sont plus grosses que les ampholytes, elles migreront beaucoup plus lentement et ces dernières pourront se stabiliser à leur pI bien avant que les protéines se soient déplacées substantiellement. La durée de la focalisation est beaucoup moins critique que celle d'une électrophorèse ordinaire. En effet dans une FIE les protéines ne risquent pas de sortir du gel puisqu'elles s'immobiliseront au point où elle auront atteint leur pI. Il faut seulement que la migration dure suffisamment longtemps pour que les ampholytes aient le temps de migrer correctement et que protéines aient le temps d'atteindre leur pI. À 2 mA, on estime le temps requis à environ 1 heure.

4.2.1 Gradient mobile ou immobilisés

La FIE a tout d'abord été développée en produisant des gradients mobiles (Vesterberg, 1971). Cette méthode des gradients mobiles, encore très utilisée, est cependant délicate à réussir, particulièrement parce que le gradient de pH n'est pas immobile mais se déplace dans le champ électrique. on a mis au point une méthode pour déposer un gradient d'ampholyte qui restera immobile dans le gel (Bjellqvist, 1982). Cette approche, qui nécessite cependant un équipement spécialisé et coûteux, permet une beaucoup reproduction plus facile.

4.2.2 Coloration

Les procédures de coloration sont similaires à celle d'une électrophorèse en gel de polysacrylamide. Il faut cependant éliminer les ampholytes du gel car elles peuvent se colorer. On fait donc précéder la coloration par trempage dans un bain d'acide trichloroacétique 5 ou 10% pour les faire diffuser hors du gel tout en fixant les protéines sur place.

Tel que mentionné précédemment, on peut se servir de la FIE pour déterminer le pI d'une protéine. La FIE est aussi une méthode très sensible pour vérifier la pureté d'une préparation de protéines.

5. Electrophorèse bidimensionnelle

5.1 Principe

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines dénaturées (EBD) est comme son nom l'indique, une combinaison de deux électrophorèses. La première, une isoélectrofocalisation (IEF), fait se déplacer tout polypeptide contenu dans l'échantillon jusqu'à une position fonction de son point isoélectrique (pI). La deuxième, une électrophorèse en présence de dodecyl sulfate de sodium (SDS), le fait de se déplacer en fonction de sa masse moléculaire (MM). Ces deux électrophorèses, perpendiculaires l'une par rapport à l'autre, combinent deux critères indépendants, c'est ce qui rend cette technique particulièrement résolutive : plusieurs centaines des constituants d'un mélange de polypeptides peuvent être individualisés sous forme de spots sur un gel. Les applications sont multiples, depuis la vérification de la pureté d'un échantillon jusqu'à des études de variabilité génétique, en passant par le suivi des variations d'expression en fonction de différents facteurs : développement, différenciation, traitements (drogues, stress, hormones, etc).

Le grand nombre de spots par gels, l'intérêt pour les variations quantitatives et la réalisation d'études portant sur un grand nombre de gels ont conduit plusieurs équipes à développer des logiciels d'analyse des gels d'EBD. L'analyse automatique représente un réel progrès par rapport au dépouillement visuel, en particulier pour l'analyse des variations quantitatives qui peuvent alors être traitées avec des outils statistiques appropriés : l'analyse de variance, par exemple, permettra de savoir si les variations observées sont significatives ou pas.

Un désavantage *à priori* de l'EBD est qu'elle ne donne pas la fonction des protéines révélées (sauf si l'on dispose d'anticorps). Cependant, l'identification est possible. La méthode encore la plus sûre reste le micro-séquençage, à partir de spots obtenus par des EBD réalisées en conditions préparatives : les homologues sont recherchés avec les séquences existant en bases de données. Plus récemment, d'autres techniques d'identification ont été proposées. Elles sont basées sur la composition (et non la séquence) en acides aminés, ou sur l'estimation très précise des masses moléculaires des peptides obtenus après digestion par une protéase (spectrométrie de masse). Les identifications obtenues par ces techniques sont en général moins certaines que celles obtenues par micro-séquençage, mais elles présentent l'avantage d'être moins coûteuses, en argent et en quantité de protéine nécessaire. Des laboratoires ont mis à disposition du public, par l'intermédiaire de WWW sur Internet, des images d'EBD sur lesquelles sont positionnées des protéines identifiées : on peut consulter par exemple le

serveur ExPASy (URL : <http://expasy.hcuge.ch/>) pour les protéines de levure, de *E. Coli*, et de différents tissus et fluides humains. Il faut cependant noter que l'utilisation de ces données par d'autres laboratoires dépend grandement de la possibilité de réaliser des EBD comparables entre laboratoires, ce qui n'est pas encore tout à fait le cas... L'EBD est en effet une technique analytique très puissante, mais sa mise en oeuvre reste délicate. Nous survolerons les

5.2 L'IEF

Le gradient de pH peut être établi soit par l'utilisation d'ampholytes, qui créeront le gradient lors de l'application du champ électrique, soit par l'utilisation d'immobilines qui copolymérisent avec les molécules d'acrylamide dans le gel d'IEF. Dans ce cas le gradient d'immobilines doit être constitué lors du coulage du gel. Les gels à immobilines ont de nombreux avantages par rapport aux gradients à ampholytes : en particulier, stabilité au cours du temps, bonne reproductibilité, grande capacité de chargement en protéines, possibilité d'obtenir des gradients de pH très étroits. Par contre il est plus difficile d'obtenir des gels d'EBD de bonne qualité.

Une grande attention doit être apportée au gradient de pH : quand une gamme de pH très large est utilisée, il arrive souvent que la plupart des polypeptides se concentrent dans une région du gel seulement : une grande partie reste inemployée et la résolution est mauvaise dans la partie utile. Il est donc le plus souvent nécessaire d'optimiser la séparation en choisissant une gamme de pH resserrée.

5.3 L'électrophorese en présence de SDS

Le gel d'IEF peut être équilibré dans une solution appropriée avant d'être couché sur le gel de 2ème dimension. Cette étape est indispensable lorsque le gradient de pH est établi par immobilines, mais pas s'il est établi par les ampholytes et si le gel de première dimension est suffisamment fin. Le gel de concentration («stacking gel») est également inutile si les gels de première dimension sont assez fins. Un gel de séparation en gradient de concentration d'acrylamide dans des limites bien choisies améliore la résolution, mais la répétabilité du gradient n'est pas toujours excellente : il est souvent préférable d'utiliser une concentration uniforme (en général entre 10 et 15%).

5.4 La révélation

Toutes les méthodes de révélation non spécifique des protéines sur gel de polyacrylamide peuvent être employées. Comme les concentrations en protéines dans les extraits sont souvent faibles, les méthodes de coloration au nitrate d'argent sont souvent utilisées, bien que leur reproductibilité soit difficile à contrôler.

La réalisation de «bonnes» EBD nécessite donc la plupart du temps une phase de mise au point, qui doit aussi optimiser la reproductibilité : par exemple, couler les gels en séries, contrôler la température en cours de migration, voire en cours de révélation. Le dispositif expérimental doit impérativement comporter des répétitions à partir d'échantillons différents, surtout pour mettre en évidence des variations quantitatives.

Les différentes innovations apparues depuis l'invention de l'EBD (logiciels d'analyse, colorations au nitrate d'argent, immobilines, identification des protéines) en font une technique de plus en plus précise. La qualité des informations que l'on peut en tirer justifie l'effort de mise au point nécessaire à son utilisation optimale.

Annexe

A- Coloration au nitrate d'argent

1. Fixation : 1h à 1 nuit à température ambiante, dans une solution contenant :

Tableau II : Composition de la solution de fixation pour 1 à 4 gels

	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels	Concentration finale
Ethanol 99%	15 ml	30 ml	45 ml	60 ml	30% (V/V)
Acide acétique	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	10% (V/V)
H ₂ O milliQ	30 ml	60 ml	90 ml	120 ml	-
Volume final	50 ml	100 ml	150 ml	200 ml	-

2 . Sensibilisation : 2H30 à température ambiante, dans une solution contenant couvrir d'un papier d'aluminium et éviter que la solution devienne jaunâtre.

Tableau III : Composition de la solution de sensibilisation pour 1 à 4 gels

	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels	Concentration finale
Ethanol 99%	15 ml	30 ml	45 ml	60 ml	20% (V/V)
Potassium acétate (D 20)	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	0,5M
Potassium tétrathionate	30 ml	60 ml	90 ml	120 ml	3g/l
Glutaraldehyde	50 ml	100 ml	150 ml	200 ml	0,5%
QSP H ₂ O milliQ Q	50ml	100 ml	150 ml	200 ml	-

Lavages : 3x 20min avec H₂O milliQ.

Coloration : 30 min à température ambiante dans une solution contenant :

Préparer à l'avance la solution d'arrêt.

Tableau IV : Composition de la solution de coloration pour 1 à 4 gels

	1 gel	2 gels	3 gels
Nitrate d'argent	0,1g	0,2g	0,3g
Formaldéhyde 37%	35µl	70µl	105µl
QSP H ₂ O milliQ	50ml	100ml	150ml

Lavages : 10 sec avec H₂O milliQ.

Développement : 5 à 10 min à température ambiante dans une solution contenant :

Tableau V: Composition de la solution de développement pour 1 à 4 gels

	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels	Concentration finale
Potassium carbonate	1,5g	3g	4,5g	6g	30g/l
Formaldéhyde 37%	25µl	50µl	75µl	100µl	500µl/l
Thiosulfate de sodium 5H ₂ O 2,48g/l	250 µl	375µl	500µl	750µl	0,0124g/l
QSP H ₂ O milliQ	50ml	100ml	150µl	200µl	0,5%

Solution d'arrêt : jusqu'à 3 jours dans une solution d'arrêt

Tableau VI : Composition de la solution d'arrêt pour 1 à 4 gels

	1 gel	2 gels	3 gels	4 gels	Concentration finale
Tris	2,5g	5g	7,5g	10g	30g/l
Acide acétique	1,25ml	2,5ml	3,75ml	5ml	25ml/l
QSP H ₂ O milliQ	50ml	100ml	150ml	200ml	0,5%

B- Préparation des solutions d'électrophorèse dénaturante SDS- PAGE

1. Préparation des gels de séparation et de concentration

Tableau VII : Composants du gel de concentration et de séparation

Composant	Gel de concentration à 4%	Gel de séparation à 15%
40% acrylamide /Bis	2,5ml	37,5ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	6,3ml	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	25ml
10 % SDS	250µl	1ml
Eau distillée desionisé	15,9ml	36ml

TEMED	25µl	50µl
10% persulfate d'ammonium	125µl	500µl
Volume total	25ml	100ml

2. Préparation des tampons

2.1 Tampon de séparation

Tris.....18,15g

SDS.....400mg

Eau distillée.....100ml

Ajuster le pH à 8,8 avec HCl concentré

2.2 Tampon de concentration

Tris.....6g

SDS (Sigma).....400mg

Eau distillée.....100ml

Ajuster le pH à 6,8

2.3 Tampon de migration (X10)

Tris..... 30,3g

Glycine.....144g

SDS (Sigma).....10g

Eau distillée.....qsp 1L

Ajuster le pH à 8,3

Le tampon de migration est réalisé par dilution 10 fois de cette solution.

2.4 Tampon échantillon (X4)

Trizma base.....0,303g

SDS (Sigma).....0,8g

Eau distillée.....4ml

Ajuster le pH à 6,75 avec du HCl concentré

Glycérol.....4ml

β -mercaptoéthanol à 14,3M : 2ml

Bleu de bromophénol : 0,1 mg

(Aliquote de 1ml à -20°C)

3. Solution de fixation

Acide trichloroacétique (sigma).....57g

Ethanol absolu (charbonneau).....150ml

Eau distillée.....qsp 500ml

4. Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250 (sigma).....0,5g

Méthanol (charbonneaux).....225ml

Acide acétique.....50ml

Eau distillée.....qsp 500ml

Le colorant est solubilisé dans le mélange méthanol/eau puis l'acide acétique est ajouté. La solution obtenue est filtrée sur filtre papier (prolabo).

5. Solution de décoloration

Méthanol.....125ml

Acide acétique.....50ml

Eau distillée.....qsp 500ml

Changement de bain deux à trois fois.

