

Cours : TECHNIQUES SEPARATIVES EN BIOCHIMIE

Chapitre 2 : L'Électrophorèse : Principes, Méthodologies et Applications

Nombre d'heures : 6h (4h théorique, 2h TD) Enseignant : [A. Allouche]

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Principes Physico-chimiques de la Migration Électrophorétique	2
1.1. La force électromotrice et la mobilité électrophorétique	2
1.2. Facteurs influençant la migration : charge, taille, matrice et pH	3
Partie 2 : L'Électrophorèse sur Support (Gel) : Matrices et Dispositifs	4
2.1. Les matrices de séparation : Agarose et Polyacrylamide	4
2.2. Dispositif expérimental et préparation des échantillons	5
2.2.1. La cuve et le système électrique	5
2.2.2. Préparation de l'échantillon et marqueurs de poids moléculaire	6
Partie 3 : Stratégies de Séparation et Méthodologies	7
3.1. Électrophorèse native et dénaturante (SDS-PAGE)	7
3.2. Électrophorèse bidimensionnelle (2D)	8
3.3. Détection et analyse : Coloration, Western Blot	9
Partie 4 : Applications en Biochimie Alimentaire et Physiologie Végétale	10
4.1. Applications en biochimie alimentaire	10
4.1.1. Contrôle de qualité et authenticité des protéines	10
4.1.2. Analyse des protéines allergènes	10
4.2. Applications en physiologie végétale	11
4.2.1. Analyse de l'expression protéique (Protéomique)	11
4.2.2. Étude des isoenzymes et de la diversité génétique	11
Conclusion et Perspectives	12
Annexes (Schémas)	13
Références Bibliographiques	15

Synthèse du Document

Introduction

L'électrophorèse est une technique de séparation fondamentale en biochimie. Elle permet de séparer des molécules chargées (protéines, acides nucléiques) sous l'influence d'un champ électrique. Sa simplicité, son faible coût et son haut pouvoir de résolution en font un outil indispensable pour l'analyse, l'identification et la purification des biomolécules. Ce cours détaille les principes physico-chimiques qui régissent la migration, les différents types de supports (gels), les protocoles expérimentaux et leurs applications majeures en biochimie alimentaire et physiologie végétale.

Partie 1 : Principes Physico-chimiques de la Migration Électrophorétique

1.1. La force électromotrice et la mobilité électrophorétique

Lorsqu'une molécule chargée est placée dans un champ électrique, elle subit une force électromotrice (F) proportionnelle à sa charge nette (q) et à l'intensité du champ électrique (E). $F = q * E$

Cette force est opposée par une force de frottement (F_f) due à la viscosité du milieu. À l'équilibre, la molécule migre à une vitesse constante (v). La mobilité électrophorétique (μ) est définie comme le rapport de la vitesse de migration au champ électrique appliqué : $\mu = v / E$

Schéma 1 (Annexe p.13) : Représentation des forces en jeu lors de la migration.

· Illustration d'une molécule chargée négativement (●-) dans un gel, montrant la force électromotrice (F) vers l'anode (+), la force de frottement (F_f) opposée au mouvement, et le sens du champ électrique (E).

1.2. Facteurs influençant la migration

· Charge nette (q) : Déterminée par le pH du milieu tampon. Pour les protéines, elle dépend du pH isoélectrique (pI) de la protéine et du pH du tampon. · Taille et forme : Les molécules plus grosses ou de forme non sphérique subissent un frottement plus important et migrent plus lentement. · Intensité du champ électrique (E) : Plus E est élevé, plus la migration est rapide. $E = V / d$ (V: tension appliquée, d: distance entre les électrodes). · Nature de la matrice : Le gel agit comme un tamis moléculaire. La taille des pores du gel détermine sa capacité à séparer les molécules en fonction de leur taille.

Partie 2 : L'Électrophorèse sur Support (Gel) : Matrices et Dispositifs

2.1. Les matrices de séparation

· Gel d'Agarose : Polymer naturel extrait d'algues. Pores larges. · Applications : Séparation de gros fragments d'ADN, d'ARN, ou de très grosses protéines et complexes. · Avantages : Facile à préparer, non toxique. · Gel de Polyacrylamide : Polymer synthétique formé par polymérisation de l'acrylamide avec du bis-acrylamide (agent réticulant). · Applications : Séparation haute résolution des protéines et petits fragments d'ADN. · Avantages : Résolution supérieure, taille des pores ajustable en variant la concentration d'acrylamide (%T) et le taux de réticulation (%C). Attention : L'acrylamide monomère est un neurotoxique.

Schéma 2 (Annexe p.13) : Représentation de la structure poreuse des gels.

· Illustration comparée de la matrice lâche d'un gel d'agarose (gros pores) et de la matrice serrée et contrôlable d'un gel de polyacrylamide (petits pores), avec des molécules de différentes tailles migrant à travers.

2.2. Dispositif expérimental et préparation des échantillons

2.2.1. La cuve et le système électrique Le dispositif de base (cuve électrophorétique) comprend :

· Deux compartiments remplis de tampon de migration, reliés par le gel. · Deux électrodes : une anode (+) et une cathode (-), connectées à une alimentation haute tension réglable. · Un support pour maintenir le gel. Le tampon assure la conductivité ionique et maintient un pH constant.

Schéma 3 (Annexe p.14) : Schéma de principe d'une cuve électrophorétique verticale (SDS-PAGE).

- Représentation en coupe d'une cuve verticale : électrodes en haut et en bas, gel entre les deux plaques de verre, puits contenant les échantillons en haut, et sens de migration des protéines SDSées (vers l'anode +).

2.2.2. Préparation de l'échantillon Les échantillons sont mélangés à un tampon de chargement qui contient :

- Un colorant (ex: Bleu de bromophénol) pour visualiser le front de migration.
- Du glycérol ou du sucrose pour alourdir l'échantillon et qu'il coule au fond du puits.
- Pour les protéines : du SDS et un agent réducteur (DTT, β -mercaptoéthanol) en cas d'électrophorèse dénaturante.

Partie 3 : Stratégies de Séparation et Méthodologies

3.1. Électrophorèse native et dénaturante (SDS-PAGE)

- Électrophorèse native : Séparation basée à la fois sur la charge, la taille et la forme native de la protéine. Préserve l'activité biologique.
- SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) : Technique dénaturante.
- Le SDS est un détergent anionique qui se lie aux protéines, masquant leur charge propre et leur conférant une charge négative uniforme proportionnelle à leur masse.
- Un agent réducteur (DTT) casse les ponts disulfure.
- Résultat : La séparation se fait uniquement sur la base de la masse moléculaire. Permet d'estimer le poids moléculaire d'une protéine inconnue.

3.2. Électrophorèse bidimensionnelle (2D)

Technique puissante pour séparer des mélanges complexes de protéines.

- Première dimension : Isoélectrofocalisation (IEF). Les protéines sont séparées dans un gel selon leur point isoélectrique (pI).
- Deuxième dimension : Le tube de gel de la première dimension est placé sur un gel de SDS-PAGE pour séparer les protéines selon leur masse moléculaire.
- Résultat : Une carte où chaque tache représente une protéine unique (ou un isoforme).

Schéma 4 (Annexe p.14) : Principe de l'électrophorèse 2D.

- Représentation en deux étapes : 1) Séparation horizontale par pI sur un gel tubulaire. 2) Séparation verticale par masse moléculaire sur un gel SDS-PAGE, produisant un pattern de taches.

3.3. Détection et analyse

- Coloration : Le gel est coloré pour révéler les bandes/taches (ex: Bleu de Coomassie pour les protéines, Bromure d'éthidium/ SYBR Safe pour l'ADN).
- Transfert (Western Blot) : Après SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt, puis avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme (ex: peroxydase). L'addition d'un substrat chromogène ou chimioluminescent permet de visualiser la protéine spécifique.

Partie 4 : Applications en Biochimie Alimentaire et Physiologie Végétale

4.1. Applications en biochimie alimentaire

- Contrôle de qualité et authenticité : Vérification de la composition protéique d'un aliment (ex: détection de l'adultération d'une farine de blé par une farine de pois par analyse des profil protéiques).
- Détection de protéines allergènes (arachides, gluten, lait) dans les aliments pour garantir l'étiquetage et la sécurité des consommateurs via des techniques comme le Western Blot.
- Étude de la dénaturation protéique lors des procédés technologiques (traitement thermique, haute pression).

4.2. Applications en physiologie végétale

- Protéomique : Analyse comparative des profils protéiques de plantes soumises à différents stress (hydrique, salin, pathogène) par électrophorèse 2D pour identifier les protéines impliquées dans la réponse au stress.
- Étude des isoenzymes (forme multiple d'une même enzyme) pour analyser la diversité génétique au sein d'une population végétale ou identifier des cultivars.
- Validation de l'expression de protéines recombinantes dans des plantes génétiquement modifiées.

Conclusion et Perspectives

L'électrophorèse reste une technique centrale et incontournable en sciences du vivant. Sa versatilité, de la simple séparation à l'analyse protéomique complexe, en fait un outil de choix pour le biochimiste. Les évolutions tendent vers l'automatisation, l'augmentation de la sensibilité de détection (coloration fluorescente) et le couplage avec la spectrométrie de masse pour l'identification directe des protéines.

Annexes : Schémas

Page 13 Schéma 1 : Principes de la migration électrophorétique (Un schéma montrant une molécule chargée négativement dans un gel, avec : - Une flèche longue vers la droite (anode) représentant la force $F = qE$. - Une flèche plus courte vers la gauche représentant la force de frottement F_f . - Un champ électrique E dirigé vers la droite.) Légende : "Forces s'exerçant sur une particule chargée négativement lors de la migration électrophorétique."

Schéma 2 : Matrices de gel (Agarose vs Polyacrylamide) (Deux dessins côte à côte : - Left: Structure lâche et irrégulière d'un gel d'agarose avec de gros pores. - Right: Structure serrée et régulière d'un gel de polyacrylamide avec de petits pores.) Légende : "Comparaison schématique des tailles de pores dans les gels d'agarose et de polyacrylamide."

Page 14 Schéma 3 : Dispositif de l'électrophorèse verticale (SDS-PAGE) (Schéma annoté d'une cuve verticale : - Alimentation haute tension (V) - Électrode supérieure (Cathode, -) - Puits de dépôt des échantillons - Gel entre deux plaques de verre - Tampon de migration - Électrode inférieure (Anode, +) - Sens de migration des protéines (vers le bas)) Légende : "Vue en coupe d'un système d'électrophorèse verticale pour SDS-PAGE."

Schéma 4 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D) (Un diagramme en deux parties : - Partie 1 (IEF) : Un gel tubulaire avec un gradient de pH (pH élevé à gauche, pH bas à droite). Les protéines forment des bandes à leur pI. - Partie 2 (SDS-PAGE) : Le gel tubulaire est déposé sur un gel rectangulaire SDS-PAGE. Les bandes sont séparées en taches selon leur masse moléculaire.) Légende : "Principe de séparation en deux dimensions : point isoélectrique (pI) puis masse moléculaire."

Références Bibliographiques

1. Westermeier, R. (2016). Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations (5th ed.). Wiley-VCH.
2. Hames, B. D., & Rickwood, D. (Eds.). (1990). Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (3rd ed.). Oxford University Press.
3. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. (Article fondateur de la SDS-PAGE).
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254. (Méthode de dosage des protéines).