

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Batna 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

POLYCOPIE DE COURS 4

Chapitre 4 : **Méthodes électro-phorétiques
et immunochimiques**

MODULE

MÉTHODES MODERNE D'ANALYSES ET DE
DOSAGES EN BIOLOGIE
MASTER I (BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE)

Réalisé par

Mr. Ghedadba Nabil

Intitulé du Master : Biotechnologie végétale

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UEM1

Intitulé de la matière : Méthodes modernes d'analyses et de dosages en biologie.

Crédits : 4

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Actualiser les connaissances de l'étudiant en matière de nouvelles techniques d'analyse en biologie.

Connaissances préalables recommandées : Biologie.

Contenu de la matière

1. Méthodes spectroscopiques (Spectrophotométrie)
2. Méthodes chromatographiques (chromatographie d'absorption, échange ionique, affinité etc.)
3. Méthodes enzymatiques (dosage d'enzymes, de substrat etc.)
4. Méthodes électro-phorétiques et électrochimiques (réaction antigène anticorps, généralités sur les méthodes immunochimiques courantes, immuno-précipitation etc.)
5. Méthodes cytologiques et ultra structurales.
6. Méthodes cytogénétiques moléculaires (hybridation in situ, FISH, GICH.)

Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

Références : (Livres et photocopiés, sites internet, etc.)

I. Les méthodes électro-phorétiques

I.1. Définition

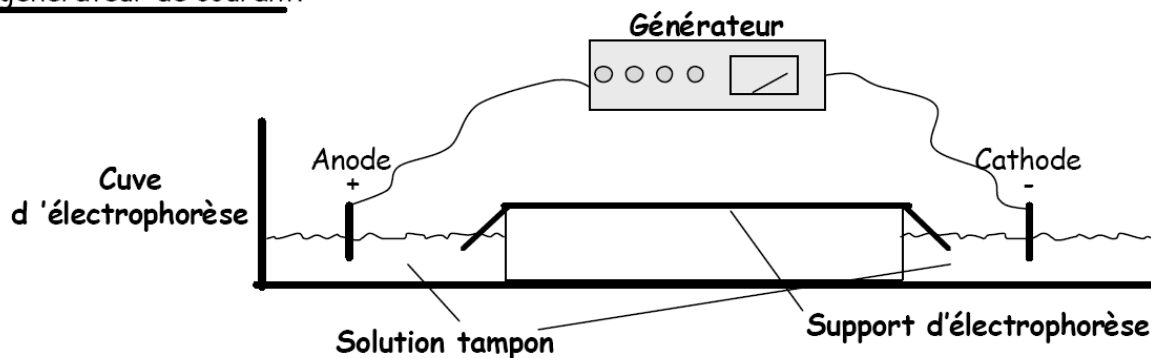
C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules **chargées** par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique. Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-).

I.2. Principe

L'électrophorèse est une technique permettant de déplacer des ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Ceux-ci migrent vers leur électrode respective: Les anions migrent vers l'anode et les cations migrent vers la cathode. Pour les molécules non chargées, il n'existe pas de migration. Du fait de leurs caractéristiques propres et des conditions de l'électrophorèse, la vitesse de migration et la distance parcourue dans la matrice par ces ions diffèrent, ce qui permet leur séparation.

Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.



Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.

I.3- Types d'électrophorèse

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

I.3.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle.

I.3.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS (**Fig. 1**) est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative (**Fig. 2**). Les protéines transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire.

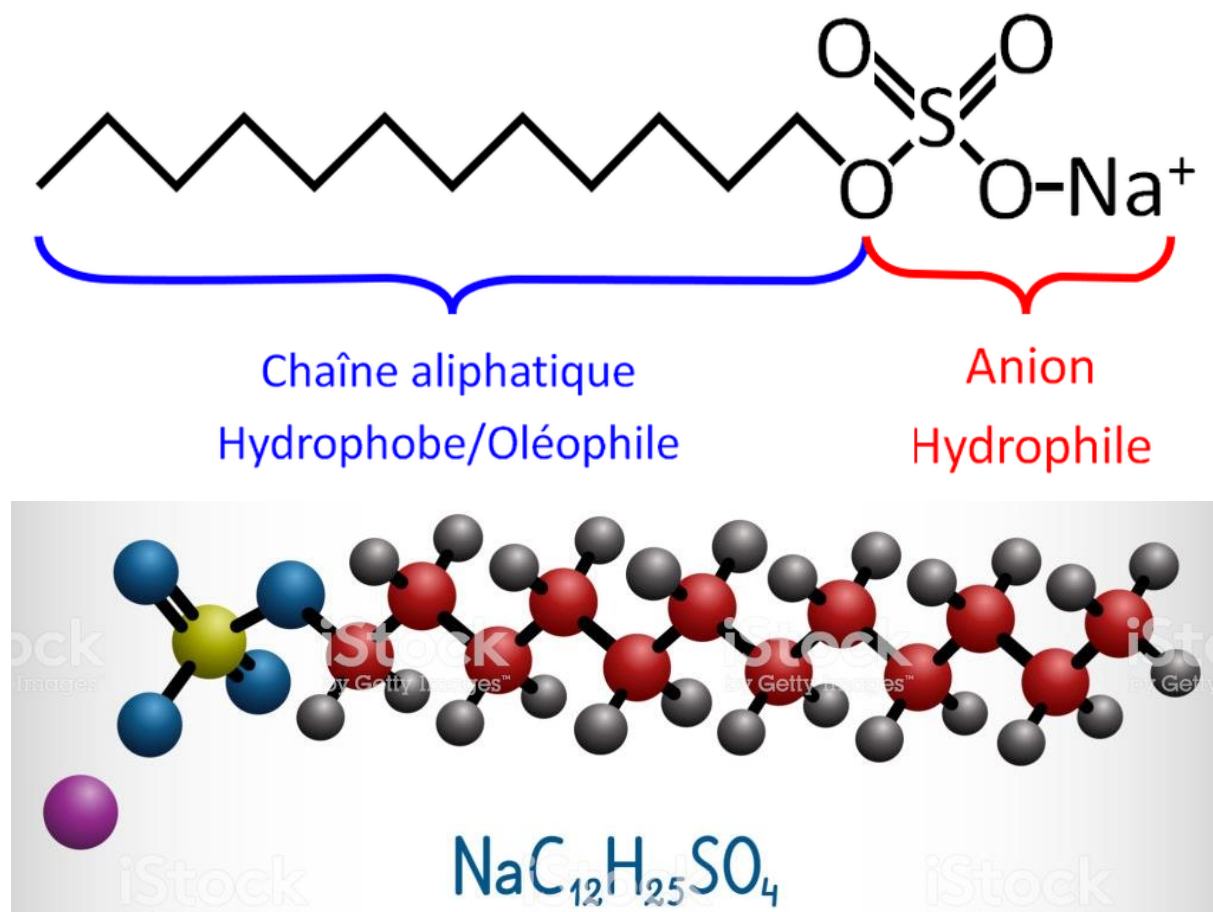


Figure 1. Structure chimique du SDS.

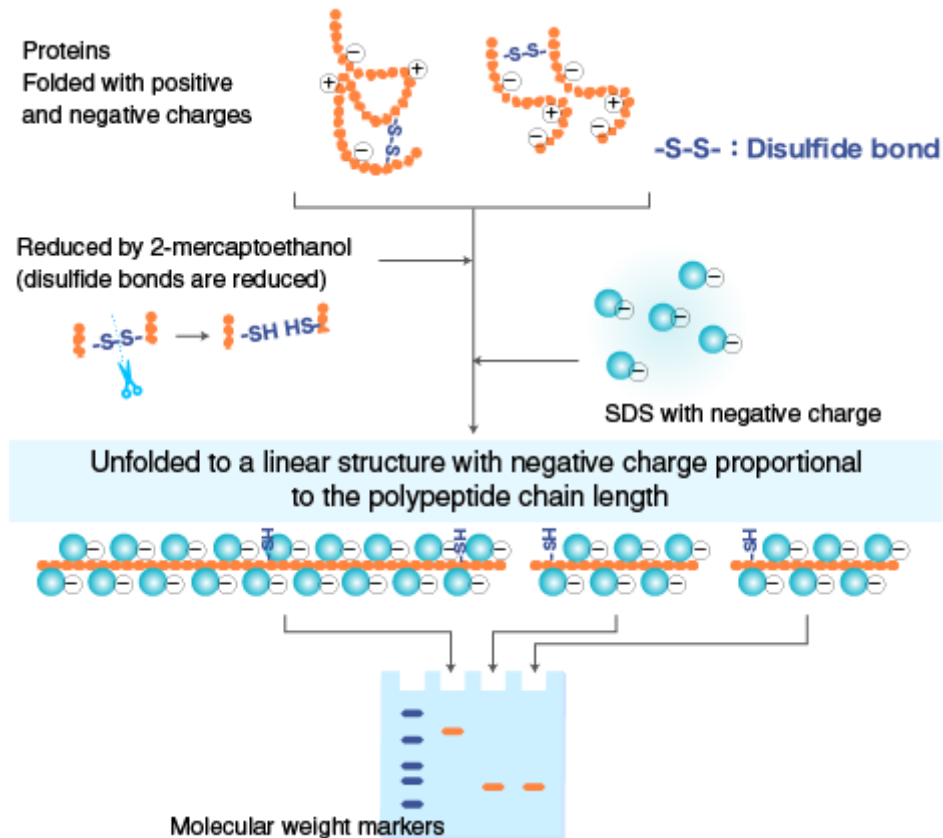


Figure 2. Action du SDS sur les protéines.

Selon le support électrophorétique, il existe deux types d'électrophorèse:

I.3.3. Electrophorèse de zone sur support

Les mobilités obtenues en ce type d'électrophorèse sont plus faibles que celles de l'électrophorèse en veine liquide. Ce type utilise un support poreux stabilisant la phase liquide.

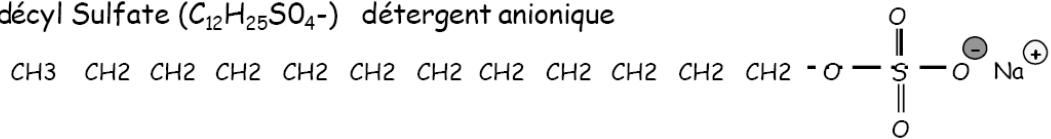
Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, homogène, poreux, inerte et imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide (PAGE), etc. Les différents types d'électrophorèse de zone sont souvent nommés en fonction du type de support (papier, ester de cellulose, gel, etc.). Electrophorèse sur papier, sur acétate de cellulose, sur gel (amidon, agar, agarose, polyacrylamide).

Les fractions séparées par électrophorèse de zone migrent comme des zones individuelles. La taille des pores pour le support en gel peut influencer la vitesse de migration (ralentissement du déplacement des grosses molécules).

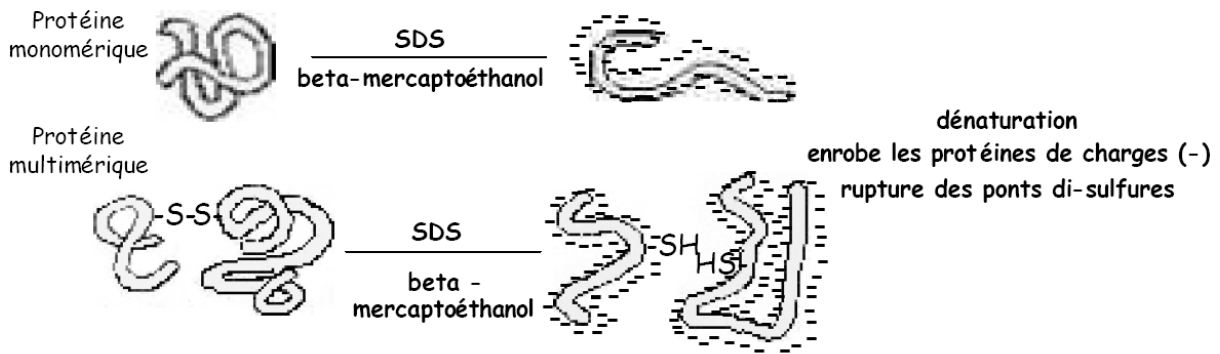
ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

Séparation de **protéines** réalisée en **condition dénaturante**, en présence de **SDS**

Sodium Dodécyl Sulfate ($C_{12}H_{25}SO_4^-$) détergent anionique



Les extraits protéiques mis à bouillir en présence d'un **détergent** et d'un **agent réducteur**



perte de la charge nette et de la structure III ou IV

Conditions SDS-PAGE => suppression facteurs **FORME** et **CHARGE** lors migration

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur TAILLE

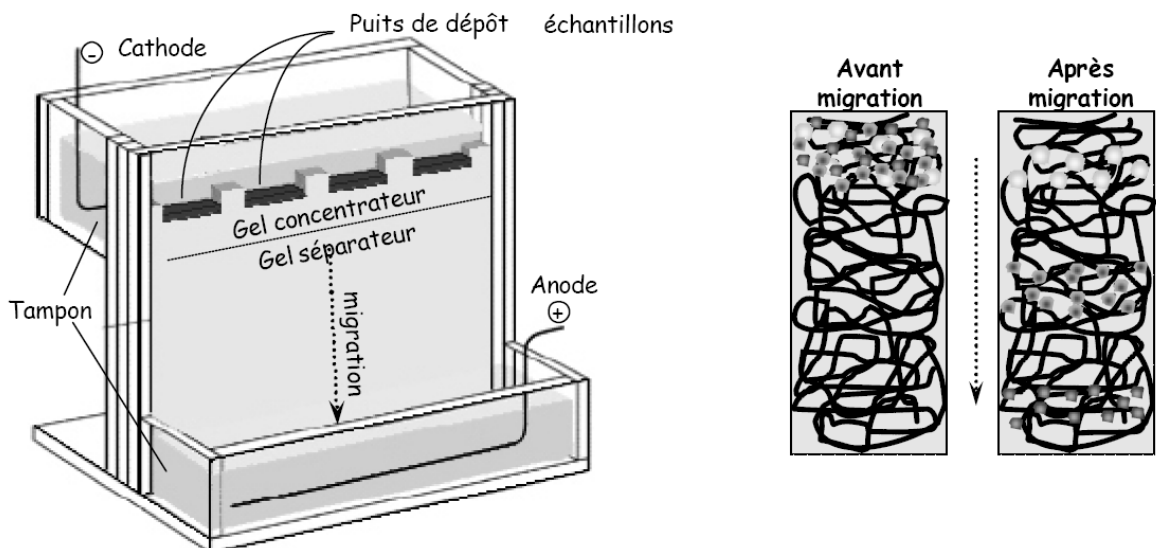
avec une électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS

Préparation d'1 **gel de séparation** (résolution, 6-15% polyacrylamide) contenant du SDS

Un **gel concentrateur** (stacking gel, 3 à 5%) est coulé en haut du gel de séparation

=> **entrée homogène** de l'échantillon dans **gel de séparation**

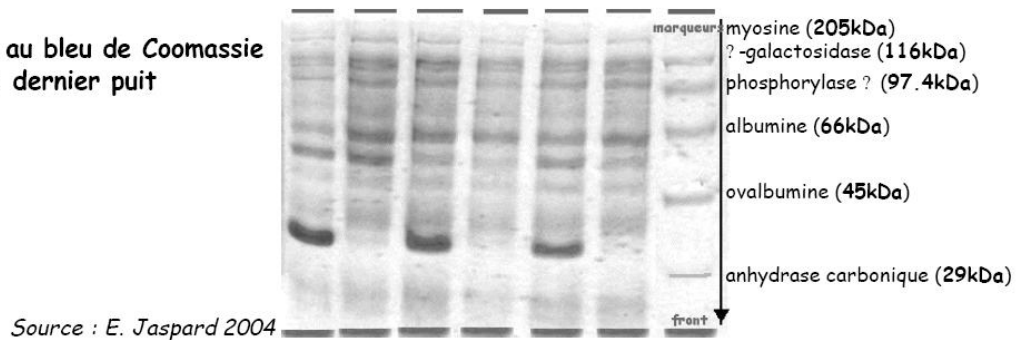
=> **affine les bandes** avant leur entrée dans le gel de résolution



Évaluation des **masses moléculaires** des protéines séparées, on utilise des standards = mélange de protéines de masses moléculaires connues

Révélation des protéines séparées dans le gel : **coloration** au bleu de Coomassie, nitrate d'argent (+ sensible), ou nouveaux colorants fluorescents

Ex: Gel coloré au bleu de Coomassie
Standard : dernier puit



=> Visualisation de l'ensemble des protéines dans le gel.

Pour la détection **spécifiques** => utilisation d'**anticorps** marqués (western blot)

➤ Applications

L'électrophorèse est utilisée pour vérifier la pureté d'une fraction chromatographique et pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue à l'aide des protéines standards.

❖ Détermination de la masse moléculaire

Le fait que le SDS rende négatives les protéines permet de les séparer en fonction de leur taille (masse moléculaire) et non pas en fonction de leurs charges. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique (R_f) au sein du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine inconnue. Dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement (R_f) et l'extrapolation de ce R_f sur la droite: $\text{Log } M = f(R_f)$, permettent la détermination de sa masse moléculaire (**Fig. 3**).

A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) (**Tab. 1**) on trace la droite d'étalonnage $\text{Log } M = f(R_f)$. Le rapport frontal (R_f) représente le rapport de la distance parcourue par la protéine sur la distance parcourue par le front de migration (F_m).

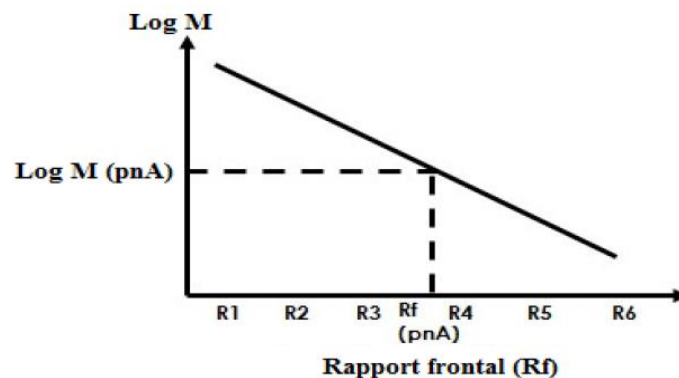


Figure 3. Mobilité des protéines en fonction du logarithme de leur masse moléculaire.

(pnA: protéine A de masse moléculaire inconnue).

Tableau 1. La masse moléculaire et les rapports frontaux de quelques protéines standards.

Protéines	Phosphorylase b	Albumine	Ovalbumine	Anhydrase carbonique	Inhibiteur de la tyrosine	Lactalbumine
MM (kDa)	97	66	45	30	20.1	14.4
Rf (cm)	0.11	0.23	0.41	0.56	0.80	0.95

✓ Electrophorèse bidimensionnelle

C'est une méthode de séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pH_i) et leur masse moléculaire. La séparation se fait en deux dimensions: La première dimension consiste à séparer les protéines selon leur pH_i par isoélectrofocalisation (IEF) et la deuxième dimension consiste à séparer les protéines selon leur masse moléculaire par électrophorèse en présence de SDS.

✓ Isoélectrofocalisation

La focalisation électrique ou isoélectrofocalisation (IEF) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (valeur de pH à laquelle la molécule ne présente aucune charge nette).

L'IEF est pratiquée sur lame ou sur colonne, dans lesquelles un gradient de pH est préétabli. Le gradient de pH est réalisé en imprégnant le gel avec un mélange de substances amphotères de points isoélectriques différents. Lorsque la différence de potentiel est appliquée, les différents ampholytes se rangent dans l'ordre de leur point isoélectrique et réalisent un gradient de pH entre les deux électrodes.

Les protéines déposées migrent vers l'anode ou la cathode selon leur charge mais, au fur et à mesure de leur déplacement, le pH extérieur varie, ainsi que leur propre charge: elles ne migrent plus quand leur charge nette est nulle (elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre point isoélectrique (**Fig. 4**).

Les ampholytes sont des mélanges d'un certain nombre de molécules de faible masse moléculaire, donc très mobiles, et comportant chacune plusieurs groupements acide carboxylique et amine.

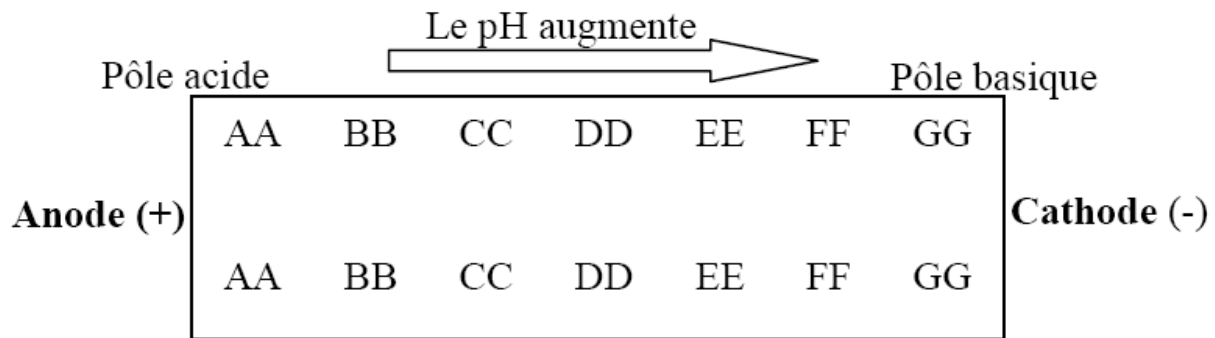


Figure 4. Gradient de pH en isoélectrofocalisation.

A, B, C, D, E, F et G sont des ampholytes de pH_i croissant de pH_i^A à pH_i^G . Les ampholytes à pH acide migrent vers l'anode, les ampholytes à pH basique migrent vers la cathode.

L'échantillon protéique est déposé dans un large puits au centre du gel. Les protéines migrent dans une direction ou dans l'autre jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur point isoélectrique, point où elles cessent de migrer.

Dans l'IEF, le gel de polyacrylamide doit être de forte porosité pour que la taille des protéines n'influence pas leur migration.

L'IEF est utilisée pour déterminer le point isoélectrique d'une protéine inconnue par l'utilisation des marqueurs de point isoélectrique (standards), en traçant la droite d'étalonnage: $pH_i \text{ standards} = f(R_f)$. Il ya une relation linéaire entre le point isoélectrique des protéines et leur rapport frontal (**Fig. 5**).

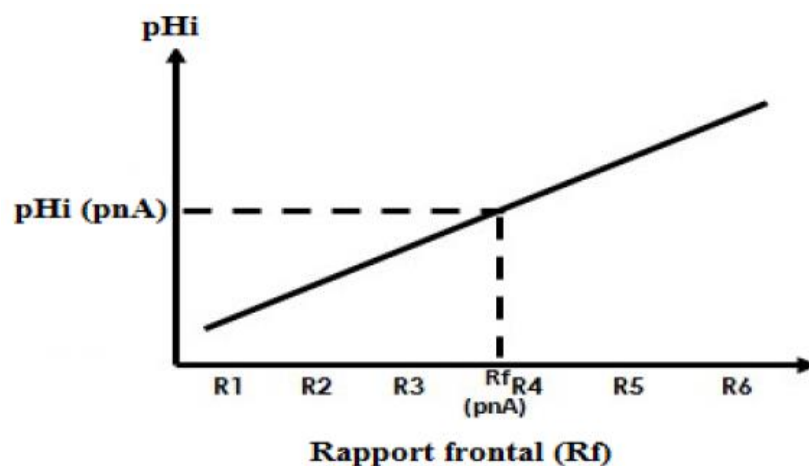


Figure 5. Mobilité des protéines en fonction de leur point isoélectrique.

(pnA: protéine A de pH_i inconnu).

✓ **Electrophorèse en champ pulsé**

C'est une méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose dont le pouvoir de séparation peut aller au moins jusqu'à 9 000 kb. Cette technique est utilisée lorsque l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide ne permet pas de séparer des molécules d'ADN dont la taille excède 50000 paires de bases (50 kb).

Les fragments d'ADN à séparer sont soumis à l'action alternative de deux champs électrophorétiques perpendiculaires agissant à une certaine fréquence et à une certaine valeur des champs, judicieusement choisies en fonction de la taille des fragments à séparer. L'un des champs étire le fragment d'ADN et lui permet de sortir du piège dans lequel il était bloqué, l'autre assure l'avancement du fragment au sein du gel.

Grâce à cette technique, il est pratiquement possible, pour tous les organismes à petit génome, procaryotes et eucaryotes inférieurs, de localiser très rapidement un gène quelconque. Par exemple, 16 des 17 chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être séparés par ce type d'électrophorèse.

➤ **Immunoélectrophorèse**

Cette technique permet de séparer les composés par électrophorèse et de les détecter par réaction immunologique par formation d'arc de précipitation entre antigène et anticorps. Les précipités peuvent être facilement visualisés sur un gel. Donc, c'est une méthode qui associe l'électrophorèse de protéines (Ag) à une immuno-diffusion contre des Ac spécifiques.

II. Les méthodes immunochimiques

1 – Définitions et principe

La présence d'un anticorps spécifique peut être mesurée par plusieurs méthodes différentes. Certaines d'entre elles mesurent la fixation directe de l'anticorps (Ac) sur l'antigène (Ag). Ces techniques sont basées sur des interactions primaires alors que d'autres détectent les changements physiques de l'antigène induit après la fixation de l'anticorps et sont donc basées sur des interactions secondaires. Quoi qu'il en soit, ces deux types de tests peuvent être employés pour mesurer le titre et la spécificité des anticorps produits au cours de la réponse immunitaire. Ces tests ayant été utilisés historiquement pour détecter la présence d'anticorps dans le sérum de patients, on les appellent communément tests sérologiques. La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par titrage de celui-ci en dilution limite.

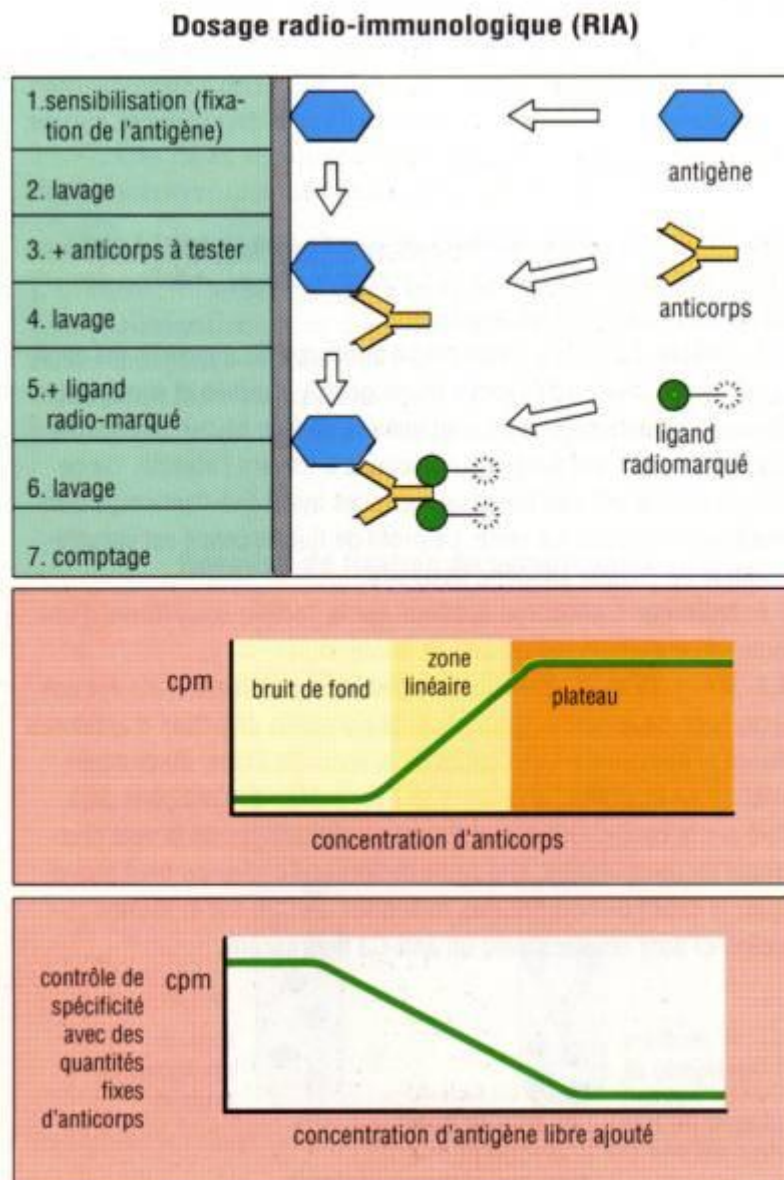
2 – Méthodes directes de dosage des anticorps

Deux méthodes sont couramment utilisées pour mesurer la fixation directe des anticorps sur un antigène : Le RIA (RadioImmuno Assay), l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

2 – 1 – RIA (RadioImmuno Assay)

L'antigène spécifique des anticorps que l'on veut détecter est préalablement marqué à l'iode 125. La préparation contenant l'anticorps est alors incubée avec l'antigène marqué. Les complexes Ag/Ac qui se forment en phase liquide sont alors précipités avec une solution de chlorure d'ammonium ou de polyéthylèneglycol. Le culot de précipitation est ensuite lavé avec une solution saline et la présence de l'anticorps à doser est déterminée en mesurant la radioactivité présente dans le précipité et en la comparant avec une gamme étalon réalisée soit avec un sérum titré soit avec une préparation purifiée d'anticorps de concentration connue. Cette technique bien que relativement coûteuse et délicate car utilisant des produits radioactifs, présente l'avantage d'une grande sensibilité. En biologie clinique, cette méthode est encore employée pour détecter la présence d'anticorps anti-ADN natif chez les patients atteints de LED (test de Farr) ou pour la détection des anticorps anti-GAD chez les diabétiques.

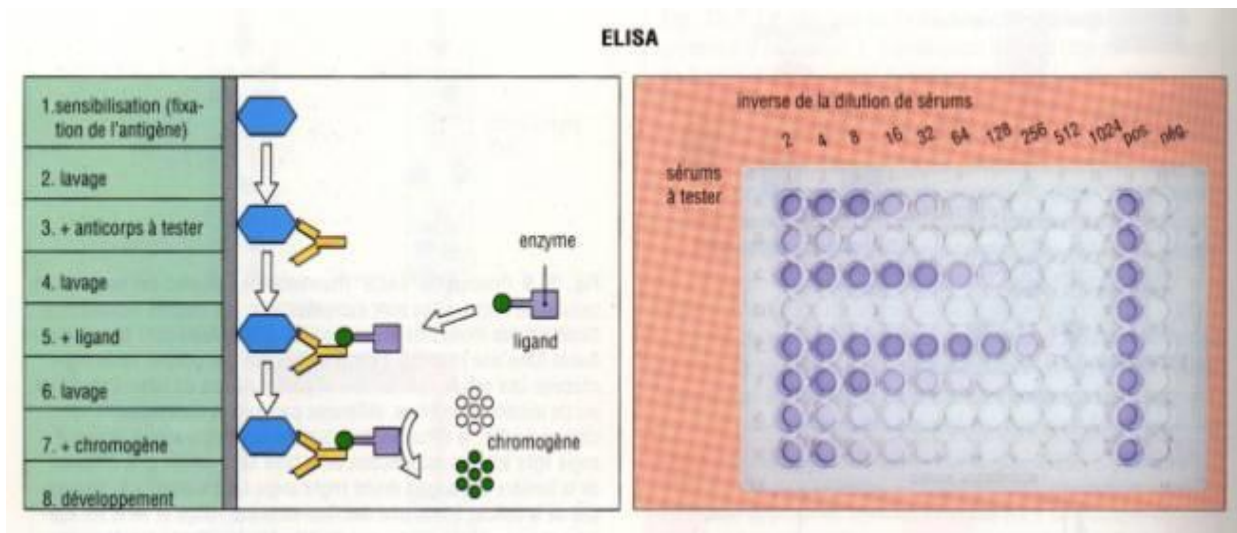
Figure 2 : Technique de RIA



2 – 2 – l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

La technique ELISA, plus simple et moins coûteuse a presque totalement remplacé le RIA. La révélation du test n'utilise pas, comme dans le RIA de radioéléments mais est liée au clivage par une enzyme, d'un substrat incolore en un produit coloré. Pour détecter la présence dans un sérum d'un anticorps spécifique, l'antigène spécifique de l'anticorps à doser est déposé dans un puits à fond plat en plastique. L'antigène est dilué dans un tampon bicarbonate à pH 9,6 ce qui favorise les interactions électrostatiques entre l'antigène et le plastique de la plaque et permet la fixation stable de l'antigène au fond du puits. Des dilutions limites du sérum contenant l'anticorps à doser sont alors déposées dans les puits. Après un temps de contact suffisant, les puits sont lavés avec une solution saline de sorte que seuls les anticorps spécifiques restent fixés sur l'antigène et donc au plastique. On révèle la présence de l'anticorps fixé au fond de la plaque en déposant ensuite dans le puit un anticorps anti-Immunoglobuline marquée avec une enzyme qui peut être la phosphatase alcaline ou la peroxydase. Après lavage, il ne reste plus qu'à révéler la présence des anticorps spécifiques en ajoutant le substrat de l'enzyme ayant servi à marquer les anticorps anti-Immunoglobuline et à lire la réaction colorée.

Figure 3 : Principes de l'ELISA



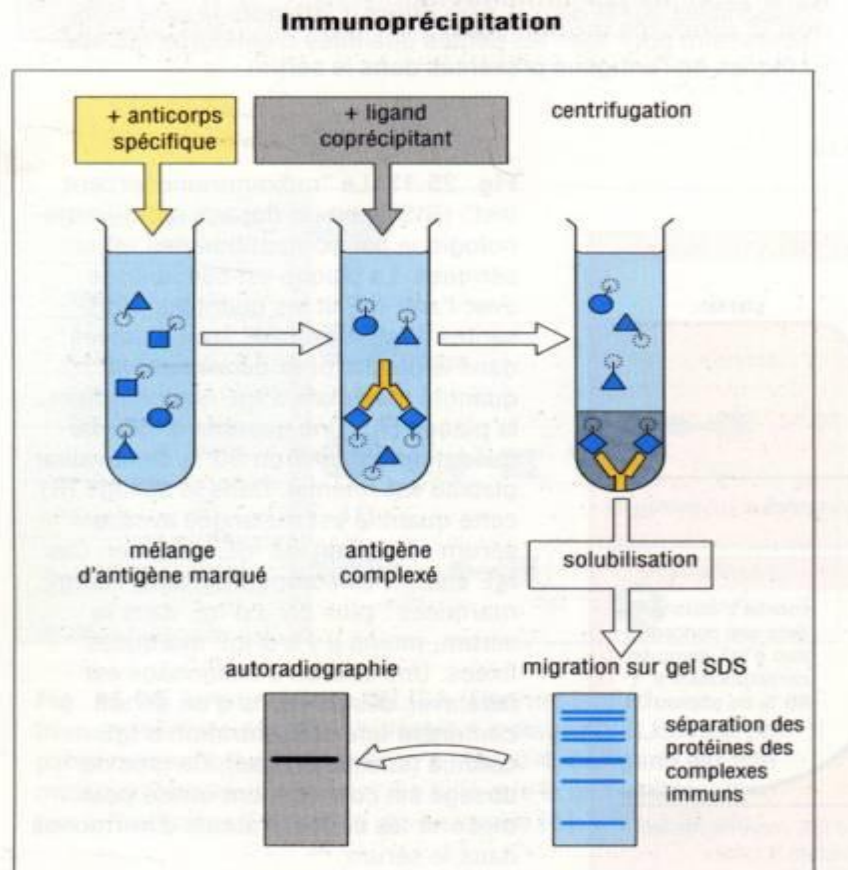
3- Réactions de précipitation

3-1 –Immuno-précipitation

Dans cette technique, les cellules contenant l'antigène à analyser sont incubées en présence d'acide aminé marqué. Ainsi, l'ensemble des protéines synthétisées par la cellule seront radioactives. Les cellules ainsi marquées sont lysées à l'aide d'un détergent. L'anticorps spécifique de l'antigène à analyser fixé sur des billes d'agarose est alors ajouté au lysat cellulaire. Le complexe Ag/Ac est alors précipité, le culot de précipitation lavé pour éliminer les Ag non fixés. L'antigène est alors élué de l'anticorps par un détergent ionique : le dodecylsulfate de sodium (SDS). Non seulement le SDS dissocie l'Ag de l'Ac mais il charge aussi négativement l'antigène. La préparation antigénique ainsi obtenue est alors déposée au sommet d'un gel de polyacrylamide pour y subir une électrophorèse (PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Après application d'un courant électrique, les protéines antigéniques à analyser migrent vers le pôle +. Le SDS chargeant de façon homogène l'ensemble des protéines, leur migration ne dépendra plus de leur charge mais uniquement de leur masse moléculaire. La position

des protéines sur le gel, direct reflet de leur masse moléculaire est révélée par autoradiographie.

Cette technique de SDS-PAGE peut être combinée à une isoélectrofocalisation dans une méthode appelée électrophorèse bidirectionnelle. Dans ce cas, les protéines immunoprécipitées sont éluées dans un tampon non ionique à base d'urée et déposées sur un gel d'IEF qui permet la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique. Après la migration, le gel est démoulé et placé au sommet d'un gel de polyacrylamide contenant du SDS. Au cours de cette seconde étape, les protéines se séparent en fonction de leur masse moléculaire. Cette méthode augmente considérablement la sensibilité de détection et le pouvoir de résolution du SDS-PAGE.



3 – 2 – Immunoempreinte ou Western blot

Une approche alternative pour éviter les problèmes liés à la manipulation de substances radioactives consiste à lyser les cellules directement dans un tampon riche en détergent. Le lysat cellulaire ou tissulaire ainsi obtenu est incubé avec du SDS et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Les protéines ainsi séparées en fonction de leur masse moléculaire sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps marqué spécifique. Après lavage pour éliminer la fixation d'anticorps non spécifique, la position des protéines est révélée à l'aide d'un Ac anti-Ig marqué avec un radioélément ou une enzyme. Cette méthode appelée Western blot a de nombreuses applications en biologie clinique. Elle permet notamment de détecter la présence dans le sérum des patients HIV+ d'anticorps spécifiques du virus et donc de contribuer au diagnostic de l'infection.

L'immuno-empreinte ("immunoblotting")

