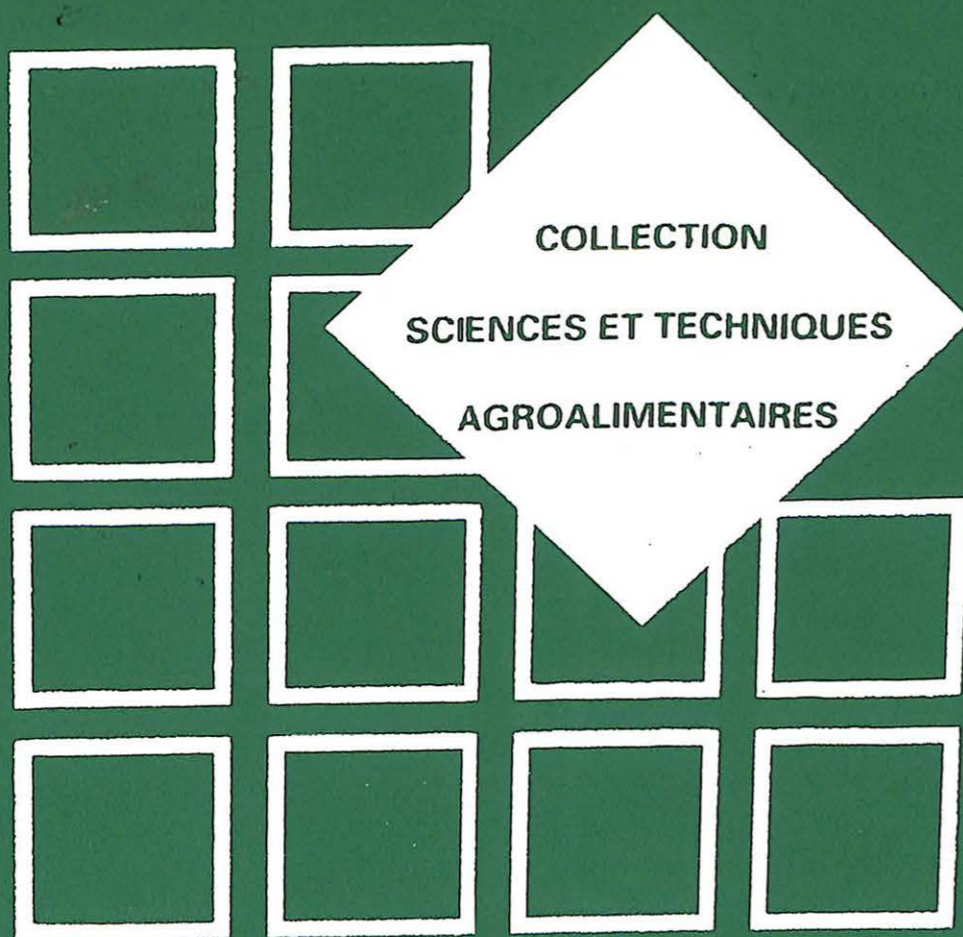


# GUIDE PRATIQUE D'ANALYSES DANS LES INDUSTRIES DES CÉRÉALES

**B. GODON, W. LOISEL**  
Coordonnateurs



*lavoisier*  
**TEC** /  
**DOC**

# 1

## ÉLECTROPHORÈSE

---

**J.-C. AUTRAN**  
**M.-H. MOREL**

---

*[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.]*

# 1

## Introduction

En solution ou en suspension dans l'eau, dans des solutions aqueuses ou dans certains autres liquides, des macromolécules (protéines, acides nucléiques), des particules, des grains d'émulsion, ou même des bactéries, tendent à se déplacer sous l'effet d'un champ électrique : c'est le phénomène d'électrophorèse, découvert en 1892 par Linder et Picton et développé en tant que méthode analytique et préparative dans les années 30 par Tiselius (Nobel 1949).

*L'importance du phénomène d'électrophorèse, outre son intérêt théorique propre, réside dans l'utilisation très large qu'on en fait, à des fins analytiques ou préparatives, plus particulièrement pour l'étude et le fractionnement des protéines et des acides nucléiques.*

L'électrophorèse constitue certainement la technique de fractionnement des macromolécules la plus communément utilisée par les biochimistes et biologistes d'aujourd'hui. Les raisons de cette popularité sont multiples : il s'agit d'une technique analytique de haute résolution (elle peut fournir des informations sur la taille, la conformation et la charge des molécules), mais qui peut être aussi préparative ; elle est relativement facile à apprendre et à mettre en œuvre ; son coût d'utilisation est généralement faible pour les laboratoires ; c'est une technique polyvalente et qui peut être utilisée en parallèle, ou en série, avec de nombreuses autres techniques biochimiques ou biologiques. On doit notamment à cette méthode la découverte, la caractérisation, la purification de nombreux constituants des tissus animaux et végétaux, l'étude des sérums pathologiques, de nouvelles classifications taxonomiques et, plus récemment, le contrôle de la composition et de la qualité de nombreux produits alimentaires.

*L'électrophorèse suppose tout d'abord que les molécules ou les particules étudiées possèdent une charge électrique.* Dans le cas des macromolécules ionisables, l'origine de la charge électrique est évidente, mais, d'une façon plus générale, la surface d'un solide peut aussi acquérir une charge électrique au contact de certains liquides qui favorisent l'ionisation. Ainsi, la surface de la silice ou du verre, au contact de l'eau, se charge négativement en perdant des ions  $H^+$  (silice) ou  $Na^+$  (verre). Même des corps qui ne sont pas capables de perdre des ions peuvent néanmoins acquérir au contact de ces liquides une charge superficielle qu'on attribue à l'adsorption préférentielle d'ions d'une nature donnée ou d'un signe donné présents dans le liquide. De plus, de telles substances peuvent acquérir une charge électrique par fixation de ligands ionisés (par exemple, le dodécylsulfate de sodium ou SDS).

On suppose que la particule possède des charges électriques localisées à sa zone superficielle. Naturellement, d'après le principe d'électroneutralité, cela impose la présence autour de la particule d'une couche d'ions de signes opposés dont la charge électrique compense exactement celle de la particule. Il faudrait en effet fournir un travail considérable pour accumuler dans un volume

donné ou sur une surface donnée, des charges électriques de même signe, non compensées par des charges de signe opposé très voisines. On admet donc que la charge électrique totale d'un petit élément de surface électriquement chargé et d'une fine tranche de solution contiguë contenant un excès d'ions de signe opposé doit être pratiquement nulle.

Les théories classiques de l'électrophorèse reposent sur la structure de la couche double électrique et dérivent des *théories de l'électroendosmose*. L'électroendosmose correspond au déplacement d'un liquide le long d'une paroi solide sous l'effet d'un champ électrique parallèle à celle-ci. Ce déplacement provient du fait que, lorsqu'une paroi solide acquiert des charges, par exemple négatives au contact de l'eau, l'eau se trouve en retour positivement chargée par rapport à la paroi et, comme cette dernière est immobile, c'est l'eau qui va migrer en sens inverse lorsqu'un champ électrique est appliqué.

*Dans l'électrophorèse proprement dite*, une particule, solide ou liquide, peut posséder une charge électrique propre, ou bien acquérir une charge superficielle au contact d'une solution aqueuse, tout comme la paroi solide dans l'électroendosmose et, pour des raisons analogues, elle s'entoure d'un nuage diffus d'ions compensateurs.

Mais, contrairement au cas d'une paroi solide, la particule n'est pas immobilisée : *dans un champ électrique elle est entraînée vers l'électrode de signe opposé à celui de sa charge superficielle globale*. Elle est toutefois ralentie dans ses déplacements par les ions compensateurs mobiles qui viennent s'accumuler devant la particule en mouvement et se déplacent en entraînant le liquide, le long de la surface de la particule et en sens inverse du déplacement de celle-ci, avant de se disperser derrière elle.

L'électrophorèse diffère de l'électrolyse bien que, dans les deux cas, le transfert des charges soit assuré par un déplacement d'ions. Mais, dans le cas de l'électrophorèse, l'un des ions est un macro-ion nettement plus important que l'ion de signe contraire et surtout, *dans l'électrophorèse, on étudie la séparation des particules chargées par différence de vitesse de transport*, alors que, dans l'électrolyse, on s'intéresse avant tout aux produits recueillis aux électrodes par décharge des ions.

Il existe cinq modes principaux de techniques électrophorétiques : (1) *l'électrophorèse en milieu liquide* (dite à « frontières mobiles »), aujourd'hui pratiquement abandonnée, (2) *l'électrophorèse de zones ou électrophorèse sur support* (la plus couramment utilisée actuellement), (3) *l'électrofocalisation*, (4) *l'isotachophorèse* et (5) *l'électrophorèse à champ pulsé*, chacun de ces modes présentant naturellement de nombreuses variantes.

Cependant, quel que soit le mode utilisé, une séparation électrophorétique repose sur le principe de migration d'ions ou de molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Par exemple, à la suite d'une électrophorèse sur support, des ions ou des molécules possédant des vitesses de migration différentes vont pouvoir se séparer et être détectés en des emplacements différents. Un mélange protéique naturel, comme le sérum sanguin, se sépare généralement en un grand nombre de polypeptides visualisés sous la forme d'un diagramme de « bandes », ou une carte de « spots », caractéristiques de l'échantillon analysé.

Dans ce chapitre, nous ne traiterons cependant pas en détail de la théorie complexe de chacun de ces modes d'électrophorèse et nous renvoyons le lecteur à des ouvrages où ces aspects théoriques (conductivité des électrolytes, cinétique ionique, fonction de régulation de Kohlrausch, théories de l'effet de concentration et de l'isotachophorèse, etc.) ont été récemment développés (Autran, 1991, 1996 ; Charlionet et Rivat, 1990 ; Chrambach *et al.*, 1992, 1993).

Nous nous limiterons ainsi à :

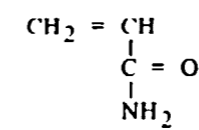
- 1) l'exposé d'un cas concret : celui de l'électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide utilisée pour l'identification des variétés de blés et autres céréales (§ 2) ;
- 2) la présentation des principales techniques électrophorétiques actuelles (§ 3) ;
- 3) quelques exemples d'application des techniques électrophorétiques dans le domaine agroalimentaire (§ 4).

## 2 Un exemple concret : l'électrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide

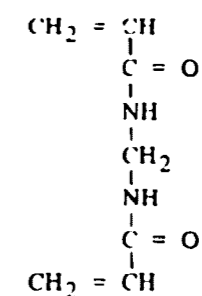
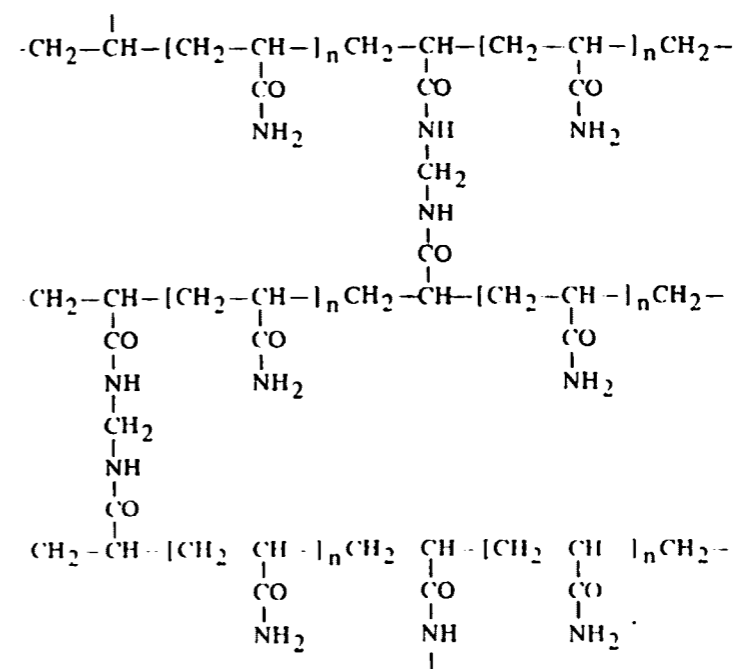
### 2.1 FORMATION ET STRUCTURE DU GEL

Le gel de polyacrylamide (*figure 1*) est le produit de polymérisation du monomère *acrylamide*,  $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$  avec inclusion d'un agent bifonctionnel réticulant les chaînes polymériques entre elles. Ce dernier est habituellement le comonomère *N, N'*-méthylène-*bis*-acrylamide  $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$ . Il peut être remplacé par le *N, N'*-bisacrylylcystamine (BAC), analogue comprenant un pont disulfure, ou encore par le diallyltartradiamide (DATD). Le réseau tridimensionnel du gel est formé par un mécanisme de polymérisation de type vinylique, conduisant à la formation de nombreuses chaînes enroulées au hasard possédant un état d'entropie maximum, c'est-à-dire de forme la plus irrégulière possible. Cette structure détermine donc un ensemble de pores ou de micro canaux dans lesquels les molécules protéiques vont pouvoir se déplacer sous l'effet du champ électrique et y subir un effet plus ou moins marqué de *tamissage moléculaire*.

La concentration en monomère, en comonomère, ainsi que le degré de polymérisation (longueur de la chaîne) et de pontage (quantité de *N, N'*-méthylène-*bis*-acrylamide incorporé), déterminent la densité, la viscosité, l'élasticité et la résistance mécanique du gel.



Acrylamide

*N, N'*-méthylène-*bis*-acrylamide

Gel de polyacrylamide

■ **Figure 1** Structure chimique de l'acrylamide, du *NN'*-méthylène-*bis*-acrylamide et du gel de polyacrylamide

La densité ou la concentration du gel peut être définie par les deux indices T et C. Le premier représente la concentration totale en acrylamide + *bis*-acrylamide, le deuxième, la concentration en *bis*-acrylamide par rapport au total acrylamide + *bis*-acrylamide :

$$T = \frac{a+b}{V} \cdot 100 (\%)$$

$$C = \frac{b}{a+b} \cdot 100 (\%)$$

avec : a = acrylamide (g) ; b = *N, N'*-méthylène-*bis*-acrylamide (g) ; V = volume de tampon (ml).

La concentration en acrylamide influence directement la taille des pores du gel. Ainsi, des gels ayant moins de 2,5 % d'acrylamide, qui sont nécessaires pour le

tamissage de protéines de poids moléculaire de l'ordre du million, sont semi liquides. A l'autre extrême, des gels à 30 % d'acrylamide peuvent exercer un effet de tamissage sur des polypeptides de poids moléculaire de l'ordre de seulement 2000.

Le rapport acrylamide/*bis*-acrylamide est très critique : s'il est inférieur à 10, les gels deviennent cassants, rigides et opaques ; s'il est inférieur à 100, les gels sont pâteux et ont une très faible résistance mécanique. Des gels normaux, élastiques et transparents, sont obtenus avec des rapports de l'ordre de 30, à condition que la concentration en acrylamide soit supérieure à 3 %. Une augmentation de la teneur en acrylamide doit normalement être accompagnée d'une diminution de la concentration en *bis*-acrylamide, si l'on veut que les gels conservent leur élasticité. Les calculs de concentration optimales peuvent se faire au moyen des formules suivantes :

$$C = 6,5 - 0,3 T$$

ou encore :

$$B = 0,201 - 0,0112 T$$

où B est la concentration en *bis*-acrylamide.

L'acrylamide et le *bis*-acrylamide sont des *neurotoxiques*. Tout contact avec la peau et les muqueuses doit être évité lorsqu'on manipule ces produits à l'état de solutions ou de cristaux. Il ne faut jamais pipeter de solutions d'acrylamide. Par contre, après polymérisation, le gel de polyacrylamide n'est pratiquement plus toxique, mais il convient d'être prudent car il peut encore contenir du monomère non polymérisé.

## 2.2 MÉCANISME DE LA POLYMÉRISATION

Les principaux systèmes de « catalyseurs » fournissant des radicaux libres qui permettent la polymérisation des gels de polyacrylamide sont les suivants :

- Persulfate d'ammonium - *N, N, N', N'*-tétra-méthyl-éthylène-diamine (TEMED)
- Persulfate d'ammonium - 3-diméthyl-amino-propio-nitrile (DAPN)
- Eau oxygénée - sulfate ferreux - acide ascorbique
- Riboflavine - TEMED

Les trois premiers sont des systèmes chimiques, le dernier un système photo-chimique.

L'amorçage de la *polymérisation chimique* nécessite la présence d'un système donneur-accepteur, de type oxydo-réducteur, constitué d'un *promoteur* ou initiateur (tel que le persulfate), et d'un *accélérateur* de la réaction qui doit être une base telle que le TEMED. Ce système forme des radicaux oxygénés libres hautement réactifs qui se fixent sur les doubles liaisons carbone-carbone du monomère acrylamide pour engendrer de nouveaux radicaux libres, aptes à s'ajouter à leur tour à une autre molécule de monomère acrylamide ou de *bis*-acrylamide formant ainsi le réseau à trois dimensions, caractéristique du gel de polyacrylamide.

Comme les bases TEMED ou DMAPN sont nécessaires, la polymérisation peut être retardée ou empêchée aux pH acides. L'oxygène moléculaire, les réducteurs, le froid, ou des impuretés peuvent également retarder ou empêcher la réaction de polymérisation. Comme des polymérisations retardées donnent rarement des gels reproductibles, il est conseillé de sélectionner des conditions permettant une prise du gel en moins de 30 minutes.

Même de très faibles concentrations d'amines aliphatiques tertiaires, telles que le TEMED, accélèrent la polymérisation, tandis que le DMAPN est moins actif. Le persulfate d'ammonium a de multiples avantages : pouvoir être obtenu très pur, être stable à 0 °C et avoir une faible tendance à produire de l'oxygène moléculaire.

Dans la polymérisation photochimique, l'initiateur est la riboflavine. En présence de traces d'oxygène et de TEMED, ainsi que d'une source de lumière ultraviolette, elle subit une photodécomposition et une réduction, sous l'action des ions H<sup>+</sup> apportés par le TEMED, pour former le leuco-dérivé incolore ou leucoflavine, lequel, aussitôt réoxydé en présence d'oxygène, permet la production de radicaux libres d'acrylamide qui réagissent entre eux.

On ne peut pas exclure la formation d'artefacts suite à l'interaction entre les échantillons protéiques et des excès de persulfate ou de riboflavine.

Il est enfin à noter que le terme de « catalyseurs », souvent employé à propos des promoteurs et des accélérateurs, n'est pas exact puisque ces substances sont ou détruites ou transformées au cours de la réaction de polymérisation.

## 2.3 EXEMPLES D'ÉQUIPEMENTS

Tous les types d'électrophorèses nécessitent un certain nombre d'équipements classiques : alimentation stabilisée de courant continu pouvant délivrer quelques centaines de volts sous quelques dizaines de milliampères, système de refroidissement pour évacuer les calories dues à l'effet Joule pendant le passage du courant, matériels d'extraction et de centrifugation des extraits protéiques ou des acides nucléiques, micro seringues pour le dépôt des échantillons, ... sur lesquels nous n'insisterons pas.

Chaque appareillage d'électrophorèse possède un certain nombre d'avantages et d'inconvénients et se trouve plus ou moins adapté, notamment par sa géométrie, pour résoudre tel ou tel problème de fractionnement. Il existe par exemple des appareillages pour gels en tubes verticaux, en plaques horizontales ou en plaques verticales. Mis à part le cas des séparations de première dimension lors d'électrophorèses bidimensionnelles, pour lesquelles des tubes de faible diamètre sont parfois préférés, on utilise généralement aujourd'hui les gels en plaques qui ont, par rapport aux tubes, les avantages suivants :

- meilleure évacuation des calories dans les plaques (surtout dans les plaques ultra-minces actuelles) et réduction de la distorsion des bandes protéiques causée par la chaleur ;

- plus grande facilité d'analyse densitométrique et de photographie ; comparaison beaucoup plus précise des mobilités des bandes entre différents échantillons ;
- préparation plus reproductible de gels permettant l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons dans les mêmes conditions ;

Les gels en plaques ont généralement des dimensions de l'ordre de 12 × 14 cm, parfois seulement de 7 × 7 cm (ou, plus récemment, de 3 × 3 cm), parfois au contraire de 20 × 20 cm pour certaines analyses bidimensionnelles, ou de 20 × 80 cm dans le cas des gels de séquences d'acides nucléiques. Leur épaisseur va généralement de 0,75 mm à 3 mm, mais des gels ultra minces (400 µm ou même 200 µm) sont aujourd'hui de plus en plus utilisés. Le nombre d'échantillons pouvant être analysés simultanément peut aller de 10 à 48, ou même 96. Selon la géométrie du gel et son épaisseur, selon aussi le type (charge et taille) des protéines, des séparations valables peuvent être obtenues soit à faible voltage pendant 4, 6, 18 ou 24 heures, soit à haut voltage (1 000 à 3 000 volts) pendant seulement 40 ou même 20 minutes. Dans ces derniers cas, un système de refroidissement efficace par circulation d'eau thermostatée est absolument indispensable.

L'électrophorèse capillaire requiert, quant à elle, des équipements très spécifiques : alimentations délivrant 25 000 ou 30 000 volts, tubes capillaires de diamètre 50 µm, voire de seulement 20 µm.

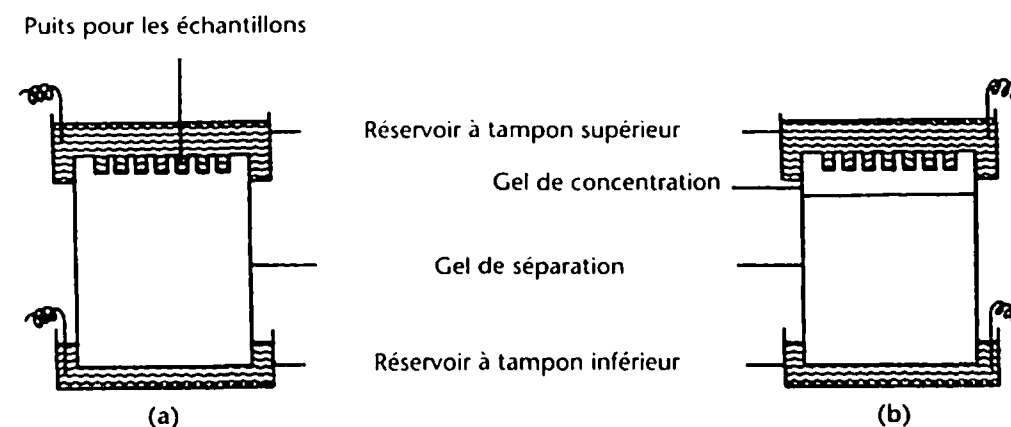
## 2.4 CHOIX DES TAMPONS

### 2.4.1 SYSTÈMES CONTINUS ET SYSTÈMES DISCONTINUS

Les systèmes d'électrophorèse de zone dans lesquels les mêmes ions tampons sont présents depuis le gel jusqu'aux réservoirs à électrodes et à la solution d'échantillons sont appelés *systèmes continus*. Dans ces systèmes, l'échantillon protéique est appliqué directement sur le gel dans lequel la séparation doit avoir lieu. Ce « gel de séparation » doit avoir des pores suffisamment petits pour permettre une séparation par tamisage moléculaire des composants de l'échantillon.

Au contraire, les *systèmes à tampons discontinus (ou polyphasiques)* utilisent des tampons différents entre le gel et les réservoirs à électrodes (figure 2). La plupart des systèmes discontinus présentent des discontinuités à la fois en concentration et en pH. Les échantillons sont alors déposés au dessus d'un gel à larges pores (ou « gel de concentration », ou « stacking gel ») qui a été polymérisé au dessus du gel de séparation proprement dit.

Le principal avantage des systèmes discontinus est qu'on peut travailler avec des volumes relativement élevés de protéines diluées avec une résolution demeurant élevée. Cela vient de l'effet de concentration provoqué par la relation inverse entre conductivité  $\gamma$  (ou mobilité  $\mu$ ) et champ électrique  $E$ . Dans une zone où le tampon a une conductivité peu élevée, les ions sont peu mobiles, tandis que dans un tampon très conducteur, les ions sont très



■ Figure 2 Schéma de systèmes à plaques verticales à tampons continus (a) et discontinus (b)

mobiles. Mais comme les deux groupes d'ions sont forcés d'avancer à la même vitesse  $v$  de part et d'autre de leur frontière, c'est le champ électrique qui prend des valeurs élevées en arrière de la frontière et faibles en avant pour satisfaire à la relation  $v = \mu \cdot E$ . Si une protéine a une mobilité intermédiaire entre celles des deux zones, elle se concentrera rapidement en une couche extrêmement fine avant de pénétrer dans le gel de séparation. D'où une résolution accrue par rapport à un dépôt effectué sans gel de concentration. Les conditions de pH et de force ionique des tampons sont naturellement calculées pour que les mobilités de leurs ions encadrent celles des protéines étudiées et créent cet effet de concentration.

### 2.4.2 CHOIX DU pH

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide peut être réalisée dans une zone de pH allant théoriquement de 2,5 à 11, mais en pratique de 3 à 10 seulement en raison de phénomènes d'hydrolyse tels que la désamidation, pouvant intervenir aux pH extrêmes.

Dans l'électrophorèse en présence de SDS (cf. § 3.2), les complexes protéines-SDS sont chargés négativement sur une large gamme de pH, de sorte que la valeur exacte du pH (qui intervient surtout pour favoriser le phénomène de concentration) n'est généralement pas critique. En revanche, la valeur du pH est très critique dans les systèmes continus en milieu non dissociant car les protéines y sont séparées sur la base de leur taille et de leur charge nette. Or, un changement de pH entraîne généralement un changement de la charge nette des protéines et donc du type de séparation finalement obtenu.

Lors du choix du pH d'un système continu, la première condition doit être de considérer la zone de pH dans laquelle il y a stabilité des protéines considérées. Cette zone peut être très étroite si l'on doit préserver une activité biologique (cas de l'électrophorèse avec détection d'activités enzymatiques sur le gel (cf. § 3.10), ou des électrophorèses préparatives destinées à purifier des

enzymes ou des protéines sous leur forme native). La zone de pH peut être plus large si la détection des protéines se fait simplement par coloration.

Au sein de cette zone de pH, le choix exact de la valeur du pH à adopter résulte d'un compromis entre deux types opposés de considérations :

- Plus le pH du tampon est éloigné du  $pH_i$  des protéines, plus les charges nettes de celles-ci sont élevées et plus le temps de migration est court (avec corrélativement moins d'étalement des bandes par diffusion).
- D'autre part, plus le pH du tampon est proche des  $pH_i$ , plus grandes sont les différences de charge des protéines entre elles et plus grandes sont les chances de les séparer. Beaucoup de protéines ayant leur  $pH_i$  dans la zone de pH 4-7, les compromis les plus courants sont d'utiliser des tampons dans les zones de pH 8,0-9,5, pour les protéines les plus acides, ou 3,0-3,5 pour les plus basiques. Il est recommandé d'effectuer préalablement une étude systématique en faisant varier très progressivement le pH vers la zone des  $pH_i$  jusqu'à trouver une résolution et une séparation optimales des constituants du mélange protéique (cf. également § 3.8 : courbes de titration des protéines).

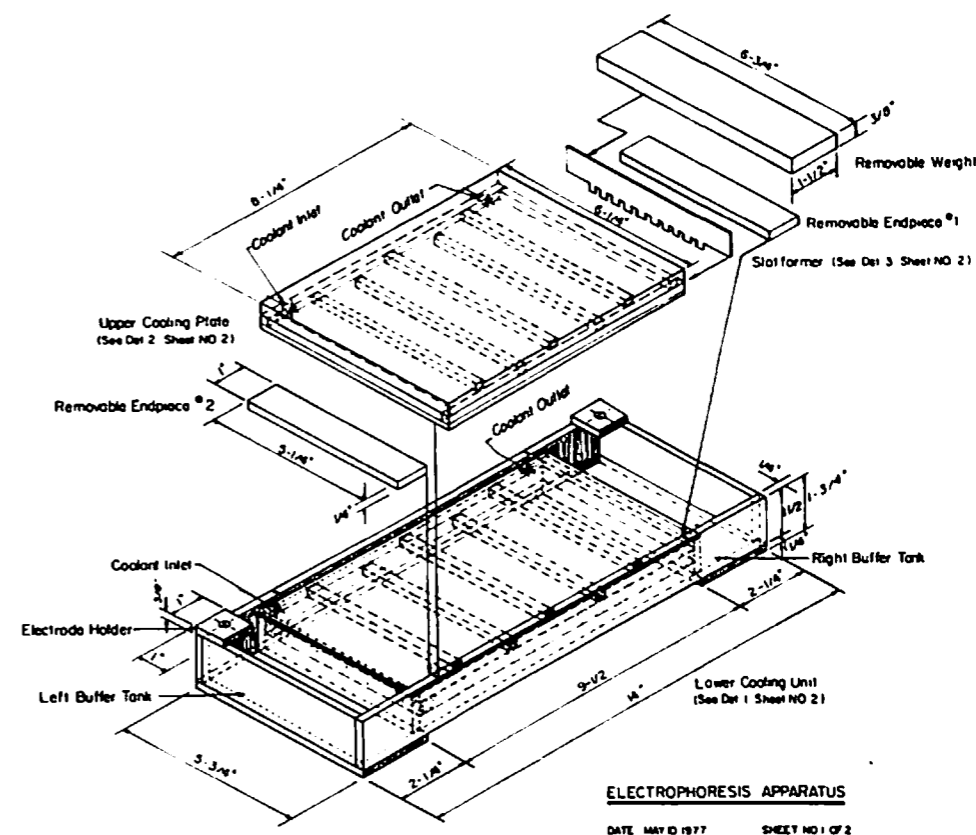
## 2.5 LES DIFFÉRENTES PHASES D'UNE MANIPULATION D'ÉLECTROPHORÈSE

L'exemple simple et classique retenu ici est celui d'une électrophorèse continue en gel de polyacrylamide, tampon acide (lactate d'aluminium - acide lactique, pH 3,1), appliquée à la fraction gliadine du grain de blé et utilisée pour l'identification variétale.

L'appareillage (figure 3) décrit à l'origine par Bushuk et Zillman (1978) permet à la fois le moulage de gels de polyacrylamide de dimensions 200 × 135 × 6 mm et la migration électrophorétique. Ce système ancien illustre les phases de préparation du gel, de polymérisation, de migration, ainsi que les questions de contact électrolyte/gel, de manière beaucoup plus concrète pour les débutants que les appareillages verticaux intégrés et miniaturisés actuels.

### 2.5.1 EXTRACTION DES PROTÉINES

Écraser chaque grain de blé (marteau ou pince) et le mettre en suspension dans une quantité de tampon lactate d'aluminium - acide lactique (coloré à la pyronine et contenant 30 % de saccharose) égale à 6 fois sa masse : par exemple, 50 mg / 300 µl. Laisser reposer 2 heures et centrifuger 10 min à 3 000 g. Le surnageant obtenu (qui contient la fraction *gliadine* du grain) sera utilisé directement pour le dépôt des échantillons dans le gel.



■ Figure 3 Schéma d'appareillage pour gel de polyacrylamide à plaque horizontale utilisé pour la séparation des gliadines du blé (D'après Bushuk et Zillman, 1978)

### 2.5.2 PRÉPARATION DU GEL

Préparer le moule destiné à couler le gel en assemblant les différentes pièces de Plexiglas et le couvercle réfrigérant. Préparer le gel en mélangeant les produits suivants :

- Acrylamide	12,0 g
- Bis-acrylamide	0,6 g
- Acide ascorbique	0,2 g
- Sulfate ferreux, 7H <sub>2</sub> O	0,005 g
- Lactate d'aluminium	5,0 g

Dissoudre dans de l'eau distillée ; ajuster à pH 3,1 avec de l'acide lactique et terminer en amenant à 200 ml avec de l'eau.

Au moment de couler le gel, ajouter :

- Eau oxygénée à 3 %	1,0 ml
----------------------	--------

Homogénéiser très rapidement et remplir le moule avec cette solution ; positionner le peigne « slot-former » (dont le rôle est d'imprimer des puits lors de la polymérisation) à 3 cm de l'une des extrémités du gel, ainsi que le bloc de

Plexiglas nécessaire pour refermer le moule, en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Ne plus toucher à l'ensemble jusqu'à polymérisation complète (5 minutes).

Retirer le « slot-former » et les différentes pièces de Plexiglas du moule ; remplir chacun des bacs à électrodes avec 250 ml de tampon lactate d'aluminium de manière à assurer un contact direct entre les extrémités du gel et l'électrolyte.

### 2.5.3 DÉPÔT DES ÉCHANTILLONS

Au moyen d'une micro pipette ou d'une seringue, prélever 10 µl de chacun des extraits protéiques et les déposer dans les différents puits imprimés par le « slot-former ». L'opération est accomplie plus aisément si les puits sont préalablement remplis de tampon car l'extrait, de plus grande densité grâce au saccharose, se dépose alors uniformément au fond des puits, déplaçant le tampon.

Cette phase doit être évidemment accomplie avec le plus grand soin car elle conditionne, pour une part, la qualité des diagrammes. Il faut veiller notamment à ne pas répandre d'échantillon à la surface du gel et à ne pas contaminer les puits voisins. La présence du colorant pyronine dans l'extrait facilite cette opération.

### 2.5.4 ELECTROPHORÈSE PROPREMENT DITE

Les dépôts ayant été effectués, connecter les tubes de circulation d'eau du bain-marie thermostaté (20 °C) à l'appareil d'électrophorèse. Connecter ensuite les cordons électriques (borne + du côté où les dépôts ont été effectués — car on travaille ici à pH acide et que les protéines y sont chargées positivement) et régler le voltage à 400 volts. La migration est alors réalisée pendant 5 heures à voltage constant (l'intensité pouvant varier légèrement entre 70 et 75 mA).

### 2.5.5 COLORATION

Démouler le gel et le transférer dans un bac plastique. Immerger le gel dans la solution de colorant préparée de la façon suivante :

- Bleu de Coomassie R250      500 mg
- Éthanol absolu                50 ml

Dissoudre et filtrer.

Rajouter :

- Acide trichloracétique à 12 %    350 ml

Laisser reposer. Les bandes protéiques apparaissent au bout de une à deux heures. Les diagrammes ne sont cependant photographiables qu'après au minimum une nuit. Le gel peut être ensuite conservé dans l'acide trichloracétique à 12 %.

### 2.5.6 EXEMPLES DE PROBLÈMES POUVANT SURVENIR

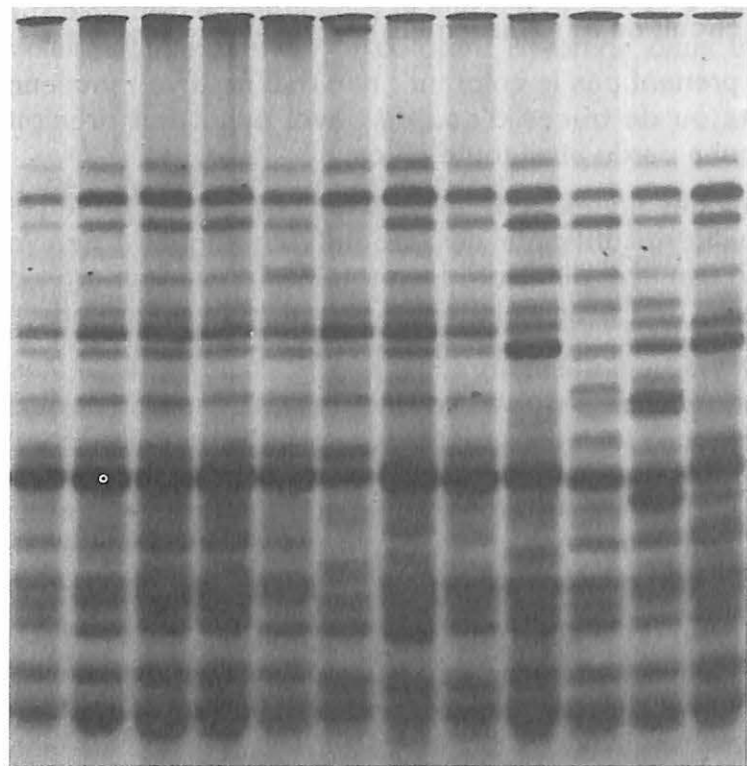
- Fuites lors du coulage du gel : revoir l'étanchéité des pièces de Plexiglas, utiliser éventuellement de la graisse.
- Polymérisation trop rapide : erreur dans la composition du gel, notamment dans les doses de « catalyseurs » ; température du laboratoire trop élevée.
- Pas de polymérisation : erreur dans la composition du gel ; oubli d'un ingrédient ; température trop basse.
- Impossibilité d'ajuster le voltage ou l'intensité aux valeurs recommandées : erreur dans la composition du gel ou du tampon, notamment erreur de pH.
- Gel de consistance anormale, difficile à manipuler : erreur dans la composition du gel ; produits chimiques de pureté insuffisante.
- Front des bandes irrégulier ou sinueux : cuve mal construite, d'épaisseur irrégulière ; électrodes de platine non parallèles ; solution mal homogénéisée avant de couler ; présence d'impuretés dans la cuve ; température non homogène pendant la migration (débit d'eau insuffisant, coupure d'eau, poches d'air dans le circuit de refroidissement).
- Protéines ne prenant pas le colorant : bac mal nettoyé ; présence d'impuretés de détergents ou de traces d'eau de Javel ayant fait précipiter le Bleu de Coomassie qui a perdu ainsi toute efficacité.
- Bandes protéiques floues : erreur dans la composition ou le pH du gel ou du tampon ; qualité insuffisante des produits chimiques ; eau insuffisamment désionisée ou distillée, diffusion des protéines dues à un arrêt prolongé (coupure de courant) ou à un délai entre l'arrêt de la migration et la coloration, extraits protéiques dénaturés ou conservés trop longtemps.
- Bandes déformées, en V, ou avec des traînées à partir de l'origine : dépôts mal effectués ou ayant débordé sur le gel ; échantillon contenant de trop grandes quantités de sels minéraux ; solvant utilisé extrayant partiellement de fractions protéiques agrégées. A noter que les traînées de surface peuvent être partiellement éliminées en découpant le gel dans son épaisseur et en ne colorant que la partie inférieure.
- Contamination d'un diagramme par les bandes d'un diagramme voisin : dépôt mal effectué, une partie de l'extrait ayant pénétré dans les fentes voisines ; oubli du saccharose dans l'extrait ; gel fissuré à l'endroit des dépôts.

## 3

## Les principales techniques électrophorétiques actuelles

### 3.1 ÉLECTROPHORÈSE DE ZONES CLASSIQUE : LES DIFFÉRENTS SUPPORTS UTILISÉS

En électrophorèse de zones, et à la différence de l'électrophorèse liquide, les protéines se déplacent dans un support hydraté solide (ce qui limite la diffusion) et réticulé (effet de tamisage moléculaire). Le grand pouvoir de résolution de cette technique est précisément dû à ce que les protéines sont séparées en fonction de leurs deux caractéristiques physicochimiques les plus importantes : charge électrique nette et encombrement moléculaire.



■ **Figure 4** Exemple de séparation électrophorétique des gliadines du blé en gel d'amidon (tampon lactate d'aluminium, pH 3,2)

Depuis les débuts de l'électrophorèse, divers types de supports ont été utilisés : papier, acétate de cellulose, gel d'agar, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, gel de polyacrylamide-agarose, etc. Selon le type de protéine étudié et le type de problème à résoudre, on s'oriente vers le type de support que l'on juge le plus favorable après des essais souvent empiriques. Il est cependant souhaitable de bien considérer les facteurs importants suivants :

- pouvoir de séparation ;
- régularité de la séparation entre les différentes parties du gel ;
- résistance mécanique (plus grande fragilité des gels d'amidon) ;
- simplicité de préparation (gels de polyacrylamide) ;
- problèmes d'électroendosmose ;
- répétabilité de la structure (gels commercialisés, prêts à l'emploi) ;
- coût et pureté des produits commerciaux disponibles ;
- toxicité (acrylamide).

Les supports qui sont actuellement les plus utilisés pour l'étude des protéines sont les gels de polyacrylamide (PAGE) continus ou discontinus, c'est-à-dire avec gel de concentration et gel de séparation, les bandes d'acétate de cellulose, les gels d'agar (cf. immunoélectrophorèse § 3.15). L'électrophorèse en gel d'amidon est de moins en moins utilisée mais peut fournir une très bonne résolution avec certaines protéines ou enzymes (*figure 4*). Les gels d'agarose sont également utilisés pour l'électrophorèse des acides nucléiques (cf. § 3.13).

### 3.2 ÉLECTROPHORÈSE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE DODÉCYLSULFATE DE SODIUM (SDS-PAGE)

Le dodécylsulfate de sodium (SDS), de formule  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ , est le détergent ionique le plus utilisé en électrophorèse. Il a en fait deux fonctions :

- dissocier des protéines agrégées, peu solubles ou hydrophobes, par exemple les protéines de membranes ;
- permettre une séparation des protéines en fonction de leur géométrie, masse molaire et forme.

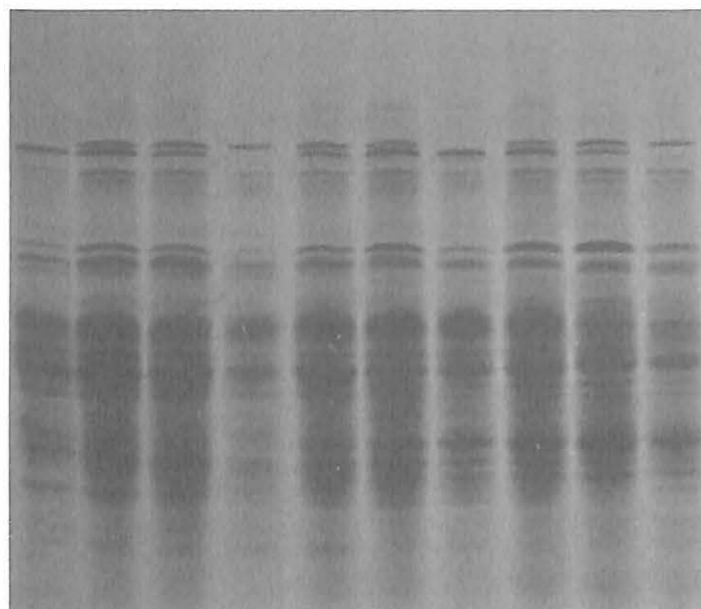
Lorsque du SDS est en excès dans le milieu, il se fixe sur les protéines selon un rapport de masse relativement constant (1,4 g de SDS par g de polypeptide) et les transforme en polyanions. Selon les inventeurs de la technique (Weber et Osborn, 1969), les charges natives (des chaînes latérales et des acides aminés terminaux) du polypeptide sont alors insignifiantes en comparaison du nuage de charges négatives apportées par le détergent fixé, de sorte que les complexes SDS-polypeptide ont - quel que soit le polypeptide - des densités de charges essentiellement identiques et (en principe) migrent dans les gels de polyacrylamide uniquement en fonction de leur taille moléculaire.

En réalité, cette dissociation-dénaturation n'intervient que si l'action du SDS est combinée à celle d'un réducteur des liaisons S-S ( $\beta$ -mercaptoéthanol, ou dithiothreitol), ceci à température élevée (1-2 heures à 40 °C, ou 1-2 min. à 100 °C). Dans ces conditions, le complexe SDS-polypeptide prend une forme allongée (semblable à une baguette), dont la longueur est proportionnelle à la masse moléculaire.



Comme la densité de charge est identique pour toutes les protéines, il s'ensuit que le rapport  $q/r$  est constant ( $q$  représentant la charge négative globale de la protéine et  $r$  son rayon) et donc la mobilité électrophorétique  $\mu = k q/r$  est la même pour chaque particule. La charge négative permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement par effet de tamis moléculaire.

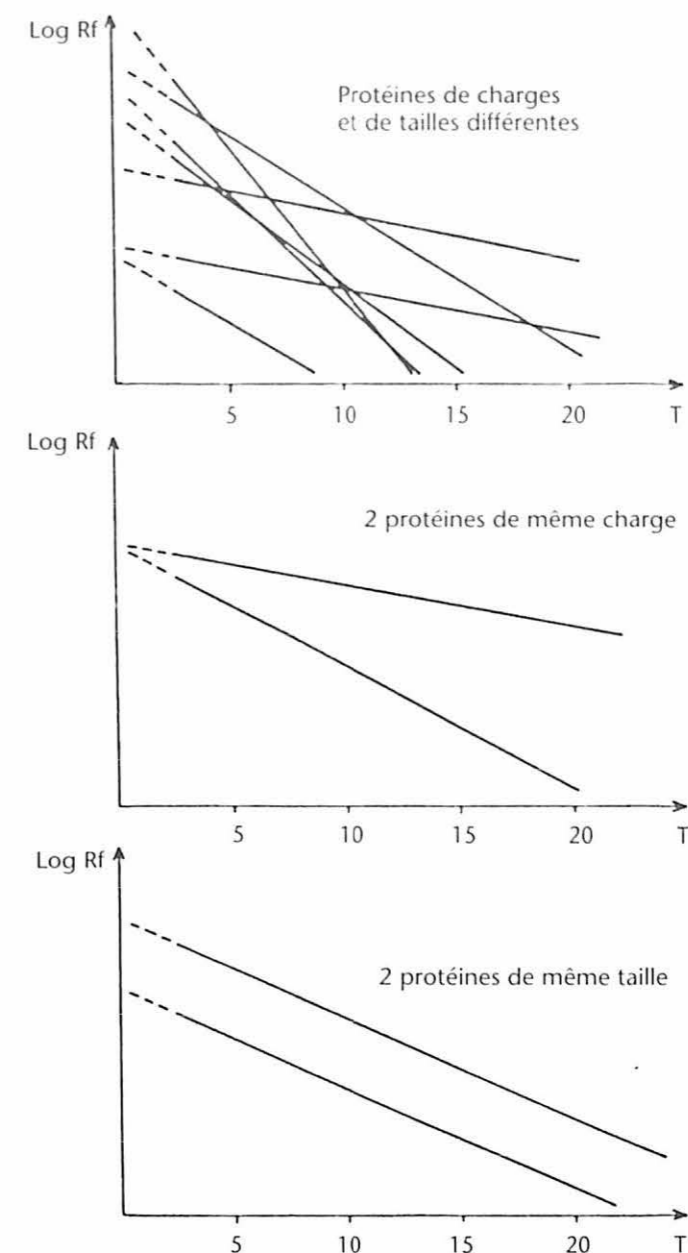
La simplicité et la rapidité de la technique, outre le fait qu'elle ne nécessite que des micro quantités, ont fait de la SDS-PAGE la méthode la plus largement utilisée pour déterminer la complexité et les masses moléculaires relatives des constituants polypeptidiques d'un échantillon protéique (figure 5). Il ne faut cependant pas oublier qu'il ne s'agit que d'une estimation car les écarts entre les masses moléculaires relatives trouvées par SDS-PAGE et par les autres méthodes de détermination sont parfois importants (exemple, la D-hordéine de l'orge : 100000 par SDS-PAGE, 50000 par équilibre de sédimentation) en raison de la forme de la protéine analysée, différente de celle des protéines témoins, de sa teneur en proline, ou de la répartition des résidus prolines dans sa séquence.



■ Figure 5 Exemple de séparation électrophorétique des gluténines du blé en gel de polyacrylamide-SDS (tampon Tris-HCl-glycine, pH 8,8)

### 3.3 ÉLECTROPHORÈSE EN GELS À GRADIENT DE CONCENTRATION - DIAGRAMMES DE FERGUSSON

La porosité d'un gel de polyacrylamide décroît lorsqu'on augmente la concentration ( $T$ ) d'acrylamide. En utilisant un formeur de gradient, on peut préparer des tubes ou des plaques de gels possédant une porosité progressivement décroissante. En faisant migrer un mélange de protéines dans un tel gel, dans le sens des porosités décroissantes, chacun des constituants protéiques va se



■ Figure 6 Diagrammes de Ferguson : migration des protéines dans des gels de polyacrylamide. Le logarithme de la mobilité relative des protéines est déterminé en fonction de la concentration du gel utilisé. La pente des droites obtenues est appelée le coefficient de retardement (D'après Charlionet et Rivat, 1990)

trouver stoppé à l'endroit où les pores sont devenus trop petits pour que la protéine continue d'avancer, d'où un pouvoir de résolution sensiblement amélioré, surtout pour les protéines de faible masse moléculaire qui ont une tendance à diffuser plus faiblement que dans les gels de concentration uniforme. De tels gels sont actuellement commercialisés prêts à l'emploi, notamment avec le nouveau système rapide et miniaturisé (« Phast System », Pharmacia).

Au plan théorique, Fergusson (1964), travaillant sur les électrophorèses en gel d'amidon, a mis en évidence une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité relative et la concentration T du gel :

$$\log R_f = \log \mu_0 - K_r \cdot T$$

et a appelé coefficient de retardement,  $K_r$ , la pente de la droite obtenue.  $K_r$  est une constante physique caractérisant, dans un système tampon et un type de gel déterminés, la protéine étudiée.  $K_r$  peut être relié à la masse moléculaire des protéines, alors que  $\mu_0$  est la mobilité de la protéine dans un milieu de concentration nulle ( $T = 0$ ), c'est-à-dire qu'elle dépend uniquement de la charge de la protéine.

Des diagrammes de Fergusson peuvent être construits d'après les mesures de mobilité réalisées au cours d'électrophorèses de zone en gel de polyacrylamide (ou d'autres supports gélifiés) de différentes concentrations T. La courbe des  $\log(R_f)$  en fonction de T est, pour chaque espèce protéique étudiée, une droite qui correspond à l'équation ci-dessus.

Pour un ensemble de protéines, on obtient ainsi une série de droites. Lorsque deux droites sont parallèles, les protéines correspondantes ont le même coefficient de retardement, donc la même taille. Lorsque deux droites sont concourantes vers une même valeur de  $\mu_0$ , les protéines correspondantes ont, dans les conditions de force ionique et de pH utilisées pour les électrophorèses, la même charge électrique effective (figure 6). Ces diagrammes peuvent être construits pour des protéines couvrant un large éventail de masses moléculaires (de 40 à 900 kDa). Pour chaque protéine, il est nécessaire de réaliser des électrophorèses comportant au minimum 3 (optimum 7) gels de concentration différents. Il s'agit donc d'une procédure relativement longue, mais qui peut donner des estimations très précises de taille moléculaire et de mobilité relative en milieu non restrictif.

Dans le cas de l'électrophorèse en présence de SDS, il est possible de construire des droites de calibration selon le modèle des diagrammes de Fergusson ( $\log_{10} Mr = a + b.R_f$ ) permettant une estimation des masses moléculaires des polypeptides en se référant à la distance de migration ( $R_f$ ) de polypeptides de masse moléculaire relative connue ( $Mr$ ) et analysés exactement dans les mêmes conditions.

### 3.4 ISOÉLECTROFOCALISATION ANALYTIQUE (IEF ET NEPHGE)

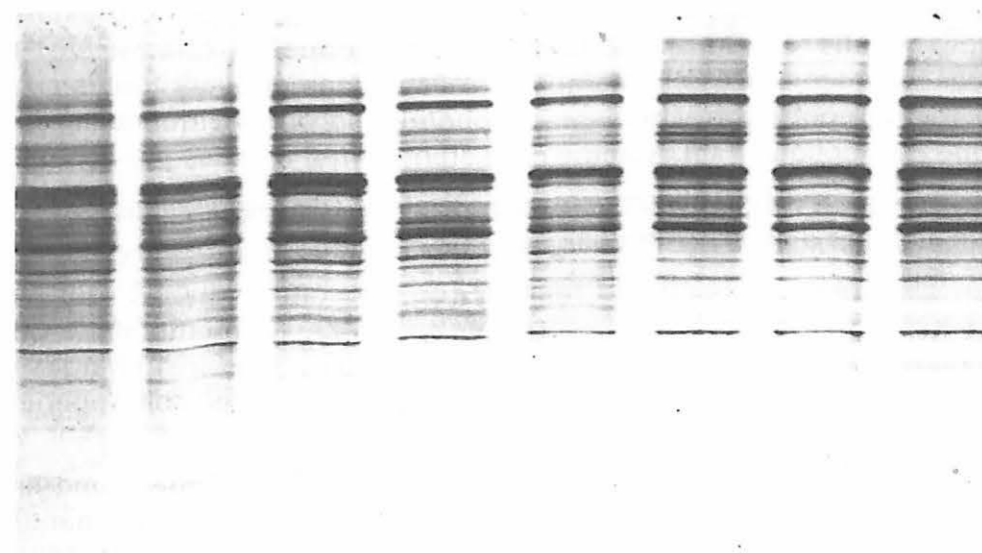
Développée surtout après 1968, cette technique a constitué un progrès majeur dans le domaine des méthodes de séparation fine des protéines. Sa réalisation implique des équipements semblables à ceux de l'électrophorèse classique : gel de polyacrylamide, migration en plaques horizontales ou en tubes verticaux, mais son principe est totalement différent. Contrairement à l'électrophorèse où la séparation a lieu à pH constant, l' (iso) électrofocalisation est réalisée dans un *gradient de pH* formé par migration (préalable ou simultanée)

de substances amphotères, disponibles dans le commerce pour toutes les gammes de pH possibles (2,5-4, 4-6, 5-7, 7-9, 3,5-10,...) et connue sous : des noms commerciaux tels qu'« Ampholines », « Pharmalytes », « Servalytes »,...

Ces ampholytes (« amphoteric electrolytes ») ou encore ampholytes porteurs (Carrier Ampholytes : CA) sont des substances de masse moléculaire de l'ordre de 300 à 700 Da (analogue à celle de peptides) et sont vraisemblablement synthétisées par réaction entre l'acide acrylique et des amines telles que hexaméthylène- ou pentaméthylène-diamine, d'où un mélange très complexe de plusieurs centaines de constituants présentant entre eux des variations très faibles de masse moléculaire et de  $pH_i$  et pouvant présenter une évolution quasi continue de mobilités électrophorétiques. Sous l'effet d'un champ électrique, ces ampholytes vont donc se ranger, entre l'anode et la cathode, en couches successives, dans l'ordre de leurs  $pH_i$  et constituer ainsi un gradient de pH.

Lorsqu'une protéine est introduite dans un tel gradient de pH, par exemple à un pH inférieur à son  $pH_i$ , elle acquiert, par définition, une charge nette positive. Elle va donc migrer vers la cathode, c'est-à-dire vers un environnement de pH de plus en plus élevés lesquels, en retour, influencent (font régresser) son ionisation. Ainsi, au cours de son déplacement, la protéine va voir sa charge nette diminuer, jusqu'à ce qu'elle atteigne son  $pH_i$ , point auquel elle présente une charge nette nulle. Elle s'arrête donc en ce point.

L'électrofocalisation est donc une technique qui permet la séparation des protéines en fonction de leur  $pH_i$ . En conséquence, le diagramme obtenu est *en principe* indépendant du point auquel l'échantillon a été déposé. La protéine doit en effet atteindre son  $pH_i$ , qu'elle ait été déposée du côté de l'anode ou du côté de la cathode, pourvu que le temps de l'expérience ait été suffisant. Également, lorsque toutes les protéines ont atteint leur  $pH_i$ , le diagramme ne doit plus *en principe* évoluer, de sorte que le résultat final est indépendant du temps de l'expérience.



■ Figure 7

Exemples de diagrammes d'électrofocalisation des gliadines du blé dans la zone de pH 5-9

Il faut bien insister sur le fait que si la protéine qui a atteint son  $pH_i$  migre (en raison des phénomènes de diffusion), par exemple vers la cathode, elle acquiert aussitôt une charge négative qui va entraîner sa migration, son rappel, dans le sens positif et donc son retour vers le  $pH_i$ . De même, en cas de diffusion vers l'anode. *L'effet de focalisation agit ainsi contre l'effet de diffusion*, de sorte que les fractions séparées se concentrent en des zones très fines (figure 7) avec une résolution qui ne peut normalement pas être atteinte en électrophorèse conventionnelle.

C'est donc en théorie une méthode d'équilibre qui, dans la mesure où le gradient de pH est bien établi et bien stabilisé, est auto-correctrice et en principe peu exigeante en termes de technique expérimentale. En pratique, ceci n'est pas toujours vrai, notamment en raison du phénomène de « plateau » qui tend à réduire la pente du gradient au cours du temps, et des problèmes de « dérive » du gradient, notamment dans la région des ampholytes basiques. Ces problèmes sont parfois surmontables avec les nouvelles générations d'ampholytes, notamment les « Immobilines », qui se fixent par des liaisons covalentes aux mailles du gel de polyacrylamide et permettent d'obtenir des gels à gradient de pH immobilisé (IPG), beaucoup plus stables que les gels à ampholytes porteurs (CA).

A signaler également que certaines protéines très basiques ont des difficultés à entrer dans les gels d'électrofocalisation ou s'y séparent très mal. Une variante consistant à déposer l'échantillon du côté acide du gradient de pH et à arrêter l'expérience avant que les protéines n'atteignent réellement leur zone de  $pH_i$  a été utilisée, notamment pour les séparations de première dimension dans les électrophorèses bidimensionnelles. Cette variante est connue sous le nom de NEPHGE (NonEquilibrium pH Gradient Electrophoresis) (cf § 3.7).

### 3.5 ISOTACHOPHORÈSE (ITP)

#### 3.5.1 PRINCIPE

Une isotachophorèse implique une migration dans un champ électrique d'espèces ioniques ayant des charges du même signe et ayant toutes en commun le même contre-ion. Une isotachophorèse se produit quand un champ électrique est appliqué à un système consistant en :

- 1) Une solution d'échantillon contenant les ions (de même signe) à séparer, solution qui doit être introduite entre :
- 2) Un électrolyte, l'électrolyte meneur (ou « locomotive », L), qui ne doit contenir qu'une seule espèce ionique : l'ion  $L^-$ , de même signe que les ions de l'échantillon à séparer, mais constitué d'ions très chargés et de petite taille, de manière à ce que sa mobilité nette  $\mu_L$  soit supérieure à celle de chacun des ions de l'échantillon ;
- 3) Un second électrolyte, l'électrolyte terminal T, qui contient une espèce ionique, l'ion terminal  $T^-$ , de même signe que les ions de l'échantillon à séparer, mais constitué d'ions peu chargés et de grande taille, de manière à ce que sa mobilité nette  $\mu_T$  soit inférieure à celle de chacun des ions de l'échantillon ;

- 4) Un contre-ion commun (sans quoi il se produirait une ITP inverse qui perturberait le gradient des ions  $L^-$  et  $T^-$ ).

La polarité du champ électrique doit être telle que l'ion meneur migre vers l'électrode qui est placée du même côté de l'échantillon que l'électrolyte meneur. Lorsque ces conditions sont réalisées et quand le système a atteint son équilibre dynamique (« steady state »), tous les ions se déplacent à la même vitesse (d'où le terme « isotachophorèse ») et sont séparés individuellement en zones se trouvant au contact immédiat l'une de l'autre et disposées dans l'ordre de leur mobilité nette  $\mu$ .

#### 3.5.2 THÉORIE

La concentration ionique au sein d'une zone séparée d'échantillon s'adaptera d'elle-même à la concentration de la zone précédente. Ceci est théoriquement décrit par la fonction dite de régulation de Kohlrausch, qui est la base de la théorie de l'isotachophorèse. En considérant, par exemple, deux substances chargées négativement,  $A^-$  et  $B^-$ , avec un contre-ion commun  $C^+$  le rapport entre les concentrations  $[A]$  et  $[B]$  des ions  $a^-$  et  $b^-$  est donné par la formule :

$$\frac{[A]}{[B]} = \frac{\mu_a \cdot z_b (\mu_b - \mu_c)}{\mu_b \cdot z_a (\mu_a - \mu_c)}$$

où  $\mu$  est la mobilité ionique ( $m^2 \cdot volt^{-1} \cdot sec^{-1}$ ),  $z$ , la charge électrique et  $a$ ,  $b$  et  $c$ , les indices qui se rapportent aux ions  $A^-$ ,  $B^-$  et  $C^+$  respectivement. L'équation de Kohlrausch détermine ainsi les conditions à une frontière entre les deux ions  $A^-$  et  $B^-$  ayant un contre-ion  $C^+$  en commun, lorsque la frontière se déplace dans le champ électrique.

Supposons que la migration ait lieu dans un tube étroit et que, dans les conditions initiales, les ions  $A^-$  et  $B^-$  aient été introduits entre les électrolytes meneur et terminal (contenant les ions  $L^-$  et  $T^-$ ). Supposons également que les mobilités nettes soient dans l'ordre suivant :  $\mu_L > \mu_{A^-} > \mu_{B^-} > \mu_{T^-}$ . Quand un champ électrique est appliqué entre les électrodes, les ions chargés négativement commencent à migrer vers l'anode avec une vitesse  $v$  qui est fonction de leur mobilité nette  $\mu$ , selon la formule  $v = \mu \cdot E$ .

Les ions ayant la mobilité nette la plus élevée vont migrer les premiers tandis que ceux ayant des mobilités nettes plus faibles vont suivre dans l'ordre décroissant de leur mobilité nette. La densité de courant dans un tel système ne peut qu'être homogène et les zones ne peuvent donc que se suivre en restant en contact direct les unes avec les autres, avec une même vitesse. Pour que l'équation de Kohlrausch soit vérifiée, c'est le champ électrique qui est donc amené à se modifier de manière à assurer que tous les ions se déplacent à la même vitesse. Le champ électrique prendra par exemple des valeurs plus élevées dans la région d'un ion dont la mobilité est plus faible.

La chute de mobilité nette à la frontière entre deux zones se trouve donc accompagnée d'un saut proportionnel du champ électrique ( $E$  est inversement proportionnel à  $\mu$ ). En général, l'isotachophorèse est réalisée à intensité

constante. Ceci permet de maintenir un champ de valeur constante sur l'ensemble de chaque zone d'échantillon séparé du fait que la résistance au sein d'une zone est homogène. La vitesse de migration des zones ne change donc pas pendant l'expérience.

Comme la mobilité nette de chacun des ions est constante dans des conditions données, l'équation de Kohlrausch peut être réécrite de la façon suivante :

$$[A^-] = [L^-] \times \text{constante}$$

Ceci indique qu'à l'équilibre, la concentration au sein de chaque zone est constante et que la concentration de l'ion échantillon  $A^-$  est directement proportionnelle à la concentration de l'ion meneur  $L^-$ . Or, la concentration des ions dans chaque zone peut uniquement être modifiée par un changement de la longueur de la zone. Ceci nous amène à une *propriété unique de l'isotachophorèse* : la longueur d'une zone est directement proportionnelle à la quantité d'ions qu'elle contient.

### 3.5.3 EFFET DE CONCENTRATION

Une conséquence importante des propriétés de l'isotachophorèse est l'effet dit de concentration. Si un constituant  $A^-$  est introduit à très faible concentration, l'équation de Kohlrausch s'applique aussi à lui.

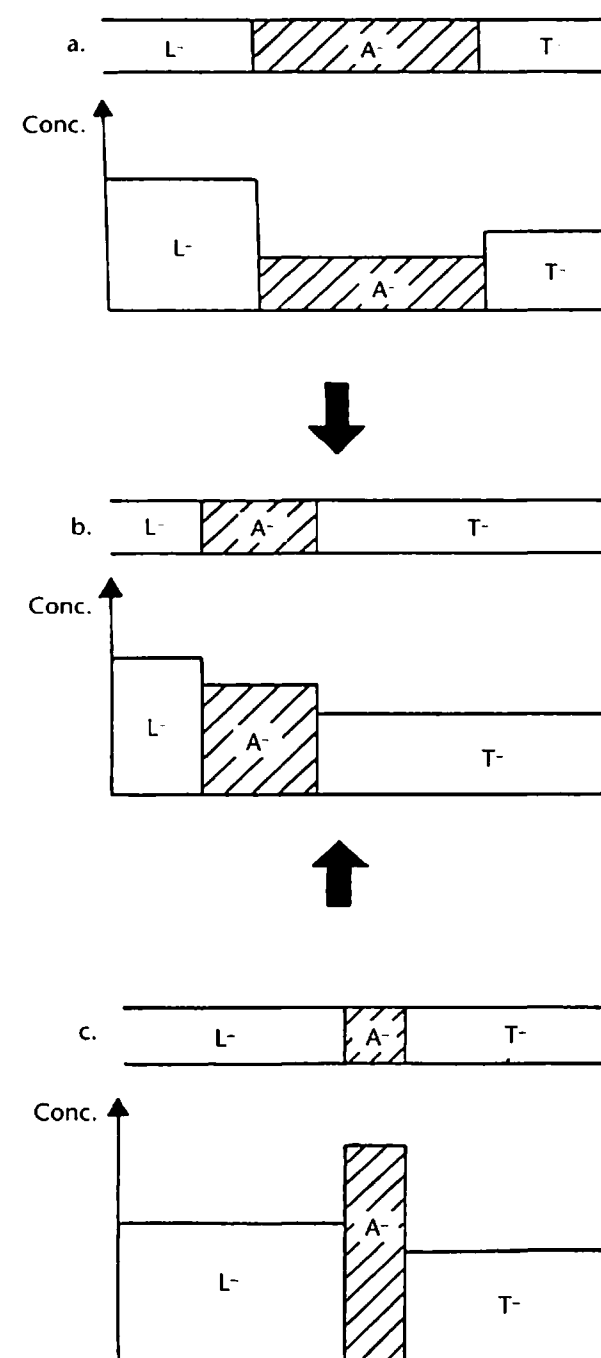
Comme la mobilité de  $A^-$  se place entre les mobilités de l'ion meneur et de l'ion terminal, la concentration de  $A^-$  à l'équilibre est intermédiaire entre les concentrations de  $L^-$  et de  $T^-$ . La conséquence est que l'ion  $A^-$  va se concentrer jusqu'à atteindre la valeur de concentration théoriquement définie. Inversement, si un échantillon concentré est introduit dans le système isotachophorétique, une dilution se produira jusqu'à ce que l'équilibre correct des concentrations soit atteint (figure 8).

### 3.5.4 EFFET SUR LA FINESSE DES ZONES

Comme conséquence de la diffusion, un ion peut migrer de sa zone dans une autre. Si  $A^-$  diffuse dans la zone  $L^-$ , il va se trouver soumis à un champ électrique plus faible que dans la zone  $A^-$ . Comme la mobilité de  $A^-$  est une donnée constante, l'ion  $A^-$  dans la zone  $L^-$  prendra une vitesse réduite par rapport aux ions  $L^-$ , car  $v = \mu \cdot E$ . L'ion  $A^-$ , par conséquent, sera facilement rattrapé par sa propre zone. De même, si un ion  $L^-$  diffuse dans la zone  $A^-$  de champ électrique plus élevé, sa vitesse s'accroîtra. Il réintégrera aussitôt sa zone initiale  $L^-$  et sa vitesse reprendra la valeur de celle des autres ions  $L^-$ . La conséquence de ces effets est qu'il y a dans l'isotachophorèse un *effet de neutralisation de la diffusion*, se traduisant par des zones très fines et donc par un pouvoir de résolution élevé.

### 3.5.5 RÉALISATION PRATIQUE

La technique d'isotachophorèse met en jeu des effets extrêmement intéressants au plan théorique. Ces effets sont d'ailleurs utilisés souvent sans le savoir en



■ **Figure 8** Illustration de l'effet de concentration au cours d'une isotachophorèse

électrophorèse discontinue dans la couche de gel de concentration. Au plan pratique, cependant, les séparations par isotachophorèse restent délicates à mettre en œuvre et nécessitent des appareillages sophistiqués qui sont d'ailleurs peu répandus. Il existe ainsi des appareils analytiques utilisant des colonnes capillaires et une détection UV des pics avec tracé direct sur enregistreur et des appareils préparatifs, également de maniement délicat. En particulier, la détermination des ions meneur et terminal optima pour un mélange

complexe de protéines n'est pas évidente. A signaler également que pour améliorer la séparation des constituants d'un mélange protéique, il est quasiment indispensable d'introduire des ions « espaceurs » qui peuvent être les mêmes ampholytes que ceux utilisés en électrofocalisation.

### 3.6 TECHNIQUES PRÉPARATIVES

Les différentes techniques d'électrophorèse analytique décrites ci-dessus peuvent être appliquées à l'échelle préparative, c'est-à-dire non plus seulement en vue de déterminer la composition d'un mélange de constituants, mais en vue d'isoler, de purifier certains d'entre eux en quantité non négligeable (de quelques mg à quelques centaines de mg). En électrophorèse analytique, on dépose des quantités d'échantillon généralement de l'ordre de 0,1 mg. En électrophorèse préparative, le dépôt sera donc de l'ordre de quelques dizaines de mg, voire du gramme, de protéines.

Le principe de la technique n'est pas modifié, mais les appareillages sont adaptés à de plus grosses quantités : colonnes de 2 ou 3 centimètres de diamètre, couches de gels de 0,5 à 1 cm d'épaisseur. La mise en œuvre de ces techniques préparatives est généralement plus délicate que celle de leurs homologues analytiques et les résolutions obtenues sont toujours inférieures.

Deux principaux types de support sont utilisés : les gels de polyacrylamide, qui offrent un pouvoir de résolution élevé mais à partir desquels la récupération des protéines n'est pas toujours facile et les gels granulaires (de structure semblable à des supports de chromatographie du type Sephadex) qui permettent facilement d'éluer les fractions.

Comme il s'agit ici de préparer des fractions protéiques purifiées ayant conservé leur structure native, on ne peut généralement pas procéder à leur identification par coloration directe (qui les dénaturerait). On a donc recours à une élution à partir du support, après repérage des fractions par spectrophotométrie UV ou par coloration d'une empreinte du diagramme.

Parmi les systèmes actuellement utilisés, nous prendrons les deux exemples suivants :

a) L'électrophorèse / isotachophorèse préparative en gel de polyacrylamide.

Ce système se pratique au moyen d'une colonne verticale de 2,5 × 30 cm réfrigérée, dont les extrémités sont connectées à des réservoirs de tampon circulant et qui est soumise à une tension de l'ordre 1 000 volts.

Les protéines, déposées au sommet de la colonne se séparent au cours de la traversée du gel et peuvent être récupérées au fur et à mesure qu'elles parviennent à l'extrémité inférieure, grâce à un autre système de tampon circulant et sont envoyées dans un collecteur de fractions comme en chromatographie.

b) L'électrofocalisation préparative en couche de gel granulaire de Sephadex.

Ce système utilise un moule parallélépipédique dans lequel on coule une couche (2 à 10 mm d'épaisseur) de gel de Sephadex G75 contenant des

ampholytes. La solution protéique peut être incorporée au gel ou déposée ensuite. Après focalisation (exemple : 1 nuit sous un voltage de 600 V), une empreinte de la couche est prise au moyen d'un papier filtre que l'on colore. Cela permet de localiser les bandes et de récupérer simplement la couche de Sephadex au moyen d'une spatule dans les zones où se trouvent les protéines recherchées et d'éluer ensuite facilement ces dernières dans des micro colonnes munies de filtres.

### 3.7 TECHNIQUES BIDIMENSIONNELLES (2-D)

Il est possible de combiner deux à deux les techniques électrophorétiques décrites ci-dessus et de cumuler ainsi les pouvoirs de résolution. Différents systèmes 2-D ont été utilisés : par exemple :

- Une électrophorèse PAGE classique à pH acide suivie d'une PAGE à pH basique.
- Une PAGE en milieu non dissociant suivie d'une PAGE en milieu dissociant (urée).
- Une PAGE à pH acide suivie d'une SDS-PAGE (PAGE x SDS-PAGE) (figure 9).
- Une électrofocalisation suivie d'une électrophorèse classique en gel de polyacrylamide (IEF x PAGE).
- Une électrofocalisation suivie d'une électrophorèse en gradient de polyacrylamide (IEF x PAGE-GRADIENT).



■ **Figure 9** Exemple de séparation bidimensionnelle (A-PAGE x SDS-PAGE) des gluténines du blé tendre (D'après Redaelli et al., 1995)

Le système qui possède actuellement le meilleur pouvoir de résolution est toutefois celui qui combine une électrofocalisation en présence d'urée ou de détergent neutre dans la première dimension et une SDS-PAGE dans la seconde dimension. Un tel système IEF x SDS-PAGE a été décrit par O'Farrell (1975). Cette séparation se fonde sur la combinaison de deux caractéristiques indépendantes de la protéine : l'une est sa charge, reflétée par son pH, et l'autre est sa taille moléculaire, qui détermine la mobilité du complexe SDS-protéine dans le gel de SDS-PAGE.

O'Farrell a été ainsi le premier à démontrer le potentiel extraordinaire de cette technique en révélant, au moyen d'un marquage radioactif, plus de 1000 polypeptides (dont certains représentant moins de 0,001 % des protéines totales) à partir d'un extrait cellulaire. Cette technique a été très largement exploitée, notamment dans le cas des protéines végétales, pour déterminer des cartes d'identité génétiques, identifier des marqueurs moléculaires, ou suivre l'expression des protéines du blé ou du maïs dans différents organes, à différents stades de maturation (Anderson *et al.*, 1985 ; Thiellement *et al.*, 1985 ; Damerival *et al.*, 1987 ; de Vienne *et al.*, 1994).

Les protéines très basiques restent cependant mal séparées en IEF x SDS-PAGE, car elles pénètrent difficilement dans le gel d'IEF. Même lorsque les ampholytes les plus basiques sont utilisés, l'étendue du gradient de pH reste faible car, en présence d'urée, les régions basiques du gradient sont instables. De plus, les rares protéines basiques qui pénètrent dans le gel d'IEF dans ces conditions donnent souvent des traînées.

Il existe une possibilité de surmonter ces difficultés en utilisant en première dimension une pseudo électrofocalisation, c'est-à-dire une migration électrophorétique en gradient de pH qui n'atteint pas l'équilibre aux pH. Cette technique, connue sous le nom de NEPHGE (NonEquilibrium pH Gradient Electrophoresis) a été décrite par O'Farrell *et al.* (1977).

Les principales différences de la NEPHGE par rapport à l'IEF sont que les échantillons sont introduits du côté acide du gel et que le produit voltage 5 temps est beaucoup plus faible. Dans ces conditions, le gradient de pH n'atteint pas son complet équilibre et les protéines ne focalisent pas à leur pH, comme en IEF. Néanmoins, les protéines se séparent dans les gels NEPHGE selon leur différence de charge.

Plus récemment, les ampholytes en gradient immobilisé (IPG) ont été introduits dans les systèmes bidimensionnels (IPG x SDS-PAGE ou IPG-DALT), permettant d'obtenir une résolution à la fois extrêmement élevée et très reproductible (Wieser *et al.*, 1986).

### 3.8 COURBES DE TITRATION DES PROTÉINES

Righetti *et al.* (1978) ont développé une technique simple permettant d'obtenir les courbes de mobilité des protéines en fonction du pH. Il s'agit d'une technique bidimensionnelle dans laquelle les protéines se déplacent perpendiculai-

rement à un gradient de pH engendré par des ampholytes fixés. Un gel d'IEF contenant des ampholytes et portant une rigole centrale, sans échantillon protéique, est tout d'abord préparé pour constituer le gradient de pH. L'échantillon est ensuite déposé dans la rigole et le gel est soumis à une électrophorèse normale perpendiculairement au sens de l'IEF. Les protéines migrent donc selon leur mobilité au pH où elles se trouvent. D'où un ensemble de « courbes de titration », chaque courbe correspondant à un constituant du mélange déposé.

La forme de ces courbes peut informer sur la nature et le nombre des acides aminés chargés qui ont été substitués entre différents mutants génétiques. Les avantages de cette technique sont les suivants :

- Une courbe complète est obtenue en une seule expérience.
- La préparation protéique n'a pas besoin d'être purifiée.
- Elle permet de préciser les conditions optimales de pH à utiliser pour la purification des constituants par les autres méthodes fondées sur les différences de charge électrique : électrophorèse, IEF, isotachophorèse, chromatographie d'échanges d'ions.

### 3.9 TECHNIQUES DE COLORATION ET DE QUANTIFICATION DES ÉLECTROPHORÉGRAMMES

Des bandes protéiques de concentration suffisamment élevées peuvent être localisées par spectrophotométrie directe des gels non colorés, à 280 nm. Ce procédé est toutefois limité par l'absorption relativement faible des protéines à 280 nm, la diffraction de la lumière et aussi la présence de nombreuses impuretés absorbant dans l'UV dans les préparations commerciales d'acrylamide. On est donc amené presque toujours à identifier les bandes protéiques par des *colorants spécifiques*.

Le colorant actuellement le plus utilisé pour les gels de polyacrylamide est le Bleu de Coomassie (G250 ou R250) en raison de sa grande sensibilité, de la simplicité et de la généralité de son application. 0,2-0,5 µg d'une protéine présente en bandes fines peuvent être ainsi détectés et la coloration est en principe quantitative jusqu'à 15 µg.

A l'origine, on procédait d'abord à une fixation des protéines en immergeant le gel dans l'acide trichloracétique avant de le colorer. Actuellement il est courant de fixer et de colorer simultanément. Comme le *Bleu de Coomassie* est très peu polaire, il est courant d'utiliser des solutions méthanoliques ou éthanoliques additionnées ensuite d'acide acétique ou trichloracétique (cf. § 2.5.5). Le temps de coloration dépend de l'épaisseur et de la densité du gel. Il est généralement de l'ordre de quelques heures. On peut le réduire en utilisant des gels ultra-minces, ou en colorant à température plus élevée (40, 50 ou même 80 °C). Après coloration, il est souvent indispensable d'éliminer l'excès de colorant et d'améliorer le contraste des diagrammes par une phase dite de décoloration. Ceci peut être obtenu soit par immersion et lavage du gel dans une solution acide ou alcoolique, soit par une autre électrophorèse en milieu

acide, longitudinalement ou transversalement (selon l'épaisseur du gel), ce qui est beaucoup plus rapide. Le Bleu de Coomassie étant un colorant anionique, cette décoloration électrophorétique en milieu acide est possible sans perdre les bandes protéiques. Des appareils vendus dans le commerce permettent cette opération.

Dans la plupart des cas, le Bleu de Coomassie a remplacé la plupart des anciens colorants spécifiques des protéines (amido black, fast green, nigrosine, ...).

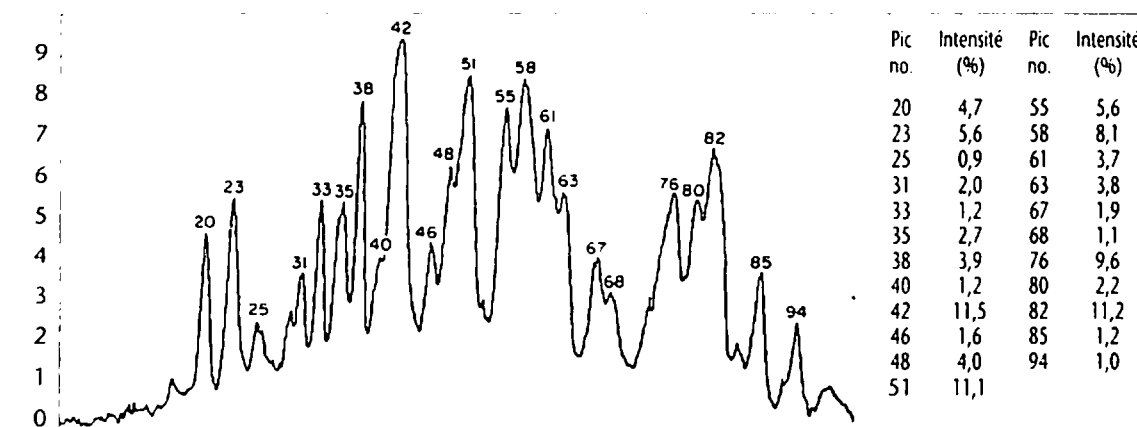
Il convient enfin de signaler le développement plus récent de méthodes de coloration des gels d'électrophorèse par le nitrate d'argent. De nombreuses variantes ont déjà été décrites qui permettent d'atteindre une sensibilité de détection inégalée. Cette méthode est fondée sur la réduction spécifique du sel d'argent en argent métallique en présence de polypeptides. Les gels doivent pour cela être incubés dans une solution contenant du méthanol et de l'acide acétique, puis prétraités au formaldéhyde avant l'addition d'un mélange complexe contenant notamment du nitrate d'argent et du nitrate de cuivre. L'argent est alors sélectivement réduit en présence d'éthanol, de formaldéhyde et d'acide citrique. Cette méthode est aujourd'hui de loin la plus sensible (comparable à certaines autoradiographies), mais son succès, du moins pour certains types de protéines, passe par un protocole sophistiqué (10 à 20 lavages du gel dans des bains différents) devant être suivi avec beaucoup de soin et de propreté. De plus, elle ne peut pas être utilisée à des fins quantitatives.

La quantification des bandes séparées en électrophorèse monodimensionnelle est habituellement réalisée par *densitométrie* des gels après coloration, ou des photographies de gels. Un densitomètre est constitué d'une source de lumière ponctuelle qui se déplace sur chaque diagramme électrophorétique à vitesse constante. Un photomultiplicateur permet de détecter les différences de transmission de la lumière causée par les bandes protéiques et d'envoyer un signal à un enregistreur qui trace une courbe comportant des pics dont la position et la surface correspondent respectivement à la mobilité des bandes et à leur intensité.

Les densitomètres modernes calculent automatiquement la surface des pics et éditent des bulletins d'analyse comportant le pourcentage relatif de chacun d'eux et divers calculs par rapport à des étalonnages de mobilité ou à des standards internes de concentration (*figure 10*).

Il faut cependant considérer avec prudence toute analyse densitométrique. L'exactitude des résultats obtenus est en effet limitée par de nombreux facteurs :

- réponse non linéaire au delà d'une certaine intensité des bandes ;
- bandes d'un même diagramme ayant des spectres d'absorption différents ;
- rapport quantité de protéine / quantité de colorant fixé pouvant varier d'un groupe de protéines à un autre et d'un colorant à un autre, ce qui conduit selon le cas à surestimer ou sous estimer certaines protéines [après coloration des gliadines du blé par la nigrosine, la fraction  $\omega$  est estimée à 20-25 % du total ; après coloration au Bleu de Coomassie, à 10-12 % seulement] ;



■ **Figure 10** Tracé densitométrique d'un électrophorégramme A-PAGE des gliadines de la variété de blé dur Calvinor. La nomenclature des constituants est selon Bushuk et Zillman (1978) (D'après Autran et Galterio, 1989)

- problèmes de transparence du gel ;
- problème des protéines qui ont été déposées mais qui n'entrent pas dans le gel et qui ne participent pas au diagramme, ou qui ne donnent pas de bandes en migrant seulement sous forme de traînées ;
- difficulté de choisir une ligne de base pour l'intégration des pics, le « bruit de fond » (qui correspond aussi à des protéines ayant fixé du colorant) étant parfois variable d'un échantillon à l'autre.

L'analyse quantitative des protéines séparées en électrophorèse bidimensionnelle (cf. § 3.7) doit faire l'objet d'un développement particulier en raison de la complexité des systèmes mis en œuvre, inévitable si l'on considère la très haute résolution (couramment 2000 spots protéiques) des systèmes de séparation IEF x SDS-PAGE. L'analyse quantitative de tels systèmes s'est longtemps heurtée à plusieurs obstacles, aujourd'hui partiellement ou entièrement résolus avec le développement de micro ordinateurs et de logiciels suffisamment puissants (Zivy *et al.*, 1984 ; Tarroux *et al.*, 1987 ; Rabilloux *et al.*, 1994). Elle fait appel à la séquence d'opérations suivantes :

- numérisation des électrophorégrammes par caméra CCD ou scanner ;
- correction de l'image : élimination automatique du bruit de fond pour ne conserver qu'une carte de spots (avec éventuellement élimination manuelle de spots artefactuels) et correction des déformations des lignes de migration ;
- comparaison de plusieurs répétitions et alignement (éventuellement manuel) des spots homologues d'une même série d'électrophorégrammes ;
- repérage (en x, y) et quantification (après transformation gaussienne) des protéines ;

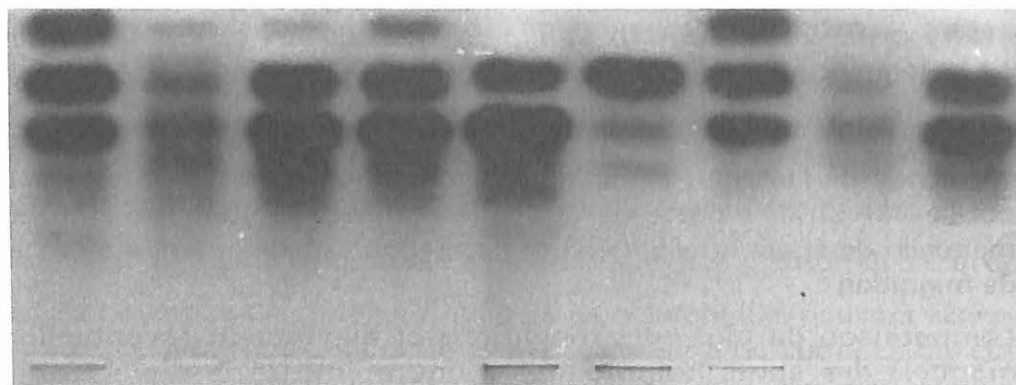
- expression des résultats en listes, diagrammes, courbes, avec, par exemple, recherche des sous-ensembles de protéines évoluant de façon coordonnée au cours d'un événement biologique (Eddé, 1988 a).

### 3.10 ÉLECTROPHORÈSE AVEC RÉVÉLATION D'ISOENZYMES

Après séparation électrophorétique d'un extrait protéique complexe, il est possible de révéler au sein du diagramme celles des bandes qui possèdent une activité enzymatique déterminée. Les principales limitations de ces procédés viennent du fait que des méthodes de détection n'existent que pour un nombre relativement limité d'enzymes et que les résultats ne sont pas facilement quantifiables. On utilise donc surtout ces procédés pour identifier les formes multiples de certaines enzymes (polymorphisme biochimique), pour des comparaisons analytiques d'enzymes entre différentes espèces, races ou variétés ou comme étape préliminaire à un isolement préparatif (Pasteur *et al.*, 1987).

En général, on procède à une incubation du gel (éventuellement découpé selon son épaisseur) dans un bain contenant un substrat de l'enzyme, à la température optimale de la réaction enzymatique, dans un milieu de pH et de force ionique favorables à cette réaction et contenant tous les effecteurs nécessaires. On révèle les produits de la réaction par un colorant spécifique, ce qui permet de localiser les régions du diagramme où cette réaction a eu lieu et où se trouvent les protéines qui possèdent l'activité enzymatique en question.

Pour révéler par exemple les formes multiples de  $\beta$ -amylases, on incube le gel d'électrophorèse dans une solution d'amidon et on colore ensuite à l'iode. Le gel se colore entièrement, sauf à l'emplacement des bandes  $\beta$ -amylasiques (où l'amidon a été hydrolysé) et qui apparaissent ainsi blanches sur fond bleu-noir. De même, pour révéler les peroxydases, on incube le gel dans une solution de guaiacol ou de catéchol et on révèle les bandes en ajoutant de l'eau oxygénée (*figure 11*).



■ **Figure 11** Identification des protéines possédant une activité peroxydasique au sein d'un extrait de protéines du blé  
(D'après Kobrehel et Gautier, 1973)

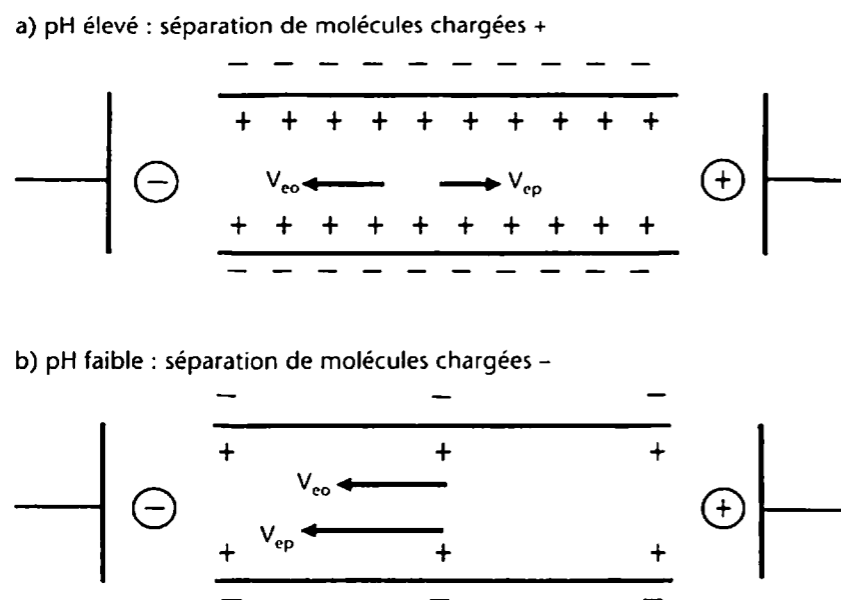
### 3.11 ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE (CE)

L'électrophorèse capillaire (CE : capillary electrophoresis, ou HPCE : high-performance capillary electrophoresis) est une méthode récente présentant un potentiel extraordinairement élevé pour la résolution et la purification des substances biologiques. Elle suscite un grand intérêt car c'est une technique d'analyse extrêmement performante, facile à manier et qui peut donc être utilisée dans tous les laboratoires et en particulier dans l'industrie pharmaceutique pour répondre au besoin de contrôles de plus en plus performants. La mise au point des séparations s'effectue aisément pour des molécules variées, car les temps d'analyse sont courts, et la plupart des appareils sont automatisés, de manière à permettre un accès très rapide à tous les paramètres.

Les premiers travaux en électrophorèse capillaire ont été présentés en 1974 par Virtanen qui avait réalisé la détection potentiométrique de solutés séparés électrophorétiquement dans des tubes de verre de 200 à 500  $\mu\text{m}$  de diamètre. Dès le départ, l'intérêt d'utiliser des tubes d'un diamètre de plus en plus petit a été mis en évidence, ainsi que l'obligation de développer des méthodes de détection qui permettent de profiter de la sélectivité de cette technique en y alliant une très bonne sensibilité. La séparation des molécules est donc aujourd'hui réalisée dans un capillaire composé de silice d'un diamètre interne de 50  $\mu\text{m}$ . Dans ces conditions, la dissipation de la chaleur est très bonne et on peut utiliser des champs électriques de plusieurs dizaines de milliers de volts sans problème de convection, rendant possible la séparation de protéines avec un nombre de plateaux théoriques avoisinant le million par mètre, ce qui représente un accroissement énorme par rapport aux techniques classiques de chromatographie. En dehors de l'amélioration de la sélectivité, on constate aussi une réduction conséquente des temps d'analyse. En ce qui concerne la détection, d'importants progrès ont été effectués, qui ont permis l'utilisation directe du capillaire comme cellule de détection (ce qui signifie un trajet optique de 50  $\mu\text{m}$ ) tout en gardant une excellente sensibilité (Pairaud, 1989).

En électrophorèse capillaire en solution libre, mode qui convient pour la séparation des molécules chargées, la séparation est réalisée dans un capillaire rempli de tampon. Chacune de ses extrémités plonge dans un réservoir auquel on applique le potentiel. Les molécules se déplacent alors en fonction de leur mobilité électrophorétique au pH choisi. Le facteur déterminant dans ce type de séparation est l'existence d'un flux électro-endo-osmotique dont la vitesse linéaire est proportionnelle au champ électrique mais qui dépend aussi de la force ionique et surtout du pH du tampon, mais pas de la nature de l'échantillon analysé. A pH faible, les molécules chargées positivement migrent d'elles-mêmes vers la cathode, et leur mobilité est d'autant plus élevée qu'elles sont chargées. Au contraire, à pH élevé, les molécules chargées négativement sont alors séparées en fonction de leur résistance au flux électro-endo-osmotique, résistance qui est d'autant plus forte que la molécule est chargée (*figure 12*). On observe généralement un élargissement des bandes dans le cas où le soluté passe trop de temps dans le capillaire, ce qui peut être évité en utilisant des voltages élevés ou des capillaires plus courts. Pour des capillaires d'un diamètre interne de 50  $\mu\text{m}$  et d'une longueur de 1 m, le voltage maximum utilisable est





■ **Figure 12 Principe de la séparation de molécules chargées par électrophorèse capillaire : (a) séparation des molécules chargées — par leur résistance au flux électro-osmotique, (b) pH faible : séparation des molécules chargées +**  
(D'après Pairaud, 1989)

de 25 à 30 kV et les meilleurs résultats sont obtenus quand la concentration des molécules de l'échantillon est environ mille fois inférieure à celle du tampon. (Pairaud, 1989).

Plusieurs techniques de séparation analytique dans le format capillaire ont été décrites ces dernières années : l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse capillaire en gel (CGE), l'isotachophorèse capillaire (CITP) et l'électrofocalisation capillaire (CIEF). Il est également possible de coupler l'EC avec un spectromètre de masse par l'intermédiaire d'un électrospray (CE-ESI-MS).

Il existe d'ores et déjà un très grand nombre d'utilisations de ces techniques d'électrophorèse capillaire pour des applications telles que : peptides (séparation rapide selon la charge, impuretés dans des lots de peptides synthétiques...), protéines (analyse d'un mélange de protéines ; cartes tryptiques ; détection de formes dégradées, glycosylées, amidées ; analyses de contrôle en industrie pharmaceutique, nucléotides, nucléosides, bases, médicaments, catécholamines, vitamines, acides aminés).

### 3.12 ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

Développées à partir de 1983, les techniques d'électrophorèse de l'ADN en champ pulsé pourraient permettre de faire le lien entre l'étude de l'ADN au niveau « macromoléculaire » par analyse génétique classique (établissement de caryotypes et de groupes de liaison, cytogénétique...) et la structure fine de

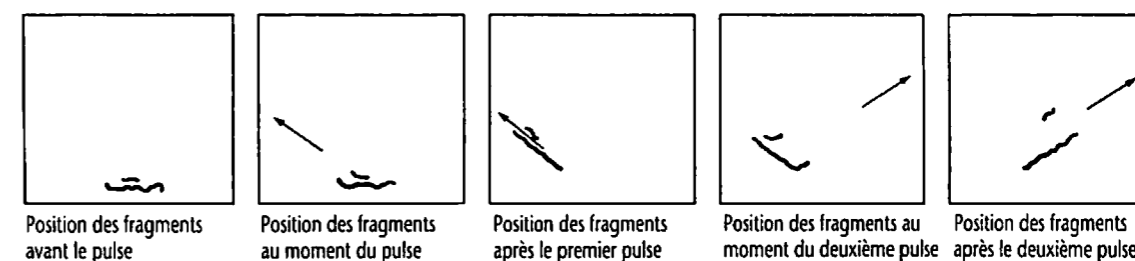
nombreux gènes pris individuellement par les méthodes du génie génétique. Ce type d'électrophorèse permet en effet de séparer des molécules d'ADN de grandes tailles (pouvant aller actuellement jusqu'à quelques millions de bases) avec une très bonne résolution, permettant l'établissement de cartes précises de régions importantes de chromosomes à l'échelle de la mégabase, comme celles du complexe HLA chez l'homme ou la séparation de petits chromosomes comme ceux de la levure.

#### 3.12.1 PRINCIPE DE L'ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

Les techniques classiques d'électrophorèse sont fondées sur l'effet tamisant des supports solides utilisés (gels d'agarose ou d'acrylamide). En effet, comme la charge de l'ADN (conférée par la présence des groupes phosphates  $H_3 PO_4^-$ ) est proportionnelle à sa taille, la densité de charge est constante et les fragments d'ADN linéaires migrent à la même vitesse dans un champ électrique constant, quelle que soit leur taille. C'est au contraire l'effet tamisant du support solide utilisé qui joue le rôle de différentiel de migration, les molécules d'ADN étant d'autant plus freinées qu'elles sont plus grandes.

Cependant, au delà de 50 000 paires de bases, la taille des fragments d'ADN est supérieure au diamètre des plus larges pores des supports d'électrophorèse, annulant tout effet de tamisage différentiel. L'utilisation de supports à pores plus larges a permis de reculer légèrement la limite supérieure de séparation, mais les gels correspondants sont extrêmement fragiles et de maniement délicat. C'est la manipulation d'un tout autre paramètre, *la nature du champ électrique*, qui a permis de réaliser les progrès les plus spectaculaires, permettant la migration d'ADN de tailles pouvant aller jusqu'à quelques milliers, voire quelques dizaines de milliers de bases.

Au lieu d'un champ électrique unidirectionnel, uniforme et continu, l'électrophorèse pulsée utilise *deux champs d'orientations différentes, appliqués de façon alternative*. Des électrodes étant placées sur les divers côtés de l'appareil utilisé, un pulseur permet d'alterner l'établissement des champs électriques et de choisir le temps d'application de chacun d'eux (temps de pulse). Entre deux applications successives, les molécules subissent un *phénomène de réorientation* lié à la différence de direction entre les champs (Eddé, 1988 b) (figure 13).



■ **Figure 13 Mécanisme proposé pour la séparation de fragments d'ADN par électrophorèse en champ pulsé**  
(D'après Pharmacia-LKB, cité par Eddé, 1988 b)

Comme la vitesse de réorientation des molécules d'ADN est étroitement liée à leur taille, la durée d'application du champ électrique dans une direction donnée (la durée du pulse) aura deux composantes : l'une de réorientation (au cours de laquelle on peut admettre que la molécule ne migre pas) et l'autre de migration proprement dite. De faibles différences intervenant dans les durées de réorientation de molécules de tailles voisines peuvent entraîner une forte différence dans les durées de migration, conduisant une amélioration de la séparation. L'intervalle de taille pour lequel la séparation des molécules d'ADN est optimale dépend alors du temps de pulse choisi. On doit donc régler ce paramètre en fonction de la taille des molécules à séparer.

### 3.12.2 LES DIFFÉRENTES TECHNOLOGIES D'ÉLECTROPHORÈSE EN CHAMP PULSÉ

Plusieurs solutions techniques ont été conçues dont la première a été proposée par Schwartz et Cantor (1984), qui sont à l'origine de l'électrophorèse en champ pulsé. Depuis cette date, des progrès considérables ont été accomplis en utilisant les principaux systèmes suivants et en retenant comme modèle les 17 chromosomes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

- la technique OFAGE (Orthogonal-Field-Alternation Gel Electrophoresis) ;
- la technique FIGE (Field-Inversion Gel Electrophoresis) ;
- la technique CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field).

Dans la technique OFAGE, deux champs orthogonaux alternatifs sont utilisés (angle de réorientation de 90°). Cette configuration est assurée par un appareil à électrophorèse de forme carrée et par la présence sur chaque côté de 8 électrodes plongeant verticalement dans le tampon. Ce type d'appareil permet de faire migrer des fragments d'ADN possédant jusqu'à 9 millions de paires de bases, mais ne permet pas de produire des champs électriques véritablement homogènes, d'où les trajectoires de migration courbes généralement obtenues, rendant malaisée la comparaison de plusieurs échantillons. Une amélioration de la technique nommée TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis) fait appel à une orientation transversale du champ électrique (120°) par rapport au gel positionné verticalement dans la cuve.

La technique FIGE ne nécessite au contraire qu'un appareillage classique auquel on ajoute simplement un inverseur périodique du champ électrique (angle de réorientation de 180°). Les champs électriques étant proches de l'homogénéité, les trajectoires de migration sont droites et la comparaison de plusieurs échantillons migrant simultanément est aisée.

Dans la technique CHEF, on utilise des champs alternatifs strictement homogènes, généralement orientés à 120°, angle qui permet d'obtenir des champs électriques homogènes et des trajectoires de migration absolument droites indépendantes de la position de l'échantillon, d'où des comparaisons précises de plusieurs échantillons analysés simultanément. La technique CHEF permet ainsi la séparation avec une excellente résolution de 15 sur les 17 chromosomes de levure en 24 heures.

### 3.12.3 PERSPECTIVES

En quelques années, l'électrophorèse en champ pulsé a permis de séparer les chromosomes d'un grand nombre d'eucaryotes inférieurs, particulièrement la levure, facilitant la localisation précise des gènes correspondants sur les chromosomes. Chez l'homme, l'utilisation de cette technique a d'ores et déjà permis de construire des cartes de régions importantes du génome dans le système HLA. Il est très probable que l'électrophorèse en champ pulsé aboutisse dans les prochaines années à une connaissance beaucoup plus approfondie des cartes génétiques des organismes supérieurs en vue du diagnostic des anomalies génétiques.

### 3.13 ÉLECTROPHORÈSE DES ACIDES NUCLÉIQUES. DÉTERMINATION DES SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES PAR ÉLECTROPHORÈSE

Les acides nucléiques, dont le rapport charge/masse est invariable, migrent avec des mobilités égales dans un champ électrique mais peuvent néanmoins être séparés en fonction de leur taille en sélectionnant un gel exerçant un tamisage moléculaire approprié. Les gels d'agarose sont ainsi utilisés pour séparer de très grosses molécules telles que des espèces d'ARN ou d'ADN intacts (70 pb à 9 Mb), alors que les gels de polyacrylamide peuvent être utilisés pour la séparation de plus petits fragments d'ARN ou d'ADN (10-1000 pb).

Les techniques en gel d'agarose et en gel de polyacrylamide ont été extensivement utilisées ces dernières années pour analyser la taille, la structure et la fonction des molécules d'ARN et d'ADN. En particulier, les récents développements des techniques d'ADN recombinants, de cartes de restriction, de séquence des nucléotides, utilisent toutes l'électrophorèse comme un outil analytique de sensibilité particulièrement élevée. Les enzymes de restriction, qui coupent les molécules d'ADN en des points spécifiques sont ainsi utilisées pour engendrer des fragments parfaitement définis d'ADN, dont la taille est ensuite déterminée par électrophorèse. Ces techniques sont extrêmement sensibles puisqu'elles permettent de détecter moins de 10 ng par bande après coloration par 1 µg/ml de bromure d'éthidium.

Plusieurs méthodes de détermination rapide des séquences d'acides nucléiques (méthode de Sanger *et al.*, enzymatique ; méthode de Maxam et Gilbert, chimique) permettent également la lecture des séquences nucléotidiques de fragments d'ARN ou d'ADN directement sur le gel. Ces méthodes utilisent un gel de polyacrylamide de concentration élevée capable de séparer des fragments dont la longueur ne diffère que d'un seul nucléotide.

La méthode de Maxam et Gilbert, repose ainsi sur la mise au point de techniques chimiques permettant de couper un fragment d'ADN au niveau d'un seul type de base spécifiquement : A, G, C, ou T (en réalité G, G+A, C+T, ou C). Considérons par exemple le cas d'une coupure de l'ADN uniquement au niveau de la guanosine. Comme cette coupure se fait avec un mauvais rende-

ment (seulement 2 % de l'ADN est coupé à chaque niveau), on se trouve en fait en présence d'un mélange de fragments de longueurs différentes, mais tous terminés par G.

La méthode s'applique de la manière suivante :

- Découpage de l'ADN par une enzyme de restriction.
- Séparation et purification des fragments d'ADN ainsi obtenus.
- Fixation à l'extrémité 5' de chaque chaîne de chaque fragment d'un  $^{32}\text{P}$  provenant d'ATP radioactif, à l'aide d'une enzyme, la polynucléotide kinase.
- Séparation des 2 chaînes après traitement alcalin, par électrophorèse ou toute autre méthode.
- Séparation d'une chaîne en 4 aliquotes. Mise en oeuvre sur chacun d'entre eux d'une des méthodes permettant de couper les fragments au niveau d'un seul type de base. Quatre méthodes, correspondant à chacune des bases, seront appliquées.
- Électrophorèse, sur le même gel, des 4 mélanges réactionnels.
- Autoradiographie du gel d'électrophorèse. Seuls les fragments marqués par le  $^{32}\text{P}$  sont visibles. Ce sont donc tous des fragments commençant à l'extrémité 5' et se terminant par la base au niveau de laquelle a été réalisée la coupure. La coupure se faisant avec un mauvais rendement, on aura dans chaque aliquote un grand nombre de bandes, correspondant aux fragments se terminant par la base.

Considérons par un exemple le cas d'une chaîne d'ADN formée de 12 nucléotides. On divise l'échantillon en 4 parties et on utilise dans chaque cas une des méthodes permettant la coupure au niveau d'un seul type de base après avoir fixé le  $^{32}\text{P}$  à l'extrémité 5'. On fait 4 électrophorèses que l'on révèle par autoradiographie. On a dans chaque cas plusieurs bandes correspondant à des fragments d'ADN de longueur différente que l'on identifie d'après leur vitesse de migration :

- L'ADN qui a été coupé au niveau de A donne 4 bandes correspondant à des fragments de longueur 2, 6, 9 et 11 nucléotides.
- L'ADN coupé au niveau de G donne 3 bandes de longueur 1, 3 et 5 nucléotides.
- L'ADN coupé au niveau de T donne 3 bandes correspondant à des longueurs de 4, 8 et 10 nucléotides.
- L'ADN coupé au niveau de C donne 2 bandes de longueur respective 7 et 12 nucléotides.

On peut en déduire la séquence de la chaîne : ( $^{32}\text{P}$ ) 5' GAGTGACTATAC 3'.

Dans les récents développements des techniques de séquençage, on n'utilise plus de radio-isotopes, mais une détection par fluorescence. Comme il est possible d'utiliser un fluorophore différent pour chacune des 4 réactions, on peut réunir sur une seule ligne les 4 types de fragments obtenus dans les 4 réac-

tions. Un appareillage automatique permet alors d'acquérir en temps réel les données fournies par le système de détection au cours de l'électrophorèse (différenciation des 4 types de fluorophores par un jeu de filtres, après excitation par un laser argon), d'analyser et de stocker directement la séquence dans un fichier d'ordinateur.

Précisons encore que dans les gels préparés pour la séquence et la détermination des masses moléculaires des acides nucléiques, il est indispensable de conserver les molécules sous une forme totalement dénaturée car des variations de structure secondaire pourraient conduire à des variations de mobilité électrophorétique. Les gels dénaturants les plus couramment utilisés contiennent ainsi de l'urée 6-8 M, du formamide 99 % ou du glyoxal. Dans ces conditions, la mobilité électrophorétique est indépendante de la composition en bases et de la structure secondaire. Toutes les molécules simple brin de même longueur migrent donc de façon identique.

Signalons enfin l'utilisation croissante de l'électrophorèse de fragments d'acides nucléiques dans le but de caractériser avec précision la diversité génétique ou de suivre le devenir de séquences particulières dans le génome d'un organisme et d'évaluer leur conservation dans le temps. Cette voie d'approche du polymorphisme biochimique est appelée RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

### 3.14 TECHNIQUES DE TRANSFERT : « PROTEIN BLOTTING »

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide est une technique très puissante d'analyse des mélanges protéiques complexes, mais ses possibilités sont limitées en ce sens que les protéines séparées restent enfermées au sein d'une matrice dense constituée par le gel et ne sont donc pas immédiatement disponibles pour des analyses complémentaires. Un grand nombre de méthodes ont été développées en vue de surmonter cette difficulté, par exemple, l'élution des protéines à partir de fines tranches de gel, ou encore la réalisation de cartes peptidiques in situ. Ces techniques sont malheureusement longues et présentent aussi des inconvénients au plan de la résolution et de la sensibilité.

Plus récemment, des techniques de prise d'empreinte (blotting) permettant de surmonter ces problèmes ont été inventées. Les protéines peuvent être ainsi transférées hors du gel et sur une membrane ou sur un filtre, formant ainsi une réplique exacte de la séparation protéique originale et laissant les protéines transférées accessibles à toute espèce d'analyse.

Une large gamme de réactifs ou de sondes deviennent alors utilisables : anticorps, ADN, ARN, lectines, etc. Il est évident que la manière dont on accomplit l'étape du transfert est cruciale pour l'obtention d'une réplique fidèle à l'original. En particulier, le choix du tampon, l'éventuelle étape d'équilibration précédant le transfert, le milieu et les techniques de transfert jouent très fortement sur le succès de l'expérience. Plusieurs méthodes de transfert peuvent être citées :

- L'électrotransfert ou « electroblotting » (selon Towbin *et al.*, 1979), dans laquelle le transfert est réalisé en plaçant le gel dans une sorte de sandwich formé du gel initial, de filtres de nitrocellulose, de papiers filtres, de « Scotch Brite », le tout dans une cassette de plastique percé de trous. C'est le passage du courant (0.5 A, 10-15 V/cm, 2 à 20 heures à 4 °C) qui permet le transfert des protéines depuis le gel jusque sur le film de nitrocellulose.
- La méthode par pressage (selon Peltre *et al.*, 1982).
- La méthode par aspiration.
- La diffusion passive, utilisant un double sandwich semblable au précédent et immergé dans le tampon de transfert.

### 3.15 IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

Les techniques immuno-électrophorétiques exploitent à la fois les *différences de mobilité* des protéines dans un champ électrique et les *propriétés immunologiques* de ces protéines. Concrètement, les protéines sont soumises à une séparation électrophorétique dans un gel. Dans la technique développée initialement par Grabar (Institut Pasteur, 1953), une auge est creusée dans ce gel parallèlement à la direction du champ électrique à quelques millimètres du bord de la ligne de migration des protéines. Un anticorps contre les protéines étudiées est alors introduit dans l'auge. L'anticorps diffuse dans le gel. Il peut alors rencontrer des antigènes correspondants et former (aux endroits où le rapport antigène / anticorps est optimal) des complexes insolubles. Ces complexes peuvent être visualisés sous la forme d'*arcs de précipitation* ayant des formes et des positions (relativement aux protéines et à leur ligne de départ) très caractéristiques.

Les techniques immuno-électrophorétiques varient selon :

a) Le principe de la séparation :

- Électrophorèse de zone à pH constant.
- Électrofocalisation.
- Isotachophorèse.
- Combinaison bidimensionnelle de deux techniques de principes différents.

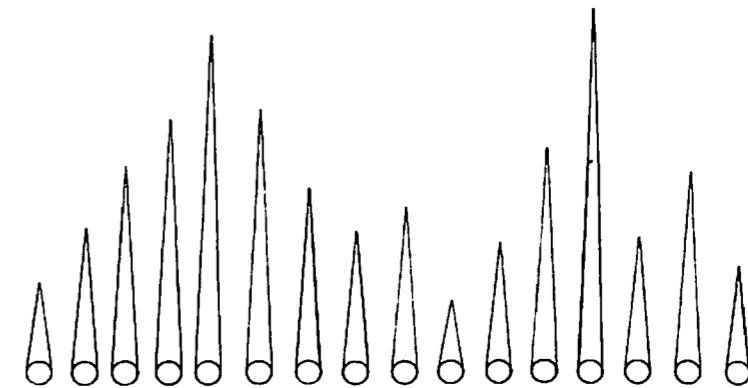
b) Le support de l'électrophorèse :

- Le gel d'agarose (le plus utilisé) possède une grande porosité et permet de séparer des constituants de poids molaire allant jusqu'à 1 million, mais présente des inconvénients : électroendosmose et importante diffusion (qui facilite la reconnaissance immuno-chimique, mais qui diminue la résolution).
- Le gel de polyacrylamide ne subit pas l'électroendosmose ; sa porosité peut être ajustée en fonction de la concentration (T) et du degré de réticulation (C) ; la diffusion y est faible et la taille des molécules séparables est limitée à 300 000 ou 400 000.
- Les gels mixtes (polyacrylamide-agarose) possèdent des propriétés intermédiaires.

- Les membranes d'acétate de cellulose dont la qualité de séparation est supérieure à l'agarose ; ce sont des supports prêts à l'emploi, mais leur manipulation est délicate (fragilité, dessèchement).
- Des supports divers : papier, gel granulaire (Sephadex), milieu liquide.

c) La détection immuno-chimique

- La *précipitation antigène-anticorps* est obtenue par double diffusion des antigènes et des anticorps les uns vers les autres (Grabar et Williams, 1953) ; elle présente une grande simplicité, mais des inconvénients : temps de diffusion très long ; difficultés d'interprétation si les arcs sont trop nombreux ; pas de quantification possible.
- L'*immuno-électro-précipitation*, ou technique des « rockets » est obtenue par migration électrophorétique des antigènes dans un gel contenant les anticorps. C'est une méthode rapide et quantifiable. Cette immuno-électro-précipitation peut également être obtenue par migration électrophorétique des antigènes, préalablement séparés par électrophorèse, perpendiculairement dans un gel contenant les anticorps (*figure 14*).
- L'*immuno-marquage ou immuno-affinité* : les antigènes y sont caractérisés par un immun sérum marqué (par radioactivité ou par une enzyme) après immobilisation par précipitation antigène-anticorps ; ou encore après immobilisation sur une empreinte ou réplique des antigènes séparés en électrophorèse, la réplique de la séparation étant faite sur une membrane de nitrate de cellulose (Southern, 1975).



■ **Figure 14** Schéma d'une séparation par immuno-électro-précipitation ou technique des « rockets ». La hauteur du pic est proportionnelle à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon

Ces différentes techniques d'immuno-électrophorèse sont très utilisées pour les protéines du sérum et pour de nombreuses autres protéines pour :

- examiner la pureté de préparations protéiques ;
- analyser la composition de mélanges protéiques et identifier en particulier la présence de protéines particulières ou ayant des propriétés immunologiques communes (Skerritt et Hill, 1990) ;
- rechercher la présence d'anticorps contre des antigènes connus ;
- contrôler l'identité ou la non-identité de deux antigènes.

## 4

## Quelques exemples d'application des techniques électrophorétiques dans l'agroalimentaire

Les industries agroalimentaires (IAA) ont une activité dont l'objectif est de transformer une production agricole de composition éminemment variable en des aliments de qualités nutritionnelle, hygiénique et organoleptique définies, en s'appuyant sur des traitements physiques ou biologiques, avec ou sans ajout d'additifs ou d'auxiliaires technologiques.

Les IAA ont donc des exigences et des contrats, des règlements ou des normes à respecter, qui concernent aussi bien la qualité des matières premières utilisées que la qualité des produits finis. Le problème peut être de caractériser les matières premières avec précision, ou d'en contrôler la conformité : identification des variétés présentes dans les lots de grains de céréales, prédiction de la qualité de végétaux en cours de sélection, identification d'espèces dans les filets de poissons, contrôle de la pureté d'un lait de chèvre,... Il peut également s'agir d'un contrôle au niveau des produits finis transformés : détermination de la teneur en œufs d'une pâte alimentaire, détection de protéines végétales dans des produits d'origine animale (pâtes, saucissons)...

Compte tenu que chaque espèce, variété, ou race possède un patrimoine génétique qui lui est propre et que l'expression de cette spécificité se retrouve dans la composition protéique, il est clair que l'analyse électrophorétique des protéines constitue un outil de choix pour l'appréciation ou le contrôle de la qualité dans les produits agricoles et alimentaires.

Techniquement, ce type d'analyse ne pose pas de problème lorsqu'il s'agit d'analyser un produit pur et non transformé (grain, lait, poisson, viande). La situation est moins simple lorsqu'on a affaire à des mélanges (farines industrielles) ou à des produits ayant subi des traitements thermiques ou autres transformations technologiques (pâte alimentaire séchée à très haute température ou précuites, conserves, fromages,...).

### 4.1 ANALYSE DES PRODUITS AGRICOLES BRUTS

L'utilisation de l'électrophorèse pour le contrôle des matières premières repose sur le concept « un gène, une protéine ». Les protéines étant des produits de la traduction des gènes, elles peuvent être considérées comme des marqueurs de ces gènes et la spécificité génomique d'une espèce s'exprime ainsi directement dans sa composition protéique. L'étude de la composition fine des protéines est donc susceptible de fournir des informations sur l'identité et « l'histoire » d'un organisme ou d'un produit. Ces informations pouvant être « lues » au moyen de

techniques de séparation telles que l'électrophorèse, on conçoit que les diagrammes électrophorétiques puissent constituer des sortes de « cartes d'identité » ou « d'empreintes digitales » des échantillons analysés et parfois de la variété ou de l'espèce à partir de laquelle ils ont été obtenus.

Toutes les protéines ne permettent pas cette discrimination. Certaines protéines, étroitement associées à une structure, ou à une fonction vitale pour l'individu n'ont subi que peu de modifications au cours de l'évolution et leur diagramme apparaît identique même entre des organismes appartenant à des familles ou des embranchements différents. Au contraire, d'autres protéines telles que les protéines de réserve des végétaux, semblent avoir toléré un plus grand nombre de mutations et permettent des discriminations très poussées grâce à leur polymorphisme et leur variabilité génétique élevés.

D'autre part, toute analyse électrophorétique des protéines suppose leur solubilisation préalable, ce qui peut poser des problèmes avec certaines matières premières. La composition du solvant d'extraction doit être optimisée de façon à privilégier la solubilisation de la fraction protéique qui présente la plus forte variabilité intravariétale ou intraspécifique.

Enfin, le choix de la technique électrophorétique est essentiel. En fonction de la technique la séparation va s'accomplir selon différents critères : taille moléculaire (SDS-PAGE), charge électrique nette et encombrement moléculaire (PAGE natif), point isoélectrique (IEF), de sorte que plusieurs types de diagrammes peuvent être obtenus pour un même échantillon. Le choix d'une technique de contrôle doit enfin tenir compte de son pouvoir de discrimination des échantillons à analyser, mais aussi de son coût et de ses performances.

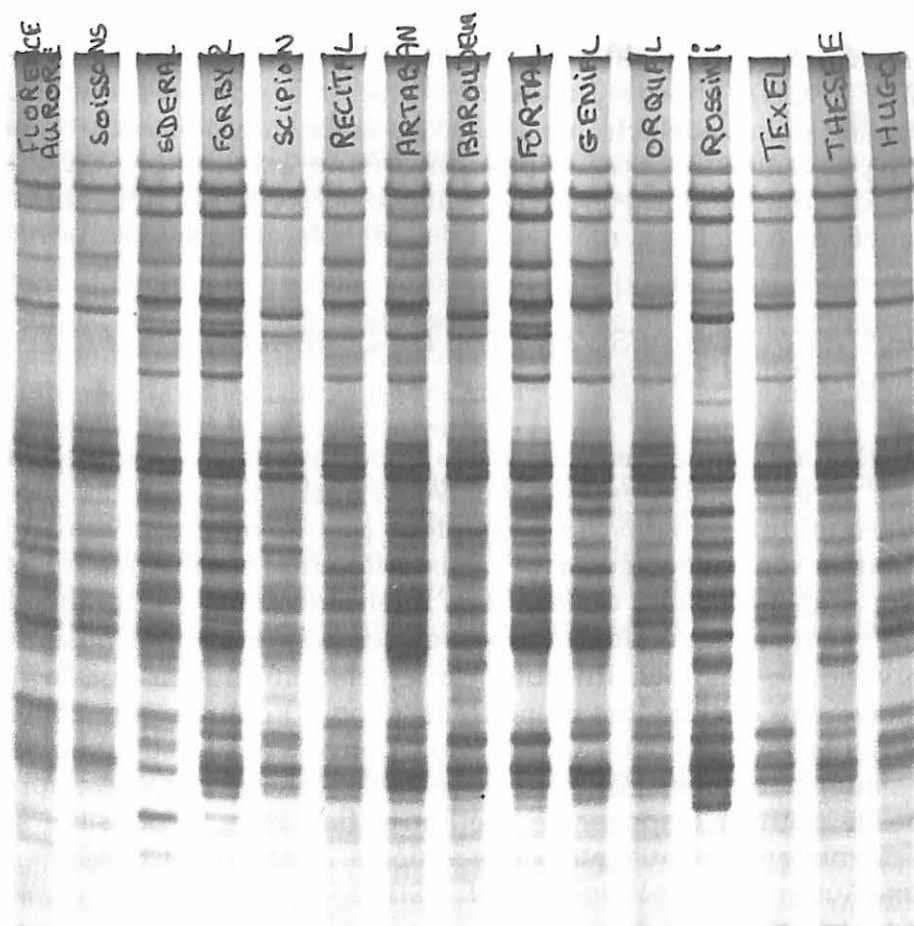
#### 4.1.1 IDENTIFICATION DES VARIÉTÉS DE CÉRÉALES ET AUTRES PLANTES

Dans la filière agroalimentaire, il est très important de pouvoir identifier et distinguer les variétés et les espèces cultivées, notamment du fait que les différentes variétés et espèces ne possèdent pas le même niveau de qualité d'utilisation et sont négociées à des prix différents. L'influence décisive de la variété sur la qualité d'une céréale a en effet amené les utilisateurs industriels (meunerie, semoulerie, malterie) à passer des contrats sur la base de la composition variétale des lots. En outre, la législation impose que le nom de la variété doive être déclaré lors d'une transaction et, d'autre part, toute nouvelle variété inscrite au Catalogue Officiel doit pouvoir être distinguée sans ambiguïté des autres variétés existantes. Pour toutes ces raisons, il est apparu indispensable de pouvoir disposer de méthodes fiables et si possible simples et rapides permettant l'identification des variétés, notamment dans les lots commerciaux (Autran, 1975 ; Wrigley *et al.*, 1982 ; Cooke, 1986).

En regard des autres procédés qui ont été envisagés (par exemple, forme ou couleur du grain), il est apparu que les procédés les plus sûrs et les plus spécifiques étaient ceux reposant sur la composition biochimique du grain, notamment l'électrophorégramme de protéines de réserve très polymorphes telles que les prolamines ou les glutélines. (Autran, 1984, 1986, 1995) (On rappelle

que, chez le blé, les protéines de cette famille (appelées respectivement gliadines et gluténines) constituent l'essentiel du gluten, complexe protéique visco-élastique qui confère à la pâte ses propriétés technologiques).

La principale technique actuellement utilisée est l'électrophorèse des prolamines en gel de polyacrylamide en milieu acide (tampon lactate d'aluminium, pH 3,1) (Berger et Le Brun, 1986). Les protéines extraites par l'alcool dilué migrent vers la cathode en fonction de leur charge nette et de leur encombrement moléculaire et se séparent en 20-30 constituants selon la variété (*figure 15*). Chaque bande est caractérisée par sa mobilité électrophorétique (relativement à des bandes témoins) et son intensité (déterminée visuellement ou par densitométrie). A chaque variété on fait alors correspondre un diagramme de référence (non influencé par les facteurs agro-climatiques) lequel constitue son « empreinte digitale ». Par comparaison entre le diagramme d'une variété inconnue et une collection de diagrammes de références (comparaison facilitée par des clés de détermination ou actuellement par l'interrogation d'un fichier informatique) (Autran et Abbal, 1986 ; Sapirstein et Bushuk, 1987) il est possible d'identifier avec certitude la quasi totalité des variétés cultivées.

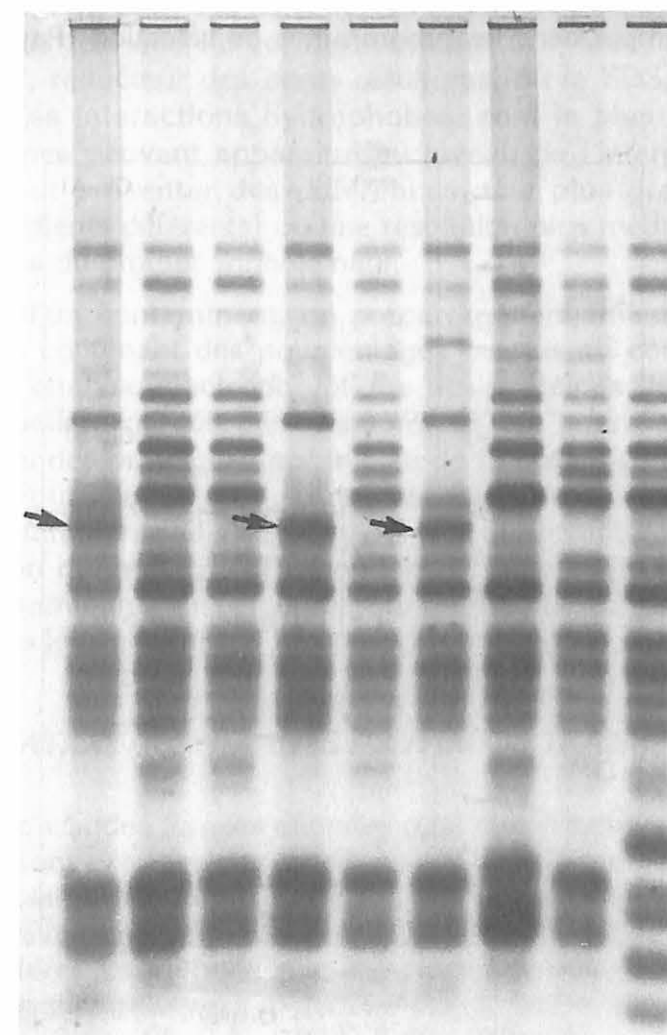


■ **Figure 15** Électrophorégrammes en gel de polyacrylamide (A-PAGE) des gliadines des principales variétés françaises de blé tendre obtenus selon la méthode officielle française d'identification variétale (tampon lactate d'aluminium, pH 3,1)  
(Photographie fournie par J. Le Brun, Institut Technique des Céréales et Fourrages)

Une autre technique jusqu'ici plutôt appliquée aux cas des blés durs et des orges est l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Dans ce système, les protéines (gluténines du blé dur, hordéines de l'orge ou du malt) extraites par un tampon Tris contenant du SDS et un réducteur (le mercaptoéthanol) se séparent en fonction de leur seul encombrement moléculaire les protéines les plus petites présentant les mobilités relatives les plus élevées (Montembault *et al.*, 1983 ; Berger et Le Brun, 1985 ; Marchylo, 1987 ; Weiss *et al.*, 1991).

#### 4.1.2 SÉLECTION VARIÉTALE DES CÉRÉALES

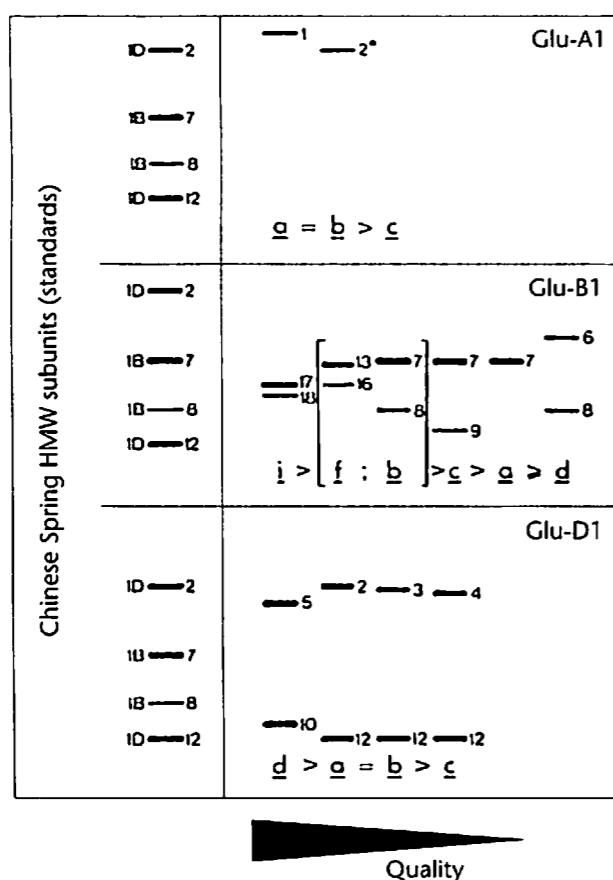
En amont de la filière des IAA, l'électrophorèse des protéines est un outil largement utilisé par les généticiens et les sélectionneurs (Autran *et al.*, 1981 ; Cooke, 1987).



■ **Figure 16** Électrophorégrammes en gel de polyacrylamide des gliadines (A-PAGE) de quelques variétés françaises de blé dur, avec indication de la bande  $\gamma$ -45, marqueur d'une recouvrance élastique élevée du gluten

Chez le blé dur, la qualité culinaire des pâtes alimentaires dépend en grande partie des propriétés viscoélastiques du gluten. L'analyse électrophorétique des gliadines en PAGE acide (*figure 16*) a permis de distinguer deux types de variétés : d'une part, des variétés possédant le constituant  $\gamma$ -gliadine 45 (associée à un gluten ferme et élastique) et, d'autre part, des variétés possédant le constituant  $\gamma$ -gliadine 42 (associée à un gluten de faibles propriétés viscoélastiques). Les  $\gamma$ -gliadines 42 et 45 correspondent en fait à deux formes alléliques d'un même gène. La mise en évidence de cette relation étroite a permis de sélectionner des blés durs ayant un fort potentiel de qualité culinaire (Damidaux *et al.*, 1978).

Chez le blé tendre, les corrélations existant entre la présence de certaines gliadines analysées en PAGE acide et la qualité boulangère des variétés se sont révélées nettement moins significatives que chez le blé dur. Par contre, l'étude du polymorphisme des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire (HMW) est apparue plus prometteuse et les relations entre le type allélique HMW mis en évidence par SDS-PAGE et la force boulangère (*figure 17*) ont pu être prises en compte dans les programmes de sélection (Payne *et al.*, 1981 ; Branlard, 1987).



■ **Figure 17** Variation allélique des sous-unités gluténines de haut poids moléculaire des blés tendres séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et relation avec la qualité boulangère (D'après Payne *et Lawrence*, 1983)

## 4.2 CONTRÔLE DE LA CONFORMITÉ DES PRODUITS AGRICOLES TRANSFORMÉS

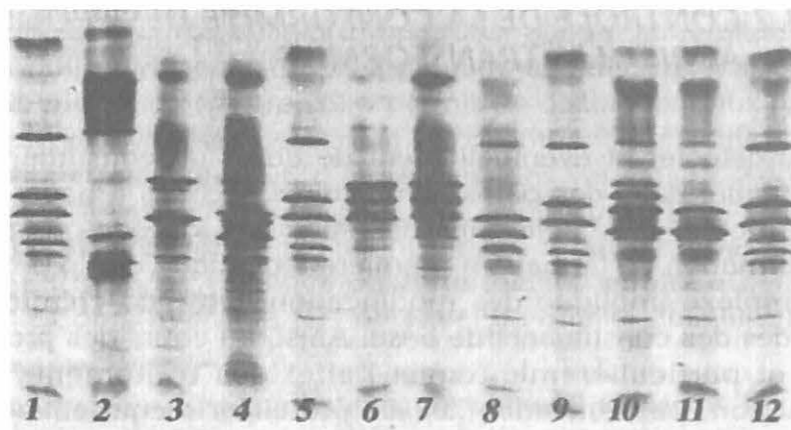
Il s'agit ici de détecter et éventuellement de doser un constituant mineur du produit : blé tendre dans des pâtes alimentaires séchées à haute température ou précuites, protéines de soja dans des saucisses ou des pâtés,... Dans ce cas, la transformation de la matière première biologique en un produit alimentaire plus complexe implique des modifications physico-chimiques plus ou moins profondes des constituants de base. Ainsi, au cours des processus technologiques, et particulièrement sous l'effet des traitements thermiques (séchage, cuisson, pasteurisation,...) les protéines réagissent avec d'autres constituants (lipides, amidon) et subissent des dénaturations souvent irréversibles qui conduisent à leur insolubilisation. Lorsque la « carte d'identité protéique » doit être établie à partir d'un produit transformé, des problèmes nouveaux se posent, tout d'abord au niveau de l'extraction des protéines (qui doit être menée en utilisant des solvants dénaturants et à plus haute température). Des réactifs tels que l'urée, destructurant des liaisons hydrogènes, le mercaptoéthanol, réducteur des ponts disulfures, ou le SDS, détergent anionique rompant les interactions hydrophobes, sont le plus souvent utilisés. D'autres problèmes peuvent apparaître au niveau de l'interprétation du diagramme, qui peut présenter des différences, une plus grande complexité (mélange d'ingrédients différents) ou une résolution plus médiocre des bandes, par rapport à celui du produit agricole natif.

Pour le dosage d'un contaminant, on prépare généralement une gamme de produits témoins contenant des pourcentages connus du contaminant. Après solubilisation et analyse électrophorétique des protéines, le diagramme est analysé, soit visuellement, soit par densitométrie. En principe, l'intensité de la coloration des bandes protéiques par le bleu de Coomassie est proportionnelle à leur quantité. Pour chaque produit, on détermine alors le rapport entre l'aire de la bande contaminante et l'aire des bandes du constituant principal, d'où une courbe étalon qui met en correspondance ces rapports et les proportions connues du contaminant. Cette courbe étalon est utilisée pour le dosage du contaminant dans les échantillons inconnus.

### 4.2.1 IDENTIFICATION DES VIANDES BRUTES OU TRANSFORMÉES

L'identification de viandes fumées et cuites peut être effectuée par IEF des protéines. Celles-ci sont extraites par un tampon SDS 4 %, mercaptoéthanol 2 % à température ambiante pendant 3 heures. L'IEF est réalisée en milieu dénaturant (urée 8 M), avec une gamme d'ampholytes de pH 4-6. L'analyse des diagrammes de différentes viandes non transformées montre qu'il est a priori possible de distinguer plusieurs espèces : bœuf, buffle, porc, cheval, dinde, chèvre et mouton (Schrøder *et al.*, 1990 ; Tao, 1989) (*figure 18*).

La cuisson et le fumage des viandes ne modifient pas notablement les électrophorogrammes. Certaines bandes sont atténuées, mais l'identification reste possible (Hoffmann *et Blüchel*, 1992).



■ **Figure 18** Identification de différentes espèces de viandes par électrofocalisation des protéines musculaires

1, bœuf ; 2, porc ; 3, kangourou rouge ; 4, kangourou gris ; 5, bœuf ; 6, dinde ; 7, cheval ; 8, buffle ; 9 bœuf ; 10, chèvre ; 11, mouton ; 12, bœuf

(D'après Tao, 1989)

#### 4.2.2 IDENTIFICATION DES ESPÈCES DE POISSONS

Un travail semblable au précédent a été réalisé sur le poisson et a abouti à la publication de catalogues électrophorétiques des espèces de poissons commercialisées. L'identification est fondée sur l'électrofocalisation ou sur l'électrophorèse SDS-PAGE des protéines sarcoplasmiques solubles (Plowman et Herbert, 1992 ; Sotelo *et al.*, 1992).

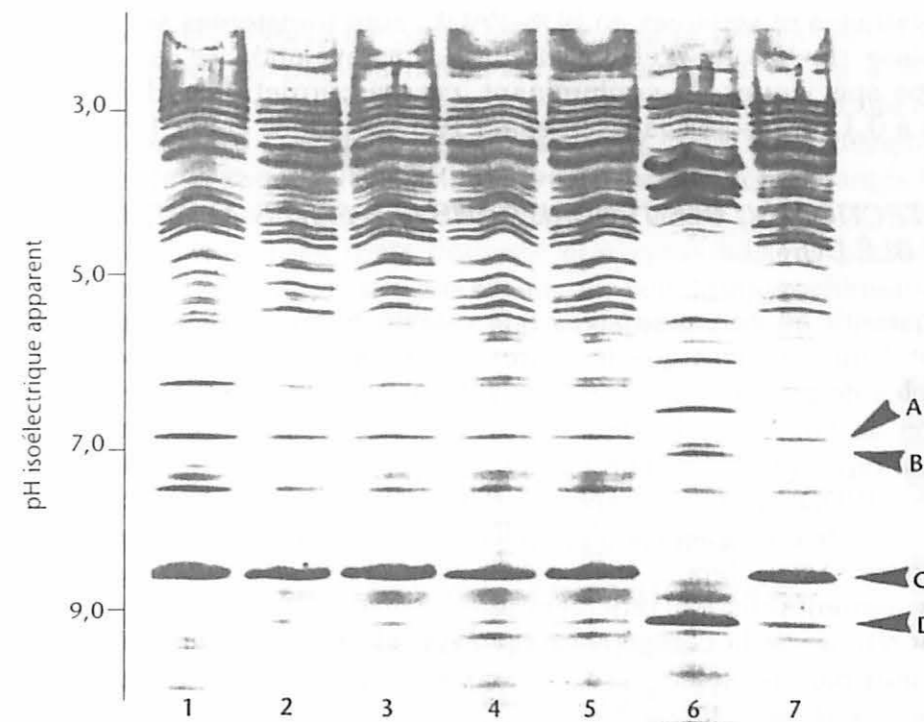
#### 4.2.3 DÉTECTION DU LAIT DE VACHE DANS LES FROMAGES DE CHÈVRE OU DE BREBIS

Les fromages de brebis ou de chèvre doivent être fabriqués exclusivement avec du lait de brebis ou de chèvre. Le lait de vache étant d'un coût inférieur à celui des laits de brebis ou de chèvre, l'ajout de lait de vache lors de la fabrication de ces fromages présente un intérêt économique et constitue une fraude (Amigo *et al.*, 1992).

La mise en évidence de cette fraude, ainsi que l'analyse des fromages au lait de mélange sont possibles par des techniques chromatographiques, électrophorétiques ou immunochimiques, appliquées soit aux caséines (Creamer, 1991 ; Mayer et Örtner, 1992 ; Ortin *et al.*, 1992), soit aux protéines du lactosérum (Rispoli et Saugues, 1989 ; Addeo *et al.*, 1989) (figure 19).

La technique d'électrophorèse, basée sur la différence de mobilité de la caséine  $\alpha_s$  de vache par rapport aux caséines  $\alpha_s$  de chèvre, présente une limite d'utilisation pour les fromages affinés ; la protéolyse résultant de l'affinage fait apparaître de nombreuses bandes sur le diagramme, le rendant ainsi difficile à interpréter.

En revanche, l'électrofocalisation des caséines ou des protéines du sérum permet l'identification des laits des différentes espèces, y compris après des affinages de 1-4 mois.



■ **Figure 19** Électrofocalisation en couche mince de gel de polyacrylamide (gradient de pH 2,5-10,0) de la fraction caséine isolée d'échantillons de fromages.

A,  $\gamma_2$  caséine ovine ; B,  $\gamma_2$  caséine bovine ; C, para- $\kappa$ -caséine ovine ; D, para- $\kappa$ -caséine bovine

(D'après Addeo *et al.*, 1989)

#### 4.2.4 DÉTECTION DE PROTÉINES ÉTRANGÈRES DANS LES PRODUITS CARNÉS

Il s'agit ici de détecter la présence de protéines végétales (soja, gluten) ou animales (lait, œuf) dans des produits carnés transformés (en général cuits ou appertisés). L'identification a été possible par SDS-PAGE, avec résolvabilisation des protéines par de l'urée (10 M) ou par du SDS (1-2 %) en présence de mercaptoéthanol (1-2 %). En général, la cuisson des produits ne modifie pas la position des bandes mais atténue leur intensité après coloration ainsi que la finesse de la séparation (Windemann, 1988).

Les protéines spécifiques de la viande (actine, myosine) se différencient bien de celle de l'œuf, du soja, ou du lait. Lorsqu'on analyse des mélanges viandes + protéines étrangères, le dosage de ces dernières reste possible du fait que les deux types de protéines ne se complexent pas au cours des traitements thermiques.

Après analyse densitométrique des diagrammes de mélanges viandes + soja soumis à un traitement thermique de 100 °C pendant 1 heure, une courbe étalon a pu être construite. On peut constater que la limite inférieure de détection avoisine 3 % de soja dans un produit carné (Feigl, 1990).

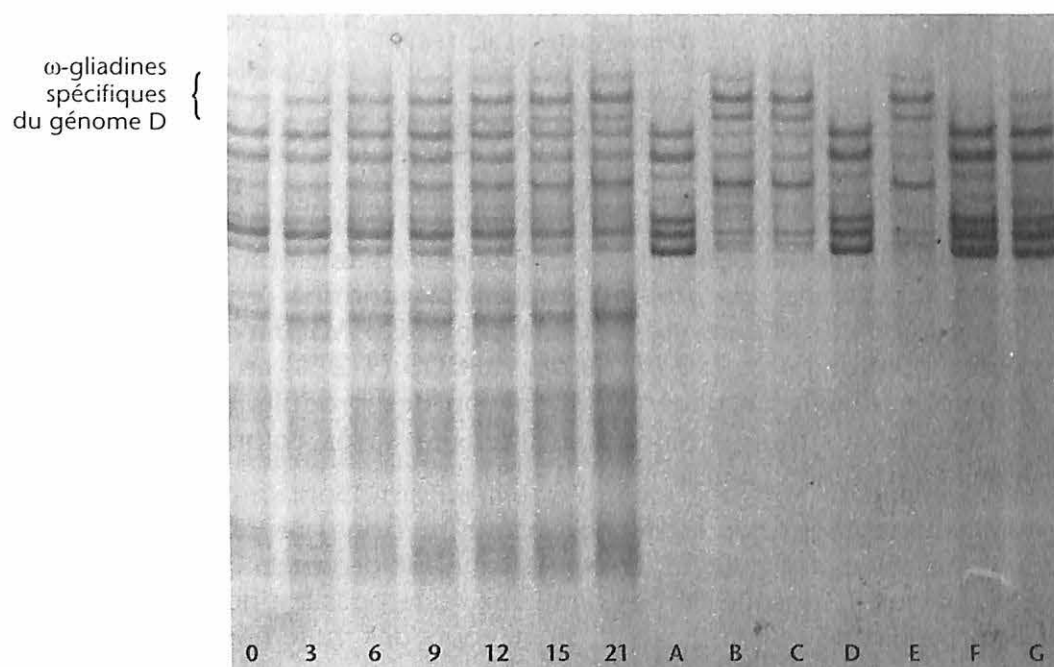
On peut cependant améliorer considérablement la sensibilité de la détection en utilisant des méthodes immunochimiques. Dans ce cas, les protéines, préala-



blement extraites et séparées en SDS-PAGE, sont transférées sur une feuille de nitrocellulose (technique d'électroblotting). La révélation se fait alors à l'aide d'anticorps spécifiques du contaminant, ce qui permet de réduire le seuil de détection à 0,1 % de soja (Janssen *et al.*, 1987 ; Hedges *et al.*, 1992).

#### 4.2.5 DÉTECTION DU BLÉ TENDRE DANS LES PÂTES ALIMENTAIRES DE BLÉ DUR

Afin de garantir au consommateur une qualité optimale, les législations française et italienne exigent que les pâtes alimentaires soient fabriquées à partir de semoules de pur blé dur (*Triticum durum*) et interdisent donc en particulier l'utilisation de farines de blé tendre (*Triticum aestivum*). Le génome des blés durs est de type AABB (28 chromosomes) alors que celui des blés tendres est de type AABBDD (42 chromosomes). On a pu mettre en évidence l'existence de diverses protéines ou enzymes, codées par le génome D et donc spécifiques du blé tendre. Ainsi, depuis 1975 en France, la recherche du blé tendre dans les pâtes alimentaires est officiellement réalisée par détection d'une bande électrophorétique de la catégorie des peroxydases (peroxydase  $\alpha$ 7D). Celles-ci sont extraites par une solution saline, sont séparées par électrophorèse PAGE à pH 8,6, puis révélées à l'aide d'une coloration spécifique de l'activité peroxydase. La comparaison des électrophorégrammes de blés tendres et de blés durs permet l'identification de la peroxydase  $\alpha$ 7D et le dosage se fait par référence à une gamme de pâtes contenant des proportions connues de blé tendre.



■ **Figure 20** Exemple de détection du blé tendre dans les pâtes alimentaires de blé dur ayant subi un séchage à très haute température à partir d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide (A-PAGE) des  $\omega$ -gliadines

A, B, C, D, E, F et G représentent des échantillons inconnus, analysés en comparaison d'une série de témoins contenant respectivement : 0, 3, 6, 9, 12, 15 et 21 % de blé tendre

Cette méthode a été remise en cause en raison de la généralisation des techniques de séchage des pâtes à haute température (> à 70 ou à 90 °C) qui entraînent l'inactivation des peroxydases (et la dénaturation de toute autre protéine thermosensible). Des travaux sont donc en cours pour développer une autre méthode de dosage, soit à partir de protéines thermorésistantes telles que les  $\omega$ -gliadines, facilement caractérisées en PAGE acide (figure 20), soit à partir de protéines dénaturées mais pouvant être resolubilisées par un solvant approprié (albumines), ou encore identifiées par voie immunochimique grâce à certains épitopes non modifiés par le traitement thermique.

## 5

### Conclusions : possibilités et limites des techniques électrophorétiques Signification à accorder aux électrophorégrammes

L'électrophorèse, sous ses formes innombrables que l'on utilise actuellement constitue un outil extrêmement puissant, universellement applicable à des fins analytiques, notamment pour l'étude du polymorphisme des constituants biochimiques et présentant, par rapport aux autres méthodes d'étude des macromolécules, des avantages décisifs du point de vue pouvoir résolutif, sensibilité, rapidité, analyses simultanées et en grandes séries de micro quantités d'échantillons.

Il convient néanmoins d'être conscient des limites des techniques électrophorétiques.

Du point de vue biochimique et génétique, il est évident que la composition protéique et les relations métaboliques entre constituants des êtres vivants sont des données infiniment complexes qui ne peuvent se résumer en quelques diagrammes électrophorétiques. Par ailleurs, ces diagrammes ne constituent qu'une image partielle et simplificatrice du véritable polymorphisme biochimique car, les techniques électrophorétiques étant fondées sur la charge électrique et l'encombrement moléculaire des constituants, la plupart des mutations ou des différences portant sur des acides aminés non chargés (c'est-à-dire 70 ou 80 % de l'ensemble), ne sont pas détectées.

Il faut également bien réaliser que la mobilité électrophorétique d'une protéine, bien que reproductible dans des conditions déterminées, ne peut pas être considérée comme une constante chimique de la protéine (comme pourrait l'être le point de fusion, la densité ou l'indice de réfraction d'un corps pur). En effet, la mobilité est fonction à la fois de la charge électrique nette et de l'encombrement moléculaire de la protéine. La charge électrique, résultante de

l'ionisation des différents acides aminés situés à la surface de la molécule, varie nécessairement en fonction du pH du milieu. Le facteur encombrement moléculaire, lui-même influencé par la présence d'agents dissociants, intervient aussi plus ou moins dans la séparation selon le pouvoir séparateur du support. Or ce pouvoir séparateur dépend beaucoup de la nature du gel utilisé, de son degré de réticulation, des catalyseurs utilisés, du mode de préparation et même de la géométrie de l'appareil.

Compte tenu de la complexité des protéines naturelles et compte tenu du fait que des constituants présentant des différences au niveau d'acides aminés non chargés ont peu de chances d'être différenciés, beaucoup de bandes électrophorétiques apparemment pures renferment en réalité plusieurs espèces moléculaires différentes. Il n'est donc pas surprenant que toute modification même mineure des conditions expérimentales puisse se traduire par des changements de mobilité, une répartition différente des constituants et donc un diagramme différent. Pour des caractérisations approfondies, on ne saurait donc trop recommander de travailler dans des conditions rigoureusement fixées, de combiner deux ou trois techniques mettant en jeu des principes différents ou d'utiliser une technique bidimensionnelle.

Lors de toute interprétation de diagramme électrophorétique, il ne faut donc jamais perdre de vue que l'égalité des mobilités de deux bandes, dans des conditions expérimentales données, ne constitue qu'une *présomption d'identification*. S'il est parfois utile de dresser un répertoire simplifié des bandes visibles (en confondant nécessairement des constituants de mobilités très voisines difficiles à différencier avec certitude), la plus grande prudence doit évidemment être observée lorsqu'on cherche à établir des corrélations à partir de telles données simplifiées.

Enfin, si les techniques électrophorétiques sont bien adaptées à l'étude du polymorphisme biochimique, il n'est pas évident qu'elles constituent les meilleurs outils possibles pour l'étude des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des constituants protéiques. Un diagramme d'électrophorèse permet en effet de faire un inventaire et un classement d'un certain nombre d'espèces moléculaires. Il ne renseigne pas (surtout dans le cas d'électrophorèses en milieu dissociant après réduction des liaisons disulfures) sur la manière dont les constituants étaient initialement associés, ou sur leur structure native. Pour bon nombre d'études, il est donc indispensable d'associer l'électrophorèse à d'autres techniques préservant la structure, les agrégats ou les complexes natifs, telles que les méthodes d'immunochimie, d'extraction sélective ou de chromatographie.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Addeo F., Moio L., Chianese L., and Nota G., 1989. Evaluation of bovine and water buffalo milk in mixtures of liquid milk and mozzarella cheese by gel isoelectric focusing. *Ital. J. Food Sci.*, 3 : 71-80.

Amigo L., Ramos M., Calhau L., and Barbosa M., 1992. Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing and immunodiffusion in determinations of cow's and goat's milk in Serra da Estrela cheeses. *Lait*, 72 (1) : 95-101.

Anderson N.G., Tollaksen S.L., Pascoe F.H., and Anderson N., 1985. Two-dimensional electrophoretic analysis of wheat seed proteins. *Crop Sci.*, 25 (4) : 667-674.

Autran J.C., 1975. Nouvelles possibilités d'identification des variétés françaises de blé par électrophorèse des gliadines du grain. *Ind. Agric. Alim.*, 9-10 : 1075-1094.

Autran J.C., 1984. Identification variétale à partir des constituants protéiques. In : *Guide pratique d'analyse dans les industries des céréales*. (B. Godon et W. Loisel, Ed.), Lavoisier-APRIA, 2, 2 : 47-67.

Autran J.C., 1986. Identification des céréales et autres plantes par électrophorèse. *Biofutur*, 51 : 121-126.

Autran J.C., 1991. Électrophorèse. In : *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires* (G. Linden, Ed.), Lavoisier-APRIA, Paris, 5 : 115-140.

Autran J.C., 1994. Wheat identification in Europe. In : *Identification of Food Grain Varieties* (C.W. Wrigley, Ed.) American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minn., USA (in press).

Autran J.C., 1995. Determination of common wheat in pasta products : an update of the achieved studies in the European (BCR) collaborative study (in German). *Getreide Mehl und Brot*, 49 (5) : 272-277.

Autran J.C., 1995. Wheat identification in Europe. In : *Identification of Food Grain Varieties* (C.W. Wrigley, Ed.), American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minn., USA : 175-199.

Autran J.C., 1996. Electrophoresis. In : *Analytical Techniques for Foods and Agricultural Products* (G. Linden, ed.), Lavoisier, Chap. 5 (in press).

Autran J.C., and Abbal P. 1988. Wheat cultivar identification by a totally automatic soft-laser densitometry and computer-aided analysis of protein electrophoregrams. *Electrophoresis*, 9 (5) : 205-213.

Autran J.C., and Galterio G. 1989. Association between electrophoretic composition of proteins, quality characteristics and agronomic attributes of durum wheats. II. Protein-Quality associations. *J. Cereal Sci.*, 9 (3) : 195-215.

Autran J.C., Berrier R., Jeanjean M.F., Joudrier P., et Kobrehel K., 1981. Emplois de l'électrophorèse dans la filière « céréales ». Possibilités et limites actuelles. *Industries des Céréales*, 8 : 3-19.

Berger M., and Le Brun J., 1985. Nouvelle clé d'identification des variétés de blé dur. *Industries des Céréales*, 37 : 17-25.

Berger M., et Le Brun J., 1986. Nouvelles méthodes d'identification variétale. *Industries des Céréales*, 40 : 11-17.

Branlard G., 1987. Prediction of bread wheat quality from HMW glutenins and gliadins. *Proc. 3rd International Workshop on Gluten Proteins*, 6-9 May, Budapest, Hongrie (F. Békés, Ed.), poster, 604-612.

Bushuk W., and Zillman R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. I. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.*, 58 : 505-515.

Charlionet R., et Rivat C., 1990. *Électrophorèse. Principes et concepts méthodologiques*. Éditions INSERM, Paris.

Chrambach A., Dunn M.J., and Radola B.J., 1992. *Advances in electrophoresis*. Vol. 5. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Chrambach A., Dunn M.J., and Radola B.J., 1993. *Advances in electrophoresis*. Vol. 6. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Cooke R.J., 1986. Gel electrophoresis : A role in agriculture. In : *Electrophoresis '86* (M.J. Dunn, Ed.), Proceedings of the Fifth Meeting of the International Electrophoresis Society, VCH, London : 203-217.

Cooke R.J., 1987. Electrophoresis in plant testing and breeding. *Adv. Electrophor.*, 2 : 171-261.

Creamer L.K., 1991. Electrophoresis of cheese. *Bull. IDF*, 261 : 14-28.

Damerval C., Zivy M., Granier F., and De Vienne D., 1987. Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophor.*, 2 : 263-340.

Damidaux R., Autran J.C., Grignac P., et Feillet P., 1978. Mise en évidence de relations applicables en sélection entre l'électrophorégramme des gliadines et les propriétés viscoélastiques du gluten de *Triticum durum* Desf. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 287, Série D : 701-704.

De Jong N., Visser S., and Olieman C., 1993. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 652 (1) : 207-213.

De Vienne D., Maurice A., Josse J.-M., Leonardi A. and Damerval C., 1994. Mapping factors controlling genetic expression. *Cell. Mol. Biol. (Paris)*, 40 (1) : 29-39.

Eddé B., 1988 a. Étude quantitative de protéines séparées par électrophorèse bidimensionnelle. *Biofutur*, 65, Supplément n° 17 : 9-12.

Eddé B., 1988 b. Électrophorèse d'ADN en champs pulsés. *Biofutur*, 65, Supplément n° 17 : 3-7.

Feigl E., 1990. Electrophoretic soja determination in frankfurter-type sausage using

commercially available SDS-containing gel plates and an apparatus for isoelectric focusing (in German). *Fleischwirtschaft*, 70 (6) : 702-703.

Fergusson K.A., 1964. Starch-gel electrophoresis application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism*, 13 : 985-1002.

Grabar P., and Williams C.A., 1953. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et de immunochimiques d'un mélange de protéines. *Biochim. Biophys. Acta*, 10 : 193-199.

Hedges B.R., Palmer R.G., and Amberger L.A., 1992. Electrophoretic analyses of soybean seed proteins. In : *Mod. Methods Plant Anal.*, New Ser., 14 (Seed Analysis) (H.-F. Linskens and J.F. Jackson, eds), Springer Verlag, Berlin : 143-158.

Hofmann K., and Blüchel E., 1992. Animal species determination of meat and products thereof previously heated at high temperatures by isoelectric focussing and sensitive silver staining. *Fleischwirtschaft*, 72 (1) : 85-89.

Janssen F.W., Voortman G., and De Baaij J.A., 1987. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining. *J. Agric. Food Chem.*, 35 (4) : 563-567.

Kobrehel K., et Gautier M.F., 1973. Genetic variability in the peroxydase composition of wheat. In : *Proc. Symp. Genetics and Breeding of durum wheat*, Bari, Italie : 527-536.

Marchylo B.A. 1987. Barley cultivar identification by SDS gradient PAGE analysis of hordein. *Can. J. Plant Sci.*, 67 (4) : 927-944.

Mayer W., and Hörtner H., 1992. Discontinuous electrophoresis of b-caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products. *Electrophoresis*, 13 : 803-804.

Montembault A., Autran J.C., Joudrier P., and Moll M., 1983. Varietal identification of barley and malt. *J. Inst. Brew*, 89 (4) : 299-303.

O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250 : 4007-4021.

O'Farrell P.Z., Goodman H.M., and O'Farrell P.H., 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12 : 1133-1142.

Ortin L., Sanchez-Albaga T., Dominguez C., and Ortin F.J., 1992. Determination of proteins in cheese made from mixtures of sheep, goat and cow milk. Use of the PhastSystem for separation of k-caseins and determination by densitometry (in Spanish). *Alimentaria (Madrid)*, 29 (234) : 27-33.

Pairaud C., 1989. L'électrophorèse capillaire. *Biofutur*, 30 : 7-11.

Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. et Britton-Davidian J., 1987. *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Ed. Lavoisier, Tec & Doc, Paris.

Payne P.I., and Lawrence G.J., 1983. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high-molecular-weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Res. Commun.*, 11 (1) : 29-35.

Payne P.I., Corfield K.G., Holt L.M. and Blackman J.A. 1981. Correlations between the inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J. Sci. Food Agric.*, 32 (1) : 51-60.

Peltre G., Lapeyre J., and David J., 1982. Heterogeneity of grass pollen allergens recognized by IgE antibodies in human patients by a new nitrocellulose immunoprint technique. *Immunol. Lett.*, 189 : 171-178.

Plowman J.E., and Herbert B.R., 1992. Identification of the species of origin of cooked fish by isoelectric focusing. *Lebensm. -Wiss. u. Technol.*, 25 (3) : 224-227.

Rabilloud T., Vincens P., Asselineau D., Penetier J.-L., Darmon L., and Tarroux P., 1994. Computer analysis of two-dimensional electrophoresis gels as a tool

in cell biology : Study of the protein expression of human keratinocytes from normal to tumor cells. *Cell. Mol. Biol.*, 40 (1) : 17-27.

Redaelli R., Morel M.H., Autran J.C., and Pogna N.E., 1995. Genetic analysis of low Mr glutenin subunits of wheat fractionated by two-dimensional electrophoresis (A-PAGE x SDS-PAGE). *J. Cereal Sci.*, 21 (1) : 5-13.

Righetti P.G., Krishnamoorthy R., Gianazza E., and Labie D., 1978. Protein titration curves by combined isoelectric focusing - electrophoresis with Hb mutant as model. *J. Chromatogr.*, 166 : 455-460.

Rispoli S., et Saugues R., 1989. Isoélectrofocalisation des lactosérums de fromages de mélange brebis-vache sur gel de polyacrylamide. Application à la recherche et au dosage du lait de vache dans les fromages de brebis. *Lait*, 69 : 211-222.

Sapirstein H.D., and Bushuk W., 1987. Computer-aided wheat cultivar identification and analysis of densitometric scanning profiles of gliadin electrophoregrams. *Seed Sci. Technol.*, 14 (3) : 489-517.

Schröder B., Horn D., and Darge W., 1990. Differentiation of animal species by isoelectric focusing with heat-treated material. Comparison of different extraction and staining methods. *Fleischwirtschaft*, 70 (1) : 102-104, 107.

Schwartz D.C., and Cantor C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37 : 67-75.

Skerritt J.H., and Hill A.S., 1990. Homologies between grain storage proteins of different cereal species. 2. Effects of assay format and grain extractant on antibody cross-reactivity. *J. Cereal Sci.*, 11 (2) : 123-141.

Sotelo C.G., Pineiro C., Gallardo J.M., and Perez-Martin R.I., 1992. Identification of fish species in smoked fish products by electrophoresis and isoelectric focusing. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 195 (3) : 224-227.

Southern E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98 : 503-517.

Tao S.H., 1989. Méthodes d'identification des espèces animales. *Revue des Industries Alimentaires*, 421 : 43-47.

Tarroux P., Vincens P., and Rabilloud T., 1987. HERMeS : A second generation approach to the automatic analysis of two-dimensional electrophoresis gels. Part V : Data analysis. *Electrophoresis*, 8 (4) : 187-199.

Thiellement H., Zivy M., de Vienne D., and Hofmann J.P., 1985. Genome expression in young wheat as revealed by two-dimensional electrophoresis of proteins at different developmental stages. *Actual Bot.*, 2 : 97-101.

Towbin H., Staehelin T., and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 4350-4354.

Urbanke W., Luf W., and Brandl E., 1992. Use of HPLC for detection and adulteration of milk and milk products of different species (in German). *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 195 (2) : 137-142.

Weiss W., Postel W., and Görg A., 1991. Barley cultivar identification. I. Sodium

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis*, 12 (5) : 323-330.

Weser J., Postel W., Gunther S., and Görg A., 1986. Horizontal high-resolution IPC-DALT of pea proteins. In : *Electrophoresis '86* (M.J. Dunn, Ed.), Proceedings of the Fifth Meeting of the International Electrophoresis Society, VCH, London : 607-610.

Windemann H. 1988. Detection of wheat proteins in foods. *Swiss Food*, 10 (4a) : 39-41.

Wrigley C.W., Autran J.C., and Bushuk W., 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In : *Advances in Cereal Science and Technology* (Y. Pomeranz, ed.), Vol V, Chap. 5, American Association of Cereal Chemists, St Paul, MN, USA : 211-259.

Zivy M., Thiellement H., de Vienne D. and Hofmann J.P. 1984. Study on nuclear and cytoplasmic genome expression in wheat by two-dimensional gel electrophoresis. 2. Genetic differences between two lines and two groups of cytoplasm at five development states. *Theor. Appl. Genet.*, 68 (4) : 335-345.

# 2

## CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE

---

**M.-F. SAMSON**  
**J.-C. AUTRAN**

---