

ELECTROPHORESE 2D

SCIENCES EN TETE BIOLOGIE-ANNEE 2020-2021

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) est l'association des techniques d'électrofocalisation et d'électrophorèse dénaturante SDS. Permettant de séparer les protéines sous l'effet d'un champ électrique selon deux critères : la charge électrique et le poids moléculaire. Cette combinaison de deux types de séparations électrophorétiques dans deux orientations différentes, permet d'obtenir un degré de résolution supérieur par rapport à chacune de ces deux méthodes. Cette technique s'effectue avec des protéines dénaturées afin de maximiser la solubilité des polypeptides et donc favoriser leur entrée dans le gel.

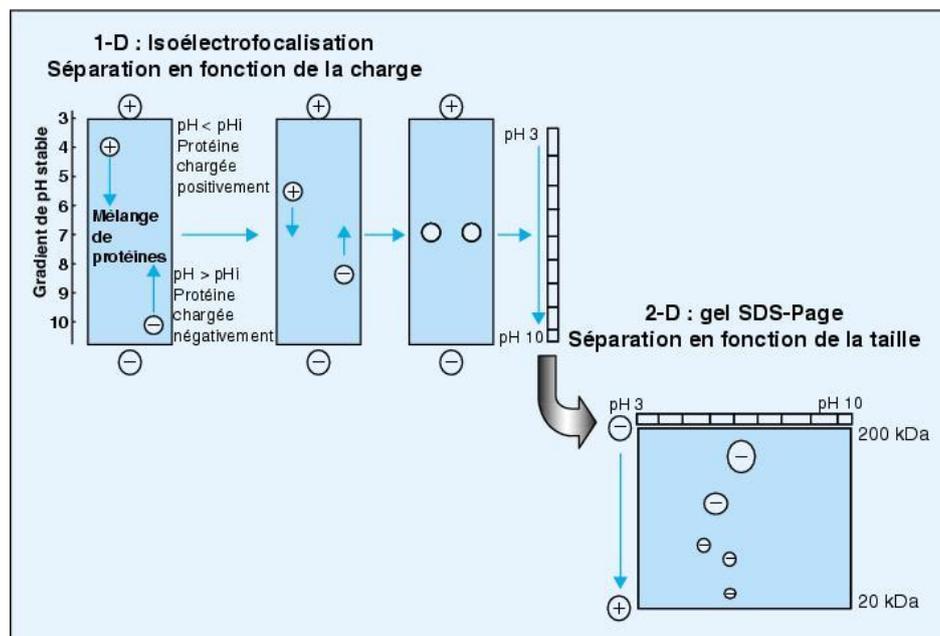
1. DEUX DIMENSIONS

1^{ère} dimension : Isoélectrofocalisation (IEF)

Les protéines sont soumises à un champ électrique dans un gel à gradient de pH immobilisé. Migration dans la gamme de pH la plus étendue possible jusqu'à une position où la valeur du pH est égale au point isoélectrique (pI). Ce point correspond au pH pour lequel la charge électrique globale de la protéine est nulle.

2^e dimension : SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Correspond à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à concentration variable (de 5 à 12%) en présence d'un agent dénaturant, le dodécylsulfate de sodium (SDS). Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire : celles chargées négativement migrent vers l'anode (+). Les plus petites protéines migrent plus rapidement et plus loin.



Schématisation des étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle (Dupont, 2005)



2. DÉTECTION

Les protéines sont ensuite détectées par différentes colorations des gels :

- Bleu de Coomassie : l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de protéines. La détection minimale est de 100 ng de protéine par spot.
- Nitrate d'argent : x1000 plus sensible à la quantité de protéines détectées. Cependant, la reproductibilité reste difficile et certaines protéines ne sont pas colorées par cette méthode.
- Réactifs fluorescents (Sypro) : la méthode est équivalente au nitrate d'argent au niveau de la sensibilité et de l'intensité de coloration, mais avec une meilleure reproductibilité, facilité et rapidité.

Par la suite, il est possible de réaliser une spectrométrie de masse permettant de séquencer des protéines après les avoir fragmentées (*cf. fiche spectrométrie de masse*).

AVANTAGES ET INCONVENIENTS

Avantages	Inconvénients
Identification de certaines modifications post-traductionnelles : acétylation, hydroxylation, méthylation, palmitoylation...	Ne convient pas aux protéines faiblement exprimées, ni très hydrophobes, ni aux protéines membranaires.
Séparation simultanément de plusieurs milliers de polypeptides d'un mélange complexe	Ne donne pas la fonction des protéines révélées (sauf si on dispose d'anticorps).
Permet d'obtenir le protéome	

APPLICATIONS

Cette technique permet d'identifier des protéines, mais également des anomalies. Par exemple dans les chaînes de globines, les hémoglobinopathies peuvent être détectées par l'électrophorèse 2D. Le but est d'étudier le phénotype hémoglobinique qui comporte des anomalies à la fois quantitatives et qualitatives : défaut de synthèse, variation de la solubilité...

SOURCES ET EN SAVOIR PLUS

Contribution of proteomic analysis to study cardiovascular physiopathology. Annales de Biologie Clinique, volume 63, 2005.

L'électrophorèse bidimensionnelle des protéines dénaturées

<https://www.gazettelabo.fr/archives/pratic/1995/1elecbi.htm>



Outils protéomique

<https://tecfa.unige.ch/perso/lombardf/bist/ressources/prot-gels-2d-intro.pdf>

Sujet de TP Synthèse L2 - Etienne BLANC

Techniques d'analyse du protéome - Introduction à la protéomique

<http://www.takween.com/techniques/proteomique.html#:~:text=Elle%20pr%C3%A9sente%20n%C3%A9anmoins%20certains%20inconv%C3%A9nients,pas%20color%C3%A9es%20par%20cette%20m%C3%A9thode.>