

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET

معهد علوم البيطرة

INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES

قسم الصحة الحيوانية

DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE



Projet de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Docteur Vétérinaire

Présenté par :
Belaouedj Rim
Batache Kadia Hanane

Thème

***L'ELECTROPHORESE EN
MEDECINE VETERINAIRE***

Soutenu publiquement le :

Jury :

Président : Saim Mohamed Said

Encadreur : Aggad Hebib

Examineur: Derrer Sofiane

Grade :

M.C.A.

Professeur

M.C.A.

Année Universitaire 2020-2021

SOMMAIRE

- REMERCIEMENTS	I
- LISTE DES FIGURES	II
- LISTE DES ABREVIATIONS	II
- RESUME	III
- INTRODUCTION	1
- I- HISTOIRE DE L'ELECTROPHORESE.....	2
- II- PRINCIPES ET PRATIQUE.....	4
- III- FACTEURS DE LA MIGRATION	6
- IV- FONCTIONNEMENT	9
- V- AUTRES ELECTROPHORESES	14
- VI- EXEMPLES D'APPLICATION	18
- CONCLUSION.....	23
- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	24

REMERCIEMENTS

Nos remerciements les plus chaleureux à la famille Belaouedj et à la famille Batache pour tous les sacrifices consentis, que Dieu vous préserve et vous donne longue vie

Nos plus vifs remerciements à nos membres de jury: Dr Saim Mohamed Said et Dr Derrer Sofiane pour avoir accepté de juger ce travail.

De même, nous remercions profondément notre encadreur Mr AGGAD Hebib pour nous avoir donné l'opportunité d'aborder ce thème et de réaliser cette étude, aussi pour les efforts fournis pour nous orienter vers la bonne voie et vers le bon esprit scientifique.

Nous remercions aussi les techniciens de laboratoire qui nous ont aidé tout au long de notre étude.

Finalement, notre gratitude va à l'ensemble des responsables, des professeurs et des travailleurs de l'institut de science vétérinaire de Tiaret ainsi qu'à toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide de près ou de loin

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Principe et fonctionnement de l'électrophorèse	8
Figure 02 : Générateur et cuve d'électrophorèse et peignes	11
Figure 03 : Réactifs d'électrophorèse disponibles au niveau du laboratoire.....	13

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

RT-PCR : PCR Real Time

Kb: Kilobase

BEI : Bromure d'éthidium

TBE : Tris, Borate, EDTA

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

المخلص:

الرحلان الكهربائي هو تقنية لتحريك الأيونات (الجزيئات التي فقدت حيادها الكهربائي) تحت تأثير المجال الكهربائي. تهاجر هذه نحو القطب الخاص بها: تهاجر الأنيونات (ذات الشحنة السالبة) نحو القطب الموجب (الجهد الموجب) وتهاجر الكاتيونات (المشحونة إيجاباً) نحو القطب السالب (الجهد السالب). فيما يتعلق بالجزيئات غير المشحونة ، لا توجد هجرة. نظرًا لخصائصها المحددة وظروف الرحلان الكهربائي ، تختلف سرعة الترحيل والمسافة المقطوعة في المصفوفة بواسطة هذه الأيونات. هذا يسمح لهم بالانفصال.

الكلمات المفتاحية: الرحلان الكهربائي ، المادة ، الكواشف ، الأيونات

RESUME

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

Mots clés : Electrophorèse, matériel, réactifs, ions.

Abstract

Electrophoresis is a technique for moving ions (molecules that have lost their electrical neutrality) under the effect of an electric field. These migrate towards their respective electrode: the anions (negatively charged) migrate towards the anode (positive potential) and the cations (positively charged) migrate towards the cathode (negative potential). Regarding uncharged molecules, there is no migration. Due to their specific characteristics and the conditions of electrophoresis, the speed of migration and the distance traveled in the matrix by these ions differ. This allows them to be separated and studied.

Keywords: Electrophoresis, material, reagents, ions.

INTRODUCTION

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation particulièrement efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN, l'ARN et les protéines en fonction de leur masse moléculaire.

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

Bien que l'électrophorèse sur gel d'agarose soit une technique simple et aisée, elle possède un pouvoir de séparation efficace.

Après la migration d'électrophorèse, le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN fluorescente. Les bandes peuvent être alors découpées et séparées du gel, puis dissoutes afin de récupérer l'ADN purifié.

L'objectif de ce travail est de donner des informations plus approfondies sur cette méthode de séparation et de détection des biomolécules citées plus haut, c'est dire développer une compréhension de base de la théorie de l'électrophorèse et d'acquérir une familiarité pratique avec les processus de séparation de diverses molécules par électrophorèse horizontale sur gel.

I- HISTOIRE DE L'ELECTROPHORESE

L'origine de cette technique a été imaginée par S.E. Linder et H. Picton en 1892. Ils se sont inspirés des études de Hermann Von Helmholtz menées sur l'électro-osmose. Celui-ci constate qu'il est possible, sous un champ électrique, de déplacer des particules chargées vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1937, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, met au point la première électrophorèse:

- l'électrophorèse libre. Cette technique lui a permis de séparer les protéines du sérum sanguin en appliquant un champ électrique. La solution est placée dans un tube en U de section carrée afin de réaliser des mesures optiques au travers du tube.

Il a pu ainsi obtenir sur le pôle + des protéines de charge très négative comme l'albumine et sur le pôle - des protéines de charge plus positive comme les globulines.

Cette technique ne permet toutefois pas de séparer totalement les protéines. Il est néanmoins possible de mettre en évidence les frontières formées par des méthodes optiques comme la fluorescence, l'absorption des UV ou l'indice de réfraction.

En 1939, P. König et D Von Klobusitzky ont séparé avec succès les composants du venin de serpent en élaborant la technique d'électrophorèse sur papier.

En 1952, Pierre Grabar élabore, en collaboration avec C.A. Williams, une méthode connue sous le nom d'analyse immuno-électrophorétique, qui permet d'analyser de manière précise des mélanges très complexes d'antigènes. Dès la première application de cette méthode à l'analyse du sérum sanguin humain, il parvient à déceler dans le sérum plus de 30 constituants indépendants, alors que l'électrophorèse en veine liquide ou sur papier ne permettait d'isoler que 5 ou 6 groupes de protéines. La méthode est rapidement utilisée dans de nombreux laboratoires médicaux pour des besoins de diagnostics.

En 1955, O. Smithies met au point la technique d'électrophorèse en gel d'amidon. En 1957, Joachim Kohn sépare les différents phénotypes de l'hémoglobine en élaborant la technique d'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose.

En 1969, Beber et Osborn introduisent l'agent dénaturant SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) pour séparer les différentes sous-unités protéiques.

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse est donc une technique d'analyse et de séparation basée sur les critères de la charge électrique et la taille des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ.

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles. Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées. En fonction de différents paramètres (charge, masse, forme, nature du support, conditions physico-chimiques) la vitesse de migration va être variable, ce qui permet la séparation des différentes molécules. A partir de ce principe général, il existe plusieurs variantes de cette technique adaptées à différentes situations.

Le choix du support est dicté par la nature des molécules à séparer et selon le support on distingue deux types d'électrophorèse :

L'électrophorèse libre, en veine liquide selon Tiselius (1937), est réalisée dans un tube en U de section carrée (ceci afin de pouvoir réaliser des mesures optiques au travers du tube, comme avec une cuve de spectrophotomètre) : la séparation n'est pas totale, mais les

frontières qui se forment sont mises en évidence par des méthodes optiques (absorption UV,

indice de réfraction, fluorescence...). Cette méthode est utilisée en recherche pour mesurer la

mobilité électrophorétique et pour vérifier la pureté des protéines.

II- PRINCIPES ET PRATIQUE DE L'ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

1- SÉCURITÉ EN LABORATOIRE

L'utilisation courante de gants et lunettes de protection est une bonne pratique de laboratoire.

Soyez prudent avec l'utilisation d'appareils pour chauffer ou fondre des réactifs.

Ne pipetez pas de réactifs à la bouche - utilisez les pro-pipettes.

Soyez prudent en vous servant d'équipement électrique dans le laboratoire.

Se laver toujours soigneusement les mains avec du savon et de l'eau après avoir touché des réactifs ou des matériaux biologiques en laboratoire.

2- CAHIERS DE LABORATOIRE

Les scientifiques documentent tout ce qui se passe pendant une expérience: les conditions expérimentales, leurs idées, leurs observations et, bien sûr, toutes les données découlant de l'expérience.

Aujourd'hui, vous prendrez des notes sur votre expérience dans un cahier de laboratoire ou sur une fiche en papier.

3- RAPPELS THEORIQUES

Elle est utilisée à des fins analytiques: pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité, -ou à des fins préparatives, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue.

La taille des fragments qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kb. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI).

On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng).

L'électrophorèse en gel d'agarose est donc une technique très sensible; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre.

3.1. Structure de l'agarose :

L'agarose est un polyside hautement purifié extrait de l'agar. Ce polymère linéaire est constitué de la répétition d'un motif de type diholoside.

L'agarose n'est pas chargé électriquement. Seuls sont retrouvés dans la plupart des préparations quelques anions tels des pyruvates et des sulfates qui peuvent provoquer une certaine endosmose.

L'agarose ultrapur utilisé en biologie moléculaire a en général une teneur en sulfates inférieure à 0,35 % et ne donne donc lieu qu'à un très faible courant d'électroendosmose.

3.2. Propriétés de l'agarose :

L'agarose est une poudre blanche qui se dissout dans l'eau à ébullition. La solution d'agarose reste à l'état liquide tant que la température est supérieure à 40-45 °C (surfusion) Quand la température devient inférieure à 40°C, la solution se solidifie en un gel stable qui ne fond pas tant que la température reste inférieure à 100 °C. La réticulation d'un gel dépend de sa concentration en agarose: la taille des pores est d'autant plus petite que la concentration de l'agarose dans le gel est plus élevée. On utilise le plus souvent des concentrations allant de 0,4 à 2 % (masse/volume). La cohésion entre des chaînes polyosidiques est maintenue par des liaisons faibles, hydrogènes essentiellement. Les gels d'agarose sont donc fragiles, on doit les manipuler avec précaution.

L'agarose à bas point de fusion se liquéfie à 65°C (en dessous de la Tm de la plus part des acides nucléiques), reste liquide à 37°C, mais se fige rapidement à 25°C. Les caractéristiques de résolution de cet agarose sont semblables à celles de l'agarose classique. Ses propriétés le destinent à la récupération de fragments d'ADN après électrophorèse.

4- MATERIEL D'ELECTROPHORESE

Pour réaliser des électrophorèses horizontales. L'appareillage comporte:

- une cuve pour électrophorèse
- un support où le gel est coulé
- des peignes pour la formation des puits (où sont déposés les échantillons).

Plusieurs types d'appareillage sont disponibles dans le commerce: - pour la réalisation de mini gels : avantages consommation d'agarose faible migration rapide (30 à 60 minutes) inconvénients nombre de dépôts faibles (8) volume des puits faible (8 à 20uL) utilisation systématique pour les contrôles rapides - pour la réalisation de grands gels avantages nombre de dépôts élevé (20 ou plus) volume des puits important (20 à 50 uL) meilleure séparation des fragments inconvénient migration longue (quelques heures) utilisation analytique et préparative

III. FACTEURS DE LA MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

A pH neutre les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence des phosphates et migrent donc vers l'anode quand elles sont soumises à un champ électrique. Leur rapport charge/taille étant constant, ces molécules se séparent essentiellement en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers le réseau d'agarose. La séparation est ainsi assurée par l'effet de filtration du gel. La vitesse de migration d'une molécule d'ADN est fonction de deux paramètres: sa taille et la concentration en agarose du gel, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également.

1. Taille et conformation de l'ADN

Les molécules d'ADN bicaténaires linéaires migrent en fonction de leur longueur: La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases.

Les molécules d'ADN plasmidiques circulaires se présentent sous trois conformations de taille identique:

- la forme surenroulée (forme 1 ou circulaire contrainte), - la forme relâchée (forme 2), résultant d'une coupure d'un des brins qui entraîne la disparition du surenroulement, - la forme linéaire (forme 3) résultant d'une coupure des deux brins. La forme I migre le plus rapidement puis ensuite la forme 3, la plus retardée étant la forme 2.

2. Concentration en agarose

La concentration en agarose est exprimée en % masse d'agarose/volume de gel. Un fragment d'ADN d'une taille donnée migre d'autant plus vite que le pourcentage d'agarose est plus faible. Un gel de concentration donnée permet donc de séparer une fourchette donnée de fragments d'ADN, comme le montre le tableau ci-dessous.

concentration en agarose	domaines de séparation de molécules d'ADN bicaténaire linéaire (taille en kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2,0	0,1-2

3. Autres facteurs

Tension du courant Pour une tension faible, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle à cette grandeur. D'une manière générale, la résolution des fragments est d'autant meilleure que le voltage est faible, idéalement 5 V par cm de gel.

4. TAMPON

Deux tampons d'électrophorèse sont surtout utilisés:

- tampon TAE: Tris Acétate EDTA => Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM; pH 7,8
- tampon TBE: Tris Borate EDTA => Tris-borate 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,2

Dans des gels identiques et à intensité constante, la migration est plus rapide dans le TBE que dans le TAE. Le tampon TBE est le plus souvent utilisé pour les contrôles rapides mais l'ADN s'élue difficilement de ce type de gel.

Pour la récupération de fragments d'ADN on utilise de préférence le TAE. Température La vitesse de migration n'est pas modifiée entre 4 et 30°C: on peut donc faire migrer les gels à température ambiante.

5. SUIVI DE LA MIGRATION ET REVELATION

5.1 Suivi de la migration

Les échantillons d'ADN avant d'être déposés dans les puits sont mélangés avec une solution de charge qui contient: - un alourdisseur (glycérol ou Ficoll ou saccharose) pour entraîner l'ADN au fond des puits - des marqueurs de mobilité (bleu de bromophénol et xylène cyanol), - éventuellement un agent dénaturant (SDS) pour arrêter les réactions enzymatiques Les deux marqueurs migrent à des vitesses différentes: le bleu de bromophénol (violet) migre avec les fragments de petite taille, le xylène cyanol (bleu turquoise) avec les fragments de grande taille. On peut ainsi suivre indirectement la migration de l'ADN.

5.2 Révélation

LE bromure d'éthidium (BET) est un colorant fluorescent très utilisé en biologie moléculaire pour le marquage et la détection des acides nucléiques. Du fait de la planéité de sa structure, cette molécule possède la propriété de s'insérer entre les paires de base des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée Elle est révélée par excitation sous illumination par UV courts (vers 300 nm) en plaçant le gel sur un transilluminateur ("table UV"). Le BET doit être manipulé avec d'extrêmes précautions car c'est un produit hautement mutagène. Une photographie du gel peut être prise avec un appareil instantané (Polaroid) et conservée.

6. ETALONNAGE DU GEL

On étalonne les gels avec des marqueurs de taille. Un marqueur de taille est un mélange de fragments d'ADN linéaires bicaténaires dont les tailles sont connues.

Il existe deux types de marqueurs de taille: - Des marqueurs fabriqués à partir d'une molécule d'ADN naturelle digérée par des endonucléases de restriction. Un marqueur de ce type, très fréquemment utilisé, est l'ADN du phage lambda digéré par une ou deux endonucléases.

Comme la séquence de l'ADN de lambda est connue on peut calculer le nombre et la taille des fragments obtenus par digestion avec n'importe quelle endonucléase de restriction. Ce marqueur peut être soit préparé au laboratoire, soit acheté dans le commerce.

Des marqueurs existent dans le commerce, ils sont composés d'une série de fragments, chacun constitué de une à plusieurs répétitions d'un segment d'ADN de taille connue. En plus de ces 12 fragments, l'échelle contient des fragments qui varient entre 75 et 1636 pb. Ce marqueur peut être utilisé pour mesurer des fragments d'ADN linéaires bicaténaires longs de 0,5 à 12 kb.

L'agarose est un polysaccharide dérivé de l'agar. Ce composant est constitué d'un mélange d'agarose et d'hydrocolloïdes qui rend le gel transparent et résistant. Le gel contient des capillaires microscopiques qui agissent en tant que "tamis" moléculaires. Les propriétés du gel conditionnent la vitesse de migration des molécules: les petites molécules migrent plus rapidement que les grandes.

De plus, des molécules de même masse et charge peuvent présenter des formes différentes : celles de forme plus compacte (les formes arrondies sont plus compactes que les formes allongées) migrent plus rapidement.

Des facteurs tels que la charge, la taille et la forme des molécules, ainsi que les conditions de tamponnage, la concentration du gel et la tension électrique, ont un impact sur la mobilité des molécules dans le gel. Parmi des molécules de masse et de forme moléculaire semblable, les plus chargées migreront plus vite. Par ailleurs, différentes molécules interagissent à des degrés variables avec l'agarose. Moins l'interaction est aisée, plus la migration des molécules est ralentie.

Le gel est fabriqué à travers la dissolution de poudre d'agarose dans de la solution tampon bouillante. La solution est ensuite refroidie jusqu'à 60° C, puis versée dans un plateau de support, où elle se solidifie. Le support est alors submergé dans un appareil d'électrophorèse à électrodes contenant de la solution tampon.

Afin de les préparer pour l'électrophorèse, les échantillons sont mélangés avec des composants qui leur donnent plus de densité, tels le glycérol ou le sucre.

Ces derniers rendent les échantillons plus denses que le tampon d'électrophorèse. Les échantillons peuvent alors être déposés à l'aide d'une micropipette ou d'une pipette de transfert dans des encoches créées dans le gel à partir d'un gabarit lors du coulage. Grâce à leur densité, les échantillons sont submergés dans la solution tampon et demeurent dans les puits.

IV- FONCTIONNEMENT

L'appareil d'électrophorèse est branché à une source de courant continu direct et mis sous tension. Les molécules chargées contenues dans les échantillons pénètrent alors le gel à travers des capillaires. Les molécules dont la charge nette est négative migrent vers l'électrode positive de l'appareil d'électrophorèse (anode), alors que les molécules dont la charge nette est positive migrent vers l'électrode négative (cathode).

Dans une certaine mesure, plus le champ électrique est fort, plus les molécules migrent rapidement. Le tampon sert à la fois de conducteur à l'électricité et de contrôle du pH. En effet, le pH influence la charge et la stabilité des molécules biologiques.

1- DISPOSITIF EXPERIMENTAL

La figure suivante résume les principales étapes de l'électrophorèse, depuis le coulage de l'agarose, jusque la visualisation lecture du gel (Figure 01).

1. La durée de chauffage varie en fonction du volume total de la solution tampon.
2. Laisser refroidir la solution d'agarose jusqu'à 60°C en tournoyant délicatement afin que la chaleur se dissipe uniformément. S'il y a eu de l'évaporation, ajouter de l'eau distillée pour maintenir le volume de concentration indiqué sur la fiole dans l'étape 3.
3. Distribuer le volume de solution d'agarose refroidie nécessaire au coulage de gels individuels. Prévoir 30 ml pour des supports de 7x7 cm, 50 ml pour des supports de 7x10 cm, et 60 ml pour des supports de 7x14 cm.
4. Laisser le gel finir de se solidifier. Il se raffermira et refroidira au bout d'une vingtaine de mn.

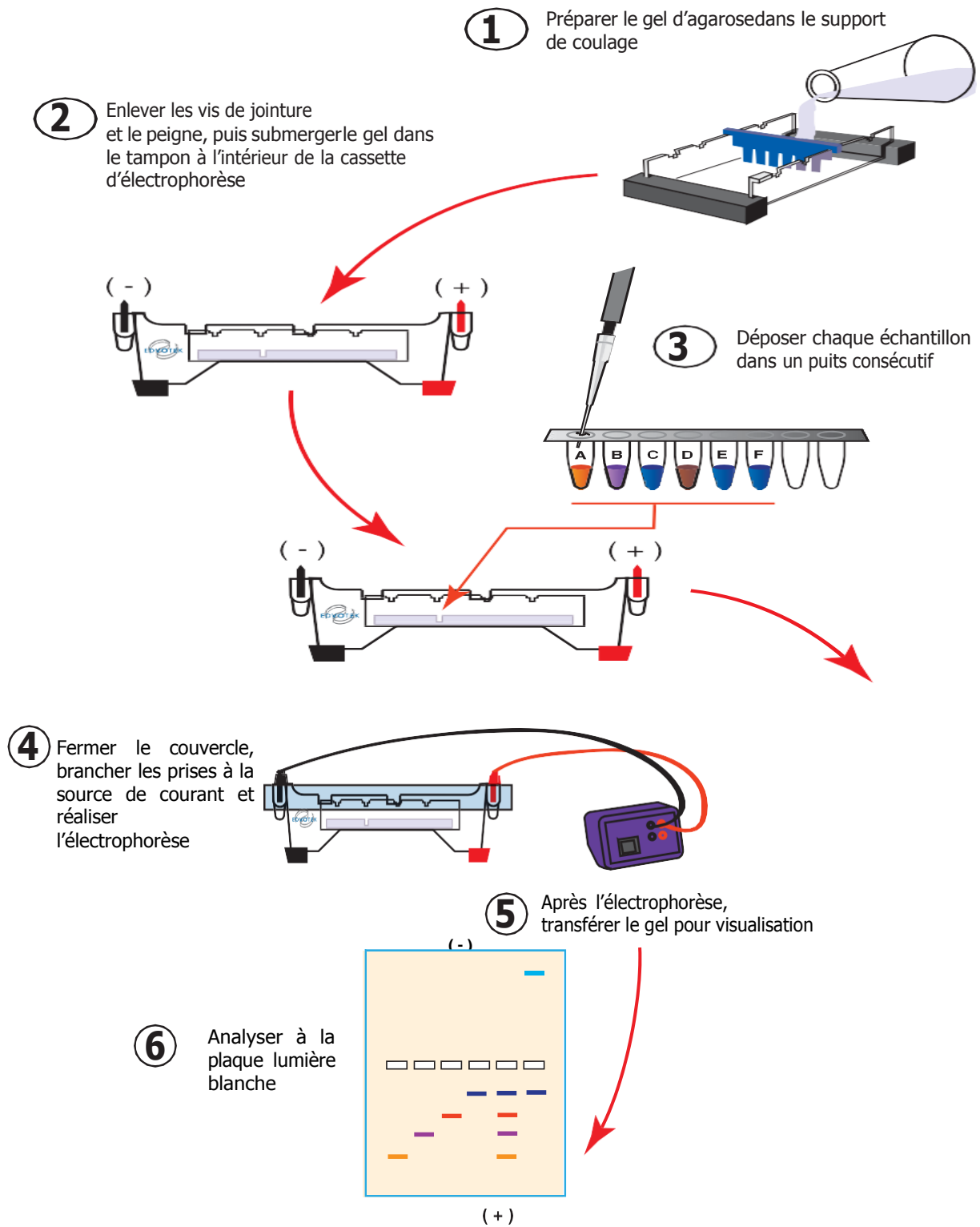


Figure 01 : Principe et fonctionnement de l'électrophorèse

1. DILUER le tampon concentré (50x) avec de l'eau distillée afin d'obtenir du tampon 1x (Tableau A).
2. MELANGER la poudre d'agarose avec le tampon 1x dans une fiole de 250 ml.
3. DISSOUDRE la poudre d'agarose en faisant bouillir la solution. CHAUFFER la solution dans le microondes à haute température pendant 1 minute. RETIRER soigneusement la fiole du microondes et MELANGER la solution en faisant tourner la fiole. Continuer à CHAUFFER la solution par périodes de 15 minutes jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissolue (la solution doit être claire, comme de l'eau).
4. Laisser REFROIDIR l'agarose jusqu'à 60°C en tournant délicatement la fiole afin de permettre une dissipation régulière de la chaleur.
5. Pendant que l'agarose refroidit, FERMER le support de coulage à l'aide des vis de jointure caoutchoutées.
PLACER le gabarit (peigne) dans la fente centrale.
6. VERSER la solution d'agarose refroidie dans le support de coulage. Le gel devrait se solidifier au bout d'une vingtaine de minutes maximum. Le gel se raffermira et deviendra moins transparent en se solidifiant.
7. ENLEVER les vis de jointure et le peigne. En enlevant le peigne en évitant d'endommager les puits.
8. PLACER le gel (le support) dans la cassette d'électrophorèse. COUVRIR le gel avec le tampon d'électrophorèse 1x (voir Tableau B contenant les volumes recommandés). Le gel doit être submergé dans son intégrité.
9. DEPOSER les échantillons (35- 38 µL) dans les puits dans l'ordre indiqué dans le Tableau 1.
10. FERMER le couvercle de sécurité. VERIFIER que le gel soit placé dans la direction correcte.
11. BRANCHER les prises à la source de courant et REALISER l'électrophorèse (voir Tableau C contenant les durées et les tensions).

12. Une fois que l'électrophorèse a été complétée, RETIRER le gel et le support de coulage de la cassette d'électrophorèse et VISUALISER le gel d'agarose.

Afin d'obtenir de meilleurs résultats, il est recommandé l'utilisation de 7x14 cm de gel et le placement du gabarit (peigne) dans la fente du milieu. On peut préparer les gels en avance ou de permettre aux élèves de les préparer eux-mêmes.

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 tamisage moléculaire.

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

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 tamisage 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 tamisage 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.

1.1 Préparation individuelle de gel

Afin de gagner du temps, une quantité plus importante de solution d'agarose peut être préparée à l'avance et distribuée plus tard en classe.

Les gels peuvent être préparés à l'avance et conservés pour une utilisation postérieure. Les gels solidifiés peuvent être stockés sous tampon dans le réfrigérateur pendant un maximum de deux semaines.

Ne pas laisser les gels geler à -20°C car cela les détruirait.

Les gels qui ont été retirés des plateaux de support pour stockage doivent être refixés aux supports à l'aide de quelques gouttes d'agarose fondue. Ceci les empêchera de glisser dans les plateaux et les cuvettes.

La séparation moléculaire est basée non seulement sur la mobilité électrophorétique des molécules, mais aussi sur le principe de filtration sur gel

- les gels d'électrophorèse retardent les molécules de taille plus grande, ce qui est l'inverse de la filtration par gel.

Les molécules anioniques (-) \square migrent vers l'anode (+)

Les molécules cationiques (+) \square se déplacent vers la cathode (-).

V. AUTRES ELECTROPHORESES

- Bn-page (blue native page) : permet de séparer des complexes de protéines issus de broyat cellulaire (ex: complexes de la chaîne respiratoire)
- Electrophorèse bidimensionnelle; couple une isofocalisation à une migration en fonction de la taille (sds-page)
- Electrophorèse en champ pulsée : permet de séparer de très grosses molécules d'ADN. Alternance de 2 champs électriques orthogonaux, la vitesse à laquelle les molécules sont capables de s'orienter dans le sens du courant est fonction de leur taille.

-Immunoélectrophorèse

La révélation est basée sur une réaction "antigène-anticorps". On mettra de côté l'immunoblot, qui consiste à visualiser des protéines sur un gel (la fixation d'Ac étant révélée par un second anticorps marqué). Les techniques ci-dessous utilisent le fait qu'à des concentrations adéquates, du fait de la présence de familles d'anticorps (polyclonaux) et de la bivalence de ces anticorps, il se forme des agrégats (= réaction d'immunoprécipitation. Ce précipité est ensuite coloré selon les techniques classiques.

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

-Immuno-électrophorèse de Grabar et Williams

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

-Electro-immunodiffusion double (= électrosynérèse)

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

-Electro-immunodiffusion monodimensionnelle (Laurell)

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

-Electro-immunodiffusion bidimensionnelle (Laurell)

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

-Electrophorèse en champs pulsés

Cette technique est utilisée pour l'électrophorèse des molécules d'ADN de haut poids moléculaire (15 -100 kb). Dans cette gamme de taille (au-delà de 20 kb), les molécules ne sont plus séparées par les méthodes classiques, car la migration devient indépendante de la taille (le déplacement de ces molécules cylindriques ayant toutes le même diamètre s'effectuant par "reptation"). L'emploi de deux champs orthogonaux utilisés en alternance fait que les molécules d'ADN, qui mettent un certain temps à s'orienter dans le sens du champ électrique, ne migrent que lorsque celle-ci est réalisée. Le temps nécessaire à l'orientation est d'autant plus grand que la molécule d'ADN est longue.

Il devient alors possible de séparer les molécules en fonction de leur longueur. Cette méthode s'avère très utile dans les analyses du génôme des procaryotes et des eucaryotes.

-Electrophorèse capillaire

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50 μm et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 -30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans le capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption UV, fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (on injecte seulement quelques nanolitres de l'échantillon).

Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides,... le nombre de plateaux est de l'ordre de 500000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable (on peut séparer des peptides différant d'un acide aminé, des mélanges complexes d'oligonucléotides, des fragments tryptiques de peptides ; la méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse,...). La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés.

Electrophorèse capillaire en solution libre (FSCE)

Dans l'électrophorèse capillaire, le courant d'endosmose est la force dominante (il entraîne tous les solutés quelle que soit leur charge) et il dépend des charges présentes sur la paroi du capillaire (qui est fonction du pH); ce courant diminue à pH acide.

Dans l'électrophorèse capillaire, le courant d'endosmose est la force dominante (il entraîne tous les solutés quelle que soit leur charge) et il dépend des charges présentes sur la paroi du capillaire (qui est fonction du pH); ce courant diminue à pH acide.

Electrophorèse capillaire micellaire (MCE)

Les micelles de détergent (SDS) forment une phase pseudo-stationnaire et le soluté se partage entre celle-ci et la phase mobile. Les substances les plus apolaires sont davantage "retenues" et la séparation obtenue s'apparente à celle de la HPLC en phase inverse.

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 cc 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

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).

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 Dissoudre et filtrer. Rajouter 50ml - 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 %

VI- EXEMPLES D'APPLICATION 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, etc).

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 SOS 4 %, mercaptoéthanol 2 % a 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 (Schrcoder et al., 1990 ; Tao, 1989) (figure 18).

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

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 de 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 α_1 de vache par rapport aux caséines α_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.

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 résolubilisation 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, préalablement 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).

POSSIBILITES ET LIMITES DES TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

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 résolusif, 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.

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.

CONCLUSION

L'électrophorèse est une technique séparative. Elle est utilisée le plus souvent dans un but analytique mais également parfois pour purifier des molécules solubles.

Le principe consiste à soumettre un mélange de molécules à un champ électrique ce qui entraîne la migration des molécules chargées.

Cependant ; c'est une méthode onéreuse dans le contexte actuel en plus du temps imparti et parfois aussi du danger en relation avec la manipulation des réactifs.

D'autres méthodes automatisées, plus précise, fiables et plus pratiques existent sur le marché, cependant les prix sont très élevées par rapport à nos ressources mais leur utilisation s'avère une nécessité impérieuse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. 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 Sei.*, 3 : 71-80.
2. 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.
3. 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.
4. Bee LE MC,OJ Cotterill (1979) : Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of food sciences*. 44(3), 656-667.
5. Berger M., et Le Brun J., 1986. Nouvelles méthodes d'identification variétale. *Industries des Céréales*, 40 : 11 -1 7.
6. Boyer RF (1993) : *Modern experimental biochemistry (2e ed)*, Addison-Wesley Publishing Company, Reading (USA). p. 114-45 [développement des techniques modernes d'électrophorèse].
7. 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.
8. Bushuk W., and Zillman R.R., 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. 1. Apparatus, method and nomenclature. *Can. J. Plant Sei.*, 58 : 505-515.
9. Chrambach A., Dunn M.J., and Radola B.J., 1993. *Advances in electrophoresis*. Vol. 6. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
10. 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.
11. Cooke R.J., 1987. Electrophoresis in plant testing and breeding. *Adv. Electrophor.*, 2: 171-261. Creamer L. K., 1991. Electrophoresis of cheese. *Bull. /OF*, 261 : 14-28.
12. Damerval C., Zivy M., Granier F., and De Vienne D., 1987. Two-dimensional

- ou d'acides aminés sur papier ou acétate de cellulose], 449-51.
14. 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.
 15. Kamoun P (1977) : Appareils et méthodes en biochimie, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
 16. Kobrehel K., et Gautier M.F., 1973. Genetic variability in the peroxidase composition of wheat. In : Proc. Symp. Genetics and Breeding of durum wheat, Bari, Italie : 527-536.
 17. Le Carrer (1944) Electrophorèse et immunofixation des protéines sériques. Interprétations illustrées. Sébia.
 18. Marchylo B.A. 1987. Barley cultivar identification by SOS gradient PAGE analysis of hordein. *Can. J. Plant Sci.*, 67 (4) : 927- 944.
 19. Mayer W., and Hortner H., 1992. Discontinuous electrophoresis of b-caseins for the determination of bovine caseins in milk and dairy products. *Electrophoresis*, 13 : 803-804.
 20. Plummer DT (1987): An introduction to practical biochemistry (3^e edition), McGraw Hill Book Co., London.
 21. Protein electrophoresis-serum: Applications cliniques de l'électrophorèse des protéines sériques. <http://austin360.adam.com/ency/article/003540.htm>.
 22. Redaelli R., Morel M.H., Aufran J.C., and Pogna N.E., 1995. Genetic analysis of low Mr glutenin subunits of wheat fractionated by two-dimensional electrophoresis (A-PAGE x SOS-PAGE). *J. Cereal Sci.*, 21 (1):5-13.
 23. 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.
 24. 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.
 25. RL Dryer, GF Lata (1989) experimental biochemistry, Oxford University Press, Oxford.
 26. 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.

28. Schwartz D.C., and Cantor C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cel/*, 37: 67-75.
29. 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 Sei.*, 11 (2) : 123-141.
30. 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. Farsch.*, 195 (3) : 224-227.
31. Southern E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Mol. Bio/.*, 98 : 503-517.
32. Switzer RL, LF Garrity (1999) *Experimental Biochemistry*, WH Freeman, NY: 61-77
33. Szymanowicz A (2006) L'électrophorèse des protéines sériques. *Annales Biologie Clinique*.
34. Tao S.H., 1989. Méthodes d'identification des espèces animales. *Revue des Industries Alimentaires*, 421 : 4 3-4 7.
35. 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.
36. 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.
37. Towbin H., Staehelin T., and Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet : procedure and some applications. *Proc. Nat/. Acad. Sei. USA*, 76: 4350-4354.
38. Urbanke W., Lut W., and Brandi E., 1992. Use of HPLC for detection and adulteration of milk and milk products of different species. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch.*, 195 (2) : 137-142.
39. Weiss W., Postel W., and Gôrg A., 1991. Barley cultivar identification. 1. Sodium dodecyl suif ate polyacrylamide gel electrophoresis and glycoprotein blotting. *Electrophoresis*, 12 (5): 323-330. 42.
40. Weser J., Postel W., Gunther S., and Gôrg A., 1986. Horizontal high-resolution IPG-DAL

Food, 10 (4 : 39- 41.

42. 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.
43. 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 cytoplasms at five development states. Theor. Appl. Genet., 68 (4) : 335-345.