

Zeitschrift: Tracés : bulletin technique de la Suisse romande
Band: 129 (2003)
Heft: 23: Protéomique

Artikel: Nouveau défi pour l'électrophorèse
Autor: Girault, Hubert / Lion, Niels
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-99255>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 13.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Nouveau défi pour l'électrophorèse

PROTÉOMIQUE

Le séquençage du génome humain a ouvert une nouvelle ère de la biologie, où la compréhension précise des processus du vivant passe par l'analyse systémique de tous les gènes exprimés, ainsi que des produits de cette expression : les protéines. L'enjeu de toutes les disciplines post-génomiques consiste donc à détecter, identifier et quantifier toutes les protéines présentes dans un échantillon, à un temps donné et dans des conditions données. Pour autant, l'analyse de dizaines ou centaines de milliers de protéines aux propriétés physico-chimiques très différentes en termes de solubilité, de taille et de charge pose un véritable défi aux sciences analytiques. Non seulement les protéines présentent une variabilité très importante en termes de propriétés physico-chimiques, mais également en termes d'abondance. Si la dynamique à analyser est encore l'enjeu de nombreuses discussions, le consensus actuel veut que le taux de présence d'une protéine dans un échantillon puisse varier d'au moins 10^6 et pourrait aller jusqu'à 10^{12} [1]¹. Cet article et le suivant montrent la contribution de la chimie-physique aux nouvelles techniques bio-analytiques.

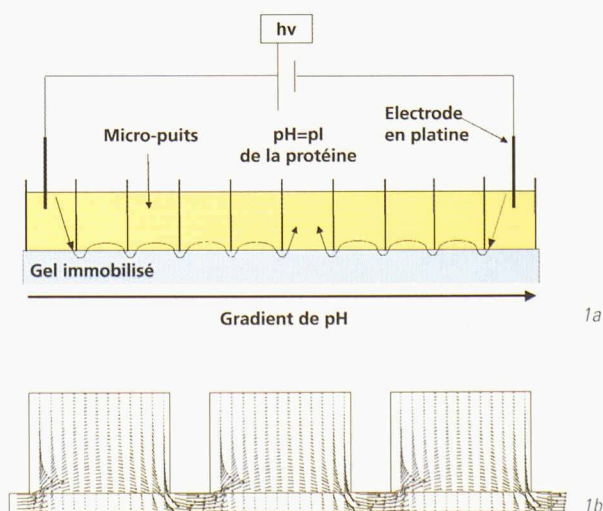
Une technique incontournable : l'électrophorèse

Les techniques analytiques actuelles, principalement basées sur l'électrophorèse bi-dimensionnelle sur gel, permettent de détecter seulement quelques milliers de protéines, avec une gamme dynamique de 10^4 à 10^5 au mieux [2]. Le défi analytique posé par l'ère post-génomique est donc énorme et appelle de nouveaux développements. Depuis plusieurs années, notre laboratoire explore de nouvelles pistes pour le fractionnement de mélanges complexes de protéines. L'idée de base consiste à fractionner le mélange initial d'après une propriété physico-chimique : le point isoélectrique, pI . La char-

ge d'une protéine dépend en effet du pH de la solution dans laquelle elle se trouve : si l'on en place une dans un gradient de pH , elle migrera sous champ électrique jusqu'au pH où sa charge est nulle, soit le pI . Ce principe de séparation est utilisé comme première dimension du gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle : la solution de protéines est appliquée sur un gel contenant un gradient de pH immobilisé et les protéines migrent sous champ dans le gel. L'invention des gels contenant des gradients de pH a révolutionné l'analyse biochimique jusqu'à devenir la technique de référence pour l'analyse d'échantillons protéiques complexes.

Dépasser les limites de la méthode, l'approche Off-Gel™

Cependant, cette technique séparative, couplée à la seconde dimension du gel d'électrophorèse qui sépare les protéines suivant leur taille présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, elle requiert au moins deux jours de travail de laboratoire et ne permet pas de récupérer les protéines en solution ; celles-ci restent emprisonnées dans le gel après séparation et leur excision pour une analyse complémentaire par spectrométrie de masse est une procédure complexe. Ensuite, les protéines les plus abondantes - telles l'albumine ou les



¹ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie en fin d'article.

Fig. 1 : La séparation Off-Gel™ consiste à appliquer, sur le gel à gradient de pH immobilisé, une barrette de micropuits, dans lesquels on répartit le mélange protéique à fractionner. Les protéines migrent alors sous champ électrique dans le liquide, et n'entrent dans le gel que pour passer d'un puits à un autre, jusqu'à atteindre le puits correspondant à leur pI.

Fig. 2 : Le fractionnement par Off-Gel™ d'un extrait protéique de la bactérie *E. Coli* montre l'intérêt de l'approche : la figure de gauche montre l'analyse par électrophorèse bi-dimensionnelle de l'extrait protéique total ; la figure de droite montre la même analyse réalisée sur une des fractions après Off-Gel™. Après fractionnement, les protéines marquées d'un cercle apparaissent bien plus visibles.

(Tous les documents illustrant cet article ont été fournis par les auteurs)

immunoglobulines dans le plasma humain -, masquent les molécules plus rares qui jouent souvent un rôle physiologique prépondérant, comme les récepteurs membranaires ou les facteurs de transcription [3].

L'approche *Off-Gel™* consiste à séparer l'échantillon protéique en fractions de pI. La figure 1a présente le principe de la technique, basée sur un gel à gradient de pH immobilisé, première dimension du gel d'électrophorèse bi-dimensionnelle. Mais au lieu de faire migrer les protéines à l'intérieur du gel, on tire parti du fait que le gradient de pH à l'intérieur du gel tamponne la solution qui se trouve juste en contact avec lui [4]. Il est ainsi possible de faire migrer les protéines dans le liquide, ce qui permet à la fois d'accélérer la séparation, et de maintenir les protéines en solution. La figure 1b montre une simulation par éléments finis des lignes de courant que suivent les protéines lors de leur migration, ces lignes de courant n'entrant dans le gel, plus résistif, que pour passer d'un puits à un autre [5]. Cette technique a été utilisée pour séparer deux isoformes de la β -lactoglobuline qui ne diffèrent que de 0,1 unité de pI, ce qui donne une idée de la résolution offerte par la technique. Mais le principal intérêt du fractionnement par *Off-Gel™* réside dans la possibilité de fractionner des échantillons complexes : la figure 2 montre le gain de sensibilité qui peut être obtenu grâce au pré-fractionnement par *Off-Gel™* sur un extrait protéique de la bactérie *E. Coli* [6]. Les avantages clefs du *Off-Gel™* résident dans la rapidité de séparation, la diminution de la complexité des échantillons protéiques, ainsi que dans la possibilité de récupérer les protéines directement en phase liquide, ce qui permet de poursuivre la séparation par chromatographie liquide et d'assurer l'identification par spectrométrie de masse en évitant l'étape complexe d'excision des protéines du gel.

Création d'une spin-off

Le développement du *Off-Gel™* a démarré par une thèse menée au sein du Laboratoire d'électrochimie physique et analytique de l'EPFL, qui visait principalement à établir la faisabilité de la technique ainsi qu'à en explorer les aspects physico-chimiques fondamentaux. Cette étape a impliqué un

gros travail de caractérisation des gels à gradient de pH immobilisé, ainsi qu'une étude approfondie par éléments finis du mécanisme de séparation. La technique a ensuite été reprise par *DiagnoSwiss SA*, une spin-off du Laboratoire d'électrochimie physique et analytique, qui a mené toute la validation expérimentale sur des échantillons biologiques. Finalement, un accord de développement et de commercialisation a été conclu avec *Agilent* pour faire du *Off-Gel™* le cœur d'une nouvelle plate-forme d'analyse protéomique.

Hubert Girault, professeur
et Niels Lion
Laboratoire d'Electrochimie Physique et Analytique
EPFL, CH - 1015 Lausanne

Bibliographie

- [1] D. F. HOCHSTRASSER, J. C. SANCHEZ ET R. D. APPEL : « Proteomics and its trends facing nature's complexity », *Proteomics*, N° 2, pp. 807-812, 2002
- [2] T. RABILLOUD : « Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains », *Proteomics*, N° 2, pp. 3-10, 2002
- [3] S. P. GYGI, G. L. CORTHALS, Y. ZHANG, Y. ROCHON ET R. AEBERSOLD : « Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, N° 97, pp. 9390-9395, 2000
- [4] A. ROS ET AL. : « Protein purification by *Off-Gel™* electrophoresis », *Proteomics*, N° 2, pp. 151-156, 2002
- [5] I. L. ARNAUD, J. JOSSEMAND, J. S. ROSSIER ET H. H. GIRAULT : « Finite element simulation of *Off-Gel™* buffering », *Electrophoresis*, N° 23, pp. 3253-3261, 2002
- [6] P. E. MICHEL ET AL. : « Protein fractionation in a multicompartiment device using *Off-Gel™* isoelectric focusing », *Electrophoresis*, N° 24, pp. 3-11, 2003

