

Chromatographie échangeuse d'ions

1. Principe

Le critère de l'ionité des molécules donne lieu aux techniques de chromatographie d'échange d'ions, la chromatographie d'échange d'ions sépare les protéines en fonction de leur charge de surface nette, grâce à des interactions électrostatiques qui se produisent entre les protéines et une phase stationnaire chargée.

Deux types de chromatographie d'échange d'ions sont à distinguer:

- **Chromatographie d'échange d'anions** (phase stationnaire chargée positivement qui se lie à des protéines chargées négativement).
- **Chromatographie d'échange de cations** (phase stationnaire chargée négativement qui se lie à des protéines chargées positivement).

2. Technique

- L'échange ionique est en rapport avec la charge électrique nette des protéines et qui dépend de leurs compositions en acides aminés.
- La charge nette d'une protéine est influencée par le pH du solvant (tampon) dans lequel elle est dissoute (échange des ions d'hydrogène avec les protéines). Le point isoélectrique (pI) d'une protéine est le pH auquel la protéine a une charge globale nette égale à zéro.

A un pH supérieur au pI, une protéine aura une charge nette négative. Un pH inférieur au pI rend la protéines chargée positivement (assez de H⁺).

- Le pH du solvant peut être ajusté afin de faciliter la liaison des protéines aux résines échangeuses d'ions ou de promouvoir leur élution une fois liées. La connaissance préalable du point isoélectrique d'une protéine peut aider à déterminer le type de chromatographie échangeuse d'ions le plus approprié ; En règle générale, Un pH de tampon (solvant) qui est d'environ à une unité de pH loin du pI est suffisant pour la liaison d'une protéine en chromatographie d'échange d'ions. Cependant, dans certains cas, un pH du tampon plus éloigné du pI devient nécessaire.

Quatre groupes fonctionnels chargés sont plus couramment utilisés dans la chromatographie d'échange d'ions. Ils sont classés en 'échangeurs d'anions' et 'échangeurs de cations'.

- **Echangeurs d'anions (phase stationnaire chargée positivement)**

Exemples:

- Ammonium quaternaire (Q)  est un échangeur d'anions fort
- Diéthylaminoéthyle (DEAE) est un échangeur d'anions faible

La chromatographie d'échange d'anions DEAE-cellulose ne doit pas être utilisée à des pH supérieurs à pH 8,5. Le groupe diéthylamino ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) du DEAE-cellulose porte une charge positive qui est à la base du fonctionnement de cette colonne. En effet, les acides aminés/protéines chargés négativement vont se lier (via des liaisons électrostatiques) au groupe diéthylamino (molécules retenues), alors que les acides aminés/protéines chargés positivement se retrouveront dans l'éluant (molécules non retenues). Comme le groupe diéthylamino possède un pKa voisin de 8,5, ce groupe sera déprotoné à un pH supérieur à 8,5, ce qui lui enlève toute sa capacité à lier des substances chargées négativement..

- **Echangeurs de cations (phase stationnaire chargée négativement)**

Exemples:

- Méthyl sulfonate est un échangeur de cations fort
- Carboxyméthyl (CM) est un échangeur de cations faible

Les échangeurs faibles (fournissant moins de rétention pour certaines protéines, ce qui permet leur élution à une force ionique plus faible) sont plus appropriés pour des protéines qui ne nécessitent pas un pH extrême pour la liaison et ainsi on peut éviter l'impact d'une force ionique élevée sur la stabilité des protéines, lors de l'élution. Dans la chromatographie d'échange d'ions, la phase stationnaire (colonne) est d'abord équilibrée avec un tampon à force ionique faible. L'échantillon de protéines est ensuite chargé sur la colonne dans le même tampon de faible force ionique utilisé pour l'équilibrage de la

colonne. La protéine liée est lavée abondamment (lavage) avant l'élution avec un tampon de force ionique plus élevée ou, dans certains cas, un tampon avec un pH modifié. Néanmoins, on peut ajuster le pH du tampon de façon à ce que la protéine d'intérêt ne se lie pas à l'échangeur d'ions tandis que les protéines contaminantes vont se lier. Dans ce cas, la protéine d'intérêt n'est pas retenue (elle est recueillie dans la phase d'écoulement de la colonne), alors que les protéines contaminantes, retenues sur la colonne, sont éliminées.

3. Elutions des molécules

3.1 Elution avec les sels: En général, les sels tels que NaCl ou KCl sont utilisés pour l'élution. Les ions Na^+ ou K^+ servent de contre-cations dans la chromatographie d'échange de cations et Cl^- servent de contre-anion dans la chromatographie d'échange d'anions.

Il existe trois méthodes générales d'élution des protéines: élution en une seule étape, élution par plusieurs étapes, et élution par un gradient de concentration linéaire. La meilleure méthode à choisir dépend du type de chromatographie utilisé et de la résolution requise.

- **Par une seule étape** - une seule étape d'élution (par exemple, utilisation d'une seule concentration en sel) déplace toutes les protéines liées. Ce mécanisme fonctionne le mieux pour les procédures chromatographiques basées sur une interaction très spécifique (par exemple, la chromatographie d'affinité). L'élution en une étape n'offre pas de résolution, mais reste idéale pour se débarrasser des contaminants très rapidement. Elle nécessite la connaissance préalable des conditions de tampon nécessaires pour le déplacement de la protéine.

- **Par plusieurs étapes** - plusieurs éluions sont effectuées séquentiellement (par exemple, utilisation de concentrations différentes en sel), avec des conditions plus strictes à chaque étape. Dans une élution par étape, le nombre de fractions recueillies est fonction du nombre de conditions d'élution séquentielles. L'élution par étapes fournit une meilleure résolution que l'élution en une seule étape, mais une résolution plus faible que le gradient d'élution linéaire.

- **Par un gradient de concentration linéaire** - plusieurs fractions consécutives sont rassemblées tandis que les conditions d'élution sont ajustées de façon linéaire.

Un gradient linéaire (par exemple, un gradient de concentration en sel) offre la plus haute résolution pour la chromatographie échangeuse d'ions et la chromatographie d'interaction hydrophobe. En règle générale, un grand nombre de fractions consécutives sont collectées.

3.2 Elution avec le pH: Pour les protéines liées à un échangeur de cations (exemple CM-cellulose, chargée -), l'augmentation du pH du tampon conduit à une charge positive moindre sur la protéine (**tendance à charger la protéine -**), et permet son élution de la colonne. Pour les protéines liées à un échangeur d'anions (exemple DEAE-cellulose, chargée +), la diminution du pH du tampon entraîne une charge négative moindre sur la protéine (**tendance à charger la protéine +**), et permet son élution de la colonne.

4. Exemple d'une conduite d'une Chromatographie échangeuse d'anions

Un surnageant de culture concentré contenant les protéines d'intérêt est déposé sur une colonne échangeuse d'anions (5 x 18 cm), prête à l'emploi, tapissée avec un gel Q-sepharose à haute Performance. La colonne est régénérée puis équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,5 (tampon A), on injecte deux fois 30 ml de surnageant concentré (pression maximum de 0,5 mpa). L'élution est réalisée avec un gradient continu et croissant de NaCl à des concentrations de 0 à 1 M ajouté au tampon A (tampon B). Le débit est ajusté à 10 ml/min et des fractions de 10 ml sont collectées, au total 600 tubes ou fractions sont obtenues, Les fractions, où se trouve l'activité recherchée, sont regroupées, concentrées et diafiltrées avec le dispositif d'ultrafiltration (voir le cours) . Sur ce dernier, le tampon d'élution est remplacé par le tampon phosphate 50 mM à pH 7,0.

Le chromatogramme est tracé instantanément sur le papier de l'enregistreur .un modèle de l'Akta purifier et gradifrac sont donné ci-dessous, c'est un appareillage sur lequel on peut utiliser plusieurs type de colonnes : échangeuses d'ions, gel filtration, affinité.....



Système de purification (deux modèles : AKTA PRIME et GRADIFRAC).

5. Applications de la chromatographie d'échange ionique

L'échange ionique est la méthode chromatographique la plus utilisée pour la séparation et la purification des biomolécules chargés tels que des polypeptides, des protéines, des acides nucléiques. Sa grande capacité et simplicité, et son haute résolution sont les raisons principales de sa réussite comme méthode de séparation. La chromatographie d'échange ionique est très utilisée dans plusieurs applications industrielles :

- Séparation et purification des composants du sang tels que l'albumine et les enzymes d'origine végétales et microbiennes
- Traitement et adoucissement de l'eau
- Adoucissement de l'eau destinée à l'extraction du sucre
- Déminéralisation du lactosérum
- Fermentation : résines d'échange cationique sont employées pour contrôler le processus de fermentation pendant la production de β -galactosidase.
- Élimination d'acide sulfurique et d'acides organiques créés au cours de la fabrication du phénol. On utilise une résine spéciale faiblement basique à squelette formo-phénolique.
- Élimination de phénol dans des effluents industriels. Il se fixe sur une résine adsorbante non ionique. La régénération se fait avec de l'acétone.

- Élimination des dérivés de l'antraquinone, molécules organiques que l'on peut fixer sur une résine adsorbante non ionique. La régénération se fait au méthanol.
- Élimination de traces de métaux, en particulier du fer, à l'aide d'une résine fortement acide. Le traitement se fait à charge volumique élevée.