

La chromatographie d'exclusion (Tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel)

1.Principe

- Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur **taille** et de leur **forme**.
- On utilise pour cela des granules de gel poreux.
- Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau **du volume mort (V_m ou V_0)**. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.
- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

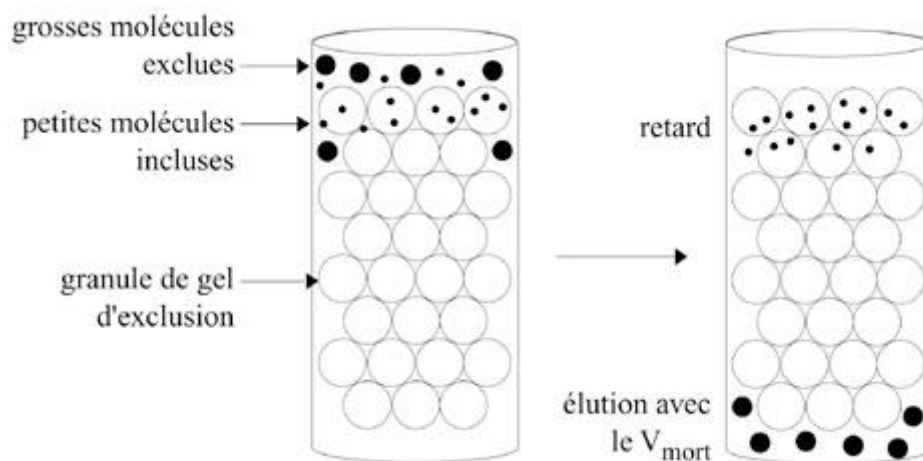


Figure 1 : Schéma du tamisage moléculaire.

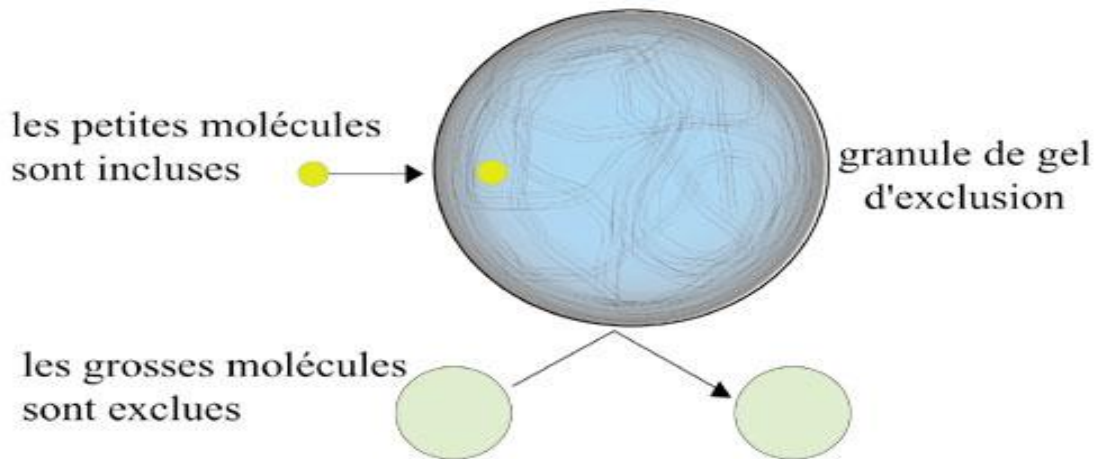


Figure 2 : Représentation d'un gel d'exclusion.

2. Détermination de la masse molaire d'une molécule.

Un mélange de molécules que l'on appelle standards, de masses molaires connues, est séparé par chromatographie de filtration sur gel

- chaque molécule est éluée avec un volume d'éluion V_e .
- par ailleurs, le volume d'exclusion du gel (V_0) est le volume d'éluion d'une molécule non retardée par le gel, c'est-à-dire une molécule de taille supérieure à celle des billes et qui n'y diffuse pas. Bien souvent, on utilise le bleu dextran, polymère d'ose de masse molaire supérieure à $2 \cdot 10^6$ Da.
- enfin, le volume total du gel (V_t) est la somme du volume des billes et du volume externe aux billes : il est donné par le volume d'éluion d'une molécule qui diffuse totalement dans les billes et qui est donc totalement retardée.

le calcul de la masse moléculaire d'une protéine se fait :

- Soit en portant le logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'éluion (Figure 3 ci-dessous) : $\log MM = f(V_e)$
- Soit l'on porte logarithme de la masse moléculaire en fonction du K_{AV} , le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel : $\log MM = f(K_{AV})$.

Le K_{AV} , est le coefficient de partage entre la phase liquide et la phase gel :

$$K_{AV} = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

- V_t = volume total (il est mesuré en remplissant la colonne d'eau)

- V_m = volume mort (il est déterminé en mesurant le V_e d'une substance totalement exclue)

Représentation du logarithme de la masse moléculaire en fonction du volume d'élution :

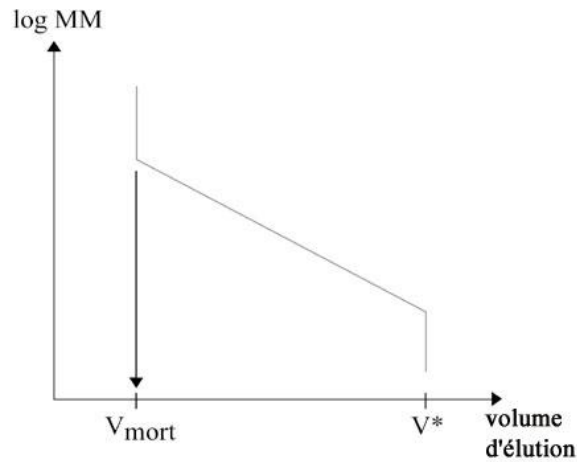


Figure 3 : Variation du volume d'élution en fonction de log MM.

Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0).

Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Une molécule totalement incluse sera éluee avec un volume d'élution $V^* = V_m + V_i$, où V_i est le volume d'eau interne aux granules de gel (voir plus bas).

Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (voir figure ci-dessous).

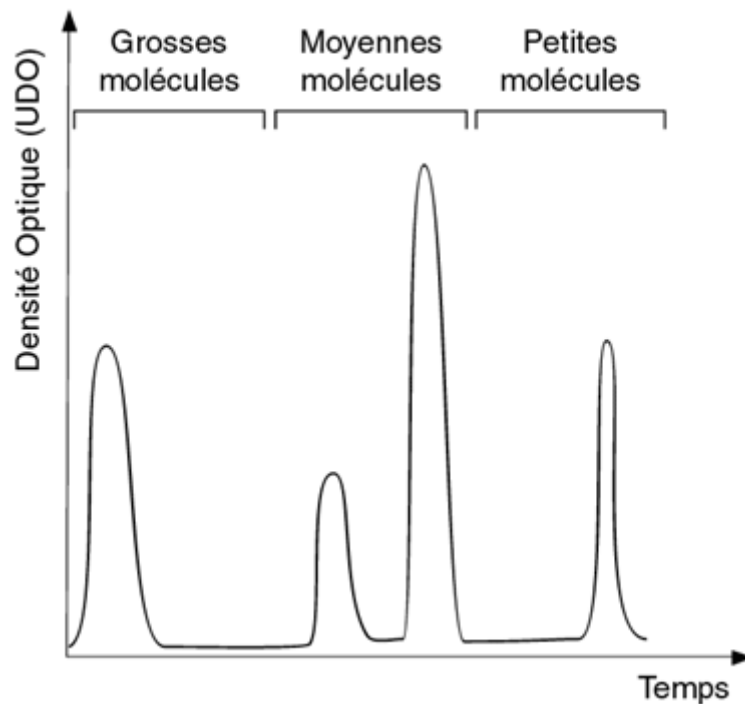


Figure 4 : Elution des solutés dans l'ordre inverse des masses moléculaires.

3. Théorie de la chromatographie d'exclusion

On considère une colonne de volume total V_{total} remplie d'un gel solvaté :

$$V_{\text{total}} = V_0 + V_i + V_g$$

- $V_0 = V_m$ = volume d'eau externe aux granules
- V_i = volume d'eau interne aux granules
- V_g = volume du gel

Un soluté est distribué dans l'eau interne et l'eau externe selon un coefficient de distribution (de partage) : K

- si $K = 0$, le soluté est totalement exclu.
- si $0 < K < 1$, le soluté est partiellement inclus. Le taux d'inclusion augmente avec K .
- si $K = 1$, valeur théorique correspondant à une inclusion totale d'un composé dans le gel.
- si $K > 1$, le soluté est inclus et adsorbé.

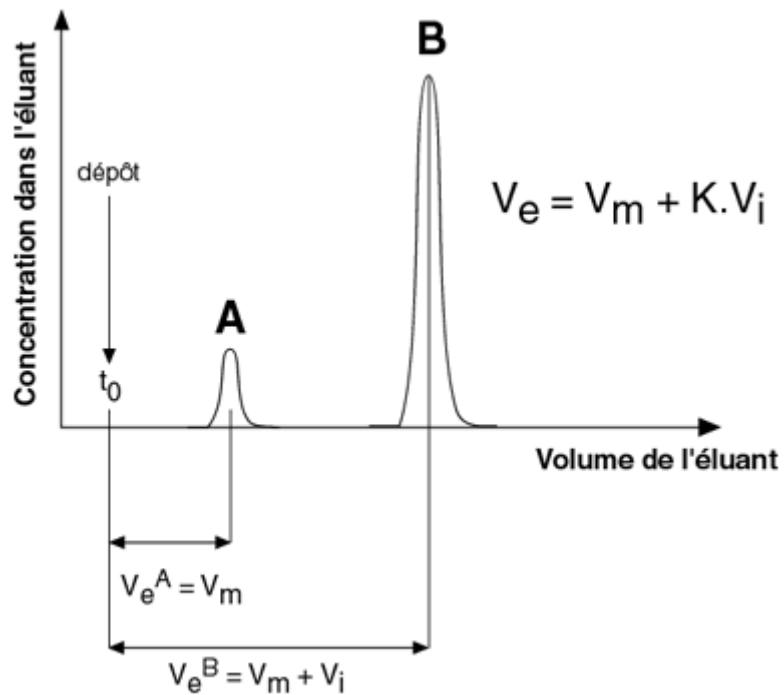


Figure 5 : Diagramme d'élution des substances A et B.

Donc, si l'on dépose un mélange de 2 solutés A et B dont les constantes de distribution sont respectivement égales à 0 et 1,

- A sera élué avec un volume d'élution $V_e^A = V_m$
- B sera élué avec un volume d'élution $V_e^B = V_m + V_i$

L'expression générale qui relie le volume d'élution d'un soluté à son coefficient de distribution est :

$$V_e = V_m + K.V_i$$

La constante K est égale à : concentration du soluté dans l'eau interne / concentration du soluté dans l'eau externe.

4. Méthodologie et appareillage

4.1 Principaux gels

Il existe de très nombreuses marques de gels de filtration différents par leur stabilité, résistance à la pression et au débit, etc. On doit aussi comprendre que pour un gel ayant un domaine de fractionnement donné, on peut obtenir des préparations ayant une résolution plus ou moins fine. Les microbilles de faibles diamètres, de l'ordre de 20 μm , permettent d'obtenir une résolution très fine, alors qu'une préparation de billes plus de l'ordre de 200 μm ne l'est pas. C'est pourquoi certaines compagnies vendent des résines de qualités différentes, par exemple "coarse", "medium", "fine", "superfine". Les résines ayant une résolution supérieure ont l'inconvénient d'avoir un débit beaucoup plus lent et d'être beaucoup plus fragiles. De plus, elles sont beaucoup plus dispendieuses. Ces deux caractéristiques limitent évidemment leur emploi à des applications requérant une plus grande précision.

Le **Sephadex™ G**, de la compagnie Pharmacia, est probablement la plus connue des résines de filtration sur gel. Il est constitué de dextran (un polymère linéaire de glucose) dont les fibres sont réticulées à l'épichlorohydrine pour former les microbilles poreuses. Les différentes variantes (G-25, G-100, G-200, etc.) sont obtenues en contrôlant la réaction de réticulation. Les variantes ont différentes capacités de rétention d'eau, porosités, domaines de fractionnement, limites d'exclusion, etc. Celles ayant des pores plus grands (G-25, G-50, etc.) ont un domaine de fractionnement très réduit, une limite d'exclusion très basse et un débit rapide. Par exemple, la limite d'exclusion du G-25 est de 5000 Da. Elles sont utilisées surtout pour le dessalage. Celles ayant des pores beaucoup plus petits ont un domaine de fractionnement plus élevé. Ainsi le G-200 a une limite de résolution de 600 000 Da. Comme le dextran est très hydrophile, ce gel est utilisé pour les séparations en milieu aqueux. Les variétés de Sephadex ayant une relativement haute limite de résolution sont cependant très fragiles et ne supportent pas des débits ou des pressions hydrostatiques trop élevées.

Le **Sephadex LH**, toujours de Pharmacia, est un dérivé hydroxypropylé du Sephadex G. Il est stable en présence de solvant organiques purs ou mélangés avec de l'eau.

Le **Bio-Gel P** est produit par Bio-Rad. C'est un polymère d'acrylamide réticulé avec du bisacrylamide. Encore ici, on peut obtenir différents niveaux de porosité, donc de domaines de fractionnement, en faisant varier les réactifs des réactions de polymérisation et de réticulation. Les différentes variétés de Bio-Gel P, ont des domaines de fractionnement du

même ordre que ceux des différentes variétés du Sephadex G. Cette matrice résiste mieux aux pressions hydrostatiques et aux débits élevés.

Le **Sephacryl**, de Pharmacia, est plus ou moins l'équivalent du Bio-Gel P, sauf qu'il c'est un mélange composite de dextran et d'acrylamide.

Le **Sepharose**, de Pharmacia, est une préparation d'agarose gélifiée en microbilles et débarrassée de la grande majorité de ses contaminants chargés. La stabilité de cette matrice est due aux liens hydrogène qui lient les polymères d'agarose entre eux. On peut contrôler le domaine de fractionnement en modulant la quantité d'agarose qu'on fait gélifier. Les limites d'exclusion sont extrêmement élevées, souvent de l'ordre du million de Da. Le fait que ce type de gel ne soit pas stabilisé par des liens covalents le rend plus fragile.

Le **Bio-Gel A**, de Bio-Rad, est plus ou moins l'équivalent du Sepharose.

Le **Fractogel TSK**, de Pierce, est un polymère de vinyle.

4.2 Aspects techniques

4.2.1 Colonnes et échantillons

Les dimensions du lit de la colonne et le volume de l'échantillon varient selon le but de la filtration sur gel. Le lit de la colonne doit être relativement long pour une détermination de Masse moléculaire ou une purification, afin d'obtenir une résolution maximale. Idéalement la hauteur devrait être de l'ordre de 100 cm avec un petit diamètre, 1 à 2 cm. Évidemment dans ces conditions, le débit est passablement lent 1ml par minute. L'échantillon doit aussi être minime en termes de volume environ 1ml. Il est généralement de l'ordre du centième de celui du lit de la colonne

Pour le dessalage, la résolution est beaucoup moins critique. On utilise des colonnes beaucoup plus courtes, c'est la rapidité qui est recherchée. On peut tolérer des volumes d'échantillon qui vont jusqu'à 10 à 20% du lit de la colonne

4.2.2 Détermination du volume mort et calibrage de la colonne

Il est important de déterminer le volume mort d'une colonne. Pour cela on prend une molécule dont on est sûr que le poids ou le volume rendent impossible son entrée dans les pores du gel.

On chromatographie ce produit dans les mêmes conditions que celles qui serviront à l'échantillon: dimension de la colonne, débit, pression, etc. Normalement ce calibrage se fait en même temps que celui des étalons de masse moléculaire. Le bleu de dextran est le plus souvent utilisé. Pour calibrer une colonne, il suffit de chromatographier des protéines de poids moléculaire connu dans la colonne. On note le volume d'élution de chaque étalon. Cela permet de construire une courbe Masse moléculaire en fonction du K_{av} . On peut aussi utiliser le V_e au lieu du K_{av} , dans ce cas, la courbe de calibrage n'est bonne que pour cette colonne et dans les conditions identiques de chromatographie. Une fois calibrée, la colonne peut être employée pour déterminer la masse moléculaire d'un ou plusieurs inconnus. Cet inconnu devra être chromatographié sur la même colonne dans les mêmes conditions (solvant, débit, pression hydrostatique, etc.). En reportant sur la courbe le K_{av} ou le V_e de l'inconnu, on peut facilement en calculer la masse moléculaire.

4.2.3 Éluion

Le débit doit être très stable et lent si on veut obtenir une bonne résolution. On peut utiliser des dispositifs plus simples comme des vases de Mariotte. Il est cependant plus courant d'utiliser des pompes péristaltiques.

Les résines de filtration sur gel sont plutôt fragiles, particulièrement celles ayant une limite d'exclusion élevée car elles ont une grande porosité. Les vitesses de débit et les pressions hydrostatiques doivent donc être soigneusement contrôlées pour éviter que les billes du gel éclatent. Comme les pompes péristaltiques peuvent développer des pressions assez fortes, on doit utiliser ces appareils avec précaution.

Les filtrations sur gel peuvent se faire sans problème à température de la pièce. Cependant, elles se font souvent à 4°C, dans une chambre froide ou un réfrigérateur à chromatographie, pour éviter la dégradation des protéines. C'est évidemment le cas lors de la purification de protéine où la stabilité des protéines est cruciale.

6. Applications de La chromatographie d'exclusion

Il existe deux grands types d'application des filtrations sur gel couramment utilisé en biochimie: les séparations de groupe, pour obtenir une séparation grossière, et le fractionnement moléculaire pour une séparation fine.

La séparation de groupe consiste à séparer les petites molécules des grosses, en deux groupes distincts: les grosses molécules qui sortent dans le volume mort et les autres qui sortent plus tard. Ainsi, la filtration sur gel peut servir au "dessalage" de solutions: séparation brute des protéines d'une solution des molécules de petit poids moléculaire comme les sels (d'où le terme "dessalage"), sucres, acides aminés, etc. Dans ce cas on utilise une résine ayant un petit domaine de fractionnement où toutes les protéines iront dans le volume mort tandis que les sels et autres petites molécules pourront entrer dans les pores du gel. Il est alors facile de recueillir le volume mort contenant les protéines débarrassées des petites molécules.

Dans le fractionnement moléculaire, on sépare un mélange complexe (généralement de protéines) en plusieurs fractions de poids moléculaire spécifique. Le principal usage de ce type de procédure est la détermination de la masse moléculaire des protéines, ce qui est une application "analytique". C'est une technique assez précise qui permet de travailler sur des molécules non dénaturées et possédant encore leur structure quaternaire.

On peut aussi se servir du fractionnement moléculaire pour purifier une protéine donnée, ce qui est donc une application "préparative".

Dessalage

On peut facilement séparer les macromolécules d'une solution par dessalage. On prend un gel ayant une limite d'exclusion très basse qui permettra seulement de laisser pénétrer les petites molécules mais pas les macromolécules. Avec une résine ayant un débit rapide (limite de résolution basse, qualité de résolution grossière), on peut donc rapidement recueillir le volume mort, où sont restées les macromolécules.

On se sert de cette technique pour éliminer des contaminants (sels, détergents, etc.) d'une préparation. Cette approche peut avantageusement remplacer la dialyse, elle est beaucoup plus rapide mais nécessite un peu plus de manipulations et un suivi constant.

Du côté industriel, on peut produire du lait sans lactose, pour les personnes intolérantes à ce produit, en dessalant du lait. Évidemment, dans ce cas on utilise des colonnes de taille industrielle.

L'application la plus importante de la chromatographie d'exclusion stérique est la détermination rapide des masses moléculaires moyennes, du degré de polymérisation ou de la distribution de la masse moléculaire de polymères ou biopolymères. Cette technique permet la séparation de masses moléculaires allant de 200 à 10^7 Da. Une autre application de la chromatographie d'exclusion stérique est la séparation des biomolécules de masse moléculaire élevée, des espèces de faible masse et des sels. Par exemple, un gel avec une limite d'exclusion de plusieurs milliers peut séparer les protéines des acides aminés et des peptides de faible masse moléculaire. La chromatographie par perméation de gel permet aussi de séparer des oligomères exemple : la séparation d'une série d'acides gras dont la masse moléculaire M varie de 116 à 344 sur un emballage à base de polystyrène avec une limite d'exclusion de 1000.