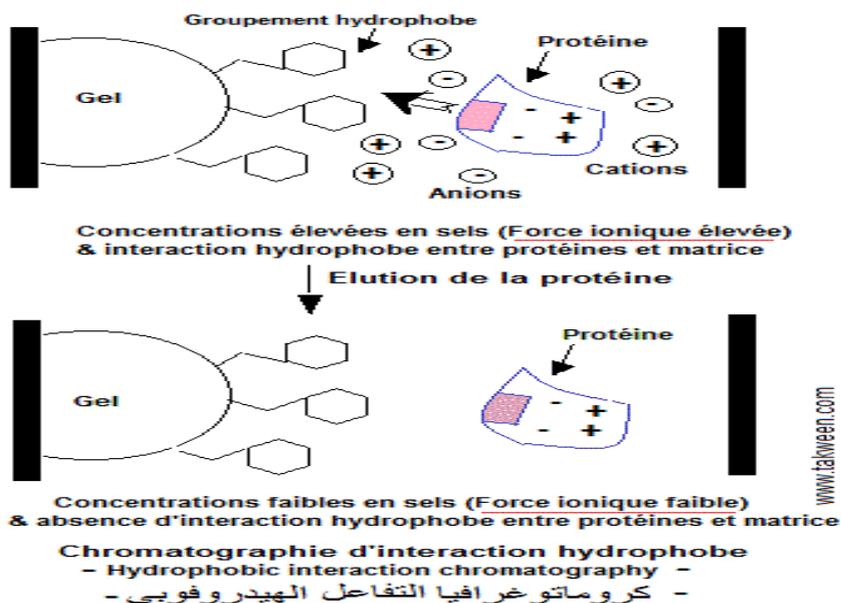


Chromatographie d'interaction hydrophobe

1.Principe

Elle sépare les protéines en fonction de leur caractère hydrophobe. Son principe repose sur le fait qu'en présence d'une **force ionique élevée** (fortes concentrations en sels), les molécules d'eau constituant l'enveloppe d'hydratation des protéines sont déplacées pour hydrater les anions et les cations provenant de la dissociation du sel (relargage, salting out). Ceci entraîne une réorganisation des molécules d'eau autour des protéines et l'exposition de leurs zones hydrophobes favorisant l'établissement d'interactions hydrophobes entre ces zones (normalement enfouies) et les groupements hydrophobes portés par la phase stationnaire. Les protéines qui se lient à la phase stationnaire réadoptent leur conformation native lorsqu'un tampon avec une **force ionique faible** est ajouté. Il en résulte une **élution** des protéines.

Le gel de chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) porte un groupement hydrophobe comme un noyau phénol à l'extrémité d'une chaîne carbonée. Ce groupe hydrophobe interagit avec les zones hydrophobes situées à la surface des protéines. La CIH peut être une méthode de séparation précieuse pour la purification des protéines qui peuvent se replier spontanément par une **diminution de la force ionique**. Cependant, sous crainte de précipitation par les sels d'une protéine d'intérêt, la force ionique du tampon de liaison doit être aussi faible que possible pour lier la protéine. Dans le cas contraire, il faut faire fixer les protéines contaminantes et récupérer la protéine d'intérêt dans la fraction non retenue.



2.Méthodologie

L'instrumentation pour la chromatographie d'interaction hydrophobe peut être automatisable et semi-automatisable. Le fait que la technique peut être automatisable permet de réaliser des séparations plus rapidement, permet d'obtenir un plus grand nombre de données fiables (reproduit la séparation sous les mêmes conditions).

En addition, il existe plusieurs facteurs qui peuvent optimiser la séparation :

- Choisir une résine qui possède beaucoup de sites disponibles (plus d'interactions de l'analyte avec la résine contribue à avoir un meilleur rendement).
- Choisir un Ligand très pur (augmente la sélectivité pour l'analyte, qui augmente le rendement).

2.1 Influence du choix et de la concentration du sel antichaotropique

Une des considérations la plus importante est le choix du sel et sa concentration de départ (salinité initiale) ainsi que sa concentration de fin d'éluion (salinité finale). Il faut d'emblée comprendre que la capacité d'un sel à favoriser la rétention de la protéine sur la phase stationnaire suit la même relation que lors de la précipitation des protéines. Cette relation est illustré par **la série de salage de Hofmeister**.

L'effet **salting-in** (effet chaotropique) indique la tendance de la solubilité dans l'eau d'une protéine à augmenter lorsque nous augmentons la force ionique et l'effet (lyotropique) **salting-out** indique la tendance de la solubilité dans l'eau d'une protéine à diminuer lorsque nous augmentons la force ionique. Il va donc de soi de dire que selon la série de Hofmeister suivante, les sels de Ba^{2+} est celui qui favorise le plus la rétention de la protéine sur la phase stationnaire (c'est celui avec l'effet chaotropique le plus marqué de par sa grande capacité à solubiliser les protéines en milieu fortement salin) tandis que le PO_4^{3-} est le sel qui favorise le plus l'éluion de la protéine (c'est celui avec l'effet chaotropique le moins marqué de par sa faible capacité à solubiliser les protéines en milieu fortement salin). Cependant, le sel le plus utilisé est le sulfate d'ammonium (grande effet lyotropique et petit effet chaotropique). Lors de la considération des effets chaotropique/lyotropique, il ne faut pas oublier de considérer la solubilité du sel car si la quantité de sel qu'on doit mettre dépasse sa solubilité dans l'eau, l'expérimentateur aura des ennuis puisque la force ionique (gradient d'éluion) ne sera pas comme prévu.

Série Hofmeister des ions lyotropique ou chaotropique

- Augmentation de l'effet lyotropique (Salting out) . Classé de l'effet le moins au plus prononcé.



- Augmentation de l'effet chaotropique (Salting in). Classé de l'effet le moins au plus prononcé.



2.2 Influence du pH de la phase mobile

Ce facteur entre en jeu seulement lorsque les bases ou acides des acides aminés sont situées à proximité d'un site hydrophobe. Dans le cas où une protéine aurait des acides aminés acide (ou basique) sur le site apolaire de la molécule (où se fait le contact entre la molécule et la phase stationnaire), le pH vient influencer la rétention. Si la protéine contient des acides aminés éloignés du site de contact, le pH n'est pas un facteur.

2.3 Influence de la présence d'additifs

La présence d'additif vient affecter la rétention de deux manières. En se liant à la colonne, le tensioactif vient diminuer son hydrophobicité, ce qui influence la rétention. Un tensioactif est une molécule qui contient deux parties avec des polarités différentes. En se liant à la molécule, le tensioactif vient diminuer son hydrophobicité, ce qui influence la rétention. En effet, la section hydrophobe du tensioactif se lit avec la section hydrophobe de la protéine. Par contre, l'autre bout des tensioactifs est hydrophile donc le «complexe» formé par le tensioactif et la protéine est maintenant moins hydrophobe et plus hydrophile, ce qui diminue la rétention. Par contre, l'ajout de tensioactif a une dimension d'utilité. En effet, si on cherche à séparer plusieurs molécules excessivement apolaires, cela serait impossible nous n'arriverions pas à solubiliser les molécules dans une solution très saline; la séparation serait alors impossible. Par contre, en ajoutant des surfactants dans la solution, on permet à des espèces très hydrophobes (telles que des protéines membranaires), de se solubiliser et ainsi d'être séparé par CIH. On peut aussi ajouter des solvants organiques comme additifs.

2.4 Influence de la température

La rétention en CIH est directement proportionnelle à l'entropie. En chauffant, on augmente l'entropie et donc on augmente aussi le temps de rétention des molécules sur la phase stationnaire apolaire. Ce comportement est opposé par rapport au comportement général de la relation température-rétention en chromatographie liquide. En effet, la tendance générale est que plus on chauffe, plus on donne de l'énergie au système et plus il sera facile de rompre les interactions intermoléculaire qui unissent la molécule à la phase stationnaire. Par contre, dans le cas de la CIH, lorsqu'on chauffe la molécule apolaire, il se produit des changements de conformations qui font en sorte de rendre disponible des groupements apolaires qui étaient préalablement pas disponible dans la conformation à basse température. Ainsi, plus on est à haute température, plus il y a de groupement apolaires disponible pour se lier à la phase stationnaire apolaire et plus il y a de rétention.

3. Types de groupe fonctionnel hydrophobe

La phase stationnaire utilisée pour la CIH est composée d'une matrice de base faite d'agarose réticulé ou d'un copolymère synthétique. Un ligand alkyle ou aryle est ensuite conjugué à la matrice, fournissant une spécificité pour des molécules hydrophobes.

- **Alkyle**: une chaîne hydrocarbonée de différentes longueurs; souvent un groupe butyle ou octyle est utilisé. La capacité de liaison de la phase stationnaire est augmentée avec l'augmentation de longueur de chaîne alkyle Les groupes fonctionnels lient des protéines entièrement sur l'hydrophobicité de la protéine

- **Aryle**: un groupe fonctionnel dérivé d'un cycle aromatique; souvent un groupe phényle. Les groupes aryle offrent spécificité croissante, les protéines peuvent également interagir avec le groupe fonctionnel grâce à des interactions d'empilement de base.

✚ A quelles étapes utilise-t-on la chromatographie d'interaction hydrophobe?

La chromatographie d'interaction hydrophobe est souvent utilisée comme une étape intermédiaire dans un protocole de purification. Les protéines sont liées à une phase stationnaire dans un tampon de force ionique élevée. De ce fait, elle peut typiquement être réalisée immédiatement après la chromatographie par échange d'ions, sans échange de tampon ou de dilution nécessaire. De même, la chromatographie d'interaction hydrophobe est couramment réalisée après une précipitation au sulfate

d'ammonium. Parfois la chromatographie d'interaction hydrophobe est applicable dans les premières étapes d'un protocole de purification ou en tant qu'étape finale visant l'élimination des traces d'impuretés de la protéine d'intérêt.

Résolution des problèmes liés a la chromatographie d'interaction hydrophobe

Problème	Cause	Solution
La protéine ne se lie pas à la colonne	La colonne n'a pas été équilibrée	Faire passer plus de tampon d'équilibration sur la colonne et recharger la protéine
	La force ionique du tampon de liaison est trop faible	Augmenter la force ionique du tampon
	La protéine s'agrège à la force ionique utilisée	Diminuer la force ionique du tampon ou essayer un sel différent
La protéine n'est pas éluée	La force ionique du tampon d'éluion est trop élevée	Diminuer la force ionique
	La protéine est agrégée sur la colonne	Ajuster les conditions du tampon pour une meilleure stabilité de la protéine
	La rétention est trop élevée	Essayer une phase stationnaire différente qui offre moins de rétention
Résolution faible	Le débit est soit trop élevé ou trop faible	Ajuster le débit
	La colonne n'a pas été lavée suffisamment	Laver avec un tampon de force ionique plus faible, nettoyer la phase stationnaire en suivant les recommandations du fournisseur
	La protéine est agrégée sur la colonne	Ajuster les conditions du tampon pour une meilleure stabilité des protéines
	faible rétention sur la colonne	Essayer une phase stationnaire différente qui offre une meilleure rétention
La protéine perd son activité pendant la procédure	La protéine est dénaturée ou agrégée	Ajuster les conditions du tampon pour une meilleure stabilité des protéines
	La protéine n'est pas revenue à sa conformation native	Essayer la liaison avec un sel différent ou à une force ionique plus faible, ajouter des additifs permettant une meilleure stabilité de la protéine
	Un cofacteur nécessaire à l'activité a été éliminé pendant la purification	Ajouter le cofacteur