

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira
Béjaïa



وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة عبد الرحمان ميرة
بجاية

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Techniques d'Analyse Biologique

La chromatographie

- Une **colonne** est remplie avec une **phase stationnaire** ou fixe.
- Une **phase mobile**, ou solvant organique (ou mélange de solvants) ou **éluant**, est introduite au sommet de la colonne et entraîne les constituants (ou solutés) du mélange.
- Le solvant entraîne les molécules de solutés. Il existe une série de **transferts entre les 2 phases**.
- Les constituants du mélange migrent avec des **vitesse**s différentes. Ils sont élués (déplacés) et recueillis séparément, en solution dans la phase mobile, dans un détecteur de concentration.
- Un **chromatogramme** présente des pics en fonction du temps.

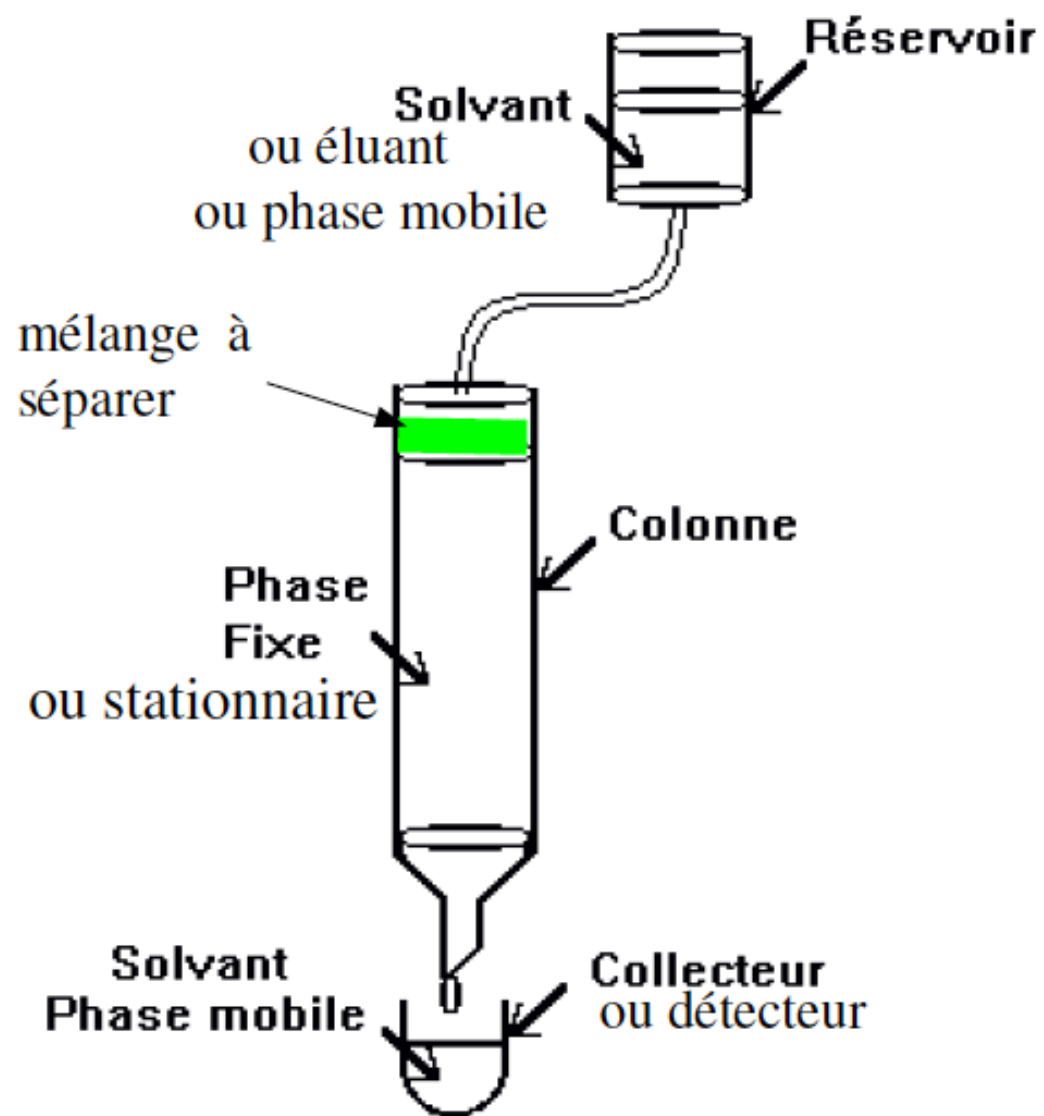


Fig. Chromatographie d'élution sur colonne

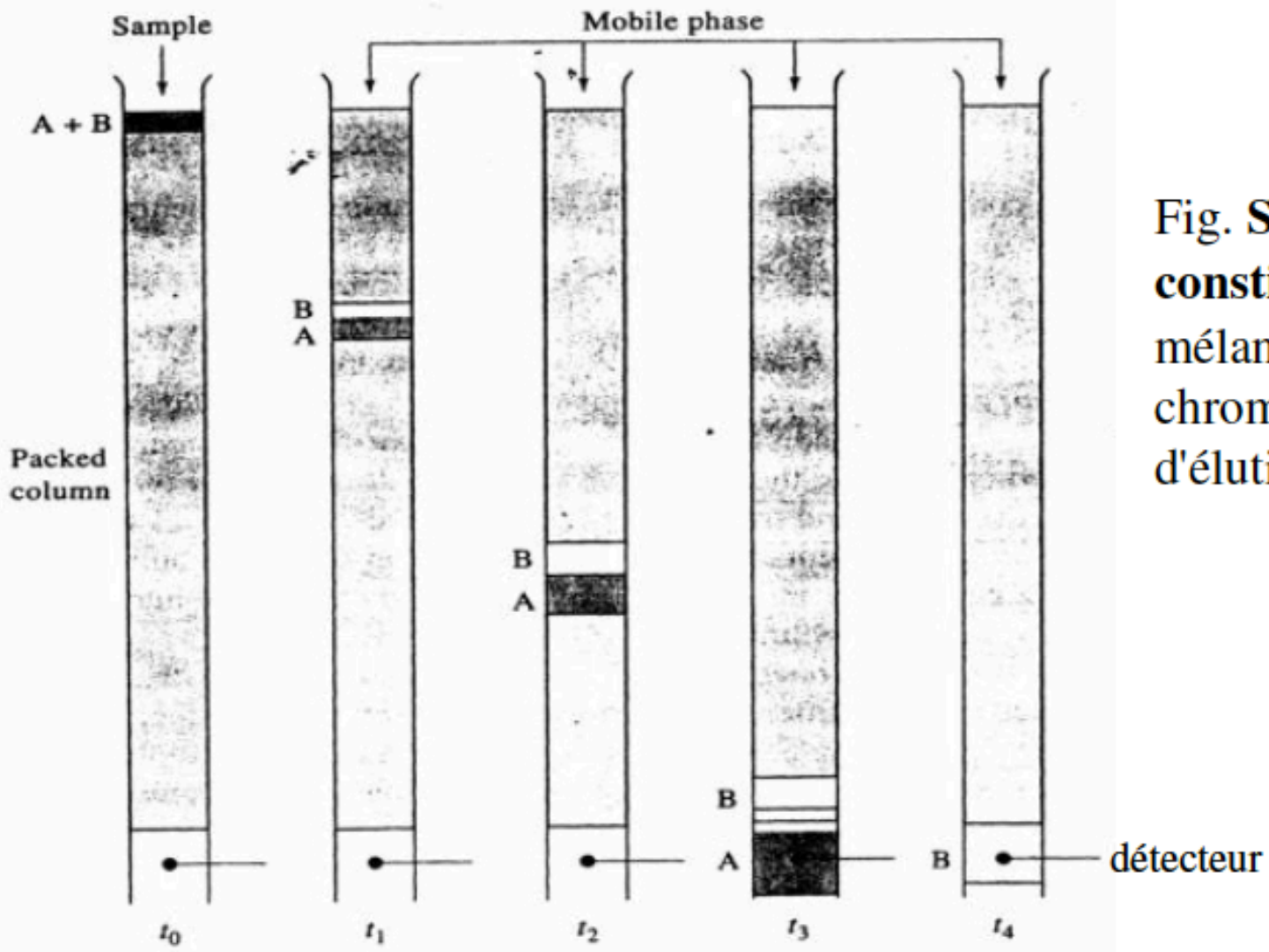
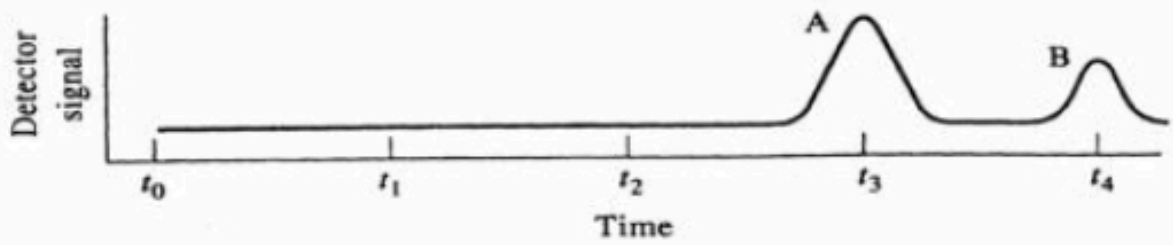


Fig. Séparation des constituants d'un mélange par chromatographie d'éluion sur colonne.



Basée sur l'utilisation d'une **phase mobile**, qui contient le mélange de substances à fractionner, et une **phase stationnaire**, au travers de laquelle les substances sont séparées.

- les interactions des différentes substances avec la phase stationnaire ralentissent plus ou moins leur migration au travers de cette phase selon les propriétés respectives de chaque substance
- les propriétés communément utilisées pour effectuer le fractionnement sont:
 - **la taille** (Chromatographie par gel-filtration)
 - **les interactions ioniques** (Chromatographie par échange d'ions)
 - **la spécificité** (Chromatographie d'affinité)

1- La chromatographie d'exclusion

Ce type de chromatographie, également appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire, bien que la forme intervienne également. La séparation des constituants va se faire selon leur rayon de Stokes ou rayon hydrodynamique. Noté R_s

Ce rayon peut être calculé selon la relation suivante :

k_B : constante de Boltzmann

T: température en Kelvin

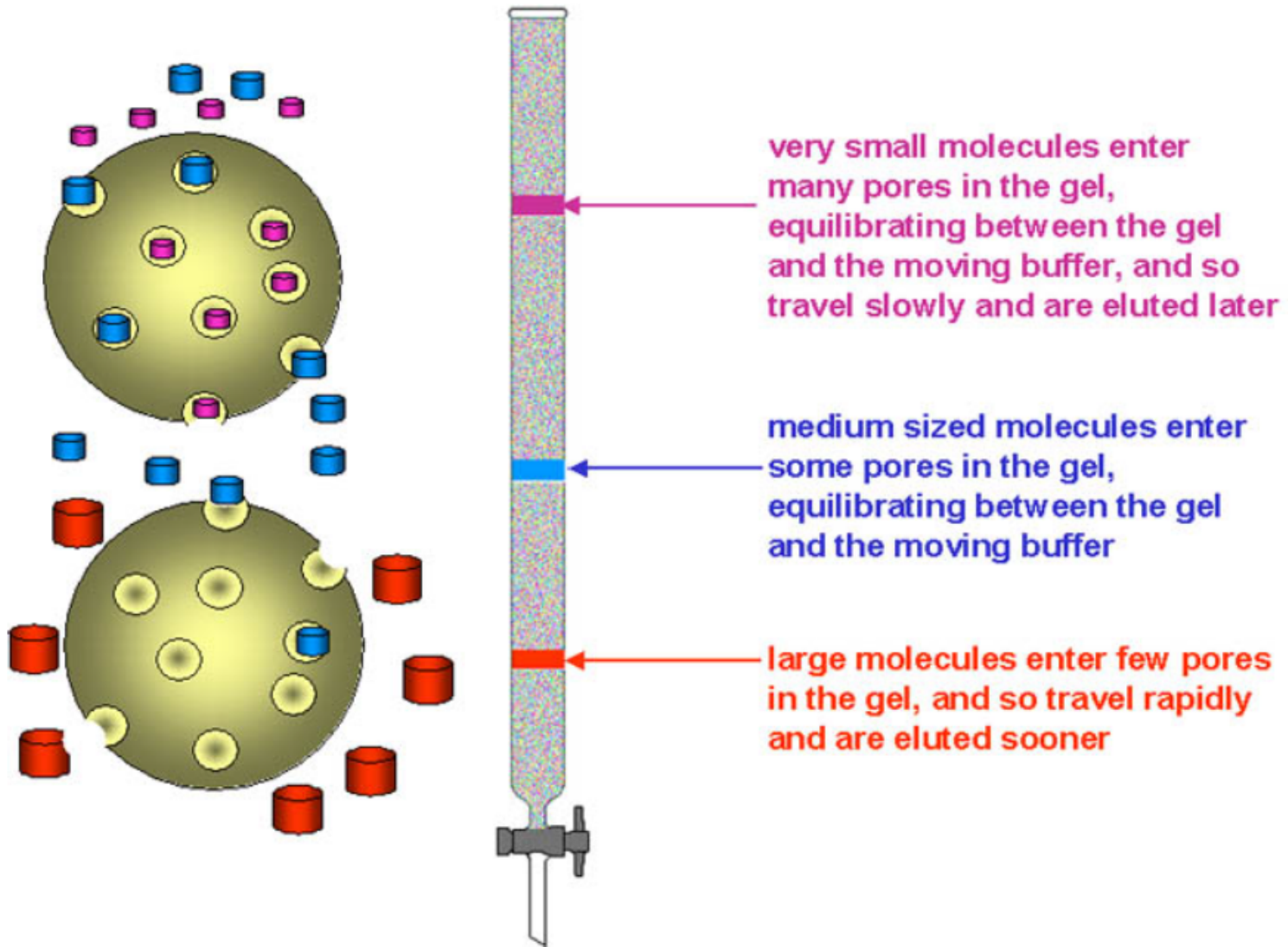
η : viscosité du milieu (ici du tampon)

D: coefficient de diffusion

$$R_s = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

les macromolécules pénètrent ou non selon leur taille propre par rapport à la taille des pores. Les plus petites molécules pénètrent plus profondément dans tous les pores comme elles peuvent pénétrer dans les petits pores tandis que les grosses molécules sont exclues des pores dont la taille effective est plus petite que la taille des molécules. Par conséquent, les grosses molécules s'éluent d'abord des colonnes, suivies des molécules de taille moléculaire décroissante. La séparation se fait donc dans l'ordre des tailles décroissantes.

Dans ce type de chromatographie, la **phase stationnaire** est donc solide (les billes) et la **phase mobile** est liquide (un tampon dont le flux entraîne les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut séparer efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente.



dans cette technique de chromatographie, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme

- les principes de cette méthode sont assez simples:

1) la phase stationnaire (résine) consiste en un réseau de polymères réticulé possédant des pores, fabriqué sous forme de billes

2) les pores dans les billes du gel sont suffisamment grands afin de permettre la pénétration complète des petites molécules, mais ils ne laissent pas pénétrer toutes les protéines à partir d'une certaine taille => la limite d'exclusion

3) les protéines qui ne pénètrent pas dans les pores traversent la colonne plus rapidement que les protéines retenues dans les pores des billes

- l'inaccessibilité aux protéines à partir d'une certaine taille est due au fait que certains pores sont trop étroits pour laisser passer des protéines,
- les matrices utilisées sont faites de polymères insolubles à base de polysaccharides comme le dextrane (Sephadex) ou l'agarose (Sépharose), ou de polyacrylamide (Bio- Gel), préparées sous la forme de billes réticulées (poreuses)

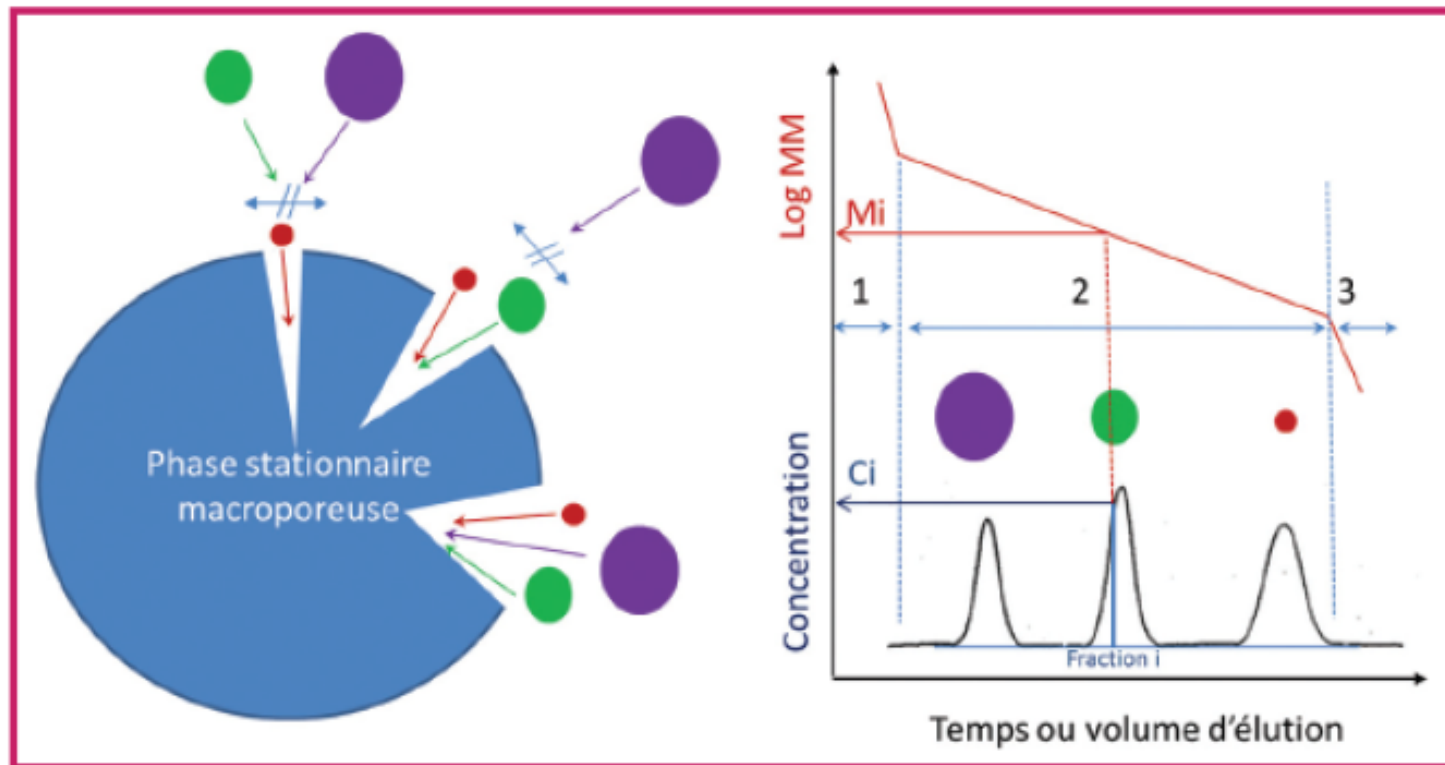
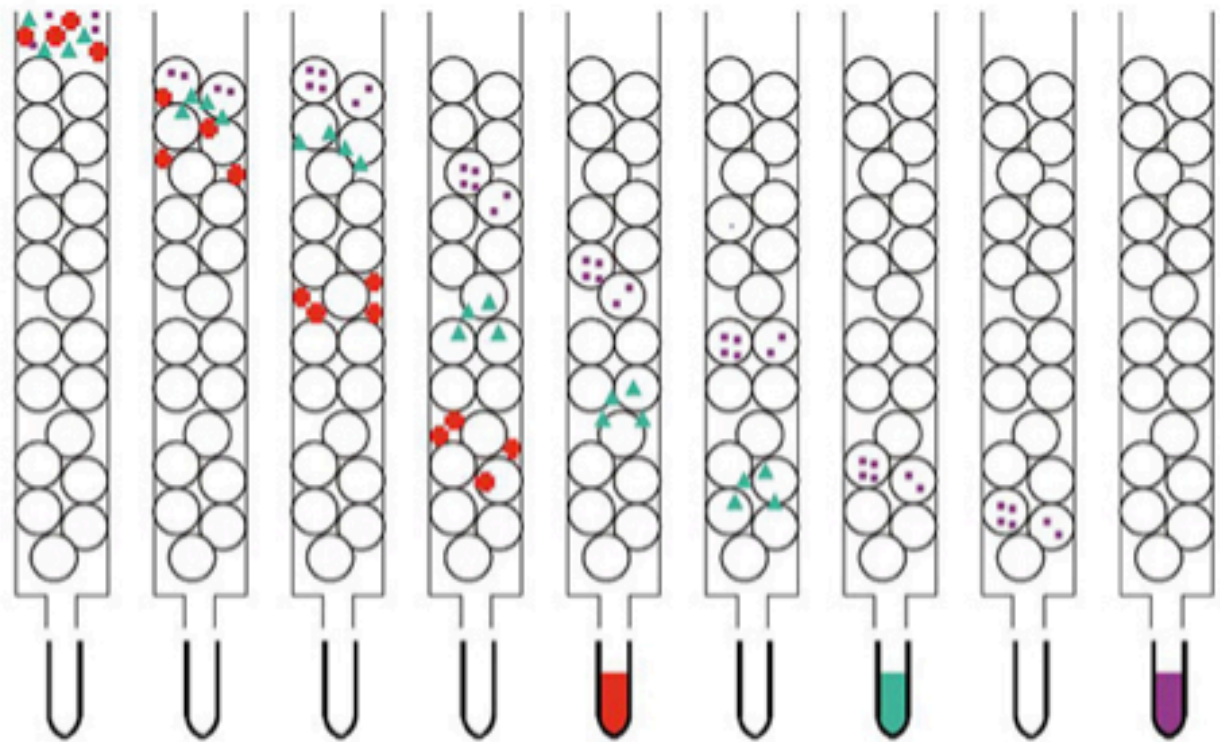





Figure A : Principe de l'exclusion stérique (L. Picton et D. Le Cerf, Chromatographie d'exclusion stérique multi-détection, Détermination des grandeurs macromoléculaires, L'Actualité Chimique, 422-423, 59-64, 2017).

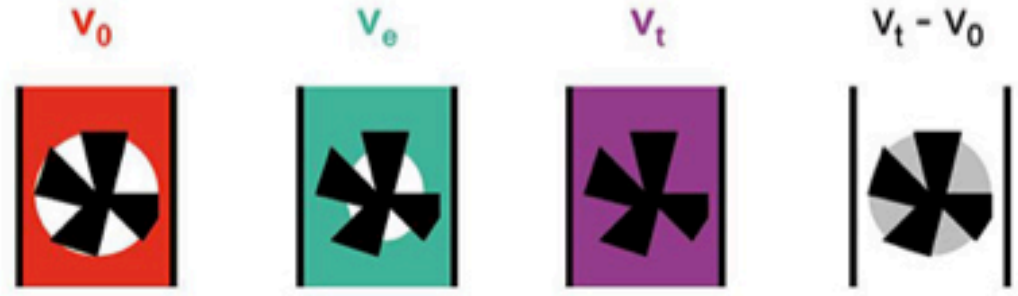
Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser au milieu de billes poreuses. Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes



R_s : Rayon de Stokes

$$K_{av} = (v_e - v_0) / (v_t - v_0)$$

-  : R_s élevé
-  : R_s moyen
-  : R_s petit



Selon la nature chimique de la résine et sa réticulation (qui déterminent la taille des pores) on dispose de la capacité à séparer des molécules extrêmement différentes en terme de masse moléculaire. Il faut donc choisir une résine adaptée à la molécule à purifier, ce qui est déterminé au cours de la mise au point de la méthode de purification.

Nature chimique des différentes résines citées :

Séphadex G : Dextran réticulé (épichlorohydrine)

Biogel P : Acrylamide/bisacrylamide

Sépharose : Agarose

Type de résine	Fractionnement efficace (Da)
Sephadex G15	0 - 1 500
Sephadex G50	1 500 - 30 000
Séphadex G200	5 000 - 800 000

Remarque: C'est une technique très simple à mettre en œuvre, peu onéreuse, qui est très peu destructrice pour les constituants à séparer, mais dont la résolution (capacité à séparer des molécules dont les caractéristiques sont proches) est modeste.

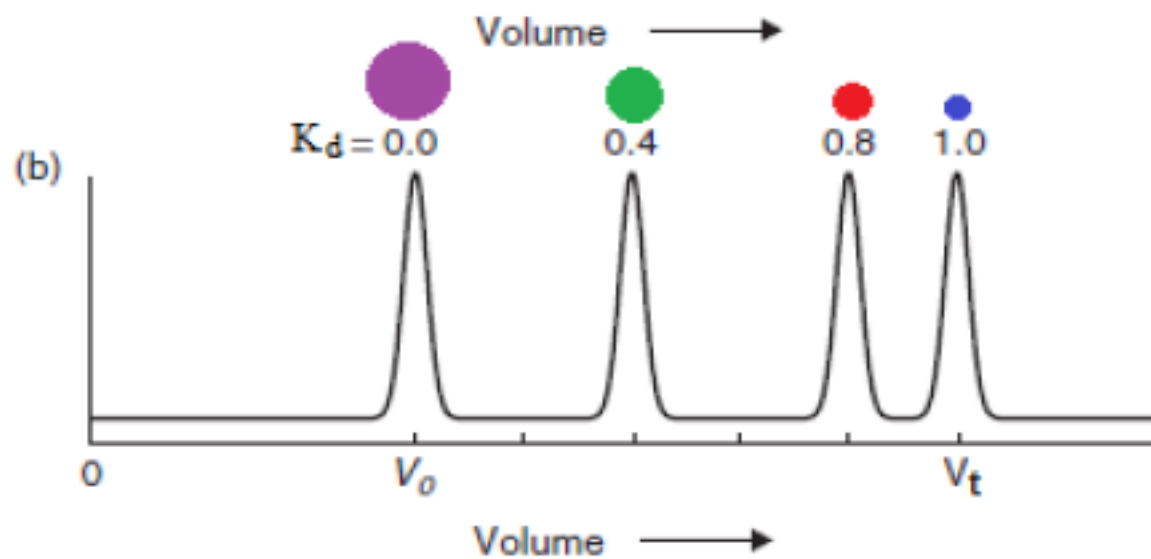
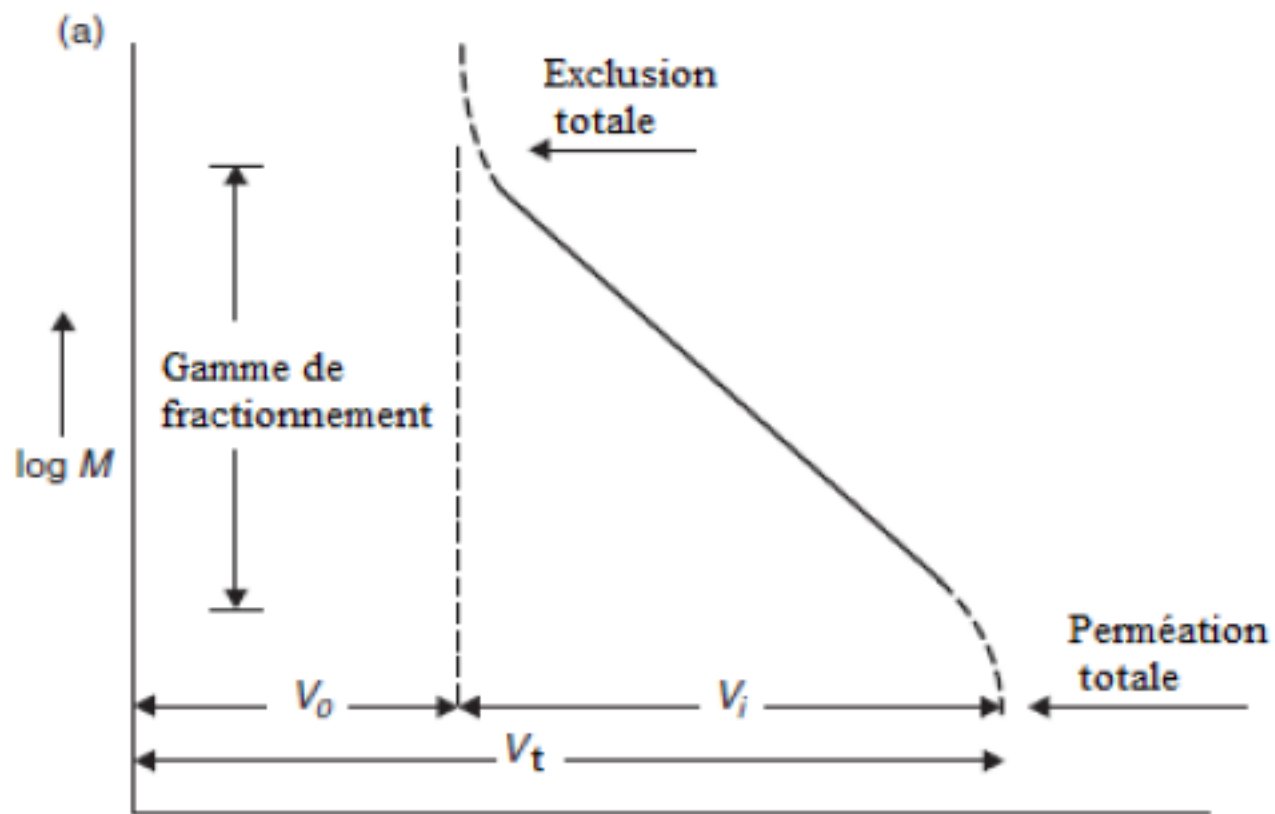
Le volume d'éluion V_e peut être exprimé comme suit :

$$V_e = V_0 + K_d V_i$$

où K_d est le coefficient de distribution, V_0 est le volume de phase mobile nécessaire pour transporter une grosse molécule supposée exclue des pores et V_i est le volume total des pores.

Le coefficient de distribution représente une fraction volumique de pores disponibles pour des molécules d'une taille moléculaire donnée. Dans des conditions idéales sans interaction, le coefficient de distribution se situe dans l'intervalle $0 \leq K_d \leq 1$.

Les molécules qui sont plus grandes que les pores les plus grands éluent au volume d'éluion V_0 (limite d'exclusion totale, $K_d = 0$) et les petites molécules qui peuvent pénétrer dans tous les pores éluent au volume $V_t = V_0 + V_i$ ($K_d = 1$) à la limite de perméation totale.



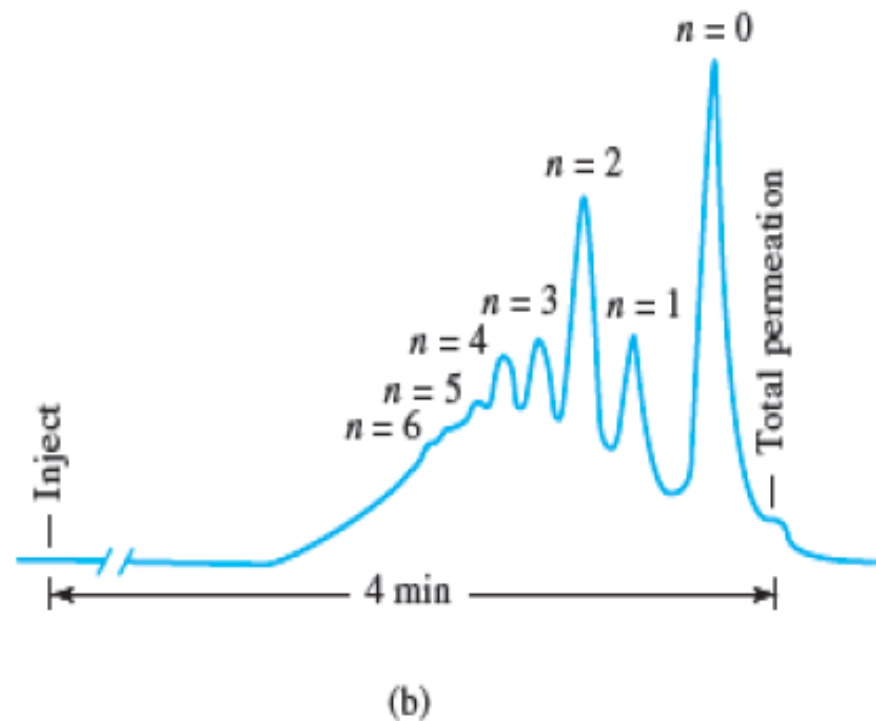
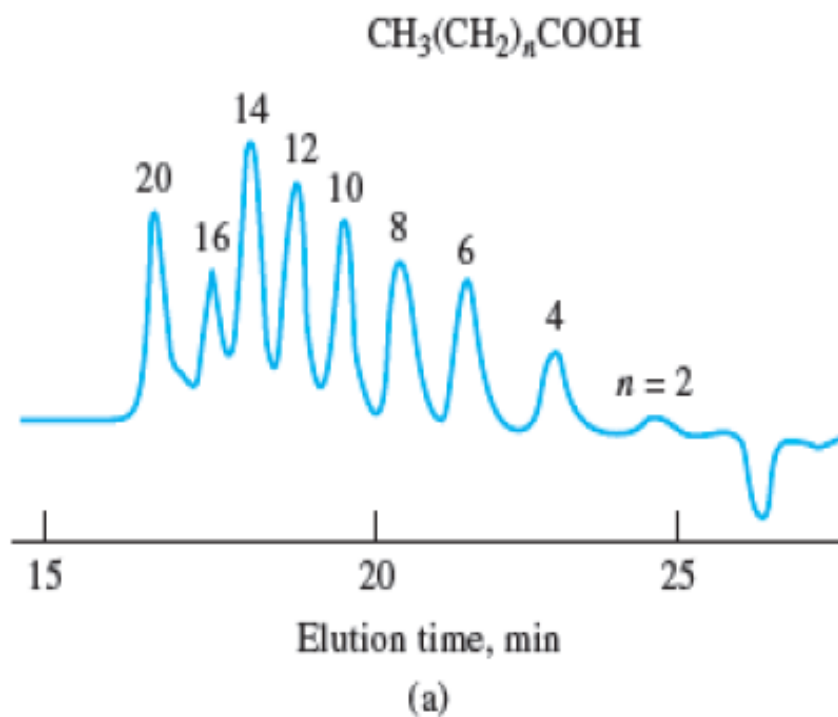


Figure : Applications de la chromatographie d'exclusion stérique. a) Séparation des acides gras. Colonne: à base de polystyrène, phase mobile: tétrahydrofurane, détecteur: indice de réfraction. (b) Analyse d'une résine époxy commerciale (n : nombre d'unités monomères dans le polymère). Colonne: silice poreuse, phase mobile: tétrahydrofurane, détecteur: absorption UV. (D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis 7th Edition*, Cengage Learning, p.774 (pp.992), 2017.)

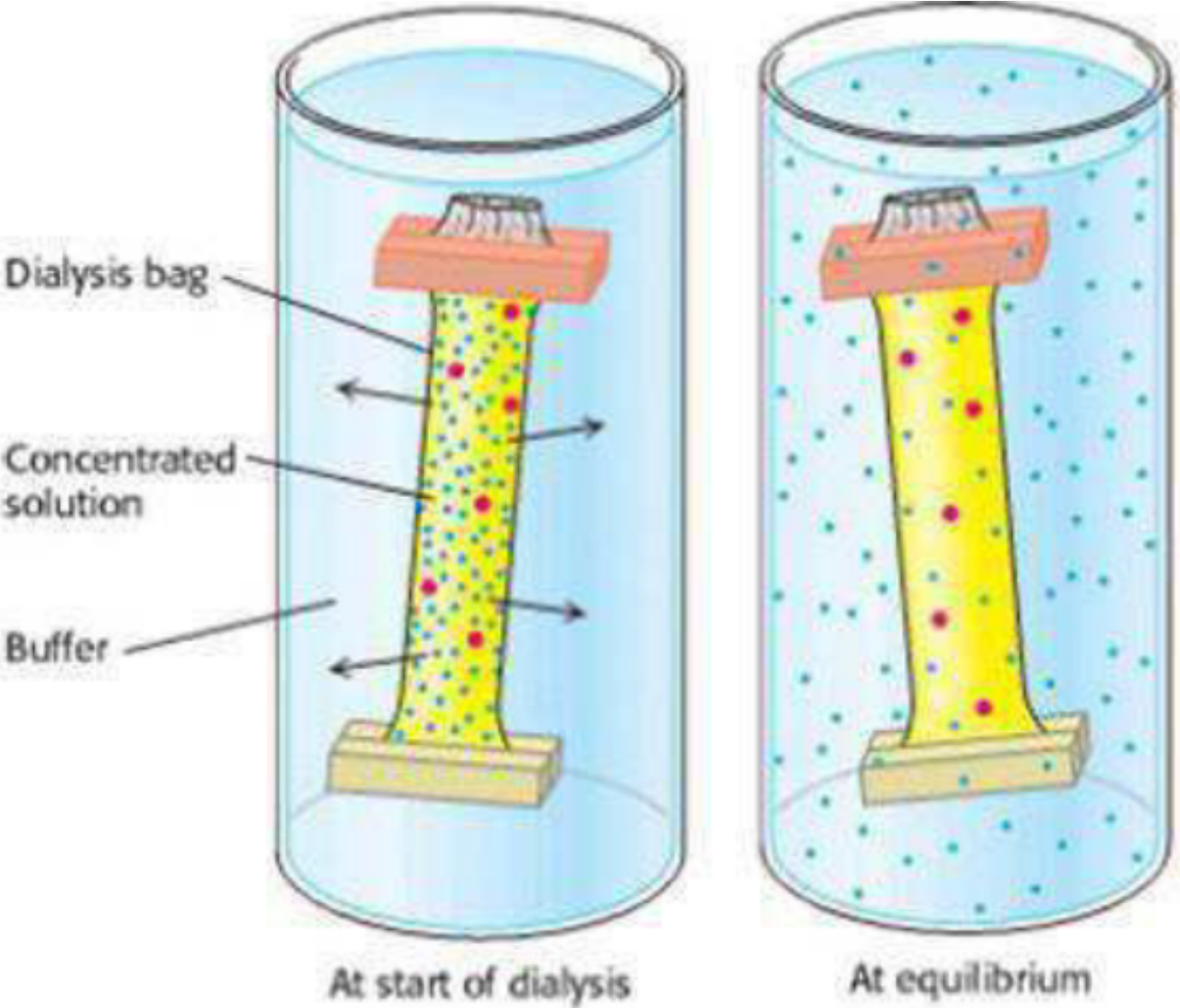
La dialyse: une forme de filtration moléculaire

la dialyse permet de séparer les molécules selon leurs tailles grâce à l'utilisation de membranes semi-perméables qui présentent des pores de taille inférieure aux protéines

- ces pores permettent aux petites molécules, comme les sels et les métabolites, de diffuser au travers de la membrane, mais empêchent la diffusion de plus grosses molécules
les membranes utilisées sont à base de cellophane (cellulose)

- Cette technique est fréquemment utilisée pour éliminer les sels présents dans un échantillon de protéine obtenu après précipitation (salting out) ou après élution avec un tampon riche en sels d'une colonne de chromatographie par échange d'ions
- la solution de protéines et de sels est mise à l'intérieur d'un sac à dialyse, puis immergée dans un large volume de tampon. Après plusieurs heures, les solutions se retrouveront à l'équilibre grâce à la diffusion des sels de l'intérieur du sac vers le tampon de dialyse

DIALYSE



2. Chromatographie d'affinité

- Dans cette technique, un ligand, qui lie spécifiquement la protéine d'intérêt, est **fixé de manière covalente à une matrice poreuse et inerte**.
- Quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au **ligand immobilisé**, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne.
- On peut alors récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand.

- soit en ajoutant un excès de ligand libre dans la colonne (celui-ci entre en compétition pour la liaison de la protéine) ou en changeant le pH, la force ionique et/ou la température

- quand une solution contenant un mélange de protéines traverse la colonne, la protéine d'intérêt se liera au ligand immobilisé, alors que les autres protéines ne s'y lieront pas et sortiront de la colonne.

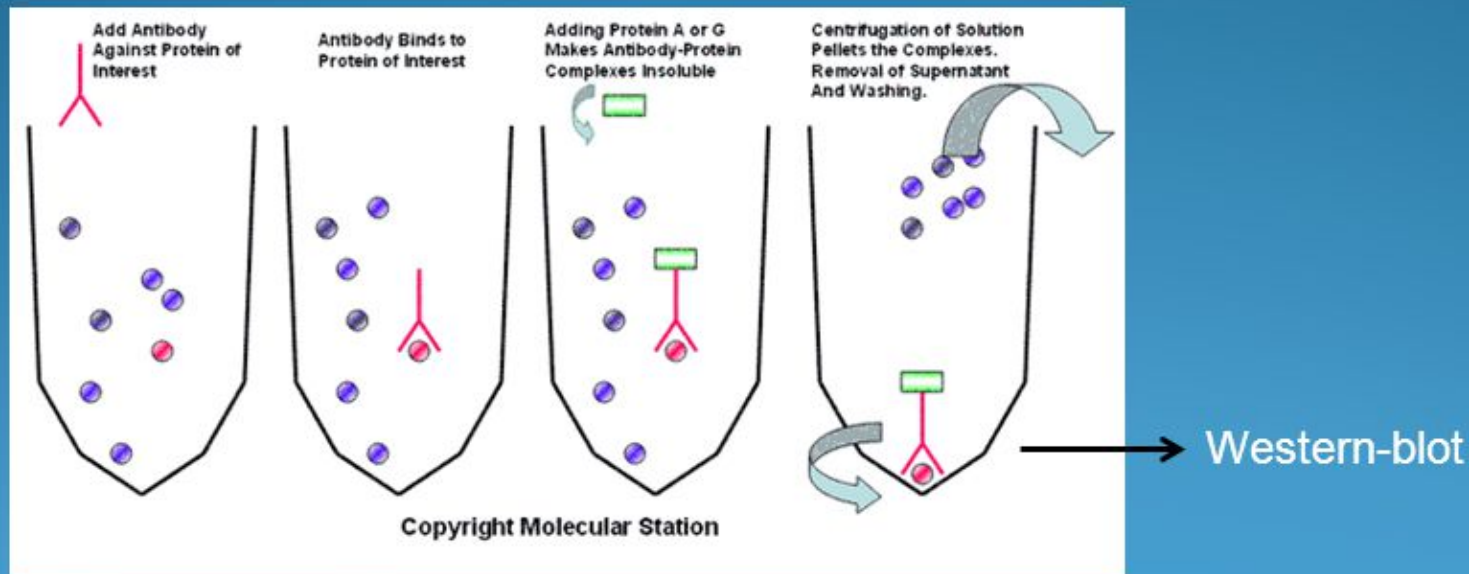
on peut alors récupérer la protéine désirée sous une forme très pure en modifiant les conditions d'élution pour faire en sorte que la protéine se détache du ligand

- soit en ajoutant un excès de ligand libre dans la colonne (celui-ci entre en compétition pour la liaison de la protéine) ou en changeant le pH, la force ionique et/ou la température

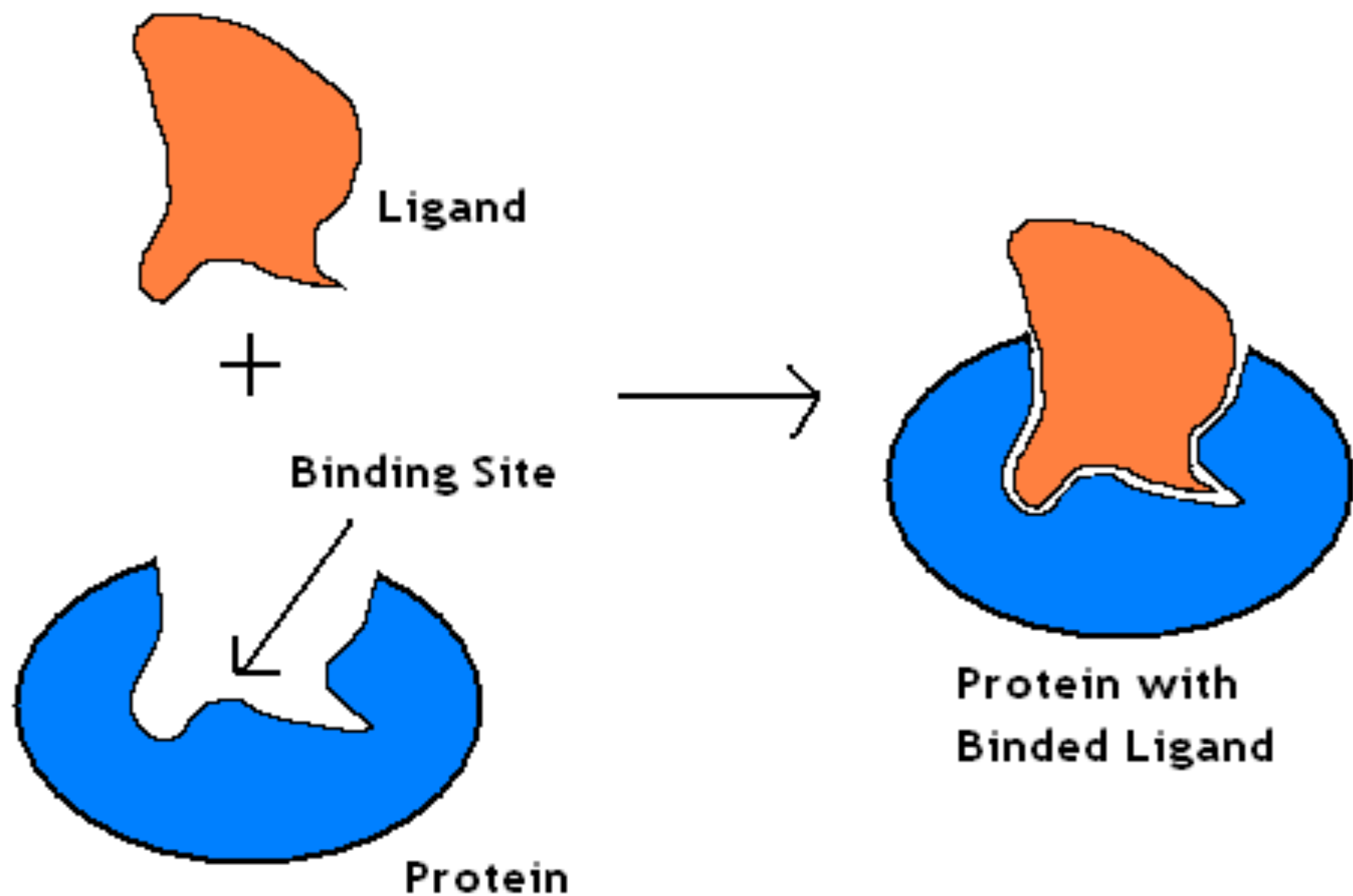
- **Cette approche possède le grand avantage d'exploiter les propriétés biochimiques uniques de la protéine d'intérêt, au lieu d'utiliser des propriétés physico-chimiques qui sont aussi partagées par d'autres protéines.**
- **possède aussi l'avantage de pouvoir purifier la protéine d'intérêt à un très haut degré de pureté en une seule étape**

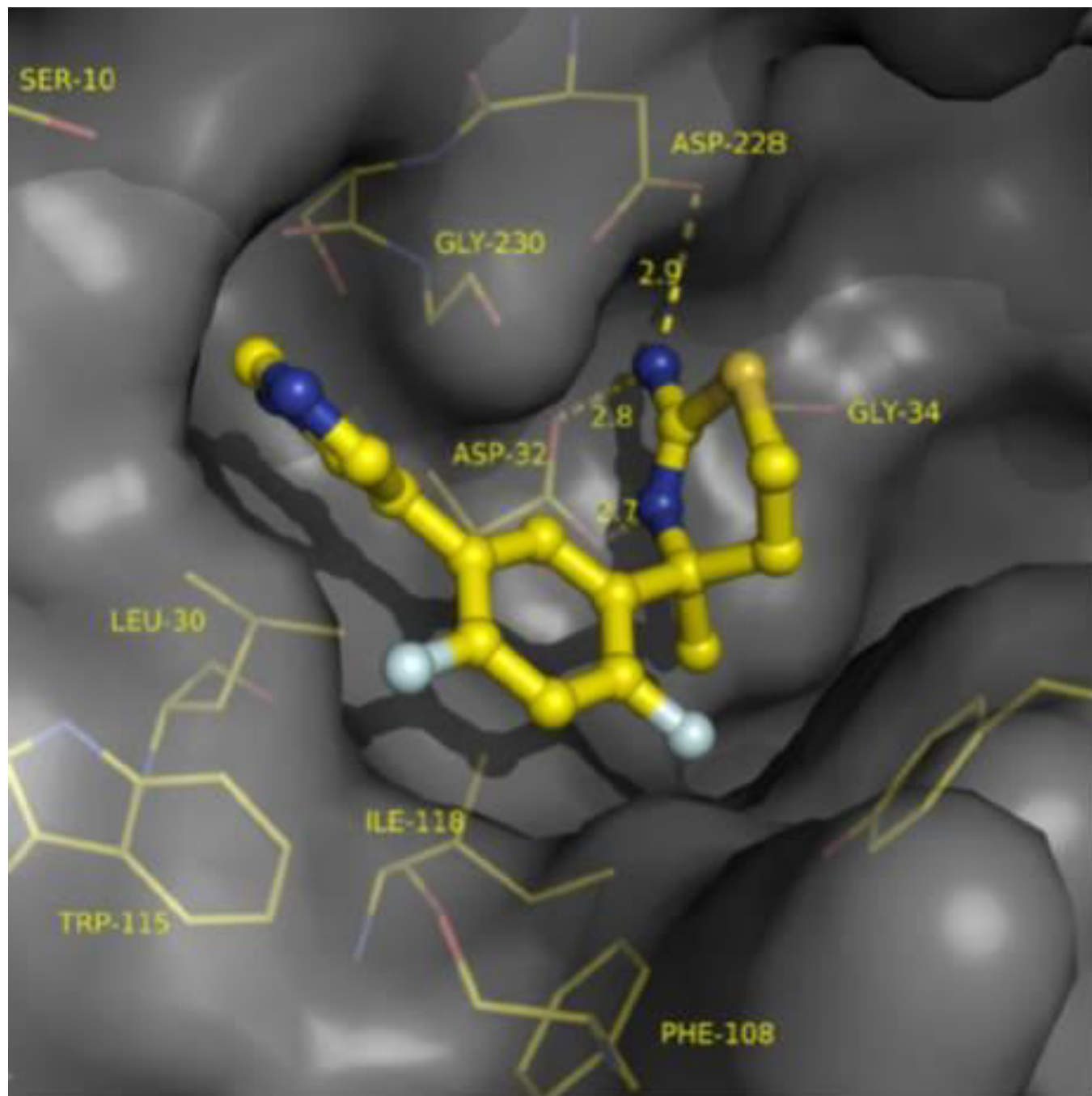
Immunoprécipitation

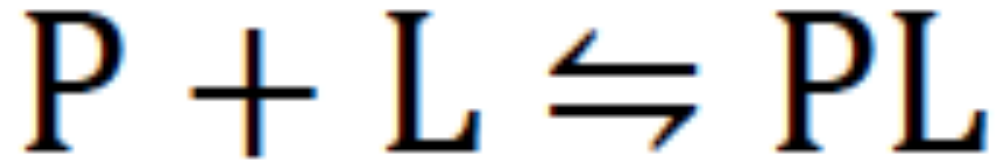
- Isoler une protéine d'intérêt à partir d'un lysat cellulaire
- Utiliser un Ac spécifique de la protéine d'intérêt
- Précipiter le complexe Protéine-Ac avec une forme insoluble de protéines se liant à des anticorps (ex: Protein G)
- Centrifuger la suspension: la protéine d'intérêt est séparée



- Interactions protéines-protéines, protéine-médicament
- Concentration d'une protéines présente en faible quantité







L'équilibre de fixation d'un ligand sur une protéine correspond à la réaction :

Vitesse d'association : $v_a = k_a \cdot [P] \cdot [L]$

Vitesse de dissociation : $v_d = k_d \cdot [PL]$

k_a et k_d sont des constantes microscopiques.

Avec : $[L]$ = concentration du ligand libre et $[PL]$ = concentration du ligand lié.

A l'équilibre, les vitesses sont égales :

$$k_a \cdot [P] \cdot [L] = k_d \cdot [PL]$$

Avec : K_a = constante d'équilibre d'association et K_d = constante d'équilibre de dissociation. Ce sont des constantes macroscopiques.

Et :

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

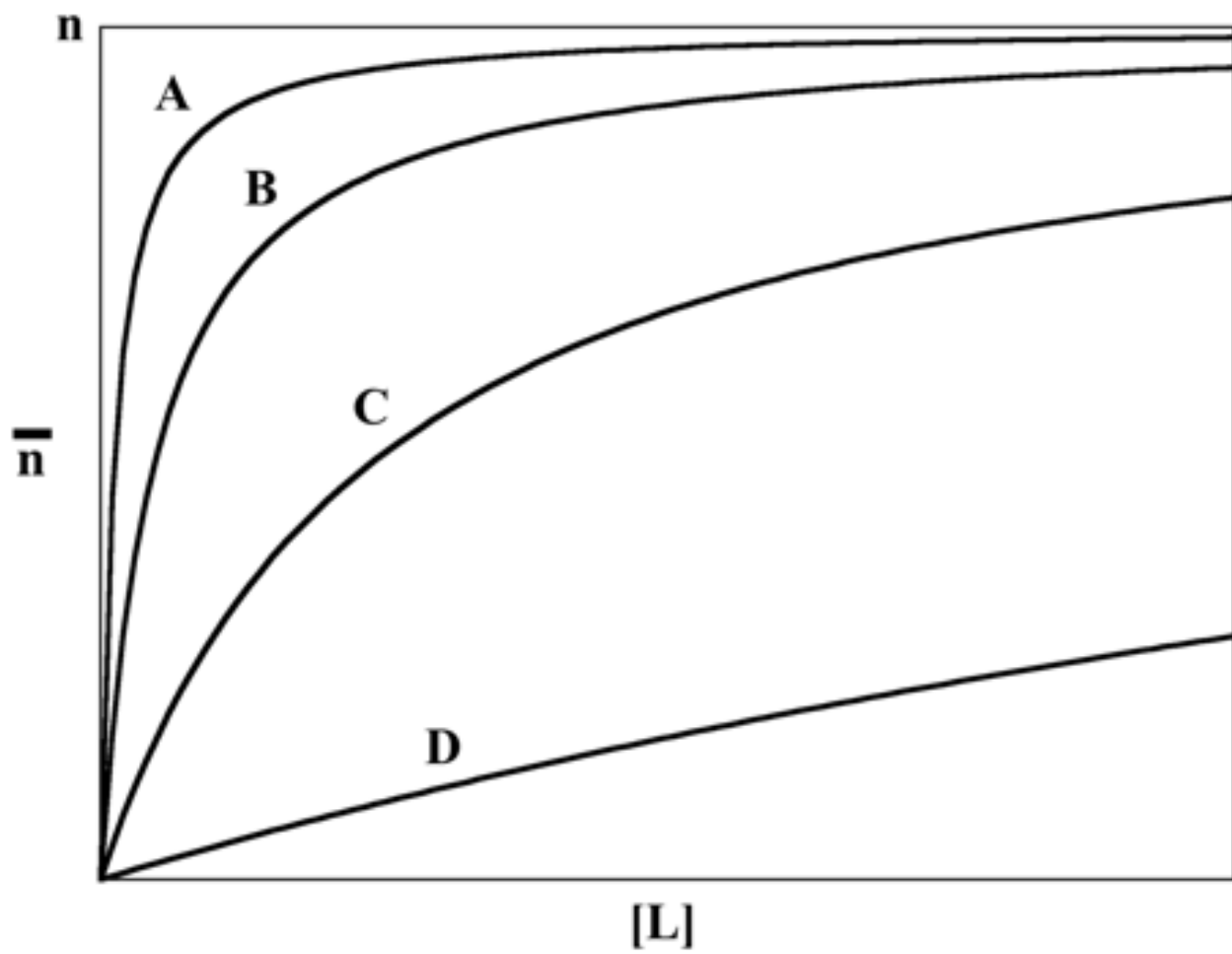
$$KD = \frac{1}{KA} = \frac{[P libre][L libre]}{[PL]}$$

La fonction de saturation

Y = nombre moyen de sites de fixation occupés par le ligand ramené au nombre total de sites de fixation = f([L])

$$Y = \frac{\text{Concentration du ligand lié}}{\text{Concentration totale de sites de fixation}}$$

$$Y = \frac{\text{Concentration des complexes } [PL_i]}{[\text{nombre } n \text{ de site(s) de fixation par molécule de protéine}] \times [\text{concentration totale de protéine}]}$$



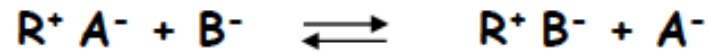
<u>Ligand</u>	<u>Spécificité</u>
NAD,	NADP Dehydrogénases
5'-AMP	enzymes NAD-dépendantes
2',5'-ADP	enzymes NADP ⁺ -dépendantes
Glutathione	Glutathione-S-transferase (protéines de fusion)
Chitin	Chitin binding protein (protéines de fusion)
Amylose	Maltose binding protein (protéines de fusion)
Bleu B	Kinases, déhydrogénases
Bleu F3G-A	enzymes NAD ⁺ -dépendantes
Rouge HE-3B	enzymes NADP ⁺ -dépendantes
Vert A	protéines CoA, HSA, déhydrogénases
Arginine	Fibronectin, prothrombin
Benzamidine	protéases à Serine
Calmodulin	Kinases
Gélatine	Fibronectin
Héparine	Lipoprotéines, protéines liant l'ADN et l'ARN
Lectines, concanavaline A	protéines glycosylées
Anticorps	(IgG) Antigènes (protéines, etc)
Protéine A	fragments Fc des anticorps
Protéine G	Anticorps
Poly U	protéines liant l'ARN

Détection des protéines lors de l'éluat d'une colonne chromatographique

- lorsqu'on purifie une ou des protéines par chromatographie, il faut une méthode qui permette de la ou les détecter quantitativement et spécifiquement dans les différentes fractions de l'éluat
- les méthodes utilisées sont:
 - absorption des protéines dans l'UV avec un spectrophotomètre
 - les protéines absorbent la lumière autour de 280nm
 - méthode non spécifique
 - essai colorimétrique (essai de Bradford)
 - contient un produit qui, en réagissant avec les protéines, donne une couleur mauve à la solution -> l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de protéine en solution
 - méthode non spécifique
 - essai enzymatique
 - pratique si la protéine à purifier est une enzyme
 - détection de la protéine sur gel SDS-PAGE (avec un colorant)
 - permet de déterminer le degré de pureté de la protéine
 - détection de la protéine avec un anticorps (essai ELISA ou immunoblot)
 - très spécifique

3- Chromatographie par échange d'ions

- dans un processus d'échange d'ions, les ions liés électrostatiquement à un support insoluble sont remplacés de manière réversible par des ions en solution:

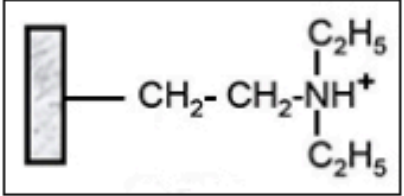
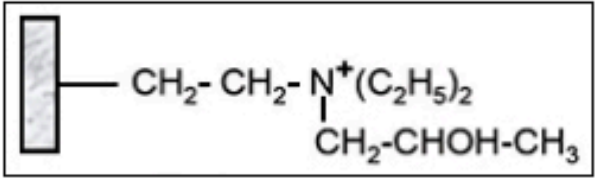


- $R^+ A^-$ est un échangeur d'anions, sous la forme A^-
- un échangeur de cations porte des groupes chargés négativement et lie des cations de manière réversible
- les protéines portent à la fois des charges positives et négatives et peuvent lier à la fois un échangeur d'anions ou de cations
- l'affinité avec laquelle une protéine se lie à un échangeur d'ions dépend:
 - 1) du pH de la solution, puisque la charge nette des protéines varie selon le pH
 - 2) de la nature et des concentrations des autres ions en solution, qui vont aussi compétitionner pour les sites de liaison de l'échangeur d'ions
- ces deux principes peuvent être utilisés pour purifier une protéine donnée parmi un mélange de molécules biologiques.

La chromatographie échangeuse d'ions

Dans la chromatographie échangeuse d'ions, le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est la charge nette. Pour cela, on utilise des résines chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

Les principaux groupements utilisés pour fabriquer des résines chargées sont

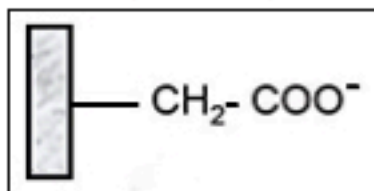
Résines échangeuses d'anions (chargées positivement)	
Faible (Pka ≈ 10 d'où pH ≤ 9)	Fort (Pka élevé)
Diéthylaminoéthyl (DEAE) 	Diéthyl(2 hydroxypropyl)aminoéthyl (QAE) 

Résines échangeuses de cations
(chargées négativement)

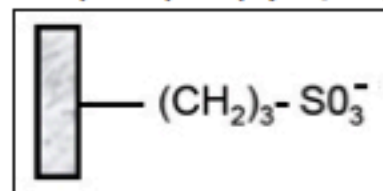
Faible
(Pka \approx 4 d'où pH \geq 5)

Fort
(Pka \approx 2)




Carboxyméthyl (CM)



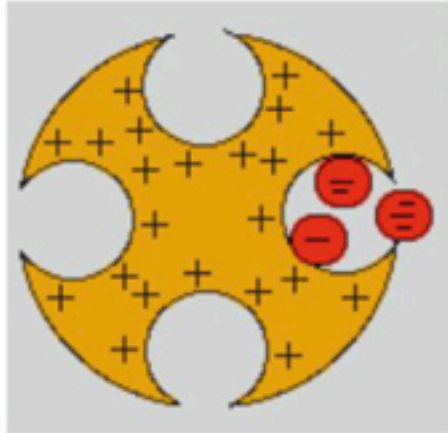
Sulphopropyl (SP)



Si on prend l'exemple de la chromatographie échangeuse d'anions, la résine étant chargée positivement, seules les molécules chargées négativement vont se fixer sur celle-ci. Les molécules neutres ou chargées positivement ne vont pas s'accrocher et vont donc être éluées immédiatement (c'est le « non-fixé »). Il convient bien entendu que la résine soit la plus neutre possible pour éviter tout autre type d'interaction avec les molécules (hormis les interactions électrostatiques). Il peut s'agir de cellulose, de dextran, d'agarose, de copolymères polystyrène/divinyl benzène, etc.

-  = **R** : Résine
-  = **M** : Molécule
-  = **S** : contre ion

✓ ADSORPTION



Cellulose, dextran, agarose, copolymère polystyrène / divinyl benzène...

✓ DESORPTION

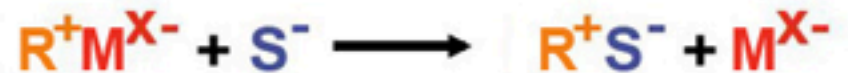
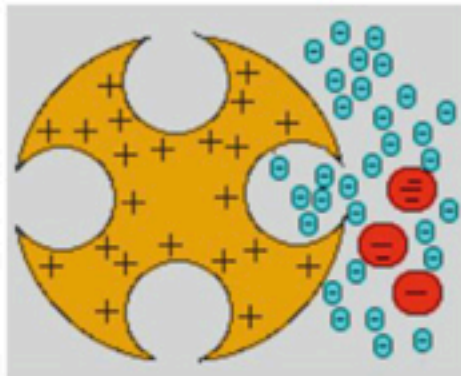


Figure 2 - Schéma du principe de séparation de la chromatographie échangeuse d'ions

L'éluion des molécules fixées peut alors être réalisée de différentes manières. On peut utiliser un tampon d'éluion contenant des ions négatifs qui vont entrer en compétition avec les molécules fixées pour les charges positives portées par la résine.

On peut, soit utiliser directement un tampon contenant une forte concentration en ions (pour éluer toutes les molécules d'un coup), ou, au contraire, augmenter progressivement la concentration ionique (on parle de gradient) ce qui permet de décrocher successivement les différentes molécules en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques.

Pratiquement dans ce dernier cas de figure, on utilise deux solutions tampon, l'une de faible concentration ionique et l'autre de forte concentration ionique. Deux pompes pilotées aspirent et mélangent ces deux solutions selon un rapport qui varie avec le temps (la proportion de solution de forte concentration ionique augmentant progressivement). Le produit de ce mélange est utilisé dans la colonne.

Un autre moyen consiste à modifier la charge de la ou des molécules fixées. L'un des moyens classiques pour obtenir un tel effet est de modifier le pH. En effet, de nombreux groupes ionisables sont sensibles au pH. En baissant le pH, on favorise l'ionisation des groupements basiques (chargés positivement) et on défavorise l'ionisation des groupements acides (chargés négativement). En baissant le pH, on favorise donc l'apparition d'une charge nette positive pour les molécules portant des groupes ionisables sensibles au pH. La transition entre une charge nette négative et une charge nette positive se fait à la valeur du pH_i . Encore une fois, on peut choisir d'appliquer directement un tampon au pH très bas, ou d'utiliser un gradient de pH. Dans les deux cas, chaque espèce moléculaire se détache de la résine lorsque le pH de la solution devient égal ou inférieur au pH_i de la molécule. Pratiquement, pour appliquer un gradient de pH, on procède de la même manière que pour appliquer un gradient de concentration ionique (mélange variables de deux solutions, l'une basique et l'autre acide).