

La chromatographie d'affinité

1. Principe

Dans la chromatographie d'affinité, la séparation des molécules va se faire selon leur capacité à se lier à un ligand spécifique fixé sur une résine. Toute la subtilité de la technique consiste à choisir judicieusement le ligand qui est utilisé. Un exemple classique est l'utilisation d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement la molécule à purifier. Lors du dépôt du mélange contenant la molécule à purifier, seules les molécules possédant de l'affinité pour le ligand attaché à la résine vont se lier (dans l'idéal, une seule espèce moléculaire). Il faut, bien sûr, que la résine porteuse soit la plus neutre possible, pour éviter la fixation non spécifique d'autres espèces moléculaires. Après avoir éliminé le « non-fixé » en lavant la résine avec le tampon de fixation, la molécule d'intérêt peut être éluée, par exemple en utilisant un tampon d'éluion de haute force ionique, de pH différent, ou comportant une forte concentration d'une molécule possédant également de l'affinité pour le ligand (libération de la molécule d'intérêt par compétition pour les sites de fixation). Voir la figure ci-dessous :

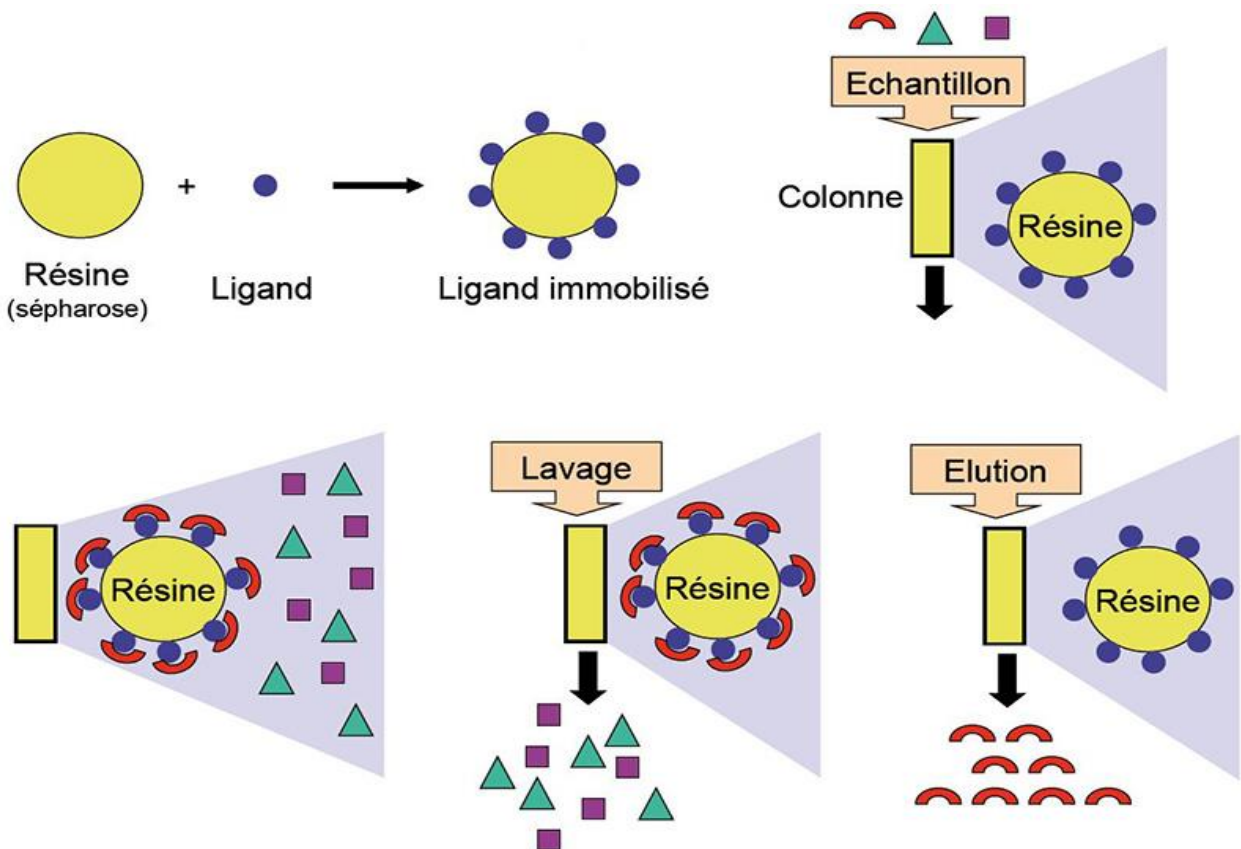


Schéma du principe de séparation de la chromatographie d'affinité

2. Méthodologie

Une chromatographie d'affinité comporte généralement deux ou trois étapes:

- Le couplage du ligand sur la résine (si nécessaire)
- L'adsorption de la molécule d'intérêt (et l'élimination concomitante des molécules contaminantes)
- La désorption de la molécule d'intérêt

2.1 Le couplage du ligand sur la résine

Il faut coupler le ligand sur une résine à chromatographie qui, en tant que telle, n'a pas d'affinité pour la molécule d'intérêt. Ce couplage ("coupling") doit évidemment se faire sans dénaturer le ligand pour que ce dernier conserve son affinité. Il existe des gels de couplage ("coupling gels") qui sont des résines préparées d'avance sur lesquelles on peut coupler le ligand choisi. Ce sont des résines spécialisées destinées uniquement à cet usage. Elle possède en général un groupement chimique facilement activable

posé au bout d'un bras écarteur. Diverses résines existent avec divers groupements activables selon la nature chimique du ligand qu'on veut utiliser: bromure de cyanogène ou p-nitrophényle pour coupler un ligand avec une amine, hydrazine pour un aldéhyde, un thiol pour un autre thiol.

Ce couplage consiste donc :

- 1) à "activer" le gel pour qu'il puisse former un lien covalent avec le ligand;
- 2) mettre en présence la résine avec ce ligand;
- 3) déclencher la réaction de formation du lien covalent entre le ligand et la résine par des conditions physico-chimiques appropriées;
- 4) éliminer les réactifs résiduels en percolant le gel avec un tampon approprié. Le gel est alors prêt à être utilisé.

Parmi [les diverses méthodes d'activation](#), on peut citer :

- l'activation des groupes hydroxyles du support (l'agarose par exemple) par le bromure de cyanogène dans une solution dont le pH est finement contrôlé (pH 8,3). Des groupements imidocarbonates sont formés sur lesquels on peut fixer des ligands contenant des amines libres, par exemple une protéine par la chaîne latérale de ces lysines. Les groupes hydroxyles qui n'ont pas réagi sont bloqués par action de l'éthanolamine ou la glycine.
- les groupes hydroxyles du support peuvent être activés par le carbonyl di-imidazole.
- l'activation du support peut être faite avec le glutaraldéhyde qui se polymérise et forme des chaînes à 5 carbones qui constituent des points de fixation à une certaine distance de la matrice.
- une autre méthode d'activation utilise le chlorure de tosyl et elle permet le couplage de molécules qui possèdent un groupement aminé, thiol ou phénol.

Pour rendre certains ligands accessibles au site de fixation sur la molécule avec laquelle ils interagissent, il est nécessaire d'augmenter la longueur de la chaîne carbonée à l'extrémité de laquelle se situe le groupement activé. Cette chaîne additive s'appelle **un bras espaceur**.

2.2 Adsorption

L'adsorption se fait évidemment dans des conditions physico-chimiques (pH, force ionique, etc.) où l'équilibre de la réaction tend fortement vers le maintien de l'interaction ligand-molécule d'intérêt. Toutes les molécules sans affinité pour le ligand ne se lieront évidemment pas et élueront rapidement. On lave ensuite la colonne avec le solvant d'adsorption pour éliminer toute molécule contaminante résiduelle.

La chromatographie d'affinité est la plus délicate à mettre en oeuvre car elle nécessite la mise au point des conditions expérimentales spéciales pour obtenir un gel correctement activé :

- le ligand doit être orienté de manière optimale pour une parfaite reconnaissance stéréochimique de la molécule que l'on veut séparer
- il ne faut pas que le ligand subisse l'action des enzymes, c'est pour cela qu'on utilise davantage des analogues de substrats (inhibiteurs compétitifs par exemple) que les substrats eux-mêmes
- il faut trouver des conditions d'élution de la molécule fixée au ligand qui préserve sa fonction biologique

- en conséquence, cette méthode chromatographique est coûteuse

2.3 Désorption

La désorption est faite en exposant la résine contenant le complexe ligand-molécule d'intérêt à des conditions qui déstabilisent l'interaction. Cela peut être fait en changeant les conditions physico-chimiques (pH, force ionique) initiales pour affaiblir l'interaction. Un agent chaotropique ou un détergent (Triton, Tween) peut aussi être utilisé à cette fin. Ces produits doivent être compatibles avec la stabilité de la protéine et utilisés à des concentrations pas trop fortes. Cependant, on utilise le plus souvent un mélange de désorption contenant un produit chimique plus ou moins structurellement analogue au ligand et, si possible, ayant encore plus d'affinité pour la molécule d'intérêt. Quelque fois il peut même s'agir de la forme libre du ligand. On peut aussi utiliser des détergents doux (Tween, Triton, etc.) qui vont briser certaines interactions protéine-protéine impliquées dans l'emploi d'un anticorps comme ligand.

2.4 Méthodes sur colonne et en vrac (par agitation)

Il existe deux méthodes pour adsorber et éliminer les contaminants, puis pour éluer la protéine, celles sur colonne et celles en vrac ("batch").

La plus commune est la [méthode sur colonne](#). Il s'agit essentiellement de la technique typique de chromatographie sur colonne. Après avoir monté la colonne de résine, on y fait percoler le mélange à séparer. Les molécules d'intérêt s'y adsorberont tandis que les autres sortiront de la colonne avec le flux de solvant. Ensuite, on élue en faisant percoler un solvant déstabilisant l'interaction ligand-molécule spécifique pour recueillir celle-ci dans le flux de solvant. La méthode sur colonne s'utilise surtout pour des [chromatographies analytiques](#) ou lorsque le mélange à séparer est [relativement petit](#).

La méthode [en vrac ou par agitation](#) consiste à exposer résine et mélange à séparer simplement en les brassant ensemble, par exemple dans un bécher avec un agitateur magnétique, durant une période de temps suffisante pour que l'adsorption complète se fasse. On récupère ensuite la résine, sur laquelle les molécules spécifiques sont toujours attachées, par simple sédimentation ou, quelquefois, par centrifugation ou filtration pour accélérer le processus. On élimine ainsi le "surnageant" ou le "filtrat" contenant le matériel non adsorbé. On peut ensuite laver la résine avec le solvant d'adsorption pour enlever les traces résiduelles

de contaminants. La molécule d'intérêt peut alors être désorbée, avec un solvant déstabilisant l'interaction ligand-molécule spécifique, soit sur colonne, soit par un autre brassage. La méthode en vrac est bien adaptée aux **chromatographies préparatives** où de **larges volumes d'un mélange** doivent être séparés rapidement sur des résines ayant des débits trop lents en colonne.

2.5 Détection des effluents

Lorsqu'on emploie une colonne il faut évidemment suivre au fur et à mesure la sortie des molécules d'intérêt. Pour les protéines on emploie surtout l'absorption à 280 nm. C'est une technique facile à faire basée sur le fait que les protéines contiennent un acide aminé absorbant fortement dans l'UV moyen, avec un pic aux alentours de 280 nm, la tyrosine. D'autres acides aminés aromatiques ont aussi une certaine absorbance dans cette région (phénylalanine, tryptophane...). Elle est suffisamment éloignée de 254 nm où est le pic d'absorption des acides nucléiques (254 nm) qui risquent de contaminer la préparation.

Pour ces derniers, on les suit généralement à 260 nm. Pour avoir une sensibilité accrue on peut employer, pour les protéines, 190-230 nm, soit la bande d'absorption du lien peptidique. Cependant ces longueurs d'onde nécessitent des détecteurs beaucoup plus coûteux, plus difficiles d'entretien et plus susceptibles aux interférences. On travaille à ces longueurs d'onde quand on désire une sensibilité très forte où encore si la protéine d'intérêt ne possède pas de tyrosine ou de tryptophane.

3. Avantage et inconvénient

L'avantage de cette technique est sa très grande sélectivité potentielle, à tel point que son utilisation peut parfois permettre une purification suffisante en une seule étape, ce qui est rarement le cas avec les autres types de chromatographie.

L'inconvénient de cette technique provient de la nécessité de posséder un ligand adapté, lui-même suffisamment purifié. Il faut donc, dans une première étape, trouver un ligand suffisamment spécifique (ce qui détermine la sélectivité de la purification) et qui possède pour la molécule d'intérêt une affinité ni trop faible (il faut une interaction suffisante pour que cette molécule soit retenue), ni trop forte (car il faut pouvoir la décrocher). Une fois la « perle rare » trouvée, il faut, dans une seconde étape, purifier ce ligand avant de le coupler à une résine porteuse. La purification du ligand est nécessaire car l'utilisation d'un mélange entraînerait

une forte probabilité de fixer des molécules autres que celle d'intérêt. Le couplage est, lui, généralement simple, des matériels et techniques bien rodés étant disponibles.

La chromatographie d'affinité est donc très puissante par sa sélectivité importante, mais souvent plus lourde et plus onéreuse à mettre en œuvre que d'autres types de chromatographie. Par ailleurs, elle n'est pas adaptée à la purification de grandes quantités de molécules. En effet, la capacité est fonction du nombre de sites disponibles sur la résine : lorsque ceux-ci sont saturés, les molécules en surnombre ne seront pas purifiées.

4. Applications

La chromatographie d'affinité est utilisée :

- en enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques ;
- en immunologie, pour la purification d'anticorps ;
- en biochimie, pour l'isolement des protéines et des acides nucléiques.

4.1 Isolement des protéines

Les chromatographies d'affinité sont abondamment utilisées pour isoler des protéines. De nombreux types de molécules peuvent être utilisés comme ligand.

Les ligands d'une enzyme peuvent être un cofacteur non hydrolysable de cette enzyme, ou encore un analogue structural non hydrolysable du substrat. Un glucide peut être un bon ligand pour une lectine. Inversement, une lectine servira de ligand pour une glycoprotéine. On peut multiplier à l'infini les possibilités.

De plus, on a trouvé de façon empirique que certains colorants avaient une affinité inattendue pour certaines protéines. Ainsi, le bleu de dextran peut se fixer réversiblement à certaines kinases tandis que le bleu de procion a une affinité pour des déshydrogénases utilisant le NAD comme cofacteur.

4.2 Isolement des antigènes

Les anticorps sont des ligands très efficaces pour isoler leur antigène spécifique, on parle alors d'immunoaffinité. L'interaction entre un antigène et son anticorps est très forte, des K_D de l'ordre 10^{-10} ne sont pas rares. Le défi dans ces chromatographies est de détacher l'antigène sans l'endommager et, si possible, sans endommager la colonne et l'anticorps qui lui est attaché. On doit donc employer des conditions douces de détergents (Triton, Tween), de pH, de forces ioniques...) Les ligands d'une enzyme peuvent être un cofacteur non hydrolysable de cette enzyme, ou encore un analogue structurel non hydrolysable du substrat.

.

4.3 Isolement des acides nucléiques

On a aussi mis au point des méthodes de chromatographie d'affinité pour isoler des acides nucléiques. Ainsi les ARNm polyadénylés peuvent facilement être isolés par chromatographie sur des résine d'oligo(dT)-cellulose ou de poly(U)-Sepharose. En effet, à faible force ionique, la courte séquence de polyadénines au bout 3' des ARNm peut se lier par simple complémentarité de base à des séquences de d'oligo-désoxythymidine ou de poly-uridine. On peut ensuite désorber à haute force ionique.