

Exercice 4 : La carboxyméthylcellulose (CM-cellulose) est un support échangeur de cations. Elle est obtenue en substituant la cellulose par des groupements carboxyméthyls (-CH₂-COOH). Questions :

1 - Quelle est la proportion des groupements carboxyméthyls chargés négativement aux pH suivants : 1 ; 4,76 ; 7 et 9 (on considérera que le pKa du groupement carboxyl des radicaux carboxyméthyls est 4,76). **2** - Parmi les protéines suivantes : Ovalbumine (pHi = 4,6), Cytochrome c (pHi = 10,65) et Lysozyme (pHi = 11), quelles sont celles qui sont retenues par la CM-cellulose à pH 7 ?

CORRECTION

1 - Proportion des groupements carboxyméthyls (pKa = 4,76) chargés négativement aux pH : 1, 4,76,7 et 9. Le pH est donné par la relation suivante :

$$pH = pKa + \log \frac{(-CH_2-COO^-) \leftarrow \text{base}}{(-CH_2-COOH) \leftarrow \text{acide}}$$

À pH = 1 : log Base/Acide = pH - pKa = 1 - 4,76 = -3,76 donc : = 1,74 10⁻⁴

Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) = 1,74 10⁻⁴ * A

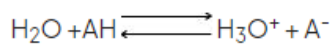
On en déduit que A + 1,74 10⁻⁴ * A = 100 (A) est mis en facteur : A = 100 / (1 + 1,74 10⁻⁴)

On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 99,98 % et (B) = 0,02 %

À pH = 4,76 : A = 50 % et B = 50 %

À pH = 7 : A = 0,575 % et B = 99,425 %

À pH = 9 : A = 5,73 10⁻³ % et B = 99,994 %



Ces résultats peuvent être traduits par le diagramme de prédominance suivant :

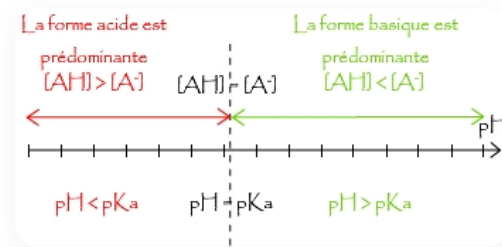


Diagramme de prédominance d'un couple acide base

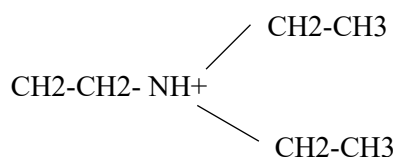
2 - À pH = 7, on a pu calculer que la résine était à 99,425 % sous forme basique, chargée négativement (-CH₂-COO⁻).

Protéine :	pHi :	Charge à pH = 7 :
Ovalbumine	4,6	négative
Cytochrome c	10,65	positive
Lysozyme	11	positive

Ainsi, seule l'ovalbumine, qui à pH = 7 est chargée négativement, ne sera pas retenue sur la colonne.

Le cytochrome c et le lysozyme seront retenus.

Exercice 5 : La diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) est un support échangeur d'anions, obtenu en substituant la cellulose par des groupements diéthylaminoéthyls :

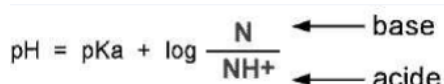


Questions : 1 - Quelle est la proportion de radicaux-DEAE chargés positivement aux pH suivants : 2 ; 7 ; 9,4 ; 12 ? (On considérera que le pK de l'amine tertiaire du groupement DEAE est 9,4).

2 - Parmi les protéines suivantes : Sérumalbumine (pHi = 4,9), Uréase (pHi = 5), Chymotrypsinogène (pHi = 9,5), quelles sont celles qui, à pH 7, sont retenues par la DEAE-cellulose ? (On considérera que les interactions protéine-DEAE-cellulose sont uniquement de type électrostatiques).

Correction exercice 5 :

1 - Proportion des groupements diéthylaminoéthyls (DEAE : pKa = 9,4) chargés négativement aux pH : 2, 7, 9,4 et 12. Le pH est donné par la relation suivante :



À **pH = 2** = Log Base/Acide = pH - pKa pH - pKa = 2 - 9,4 = -7,4 donc : = $3,98 \cdot 10^{-6}$ Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) = $3,98 \cdot 10^{-6} \cdot (A)$, on en déduit que (A) + $3,98 \cdot 10^{-6} \cdot (A)$ = 100(A) est mis en facteur : (A) = $100 / (1 + 3,98 \cdot 10^{-6})$. On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = environ 100 % et (B) = 0 %

À **pH = 7** : = pH - pKa = 7 - 9,4 = -2,4 donc : = $3,98 \cdot 10^{-3}$ Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) = $3,98 \cdot 10^{-3} \cdot (A)$. On en déduit que (A) + $3,98 \cdot 10^{-3} \cdot (A)$ = 100(A) est mis en facteur : (A) = $100 / (1 + 3,98 \cdot 10^{-3})$. On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 99,996 % et (B) = 0,004 %

À **pH = 9,4** : = pH - pKa = 9,4 - 9,4 = 0 donc : = 1 Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) = (A), on en déduit que (A) + (A) = 100(A) est mis en facteur : (A) = 100 / (2)

On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 50 % et (B) = 50 %

À **pH = 12** : = pH - pKa = 12 - 9,4 = 2,6 donc : = 398,1 Sachant que (A) + (B) = 100 % et que (B) = $398,1(A)$, on en déduit que (A) + $398,1(A)$ = 100(A) est mis en facteur : (A) = $100 / (1 + 398,1)$

On peut ainsi calculer le pourcentage des formes (A) et (B) : (A) = 0,25 % et (B) = 99,75 %

Globalement, on peut donc constater qu'à un pH inférieur au pKa (pH acide), les groupements diéthylaminoéthyls se présenteront majoritairement sous forme acide (-NH⁺). À l'inverse, à un pH supérieur au pKa (pH basique), les groupements diéthylaminoéthyls se présenteront majoritairement sous forme basique (-N)

2 - À pH = 7, on a pu calculer que la résine était à 99,996 % sous forme acide, chargée positivement.

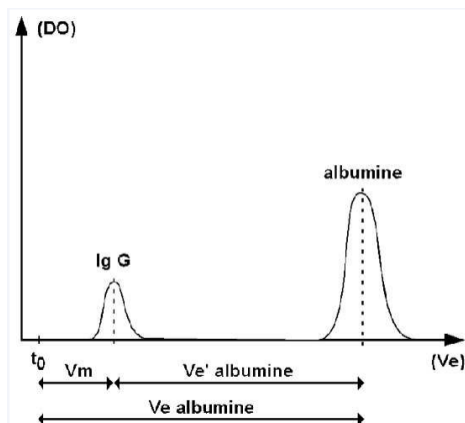
Protéine :	pHi :	Charge à pH = 7 :
Sérumalbumine	4,9	négative
Uréase	5,0	négative
Chymotrypsinogène	11,0	positive

Ainsi, à pH = 7 la sérumalbumine et l'uréase sont chargées négativement, et seront donc retenues sur la colonne. Le chymotrypsinogène ne sera pas retenu.

Exercice 6 : Un mélange d'immunoglobulines G ($MM = 160000$ Da) et d'albumine sérique bovine ($MM = 67000$ Da) est déposé sur colonne de séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da). Rappel : $MM =$ masse moléculaire.

Question : 1 - Tracer un diagramme d'éluion vraisemblable (DO en fonction de V_e) en indiquant le volume mort.

Correction exercice 6 : Voici un diagramme d'éluion vraisemblable pour une chromatographie d'exclusion séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da), sur laquelle on aurait déposé un un mélange d'immunoglobulines G ($MM = 160000$ Da) et d'albumine sérique bovine ($MM = 67000$ Da). Ici on a représenté la mesure de la densité optique (DO) de l'éluat en fonction du volume d'éluion (V_e) :



Les IgG présentent une masse moléculaire supérieure à la valeur de la limite d'exclusion de la colonne (100000 Da). Elles seront donc éluées en premier, et donneront la valeur du volume mort de la colonne ($V_m = V_e \text{ IgG}$). L'albumine de masse moléculaire 67000 g/mol, sera incluse dans le gel et éluée plus tard, avec un V_e albumine qui est égal à $V_m + V_e'$ albumine.