

5. CHROMATOGRAPHIE d'AFFINITE

5.1. Principe

La chromatographie d'affinité exploite les propriétés des interactions biologiques entre les molécules, et, théoriquement, capable de séparer et purifier les molécules d'un mélange en une seule étape. Au début, elle est utilisée pour purifier les enzymes, et ensuite étendue aux acides nucléiques, aux immunoglobulines, aux récepteurs membranaires, aux fragments cellulaires et même aux cellules. La phase stationnaire de cette méthode qui remplit la colonne est un support (silice, polymère) inerte chimiquement, sur lequel se lie un ligand par covalence. Cette méthode est basée, donc, sur des interactions spécifiques et réversibles entre le ligand et son partenaire (affinant) en solution (Tab. 01).

Tableau 01: Différents types d'affinité en chromatographie

Ligand	Affinant
Enzyme	Substrat ou inhibiteur
Antigène	Anticorps
Hormone	Récepteur

5.2. Phase stationnaire (gel d'affinité)

Elle est constituée d'un ligand (effecteur) lié à un support poreux avec des liaisons covalentes, soit directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (spacer) (Fig. 05).

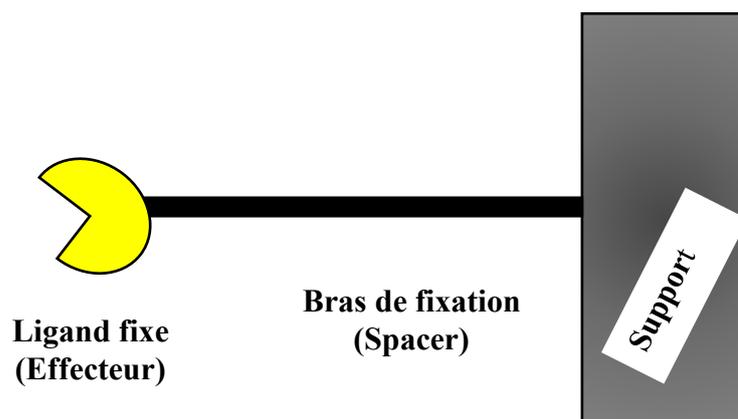


Figure 05: Schéma d'un gel d'affinité

5.2.1. Supports

Les plus utilisés sont des dérivés de polymères osidiques : la caroxyméthylcellulose (CM-cellulose) comme La CM-cellulose aminohexylique (spacer long) et la CM-cellulose hydrazique (spacer court) et les Sépharoses activées par le bromure de cyanogène (à pH = 11). Les supports doivent être poreux, insolubles dans l'eau mais mouillables, stables chimiquement et mécaniquement, plus que la présence des groupements fonctionnels réactifs capable de fixer les bras fixateurs.

5.2.2. Effecteurs

Toute substance permet la formation d'un complexe stable avec les molécules à séparer s'appelle un effecteur. Il existe différents types d'effecteurs selon l'utilisation, immunologique, enzymologique ou d'autres (Tab. 01).

5.3. Elution

L'élution des molécules fixées est effectuée d'une manière spécifique (compétiteurs) ou non spécifique. Dans le premier cas, des substrats ou des inhibiteurs réversibles sont utilisés pour l'élution des enzymes. Toutefois, on utilise deux méthodes pour l'élution non spécifique : la modification de la force ionique ou la modification du pH en ajoutant l'acide acétique dilué ou de NH₄OH.

5.4. Etapes de la chromatographie d'affinité

Cette méthode passe par trois étapes représentées dans la figure 06:

5.4.1. Etape de fixation

Dans une colonne prête à l'utilisation, l'échantillon contenant les molécules d'intérêt est mis an surface. Au cours du déplacement de l'échantillon le long de la colonne, les molécules sont spécifiquement retenues par la phase stationnaire.

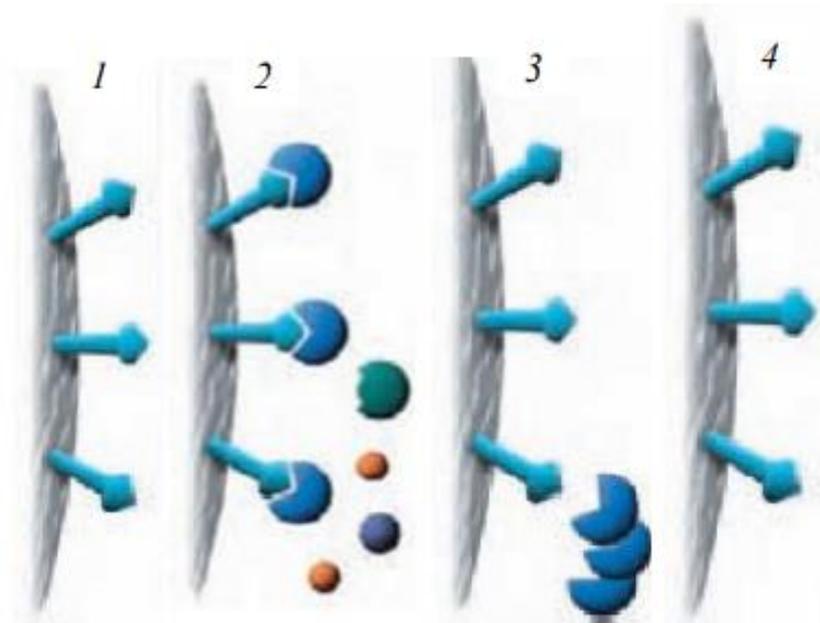


Figure 06: Principe de séparation de la chromatographie d'affinité

5.4.2. Etape de purification

Les impuretés, les molécules qui ne sont pas retenus par le ligand, seront éliminés par la phase mobile ou par lavage en utilisant une autre solution tampon.

5.4.3. Etape d'élution

Pour éluer les molécules fixées (affinant), quelques paramètres doit être modifiés (voir la section Elution).

5.5. Applications

Ce procédé est adapté soit à l'analyse, soit à la préparation des échantillons biologiques. Il est utilisé en :

- Enzymologie : extraction d'enzymes et la purification des extraits enzymatiques ;
- Immunologie : purification des anticorps ;
- Protéinochimie : étude des protéines membranaires ;
- Chimie : fractionnement de divers acides nucléiques, tels que les ARNm, ARN ribosomiaux, etc.

6. CHROMATOGRAPHIE d'EXCLUSION STÉRIQUE

6.1. Principe

La gel-filtration est fondée sur la différence de pénétration des composés d'un mélange dans la phase stationnaire qui est un gel poreux. La séparation est mise en place grâce à la présence des pores dans le gel remplis de la phase mobile (Fig. 07). Cette méthode est basée aussi sur la masse et la forme des molécules, puisque généralement la taille des molécules est proportionnelle à leur masse, et deux molécules qui ont la même masse molaire mais deux formes différentes (fibrillaire et ronde) ne migre pas de la même vitesse.

Dans le mélange de composés, les grosses molécules, qui ne peuvent pas entrer dans les pores, passent entre les grains de gel, migrent rapidement et donc exclues (éluées) en premières ($K_d = 0$). Cependant, les particules moyennes et petites sont distribuées entre les deux phases, car elles sont capables de pénétrer dans les pores du gel ($0 < K_d < 1$) et donc exclues tardivement (Fig. 08). Un K_d plus que 1 indique que les solutés réagissent avec les parois des pores du gel par adsorption, ce phénomène ne fait pas partie de CES.

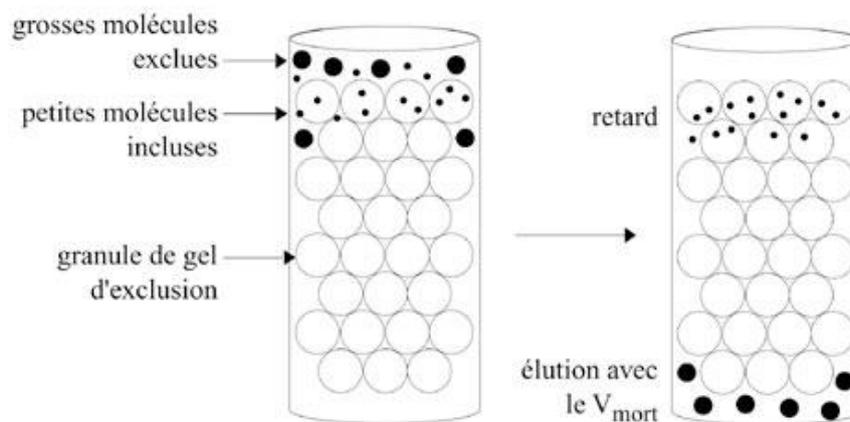


Figure 07: Principe de la chromatographie d'exclusion stérique

BN : il existe deux type de CES selon la nature de la phase mobile:

- Chromatographie de perméation sur gel lorsque la phase mobile est un solvant organique (hydrophobe) ;
- Chromatographie de filtration sur gel (tamisage moléculaire) lorsque la phase mobile est de nature aqueuse (hydrophile), et la séparation a mis en place grâce à la pression atmosphérique.

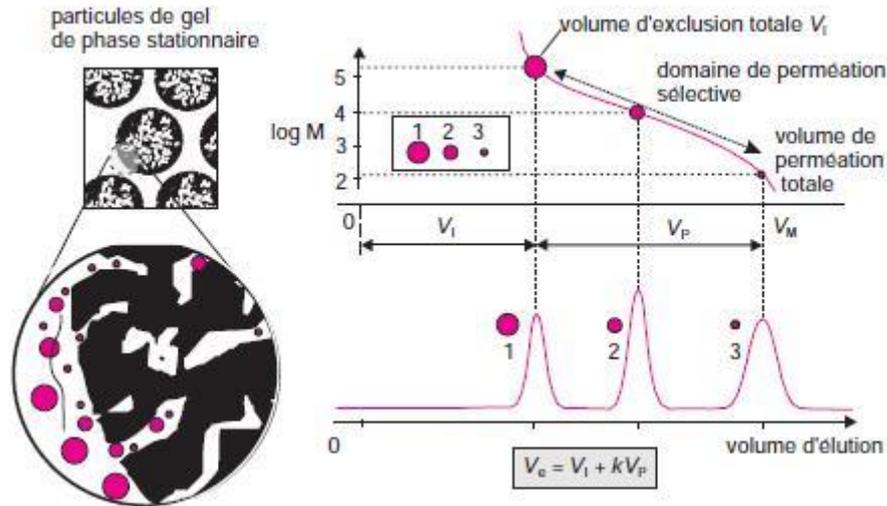


Figure 08: Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1, 2, 3) et la courbe $\log (M) = f (V_e)$.

6.2. Théorie de la CES

La répartition d'une molécule entre la phase stationnaire et mobile, pour un gel donné, est effectuée en fonction du coefficient de diffusion (K_d). Ce dernier est défini comme étant le rapport entre la concentration de la molécule dans le milieu intra-granulaire considéré comme phase stationnaire (C_s) et celle dans le milieu extra-granulaire considéré comme phase mobile (C_m).

$$Kd = \frac{C_s}{C_m}$$

6.3. Phase stationnaire

La phase stationnaire est un gel formé de substance solide, constituée de petites particules poreuses très régulières et calibrées. Chaque grain résulte de la liaison des macromolécules assemblées les unes aux autres de façon à former un ensemble régulièrement réticulé. La taille des pores est en fonction de la taille des molécules à séparer.

Tout gel utilisé comme phase stationnaire pour CES a un domaine de fractionnement spécifique (limite de séparation maximale et minimale). On distingue deux types de gel, les gels hydratés comme gel de Sephadex (porosité après gonflement dans l'eau) et les gels permanents organiques (des copolymères) et minéraux (gels de silice) (emblée une structure réticulée). Dans ce type des gels (minéraux) s'ajoute l'effet d'adsorption à celui de tamisage moléculaire.

Exemple des gels : Sephadex (Dextran), Polyacrylamides (Biogels), Sépharose (Agarose) Polyvinyle (Fractogel) sont des *xérogels* et les *aérogels* (silice désactivée par silanisation de OH). On peut utiliser des gels mixtes comme acrylamide-agarose ou acrylamide-dextran.

6.4. Phase mobile

La phase mobile doit être compatible avec le système de détection, capable de dissoudre l'échantillon, d'imprégner et de gonfler le gel et ne pas détériorer la phase stationnaire.

6.5. Mode opératoire

- Choix et préparation du gel ;
- Choix de la phase mobile : la force ionique et le pH sont choisis selon la nature des solutés. Aussi, la vitesse de débit et la pression doivent être programmées d'une façon de ne pas écraser les billes de gel ;
- Introduction du gel dans la colonne ;
- Injection de l'échantillon ;
- Elution et collection des solutés ;
- Régénération de la colonne: pour conserver le gel, il doit être lavé pour éliminer les impuretés, et stocké à une température de 2-4°C en présence d'un agent antimicrobien et un conservateur ;
- Analyse du chromatogramme et identification des fractions collectées.

6.6. Applications

- Purification de protéines, peptides, polysaccharides, hormones, cofacteurs, acides nucléiques, ... et même les virus ;
- Détermination du poids moléculaire par ce que le volume d'éluion (V_e) et en fonction linéaire, approximativement, avec $\log(\text{poids moléculaire})$ dans le domaine d'application ;
- Dessalage : dans une colonne de Sephadex G₂₅, les grosses molécules d'un échantillon (molécules + sels) sont exclues du gel alors que les sels sont retenus dedans

(s'applique pour les acides nucléiques, polysaccharides et protéines). Plus rapide que la dialyse.

7. CHROMATOGRAPHIE par ECHANGE d'IONS (CEI)

7.1. Principe

La chromatographie ionique est une chromatographie liquide, réalisée dans une colonne (souvent) contenant une phase stationnaire poreuse, sur laquelle est greffé un échangeur d'ions qui peut interagir avec les substances ioniques. La séparation en CEI repose sur des interactions électrostatiques (ioniques) réversibles entre l'échangeur d'ions, les contre ions échangeables (mobiles) et les molécules chargées.

Un mélange contenant plusieurs substances de charges différentes (A, A-, A+, A++, A+++) est mis dans une colonne échangeuse d'ions pour séparer les solutés. Ces derniers se fixent sur l'échangeur selon le signe de leur charge, les substances ayant une charge nulle ou la même charge que celle d'échangeur d'ions s'éluent de la colonne en premier, tandis que celles ayant un signe de charge opposé à celui d'échangeur s'adsorbent. L'adsorption des substances est mise en place en fonction de leur affinité (le nombre des charges), A+++ a une grande affinité par rapport à A+ et A++ sans oublier l'effet de compétition lorsque le mélange est concentré (A+++ en grande quantité peut écarter A+ et A++).

7.2. Phase stationnaire ou Echangeurs d'ions

La phase stationnaire en CEI est un échangeur d'ion portant des groupements fonctionnels chargés positivement ou négativement capable d'échanger réversiblement les substances à séparer. Les groupements ionisables sont greffés sur un support qui joue le rôle d'une matrice d'une nature définie. L'échangeur d'ion est un solide (souvent gélifiable) à base de granules, poreux et constitue d'un réseau de macromolécules insolubles. Il peut être préparé soit de produits naturels ou de copolymères de synthèse (résine). Il doit : être résistant aux pressions mécaniques, avoir une grande surface d'échange, utiliser à une grande gamme de pH et assurer un transfert rapide des ions.

L'affinité de la phase stationnaire pour un ion (analyte) donné dépend de plusieurs facteurs:

- La porosité et la granulométrie du support, qui varient selon le taux de pontage de la résine (diamètre varie entre 30 et 800 µm), autrement dit l'accessibilité des groupements fonctionnels.

- La charge des groupements fonctionnels, qui est aussi dépend de: leur nature (pKa), le pH de la solution (tampon), la taille et la densité de charge de l'ion considéré, analyte (selon le pKa et le pHi, une charge élevée indique une fixation grande, ou/et une petite taille), la concentration des analytes dans la colonne (agit sur la position de l'équilibre, une concentration élevée en analytes peut éluer ceux fortement retenus même de faible affinité).

7.2.1. Supports

Ils peuvent être de nature minérale comme la *silice* ou organique comme les *copolymères de synthèse* ou *résine* et la *cellulose* qui fournit, par oxydation, le *Dextran* (polymère de glucose) qui donne à son tour le Sephadex après une polymérisation par la glycérine (après greffage fournit le matériel d'IEC).

7.2.2. Groupements fonctionnels

Les groupements échangeurs chargés sont greffés par covalence sur la matrice, et selon leur charge on distingue deux types d'échangeurs : les échangeurs anioniques (référence aux groupements fixés sur le support) qui sont des échangeurs de cations et les échangeurs cationiques qui sont des échangeurs d'anions.

7.2.2.1. Echangeur de cations

Les échangeurs de cations portent des groupements acides, et il en existe trois types selon leur aptitude à l'ionisation:

- Résines cationiques fortes ou acides forts portant des restes *acides sulfoniques aromatiques*. Cette résine se résulte de la sulfonation (fixation du groupement SO_3H^+) du copolymère styrène/divinylbenzène. Cette réaction est faite en présence d'acide sulfurique (H_2SO_4) dans le milieu (Fig 09).



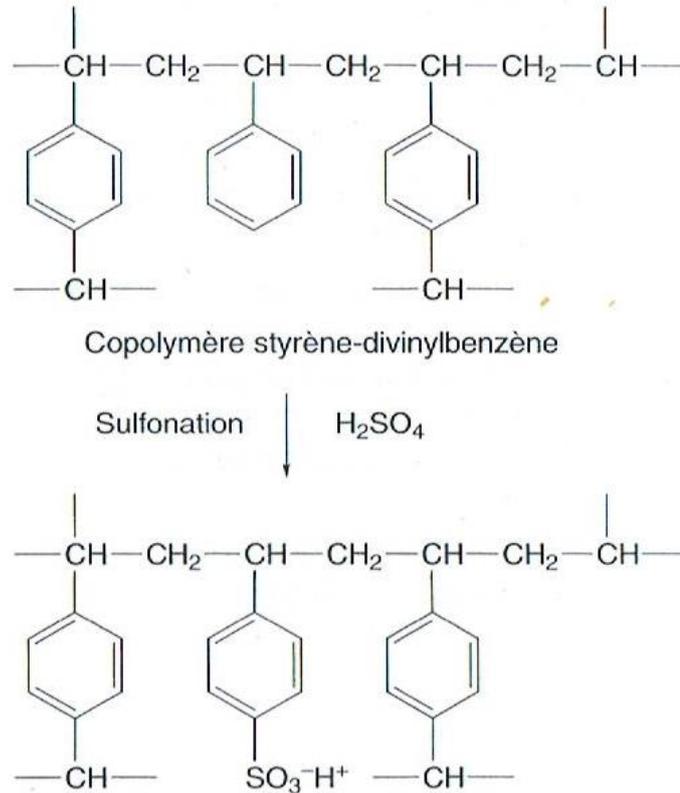
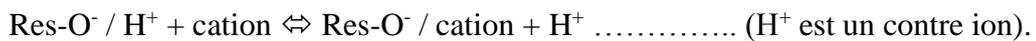


Figure 09: Sulfonation du copolymère styrène-divinylbenzène

- Résines cationiques faibles ou acides faibles avec des groupements *acides carboxyliques*.



- Résines cationiques très faibles ou acides très faibles avec *des groupements phénols*



7.2.2.2. Echangeur d'anions

Les échangeurs anioniques portent des groupements basiques, et il en existe deux types:

- Résine anioniques fortes ou bases fortes ou *hydroxydes d'ammoniums quaternaires*.
Pour réaliser cette résine, on fait une chlorométhylation du même support, copolymère styrène/divinylbenzène, au lieu de la sulfonation ce qui provoque la fixation du groupement $-\text{CH}_2\text{Cl}$.

- Résine faibles ou bases faibles avec des *polyalkylamines*.

Certains groupement fonctionnels sont dit forts par ce que leur aptitude d'échanger est constante et indépendante au pH (ils sont très ionisés quel que soit le pH). Cependant, les autres échangeurs tels que les phosphonates ($-\text{PO}_3^{2-}$), carboxylate (CO_2^-), ammonium tertiaire ($-\text{NR}_2^+$) et secondaire ($-\text{NR}^+$) sont dits faibles car ils ne sont pas ionisés dans toute la gamme de pH, et donc ils n'assurent pas leur fonction.

Le choix entre un échangeur fort ou faible est en fonction de la stabilité des molécules à séparer ainsi que l'effet du pH sur leur charge. Au fait, l'ionisation des électrolytes faibles nécessite une valeur très haute ou très faible de pH, donc ils peuvent être séparés que sous l'effet d'un échangeur fort (acide ou base). Cependant, les électrolytes forts se séparent en utilisant un échangeur faible, qui, par conséquence, réduit le risque de la fixation des impuretés faiblement chargés ou la dénaturation des solutés. Généralement, le pH agit sur la rétention des analytes notamment pour les échangeurs faibles.

7.3. Phase mobile

La séparation des molécules ionisables en utilisant l'CEI est mise en place avec une solution aqueuses, phase mobile ou éluant. L'emploi de la solution aqueuse est en raison des propriétés d'ionisations et de solubilisations de l'eau, cependant le mélange de solvant polaire (méthanol/eau) peut être utilisé, dans certain cas, pour faciliter la solubilité et optimiser l'élution des solutés. L'élution est faite grâce à une modification des équilibres entre l'échangeur d'ions et le soluté, soit en modifiant le pH, soit en augmentant la force ionique :

- L'augmentation de la force ionique exerce un effet de compétition, c'est-à-dire le déplacement des ions fixés (solutés par exemple protéine) et remplacement par d'autres ions (contre ions) de charge et concentration élevée.

- Le pH du milieu influe la charge totale nette des protéines (acides aminés) comme ci:

Si le $\text{pH} > \text{pHi}$: la protéine prend une charge négative et pour l'éluer, il est nécessaire de diminuer la valeur du pH.

Si le $\text{pH} < \text{pHi}$: la protéine prend une charge positive et pour l'éluer, il est nécessaire d'augmenter le pH.

Si le $\text{pH} = \text{pHi}$: la protéine prend une charge totale nulle et donc s'élue.

7.4. Etapes de la chromatographie

1. Choix de la phase stationnaire ;
2. Choix de la phase mobile ;
3. Réglage des conditions de travail ;
4. Remplissage de la colonne (ni fissure ni bulles): le volume de la résine utilisé dépend de sa capacité de rétention, son affinité et la concentration de l'échantillon ;
5. Equilibration de la colonne (fixation des contres ions) ;
6. Injection de l'échantillon (fixation ou adsorption des solutés) et réglage de la vitesse d'écoulement de l'éluant (exprimée en goutte min⁻¹ ou en ml min⁻¹ ;
7. Elution : désorption des solutés et fixation d'autres ions de densité de charge et concentration plus élevées. L'élution par gradient continu est la plus répandue en comparant avec celle isocratique ;
8. Récupération des fractions ;
9. Analyse du chromatogramme ;
10. Régénération du gel.

7.5. Applications

La chromatographie sur échangeur d'ions s'applique à un grand nombre de substances biologiques chargés, et particulièrement en :

- Analyse de mélange, des sels minéraux, d'acides aminés (hydrolysats de peptides), de peptides (peptides hormonaux en particulier), de protéines et autres molécules par différents échangeurs ;
- Analyse (dosage) des traces ioniques dans un échantillon ;
- Séparation des acides nucléiques sur échangeurs anioniques ;
- Déminéralisation de l'eau ;
- Analyse toxicologique, pharmaceutique et en thérapie.