

2. Techniques chromatographique

I. Généralités

I.1 Définition

La chromatographie est une technique permettant de séparer les constituants d'un mélange homogène en les faisant migrer, sur une phase immobile (Phase stationnaire), par une phase liquide ou gazeuse (Phase mobile).

C'est également une méthode analytique qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange liquide ou gazeux. Nous avons à retenir avant tout que : **Chromatographie = Séparation.**

I.2. Principe

Elle est basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe repose sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène.

Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Chaque constituant adopte une vitesse de migration qui lui est propre en fonction de sa solubilité dans la phase mobile et de son affinité pour la phase fixe qui tend à le retenir. Finalement on obtient la séparation des constituants du mélange initial.

Chaque composé est caractérisé par son **coefficient de partition** défini comme suit :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{dont : } C_s = \text{Concentration du soluté dans la phase stationnaire.}$$

C_m = Concentration de soluté dans la phase mobile.

Ce paramètre quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases. Plus sa valeur est élevée, plus le soluté est retenu. K dépend de la température et de trois forces d'interaction : PS/soluté, PM/soluté et PM/PS.

I.3. Classification des techniques chromatographiques :

Il existe de très nombreux types de chromatographie en fonction de trois modalités différentes :

- Selon la nature physique des phases (mobile et stationnaire).
- Selon la nature des interactions entre ces phases et les molécules à purifier (le phénomène mis en œuvre).
- Selon le procédé opératoire (type du support qui porte la phase stationnaire).

I.3.1. Classification selon la nature des phases

- **la phase mobile** est un **fluide**, donc soit un **liquide**, soit un **gaz**
- **la phase stationnaire** est soit un **solide**, soit un **liquide**.

La combinaison de ces possibilités conduit à diverses possibilités :

- chromatographie liquide — solide (CLS)
- chromatographie liquide — liquide (CLL)
- chromatographie gaz — solide (CGS ou GC)
- chromatographie gaz — liquide (CGL ou GC)

I.3.2. Classification selon le mécanisme de rétention

Cette classification repose sur la nature de la phase stationnaire et son interaction avec les molécules à séparer. On distingue :

- **la chromatographie d'adsorption** (LSC, GSC) (la phase stationnaire est un solide) ; par extension on pourrait y rattacher **la chromatographie d'affinité**, qui correspond à un cas où les propriétés d'adsorption de la phase stationnaire sont spécifiques vis-à-vis d'un (ou une famille de) composé(s).
- **la chromatographie de partage** (LLC, GLC), lorsque la phase stationnaire est un liquide non miscible avec la phase mobile (mise en jeu de coefficients de partage).
- **la chromatographie d'échange d'ions** (IEC), où la phase stationnaire porte des groupes fonctionnels acides ou basiques, destinée à séparer des composés ionisés.
- **la chromatographie d'exclusion stérique** (SEC) où la phase stationnaire (poreuse) se comporte comme un tamis et sépare les composés en fonction de leur taille ; on parle aussi de chromatographie de perméation de gel (GPC).

I.3.3. Classifications selon les procédés utilisés

Selon le support qui porte la phase stationnaire, on distinguera :

- la chromatographie sur colonne (Voir Fig. 01).



Figure 01. Chromatographie sur colonne.

- la chromatographie de surface (planaire) :
 - ✓ Chromatographie sur papier (Fig.02).
 - ✓ Chromatographie sur couche mince (CCM) (Fig. 03).

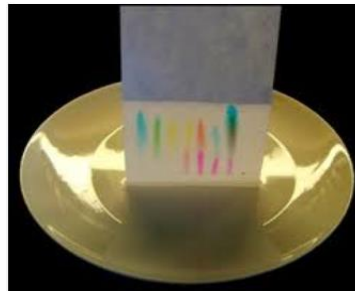


Figure 02. Papier filtre wattman.



Figure 03. Plaque CCM.

1.4. Choix de la technique

Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes.

Le choix de l'une ou l'autre dépend :

- **De la nature du soluté à séparer** : Gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- **Du but de l'analyse** : Identification de composants d'un mélange, nécessité ou non de "coupler" la chromatographie avec une méthode spectroscopique ou avec la spectrométrie de masse (GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification).

II. Chromatographie En Phase Liquide (CPL)

Tableau 1. Méthodes de séparation en chromatographie en phase liquide.

Chromatographie en phase liquide				
Liquide-Liquide	Liquide-Solide			
C. De partage	C. D'adsorption			
	Sur couche mince	Sur colonne		
	CCM	Exclusion stérique	Echangeuse d'Ion	D'Affinité

Chromatographie de Partage (CP)

1. Définition

La chromatographie de partage appelée aussi **chromatographie sur papier**, est une chromatographie **liquide-liquide** qui permet de séparer et d'identifier les espèces chimiques d'un mélange. Elle fonctionne par partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles ; l'une mobile et l'autre stationnaire (Fig.4).

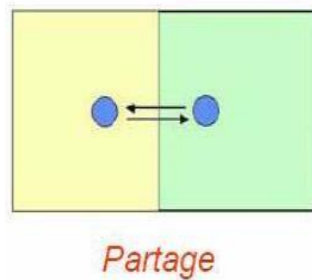


Figure 4.Chromatographie de Partage (CP).

Actuellement, malgré l'apparition de la CCM et la HPLC, la CP conserve toute sa valeur pour séparer des substances très polaires (acides aminés, glucides et les composés polyfonctionnels). Cette méthode est basée sur la différence d'affinité des solutés pour deux phases : La phase stationnaire est constituée par l'eau elle-même, absorbée par la cellulose du

papier ou liée chimiquement à elle. La phase mobile est le plus souvent un mélange du solvant organique et de l'eau.

2. Principe

L'échantillon, mis en solution, est déposé en un point repère du papier filtre wattman humidifié (phase stationnaire), et le solvant qui se déplace par capillarité (phase mobile) fait migrer les composants de l'échantillon à des vitesses variables selon leur solubilité (chromatographie ascendante) (la technique ressemble à celle de la CCM). Une fois le passage du solvant terminé, on va recueillir la feuille de papier ou chromatogramme, on va la sécher et on va la révéler. On va donc faire apparaître les différentes molécules qui ont été séparées sous forme de tache à l'aide d'un procédé approprié (Fig.5).

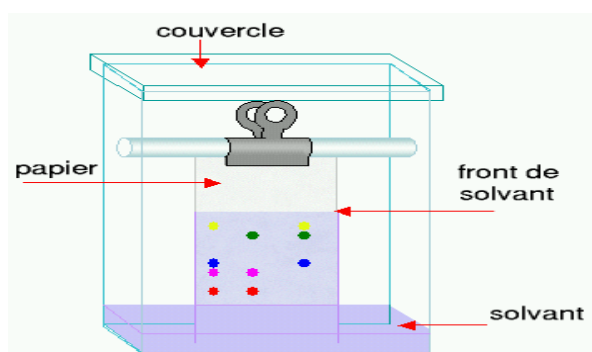


Figure 5. Chromatographie sur papier (de partage).

Généralement, un soluté très soluble dans la phase fixée migrera lentement, la **force de rétention** prédominant sur la **force d'entraînement**. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement. Ses plus grands inconvénients par rapport à la chromatographie sur couche mince sont : la durée de développement beaucoup plus longue et une séparation généralement moins bonne.

Il s'établit un équilibre qui dépend de la solubilité relative du soluté dans les deux solvants donc du **coefficient de partage** (K). La séparation de deux ou plusieurs corps sera d'autant efficace que leurs coefficients de partage respectifs seront différents.

$$K = C_s / C_m$$

Rapport frontal

On appelle rapport frontal, R_f (ou « référence front », « coefficient de migration »), le rapport **Distance parcourue par le soluté / Distance parcourue par le solvant**. Le schéma de

la figure 06 montre comment calculer le R_f dans le cas d'une chromatographie liquide ascendante.

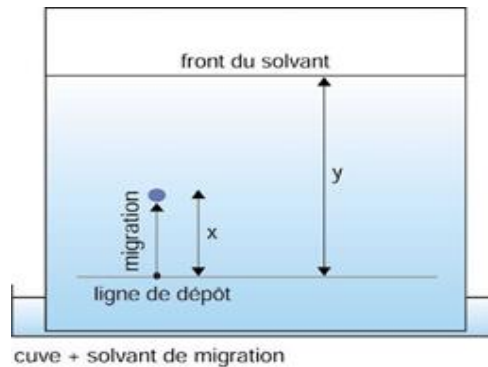


Figure 06. Schéma montrant comment calculer le rapport frontal d'une substance ($R_f = x/y$).

NB : Un soluté très soluble dans la phase fixe aura un R_f faible, alors qu'un soluté très soluble dans la phase mobile aura un R_f élevé et proche de 1. ($0 < R_f < 1$).

Appareillage

Elle se compose : - **des analytes** (l'échantillon)

- **d'une phase stationnaire** (un liquide fixé sur **un support inerte** : papier filtre wattman, papier cellulosique, gel de silice).

- **d'une phase mobile** (l'éluant) (solvant ou un mélange des solvants).

3. Types de chromatographie de partage

Selon la polarité de la phase stationnaire et mobile on peut distinguer :

- **Chromatographie de partage sur phase normale**

La phase stationnaire est polaire, de nature hydrophile, avec des groupements : amine : NH_2 , nitrile : CN , dialcool : $(\text{CHOH})\text{CH}_2\text{OH}$, greffés sur la silice. La phase mobile est un solvant apolaire, de nature lipophile, l'hexane ou l'éther isopropylique $(\text{CH}_3)_2\text{CHOCH}(\text{CH}_3)_2$. En chromatographie à phase normale, le constituant le moins polaire est élué le premier.

"Si le soluté est hydrophile, alors la phase stationnaire sera hydrophile et la phase mobile hydrophobe $\Rightarrow$ Partage dit en phase normale".

- **Chromatographie de partage sur phase inversée (RP)**

La phase stationnaire, est constituée souvent d'un hydrocarbure qui est apolaire, de nature lipophile avec des chaînes alkyles de C_4 à C_{30} . La phase mobile est un solvant polaire, tel l'eau et le méthanol. Dans ces systèmes, le solvant le plus polaire (l'eau) est le moins éluant et la force éluante de la phase mobile est augmentée par ajout d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile), le constituant le plus polaire est élué le premier.

"Si le soluté est hydrophobe, alors la phase stationnaire sera hydrophobe et la phase mobile hydrophile $\Rightarrow$ Partage dit en phase inverse".

Chromatographie d'Adsorption

1. Définition et Principe

L'adsorption est un phénomène physico-chimique qui consiste en la fixation d'une substance à l'état liquide sur une surface solide. Ce phénomène fait intervenir des forces complexes entre le soluté et l'adsorbant : forces électrostatiques, forces de liaison d'hydrogène et autre.

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et à une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

La chromatographie d'adsorption se pratique soit sur **couche mince**, soit sur **colonne**. Dans le cas de la chromatographie sur colonne, celle-ci est remplie de particules solides, à des granulométries, des porosités et activités adaptées au cas à résoudre. Soit en couche mince régulière (0,25 à 2mm, généralement). Les adsorbants les plus largement employés sont l'oxyde de magnésium, l'alumine (l'oxyde d'aluminium) ou le gel de silice.

2. Elément de la chromatographie d'adsorption

2.1. Adsorbant (Phase stationnaire) : Il doit être poreux, finement broyé et réduit en particule de faible diamètre. Il existe plusieurs types d'adsorbants comme la cellulose, l'alumine et la silice (SiO_2).

La qualité d'un adsorbant dépend de son homogénéité, sa surface, sa teneur en eau et sa pureté. Il est caractérisé par :

-La capacité d'adsorption : il existe deux types d'adsorbants, forts adsorbants comme le gel de silice ou d'alumine active (capacité élevée d'adsorption) et faibles adsorbants comme l'insuline, le talc ou le carbonate de sodium (capacité faible d'adsorption).

-La polarité : certains adsorbants présentent une faible polarité tels que le charbon actif, cependant certains d'autres ont une forte polarité tels que le gel de silice ou l'alumine.

-La granulométrie : les adsorbants sont commercialisés sous forme de granules, plus que les grains sont fines plus que la séparation est bonne mais plus lente.

Parmi les propriétés de la phase stationnaire dans la CA :

- ✓ Insoluble dans la phase mobile.
- ✓ Inerte chimiquement vis-à-vis des solutés et de la phase mobile.
- ✓ Pouvoir adsorbant important.

2.2. Solvants (Eluant = phase mobile) : Il doit être inerte vis-à-vis la molécule adsorbée et l'adsorbant. Dans chaque système chromatographique, on choisit le solvant de fixation et celui d'élution en fonction de la nature des molécules à séparer (la polarité). Lorsque l'adsorbant est apolaire, le solvant de fixation doit être le plus polaire possible. L'élution est débutée avec un solvant polaire puis poursuivie avec des solvants de plus en plus moins polaires jusqu'au solvant apolaire.

Chromatographie d'Adsorption sur couche mince (CCM)

1. Définition et appareillage

Est une technique de **Chromatographie Planaire**. Repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille d'aluminium. La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est l'une des chromatographies les plus faciles à mettre en œuvre. Elle est utilisée en général dans un but **analytique qualitatif**.

2. Les principaux éléments d'une CCM sont :

- la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle (Fig. 07).
- la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre (Fig.07).

- l'échantillon : environ un microlitre (1 μ l) de solution diluée (2 à 5 %) de l'échantillon à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant (Fig.07).
- l'éluant (phase mobile) : un solvant unique ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (Fig.07).

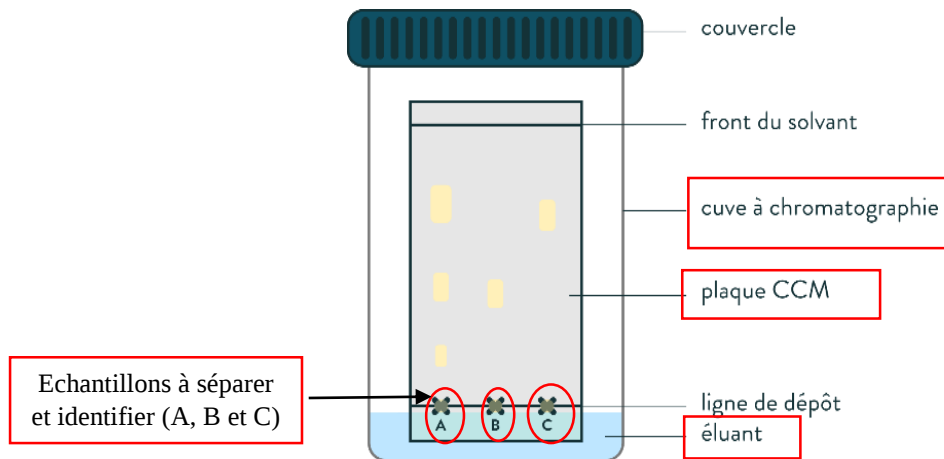


Figure 07. Les éléments de la CCM.

3. Réalisation d'une CCM

○ Activation de la plaque CCM

Avant chromatographie —→ il faut chauffer la plaque 30min à 100°C afin d'éliminer l'eau qui forme des liaisons avec la silice, dont le but de renforcer le pouvoir adsorbant.

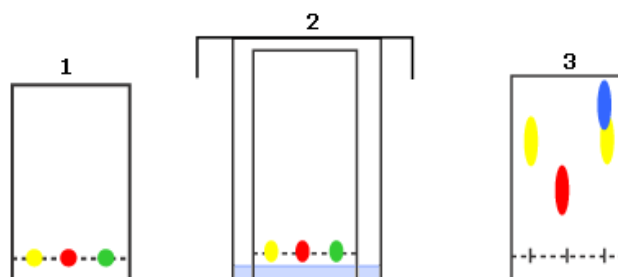
○ Dépôt de l'échantillon

L'échantillon est dissout dans un solvant volatil, peu polaire (les plus utilisés sont le MeOH et le chloroforme) et qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Il doit être appliqué sur la plaque CCM avec un soin extrême soit manuellement via un tube capillaire, soit avec une micropipette ou une micro-seringue en verre calibrée de telle sorte que la goutte émergente touche juste la surface de la plaque (juste un point). On peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte au même point pour le concentrer, mais chaque dépôt doit être séché avant l'application d'un autre.

○ Développement de la plaque

La plaque préparée est introduite en position verticale dans la cuve et l'éluant qui en recouvre le fond (à une profondeur de 0,5 à 1 cm) monte par capillarité, entraînant à des vitesses

différentes les constituants à séparer. Lorsque le niveau atteint par le solvant est d'environ 1 cm de l'extrémité supérieure (front de l'éluant), la plaque est retirée de la cuve. Le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir.



○ Révélation et analyse des spots

Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire (spots incolore) on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation (physique ou chimique). Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes :

- Révélation à l'œil nu : si la tâche est colorée.
- Révélation UV (cas des échantillons incolores) :
 - Si la plaque est fluorescente, sous une lampe UV, toute la plaque apparaît verte sauf là où sont les taches que l'on entoure au crayon.
 - Les dérivés aromatiques absorbent dans l'UV. Placer la plaque sous une lampe UV et entourer les taches colorées.
- Révélation à l'Iode : Beaucoup de composés organiques forment des taches jaune-marron en présence d'iode. Dans un flacon, placer la plaque et quelques cristaux d'iodes, puis boucher. Les taches apparaissent.

NB : Dans tous les cas, il faut noter les positions des taches colorées juste à la fin de la chromatographie en les cerclant car certains produits disparaissent avec le temps.

○ Calculs et interprétation

Chaque substance est caractérisée par sa mobilité appelée rapport frontal. Le rapport frontal (R_f) de chaque composé est défini par le rapport : $R_f = \text{distance parcourue par le soluté} / \text{distance parcourue par l'éluant}$ (Fig.08).

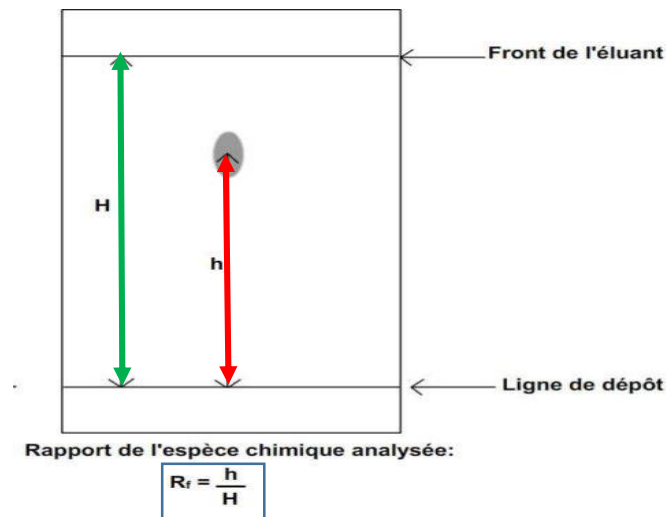


Figure 08. Le rapport frontal (R_f).

4. Application

La chromatographie est donc une technique qui permet :

- ✓ Vérifier qu'une substance est pure.
- ✓ Analyser un mélange.
- ✓ Reconnaître les constituants d'un mélange par comparaison du R_f .

Chromatographie d'Affinité (CAff)

1. Définition

Cette technique est basée sur les interactions entre un effecteur, lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire (fixe), et son partenaire d'affinité en solution (molécule à purifier).

C'est une méthode de séparation dont l'objectif principal est de séparer les molécules selon leur capacité à se lier à un ligand (un effecteur) spécifique fixé sur un support macromoléculaire chimiquement inerte (la résine) directement ou indirectement à l'aide d'un bras fixateur (espaceur) (voir figure 09). Cet effecteur présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité : Enzyme-Substrat, Hormone-Récepteur, Antigène-Anticorps, Sucre-Lectine et Metal-Metalloproteine).

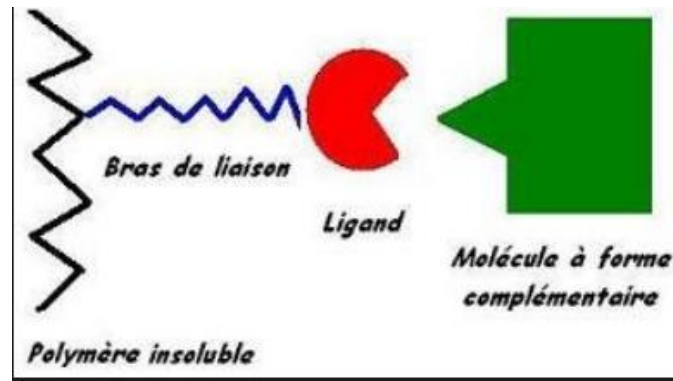


Figure 09. Ligand fixé sur le support par des liaisons covalentes à l'aide d'un espaceur.

2. Principe

La phase stationnaire de la chromatographie d'affinité consiste en un support (par exemple des billes de cellulose) auquel le ligand a été attaché de manière covalente, exposant les groupes réactifs nécessaires à la liaison enzymatique. Lorsque le mélange de protéines est passé à travers la colonne de chromatographie, les protéines qui contiennent un site de liaison pour le substrat immobilisé (ligand) se lieront à la phase stationnaire, tandis que toutes les autres protéines seront éluées dans le volume vide de la colonne.

Une fois que toutes les autres protéines liées ont été éluées, la ou les enzymes fixées peuvent être éluées de différentes manières :

- ✓ en augmentant la force ionique du tampon, comme avec un gradient de chlorure de sodium, affaiblissant ainsi les interactions entre l'enzyme et le substrat immobilisé ;
- ✓ en modifiant le pH du tampon ; et
- ✓ en ajoutant une forte concentration de substrat (ou un analogue de substrat) au tampon d'élution, de sorte qu'il y ait compétition entre le substrat libre et immobilisé pour la protéine enzymatique (Fig.10).

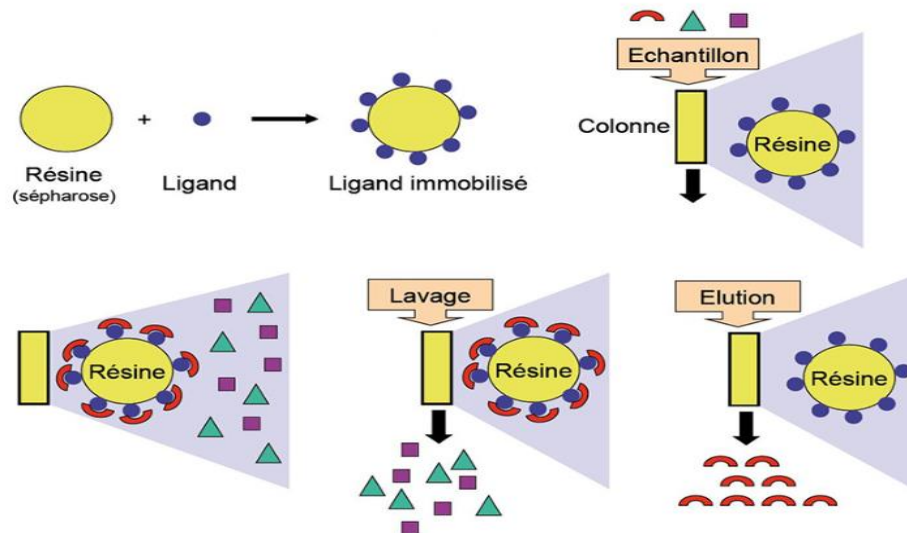


Figure 10. Principe de séparation de la chromatographie d'affinité.

3. Composants de la chromatographie d'affinité

A/ Phase stationnaire (le gel) : Est un support macromoléculaire inerte portant un effecteur présentant une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon. Les supports doivent présenter les propriétés suivantes :

- Insolubles dans l'eau
- Poreux
- Chimiquement et mécaniquement stables
- Porter des groupements fonctionnels réactifs pour permettre la fixation de l'effecteur par liaison covalente.
- Les principaux supports utilisés sont : carboxyméthylcellulose, sepharose et le gel de polyacrylamide.

B/ Le bras fixateur : C'est une chaîne poly-carbonée (C_6-C_8) intercalée entre la matrice et le ligand.

C/ Le ligand : Toute substance capable de former des complexes stables avec les molécules à isoler et possédant, par surcroît un groupement réactif assez éloigné du site actif pour que celui-ci reste librement accessible après la fixation. C'est la molécule fonctionnelle, fixée directement ou indirectement sur la matrice.

D/ Phase mobile : Tampon d'élution variable (pH, NaCl...).

4. Etapes d'une chromatographie d'affinité : Elle comporte généralement trois étapes :

➤ **Etape de Fixation**

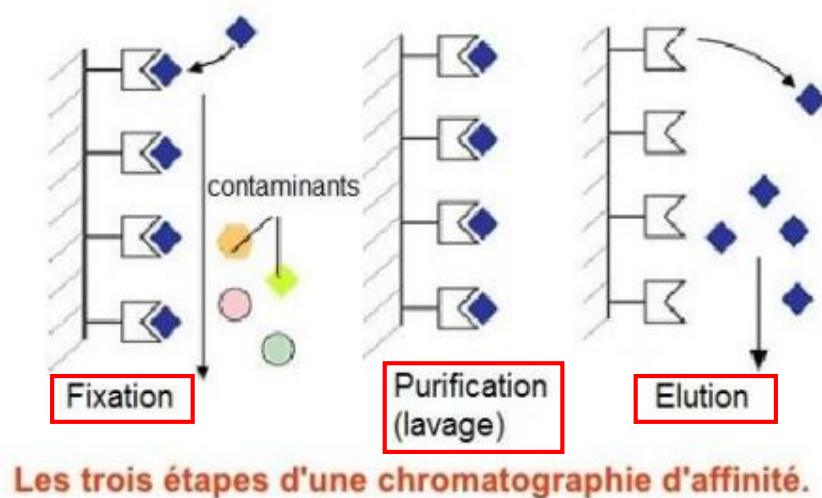
La première étape consiste à fixer un ligand biospécifique par liaison covalente à un support sans perdre son affinité pour le produit à analyser. Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire.

➤ **Etape de Purification (de Lavage)**

En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules qui ne sont pas fixées sur le ligand (les contaminants) sont éliminées et éluées.

➤ **Etape d'Elution**

La molécule fixée (adsorbée) est finalement décrochée de la colonne et recueillie, on modifiant certains paramètres de la phase mobile tels que : le pH, la force ionique (gradient NaCl) ou par l'ajout d'un compétiteur.



5. Applications

La chromatographie d'affinité a été utilisée en :

- Enzymologie, pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extraits enzymatiques.
- Immunologie, pour la purification d'anticorps.
- Protéino-chimie, pour l'étude des protéines membranaires.

- Chimie des acides nucléiques, pour le fractionnement de divers acides nucléiques (ARNm, ARNr, etc.).

Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES)

1. Définition et Principe

Encore appelé : tamisage moléculaire, gel filtration ou perméation de gel. Cette méthode chromatographique permet la séparation des molécules en fonction de leur **taille** et de leur **forme**. C'est une méthode fondée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon (analytes) dans les pores de la phase stationnaire. Cette dernière est un solide poreux (granules de gel poreux) (Fig. 11) dont la dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer. Les grosses molécules dont le diamètre est **supérieur** à celui des pores sont **exclues** et sont donc éluées **les premières**, au niveau du **volume mort** (V_m ou V_0). Les **petites** et **moyenne** molécules sont éluées plus **tardivement** (V_1 et V_2), elles pénètrent dans les pores du gel, leurs migration est donc retardée (Fig. 12 ; 13).

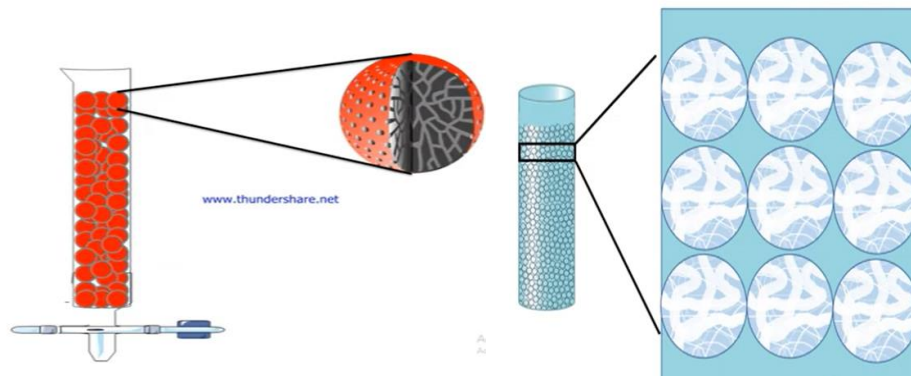


Figure 11. Phase stationnaire de la CES (granules de gel poreux).

La chromatographie d'exclusion stérique est généralement utilisée pour déterminer le poids moléculaire des composés d'un échantillon par l'utilisation de substances standards.

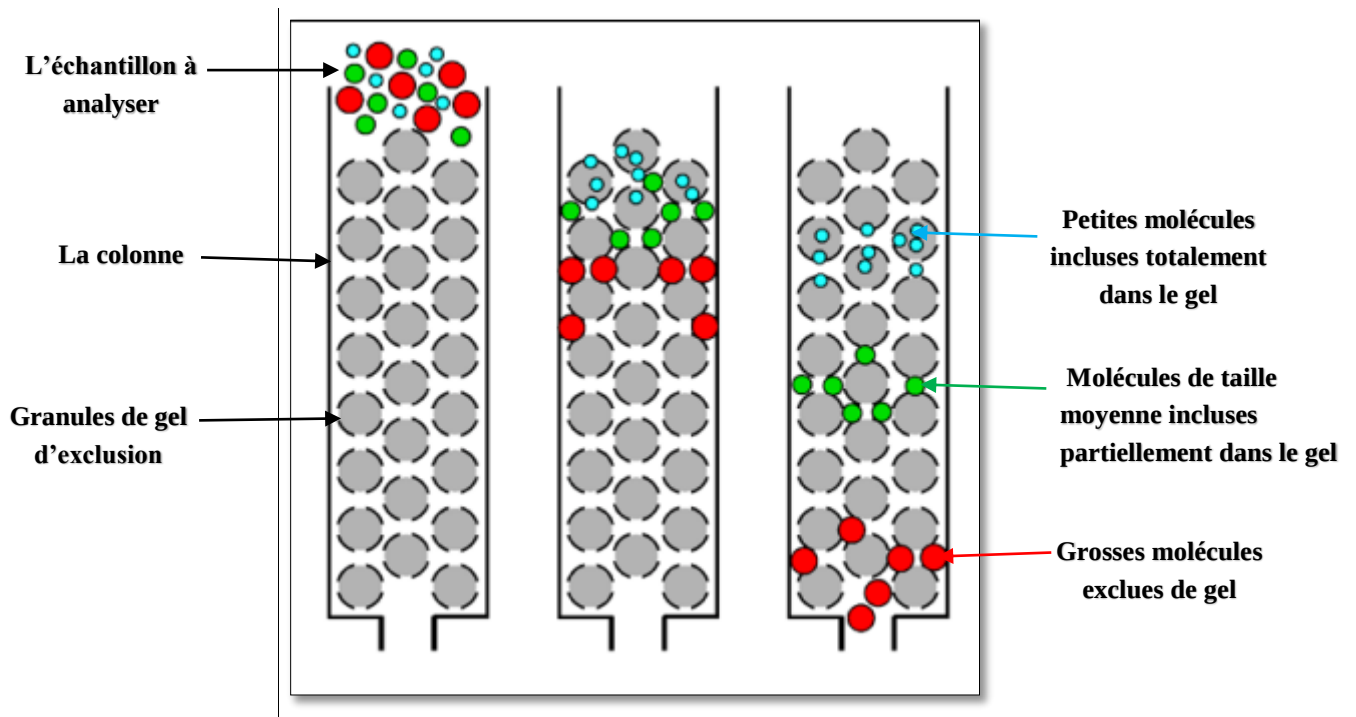


Figure 12. Principe de la séparation des molécules par Chromatographie d'Exclusion stérique (CES).

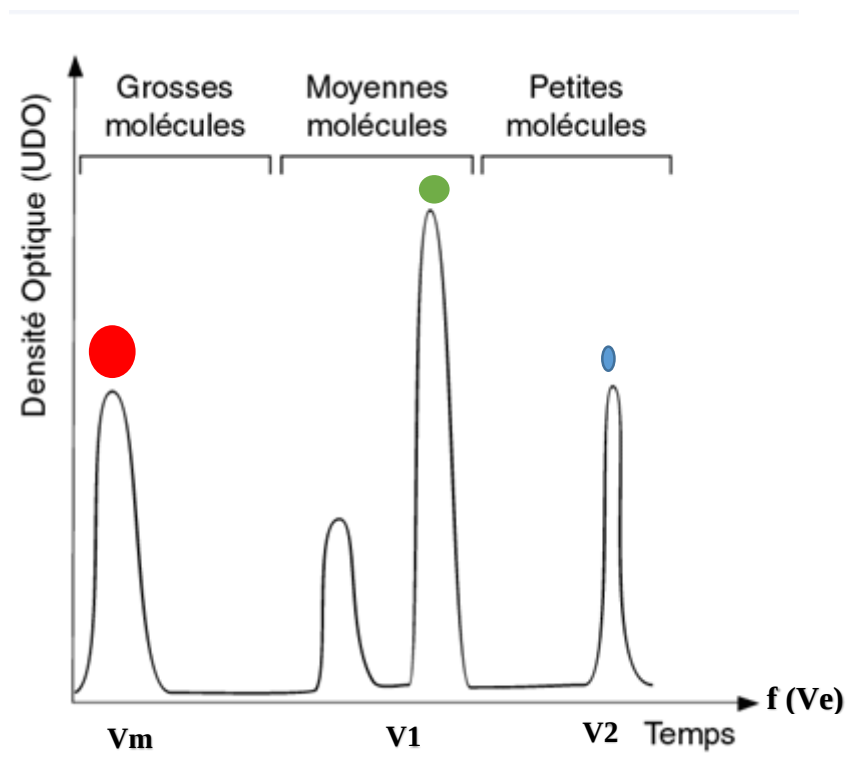


Figure 13. Courbe d'élution des analytes.

2. Les phases

2.1. La phase stationnaire : Sont constitués par des polymères poreux organiques ou minéraux dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. Dans cette technique le matériel servant de base est un gel. La **filtration de gel** est une chromatographie d'exclusion sur un support **hydrophile** (gel hydrophile tels que : gel de dextrane (Séphadex) et gel de polyacrylamide) qui est utilisé pour séparer des composés **polaires** : polysaccharides et protéines, dans les éluants **polaires**. Tandis que la **perméation de gel** est une chromatographie d'exclusion sur un support **hydrophobe** (le gel est hydrophobe : gel de polystyrène) qui est utilisée pour séparer des composés non polaires (lipides et polymères synthétique). La phase mobile utilisée est **apolaire** aussi.

2.2. La phase mobile : le choix de la phase mobile ne s'effectue plus selon la polarité du solvant comme dans le cas de la chromatographie de partage et celui de la chromatographie d'adsorption. La phase mobile doit surtout être capable de dissoudre l'échantillon et être suffisamment semblable à la phase stationnaire afin de la mouiller et d'éviter l'adsorption. Lorsque le gel est mou, le solvant doit aussi le gonfler puisque la taille des pores de ce gel dépend de la quantité de solvant imbibée. Les solvants les plus couramment utilisés sont : l'eau, le chloroforme et le trifluoroéthanol.

3. Les étapes d'une chromatographie d'exclusion stérique

Elles regroupent :

- ✓ Choix et préparation du gel : Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau.
- ✓ Choix de la phase mobile : Le pH et la force ionique dépendent de la nature des analytes. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire. Aussi, la vitesse de débit et la pression doivent être programmées d'une façon de ne pas écraser la phase stationnaire.
- ✓ Remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.
- ✓ Injection de l'échantillon à analyser.
- ✓ Elution: Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé.
- ✓ Collection des fractions et l'analyse des chromatogrammes obtenus.

Chromatographie Echangeuse d'Ions (CEI)

1. Définition et Principe

Encore appelée chromatographie à échange d'ions ou chromatographie à ions, est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules chargées (liquide). Dans ce procédé chromatographique le paramètre qui va permettre la séparation des différents constituants est **la charge électrique**. Pour cela, on utilise des **résines chargées positivement (Chromatographie Echangeuse d'Anions (CEA))** (Voir Fig. 14) ou **négativement (Chromatographie Echangeuse de Cations (CEC))** (voir Fig. 15).

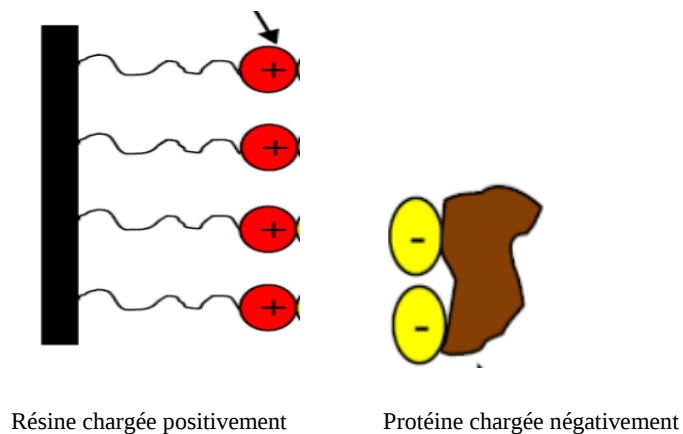


Figure 14. Schéma d'une résine échangeuse d'anions (résine anionique).

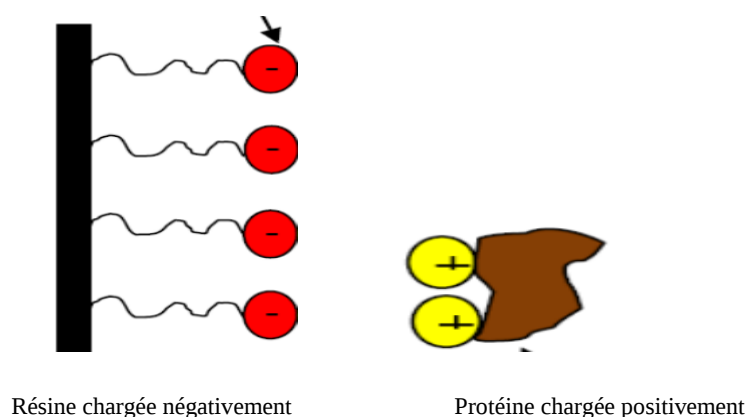


Figure 15. Schéma d'une résine échangeuse de cations (résine cationique).

La séparation des composés est basée sur des interactions ioniques (électrostatiques) réversibles entre une phase stationnaire appelée **échangeur d'ion** et un **soluté ou protéine chargé** existante dans le mélange à séparer.

Si on prend l'exemple de la chromatographie échangeuse d'anions (CEA), 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 »).

2. Composants d'une CEI

- **La phase stationnaire** est une résine (**le support**) sous forme de billes porteuse de groupements ionisés (**l'échangeur d'ions**) négativement ou positivement, permettant la rétention des espèces dont on désire obtenir la séparation. Le soluté ionique ou ionisable interagit avec les groupes de charges opposées de la phase stationnaire par des interactions ioniques (électrostatiques).
 - Les supports : peuvent être de deux types : minéraux comme la silice et organiques comme la résine polystyrénique, cellulose, dextrane. Elles se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de quelques micromètres. Ces particules sont ensuite greffées pour en faire des poly-anions ou poly-cations.
 - Les échangeurs d'ions : sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution. Ils sont de deux types : Echangeurs de Cations (portent des charges $-$) et Echangeurs des Anions (portent des charges $+$).
- **La phase mobile** le plus souvent est une solution aqueuse de force ionique donnée (généralement un tampon de pH). On peut éluer avec une solution de composition constante (conditions isocratiques) ou avec **un gradient de pH** et/ou **de force ionique**, pour décrocher successivement les différents ions fixés sur l'échangeur d'ions.
 - 📊 Le pH influe sur la charge nette de la protéine (caractère amphotère) :
 - Si le $pH_m > pI$ de la protéine, cette dernière devient chargée ($-$) : Pour l'éluer, il faut diminuer le pH. Les protéines seront chargées positivement et elles décrocheront de la résine.
 - Si le $pH_m < pI$ de la protéine, cette dernière devient chargée ($+$) : Pour l'éluer, il faut donc augmenter le pH. Les protéines seront chargées négativement, elles décrocheront de la résine.

 La force ionique exerce un effet de compétition entre la protéine fixée et des autres ions (déplacement des ions fixés «les protéines» par un autre ion qui est fortement chargé et de concentration plus élevée (Cl^- , Na^+ , ...)).

3. Mode opératoire : Il consiste à :

- Choix du gel (la phase stationnaire).
- Choix de la phase mobile.
- Remplissage de la colonne par la phase stationnaire.
- Equilibration de la colonne en utilisant une solution tampon.
- Injection de l'échantillon.
- L'élution (étape de désorption).
- Récupération des fractions recueillies.
- Dosage des fractions collectées on utilisant le spectrophotomètre.
- L'analyse des chromatogrammes obtenus.
- Régénération du gel par lavage.

4. Applications

La CEI est le plus souvent utilisée pour séparer des molécules ionisables, quelle que soit leur taille: ions minéraux (tous les cations alcalins, alcalino-terreux ou métalliques), acides aminés, peptides, protéines, nucléotides, acides nucléiques, glucides ionisés et lipides ionisés. Elle est utilisée aussi pour la purification des eaux (Mg^+ , Cl^-).