

Module : Techniques d'analyses biochimiques
Spécialité : L3 microbiologie appliquée
Chargé de cours : Mme Mostefa Sari F.

Méthodes Chromatographiques

I. Généralités.

Méthode de séparation des constituants d'un mélange.

Applications: Identification, dosage (quantification), purification.

Quelques noms et dates :

- **1903** : mise en évidence par Mikhail TSWETT, botaniste russe
- **1931** (KUHN et LEDERER) : chromatographie sur colonne (chromatographie liquide-solide CLS)
- **1938** (IZMAILOV et SCRAIBER) : chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC), TAYLOR et UREY : chromatographie par échange d'ions
- **1941** (MARTIN et SYNGE, Nobel en 1952) : concept de chromatographie gaz-liquide, chromatographie de partage liquide-liquide
- **1952** : développement pratique de la chromatographie gaz-liquide
- **1955** : 1^{er} chromatographe gaz-liquide sur le marché (chromatographie en phase gazeuse : CPG ou GC)
- **1965** (HALASZ, HORVATH) : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC)

Domaine d'application de la chromatographie

Domaine d'application très vaste:

- ♣ Industries chimiques ;
- ♣ Agro-alimentaires ;
- ♣ Environnement ;
- ♣ Pharmacie
- ♣ Biochimie.

Avantage: Séparation, identification et quantification de très faibles quantités de produits (\approx ng)

I. 1. Principe :

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la **phase stationnaire** et la **phase mobile** (gaz ou liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants du mélange. Ces derniers parcourent la phase stationnaire avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).



$$K = C_S / C_M$$

K : Coefficient de distribution

C_S : Concentration de l'analyte A dans la phase stationnaire

C_M : Concentration de l'analyte A dans la phase mobile

Chromatographie : partition phase stationnaire - phase mobile

Extraction : partition entre deux phases liquides non miscibles

Cristallisation : partition entre phase liquide - phase cristalline

Distillation : partition entre phase liquide - phase gazeuse

Sublimation : partition entre phase solide - phase gazeuse

I. 2. Classification des méthodes chromatographiques :

On distingue les différentes méthodes chromatographiques selon la nature des phases.

Phase stationnaire : - dans une colonne au travers de laquelle progresse la phase mobile par gravité ou sous l'action d'une différence de pression → **chromatographie sur colonne**

- sur une surface plane → **chromatographie sur couche mince** (CCM)

Phase mobile : phase qui se déplace sur ou à travers la phase stationnaire, entraînant avec elle l'analyte. Le processus d'entraînement de cet analyte est appelé **élution**. La phase mobile peut être un **liquide** ou un **gaz**.

Choix d'un système chromatographique

La chromatographie sous toutes ses formes, est une **méthode de séparation** des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide. Les différentes techniques sont complémentaires plutôt que concurrentes. Le choix de l'une ou l'autre dépend :

- 1. de la nature du soluté** : gaz, liquide volatil, liquide peu volatil, solide, macromolécule, espèce organique, polaire, ionique,...
- 2. du but de l'analyse** : identification, contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages, quantification...

I.2.1. Chromatographies en phase liquide (CPL)

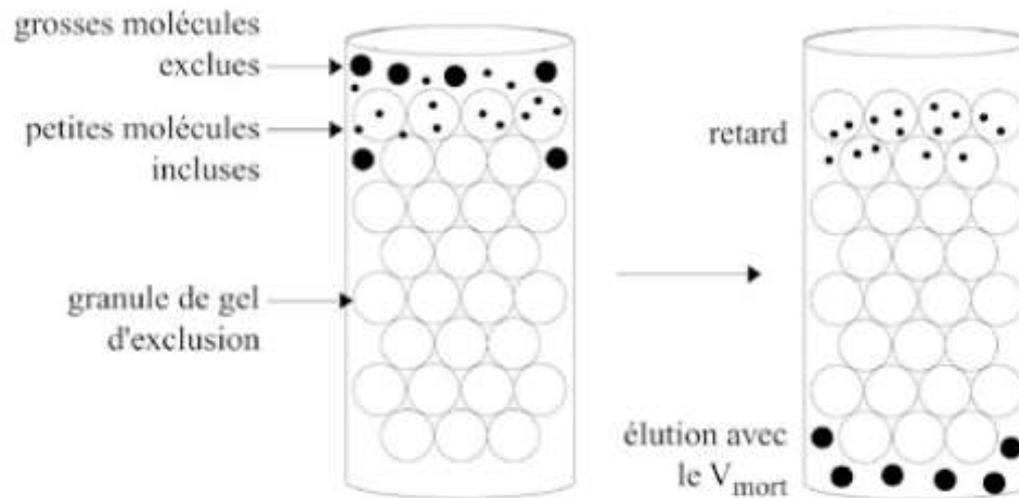
La phase mobile est un liquide. On distingue:

- Les chromatographies de partage :

- La chromatographie **liquide-liquide (CLL)** ou chromatographie de partage : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide inerte : soit imprégnée dans un solide poreux (risques de lessivage), soit greffée sur le solide (**phase greffée**).

La séparation repose sur le **coefficient de partage** du soluté dans les deux phases liquides.

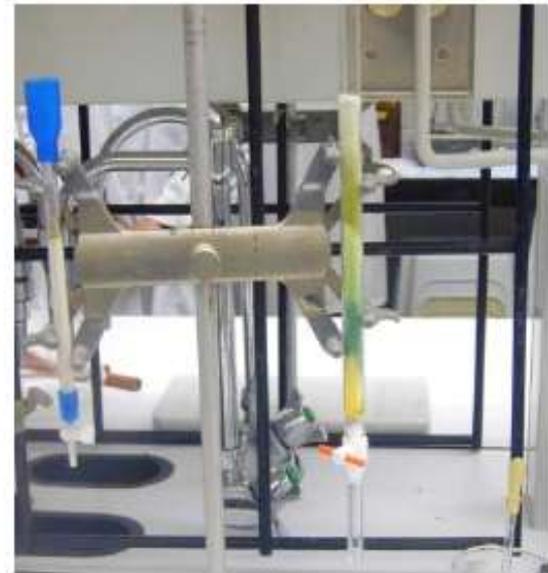
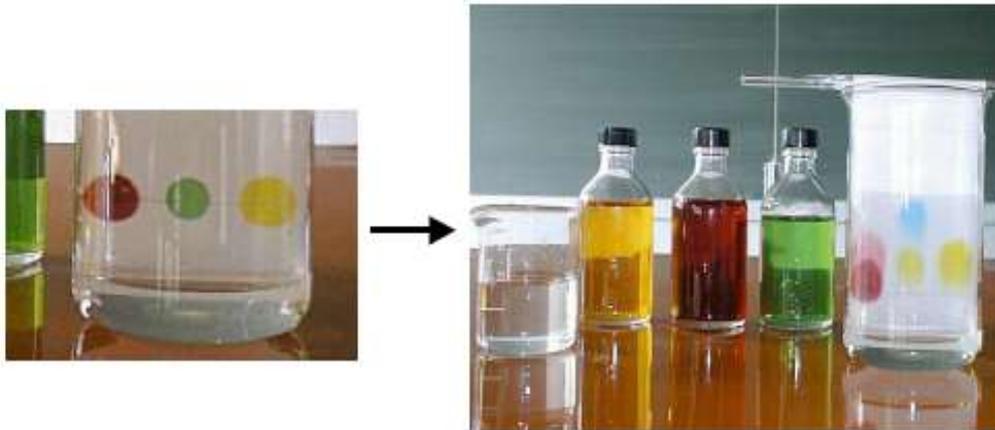
- La **chromatographie d'exclusion**, ou perméation de gel, ou tamisage moléculaire : la phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel et sont donc retardés.



-Les chromatographies d'adsorption :

- La chromatographie liquide-solide (CLS) ou chromatographie d'adsorption (la plus ancienne et la plus générale) :

la phase stationnaire est un adsorbant solide polaire (silice ou alumine) : chromatographie sur colonne ou CCM. L'analyte adhère à la phase stationnaire par physisorption et chimisorption → coefficient d'adsorption. La phase stationnaire peut être modifiée pour être apolaire : chromatographie d'adsorption en phase inverse.



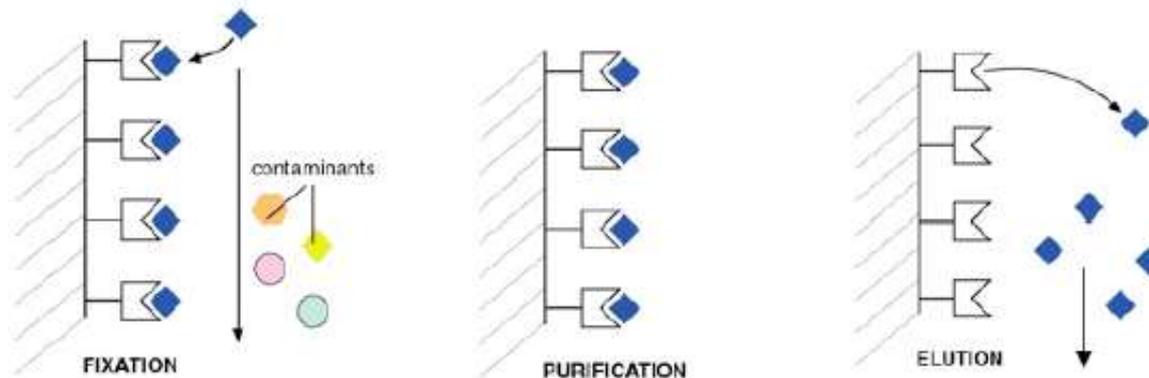
-Les chromatographies d'adsorption :

- La chromatographie par échange d'ions ou chromatographie ionique :

la phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions (polymère porteur de groupements ionisés, négativement pour séparer des cations, positivement pour séparer des anions) : interactions électrostatiques.

- La chromatographie d'affinité :

la phase stationnaire est ici un substrat inerte sur lequel est greffé un "effecteur" qui présente une affinité pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).



I.2.2. Chromatographies en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz vecteur. On distingue :

- **chromatographie de partage :**

- La chromatographie gaz-liquide : la phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.

- **chromatographie d'adsorption :**

- La chromatographie gaz-solide : la phase stationnaire est un solide poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.

Eventuellement, la phase mobile peut être un fluide à l'état supercritique (ex CO₂ à 50°C et 150 bars)

TABEAU 28-1 Classification des méthodes chromatographiques sur colonne

Classification générale	Méthode spécifique	Phase stationnaire	Type d'équilibre
Chromatographie en phase liquide (CPL) (phase mobile liquide)	Liquide-liquide (CLL) ou partage	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre liquides non miscibles
	Liquide-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre liquide et surface greffée
	Liquide-solide (CLS) ou adsorption	Solide	Adsorption
	Échange d'ions	Résine échangeuse d'ions	Échange d'ions
Chromatographie en phase gazeuse (CPG) (phase mobile : gaz)	Liquide-gel (CLG) ou perméation	Liquide dans les interstices d'un solide polymérique	Partage/tamassage
	Gaz-liquide (CGL)	Liquide immobilisé sur un solide	Partage entre gaz et liquide
	Gaz-phase greffée	Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre gaz et surface greffée
Chromatographie en fluide supercritique (CFS)(phase mobile : fluide supercritique)	Gaz-solide (CGS)	Solide	Adsorption
		Espèce organique liée chimiquement à une surface solide	Partage entre fluide supercritique et surface greffée

I.3. 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 : 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 (CPG/SM ou GC/MS), contrôle de pureté, purification de produits (colonnes préparatives), suivi de réaction en continu pour optimiser des paramètres, dosages (quantification)...

II. Chromatogramme.

Diagramme montrant l'évolution du signal du détecteur (\propto à la concentration en soluté) en fonction du temps d'élution (plus rarement du volume d'élution)

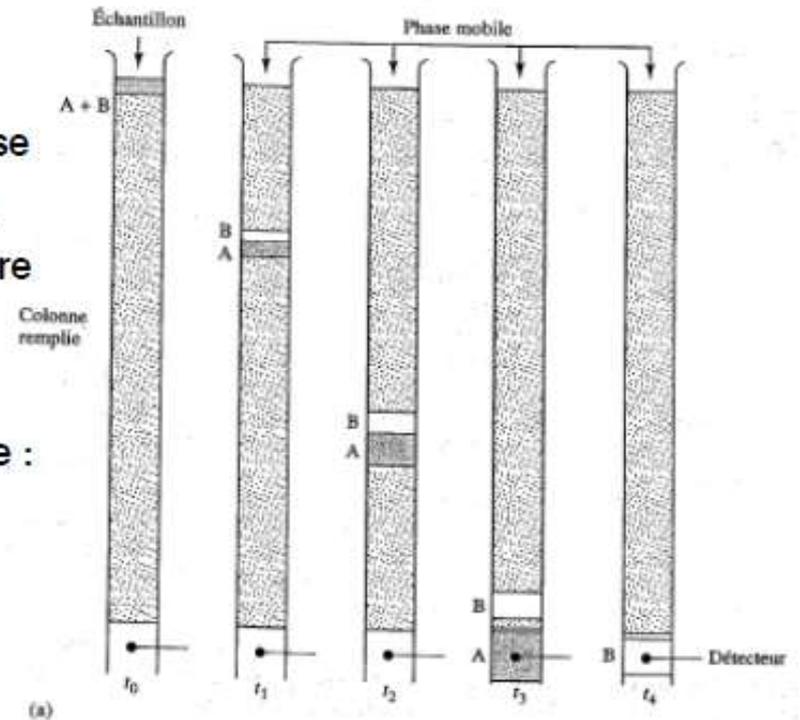
Elution : entraînement d'un soluté à travers la phase stationnaire par le mouvement de la phase mobile.

En CLS (colonne ou CCM), la phase mobile peut être appelée **éluant**

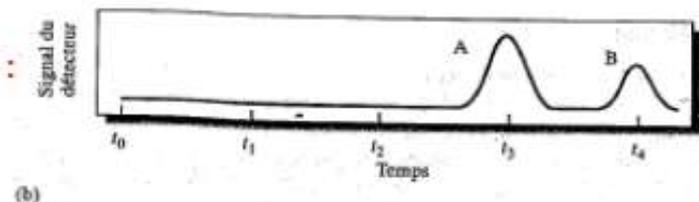
L'analyse du chromatogramme permet une analyse :

-qualitative : identification / position du pic

-quantitative : aire des pics



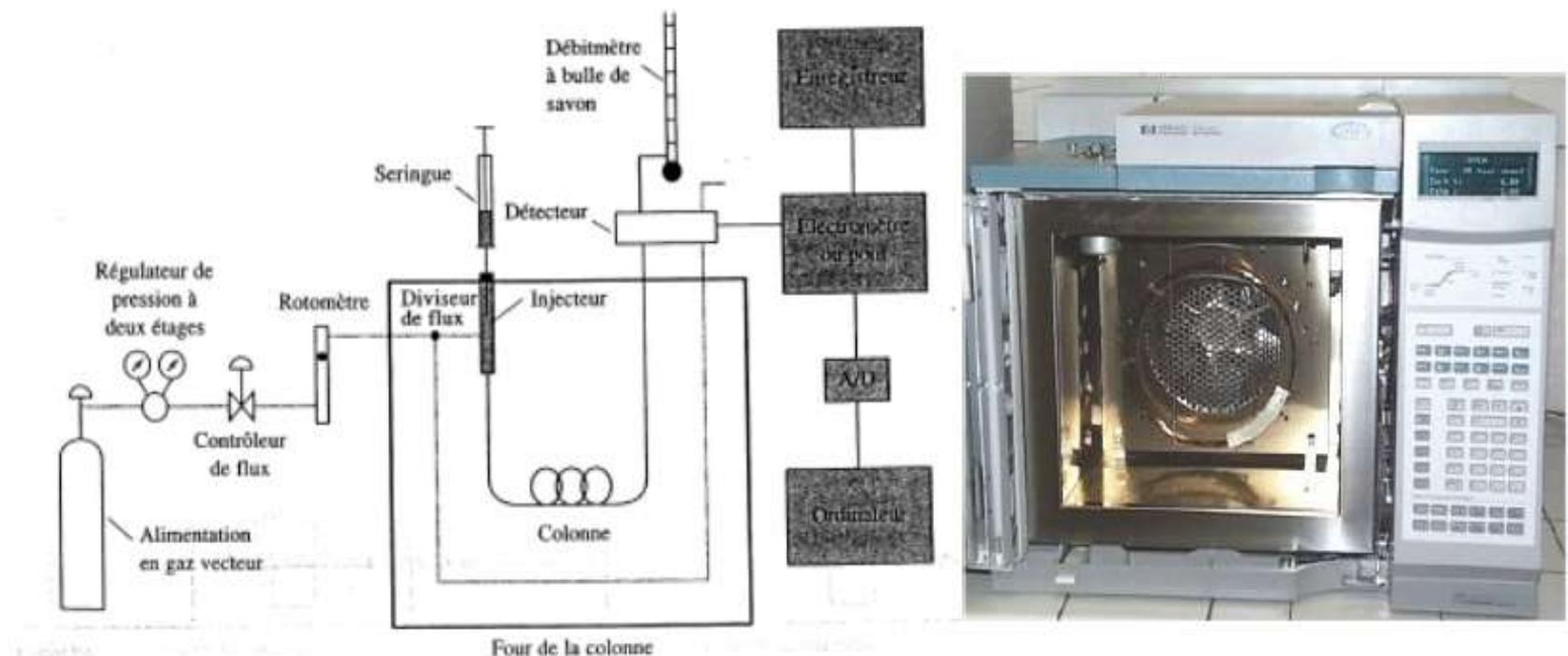
Chromatogramme :



IV. Chromatographie en phase gazeuse

L'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte appelé **gaz vecteur** (phase mobile). **Il n'y a pas d'interaction entre l'analyte et la phase mobile en CPG.**

IV.1. Schéma de principe



IV.2. Alimentation en gaz vecteur

Gaz inerte vis-à-vis de l'échantillon et du garnissage de la colonne (phase stationnaire) : **He, N₂, H₂, Ar** ... (le choix du gaz dépend du détecteur utilisé).

Le gaz doit être exempt de traces d'H₂O et O₂ : gaz **purs et desséchés** (tamis moléculaire).

Contrainte : régulation du débit (u) : $\Delta \text{débit} = 1\% \rightarrow \Delta t_R = 1\%$

En général : 25 à 100 ml/mn pour les colonnes remplies
 0,5 à 5 ml/mn pour les colonnes capillaires

IV.3. Injection de l'échantillon

Microseringue (**1** μ l à 10 μ L). Injection à travers un **septum** (élastomère) dans une chambre à vaporisation instantanée (**injecteur**) située à une extrémité de la colonne.

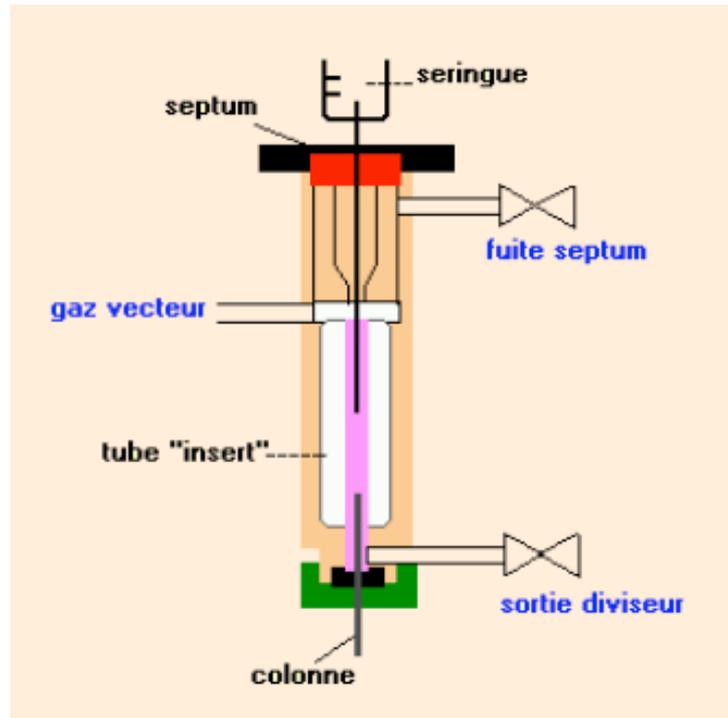
Temp. de l'injecteur : doit permettre la vaporisation mais éviter la décomposition ($\approx 50^\circ\text{C}$ au dessus du point d'ébullition du constituant le moins volatil)

Les caractéristiques de l'injecteur dépendent du type de colonne utilisé :

-Colonnes remplies : injection de 0,1 à 0,5 μ l de solution de l'échantillon, injecteur "classique", à vaporisation directe.

-Colonnes capillaires (faibles débits) : quantités très faibles, difficiles à mesurer : injecteur avec ou sans division (split/splitless)

Injecteur split/splitless :



Mode split : le gaz vecteur pénètre dans la chambre de vaporisation avec un débit élevé (ex: 50 ml/mn), une vanne de fuite, réglable, permet d'évacuer la plus grande partie du gaz et de ne laisser entrer dans la colonne qu'une faible partie (1/20 à 1/500), ex: 1% de 50 ml/mn, soit un débit dans la colonne de 0,5 ml/mn : seulement 1% de l'échantillon injecté passe réellement sur la colonne.

Mode splitless : réservé aux solutions très diluées (analyse de traces)

Injecteur “on column” :

Injection directe, à froid (40°C), de l'échantillon à l'intérieur de la colonne (micro-seringue spéciale). La vaporisation n'a lieu qu'après le dépôt.

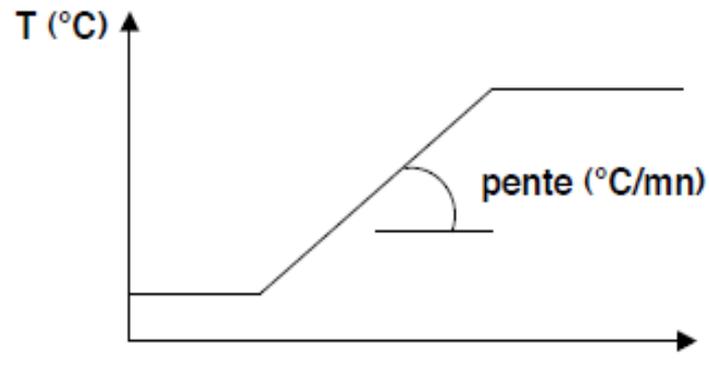
Adapté aux composés fragiles (thermodégradables), en biochimie par ex.

Injecteur à température programmable (PTV) :

Programmation de la température de la chambre d'injection de 20 à 300°C en quelques dizaines de secondes : conjugue les avantages de l'injecteur split/splitless et de l'injecteur “on column” : possibilité d'injecter à froid, en mode split, avec une seringue “classique”.

IV.3. Colonne et four

Colonne (une ou deux) dans enceinte thermostatée (40 à 400 °C) avec possibilité de programmation de température. Doit être très stable : ΔT de 1 °C \Rightarrow Δt_R de 2 à 3%.



IV.3.1. Colonnes remplies (à garnissage) (les plus anciennes)

Tube en acier inox, verre, ou téflon de 1/8 ou 1/4 de pouce de ϕ (3,18 ou 6,35 mm) et 1 à 3 m de long, rempli d'un support poreux, inerte et stable, finement et uniformément divisé, préalablement recouvert d'une couche mince de la phase stationnaire liquide. La phase stationnaire est donc imprégnée (taux de 3 à 25%) dans les pores (pb de lessivage). Grand choix de phases stationnaires.

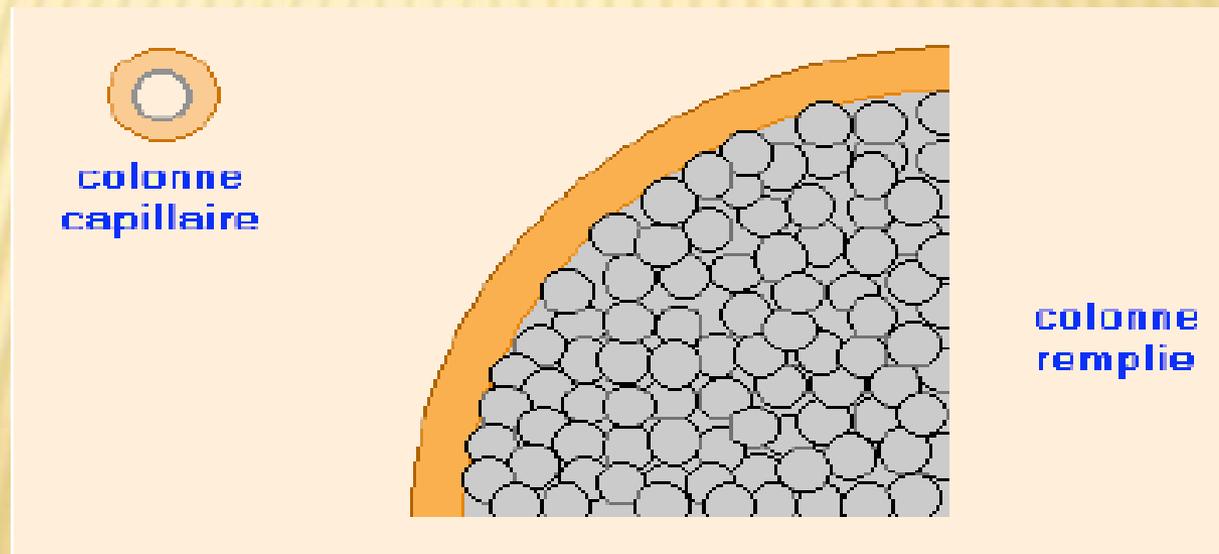
IV.3.2. Colonnes capillaires

Golay (1957), développées dans les années 70.

Colonnes tubulaires ouvertes : la phase stationnaire tapisse les parois internes, sous forme d'un **film** (épaisseur 0,05 à 5 μm) : **WCOT** (Wall Coated Open Tubular).

1^{ères} colonnes en acier, puis en **silice fondue** (très pure) (FSOT : Fused Silica Open Tubular) recouvert d'une gaine extérieure en polyimide (thermiquement résistant)

σ intérieur = 0,1 à 0,35 mm, L = 10 à 100 m (**25 m**) enroulée en spirales de $\sigma \approx 15$ cm



IV.4. La phase stationnaire

- faible tension de vapeur (Eb. au moins $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ > à la T_{max} d'utilisation de la colonne;
- stabilité thermique;
- inertie chimique;

Phase stationnaire solide (chromatographie gaz/solide) :

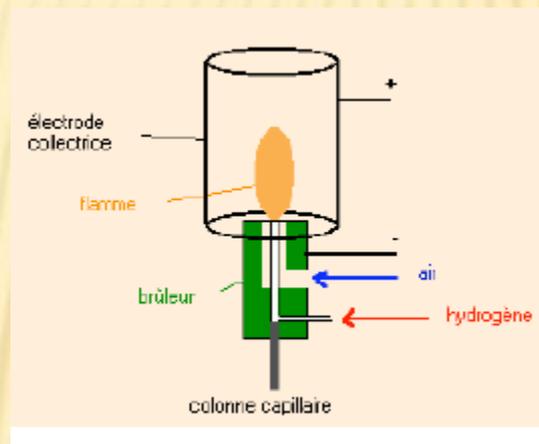
Matériau adsorbant (silice ou alumine) déposé sous forme de fines particules très fines sur la paroi interne des colonnes capillaires : **PLOT** (Porous Large Open Tubular).

Pour séparation de gaz (N_2 , CO, CO_2) et hydrocarbures très légers.

IV.5. Principaux détecteurs

Détecteur à ionisation de flamme (FID) (le plus utilisé).

La phase mobile pénètre dans un brûleur alimenté par un mélange H_2 + air → combustion, production d'ions et d'électrons → faible courant électrique amplifié par un électromètre.



Autres détecteurs

- Détecteur thermoionique :

Semblable au FID + céramique en silicate de Rb ou Cs à l'extrémité de la flamme : formation d'un plasma dans lequel se forme un nombre élevé d'ions en présence de molécules phosphorées ou azotées.

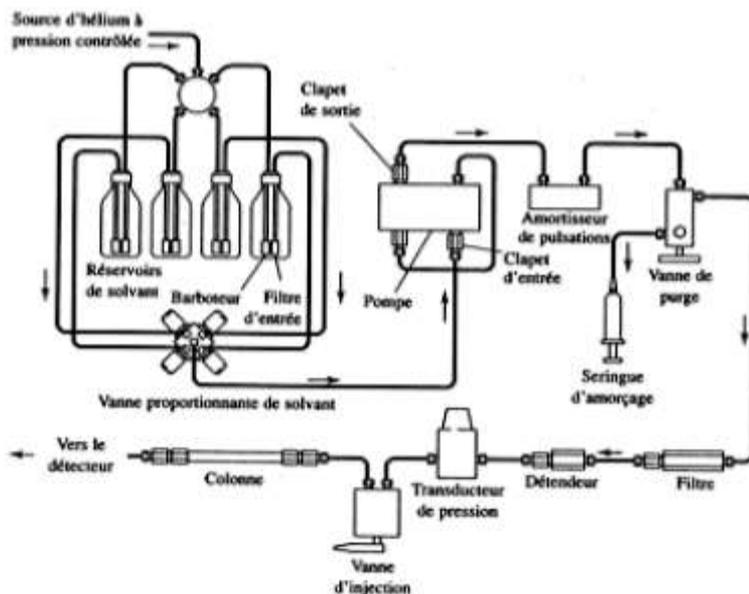
→ Sélectif aux composés contenant P et N (applications : pesticides,...)

- Détecteur à photométrie de flamme : excitation des éléments par de la lumière à des λ caractéristiques (526 nm pour P, 394 pour S)

- Détecteur à capture d'électrons (composés halogénés)

V. Chromatographie Liquide Haute Performance

V.1. Appareillage.



Eléments reliés entre eux par des tubes ($\varnothing = 0,1 \text{ mm}$) en inox ou PEEK®

V.1.1. Réservoirs de phase mobile (solvants très purs)

Verre ou inox ($V = 0,5 \text{ à } 2\text{L}$)

Filtre (poussières), dégazage (barbotage de gaz inerte)

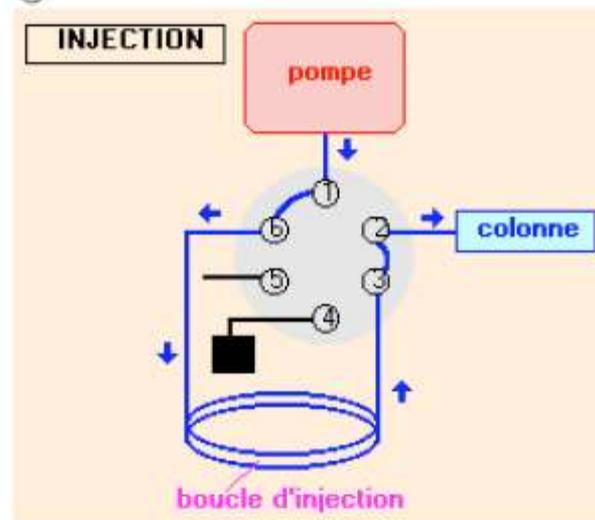
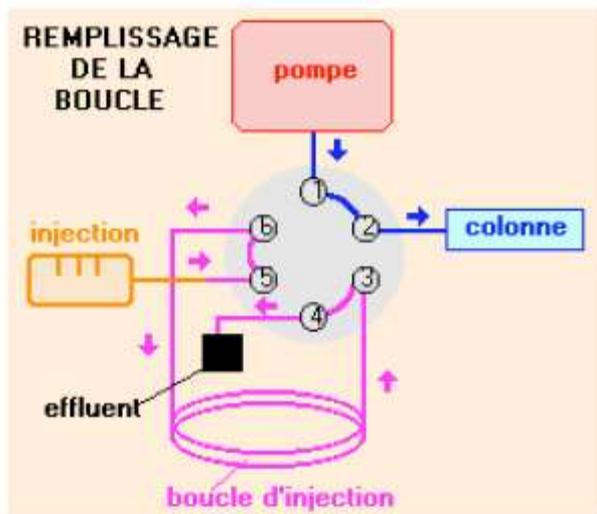
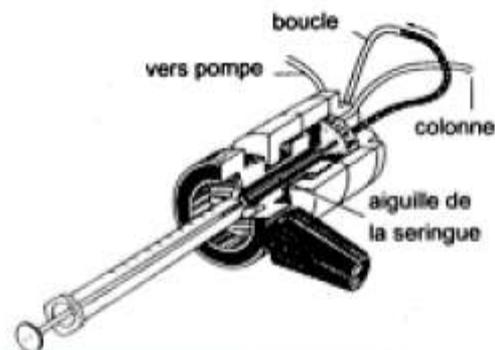
- Mode **isocratique** (éluant unique)
- Mode **gradient d'éluion** (mélange de solvants)

V.1.2. Système de pompage

- P → 420 bars
- pas de pulsation : pompes à piston alternatif
- 0,1 < débit < 10 ml/min ($\Delta = 0,5 \%$)
- résistance à la corrosion

V.1.3. Injecteurs

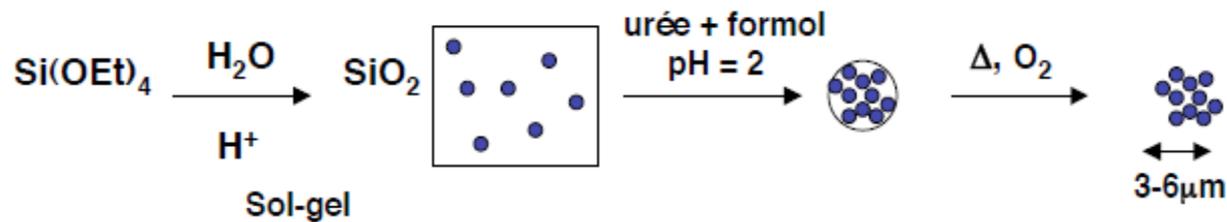
Vanne d'injection à boucle ($5\mu\text{L} < V < 500\mu\text{L}$)



V.1.4. Colonnes

“standard” : **Inox** ($5 \text{ cm} < L < 30 \text{ cm}$, $4 \text{ mm} < \varnothing_{\text{int.}} < 10 \text{ mm}$), efficacité $\approx 50\,000$ plateaux / m
Micro-colonnes ($L \approx 5 \text{ cm}$, $\varnothing_{\text{int.}} \approx 1 \text{ mm}$, $\approx 100\,000$ plateaux / m) : rapidité, faibles volumes de solvants

Matériau de remplissage : **gel de silice** préparé par procédé sol-gel



silice \neq celle utilisée en CPL préparative (sable $\rightarrow \text{Na}_2\text{SiO}_3 \rightarrow \text{Si(OH)}_4 \rightarrow \text{SiO}_2$)

Propriétés et caractéristiques de la silice :

- **polaire** (silanols Si-OH), ≈ 5 silanols / μm^2
- **poreux** : \varnothing moyen des pores, distribution poreuse, surface spécifique ($\approx 350 \text{ m}^2/\text{g}$)
- **adsorbant** : CPL préparative = CLS (chromato d'adsorption),
CLHP = CLL, plus exactement Liquide -Phase greffée (chromato de partage)
 \rightarrow **la silice est donc modifiée.**

V.1.5. Détecteurs

- **sensibilité** : limite de détection (LD) : signal / bruit ≈ 2
- **réponse linéaire** sur un large domaine de []

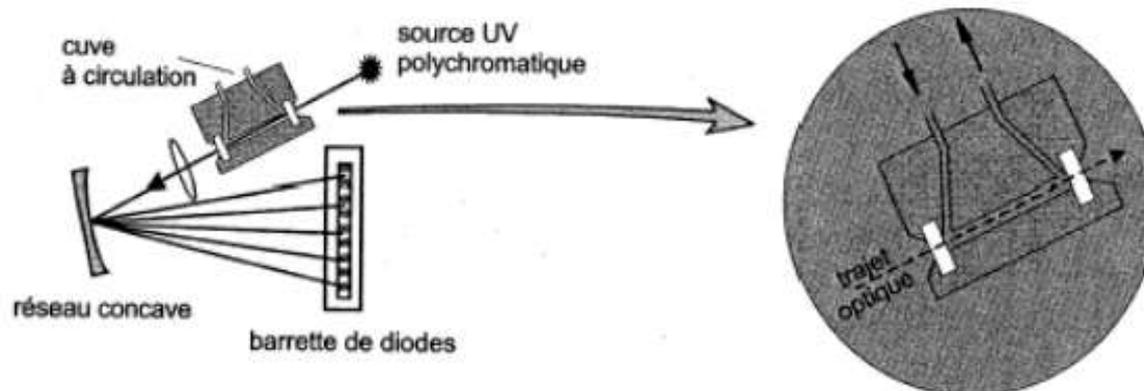
a. Détecteur spectrophotométrique (absorbance)

- monochromatique :

source (D ou vapeur de Hg), monochromateur (ex. raie 254 nm du Hg), cellule, PM

Sélectif : la détection dépend de ε de chaque espèce à la λ choisie. LD $\approx 0,3$ ng / ml, linéarité $\approx 10^4$

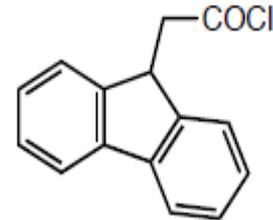
- polychromatique :



b. Détecteur spectrofluorimétrique (fluorescence)

Peu de composés fluorescent naturellement → dérivatisation : ex. FMOOC pour les amines

☺ Très sensible : LD \approx 8 pg / mL, linéarité \approx 10⁴



c. Réfractomètre (indice de réfraction)

Variation de l'indice de réfraction / présence de soluté dans le solvant

☺ Universel

☹ Peu sensible (\approx 1 μ g / mL), Utilisable seulement en mode isocratique.

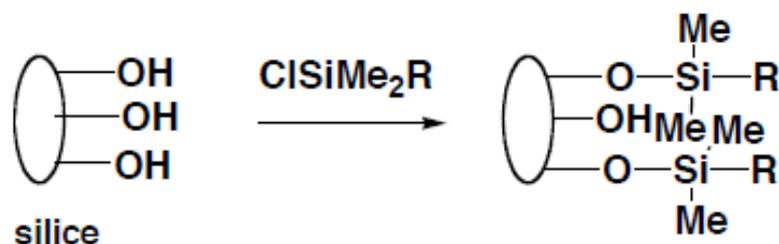
d. Autres détecteurs

- électrochimiques (mesures potentiométriques, conductimétriques, voltampérométriques)

- couplage / spectromètre de masse (electrospray) voire RMN.

V.2. Phase stationnaire

Phases greffées : silanisation de silices



V.2.1. Phases polaires ou "normales"

- fonctions amine : $R = -(CH_2)_n-NH_2$

$R = -(CH_2)_n-NMe_2$

$R = -(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-NH_2$

- fonctions diol : $R = -(CH_2)_3-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$

- fonctions nitrile : $R = -(CH_2)_n-CN \quad \dots$

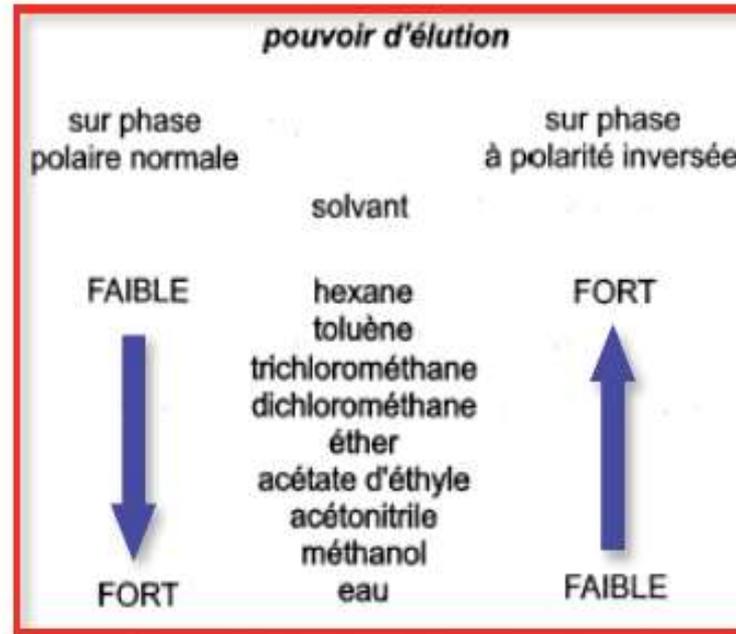
V.2.2. Phases apolaires ou "à polarité inversée" (phases inverses)

- groupes alkyle ou aryle : $R = -(CH_2)_7-CH_3$ RP-8 (diméthyl-octylsilane)

$R = -(CH_2)_{17}-CH_3$ RP-18 (diméthyl-octadécylsilane)

$R = -(CH_2)_n-Ph \quad \dots$

V.3. Phase mobile



Chromatographie "normale" :

Les composés les plus polaires sont davantage retenus

Chromatographie "inverse" :

Les composés les plus polaires sont élués en premier

VI. Chromatographie sur couche mince CCM

Principe



La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des solutés entre **l'adsorbant solide fixe et la phase mobile**.

Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et 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.

Le partage peut se faire également entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire liquide.

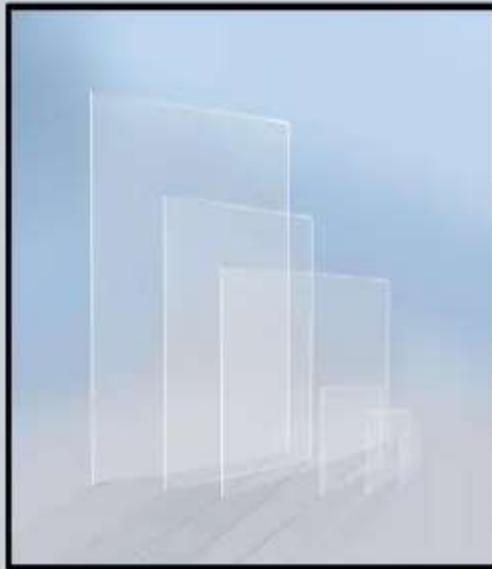
Choix des conditions opératoires



➤ Choix de la plaque :



Plaques en aluminium



Plaques en verre



Plaque en plastique

➤ Choix du support ou la phase stationnaire :



Perles de gel de silice



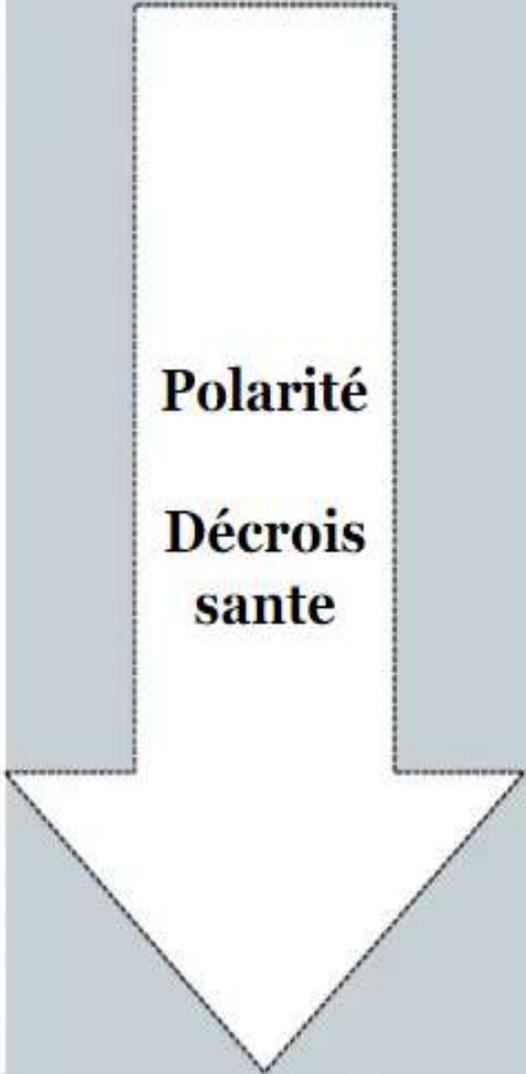
Poudre d'alumine



cellulose

➤ Choix de l'éluant
ou la phase mobile :

- Eau (plus polaire)
- Méthanol
- Acétonitrile
- Acide acétique
- Propanol
- Tétrahydrofurane
- Acétate d'éthyle
- Éther diéthylique
- Chloroforme
- Dichlorométhane
- Toluène
- Cyclohexane
- *n*-Hexane (moins polaire)



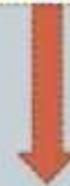
**Polarité
Décrois
sante**

Les étapes du protocole d'une CCM

**1-Dépôt
d'échantillons**



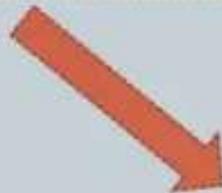
**2-Immersion du
support**



4-Séchage



3-L'éluion



5-révélation

1-Préparation de la cuve :



- a. L'atmosphère de la cuve doit être saturée en vapeur d'éluant.

- b. Le niveau de l'éluant au fond de la cuve doit être de 5 à 8 mm.

2- Les Plaques de CCM



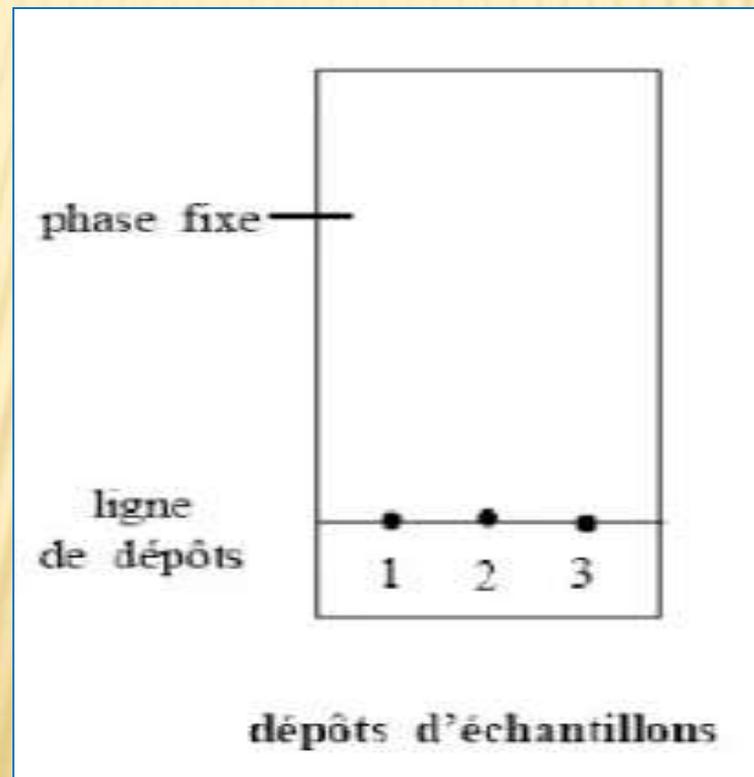
a. La couche d'adsorbant est fragile.

B- tracer un léger trait de crayon parallèle au bord inférieur de la plaque à une distance de 2 cm.

3- Dépôt du mélange

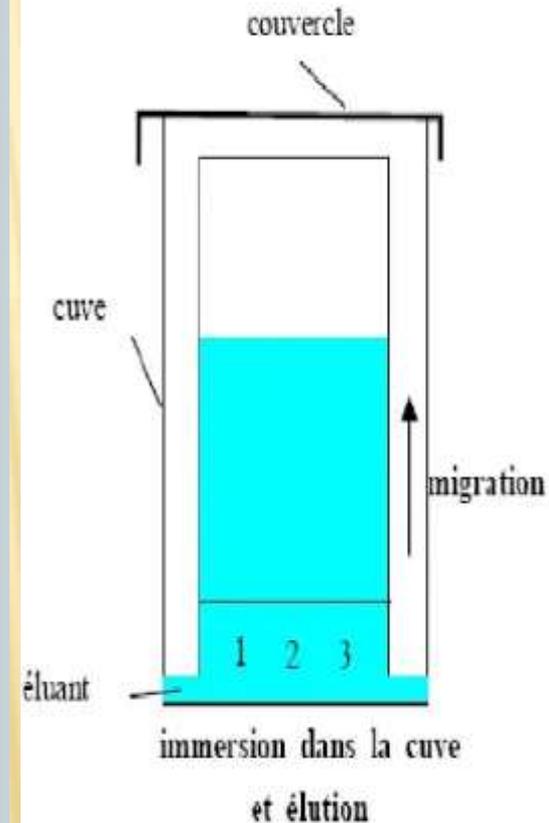


Les solutions avec lesquelles on va réaliser les dépôts doivent être des solutions diluées.



4- Elution

- a. Disposer la plaque dans la cuve (le dépôt doit être au-dessus du niveau de l'éluant).
- b. Éviter de déplacer la cuve ou de la faire vibrer pendant l'éluion.
- c. Quand le front de l'éluant arrive à 1 cm du bord supérieur, retirer doucement la plaque.
- d. Sécher la plaque à l'air ou éventuellement au sèche-cheveux pour évaporer entièrement l'éluant.



5- Révélation de la CCM

1- À l'oeil nu

2- À la lampe UV

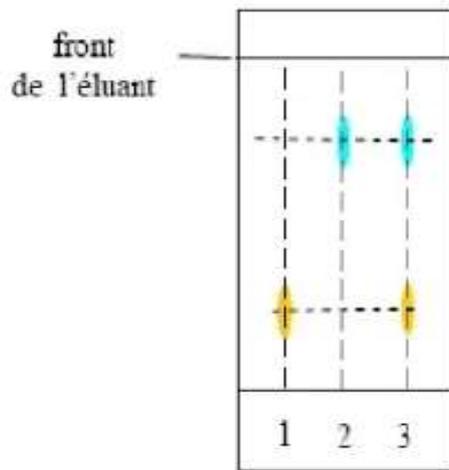
3- Avec un révélateur chimique

À l'iode

Au permanganate de potassium

Par la vaniline

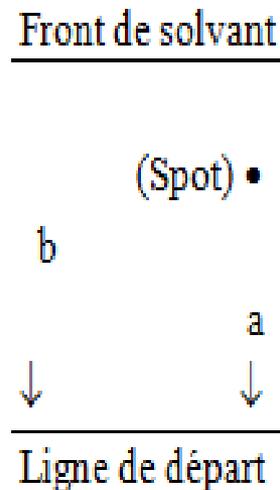
Par la ninhydrine



séchage et révélation

6- Calculs et interprétation

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le Rf de Rétention factor en anglais qui a été fort habilement traduit comme Rapport frontal. Ce Rf est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.



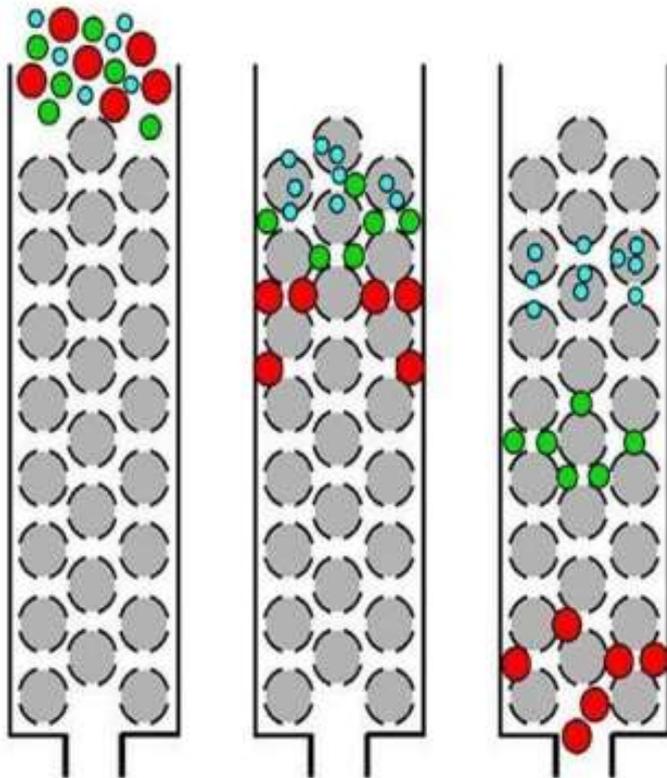
Le Rf vaut : $Rf = a / b$

Le Rf est caractéristique d'une molécule pour un éluant et un support donnés. Cette valeur servira d'authentique lors de CCM d'identifications.

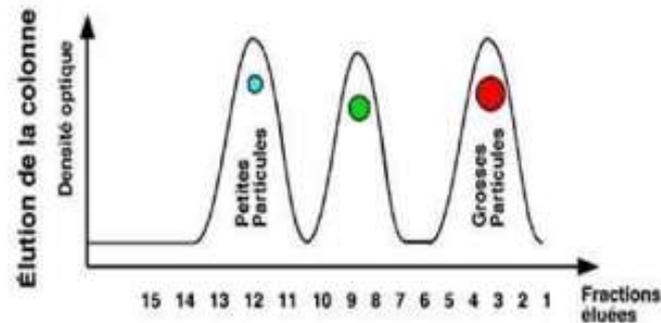
La Chromatographie d'exclusion moléculaire

- La chromatographie d'exclusion permet la séparation des molécules à travers un gel poreux en fonction du poids moléculaire de la protéine.
- En fonction de :
 - la taille
 - la forme
 - poids moléculaire

Chromatographie d'exclusion



Ou chromatographie gel filtration: la séparation est basée sur la taille des protéines.



- Le gel est composé de billes trouées avec des trous de différents diamètres; les petites molécules pénètrent dans les trous et sortent tardivement et les grandes sortent les premières.



Équipement utilisé pour effectuer la chromatographie d'exclusion moléculaire

Chromatographie d'échange d'ions

1/ Résine échangeuse de cations : la CM-cellulose (carboxyméthyle cellulose) est une résine chargée négativement (R-), les différentes protéines doivent être chargées positivement(+) pour être accrochées à la résine.

Le pH du travail doit être <inférieur à l'ensemble des pHi des protéines (pHi c'est le pH isoélectrique)

2/ Résine échangeuse d'anions : DEAE cellulose (diéthyl amino éthyle cellulose), c'est une résine chargée positivement (R+), les différentes protéines doivent être chargées négativement pour être accrochées à la résine.

Le pH doit être >supérieur à l'ensemble des pHi des protéines.

► La chromatographie d'échange d'ions est une **technique de séparation** des molécules basée sur leur **différence de charge**.

► S'applique aux protides

En chromatographie ionique le mécanisme de séparation se produit par échange d'ions entre une phase stationnaire, qui porte des groupements fonctionnels chargés et **une phase mobile**. Des gels de silice chimiquement modifiés à l'état solide remplissent une colonne d'acier et servent de **phase stationnaire**.

La séparation des molécule donc elle dépend ainsi de leur charge c'est-à-dire en fait du pH du solvant par rapport à leur point isoélectrique

La phase stationnaire porte *des groupements fonctionnels ionisés* qui sont de charge :

positive ou négative

sur lesquelles des *ions mobiles* (**ion échangeur**) de charges opposées sont liées par des **forces d'attractions électriques** :

On parle de chromatographie échangeuse de cations ou d'anions.

- ▶ Une résine échange d'ions consiste en une **matrice insoluble comportant des groupes chargés** (chimiquement liés au support) qui vont permettre de retenir des contre-ions mobiles.
- ▶ La charge du contre-ion échangé (+ ou -) détermine le type d'échangeur d'ions : échangeur d'anion ou de cation.

Phase stationnaire = résine (polymère organique, ex styrène-DVB) échangeuse d'ions

Résine anionique (échangeuse de cations) :



forts : acide sulfonique ($\text{G}^- = \text{SO}_3^-$)

faibles : acide carboxylique ($\text{G}^- = \text{COO}^-$)

Résine cationique (échangeuse d'anions) :

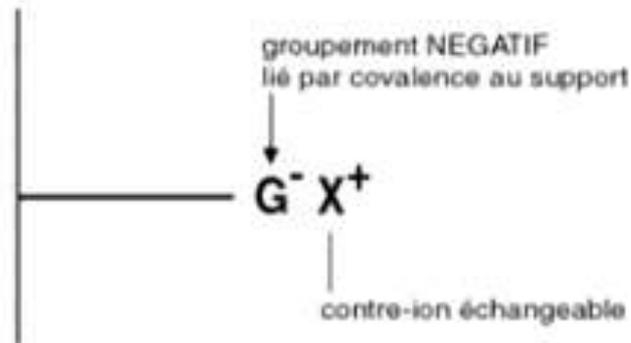


forts : ammonium ($\text{G}^+ = \text{N}(\text{CH}_3)_3^+$)

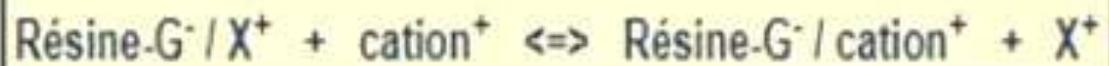
faibles : amines II ou III

Résine échangeuse de cations

- La résine porte des composés de type G^- , capable d'échanger un cation C^+ .

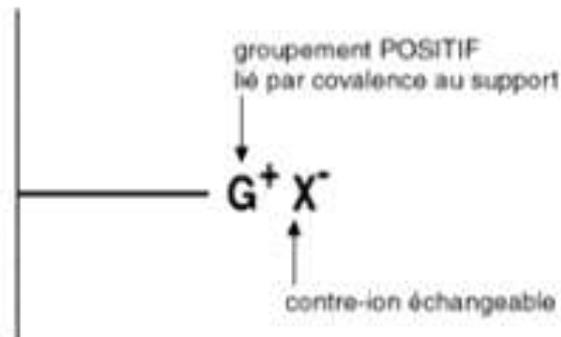


- Réaction d'échange :

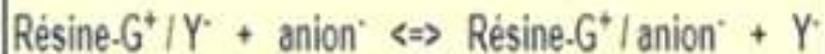


Résine échangeuse d'anions

- La résine porte des composés de type G^+ , capable d'échanger un anion A^-

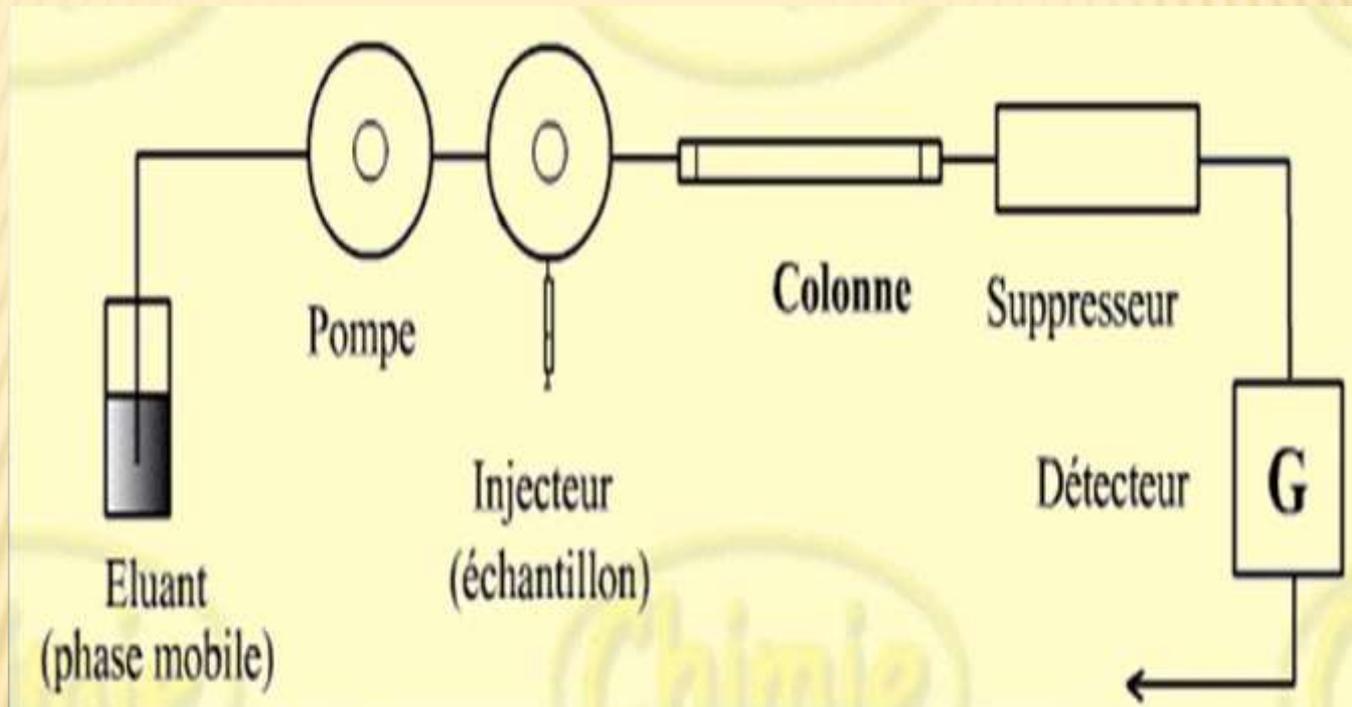


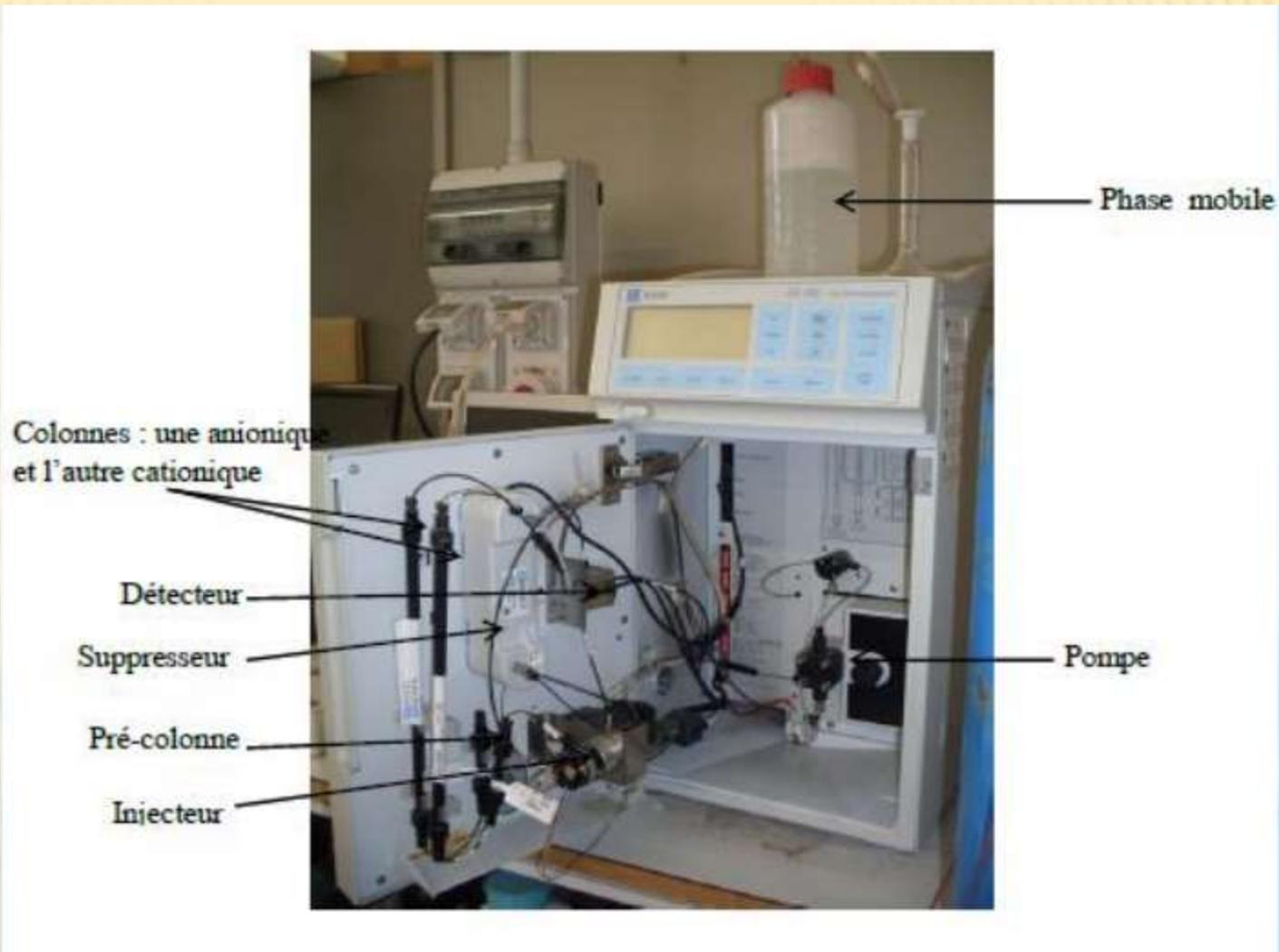
- Réaction d'échange :



Capacité d'une résine

- ▶ La capacité d'une résine est la quantité d'ions qu'elle est capable de retenir. On l'exprime en équivalents par gramme de résine sèche ou par mL de résine humide.





Phase mobile

Colonnes : une anionique
et l'autre cationique

Détecteur

Suppresseur

Pré-colonne

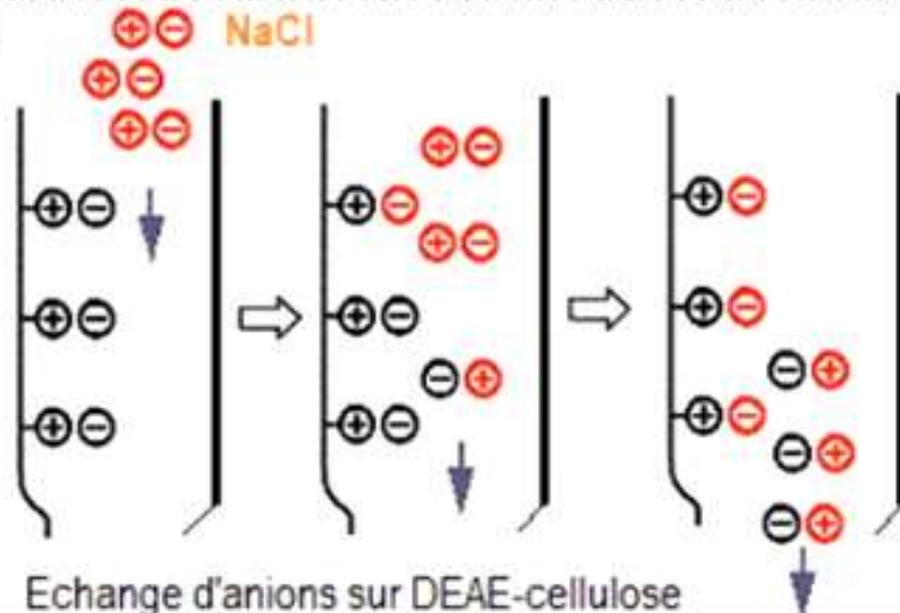
Injecteur

Pompe

Les étapes de la chromatographie d'échange d'ions

1. Fixation

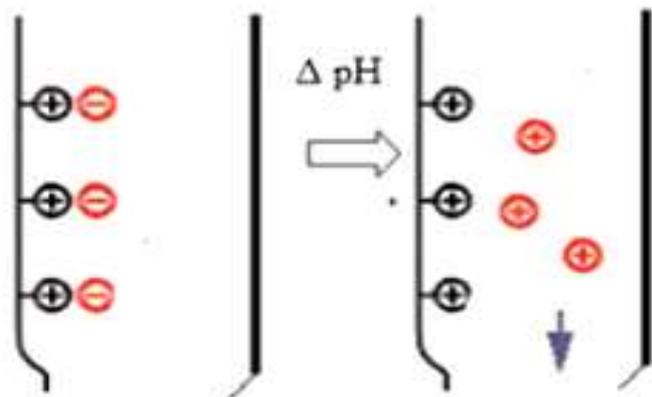
Seuls les anions contenus dans l'échantillon se fixent sur la résine échangeuse d'anions à la place du contre-ion qui est élué avec les cations non reter



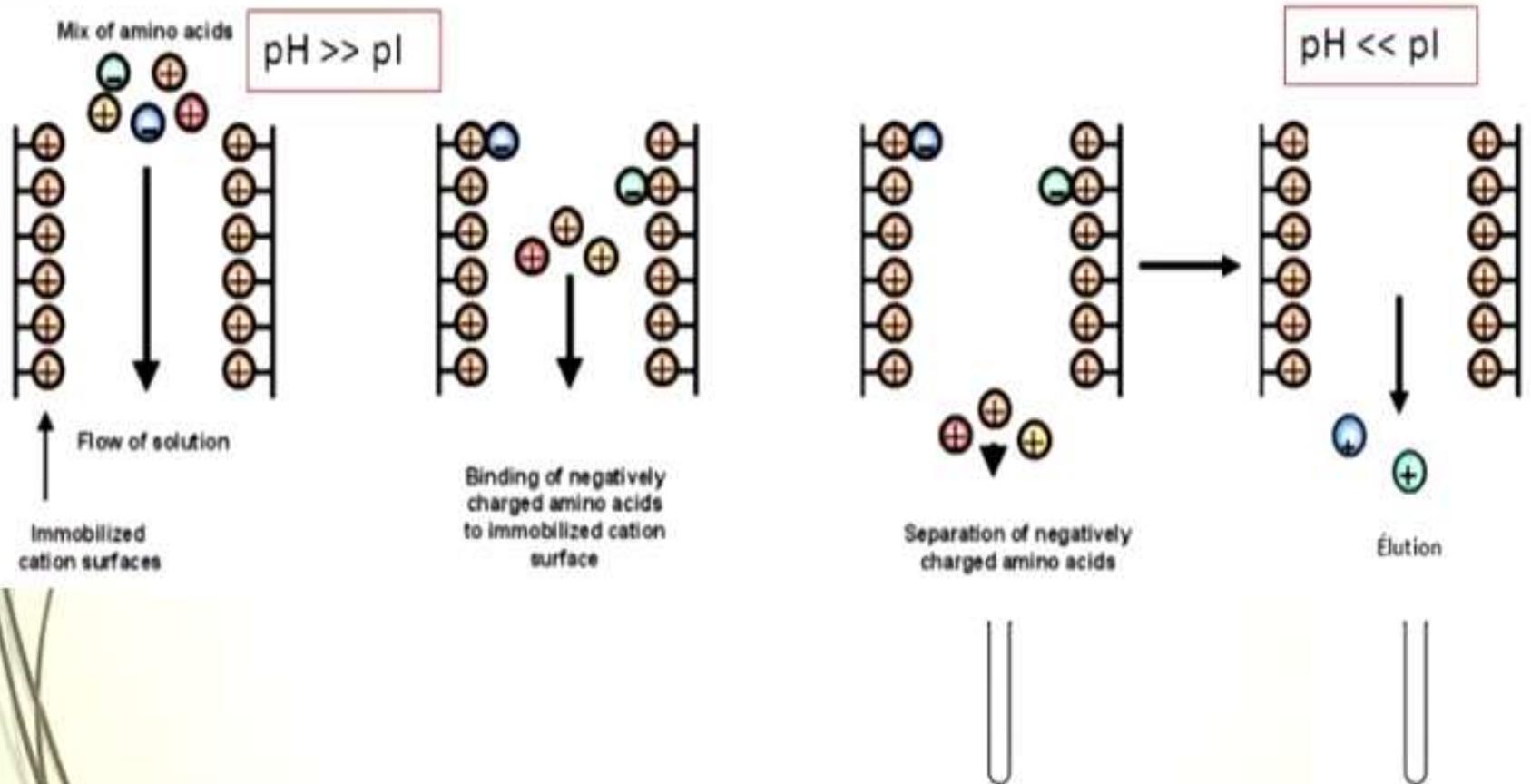
Les étapes de la chromatographie d'échange d'ions

2. Elution

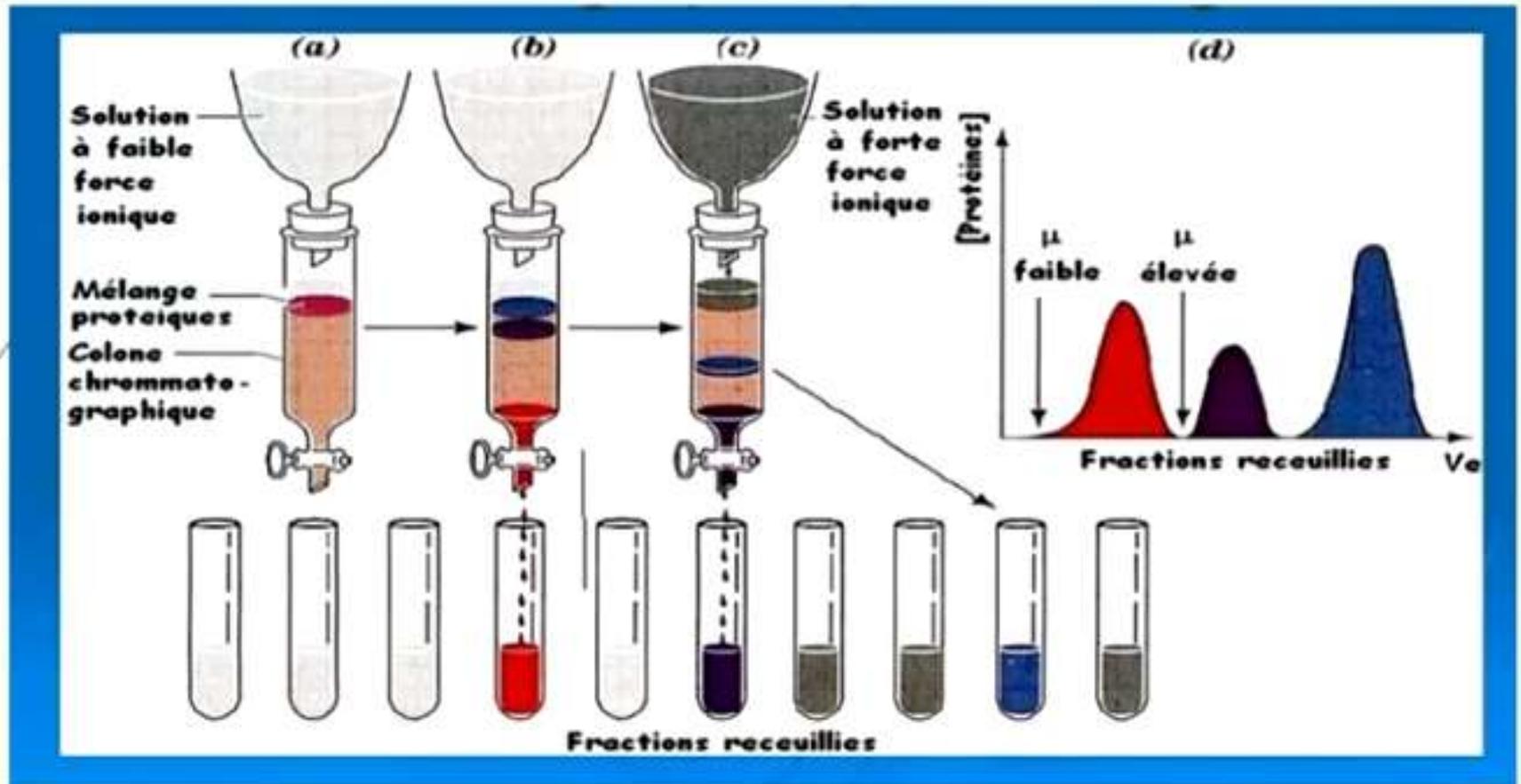
= décrochage de l'anion précédemment fixé par utilisation d'un pH qui modifie sa charge



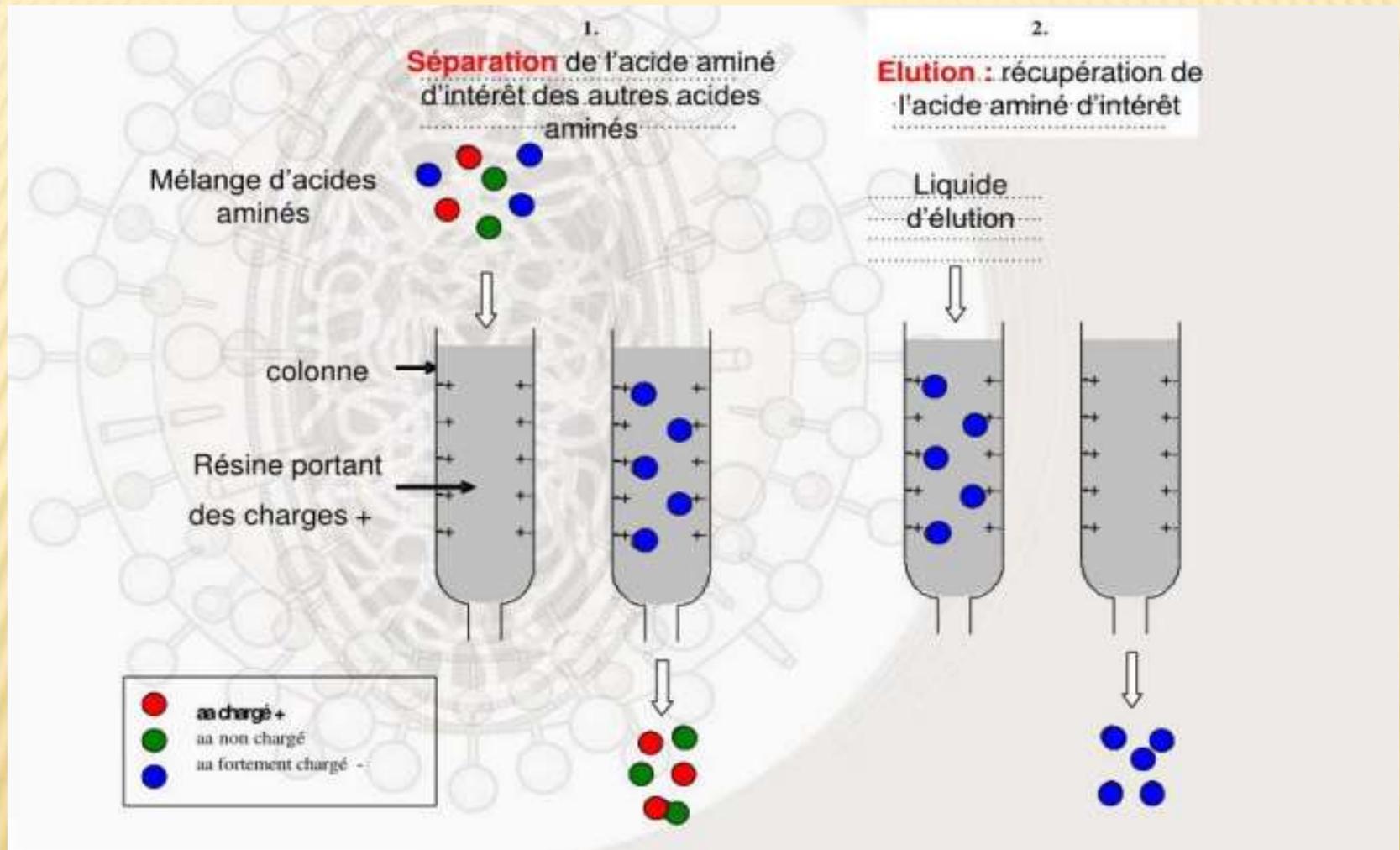
Séparation d'acides aminés



Séparation des protéines



Exemple de séparation : Mélange d'AA



Nature des Chroma échangeuses d'ions

la nature selon le signe de l'ion mobile



+ échangeuse de cations

- échangeuse d'anions

Résine

- Réseau 3D de polystyrène (ou autre "haut polymère") sur lequel ont été greffés
- -des "groupements fonctionnels",
 - ionisés ou ionisables,
 - susceptibles de capter ou céder un ion

Molécules concernées

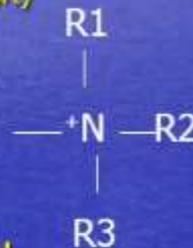
- Espèces ionisables (organiques ou minérales)
- Espèces ionisées(organique ou minérales(
- Molécules solubles dans l'eau
- Peu volatiles

Les groupements les plus utilisés

- Sulfonâtes: $-\text{SO}_3^-$ (fort)



- Ammonium quaternaire



- Groupements acides $-\text{COOH}$ (faible)

- Groupements basiques ($-\text{NR}_2$; NRH ; $-\text{NH}_2$)

Groupement cationique

- ammonium quaternaires NR_3^+ , ex: **Dowex1**
ammonium tertiaires NR_2^+ ,
- sulfonium S^+, \dots
- => **résine** (d'échange) **anionique**

Groupement anionique

- sulfonate SO_3^- , => ex: **Dowex50**
- carboxylate CO_2^-
- aminodiacétate $\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$
- Phosphonate $(\text{PO}_3^-)_2$

=> **résine** (d'échange) **cationique**

Phase stationnaire

- Particules sphériques 
 - Faible diamètre 5 -20 μm
 - Taille très homogène
- Macroporeux
- Pelliculaires
- ; grpt fonctionnel greffagesupport inerte

Formes des supports

- Grains Copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB) Résines

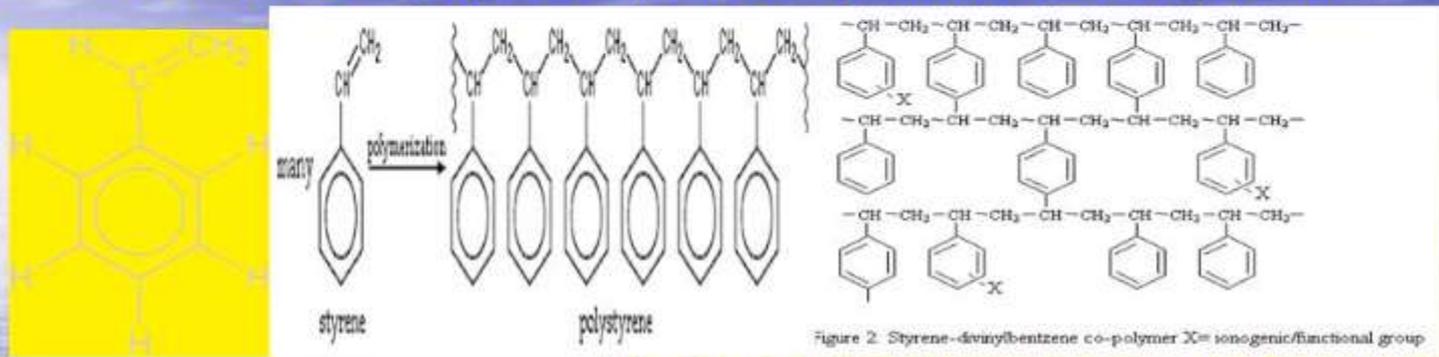
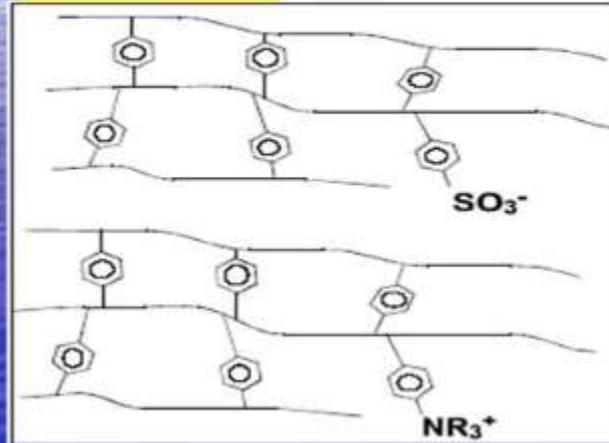
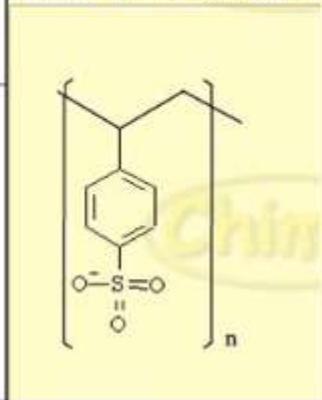


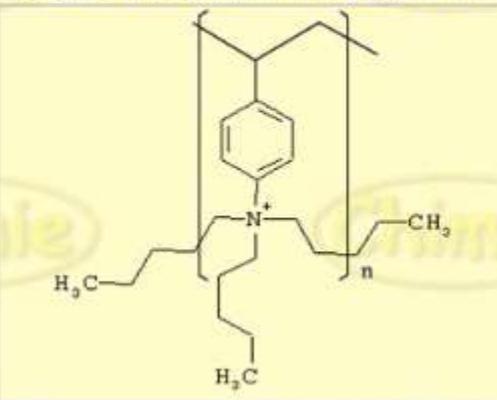
Figure 2. Styrene-divinylbenzene co-polymer X= ionogenic/functional group



Résine à motif sulfonique



Résine à motif ammonium quaternaire

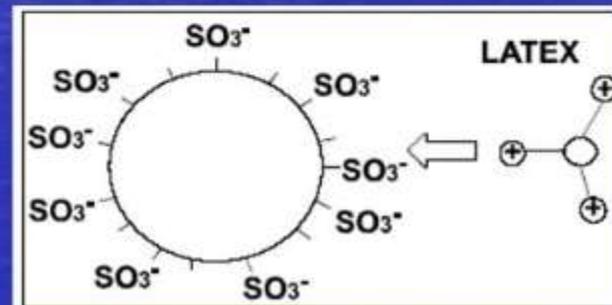


Formes des supports

Fines couches ($1\mu\text{m}$)

Déposées sur des microbilles de verre ($30\text{-}50\mu\text{m}$ de ϕ)

De microbilles de silices



- Grains

Copolymère styrène-divinylbenzène (PS-DVB) Résines
poudre+eau: gonfle donc $-\text{SO}_3\text{H}$ devient $-\text{SO}_3^-$

Eau à l'intérieur → réticulation et efficacité du gel

8% est un bon pourcentage pour μ poreux

Compromis entre la résistance et l'efficacité

Mais macroporeux, on peut aller plus haut

g/mEq5

- **Pelliculaires**

- Résistance excellente
- Meilleure efficacité
- CE plus faible (**inconvénient**)

- **Silices macroporeux**

- meilleure résistance
- granulométrie de 3 – 5 μ m
- un CE 0.05 – 1 mEq/g
- Bon débit avec une bonne efficacité
- Inconvénient zone de pH 2-7

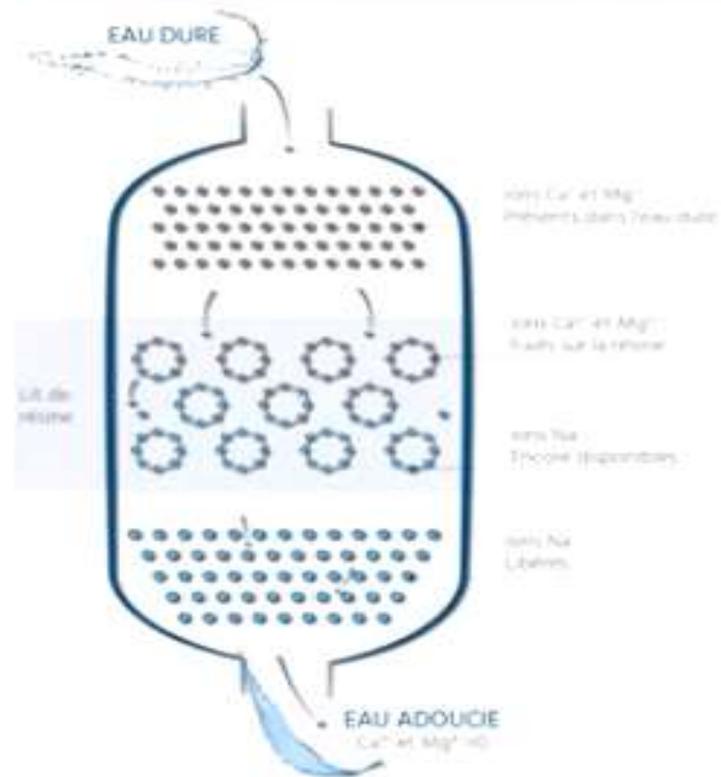
Régénération d'une résine

- Il est possible de réutiliser une résine plusieurs fois. Pour cela, il faut la régénérer c'est-à-dire la **remettre sous sa forme ionique initiale**.
- La régénération d'une résine échangeuse de cations s'obtient par passage d'une solution acide tandis que la régénération d'une résine échangeuse d'anions s'obtient par passage d'une solution de soude.

Applications de la chromatographie d'échange d'ions

- Traitement de l'eau

PRINCIPE DE L'ADOUCCISSEMENT DE L'EAU



Applications de la chromatographie d'échange d'ions

- Industrie du sucre : Le procédé consiste à éliminer les "non-sucre" d'un jus sucrés dans le but d'augmenter le rendement de cristallisation du sucre.
- Produits de laiterie : Le lactosérum, ou petit-lait, obtenu lors de la fabrication du fromage, est riche en protéines et trouve des emplois dans l'industrie alimentaire. On le déminéralise pour en augmenter la pureté. Le principe est le même que celui de la déminéralisation d'eau ou de jus sucrés.

Applications :

- **deionisation d'eau (adoucisseurs)**
- **séparation**
- **dosage d'ions**

La chromatographie d'affinité :

Principe :

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinités sont utilisées :

- affinité enzyme-substrat
- affinité ligand-récepteur
- affinité antigène-anticorps

Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

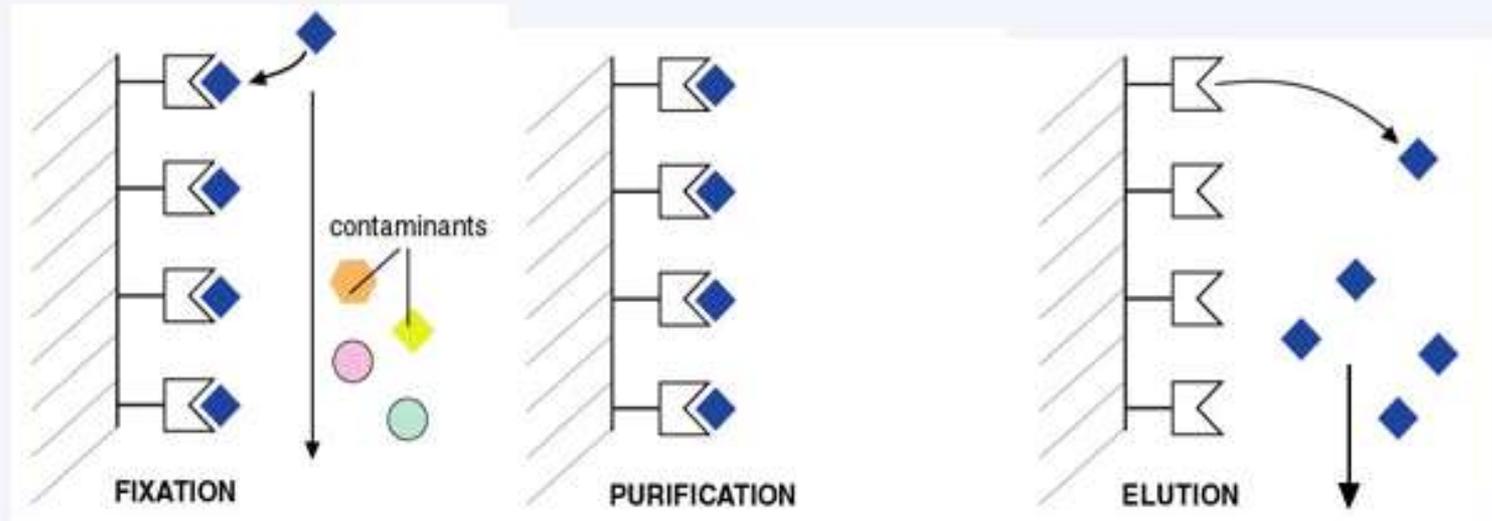


Figure 1 : Les trois étapes d'une chromatographie d'affinité.

- 1 - **Etape de FIXATION** : Le mélange de molécules contenant le composé à purifié 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.
- 2 - **Etape de PURIFICATION** : En continuant à faire passer du tampon dans la colonne, toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées.
- 3 - **Etape d'ELUTION** : La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie dans l'éluat.

Souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction au moins est une protéine (P), l'autre sera qualifié de ligand (L) de cette protéine :



L'association de P et de L forme le complexe PL. La constante définissant cet équilibre est :

$$K_a = (P).(L) / (PL)$$

NB : C'est une constante d'association à l'équilibre, qui s'écrit donc avec un "K" majuscule.

La phase stationnaire (le gel d'affinité) : elle est constituée d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, Séphadex, gel de polyacrylamide) par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais).

Exemples de dérivés de la carboxyméthylcellulose ou CM-cellulose :

- La CM-aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.
- O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)₆ - NH₂ (spacer long)
- La CM-hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle.
- O - CH₂ - CO - NH - NH₂ (spacer court)
- La CM- aminohexylique (ou aminododécylique) succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction -NH₂ réactive.
- O - CH₂ - CO - NH - (CH₂)_n - NH - CO - CH₂ - CH₂ - COOH (n = 6 ou 12, spacer long)

La longueur du bras est choisie de manière à limiter les contraintes stériques.

Effecteurs :

- Affinité enzyme-substrat : substrats, analogues, inhibiteurs réversibles, effecteurs allostériques, coenzymes.
- Affinité ligand-récepteur : haptènes, antigènes, anticorps.
- Affinité antigène-anticorps : hormones, peptides, analogues peptidiques.

Elution : elle peut être réalisée de différentes façons :

- Tampon de pH différent de celui ayant permis la charge : changement de l'état d'ionisation de la protéine : désorption
- Tampon de force ionique différente de celle ayant permis la charge : changement de conformation de la protéine.
- Compétition avec un ligand libre.

Application :

La chromatographie d'affinité a été 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.

L'Électrophorèse :

Principe :

La **technique** de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'**ions** (espèces chargées positivement ou négativement) sous l'effet d'un **champ électrique**. Du fait de leurs caractéristiques propres et en fonction des conditions de l'électrophorèse ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres. Les **cations** (+) migrent vers la cathode (-) et les **anions** (-) se déplacent vers l'anode (+). Sur les **acides nucléiques**, les charges sont portées par les groupements **phosphate** du squelette.

Sur les **protéines**, la situation est plus complexe et il existe différents types de groupements ionisables :

Ceux pouvant acquérir une charge négative :

Les fonctions **acide carboxylique** (-COOH) de l'**acide glutamique**, de l'**acide aspartique** et de l'extrémité C-terminale de la chaîne polypeptidique ;

La fonction **thiol** (-SH) de la **cystéine** ;

Les fonctions **alcool** (-OH) de la **sérine**, de la **thréonine** et de la **tyrosine**.

Ceux pouvant acquérir une charge positive :

La fonction **guanido** de l'**arginine** ;

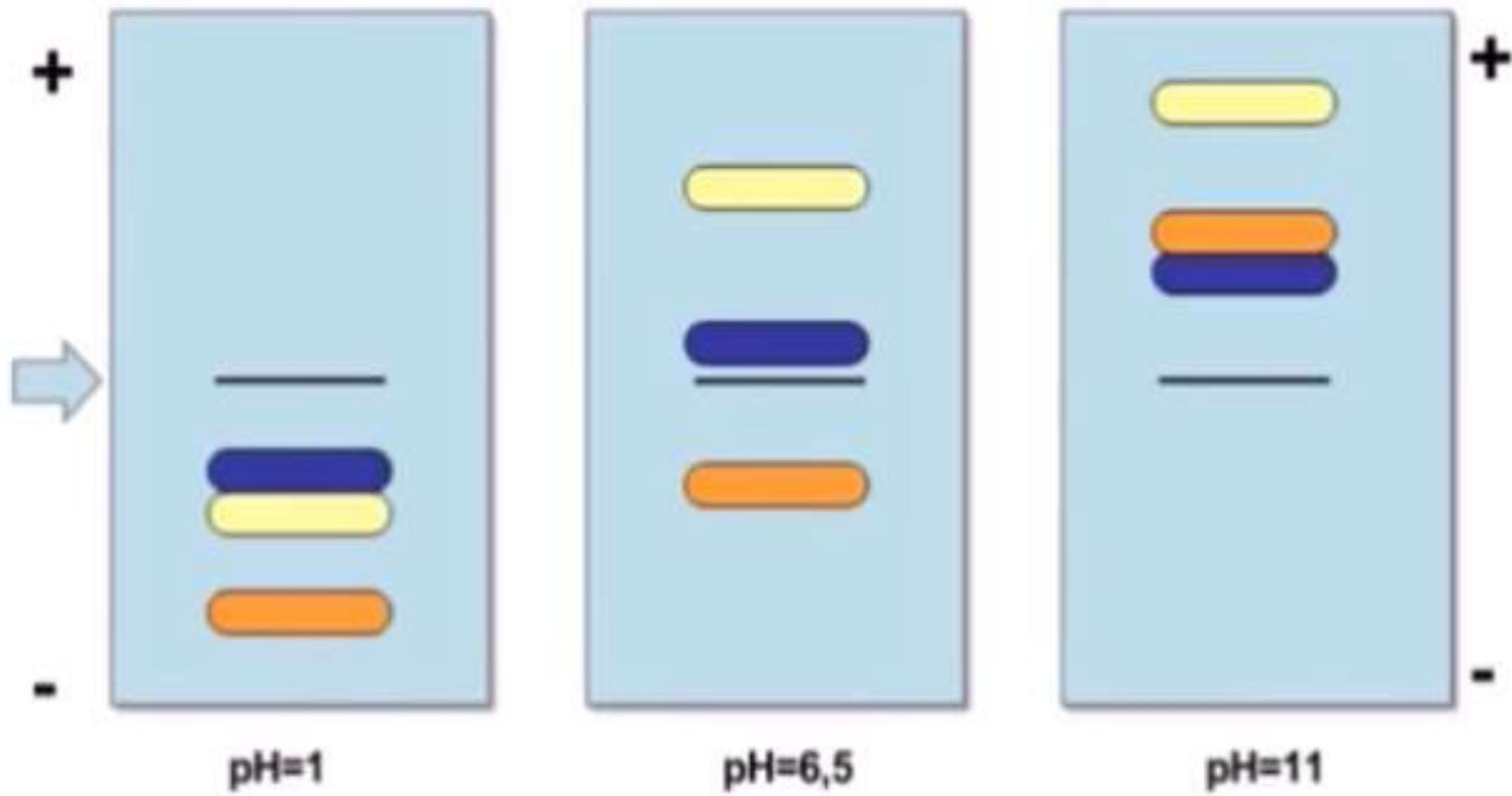
La fonction **imidazole** de l'**histidine** ;

La fonction **amine** (-NH₂) de la **lysine** et de l'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique.

La charge nette d'une protéine dépend donc en général de sa composition en **acides aminés** et du **pH**.

Exemple de comportement en électrophorèse des acides aminés

● Alanine $pI=6,0$ ● Lysine $pI=9,59$ ● Acide Aspartique $pI=2,77$



Différents types d'électrophorèse

1-Electrophorèse de zone, Electrophorèse sur papier

La migration se fait au sein d'un liquide d'une phase liquide imprégnant un solide poreux ou un gel. Elle aboutit à la séparation plus ou moins parfaite des fractions protéiques sous forme de zones distinctes. Le support doit être homogène, poreux, physiquement et chimiquement inactif. Les plus utilisés sont : le papier, l'acétate de cellulose, les gels de polyacrylamide, de silice...etc.

Principe

Sous l'influence d'un champ électrique, les différentes fractions migrent à des vitesses différents, la migration (appelée apparente) est la résultante des forces qui dépendent de :

- De la mobilité de la protéine.
- De l'électro-endosmose.
- Du courant d'évaporation.
- D'autres facteurs qui dépendent du support.

La mobilité

$d = \mu \cdot E \cdot t$; (d : migration apparente)

La charge

$\mu = 1/6\pi\eta \cdot q/r$, la charge d'une protéine est liée au pH (généralement pH=8,6 pour les protéines sériques).

Facteurs de frictions

Ils sont liés à la géométrie de la molécule protéique : taille, forme, hydratation...etc. et à la viscosité du tampon. Le passage du courant électrique s'accompagne toujours d'un dégagement de chaleur. Pour des tensions d'alimentation plus élevées, l'accroissement de température devient sensible, il est alors nécessaire de refroidir la cuve.

Le champ électrique

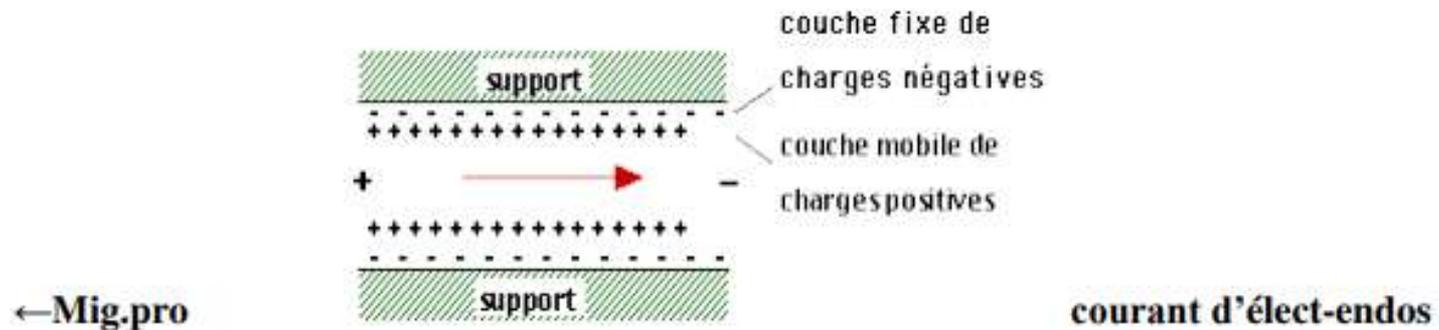
Le déplacement d'une protéine dépend du champ électrique, E est maintenu constant durant la migration.

Les courants liquidiens

Ils sont particuliers à l'électrophorèse sur support, ils vont différencier ce type de migration par rapport à l'électrophorèse en veine liquide. On les considère comme des facteurs principaux puisque c'est à cause d'eux que la relation $d = \mu \cdot E \cdot t$ n'est pas vérifiée.

a) Le courant électro-endosmose :

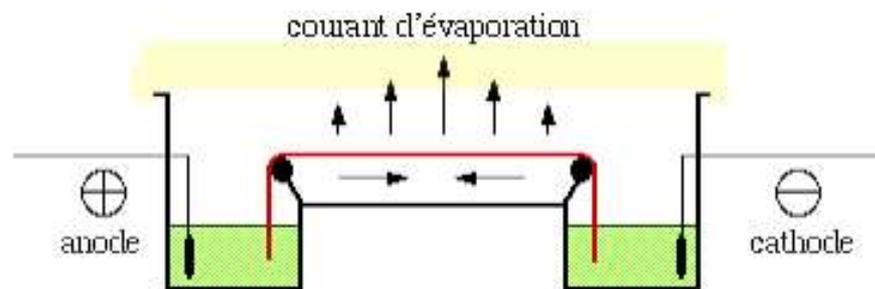
Dans les conditions de la technique, le support se charge négativement. La couche mobile de charge positive migre dans la direction du champ entraînant globalement la phase liquide vers la cathode.



Les protéines migrent dans la direction inverse du champ, donc le courant électro-endosmose s'oppose au déplacement des protéines.

b) Le courant d'évaporation (ou rhéophorèse)

Le passage du courant s'accompagne d'un échauffement du support (par effet Joule), ce qui entraîne l'évaporation de l'eau au niveau de la surface de la bande. Comme celle-ci plonge dans le tampon, il s'établit depuis chaque extrémité un courant liquide qui tend à compenser cette évaporation. De ce fait; l'évaporation est maximale au milieu de la bande; il s'établit ainsi un courant liquidien depuis chaque extrémité vers le centre de la bande. Pour limiter ce phénomène, la cuve est fermée par un couvercle; on utilise aussi des cuves réfrigérées.



c) Le courant d'électrolyse

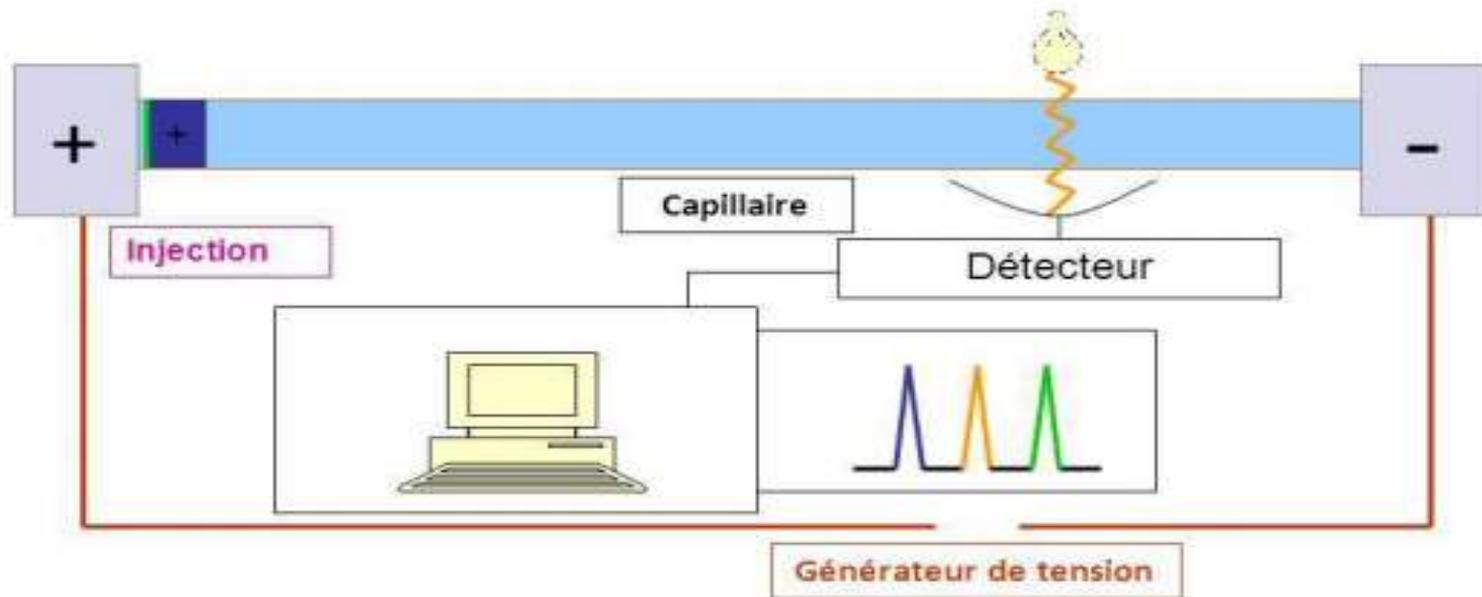
Ce courant de liquide s'établit lorsque, à la suite de la décharge des ions sur les électrodes, il y a modification du tampon dans les compartiments d'électrodes.

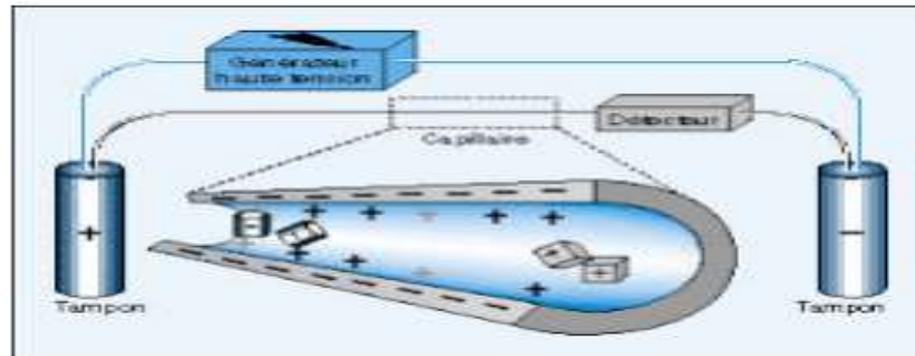
Les facteurs liés à la nature du support

Les propriétés absorbantes du support se manifestent à l'égard des protéines et vont en freiner la migration. Le support présente des canaux sinueux dans les quels migrent les protéines. La distance de migration mesurée est nettement inférieure au déplacement réel, ce qui explique qu'en électrophorèse de zone, on mesure mobilité apparente.

Introduction électrophorèse capillaire

Principe





Installation d'électrophorèse capillaire

En électrophorèse capillaire, le support plan de la technique est remplacé par un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice de très faible diamètre (15 à 150 μm). Ce capillaire d'une longueur ($L=20$ et 80 cm) est rempli d'un électrolyte tampon. (la d.d.p $\approx 600\text{V/cm}$), mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères afin que la puissance dissipée reste inférieure à 3 W. Pour limiter l'échauffement du capillaire, il est préférable de le placer dans une enceinte thermo statée. Un détecteur est placé près du compartiment cathodique ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode.

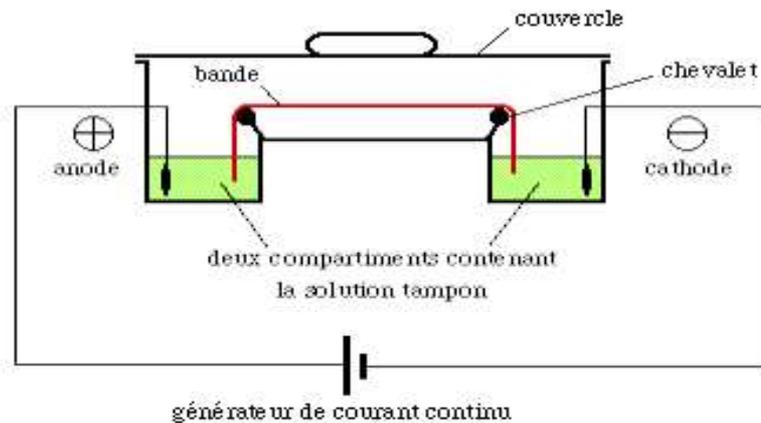
Application de l'électrophorèse

1-Analyse des protéines sériques

Elle est très utilisée dans le domaine biologique et médical. Son but est de séparer les protéines du sérum, d'identifier les fractions et de déterminer le pourcentage relatif de chacune d'elles.

Description de la technique

A-Préparation et mise en place des bandes



Cuve d'électrophorèse

Les bandes sont imprégnées de tampon par flottation, puis immersion (pH=8,6). La cuve est remplie en ajustant le tampon au même niveau dans les deux compartiments en vérifiant l'absence de solution sur la cloison séparant les deux compartiments.

B-Dépôt

Le dépôt est fait du côté cathodique. On dépose à l'aide d'une micropipette 2 μ L de sérum sur une bande de 25 mm de large, en laissant quelques mm de part et d'autre du dépôt.

C-Migration

On travaille sous tension de 150 à 250 V pendant 20 min à 1h.

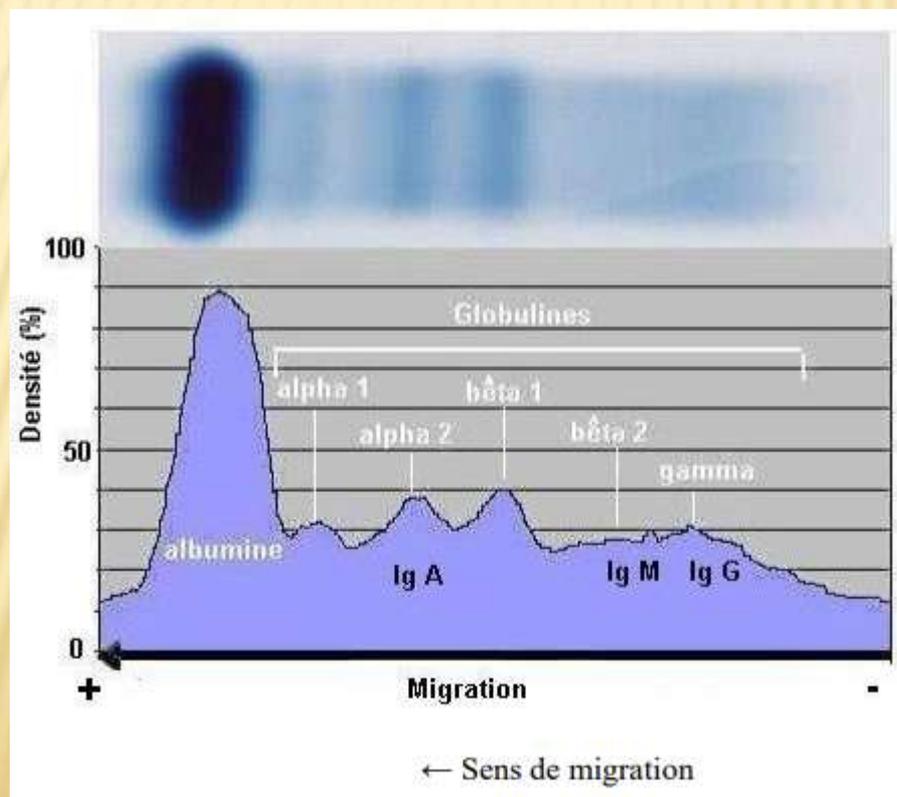
D-Analyse des résultats

→ Traitement de la bande

Les protéines sont fixées par chauffage ou par un acide fort, puis elles sont colorées à l'aide d'un colorant (Rouge de Ponceau S, vert de lissamine, amidoschwartz). Le fond de la bande est décoloré à l'aide d'une solution d'acide acétique à 5%.

→ Analyse des fractions

Il est difficile de d'identifier des fractions à l'œil nu.



Pour l'analyse quantitative, on utilise les techniques suivantes :

a-si l'électrophorèse était faite sur papier, les fractions protéiques colorées étaient découpées, éluées par un solvant convenable, et l'on mesurait l'absorbance des éluats.

b-sur acétate de cellulose, on découpe les fractions et l'on dissout la bande dans un solvant convenable. Les solutions sont ensuite passées au photomètre.

On peut remplacer ces techniques par la lecture densitométrique avec intégration.

La bande est passée dans un densitomètre : c'est un photomètre qui mesure l'absorbance des fractions colorées de la bande en fonction de leur position sur celle-ci. La courbe $D.O = f(x)$ enregistrée présente autant de pics qu'il y a des fractions séparées. L'aire d'un pic est proportionnelle à la concentration de la fraction protéique correspondante.

L'intégrateur trace la courbe $S = \int (D.O) dx$

La hauteur h d'un gradin est proportionnelle à la concentration de la fraction protéique.

Emplacement du dépôt

Piste d'électrophorèse et analyse densitométrique

(sérum humain normal)

La teneur d'une fraction (x) est donc égale en % : $Teneur = \frac{h \cdot 100}{H}$

Révélation spécifique

En analyse biologique, on utilise une révélation spécifique pour les glycoprotéines ou lipoprotéines et pour les isoenzymes de la lactate déshydrogénase (LDH).

Les glycoprotéines sont colorées par le réactif de Schiff, après oxydation de la partie glucidique par l'acide périodique.

Les lipoprotéiques sont colorées par le noir de Soudan ou le rouge de Ciba.

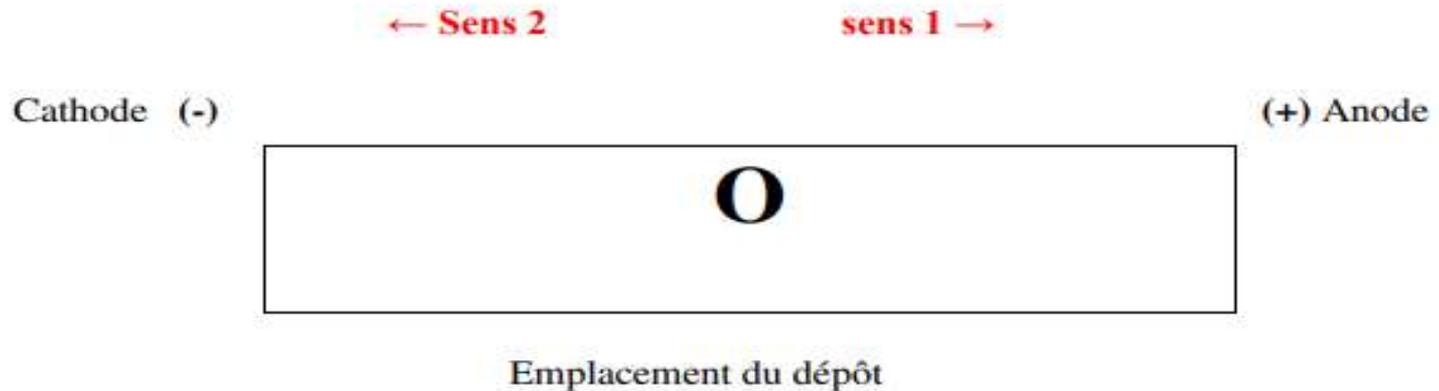
Immunoélectrophorèse

C'est une méthode qui associe l'électrophorèse de protéines (antigènes) à une immunodiffusion contre des anticorps spécifiques. Elle aboutit à une réaction antigène-anticorps en donnant un arc de précipitation par couple AG-Ac. L'immunoélectrophorèse se réalise en deux temps.

1-Premier temps : Le temps d'électrophorèse

Les antigènes sont séparés en électrophorèse de zone sur une lame de gel d'agar tamponnée à pH variable de 8,2 à 8,6.

Il est à noter que les phénomènes d'électro-endosmose sont accentués, d'où la nécessité de faire le dépôt dans un trou percé dans le gel d'agar au centre de la lame.



Les fractions protéiques particulièrement mobiles du sérum migrent vers l'anode sens (1). Les fractions les moins mobiles sont entraînées vers la cathode par le courant d'électro-endosmose, elles migrent donc en apparence vers la cathode (-), bien que chargées négativement (sens 2).

Rq

Ce fort courant d'électro-endosmose peut quelques fois se visualiser par un affaissement du gel côté anode et un gonflement côté cathode.

2-Deuxième temps L'immunodiffusion

La plaque est placée en chambre humide pendant 24h à 48 h. les arcs de précipitation apparaissent sous forme d'arcs de cercles blanchâtres sont analysés.

Exploitation et interprétation d'une immunoélectrophorèse

L'exploitation de la plaque est faite visuellement :

→ Par observation directe sur fond noir ou à la loupe éclairante.

→ Par photographie et agrandissement.

→ Par coloration après lavage et séchage.

L'interprétation se fait toujours par comparaison entre l'échantillon à analyser et un sérum normal.

Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

A-Gel de polyacrylamide, support d'électrophorèse

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule poreuse qui est utilisable comme support d'électrophorèse : c'est un copolymère d'acrylamide et de N, N-méthylène bis-acrylamide.

(1) $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ Acrylamide

(2) $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ N, N-méthylène bis-acrylamide

(1) + (2) \rightarrow

B-Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécylsulfate)

Cette méthode dérive de la précédente, est une méthode d'analyse séparant les protéines en fonction de leur géométrie, masse molaire et forme.

Le SDS ($\text{CH}_3\text{-(CH)}_{11}\text{-SO}_3\text{Na}^+$) en excès dans le milieu se fixe sur les protéines, les transforme en macropolyanions de **même mobilité électrophorétique**.

Chaque molécule de SDS qui se fixe apporte une charge négative q , et quelle que soit la protéine (q/r) est constant, donc la mobilité ($\mu = k \cdot q/r$) est la même pour chaque particule, les molécules migrent vers l'anode, mais la séparation est faite uniquement par effet de tamis moléculaire. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse molaire et le déplacement électrophorétique au sein du gel.

Cette technique est utilisée pour déterminer la masse molaire d'une protéine. A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse molaire connue), on trace la courbe d'étalonnage : $\lg M = f(d)$. Puis dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement permet la détermination de sa masse molaire.