

# Techniques chimiques pour la biologie

## TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

### Chapitre II



# TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie a pour but de séparer et de caractériser les molécules d'un mélange qui diffèrent par leurs :

- taille
- solubilité
- forme
- masse
- charge
- propriétés d'adsorption

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

Il existe plusieurs types de chromatographie dont le principe est fondé sur les interactions entre 3 composants :

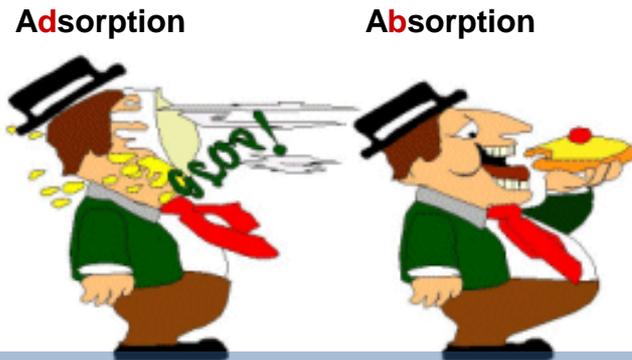
- le mélange à séparer (solutés)
- phase stationnaire (qui ne bouge pas)
- phase mobile (éluant)

### chromatographie d'adsorption

Ce mode de chromatographie met en jeu un mécanisme d'adsorption du soluté sur la phase stationnaire solide et un mécanisme d'éluion (désorption) par la phase mobile liquide ou gazeuse (éluant).

L'adsorption est la fixation plus ou moins énergétique d'un gaz, d'un liquide ou d'un soluté sur une **surface** solide; elle met en jeu des liaisons à faible énergie (liaisons hydrogène...)

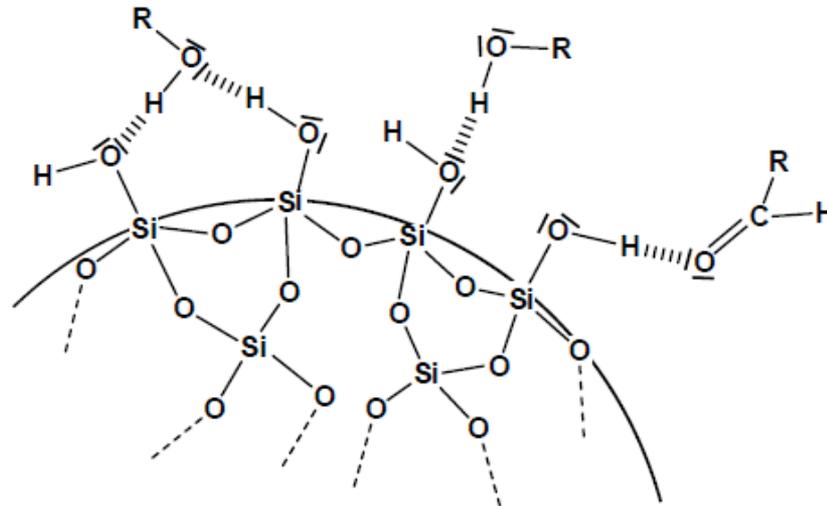
selon le caractère de polarité.



### chromatographie d'adsorption

Les phases stationnaires utilisées en chromatographie d'adsorption sont généralement la silice  $\text{SiO}_2$  ou l'oxyde d'aluminium  $\text{Al}_2\text{O}_3$

### chromatographie d'adsorption



Vision schématique de la surface d'un grain de silice. L'interaction avec un alcool est plus forte qu'avec un aldéhyde (plus grand nombre de liaisons hydrogène établies) : à éluant égal, l'**alcool** est plus retenu par la phase stationnaire que l'**aldéhyde**.

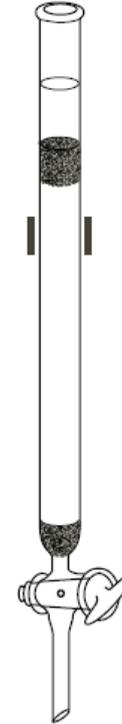
# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### chromatographie d'adsorption



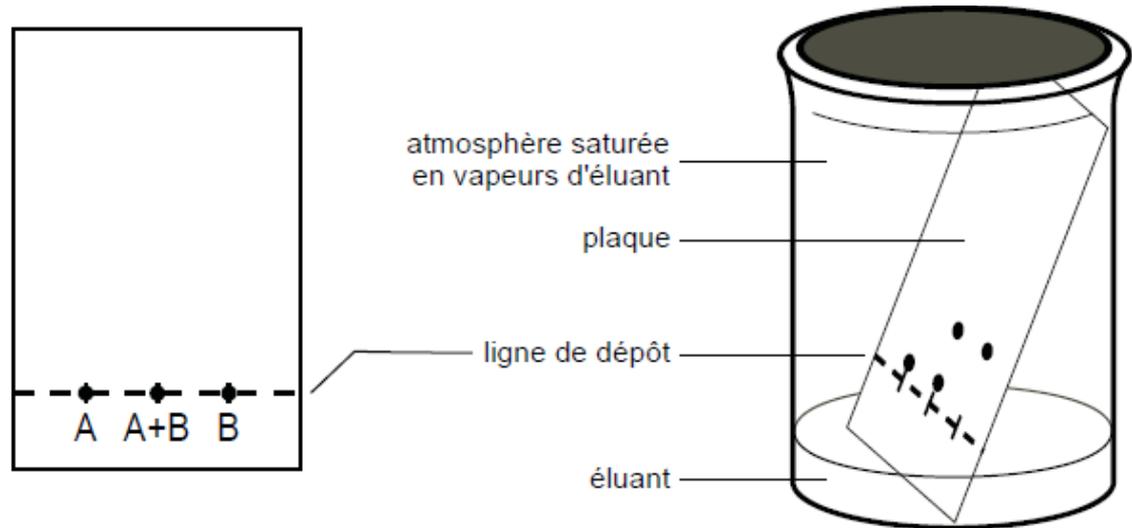
Couche mince



Colonne en verre

### chromatographie d'adsorption

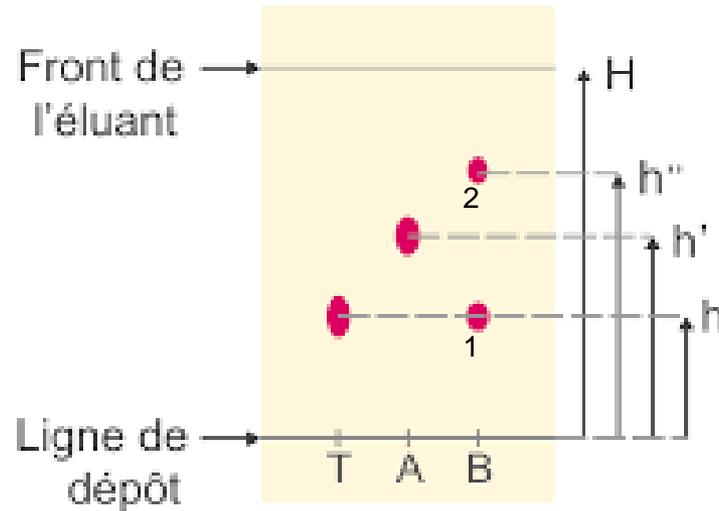
Sur couche mince



Chromatographie sur couche mince (CCM)

**rapport frontal :  $R_f$**

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par un soluté}}{\text{distance parcourue par le solvant}}$$



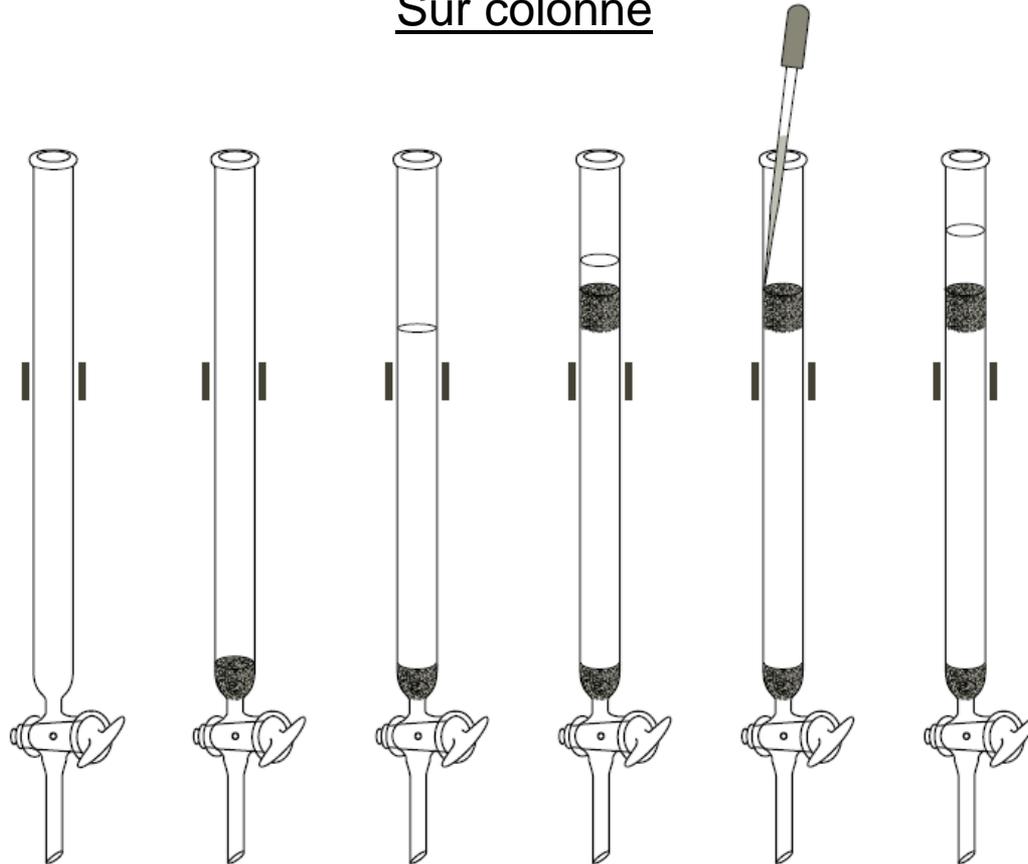
Pour T on a une seule tache  $\rightarrow R_f(T) = h/H$

Pour A on a une seule tache  $\rightarrow R_f(A) = h'/H$

Pour B on a deux taches  $\rightarrow R_{f(B1)} = h/H$  et  $R_{f(B2)} = h''/H$

### chromatographie d'adsorption

Sur colonne



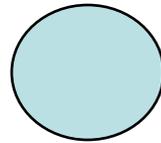
**Chromatographie sur colonne**

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### chromatographie d'adsorption

Sur colonne



Vidéo



E150 a → Jaune } Vert  
E133 → Bleu }

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE chromatographie d'adsorption

### Sur colonne

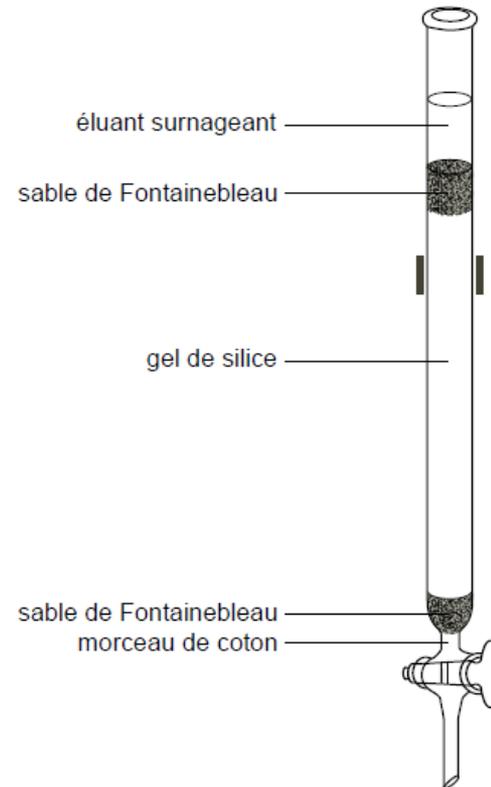


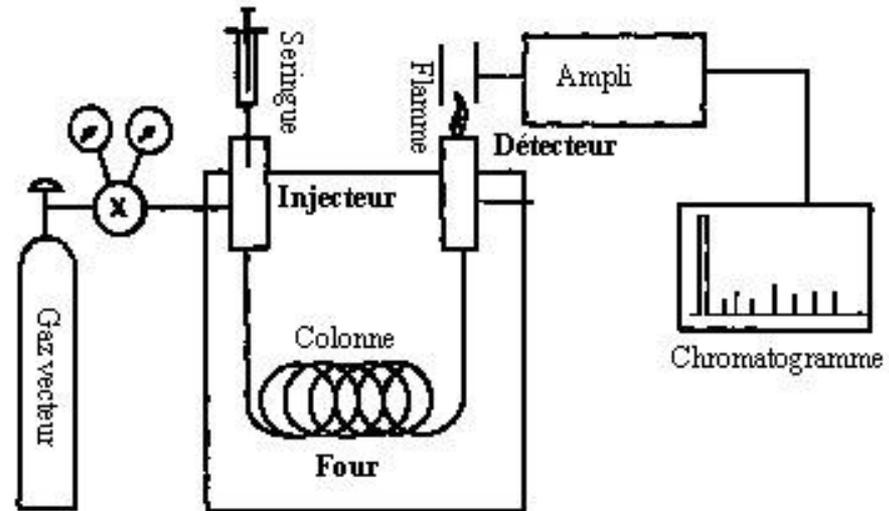
Schéma d'une colonne de chromatographie. ■ : Fixations fermes avec une pince plate.

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE chromatographie d'adsorption

Sur colonne pour phase gazeuse

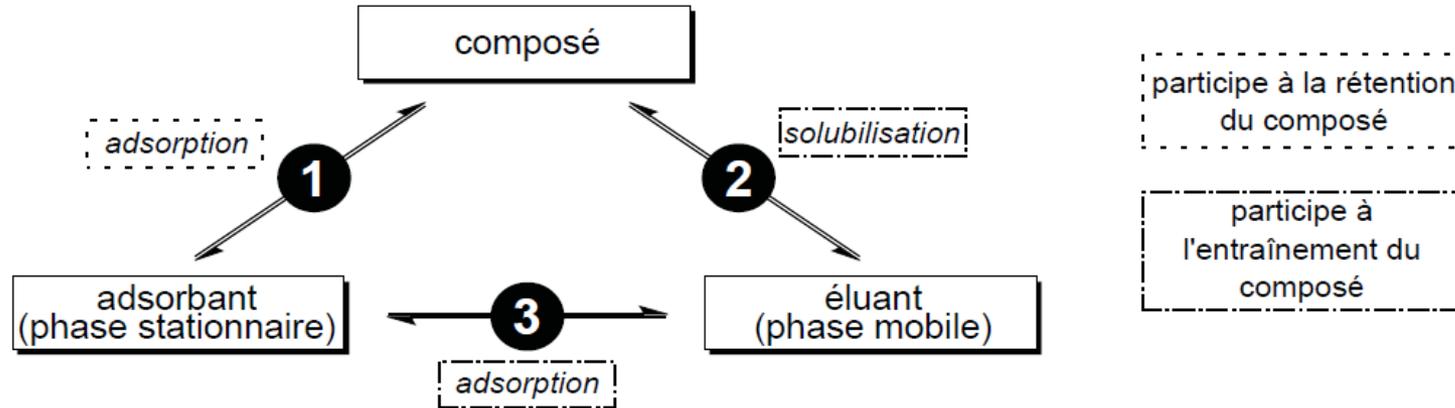


colonne pour phase gazeuse



Appareil de chromatographie en phase gazeuse

### chromatographie d'adsorption



Migration des composés sur une phase stationnaire **polaire**.

Composé	Éluant	Le composé...
polaire	polaire apolaire	...migre car il est solubilisé (2) et « poussé » (3) ...ne migre pas (1)
apolaire	polaire apolaire	...migre car il est « poussé » (3) ...migre car il est solubilisé (2)

### chromatographie de partage

Il s'agit d'une chromatographie de partition qui repose sur les **différences de solubilités** relatives des molécules à séparer dans un solvant organique ou aqueux.

coefficient de partage  $K = C_s/C_m$

$C_s$  : la concentration du soluté dans la phases stationnaire

$C_m$  : la concentration du soluté dans la phases mobile

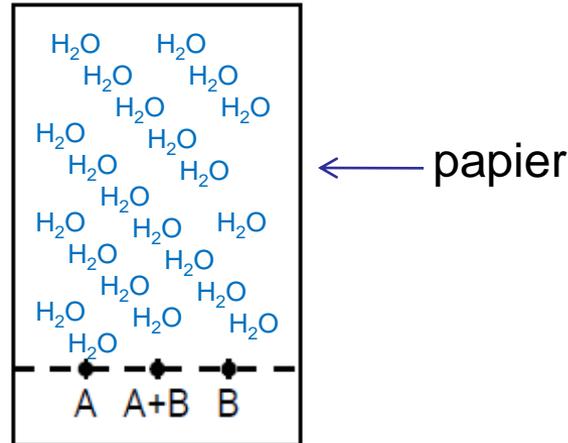
### chromatographie de partage

#### Sur papier

Dans la chromatographie sur papier, la technique fonctionne par partage de solutés entre deux phases non miscibles (aqueuse et organique).

-la phase stationnaire c'est une phase aqueuse constituée par l'eau adsorbé par le papier (l'humidité du papier).

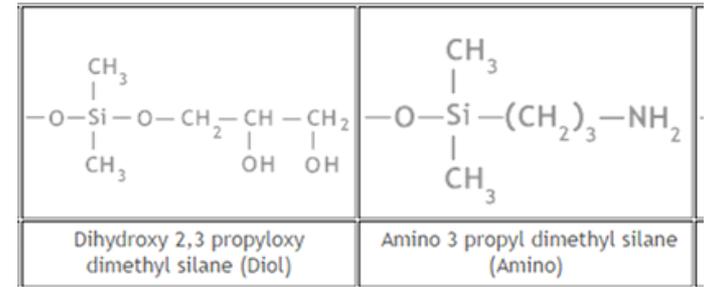
-La phase mobile est constituée par un solvant organique qui va migrer par capillarité



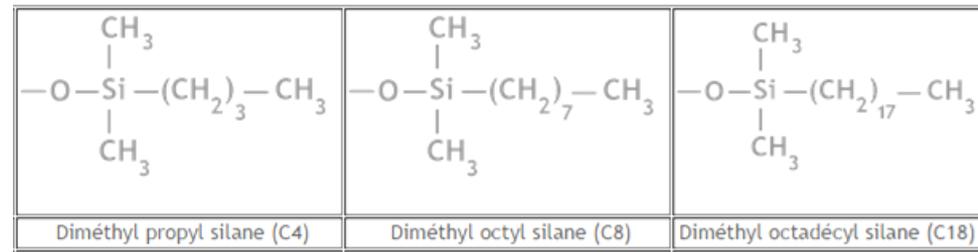
### chromatographie de partage

la phases stationnaire liquide est remplacée par une phase stationnaire greffée.

- Chromatographie de partage sur phase normale



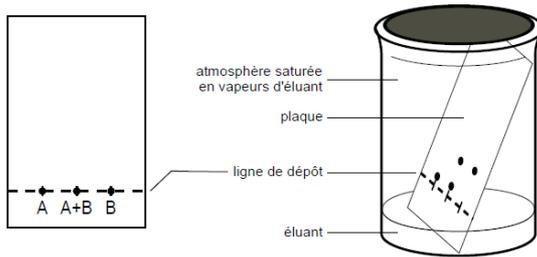
- Chromatographie de partage sur phase inversée



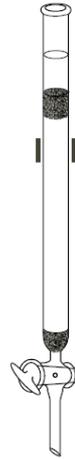
### chromatographie de partage

Ainsi, un soluté très soluble dans la phase stationnaire migrera lentement, la force de rétention prédominant sur la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté plus soluble dans la phase mobile migrera rapidement

### chromatographie de partage



Couche mince



Colonne normale



Colonne HPLC



Colonne CPG

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

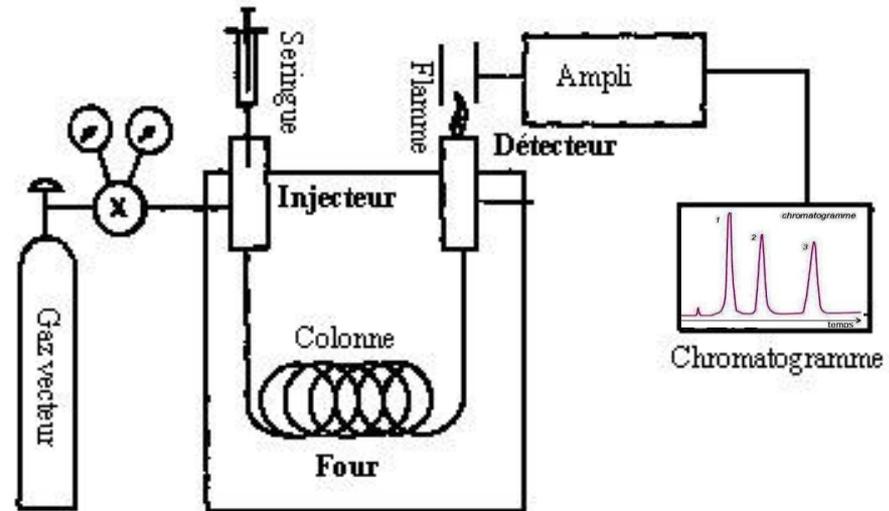
CPG : Chromatographie en phase gazeuse

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE chromatographie d'adsorption

Sur colonne pour phase gazeuse

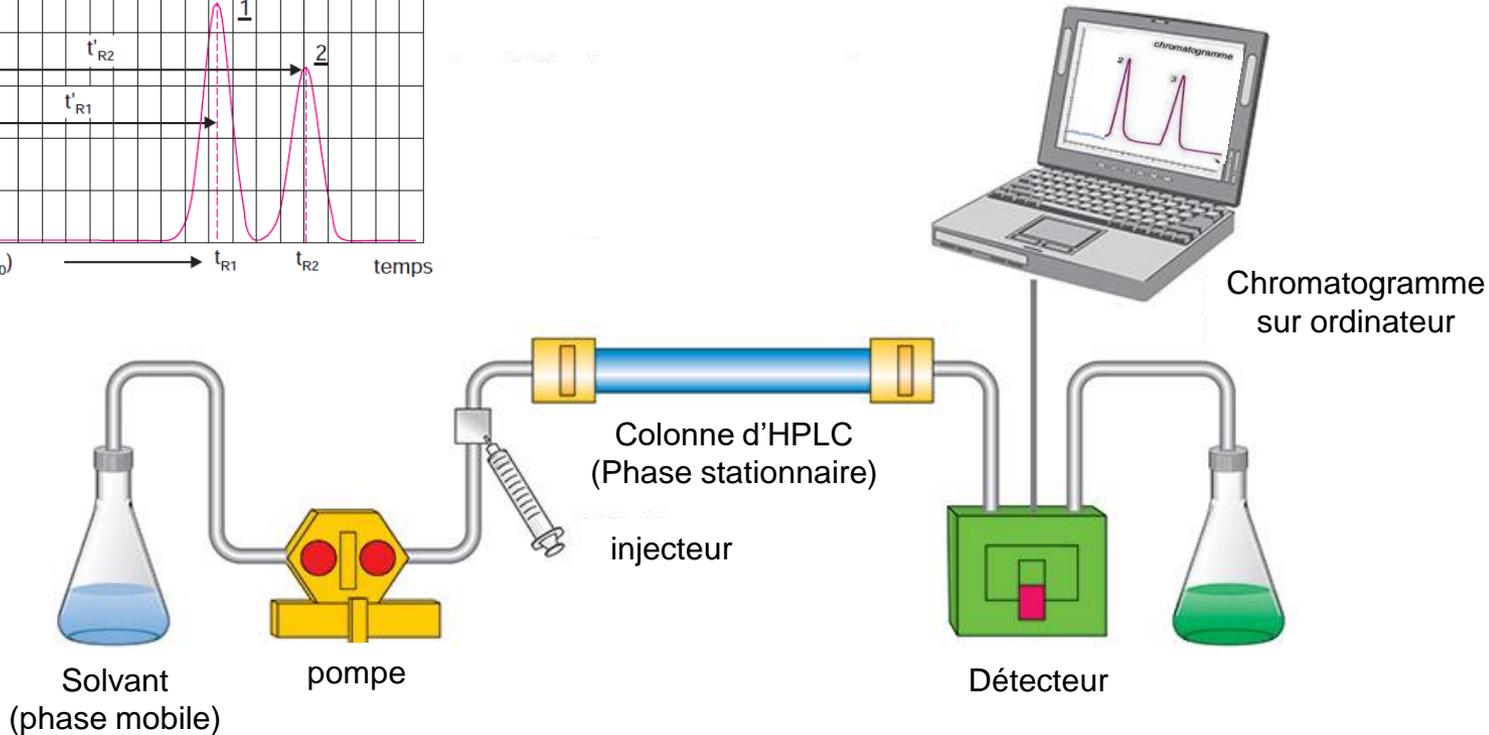
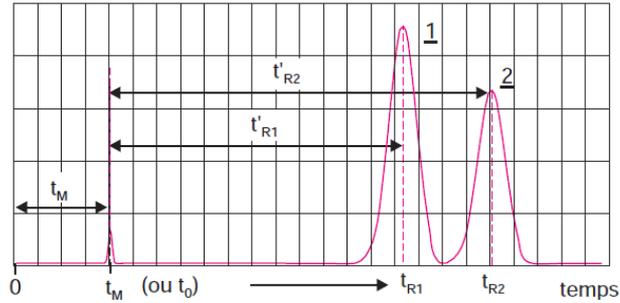


colonne pour phase gazeuse



Appareil de chromatographie en phase gazeuse

### chromatographie de partage

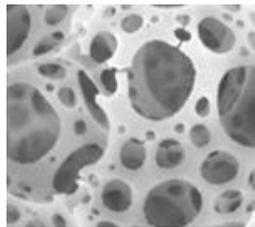
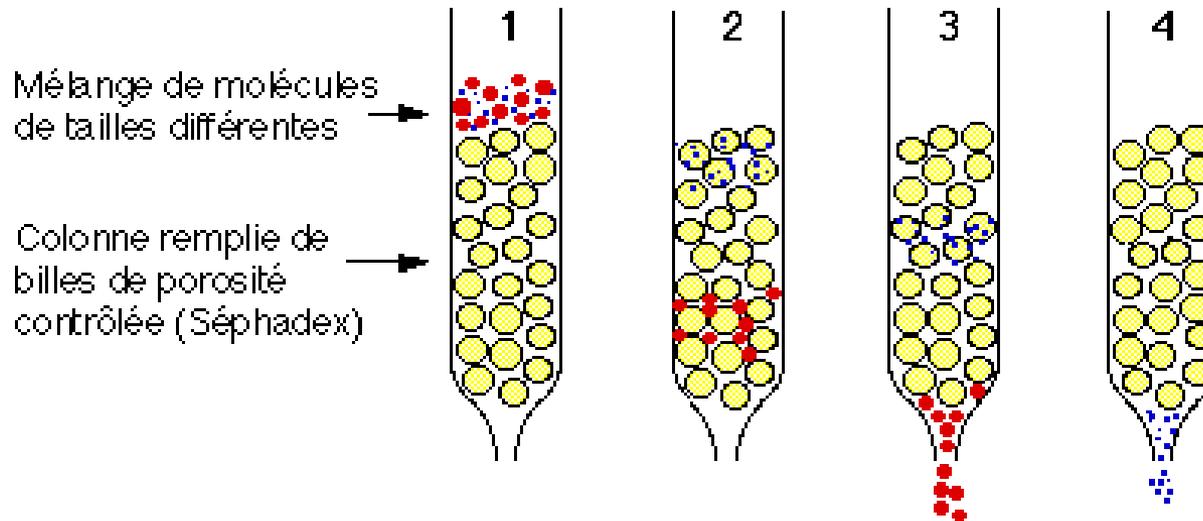


Appareil de Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

### chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules en fonction de leur tailles.

### chromatographie d'exclusion



### chromatographie d'exclusion



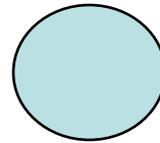
Colonne normale



Colonne HPLC

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

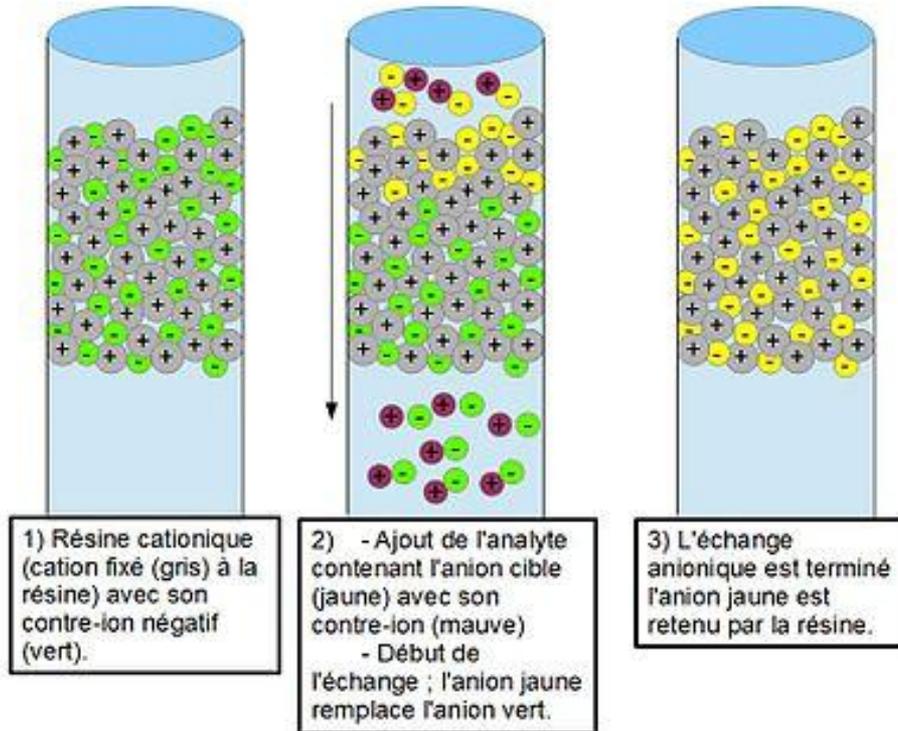


Vidéo chromatographie d'exclusion

### chromatographie échangeuse d'ions

chromatographie échangeuse d'ions est un type de chromatographie en phase liquide permettant d'isoler une substance chargée électriquement d'un mélange de molécules

### chromatographie échangeuse d'ions



### chromatographie échangeuse d'ions

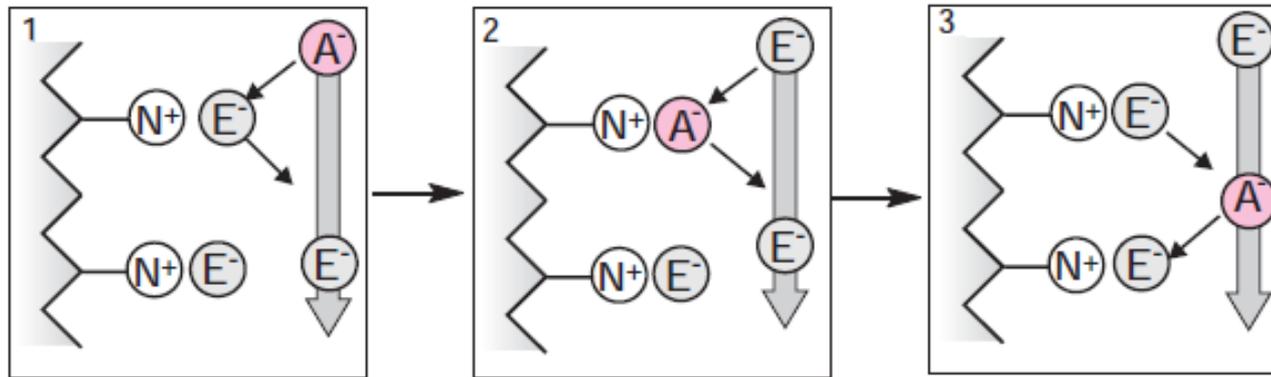


Illustration de la progression d'un anion  $A^-$  au contact d'une phase stationnaire ammonium associée avec un contre-anion  $E^-$  de la phase mobile.

Colonne anionique (chromatographie échangeuse d'anion)

### chromatographie échangeuse d'ions

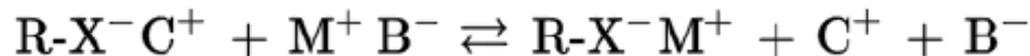
R-X la phase stationnaire.

A un anion connu.

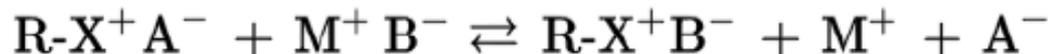
C un cation connu.

M et B les constituants du mélange.

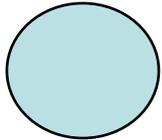
1. Phase stationnaire échangeuse de cations : M se fixe, C est élué avec B



2. Phase stationnaire échangeuse d'anions : B se fixe, A est élué avec M



### chromatographie échangeuse d'ions



Vidéo



Colonne normale



Colonne HPLC

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### Paramètres de séparation et de rétention

#### Rapport frontal

$$R_{f1} = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x_1}{x_0}$$

#### Facteur de rétention k

$$k_1 = \frac{1}{R_{f1}} - 1$$

#### Efficacité N

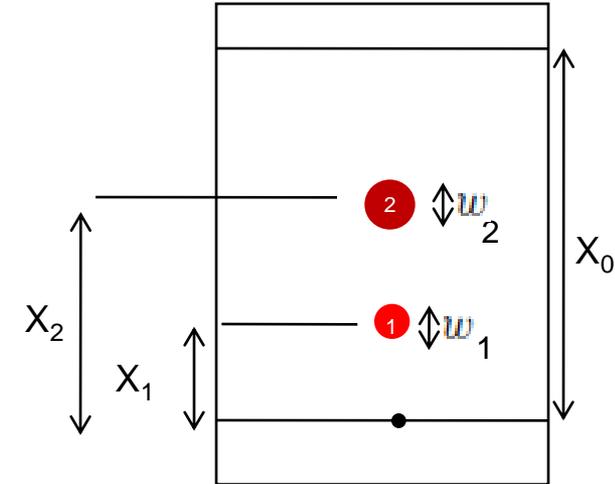
$$N_1 = 16 \frac{x_1^2}{w_1^2}$$

#### Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H)

$$H_1 = \frac{x_1}{N_1}$$

#### Résolution

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$



#### facteur de séparation (ou sélectivité)

$$\alpha = k_1/k_2$$

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### Paramètres de séparation et de rétention

#### Rapport frontal

$$R_{f1} = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x_1}{x_0}$$

#### Facteur de rétention k

$$k_1 = \frac{1}{R_{f1}} - 1$$

#### Efficacité N

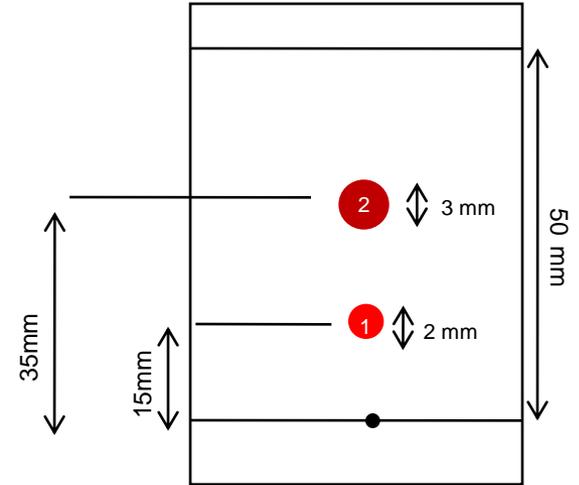
$$N_1 = 16 \frac{x_1^2}{w_1^2}$$

#### Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H)

$$H_1 = \frac{x_1}{N_1}$$

#### Résolution

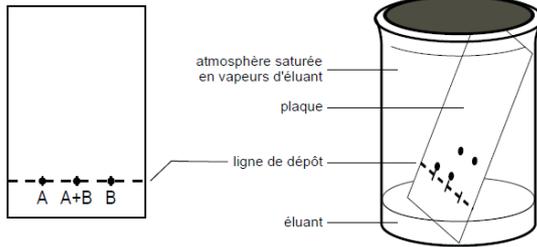
$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$



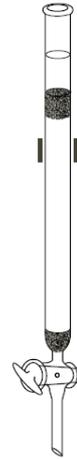
#### facteur de séparation (ou sélectivité)

$$\alpha = k_1/k_2$$

### chromatographie de partage



Couche mince



Colonne normale



Colonne HPLC



Colonne CPG

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance

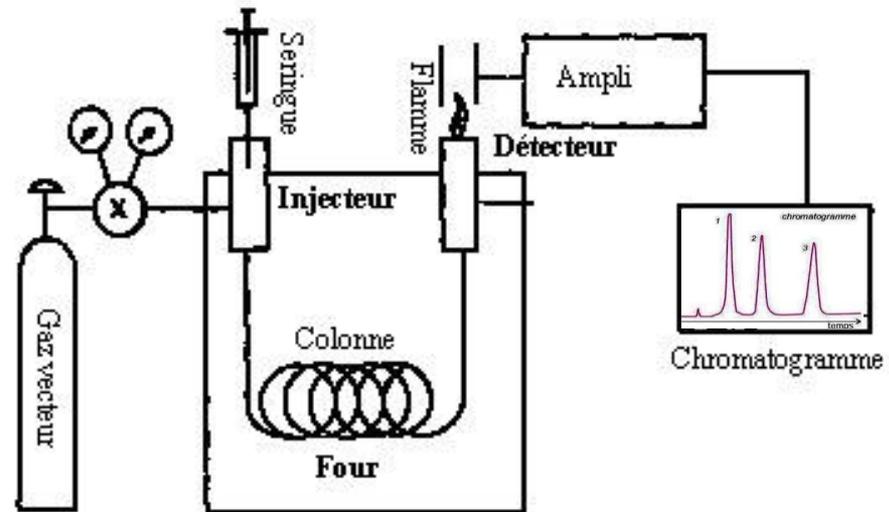
CPG : Chromatographie en phase gazeuse

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE



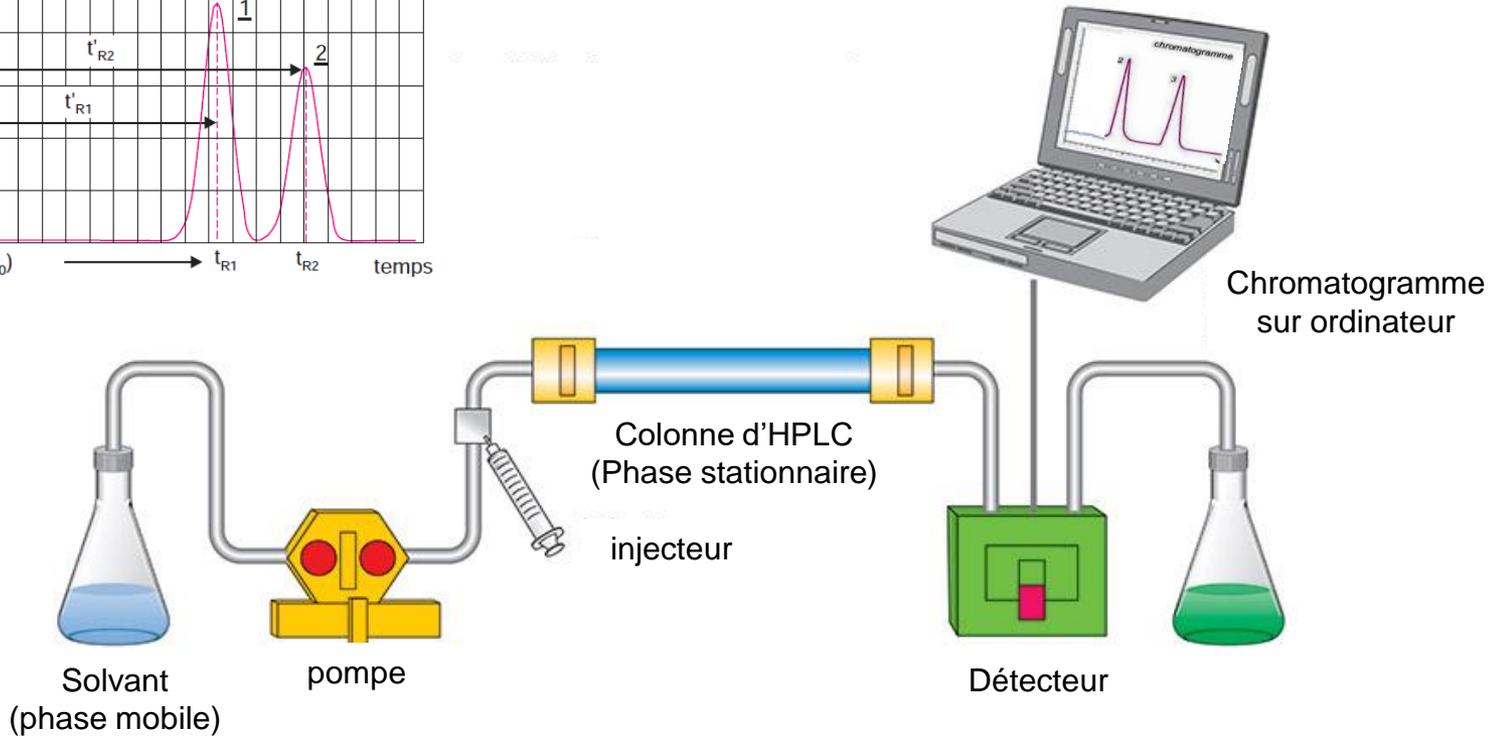
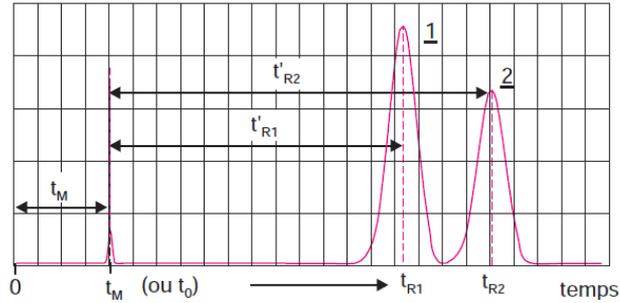
colonne pour phase gazeuse



Appareil de chromatographie en phase gazeuse

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

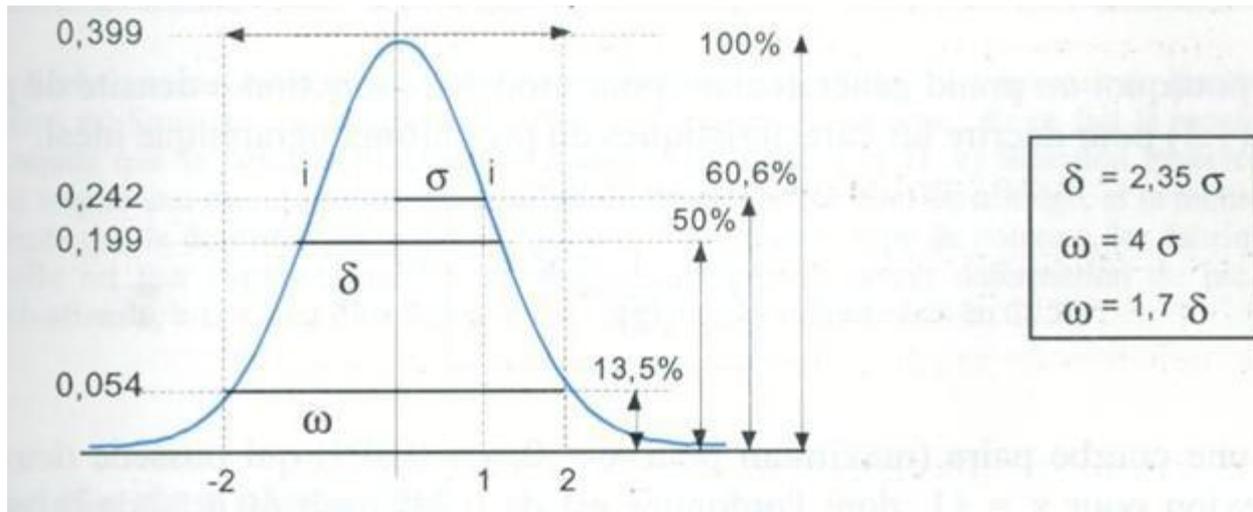


Appareil de Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

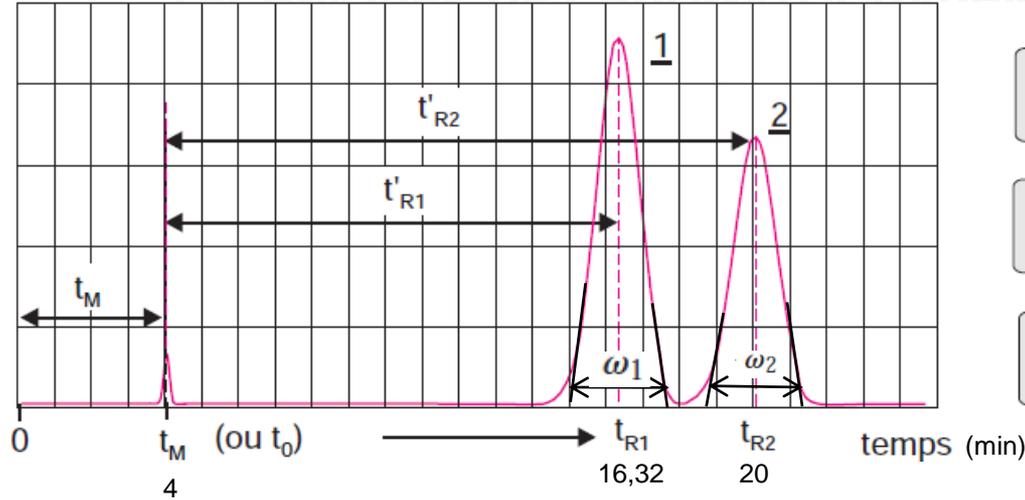
## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

Caractéristiques de la courbe de gauss



# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE



ici, on a :

$$k_1 = \frac{t'_{R1}}{t_M}$$

$k_1 = 3,08$

$$k_2 = \frac{t'_{R2}}{t_M}$$

$k_2 = 4$

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

$\alpha = 1,3 = \frac{k_2}{k_1}$

facteur de rétention  $k$

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

facteur de résolution entre deux pics

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2}$$

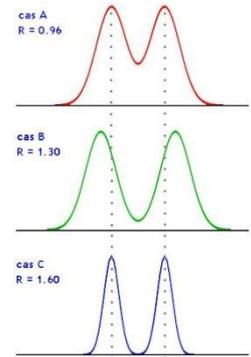
$R < 1$  : mauvaise résolution  
 $1 < R < 1,4$  : résolution acceptable  
 $1,4 < R < 1,6$  : résolution optimale  
 $R > 1,6$  : résolution bonne mais le temps d'analyse est trop long

efficacité d'une colonne

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2}$$

facteur de séparation (ou sélectivité)

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$



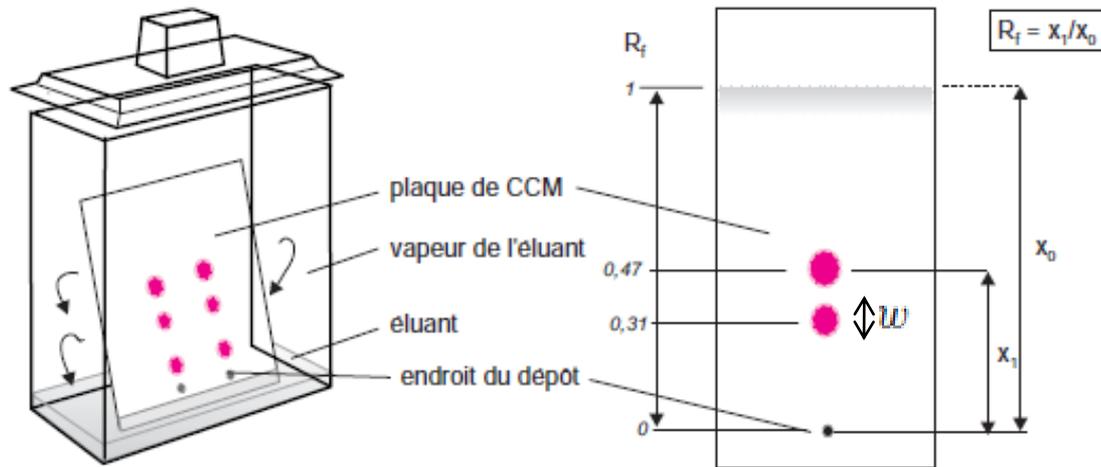
hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H)

$$H = \frac{L}{N}$$

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### PARAMÈTRES DE SÉPARATION ET DE RÉTENTION



**rapport frontal**

$$R = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0}$$

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2}$$

$$k = \frac{1}{R_f} - 1$$

**efficacité  $N$**

X1

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2}$$

**hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou  $H$ )**

$$H = \frac{x}{N}$$

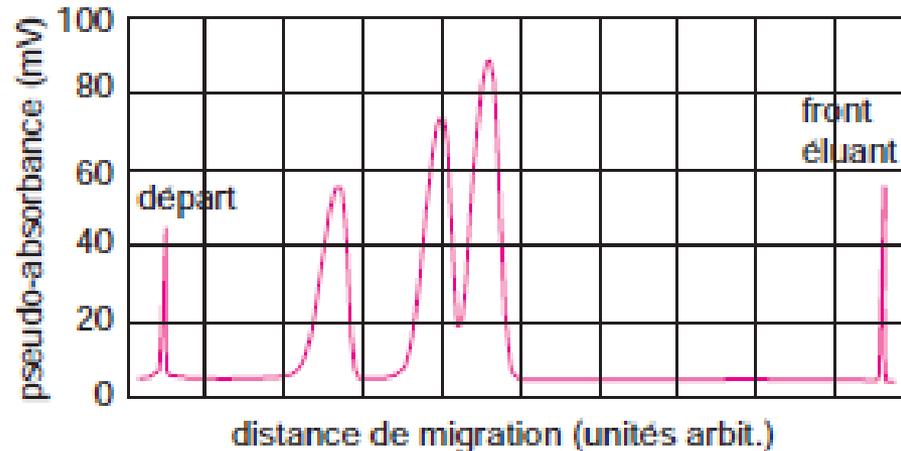
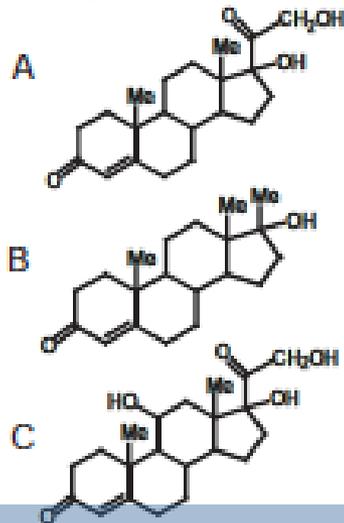
# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

### Exercice

La figure ci-après représente le résultat de la scannérisation d'une plaque de CCM en phase normale (phase mobile : hexane/acétone 80:20). Les trois composés ont pour structures A, B et C.

- Attribuer à chaque pic de l'enregistrement le composé qui lui correspond.
- Quel serait l'ordre d'éluion des composés A, B et C sur une colonne de CLHP contenant le même type de phase stationnaire et la même phase mobile ?
- Quel serait l'ordre d'éluion des composés A, B et C sur une colonne de CLHP contenant une phase de type *RP-18* avec comme éluant un mélange acétonitrile/méthanol (8:2) ?
- Calculer le  $R_f$  du composé qui migre le plus rapidement sur la plaque.



### Exercice

Un mélange de deux composés  $A$  et  $B$  conduit après migration à deux taches aux caractéristiques suivantes (distance de migration  $x$  et diamètre du spot  $w$ ) :

- $x_A = 27$  mm       $w_A = 2$  mm
- $x_B = 33$  mm       $w_B = 2,5$  mm

La migration du front de solvant dans cette expérience est de 60 mm.

- Calculer  $R_f$ ,  $N$  et  $H$  pour chacun des composés.
- Calculer le facteur de résolution entre les deux composés  $A$  et  $B$ .
- Établir la relation entre le facteur de sélectivité et le  $R_f$  des deux composés. Calculer sa valeur numérique.



# TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

**Electrophorèse** : Méthode de séparation de particules chargées électriquement (séparation, caractérisation ou purification de molécules d'intérêt).

**Electro** : énergie électrique

**Phoresis** : *phoros* (Grec) porter

### Principe

La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'ions (molécules 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.

*Cation : chargé +. Attiré **lors de l'électrolyse** par la CATHODE (ou électrode négative)*

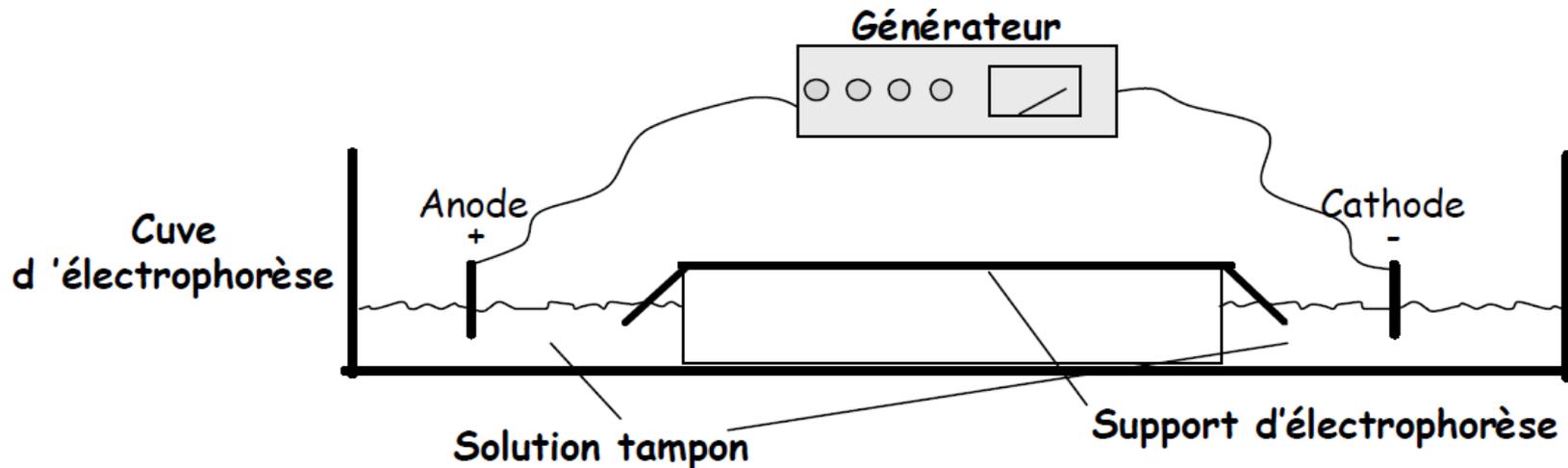
*Anion : chargé -. Attiré **lors de l'électrolyse** par l'ANODE (ou électrode positive)*

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

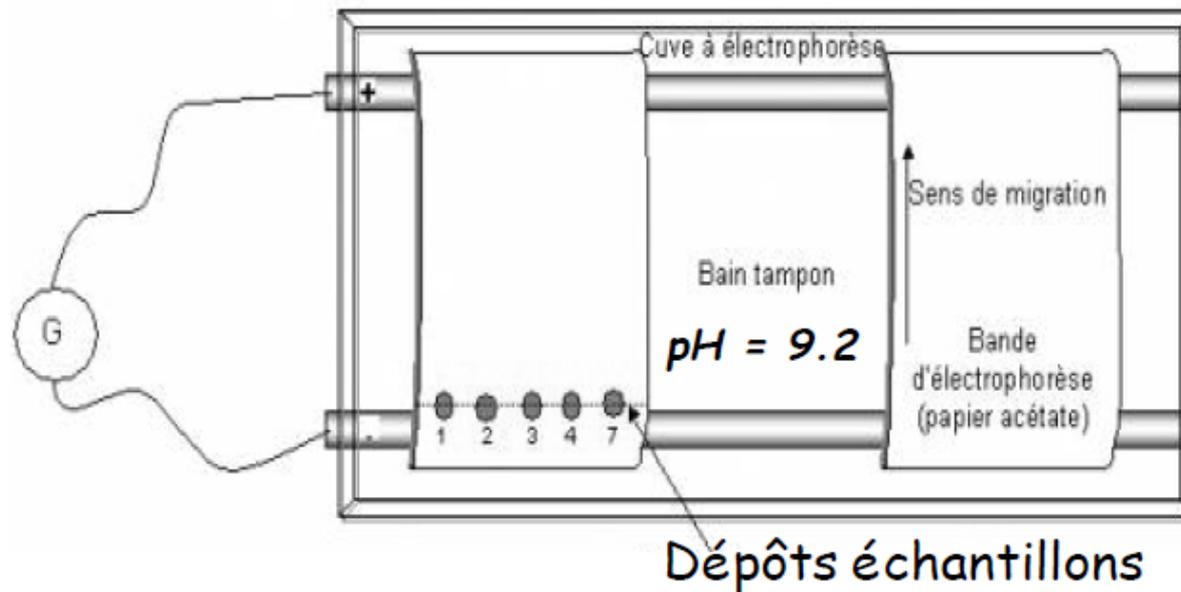
Les molécules à séparer sont déposées sur un support dont chaque extrémité est en contact avec une solution tampon.

Dans chaque solution tampon se trouve une électrode. Les électrodes sont reliées à un générateur de courant.



**Lorsque le générateur envoie du courant, les molécules chargées se déplacent sur le support en direction de l'électrode de signe opposé à leur charge.**

### ÉLECTROPHORÈSE SUR PAPIER ET ACÉTATE DE CELLULOSE



### SUPPORTS SEMI-SOLIDES « ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL »

#### Séparation des molécules selon leur ratio charge / masse

Conjuguent mobilité électrophorétique + effet filtration du gel (taille des pores limite vitesse de migration)

Les molécules chargées atteignent rapidement une vitesse

$$V = qE/f$$

q: charge particule

E: champ électrique

f: coef. frottement particule/solvant

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

### Agarose

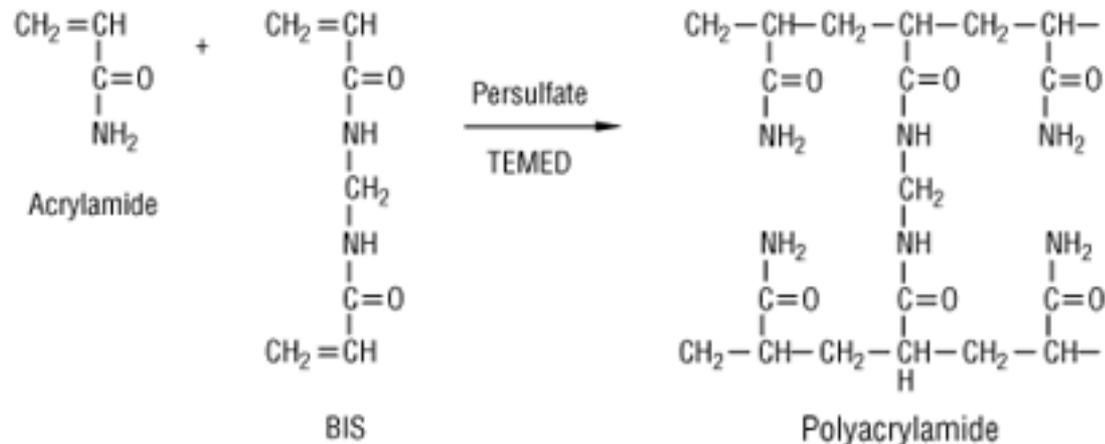
colloïde naturel extrait d'algue rouge (*Gracilaria*)

Grande taille de pores => séparation **très grosses** molécules :

Protéines **>500kDa**, Ac. Nucléiques **>1500pb**.

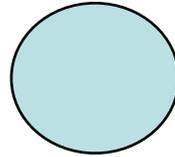
### Polyacrylamide

De l'acrylamide **CH<sub>2</sub>=CH-CO-NH<sub>2</sub>** est mis à polymériser avec du NN' méthylène-**bis**-acrylamide **CH<sub>2</sub>=CH-CO-NH-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH=CH<sub>2</sub>**, donnant des chaînes latérales linéaires



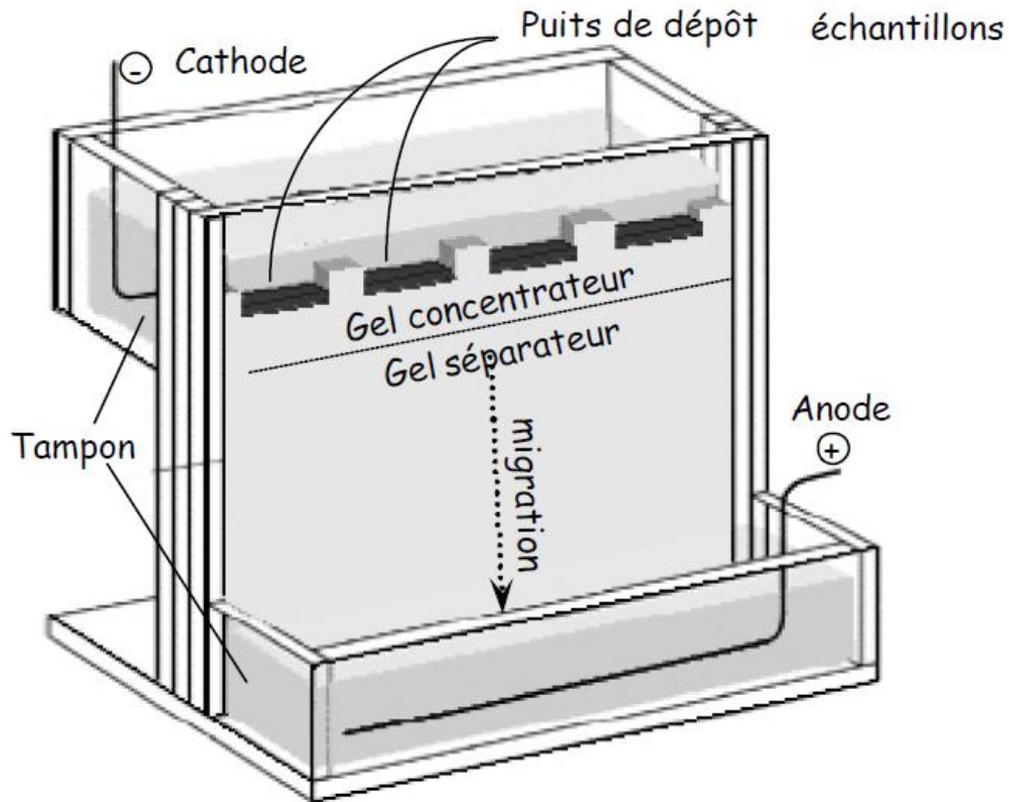
### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)

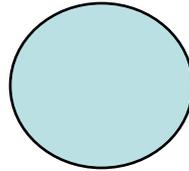
<u>polyacrylamide</u>	<u>Gamme séparation</u>
7.5 %	40-400 kDa
10 %	20-300 kDa
12 %	15-200 kDa
15 %	6-90 kDa



Préparation du gel

### ÉLECTROPHORÈSE système



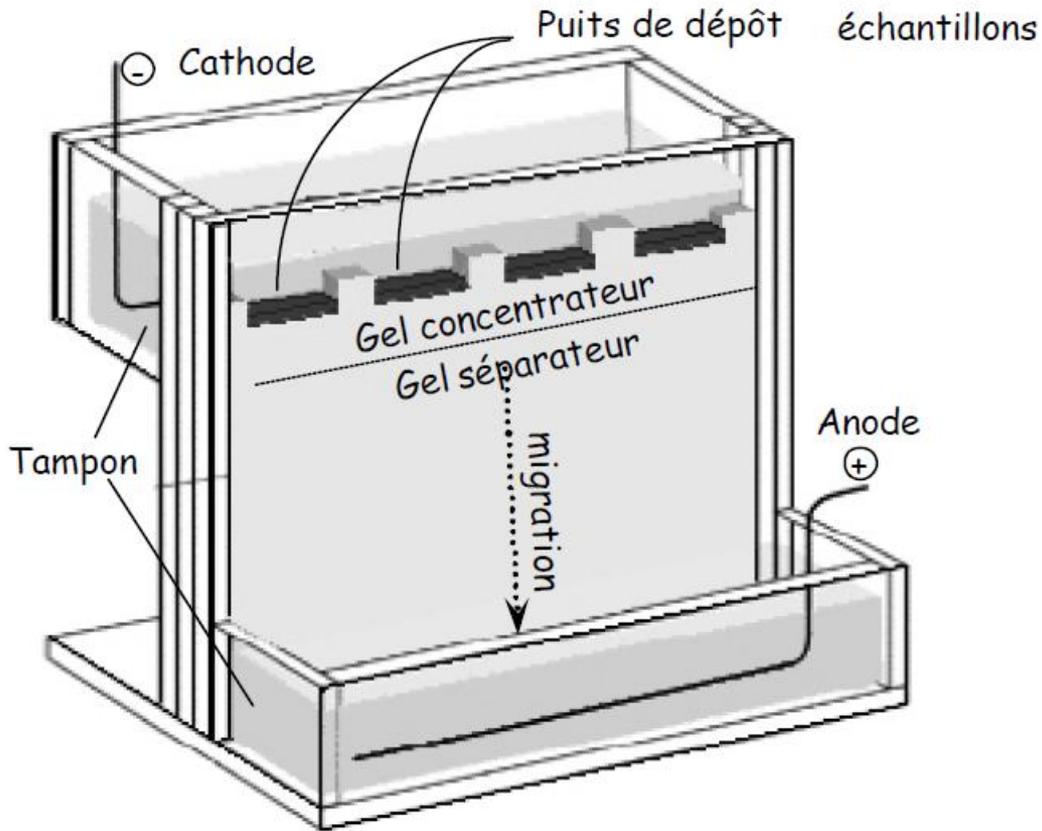


Électrophorèse gel

### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)

<u>polyacrylamide</u>	<u>Gamme séparation</u>
7.5 %	40-400 kDa
10 %	20-300 kDa
12 %	15-200 kDa
15 %	6-90 kDa

### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE (PAGE)



**-FORME**

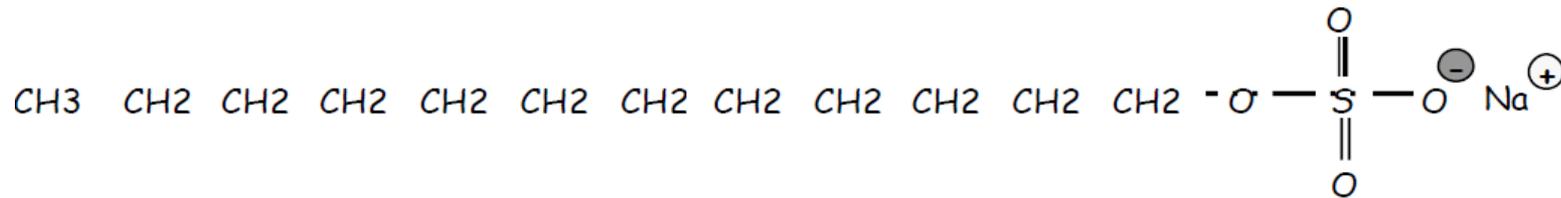
**-CHARGE**

**- TAILLE**

### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

Séparation / purification d'un mélange de **PROTEINES**

Séparation de **protéines** réalisée **en condition dénaturante**, en **présence** de **SDS**  
Sodium Dodécyl Sulfate ( $C_{12}H_{25}SO_4^-$ ) détergent anionique



# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

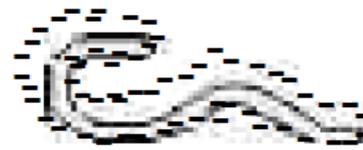
### ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)

Séparation / purification d'un mélange de **PROTEINES**

Protéine monomérique



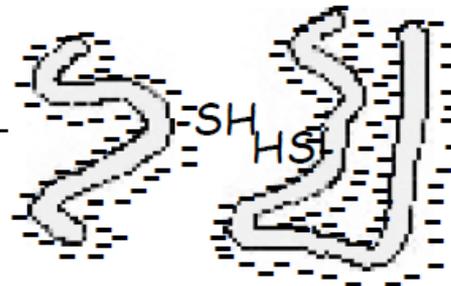
SDS  
beta-mercaptoéthanol



Protéine multimérique



SDS  
beta-mercaptoéthanol

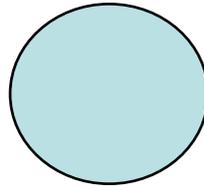


dénaturation  
enrobe les protéines de charges (-)  
rupture des ponts di-sulfures

*perte de la charge nette et de la structure*

Conditions SDS-PAGE => suppression facteurs **FORME** et **CHARGE** lors migration

Séparation des protéines uniquement en fonction du facteur **TAILLE**



Vidéo électrophorèse SDS-PAGE

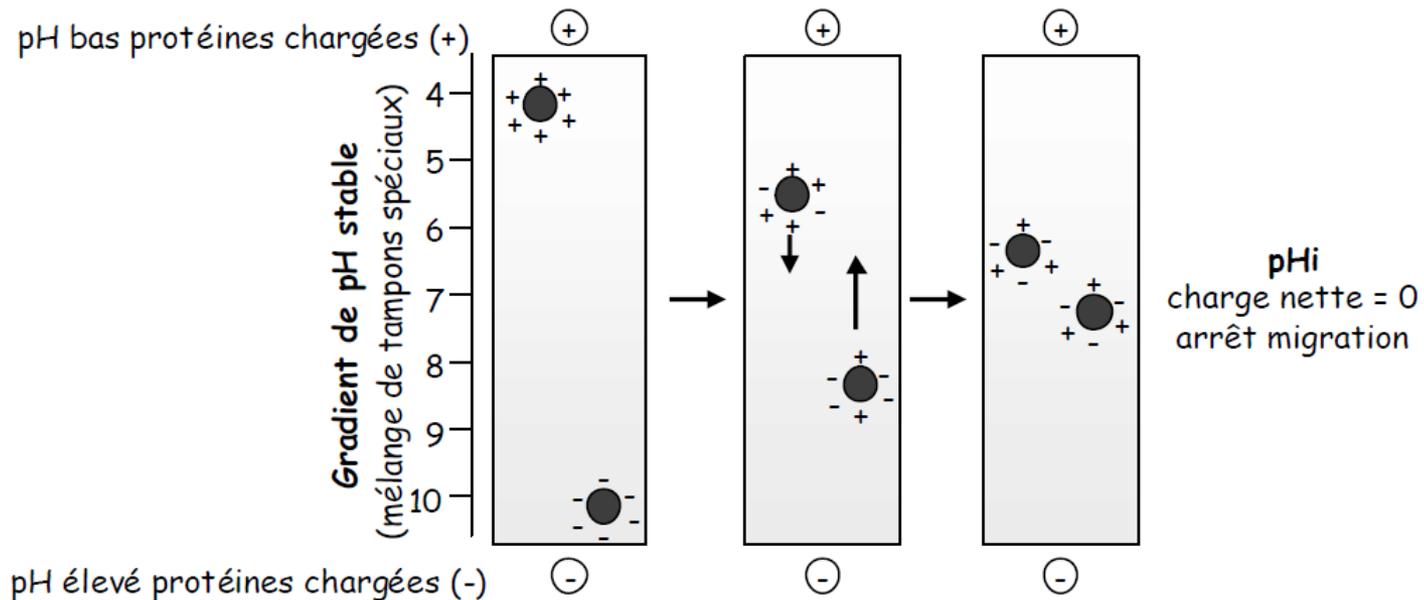
# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

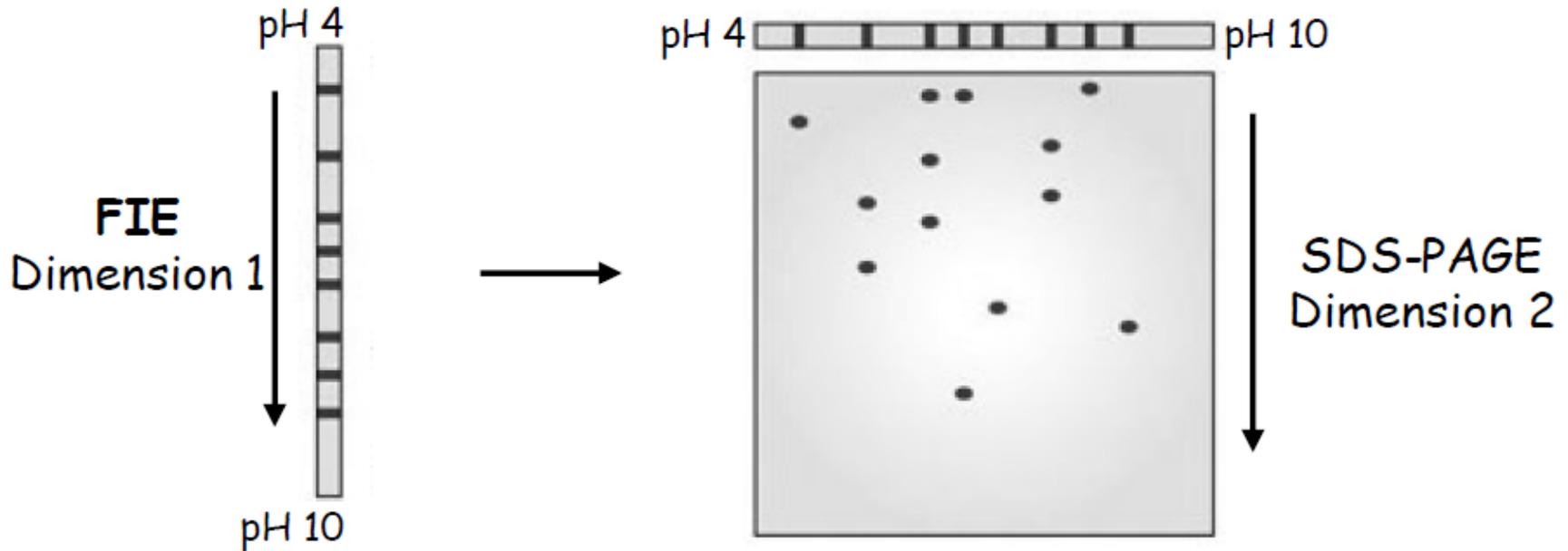
### Séparation des protéines en fonction de la charge par Focalisation Isoélectrique (FIE)

La **charge nette** d'une protéine varie avec le **pH**. A **pHi** : charge nette nulle.  
Valeur de pHi spécifique d'une protéine, qui ne migre plus dans un champ électrique

On réalise une **électrophorèse** dans un **tube** étroit de gel **polyacrylamide** où un **gradient de pH est établi**. On soumet alors à un fort courant électrique



### DIMENSION 2



Le gel étroit de protéines séparées par FIE est soumis à une SDS-PAGE dans une direction **perpendiculaire**.

Séparation en fonction de la taille des protéines



# DIALYSE

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## DIALYSE

La dialyse est une technique de purification de solutions. En particulier, en médecine, la dialyse est une méthode d'épuration du sang à travers une membrane.

Le principe consiste à séparer deux solutions par une membrane. On distingue différents types de membranes,

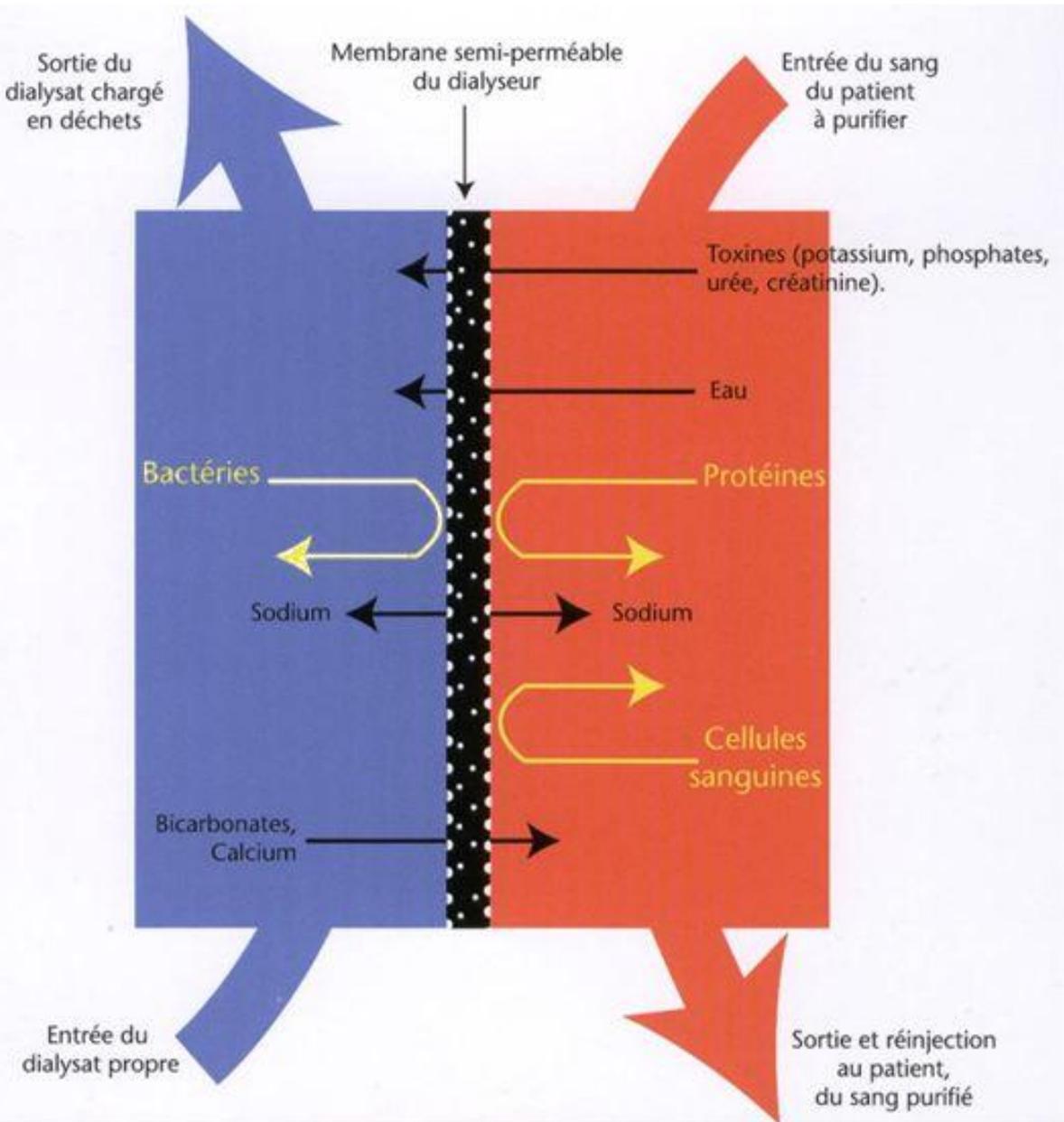
- hémiperméables (qui ne laissent passer que le solvant)

- dialysantes (pores de diamètre de l'ordre du nanomètre (nm), identiques et connus) qui laissent passer le solvant et les solutés en dessous d'une certaine taille.

Par effet de diffusion (due à l'agitation moléculaire) les petites molécules traverseront la membrane, tandis que les grosses molécules (souvent macromolécules) seront retenues d'un côté. La principale application de la dialyse dans le domaine médical concerne les personnes dont les reins ont cessé de fonctionner, temporairement (insuffisance rénale aiguë) ou définitivement (insuffisance rénale chronique au stade terminal).

Le produit d'une dialyse (solution de recueil des petites molécules) s'appelle un dialysat.

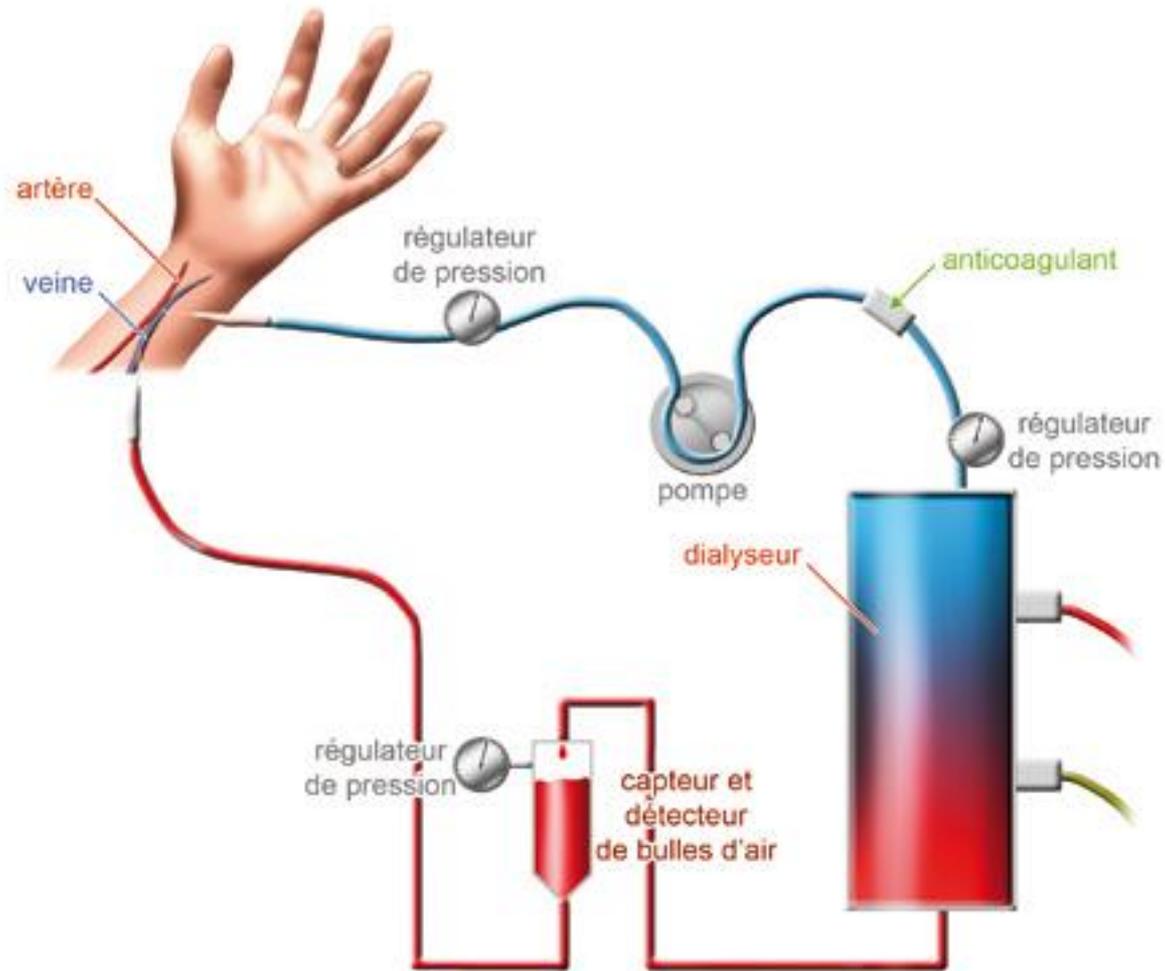
# Les membranes de dialyse



**Module où se font les échanges de solutés et d'eau entre le sang du patient et le dialysat**

# TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

## DIALYSE



© Magla Tefignac