

The background of the slide features a collection of laboratory glassware, including a large Erlenmeyer flask on the left containing a red liquid, a graduated cylinder in the center with a blue liquid, and a beaker on the right with a yellow liquid. The glassware is set against a light blue grid background with a diagonal blue gradient. The main title is centered over this background.

Techniques d'analyse biochimique

**Enseignante :
Dr. YAKHLEF G.**

**L3 Microbiologie
2022/2023**



Chapitre III : Méthodes de désintégration cellulaire, extraction et fractionnement

6) Méthodes chromatographiques

7) Méthodes électrophorétiques



6) MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Définition

La chromatographie regroupe un ensemble de techniques qui permettent de **séparer** les composés contenus dans un mélange afin de les identifier et/ou les quantifier.

La séparation est réalisée grâce à :

- Une **phase stationnaire** : retient plus ou moins les composés d'un mélange permettant leur séparation
- Une **phase mobile** : entraîne les composés du mélange à travers la phase stationnaire selon différents modes.



TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Principe

La chromatographie repose sur la différence de distribution des constituants d'un échantillon entre la phase stationnaire (qui peut être solide ou liquide) et la phase mobile (qui peut être un liquide ou un gaz) non miscibles entre elles.

- On définit alors le coefficient de distribution K_d

$$K_d = \frac{\text{Concentration de l'analyte dans la phase stationnaire}}{\text{Concentration de l'analyte dans la phase mobile}}$$

Les molécules ayant un K_d élevé sont retenues plus fortement par la phase stationnaire que les molécules ayant un K_d plus faible



TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Classification

- Selon:
- La nature des phases stationnaires et mobiles
 - Le mécanisme de rétention
 - Le procédé opératoire

Classification selon la Nature des phases

Phase mobile liquide :
Chromatographie en phase
liquide (CPL)

Chromatographie liquide-liquide (CLL)

Chromatographie liquide-solide (CLS)

Phase mobile gazeuse :
Chromatographie en phase
gazeuse (CPG)

Chromatographie gaz-liquide (CGL)

Chromatographie gaz-solide (CGS)

Phase mobile Supercritique : Chromatographie en Phase Supercritique

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Classification

- Selon:
- La nature des phases stationnaires et mobiles
 - Le mécanisme de rétention
 - Le procédé opératoire

Classification selon le Mécanisme de rétention

Partage

Partage selon la polarité entre la phase mobile et la phase stationnaire liquide

Adsorption

Adsorption physique selon la polarité

Exclusion

Rétention selon la taille des molécules

Echange d'ions

Interactions électrostatiques selon la charge des molécules

Affinité

Interactions biologiques ou chimiques sélectives avec un ligand

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Classification

- Selon:
- La nature des phases stationnaires et mobiles
 - Le mécanisme de rétention
 - Le procédé opératoire

Classification
selon le
**Mécanisme de
rétention**

Partage

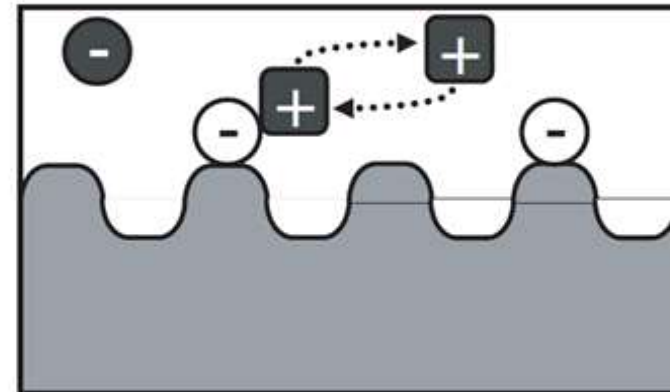
Adsorption

Exclusion

Echange d'ions

Affinité

(d) Ion-exchange



Separation based on exchange
between surface and eluents

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Classification

- Selon:
- La nature des phases stationnaires et mobiles
 - Le mécanisme de rétention
 - Le procédé opératoire

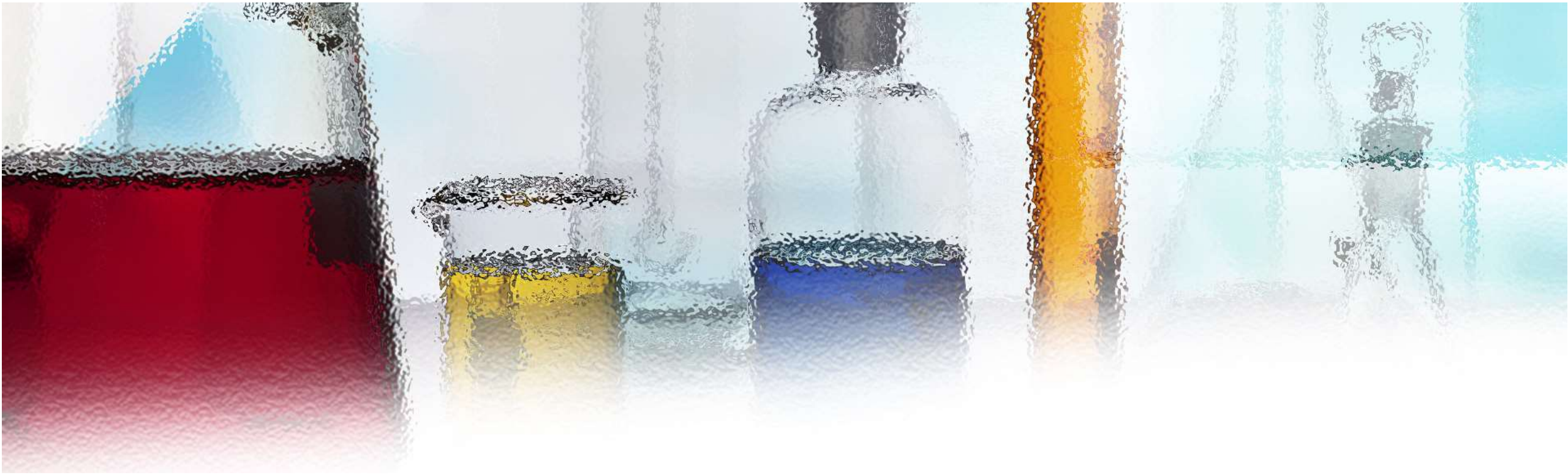
Classification selon le **Procédé opératoire**

Chromatographie sur colonne

Chromatographie
planaire

Chromatographie sur papier

Chromatographie sur couches minces (CCM)



1) CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE

Chromatographie planaire

Cette chromatographie recouvre la **chromatographie sur couches minces** (CCM) et la **chromatographie sur papier**.

- La phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie sur papier) ;
- La phase mobile est un liquide (solvant) qui se déplace par capillarité ou par gravité tout au long de la phase stationnaire.



CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Chromatographie sur papier

Principe

- Méthode qualitative couramment utilisée pour la séparation et l'identification des composés colorés.
- Repose sur la séparation des biomolécules d'un mélange sur la base du phénomène de **partage**, c'est-à-dire la différence de solubilité et donc de distribution d'une biomolécule donnée (analyte) entre la phase stationnaire et la phase mobile.



Chromatographie sur papier

Le papier (support)

- En cellulose **inerte**
- Largement **hydraté** (distribution de l'analyte entre l'eau immobilisée (phase stationnaire), et le solvant constituant la phase mobile)



Whatman No. 1 Chromatography Paper, 11-cm² Sheets



Chromatography Paper Strips

Chromatographie sur papier

Phase stationnaire

- constituée par **l'eau** elle-même adsorbée sur la cellulose du papier ou liée chimiquement à elle
- Les composés les plus solubles dans l'eau sont fortement retenus par la phase stationnaire et migrent donc lentement

Phase mobile

- souvent un **mélange de solvants organiques et de l'eau.**
- Les solvants utilisés sont plus ou moins polaires
- Le choix de la composition de la phase mobile se fait selon la polarité des composants de l'échantillon à analyser
- Ex. de solvants: méthanol, l'éthanol, l'acide éthanoïque et le propanol



Chromatographie sur papier

Méthodologie

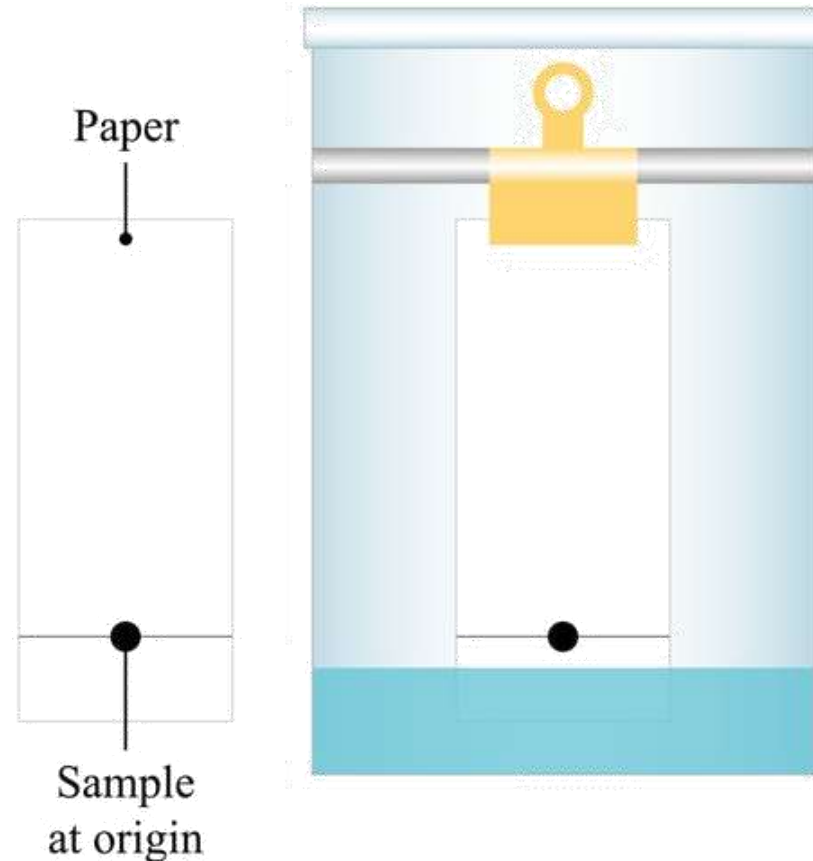
1. Dépôt de l'échantillon



Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon
- 2. Développement (élution)**



Chromatographie sur papier

Méthodologie

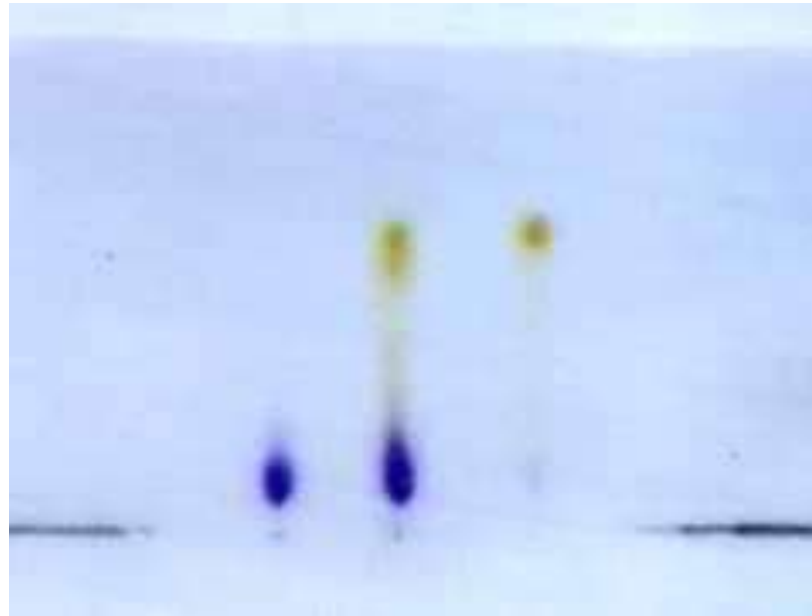
1. Dépôt de l'échantillon
- 2. Développement (élution)**



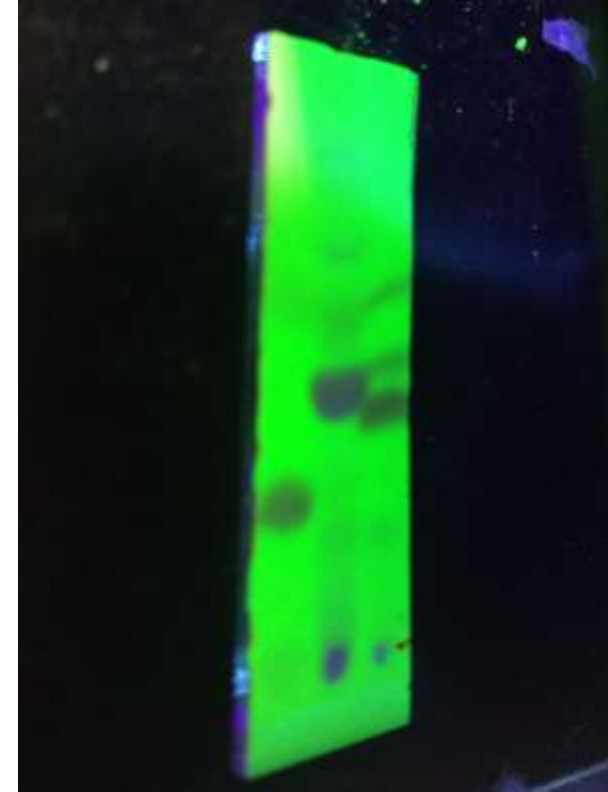
Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon
2. Développement (élution)
- 3. Révélation**



Spots visibles à l'oeil nu

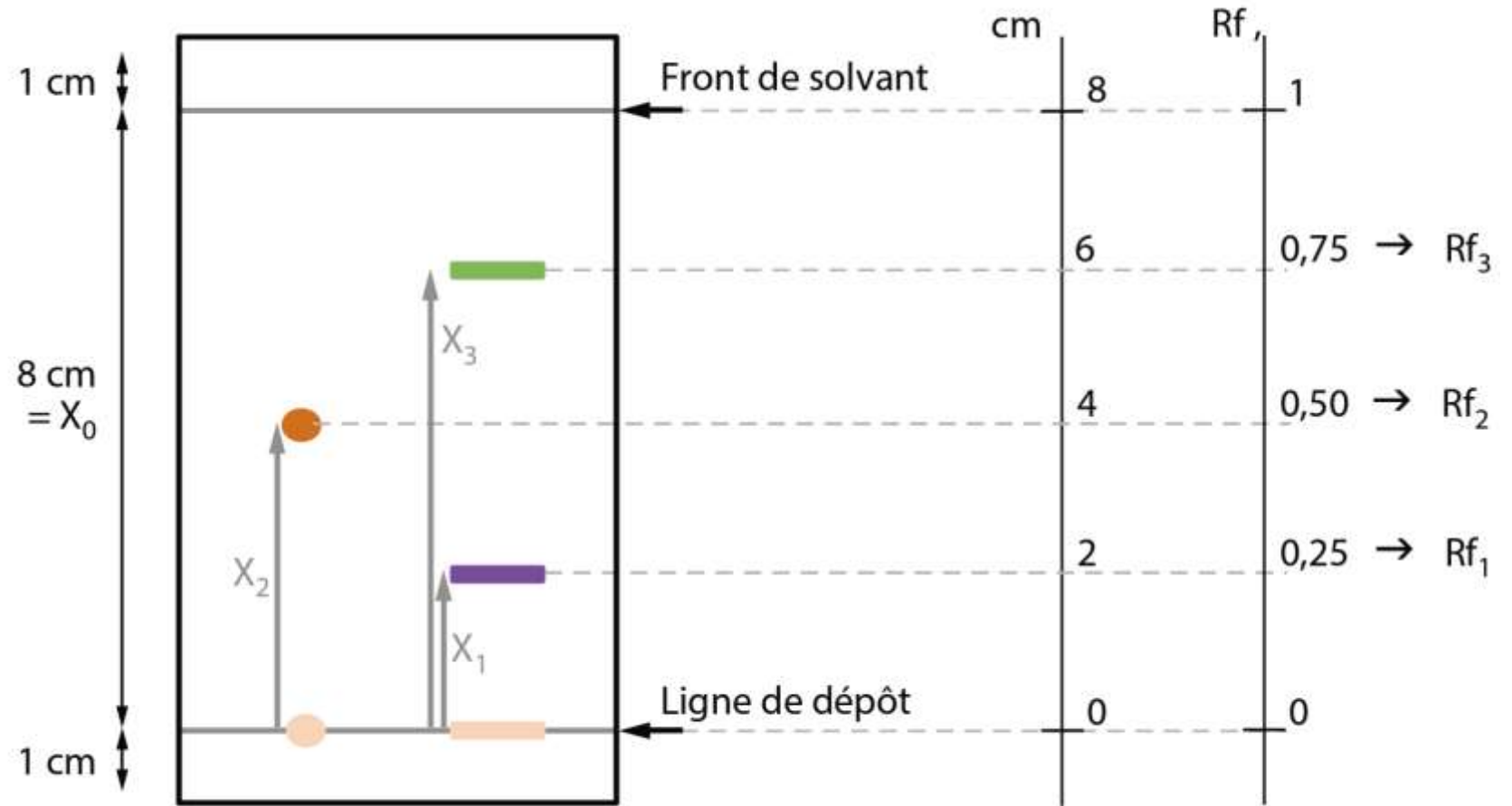


Spots visibles sous lampe UV

Chromatographie sur papier

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon
2. Développement (élution)
3. Révélation
4. **Calcul de Rf (rapport frontal)**



$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par l'échantillon (cm)}}{\text{Front du solvant (cm)}}$$

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES (CCM)

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Contexte et Principe

La chromatographie sur couches minces (CCM):

- Forme de chromatographie planaire la plus couramment utilisée
 - Emploie une approche expérimentale très similaire à la chromatographie sur papier.
- La CCM repose sur la séparation des biomolécules d'un mélange sur la base de des phénomènes **d'adsorption et/ou de partage**.
 - pour les phases stationnaires polaires : Phénomène d'adsorption prédominant ;
 - Dans le cas des phases inverses (phases stationnaires hydrophobes) : Phénomène de partage prédominant.



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

- consiste en une couche adsorbante uniforme sur une plaque souple (polymère ou aluminium) ou rigide (verre).



Silice sur plaque de verre



**PLAQUES DE SILICE SUR SUPPORT
ALUMINIUM**

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

- Les phases stationnaires adsorbantes les plus couramment rencontrées :
 - Le gel de silice ;
 - L'alumine (pas l'aluminium) ;
 - La cellulose.
- Types d'interactions entre phase stationnaire et analyte : forces électrostatiques / liaisons hydrogène.
- Epaisseur de la couche de phase stationnaire :
 - 0,2 mm (200 μm) pour une plaque analytique
 - 1-3 mm pour une plaque préparative



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

► Silice vierge (ou gel de silice)

La silice vierge est un polymère réticulé de dioxyde de silicium hydraté ($\text{SiO}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$). Le cœur des grains de silice est composé de groupements siloxanes (-Si-O-Si-). La surface est recouverte de **groupements silanols** (alcool libre, SiOH). Certains groupements silanols sont **reliés entre eux** par des liaisons hydrogènes ou d'autres peuvent être **hydratés**.

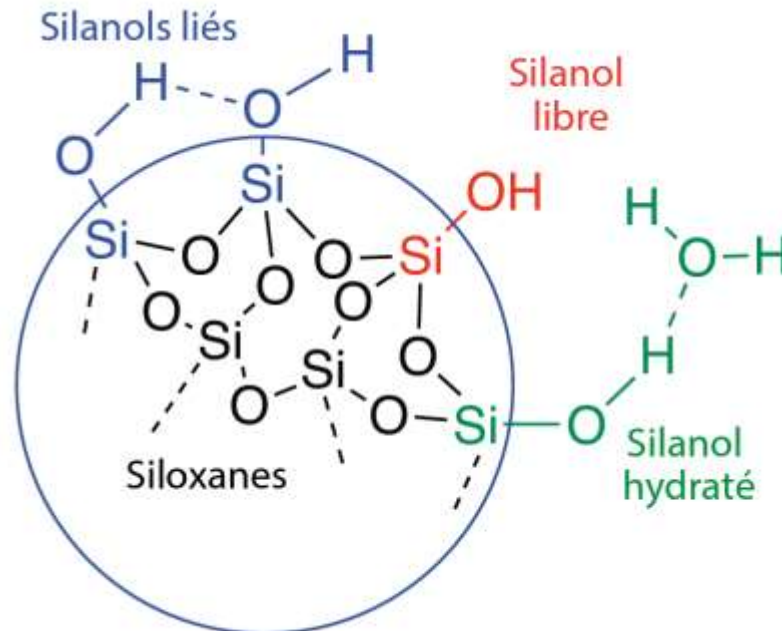


Schéma d'un grain de silice vierge

Ce sont les groupements silanols qui confèrent à la silice son caractère polaire mais également un caractère acide, qui peut entraîner des réactions parasites (dégradation des composés).

La silice est le support de base en chromatographie. Elle peut être utilisée directement comme phase stationnaire (support le plus courant en chromatographie sur colonne et en CCM) ou les groupements silanols peuvent être fonctionnalisés pour donner des silices greffées

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase stationnaire

▶ Alumine (ou oxyde d'aluminium)

L'alumine est composée d'oxyde d'aluminium hydraté ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_n$).

La surface des grains est recouverte de groupements hydroxyles, d'aluminoxanes (Al-O-Al), de cations Al^+ ou d'oxydes anions AlO^- . Cela conduit à trois formes d'alumine en fonction du pH : alumine acide (pH 4-4,5), neutre (pH 7-8) ou basique (pH 9-10).

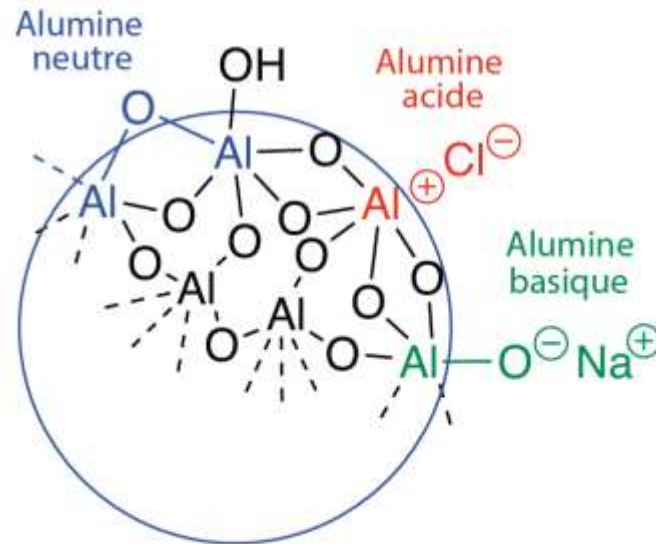


Schéma d'un grain d'alumine

Avantage : les différentes formes d'alumine disponibles en fonction du pH permettent d'adapter la phase stationnaire aux composés à analyser possédant des fonctions sensibles au pH.

L'alumine (sous ses trois formes) est un support classique en CCM.

La rétention sur alumine est similaire à celle sur silice.

Exemple d'application

Purification sur alumine neutre de composés possédant une fonction protonable sur silice vierge.

Chromatographie sur couches minces (CCM)

Phase mobile

- Constituée d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants.
- Choix du solvant : en fonction de la polarité des constituants de l'échantillon.
- Solvants les plus courants : l'hexane, l'acétone et l'alcool.

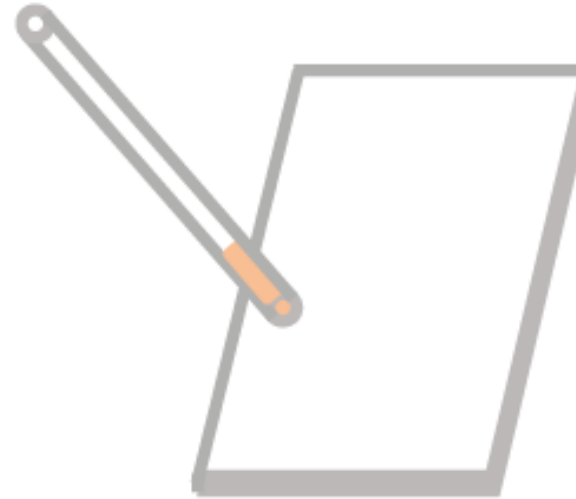


Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

1. Dépôt de l'échantillon

- Le **dépôt** des échantillons peut être réalisé sous forme de points ou de bandes. Les dépôts sont faits manuellement à l'aide d'un capillaire, d'une pipette ou d'une seringue sur la **phase stationnaire**.

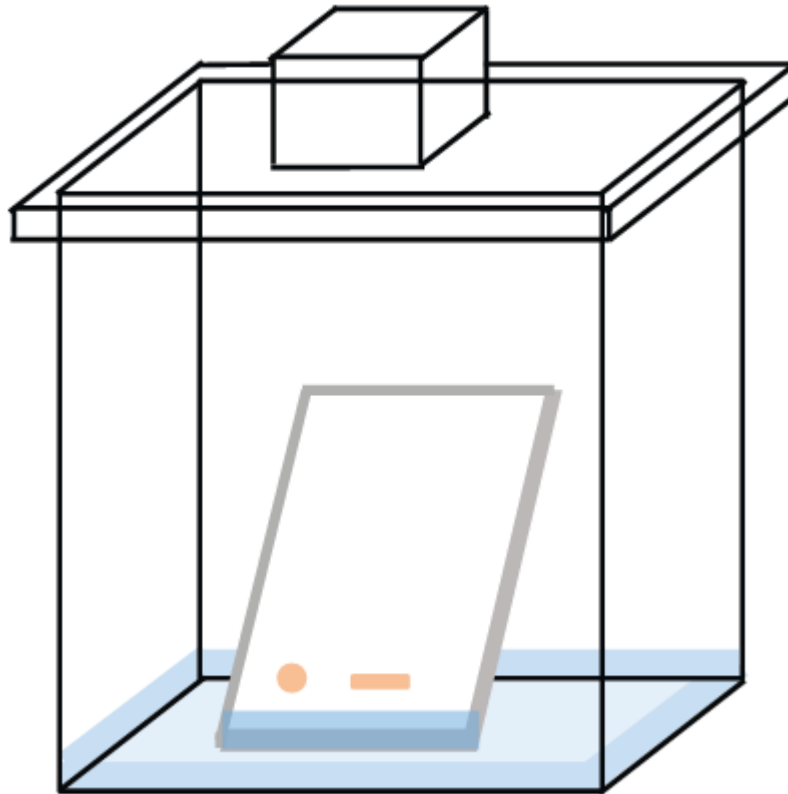


Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

- L'**élution** est réalisée dans une **cuve de migration** qui contient une **solution d'élution** = phase mobile

2. Développement (élution)



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie

- La **visualisation** de la plaque peut être effectuée directement à l'œil nu dans le cas de composés visibles et/ou à l'aide d'une lampe UV (pour les composés capables d'absorber ou d'émettre de la fluorescence à 254 nm ou 365 nm).



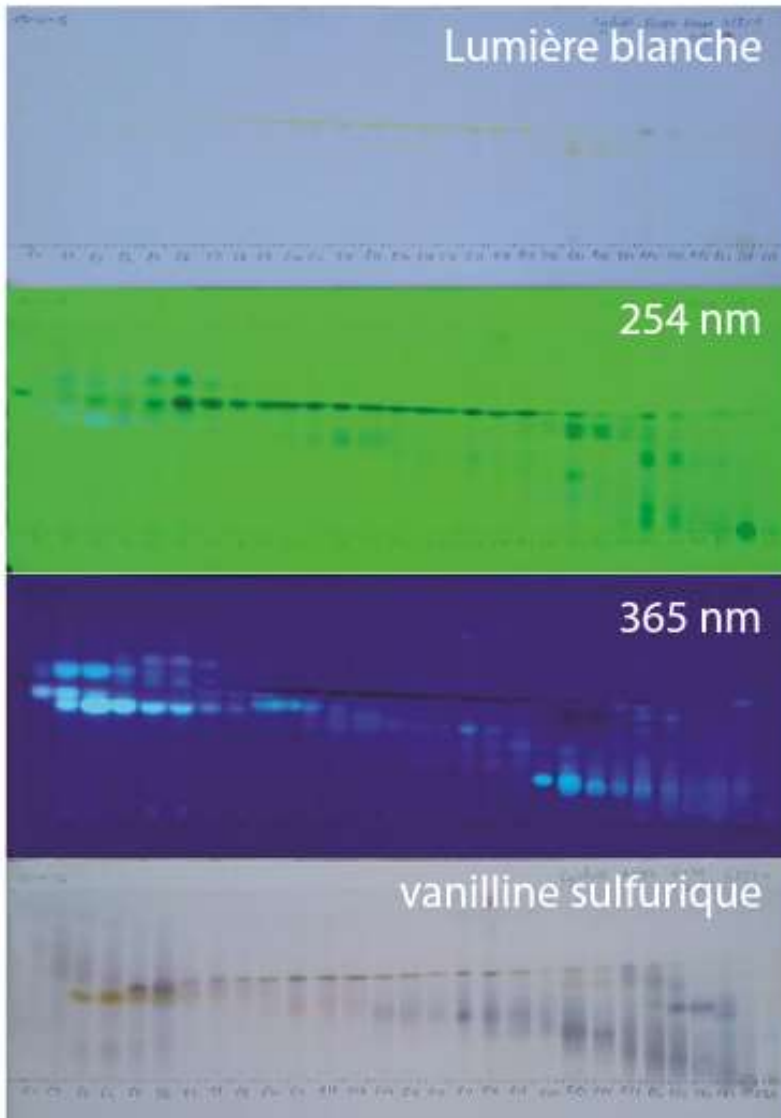
Exemples de quelques révélateurs chimiques

Révélateurs	Réactifs	Molécules ciblées	Visualisation	Couleur de révélation
Molisch	alpha naphthol éthanolique + solution d'acide sulfurique	sucres	lumière blanche	violet
Ninhydrine	ninhydrine	acides aminés	lumière blanche	rouge, jaune
Neu	diphénylborate d'aminoéthanol	polyphénols	UV 365 nm	jaune, vert, bleu
Dragendorff	iodobismuthate de potassium	alcaloïdes	lumière blanche	orange
Vanilline	solution éthanolique de vanilline et d'acide sulfurique	non spécifique	lumière blanche	variable selon les molécules

3. Révélation

Chromatographie sur couches minces (CCM)

▶ Exemple de visualisation d'une plaque CCM selon différents moyens de détection



Peu de composés visibles

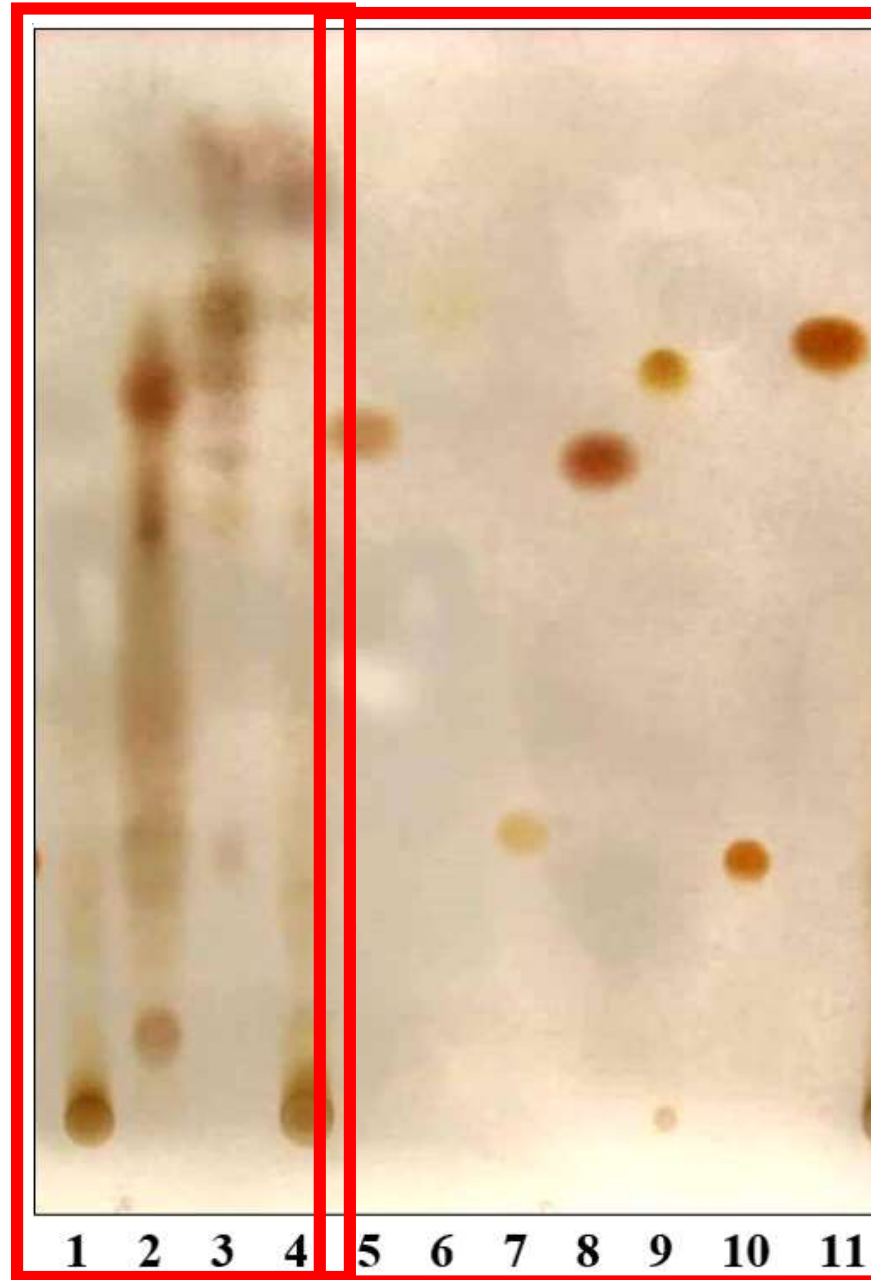
Les plaques « F254 » possèdent dans leur phase stationnaire un indicateur de fluorescence vert (parfois bleu) permettant de visualiser les substances qui absorbent dans l'UV à 254 nm (absorbance caractéristique des noyaux aromatiques). Celles-ci apparaissent en sombre sur le fond fluorescent.

Les molécules fluorescentes sont visibles à 365 nm sur fond sombre.

Révélation chimique non spécifique de l'ensemble des composés présents sur la plaque.

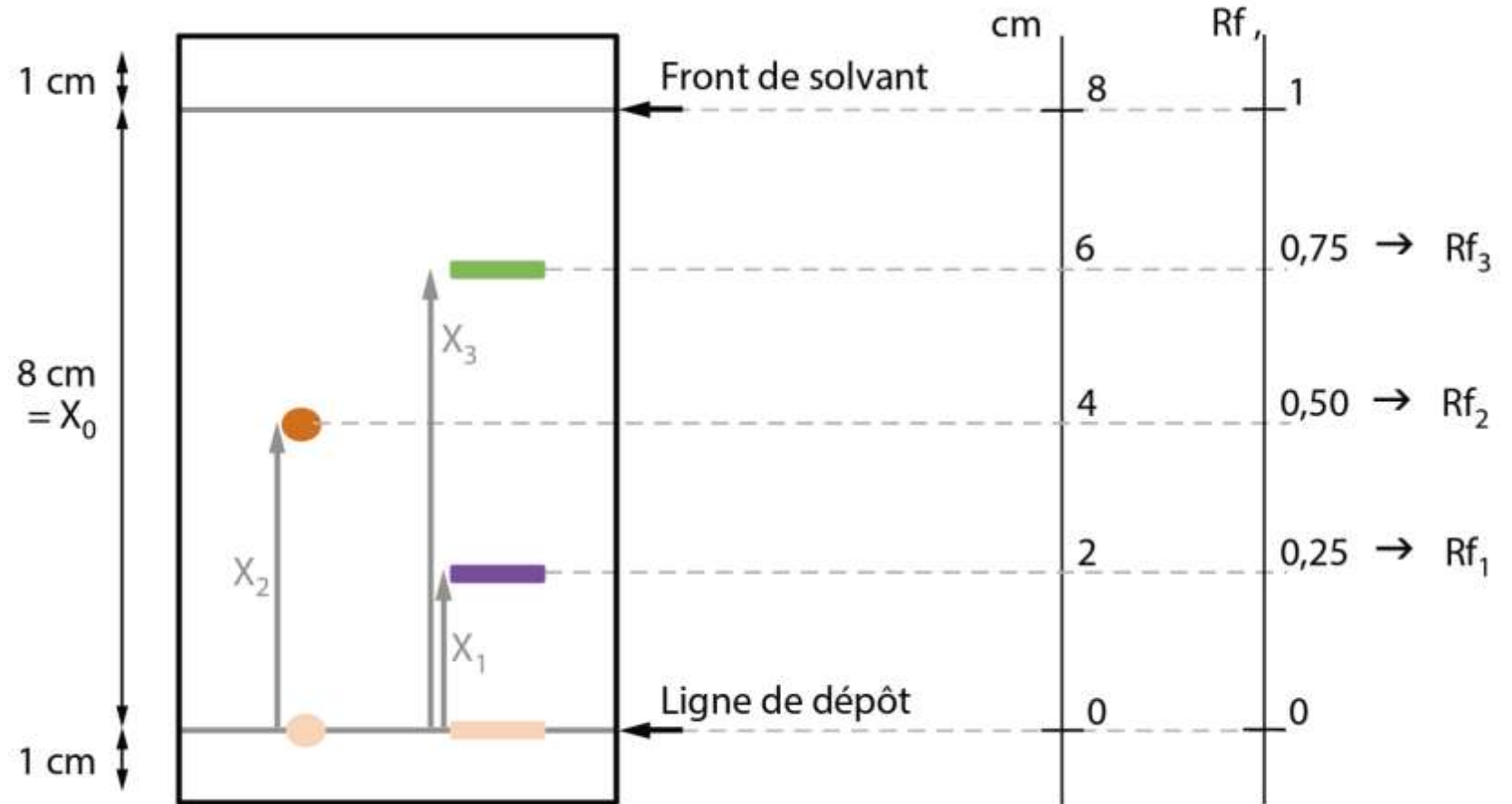
Exemple de CCM : Chromatographie sur couches minces d'extraits végétaux.

- **De 1 à 4** : Extraits végétaux ;
- **De 5 à 11** : témoins de composés phénoliques:
 - 5** : Acide gallique
 - 6** : Flavone
 - 7** : Naringine
 - 8** : Catéchine
 - 9** : Morine
 - 10** : Rutine
 - 11** : Quercétine.



Chromatographie sur couches minces (CCM)

Méthodologie



4. Calcul de Rf


$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par l'échantillon (cm)}}{\text{Front du solvant (cm)}}$$

Chromatographie sur couches minces (CCM)

- Domaines d'application : chimie, biochimie, agroalimentaire, environnement, pharmaceutique, clinique, toxicologie, médecine légale...etc.
- Analyse de diverses substances : lipides, acides organiques, carbohydrates, peptides, phénols, colorants naturels et synthétiques, vitamines...etc.
- La CCM peut être appliquées à des fins **analytiques** (qualitatives ou semi-quantitatives), ou **préparatives**.



Chromatographie sur couches minces (CCM)

- 
- **CCM analytique** : permet l'identification de composés par comparaison à un produit de référence déposé sur la même plaque.
 - permet aussi d'avoir un premier aperçu du contenu moléculaire d'un échantillon avant l'utilisation de méthodes de caractérisation plus poussées (criblage ou screening)
 - **CCM préparative** : permet la purification des molécules.

Exemple de CCM analytique : Chromatographie sur couches minces d'extraits végétaux.

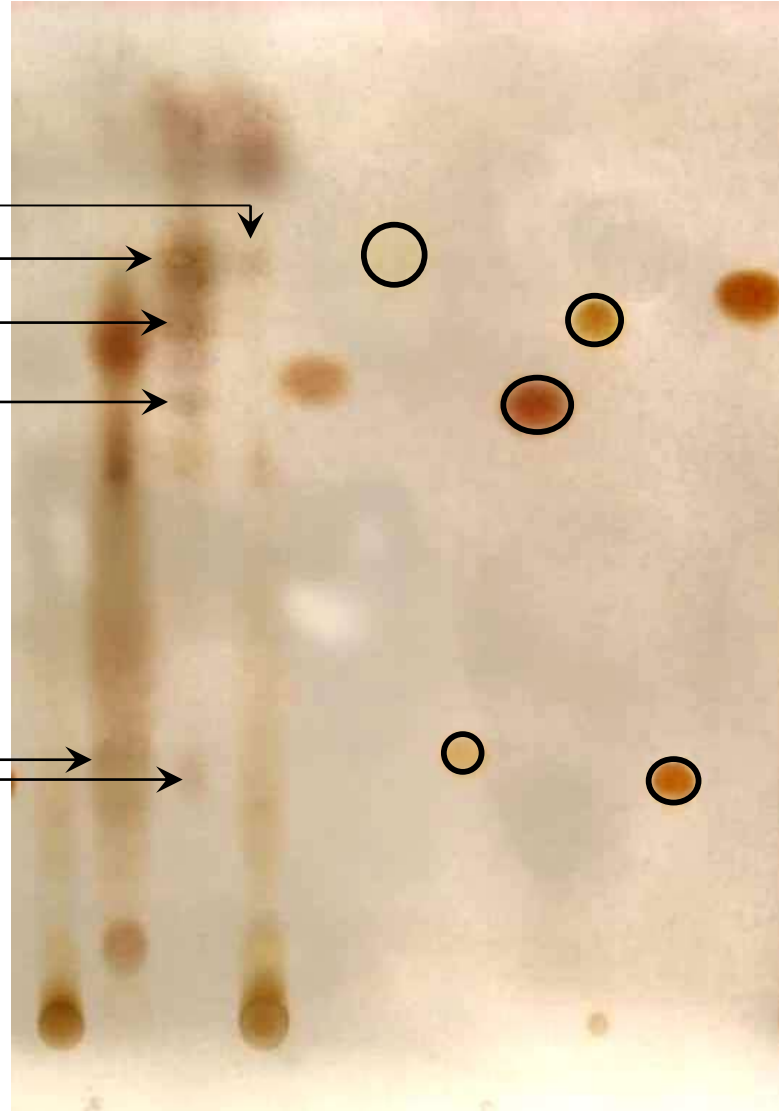
Br4 et Ch6 ≡ Flavone
Rf = 0.62

Ch5 ≡ Morine
Rf = 0.57

Ch3 ≡ Catéchine
Rf = 0.51

Ac3 ≡ Naringine
Rf = 0.22

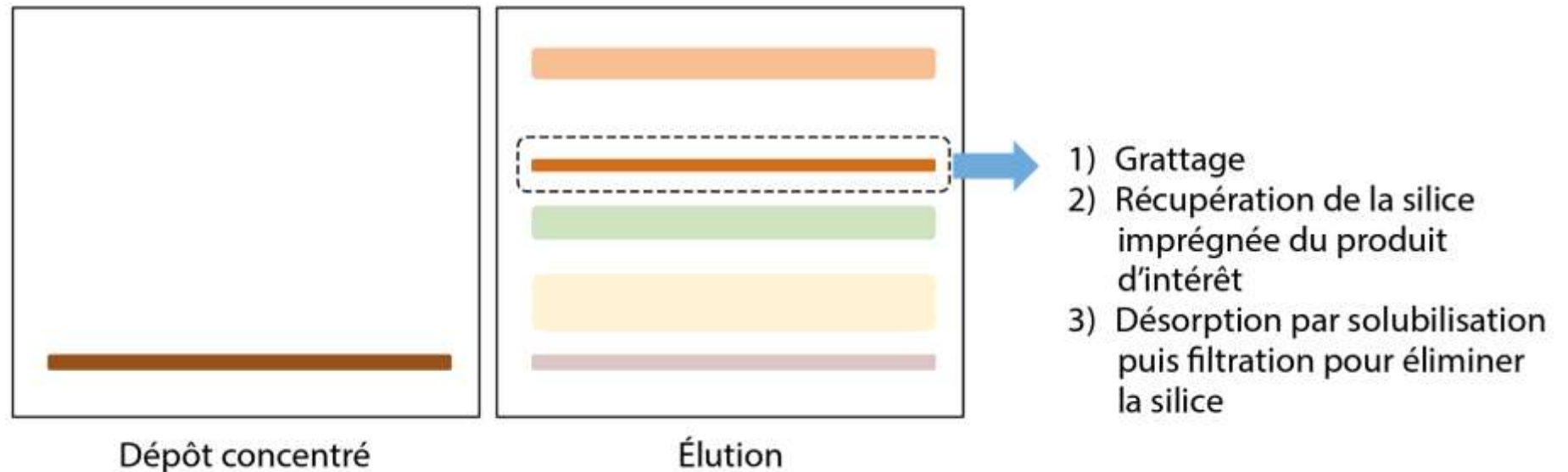
Ch1 ≡ Rutine
Rf = 0.197



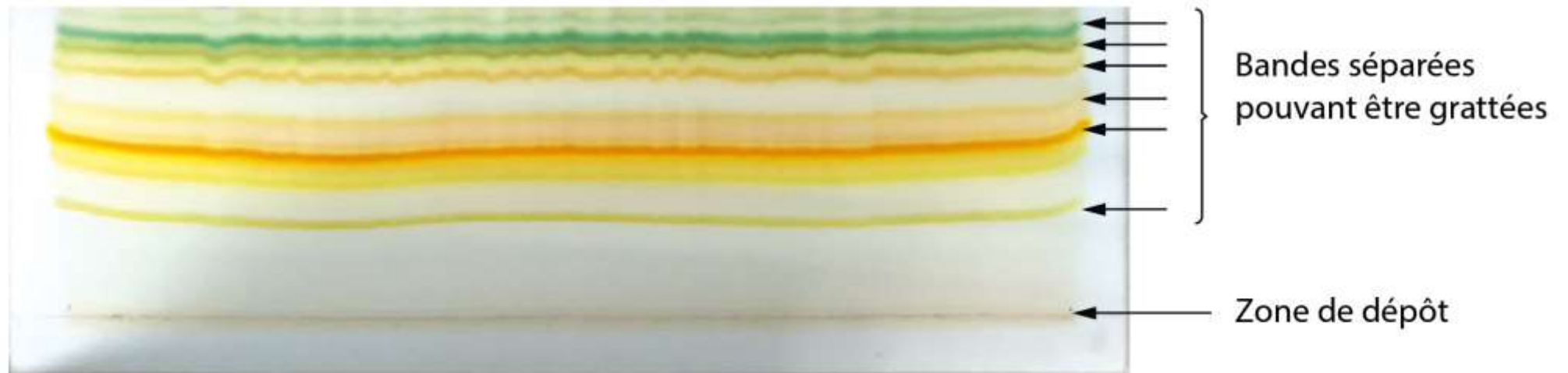
LA CCM PRÉPARATIVE

CCM préparative

- Utilisées pour la **Purification** de molécules
- Consiste à déposer une grande quantité d'extrait sur toute la largeur de la plaque et à faire migrer celle-ci avec un système d'élution optimisé au préalable.
- Cela permet de séparer la/les bande(s) d'intérêt par grattage de la silice et désorption dans un solvant approprié



CCM préparative



Fractionnement d'un extrait de plante par CCM préparative



CCM préparative

Caractéristiques des plaques adaptées pour réaliser une CCM préparative :

- dimension de la plaque : 20 x 20 cm ;
- migration sur plaque entière (environ 15cm) ;
- épaisseur de phase stationnaire 0.5, 1 ou 2mm.

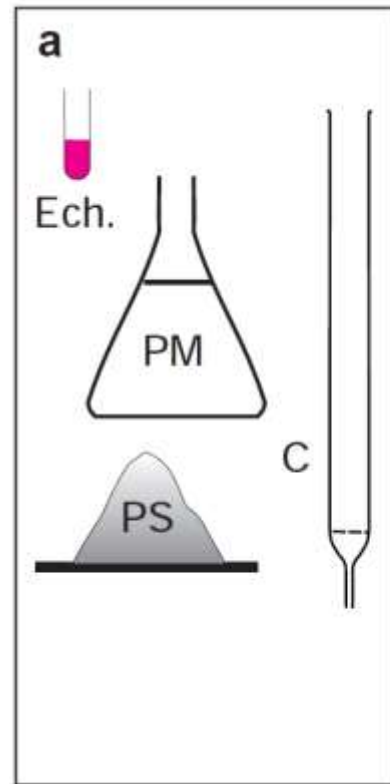




2) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Chromatographie sur colonne

La phase stationnaire est confinée dans un tube en verre ou en plastique et la phase mobile (un solvant ou un tampon) peut s'écouler à travers la phase stationnaire.



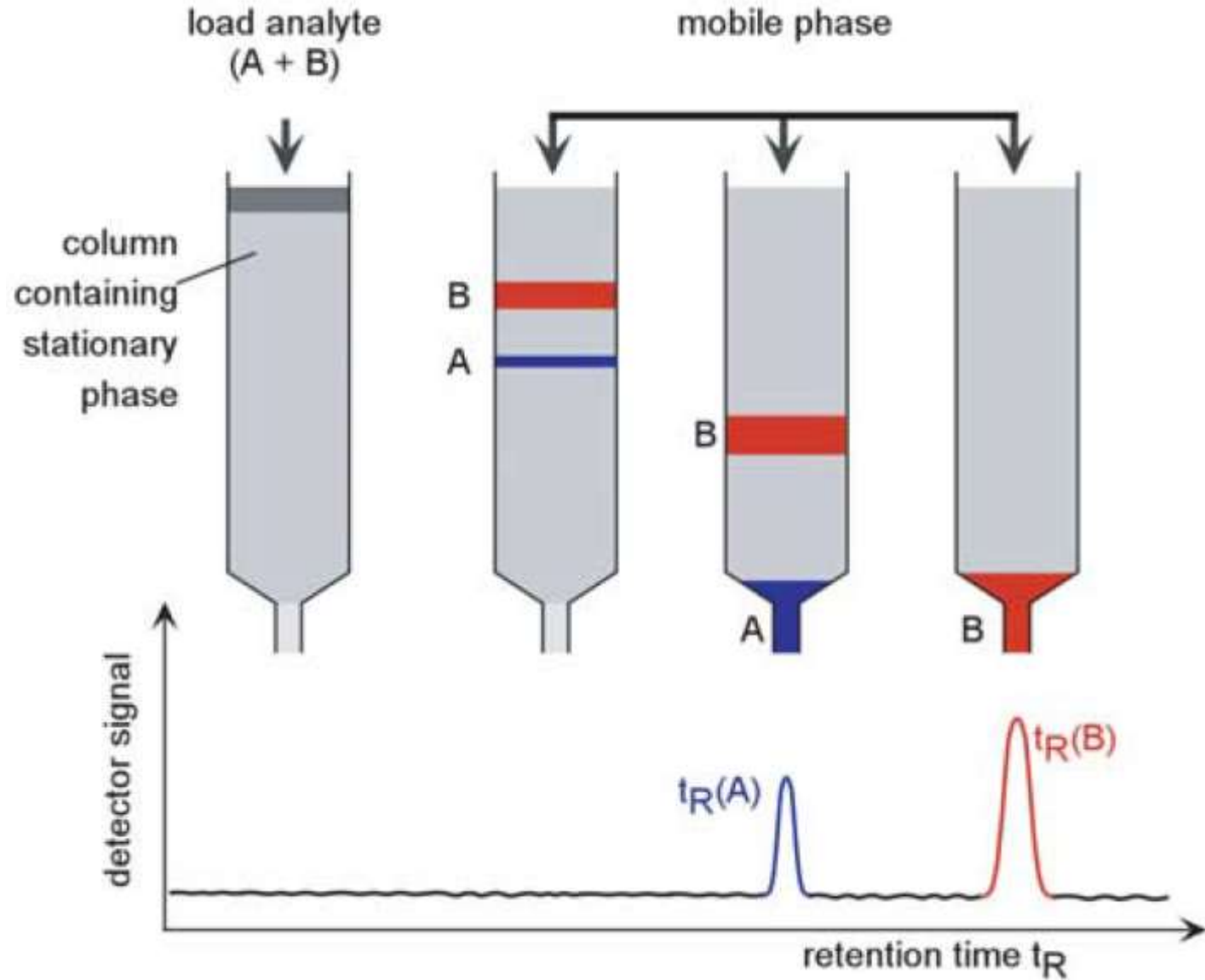
Chromatographie sur colonne

Chaque composant de l'échantillon est élué de la phase stationnaire à un moment précis, appelé "**Temps de rétention**".

Lorsque les composants traversent le détecteur, leur signal est enregistré et tracé sous la forme d'un chromatogramme.

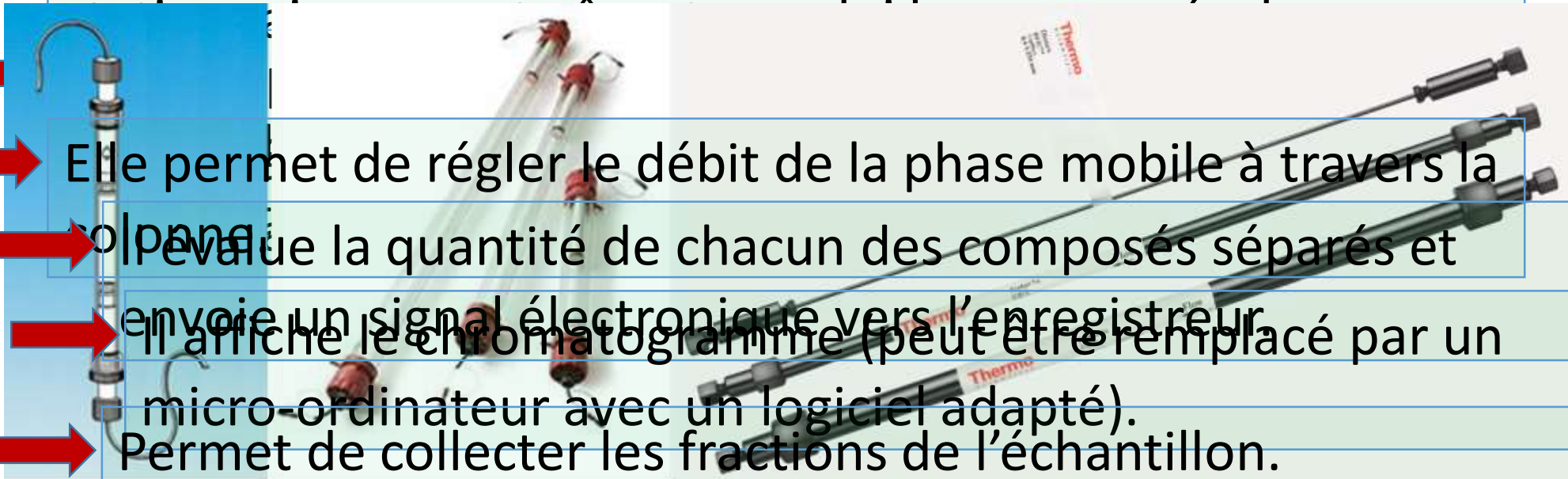


Chromatographie sur colonne



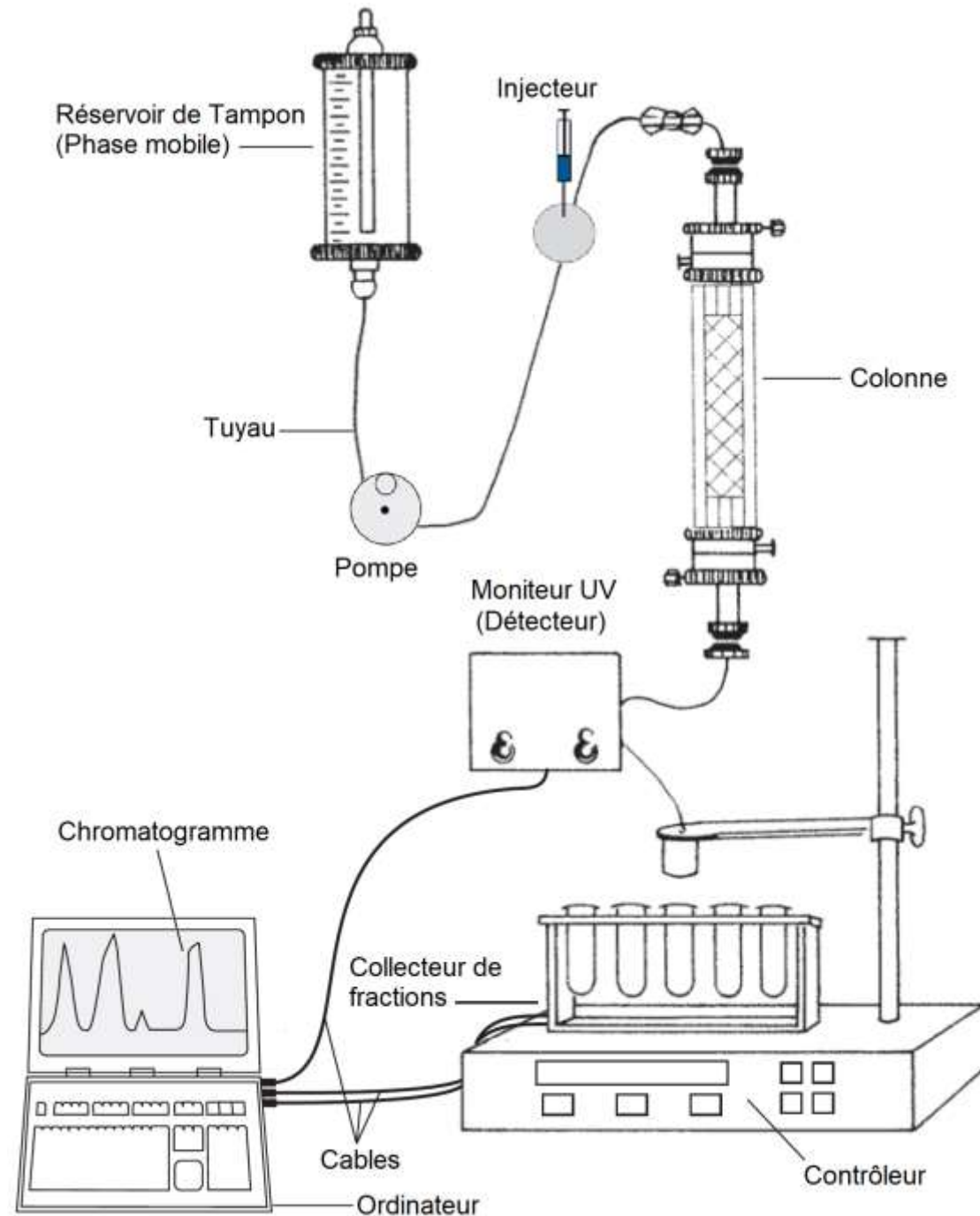
Éléments chromatographiques

1. L'échantillon → C'est la solution qui contient les composés à analyser.
2. La phase stationnaire → C'est un gel constitué de granules qui se trouve dans une colonne. Les granules peuvent être : poreuses, porter une charge ionique ou un site d'affinité.
3. La phase mobile → C'est un liquide qui se déplace à travers la phase stationnaire.
4. La colonne →
5. La pompe → Elle permet de régler le débit de la phase mobile à travers la colonne.
6. Le détecteur → Il évalue la quantité de chacun des composés séparés et envoie un signal électronique vers l'enregistreur.
7. L'enregistreur → Il affiche le chromatogramme (peut être remplacé par un micro-ordinateur avec un logiciel adapté).
8. Le collecteur de fractions → Permet de collecter les fractions de l'échantillon.



Éléments chromatographiques

1. L'échantillon
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile
4. La colonne
5. La pompe
6. Le détecteur
7. L'enregistreur
8. Le collecteur de fractions



Mode opératoire

1. Préparer le gel.
2. Remplir la colonne.
3. Equilibrer la colonne.
4. Injecter l'échantillon.
5. Effectuer l'élution.
6. Récupérer les fractions.
7. Analyser le chromatogramme.
8. Régénérer le gel.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE

Synonymes :

Chromatographie d'exclusion moléculaire; Filtration sur gel; Perméation sur gel; Tamisage moléculaire.

Chromatographie d'exclusion stérique

Principe

La chromatographie d'exclusion stérique est utilisée pour désigner la séparation des molécules de tailles différentes en raison de leur pénétration dans les pores, remplis de solvant, d'une phase stationnaire appropriée.

- La phase stationnaire (le gel): Un solide granuleux inerte et poreux
- La dimension des pores est voisine de celle de certaines molécules à séparer

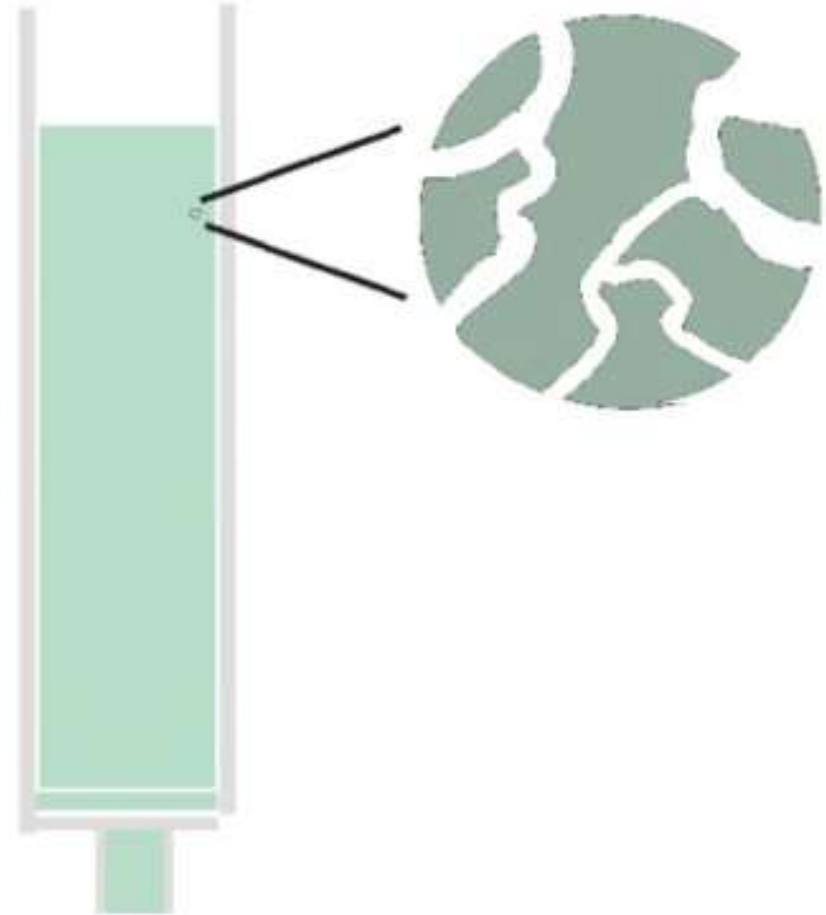


Chromatographie d'exclusion stérique

Principe

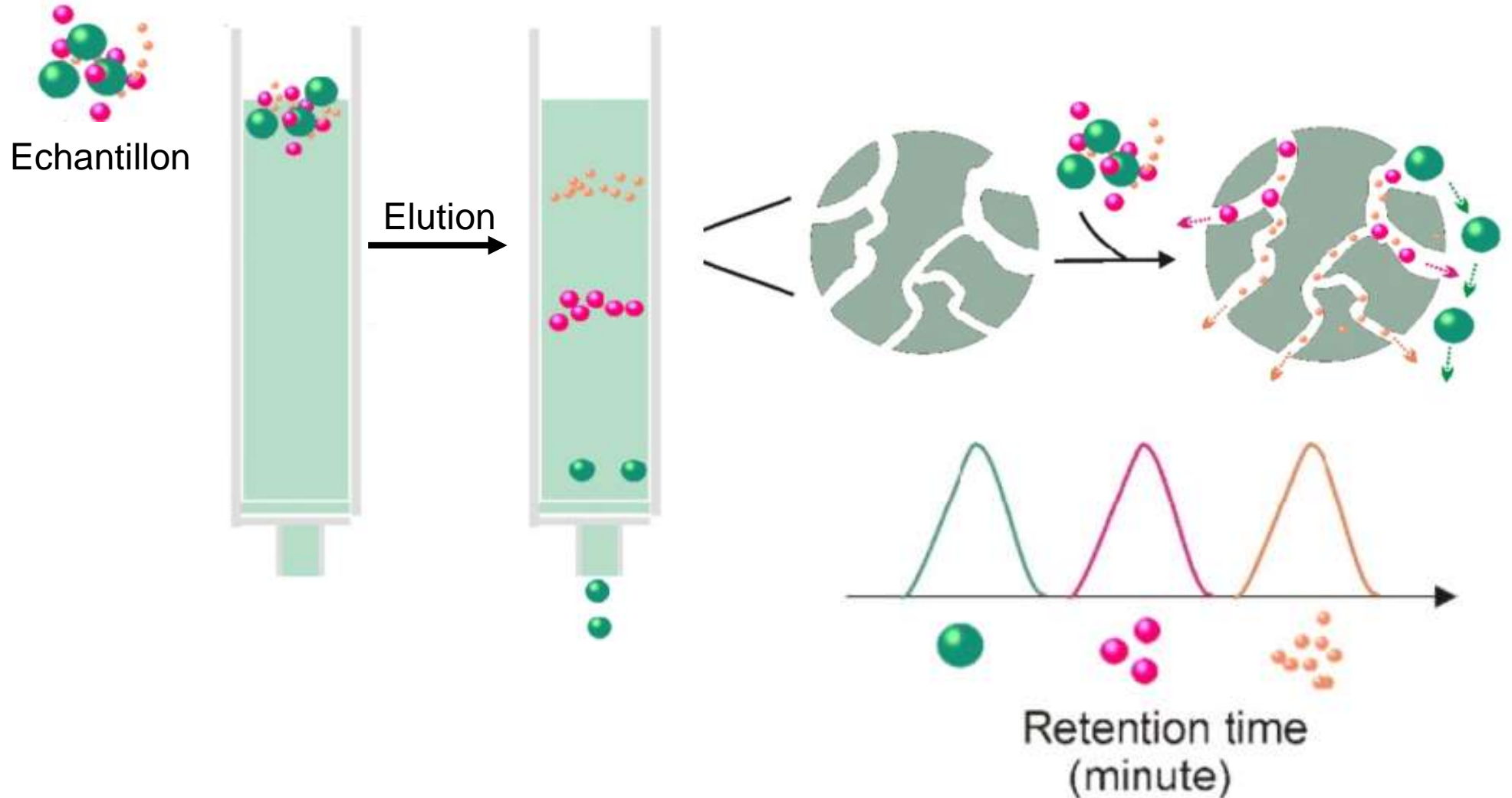


Colonne remplie
de gel



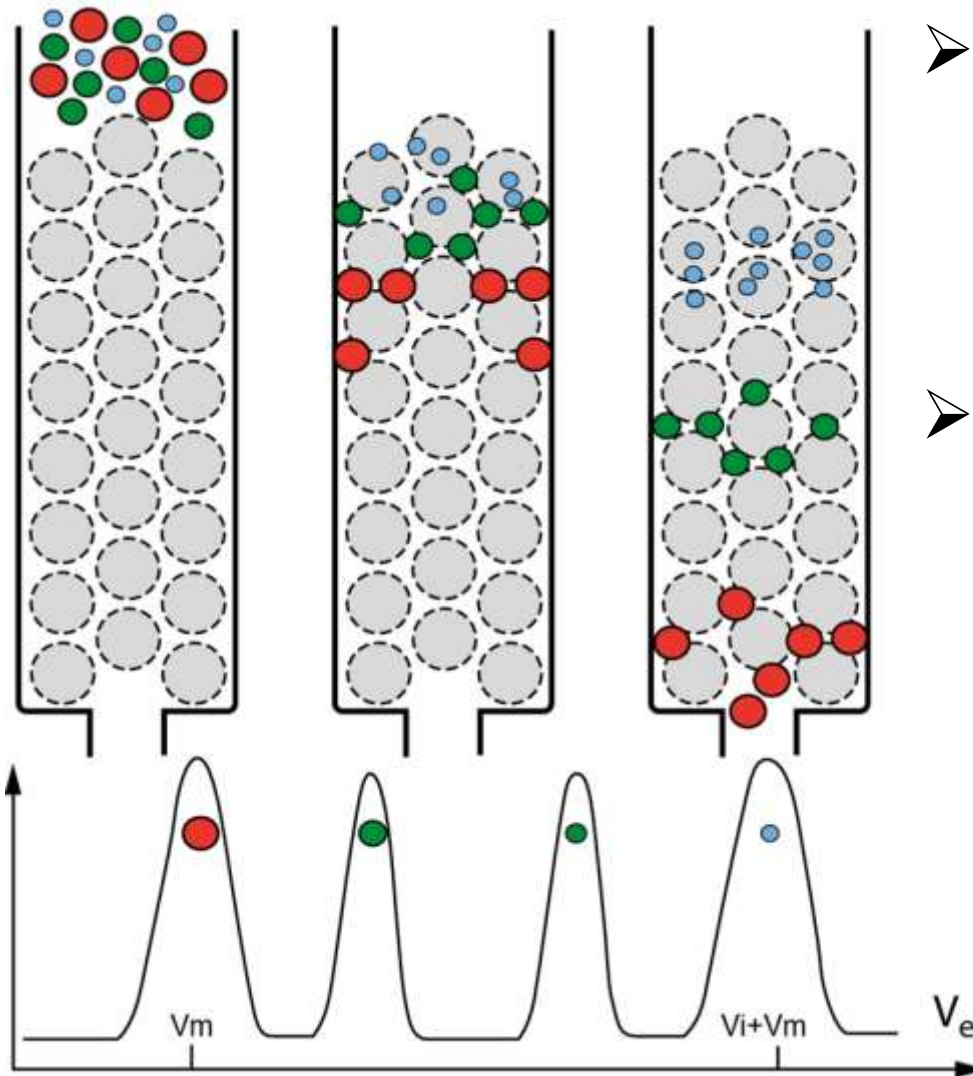
Chromatographie d'exclusion stérique

Principe



Chromatographie d'exclusion stérique

Principe



- Les grosses molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et donc élués en premier.
- Les petites molécules et les molécules de taille moyenne pénètrent dans les pores du gel --> leur migration est retardée --> sont donc éluées plus tardivement

Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

1. L'inertie chimique
2. La stabilité physico-chimique
3. La nature chimique
4. Le diamètre des pores (la porosité)
5. La taille et la forme des particules (Granulométrie)
6. La consistance



Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

1. L'inertie chimique

- Le gel ne doit pas réagir avec la phase mobile.
 - Le gel ne doit pas réagir avec l'échantillon
- => Donc il doit être inerte chimiquement vis-à-vis des composés de l'échantillon et de la phase mobile



Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

2. La stabilité physico-chimique

- Le gel doit être résistant aux conditions de l'expérience (température , pression ...)



Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

3. La nature chimique

- Dextran
- Polyacrylamide
- Agarose



Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

4. Le diamètre des pores (la porosité)

- Il détermine le pouvoir de séparation
- La porosité du gel est choisie en fonction du poids moléculaire des biomolécules présents dans l'échantillon
- Chaque gel a un intervalle de séparation caractéristique
- Le gel agit comme un tamis moléculaire, retenant les molécules jusqu'à la limite d'exclusion et permettant à celles qui dépassent cette limite (molécules plus grosses) de passer facilement.



Chromatographie d'exclusion stérique



Gel	Fractionation range (Da)
-----	--------------------------

Dextran (Sephadex)

Example	G-10	<700
	G-50	1500–30 000
	G-200	5000–600 000

Agarose (Sepharose)

Example	6B	10 000–4 000 000
	4B	60 000–20 000 000
	2B	70 000–40 000 000

Polyacrylamide (Biogel)

Example	P-2	100–1800
	P-100	5000–100 000
	P-300	60 000–400 000

Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

5. La taille et la forme des particules (Granulométrie)

- Les particules du gel sont petites de granulométrie de 40 à 300 μm en chromatographie classique et de 20 à 80 μm en haute performance
- La forme est sphérique, ce qui assure un écoulement uniforme de la phase mobile



Chromatographie d'exclusion stérique

La phase stationnaire

Le gel de ce type de chromatographie est caractérisé par:

6. La consistance

- Elle varie selon la nature et le degré de réticulation des gels



Chromatographie d'exclusion stérique

Mode opératoire

1. Choix du gel → Il dépend du poids moléculaire des composés à séparer
2. Choix de la phase mobile → Le pH et la force ionique de la phase mobile dépendent de la nature des composés de l'échantillon. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire
3. Préparation du gel → Il existe des gels prêts à l'emploi et des gels qui nécessitent un gonflement par l'eau
4. Remplissage de la colonne avec la phase stationnaire.
5. Equilibration de la colonne → C'est le lavage de la colonne avec la phase mobile (3 fois).
6. Injection de l'échantillon.
7. Elution → Elle se fait avec la phase mobile qui se déplace le long de la phase stationnaire avec un débit bien déterminé. L'ordre d'élution est selon le poids moléculaire des composés de l'échantillon (les molécules les plus grosses sont éluées en premier, les plus petites en dernier)
8. Collection des fractions et l'analyse du chromatogramme.

Théorie de la chromatographie d'exclusion stérique

On considère une colonne de volume total V_t remplie d'un gel solvaté :

$$V_t = V_m + V_i + V_g$$

$V_0 = V_m$ = Volume mort : volume d'eau externe aux granules

V_i = Volume d'eau interne aux granules

V_g = Volume du gel

Volume totale de la colonne (il est mesuré en remplissant la colonne d'eau)



Théorie de la chromatographie d'exclusion stérique

Un soluté est distribué dans l'eau interne et l'eau externe selon un coefficient de distribution : **K**

$$K = \frac{V_e - V_m}{V_i}$$

V_e : Volume d'élution du soluté

V_m : Volume mort (il est déterminé en mesurant le V_e d'une substance totalement exclue)

V_i : Volume d'eau interne aux granules

L'expression générale qui relie le volume d'élution d'un soluté à son coefficient de distribution est :

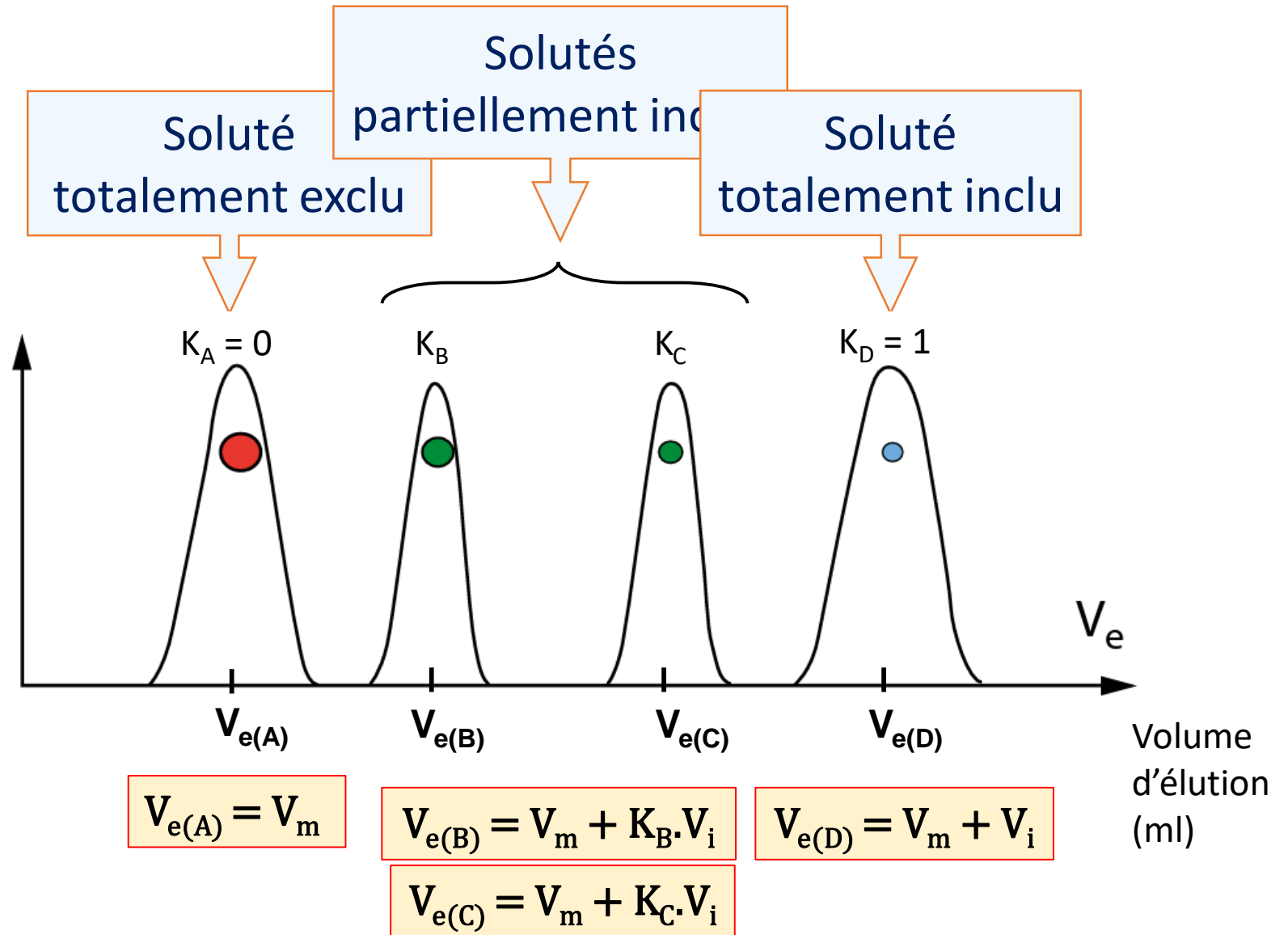
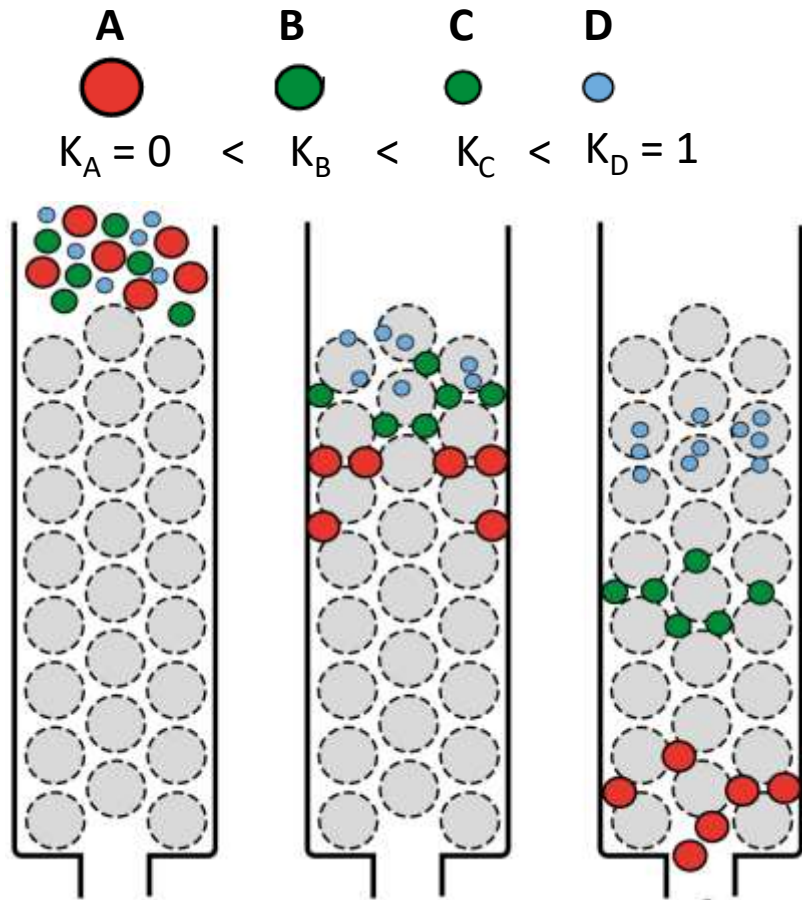
$$V_e = V_m + K \cdot V_i$$



Théorie de la chromatographie d'exclusion stérique

$$V_e = V_m + K \cdot V_i$$

Soit un mélange de molécules de tailles différentes, avec des K allant de 0 à 1:



Chromatographie d'exclusion stérique

Applications

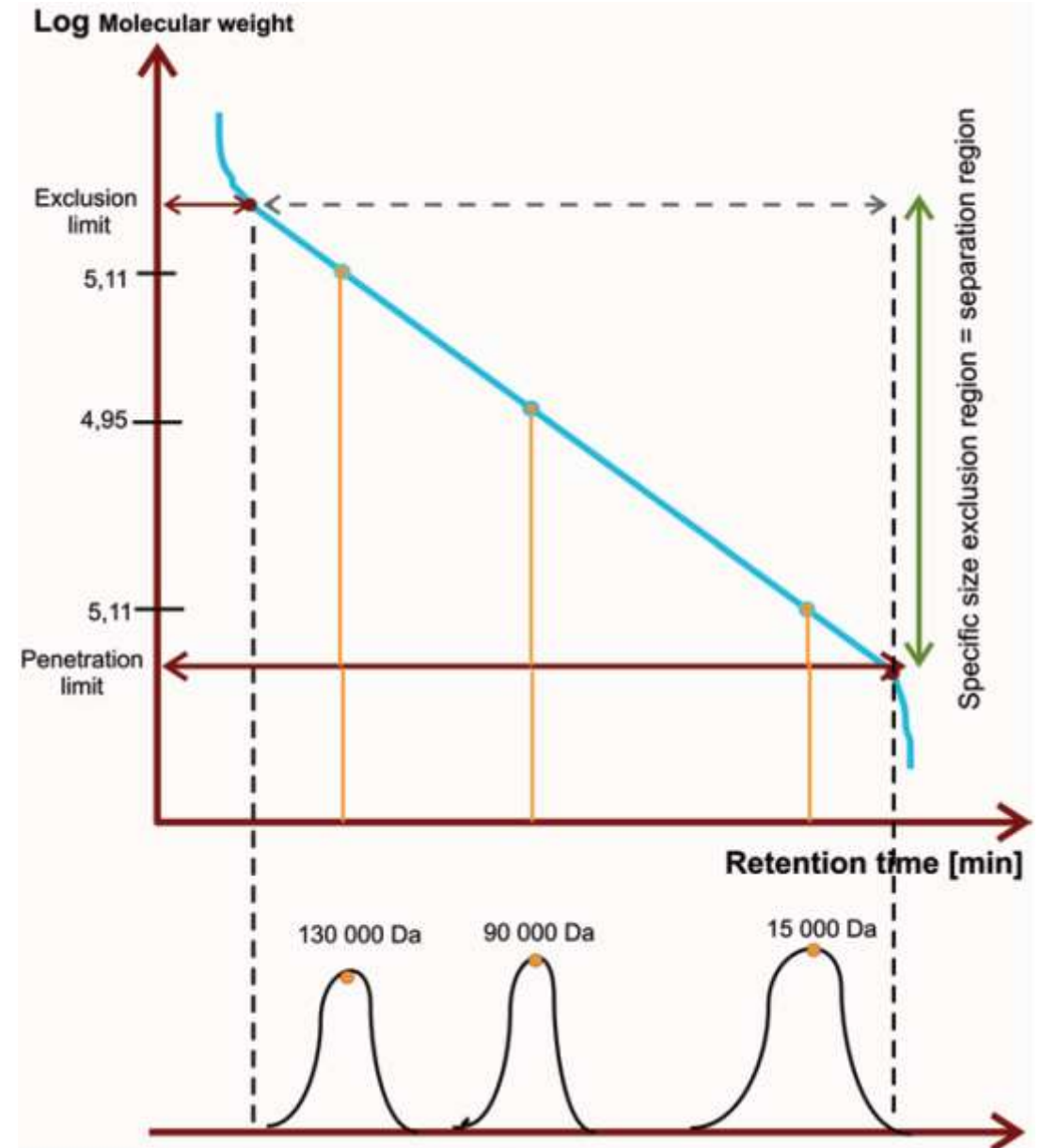
1. Détermination du poids moléculaire des molécules de l'échantillon
2. Purification de biomolécules
3. Dessalage
4. Séparation de petites molécules et de macromolécules pour autres fins
5. Concentration des solutions



Chromatographie d'exclusion stérique

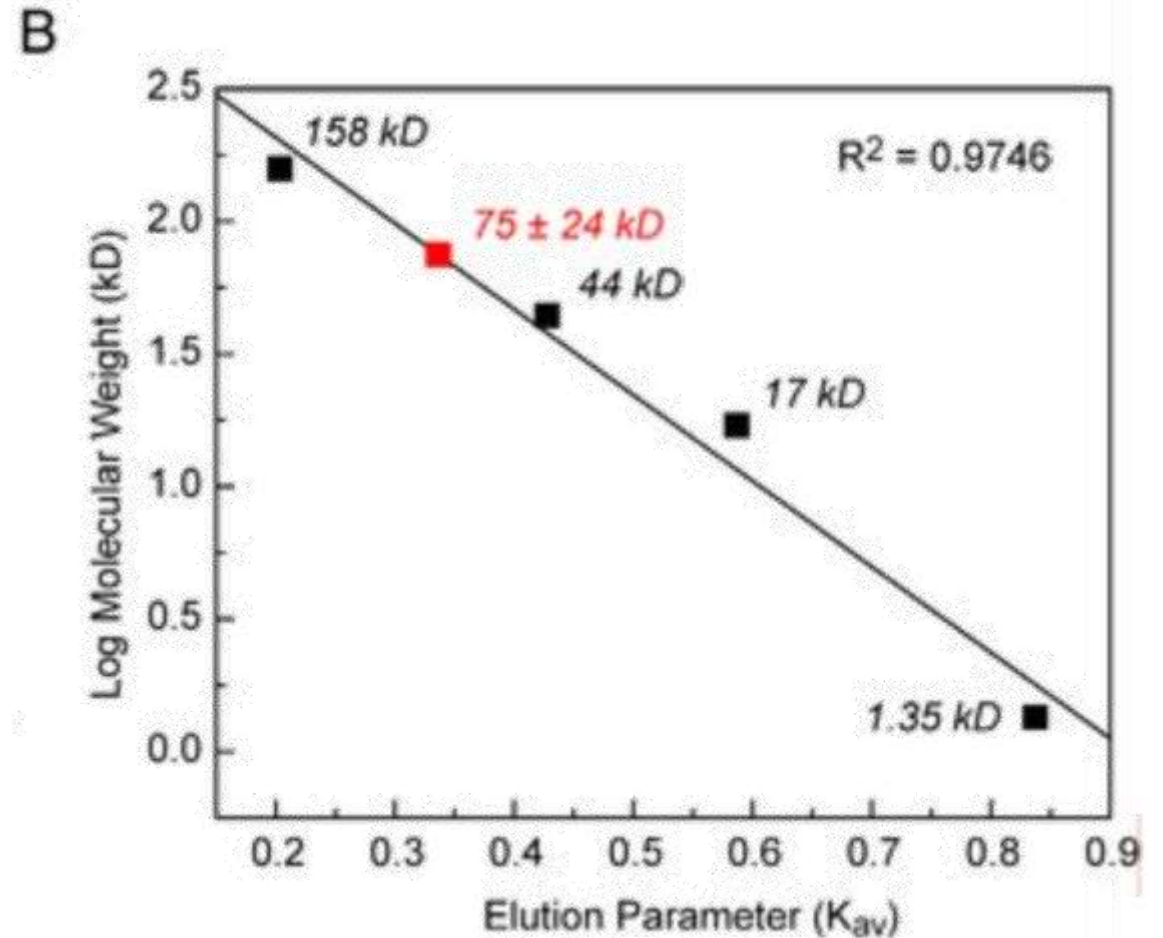
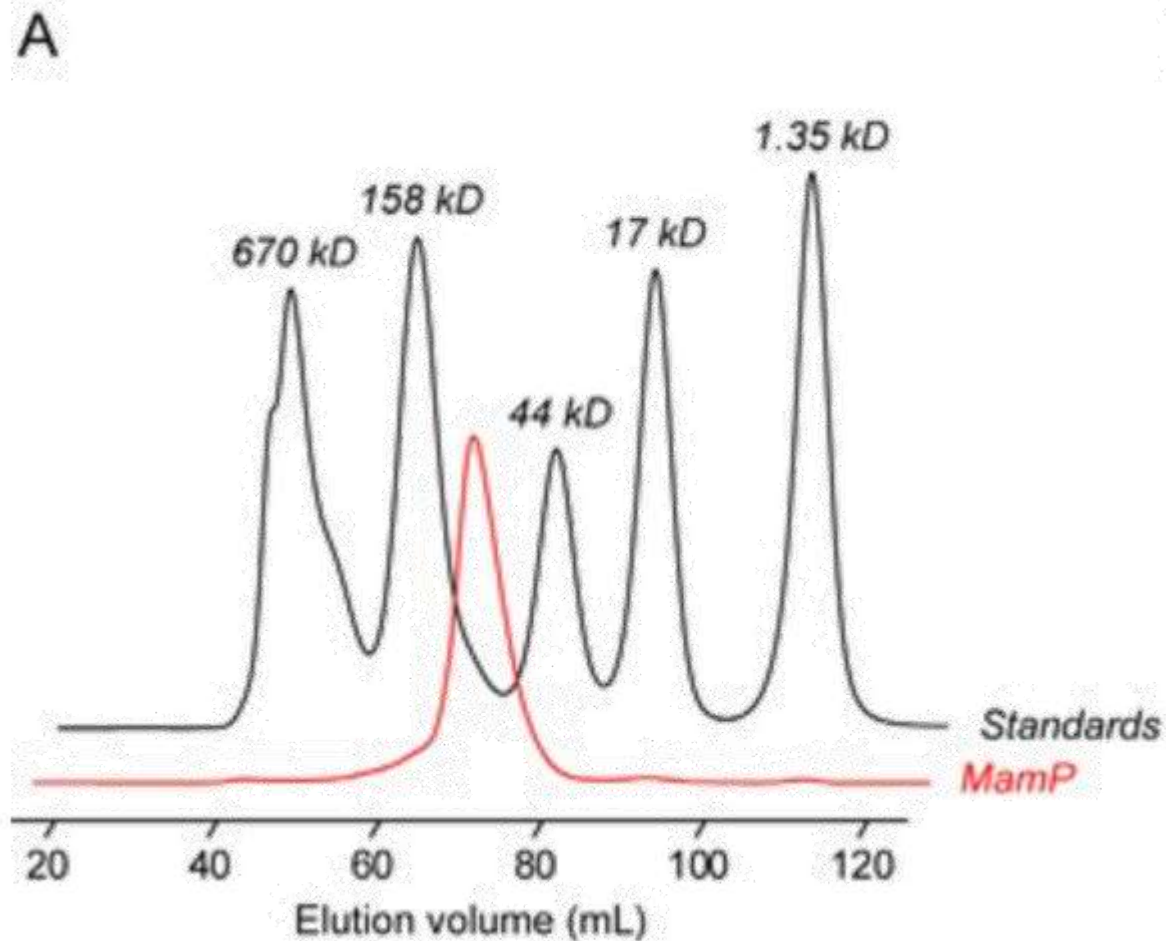
1. Détermination du poids moléculaire des molécules de l'échantillon

- Le volume d'élution (ainsi que le Temps de rétention), sont linéairement corrélés au logarithme du poids moléculaire dans l'intervalle de séparation
- Détermination du poids moléculaire : à partir d'une courbe de standards. Par **étalonnage** direct avec des étalons (standards) de poids moléculaires connus



Chromatographie d'exclusion stérique

1. Détermination du poids moléculaire des molécules de l'échantillon



Chromatographie d'exclusion stérique

Applications

2. Purification de biomolécules

- Protéines, peptides, polysaccharides, hormones, cofacteurs, acides nucléiques ...etc.



Chromatographie d'exclusion stérique

Applications

3. Dessalage

- Une colonne de gel (Sephadex G25) sépare les substances de haut poids moléculaire éluées dans le volume mort (volume d'exclusion), des sels qui sont retenus à l'intérieur des granules.
- Cette méthode est plus rapide que la dialyse.



Chromatographie d'exclusion stérique

Applications

4. Séparation de petites molécules et de macromolécules pour autres fins

- Extraction du phénol dans la préparation d'acides nucléiques ;
- Interruption de réactions entre macromolécules et réactifs de faible masse molaire ;
- Extraction de produits, cofacteurs ou inhibiteurs d'enzymes ;
- ...etc.



Chromatographie d'exclusion stérique

Applications

5. Concentration des solutions

- Les substances de haut poids moléculaire peuvent être concentrées par addition de gel sec (Sephadex G25 par exemple) qui en s'hydratant absorbe les petite molécules (solvant).
- Les substances concertées sont récupérées après centrifugation.



CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Principe

La CEI repose sur la **séparation de composés chargés** par échange d'ions grâce à une **phase stationnaire** greffée **avec** des **groupements** fonctionnels **ionisés** de charge opposée.

La séparation des analytes est basée sur des interactions ioniques réversibles entre la phase stationnaire chargée, appelée « **échangeur d'ion** », des **contres ions** échangeables et un **soluté chargé**.



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

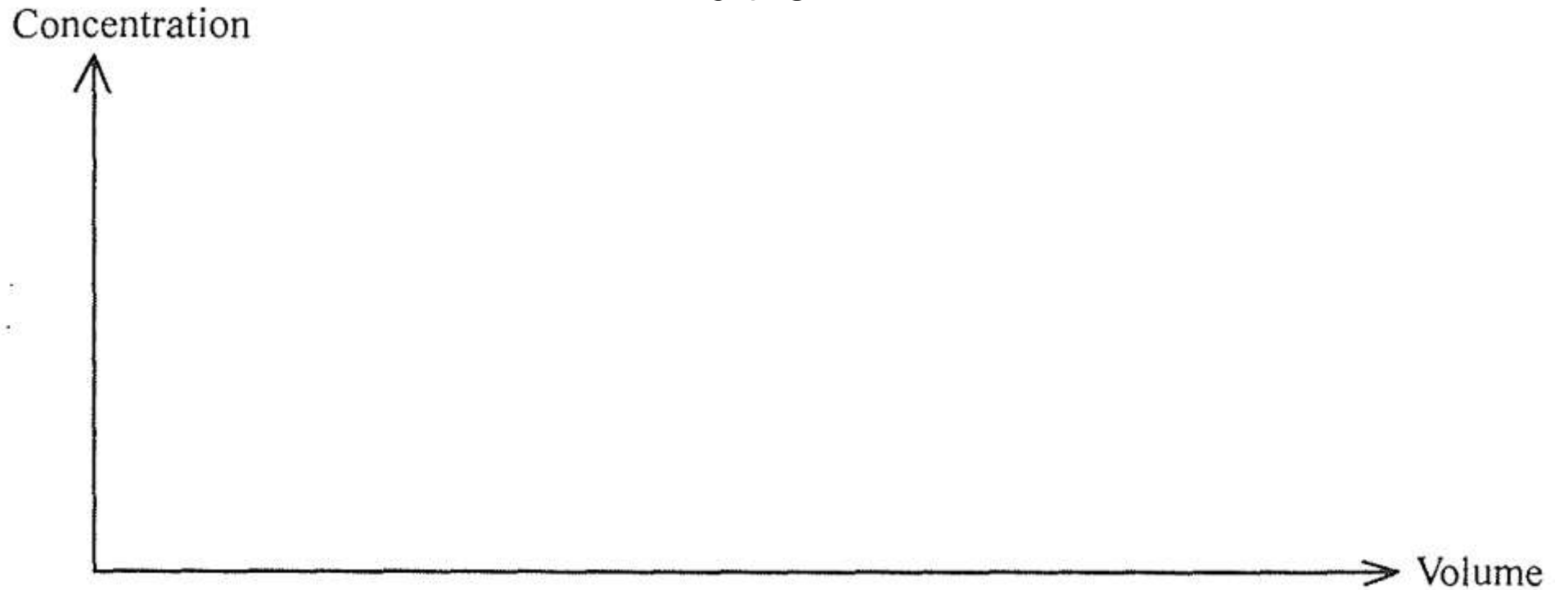
Principe



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Principe

Elution :



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Principe

En plus de la charge des analytes, la séparation en CEI est fonction de :

- La force ionique du milieu ;
- Le pH du milieu ;
- La présence de certains additifs comme les solvants organiques ;
- Les propriétés de l'échangeur d'ion.



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Phase stationnaire

Un **support solide** (matrice, résine) sur lequel sont greffés des **groupements ioniques**

1) Support :

- Solide
- Nature:
 - Minéral (ex. silice)
 - Organique
 - Synthétique (ex. polystyrène)
 - Naturelle (ex. Cellulose, Dextrane)
- Poreux
- Granuleux (diamètre \approx 30 à 800 μm (chromatographie basse pression) et 5-10 μm (HPLC))
- Capacité de rétention : quantité maximale d'ions que peut fixer l'échangeur d'ions (mEq/g de résine sèche ou mEq/mL de résine humide).

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

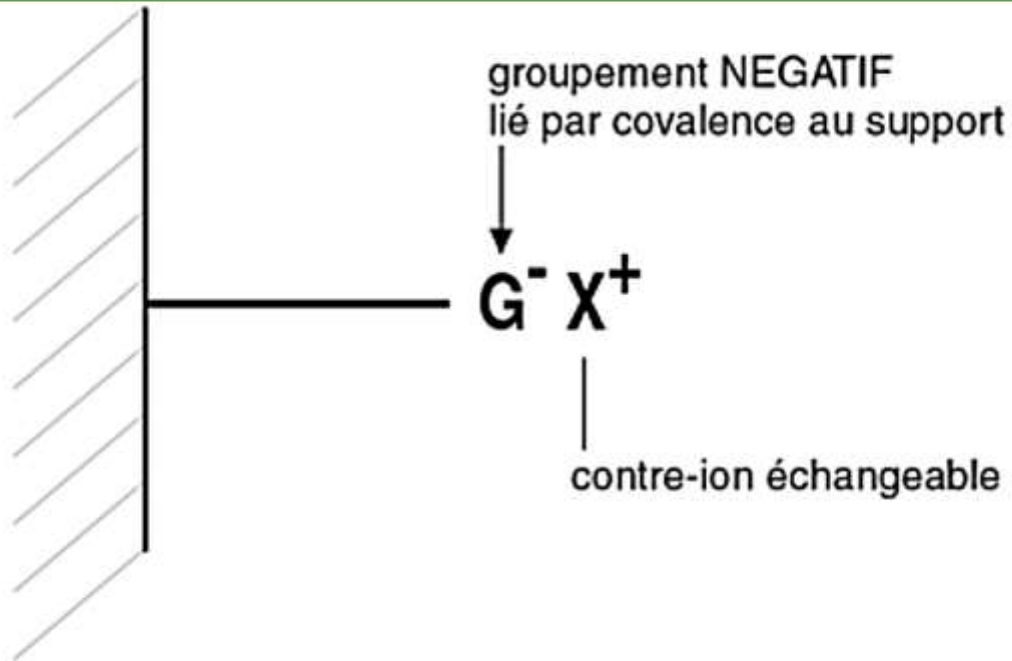
Phase stationnaire

Un **support solide** (matrice, résine) sur lequel sont greffés des **groupements ioniques**

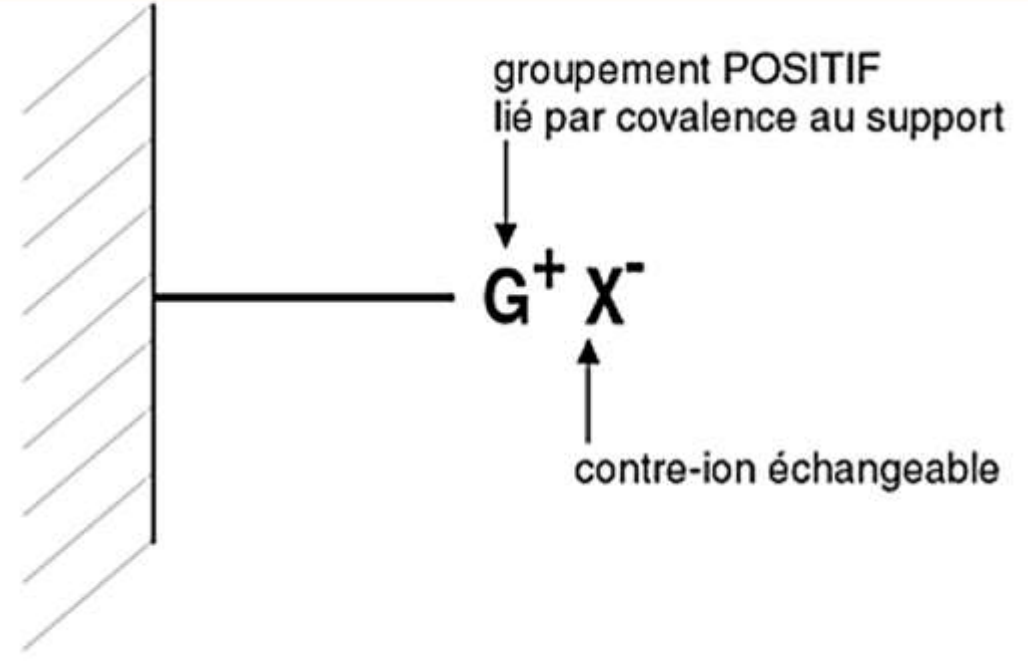
2) Groupements fonctionnels :

On les classe selon leur charge en deux catégories :

Résine échangeuse de cations (cationique) :



Résine échangeuse d'anions (anionique) :



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Résines cationiques fortes

Fortement ionisées quel que soit le pH
(Résines sulfoniques)

Résines cationiques faibles

Non ionisées en milieu acide fort
(Résines carboxyliques)

Résines anioniques fortes

Fortement ionisées quel que soit le pH
(Résines à amine quaternaire)

Résines anioniques faibles

Non ionisées en milieu basique fort
(Résine à amine secondaire)

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Phase mobile

- Solution **aqueuse**
- +/- **solvants** polaires (méthanol-eau) (pour faciliter la solubilité de certains solutés).

Rôles de la phase mobile en CEI

- Entraînement de l'échantillon à travers la colonne
- **Assure** l'adsorption des molécules d'intérêt sur la résine (**réten**tion), puis leur désorption (**élu**tion)

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Phase mobile

On peut moduler la rétention des analytes par :

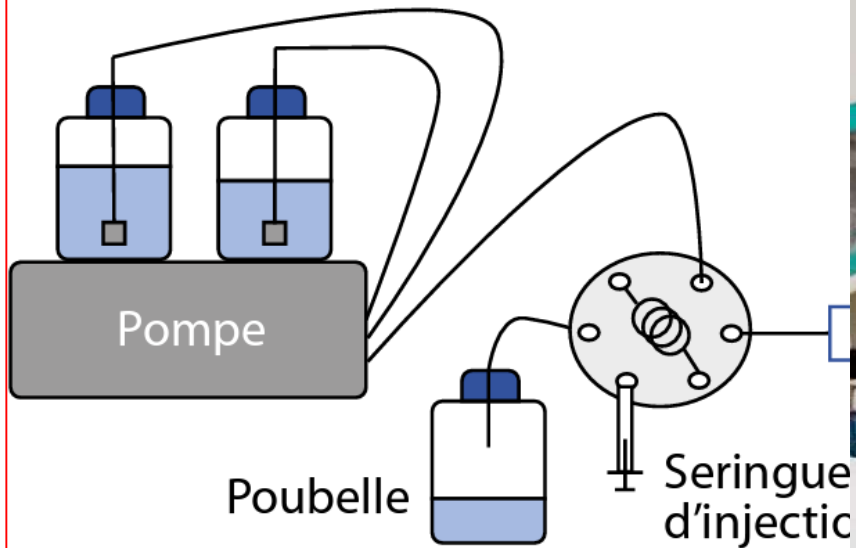
- Modification du **pH** (influence l'ionisation du soluté et aussi des groupements de la résine) ;
- Modification de la **force ionique** (déplacement du soluté par des ions ayant plus d'affinité pour la résine) ;
- Modification de la nature ou la proportion **des solvants**.

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

Appareillage

Phase mobile



Suppresseur : réduit la conductivité
=> réduction de la conductivité



Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur

2. Choix de la phase mobile

3. Remplissage de la colonne

4. Equilibrage de l'échangeur

5. Injection de l'échantillon.

6. Elution

7. Collection des fractions

8. Analyse du chromatogramme.

9. Régénération de l'échangeur

➤ Type (anionique ou cationique):

- selon la **charge** de la molécule d'intérêt (ou son **pHi** s'il s'agit d'une protéine)
- selon le **pH** de la phase mobile

➤ Porosité :

- selon la **taille** des molécules d'intérêt

➤ Granulométrie :

- selon le type de chromatographie (à basse pression ou HPLC).

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur
2. Choix de la phase mobile
3. Remplissage de la colonne
4. Equilibrage de l'échangeur
5. Injection de l'échantillon.
6. Elution
7. Collection des fractions
8. Analyse du chromatogramme.
9. Régénération de l'échangeur

- La phase mobile de départ doit **assurer l'adsorption** de la molécule d'intérêt sur la résine
- Choix du **pH** et de la **Fi** :
 - ☐ selon la nature de l'échangeur :
 - pH : doit assurer l'ionisation du groupement porté par l'échangeur d'ions
 - Fi : les contre-ions (Na^+ ou Cl^-) se lient aux groupements chargés de la résine.
 - ☐ selon la nature de la molécule d'intérêt.
 - pH : doit assurer l'ionisation de la molécule d'intérêt

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur
2. Choix de la phase mobile
3. Remplissage de la colonne
4. Equilibrage de l'échangeur
5. Injection de l'échantillon.
6. Elution
7. Collection des fractions
8. Analyse du chromatogramme.
9. Régénération de l'échangeur

- Dans le tampon de départ (pH et F_i bien définis)
- **But :**
 - Garanti l'ionisation du groupement de l'échangeur
 - Assure que tous les groupes chargés de l'échangeur soient liés à des contre-ions échangeables.
 - Garantir que, lorsque l'échantillon est introduit dans la colonne, les molécules d'intérêt se lient à la résine et que le plus grand nombre possible d'impuretés ne se lient pas.

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur
2. Choix de la phase mobile
3. Remplissage de la colonne
4. Equilibrage de l'échangeur
5. Injection de l'échantillon.
6. Elution
7. Collection des fractions
8. Analyse du chromatogramme.
9. Régénération de l'échangeur

➤ Durant cette étape, il y aura **adsorption** des molécules d'intérêt sur la résine : La phase mobile doit fournir les conditions de pH et de force ionique nécessaires pour cette adsorption.

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur
2. Choix de la phase mobile
3. Remplissage de la colonne
4. Equilibrage de l'échangeur
5. Injection de l'échantillon.
6. Elution
7. Collection des fractions
8. Analyse du chromatogramme.
9. Régénération de l'échangeur

➤ Etape de désorption.

➤ Réalisée soit :

- en **modifiant le pH** de la phase mobile (=> ce qui modifie la charge des molécules d'intérêt => plus d'interaction électrostatique avec la résine => élution).
- en **augmentant la Fi** : par ajout d'un sel (à concentration croissante) => apport d'ions de même charge que les molécules adsorbées à la résine (contre-ions) => compétition => déplacement des molécules d'intérêt => élution.

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Mode opératoire

1. Choix de l'échangeur
2. Choix de la phase mobile
3. Remplissage de la colonne
4. Equilibrage de l'échangeur
5. Injection de l'échantillon.
6. Elution
7. Collection des fractions
8. Analyse du chromatogramme.
9. Régénération de l'échangeur

➤ par lavage extensif avec une solution de pH permettant de remettre les charges dans leur valeur initiale. Les contre ions sont réassociés à leurs groupements fonctionnels et la résine est prête à être utilisée.

Chromatographie d'échange d'ions (CEI)

Applications

- Deionisation d'eau (adoucissement)
- Analyse et séparation des :
 - Sels minéraux ;
 - Acides aminés ;
 - Peptides ;
 - Protéines ;
 - Nucléotides ;
 - Acides nucléiques ;
 - Lipides ;
 - Glucides ionisés ;
 - Etc.



CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

Chromatographie d'affinité

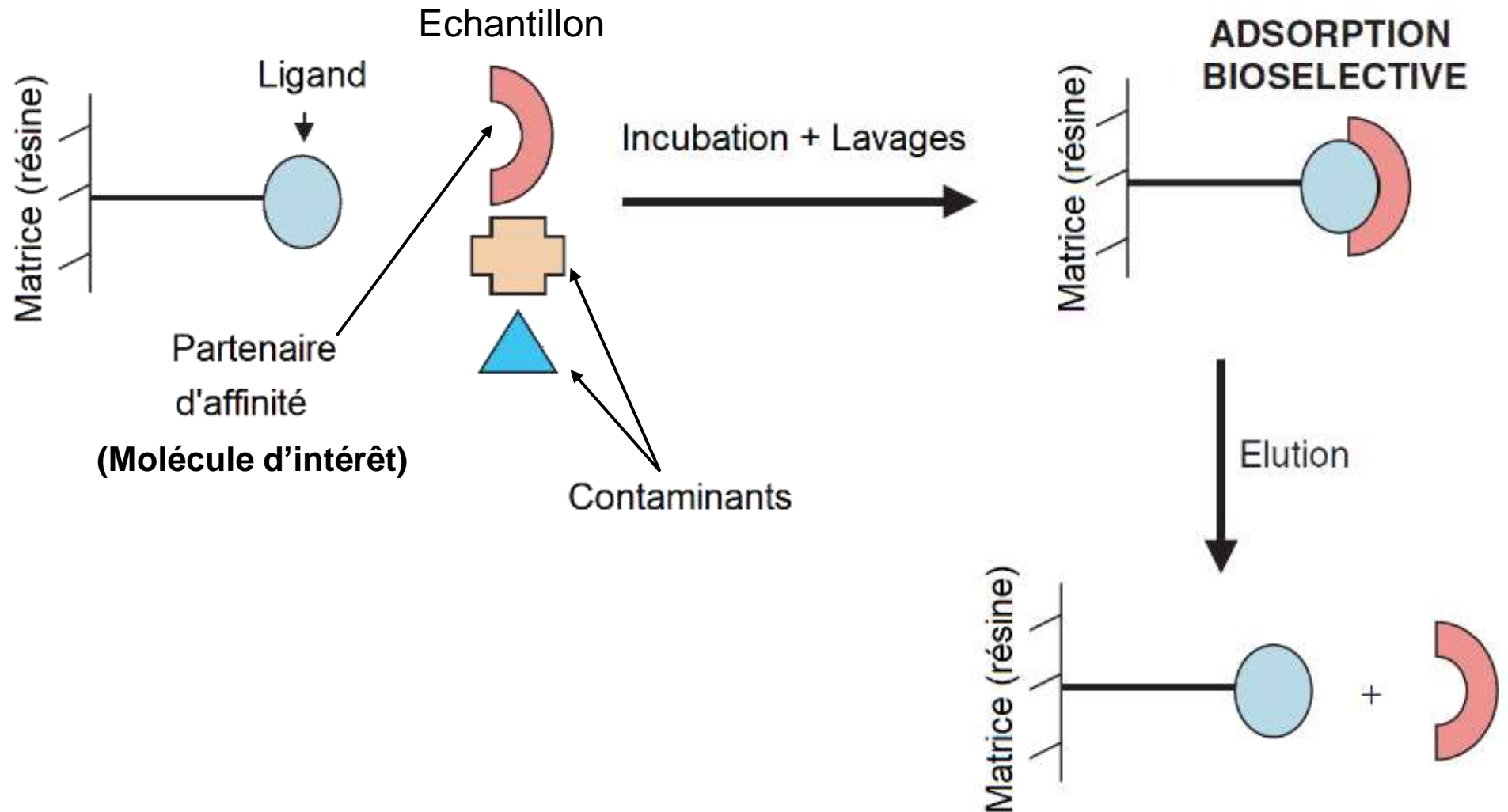
Principe

La chromatographie d'affinité est basée sur des interactions spécifiques et réversibles entre des composés spécifiques (**ligands**), lié par covalence à un support inerte qui constitue la phase stationnaire, et son **partenaire d'affinité** en solution (substance à analyser ou affinant).



Chromatographie d'affinité

Principe

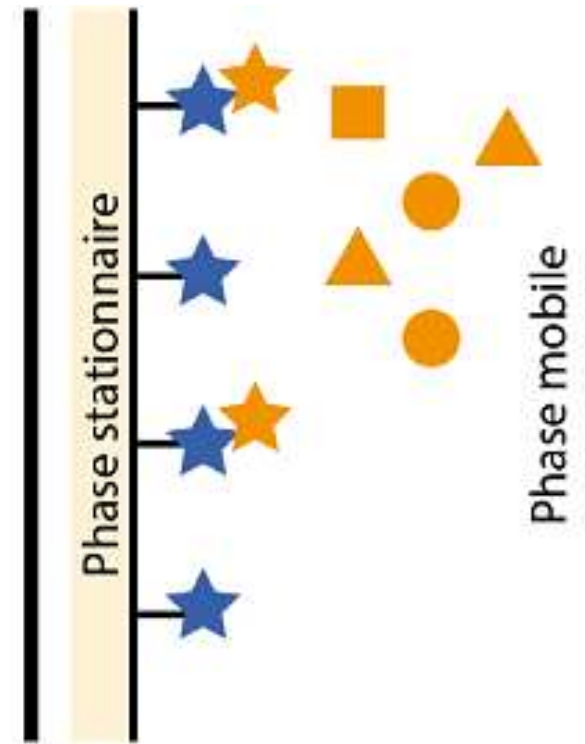


Chromatographie d'affinité

Principe

Trois types d'affinités sont principalement utilisés :

- Enzyme-substrat
- Antigène-anticorps
- Ligand-récepteur



- ★ Ligands spécifiques
- ★ Molécules cibles

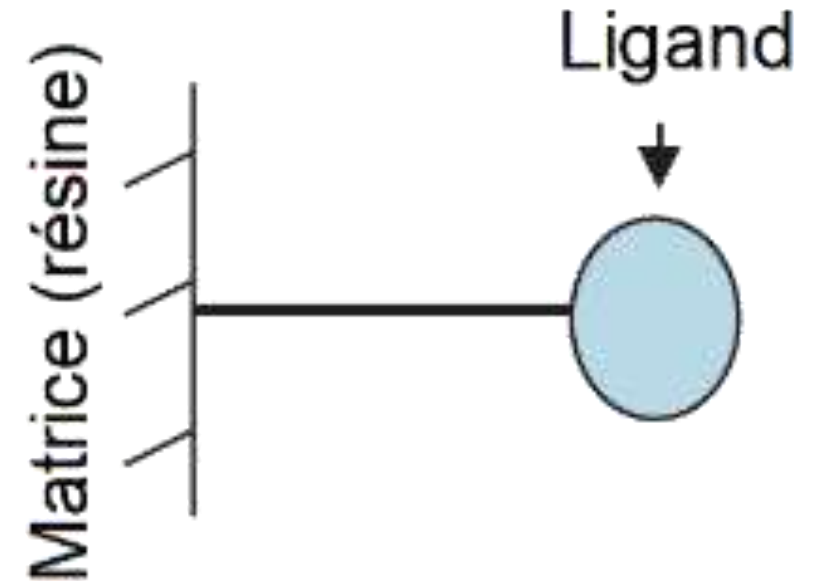
Interactions
spécifiques



Chromatographie d'affinité

Phase stationnaire

Constituée d'un effecteur (**ligand**), fixé par covalence à un support poreux (**matrice** ou résine) par l'intermédiaire d'une chaîne latérale : le **bras espaceur** (bras fixateur).



Chromatographie d'affinité

Phase stationnaire

1) La matrice :

- En Dextran, Agarose ou Polyacrylamide
- Particules uniformes
- Insoluble dans l'eau
- Stable chimiquement et mécaniquement
- Porte des groupements fonctionnels réactifs => fixation du ligand/bras espaceur.

La matrice ne doit pas adsorber les molécules de l'échantillon

2) Le bras espaceur :

- Une chaîne polycarbonnée (C6-C8) intercalée entre la matrice et le ligand.

Chromatographie d'affinité

Phase stationnaire

3) Le ligand :

- Toute substance capable de former des complexes spécifiques et stables avec les molécules à isoler.
- Fixée directement ou indirectement sur la matrice.

Les effecteurs utilisés sont :

➤ Pour la purification des enzymes :

- Des substrats et analogue de substrat.
- Des inhibiteurs réversibles.
- Des effecteurs allostériques.
- Des coenzymes.

➤ En immunologie :

- Des haptènes.
- Des antigènes.
- Des anticorps.

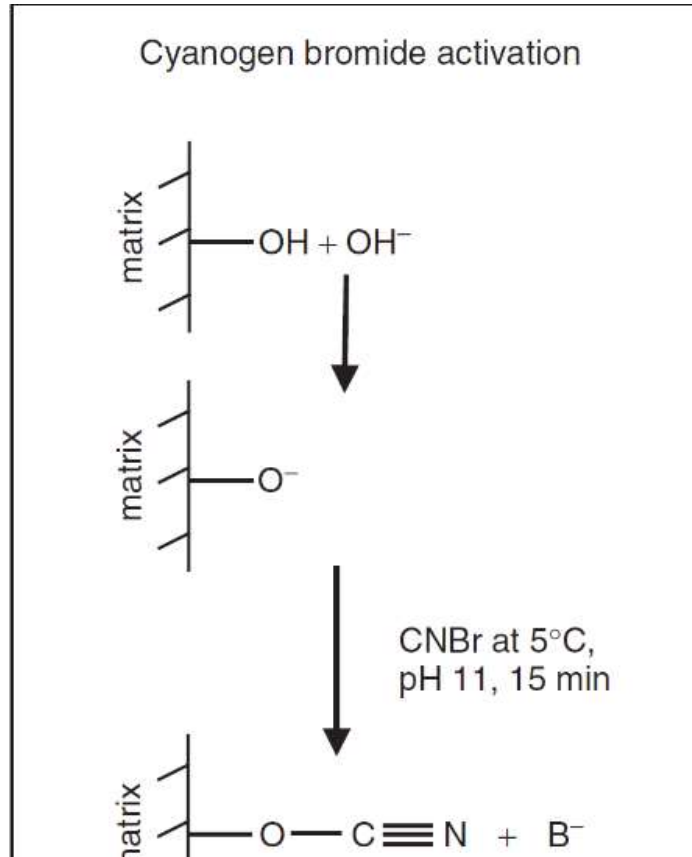
➤ Pour l'étude des protéines réceptrices :

- Des hormones.

Chromatographie d'affinité

La fixation du ligand sur la matrice se fait en deux étapes :

- (1)** Activation du groupe fonctionnel sur la matrice (en utilisant le bromure de cyanogène)
- (2)** Couplage (ou la liaison) du ligand à ce groupe fonctionnel.



- le ligand doit être étroitement lié à la matrice
- La liaison ne doit pas altérer l'affinité du ligand pour son partenaire
- La construction (ligand-matrice) doit être résistante à la modification par le tampon d'éluion (variations de pH/Fi).

Chromatographie d'affinité

Mode opératoire

1. Préparation du gel

➤ Fixation du ligand sur le support

2. Remplissage de la colonne par le gel d'affinité

➤ en utilisant un tampon d'éluion.

3. Equilibrage de la colonne

➤ Peut être réalisée de différentes façons :

➤ Avec un tampon dont le pH et la F_i favorisent les interactions moléculaires entre le ligand et les molécules à purifier

En **modifiant le pH** (\Rightarrow changement de l'état d'ionisation de la protéine \Rightarrow désorption).

4. Injection de l'échantillon.

➤ Au cours de cette étape, les molécules d'intérêt se lient spécifiquement au ligand de la phase stationnaire \Rightarrow separation

En **modifiant la F_i** (\Rightarrow changement de la conformation de la protéine).

5. Lavage

➤ La colonne est lavée avec le tampon pour éliminer les impuretés

En **ajoutant un ligand libre** qui entre en compétition avec le ligand de la phase stationnaire vis-à-vis de la molécule d'intérêt \Rightarrow désorption.

6. Elution

Chromatographie d'affinité

Applications

- Adaptée, soit à l'**analyse**, soit à la **préparation** de substances biologiques.
- Domaines d'application:
 - **Enzymologie** : pour l'extraction d'enzymes et la purification d'extrait 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 PAR INTERACTION HYDROPHOBE (HIC)

Chromatographie par interaction hydrophobe

Principe

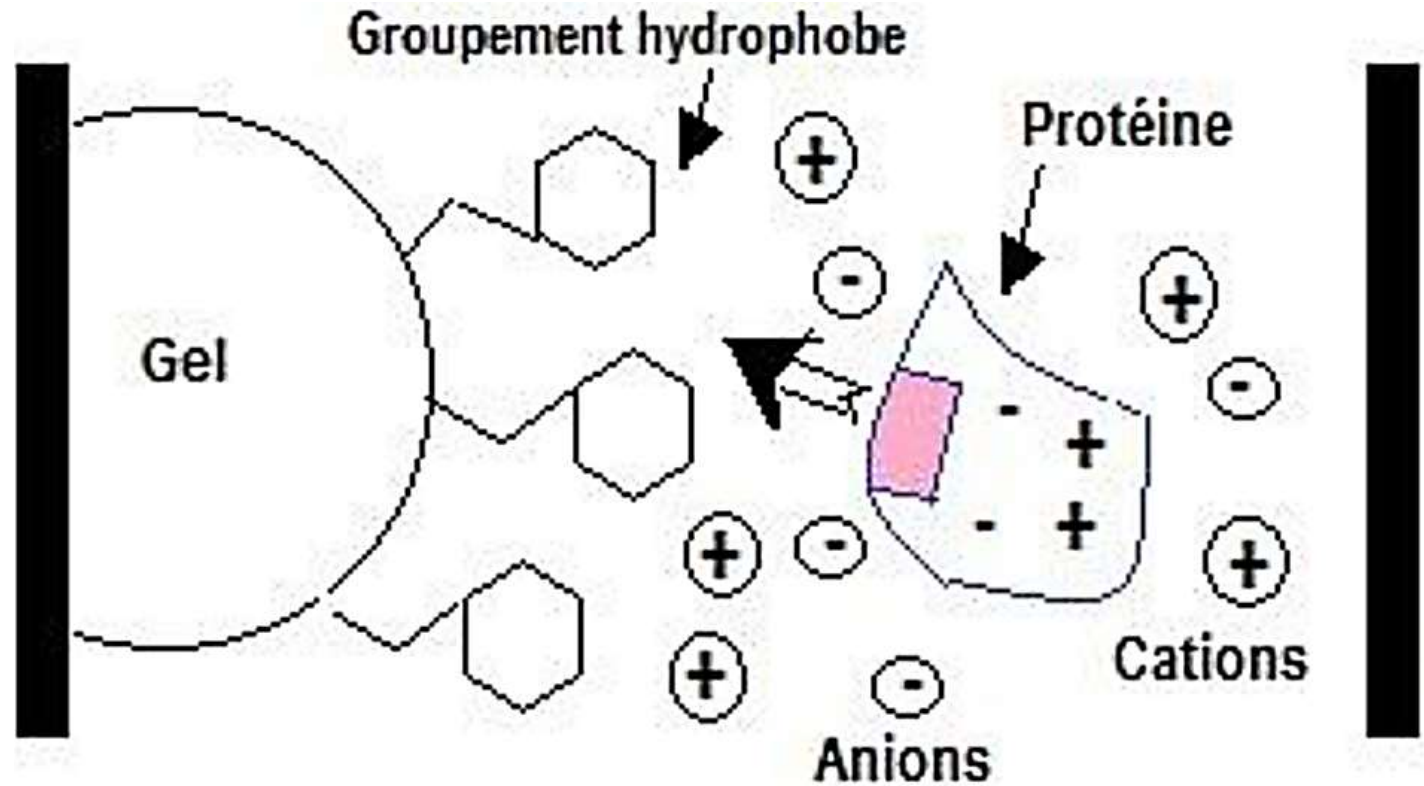
La chromatographie d'interaction hydrophobe (hydrophobic interaction chromatography, *HIC*) sépare les protéines en fonction de leur **caractère hydrophobe**.



Chromatographie par interaction hydrophobe

Principe

En présence d'une **Fi élevée** => réorganisation des molécules d'eau autour des protéines => **exposition** de leurs **zones hydrophobes** => établissement d'interactions hydrophobes avec les groupements hydrophobes portés par la phase stationnaire.

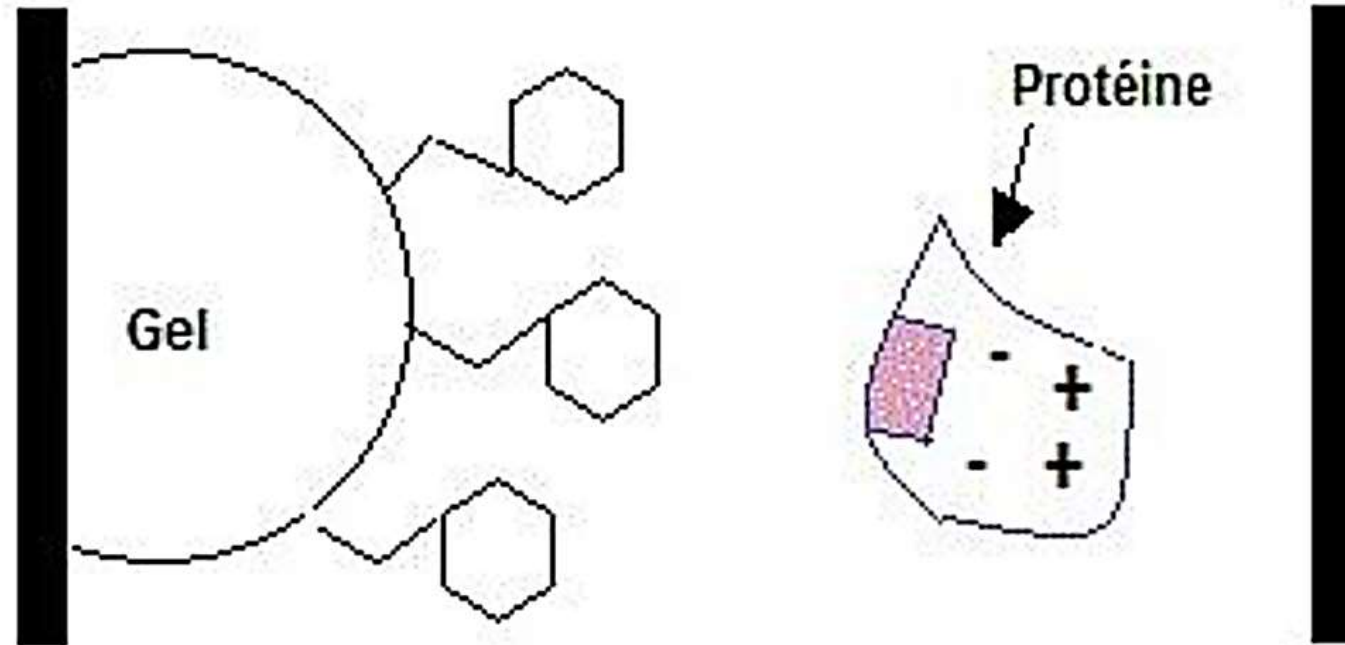


Concentrations élevées en sels (Force ionique élevée) & interaction hydrophobe entre protéines et matrice

Chromatographie par interaction hydrophobe

Principe

Elution : par un tampon à **Fi faible**.

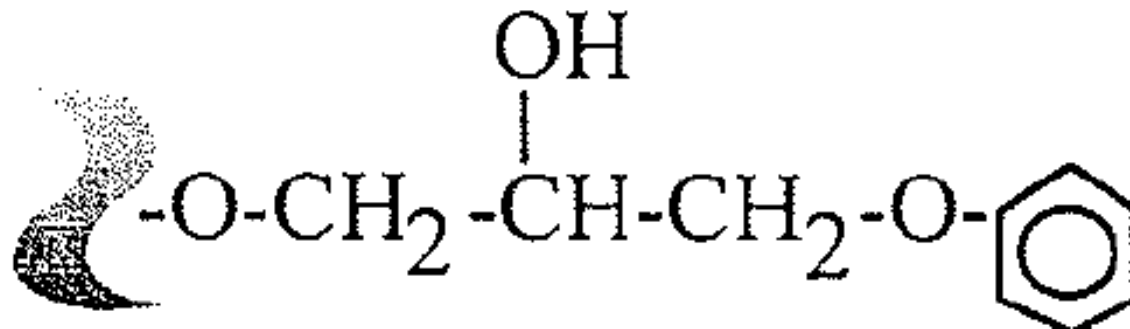


Concentrations faibles en sels (Force ionique faible)
& absence d'interaction hydrophobe entre protéines et matrice

Chromatographie par interaction hydrophobe

Phase stationnaire

Matrice hydrophile (gel) portant un **groupement hydrophobe** comme un **noyau phénol** à l'extrémité d'une chaîne carbonée.



Phenyl-Sepharose

Chromatographie par interaction hydrophobe

Phase mobile

- Constituée par une **solution aqueuse chargée en sels**
 - De nombreux analytes se lient à la phase stationnaire lorsque la F_i est élevée
- Diminution de la F_i => Elution des analytes
 - Les analytes élués les premiers sont les moins hydrophobes



Chromatographie par interaction hydrophobe

Applications

➤ Purification des protéines

La séparation des analytes se fait généralement en conditions non-dénaturantes ce qui explique l'intérêt suscité par ce type de chromatographie.



CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Chromatographie liquide de haute performance

Principe

- La HPLC est utilisée pour séparer les biomolécules d'un mélange qui est pompé sous **haute pression** dans la phase mobile à travers la colonne de phase stationnaire.
- La séparation dépend des interactions chimiques entre les biomolécules, présents dans la phase mobile, et la phase stationnaire.



Chromatographie liquide de haute performance

Principe

➤ **La HPLC est une méthode très polyvalente qui englobe toutes les principales formes de chromatographie liquide :**

=> la HPLC est une méthode automatisée avancée de chromatographie de partage, d'adsorption, d'échange d'ions, d'exclusion stérique et d'affinité.



Chromatographie liquide de haute performance

Principe

L'échantillon est injecté dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de **fine granulométrie** (grains de très petite taille $\approx 2-5\mu\text{m}$)

- ⇒ Augmentation de la surface de contact entre phase stationnaire et phase mobile véhiculant l'échantillon
- ⇒ Meilleure séparation des composants



Chromatographie liquide de haute performance

Principe

Fine granulométrie => résistance ↑ à l'écoulement

⇒ nécessité d'utiliser un débit d'écoulement élevé de la phase mobile

⇒ **augmentation de la pression**

Débit élevé de la phase mobile

⇒ diminution du temps nécessaire pour séparer les composants

⇒ **Résolution améliorée (pics sont bien séparés)**



Chromatographie liquide de haute performance

Avantages de la HPLC

- Meilleure résolution
- Rapidité de l'analyse
- Colonnes HPLC réutilisables sans reconditionnement ni régénération
- Reproductibilité grandement améliorée car les paramètres affectant l'efficacité de la séparation peuvent être étroitement contrôlés
- Fonctionnement de l'instrument et Analyse des données facilement automatisés
- Adaptation de la HPLC aux procédures préparatoires à grande échelle.

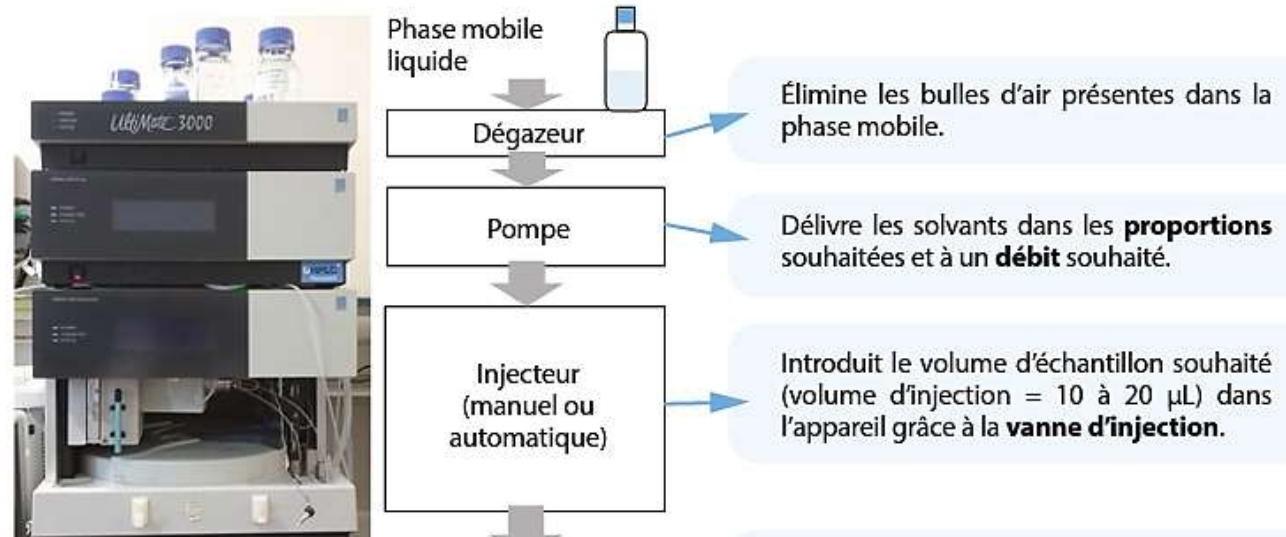


HPLC

Appareillage

- Colonne en acier inoxydable pré-rempli d'un matériau de

► Schéma général de l'appareillage



Comparaison des propriétés de différents détecteurs de l'HPLC

Type de détecteur	Molécules détectées	Sensibilité	Destructif
UV-visible	Molécules ayant un groupement chromophore	+	Non
DEDL/Corona	Universel (molécules non volatiles)	-	Oui
Spectromètre de masse	Molécules pouvant s'ioniser	++	Oui
Fluorimètre	Molécules fluorescentes	++	Non

HPLC préparative

- Colonne à **diamètre** et/ou **longueur** plus importants => permet de charger une plus grande quantité d'échantillon ;
- Boucle d'injection de plus grand **volume** (50-100 μL) ;
- Pompes assurant des **débits** plus élevés ;
- Présence d'un splitter (pour les détecteurs qui dégradent les molécules tels que le DEDL et la SM) qui divise le débit de la phase mobile afin d'envoyer une petite partie vers le détecteur et la majorité du débit vers le collecteur ;
- Système de collecte et logiciel qui le pilote afin de récupérer les différentes fractions/molécules séparément.

Chromatographie liquide de haute performance

Applications

Dans différents domaines :

- 1) **Clinique** : quantification des médicaments dans les fluides corporels ;
- 2) **Environnementale** : identification des produits chimiques dans l'eau potable ;
- 3) **Médico-légale** : analyse des colorants textiles ;
- 4) **Industriel** : stabilité des composés dans les produits alimentaires ;
- 5) **Pharmaceutique** : contrôle de la qualité et de la durée de vie d'un médicament synthétique ;
- 6) **Recherche** : séparation et isolement des composants d'échantillons naturels provenant d'animaux et de plantes.



CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Chromatographie en phase gazeuse

Principe

La CPG est une technique dans laquelle l'échantillon doit être porté à l'**état de vapeur** avant de parcourir la colonne

⇒ la CPG se limite aux composés suffisamment **volatils** et **thermiquement stables**



Chromatographie en phase gazeuse

Principe

Il existe deux types de CPG, chacune ayant un principe de séparation différent :

1) *La chromatographie Gaz-Liquide* :

- C'est une chromatographie **de partage** ;
- La **phase stationnaire** est un **liquide** immobilisé sur un support solide par imprégnation ou par greffage.
- Est basée sur le partage des solutés entre une **phase gazeuse mobile** inerte appelé **gaz vecteur** et une phase liquide fixée sur la surface d'un support poreux inerte.
- Cette méthode est la plus fréquemment utilisée, et c'est à elle que se réfère souvent la chromatographie en phase gazeuse.



Chromatographie en phase gazeuse

Principe

Il existe deux types de CPG, chacune ayant un principe de séparation différent :

2) *La chromatographie Gaz-Solide :*

- C'est une chromatographie d'**adsorption** ;
- La phase **stationnaire** est un **solide** poreux, réservé à l'analyse de mélanges de gaz ou de liquides à bas points d'ébullition.
- Ce type de chromatographie est peu utilisé en raison des trainées dans les pics d'élutions provoquées par la non linéarité du processus d'absorption.



Chromatographie en phase gazeuse

Paramètres influençant la séparation en CPG :

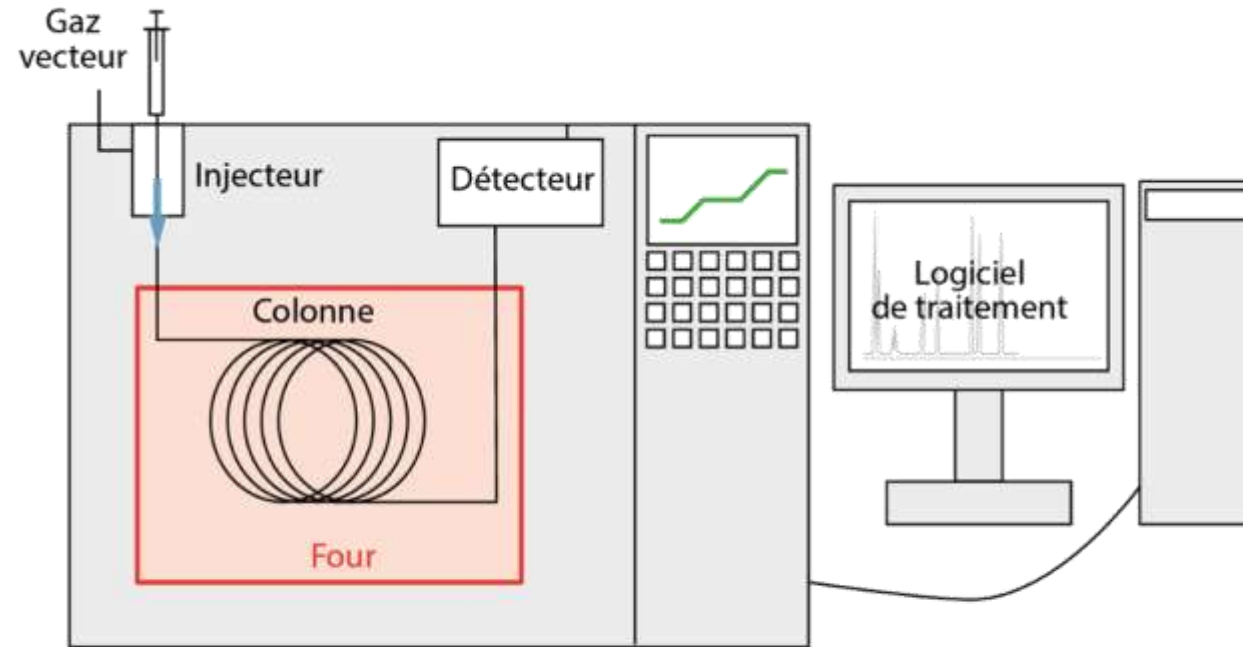
- Température appliquée à la colonne ;
- Nature et longueur de la phase stationnaire ;
- Nature et débit du gaz vecteur.



Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile (gaz vecteur)
4. L'échantillon
5. L'injecteur
6. Le four
7. Le détecteur



Chromatographe en phase gazeuse



Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
 - Contient la phase stationnaire
 - Se présente sous forme de tube fin enroulé.
2. La phase stationnaire
 - constitué d'un support solide inerte est poreux (généralement de la silice), dont la surface est imprégnée ou greffée avec le liquide stationnaire.

➤ Il existe deux types de colonnes :

1) Les colonnes remplies (colonnes à garnissage)



- Phase stationnaire : liquide immobilisé, par imprégnation ou par réaction chimique, sur un support poreux et inerte
- Diamètre de la colonne : environ 0,5 cm
- Longueur de la colonne : de 1 m à 20 m

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

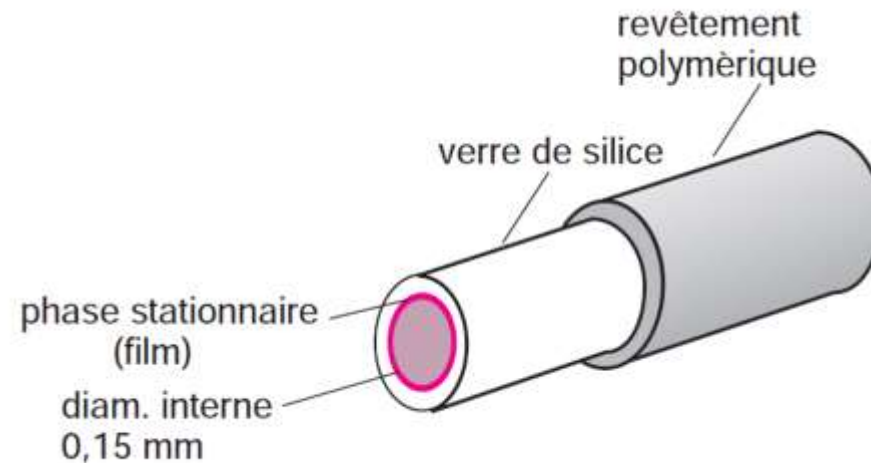
1. La colonne

2. La phase stationnaire

➤ Il existe deux types de colonnes :

1) Les colonnes remplies (colonnes à garnissage)

2) Les colonnes capillaires



- une couche de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne
- Diamètre de la colonne : environ 0,25 mm
- Longueur de la colonne : de 10 m à 100 m

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne

2. La phase stationnaire

3. La phase mobile (gaz vecteur)

- Un gaz inerte
- Généralement de l'azote, de l'argon, de l'hélium ou de l'hydrogène.
- Le gaz circule dans la colonne à débit constant
- Le gaz doit répondre à certaines qualités :
 - i. Faible viscosité ;
 - ii. Grande pureté ;
 - iii. Inertie vis à vis de l'échantillon et de la phase stationnaire
 - iv. Compatibilité avec le détecteur.

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile (gaz vecteur)
4. L'échantillon

- Directement volatilisables et stable à la température de la CPG
- sont solubilisés dans un solvant et chromatographiés
- lorsque les solutés ne sont pas volatils à la température de la chromatographie ou bien sont décomposés à cette température, il faut les transformer en dérivés volatils stables (ex. les acides aminés sont ainsi estérifiées par le butanol, les acides gras estérifiés par le méthanol, les oses réduits en alditols, puis acétylés)

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile (gaz vecteur)
4. L'échantillon
5. L'injecteur

- Il permet :
- i. l'introduction, par le biais d'une seringue (1 à 10 μL), de l'échantillon ;
 - ii. son évaporation (T° de l'injecteur = T° du produit le moins volatil + 20°C) ;
 - iii. son entraînement par le gaz vecteur vers la colonne.

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile (gaz vecteur)
4. L'échantillon
5. L'injecteur
6. Le four

- Les colonnes sont placées dans des enceintes chauffées appelées four
- La température du four est légèrement supérieure au point de vaporisation du constituant le moins volatil

Chromatographie en phase gazeuse

Composantes de la CPG

1. La colonne
2. La phase stationnaire
3. La phase mobile (vecteur)
4. L'échantillon
5. L'injecteur
6. Le four
7. Le détecteur

Récapitulatif des détecteurs pour la chromatographie en phase gazeuse

Type de détecteur	Sélectivité	Sensibilité (g)
Ionisation de flamme (FID)	La plupart des composés organiques carbonés	10^{-10}
Conductivité thermique (TCD)	Universel	10^{-8}
Spectrométrie de masse (MS)	Composés ionisables par la source	10^{-10} à 10^{-16}
Capture d'électrons (ECD)	Composés halogénés, organométalliques	10^{-13}
Thermo-ionisation (TID)	Composés azotés ou phosphorés	10^{-11}
Photo-ionisation (PID)	Composés oxygénés, soufrés, organométalliques...	10^{-12}
Photométrie (FPD)	Composés soufrés, phosphorés, organométalliques	10^{-10}

Chromatographie en phase gazeuse

Applications

- La CPG est utilisée pour l'analyse :
 - de composés **volatils** et **thermiquement stables**
 - de composés pouvant être rendus volatils par une réaction chimique (nommée dérivation)
- L'analyse par la CPG est **qualitative** et **quantitative**
- Composés couramment analysés en CPG :
 - Arômes ; Pesticides ; Acides gras ; Solvants résiduels ...etc.



Chromatographie en phase gazeuse

Applications

Domaines d'application :

- 1) **Biologie clinique** : Dosage de cholestérol, détection des acides gras.
- 2) **Pharmacologie** : Dosage des benzodiazépines, des métabolites médicamenteux pour des études de biodisponibilité et de suivi thérapeutique.
- 3) **Toxicologie** : Méthode officielle de dosage de l'éthanol. Dosage du méthanol, éthylène glycol, cyanure, les carbamates.
- 4) **Pharmacie hospitalière** : Dosage de l'oxyde d'éthylène dans le matériel médico-chirurgical stérilisé par ce gaz. Contrôle des gaz médicaux, matières premières, produits finis et les alcaloïdes.
- 5) **Industrie agroalimentaire** : Dosage des pesticides, recherche des nitrosamines dans l'atmosphère et dans les produits de charcuteries.



RÉCAPITULATIF :

**COMMENT CHOISIR UN SYSTÈME
CHROMATOGRAPHIQUE ?**

COMMENT CHOISIR UN SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE ?