

II-4- La chromatographie :

II-4-1- Définition :

La **chromatographie** est une technique physique de séparation d'espèces chimiques qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange.

L'échantillon contenant une ou plusieurs espèces, est entraîné par un courant de phase mobile (liquide, gaz ou fluide supercritique) le long d'une phase stationnaire (papier, gélatine, silice, polymère, silice greffée etc.) ; chaque espèce se déplace à une vitesse propre, dépendant de ses caractéristiques, de celles des deux phases et les différences d'affinité entre elles. Cette technique d'analyse physico-chimique peut être couplée à un détecteur en vue d'une analyse qualitative ou quantitative du milieu.

Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

Phase stationnaire : phase fixe soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane.

Phase mobile : phase qui se déplace à travers la phase stationnaire, en entraînant les analytes. La phase mobile ne doit pas interagir avec la phase stationnaire mais uniquement avec les analytes.

Chromatogramme : graphique d'une fonction de la concentration en analyte en fonction du temps (ou du volume) d'élution.

II-4-2- Principe :

La chromatographie repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire. Celle-ci retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie (comme les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène, etc.) réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une vitesse caractéristique qui permet de les séparer, voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement dépendante de la nature de la phase mobile et de la phase stationnaire.

Souvent, l'échantillon est analysé par comparaison avec des substances déjà connues dans l'échantillon ou par comparaison avec les résultats de l'analyse d'une solution-étalon (solution commerciale contenant des substances connues, à des concentrations bien connues). Ces substances servent de références et permettent d'identifier ou de doser chaque espèce par comparaison des vitesses de séparation (et éventuellement d'autres renseignements donnés par la détection). Il s'agit de chromatographie analytique.

Dans d'autres cas, on se contente de purifier et séparer les fractions, de les récolter pour les identifier par d'autres techniques : c'est la chromatographie préparative. Cette méthode d'analyse permet l'identification et le dosage de composés dans un mélange. Elle peut-être couplée à un spectromètre de masse pour l'identification de composés inconnus. Pour l'exploiter pleinement il est important de connaître les différentes grandeurs de rétention et d'utiliser des colonnes avec une bonne efficacité.

La chromatographie permet également d'effectuer des dosages avec une grande précision. Les principales méthodes de dosage sont la normalisation interne, la méthode des ajouts dosés et l'étalonnage interne. L'étalonnage externe peut également être effectué sous certaines conditions.

Il existe de nombreux types de chromatographie ; on peut notamment les classer selon la nature de la phase mobile :

- la chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC en anglais) ;
- la chromatographie en phase gazeuse (CPG ou GC en anglais) également appelée CPV (chromatographie en phase vapeur) ;
- la chromatographie en phase liquide (CPL ou LC en anglais) ;
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP ou HPLC en anglais) ;
- la chromatographie en phase supercritique (CPS ou SFC en anglais).

On peut aussi les nommer selon les interactions développées par la phase stationnaire :

- la chromatographie d'adsorption/d'affinité ;
- la chromatographie de partage ;
- la chromatographie à échange d'ions ;
- la chromatographie chirale (qui est, soit de la CPG, soit de la CPL) ;

- la chromatographie d'exclusion stérique (CES ou SEC en anglais) ;

Ou selon le support de la phase stationnaire :

- la chromatographie sur colonne (regroupant notamment HPLC et CPG) : la phase stationnaire est dans un tube étroit et la phase mobile progresse par gravité ou différence de pression ;
- la chromatographie planaire (qui recouvre CCM et chromatographie sur papier) : la phase stationnaire est sur la surface d'un support plat (CCM) ou dans une feuille de cellulose poreuse (chromatographie papier) et la phase mobile se déplace par capillarité ou par gravité.

Étapes d'une analyse quantitative

Choix de la méthode

- Analytes à étudier : nature et nombre

Connaître la nature de l'analyte permettra d'adapter le détecteur en sortie de l'analyse chromatographique. (Gaz, liquide...) Enfin Connaître son nombre c'est à dire sa concentration permettra d'éviter la saturation du détecteur. Il existe en chromatographie, différents détecteurs (FID, Spectro...)

1. Analytes à étudier

- Nombre d'analyses
- Exactitude recherchée

2. Échantillonnage

3. Préparation de l'échantillon

- Mise en solution
- Extraction des analytes de l'échantillon
- Concentration
- Rendement de l'extraction

4. Éliminer les interférences

- Effet de matrice
- Purification de l'extrait

5. Analyse chromatographique

- Directe
- Après traitement (méthylation, silylation...)
- Étalonnage
- Linéarité

6. Calcul des résultats

- Exactitude
- Evaluation d'incertitude

II-4-3- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Principe :

Elle est appliquée pour les substances volatiles. Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisés par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N₂). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution.

Appareillage de CPG :

Il est constitué de 3 parties :

- un injecteur
- une colonne placée dans une enceinte thermostatée
- un détecteur

II-4-4- La chromatographie en phase liquide (CPL) ou liquid chromatography (LC) :

C'est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative principalement utilisée dans le domaine de la chimie analytique comme outil scientifique majeur mais aussi dans des domaines variés tels que la chimie organique et la biochimie. Elle recouvre la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur papier, la chromatographie en phase liquide en colonne ouverte ou à basse pression, et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un solide divisé (phase stationnaire) qui est soit placé dans un tube (colonne chromatographique), soit fixé sur une surface inerte.

La séparation s'opère suivant les interactions chimiques ou physiques des analytes avec la phase mobile ainsi qu'avec la phase stationnaire.

En pratique, l'analyse LC met en œuvre plusieurs étapes :

- préparation de l'échantillon par l'opérateur
- injection
- séparation chromatographique
- détection

II-4-4-1-Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Principe de la CCM :

Le principe de séparation des composés par CCM est proche de celle en HPLC. Le principal intérêt de la CCM est l'identification rapide des composés d'un mélange. En contre partie, l'analyse est uniquement qualitative et ne permet pas le dosage d'un composé.

La **chromatographie sur couche mince** s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange à étudier est ensuite posé à l'aide d'un capillaire (pipette Pasteur par exemple ou micropipette) à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés, Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés :

La plaque de chromatographie est lue directement si les composés sont visibles (colorés), ou placée sous une lumière UV si ils sont fluorescents. Ils peuvent également être révélés en pulvérisant un révélateur qui réagira chimiquement avec les produits (en les détruisant) et dont le résultat sera coloré. (ex : une solution d'acide sulfurique puis chauffé dans une étuve).

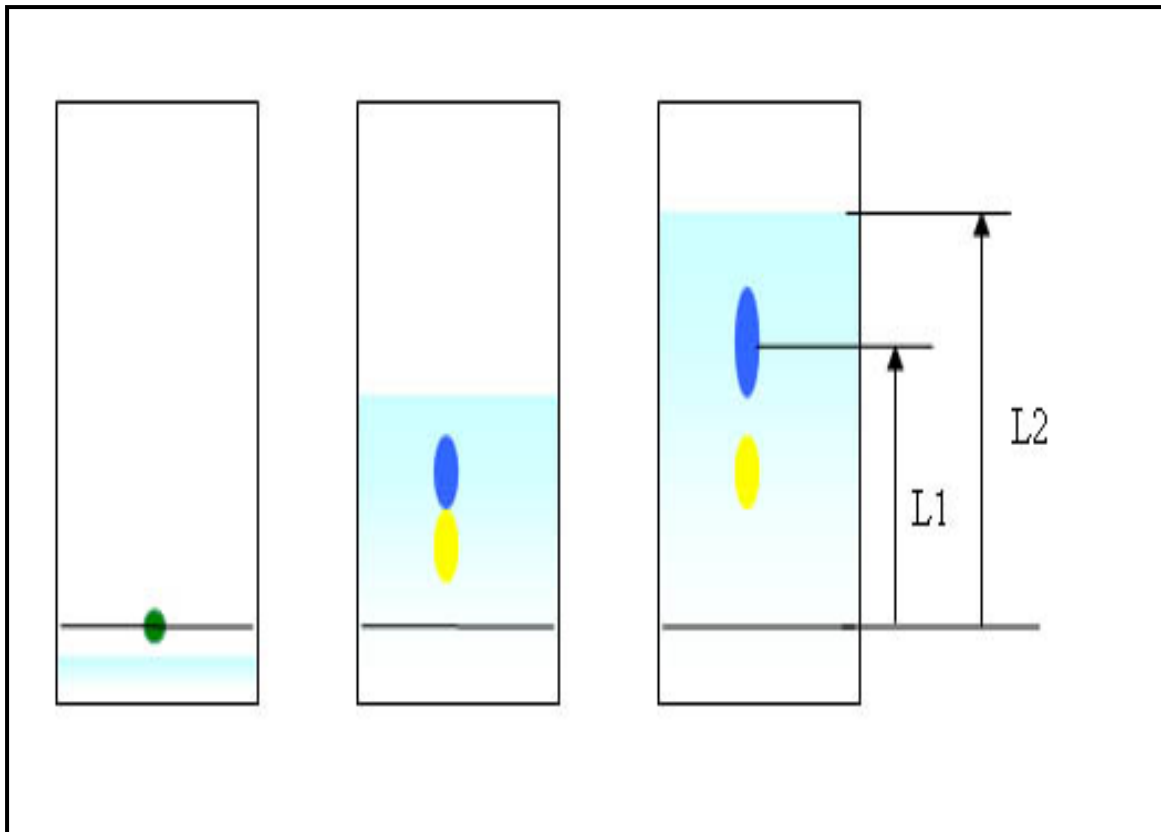


Figure 3 : Exemple d'éluion en CCM :

Nous déterminerons ensuite, le ratio frontal $R_f = L1/L2$, ce dernier étant le rapport entre la distance parcourue par le soluté, divisé par la distance parcourue par le front du solvant. Ce paramètre, nous informera sur la bonne séparation des composés.

II-4-4-2- La chromatographie liquide sur colonne :

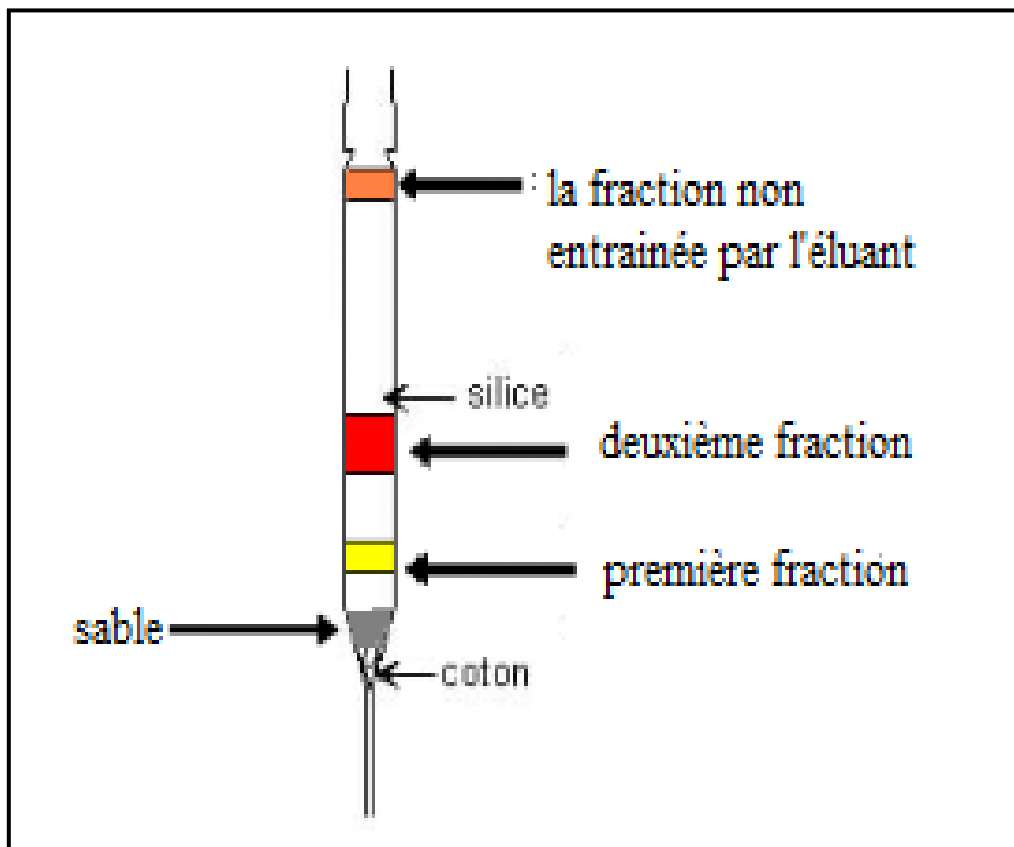
Le résultat de la séparation de notre mélange de composés en CCM, est déterminant quand au choix de l'éluant à utiliser pour la séparation et la purification à grande échelle par chromatographie liquide sur colonne , mais il faut être vigilant, car la CCM n'est pas toujours reproductible sur colonne, elle donne seulement une approche approximative et grossière de ce que nous pouvons avoir comme paramètres de séparation sur cette dernière, notamment sur le choix de la phase mobile utilisée, son volume, le diamètre de la colonne utilisée et l'ordre d'éluion des fractions des produits séparés.

Principe :

Comme pour la CCM, le principe est simple, prendre une colonne en verre de diamètre adéquat (en fonction de la quantité du mélange à purifier ou séparé et des R_f), ouverte à l'une

de ses extrémité et ayant un robinet d'arrêt à l'autre, ensuite fermer l'entrée du robinet à l'aide d'un coton et la conditionner d'abord avec une couche de sable d'environ 2cm, ensuite avec 20cm de silice ordinaire ou flash (cela dépend du type de séparation voulu), bien tasser le tout et terminer par une deuxième couche de sable, la phase stationnaire ainsi préparée, doit être bien solvatée avec la phase mobile plusieurs fois jusqu'à ce qu'elle devienne homogène. Une fois la colonne prête, le mélange d'analytes dissouts, est concentré et transvasé uniformément sur la couche de sable à l'aide d'une pipette ou canule, puis, une fois les produits absorbés par le sable, l'éluant commence à être déversé de façon à ce que la colonne soit toujours remplie et les composés commencent à migrer dans la colonne à différentes vitesses et se séparent ainsi en fractions colorées, qui seront collectées et pesées indépendamment. Elles pourront ensuite servir à d'autres analyses ou préparations.

Figure 4 : Dessin d'une colonne de chromatographie liquide.



3. L'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel

a. Principe

La stratégie la plus courante est de séparer dans un premier temps les protéines par électrophorèse bidimensionnelle sur un gel de polyacrylamide (ou **2D - PAGE - "two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis"**) hautement résolutive, elle représente donc une méthode de choix, puisqu'elle permet de séparer simultanément plusieurs milliers de polypeptides d'un mélange complexe en fonction de deux propriétés différentes : la **charge électrique** et le **poids moléculaire**.

Du fait de leur composition en acides aminés, les protéines diffèrent les unes des autres par leur **masse molaire** et leur **charge nette** à un pH donné. La charge nette est caractérisée par le **point isoélectrique** ou **pI**.

Les protéines ont :

- des pI qui s'échelonnent de 2 (glucose-1-phospho-D-mannosylglycoprotéine phosphodiesterase) à 12 (cathepsine G)
- des masses molaires de 5 kDa à 590 kDa : **calossine** - 5322 acides aminés

L'une des difficultés majeures de la séparation est de trouver des conditions d'électrophorèse qui couvrent de telles gammes de propriétés physico-chimiques.

La séparation se fait en deux temps :

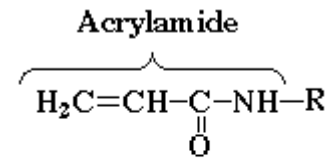
1ère dimension : une **isoélectrofocalisation (IEF)** où les polypeptides migrent jusqu'à **un pH égal à leur pI**.

Les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel présentant un gradient de pH continu. Au cours de cette étape, appelée **isoélectrofocalisation (IEF)**, elles migrent dans le gel jusqu'à une position où la valeur du pH est égale à celle de leur point isoélectrique (pI) où leur charge globale devient nulle. Cette première séparation est délicate et dépend beaucoup de la préparation des échantillons biologiques qui doit permettre une solubilisation maximale des protéines et empêcher leur agrégation et leur dégradation.

La séparation selon la charge utilisait auparavant des **ampholytes** pour obtenir un **gradient de pH**. Mais ce procédé n'était pas assez reproductible pour la comparaison de gels par superposition.

On utilise maintenant des **gradients de pH immobilisés (IPG)**, formés avec des **immobilines**.

Les immobilines sont des dérivés de l'acrylamide et leur structure générale est décrite dans la **figure ci-contre**.



**R = groupement tampon
acide faible ou base faible**

E. Jaspard (2009)

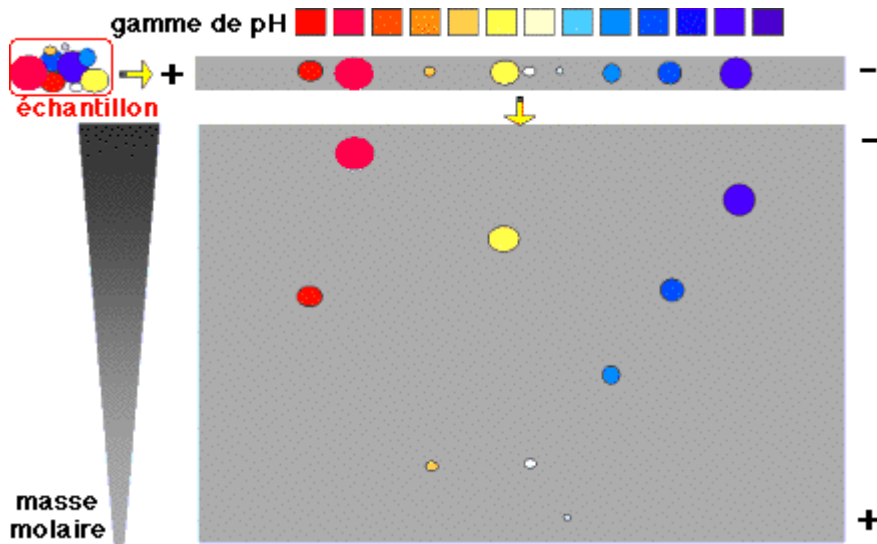
R correspond à un **groupement carboxyle** (acide) ou à une **amine tertiaire** (base) qui forment une série de molécules tampon avec différentes valeurs de pK_a d'ionisation (exemples : 3,6 - 4,4 - 4,6 - 6,2 - 7,0 - 8,5 - 9,3).

Les immobilines **co-polymérisent** avec les molécules d'acrylamide dans le gel d'**IEF** et le tout est donc **immobilisé**. Cette technique permet d'obtenir des gradients de pH reproductibles et très étroits

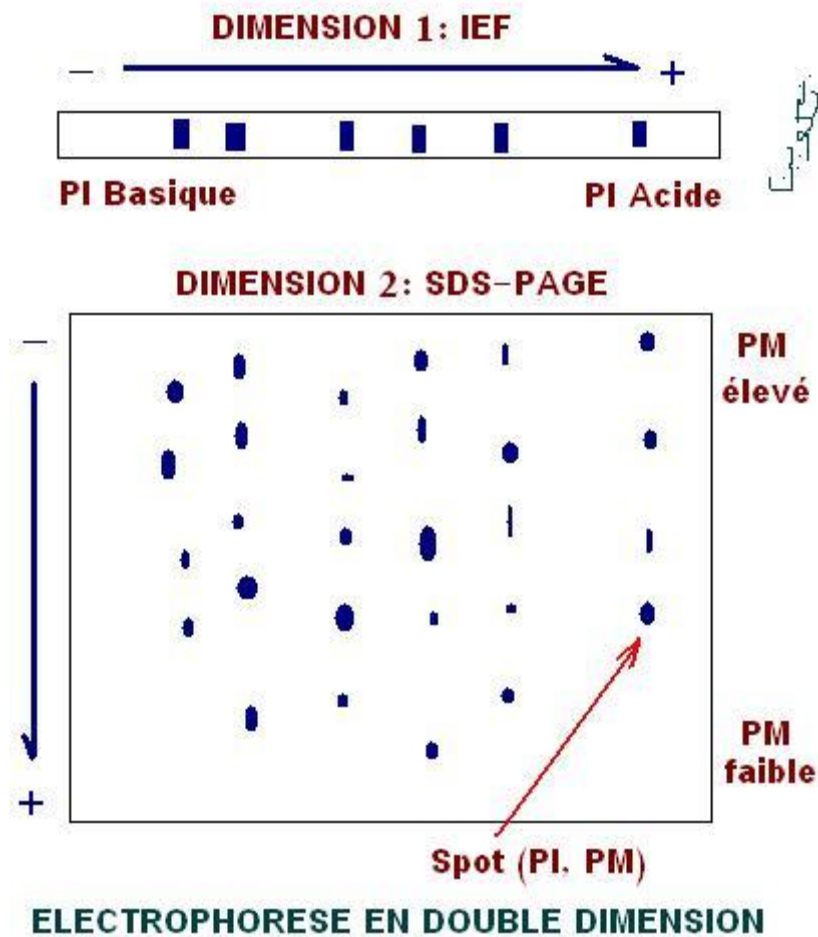
2ème dimension : les protéines sont séparées par la technique **SDS-Page** (sodium-dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). La résolution s'effectue sur un gel réticulé (poreux) constitué de polyacrylamide en présence d'un agent dénaturant, le sodium-dodécyl sulfate (SDS) et réduction des ponts disulfure. Grâce à la réticulation plus ou moins importante du gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées par tamisage moléculaire, leur vitesse de migration dans le gel étant inversement corrélée à leur taille. Comme pour l'IEF, plus le gel de deuxième dimension est grand, plus la résolution (et donc le nombre de spots séparés) augmente.

Ces deux électrophorèses sont effectuées de manière perpendiculaire l'une par rapport à l'autre.

Comme les paramètres de la séparation sont indépendants, cette technique est particulièrement résolutive : plusieurs centaines de chaînes polypeptidiques peuvent être séparées sous forme de taches de protéines (appelées aussi spots) sur un gel.



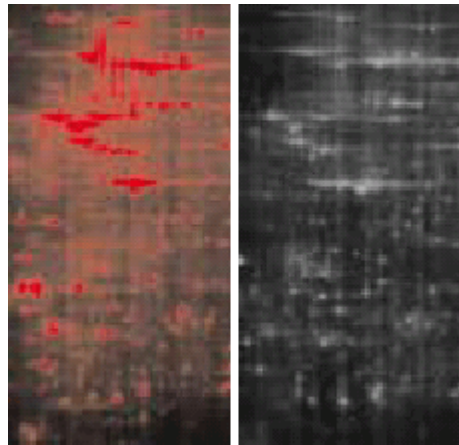
Source : Humboldt - Universität Berlin



b. Les méthodes de révélation des protéines :

Après l'électrophorèse 2D, les protéines séparées (de 100 ng à 0,1 ng de protéine par spot) sont détectées par coloration des gels. Plusieurs procédés de sensibilité différente existent et sont choisis en fonction de l'utilisation ultérieure des gels 2D:

- Bleu de coomassie : 30 - 50 ng, faible sensibilité, présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines.
- bleu colloïdal : 5 à 10 fois plus sensible
- nitrate d'argent : forte sensibilité (0,1 ng) (photo de droite **ci-contre**), elle présente néanmoins certains inconvénients : la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode.
- fluorophore "Sypro Orange, SyproRed, Sypro Ruby" : forte sensibilité (1 à 10 ng) (photo de gauche **ci-contre**), avec une reproductibilité, une facilité et une rapidité meilleures que celles de la coloration au nitrate d'argent.



Source :Sigma-Aldrich

- **l'autoradiographie des gels 2D** après incorporation dans les protéines d'isotopes radioactifs comme le ^{35}S ou le $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ est extrêmement sensible. En effet, elle permet de visualiser des quantités très faibles de protéines (de l'ordre de 1 à 100 pg).

Depuis les années 1970, les méthodes d'analyse des gels ont évolué grâce aux progrès combinés de l'informatique et de l'analyse d'images. La **digitalisation des gels** consiste en une transformation de l'image expérimentale en une information numérique utilisable par l'ordinateur. Les logiciels d'analyse d'image des gels (logiciel: "**ImageMaster 2D**") repèrent les spots et calculent leurs coordonnées et leur intensité.

La sélection des spots à prélever est transmise au couteau à gel. Les morceaux de gels sont déposés dans les puits de plaques à 96 puits.

