

La chromatographie, méthode d'analyse physico-chimique, sépare les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

Les différents types de techniques chromatographiques

La classification des chromatographies peut se faire en fonction des mécanismes de séparation. Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre les phases fixe et mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs, mais l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique.

Chromatographies en phase liquide (CPL ou CL ou encore LC pour liquid chromatography en anglais) Dans ce cas, la phase mobile est un liquide. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue :

Les chromatographies de partage.

La chromatographie de partage: C'est une chromatographie liquide-liquide. La phase stationnaire est un liquide fixé sur un support inerte (ex. : de l'eau sur la cellulose d'un papier). Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

La chromatographie d'exclusion: On l'appelle également chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche, les petites particules incluses diffusent dans les pores du gel.

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est

freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire

Les chromatographies d'adsorption

La chromatographie d'adsorption: C'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

La chromatographie d'adsorption en phase inverse: C'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

La chromatographie sur échangeurs d'ions: La phase stationnaire est un échangeur d'ions constitué par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

Cette chromatographie liquide-solide est basée sur la répartition des solutés entre l'adsorbant fixe et la phase liquide mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention (par adsorption) et à une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation.

La chromatographie d'affinité: La phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

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

- Affinité enzyme – substrat
- Affinité ligand – récepteur
- Affinité antigène – anticorps

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

Chromatographies en phase gazeuse (CPG ou CG, ou encore GC pour Gas chromatography en anglais) La phase mobile est un gaz appelé gaz vecteur ou encore gaz porteur. On distingue dans ce cas :

La chromatographie gaz-liquide: C'est une chromatographie de partage. La phase stationnaire est un liquide fixé par imbibition d'un support inerte.

La chromatographie gaz-solide: C'est une chromatographie d'adsorption. La phase stationnaire est un solide adsorbant.

La Chromatographie Liquide à Haute Performance HPLC

C'est en fait une chromatographie sur colonne, mais à haute pression, ce qui permet d'éviter toute perte de charge et de maintenir un débit constant. Hormis la chromatographie de partage, tous les types de chromatographie peuvent être adaptés à cette technique (exclusion, adsorption en phase normale et inverse, échange d'ions et affinité). Tous ces phénomènes sont directement liés à la surface de la phase stationnaire solide. Plus cette dernière est importante, plus il y a d'interactions avec le soluté et plus la séparation sera bonne. Il est donc intéressant d'utiliser des particules de phase stationnaire de la plus petite taille possible (meilleur empilement, plus grand rapport surface / volume). Pour augmenter la surface de contact entre la phase mobile et la phase fixe, on peut également simplement allonger la colonne, ce qui augmentera l'efficacité. Par contre, on ne désire pas de pertes de charges trop importantes, ni augmenter trop le temps d'analyse. L'ensemble de ces considérations explique l'usage d'une haute pression dans ce système. Cela dit, il est impossible de simplement pousser à l'infini la pression exercée dans la colonne, à cause de considérations mécaniques (écrasement de la phase stationnaire, entre autre). C'est une technique extrêmement intéressante et complémentaire à la CG, puisqu'elle permet l'étude de mélange dont les composants sont peu volatils ou qui se dégradent à haute température. Etant donné l'importance croissante de cette technique dans la plupart des laboratoires, nous allons nous attarder un peu sur elle.

La résonance magnétique nucléaire (RMN), dont les premiers travaux, vers 1945, sont dus aux physiciens Bloch et Purcell, est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance.

La meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique et en biochimie. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. Elle est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux, dont on ne saurait se passer. La RMN a longtemps été considérée comme trop peu sensible pour être adaptée aux analyses environnementales. Cette situation est en voie de changer comme en témoigne l'existence de techniques couplées de chromatographie liquide ou d'électrophorèse avec la RMN.

La résonance magnétique nucléaire a donné son nom à une méthode exceptionnelle pour résoudre les problèmes de détermination de structure des composés moléculaires organiques et de certains types de matériaux inorganiques. Les spectromètres de RMN sont donc souvent localisés dans les laboratoires de recherche, mais il existe d'autres appareils de mise en œuvre simplifiée faisant appel à ce même phénomène pour des applications de routine.

Cette méthode d'étude de la matière peut être décrite en ne choisissant que des exemples relevant du domaine de la chimie organique, l'élucidation des structures moléculaires ayant, en effet, toujours servi de moteur à son développement et aux nombreuses améliorations techniques depuis son origine.

La RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant.

Le document de base, fourni par ces appareils, est le spectre de RMN. Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance. Pour produire ces signaux, on utilise conjointement un second champ environ 10 000 fois plus faible que le précédent, en faisant appel à une source de radiations électromagnétiques du domaine des radiofréquences.

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur.

Pour comprendre l'origine de ces spectres, très différents des spectres optiques classiques, il faut faire appel au spin des noyaux.

Tout noyau atomique — de même que chaque particule subatomique — est caractérisé par un certain nombre de grandeurs intrinsèques, dont le spin. Ce paramètre vectoriel introduit en mécanique quantique, sans équivalent classique, permet, entre autres, d'expliquer le comportement des atomes dans les milieux où règne une orientation privilégiée. Le spin du noyau est à rapprocher du moment cinétique L de la mécanique classique.

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon. Les instruments correspondants sont les spectromètres de masse qui se répartissent en cinq catégories suivant leur conception. Certains dérivent des montages mis au point au début du siècle pour l'étude des particules ou des atomes ionisés soumis à un champ magnétique, tandis que d'autres font appel aux seuls champs électriques tels les « bench-top » souvent placés en aval d'une technique séparative (chromatographie par exemple). Les perfectionnements de ces appareils, leur miniaturisation ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, ont fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application par sa polyvalence et par son extrême sensibilité. Elle est présente dans des secteurs très divers : chimie organique et inorganique, biochimie, chimie clinique et environnementale, géochimie. Elle sert à toutes sortes d'analyses dans le but de déterminer la nature, la composition et même la structure éventuellement d'échantillons divers pour le respect des réglementations et dans l'industrie en général.

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Ces ions sont alors soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur rapport masse /charge, donc éventuellement leur nature.

L'électrophorèse sur gel est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques. Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ

électrique. Le préfixe « électro » fait référence à l'électricité et la racine « phorèse » vient du grec phoros, qui signifie « porter d'un côté à l'autre ».

L'électrophorèse fait référence à une technique où les molécules sont obligées de traverser une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. L'énergie motrice de l'électrophorèse est la tension qui est appliquée à des électrodes placées de part et d'autre de la couche de gel. Les propriétés d'une molécule déterminent la rapidité avec laquelle un champ électrique peut traverser un milieu gélatineux.

Lorsqu'une particule est placée dans un milieu fluide, elle est soumise à deux forces, celle de sédimentation, qui est la force gravitationnelle et la force opposée, qui est la force de friction et qui est proportionnelle à la vitesse de la particule. Ces forces agissent dans des directions opposées et finissent par se compenser, menant à un mouvement uniforme de la particule dans le milieu liquide (c'est à dire que la particule se déplace à une vitesse constante). Si le champ gravitationnel est remplacé par un champ électrique, une macromolécule peut y répondre de deux façons différentes. Si la molécule est chargée, elle va migrer dans le champ électrique, vers l'électrode de charge opposée. C'est le principe sur lequel repose l'électrophorèse. Si la molécule a une distribution de charge asymétrique (c'est à dire possède un moment dipolaire permanent), la molécule va tendre à s'orienter dans un champ électrique. Ce principe fournit les bases des techniques de biréfringence électrique et de dichroïsme. Nous ne discuterons toutefois que de l'électrophorèse.

Considérons le simple cas d'une particule chargée (+Q) se déplaçant dans un champ électrique (E) dans un milieu non conducteur, tel que l'eau. Si la particule se déplace à une vitesse constante vers l'électrode négative, la force nette (F_{tot}) s'exerçant sur la particule est nulle (puisque $F = m \cdot a$, et que l'accélération de la particule (a) est nulle à vitesse constante). Deux forces sont exercées sur la particule, l'une F_E est la force exercée par le champ électrique sur une particule chargée, laquelle s'exerce dans la même direction que le déplacement de la particule, et l'autre, F_f est la force de friction qui tend à freiner le déplacement vers l'électrode négative, et donc s'exerce dans la direction opposée au déplacement. Dès lors $F_{tot} = F_E + F_f = 0$ (1) où $F_E = QE$ (2) est la force électrique et $F_f = -fv$ (3) est la force de friction, avec v, la vitesse de la particule et f, une constante appelée coefficient de friction. L'équation (3) montre que la force F_f s'opposant au déplacement vers l'électrode négative est proportionnelle à la vitesse de la particule. Il paraît, en effet, intuitivement logique de s'attendre à ce que la force de friction s'opposant au mouvement augmente lorsque la vitesse augmente. Le coefficient de

friction dépend de la taille et de la forme de la molécule. Plus la molécule est grande, plus le coefficient de friction est grand. Il peut être démontré que le coefficient de friction pour une particule sphérique est donné par $f = 6 \pi \eta R_s$ (4) où η est la viscosité et R_s (rayon de Stokes) est le rayon de la sphère hydratée.

De (1), (2) et (3), on déduit que $FE = Ff$, c'est à dire $QE = fv$. Donc $v/E = Q/f = U =$ mobilité électrophorétique ou encore, $U = v/E = Q/6 \pi \eta R_s$ (6).

C'est pourquoi la mobilité électrophorétique U est proportionnelle à la densité de charge (charge/taille, Q/R_s) de la particule. Les macromolécules de différentes densités de charge peuvent donc être séparées par électrophorèse. Cette discussion se rapporte au cas le plus simple, puisque en réalité, il y a des contre-ions dans la solution qui forment un nuage entourant la macromolécule chargée, lequel "protège" partiellement la macromolécule chargée du champ électrique E .

Les électrophorèses modernes sont conduites dans des gels solides (p. ex. polyacrylamide), qui sont formés à partir de solutions d'acrylamide liquide après addition d'un agent de polymérisation, comme nous le verrons un peu plus en détail ultérieurement. Le gel solide est poreux aux molécules de solvant et de soluté et sert de milieu pour l'électrophorèse, tout en aidant à éliminer les forces de convection dans le liquide, qui interfèreraient avec la séparation.

Une complication qui affecte la description de l'électrophorèse que nous venons de faire, dans les gels de polyacrylamide, résulte du fait que les gels ont des pores à travers lesquels les macromolécules se déplacent. Les molécules les plus petites peuvent passer plus facilement à travers les pores que les grosses molécules, il y a donc un effet de tamisage additionnel qui contribue à la mobilité effective. Cet effet de tamisage du gel tend à augmenter le pouvoir de résolution de cette technique.

Y a-t-il un moyen d'obtenir des informations sur la masse moléculaire, en plus de la détermination de la pureté, sur un seul gel ? Qu'arrivera-t-il si deux protéines différentes, de même masse moléculaires et de même charge totale nette, mais ayant des formes différentes, sont analysées sur un seul gel d'acrylamide ? Celle qui possède la forme la plus allongée (rayon de Stokes élevé) aura la plus faible mobilité électrophorétique ($U = Q/6\pi\eta R_s$). Un R_s plus élevé va également rendre plus délicate la pénétration dans les pores.

Donc, la mobilité électrophorétique et les effets de tamisage vont tous deux rendre le déplacement de cette protéine anormalement lent et donc lui donner une masse moléculaire apparente plus élevée. On peut également imaginer le problème que va poser l'analyse de deux protéines globulaires de différentes tailles, mais avec des différences de charges qui

compensent, de sorte que les deux protéines vont migrer à la même vitesse dans le gel. Une technique permettant d'éviter ces problèmes consiste à réaliser l'électrophorèse dans des conditions dénaturantes, ce dont nous allons parler ultérieurement. En résumé, la technique d'électrophorèse permet, entre autre, de :

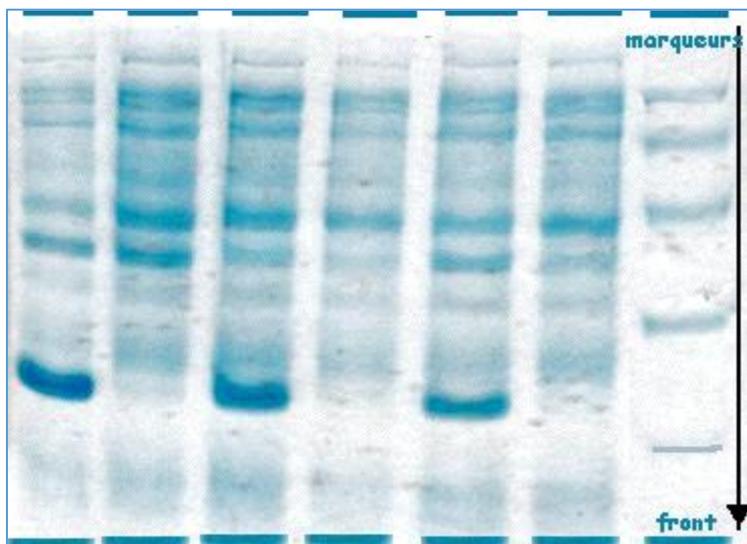
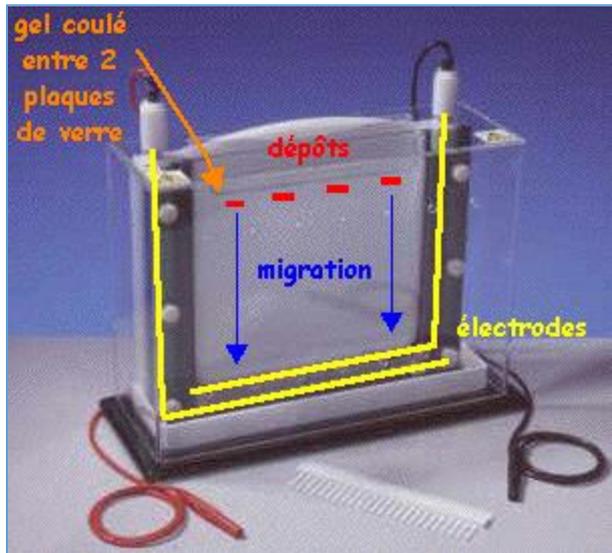
- Déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse respective
- D'évaluer le degré de purification d'une protéine
- De séparer des protéines pour les révéler par la technique de Western blot
- De séparer des protéines sur des gels bi-dimensionnels, selon 2 paramètres : point isoélectrique (isofocalisation), puis masse molaire
- De séquencer l'ADN
- De déterminer la taille de fragments d'ADN
- De séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique de Northern blot (ARN) ou de Southern blot (ADN)
- D'établir le profil de restriction (hydrolyse par des enzymes de restriction) de fragments d'ADN

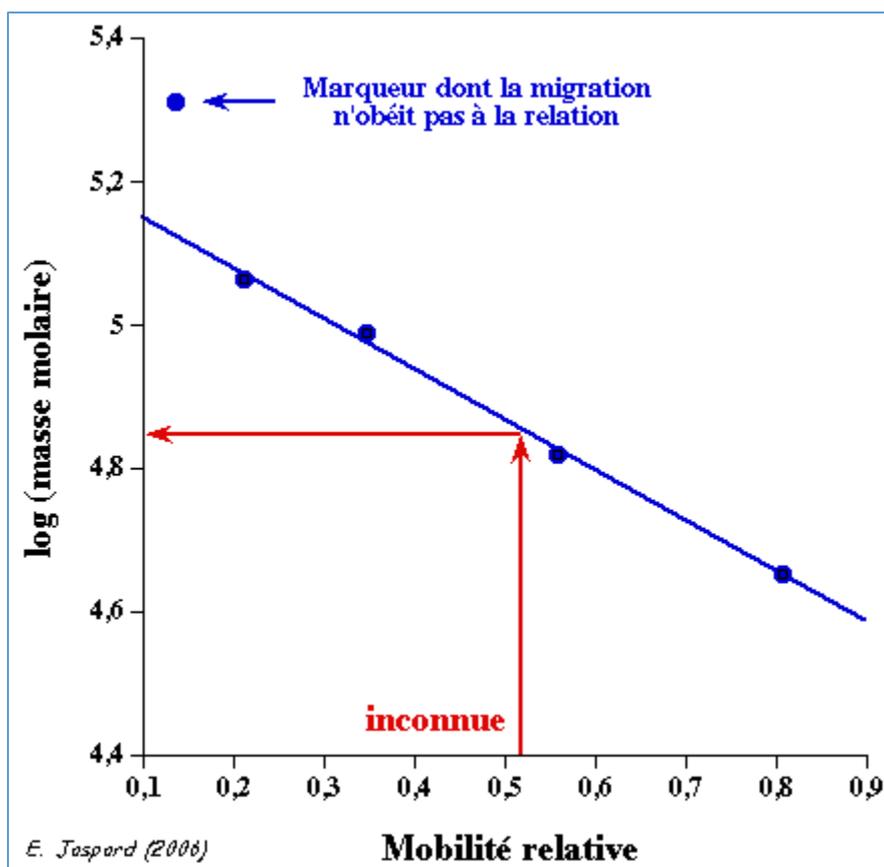
Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans les puits. La plupart des protéines n'absorbent pas la lumière dans les longueurs d'onde visible, elles ne seront donc pas visibles durant la migration. Pour s'assurer que les protéines ne soient pas éluées dans le réservoir inférieur (analyse trop longue) un colorant anionique de faible masse moléculaire, le bleu de bromophénol, est ajouté aux protéines avant qu'elles ne soient placées sur le gel. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le colorant approche de l'extrémité inférieure du gel de migration. A noter également que l'on ajoute un peu de glycérine à l'échantillon de protéines pour rendre cette solution plus dense que le tampon, ce qui va lui permettre de se déposer dans le fond du puits plutôt que de diffuser dans le tampon d'électrophorèse. Après migration, le gel est démoulé. Les protéines sont fixées dans le gel par une solution qui contient du méthanol et de l'acide acétique qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel. Les protéines sont révélées par une coloration : par exemple avec le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent (10 à 50 fois plus sensible). On peut également modifier les protéines avec un marqueur fluorescent ou radioactif, avant séparation par électrophorèse, ce qui augmente encore la sensibilité.

On obtient différentes bandes pour chaque puits. La masse molaire des protéines est déterminée à l'aide de marqueurs qui sont des protéines standards de masses molaires connues.

Exemple de marqueurs :

- Myosine (205 kDa)
- b-galactosidase (116 kDa)
- Phosphorylase (97,4 kDa)
- Albumine (66 kDa)
- Ovalbumine (45 kDa)
- Anhydrase carbonique (29 kDa)





Détermination de la masse molaire d'une protéine

La mobilité relative est le rapport entre la distance de migration d'une bande et la distance de migration du front de migration. La droite $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$ permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

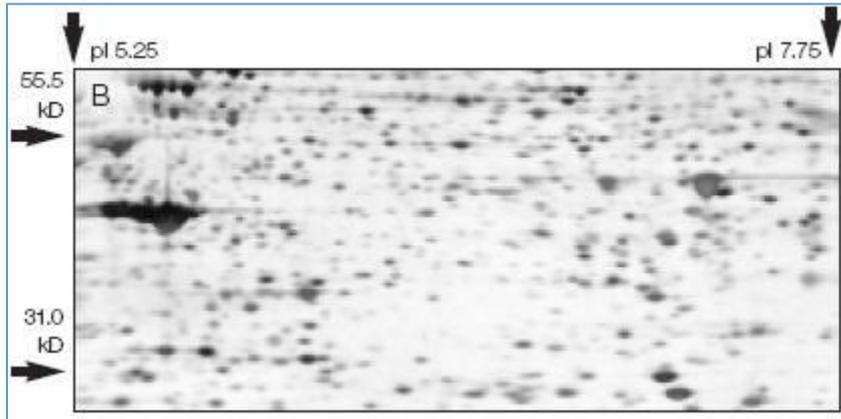
Variations sur le thème de l'électrophorèse

-Electrofocalisation

Dans cette technique, un gradient de pH est établi à l'intérieur du gel de polyacrylamide. Ce gradient est établi par préélectrophorèse d'une série de molécules de faibles masses moléculaires contenant des groupes aminos et carboxyles appelés ampholytes. Lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique, la plus négative des espèces va se concentrer à l'électrode positive, alors que la plus positive va se concentrer à l'électrode négative. Les ampholytes intermédiaires vont se répartir entre eux, avec comme résultat global une migration des ampholytes vers leur point isoélectrique et l'établissement d'un gradient linéaire de pH dans le gel. Une protéine analysée sur ce type de gel va migrer jusqu'au pH correspondant à son point isoélectrique et s'y arrêter.

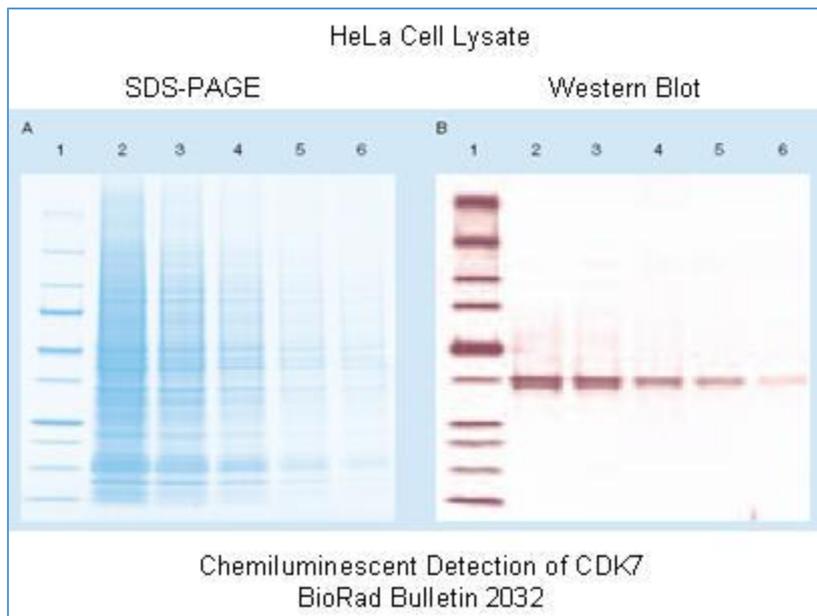
-Electrophorèse à 2D

Cette technique consiste typiquement à soumettre les protéines à une électrofocalisation dans un gel de polyacrylamide coulé dans un tube cylindrique étroit. Après cette électrophorèse, le tube de gel est enlevé et placé au-dessus d'un gel de concentration et soumis à une SDS-PAGE classique dans une direction de 90° par rapport à l'expérience d'électrofocalisation initiale. Si les protéines sont obtenues à partir de cellules marquées à la ³⁵Met, un gel 2 D représentant toutes les protéines produites par une population cellulaire donnée, peut être obtenu.



Western blot :

Après une électrophorèse standard sur plaque, le gel est recouvert d'une membrane de nitrocellulose. Le sandwich de gel et de membrane est replacé dans une chambre d'électrophorèse, de sorte que les protéines migrent du gel vers la nitrocellulose, où elles se lient irréversiblement. La membrane peut alors être ôtée et trempée dans une solution contenant un anticorps de la protéine d'intérêt. Ce complexe protéine-anticorps, formé sur la membrane peut alors être détecté par ajout d'un anticorps marqué et qui se lie sur le premier anticorps utilisé (celui qui est à présent lié à la protéine d'intérêt).



-Gel d'électrophorèse d'ADN

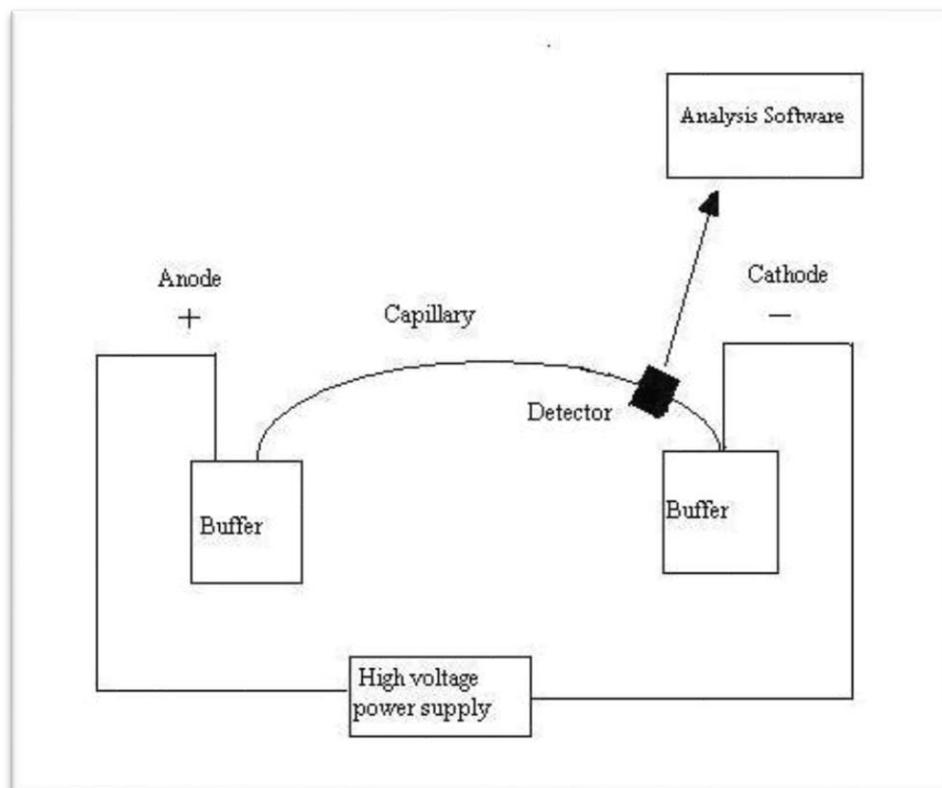
La séparation de brins d'ADN ou d'ARN par électrophorèse repose sur le même principe que celle des protéines, si ce n'est que cette fois, c'est la charge négative des groupes phosphates portés par l'ADN et l'ARN qui provoquent leur migration vers l'électrode positive. Pour le séquençage de l'ADN et pour les analyses de brins de petites tailles, on peut utiliser des gels de polyacrylamide, comme pour les protéines, par contre, en général, pour de simples analyses de restrictions ou pour évaluer le résultat d'une PCR, on préférera utiliser des gels d'agarose.

Outre l'utilisation d'un gel d'agarose à la place d'un gel de polyacrylamide, l'autre différence notable entre la séparation de protéines et la séparation d'ADN par électrophorèse réside dans la géométrie de la cuve à électrophorèse, qui est, en général, horizontale dans le cas de l'ADN.

-L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative plus récente que la chromatographie, qui correspond à une amélioration technologique considérable de la méthode d'électrophorèse de zone, dont nous venons de parler, grâce aux acquis de la CLHP. Elle se caractérise par un grand pouvoir de séparation, une excellente sensibilité, et par la possibilité de quantifier aussi bien les petites molécules que les biomolécules pour lesquelles la CLHP est beaucoup moins performante. Utilisée en divers modes, l'électrophorèse capillaire prend le nom d'ionophorèse lorsqu'il s'agit de l'analyse des ions inorganiques. En bref, elle a considérablement étendu le champ d'application de l'électrophorèse à bandelette, dont elle permet d'éliminer les tâches manuelles associées à la

manipulation des gels, ainsi que l'étape subséquente de scannérisation des électrophorégrammes.



Dans cette technique, le gel classique est remplacé par un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice (quartz fondu, verre extrêmement pur appelé parfois Silice UV) de très faible diamètre (30 à 100 μm) d'une longueur variant de 0,3 à 1 m et rempli d'une solution tampon. Les extrémités plongent dans deux réservoirs d'électrolyte, auxquels on applique une différence de potentiel pouvant atteindre 30 kV pendant le temps nécessaire.

L'intensité du courant, dans ces conditions, ne dépasse pas 100 μA , soit une puissance dissipée d'un maximum de 3 W, ce qui limite l'échauffement du capillaire qui doit néanmoins être placé dans une enceinte thermostatée. L'électrolyte est un mélange soigneusement filtré et dégazé contenant divers additifs.

Un détecteur est placé un peu avant l'extrémité du capillaire. En mode de détection UV, le capillaire sert directement de cellule de mesure de l'absorbance. On évite ainsi tout volume mort et le mélange des composés séparés. Le trajet optique étant extrêmement faible, on peut l'augmenter en utilisant un capillaire avec bulbe ou en faisant la détection à l'intérieur d'un Z, mais ces deux procédés diminuent bien entendu la résolution de la méthode. On peut également réaliser une détection électrochimique, des électrodes étant alors insérées dans le capillaire. Finalement, la détection peut se faire par spectrométrie de masse.