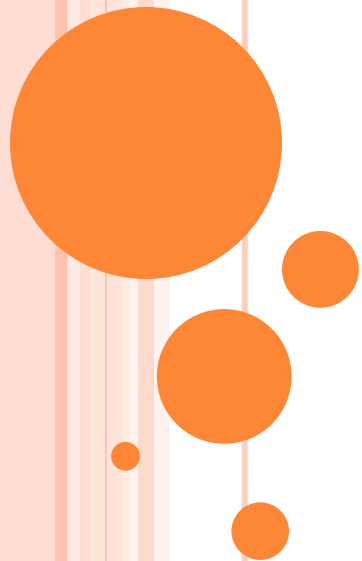
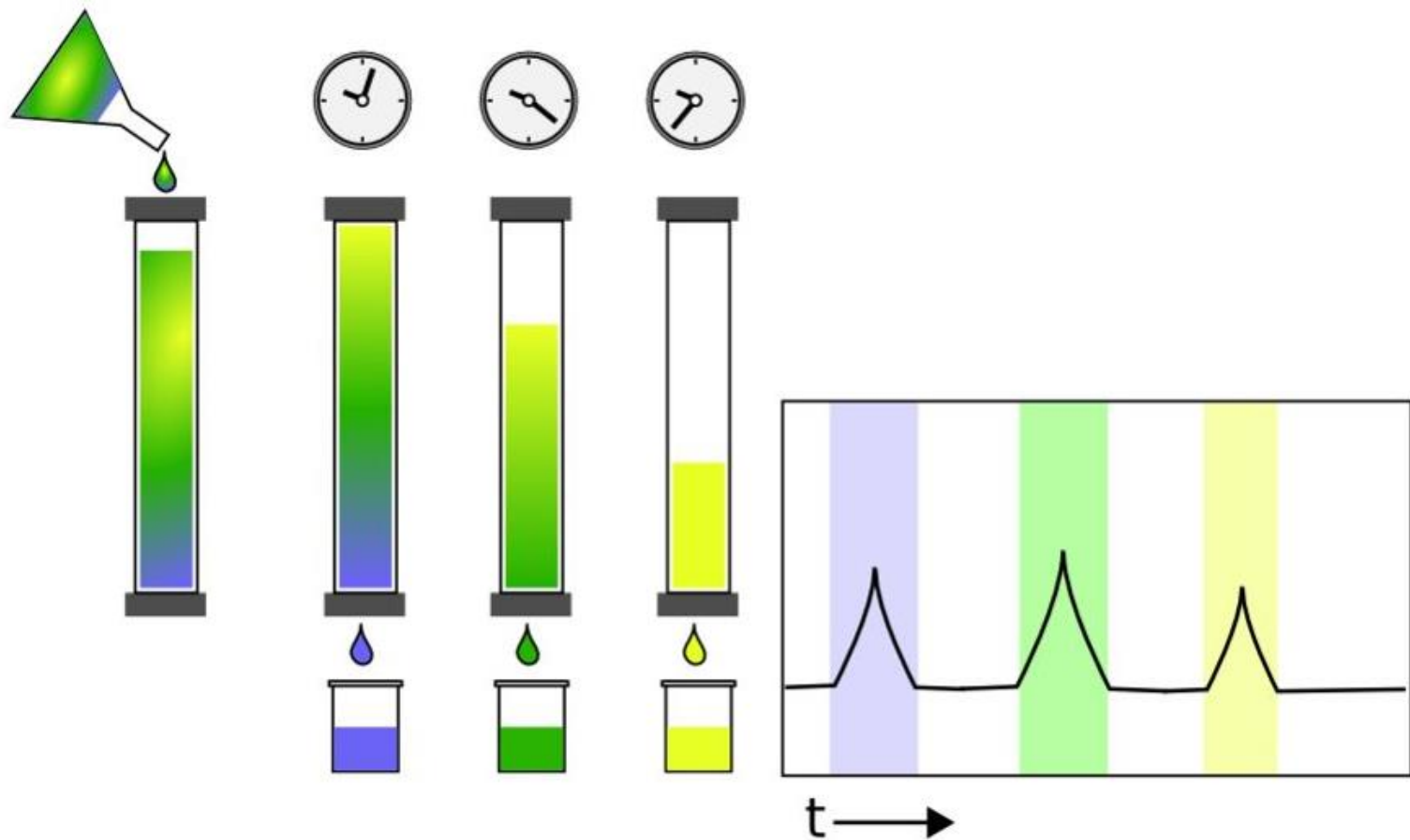




CHROMATOGRAPHIE



CHROMATOGRAPHIE: MÉTHODE ANALYTIQUE



Séparation des biomolécules → répartition parmi 2 phases:
mobile (liquide/gaz) et stationnaire (solide)

INTRODUCTION

○ Définitions

- **Soluté**: molécule faisant partie d'un mélange à séparer
- **Phase mobile**: vecteur (liquide/gaz) qui déplace les solutés;
éluant: phase mobile liquide
- **Phase stationnaire**: milieu fixe qui interagit avec certains solutés
- **Coefficient de partage**: rapport des solubilités relatives du soluté dans les 2 phases

$$\frac{\text{[soluté] dans la phase stationnaire}}{\text{[soluté] dans la phase mobile}}$$

- **Colonne chromatographique**: tube pour les séparations chromatographiques
- **Adsorption**: adhérence des molécules sur une surface pourvue de sites de liaison spécifique avec chaque soluté.

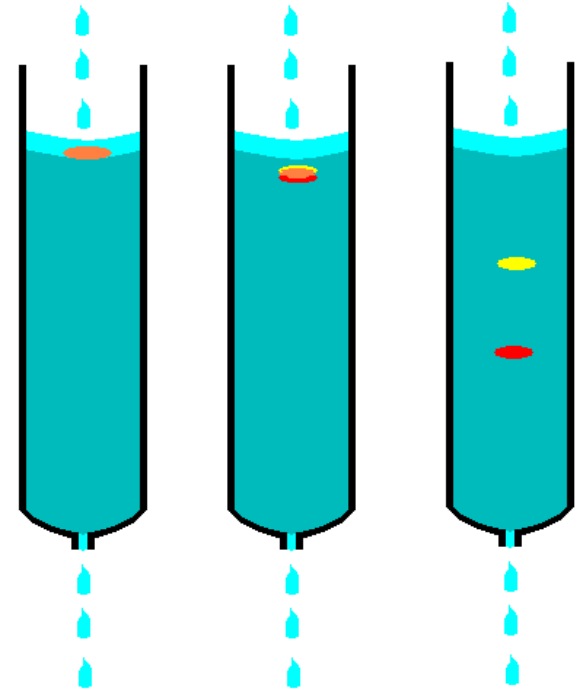
PRINCIPE GÉNÉRAL

○ Comment agissent les 2 phases?

- **Phase mobile:** déplacement des solutés à travers la phase stationnaire
- **Phase stationnaire:** affinité envers certains solutés

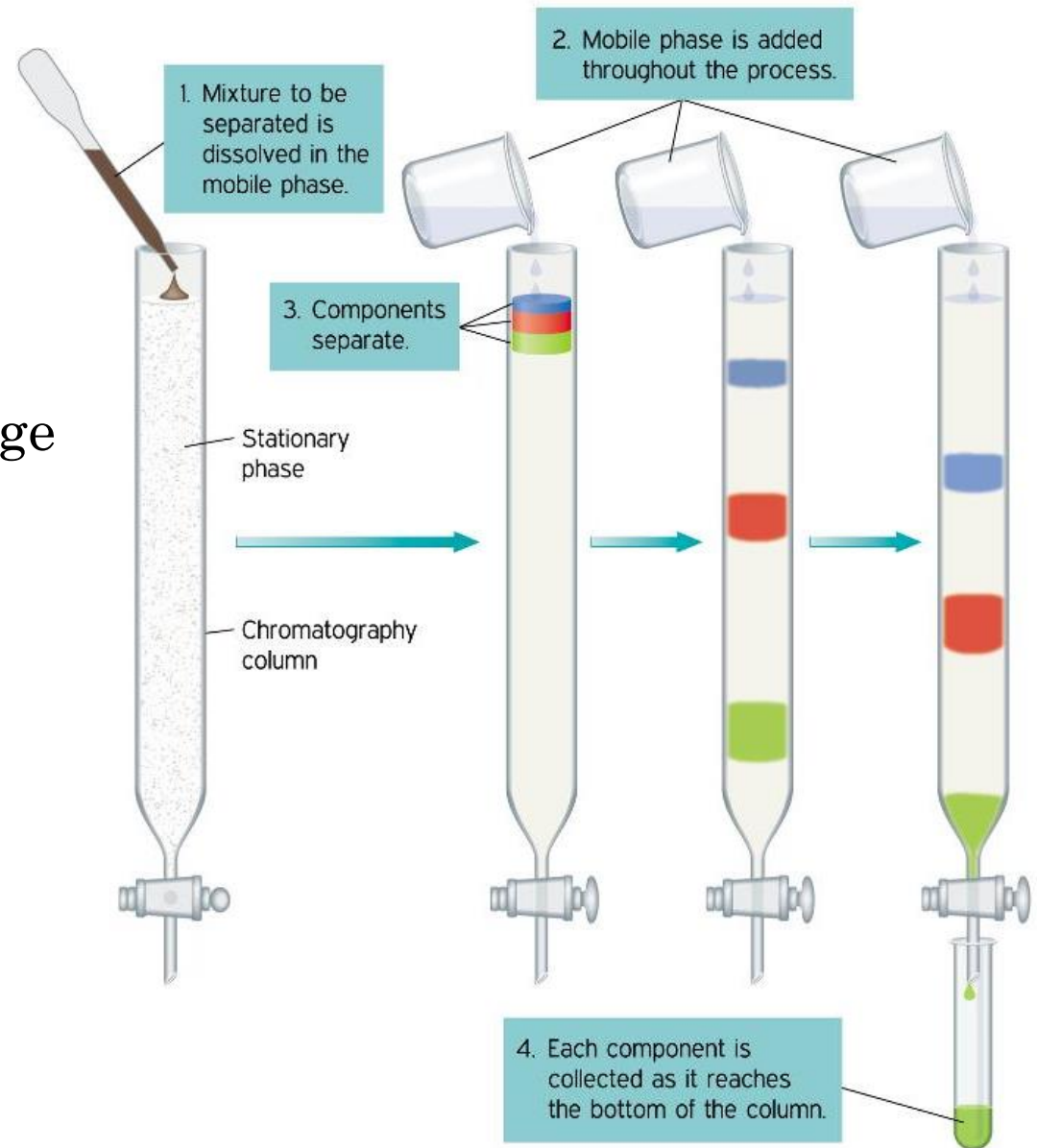
○ Séparation des solutés: migration à des vitesses différentes

- Retard des solutés préférentiellement adsorbés sur la phase stationnaire
- Avancée des solutés à faible affinité pour la phase stationnaire, mais bonne solubilité dans la phase mobile.

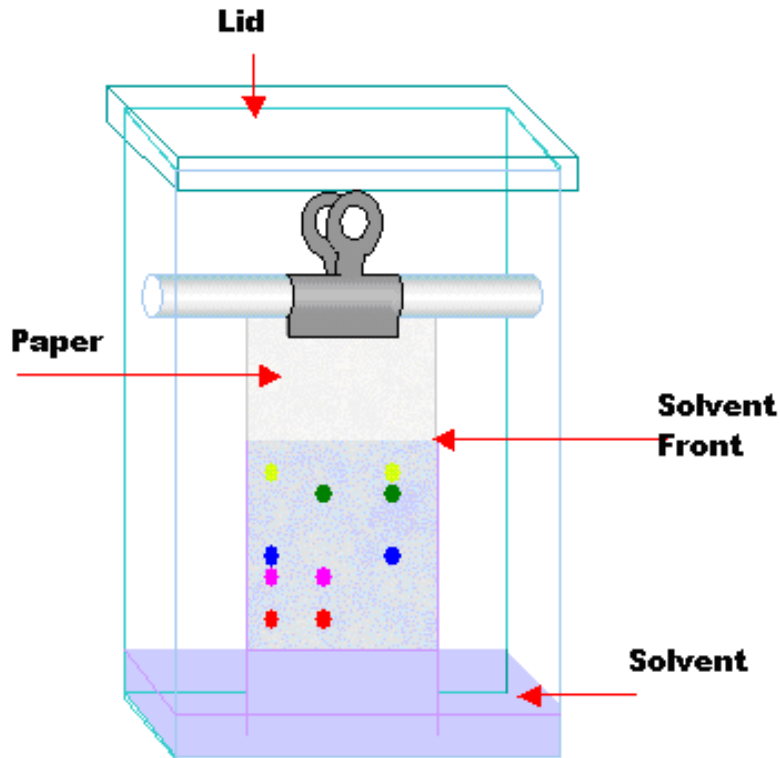


OBJECTIFS

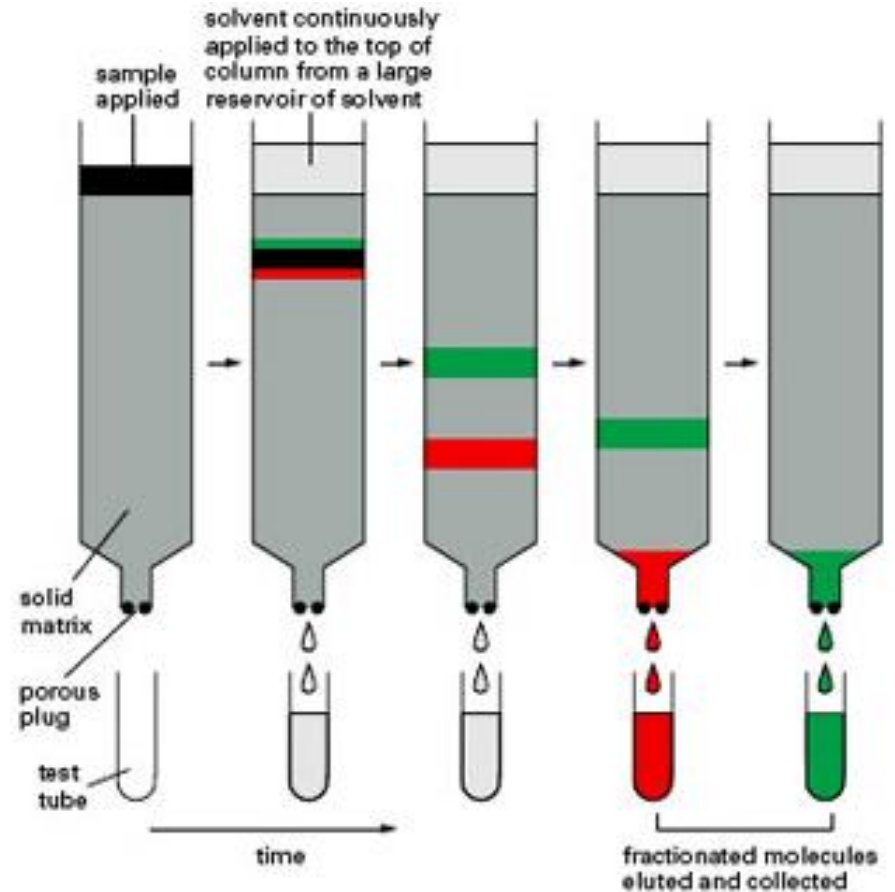
- **Objectif analytique:**
analyse qualitative et quantitative d'un mélange
- **Objectif préparatif:**
purification d'un soluté d'intérêt → analyses ultérieures.



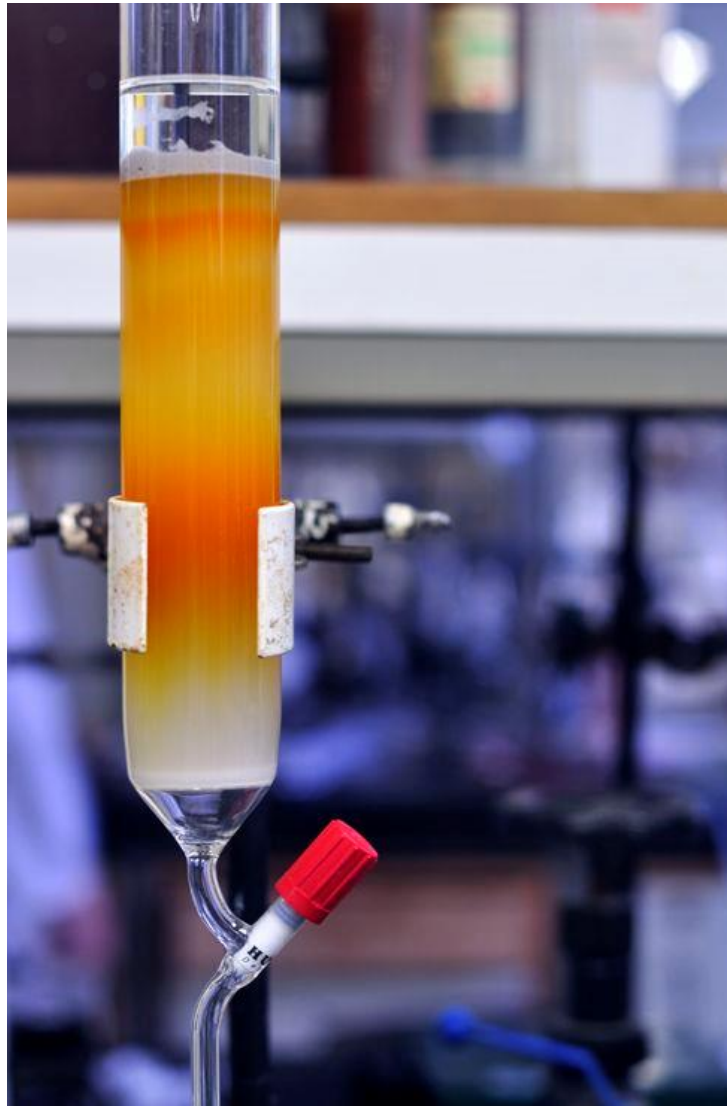
VARIANTES



Chromatographie de partage sur couche mince



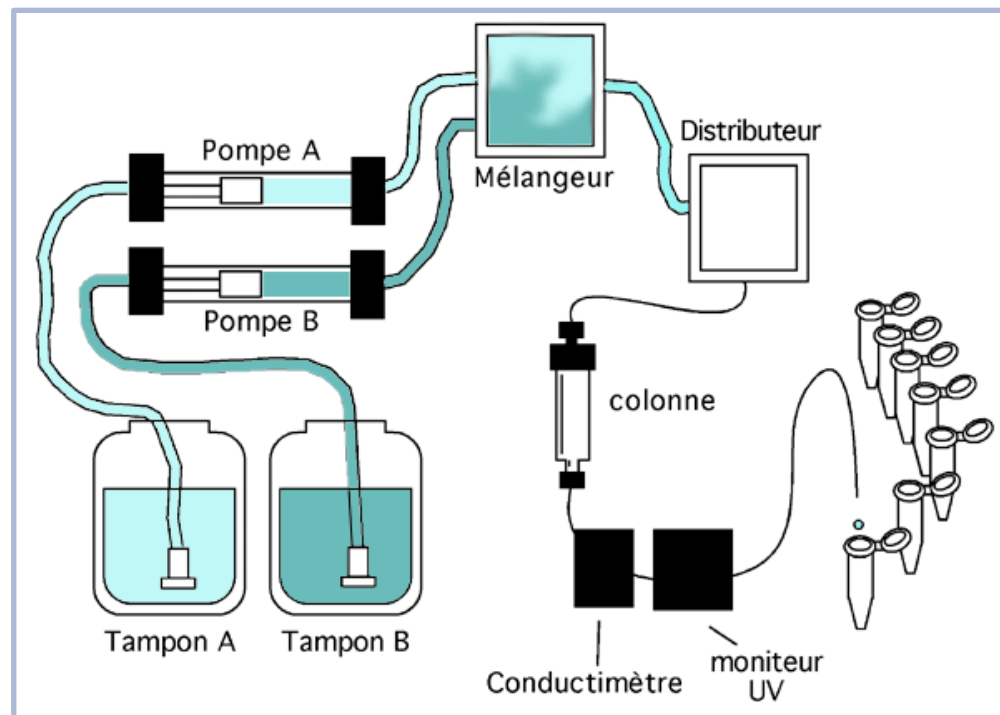
Chromatographie sur colonne



CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

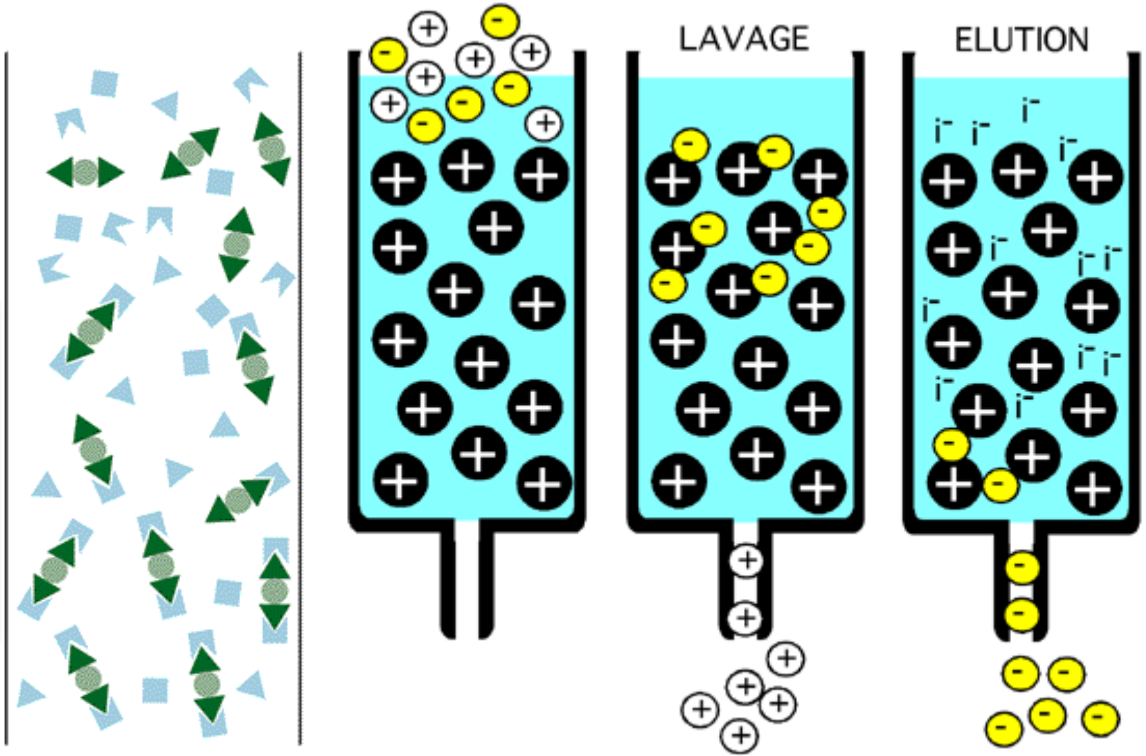
CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

- **Phase stationnaire**: solide adsorbant/support inerte imprégné de liquide → interaction spécifique avec certains solutés
- **Phase mobile**: liquide/gaz (pression ordinaire / haute pression)
- **Fractions**: tubes collecteurs remplis d'un volume fixe d'éluât
- **Elution**: recueil des fractions à la sortie de la colonne
- **Identification des solutés**: spectrophotométrie, fluorimétrie...



VARIANTES DE SÉPARATION SUR COLONNE

Chromatographie d'affinité: phase stationnaire → sites de liaison spécifique avec certains solutés

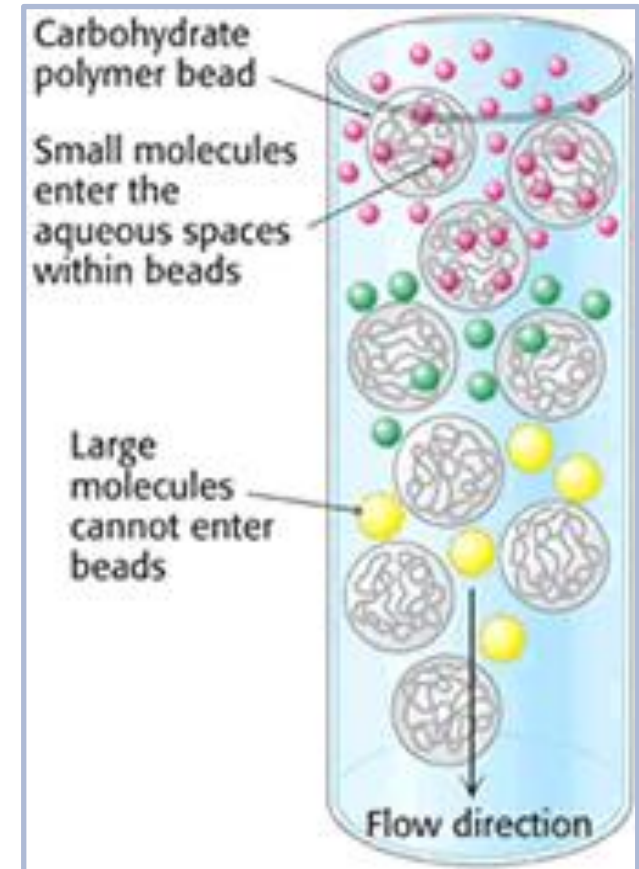
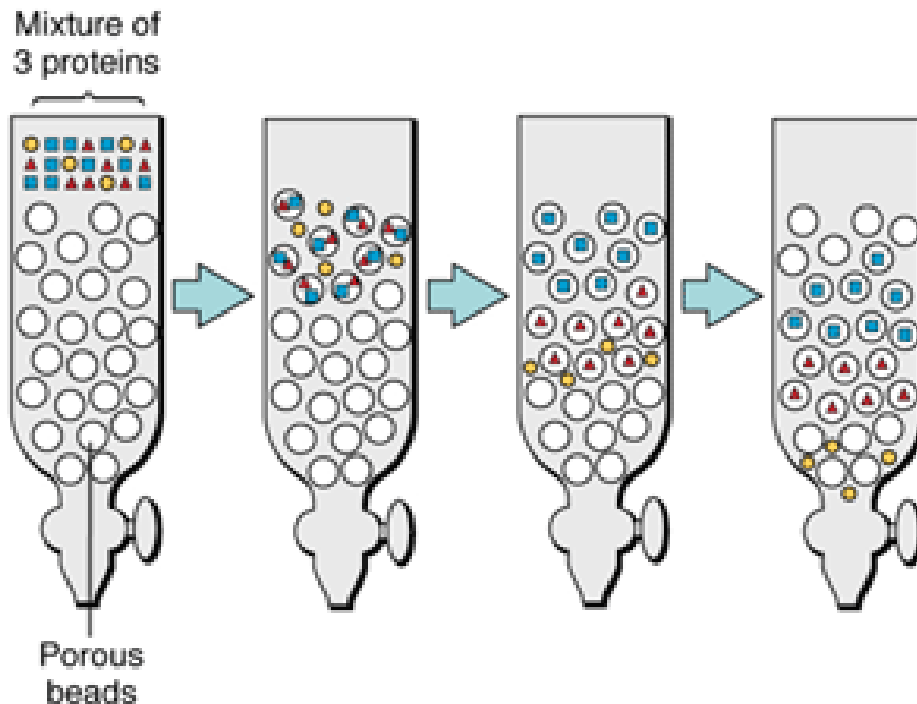


- Support material with bound "bait protein"
- Unknown protein that interacts with "bait"
- Unknown proteins that do not interact with "bait"

Chromatographie par échange d'ions: phase stationnaire → résine échangeuse d'anions / cations → séparation des solutés chargés

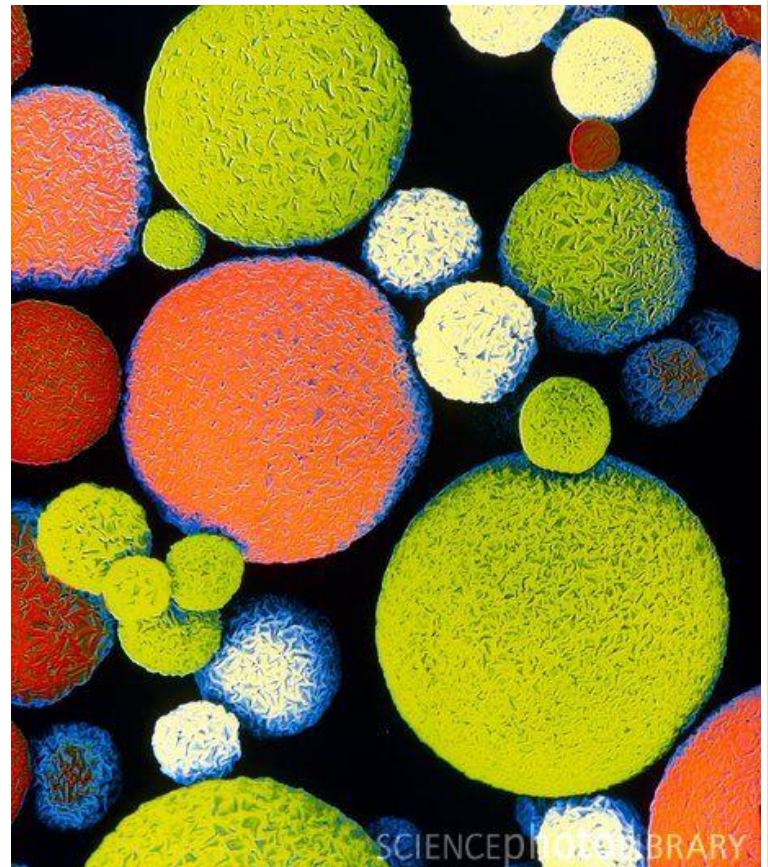
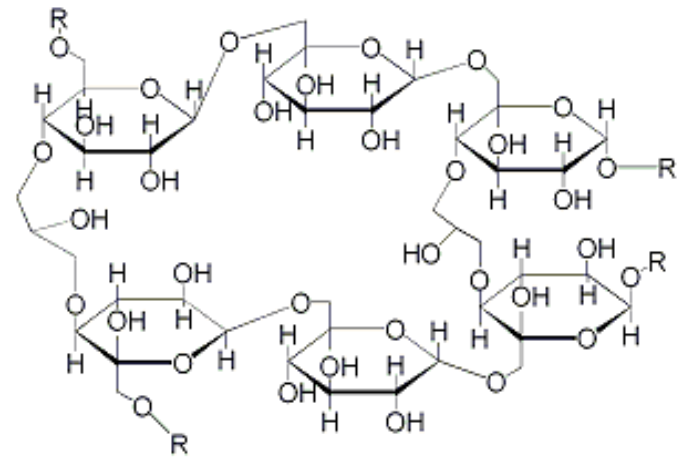
CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL

- **Principe**: méthode de séparation des solutés selon leur taille (\approx poids moléculaire)
- **Phase stationnaire** (gel): résine poreuse \rightarrow ralentissement des micromolécules.

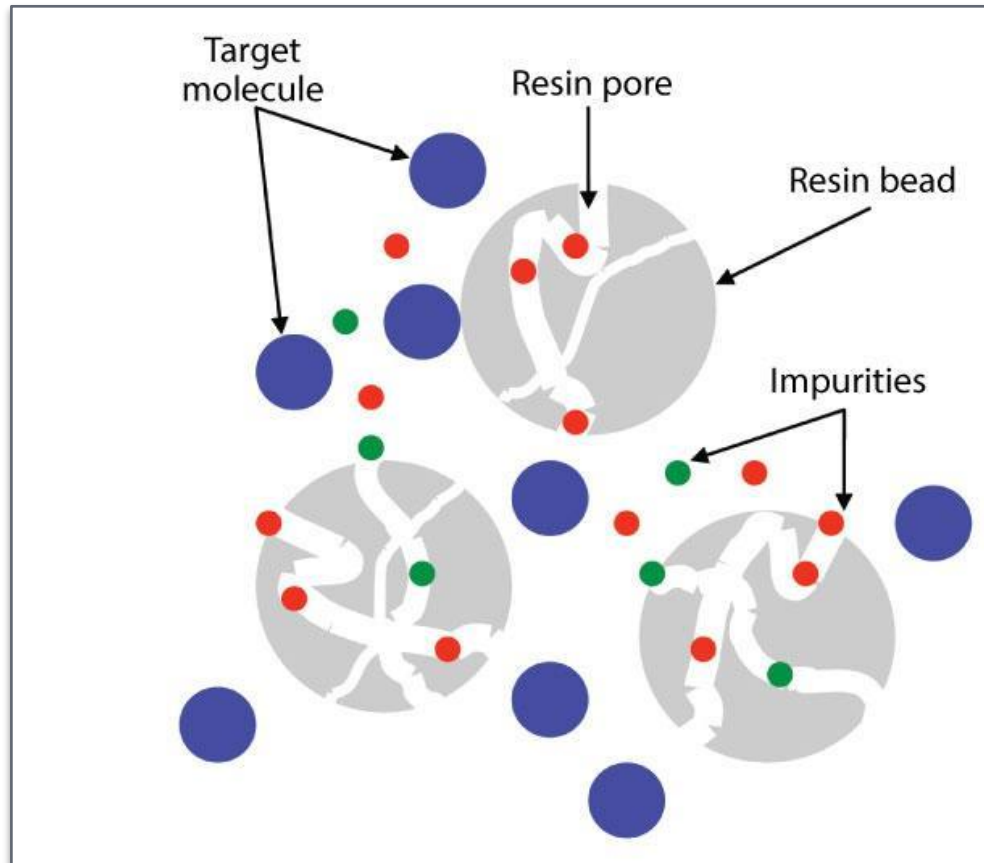


APPAREILLAGE

- **Phase mobile:** tampon qui traverse la colonne
- **Phase stationnaire:** polymère ramifié de dextrose
 - Structure: particules sphériques, poreuses (« perles »)
 - Intérieur de chaque particule: aspect d'une éponge.



PURIFICATION DES MACROMOLÉCULES PAR CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL



Macromolécules: exclusion des perles du gel → déplacement rapide
Micromolécules: accès à l'intérieur des perles → sortie par diffusion → déplacement lent (trajet plus long, vitesse plus faible)

APPLICATIONS

- **Purification** → analyse des macromolécules (protéines, peptides, ADN, ARN, oligonucléotides...) par rapport aux impuretés de petite taille (sels, solvants, tampons d'extraction...)
- **Estimation de la masse molaire des solutés** (par rapport aux standards de masse connue): graphique de la variation de l'absorbance ↔ volume d'éluât.

