

Techniques chimiques pour la biologie



SCIENCES DE LA
VIE



Shop



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



Etudier



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



Emploi



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE



Université Cadi Ayyad

**Faculté polydisciplinaire
Safi**



Filière science de la vie (S₃)

Module:

Techniques chimiques pour la biologie

Pr. Faissal AZIZ

faissalaziz@gmail.com / Faziz@kth.se

CHAPITRE 4 :

Techniques de fractionnement et
de purification

La centrifugation

I- Principe de la technique

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières.

Tous les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à la gravité, force qui s'exerce du haut vers le bas, et à la poussée d'Archimède, force qui s'exerce du bas vers le haut. En dehors du cas particulier dans lequel ces deux forces sont parfaitement équilibrées.



© Can Stock Photo - csp6041368

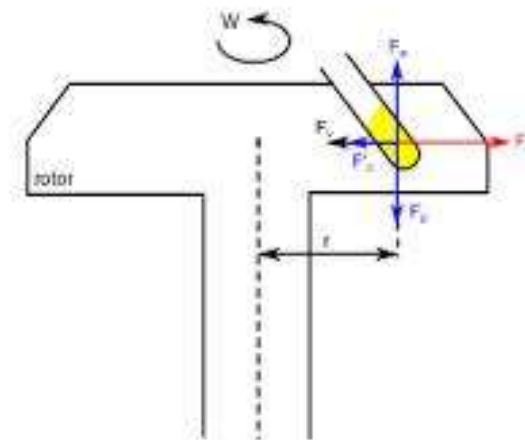


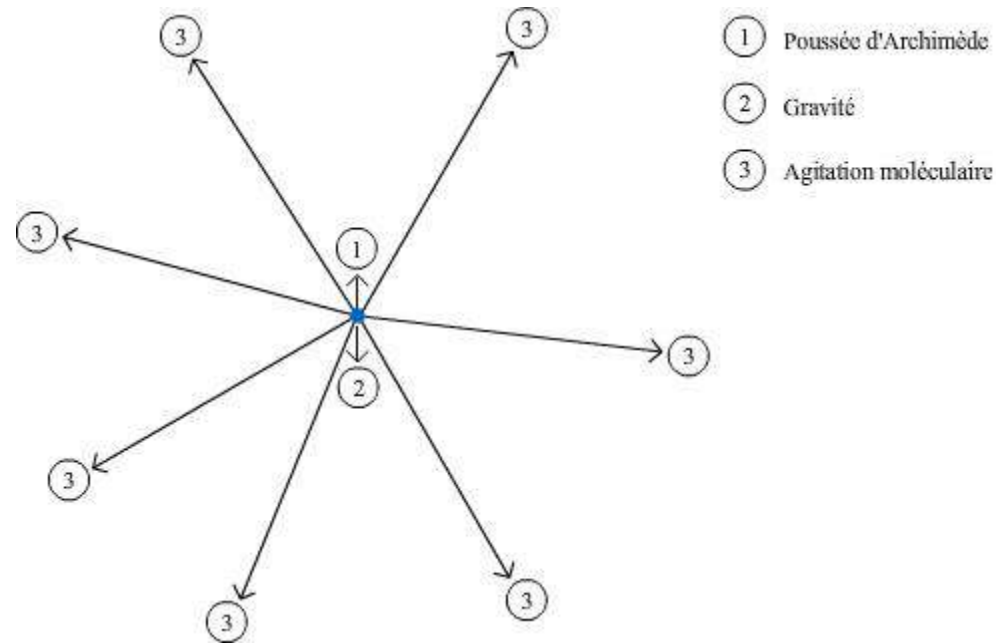
Schéma des différentes forces s'appliquant sur le composé à centrifuger

on pourrait donc s'attendre qu'avec le temps tous les constituants finissent par tomber au fond du récipient dans lequel ils se trouvent (sédimentation) ou remontent à la surface.

C'est d'ailleurs ce qui arrive pour certains. Mais pour la majorité d'entre eux, un autre phénomène intervient qui empêche ce résultat : l'agitation moléculaire.

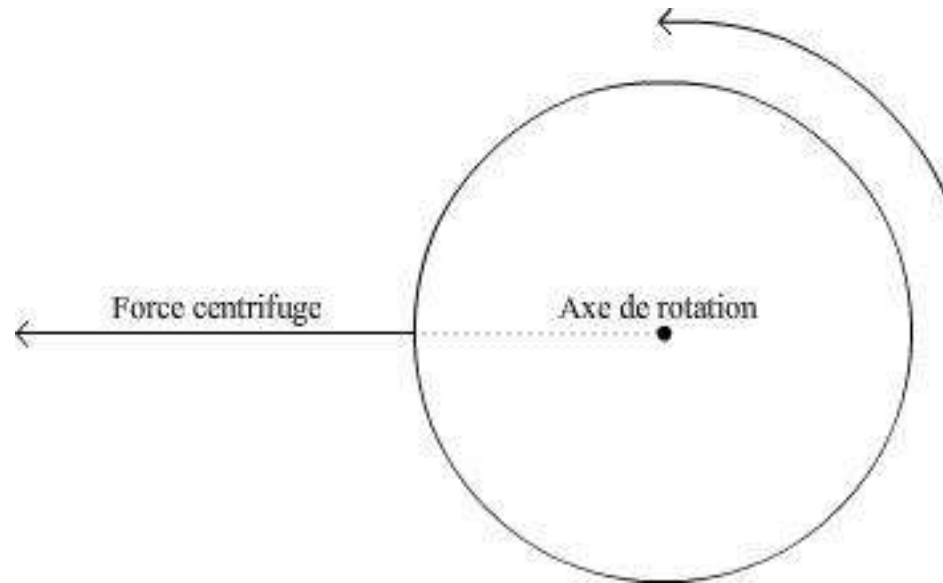
Elle n'a pas de direction privilégiée, et à l'échelle microscopique l'agitation moléculaire est de très loin plus importante que la gravité et la poussée d'Archimède, de sorte que les effets de ces dernières sont négligeables.

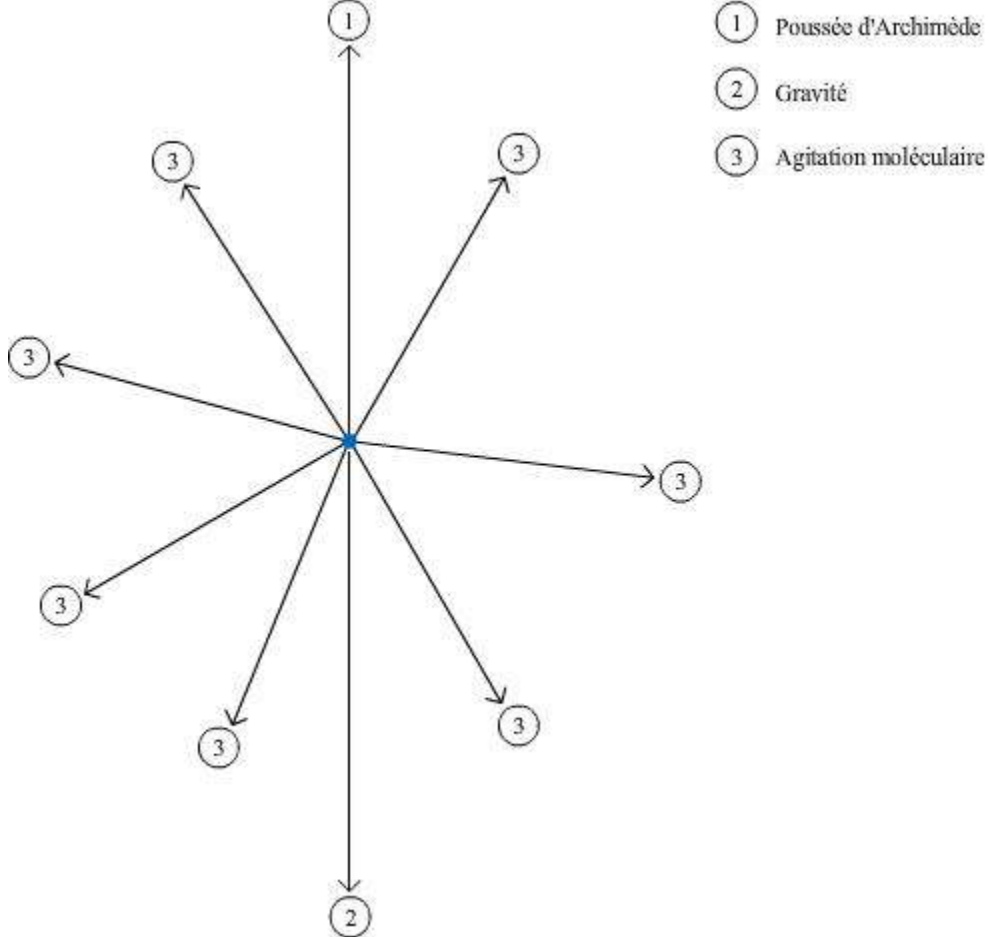




Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide. La gravité et la poussée d'Archimède sont faibles comparées à l'agitation moléculaire. Elle peut entraîner un mouvement de la particule, mais comme elle n'a pas de direction privilégiée, statistiquement l'ensemble des particules ne se déplace pas.

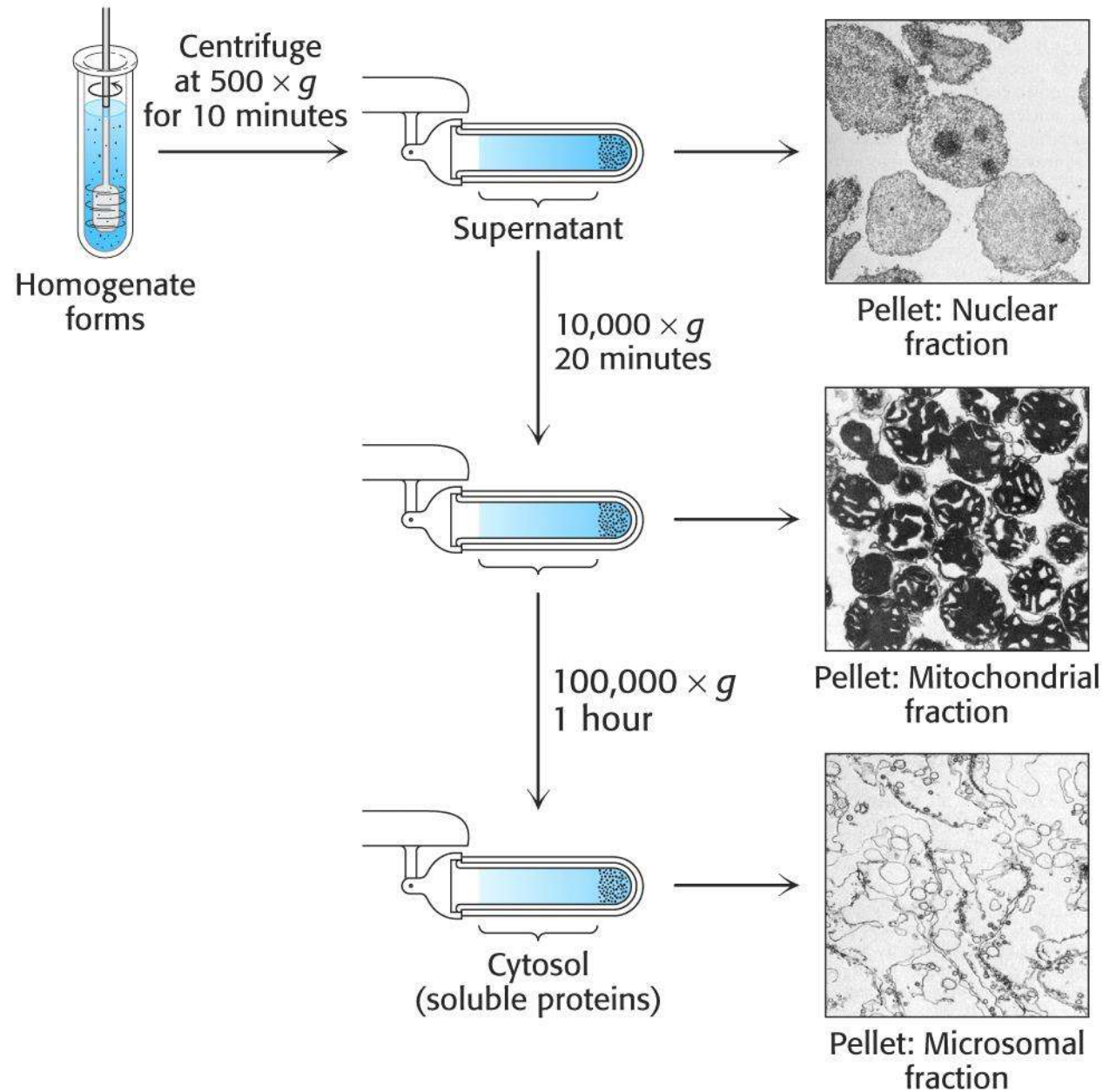
En faisant tourner l'échantillon, on fait apparaître une nouvelle force, **la force centrifuge**, qui est une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation





Force s'exerçant sur une particule en suspension dans un liquide soumis à centrifugation. La gravité et la poussée d'Archimède sont augmentées, au contraire de l'agitation moléculaire, et ne sont plus négligeables. Ayant une direction privilégiée, elles peuvent entraîner un mouvement global des particules vers le haut, si la poussée d'Archimède est supérieure à la gravité apparente, ou vers le bas dans le cas contraire.

Centrifugation différentielle



Pour un constituant donné, en choisissant correctement la **vitesse de rotation**, l'**accélération** obtenue peut devenir prépondérante par rapport à l'agitation moléculaire ce qui entraîne sa **sédimentation** vers le fond du récipient ou sa remontée. L'accélération obtenue, notée **g**, est fonction de **la vitesse angulaire** de rotation et de la **distance** à l'axe de rotation. Elle est donnée par la formule suivante :

$$g = w^2 r = 1,119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

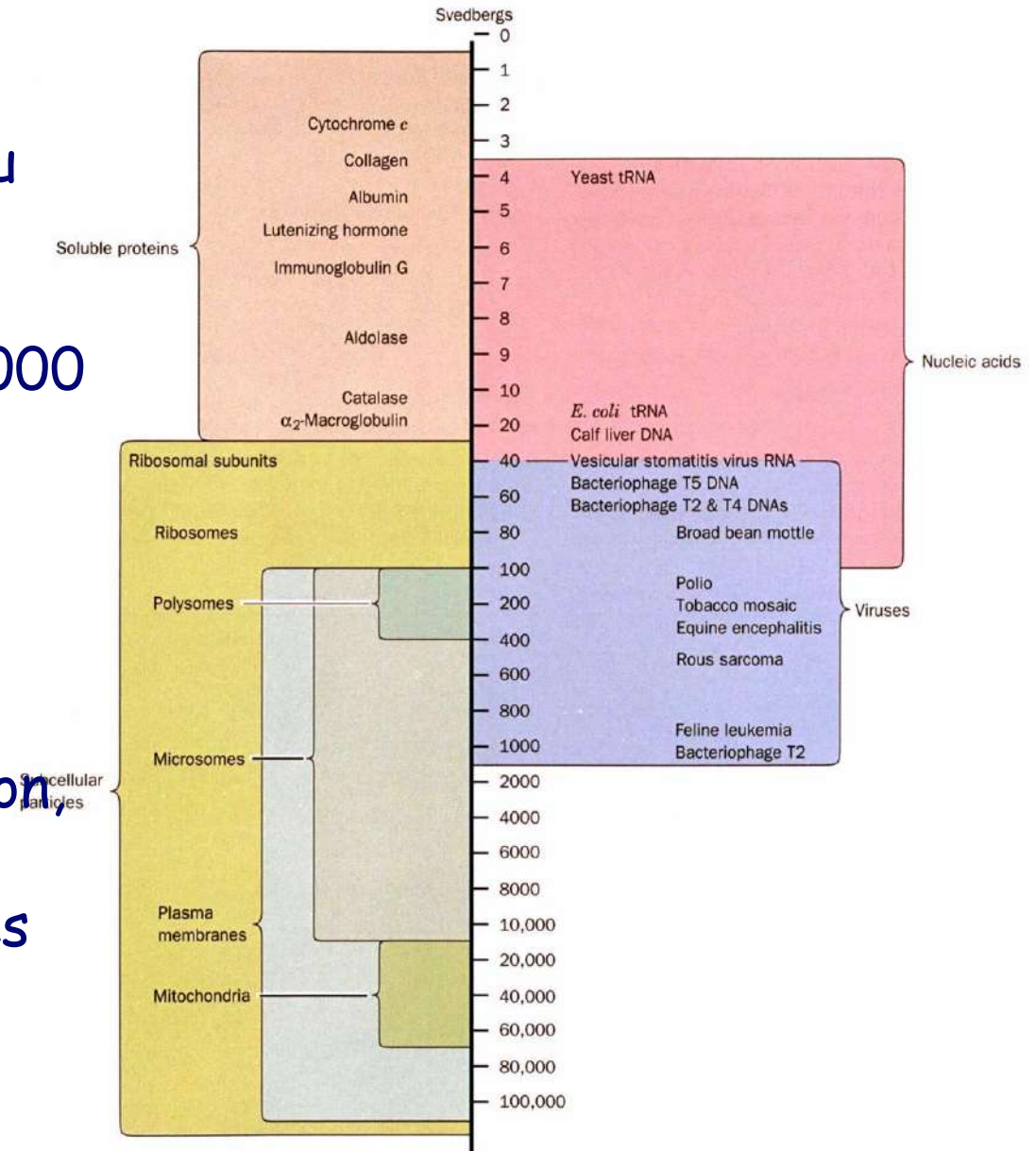
avec

- w : vitesse angulaire (rad/s);
- r : distance à l'axe de rotation
- n : nombre de rotations par minute (rpm);



L'ultracentrifugation

L'ultracentrifugeuse, mis au point par The Svedberg en 1923, peut atteindre des vitesses de rotation de 80000 rpm et permet la sédimentation de macromolécules. La masse d'une particule peut être calculée à partir de son coefficient de sédimentation, analogue à la mobilité électrophorétique, en unités **Svedberg (S)**



Ultracentrifugation

Introduction

- le comportement des macromolécules en solution, qui sont soumises au champ gravitationnel (facteur accélération $g = 9.81 \text{ ms}^{-2}$), ne démontre aucune évidence de sédimentation
 - l'agitation thermique est suffisante à les garder dispersées de façon homogène en solution
 - à moins qu'elles ne soient agrégées
- c'est seulement lorsque les macromolécules sont assujetties à des accélérations énormes qu'elles commencent à sédimenter.
- L'ultracentrifugeuse fut inventée en 1923 par un chimiste suédois, Theodor Svedberg (prix Nobel de chimie 1926)
- avec ce type de centrifugeuse, il est possible d'atteindre des vitesses de rotation de 80,000 rpm (révolutions par minute) qui donnent lieu à des forces dépassent $600,000 \times g$
- Avec cette technique, Sverdberg a pu démontrer que les protéines sont des macromolécules de composition homogène et qu'un grand nombre de protéines sont composées de sous-unités.

A. Sédimentation

- la vitesse avec laquelle une particule sédimente dans une ultracentrifugeuse dépend de sa masse
- la force, $F_{\text{sédimentation}}$, subie par une particule de masse m située à une distance r d'un point autour duquel la particule tourne avec une vitesse angulaire ω (en radians \cdot s $^{-1}$) est égale à la force centrifuge ($m\omega^2r$) qui s'exerce sur la particule moins la force due au déplacement de la solution par la particule ($V_p\rho\omega^2r$ ou force de flottaison)

$$F_{\text{sédimentation}} = m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r$$

où V_p est le volume de la particule en question et ρ est la densité de la solution

- Cependant, le déplacement d'une particule à travers une solution est opposée par une force qui représente la friction entre la particule et la solution

$$F_{\text{friction}} = v f$$

où v est la vitesse de migration de la particule et f est le coefficient de friction.

- le coefficient de friction d'une particule peut être déterminé en mesurant sa vitesse de diffusion.

- Sous l'influence d'une force centrifuge, une particule va accélérer jusqu'à ce que toutes les forces soient contrebalancées, soit :

$$m\omega^2r - V_p\rho\omega^2r = v f$$

où on atteint la phase stationnaire

À quoi peut servir cette technique? À mesurer la masse de macromolécules

- La masse molaire de particules, M , est $M = mN$ où N représente la constante d'Avogadro (6.02×10^{23}).
- Le volume d'une particule, V_p , en fonction de sa masse molaire et sa densité, est:

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

où \bar{V} représente le volume partiel spécifique de la particule qui est défini par le changement en volume lorsque 1g sec de particules est dissous dans une soluté à volume infini.

En substituant V_p et m dans les équations ci-dessus, on obtient :

$$vf = m\omega^2 r - V_p \rho \omega^2 r \rightarrow v f = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{N} \rightarrow v = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{Nf}$$

Vitesse quand toutes forces sont annulées.

si on manipule l'équation encore, on obtient une relation indépendante de ω et r , et qui est seulement dépendante des propriétés de la protéine en question

on définit alors le **coefficient de sédimentation, S** , par : $\frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf}$

- Le coefficient de sédimentation est analogue au coefficient de mobilité électrophorétique; sa valeur est exprimée en unités de 10^{-13} sec qui sont connues sous forme de Svedbergs (S).

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{1}{\omega^2} \left(\frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf}$$

La relation ci-dessus indique qu'il sera possible de déterminer la masse d'une particule, $m=M/N$, à partir de son coefficient de sédimentation S et de son coefficient de friction f

En effet, jusqu'aux années 1970, la plupart des déterminations des masses moléculaires ont été faites à partir d'une ultracentrifugeuse analytique - un instrument qui permettait la détermination des vitesses de sédimentation

- Bien que de nouvelles techniques sont maintenant utilisées pour mesurer la masse des macromolécules (par ex: chromatographie en gel de filtration, électrophorèse SDS-PAGE), l'analyse des complexes de macromolécules utilise toujours l'ultracentrifugation
- la masse des constituants de ces complexes est souvent exprimé en Svedberg (S)

Par exemple: -le ribosome bactérien

- les sous-unités 30S et 50S sont constitués par les ARNr 5S, 16S et 23S
- les deux sous-unités s'assemblent pour former le ribosome 70S

- le ribosome eucaryote

- les sous-unités 40S et 60S sont constitués par les ARNr 5S, 5.8S, 18S et 23S
- les deux sous-unités s'assemblent pour former le ribosome 80S

- le protéasome 26S

- chez les eucaryotes, complexe multiprotéique impliqué dans la dégradation des protéines

B. La centrifugation préparative.

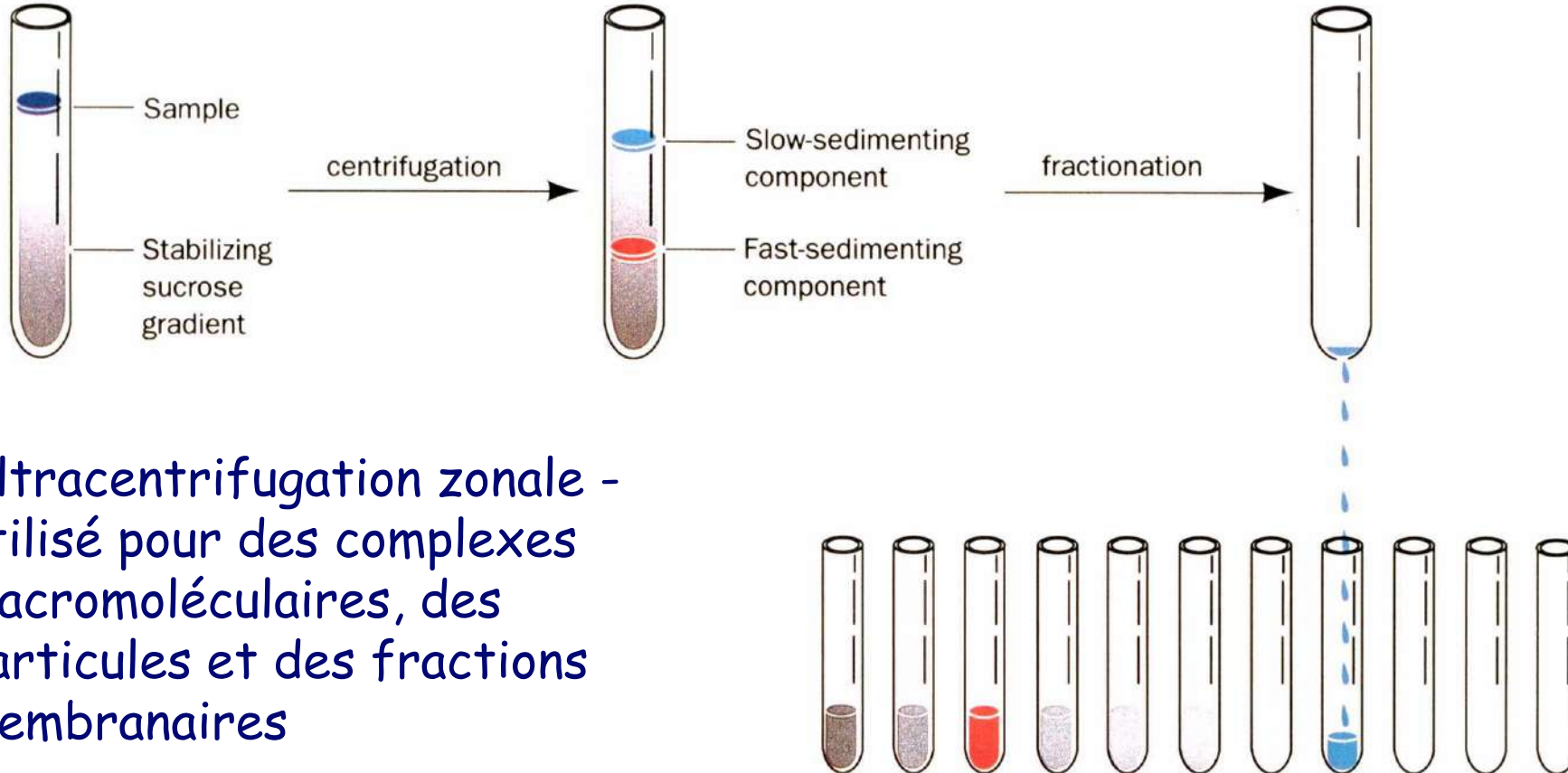
- Les centrifugeuses préparatives sont conçues pour la préparation d'échantillons possédant des volumes significatifs
- La sédimentation peut être faite dans une solution inerte comme le **saccharose** ou de **chlorure de césium (CsCl)** dans lesquels la concentration et donc la densité augmente du haut vers le bas du rotor
- L'utilisation des gradients de densité augmente de façon significative le pouvoir de résolution de la centrifugeuse.
- Dans le cas de saccharose, ce type de gradient minimise l'agitation d'une solution par convection (qui peut nuire à la résolution). Il faut se rappeler que la densité de la solution doit être moindre que celle de la macromolécule pour qu'il y ait de la migration.

Les gradients de densité ont deux applications:

- 1) **Ultracentrifugation zonale ou en zones.**
- 2) **Ultracentrifugation en gradient de densité à l'équilibre.**

A. Ultracentrifugation préparative

Dans l'**ultracentrifugation zonale**, une suspension protéique est soigneusement déposée au-dessus d'un **gradient de densité** de saccharose. Au cours de la centrifugation, chaque particule traverse le gradient en fonction de son coefficient de sédimentation:



Ultracentrifugation zonale -
utilisé pour des complexes
macromoléculaires, des
particules et des fractions
membranaires

B.1 L'ultracentrifugation en zones.

- Cette technique permet la séparation des particules selon leurs coefficients de sédimentation
- Dans ce type de centrifugation, la solution de macromolécules est déposée sous forme de couche en haut d'un gradient de densité préparé auparavant
- Ce type de gradient minimise l'agitation par échauffement de la solution, ce qui peut nuire à la résolution
- On utilise le saccharose, qui est visqueux et biochimiquement inerte pour former le gradient
- Puisque la vitesse de sédimentation est une fonction plus sensible à la forme d'une macromolécule qu'à sa densité, l'ultracentrifugation en zones sépare les macromolécules de forme similaire selon leur masse
- Pendant la centrifugation, chaque espèce se déplace à travers le gradient à une vitesse largement déterminée par leur coefficient de sédimentation et donc migre comme une zone
- À la fin de l'expérience, la récolte des fractions se fait par l'insertion d'une aiguille au fond du tube de centrifugation et on collectionne le contenu du tube par un collecteur de fraction

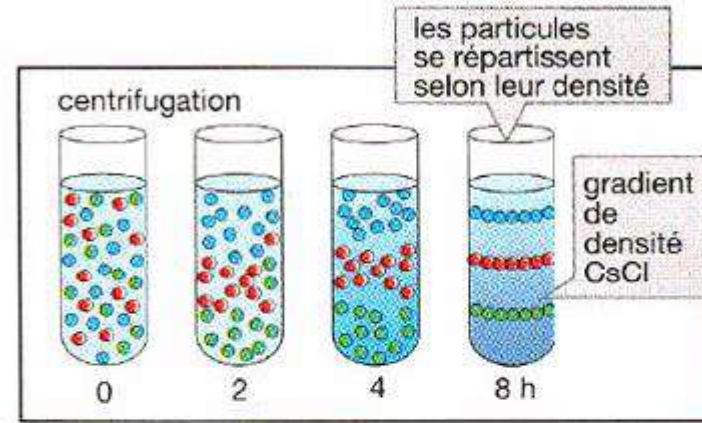
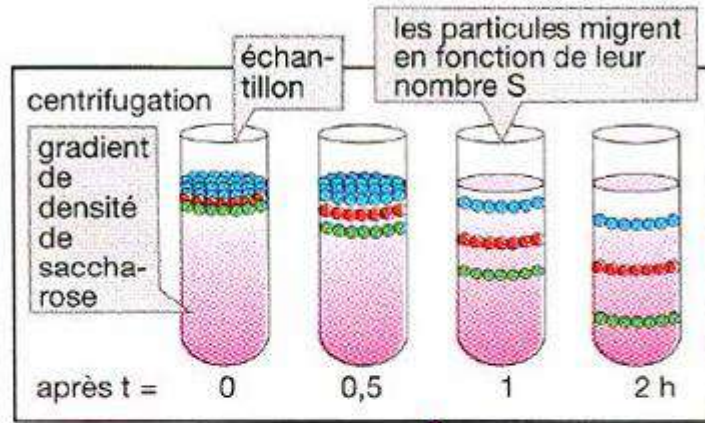
B.2 L'ultracentrifugation par densité d'équilibre.

- Cette méthode de centrifugation, aussi connue sous le nom de **centrifugation isopycnique**, **sépare les macromolécules selon leur densité**
- L'échantillon est dissout dans une solution concentrée d'une substance dense qui diffuse relativement vite comme les sels $CsCl$ et Cs_2SO_4 , et qui est subie à des hautes vitesses de rotation
 - Le fort champ centrifuge génère un gradient important de sel dans lequel les composantes de l'échantillon se retrouvent en zone de densités égales à celle de la solution de sel; autrement dit où $(1 - \bar{v}/\rho) = 0$, donc aucune migration puisque $v = 0$
- la **technique préférée pour séparer des macromolécules qui possèdent une gamme de densités.**

Par exemple: - acides nucléiques (plasmide vs ADN génomique et ARN total)

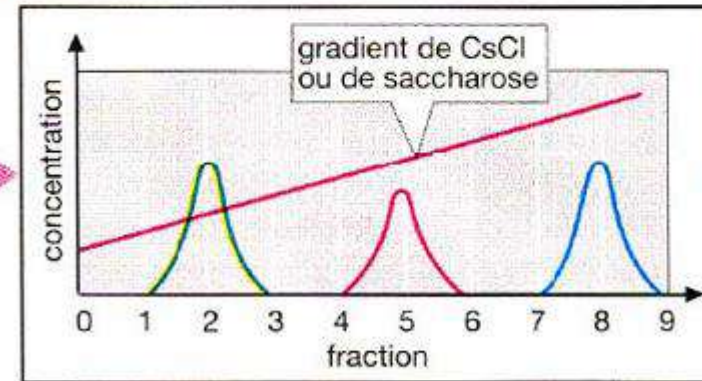
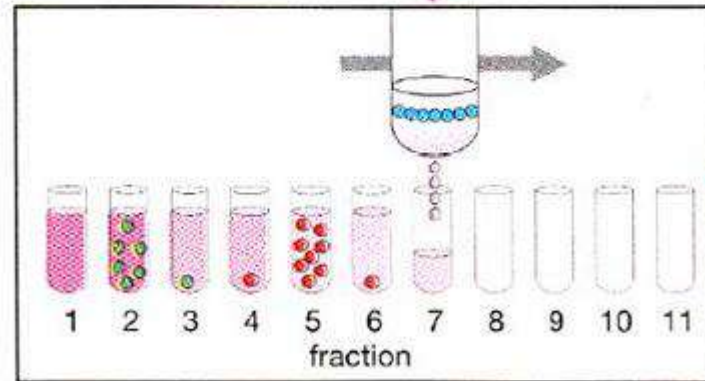
- ribosomes et polysomes
- virus
- organites subcellulaires (microsome, mitochondries, ...)

Ultracentrifugation en zones vs isopycniq



centrifugation de zone

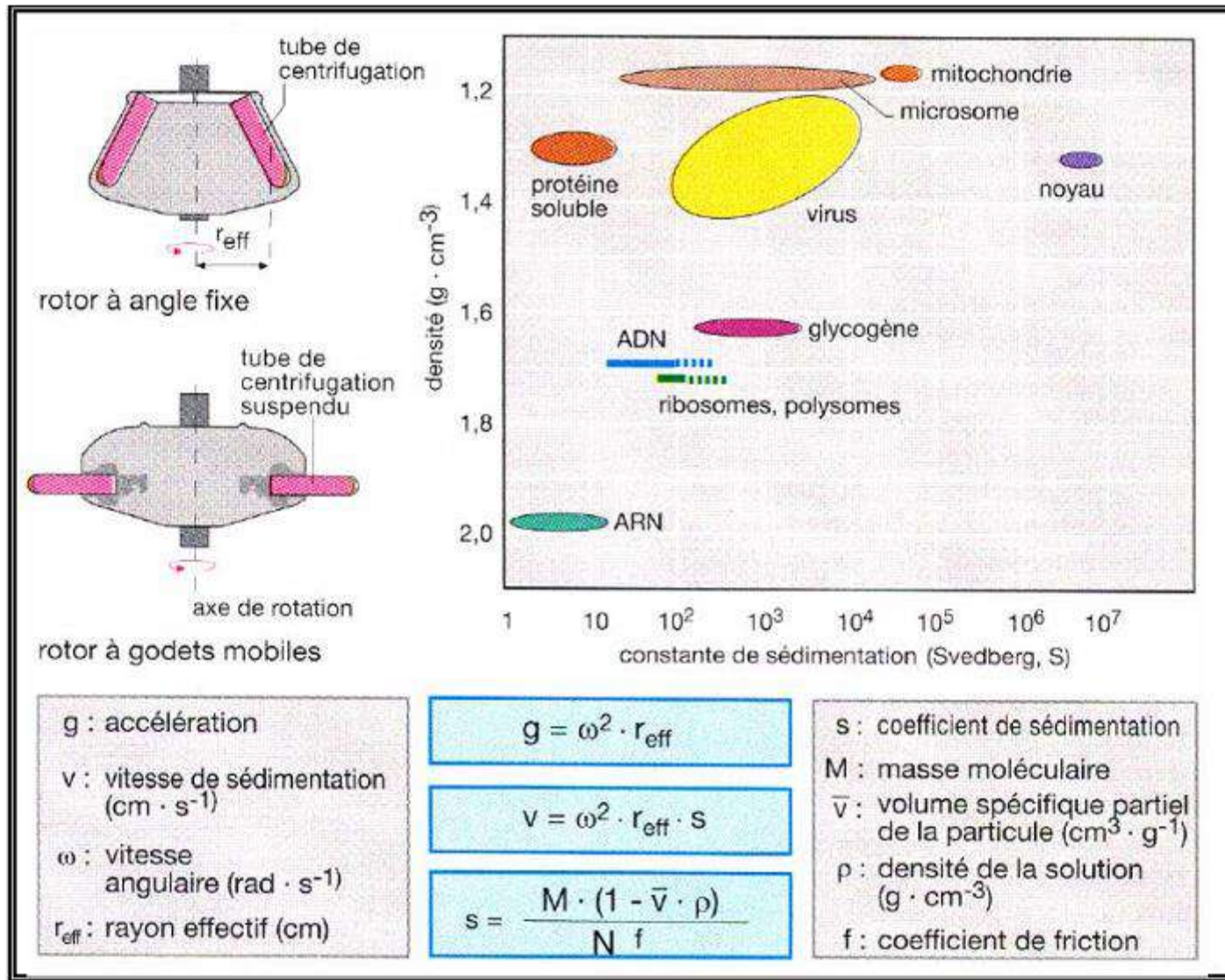
centrifugation isopycniq



fractionnement

mesure

Récapitulation des principes de l'ultracentrifugation



g : accélération
 v : vitesse de sédimentation ($cm \cdot s^{-1}$)
 ω : vitesse angulaire ($rad \cdot s^{-1}$)
 r_{eff} : rayon effectif (cm)

$$g = \omega^2 \cdot r_{eff}$$

$$v = \omega^2 \cdot r_{eff} \cdot s$$

$$s = \frac{M \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho)}{N f}$$

s : coefficient de sédimentation
 M : masse moléculaire
 \bar{v} : volume spécifique partiel de la particule ($cm^3 \cdot g^{-1}$)
 ρ : densité de la solution ($g \cdot cm^{-3}$)
 f : coefficient de friction

E. Stratégie générale de purification des protéines

Leurs différentes propriétés physicochimiques et biochimiques sont mises à profit

Caractéristiques	Techniques
• Solubilité	1. Solubilisation/précipitation saline
• Charge ionique	1. Chromatographie par échange d'ions 2. Electrophorèse 3. Focalisation isoélectrique
• Caractère polaire • d'adsorption	1. CCM 2. Chromatographie en phase inverse 3. Chromatographie par interactions hydrophobes

E. Stratégie générale de purification des protéines

Leurs différentes propriétés physicochimiques et biochimiques sont mises à profit

Caractéristiques	Techniques
• Taille moléculaire	<ol style="list-style-type: none">1. Dialyse et ultrafiltration2. Electrophorèse en gel3. Chromatographie par filtration sur gel
• Spécificité de liaison	<ol style="list-style-type: none">1. Chromatographie d'affinité

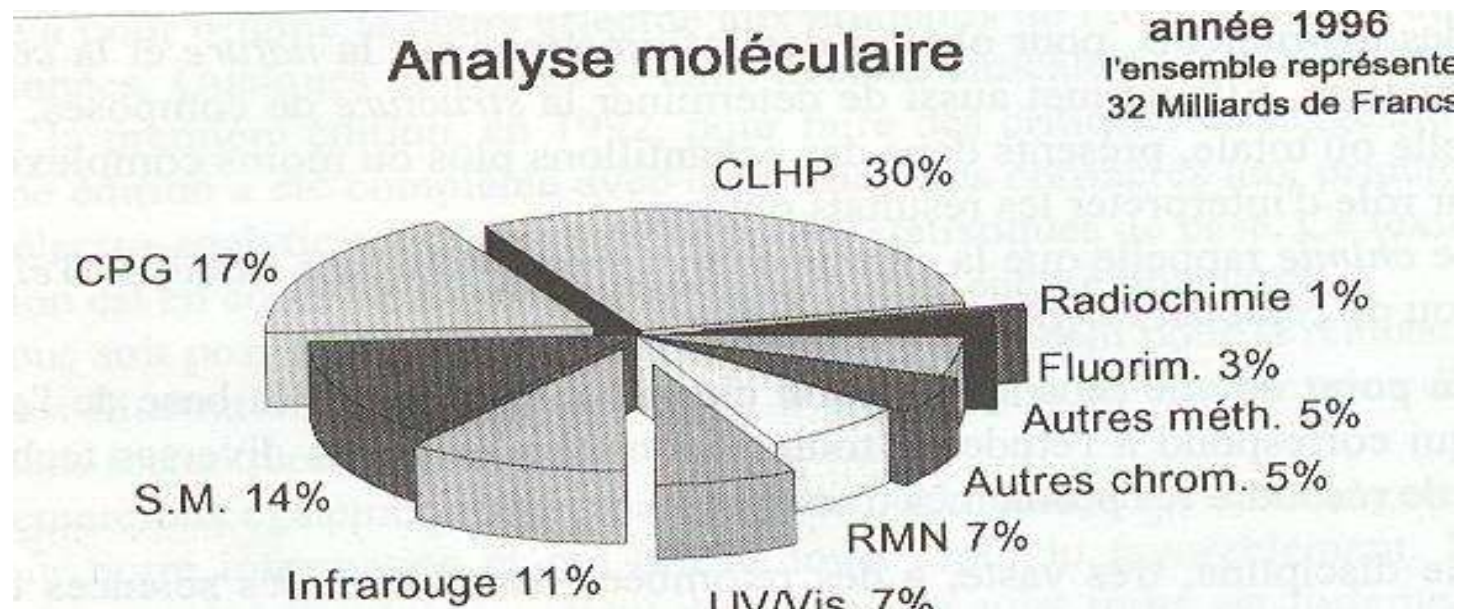
CHROMATOGRAPHIE

-Aspects généraux-

I - INTRODUCTION

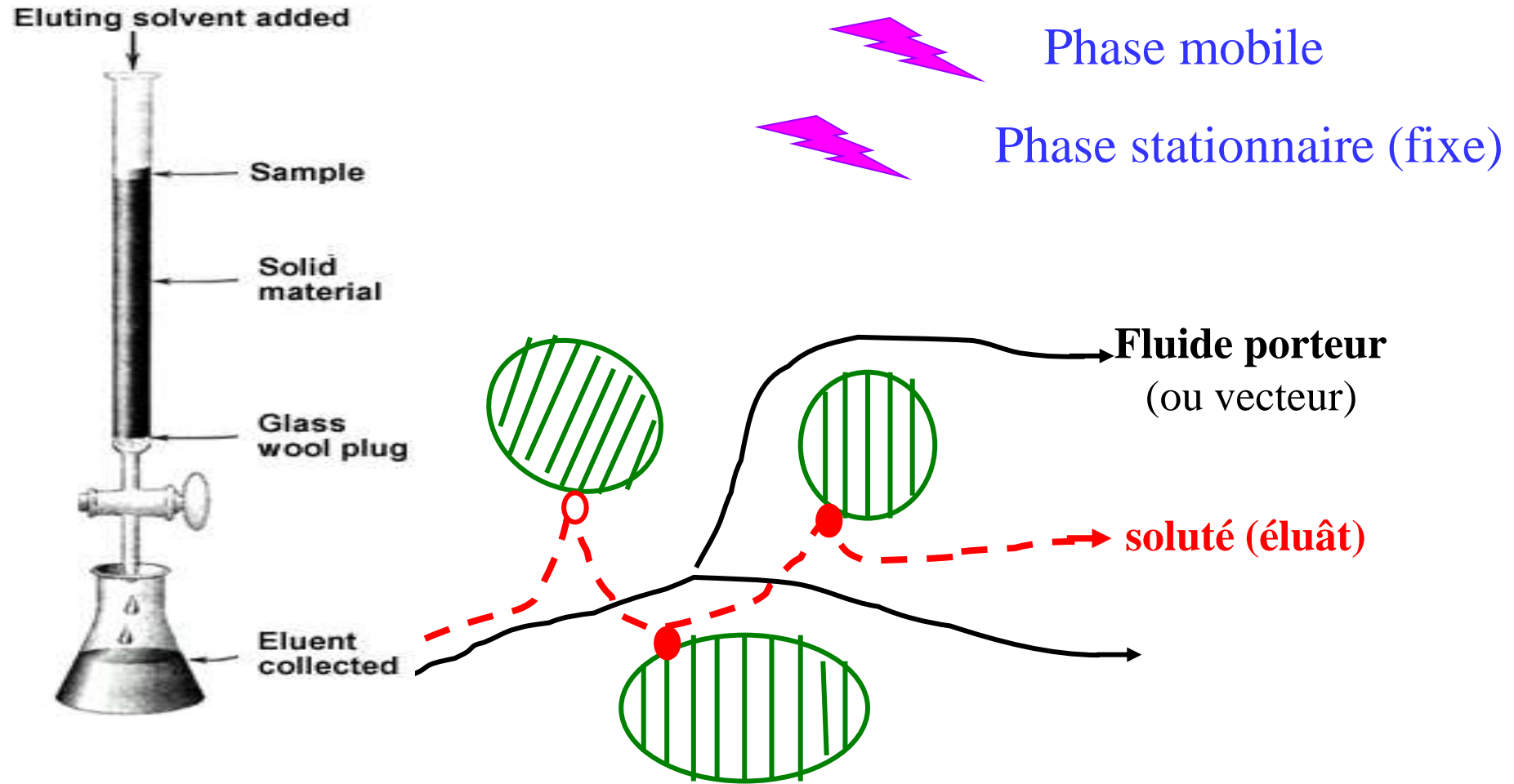
La chromatographie sous toutes ses formes, est une **méthode de séparation** des constituants d'un mélange gazeux, liquide ou solide. C'est une méthode de séparation, donc d'analyse, basée sur les différences d'affinités que peuvent présenter deux ou plusieurs composés pour deux phases, l'une fixe ou stationnaire et l'autre mobile.

La chromatographie est essentiellement une technique de **séparation physique** dont le champ d'application en **analyse quantitative** est restreint aux situations où la **composition** du mélange à séparer est connue. Pour identifier des composés séparés par chromatographie, lorsqu'on ignore tout de leur structure chimique, il est fréquent de coupler à la séparation comme telle, une technique d'analyse complémentaire comme par exemple la spectrométrie de masse ou la spectroscopie infrarouge..



La statistique ci-dessus fait apparaître que la chromatographie, à elle seule, représente plus de la moitié du chiffre d'affaires de l'instrumentation d'analyse moléculaire

I - 1 - Principe général de tous les types de chromatographie



I - 2 - Classement selon la nature des phases et processus mis en jeu

PHASE MOBILE

PHASE
STATIONNAIRE

METHODE
CHROMATOGRAPHIQUE

Gaz

Solide

C.G.S

Gaz

Liquide

C.G.L

Liquide

Solide

C.L.S

Liquide

Solide

C.L.L

MECANISMES

METHODES
CHROMATOGRAPHIQUES

Adsorption

L.G.S et C.L.S

Partition

C.G.L et C.L.L

Echanges d'ions

C.L.S

Perméations

C.L.S

3 SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE

La solution de protéines dissout dans la **phase mobile** est filtrée à travers d'une colonne constituée d'un support solide poreux: la **phase stationnaire**

Les interactions des différentes protéines avec la phase stationnaire ralentissent plus ou moins leur migration à travers le support

Si la force de rétention est de nature ionique, la technique de séparation est appelée **chromatographie par échange d'ions**

Les chromatographies

utilisent les propriétés globales d'interactions des protéines

- encombrements et tailles

Chromatographie Exclusion-diffusion

- interactions spécifiques avec un ligand

Chromatographie d'affinité

utilisent les propriétés d'interactions des acides aminés

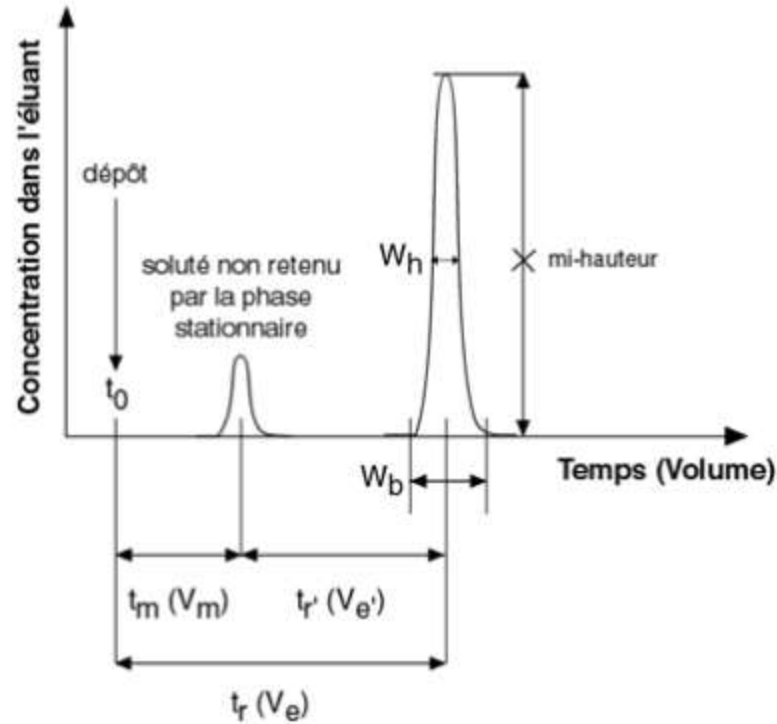
- propriétés ioniques

Chromatographie Echangeuse d'ions

- propriétés hydrophobes/hydrophyles

Chromatographie Phase inverse

Courbe d'élution type



t_0 : début de l'injection

V_m : volume mort de la colonne

t_m : temps mort

V_e : volume d'élution d'un composé

t_e : temps de rétention d'un composé

V_e' : volume d'élution réduit

($V_e = V_e' + V_m$)

t_r : temps de rétention réduit

($t_r = t_r' + t_m$)

W_b : largeur du pic à la base

W_h : largeur du pic à mi-hauteur

$$V_e \text{ (volume d'élution)} = d \text{ (débit)} \times t \text{ (temps)}$$

Les principaux paramètres d'une chromatographie

Vitesse de déplacement des solutés

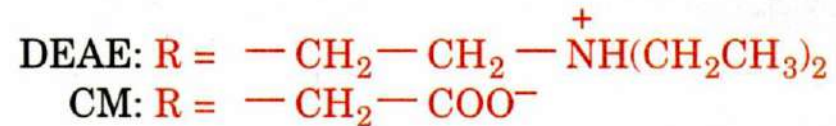
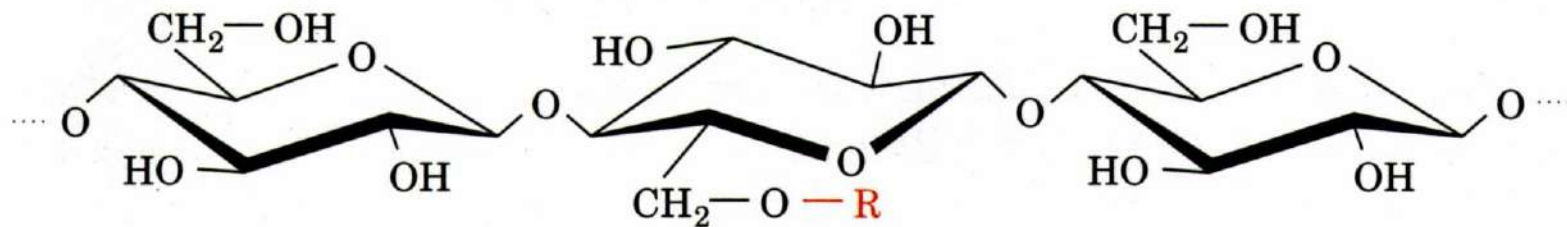
Facteurs de capacité

Efficacité d'une colonne

Résolution d'une colonne

A. Chromatographie par échange d'ions

Dans le processus d'échange d'ions, les ions liés électrostatiquement à un support insoluble et chimiquement inerte sont remplacés de manière réversible par des ions en solution:



Chromatographie sur échangeurs d'anions

Principe :

- une protéine a - une charge positive aux $\text{pH} < \text{pI}$
- une charge négative aux $\text{pH} > \text{pI}$

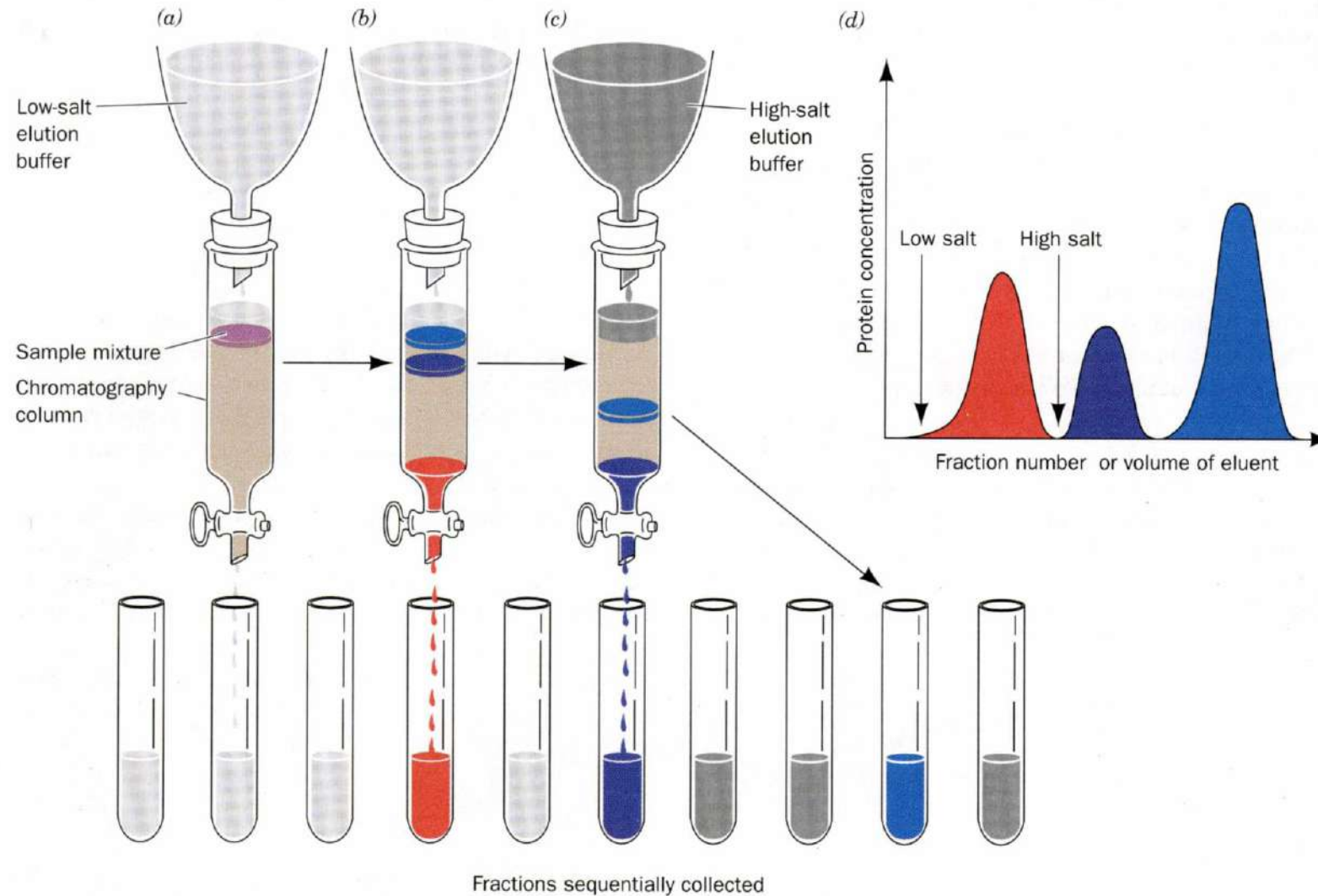
Elle peut donc être retenue sur un échangeur de cations ou un échangeur d'anions, suivant le cas

Elle peut alors être éluée par passage d'un tampon contenant du sel en quantités croissantes

Echangeur d'anions = gel porteur de charges fixes positives

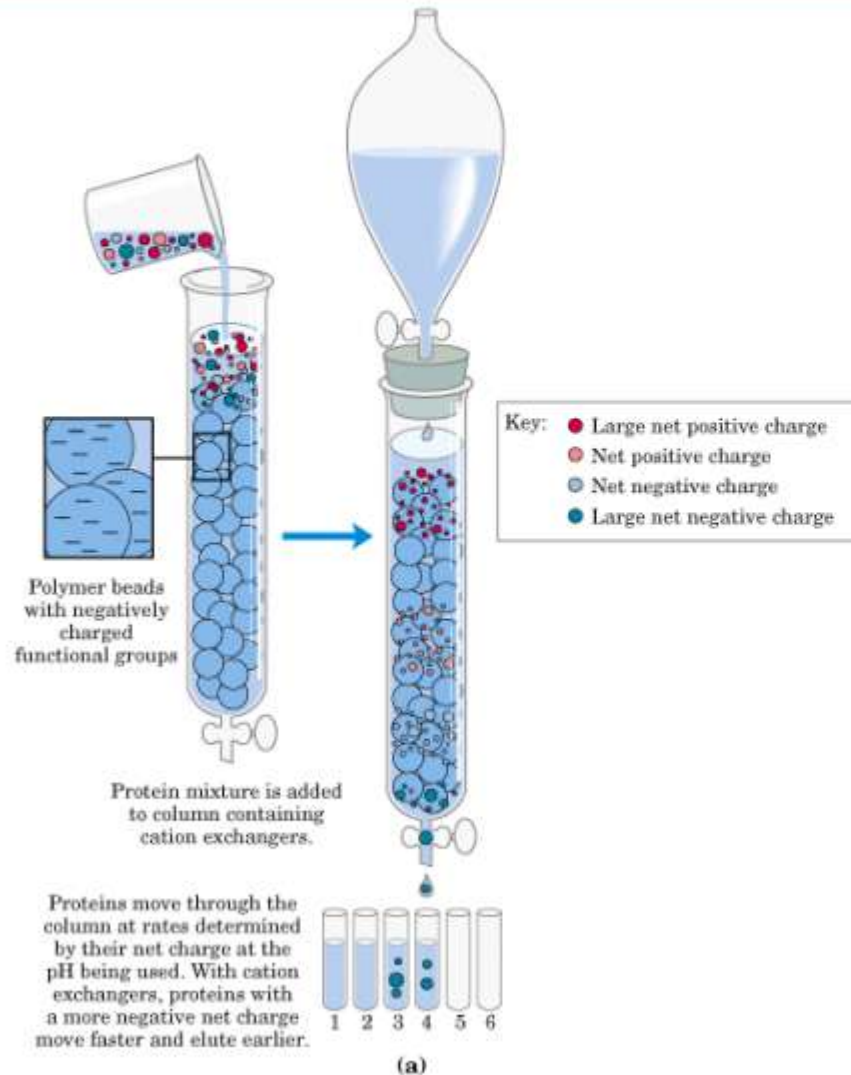
Echangeur de cations = gel porteur de charges fixes négatives

Chromatographie d'échanges d'ions avec élution par paliers



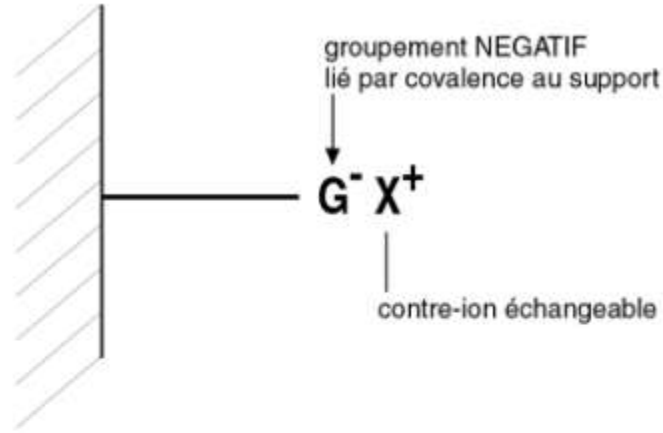
Chromatographie échangeuse d'ions

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution



- Echangeurs de **Cations**: polymères chargés négativement
Echangeurs **d'Anions**: polymères chargés positivement
- **L'éluion** consiste à déplacer l'ion fixé par un autre, de densité de charge et de concentration plus élevée. On utilise de petits ions fortement chargés : Cl^- , HO^- , Na^+ , H^+ ... ou par variation de pH afin d'éliminer les interactions ioniques.
- La **Capacité** de rétention d'un échangeur d'ions est le nombre de millimoles (mmol) d'ions que la résine peut échanger par gramme de résine sèche.

Résine échangeuse de cations (cationique) :



Résine cationique forte (acide / sodique):

Sulfonique: Résine- SO_3^- / H^+ ou Na^+

Résine cationique intermédiaire:

groupement phospho : Résine- $H_2PO_4^- / H^+$ ou Na^+

Résine cationique faible:

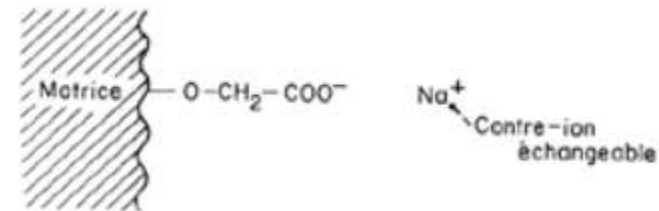
groupement carboxylique: Résine- COO^- / H^+ ou Na^+

groupement carboxyméthyl : Résine- CH_2-COO^- / H^+ ou Na^+

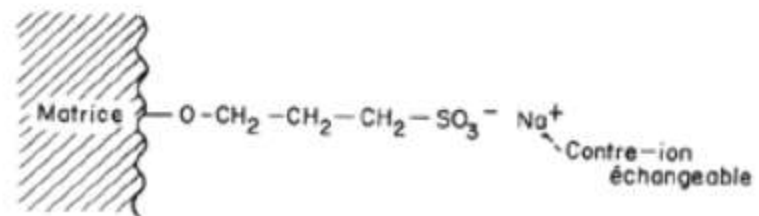
Résine cationique très faible:

phénolique : Résine- O^- / H^+ ou Na^+

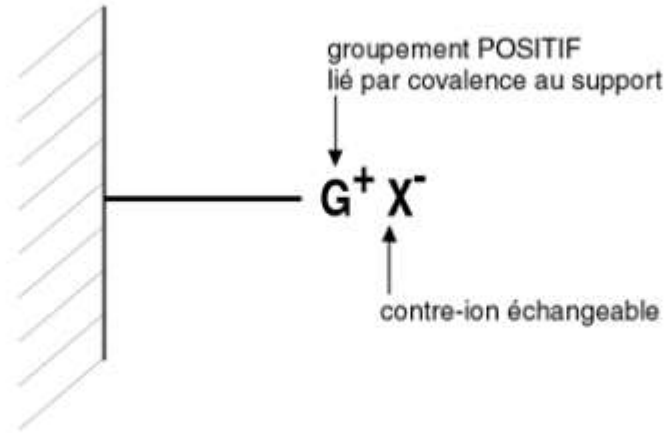
– le CM-polyoside (carboxyméthyle) : échangeur cationique faible :



– le SP-polyoside (sulfopropyle) : échangeur cationique fort :



Résine échangeuse d'anions (anionique) :



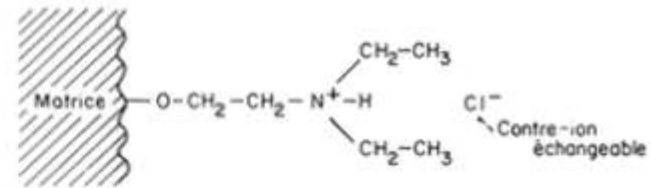
Résines anioniques faibles:

résines à groupements aminés secondaires et primaires.

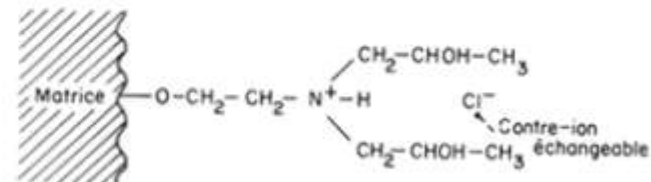
Résines anioniques fortes:

- résines à groupements aminés quaternaires.
- résines à groupements aminés tertiaires.

- le DEAE-polyoside (diéthylaminoéthyle), échangeur anionique faible :



- le QAE-polyoside (quaternaire aminoéthyle), échangeur anionique fort :



Elution par compétition

L'ordre d'efficacité croissant des contre-ions pour les résines échangeuses de cations est le suivant :

- cations monovalents : $\text{Li}^+ < \text{H}^+ < \text{Na}^+ < \text{NH}_4^+$
- cations divalents : $\text{Cd}_2^+ < \text{Mn}_2^+ < \text{Mg}_2^+ < \text{Zn}_2^+ < \text{Cu}_2^+ < \text{Ca}_2^+$
- l'efficacité augmente avec la charge : $\text{K}^+ < \text{Ca}_2^+ < \text{Al}_3^+$

Elution par variation de pH

Considérons une protéine de $pI = 5$:

- si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est inférieur au pI de la protéine

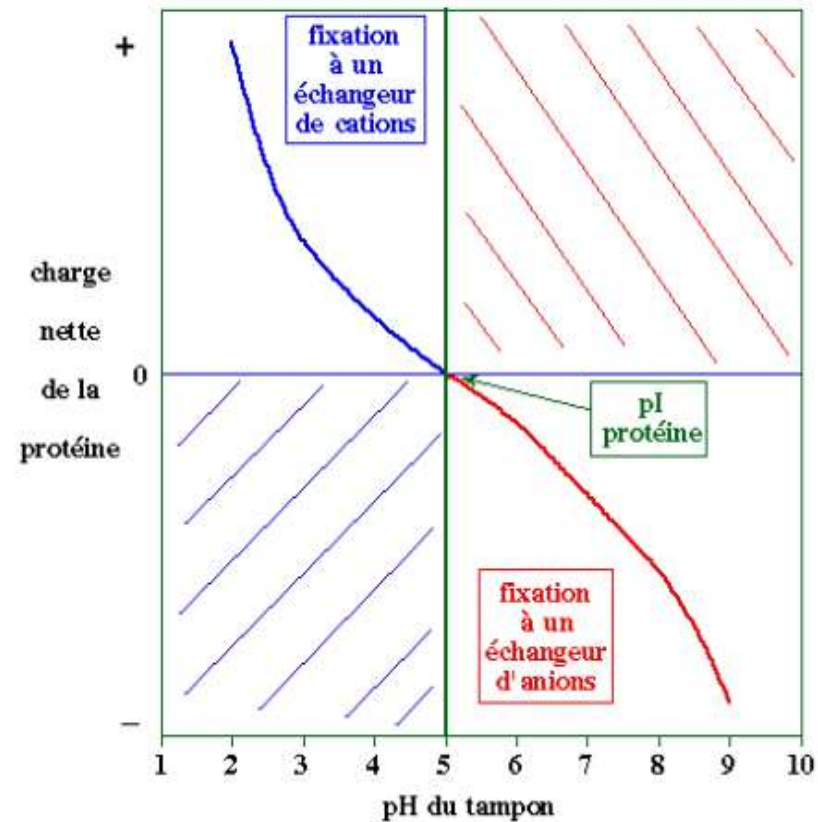
La protéine est chargée positivement (zone bleue)

=> il faut utiliser un échangeur de cations

- si le pH du tampon utilisé pour la chromatographie est supérieur au pI de la protéine

La protéine est chargée négativement (zone rouge)

=> il faut utiliser un échangeur d'anions.



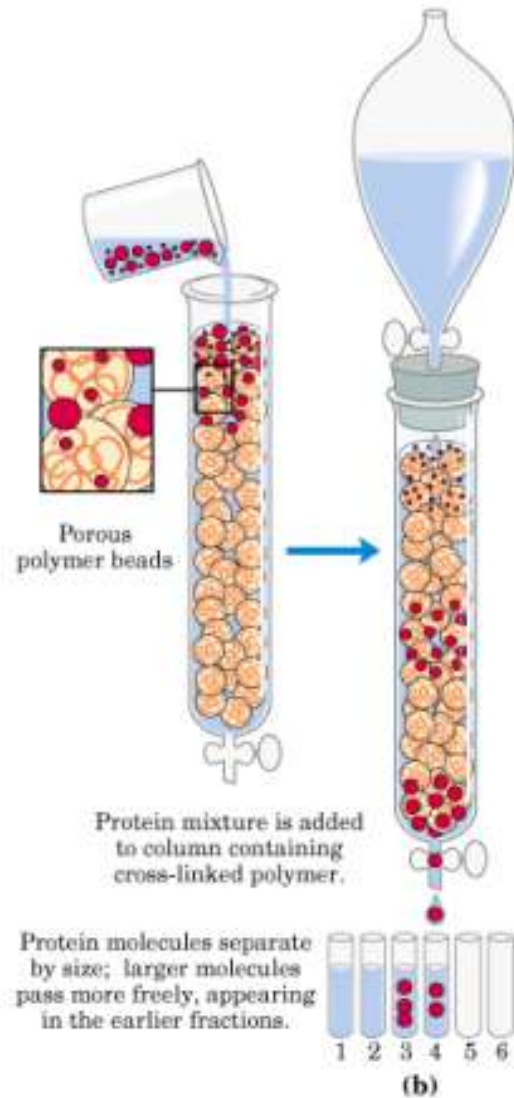
B. Chromatographie par filtration sur gel

Dans la **chromatographie par filtration sur gel**, appelée également **chromatographie par exclusion** ou par **tamissage moléculaire**, les protéines sont séparées selon leur taille et leur forme

- a. La plupart des gels sont constitués de dextran (Sephadex), d'agarose ou de polyacrylamide

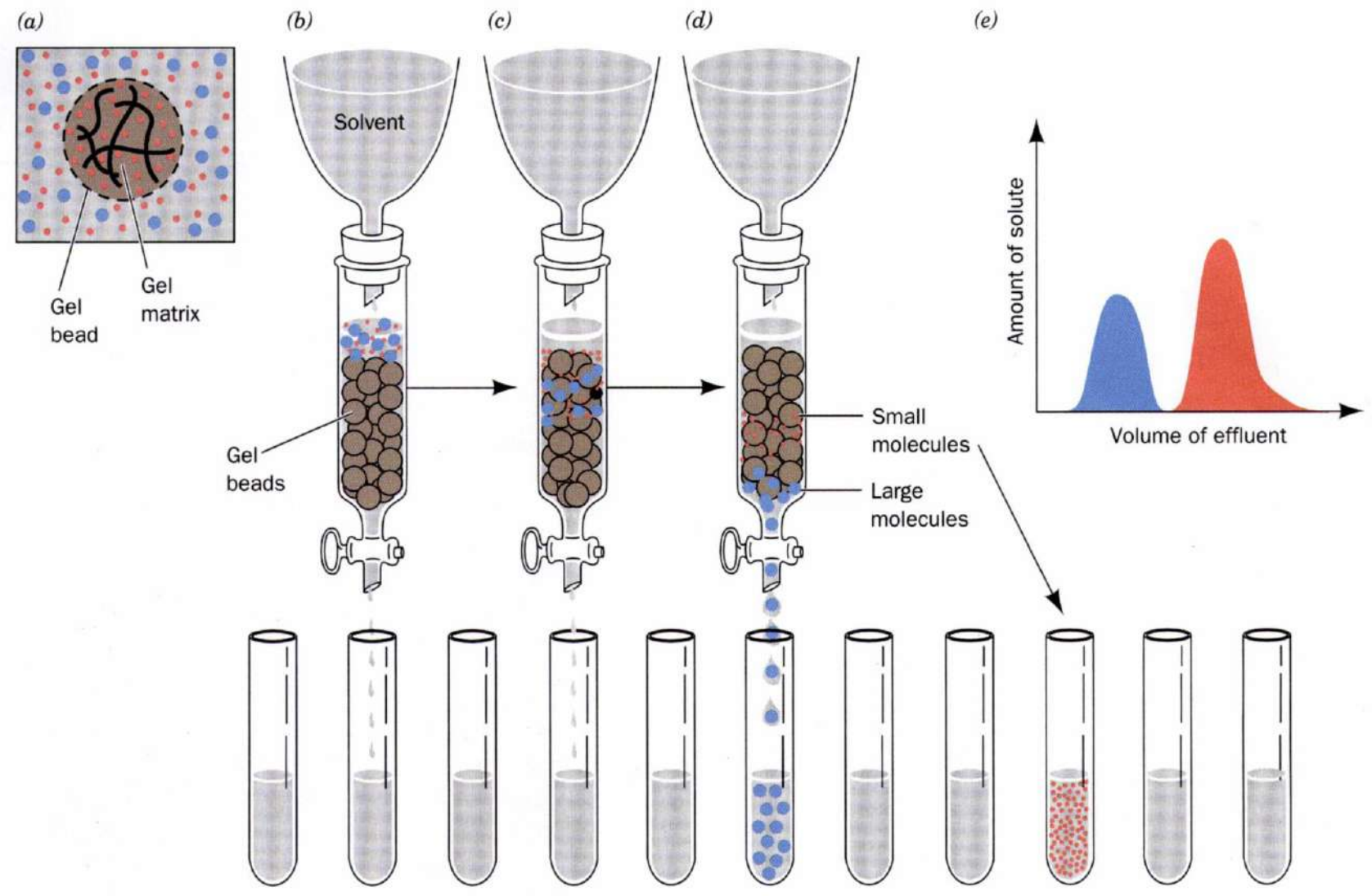
La filtration sur gel est souvent utilisée pour "dessaler" une solution protéique. Ainsi, on peut éliminer le sulfate d'ammonium d'une protéine qui a été précipitée par ce sel

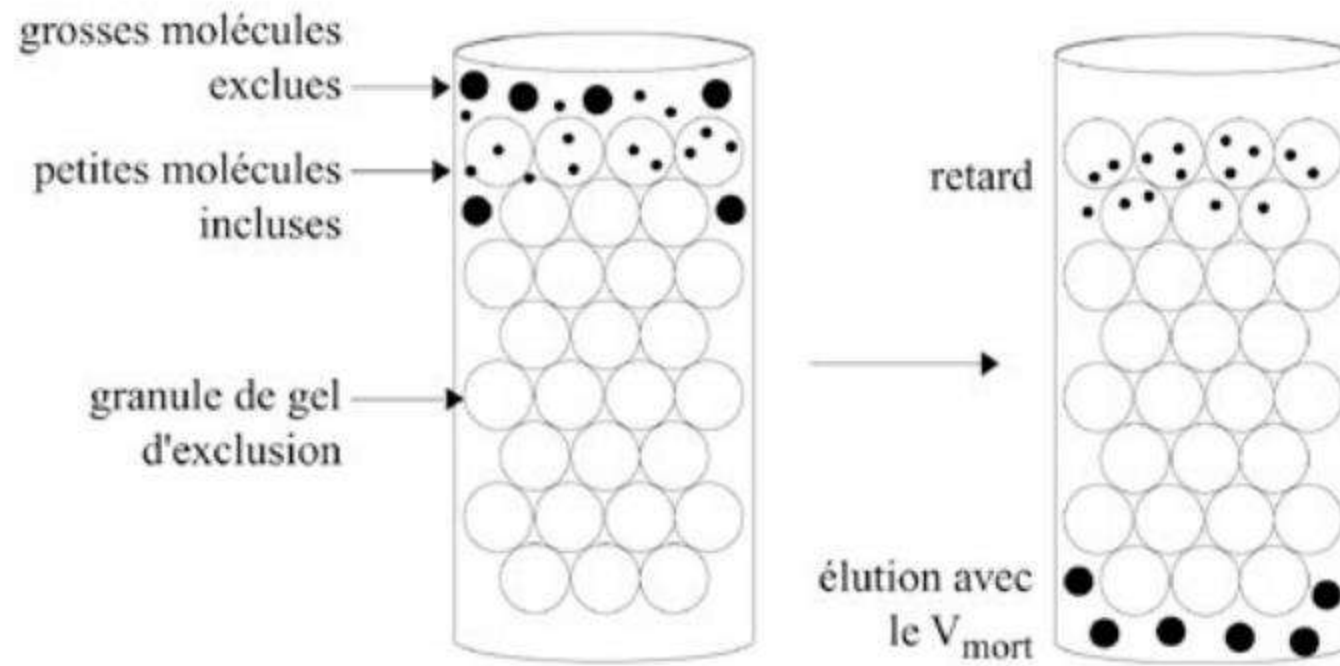
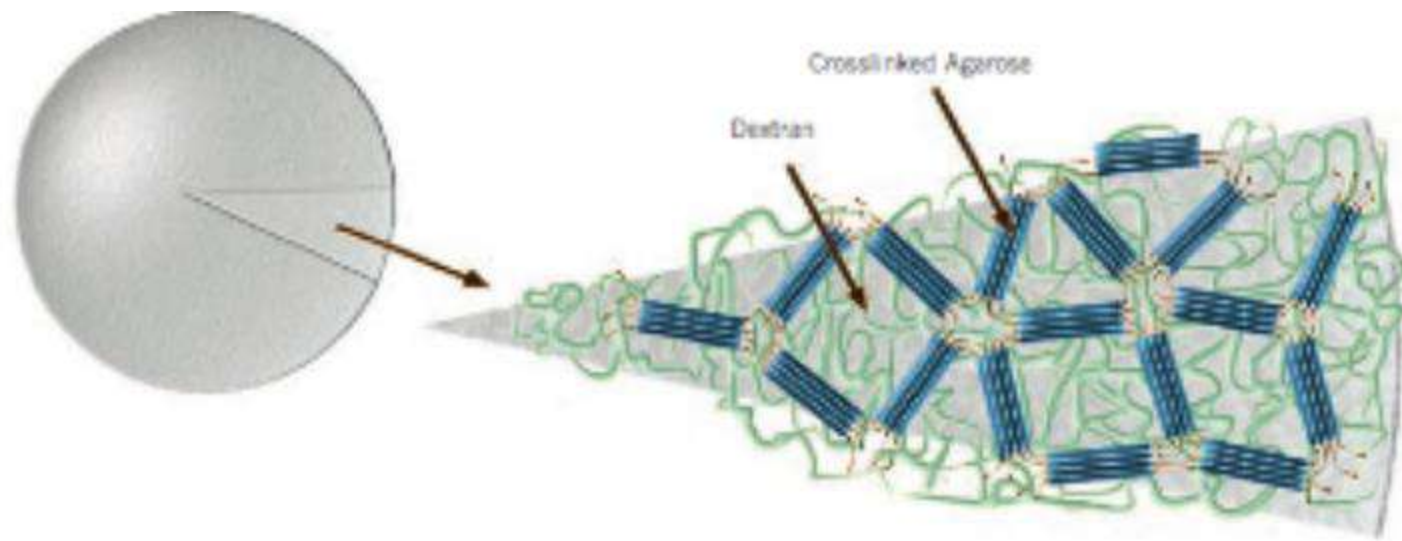
Chromatographie d'exclusion-diffusion (tamis moléculaire)



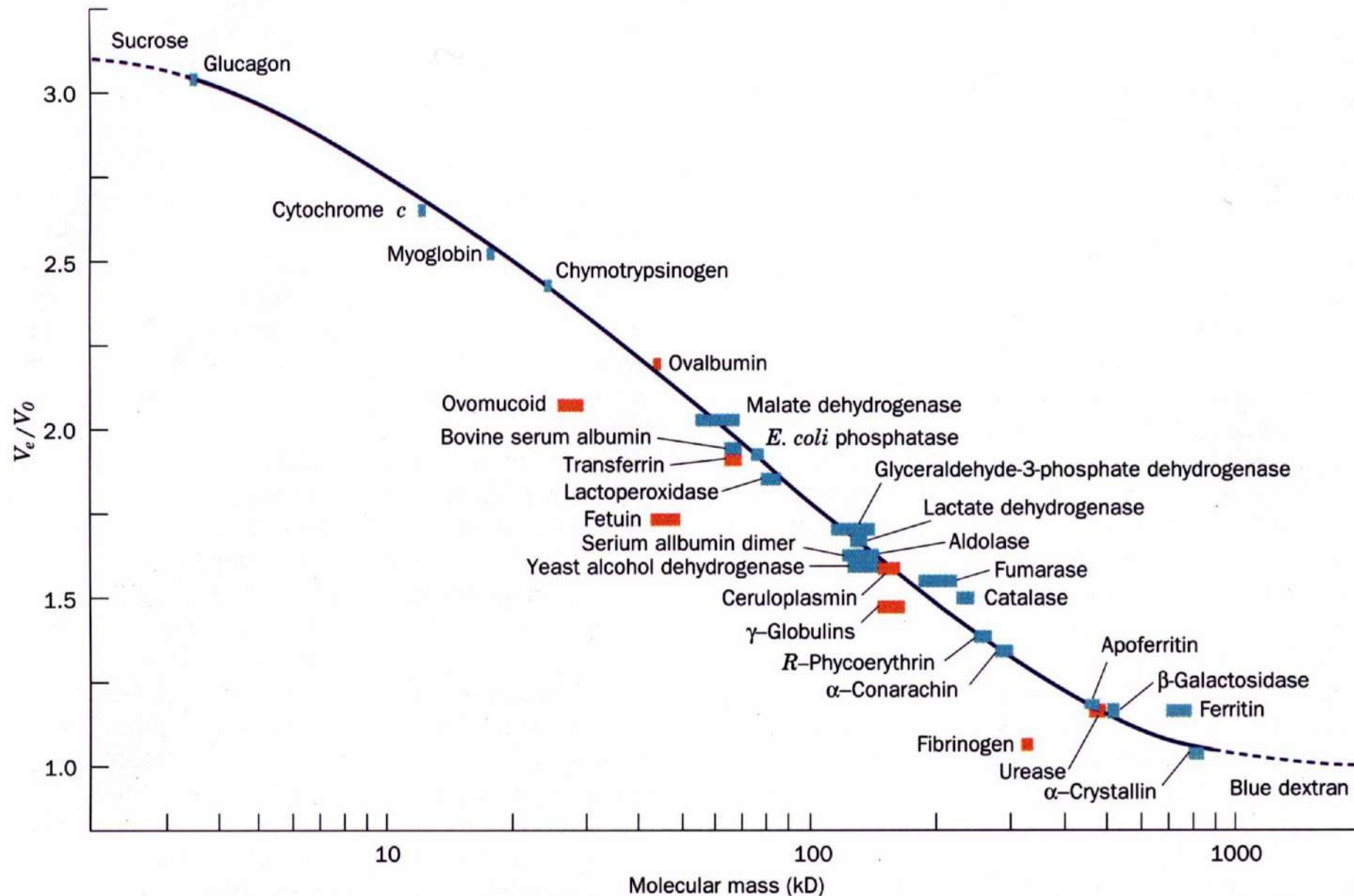
- Aussi appelé gel filtration: Support de polymères glucidiques (dextran) liés par de l'agarose réalisant des pores de tailles définies.
- Les protéines de grandes tailles migrent rapidement car elles sont exclues des pores alors que les protéines de petites tailles pénètrent les pores du support migrent lentement.
- La séparation est fonction du volume de la protéine (rayon de Stokes) et de sa capacité à utiliser le volume des pores.

Chromatographie par filtration sur gel



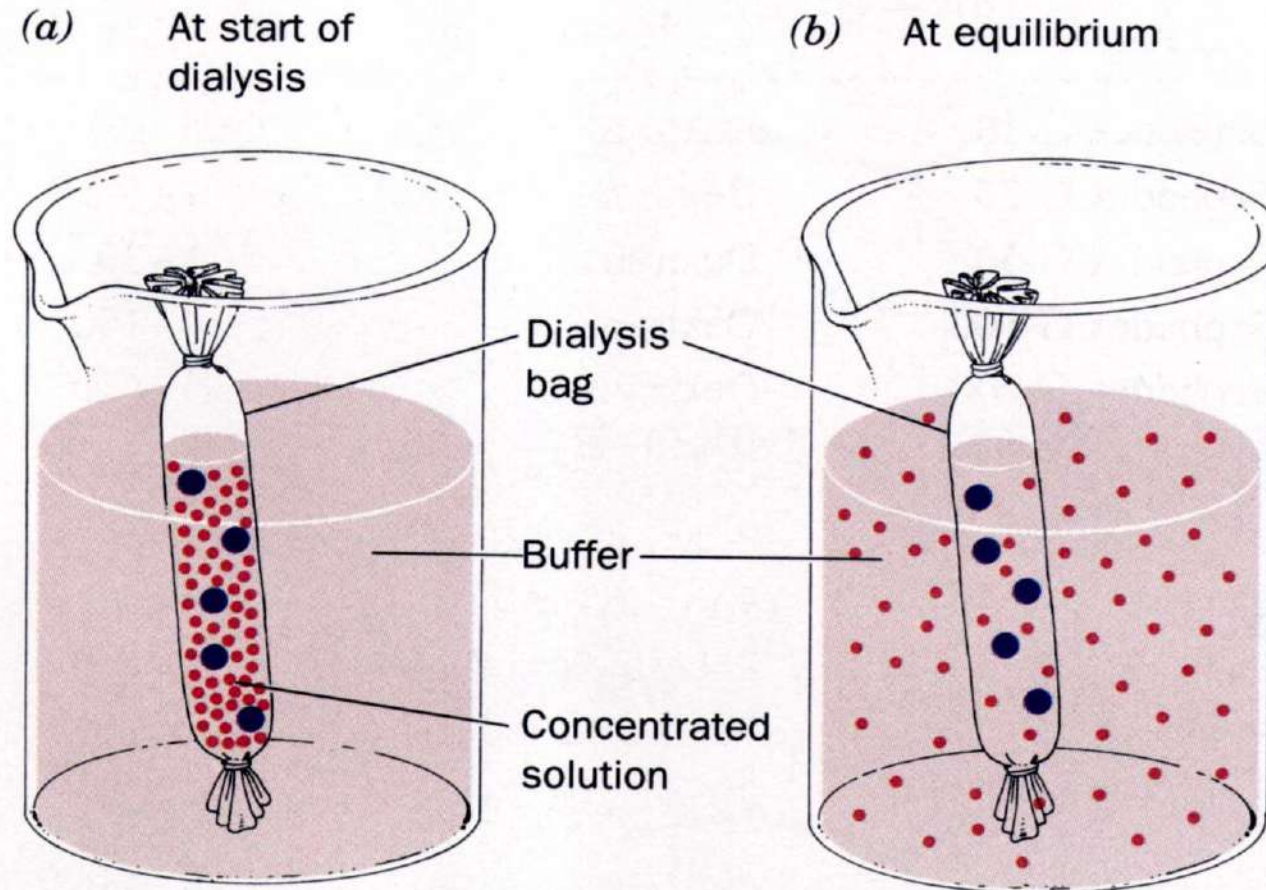


b. La chromatographie par filtration sur gel peut servir à estimer les masses moléculaires



c. La dialyse est une forme de filtration moléculaire

La dialyse permet de séparer les molécules selon leur taille, en utilisant des membranes semipermeables dont les pores ont une taille inférieure aux macromolécules



C. Chromatographie d'affinité

Dans la **chromatographie d'affinité**, un **ligand** qui se lie spécifiquement à la protéine est fixé par covalence à une matrice inerte et poreuse

Quand une solution protéique traverse ce matériel, la protéine d'intérêt se lie au ligand immobilisé, tandis que les autres sortent de la colonne. On peut récupérer la protéine désirée sous forme très pure en modifiant les conditions d'élution de sorte que la protéine se détache de la matrice chromatographique

Chromatographie d'affinité

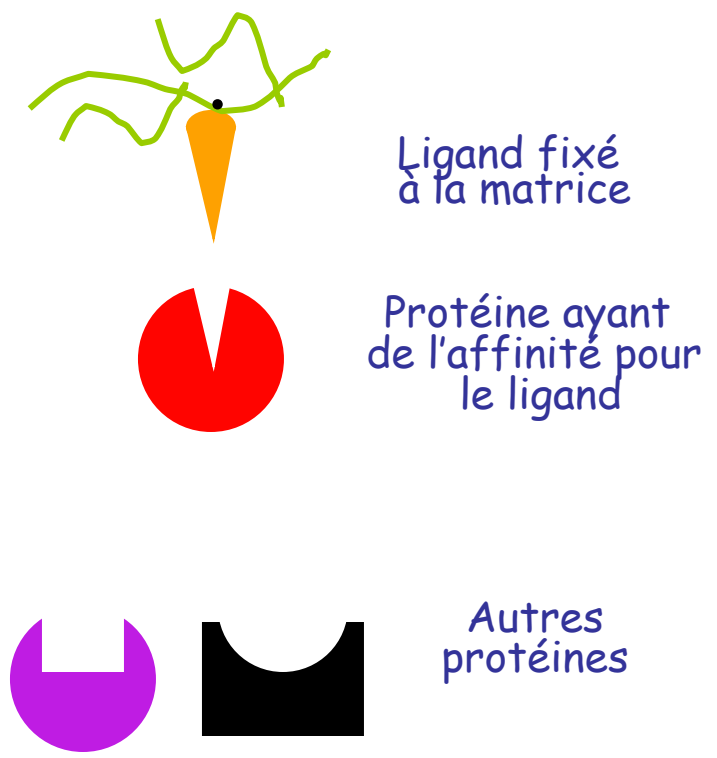
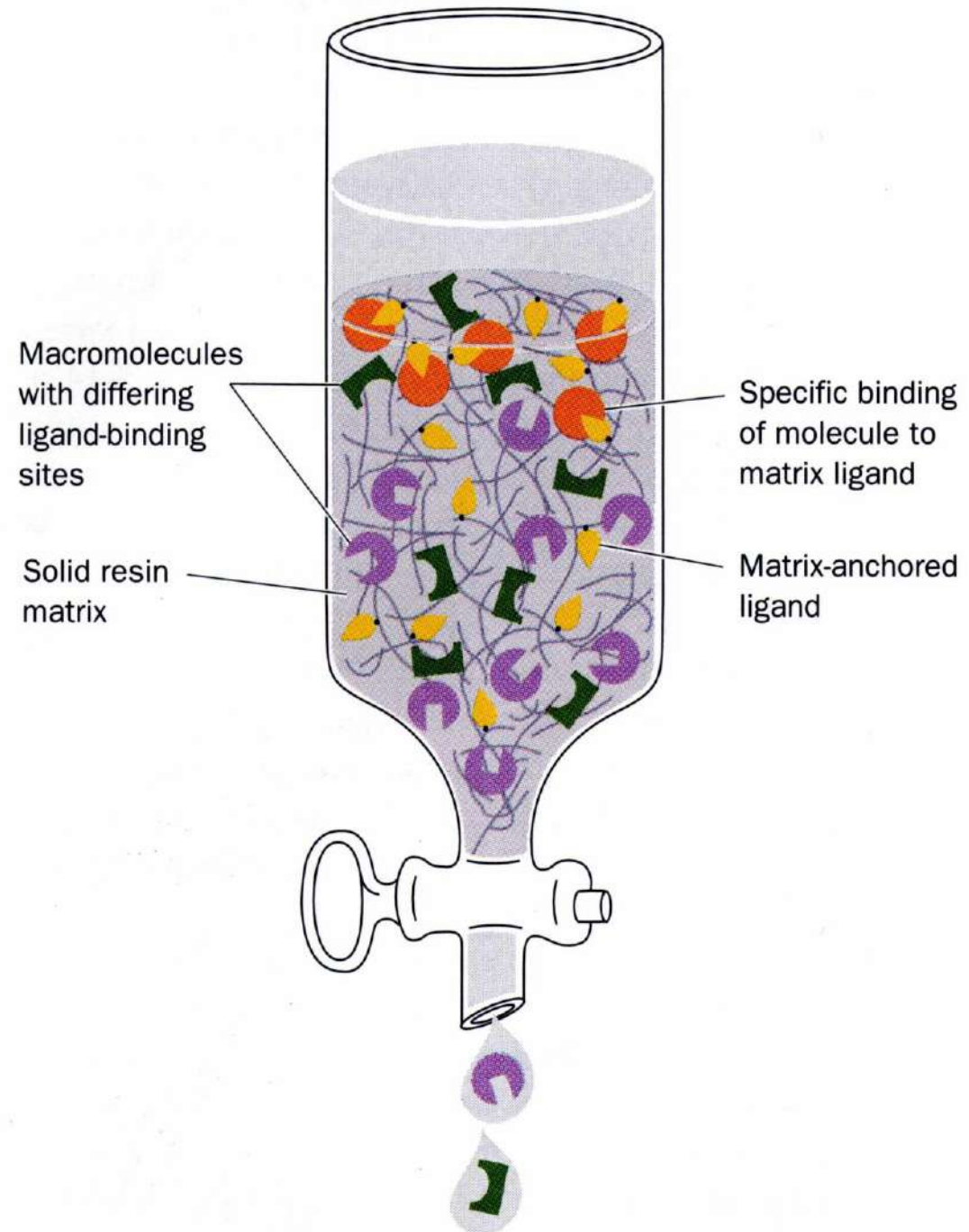
Principe :

Repose sur la relative spécificité d'interaction d'une protéine pour certains ligands

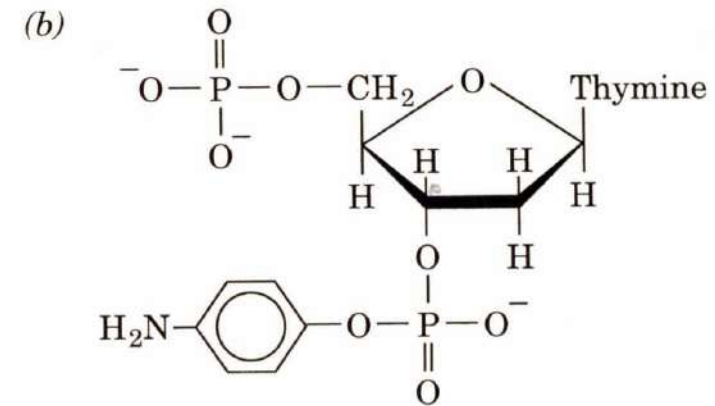
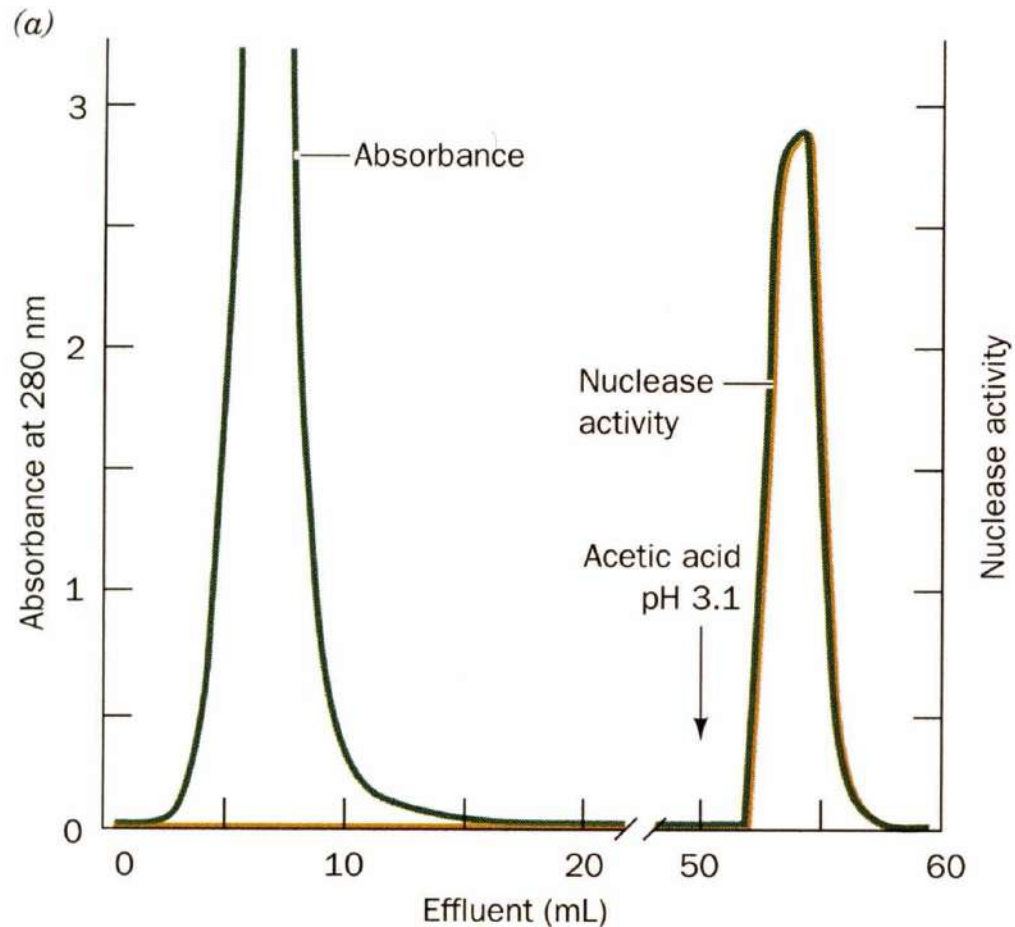
Exemple : affinité de l'hexokinase pour l'ATP

La protéine s'adsorbe sur un gel sur lequel le ligand est fixé de façon covalente

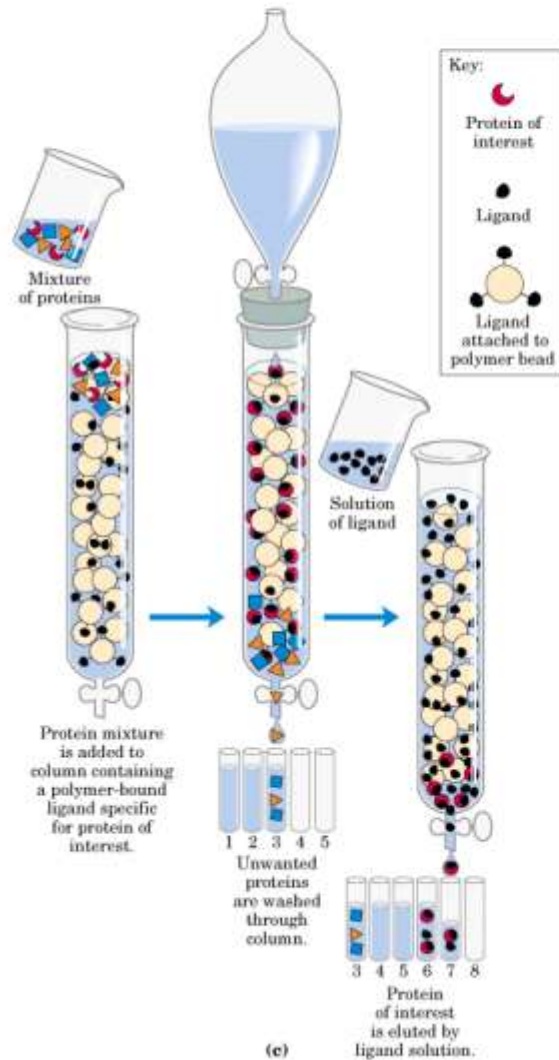
Elle est ensuite éluée en lavant avec un milieu contenant du ligand non fixé (ou en augmentant la concentration en sels, ou en changeant le pH)



Purification de la **nucléase de staphylocoque** par chromatographie d'affinité - le composé représenté en (b) a été lié par covalence à de l'agarose activé par le CNBr



Chromatographie d'affinité

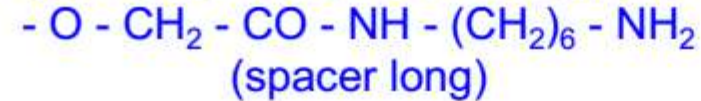


- La séparation des protéines est basée sur les interactions spécifiques. Les protéines n'ayant pas d'affinité pour le ligand sont éliminées lors du lavage.
- Le ligand est fixé sur un support inerte.
- L'éluion de la protéine fixée est réalisée soit par compétition, soit par variation de force ionique soit par variation du pH.

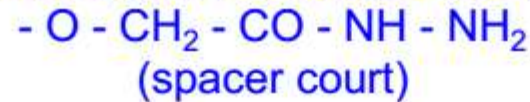
Le ligand est fixé par covalence au support inerte par l'intermédiaire d'un bras de fixation ("spacer" en anglais) qui permet l'élimination des contraintes stériques.

Ce bras doit posséder une réactivité chimique aux deux extrémités

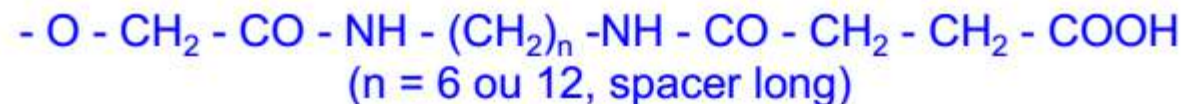
- bras aminohexylique : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle :

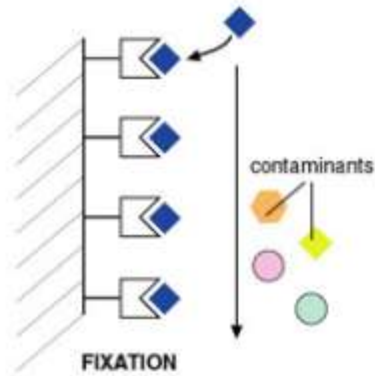


- bras hydrazide : permet la fixation d'un effecteur à fonction carboxyle :



- bras aminohexylique (ou aminododécylique) succinylée : permet la fixation d'un effecteur à fonction -NH_2 réactive :

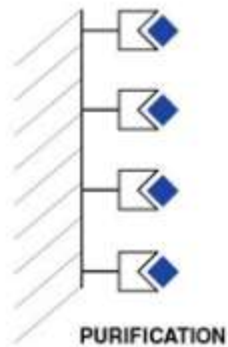




La fixation suit l'équilibre de formation du complexe



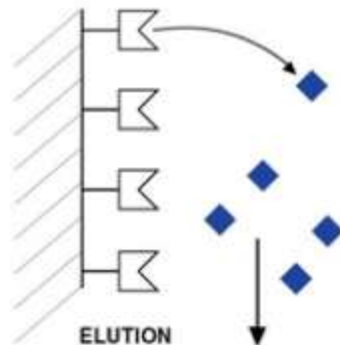
Constante d'équilibre $K_a = (P).(L) / (PL)$



la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte (agarose - sépharose)

⇒ seule la molécule présentant une affinité forte est retenue

(utilisation de tampon de force ionique modérée, de détergents pour éliminer les interactions aspécifiques)



L'éluion est obtenue par déplacement de l'équilibre de liaison :

- * par le ligand libre en concentration élevée (GSH/GST-Ag)
- * par variation de pH (ProtéineA-Sépharose)
- * par variation de la force ionique

D. Autres techniques chromatographiques

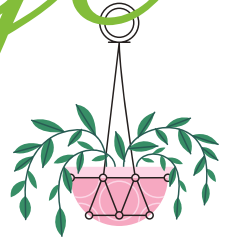
a. La chromatographie en phase inverse (RPC)

Dans les protéines dénaturées, les chaînes latérales non polaires se trouvent exposées au solvant. Par conséquent, les protéines établissent des interactions hydrophobes avec les groupes non polaires fixés sur une matrice

Les protéines sont éluées par une phase mobile contenant une forte concentration de solvant organique tel que l'acétonitrile

Dans la **chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** en phase inverse, des chaînes paraffiniques sont fixées sur des billes de silice

Bon courage



LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

