

TD B3P : Chromatographie d'exclusion-diffusion et détermination de masses molaires

Remarque :

La chromatographie d'exclusion-diffusion est également appelée :

- **tamissage moléculaire,**
- **chromatographie d'exclusion stérique,**
- **chromatographie par filtration sur gel.**

1. Présentation de la chromatographie d'exclusion-diffusion

1.1. Principe de la chromatographie d'exclusion-diffusion

La **chromatographie d'exclusion-diffusion** permet de séparer des solutés selon leur volume et plus précisément selon leur rayon de Stokes.

Si les molécules sont globulaires (et peuvent donc être assimilées à des sphères), il existe une relation de proportionnalité entre masse molaire et rayon de Stokes.

On admettra alors que le critère de séparation est la masse molaire des solutés.

La phase stationnaire est constituée de microbilles poreuses (dextran, agarose ou polyacrylamide) dont les pores sont de tailles précises mais variables selon le gel-résine utilisé.

La phase mobile est un solvant, l'éluant, qui sert uniquement à entraîner les solutés à séparer au travers le gel.

L'éluant a une composition fixe tout au long de l'élution, qui est qualifiée d'isocratique.

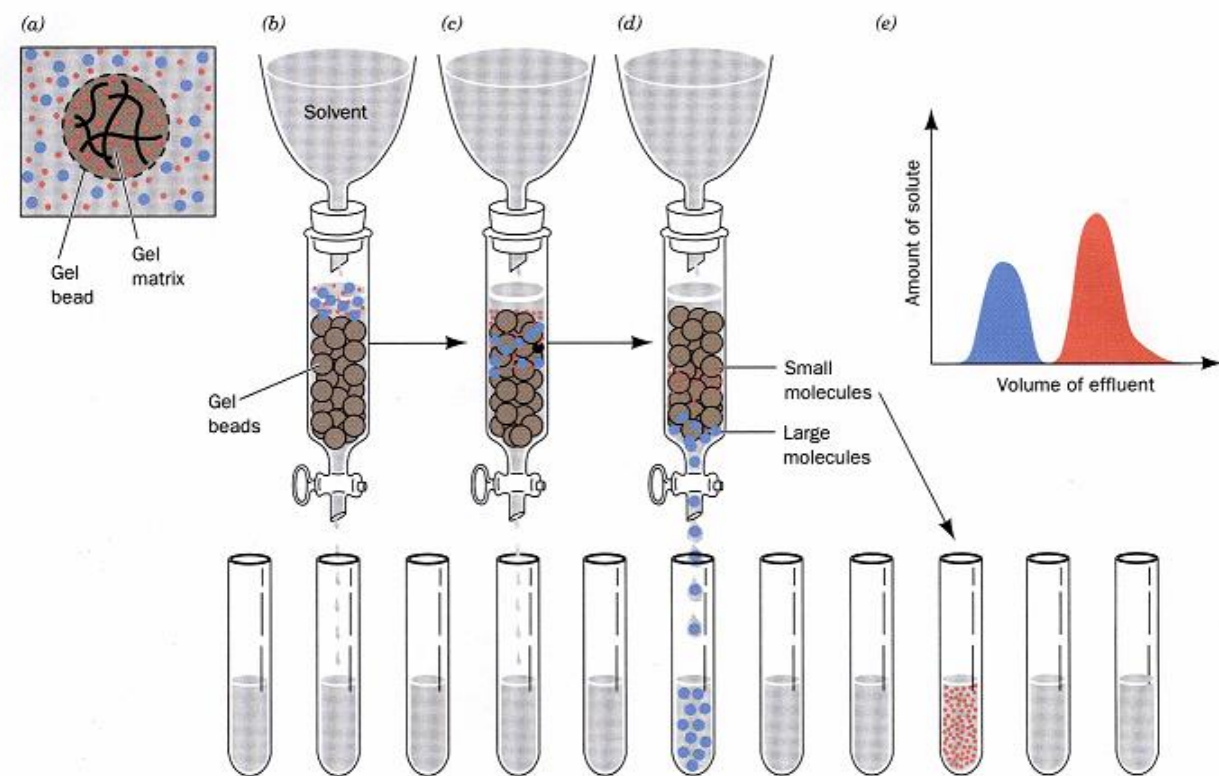
Dans le cas des protéines, les **conditions sont généralement non dénaturantes**.

1.2. Élution et séparation des solutés en chromatographie d'exclusion-diffusion

La taille précise des pores des billes entraîne un **tamissage des solutés selon leur taille** :

- plus les solutés sont petits et plus grand est le nombre de pores qu'ils peuvent pénétrer, retardant d'autant leur diffusion dans la colonne et donc leur élution.
- inversement, les solutés plus gros pénètrent dans moins de pores et seront élués plus rapidement.
- les solutés de tailles supérieures à celle des pores sont exclus et migrent avec l'éluant (solvant de la phase mobile).

La vitesse de migration, donc l'ordre d'élution des molécules, est inversement proportionnelle au logarithme décimal de leur masse molaire (donc la taille)



Pour chaque colonne de chromatographie d'exclusion-diffusion, on définit les volumes suivants :

- **Volume d'élution d'un soluté, V_e** :

Volume de solvant pour éluer un soluté de la colonne.

Il dépend du volume total de gel et de l'homogénéité du tassage de la colonne.

- **Volume mort, V_0** :

Volume d'élution d'un soluté non retardée, c'est-à-dire un soluté de taille supérieure à celle des pores et qui n'y diffuse pas, comme le **bleu dextran** par exemple.

Correspond au **volume de liquide à l'extérieur des billes poreuses**.

- **Volume interne des microbilles poreuses, V_i** :

Volume total de l'ensemble des microbilles poreuses.

- **Volume total, V_t** :

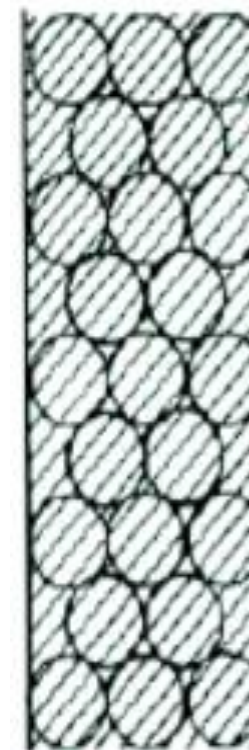
Volume total du gel. Il correspond à $V_i + V_0$.

Il correspond au volume d'élution d'un soluté assez petit pour pénétrer dans tous les pores.

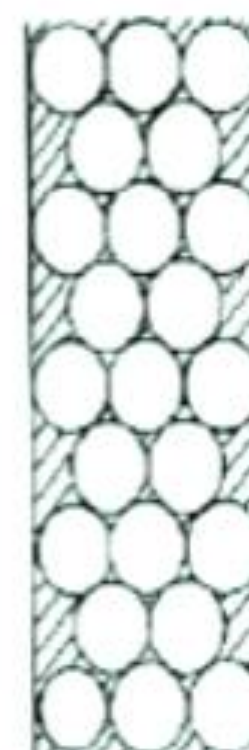
- **Volume d'élution relatif d'un soluté :**

Rapport du volume d'élution sur le volume mort :

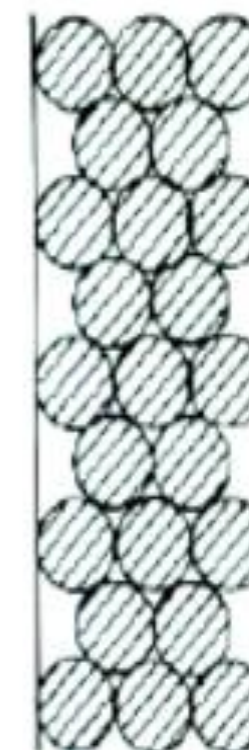
$$\frac{V_e}{V_0}$$



volume
total
(V_t)



volume
mort
(V_0)



volume
interne
(V_i)

À partir de ces volumes, on peut déterminer, pour chaque soluté élué, son coefficient d'avancement ou coefficient de partage ou coefficient de partition, noté K_{av} :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Il existe une relation de proportionnalité entre le K_{av} et le logarithme décimal de la masse molaire d'un soluté.

1.3. Domaine de fractionnement en chromatographie d'exclusion-diffusion

Pour un système chromatographique donné, il existe deux cas limites :

- celui des solutés qui sont trop gros et ne peuvent pénétrer aucun pore.
- celui des solutés si petits qu'ils entrent dans tous les pores.

Ces deux cas définissent respectivement les limites supérieure et inférieure de masse molaire en dehors desquelles la séparation des solutés selon leur taille n'est pas possible ou efficace.

À chaque colonne de chromatographie d'exclusion-diffusion est donc associé un **domaine de fractionnement exprimé en masses molaires** (en Da avec $1 \text{ Da} = 1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) **qui est l'intervalle de masses molaires pour lesquelles la séparation des solutés sera possible et efficace.**

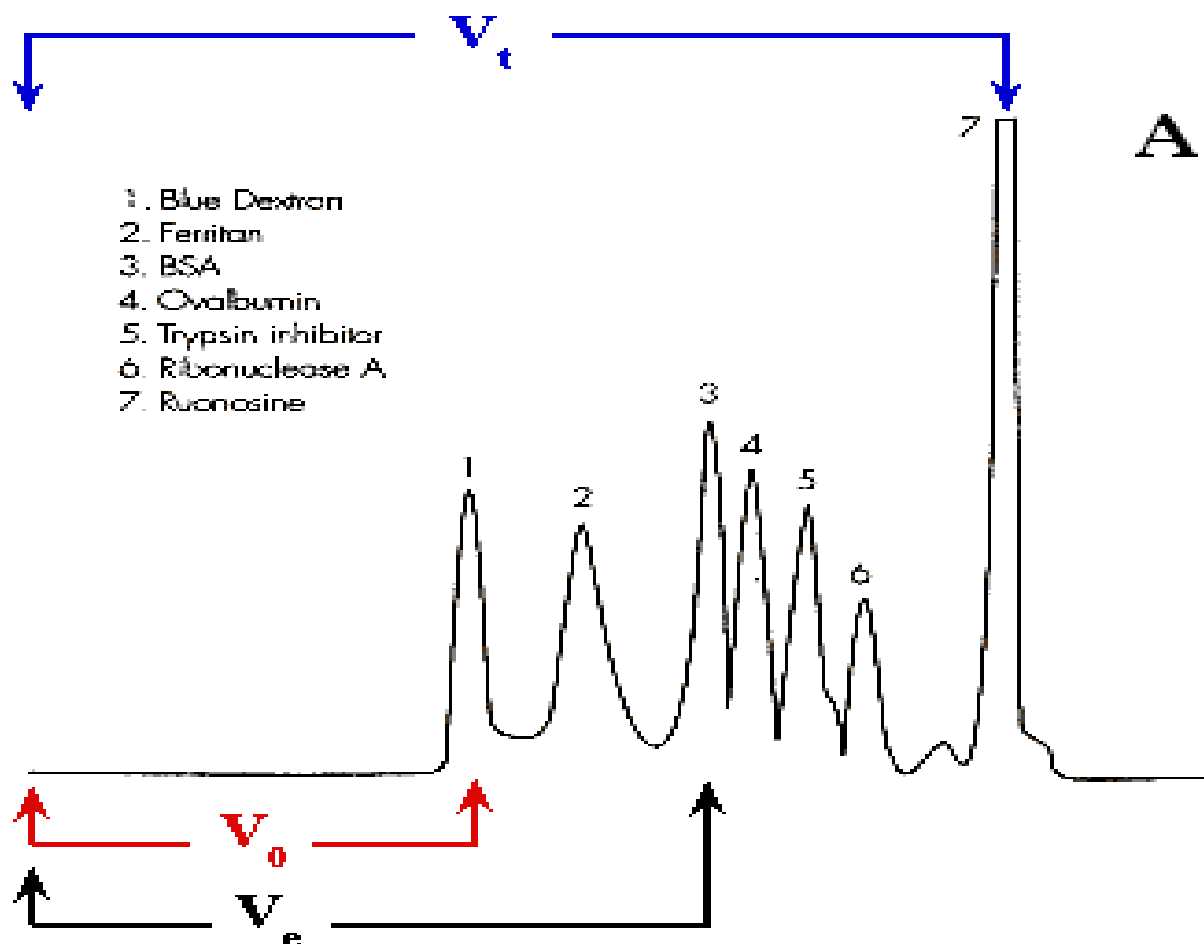
Limite, ou seuil d'exclusion = limite supérieure du domaine de fractionnement

Type de résine	Domaine de fractionnement, en Da
Type <i>dextran</i> : Sephadex G10 Sephadex G15 Sephadex G25 Sephadex G50 Sephadex G75 Sephadex G200	0 - 700 0 - 1 500 1 000 - 5 000 1 500 - 30 000 3 000 - 80 000 5 000 - 800 000
Type <i>polyacrylamide</i> : Bio-gel P-2 Bio-gel P-6 Bio-gel P-10 Bio-gel P-100 Bio-gel P-150 Bio-gel P-300	100 - 1 800 1 000 - 6 000 1 500 - 20 000 5 000 - 100 000 15 000 - 150 000 60 000 - 400 000
Type <i>agarose</i> : Sépharose 2B Sépharose 4B Bio-gel A-0,5M Bio-gel A-15M Bio-gel A-150M	2 000 000 - 25 000 000 300 000 - 3 000 000 30 000 - 500 000 30 000 - 15 000 000 5 000 000 - 150 000 000

2. Détermination de la masse molaire d'une protéine par chromatographie d'exclusion-diffusion

1) Un mélange de molécules, que l'on appelle standards, de masses molaires connues, est séparé par chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel résine.

On obtient alors le profil d'éluion des standards :

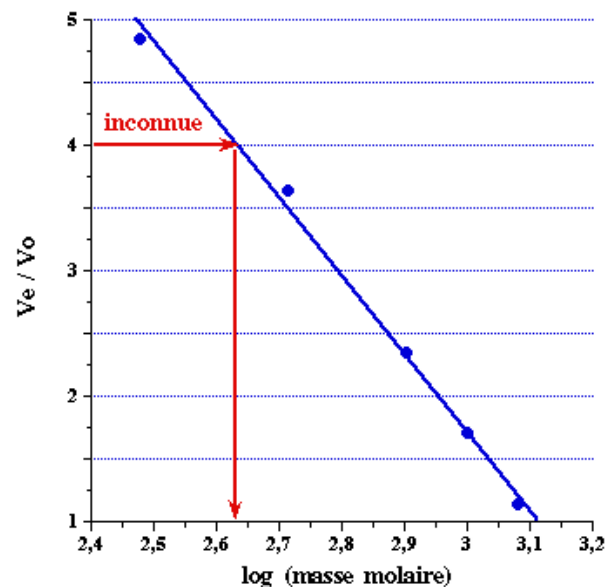


2) À partir du profil d'élution des standards, on trace la droite d'étalonnage du gel résine :

$$K_{av} = f(\log_{10}(M)) \text{ ou } \frac{V_e}{V_0} = f(\log_{10}(M))$$

3) Dans les mêmes conditions chromatographiques, on détermine le volume d'élution V_e de la protéine de masse molaire inconnue.

4) On reporte sur la droite d'étalonnage pour déterminer graphiquement le logarithme décimal de la masse molaire de la protéine.



5) On détermine par le calcul la masse molaire de la protéine : $M_{\text{protéine}} = 10^{\log_{10}(M_{\text{protéine}})}$