

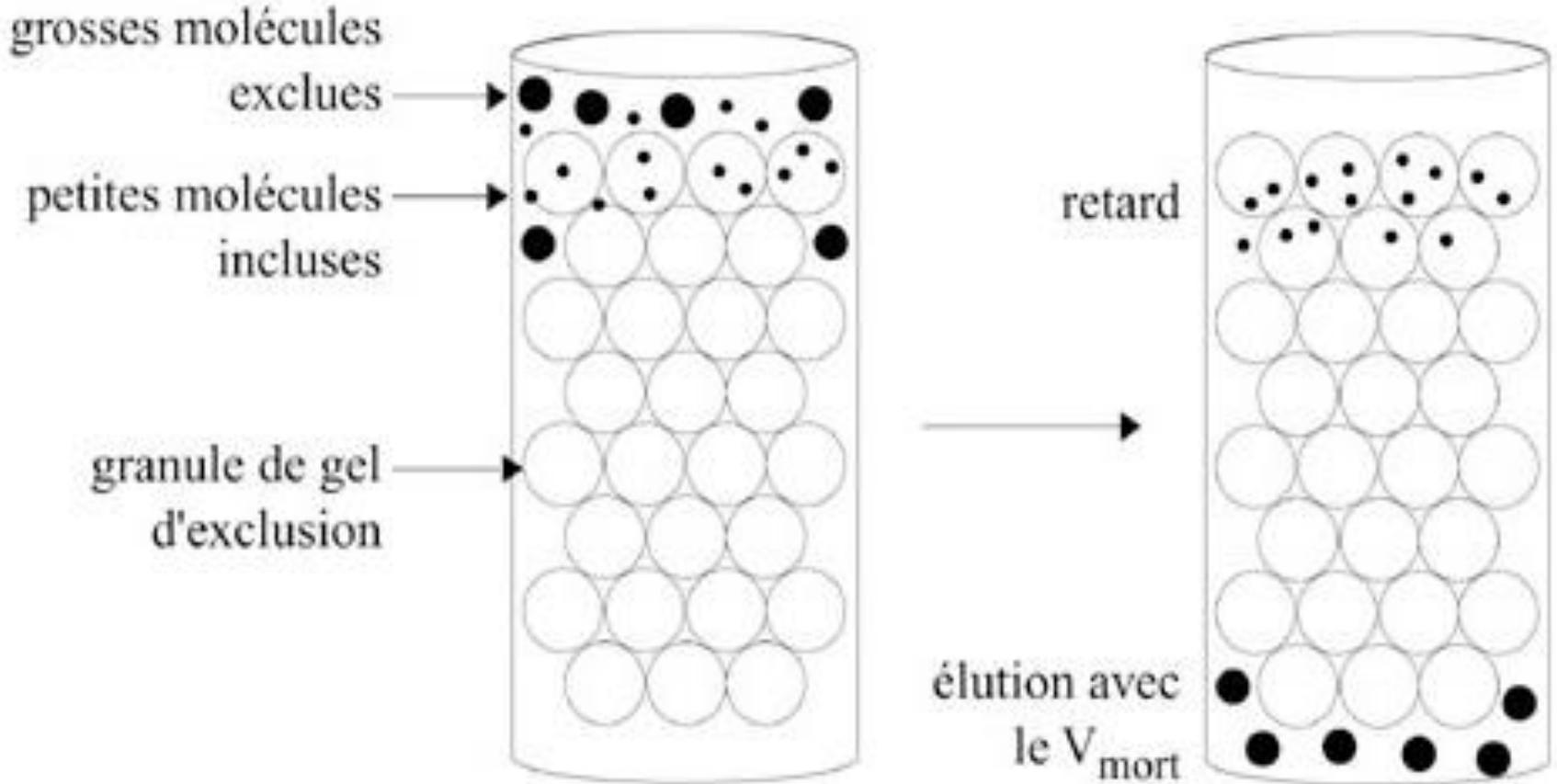
Séparation-Purification de Biomolécules

Les paramètres physico-chimiques sur lesquels reposent les principes de séparation

paramètres	type de chromatographie	domaine d'application
la charge électrique	échange d'ions	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres
la taille et la forme (en fait, le volume)	exclusion ou gel de filtration	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides nucléiques • sucres • lipides
l'existence de structures particulières qui permettent d'établir des liaisons spécifiques	affinité	<ul style="list-style-type: none"> • protéines
la polarité et/ou l'hydrophobicité	polarité de phase inversée ou phase reverse interactions hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> • protéines • polypeptides • acides aminés • acides nucléiques • sucres • acides gras <ul style="list-style-type: none"> • protéines

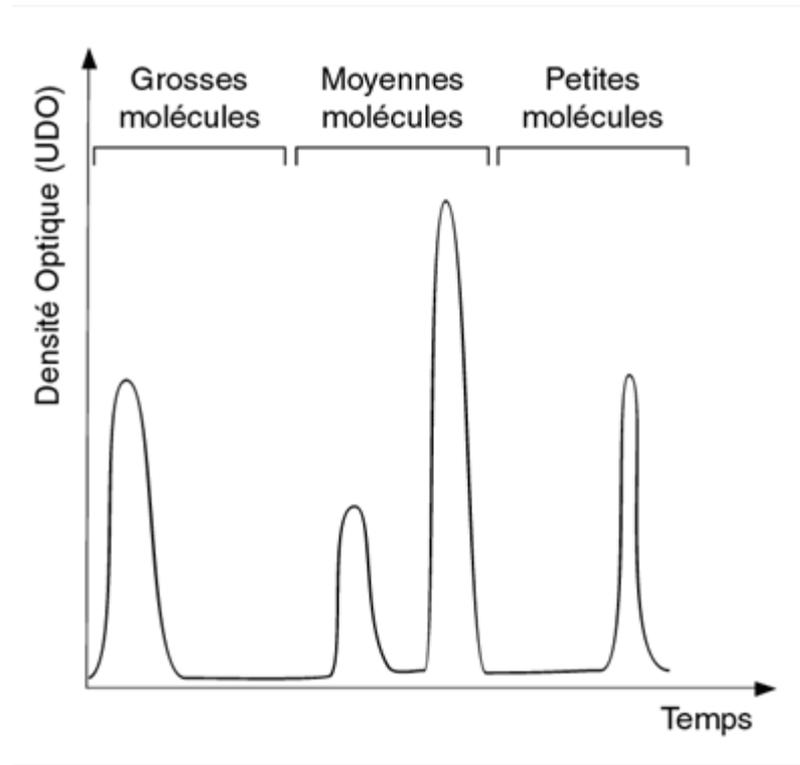
LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires.



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

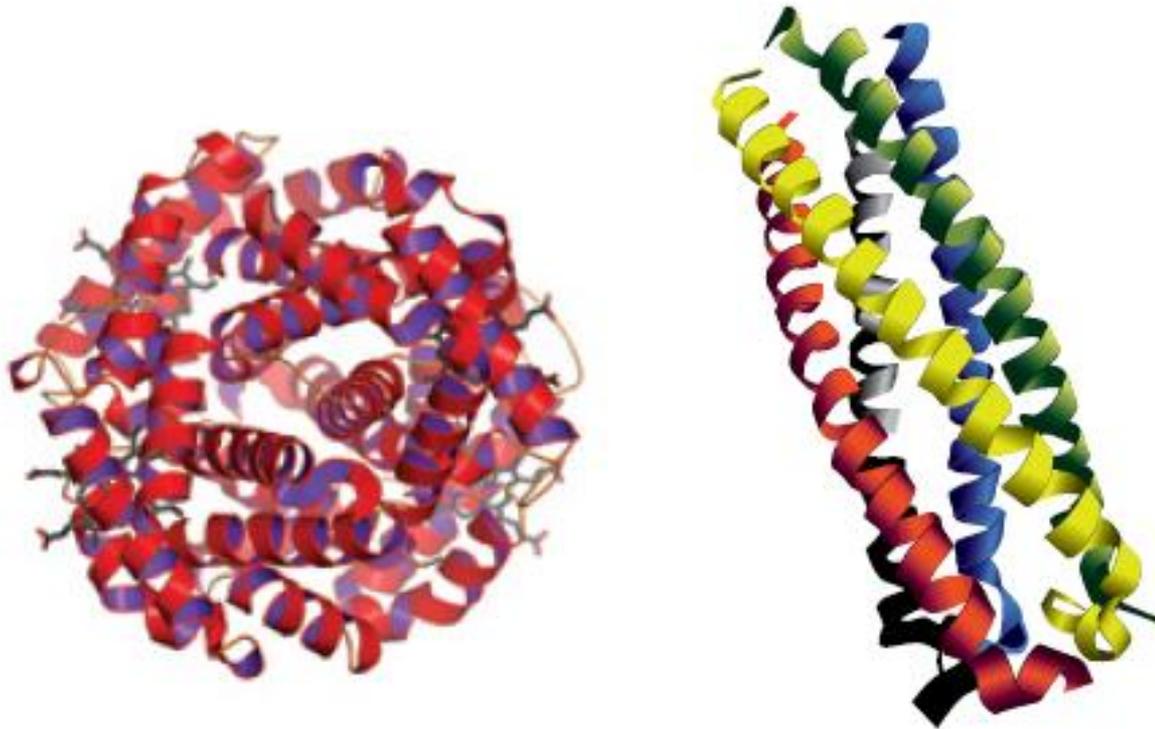
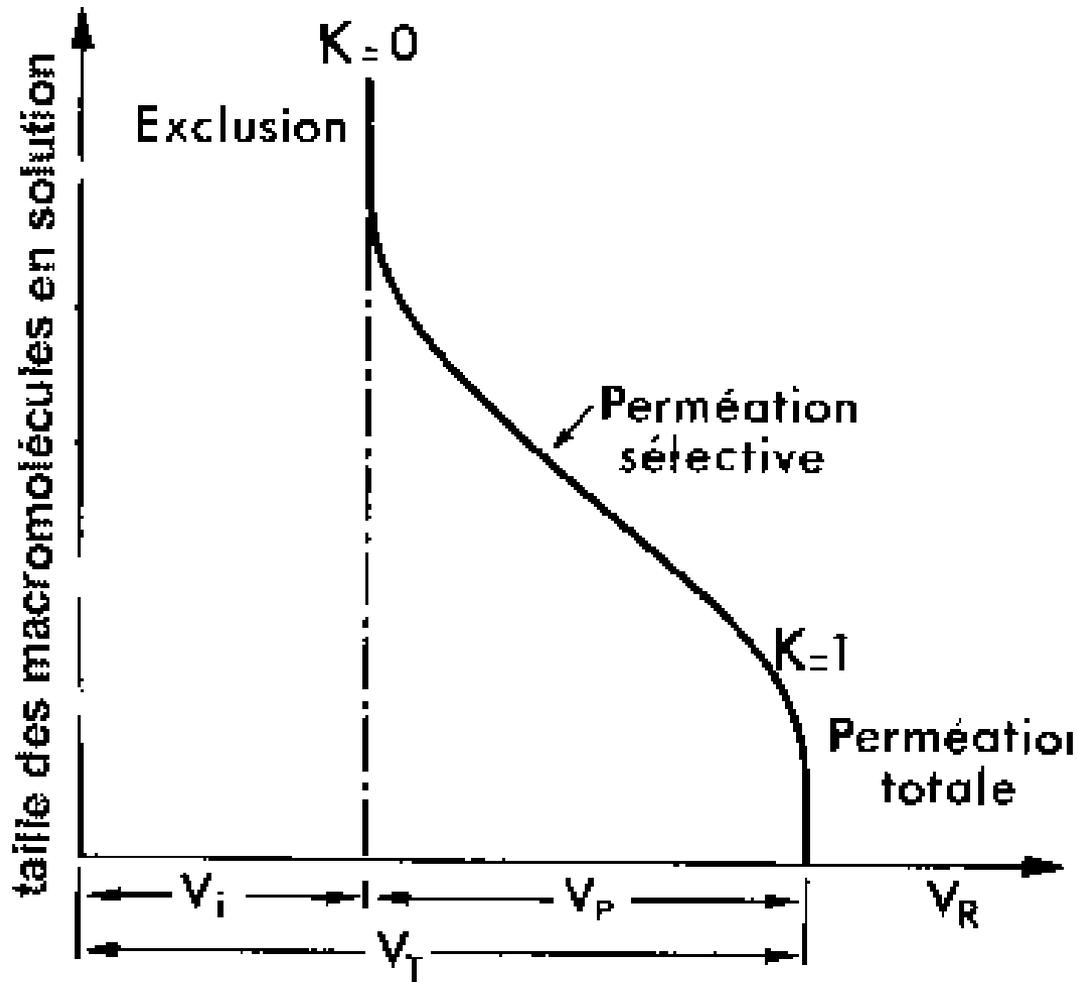


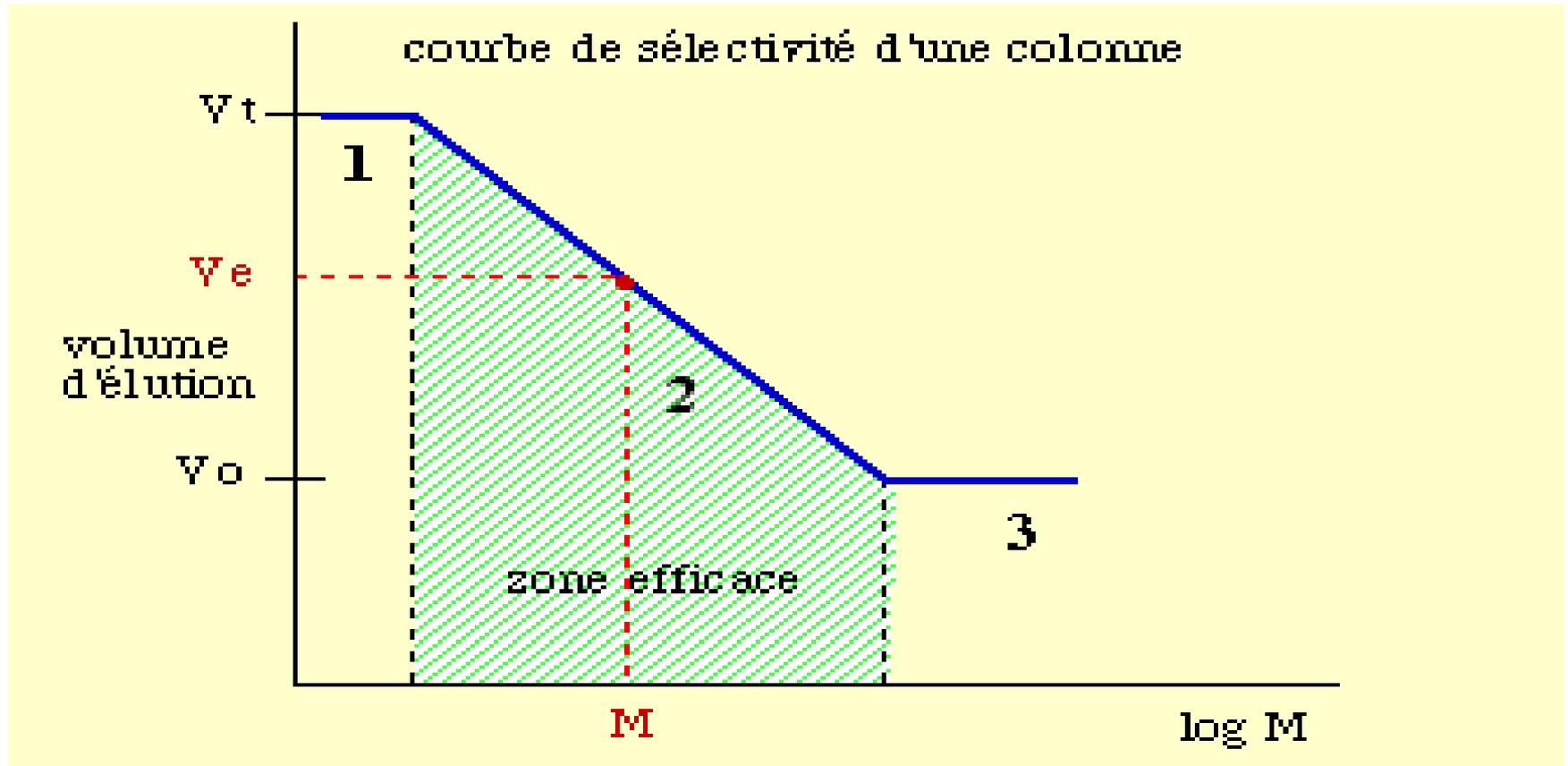
Figure 3 : comparaison de la protéine globulaire compacte par rapport à la protéine cylindrique.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



La courbe obtenue présente généralement une partie linéaire

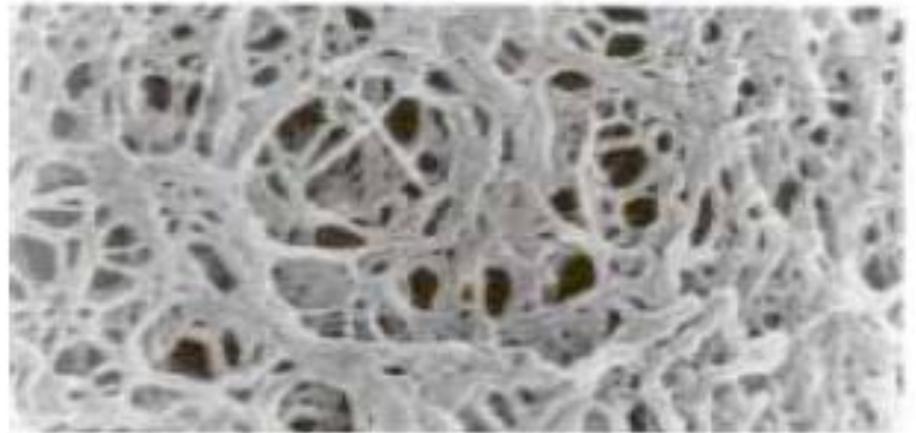
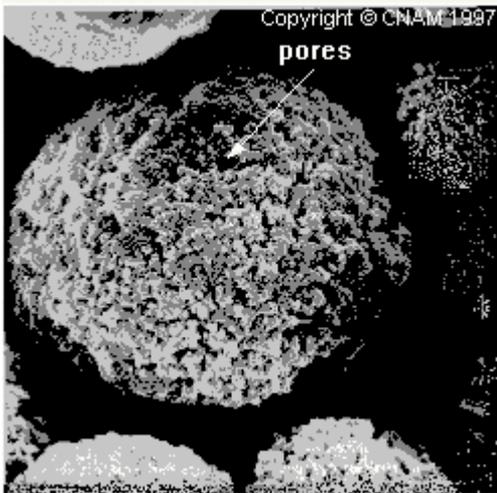
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



A chaque valeur du volume de rétention correspond une taille de particule donc une masse moléculaire .

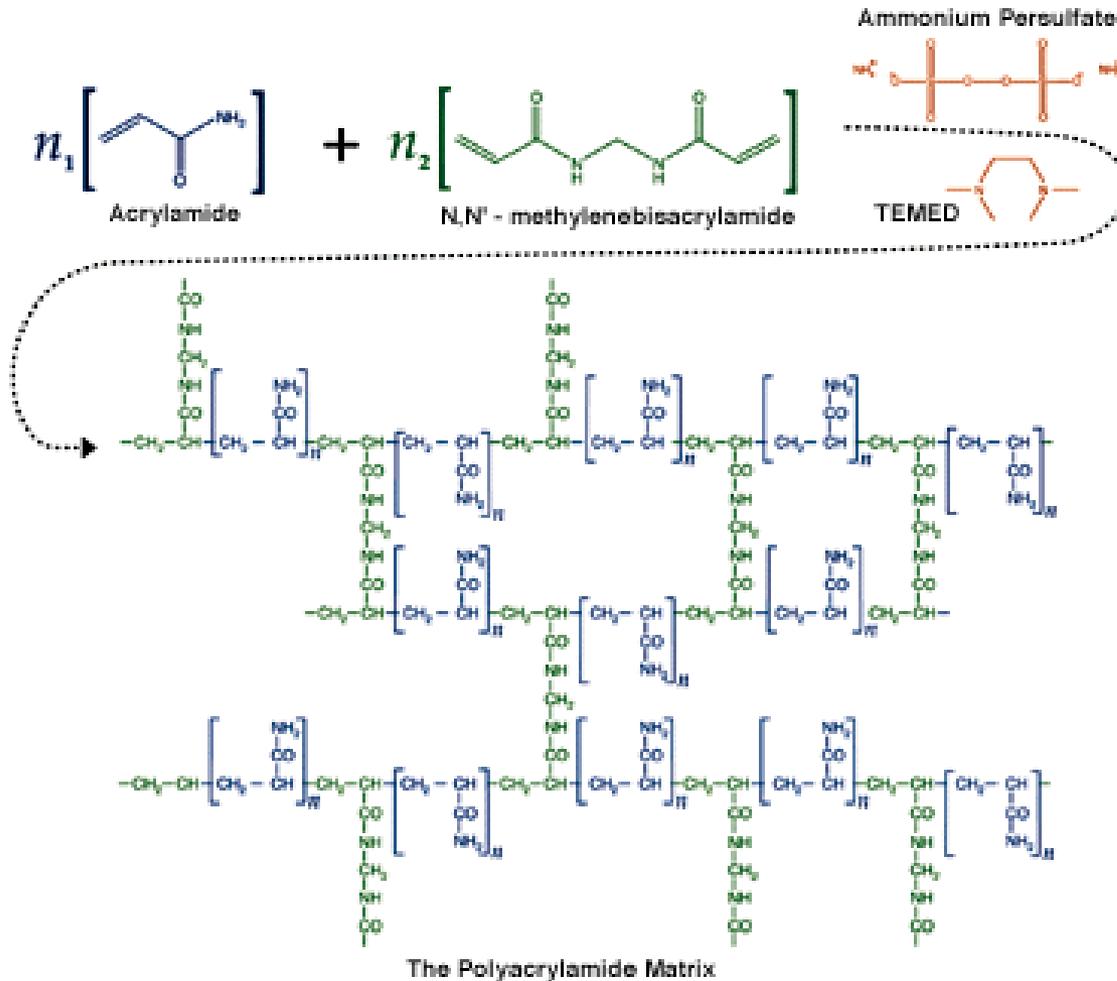
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- La phase stationnaire



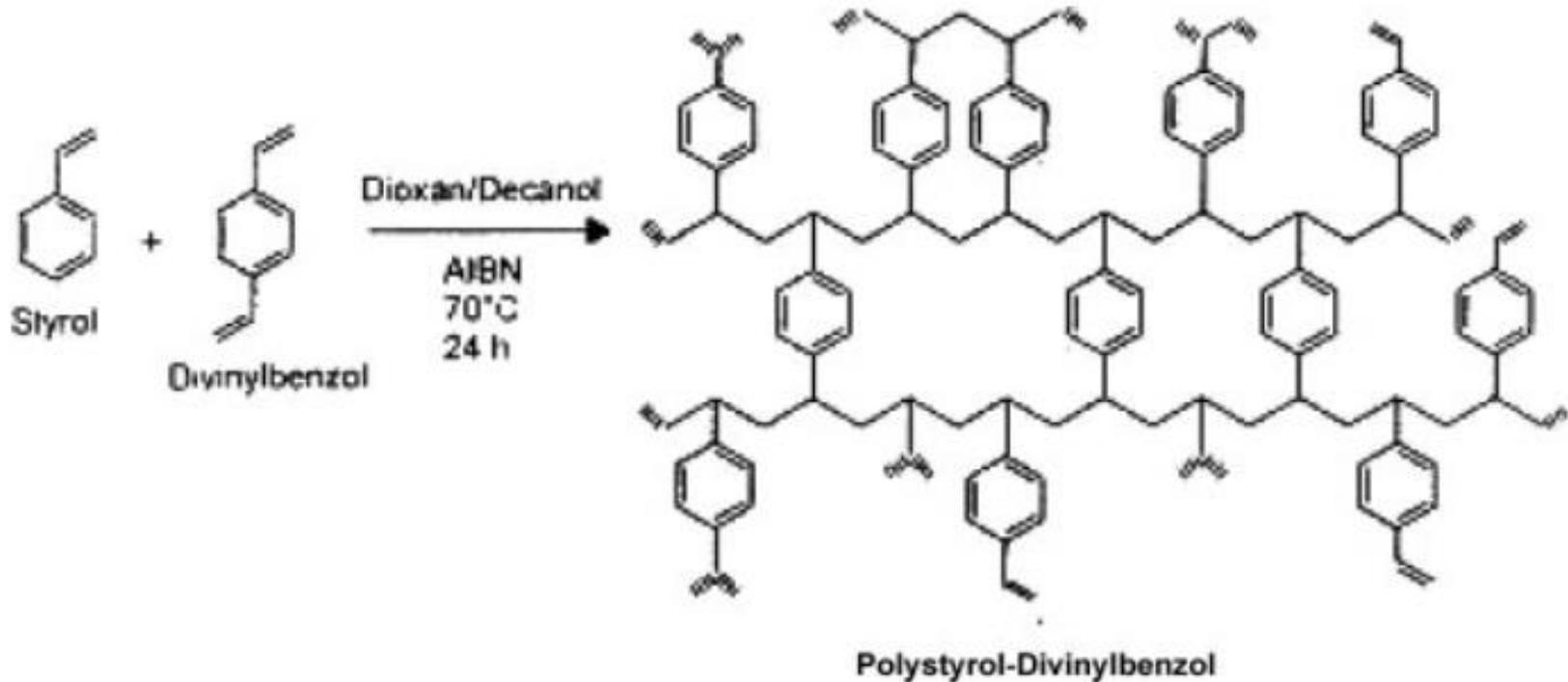
Structure de polyacrylamide

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



Exemple: Le gel de polyacrylamide (Biogel)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



Le gel de polystyrène – divinylbenzène
(Styragel)

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

Les gels peuvent varier selon :

le diamètre des pores: il est soigneusement défini. Les gels sont plus ou moins poreux selon leur capacité de gonflement;

La capacité de gonflement est la **quantité de solvant capable d'être absorbée par gramme de gel sec.**

Elle s'exprime par un chiffre d'autant plus élevé que les pores sont plus grands.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Exemple de gels commercialisés:

<i>P.M. séparés</i>		<i>P.M. séparés</i>	
<i>Sephadex</i>		<i>Agarose</i>	
G 10	jusqu'à 700	10 %	10.000 à 250.000
G 15	jusqu'à 1.500	8 %	25.000 à 700.000
G 25	100 à 5.000	6 %	50.000 à 2.000.000
G 50	500 à 10.000	4 %	200.000 à 15.000.000
G 75	3.000 à 70.000	2 %	500.000 à 150.000.000
G 100	4.000 à 150.000		
G 150	5.000 à 400.000		
G 200	5.000 à 800.000		
<i>Biogel</i>		<i>Styragel</i>	
P-2	200 à 2.000	60	800
P-4	500 à 4.000	100	2.000
P-6	1.000 à 5.000	400	8.000
P-10	5.000 à 17.000	1×10^3	20.000
P-30	20.000 à 50.000	5×10^3	100.000
P-60	30.000 à 70.000	10×10^3	200.000
P-100	40.000 à 100.000	30×10^3	600.000
P-150	50.000 à 150.000	1×10^5	2.000.000
P-200	80.000 à 300.000	3×10^5	6.000.000
P-300	100.000 à 400.000	5×10^5	10.000.000
		10×10^5	20.000.000

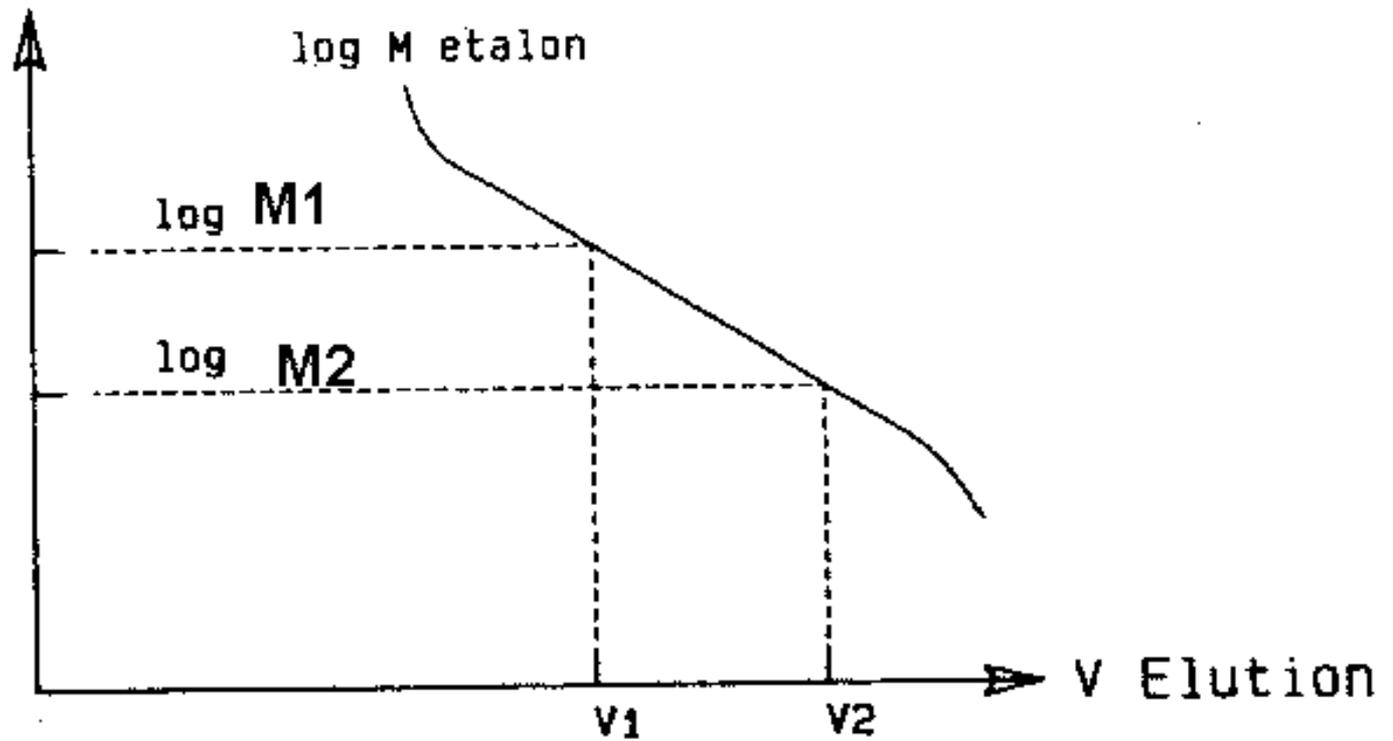
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

- Exemple de solvants utilisés: chloroforme, diméthylformamide, tétrahydrofuranne, toluène, eau et solution tampon.

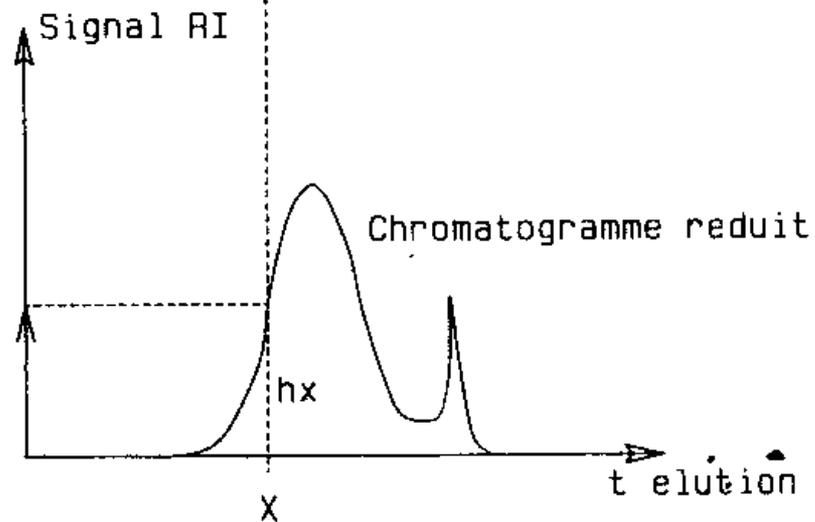
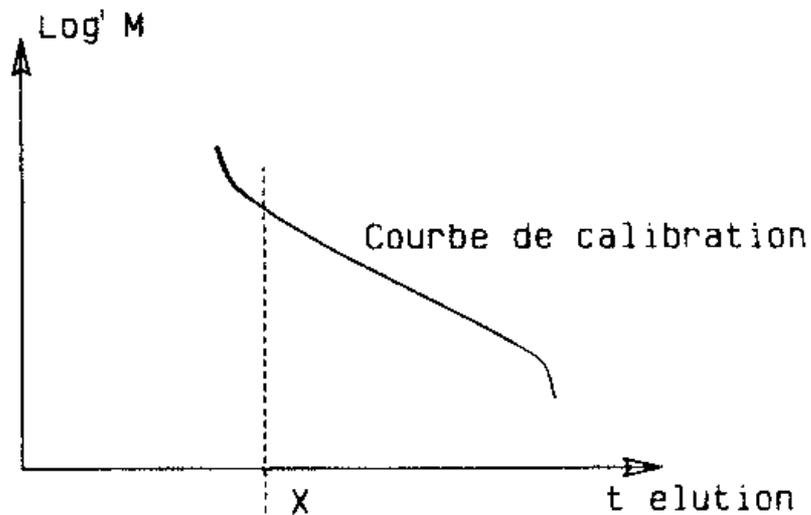
Solvent	Solubility Parameter, δ [(cal/cm ³) ^{1/2} , at 20°C]	Viscosity (cP, at 20°C)	Refractive Index, n_D^{20}	Boiling Point (°C)
Hexane	7.3	0.31	1.3749	68.7
Cyclohexane	8.2	1.0	1.4262	84.2
Toluene	8.9	0.59	1.4969	92.1
Tetrahydrofuran	9.1	0.55	1.4072	66
Ethyl acetate	9.1	0.45	1.3742	88.1
Chloroform	9.3	0.57	1.4458	61.2
Methyl ethyl ketone	9.3	0.43	1.3788	79.6
Dichloromethane	9.7	0.44	1.4241	39.8
Dichloroethane	9.8	0.79	1.4448	83.5
Acetone	9.9	0.36	1.3587	56.3
1,2,4-Trichlorobenzene	10.0	1.89 (25°C), 0.5–0.6 (145°C)	1.5717	213.5
<i>o</i> -Dichlorobenzene	10.0	1.32 (25°C)	1.5514	180.5
<i>m</i> -Cresol	10.2	12.8 (25°C)	1.5398	202.2
<i>o</i> -Chlorophenol	10.2	4.11	1.5473 (40°C)	175.6
Pyridine	10.7	0.95	1.5102	115.2
Dimethylacetamide	10.8	0.97	1.4384	166.1
<i>N</i> -Methylpyrrolidone	11.3	1.67 (25°C)	1.4700	202
Dimethyl sulfoxide	12.0	2.24	1.4783	189.0
Dimethylformamide	12.1	0.92	1.4305	153.0
1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol	12.2	1.65	1.2750	58.2

Tableau: Solvants couramment utilisés avec des garnissages de type PS/DVB réticulé

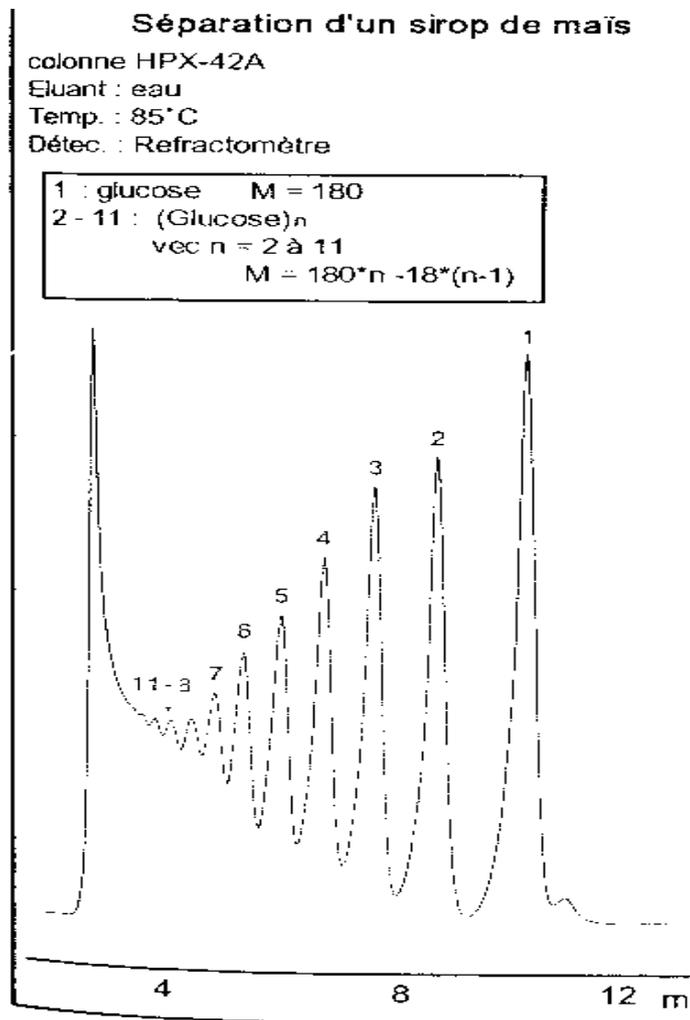
CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION



Exemple d'application :
séparation d'un sirop de maïs

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION

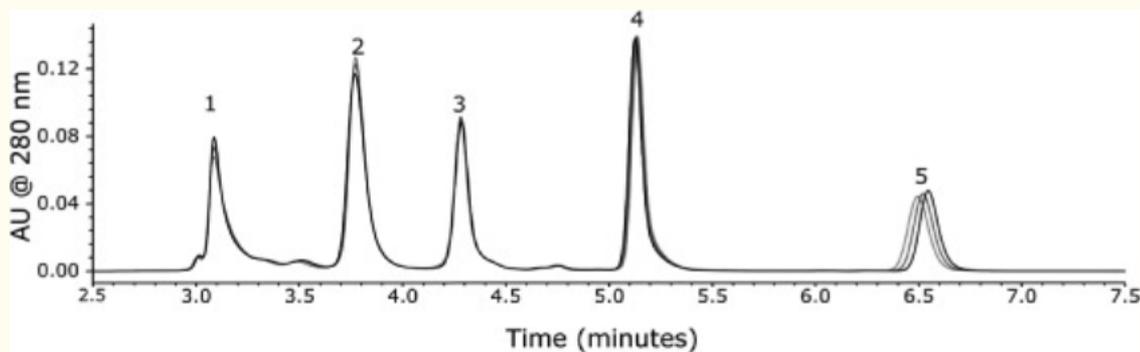
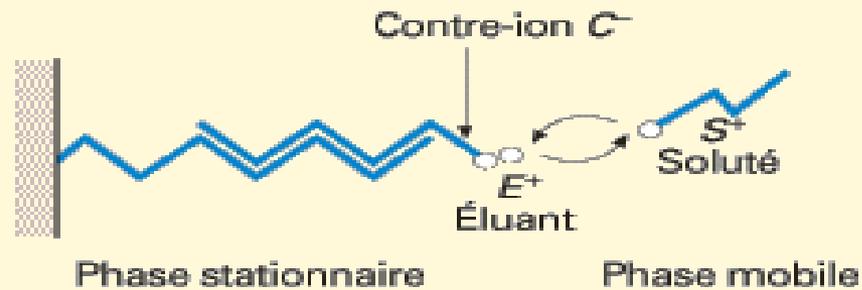


Figure 2

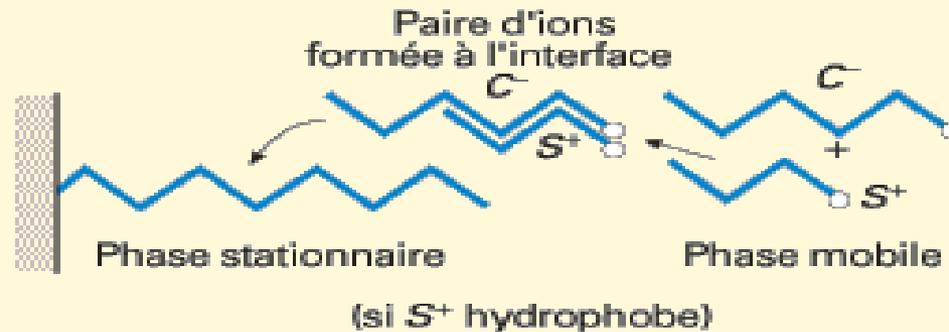
Separation of (1) thyroglobulin, (2) IgG, (3) BSA, (4) Myoglobin, and (5) Uracil on a Waters ACQUITY UPLC BEH200 SEC, 1.7 μ , 4.6 \times 150 mm. Mobile phase: 100mM sodium phosphate, pH 6.8. Flow rate: 0.3mL/min. Temperature: 30°C (black), 40°C (blue), 50°C (red). Reproduced with permission from Waters Corporation, Milford, MA. (Color figure available online.)

Chromatographie de paires d'ions

Chromatographie de paires d'ions



(a) échange d'ions dynamique



(b) partage

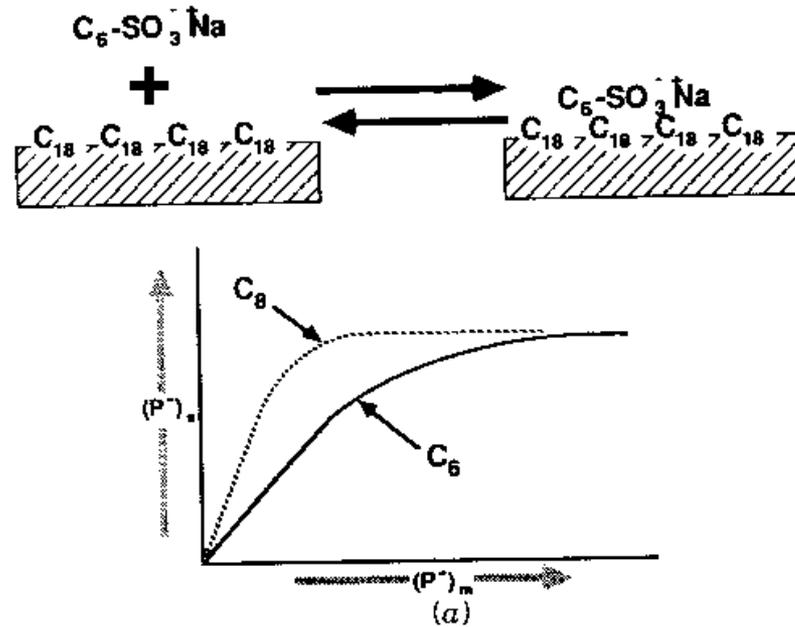
Chromatographie de paires d'ions

- Les agents d'appariement d'ions:

Les agents d'appariement d'ions utilisés sont soit des acides forts (acides sulfoniques ou sulfuriques), soit des bases fortes (ammonium quaternaire) de sorte qu'ils sont totalement ionisés quel que soit le pH.

Anioniques	Cationiques
Alkyl- et arylsulfonates pentanesulfonate hexanesulfonate octanesulfonate dodécanesulfonate camphosulfonate naphtalènesulfonate	Ammonium quaternaires tétraméthylammonium tétraéthylammonium tétrabutylammonium tétraheptylammonium cétyltriméthylammonium (cétrimide) palmityltriméthylammonium
Alkylsulfates hexylsulfate octylsulfate décylsulfate dodécylsulfate	Amines protonées octylammonium trioctylammonium
Anions inorganiques trifluoroacétate trichloroacétate phosphate perchlorate	

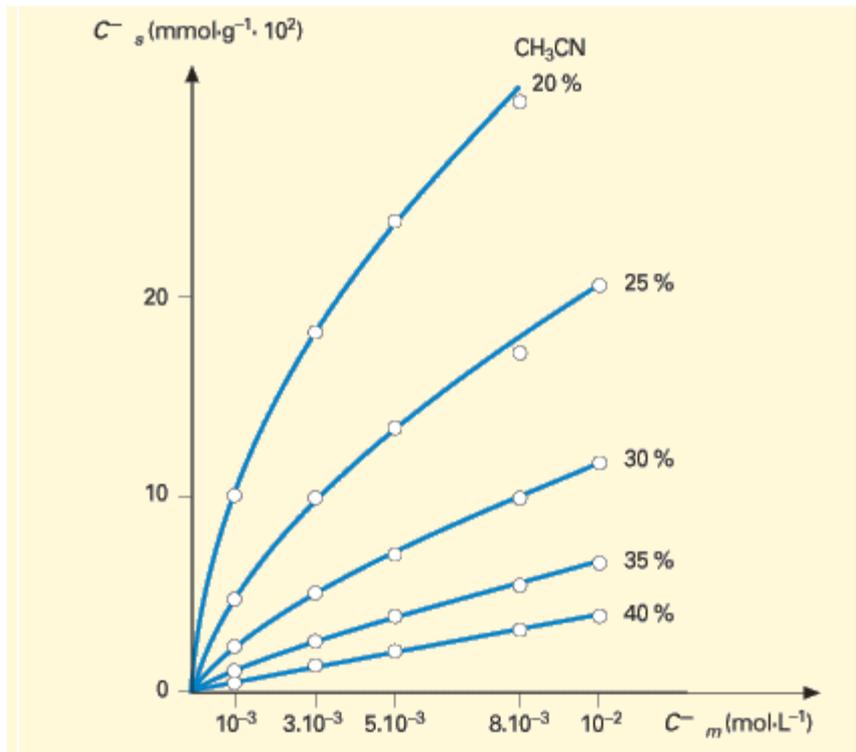
Chromatographie de paires d'ions



Cette fixation de l'agent d'appariements d'ions sur la phase stationnaire est d'autant plus importante que la chaîne hydrocarbonée (de l'agents d'appariement d'ions) est plus longue.

Chromatographie de paires d'ions

On a également démontré que plus la teneur en modificateur organique (exemple acétonitrile) est importante et plus faible est la fixation de l'agent d'appariement d'ions sur la phase stationnaire.



Colonne : longueur : 15 cm, diamètre intérieur : 4,8 mm.
Phase stationnaire : silice greffée octyle de type LiChrosorb RP 8, 10 μm .
Phase éluante : acétonitrile-eau v/v ; HClO_4 0,04 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;
dodécanesulfonate de sodium à la concentration indiquée.
Débit : 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
Détection : réfractométrie différentielle.
Température : 40 $^\circ\text{C}$.

Chromatographie de paires d'ions

- Comment varie le temps de rétention d'une espèce quand on augmente la concentration en agent d'appariement d'ions P- (influence de la force ionique):

colonne RP8
 phase = vente eau 10/ACUGO.
 $HClO_4 @ 0,04 M$
 agent appariement d'ions.
 Octane sulfonate
 ole sodium.

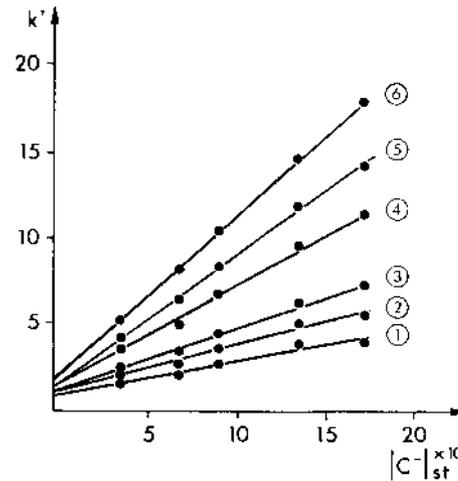


FIG. X.4. — Variation du facteur de capacité k' en fonction de la concentration du contre-ion dans la phase stationnaire.

Conditions opératoires : cf. figure X.2 sauf acétonitrile-eau : 10-90 v/v. Détection : UV à 254 nm. Solutés : 1 : pyridine ; 2 : méthyl-2 pyridine ; 3 : méthyl-3 pyridine ; 4 : diméthyl-2,4 pyridine ; 5 : diméthyl-3,4 pyridine ; 6 : triméthyl-2,4,6 pyridine.

Chromatographie de paires d'ions

Si l'on augmente la concentration de P- dans la phase mobile après avoir saturée la phase stationnaire que se passe-t-il ?

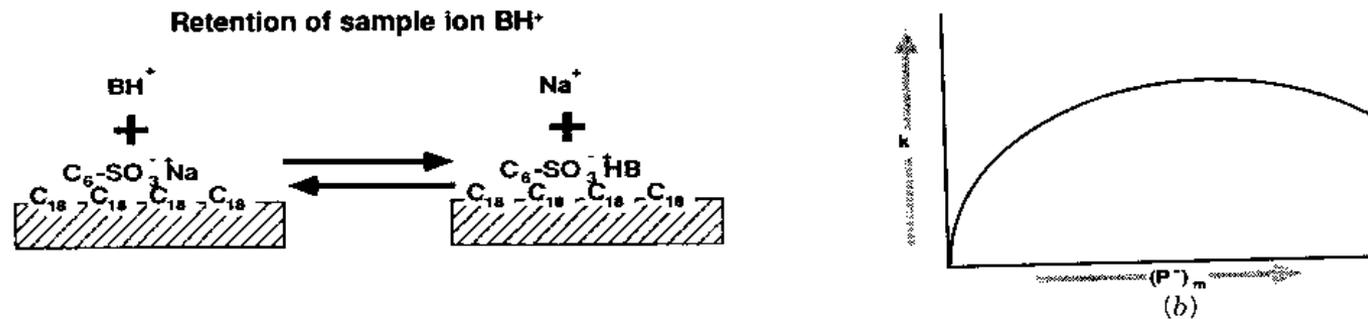
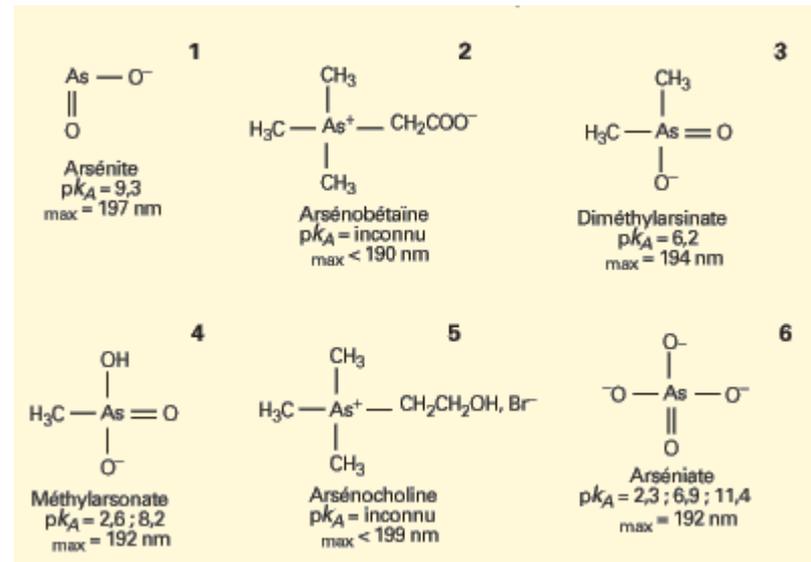
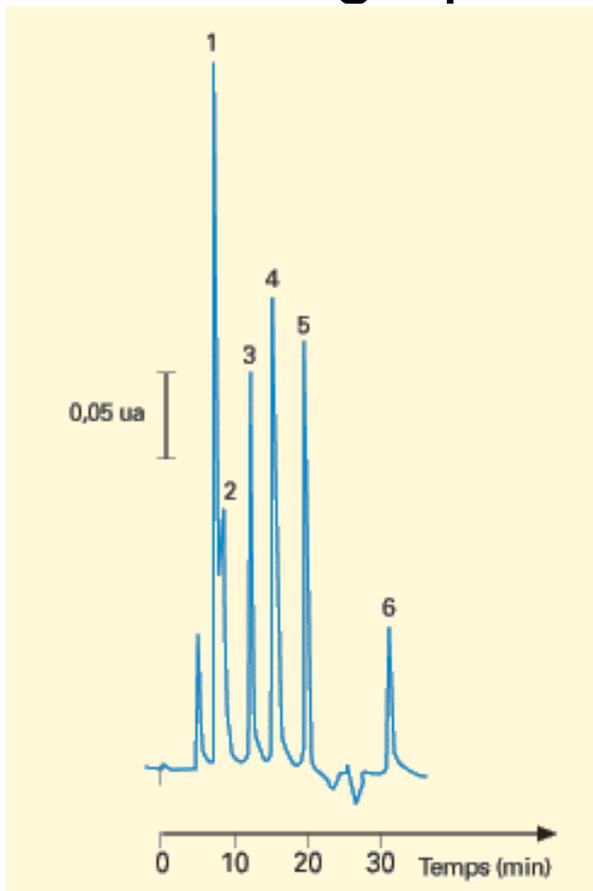


FIGURE 7.10 Effect of ion-pair reagent concentration on separation. (a) Sorption of the ion-pair reagent as a function of concentration for reagents of differing hydrophobicity (C_6 - and C_8 -sulfonates); (b) retention as a function of reagent concentration. See the text for details.

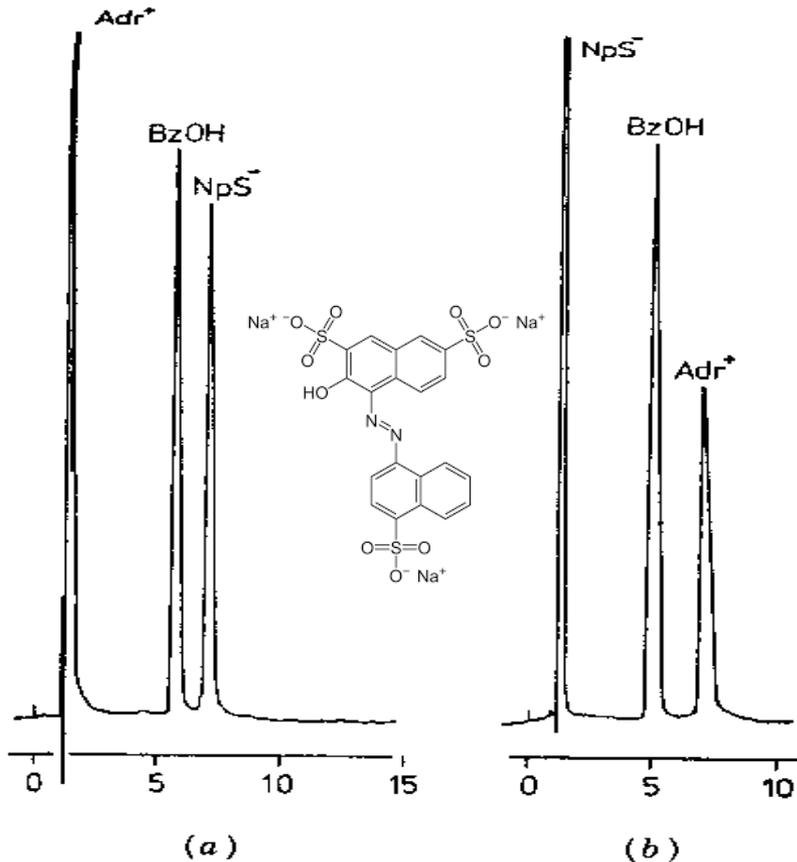
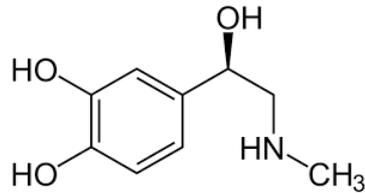
Chromatographie de paires d'ions

- Application:** Séparation d'anions arséniés par chromatographie de paires d'ions



Colonne : longueur : 25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm.
 Phase stationnaire : silice greffée octadécyle (Partisil ODS 3, 5 μm).
 Phase mobile : solution d'hydroxyde de tétrabutylammonium $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 pH = 7,3 (ajusté par addition d'acide phosphorique).
 Débit : $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.
 Détection UV à 190 nm.

Chromatographie de paires d'ions



Adr⁺ : adrenaline, BzOH alcool benzylique, NpS⁻ naphthalene sulfonate.

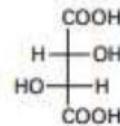
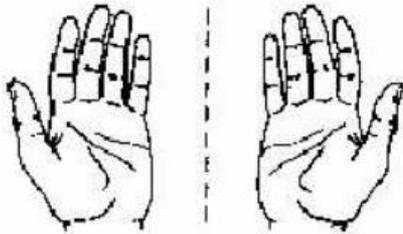
Colonne C18, tampon phosphate 20mM, pH6 + 20% méthanol.

(a) sans agent d'appariement d'ions
 (b) avec agent d'appariement d'ions 14mM octane sulfate.

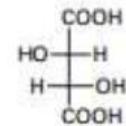
- **La chromatographie chirale**

Chiralité et énantiomères

- La chiralité constitue la propriété géométrique d'un objet (ou d'une molécule) de ne pas être superposable à son image dans un miroir.
- Exemples:



acide L-(+)-tartrique (naturel)



acide D-(-)-tartrique

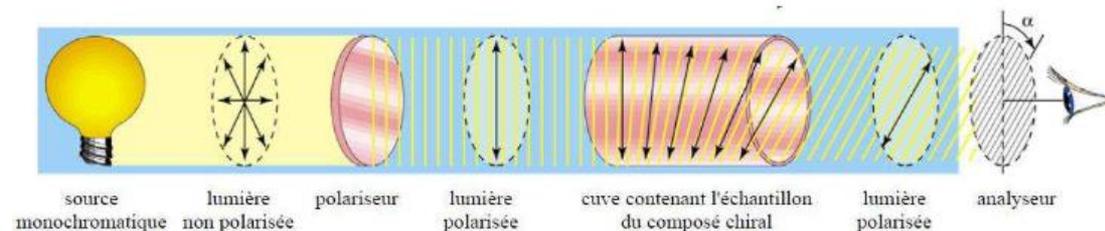
Les énantiomères: Caractéristiques et propriétés

- Définition de l'activité optique (ou pouvoir rotatoire)

Les molécules chirales induisent une rotation du plan de polarisation de la lumière. Cette rotation (**pouvoir rotatoire** α en degré) dépend de la concentration des molécules (c en g/100 mL), de la longueur du chemin parcouru par la lumière (l , en dm) et du **pouvoir rotatoire spécifique** de la substance énantiopure ($[\alpha]$). Si la substance n'est pas énantiopure, le pouvoir rotatif mesuré α_{obs} est directement proportionnel à l'excès énantiomérique. Si la valeur $[\alpha]$ est connue, l'excès énantiomérique peut être mesuré, mais la mesure n'est pas très précise. La valeur absolue de $[\alpha]$ est la même pour les deux énantiomères, mais le signe est opposé.

$$\alpha = \frac{c \cdot l \cdot [\alpha]}{100} \quad ee = \frac{\alpha_{\text{obs}} \cdot 100}{[\alpha]}$$

Après la traversée d'un «milieu optiquement actif » (exemple : un énantiomère), l'orientation de ce plan est modifiée d'un angle α .



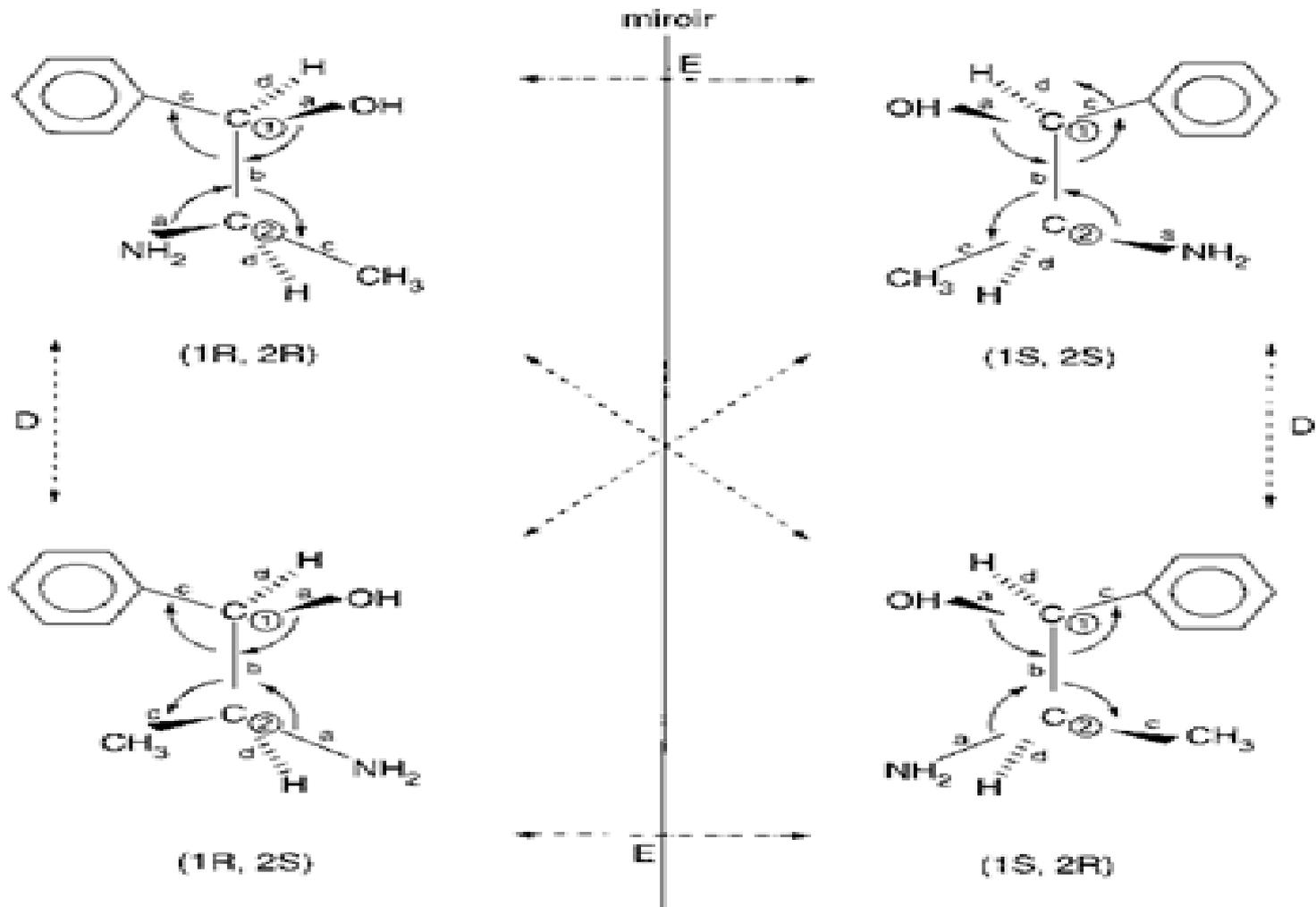
Les énantiomères: Caractéristiques et propriétés

Quelques propriétés physico-chimiques de l'acide tartrique

Composé	<i>TF</i> (°C)	Densité <i>d</i>	Solubilité (g/100 g)	$[\alpha]$ (°.dm ⁻¹ .g ⁻¹ .cm ³)
(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-tartrique	170	1,76	147	+12
(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-tartrique	170	1,76	147	-12

Deux énantiomères ont des activités optiques identiques en valeur absolue mais de signe opposé.

Enantiomère/Diastéréoisomère

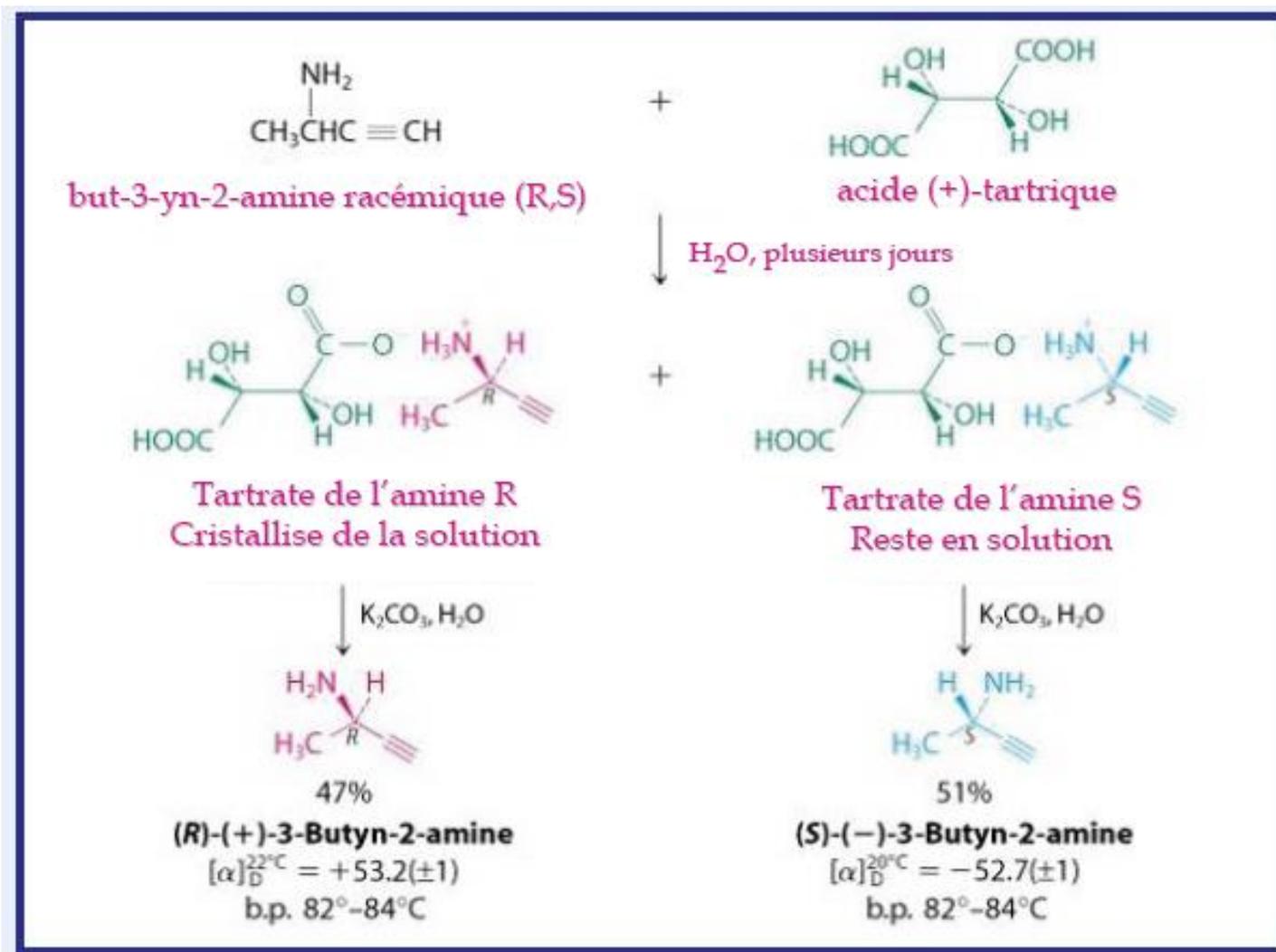


D ----- Couples de diastéréoisomères

E ----- Couples d'énantiomères

- **Résolution** de la but-3-yn-2-amine:

- **Auxiliaire chiral**: acide (+)-tartrique.
- Formation de sels **diastéréoisomères**; l'un cristallise, l'autre ne cristallise pas.



La thalidomide: importance de la chiralité

- Sédatif non barbiturique avec des propriétés anti-nauséuses retiré en 1961 à cause de ses effets secondaires tératogènes:

➤ <http://archives.radio-canada.ca/400d.asp?id=0-16-65-870>



(-)-(S)-Thalidomide



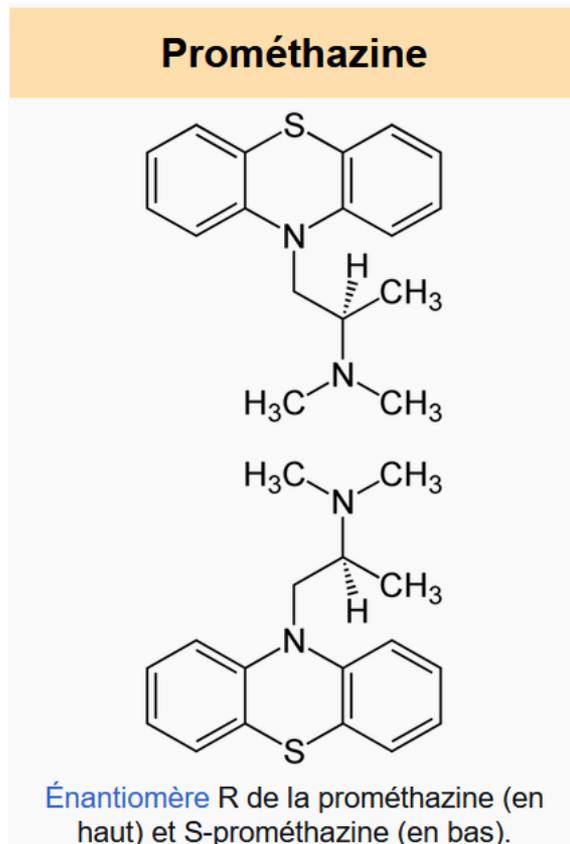
(+)-(R)-Thalidomide

- Vendue comme mélange racémique, *rac*-Thalidomide (Contergan®).

Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

- Les énantiomères présentent qualitativement et quantitativement la même activité.

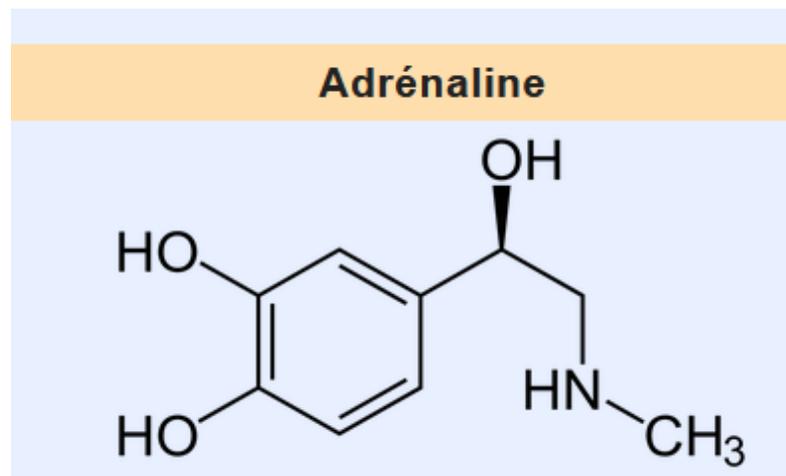
(Exemple: **Prométhazine** (+) et (-), Antihistaminiques H1)



Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

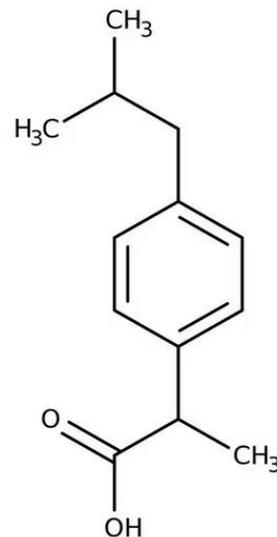
- Les énantiomères possèdent qualitativement le même type d'activité mais d'intensités différentes: Ils ont la même activité biologique mais l'affinité de fixation au récepteur est plus importante pour un des énantiomères, on parle donc d'interactions stéréosélectives

(Exemple : L'énantiomère (R) de **l'adrénaline** est plus vasoconstricteur que l'énantiomère (S))



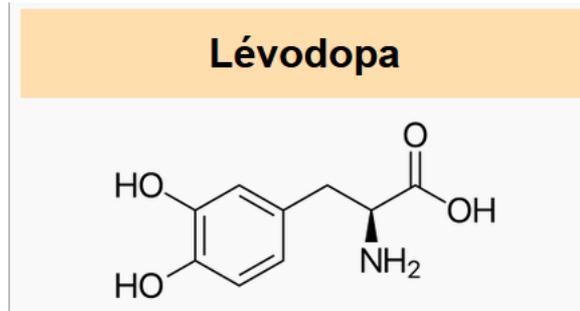
Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif (exemple: dans le cas de **l'ibuprofène**, l'action antalgique et antirhumatismale est présente exclusivement chez l'énantiomère (S), l'énantiomère (R) ne possède pas ces actions mais n'est pas toxique, d'où la commercialisation du mélange racémique.

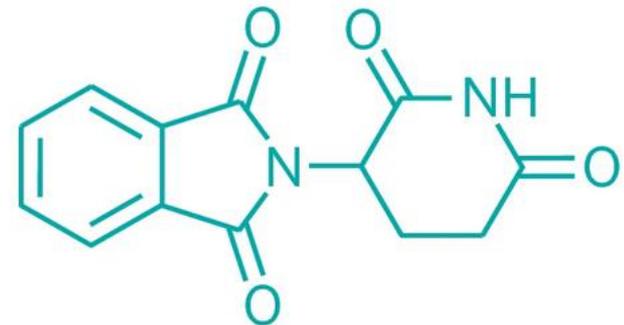


Relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament

- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique (exemple: dans le cas de la **lévodopa**, précurseur de la dopamine utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, seul l'énantiomère (S) est retenu car l'énantiomère (R) est toxique (risque d'agranulocytose),



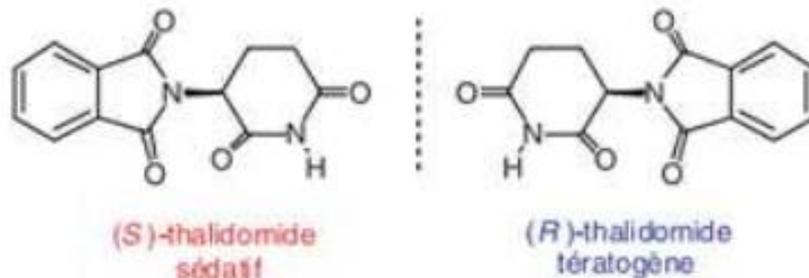
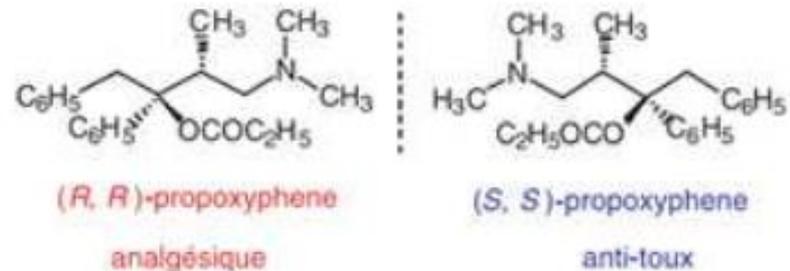
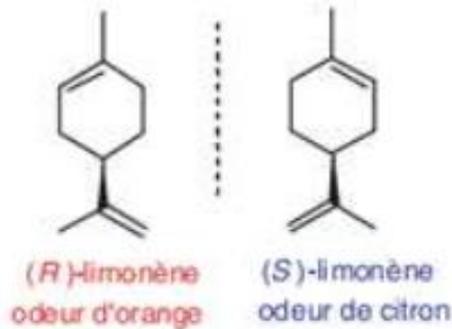
- Autre exemple: cas de la thalidomide.



Thalidomide

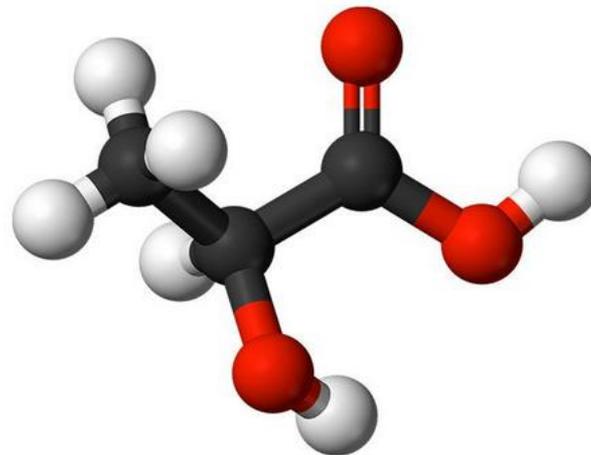
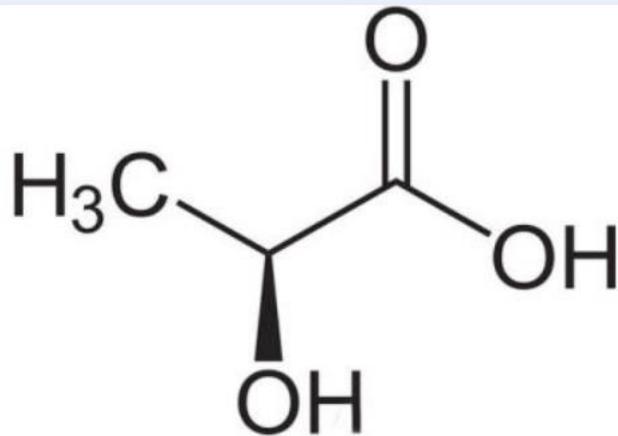
Propriétés pharmacologiques et activité biologique

- En effet, les activités biologiques de deux énantiomères peuvent être différentes



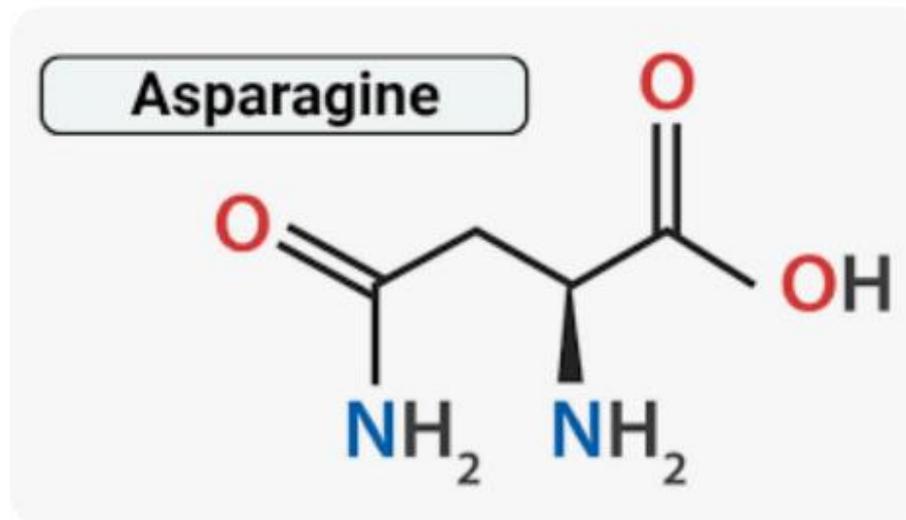
Conséquences de la chiralité

- L'acide (2R)-lactique est l'acide (2R)-2-hydroxypropanoïque, représenté sur l'image du haut. Il est *lévogyre* (-).
 - Ce composé a été découvert par Scheele dans **le lait** laissé longtemps à l'air (on dit que "le lait est tourné").
 - Son énantiomère, l'acide (2S)-lactique (image de droite) est *dextrogyre* (+). On le trouve **dans le sang**. Son accumulation dans les muscles, chez les sportifs soumis à un long effort est à l'origine des crampes.



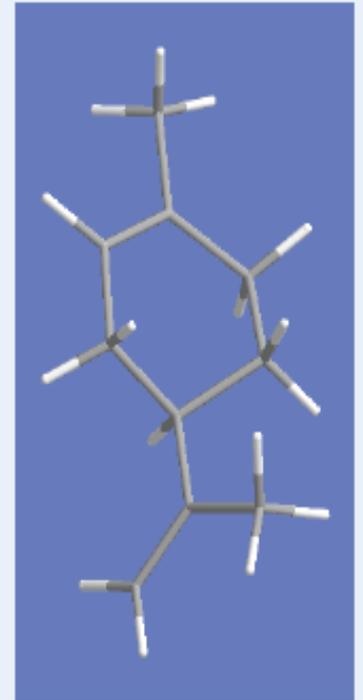
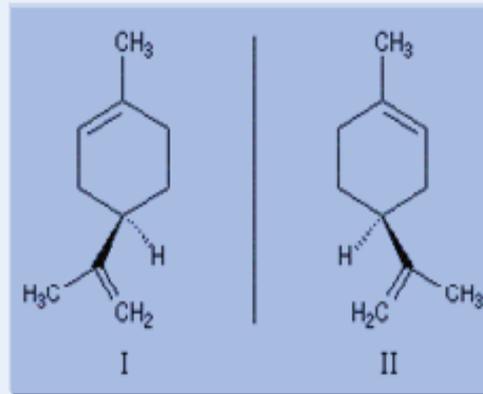
Conséquences de la chiralité

- La (S)-asparagine est représentée ci-dessous:
 - Elle se trouve à l'état naturel dans les jeunes asperges auxquelles elle confère **une saveur amère** caractéristique.
 - A. Piutti découvrit en 1886 que son énantiomère d'origine synthétique, la (R)-asparagine (II), possède un **goût sucré**.



Conséquences de la chiralité

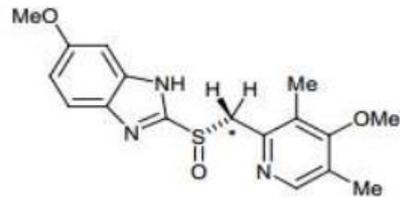
- Le limonène est constitué de deux énantiomères qui sont utilisés dans l'industrie des parfums :
 - Le (R)-limonène (image ci-contre) possède une **odeur d'orange**.
 - Le (S)-limonène a une **odeur de citron**.



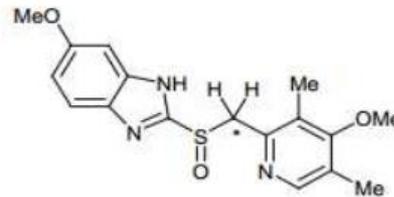
Le « chiral switch »

- Exemple:

L'énantiomère (S) de l'Oméprazole est plus efficace que l'Oméprazole (mélange racémique) en raison de son métabolisme hépatique, plus faible que celui de l'Oméprazole (mélange racémique).



(S)-enantiomer
Nexium



(RS)-racemate
Prilosec

Le « chiral switch »

Médicament énantio pur	Actions / Indications	Raisons de la commercialisation de l'énantio pur
L-dopa (Enantiomère R)	Maladie de Parkinson	Réduction des effets indésirables observés avec le médicament racémique (nausée, vomissements, anorexie, mouvements involontaires, granulocytopenie)
(S)-Kétamine (Enantiomère S)	Anesthésique	Enantiomère S plus actif et réduction des effets secondaires liés à l'énantio mère R (effets post-anesthésique : hallucinations, agitation)
Dexketaprofène (Enantiomère S)	Anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)	Action pharmacologique réside dans l'énantio mère S. Réduction de la dose administrée par rapport au mélange racémique

L'DOPA: Précurseur direct de la **dopamine**, utilisé dans le traitement de la **maladie de Parkinson**. La dopamine elle-même ne traverse pas la **barrière hémato-encéphalique**, mais la L-Dopa, oui.