

# La chromatographie d'affinité

## I. Définition et principe

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte (résine), sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinité sont utilisées :

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

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

## II. Les étapes d'une chromatographie d'affinité

### II.1 Etape de fixation

Le mélange de molécules contenant le composé à purifier est chargé (déposé) sur la colonne d'affinité. Seule la molécule présentant

une affinité pour la colonne sera retenue par l'effecteur greffé sur la phase stationnaire (**Figure :01**).

## II.2 Etape de purification

En continuant à faire passer du tampon (la phase mobile), toutes les molécules contaminantes sont éliminées et éluées (**Figure :01**).

## II.3 Etape d'élution

La molécule purifiée est décrochée de la colonne et est recueillie de l'éluât. Ceci se fait en exposant le complexe résine-molécules spécifiques à des conditions où l'interaction ligand-molécule spécifique est moins stable. Généralement, on modifie la composition du solvant pour diminuer l'affinité où on ajoute un ligand compétiteur. Ces dernières se détacheront alors de la résine, élueront dans le solvant de désorption et pourraient être récupérées (**Figure :01**).

**Remarque :** souvent, l'un des deux partenaires de l'interaction est qualifié de protéine P et l'autre de ligand L de cette protéine. L'association de P et de L forme le complexe PL :



La constante définissant cet équilibre est appelée constante d'association à l'équilibre ( **$K_a$** ) :

$$K_a = [PL]/[P] [L]$$

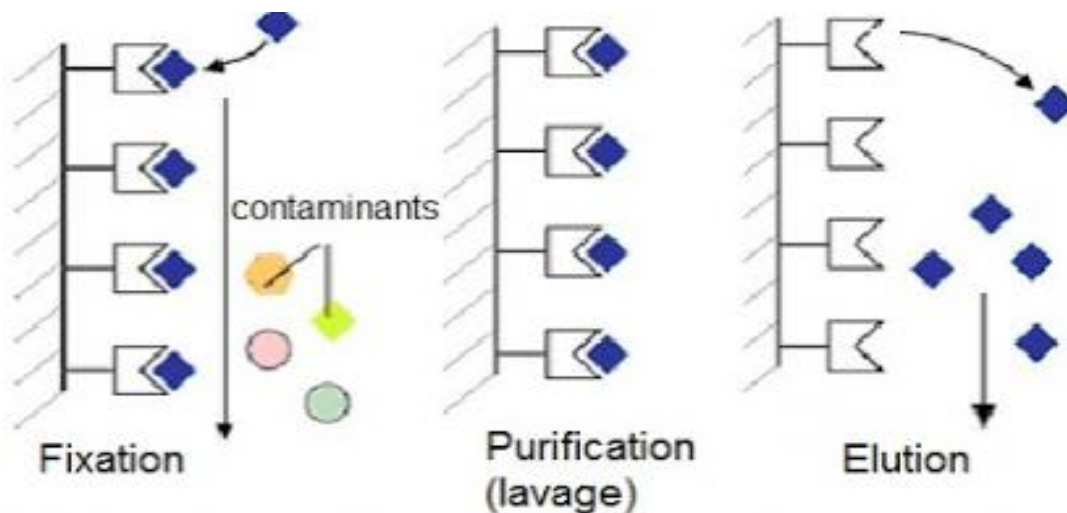
**[PL]** : concentration du complexe protéine-ligand ( c'est à dire le ligand lié à sa protéine), **[P]** : concentration de la protéine libre, **[L]** : concentration du ligand libre

$K_d$  : est la constante d'équilibre de dissociation et elle est égale à l'inverse de  $K_a$

$$K_d = 1/K_a$$

### III. La phase stationnaire (le gel d'affinité)

Est constituée d'un effecteur fixé par covalence à un support (carboxyméthylcellulose, séphadex, gel de polyacrylamide) par le biais d'un bras de fixation (spacer en anglais).



**Figure :01** Etape d'une chromatographie d'affinité